

Perfil proteico en líquido cefalorraquídeo. Aporte al diagnóstico de esclerosis múltiple*

- Sandra Viviana Pujadas¹, Leticia Bibiana Madalena¹, Paula Gabriela Murga¹,
María Laura Facio¹, Mariel Emilce Alejandre¹, Pablo Diego Bresciani¹,
Susana Alicia Fraind¹, Marco Antonio Pizzolato²

-
1. Bioquímicos.
 2. Doctor en Bioquímica.

* Laboratorio de Proteínas, Departamento de Bioquímica Clínica, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Hospital de Clínicas "José de San Martín", Universidad de Buenos Aires.

Resumen

El presente estudio permitió determinar dos perfiles proteicos, mediante SDS-PAGE con tinción argéntica, en 104 líquidos cefalorraquídeos (LCR) de pacientes con diversas patologías. En el perfil A (PA) se observaron bandas de peso molecular (PM) ≥ 67 KDa. En el perfil B (PB) se observaron, además, bandas correspondientes a proteínas de bajo PM (20-25 KDa y 13 KDa). Se analizó la presencia de bandas oligoclonales (BO) mediante electroforesis y electroinmunofijación en acetato de celulosa con tinción argéntica, sin concentración previa. El análisis estadístico estableció una asociación entre la presencia de PB y esclerosis múltiple (EM) ($p < 0,0001$) y la presencia de BO y EM ($p < 0,001$) comparada con el resto de las neuropatías. Dentro del grupo de pacientes con PB se observó una asociación significativa entre la presencia de BO y el diagnóstico de EM ($p < 0,05$). Tres pacientes sin EM presentaron BO positivas. El perfil proteico y la presencia de BO fueron útiles como herramientas diagnósticas adicionales para definir a la población de pacientes con EM. La utilización de ambas determinaciones fortalecería el aporte del Laboratorio al diagnóstico de EM, al evaluar dos eventos patológicos complementarios, la síntesis local de IgG (BO) y la destrucción axonal con liberación de proteínas de origen cerebral (PB).

Palabras clave: esclerosis múltiple * bandas oligoclonales * líquido cefalorraquídeo * proteínas derivadas de cerebro * cistatina C.

Summary

PROTEIN PROFILE IN CEREBROSPINAL FLUID. CONTRIBUTION TO THE DIAGNOSIS OF MULTIPLE SCLEROSIS

The present work allowed us to determine two protein profiles in 104 non concentrated cerebrospinal fluid (CSF) from patients with different diseases by SDS-PAGE with silver stain. In pattern A (PA) bands of molecular weight (MW) ≥ 67 KDa were observed. In pattern B (PB) bands corresponding to proteins of low MW (20-25 KDa and 13 KDa) were also observed. The presence of oligoclonal bands (OB) has been analyzed by immunofixation with

Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana

Incorporada al Chemical Abstract Service.

Código bibliográfico: ABCLDL.

ISSN 0325-2957

silver stain. An association between the presence of PB and multiple sclerosis (MS) ($p < 0.0001$) and the presence of OB and MS ($p < 0.001$) was established by statistical analysis. An association between OB and MS diagnosis was found ($p < 0.05$) in the group of patients with PB. Three patients without MS presented positive OB. The protein profile and the presence of OB have been useful as an additional diagnostic tool to define patients population with MS. The use of both determinations would support the contribution of the laboratory to MS diagnosis, evaluating two pathological events: the local synthesis of IgG (OB) and the axonal destruction with release of proteins from brain (PB).

Key words: *multiple sclerosis * oligoclonal bands * cerebrospinal fluid * derived brain proteins * cystatin C.*

Introducción

Numerosas enfermedades neurológicas presentan cuadros clínicos similares, independientemente de la causa desencadenante, involucrando mecanismos fisiopatológicos diferentes, como por ejemplo: a) las enfermedades mediadas inmunológicamente (Miastenia Gravis, lupus del sistema nervioso central, síndromes paraneoplásicos, esclerosis múltiple y síndrome de Guillain Barré) y b) enfermedades infecciosas del sistema nervioso central (SNC) tales como meningitis –en particular la causada por micobacterias–, encefalitis y neurosífilis (1). Algunas de ellas se caracterizan por comprometer la estructura axonal o las células formadoras de mielina, afectando la síntesis o el mantenimiento de la vaina de mielina. Es por ello que se las designa como enfermedades desmielinizantes siendo éste el hallazgo más sobresaliente (2).

La esclerosis múltiple (EM) es una enfermedad del SNC de etiología desconocida caracterizada por inflamación, desmielinización, degeneración axonal y gliosis. Numerosas evidencias apoyan la hipótesis de que la autoinmunidad participa en su desarrollo (3). Según los criterios de diagnóstico de Poser, basados fundamentalmente en la clínica del paciente y el análisis de los síntomas presentes en los brotes y/o remisiones, se la clasifica como definida, probable y posible (4). En el año 2001, Mc Donald y colaboradores, en una reevaluación de las guías para el diagnóstico de EM, concluyeron que un diagnóstico basado puramente en la clínica sólo es posible si hay evidencia objetiva de lesiones separadas en tiempo y espacio. Si la presentación clínica no permite el diagnóstico, es necesario recurrir a estudios por imágenes (resonancia magnética), al análisis del líquido cefalorraquídeo (LCR) y a la evaluación de los potenciales evocados visuales (5).

El hallazgo más común en el LCR de pacientes con EM, es la presencia de síntesis intratecal de IgG con un perfil oligoclonal, que se determina a través de procedimientos electroforéticos. Sin embargo, la detección

de bandas oligoclonales (BO) no es exclusiva de la EM sino que también puede estar presente en enfermedades infecciosas o inflamatorias del SNC. Las BO aparecen en el 95% de los pacientes con diagnóstico de EM definida, evaluadas por isoelectroenfoque (IEE) (6).

Un 20% de las proteínas halladas en LCR son predominantemente derivadas de cerebro, pero raramente cerebro-específicas. Se postula que estas proteínas derivadas de cerebro (PDC) brindan información importante acerca del sitio de lesión y del proceso patológico involucrado. Dada la alta concentración de estas PDC en LCR, comparada con la del suero, la fracción sérica se considera prácticamente despreciable. Las PDC pueden agruparse como: a) proteínas derivadas de neuronas y células de la glía tales como la proteína tau (PM 55-74 KDa), la S100 B (PM 21 KDa), la enolasa neuronal específica (NSE) (PM 78 KDa); y b) proteínas originadas en leptomeninges como la β -trace (PM 25 KDa) y la cistatina C con PM 13,3 KDa (7).

El estudio cuantitativo de la S100 B y de la NSE ha sido propuesto en los últimos años como un buen biomarcador de daño del SNC complementando a los métodos por imágenes, pues indicarían el daño en determinadas estructuras (8).

Si bien algunos trabajos han descripto una baja concentración de cistatina C como marcador de EM, otros autores, sin embargo, no han encontrado diferencias significativas en ese sentido (9).

El objetivo del presente estudio fue investigar la existencia de un perfil de PDC, según su PM en LCR sin concentrar, en pacientes con diversas neuropatías y, por otro lado, determinar la asociación entre el mencionado perfil proteico y la presencia de BO en pacientes con diagnóstico de EM.

Materiales y Métodos

Se analizaron 104 muestras de LCR procedentes de los servicios de Neurología, Clínica Médica, Pediatría

y Terapia Intensiva del Hospital de Clínicas José de San Martín. Se midió la proteinorraquia con el método de Bradford (10). La investigación e identificación de las BO se realizó mediante electroforesis en acetato de celulosa, con posterior electroinmunofijación con antisuero monoespecífico anti IgG (Kallestad, Austin, Texas, USA) revelada con tinción argéntica y sin concentración previa de las muestras (11). Se determinó el PM mediante electroforesis en gel de poliacrilamida al 12% y dodecil sulfato de sodio al 0,1% (SDS-PAGE) del LCR sin concentrar, con tinción argéntica (12). Se realizó la identificación inmunológica mediante la técnica de Western-Blot con antisuero monoespecífico anti-cistatina C (Dako, Glostrup, Denmark) (13). En la evaluación de los resultados se utilizó el *test* de independencia de variables (*Test* de la G).

Resultados

Los valores de proteinorraquia estuvieron comprendidos entre 0,01 g/L y 2,60 g/L, con una media de 0,47 g/L y una mediana de 0,40 g/L.

Los datos obtenidos permitieron definir dos perfiles proteicos. En el perfil denominado A (PA) se observaron bandas de PM ≥ 67 KDa. En el perfil denominado B (PB) se observaron, además de las bandas correspondientes al patrón anterior, bandas correspondientes a proteínas de bajo PM (20-25 KDa y 13 KDa). Se realizó la identificación inmunológica donde se observó que la banda presente en 13 KDa correspondía a cistatina C. Es altamente probable que las bandas de PM 21 y 25 KDa correspondan a la S-100 B y a la β -trace, respectivamente, de acuerdo a la concentración reportada para las mismas en LCR (7) (Fig. 1).

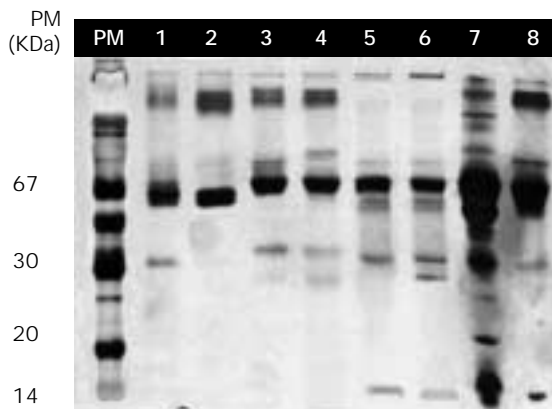


Figura 1. SDS-PAGE de LCR sin concentrar con tinción argéntica.

Patrón A (60,6%): bandas con Peso Molecular ≥ 67 Kda (calles 1 a 4).
 Patrón B (39,4%): con bandas adicionales a 13 y 20 Kda (calles 5 a 8).

Se halló el PA en un 60,6% de las muestras, mientras que un 39,4% presentó PB. El análisis estadístico mediante un *test* de independencia demuestra que el perfil proteico hallado es altamente dependiente de la patología del paciente ($p < 0,0001$), es decir, que existe una asociación entre el cuadro de EM y el PB, diferente del resto de las neuropatías (Fig. 2).

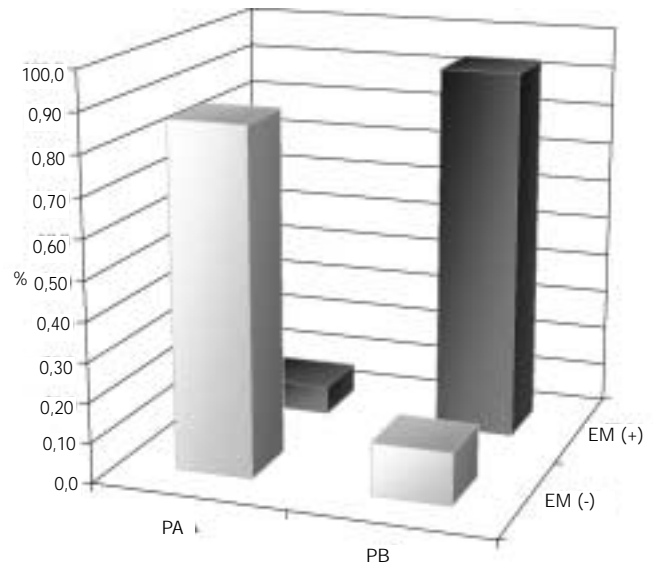


Figura 2. Análisis de distribución de frecuencia de 104 muestras de LCR.

PA 60,6%; PB 39,4%.

Se encontró una asociación entre EM y PB $p < 0,0001$.

EM: esclerosis múltiple; PA: Patrón A; PB: Patrón B.

Se investigó la presencia de BO en 80 muestras, que fueron clasificadas de acuerdo al perfil proteico en SDS-PAGE y a la presencia o no de oligoclonalidad. En la Tabla I se observan las características de los pacientes correspondientes a las 104 muestras de LCR estudiadas. En el 22,1% de las muestras analizadas se confirmó el diagnóstico de EM (23 pacientes), un 43,5% presentó BO positivas, mientras que se halló PB en el 92,6%. Tres pacientes sin EM presentaron BO positivas (uno de ellos con diagnóstico de meningoencefalitis asociado a vasculitis, otro con enfermedad de Rasmussen y el tercero con una toxoplasmosis cerebral). El análisis estadístico mediante el *test* de independencia mostró una asociación altamente significativa entre la presencia de BO y el diagnóstico de EM ($p < 0,001$) (Fig. 3).

Dentro del grupo de pacientes con PB se observó una asociación significativa entre la presencia de BO y el diagnóstico de EM ($p < 0,05$). Asimismo, no se hallaron pacientes con otras enfermedades neurológicas que presentaron BO positivas (Fig. 4).

Tabla I. Características de las muestras analizadas.

N°	Edad	PT (g/L)	BO	Diagnóstico	Patrón
1	66	2,25	-	Sme. Guillain Barré	A
2	49	0,32	-	Lesión desmielinizante (no EM)	B
3	24	0,29	-	Síndrome de Rasmussen	A
4	56	0,31	-	Sepsis sin foco	A
5	49	0,03	-	EM	B
6	64	1,00	-	EM	B
7	60	0,28	-	Neuropatía multifuncional motora	A
8	63	0,31	-	Neuritis isquémica	A
9	84	0,77	ND	Encefalitis herpética	A
10	39	0,41	-	Leucoencefalopatía multifocal progresiva	A
11	60	0,63	+	EM	B
12	74		ND	ACV	A
13	16	0,25	-	LLA (B)	A
14		0,46	-	Esclerosis en placa	A
15	84	0,67	-	Hidrocefalia / demencia / Parkinson	A
16	40	0,34	-	Meningitis	A
17	25	0,23	-	Enfermedad desmielinizante no EM	A
18	9	0,21	ND	LMA	A
19	24	0,49	-	EM; tumor hipofisario	B
20	26	0,73	+	Toxoplasmosis cerebral / problema vascular	B
21	9 meses	0,18	ND	Síndrome febril - petequias	A
22	48	0,33	-	Mielitis transversa	A
23		0,54	-	Mielomeningocele - hidrocefalia	A
24	80	0,27	ND	Isquemia	A
25	47	0,39	+	EM	B
26	34	0,47	+	Meningoencefalitis / vasculitis	B
27	33	0,17	-	EM	B
28	84	0,40	-	Deterioro del sensorio	A
29	75		ND	Sepsis	A
30	11 meses	2,60	-	Encefalitis viral	B
31	36	0,23	-	Degeneración cerebelosa progresiva	A
32	38	0,51	-	Lesión isquémica recurrente	A
33	11	0,39	ND	Meningitis	A
34	61	0,40	ND	Hemorragia subaracnoidea	A
35	46	0,40	-	Cefalea y trastornos de la marcha	A
36		0,34	-	Meningitis	A
37	60	0,43	ND	Neuropatía desmielinizante crónica	B
38	20	0,6	+	EM	B
39	41	0,49	+	EM 2° progresiva	B
40	24	0,45	-	Sme. Guillain-Barré	A
41		0,29	+	EM 12 años evolución	B
42	7	0,17	ND	LLA - neutropenia	A
43	22	0,46	+	Enfermedad de Rasmussen	B
44	26	0,43	-	Sme. Guillain-Barré	B
45		0,31	ND	Sífilis secundaria	A
46	24	0,02	-	Meningismo (meningitis)	A
47	94	0,10	-	ACV isquémico	A
48	70	0,45	-	EM	B
49	31	0,27	+	Encefalitis / EM + inmunocompromiso	B
50	60d	0,27	ND	Sepsis / bronquiolitis	A
51	61	0,59	-	Enfermedad desmielinizante	B
52	77	ND	ND	Cefalea intensa	A
53	7	0,17	ND	LLA	A
54	3 meses	0,51	ND	Meningitis	A

Tabla I. Características de las muestras analizadas. (Continuación)

N°	Edad	PT (g/L)	BO	Diagnóstico	Patrón
55	61	0,32	+	EM	B
56	36	0,62	+	EM	B
57	8	1,95	-	Sme. Guillain-Barré	A
58	52	0,42	-	Mielitis	B
59	7	0,22	ND	LLA	A
60	38	0,80	-	EM 18 años evolución	B
61	47	ND	ND	Sme. Guillain Barré	A
62	74	0,04	-	Demencia vascular / ACV isquémico	A
63	43	0,57	-	Sme. Guillain Barré	A
64	55	0,51	-	Enfermedad desmielinizante	B
65	36	0,29	-	Linfoma del manto	A
66	18 m	0,22	-	Neurosífilis (Campo oscuro negativo)	A
67	22	0,59	-	LLA (B)	A
68	7	0,12	-	LLA pre B	A
69	47	0,26	+	EM reactivacion - brote	B
70	68	0,03	-	Meningoencefalitis viral	A
71	40	0,58	-	EM 1° progresiva	B
72	41	0,54	-	EM 14 años evolución	B
73	19	0,23	-	Sme. Guillain Barré	A
74	88	ND	ND	Síndrome confusional agudo	B
75		0,48	-	Mielitis transversa	B
76	87	0,01	ND	Isquemia	A
77	39	0,19	-	LLA (B) Sme. Guillain Barré	A
78	49	0,32	-	EM	B
79		0,29	-	Lesiones en sustancia blanca	A
80	73	0,27	-	HCV crónica / cuadro tóxicometabólico	A
81	47	0,45	-	Linfoma B difuso	B
82	63	0,87	-	Artritis séptica	B
83	63	0,50	-	EM; Paraparesia	B
84	59	1,02	-	Leucoencefalitis post-infecciosa/meningitis crónica	B
85		0,42	-	Enfermedad autoinmune	A
86	35	0,26	-	EM	B
87	12	0,14	ND	LMA	A
88	68	0,53	-	Polineuropatía desmielinizante crónica	B
89		0,38	-	HIV	A
90			ND	Cáncer de endometrio	A
91	54	0,47	-	Neuropatía inflamatoria	A
92	39	1,31	ND	Aracnoidocele supracelular moderado	A
93	31	0,67	+	EM	B
94		0,43	-	EM	B
95		0,35	-	Mielitis transversa	A
96	40	0,55	-	Miopatía / Síndrome piramidal	A
97		1,3	-	Sme. Guillain-Barré	B
98	77		ND	ACV	A
99	38	0,27	-	Neurosarcoidosis	A
100	18	0,54	-	EM	B
101	38	0,28	ND	LLA pre B	A
102		0,67	ND	Meningitis tuberculosa	A
103	36	0,42	-	Mielitis	A
104	47	0,21	-	Sme. Guillain-Barré	A

EM: esclerosis múltiple; ACV: accidente cerebro-vascular; LLA: leucemia linfocítica aguda, LMA: leucemia mieloide aguda.
 BO: bandas oligoclonales; -: negativo; +: positivo; ND: no determinado.

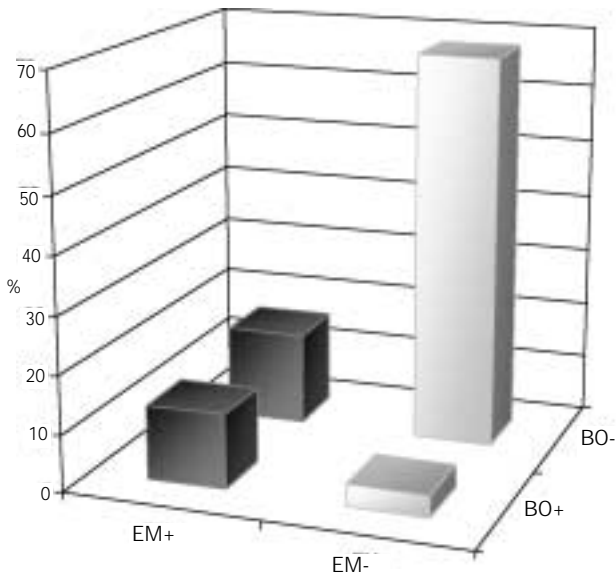


Figura 3. Análisis de distribución de frecuencia en 80 muestras de LCR.

Existe asociación entre la presencia de BO y EM ($p < 0,001$).
EM: esclerosis múltiple; BO: bandas oligoclonales.

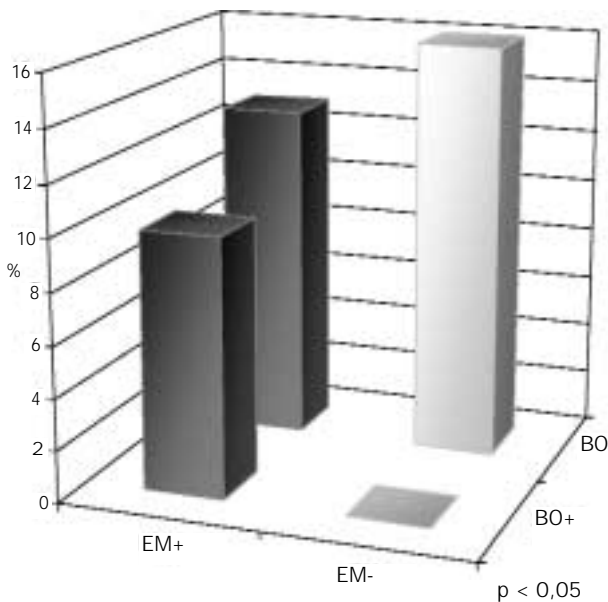


Figura 4. Análisis de distribución de frecuencia de 39 LCR con PB.

PB: patrón B; EM: esclerosis múltiple; BO: bandas oligoclonales.

Discusión

El presente estudio permitió determinar dos perfiles proteicos en LCR mediante SDS-PAGE. El análisis estadístico estableció una asociación entre la presencia de PB y EM, mientras que se asoció el PA a las demás patologías. Las bandas de bajo PM halladas en el PB (PM entre 13 y 25 KDa) corresponderían a proteínas específicas de síntesis intratecal que definen dos posibles sitios de lesión: neuronas y glía (S100 B) y leptomeninges (β -trace, cistatina C). A través de Western Blot se identificó inmunológicamente a la cistatina C como la proteína de PM 13 KDa, presente en células de microglía, astrocitos, plexo coroideo y algunas neuronas. Nagai y colaboradores encontraron concentraciones elevadas de esta proteína en pacientes con meningitis, encefalitis y mielitis, pero sin diferencia entre los grupos con EM, síndrome de Guillain-Barré, desórdenes inmunológicos, cerebrovasculares, degenerativos y tumores, entre otras alteraciones neurológicas (9). La especificidad fue mayor al 80% cuando se compararon con controles sanos y disminuyó cuando se compararon frente a otras enfermedades neurológicas (14).

El examen de numerosas sustancias involucradas en el proceso de desmielinización, tales como el óxido nítrico y sus productos de oxidación, ha sido propuesto como un excelente complemento a los métodos por imágenes y como marcadores de actividad en las recaídas, puesto que su síntesis se halla incrementada (15). La cuantificación de diversas proteínas presentes en el LCR, como la enolasa neurona específica, la proteína 14-3-3 y la proteína S100, ha sido reportada como un indicador de daño en estructuras precisas del SNC y se emplea en una variedad de patologías neurológicas (8).

Sin embargo, en muchos de estos trabajos las muestras son preseleccionadas; los valores de *cut-off* para diferenciar grupos de pacientes se optimizaron de la misma población en la que luego se aplicaron, por lo que las conclusiones deben ser tomadas con precaución cuando se trasladan a la población general. Además, es importante el momento de la toma de muestra, sobre todo en enfermedades como la EM donde el desarrollo de los síntomas clínicos no siempre se correlaciona con la actividad de la enfermedad (16).

Siendo el daño axonal resultado de la patogenia de la EM, la liberación de distintas proteínas derivadas de cerebro y la presencia de respuesta inmune local serían fenómenos que coexistirían en esta enfermedad. En consecuencia, podría existir una mejor asociación entre el tipo clínico de EM y las proteínas derivadas de cerebro, que la descrita para la presencia de BO, puesto que esta última depende de otros factores, como la capacidad de respuesta humoral individual y la actividad o no del proceso. La presencia de BO es uno de los hallazgos más útiles en el diagnóstico de EM,

aunque su aparición no es constante. Aún cuando en las recomendaciones del "Documento Consenso del 2003", consideran al isoelectroenfoque (IEE) seguido por la inmunodetección como el método *gold standard* para la detección de BO, algunos autores no hallaron diferencias significativas entre ese método y la electroforesis con tinción argéntica e inmunodetección, en distintos ensayos de sensibilidad (17).

El perfil proteico y la presencia de BO fueron útiles como herramientas diagnósticas complementarias para definir a la población de pacientes con EM. La utilización de ambas determinaciones fortalecería sustancialmente el aporte del Laboratorio al diagnóstico de EM, al evaluar dos eventos fisiopatológicos distintos, la síntesis local de IgG (BO) y la destrucción axonal con liberación de proteínas de origen cerebral (PB).

AGRADECIMIENTO

El presente trabajo fue realizado en parte con el Subsidio UBACYT B008.

CORRESPONDENCIA

DRA. SANDRA VIVIANA PUJADAS
Departamento de Bioquímica Clínica
Facultad de Farmacia y Bioquímica
Junín 956 - 1113 CIUDAD DE BUENOS AIRES
Argentina

Referencias bibliográficas

1. Roitt I, Delves P. Encyclopedia of Immunology, London: Ed Academic Press; 1992.
2. Farreras-Rozman. "Medicina Interna", 13a ed, Barcelona: Editorial Doyma; 1995.
3. Compston A, Ebers G, Lassman H, Mc Donald I, Matthews B, Wekerle H. Mc Alpine's Multiple Sclerosis, London: Ed. Churchill Livingstone; 1998.
4. Poser CM, Paty DW, Scheinberg L, Mc Donald WI, Davis FA, Ebers GC, et al. New diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines for research protocols. Ann Neurol 1983; 13: 227-31.
5. Mc Donald W, Compston A, Edan G, Goodkin D, Hartung H, Lublin F, et al. Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines from the international panel on the diagnosis of multiple sclerosis. Ann Neurol 2001; 50: 121-7.
6. Correale J, Bassani Molinas M. Oligoclonal bands and antibody responses in Multiple Sclerosis. J Neurol 2002; 249: 375-89.
7. Reiber H. Dynamics of brain-derived proteins in cerebrospinal fluid. Clin Chim Acta 2001; 310: 173-86.
8. Bartosik-Psujek H, Stelmasiak Z. Biochemical markers of damage of the central nervous system in multiple sclerosis. Ann Univ Mariae Curie Sklodowska 2001; 56: 389-92.
9. Nagai A, Murakawa Y, Terashima M, Shimode K, Umegae N, Takeuchi H, et al. Cystatin C and cathepsin B in CSF from patients with inflammatory neurologic diseases. Neurology 2000; 55: 1828-32.
10. Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 1976; 72: 248-54.
11. García M, Madalena L, Bragantini G, Bresciani P, Pizzolato M. Electroinmunofijación de orinas sin concentrar por coloración con metales pesados. Acta Bioquím Clín Latinoam 1996; 3: 215-20.
12. Marshall T, Williams K. Clinical analysis of urinary proteins using high resolution electrophoretic methods. Electrophoresis 1998; 19: 1752-70.
13. Andrews A. Electrophoresis. 2nd ed. vol 1. Oxford: Clarendon Press; 1985.
14. Verbeek M, de Jong D, Kremper H. Brain-specific proteins in cerebrospinal fluid for the diagnosis of neurodegenerative diseases. Ann Clin Biochem 2003; 40: 25-40.
15. Acar G, Idiman F, Idiman E, Kirkali Çakmakçi H, Özakba Ş. Nitric oxide as an activity marker in multiple sclerosis. J Neurol 2003; 250: 588-92.
16. Watson M, Scott M. Clinical utility of biochemical analysis of cerebrospinal fluid. Clin Chem 1995; 41: 343-60.
17. Reiber H, Thompson EJ, Grimsley G, Bernardi G, Adam P, Monteiro de Almeida S, et al. Quality assurance for cerebrospinal-fluid protein analysis: International Consensus by and Internet based group discussion. Clin Chem Lab Med 2003; 41: 331-7.

Aceptado para su publicación el 26 de octubre de 2004