

INSTITUTO DE CIENCIAS BÁSICAS Y PRECLÍNICAS "VICTORIA DE GIRÓN"

Estudio comparativo de las técnicas de focalización isoeléctrica y electroforesis ácida en gel de almidón para la detección de deficientes de ALFA-1 antitripsina

Por las Lics.:

BARBARA BARRIOS GARCIA* e HILDA GRANDA IBARRA*

Barrios García, B.; H. Granda Ibarra. *Estudio comparativo de las técnicas de focalización isoeléctrica y electroforesis ácida en gel de almidón para la detección de deficientes de ALFA-1 antitripsina*. Rev Cub Ped 55: 4, 1983.

La metodología utilizada en la detección de deficientes de alfa-1 antitripsina ha sido uno de los puntos más discutidos, pues existen técnicas cuantitativas con desventajas de reproducibilidad y diagnóstico efectivo. Las técnicas cualitativas más usadas son la electroforesis ácida en gel de almidón y la focalización isoeléctrica en geles de poliacrilamida. En este trabajo realizamos un estudio comparativo sobre la eficiencia, reproducibilidad y costo de ambas técnicas. Proponemos el uso de la focalización isoeléctrica como técnica que cumple los requisitos para estudios sistemáticos en el laboratorio.

INTRODUCCION

La detección de deficientes de alfa-1-antitripsina ha sido realizada en el mundo mediante diferentes técnicas cualitativas y cuantitativas; algunas de éstas presentan desventajas en su confiabilidad diagnóstica y su reproducibilidad, por ejemplo, las de este tipo que usan ant sueros comerciales monoespecíficos, los cuales presentan contaminaciones con artefactos y fallan en la detección de fenotipos deficientes como el MP, MS, FZ y MZ, debido a que esta proteína presenta ser de fase reactante aguda, lo que determina un incremento de concentración en el suero ante la ingestión de diferentes fármacos, como vacuna tifoidea, anticonceptivos orales o en estados de inflamación.¹

Las técnicas cualitativas más usadas en la detección de deficientes de esta proteína son la electroforesis ácida en gel de almidón y en la última década la focalización isoeléctrica en geles de poliacrilamida.^{2,3}

* Licenciada en Ciencias Biológicas. Profesora asistente. Laboratorio de Genética Médica. ICBP "Victoria de Girón."

En nuestro trabajo nos proponemos hacer un estudio comparativo respecto a la eficiencia, reproducibilidad y costo de ambas técnicas, con vista a la definición de una técnica sencilla, rápida y económica para la detección de deficientes de esta proteína, que se emplee como técnica sistemática en el laboratorio.

MATERIALES Y METODOS

Se analizaron 1 882 y 247 muestras de donantes voluntarios del banco de sangre provincial de Ciudad de La Habana, por la técnica de electroforesis ácida en gel de almidón y por focalización isoelectrica en geles de poli-acrilamida.

La electroforesis ácida en gel de almidón utiliza un gel de almidón hidrolizado al 14%. Las soluciones amortiguadoras y la solución usada como madre del gel se presentan en el cuadro I.

CUADRO I

COMPOSICION DE LOS AMORTIGUADORES DE LA ELECTROFORESIS ACIDA EN GEL DE ALMIDON

Amortiguadores cátodo		Amortiguadores anodo		Amortiguadores Stock gel	
Acido bórico	9,25 g	Acido cítrico	16,7 g	Acido cítrico	25 g
NaDH	3,00 g	PO ₄ HNa ₂	12,5 g	Tris	23 g
1 litro H ₂ O		1 litro H ₂ O		1 litro M ₂ O	
pH 9		pH 4,5		pH 4,8	

La electroforesis duró 6 horas a voltaje constante de 200 volts por centímetro; la corrida fue terminada cuando la línea borato migró 9 cm por encima de la línea de inserción de las muestras.

En cada corrida se analizaron 10 muestras de suero obtenidas de sangre total sin anticoagulante, centrifugada a 3 200 rpm durante 1 minuto; el suero se almacenó a -20 grados centígrados hasta su análisis.

Al finalizar la corrida el gel fue cortado longitudinalmente con un hilo quirúrgico y la parte inferior fue embebida en la solución colorante formada por negro amido 2B al 1% en solución de ácido acético al 10%. La decoloración se realizó en solución de metanol: agua: ácido acético en proporciones 5:5:1.²

La focalización isoelectrica en poli-acrilamida se realizó según las técnicas descritas por *Arnaud*, 1975³ con modificaciones de *Menéndez*, 1980 (comunicación personal).

El gel se preparó con las siguientes soluciones:

Acrilamida 29,1%	2,1	ml
Bisacrilamida 0,9%	2,1	ml
Sucrosa 22,5%	4,9	ml
Anfólitos pH 4-6	0,5	ml
Tetraetilendiamina	0,02	ml
Amonio persulfato 1%	0,35	ml

Los 10 mililitros de gel fueron vertidos en una cubeta de gelificación formada por una placa de cristal de $260 \times 120 \times 10$ mm, cubierta por un papel celofán humedecido con un molde en U de $260 \times 120 \times 0,5$ mm y sobre éstas una placa de plástico de $260 \times 120 \times 3$ mm, todas unidas por presillas de acero. El gel se dejó gelificar durante 10 minutos a temperatura ambiente y 10 minutos a 4 grados centígrados.

Después de gelificado se eliminaron la placa de plástico y el molde en U y el gel se sometió a una precorrida durante 30 minutos a corriente constante de 30 miliamperes como máximo; después se colocó una tira de goma de silicona horadada; en cada hueco se colocaron 3 micro-litros de suero; se analizaron 52 muestras en cada corrida.

La electroforesis duró 3 horas, a voltaje constante de 100 volts en la placa durante la primera hora y después de 250 volts las dos horas restantes.

Al finalizar la corrida el gel fue fijado en solución de ácido Tricloroacético al 10% durante toda la noche; después fue embebido en solución de ácido acético glacial al 10% durante 30 minutos y coloreado en solución de Coomasie azul brillante R-250 al 0,3% en solución de etanol: agua: ácido acético en proporciones de 1: 1: D, 48; la decoloración se llevó a cabo en solución de etanol: agua: ácido acético en proporciones de 6: 3: 1 durante 2 horas.

El diagnóstico de las bandas se realizó mediante los proteinogramas esquemáticos que se muestran en las figuras 1 y 2.

Los resultados obtenidos en los estudios por ambas técnicas se muestran en las figuras 3 y 4.

Las pruebas estadísticas para la comparación de los resultados fueron la prueba de chi cuadrado y la prueba de homogeneidad mediante el estadígrafo chi cuadrado.

RESULTADOS

De las 1 082 muestras estudiadas por electroforesis ácida en gel de almidón (EAGA), se obtuvieron 1 001 sujetos con fenotipo MM; 25 sujetos con

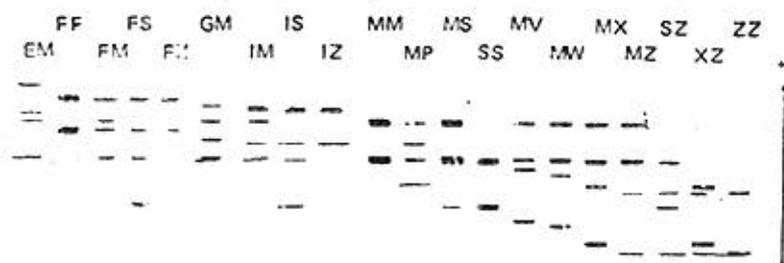


Figura 1

Proteinograma esquemático de las bandas de alfa-1-antitripsina mediante la técnica de electroforesis ácida en gel de almidón.

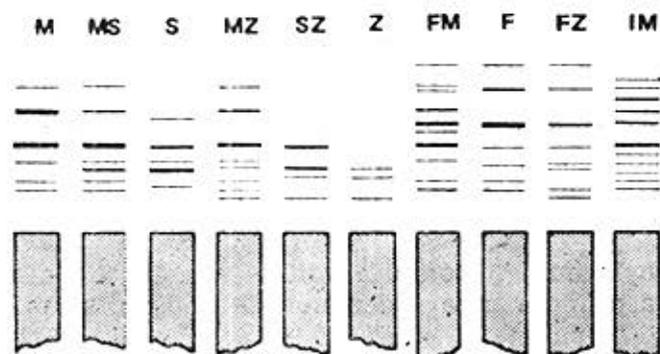


Figura 2

Proteinograma esquemático de las bandas de alfa-1-antitripsina obtenidas por focalización isoeléctrica.

fenotipo MS; 35 sujetos MZ; 11 sujetos SS; 6 sujetos ZZ y 4 variantes raras: 1 MX; 2 FM y 1 FZ.

Las frecuencias fenotípicas obtenidas de este análisis fueron: 2,31% para el fenotipo MS; 3,23% para el MZ; 1,01% para el SS; 0,55% para el ZZ; 0,18% para el FM y 0,09% para el FZ y MX respectivamente (Cuadro II).

De las 247 muestras estudiadas por focalización isoeléctrica se obtuvieron los siguientes resultados: 235 sujetos con fenotipo MM; 6 sujetos MZ; 5 sujetos MS y 1 sujeto ZZ. No se obtuvieron variantes raras.

Las frecuencias fenotípicas obtenidas de los valores anteriores fueron: 95,14% para el fenotipo MM; 2,02% para el MS; 2,42% para el MZ y 0,40% para el ZZ (Cuadro III).



Figura 3

Resultados obtenidos por electroforesis ácida en gel de almidón. De izquierda a derecha se muestra proteínograma de fenotipos MM, MZ, MZ, ZZ, y MS.

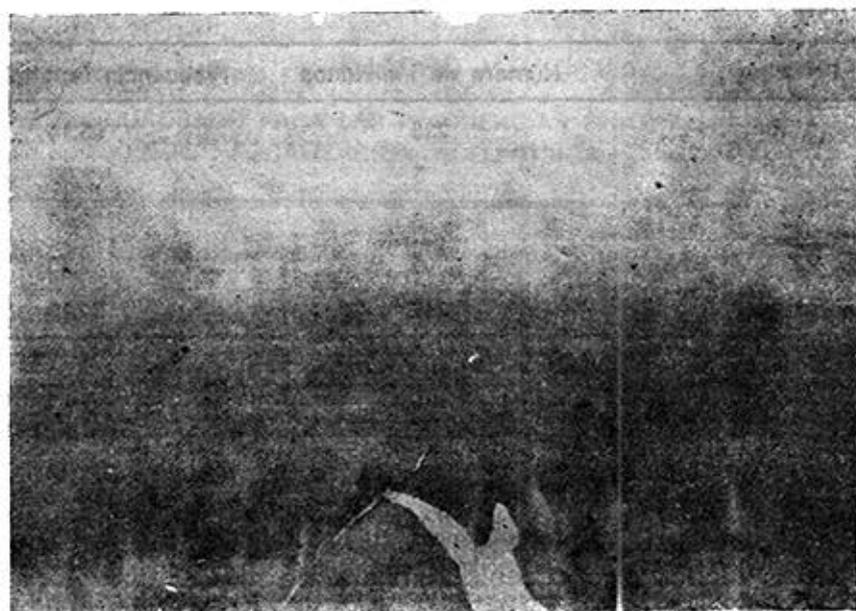


Figura 4

Resultados obtenidos en la focalización isoeléctrica. De izquierda a derecha se muestran fenotipos MM, ZZ, MM, MZ, MM, MM, MM, MM, MZ, MM, MM, MM, MM y MS.

CUADRO II

FRECUENCIA FENOTÍPICAS OBTENIDAS POR ELECTROFORESIS ACIDA
EN GEL DE ALMIDON

Fenotipo	Número de individuos	Frecuencia fenotípica (%)
MM	1 001	92,51
MS	25	2,31
MZ	35	3,23
SS	11	1,01
ZZ	6	0,55
FZ	1	0,09
MX	1	0,09
FM	2	0,18
Total	1 082	99,97

CUADRO III

FRECUENCIAS FENOTÍPICAS OBTENIDAS POR FOCALIZACION ISOELECTRICA

Fenotipo	Número de individuos	Frecuencia fenotípica (%)
MM	235	95,14
MS	5	2,02
MZ	6	2,42
ZZ	1	0,40
Total	247	99,98

El cálculo de chi cuadrado para comparar las frecuencias fenotípicas observadas y esperadas de la muestra analizada por EAGA, dio resultados significativos para todos los fenotipos (cuadro IV).

El cálculo de chi cuadrado para comparar las frecuencias fenotípicas observadas y esperadas de la muestra analizada por focalización isoeléctrica dio resultados significativos debido solamente al fenotipo ZZ aparecido (cuadro V).

La prueba de homogeneidad mediante el estadígrafo chi cuadrado con vista a comparar los resultados obtenidos en cada estudio y definir la composición homogénea de las muestras, no dio resultados significativos (cuadro VI).

CUADRO IV

CALCULO DE CHI-CUADRADO PARA LAS FRECUENCIAS FENOTIPICAS OBTENIDAS POR ELECTROFORESIS ACIDA EN GEL DE ALMIDON

Genes	Frecuencia génica	Fenotipo	Número de individuos observados	Número de individuos esperado
M	0,9521	MM	1 001	977
Z	0,0220	MZ	35	45**
S	0,0210	MS	25	43**
F	0,0014	SS	11	0,47**
X	0,0004	ZZ	6	0,51**

** Altamente significativo

$$X^2 = 5,991$$

* Significativo

$$P = 0,05$$

$$X^2 = 306,330^{**}$$

2 GL

CUADRO V

CALCULO DE CHI-CUADRADO PARA LAS FRECUENCIAS FENOTIPICAS OBTENIDAS POR FOCALIZACION ISOELECTRICA

Genes	Frecuencia génica	Fenotipo	Número de individuos observados	Número de individuos esperados
M	0,973	MM	235	233
S	0,010	MS	5	4
Z	0,016	MZ	6	7
		ZZ	1	0,02

** Altamente significativo

$$X^2 = 5,991 \quad X_2 = 0,3966$$

* Significativo

$$X^2 = 18,5875^{**}$$

$$P = 0,05$$

2 GL

(Sin tener en cuenta el fenotipo ZZ)

CUADRO VI

TEST DE HOMOGENEIDAD A TRAVES DE ESTADIGRAFO CHI-CUADRADO PARA
COMPARAR LAS FRECUENCIAS FENOTIPICAS OBTENIDAS EN LA MUESTRA DE
CIUDAD HABANA POR ELECTROFORESIS ACIDA EN GEL DE ALMIDON Y POR
FOCALIZACION ISOELECTRICA

Fenotipo	Población No. 1		Población No. 2		Total
	Observado	Esperado	Observado	Esperado	
MM	1 001	1006,28	235	229,71	1236
MS	25	24,42	5	5,37	30
MZ	35	33,37	6	7,62	41
ZZ	6	5,69	1	1,30	7
SS	11	8,95	0	2,04	11
FM	2	1,62	0	0,37	2
FZ	1	0,81	0	0,18	1
MX	1	0,81	0	0,18	1
Total	1 082		247		1329

$$X^2 = 4,5502$$

$$X^2 = 14,07$$

$$P = 0,05$$

7 g.l

DISCUSION

El valor no significativo de la prueba de homogeneidad realizada para comparar las frecuencias fenotípicas observadas y esperadas obtenidas por ambas técnicas, nos confirma la existencia de homogeneidad entre ambas muestras, lo cual indica que las diferencias que existen en los valores obtenidos en cada una de ellas se deben al test biológico usado en el análisis de las mismas y no en la composición de éstas en sí.

Los resultados significativos obtenidos en el chi cuadrado aplicado a las muestras estudiadas por EAGA con respecto a todos los fenotipos, se debe a que esta técnica basa su diagnóstico principalmente en la intensidad de las bandas después de reveladas. La heterogeneidad de esta proteína en electroforesis define la aparición de ocho bandas diferentes en posición, pero la EACA sólo permite la observación adecuada de tres de ellas, enmascarando en el proteinograma las restantes; esto trae consigo errores diagnósticos, por otro lado la intensidad de las bandas principales para la definición de los fenotipos deficientes es un factor muy subjetivo, puesto que en nuestro trabajo tres observadores diferentes participaron en el diagnóstico de los fenotipos y en todos los casos de fenotipos defi-

cientes se diagnosticaron un menor número de éstos que los que se esperaban. Esto demuestra una desventaja en esta técnica.

El desarrollo tecnológico de la EAGA resulta trabajoso y poco reproducible, además la calidad del almidón hidrolizado utilizado en las electroforesis es un factor de gran importancia, pero la calidad varía según el almidón de papas usado como base; el tiempo de hidrólisis y el envejecimiento del mismo son factores difíciles de estandarizar a gran escala. Además, entre las explicaciones ofrecidas, la separación de las bandas de esta proteína en gel de almidón, está la dada por el hecho de que se postula teóricamente que la proteína hace un complejo con el ion borato que permite la separación, así a las desventajas anteriores se une la calidad del reactivo ácido bórico usado en el desarrollo de la técnica.

Esta técnica analiza solamente 10 muestras por corrida, lo que implica un costo aproximado de más de 50 centavos dólar por muestra.

En el cálculo de chi cuadrado realizado a la muestra analizada por focalización isoelectrica, vemos que dio resultados significativos imputables solamente a la aparición inesperada de un sujeto ZZ en la muestra estudiada; al realizarse el cálculo obviando a este sujeto el chi cuadrado pierde su significación, quedando dentro de la probabilidad los valores obtenidos. Este hallazgo resultó ser un hecho puramente casual, por lo que podemos concluir que la focalización isoelectrica presenta una alta eficiencia en la detección de deficientes de esta proteína.

La focalización isoelectrica es una técnica que se ha extendido mucho en la última década en el laboratorio químico debido a su fácil manejo, alta reproducibilidad y eficiencia, por lo que es el diagnóstico de los fenotipos realizados por la posición de las bandas, lo cual facilita el diagnóstico adecuado (figura 1).

El costo de la focalización isoelectrica resulta, en las técnicas usadas hasta el momento, algo elevado por el uso de los anfólitos, sustancias capaces de separar esta proteína; son caras pero con las modificaciones descritas por nosotros se disminuye la cantidad de anfólitos y con ello el costo de la técnica se rebaja a 1 centavo dólar por muestra analizada.

CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos en la comparación de las técnicas cualitativas analizadas, podemos concluir que la focalización isoelectrica cumple todos los requisitos de reproducibilidad, bajo costo y eficiencia, para ser considerada como técnica sistemática en el laboratorio en la detección masiva de deficientes de alfa-1-antitripsina.

Agradecimiento

Deseamos agradecer la colaboración brindada en este trabajo a:

- 1) Banco de sangre provincial de Ciudad de La Habana por la recogida de las muestras.
- 2) Personal técnico del laboratorio de genética médica del ICBP "Victoria de Girón".

SUMMARY

Barrios García, B.; H. Granda Ibarra. *Comparative study of isoelectrofocusing and acid starch gel electrophoresis for detection of alpha-antitrypsin deficiencies.* Rev Cub Ped 55: 4, 1983.

Methodology used for detection of alpha-antitrypsin deficiencies has been one of the most discussed points, since there are quantitative techniques with disadvantages for reproductiveness and effective diagnosis. Acid starch gel electrophoresis and isoelectrofocusing in polyacrylamide gels are the qualitative techniques most used. In this paper a comparative study on efficiency, reproductiveness, and expense of both techniques, is carried out. We propose the employment of isoelectrofocusing as a technique fulfilling the requirements for systematic studies at laboratory.

RÉSUMÉ

Barrios García, B.; H. Granda Ibarra. *Etude comparative des techniques de focalisation isoélectrique et d'électrophorèse acide sur gel d'amidon pour le dépistage de déficients en alpha-1-antitrypsine.* Rev Cub Ped 55: 4, 1983.

La méthodologie utilisée dans le dépistage de déficients en alpha-1-antitrypsine a été l'un des points les plus discutés, car il existe des techniques quantitatives avec des inconvénients de reproductibilité et diagnostic efficace. Les techniques qualitatives les plus utilisées sont l'électrophorèse acide sur gel d'amidon et la focalisation isoélectrique sur des gels de polyacrylamides. Dans ce travail les auteurs font une étude comparative à propos de l'efficacité, la reproductibilité et le coût des deux techniques. Ils proposent l'emploi de la focalisation isoélectrique comme technique qui remplit les conditions nécessaires pour des études systématiques dans le laboratoire.

BIBLIOGRAFIA

1. Mittman, C.; T. Barbela. J. Lieberman: Antitrypsin deficiency and abnormal protease inhibitor phenotypes. Arch Environ Health 27: 201, 1973.
2. Arnaud, Ph; P. Cretssel: The detection of alpha-1-antitrypsin variants (Pi System) by analytical thin layer electrofocusing in Polyacrylamide Gel. Appic Note LKB, 1975.
3. Fagerhol, MK; M. Braenke: Classification of human serum protein after starch gel electrophoresis. Acta Pathol Microbiol Scand 68: 434, 1966.
4. Barrios, B.; H. Granda; ... Beredero: La alfa-1-antitripsina en Cuba. Rev Cub Med 111: 1, 1977.

Recibido: 27 de julio de 1982.

Aprobado: 4 de noviembre de 1982.

Lic. Bárbara García Barbosa
ICBP "Victoria de Girón"
Calle 146 No. 3102 esq. Ave. 31
Playa, Ciudad de La Habana.