VOL 80 - Nº 2
Mayo-Agosto de 2016
Ciudad de Bs. As. Argentina
ISSN 1515-6761 Ed. Impresa
ISSN 2250-5903 Ed. CD-ROM

Bioquímica y Patología Clínica

Universidad Nacional de Mar del Plata (UNMdP)

Revista de la Asociación Bioquímica Argentina.
Publicación cuatrimestral.

Revista de la Asociación Bioquímica Argentina - Volumen 80 - Nº2 - Mayo - Agosto de 2016
Bioquímica y Patología Clínica

VOL 80 - Nº 2
Mayo-Agosto de 2016
Ciudad de Bs. As. Argentina
ISSN 1515-6761 Ed. Impresa
ISSN 2250-5903 Ed. CD-ROM

Bioquímica y Patología Clínica

Revista de la Asociación Bioquímica Argentina

SUMARIO

Pág. 8 **EDITORIAL: Nuestros residentes**
Dra. Liliana Arias, Dra. Isabel Desimone

Pág. 9 **9 Manifestaciones cutáneas en pacientes pediátricos con inmunodeficiencias primarias**
Cantisano, C.; Díaz, H.; Balbaryski, J.; Quiroz, H.; Gaddi, E.

Pág. 15 **Evaluación de la tasa de revisión manual del frotis de sangre periférica en pacientes pediátricos.**
Osta, V.; Guiñazú, K.; Ayuso, C.

Pág. 24 **Cuantificación del colesterol en glóbulos rojos de distintos tamaños. Valores obtenidos en personas con riesgo cardiovascular.**
Chiari J.

Pág. 28 **Uso del inmunoblot (Western blot) en el laboratorio clínico para la detección de distrofina, disferlina y calpaína 3: tres proteínas de relevancia en el diagnóstico de miopatías hereditarias.**
Sorroche, P.B.;Cucci, M.;Wilda, M.;Ruggiero, M. F .;Bettini ,M.;Giménez, M.I.;Christiansen, S.; Grigera, P.R.

Pág. 34 **Activación y cascada de señalización de los linfocitos B**
Sánchez, M.L.

Pág. 45 **Cursos**

VOL 80 - Nº 2
Mayo-Agosto de 2016
Ciudad de Bs. As. Argentina
ISSN 1515-6761 Ed. Impresa
ISSN 2250-5903 Ed. CD-ROM

Bioquímica y Patología Clínica

REVISTA DE LA ASOCIACIÓN BIOQUÍMICA ARGENTINA

Venezuela 1823 - Piso 3 - CP (1096)
Buenos Aires - Argentina
Tel/ fax: 4384-7415 / Tel: 4381-2907
e-mail: info@aba-online.org.ar
www.aba-online.org.ar
Registro Nacional de Derechos de Autor Nº 034772
Publicación cuatrimestral

COMISIÓN DE REVISTA
Director: Dr. Fernando Brites
Secretario Científico: Dr. Jaime Kovensky
Secretarios Administrativos:
Sr. Gastón Goldberg
Sr. Jorge Signorelli
Comité Editorial:
Dr. Orlando Gabriel Carballo
Dra. Isabel Desimone
Dra. María Laura D´Ambrosio
Dr. Julián Verona.
Correctoras:
Lic. Inés Carozza (Castellano)
Lic. María Victoria González Eusevi (Inglés)

ASOCIACIÓN BIOQUÍMICA ARGENTINA - Fundada el 3 de septiembre de 1934

COMISION DIRECTIVA
Presidente: Dra. Silvia B. González
Vicepresidente: Dra. Patricia Otero
Secretaria: Dra. Viviana Osta
Tesorera: Dra. Isabel Desimone

1º Vocal Titular: Dr. Orlando G. Carballo
2º Vocal Titular: Dr. Alberto Villagra
3º Vocal Titular: Dra. María José Rial

1º Vocal Suplente: Dra. María Rugiero
2º Vocal Suplente: Dr. Eduardo Mormandi
3º Vocal Suplente: Dr. Santiago Fares Taie

COMISION REVISORA DE CUENTAS
Titular 1ª: Dra. Silvia Morilla
Titular 2º: Dra. Estella Meyer
Titular 3ª: Dra. Silvia Cajiao

1º Vocal Suplente: Dra. Graciela Astarita
2º Vocal Suplente: Dra. Claudia Ayuso

COMISIONES INTERNAS
PRENSA Y DIFUSIÓN
Presidente: Dra. Laura Colitto
Secretario: Dr. Santiago Fares Taie
Vocales:
Dr. Eduardo Mormandi

CERTIFICACION
Presidente: Dr. Alberto Villagra
Secretario: Dra. Viviana Osta
Vocales:
Dra. María José Rial

CURSOS
Presidente: Dra. Silvia González
Secretaria: Dra. María Soledad Caldirola
Vocales:
Dra. María de la Paz Domínguez
Dra. Liliana Maggi
Dra. María José Rial
Dra. Alejandra Svartz
Dra. Marysia Szefner

COMITÉ CIENTÍFICO ASESOR
Dra. Mónica Aixalá
Dr. Gloria Alvarez
Dra. Liliana Arias
Dra. Alicia Blanco
Dr. Orlando Gabriel Carballo
Dra. Silvia González
Dr. Gabriel Migliarino
Dr. Eduardo Mormandi
Dra. Raquel Osatinsky
Dr. Jorge Rey
Dra. María José Rial
Dra. Sandra Rozental
Dra. Gabriela Santizo
Dra. Nora Slobodianik

PREMIOS Y DISTINCIONES
Dra. Alicia Blanco
Dr. Fernando Brites
Dra. Nilda Fink
Dr. Nestor Litwin
Dra. Raquel Osatinsky

ARTÍCULO ORIGINAL

Uso del inmunoblot (*Western blot*) en el laboratorio clínico para la detección de distrofina, disferlina y calpaína 3: tres proteínas de relevancia en el diagnóstico de miopatías hereditarias

Sorroche, P.B.[1]; Cucci, M.[1]; Wilda, M.[4]; Ruggiero, M. F.[2]; Bettini, M.[2]; Giménez, M.I.[1]; Christiansen, S.[3]; Grigera, P.R.[4]

[1]Sección de Proteínas, Laboratorio Central, Hospital Italiano, CABA, Argentina.
[2]Departamento de Neurología, Hospital Italiano, CABA, Argentina.
[3]Servicio de Anatomía Patológica, Hospital Italiano, CABA, Argentina.
[4]Instituto de Ciencia y Tecnología Cesar Milstein (ICTMilstein-CONICET), Buenos Aires, Argentina.
Contacto: Grigera, P.R.; pgrigeracevan@centromilstein.org.ar

Resumen

La ausencia y/o disfunción de 3 proteínas constitutivas del músculo, distrofina(UniProtKB - P11532) en el caso de las distrofinopatías y, disferlina(UniProtKB - 075923) y calpaína 3 (UniProtKB - P20807) en las distrofias de cadera, juegan un papel central en la etiología de estas miopatías hereditarias. La confirmación de su presencia o ausencia en biopsias musculares es de relevancia diagnóstica y marca la necesidad de contar en el laboratorio clínico hospitalario con una técnica sensible y específica, que permita la detección e identificación de estas tres proteínas en nuestros pacientes. El objetivo de este trabajo fue desarrollar un protocolo de inmunoblot(*Western blot, WB*) adaptable al laboratorio de análisis clínicos hospitalario, para la detección de 3 proteínas constitutivas del músculo (distrofina, disferlina y calpaína 3) en material extraído de biopsias de pacientes. Aproximadamente 20 - 40 mg de biopsia muscular fue desnaturalizada en presencia de detergente SDS y mercaptoetanol por 10 minutos a 100º C y, posteriormente, analizadas en PAGE / SDS en formato mini-gel seguido de transferencia a membranas de nitrocelulosa e incubación con anticuerpos monoclonales(MAbs) con reactividad específica para las tres proteínas musculares mencionadas y revelado cromogénico y/o quimiolumínico. El protocolo presentado permite el análisis de un amplio rango de pesos moleculares que incluye a las 3 proteínas de interés: distrofina(430 Kd), disferlina (250 Kd) y calpaína 3 (95 Kd). La detección e identificación está basada tanto en la determinación del peso molecular relativo como en la reacción unívoca con anticuerpos monoclonales específicos. En el caso de calpaína 3 la técnica es capaz de detectar e identificar fragmentos de auto procesamiento en el rango de 55 - 60 Kd, un dato indicativo, no sólo de la presencia y expresión del respectivo gen, sino también de la funcionalidad de su producto. Se discute la conveniencia de utilizar quimioluminiscencia o cromógenos en el revelado del WB.

Palabras clave: distrofina, disferlina, calpaína 3, inmunoblot.

Abstract

The absence and/or dysfunction of three constitutive human muscle proteins: dystrophin (UniProtKB - P11532) in the case of dystrophinopathies, and calpain 3 and dysferlin (UniProtKB - P20807 and UniProtKB - 075923, respectively), in limb-girdle muscular dystrophies or LGMD, play a key role in the etiology of these hereditary myopathies. Confirming their presence or absence in muscular biopsies is essential for a correct diagnosis of the disease and underlines the need for a sensitive and specific technique to detect these proteins in the clinical laboratory. To develop a Western blot protocol to be used in the clinical laboratory for the detection and identification of dystrophin, dysferlin and calpain 3 in muscle biopsies. Approximately 20 - 50 mg of muscular biopsies in Urea and SDS containing buffer were analyzed in PAGE/SDS minigels, followed by electrotransference to nitrocellulose membranes, incubation with monoclonal antibodies (MAbs) specific for each of the three mentioned proteins and development with either chromogenic or chemiluminescence reagents. We showed a protocol suitable for the analysis of the large molecular-weight proteins dystrophin (430 Kd), dysferlin (220 Kd) and calpain 3 (95 Kd). Identification was based on both the analysis of their molecular weight and the univocal reactivity with specific monoclonal antibodies (MAbs). In the case of calpain 3, the technique detects not only the 95 Kd complete gene product, but also extra polypeptides in the 55 - 60 Kd range, indicative of a functional protease. The convenience of either the chromogenic or chemiluminescence protocol for signal development is discussed.

Keywords: dystrophin, dysferlin, calpain 3, westernblot.

ISSN 1515-6761 Ed. Impresa
ISSN 2250-5903 Ed. CD-ROM
Código Bibliográfico: RByPC
Fecha de Recepción: 24/02/2015
Fecha de Aceptación: 19/04/2016

Introducción

Las distrofias musculares(DM) son un grupo de miopatías que afectan predominantemente al músculo estriado y cuya etiología está asociada a la ausencia o disfuncionalidad de proteínas responsables de la arquitectura muscular[1,2]. Entre los diferentes tipos de DMs se distinguen las distrofinopatías de Duchenne o de Becker(DMD o BMD) y las distrofias musculares de cintura (*limb-girdle muscular dystrophy* o LGMD, de acuerdo a sus siglas en inglés) en sus formas dominantes: LGMD1 o recesivas LGMD2. Las distrofias DMD / BDD se caracterizan por un déficit marcado de la proteína distrofina, localizada en el sarcolema y parte de un complejo proteico que conecta el citoesqueleto con la membrana basal[3].

Por otro lado, las LGMD2 que tienen dos subtipos: A y B, están asociadas a la ausencia y/o disfunción de proteínas claves en el mantenimiento y reparación de la estructura del músculo, como lo son la disferlina(LGMD2B)[4] y la calpaína 3, una proteasa con capacidad auto catalítica (LGMD2A)[5,6,7].

Como regla general, la ausencia de una proteína es debida, fundamentalmente, a defectos del gen que la codifica; por lo tanto, verificar la presencia o ausencia de estas proteínas en el músculo de pacientes con enfermedad miopática hereditaria es de mayor importancia para un buen diagnóstico y eventual tratamiento.

El inmunoblot o *Western blot* (WB)[8] es una técnica ampliamente utilizada en laboratorios de investigación académica para la detección e identificación de proteínas presentes en muestras biológicas complejas. El WB tiene la ventaja de proveer una doble identificación, porque permite establecer el peso molecular relativo de proteínas y certificar su reactividad con anticuerpos monoclonales de especificidad unívoca.

En este trabajo se muestran los resultados obtenidos en el desarrollo de un protocolo de WB, utilizable en el contexto del laboratorio clínico hospitalario y capaz de detectar cada una de las tres proteínas musculares mencionadas.

Materiales y Métodos

a) Análisis en geles de poliacrilamida desnaturalizantes: se utilizaron geles de 8 % o 6 %(concentración final de Acrilamida), en formato de mini gel (BioRad). Las soluciones y *buffers* son las descriptas originalmente para geles de Laemmli [9].

b) Procesamiento de las muestras: las muestras fueron provistas, en todos los casos, por el banco del Departamento de Patología del Hospital Italiano de Buenos Aires, siguiendo los protocolos establecidos para el manejo de muestras de este tipo, en el contexto clínico-hospitalario. Muestras de aproximadamente 50 - 70 mg se obtuvieron de tacos de histopatología mantenidos a - 85 °C, lavados con *buffer* salino conteniendo EDTA 10 mM e inhibidores de proteasa (Halt™ protease inhibitor cocktail, Thermo). Las muestras fueron disgregadas en 50 ul de *buffer* UPET (Urea 8 %, PMSF 5 mM, Protease inhibitor cocktail 1X, EDTA 10 mM, 20 mM TrisHCl pH 6,8) con 5 - 10 golpes con tip descartable en un tubo Eppendorf de 0,5 ml a 0 - 4 °C. A continuación, se agregan 100 ul de *Buffer* Muestra 2X (40mM Tris pH 6.5, SDS 6 %, beta MSH 6 %, glicerol 50 %), seguido de vortex suave y desnaturalización a 98 °C en bloque seco por 10 - 15 minutos. Se clarificó por 15 minutos a 10 K.

c) Sembrado y análisis electroforético de la muestra: de acuerdo con la experiencia realizada, el rango de material sembrado oscila entre 15 - 20 ul, aproximadamente 10 - 20 % del total presente en los 150 ul finales(UPET + BM) de tratamiento. La corrida se realizó a 30 - 40 mA / 90 - 110 V por 3 - 4 horas en sistema mini gels de Bio Rad.

d) Transferencia: se realizó de acuerdo con protocolos estándares[8]. Se utilizaron membranas de nitrocelulosa (20 um, Bio Rad) y las transferencias fueron hechas overnight a 20 - 22 V / 90 - 100 mA en *buffer* de corrida PAGE/SDS - 20 % metanol. Las membranas fueron lavadas con H_2O, previo a la tinción con Rojo Ponceau y posteriormente bloqueadas con PBS / BSA 3 % a temperatura ambiente por 1 hora, antes del agregado de la solución de anticuerpos.

f) Detección con anticuerpos específicos y revelado: luego del bloqueo se incuba la membrana por 2 horas a temperatura ambiente o a 4 °C *overnight* con una dilución de monoclonal (MAb) de ratón en dilución 1:100, para el caso de calpaina 3 y disferlina y, 1:50 para el de distrofina en *buffer* PBS / Tween 0,1 %. En los tres casos la fuente comercial de los anticuerpos monoclonales(MAbs) utilizados es Novocastra-NC. Para distrofina: MAb NCL-DYS2-CE, para disferlina: MAb HAMLET-CE y para calpaína 3: MAbs NCL-CALP-2C4 y NCL-CALP - 12A2 . Luego de recuperar la solución de anticuerpos (con 0,1 % Na Azida como conservante y mantenida a 4 °C para su reutilización por al menos 4 ciclos), se hacen 3 lavados de 10 minutos c/u con 10 - 20 ml de PBS 1X / Tween 0,1 % seguido de incubación por 1 hora a temperatura ambiente con dilución 1/2000 del conjugado peroxidasa anti ratón(Amersham) en el mismo *buffer*. Sigue el descarte de la solución con el conjugado, lavado de *blot* por 20 minutos con 20 ml de PBS / T 0,1 % seguido por revelado cromogénico con el substrato TMB[10] o revelado quimio lumínico(ECL, Amersham)[11].

Resultados

La figura 1 muestra el perfil de WB obtenido en el análisis de 2 muestras representativas de biopsias musculares independientes, provenientes de pacientes con diagnóstico negativo para enfermedad miotrófica hereditaria y utilizadas como controles positivos. Las muestras fueron desnaturalizadas en *buffer* de Laemmli y corridas en minigeles 6 % u 8 % PAGE/SDS, seguido de transferencia a nitrocelulosa, tinción con Rojo Ponceau e inmuno detección de acuerdo a lo descripto en Materiales y Métodos.

El perfil de proteínas totales revelado por Rojo Ponceau (paneles de la izquierda) confirma la presencia de 2 proteínas estructurales mayoritarias del músculo estriado,

miosina(CAA86293, 210 Kd) y actina (P60709, 43 Kd) en ambas muestras. La presencia de estas proteínas es indicativa de una buena solubilización del material proveniente de la biopsia muscular y de actividad proteolítica reducida o nula durante el procesamiento. El grado de tinción de miosina y actina, proporcional a sus concentraciones, es también referencia de normalización y permite comparar los niveles de las tres proteínas en estudio entre muestras diferentes. Diferencias en los niveles de recuperación de miosina entre experimentos y/o entre las diferentes muestras son esperables por la eventual acción proteolítica inespecífica durante el procesamiento y/o por variabilidad en la proporción entre material intersticial graso y proteínas estructurales músculo especificas en la preparación. Los 3 paneles: superior, medio e inferior en la derecha (figura 1) muestran el perfil de inmunoreactividad ante los anticuerpos monoclonales específicos, MAb Dys2, MAb Hamlet y MAb 2C4/12A2 para las proteínas distrofina, disferlina y calpaína 3, respectivamente.

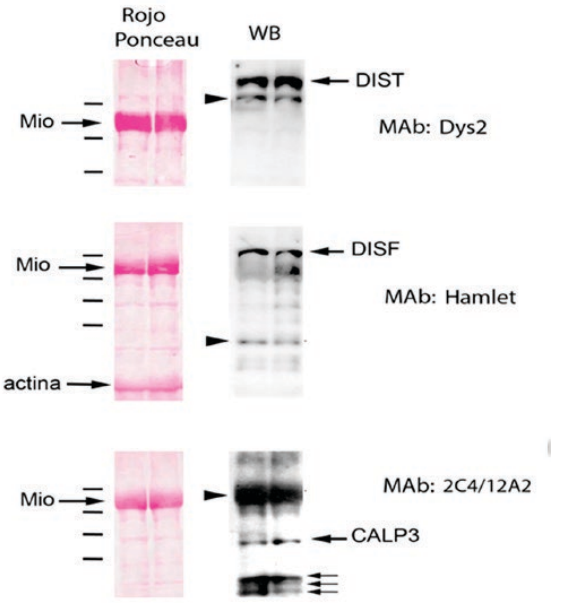
Como revelado se ha utilizado la técnica de quimioluminiscencia, que permite maximizar la sensibilidad y minimizar los riesgos de falsos negativos. Esto es particularmente importante en el caso la distrofina, que constituye sólo el 0,002 % de la proteína total del músculo y cuya transferencia es relativamente ineficiente debido a su alto peso molecular.

El perfil mostrado en la figura 1 confirma que los anticuerpos monoclonales seleccionados son capaces de identificar tres polipéptidos con los pesos moleculares esperados: distrofina (440 Kd), disferlina (250 Kd) y calpaína 3 (95 Kd), en ambas preparaciones testigos. En el caso de la distrofina (panel superior) la sensibilidad del método permite también detectar bandas reactivas de menor peso molecular (250 - 350 Kd), que pueden ser isoformas endógenas y/o productos de degradación parcial. El panel intermedio muestra el perfil obtenido con anticuerpos anti disferlina. Es clara aquí la presencia de un polipéptido de 250 Kd, correspondiente a la molécula entera de disferlina, así también, como de una banda minoritaria y de aproximadamente 70 Kd (señalada en la figura), originada posiblemente por proteólisis inespecífica[6,7].

En el caso de la calpaína 3, una proteasa calcio-dependiente de importancia en el remodelado de la estructura muscular[4,12], la mezcla de 2 anticuerpos monoclonales específicos detecta, tanto al polipéptido de 95 -100 Kd correspondiente a la molécula completa de la proteasa, como a fragmentos de auto procesamiento que corren con pesos moleculares relativos de 60, 58 y 55 Kd[6]. Este perfil es compatible con la información bibliográfica y es indicativo no sólo de expresión del gen de calpaína 3, sino también de la presencia de una proteasa activa y funcional en el músculo [5,6,7].

En la figura 2A se muestra el perfil de WB obtenido con el MAb anti disferlina bajo idénticas condiciones de procesamiento y análisis previos, pero revelado con reactivo

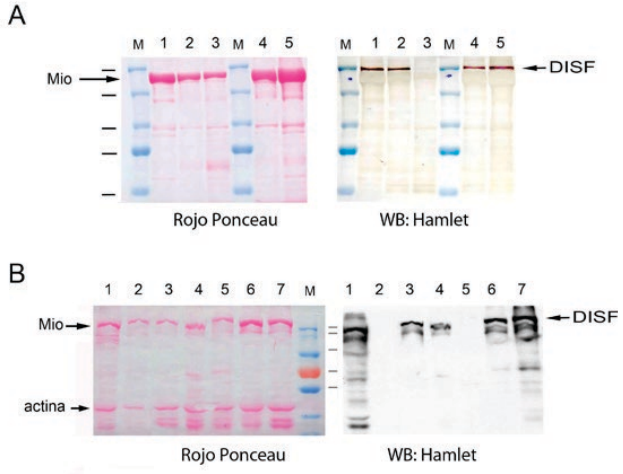
Figura I. Perfil de Inmunoblot de 2 muestras de biopsias de músculo revelado con quimioluminiscencia(ECL- Amersham).



Las muestras se corrieron en minigeles PAGE/SDS 6 % (para análisis de distrofina) y 8 % (para análisis de disferlina y calpaína 3). Los anticuerpos monoclonales(MAbs) utilizados son: para distrofina: MAb NCL-DYS2-CE, para disferlina: MAb HAMLET-CE y para calpaína 3: mezcla equivalente de MAbs NCL-CALP-2C4 y NCL-CALP-12A2. El panel superior derecho muestra la presencia de distrofina y una isoforma minoritaria de menor peso molecular que es posiblemente producto de degradación parcial (marcada con cabeza de flecha). El panel central derecho muestra el perfil obtenido con anti disferlina. Se puede detectar además una banda minoritaria de app. 70 Kd, producto posiblemente de deleción (cabeza de flecha). En el caso de calpaína 3, panel inferior, se detectan además de una banda con el peso molecular de 95Kd, el esperado para la molécula completa de calpaína 3, tres polipéptidos en la región de 50 - 60 Kd originados por auto proteólisis. La sobre exposición muestra también un efecto de masa inespecífico del revelado de la miosina, señalada por la cabeza de flecha. La barras sobre la izquierda indican la posición relativa de los markers de 250, 150, 100 y 75 Kds en orden descendente y también es señalada la posición de actina(43 Kd).

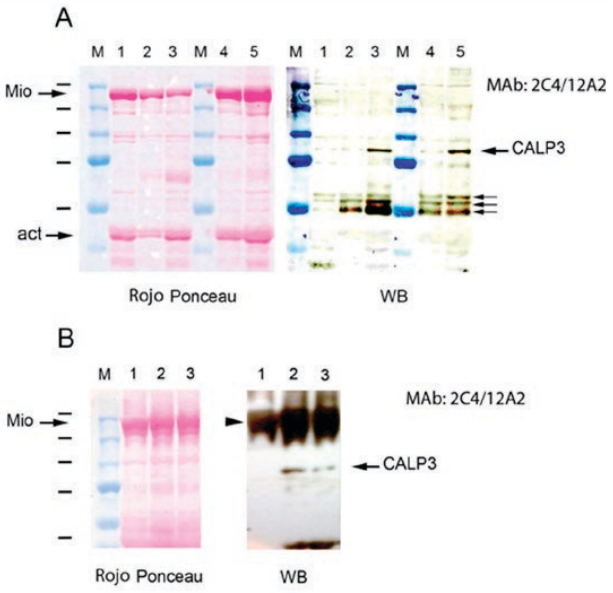
cromogénico TMB. Esta técnica de revelado tiene menor sensibilidad que la quimioluminiscencia, pero no requiere de la utilización de films radiográficos ni revelado en cuarto oscuro, simplificando el proceso de detección, por lo tanto constituye una alternativa válida para laboratorios clínicos de menor complejidad. El revelado muestra la casi exclusiva presencia de un polipéptido con el peso molecular esperado para Disferlina en 4 de las 5 muestras. La disferlina no fue detectada en la muestra analizada en la calle 3, un resultado compatible con el diagnóstico clínico de disferlinopatía correspondiente al paciente del cual fue obtenida. La tinción con Rojo Ponceau en el panel de la izquierda confirma la presencia de miosina y actina en las 5 preparaciones e indica que el material ha sido extraído en forma satisfactoria y

Figura 2. A) Perfil de disferlina y revelado cromogénico. B) Revelado por quimioluminiscencia.



A) Perfil de disferlina y revelado cromogénico. Cinco muestra de biopsias independientes fueron analizadas en gel 8 % PAGE/SDS, transferidas a nitrocelulosa incubadas con anticuerpo MAb Hamlet seguido de revelado cromogénico con TBS. Cuatro de las 5 muestras (calles 2, 3, 4 y 5) muestran presencia de disferlina mientras que en la muestra de la calle 1 no se detecta presencia de la proteína. Las bandas de miosina (Mio) en el panel superior izquierdo visualizada con Rojo Ponceau son utilizadas como referencia y normalización de la siembra de material. Los *markers* (calle M) corresponden a 250, 150, 100, 75 y 40 Kd en orden descendente. B) Revelado por quimioluminiscencia. Siete preparaciones independientes se analizaron con MAb HAMLET bajo idénticas condiciones a las descriptas en el análisis de la figura 2A, salvo que el revelado fue hecho por quimioluminiscencia. Las calles 2 y 5 muestran ausencia de señal para disferlina en las muestras mientras que la tinción con Rojo Ponceau confirma que hay sembradas cantidades equivalentes de material en todas las calles. Los *markers* (M) corresponden a 180, 130, 95, 72, 55 y 43 Kd en orden descendente.

Figura 3. Perfil con MAbs anti calpaína 3. A) Revelado cromogénico y B) Revelado por quimioluminiscencia.



Perfil con MAbs anti calpaína 3. A) Revelado cromogénico: 5 muestras representativas fueron analizadas en geles PAGE/SDS 8 %, transferidas y probadas con la mezcla de anticuerpos monoclonales, NCL-CALP-2C4, NCL-CALP-12A2 específicos para calpaina 3. El revelado fue hecho con reactivo cromogénico TMB posterior a la tinción con Rojo Ponceau (panel izquierdo). Las tres flechas señalan polipéptidos de 60, 58 y 55 Kd originados por autoproteólisis del polipéptido de 95 Kd, correspondiente a la molécula completa de calpaína 3. B) Revelado por quimioluminiscencia: una alícuota de la muestra analizada en la calle 1 de la figura 3A, fue corrida en paralelo con muestras controles (calles 2 y 3), seguido por transferencia, tinción con Rojo Ponceau y revelado por quimioluminiscencia. El resultado confirma la ausencia de señal para calpaína 3 y/o los polipéptidos originados por auto proteósis en la muestra analizada en calle 1. Los pesos moleculares relativos de los *markers* (M) señalados por barras en la figura son 250, 150, 100, 75, 55 y 40 Kd en orden descendente.

minimizando artefactos de proteólisis. La figura 2B, a modo de comparación, muestra un análisis independiente de 7 preparaciones, pero revelado con reactivo quimio lumínico, confirmando la reproducibilidad y la buena relación señal a *background* mencionada en la figura 1. disferlina no es detectada en las preparaciones analizadas en las calles 2 y 5, pese a que el perfil de Rojo Ponceau deja en claro que la carga de las muestras, la distribución y la calidad de las proteínas totales, es similar en todas las preparaciones.

La figura 3A muestra el perfil de Rojo Ponceau (panel izquierdo) y de inmuno reactividad (panel derecho), de alícuotas provenientes de las mismas preparaciones analizadas en la figura 2, pero enfrentadas con una combinación de 2 anticuerpos específicos, NCL-CALP-2C4 y NCL-CALP-12A2, contra calpaína 3. El revelado con reactivo cromogénico TMB muestra un polipéptido de 95 Kd correspondiente a la proteasa completa, en 2 de las 5 preparaciones (CALP3 en calles 3 y 5). En cuatro muestras independientes (calles 2, 3, 4 y 5) también se pudo detectar la presencia de polipéptidos reactivos en la zona de 50 - 60 Kd del gel, que como se mencionó (figura 1) se originan en la autoproteólisis de calpaína 3 (95 Kd) y son indicativos de una enzima presente y activa. Es interesante destacar que la preparación analizada en la calle 1 muestra niveles casi inexistentes del polipéptido de 95 Kd y muy disminuídos en la banda heterogénea en la región de 50 - 60 Kd. La tinción con Ponceau indica que la cantidad de material total sembrado en la calle 1 es similar a la de las otras muestras y la presencia de miosina y actina sugieren un procesamiento libre de artefactos de proteólisis. Se concluyó que la ausencia de calpaína 3 bajo estas circunstancias no es un artefacto del procesamiento sino la consecuencia de su falta de expresión y/o un exacerbado proceso de proteólisis intracelular.

En la figura 3B se ha corrido una nueva alícuota de esta preparación (calle 1) en paralelo con otras 2 muestras de pacientes asintomáticos para LGMD2A (calles 2 y 3), pero el revelado ha sido hecho, esta vez, por quimioluminiscen-

cia. Bajo estas condiciones, de mayor sensibilidad, tampoco se pudo detectar la presencia del polipéptido de 95 Kd ni de fragmentos de auto proteólisis. Es digno de destacar que la preparación analizada en la calle 1 proviene de un paciente sospechado de LGMD2A y la ausencia de polipéptidos de 95 Kd y derivados en la zona 50 - 60 Kd descripta aquí es compatible con ese diagnóstico. El WB, en la figura 3B, también muestra bandas sobreexpuestas de disferlina (señaladas por cabeza de flecha) en todas las calles debido al pre tratamiento de la membrana con anticuerpo anti disferlina, que confirma la presencia de la proteína en las 3 muestras. Tomados en conjunto estos resultados muestran que ambos, el revelado cromogénico y la quimioluminiscencia son alternativas válidas para detectar disferlina y, eventualmente, calpaína 3 en el contexto del laboratorio clínico. La quimioluminiscencia, por otro lado, es la técnica de revelado de elección para el caso de la distrofina como se muestra en la figura 1.

Discusión

El inmunoblot o WB[8] permite la identificación de proteínas en base a la reacción entre un anticuerpo específico en solución con un antígeno proteico electro transferido a un soporte de nitrocelulosa posterior a su separación electroforética en geles PAGE/SDS. Esta técnica, ampliamente utilizada en laboratorios de investigación básica, para identificar proteínas en mezclas biológicas complejas ha sido transferida a laboratorios de análisis clínicos para ser usada principalmente en la detección del virus de la inmunodeficiencia humana (HIV) en suero de pacientes. En este formato, los anticuerpos séricos anti HIV, la variable a determinar, son enfrentados a preparaciones purificadas de antígeno viral fijados a un soporte membranoso. La técnica así utilizada requiere un cuidadoso análisis de interpretación de resultados debido a problemas de sensibilidad y potenciales falsos positivos[13,14]. Por el contrario, el protocolo de WB propuesto aquí es utilizado para identificar tres proteínas con secuencia y pesos moleculares conocidos con antelación y utilizando anticuerpos monoclonales, cuya especificidad está estrictamente pre-definida[6,7] (figura 1).

El revelado por quimioluminiscencia posee una sensibilidad de 1 - 5 ng, un orden de magnitud superior que el método cromogénico. Esto es de particular importancia en el caso de la distrofina, una proteína de alto peso molecular que constituye sólo el 0,002 % de la proteína total del músculo. Debido a su tamaño, la relación moles a masa de la distrofina es significativamente menor al de las otras dos proteínas analizadas aquí, y por lo tanto, es la de menor carga específica de anticuerpos(moléculas de Mab por ug de proteína) de las tres. Dada la cantidad de muestra analizada (equivalente a 20 mg de biopsia) y a la baja eficiencia de la transferencia para proteínas de 400 Kd, es esperable que los niveles de distrofina, efectivamente presentes en la membrana estén por abajo del límite de detección del revelado cromogénico. Esto hace necesario el revelado con quimioluminiscencia sobre el reactivo cromogénico TMB para el caso de distrofina (resultados no mostrados).

El perfil mostrado en la figura 2A por otro lado, confirma que en el caso de disferlina (250 Kd) el revelado cromogénico es una alternativa válida a la quimioluminiscencia. En todos los casos el perfil de Rojo Ponceau y en especial el de las proteínas constitutivas miosina y actina, permite la normalización intermuestras y descartar artefactos proteolíticos.

El caso de calpaína 3, una proteína no estructural con capacidad auto catalítico y esencial para el mantenimiento de la arquitectura de la célula muscular[5,6,7], merece especial consideración. Debido a la falta de mutaciones sobresalientes("hot spots")[15] la interpretación de los análisis de secuencia del gen CPN3, que codifica para calpaína 3, presenta significativa complejidad y las técnicas de inmunohistoquímica con los anticuerpos anti calpaína disponibles suelen no ser concluyentes. El WB es por lo tanto la forma más sencilla para constatar o descartar su presencia en músculo de pacientes[16].

La ventaja del WB es que permite detectar no sólo a la proteasa completa de 95 Kd sino también a sus fragmentos de auto proteólisis. La presencia de estos últimos confirma la existencia de una calpaína 3 funcional, un aspecto de mayor importancia al momento de correlacionar la clínica con los resultados de laboratorio. Como se muestra en las figuras 1 y 3 ambas estrategias de revelado (quimioluminiscencia y cromogénica) permiten detectar una proteína de 95 Kd correspondiente a la molécula de calpaína 3 entera así como también 3 polipéptidos producto de auto proteólisis, que migran en la zona de 55, 58 y 60 Kd[6]. En las calles 1 a 5 del gel de figura 3A se resumen los 3 tipos de perfiles esperables en cualquier muestra analizada con MAbs 2C4 y 12 A2 anti calpaína 3[6,7]. En el perfil mostrado en las calles 3 y 5, se distingue la presencia de calpaína 3 (95 Kd) y una proporción variable de fragmentos de auto proteólisis de 61 y 55 Kds. En el segundo tipo (representado en las calles 2 y 4) las cantidades de calpaína 3 (95 Kd) son mínimas pero hay cantidades bien definidas de polipéptidos derivados en la zona de 50 - 60 Kd. Y en el tercero los niveles de ambas especies son apenas detectables, aún utilizando quimioluminiscencia (calle 1, figuras 3A y 3B). La proporción entre la cantidad de calpaína 3 (95 Kd) y de polipéptidos de 55 - 60 Kd puede servir como estimación del grado de actividad proteolítica en la célula muscular, aunque esta interpretación está condicionada a la minimización de artefactos de proteólisis durante el procesamiento de la muestra. En ese aspecto, especial cuidado debe ponerse en garantizar la cadena de frío para el manejo de la muestra desde el preciso momento de su obtención. De mayor importancia también es la utilización de inhibidores de proteólisis así como realizar una rápida solubilización y desnaturalización de la biopsia muscular en presencia de urea y detergente SDS previo a su análisis en PAGE/SDS. Como se mencionó, el perfil de tinción con Rojo Ponceau del material bloteado en la membrana y la confirmación de integridad de las pro-

teínas miosina y actina son aspectos de mayor relevancia para una correcta evaluación de las cantidades relativas de las tres proteínas y su normalización intermuestras. En síntesis, los perfiles obtenidos en el análisis por WB de 3 proteínas claves en la estructura y función muscular son los esperables tanto por las características de las muestras como por la especificidad de los anticuerpos monoclonales validados académica y comercialmente. La puesta a punto de esta técnica es a nuestro entender un valioso ejemplo de transferencia de tecnología y *know-how* del ámbito del laboratorio de investigación al laboratorio de análisis clínicos y una contribución al aumento en la calidad y diversidad de los recursos diagnósticos en la institución hospitalaria.

Referencias Bibliográficas

1. Emery AE. The muscular dystrophies. Lancet. 2002;359(9307):687-95. Review.
2. Waddell LB, Evesson FJ, North KN, Cooper ST, Clarke NF. En Hedge M, ed. Diagnosis of the Muscular Dystrophies. InTech, 2012.
3. Blake DJ, Weir A, Newey SE, Davies KE. Function and genetics of dystrophin and dystrophin-related proteins in muscle. Physiol Rev. 2002;82(2):291-329. Review.
4. Vainzof M, Anderson LV, McNally EM, Davis DB, Faulkner G, Valle G, Moreira ES, Pavanello RC, Passos-Bueno MR, Zatz M. Dysferlin protein analysis in limb-girdle muscular dystrophies. J Mol Neurosci. 2001;17(1):71-80.
5. Fanin M, Angelini C. Protein and genetic diagnosis of limb girdle muscular dystrophy type 2A: The yield and the pitfalls. MUSCLE & NERVE 2015;52(2):163-173.
6. Fanin M, Nascimbeni AC, Fulizio L, Trevisan CP, Meznaric-Petrusa M, Angelini C. Loss of calpain-3 autocatalytic activity in LGMD2A patients with normal protein expression. Am J Pathol. 2003;163(5):1929-36.
7. Renjini R, Gayathri N, Nalini A, Srinivas Bharath MM. Analysis of calpain-3 protein in muscle biopsies of different muscular dystrophies from India. Indian J Med Res. 2012;135(6):878-86.
8. Mahmood T, Yang PC. Western blot: technique, theory, and trouble shooting. N Am J Med Sci. 2012;4(9):429-34.
9. He, F. (2011). Laemmli-SDS-PAGE. Bio-protocol Bio101:e80. http://www.bio-protocol.org/e80
10. Larson G. Stabilized TMB Substrate for Horseradish Peroxidase vs. 4-chloro-1-naphthol: A comparison on Western blots. Promega Notes Magazine 1992;39:17-19.
11. Elbaggari A, McDonald K, Alburo A, Martin C. Imaging of Chemiluminiscent Western blots: Comparison of digital Imaging and X ray film. Imaging and Blotting 2008. Bio Rad Tech Notes 5809.
12. Beckmann JS, Spencer M. Calpain 3, the "gatekeeper" of proper sarcomere assembly, turnover and maintenance. Neuromuscul Disord. 2008;18(12):913-21.
13. Wesolowski LG, Delaney KP, Meyer WA 3rd, Blatt AJ, Bennett B, Chavez P, Granade TC, Owen M. Use of rapid HIV assays as supplemental tests in specimens with repeatedly reactive screening immunoassay results not confirmed by HIV-1 Western blot. J Clin Virol. 2013;58(1):240-4.
14. Centers for Disease Control and Prevention. Interpretation and Use of the Western Blot Assay for Serodiagnosis of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infections. Morbidity and Mortality Weekly Report 1989;38(S-7):1-7.
15. Richard I, Broux O, Allamand V, Fougerousse F, Chianni-Ikulchai N, Bourg N, Brenguier L, Devaud C, Pasturaud P, Roudaut C, et al. Mutations in the proteolytic enzyme calpain 3 cause limb-girdle muscular dystrophy type 2A. Cell. 1995;81(1):27-40.
16. Anderson LV, Davison K. Multiplex Western blotting system for the analysis of muscular dystrophy proteins. Am J Pathol. 1999;154(4):1017-22.