



UNIVERSIDAD MICHOCANA DE SAN NICOLAS DE HIDALGO

FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS Y BIOLÓGICAS

“DR. IGNACIO CHÁVEZ”

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

TESIS

**CARACTERIZACIÓN DE PROTEÍNAS PRESENTES EN ORINAS
DE PERROS CON DIFERENTES ENFERMEDADES RENALES,
MEDIANTE ELECTROFORESIS CAPILAR**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS DE LA SALUD**

PRESENTA:

MVZ IDALIA FUENTES AMBRUZ

DIRECTOR DE TESIS:

D.C. VIRGINIA ANGELICA ROBINSON FUENTES

MORELIA, MICH.A JULIO DE 2011



INTRODUCCIÓN

I.MARCO TEÓRICO

1 Anatomía y fisiología renal

1.1 Nefrona (nefrón): unidad funcional.

1.2 Fisiología de la filtración

2 Patofisiología de la enfermedad renal

2.1 Etiología de la enfermedad renal

2.2 Fisiopatología de la enfermedad renal

3 Proteinuria

3.1 Proteinuria en perros sanos

3.2 Fisiopatología de la proteinuria

4 Métodos para medición de funcionamiento renal

5 Antecedentes sobre identificación y/o medición de proteínas

5.1 Fundamentos de la electroforesis capilar

5.1.1 Aditivos

5.1.2 Aplicaciones de la Electroforesis Capilar

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

III. JUSTIFICACIÓN

IV. HIPÓTESIS

1 Objetivo General

2 Objetivos particulares

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

1 Tipo de estudio

2 Muestreo

3 Criterios de inclusión

4 Criterios de exclusión

5 Proteínas

6 Elección de las condiciones de análisis

7 Validación de las condiciones de análisis

8 Preparación de las Proteínas

9 Preparación de la muestra

VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1 Condiciones para el análisis

2 Condiciones para cada proteína

2.1 Albúmina

2.2 α 1 Antitripsina (A1AT)

2.3 α 1 glicoproteína ácida (A1GA):

2.4 α 2 macroglobulina (A2M):

2.5 Ceruloplasmina

2.6 Haptoglobina

2.7 Fibrinógeno

2.8 Proteína C Reactiva (CRP)

2.9 Transferrina

2.10 IgG

3 Análisis de proteínas en mezcla

4 Parámetros de validación

4.1 Linearidad

4.2 Precisión

4.3 Especificidad

5. Análisis de muestras

CONCLUSIONES

PERSPECTIVAS

BIBLIOGRAFIA

INTRODUCCIÓN

El perro es un importante modelo biológico (Rodríguez, 2007) y por su fin zootécnico debe cuidarse su salud (Marks, 1999). La enfermedad renal en perros (Beristain, 2009) es de gran relevancia, ya que dicho padecimiento representa la segunda causa de muerte no accidental en el mundo y suele detectarse hasta que ya se ha destruido entre el 70 y 80% de la función del riñón. En este momento los veterinarios detectan la enfermedad mediante las pruebas existentes. Por lo tanto, la detección temprana es la clave para la introducción de regímenes de dieta o terapéuticos que podrían ralentizar de forma considerable la progresión de la enfermedad y añadir mayor esperanza de vida al animal (Grieve, 2005).

La incidencia de falla renal varía de acuerdo a la etiología, pues existen varias patologías que suelen causar insuficiencia renal y que suelen estar influenciadas por factores como la edad, el género o la raza del paciente, pero se presenta comúnmente en perros de talla pequeña y geriátricos (a partir de los 7 u 8 años de edad) (Nelson y Couto, 2005). Dentro de las causas de alteraciones renales, se encuentran las formas hereditarias que pueden observarse en perros y gatos jóvenes en los cuales el desarrollo y la maduración normal de sus riñones han sido insuficientes. Sin embargo, las alteraciones renales se observan con mayor frecuencia en perros y gatos adultos, y son la consecuencia de los daños causados por enfermedades infecciosas, toxinas o alteraciones inmunológicas (Beristain, 2009).

Las afecciones del sistema urogenital han sido reportadas como la cuarta causa de presentación a consulta de perros en clínica veterinaria de Morelia, Michoacán. En lo que respecta a razas, es importante tener en cuenta que en las diferentes clínicas de la ciudad de Morelia, es mayor el porcentaje de perros mestizos que el de razas puras, lo que contribuye a una mayor incidencia en los perros de raza cruzada (Maldonado, 2003).

La enfermedad renal que se presenta repentinamente es llamada aguda. Si la progresión de la enfermedad es gradual, se denomina crónica (Beristain, 2009), la cual se caracteriza por ser irreversible. Tal suceso pone de manifiesto la enorme importancia que representa el poder detectar a tiempo una insuficiencia renal, es decir en fase aguda (Escalante, 2006).

La insuficiencia renal aguda (IRA) es un síndrome clínico caracterizado por una disminución brusca (horas a semanas) de la función renal, y como consecuencia de ello, los mecanismos compensadores de los riñones enfermos no son capaces de mantener sus funciones de conservación, excreción y endocrinas (Escalante, 2006).

La orina de perros sanos contiene una pequeña cantidad de proteínas que se pueden incrementar con ciertas patologías sistémicas, renales y urogenitales. Si las proteínas presentes son cadenas ligeras de inmunoglobulinas, se denominan proteínas de Bence Jones (cuyos pesos están entre los 22.5 a 45 kDa); y se encuentran en el 40% de los casos (Tizard, 2006). Las proteínas de Tamm Horsfall están presentes en la orina de perros sanos, son filtradas por el glomérulo y no se reabsorben en el túbulo; pueden ir acompañadas de células epiteliales de túbulos y vías urinarias bajas, enzimas, pequeñas cantidades de albúmina y proteínas de peso molecular alto. En un día, según Grauer, 2005, pueden eliminarse de 20 a 30 mg/Kg de proteínas en la orina (equivalente a aproximadamente 56 mg/dl).

De manera normal, las proteínas con un peso molecular mayor o igual a 70 kDa y un diámetro superior a 34 nm, no atraviesan la barrera glomerular. Esto es debido a la estructura que tiene cada proteína, ya que, aquellas con forma alargada atravesarán más fácilmente que aquellas con forma circular; también influye la interacción electrostática, y esto estará en función de la carga que tenga cada proteína (el glomérulo se caracteriza por tener carga negativa) (Zaragoza, 2001).

Si la cantidad de proteínas en orina excede a la concentración normal, a éste proceso se le denomina proteinuria, la cual constituye uno de los datos más importantes para el diagnóstico de la insuficiencia renal (a pesar de ser signo relevante de otras enfermedades sistémicas), pues es el factor aislado más importante para determinar el avance y progresión de la enfermedad renal (Miyahira, 2003).

En medicina veterinaria, es difícil diagnosticar la enfermedad renal en fase temprana ya que los signos clínicos son mínimos (solo leve incapacidad de concentrar la orina) y los mecanismos de compensación enmascaran la lesión. No obstante, es de vital importancia identificar y corregir las causas de lesión renal para prevenir mayor daño renal y

progresión de la misma (Ross, 2006). Esto puede lograrse mediante la caracterización de las proteínas en orina; en medicina humana se midió en función de su peso molecular (mediante ultracentrifugación o filtración en gel) con el fin de contribuir al diagnóstico de las enfermedades renales.

A lo largo de los años, se han presentado distintos métodos para la identificación de proteínas en suero y/o orina en humanos y animales, caracterizándose algunos por su alta especificidad pero baja sensibilidad; otros, a pesar de ser métodos prácticos, presentan la desventaja de no ofrecer un alto valor diagnóstico y la comercialización se limita a laboratorios de uso humano o centros veterinarios de Estados Unidos y Europa.

A partir de aquí, y en medicina veterinaria, el papel que la electroforesis desempeña en la separación e identificación de las proteínas urinarias en el perro suscitó interés desde la década de los sesenta (Zaragoza, 2001). Además, de acuerdo con el peso molecular de las proteínas detectadas en la orina, se puede localizar la lesión renal, clasificándola en glomerular, tubular o de tipo mixto. Por otro lado, en la orina de los perros aparentemente sanos pueden aparecer proteínas que, por los medios convencionales de detección, pasan inadvertidas y que mediante electroforesis podrían evidenciarse, lo que permite el establecimiento de un diagnóstico con prontitud (Chicharro, 2002).

Tradicionalmente, esta técnica ha sido aplicada en geles de poliacrilamida o agarosa, pero, a pesar de ser una de las técnicas de separación más ampliamente utilizadas, presenta como problemas la dificultad en la detección y la automatización, tiempos largos de análisis y bajas eficiencias. La técnica ha ido evolucionando a lo largo de los años, hasta que a partir de los años 60 se comenzó a desarrollar la técnica de electroforesis en columnas capilares (Zaragoza, 2001), dividida en diferentes modalidades dependiendo de las moléculas a determinar; en el caso específico de proteínas, las tres modalidades a elegir son Gel, Isoelectroenfoque y Zona, caracterizándose esta última por su simplicidad operacional y versatilidad, además de la posibilidad de separar especies pequeñas y de gran volumen. Debido a esto, en el presente trabajo de investigación, se eligió ésta modalidad por su gran versatilidad, rapidez, alta capacidad de resolución y eficiencia.

La electroforesis capilar (EC) se ha extendido al área biomédica, en el campo de las proteínas, péptidos, ADN, análisis de líquidos de perfusión, monitoreo de drogas, marcadores genéticos tumorales y neurobioquímicos, drogas xenobióticas, de abuso así como pericias forenses. En el área biofarmacéutica, dicha técnica se ha empleado para el control de calidad de productos farmacéuticos y biotecnológicos, quimioterápicos y de estructura quiral. También se ha aplicado en el área de alimentos y de control ambiental (Castagnino, 2000).

En el presente trabajo se planteó el desarrollo de métodos por Electroforesis Capilar de Zona (ECZ) para identificar las proteínas en orina de perros como una alternativa diagnóstica de enfermedad renal.

I.MARCO TEÓRICO

1 Anatomía y fisiología renal

Los riñones reciben alrededor del 25% del gasto cardiaco, filtran el plasma y los constituyentes plasmáticos de la sangre, y de este modo resorben de manera selectiva el agua y las sustancias útiles del filtrado y excretan finalmente el exceso y los productos de desecho del plasma (Frandsen y Spurgeon, 1995). Además producen y liberan hormonas que juegan una función vital en el control de la presión sanguínea sistémica y en la producción de glóbulos rojos, manteniendo así la homeostasis del cuerpo (Cunningham, 2005).

1.1 Nefrona (nefrón): unidad funcional.

La unidad anatómica y funcional del riñón es el nefrón (Alanís, 1988). Se estima que en cada riñón en el perro existen un total de 400, 000 nefronas, en el gato 200,000 y 1,000, 000 en el hombre (Steinhausen *et al.*, 1990). El nefrón está compuesto del corpúsculo renal y de túbulo contorneado proximal, asa de Henle y túbulo contorneado distal, continuado por el túbulo colector (Steven y Lowe, 1998).

1.2 Fisiología de la filtración

Una de las principales funciones del glomérulo es permitir la filtración de moléculas pequeñas, como el sodio, urea y agua, mientras restringe el paso de moléculas grandes. Esto permite al riñón mantener la homeostasis por la excreción de desechos nitrogenados derivados de la dieta, mientras se preservan las moléculas proteicas esenciales mayores del plasma (Schwartz y Furth, 2007). El paso potencial de una sustancia a través de la barrera de filtración glomerular (del plasma al ultrafiltrado) en individuos sanos depende de: a) el tamaño molecular: cerca del 100% de las moléculas con radio <2.5 nm la atravesarán. Casi ninguna molécula con radio >3.4 nm la pasará; b) La carga eléctrica: sustancias cargadas positivamente y eléctricamente neutras pasan la barrera mejor que las sustancias con cargas negativas debido a que la membrana basal contiene moléculas cargadas negativamente (Stockham y Scott, 2008), moléculas más cationicas son más permeables, y c) la presión capilar (Mc Gavin y Zachary, 2007).

El paso de moléculas a través del filtro glomerular depende, por tanto, de la concentración plasmática, tamaño molecular, estructura y carga eléctrica. El tamaño de la proteína parece ser el factor más determinante a la hora de atravesar la membrana basal del glomérulo. En general, proteínas con un peso molecular mayor o igual a 70 kDa y un diámetro superior a 34 nm no atraviesan la barrera glomerular (Zaragoza, 2001).

2 Patofisiología de la enfermedad renal

Numerosas enfermedades pueden producir un deterioro morfológico y funcional de los riñones, resultando en incapacidad para llevar a cabo sus misiones de excreción y regulación. Si esta inoperancia funcional se instaura de manera progresiva, se acompaña de inutilización de los nefrones y se expresa mediante una disminución lenta y progresiva del filtrado glomerular hablamos de la insuficiencia renal crónica.

La enfermedad renal crónica se define como el daño renal mantenido durante al menos 3 meses, manifestado por alteraciones en la composición de sangre u orina y/o disminución de la función renal con filtrado glomerular, con o sin daño renal (Pérez, 2005). La insuficiencia renal crónica aparece cuando más del 75% de los nefrones funcionales se ven dañados (Foyer, 2006).

2.1 Etiología de la enfermedad renal

Según Alanis (1988) las etiologías de enfermedad renal más comunes incluyen: insuficiencia renal aguda irreversible, displasia y aplasia renal congénita, enfermedades glomerulares (glomerulonefritis, amiloidosis), enfermedades túbulo-intersticiales (pielonefritis, enfermedades renal idiopática) y neoplasias (linfoma).

2.2 Fisiopatología de la enfermedad renal

Debido a que el tejido renal tiene limitadas vías de respuesta a las enfermedades que sufre, los patrones de lesiones y su evolución que inicialmente pudieron ser distintivos en enfermedades severas y prolongadas suelen terminar en un punto terminal similar de enfermedad e insuficiencia renal crónica (Mc Gavin y Zachary, 2007). La causa primaria responsable del comienzo del proceso de daño renal (que puede ser congénita, familiar o adquirida) está frecuentemente ausente o es irreconocible cuando se realiza el diagnóstico de la enfermedad renal crónica (Barrera, 2007).

3 Proteinuria

3.1 Proteinuria en perros sanos

Bajo condiciones normales la orina canina y felina contiene sólo una cantidad reducida de proteínas. Las proteínas con peso molecular mayor de 60 mil a 65 mil daltones habitualmente no se presentan en grandes cantidades en el filtrado glomerular. La pared capilar glomerular de carga negativa impide el paso de las proteínas de cargas negativas como la albúmina (Grauer, 2007). La proteína urinaria también proviene de la secreción de enzimas, mucoproteínas e inmunoglobulinas por las células epiteliales tubulares y urogenitales inferiores. Estas proteínas secretadas pueden explicar hasta el 50% de la proteína que suele estar presente en la orina (Nelson y Couto, 2005).

3.2 Fisiopatología de la proteinuria

La proteinuria extrarrenal ocurre en asociación con inflamación o hemorragia urinaria inferior. La proteinuria renal a menudo está causada por lesiones glomerulares y proporciones de proteína:creatinina urinaria que superan un valor de 3 (Nelson y Couto, 2005). Los cambios en la permeabilidad vascular de las paredes de los capilares glomerulares pueden permitir el paso de proteínas de peso molecular alto; cambios en la membrana (selectividad en el tamaño de las moléculas) y cargas iónicas anormales (selectividad de carga) pueden ser la causa de la proteinuria (Nuñez, 1998).

Las células mesangiales dañadas producen acumulación de lipoproteínas y productos de su oxidación, que, a su vez, causan incrementos en la producción de matriz, conduciendo a la activación de los monocitos y la producción de factores de crecimiento que promueven la esclerosis, causando quimiotaxis de células inflamatorias dentro del intersticio renal y formación de cicatrices en el riñón, como consecuencia de acciones fibrogénicas (Nuñez, 1998).

La proteinuria suele detectarse con los métodos semicuantitativos (tiras colorimétricas y reacción turbidimétrica del ácido sulfosalicílico). Pueden obtenerse resultados positivos falsos si la orina es alcalina (Grauer, 2007). La proteinuria detectada con estos métodos debe interpretarse considerando la densidad y sedimento de la orina. La proteinuria

también debe valorarse en el contexto de los cambios del sedimento indicativos de inflamación o hemorragia (Nelson y Couto, 2005; Grauer, 2007).

La proteinuria ocasiona hipertensión en los capilares glomerulares y daño en la permeabilidad de la barrera en las paredes glomerulares. Las proteínas perdidas a través de los glomérulos, son captadas por endocitosis de las células del túbulo proximal. Esto causa una sobrecarga en estas células, conduciendo a la activación intrarrenal de la enzima convertidora de la angiotensina (ACE), así como la activación citocinas que favorecen la fibrosis, apoptosis e infiltración de monocitos, que aceleran el grado de daño renal. Todo este mecanismo origina que la presión sanguínea sistémica se eleve. Por ello, la proteinuria es un fuerte factor predictor de la falla renal (Yu, 2003).

4 Métodos para medición de funcionamiento renal

Los métodos de rutina para valorar la función renal han permanecido sin cambios por muchos años (MacGregor et al., 2006). A lo largo de los años, se han presentado distintos métodos para la identificación de proteínas en suero y/o orina en humanos y animales, caracterizándose algunos por su alta especificidad pero baja sensibilidad, otros a pesar de ser métodos prácticos, presentan la desventaja de no ofrecer un alto valor diagnóstico y la comercialización se limita a laboratorios de uso humano o centros veterinarios de Estados Unidos y Europa.

5 Antecedentes sobre identificación y/o medición de proteínas

En medicina veterinaria, es difícil diagnosticar la enfermedad renal en fase temprana ya que los signos clínicos son mínimos (solo leve incapacidad de concentrar la orina) y los mecanismos de compensación enmascaran la lesión. No obstante, es de vital importancia identificar y corregir las causas de lesión renal para prevenir mayor daño renal y progresión de la misma (Ross, 2006) mediante la caracterización de las proteínas en orina; en medicina humana se dieron en función de su peso molecular (mediante ultracentrifugación o filtración en gel) con el fin de contribuir al diagnóstico de las enfermedades renales.

Los diferentes métodos para realizar la identificación de proteínas se describen en la Tabla 1.

Tabla 1. Técnicas de separación para determinar proteínas

Proteína	Peso molecular kDa	Técnica de determinación	Condiciones	Ventajas/ desventajas
Albumina	69	Azul Tetra bromofenol con pH ácido Ziauddin y Lee, 1997	Método convencional de EGO y tira reactiva (tinción)	* Alta sensibilidad para albúmina. * No detecta globulinas ni proteínas de Bence Jones. * Falso positivo con pigmenturia, oxiglobina, desinfectantes basados en amonio, clorhexidina u orina muy alcalina (pH mayor a 8).
		Método de Biuret Rodríguez, 2004	Espectrometría (violeta)	* Diversos factores pueden causar un falso incremento en la medición total. * Solo para suero no lipémico.
		ERD (Health Screen Canine Urine Test) Heska, 2005	Refractometría	* Resultado semicuantitativo (alta/muy alta).
		Uldum, Denmark Fernández y Galván, 2006.	Test	* Resultados limitados a positivo/negativo.
		Medición de microalbuminuria Turbidimetría (Test) Bernard y Lauwerys, 1983.	Tampón borato/ partículas de látex sensibilizadas con anticuerpos anti albúmina azida sódica	* Se obtienen resultados bajos en muestras con una concentración de albúmina superior a 700 mg/L.
		Ensayo inmunturbidimétrico González, 2009	Test	✓ Útil en humanos, aún no validado en perro dado la diferencia en resultados.
		Proteómica basada en espectrometría de masas Wu et al, 2010	HPLC Con detección de EM	✓ Requiere estandarización, protocolo para preparación de muestras, validación de técnica y potencial de biomarcadores. * Equipo costoso

		Electroforesis en gel Zaragoza, 2001	Agarosa	✗ No se puede realizar una cuantificación menor a 400 mg/L.
		Electroforesis en gel Hamilton, et al, 1989	Enfoque isoelectrico (IEF) anfolitos pH 3.5 a 5.5	✓ EIF: requiere anfolitos para gradientes de pH.
		Electroforesis en chip Chan y Herold., 2006 Pandey et al, 2008.	Kit (SDS- polidimetilacrilamida)	✗ Sensibilidad, precisión y rapidez. ✗ Únicamente proteínas con peso molecular entre 15 y 250 kDa.
		Electroforesis capilar Kim et al, 1993.	Buffer borato de sodio pH 9.4 50 mM	✓ Sensibilidad, precisión y rapidez.
		Electroforesis capilar de zona Lehmann et al, 1997. Castañón et al, 2006.	Citrato de Sodio pH 8.6' Ácido bórico 150 y 350 mM tituladas a un pH de 9.9 con NaOH	✗ Sensibilidad, precisión y rapidez.
α 1 antitripsina	54	Nefelometría Ferrer y Aznar, 1996	Medición de A1AT en sangre	✓ Alta especificidad ✗ Técnicas previas para su identificación
		Inmunolectroforesis Biogenex, 2004	Anti A1AT policlonal	✗ Sesgo en el análisis global de estudio.
		Electroforesis en gel con enfoque isoelectrico Menéndez et al, 1995	Bajo gradientes de pH	✗ Método específico vías respiratorias. ✗ Requiere anfolitos para gradientes de pH.
		Electroforesis capilar con enfoque isoelectrico Gorini et al, 2005.	Enfoque isoelectrico Fosfato de Na y K 0.2 M con CaCl ₂ 2mM Anfolitos pH 3.5 a 5	✗ Sensibilidad, rapidez, micro y macromoléculas. ✗ Requiere anfolitos para gradientes de pH.
α 1 glicoproteína ácida	41	Método nefelométrico Fauchier y Catalán, 1988.	Antisuero policlonal Títulos de anticuerpos Calibradores y controles de proteínas	✓ Específico en esta proteína ✗ Sensibilidad 0.5 a 1.2 g/L
		Electroforesis capilar Nashaben y El Rassi, 1991.	Zona Acetato de amonio 100 mM y CaCl ₂ 0.1mM pH 8.3	✓ Método específico, rápido y sensible.
α 2 macroglobulina	820	ELISA KBC, 1994.	Test	✓ Especificidad del 80%

		Electroforesis en gel Benitez et al, 2010	Agarosa	✓ Precisión
Ceruloplasmina	132	Método nefelométrico Radim, 2005	Antisuero policlonal Títulos de anticuerpos Calibradores y controles de proteínas	✓ Específico en esta proteína ✗ Sensibilidad 0.2 a 0.6 g/L
		Electroforesis Shreffler y Brewer, 1967.	Gel poliacrilamida	✗ Sensibilidad, pero poca rapidez.
Haptoglobina	85	Método nefelométrico Radim, 2005	Antisuero policlonal Títulos de anticuerpos Calibradores y controles de proteínas	✓ Específico en esta proteína ✗ Sensibilidad 0.30 a 2.0 g/L
		Electroforesis Compton et al, 1976.	Gel Acetato de celulosa	✗ Especificidad, poca velocidad. ✗ Análisis junto a hemoglobina.
Fibrinógeno	340	Medición inmunológica Revert y La Huerta, 1998.	Fibrinógeno Clauss Tampón QFA MOPS 7	✗ Sistemas de coagulación electra.
		Electroforesis en gel Cortelazzo y Cardona, 2010	Poliacrilamida bidimensional	✗ Alta especificidad, poca sensibilidad
Proteína C Reactiva	185	Método turbidimétrico Riedemann y Duffau, 2006.	TRIS 7.5	✗ Sensibilidad 0.1 mg/dl a 1 mg/L. ✗ Muestras de pacientes con gammopatías monoclonales pueden mostrar precipitación y turbidez cuando se mezclan con el buffer.
		Método nefelométrico Radim, 2005	Antisuero policlonal Títulos de anticuerpos Calibradores y controles de proteínas	✓ Específico en esta proteína ✓ Sensibilidad <5.0 mg/L a <0.3 mg/dL
		Electroforesis capilar Rikihisa et al, 1994.	Zona Citrate 0.05 M pH 4.2	✗ Sensibilidad, rapidez, especificidad.
Complemento	180	Tampón imidazol	Calibradores de proteínas Espectrofotómetro	✗ Se obtienen resultados falsamente bajos en muestras con una concentración de C3

		Byosistem, 2007		superior a 1500 mg/dL.
		Electroforesis en gel Volanakis y Barnum, 1985	Gel de Agarosa	✖ Poca sensibilidad.
Transferrina	79	Test inmunoturbodimétrico Transferrina FS, 2005	Medición fotométrica de la reacción antígeno- anticuerpo	✖ Limite inferior 3 mg/dL.
		Electroforesis capilar Landers y Prasad, 1997.	Buffer polimérico	✖ Sensibilidad, rapidez.
IgG	150	Inmuno Nefelometría cuantitativa Inmuno Turbidimetría Radim, 2005	Antígenos	✖ Específico para inmunoglobulinas.
		Inmuno electroforesis NSC, 2010	Antisuero poli específico	✖ Análisis cualitativo.
		Electroforesis en gel Zaragoza et al, 2003.	Agarosa	✖ Poca sensibilidad. ✖ Alta especificidad.
		Electroforesis capilar Chen y Lee, 2002.	Zona	✖ Alta sensibilidad. ✖ Recomendado para diagnóstico de muchas enfermedades a nivel inmunológico.

Existen diversas técnicas de separación para identificar las proteínas tratadas en este estudio. La albúmina, por ejemplo, es la proteína más analizada debido a su alta concentración en plasma; se han desarrollado test comerciales (azul tetrabromofenol, Biuret, ERD) para identificarla de manera cuantitativa y/o cualitativa en suero y orina de humanos y animales. Estas técnicas se caracterizan por ser rápidas, sin embargo no presentan la sensibilidad necesaria, pues la mayoría solo detecta si hay presencia o no mediante tinciones y marcajes. Se han desarrollado también, técnicas más específicas, que se caracterizan por su alta especificidad, la electroforesis en gel de agarosa, ha sido una de las técnicas más empleadas; sin embargo, los procedimientos para analizarla son largos y no del todo sensibles como la electroforesis en microchip o electroforesis capilar; que se ha realizado en modo zona y se han obtenido resultados satisfactorios al analizarla junto con otras proteínas como α 1 glicoproteína ácida e inmunoglobulinas (Lehmann y Koch, 1997; Castañón et al, 2006).

La mayoría de las proteínas han sido analizadas específicamente en suero de humanos para determinar enfermedades particulares, como la α 1 antitripsina, cuyos métodos de identificación los aplican para diagnosticar enfermedades de vías respiratorias (Ferrer y Aznar, 1996). La α 2 macroglobulina ha sido una proteína poco analizada en electroforesis capilar; sin embargo, se ha analizado en suero de humano para detectar el mal de Parkinson y problemas hepáticos (Benítez et al, 2010). La ceruloplasmina ha sido analizada en el suero de humanos por ser la principal transportadora de cobre sanguíneo y su disminución genera insuficiencias hepáticas; sin embargo, no ha sido analizada en orina de animales (solo de humanos para detectar la administración de anticonceptivos orales). La haptoglobina, es una proteína analizada en gran medida, ya que se caracteriza por ser transportadora de la hemoglobina, esto conlleva a la desventaja de siempre ser analizadas de forma conjunta, reduciendo la especificidad del análisis en cuestión (Shreffler y Brewer, 1967).

El fibrinógeno, se caracteriza por analizarse en suero como fibrina, éste ha sido determinado en el humano y en caso de ser eliminado por orina, lo hace en muy pequeñas cantidades, motivo por el cual, no se le ha dado la importancia requerida para realizar su identificación (Cortelazzo y Cardona, 2010). La Proteína C Reactiva, es una de las pocas proteínas que se han analizado en suero de perros, ya que su eliminación tiende a elevarse en problemas de erlichiosis y está clasificada como una proteína de fase aguda en ésta enfermedad, motivo por el cual se analiza en procesos inflamatorios tanto en humanos como animales (Revert y La Huerta, 2008). Las proteínas restantes (Transferrina, complemento) han sido analizadas en menor medida en suero de humanos, mediante métodos nefelométricos y electroforesis en gel (Landers y Prasad, 2007).

5.1 Fundamentos de la electroforesis capilar

A partir de aquí, y en medicina veterinaria, el papel que la electroforesis desempeña en la separación e identificación de las proteínas urinarias en el perro suscitó interés desde la década de los sesenta (Zaragoza, 2001) al caracterizarse como una técnica fundamental que permite la separación de las proteínas en función de su peso molecular. Con los datos que proporciona, la proteinuria puede ser clasificada en prerrenal, renal o postrenal, con la determinación de la etiología de la enfermedad. Además, en función del peso molecular de las proteínas detectadas en la orina, se puede ayudar a localizar la lesión renal,

clasificándola en glomerular, tubular o de tipo mixto. Por otro lado, en la orina de los perros aparentemente sanos pueden aparecer proteínas que, por los medios convencionales de detección, pasan inadvertidas y que mediante electroforesis pueden evidenciarse, lo que permite el establecimiento de un diagnóstico con prontitud (Chicharro, 2002).

Tradicionalmente, esta técnica ha sido aplicada en geles de poliacrilamida o agarosa, pero, a pesar de ser una de las técnicas de separación más ampliamente utilizadas, presenta como problemas la dificultad en la detección y la automatización, tiempos largos de análisis y bajas eficiencias. La técnica ha ido evolucionando a lo largo de los años, hasta que a partir de los años 60 se comenzó a desarrollar la técnica de electroforesis capilar en columnas capilares (Zaragoza, 2001), dividida en diferentes modalidades dependiendo de las moléculas a determinar; en el caso específico de proteínas, las tres modalidades a elegir son Gel, Isoelectroenfoque y Zona, caracterizándose esta última por su simplicidad operacional y versatilidad, además de la posibilidad de separar especies pequeñas y de gran volumen. Debido a esto, en el presente trabajo de investigación, se eligió ésta modalidad por su gran versatilidad, rapidez, alta capacidad de resolución y eficiencia.

La electroforesis capilar (EC) es una técnica que separa moléculas cargadas o no cargadas en un capilar delgado lleno de solución buffer por la aplicación de voltajes altos. La EC combina la separación selectiva de la electroforesis estándar con la precisión y control de instrumentación de la cromatografía de alta resolución (Stocking et al., 1998). La electroforesis se refiere a la migración de especies eléctricamente cargadas en solución o suspensión en un electrolito, cuando se les hace pasar una corriente. Las separaciones por EC son extremadamente rápidas: algunas son obtenidas en menos de 5 minutos (Jenkins, 2000).

La movilidad de un ión en un medio particular es constante y característica de ese ión. La movilidad del ión es resultado de dos factores. El ión es atraído al electrodo de carga contraria, jalándolo a través del medio. Al mismo tiempo, las fuerzas friccionales tratan de prevenir el movimiento. El balance de ambas determina la movilidad total. Un ión pequeño tendrá menor fuerza friccional y por tanto, se moverá a través del capilar más rápido que

uno más grande. De manera similar, un ión con carga múltiple experimentará más atracción al electrodo y se moverá más rápido.

Los componentes básicos de un sistema de electroforesis incluyen una fuente de voltaje (que proporcione hasta 60 kV), un capilar de sílice fundida con un diámetro interno de menor a 200 μm , 2 reservorios con buffer donde se introducen cada uno de los extremos del capilar y un par de electrodos (platino), también en cada extremo, conectados a la fuente de voltaje, y un detector.

El capilar es llenado con el buffer al pH deseado, la muestra se diluye en buffer para ser introducida en capilar y se aplica el voltaje, entonces las especies iónicas de la muestra migran a través del capilar de acuerdo a su movilidad electroforética. Eventualmente las moléculas pasan por el detector (UV) y se registra la señal en el mismo. Dicha señal analítica se conoce como electroferograma (EFG). La movilidad electroforética es una propiedad característica de cada partícula y está determinada por su carga y masa. Puede calcularse a partir de la teoría de Debye-Huckel-Henry (ecuación 1) donde la movilidad está dada por la carga de la partícula (q), la viscosidad del buffer (η) y el radio de Stokes la partícula (γ) (Altria, 1999; Linhardt y Toida, 2002).

La separación en electroforesis está basada en las diferencias de velocidad de migración de los solutos en un campo eléctrico. La velocidad de un ión está en función de su movilidad electroforética y del voltaje aplicado en los capilares de diámetro interno reducido (20-200 μm d.i.) para realizar separaciones eficientes tanto de moléculas pequeñas como grandes (Robinson-Fuentes, 2006). En la práctica, la movilidad electroforética ($\mu_{ep}=\text{cm}^2/\text{Vs}$) se calcula a través de la velocidad electroforética ($v_{ep}=\text{cm/s}$) y la fuerza del campo eléctrico ($E=\text{V/cm}$), la relación entre estos factores se muestran en la ecuación 2.

$$\mu_{ep} = \frac{-q}{6\pi\eta\gamma} \quad (1)$$

$$\mu_{ep} = \frac{v_{ep} - L_d/t_m}{E V/Lt} \quad (2)$$

Donde la velocidad electroforética se mide a través de la longitud del capilar hasta el detector (L_d) y el tiempo de migración (t_m), es decir el tiempo que le toma a un soluto moverse desde la entrada del capilar hasta la ventana del detector. La fuerza del campo

eléctrico está determinada por el voltaje aplicado (V) en la longitud total del capilar (L_T). La μ_{ep} es independiente del voltaje y la longitud del capilar, pero es altamente dependiente del tipo de buffer y pH (Beckman, 1991).

Además de la movilidad electroforética, otra fuerza que rige el proceso electroforético es el flujo electrosmótico (EOF, del inglés, Electrosmotic flow). Este fenómeno se produce a consecuencia de la superficie cargada de la pared del capilar. Los capilares de sílice fundida tienen grupos silanol (Si-OH) que cuando se ionizan (en contacto con el buffer) producen una carga negativa. Las paredes cargadas negativamente atraen iones cargados positivamente, creando una doble capa eléctrica.

El grado de ionización es controlado principalmente por el pH de buffer y cuando se aplica el voltaje a través del capilar, los cationes en la parte difusa de la doble capa migran en dirección al cátodo, arrastrando agua con ellos. El resultado es un flujo neto de solución buffer en dirección al electrodo negativo. El EOF se genera en toda la longitud del capilar, es pequeño a pH bajo y alcanza su máximo a pH 11. Gracias al EOF es posible el análisis simultáneo de especies neutras, cationes y aniones, pues el EOF actúa como una bomba que impulsa todas las moléculas hacia el detector (Ciccone, 2001; Odda y Landers, 1996).

En la EC, la separación de los analitos se basa en sus movilidades electroforéticas diferenciales, pero se discute en términos de resolución y eficiencia. La resolución es esencialmente una medida de calidad de una separación y la eficiencia se refiere a que tan estrechos son los picos. Basados en el ancho del pico a la mitad de la altura del pico, de forma similar que en la cromatografía de líquidos las eficiencias se calculan en términos de platos teóricos, a mayor número de platos teóricos, la separación es más eficiente. El cálculo de la resolución usa el tiempo de migración de dos picos y el ancho de la base de los picos. A mayor resolución, mejor separación de 2 picos. Entre mejor separación, los resultados del análisis son más confiables (Harris, 2001; Desai y Armstrong 2003) (Figura 1).

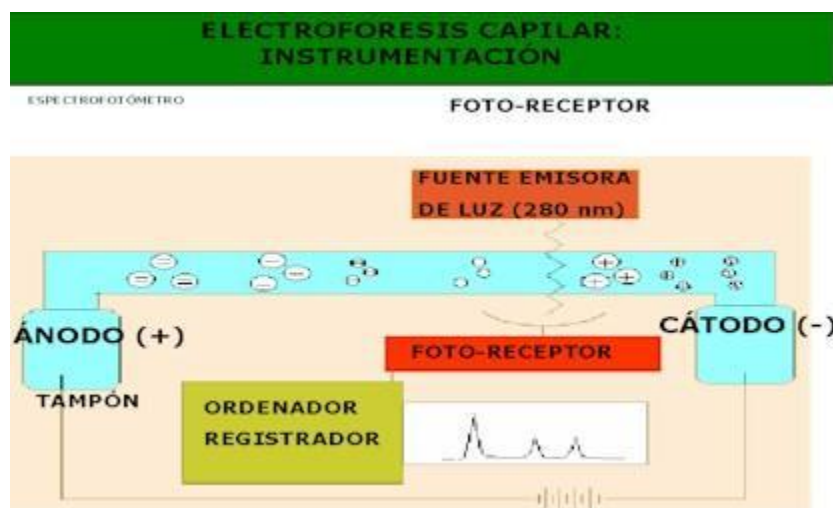


Figura 1. Instrumentación de la Electroforesis capilar.

Los principales parámetros a considerar en un análisis electroforético son el voltaje aplicado, el pH y concentración del buffer así como la longitud del capilar. El aumento o disminución de estas condiciones determinan variablemente la migración y por lo tanto la exitosa separación de los componentes de la muestra a través del capilar (Odda y Landers, 1996).

La EC ha tenido una gran aceptación ya que ofrece algunas ventajas sobre la electroforesis convencional que son:

- Posibilidad de automatización.
- Menores tiempos de análisis.
- Uso de voltajes más altos.
- El calor generado se disipa fácilmente por las paredes del capilar.
- La detección de las bandas puede realizarse dentro del capilar mismo.

5.1.1 Aditivos

Varias sustancias pueden ser agregadas a los buffers para modificar las movilidades electroforéticas formando entornos heterogéneos que puedan definir nuevos sistemas fisicoquímicos de la EC (Castagnino, 1999).

5.1.2 Aplicaciones de la Electroforesis Capilar

La electroforesis capilar (EC) se ha extendido al área biomédica, en el campo de las proteínas, péptidos, ADN, análisis de líquido de perfusión, monitoreo de drogas, marcadores genéticos tumorales y neurobioquímicos, drogas xenobióticas, de abuso así como pericias forenses. En el área biofarmacéutica, dicha técnica se ha empleado para el control de calidad de productos farmacéuticos y biotecnológicos, quimioterápicos y de estructura quiral. En el área de alimentos, se le aplica al fraccionamiento y cuantificación de aminoácidos, hidratos de carbono, ácidos orgánicos, aditivos y contaminantes. En el área de control ambiental, permite la identificación de contaminantes y sus metabolitos, pesticidas, metales pesados e hidrocarburos (Castagnino, 2000).

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

¿Es posible analizar mediante la electroforesis capilar de zona 11 proteínas que más comúnmente se podrían encontrar en perros con proteinuria?

III. JUSTIFICACIÓN

Dada la importancia que tiene la enfermedad renal al ser una de las principales causas de muerte en perros, se pretende contar con herramientas de diagnóstico de proteinuria en perros enfermos, de preferencia en su fase temprana.

En numerosas ocasiones la enfermedad renal no se detecta sino hasta que entre el 70 y 80% de la función del riñón ya se ha destruido. La detección temprana es la clave para la introducción de regímenes de dieta o terapéuticos que podrían ralentizar de forma considerable la progresión de la enfermedad y añadir mayor esperanza de vida al animal.

La proteinuria constituye uno de los datos más importantes para el diagnóstico de la enfermedad renal; existen varios métodos para diagnosticarla, sin embargo, éstos presentan como problemas la dificultad en la detección y la automatización, tiempos largos de análisis y bajas eficiencias. Es por esto, que la electroforesis capilar puede representar alternativa pues permite la separación de las proteínas en función de su peso molecular.

Por otro lado, en la orina de los perros aparentemente sanos pueden aparecer proteínas que, por los medios convencionales de detección, pasan inadvertidas y que mediante electroforesis pueden evidenciarse, lo que permite el establecimiento de un diagnóstico con prontitud.

IV. HIPÓTESIS

Se podrá identificar la presencia de proteinuria en etapa temprana en perros con enfermedad renal mediante electroforesis capilar de zona

V. OBJETIVOS

1 Objetivo General

Identificar y cuantificar la presencia de proteínas en orina de perros en etapa temprana de enfermedad renal.

2 Objetivos particulares

- ☒ Evaluar el efecto de las condiciones (tipo de buffer, pH, concentración y aditivos) en la respuesta electroforética de las proteínas.
- ☒ Aplicar las condiciones favorables a la separación de mezcla de proteínas.
- ☒ Aplicar la metodología desarrollada a la detección de proteínas en orina de perros sanos y perros con alguna enfermedad renal.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

1 Tipo de estudio

Analítico, experimental, prospectivo.

2 Muestreo

En la ciudad de Morelia Michoacán, se contactó a los Médicos Veterinarios que suelen diagnosticar la enfermedad renal en perros. Se les pidió apoyo para recolectar las muestras de orina de pacientes que tuvieran como signo la proteinuria, pero que estuvieran libres de infección en vías urinarias; esto se determinó mediante examen general de orina (EGO).

Previo Historia Clínica y Examen Físico, se tomó la muestra de orina mediante cistocentesis, se almacenó en tubos de polipropileno de 5 ml con cierre hermético y se conservaron a -70°C para no alterar las proteínas existentes en la orina.

Se tomaron además, muestras de orina de pacientes “aparentemente sanos”, con previa historia clínica, examen físico y análisis de orina, para realizar la identificación de proteínas que normalmente existen en el paciente y así hacer el comparativo con pacientes enfermos.

Se realizó el proceso de selección de las muestras de orina de pacientes enfermos, contemplando solo los que presentaran las enfermedades comúnmente diagnosticadas en consulta.

3 Criterios de inclusión

- ✓ Perros que acudan a consulta en clínicas veterinarias de la ciudad de Morelia Michoacán.
- ✓ Pacientes con Historia clínica y examen físico completo.

4 Criterios de exclusión

- ✗ Pacientes con tratamiento previo a la toma de muestra.
- ✗ Pacientes que presenten infecciones en vías urinarias.

5 Proteínas

Se utilizaron 11 proteínas estándar que se esperaba encontrar en la orina de pacientes enfermos (Tabla 2) con la finalidad de obtener sus patrones electroforéticos.

Tabla 2. Proteínas esperadas en orina de perros

Proteína	PM (kDa)	Concentración
Albúmina	69	29 a 36 g/L
α 1 Antitripsina	54	28 a 42 g/L
α 1 glicoproteína ácida	41	
α 2 macroglobulina	820	
Ceruloplasmina	132	
Complemento	180	
Haptoglobina	85	
Proteína C Reactiva	185	
Transferrina	79	2 a 4 g/L
Inmunoglobulinas	150	
Fibrinógeno	340	

*Total: 50 a 78 g/L en plasma

Cada una de las proteínas fue disuelta en agua desionizada a una concentración de 200 μ g/ml y cargadas en el vial de muestra de electroforesis capilar.

Las concentraciones mencionadas son las referidas en suero de perros, éstas jamás han sido calculadas de manera individual tanto en pacientes humanos como animales, solo agrupadas en albúmina, globulinas y fibrinógeno (Bsava, 2005).

Las proteínas mencionadas en la tabla 2, son las que se han encontrado en plasma de perros en algunos reportes (Bsava, 2005); éstas, se caracterizan por cumplir funciones de regular la presión oncótica en la sangre, como solución tampón que regula el pH sanguíneo, transporte de hormonas, transporte de drogas, coagulación y en fase aguda como respuesta al proceso inflamatorio (a través del hígado).

6 Elección de las condiciones de análisis

Las condiciones se estandarizaron usando un equipo de electroforesis capilar marca Beckman P/ACE MDQ usando capilares de sílice fundida (Polymicro Tech, Phoenix, USA) de 75 μ m de diámetro interno (d.i), 362.6 μ m de diámetro externo, 60 cm de longitud total

y 50 cm de longitud al detector. Se usó un detector de UV a 214 nm, la temperatura del capilar se mantuvo a 22°C, el voltaje es de 25 KV. Los tiempos de análisis se ajustaron a 20 minutos., Se probaron diferentes tipos de buffer, pH, concentraciones y aditivos (Tabla 3).

Tabla 3. Condiciones probadas (naturaleza del buffer de corrimiento, concentraciones, pH y aditivos) para el análisis de proteínas estándar.

Condiciones probadas para cada proteína
Citrato/MES pH 6 50 mM
Tricina pH 8.4 (25, 50, 75 y 100 mM)
Tricina pH 8.8 (25, 50, 75 y 100 mM)
HEPES pH 7 (25, 50, 75 y 100 mM)
HEPES pH 8 (25, 50, 75 y 100 mM)
MOPS pH 6 (25, 50, 75 y 100 mM)
MOPS pH 7 (25, 50, 75 y 100 mM)
Aditivos:
CaCl₂ 2, 3 y 6 mM
MgCl₂ 2, 3 y 6 mM
SDS 3 mM
Tritón-100 3 mM

Los buffer se prepararon pesando la cantidad de sal correspondiente y disolviéndola en agua bidestilada. El pH se ajustó con NaOH 1N o HCl 1N en un pH metro (Accumet Basic AB15, Fisher Scientific). Los buffers se prepararon semanalmente conservándolos a 2°C en frascos de vidrio cubiertos de parafilm y papel aluminio.

Condicionamiento del capilar

Antes del inicio de cada sesión de trabajo, el capilar se enjuaga con solución de HCl 0.1 N durante 0.5 minutos a 20 psi seguido de agua destilada y posteriormente buffer de lavado durante 2 minutos con una presión de 20 psi; en seguida se realiza la inyección del electrodo en la muestra por 15 segundos y durante 15 minutos en el buffer con su respectivo aditivo y terminar en la inmersión del buffer de separación.

7 Validación de las condiciones de análisis

Cada proteína se preparó en tres concentraciones diferentes (Tabla 4), y se realizaron los análisis de las proteínas en el buffer y concentración elegidos, realizando al menos tres repeticiones por día, por cada concentración, y por tres días consecutivos con la finalidad

de evaluar los parámetros de validación del método (linealidad, reproducibilidad, precisión y exactitud).

Tabla 4. Concentraciones utilizadas para las 11 proteínas estándar.

Proteína	Concentraciones (µg/ml)
Albúmina	500, 1000, 2000
Transferrina	500, 1000, 2000
α1 Antitripsina	500, 1000, 2000
α1 glicoproteína ácida	500, 1000, 2000
Complemento	20, 30 50
Ceruloplasmina	25, 50, 100
C Reactiva	23, 50, 100
Haptoglobina	100, 200, 400
α 2 Macroglobulina	100, 200, 500
IgG	500, 1000, 2000
Fibrinógeno	500, 1000, 2000

*Las concentraciones radican en la disponibilidad de cada proteína.

8 Preparación de las Proteínas

Cada una de las proteínas estándar fue disuelta en agua desionizada a una concentración de 200 µg/ml y cargadas en el vial de muestra de electroforesis capilar.

9 Preparación de la muestra

Las muestras de pacientes sanos y enfermos, fueron almacenadas en un ultracongelador a -70°C con la finalidad de no alterar la estructura de las proteínas contenidas. Previo a su análisis, se sacaron del ultracongelador y se dejaron a temperatura ambiente hasta que estuvieran descongeladas. Se centrifugaron a 10 000 G durante 1 minuto (Eppendorf Centrifuge 5415D) y posteriormente fueron filtradas en acrodiscos GHP de 0.45 µm de diámetro por 13 mm. La(s) proteína(s) se recuperó usando Filtros Microcon (Millipore YM 10). La dilución de las mismas fue en agua desionizada 5X y puestas en viales de 200 microlitros para su análisis.

VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se obtuvieron 11 muestras de pacientes que cumplieron con los criterios de inclusión y además 3 muestras de pacientes sanos como se muestra en la Tabla 5.

Tabla 5. Relación de muestras recolectadas y su etiología

Pacientes	Etiología
8	Piometra
1	Síndrome Nefrótico
1	Insuficiencia Renal Crónica
1	Mordedura de Serpiente
3	Clínicamente sanos

1 Condiciones para el análisis:

En la actualidad, el análisis de proteínas ha sido propuesto, según Claeys *et al*, 2001, como una buena alternativa para evaluar algunos fluidos corporales; y en especial, la electroforesis capilar, como una alternativa atractiva por encima de la electroforesis en gel de agarosa, que ha sido utilizada por más de 30 años; sin embargo, realizar electroforesis capilar se ha convertido en un gran reto, ya que cada proteína actúa de manera diferente dependiendo de su estructura, de su carga y su concentración; y por tal motivo, requiere diferentes condiciones para ser analizada.

Debido a esto, al analizar 11 diferentes proteínas de manera individual en este trabajo, se determinó como un pico pequeñas señales en el electroferograma (figura 2). Como la ECZ basa su separación en la movilidad de los analitos de acuerdo a su relación carga/masa, al analizar proteínas con estos modos, éstas dan lugar a las diferentes señales denominadas picos electroforéticos. Algunas proteínas contienen isoformas lo que da lugar a electroferogramas más complejos. Tales isoformas se atribuyen a la diferente composición de azúcares de las diversas formas de la proteína y/o a la diferente cadena aminoacídica; ofreciendo una gran heterogeneidad (Aguirrebengoa, 2006).

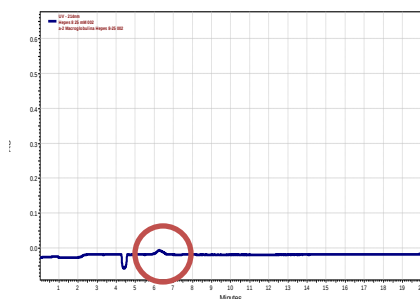


Figura 2. α_2 Macroglobulina con HEPES 25mM pH 8

Para el desarrollo de la metodología, se evaluaron condiciones tales como tipo de buffer, concentración del buffer y pH, que favorecieran la obtención de una señal electroforética adecuada para cada proteína; esto es, bandas estrechas con de tiempo de migración reproducible. De las diferentes condiciones probadas, se eligieron 5 soluciones buffer que cumplieron con el criterio mencionado (Tabla 6):

Tabla 6. Diferentes condiciones para el análisis de proteínas y tiempo de migración (t_m) de cada una de ellas.

Proteínas	Condiciones ideales	Tiempo de migración
Albúmina	Tricina 25 mM pH 8.8 con CaCl ₂ pH 8 3 mM	5.38 min
α 1 antitripsina	Hepes 25 mM pH 8 con CaCl ₂ pH 8 3 mM	9.92 min
α 1 glicoproteína ácida	Hepes 25 mM pH 8 con CaCl ₂ pH 8 3 mM	9.01 min
Transferrina	Tricina 25 mM pH 8.8 con CaCl ₂ pH 8 3 mM	4.86 min
Haptoglobina	Tricina 25 mM pH 8.8 con CaCl ₂ pH 8 3 mM	8.27 min
α 2 Macroglobulina	Hepes 25 mM pH 8 con CaCl ₂ pH 8 3 mM	6.27 min
Proteína C Reactiva	Hepes 25 mM pH 8 con CaCl ₂ pH 8 3 mM	8.94 min
Ceruloplasmina	Tricina 25 mM pH 8.4 con CaCl ₂ pH 8 3 mM	5.43 min
Fibrinógeno	MOPS 100 mM pH 7 con CaCl ₂ pH 8 3 mM	7.97 min
IgG	Hepes 100 mM pH 8 con CaCl ₂ pH 8 3 mM	8.94 min

En la mayoría de las proteínas, se pueden presentar picos definidos en más de una condición, esto facilita el obtener una buena resolución al mezclar dos o más de ellas.

Uno de los problemas que presenta el uso de la ECZ con capilares de sílice en la separación de proteínas, es la adsorción de éstas a la pared del capilar mediante interacciones electrostáticas con los silanoles libres, que empeoran su resolución e incluso impiden su detección. Existen diversas estrategias para disminuir dicha adsorción, y el principio de casi todas ellas es minimizar o enmascarar el número de silanoles libres de la pared, minimizando entonces la adsorción de proteínas y disminuyendo el flujo electroosmótico. Las diferentes estrategias podrían ser: trabajar con tampones de separación con un pH menor a 2.5, añadir aditivos al tampón de separación y recubrir el capilar de forma estática.

Los recubrimientos dinámicos del capilar se consiguen mediante la incorporación de un aditivo al tampón de separación, que tiene una gran afinidad por la pared del capilar. De esta forma, se establece un equilibrio de reparto del aditivo entre el tampón y la pared, compartiendo con la proteína en la adsorción a esta. Existen 4 tipos de tampones de separación, en éste trabajo, se utilizaron los tampones de separación con concentraciones de metales alcalinos monovalentes como el CaCl_2 a concentraciones de 2, 3 y 6 mM, MgCl_2 (2, 3 y 6 mM), SDS 3 mM y Tritón-100 (3 mM); lográndose una mejor respuesta con el CaCl_2 (3mM) debido a que es de los pocos que pueden utilizarse con altos voltajes; el inconveniente, es que estas sales provocan un aumento en la fuerza iónica que da un aumento en la temperatura del tampón, pero aún así, fue la alternativa más viable para los tipos de buffer y proteínas que se utilizaron en el desarrollo del presente estudio (Figura 3 y 4).

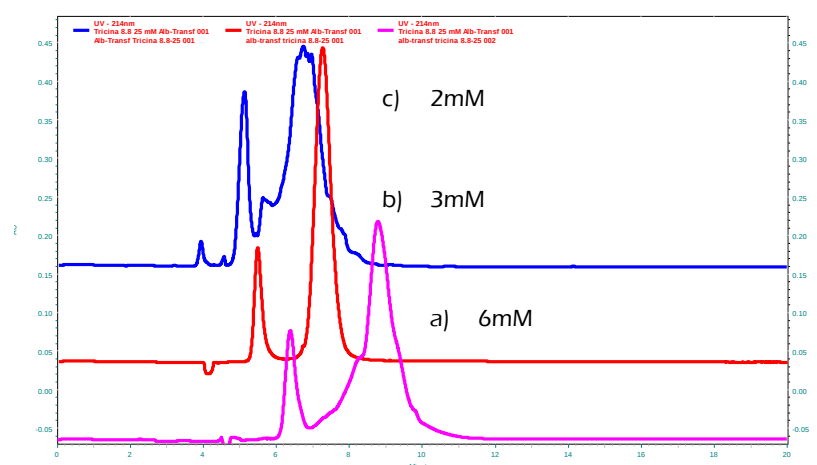


Figura 3. Comparativo entre CaCl_2 a diferentes concentraciones (2, 3 y 6 mM) en una muestra de albúmina y transferrina en buffer Tricina 25 mM pH 8.8

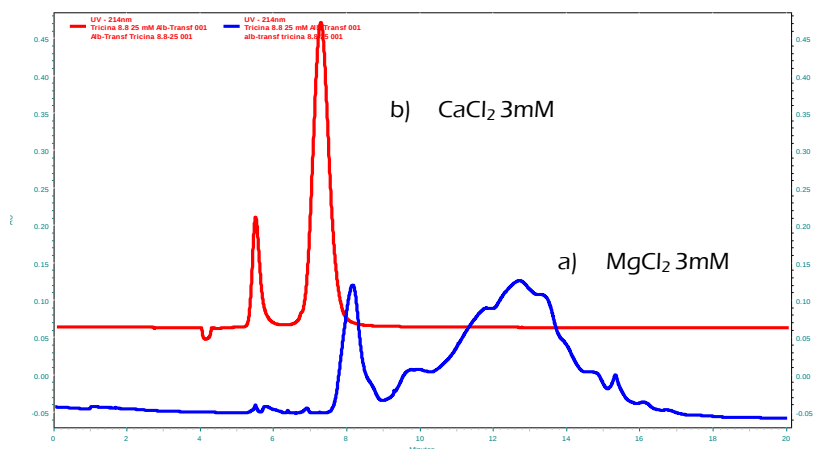


Figura 4. Comparativo entre CaCl_2 y MgCl_2 ambas 3mM en una muestra de albúmina y transferrina en buffer Tricina 25 mM pH 8.8.

2 Condiciones para cada proteína

La glicosilación de cada proteína es en función de su estructura primaria y terciaria. Cada sitio de unión de un glicano en la cadena polipeptídica determina el tipo de glicosilación característico del mismo. Por ejemplo, la glicosilación de un sitio específico de una proteína, puede verse dificultada por interacciones estéricas en su entorno, lo que determina en parte el tipo de glicosilación posible en este sitio.

Para una proteína dada, la variabilidad en la naturaleza y en el contenido de oligosacáridos con que las células glicosidan la misma cadena polipeptídica hace que ésta presente diferentes glicoformas (moléculas que tienen la misma cadena aminoácida pero diferente

composición glucídica). Esto se debe, a que la glicosilación de una proteína dada está controlada por cientos de enzimas que van sintetizando un glicano concreto unido a un sitio de unión de la cadena aminoácídica de la proteína (Aguirrebengoabengoa, 2006).

Ya que en el proceso de glicosilación de una proteína, el tipo de enzima, su concentración, sus características cinéticas y distribución en los compartimentos celulares reflejan el entorno interior y exterior en que la célula está glicosilando sus proteínas, no es extraño que el tipo de glicosilación de las proteínas que resulta en cada momento, esté relacionado con el estado patofisiológico que cada paciente.

2.1 Albúmina

La albúmina es una proteína ampliamente analizada debido a que se encuentra en mayor cantidad en el organismo en comparación al resto de las proteínas estudiadas. Es la principal proteína de la sangre y es sintetizada en el hígado. La albúmina es fundamental para el mantenimiento de la presión oncótica, necesaria para la distribución correcta de los líquidos corporales entre el compartimento intravascular y el extravascular, localizado entre los tejidos. La albúmina tiene carga eléctrica negativa. La membrana basal del glomérulo renal, también está cargada negativamente, lo que impide la filtración glomerular de la albúmina a la orina, a menos que exista una enfermedad como el síndrome nefrótico, en la cual se pierde gran cantidad de albúmina por la orina (Zaragoza, 2001).

Esta proteína pesa 69 000 daltones y tiene una vida media aproximada de 17 a 19 días; coadyuva en el 75% de la presión coloidal oncótica y su disminución puede provocar edema (subcutáneo o pulmonar) y efusión (del cuerpo, pleural, ascitis). Su incremento usualmente se debe a la deshidratación y hemoconcentración.

Al analizar la albúmina por electroforesis capilar, se presentó un mayor tiempo de migración a medida que aumentaba la concentración (25, 50, 75 y 100 mM) en un buffer de tricina pH 8.4 (Figura 5), pero el pico se observa menos definido. Al aumentar el pH (8.4 a 8.8) en este mismo buffer y a una concentración de 25 mM, se observó un pico más alto y más delgado; el tiempo de migración fue el mismo (figura 6).

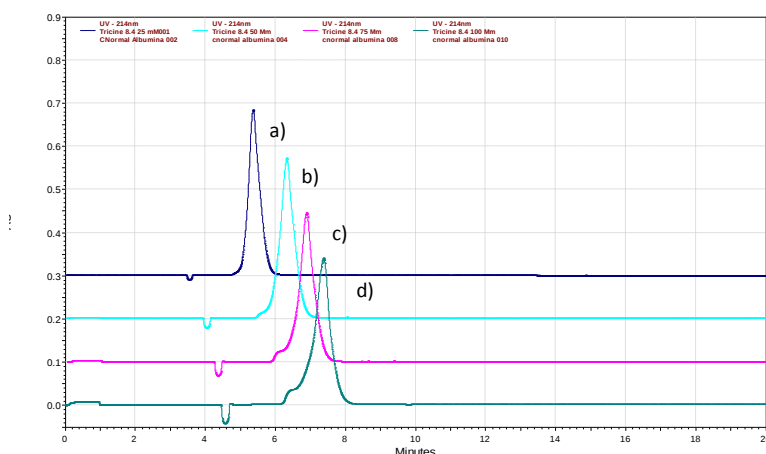


Figura 5. Albúmina con buffer tricina pH 8.4 en concentraciones a) 25 mM, b) 50 mM, c) 75 mM y d) 100 mM.

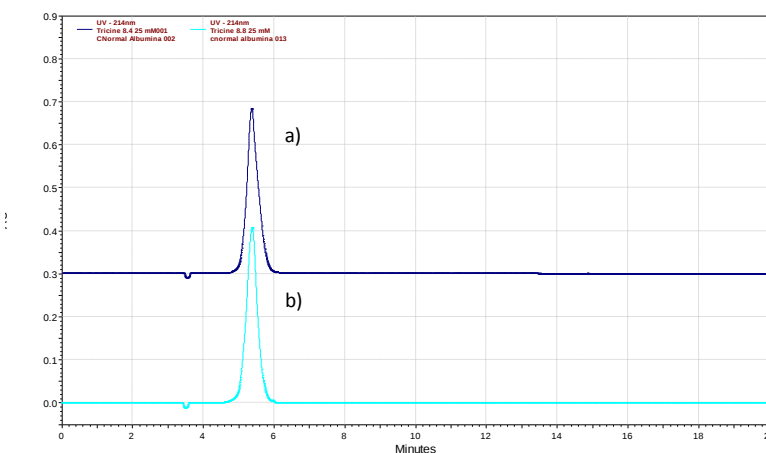


Figura 6. Albúmina con buffer de tricina a una concentración de 25 mM, con pH de a) 8.4 y b) 8.8.

Castañón et al, (2006) realizaron la determinación de albúmina *in vitro* mediante electroforesis capilar de zona, usaron ácido bórico 150 y 350 mM a un pH de 9.9 obteniendo un pico delgado, definido y un tiempo de migración de 10.2 minutos, y a medida que la concentración aumentó, el tiempo de migración lo hizo también, pero el pico fue menos definido (el artículo no cuenta con imágenes); situación similar al comportamiento de albúmina en el presente trabajo en condiciones de Tricina 25 mM pH 8.8 con CaCl_2 3 mM con la que se obtuvo un tiempo de migración 5.38 min. No se utilizaron las mismas condiciones que el autor menciona, debido a la necesidad de utilizar la menor variedad de soluciones buffer posibles al mezclar proteínas y analizarlas en conjunto.

2.2 α 1 Antitripsina (A1AT)

La A1AT es un inhibidor de proteasa sérico de 52 kDa, y en medicina es considerado el más prominente, dado el hecho de que las palabras α 1-antitripsina e inhibidor de proteasa (IP) son frecuentemente intercambiables. En 1982 se publicó su secuencia completa: está formada por 394 aminoácidos y tres cadenas laterales carbohidratadas. La proteína está codificada en el extremo distal del brazo largo del cromosoma 14. Su tamaño y estructura molecular condiciona su difusión a los tejidos, de manera que su concentración en el pulmón es el 10% de la concentración plasmática. El centro activo de la molécula comprende el fragmento situado entre los aminoácidos 358 y 363.

La alfa-1-antitripsina desempeña un papel importante en la limitación del daño hístico que producen las proteasas de los leucocitos durante los procesos inflamatorios, por eso se le considera su inhibidor principal en el suero humano. Está distribuida el 40% en el suero y el 60% restante en el espacio extravascular. En la reacción de fase aguda, se requiere una elevación aún más alta para "limitar" el daño causado por los granulocitos neutrófilos y su enzima elastasa, la cual degrada la fibra del tejido conectivo elastina. Los trastornos de la enzima incluyen la deficiencia de alfa-1 antitripsina, un trastorno hereditario en el cual la carencia de alfa 1-antitripsina lleva a una degradación tisular durante la inflamación. Esto causa enfisema pulmonar y lleva a la cirrosis hepática en casos severos (DeMeo y Silverman, 2004).

En las diferentes condiciones probadas, A1AT se presenta como un pico pequeño; se eligió como la mejor condición HEPES 25 mM pH 8 con CaCl_2 3 mM (figura 7) pues aunque no presenta un pico muy bien definido, su tiempo de migración es de 9.91 min, condición que facilita la resolución si se mezcla con otras proteínas (especialmente albúmina y α 1 glicoproteína ácida) que presentan un tiempo de migración similar. Gorrini et al, 2005 realizaron la determinación de α 1 antitripsina con fosfato de Sodio y Potasio pH 8 0.2 M con CaCl_2 2 mM, el principal objetivo de su medición en las diferentes investigaciones reportadas, es medir su concentración en suero, ya que su disminución se caracteriza por provocar problemas respiratorios especialmente durante la infancia. No presentan un electroferograma que demuestre los resultados de utilizar éstas condiciones. De igual modo que en el caso de la albúmina, no se utilizaron las mismas condiciones que el autor

menciona, debido a la necesidad de utilizar la menor variedad de buffers posibles al mezclas proteínas y correrlas en conjunto.

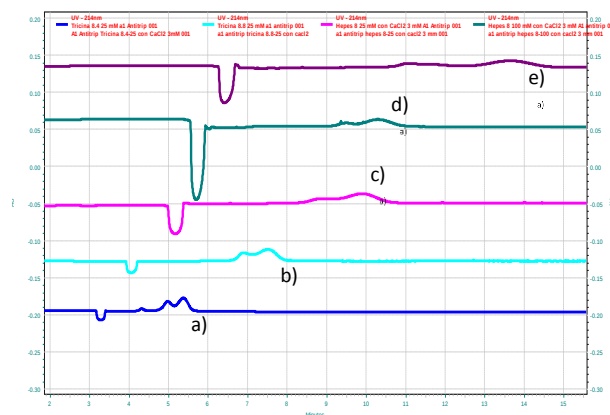


Figura 7. Electroferogramas de $\alpha 1$ antitripsina en diferentes buffers: a) Tricina pH 8.4 25 mM, b) Tricina pH 8.8 25 mM, c) Hepes pH 8 25 mM, d) HEPES pH 8 100 mM y e) MOPS pH 7 100 mM; todas con CaCl_2 3 mM como aditivo.

2.3 $\alpha 1$ glicoproteína ácida (A1GA):

La A1GA (orosomucoide) se caracteriza por ser una proteína sintetizada principalmente en el hígado. Perteneció a las proteínas de fase aguda, lo que significa que su concentración en el suero aumenta en respuesta a lesiones tisulares, inflamación, infección y cáncer. La función biológica de A1GA sigue siendo desconocida, aunque suele atribuírsele efectos inmunomoduladores y anti-inflamatorios. Además, es una proteína que puede unirse a numerosos fármacos básicos o neutros y a compuestos endógenos lipófilos, como las hormonas esteroideas, para facilitar su transporte por el torrente sanguíneo. Es una proteína de 41-43 kDa [1] con punto isoeléctrico entre 1,8 y 3,8. Además, su contenido en azúcares es muy alto, contribuyendo con el 45 % de la masa de la proteína. La cadena aminoacídica tiene 183 residuos y presenta dos puentes disulfuro. Es extremadamente soluble en agua, incluso a pHs cercanos a su pI (Aguirrebengoabengoa, 2006).

Los azúcares de esta glicoproteína se unen a la cadena aminoacídica en forma de cinco oligosacáridos anclados por un átomo de nitrógeno cada uno (N-oligosacáridos). Dichos oligosacáridos pueden ser bi, tri, tetra e incluso pentaantenarios. Dentro de ellos, la diversidad de oligosacáridos que pueden encontrarse unidos a la cadena polipeptídica es muy amplia, dando lugar a una variedad tal que, en suero, pueden encontrarse entre 12-20 glicoformas de A1GA. La heterogeneidad de formas de ésta proteína que se encuentran en el suero de un mismo individuo no sólo procede de la diversidad en la

composición de los azúcares que da lugar a glicoformas, sino que también existe una heterogeneidad que se debe a que la AGP es una proteína codificada por varios alelos en dos loci diferentes [4], por lo que la composición de la cadena aminoacídica también varía entre las diferentes moléculas de A1GA (Aguirrebengoabengoa, 2006).

Al analizarla por electroforesis capilar, esta proteína presentó picos bien definidos en todas sus condiciones (Fig.8); sin embargo, para favorecer su análisis y consecuente resolución al mezclarla con otras proteínas, se eligió en HEPES 25 mM pH 8 con CaCl_2 3 mM obteniendo un tiempo de migración de 9.03 minutos; similar al presentado por Hashabeh y El Rassi en 1991 donde identifican $\alpha 1$ glicoproteína ácida con la finalidad de investigar el potencial de la electroforesis capilar de zona en la separación y caracterización de fragmentos de glicoproteínas; esto fue llevado a cabo en un buffer acetato de amonio 100 mM pH 8.3 y CaCl_2 0.1 mM en suero de humano.

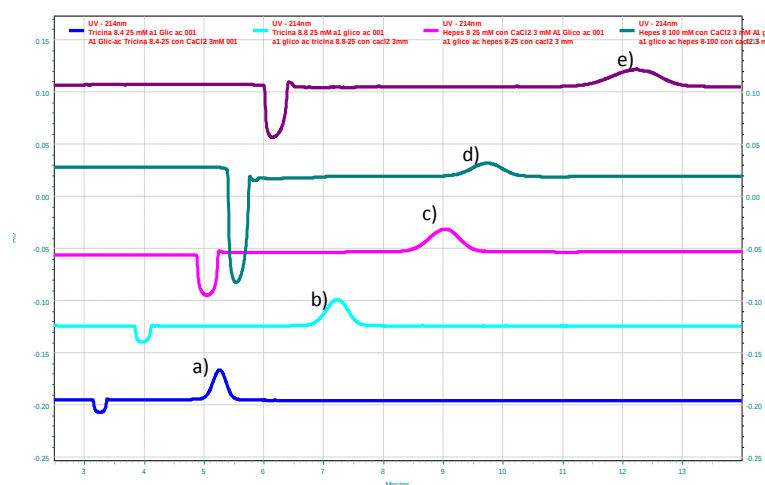


Figura 8. Electroferogramas de $\alpha 1$ glicoproteína ácida en diferentes buffers: a) Tricina 25 mM pH 8.4, b) Tricina 25 mM pH 8.8, c) HEPES 25 mM pH 8, d) HEPES 100 mM pH 8 y e) MOPS 100 mM pH 7; todas con CaCl_2 3 mM como aditivo.

En un trabajo presentado por Aguirrebengoabengoa en el 2006, se analiza A1GA en ECZ con un capilar no recubierto $L=87\text{cm}$ ($l=80\text{ cm}$), i.d. $50\text{ }\mu\text{m}$. Tampón de separación: Tricina 0,01 M, NaCl 0,01 M, AcNa 0,01 M, urea 7 M, putrescina 3,9 mM, pH: 5,5. Temperatura de separación:

35°C ; voltaje: 25kV; inyección por presión (0,5 p.s.i.) durante 30 segundos (A1GA:1mg/mL); detección: 214 nm; la finalidad en el presente era determinar las

múltiples glicoformas de dicha proteína y las diferentes variantes genéticas de la misma. En un suero normal pueden detectarse entre 12 y 20 glicoformas (sin tener en cuenta las variantes genéticas). Por tanto, es muy probable que en una misma banda electroforética o isoforma de las obtenidas con este método de CZE exista más de una forma de A1GA.

A pesar de tener condiciones diferentes a las utilizadas en el presente trabajo; el pico de A1GA fue similar en ambos casos. En el estudio realizado por Aguirrebengoabengoa, 2006; se observan 9 picos (glicoformas) bien definidas, entre los minutos 19 y 24 de la corrida, que se ven disminuídos en una muestra de una paciente con cáncer de ovario y tienden a aumentar en una muestra de un paciente con leucemia, en el presente trabajo no logran identificarse diferentes glicoformas, solamente un pico bien definido en diferentes tiempos de migración dependiendo del buffer utilizado (a medida que aumenta la concentración del buffer, aumenta el tiempo de migración del pico) donde se sospecha pudieran estar incluidas las diferentes glicoproteína de A1GA.

2.4 α 2 macroglobulina (A2M):

La A2M es una proteína plasmática de gran peso molecular encontrada en la sangre, se encuentra como componente mayor en la banda α -2 de electroforesis. Está compuesta por cuatro idénticas subunidades unidas por puentes disulfuro. Inactiva a la trombina y los factores IXa, Xa, XIa y XIIa; además de funcionar como anticoagulante, activa el factor estimulante de los melanocitos promoviendo la proliferación celular; es la antitrombina más potente (Barreta, *et al*, 2007).

Al analizarla por electroforesis capilar de zona, se obtuvieron resultados adecuados únicamente bajo dos condiciones diferentes (figura 9), eligiéndose HEPES 25 mM pH 8 con CaCl_2 3 mM por presentar un pico mejor definido en un tiempo de migración de 6.97 minutos. Pocas han sido las técnicas que analizan de manera individual a la α 2 macroglobulina, pues suelen identificarla con otros componentes para detectar, por ejemplo, su asociación con el mal de Parkinson y Síndrome de Down, enfermedades no existentes en perros y su análisis por electroforesis capilar no se ha realizado, solamente por electroforesis en geles SDS-PAGE por Barrera, *et al* en el 2007. La finalidad de analizarla en orina de perros radica en que, al ser una proteína de gran tamaño, ésta

podría servir como referencia para saber el grado de enfermedad renal que hay al filtrar o no determinadas proteínas.

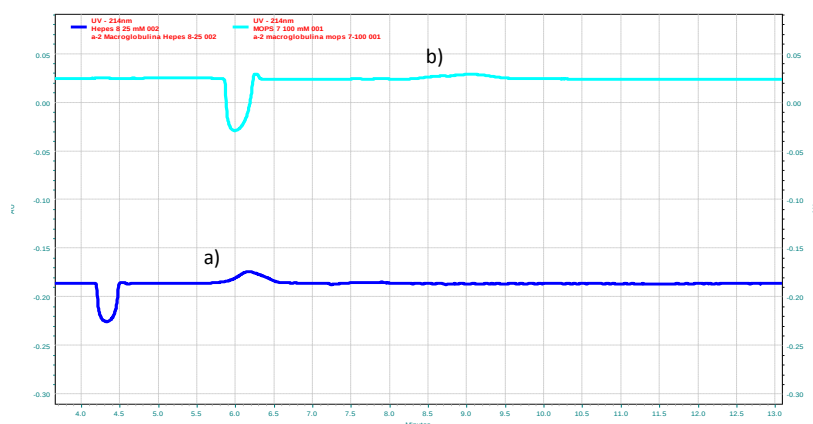


Figura 9. Corrimiento de $\alpha 2$ Macroglobulina en a) HEPES 25 mM pH 8 y b) MOPS 100 mM pH 7 con CaCl_2 3 mM como aditivo.

2.5 Ceruloplasmina

La ceruloplasmina o ferroxidasa, es una proteína transportadora del 90% de cobre en la sangre. Es una enzima sintetizada en el hígado, conteniendo 6 átomos de cobre en su estructura. Los niveles de esta proteína bajan en un paciente con problemas hepáticos debido a que se reduce su capacidad para sintetizarla.

En humanos, el aumento de ésta en la orina es indicativo de enfermedad de Wilson (Hano, *et al*, 1996), en el perro, no se ha realizado su análisis de manera individual, sin embargo en el Manual of Canine and Feline Clinical Pathology (Bsava) en el 2005 la describe como una de las proteínas pertenecientes al grupo de las α globulinas y cuyo aumento o disminución está relacionado con las funciones de oxidación del hierro y antioxidante general. Ésta proteína, junto con Haptoglobina y Fibrinógeno incrementan en la sangre como respuesta inflamatoria (mientras la albúmina disminuye).

Con esta proteína se obtuvo, en todas sus condiciones, un pico pequeño y poco simétrico (Fig.10); sin embargo, la condición que se consideró como más favorable por la simetría de su pico fue Tricina pH 8.4 25 mM con CaCl_2 3 mM con un tiempo de migración de 5.43 minutos. En estudios anteriores, ésta proteína no ha sido analizada mediante electroforesis capilar en cualquiera de sus modos.

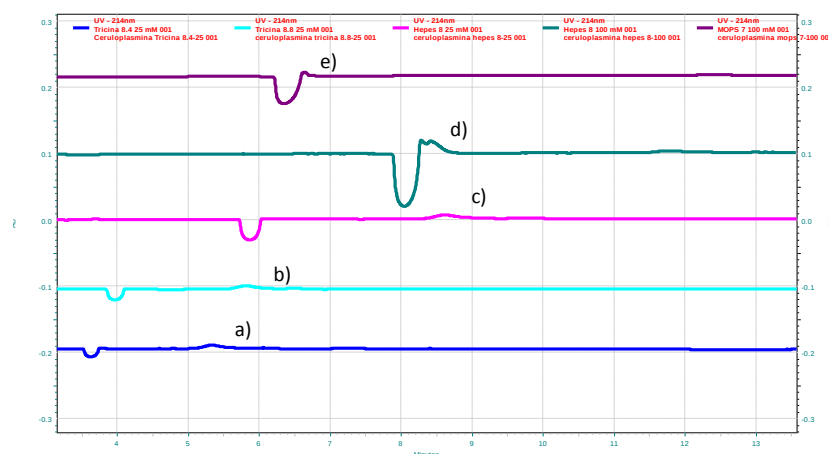


Figura 10. Ceruloplasmina en diferentes condiciones: a) Tricina 25 mM pH 8.4, b) Tricina 25 mM pH 8.8, c) HEPES 25 mM pH 8, d) HEPES 100 mM pH 8 y e) MOPS 100 mM pH 7, todas con CaCl_2 3 mM como aditivo.

2.6 Haptoglobina

La haptoglobina es una proteína de fase aguda encargada de fijar la hemoglobina plasmática de los eritrocitos, y la transporta al hígado para que no se excrete por la orina. Se usa para determinar estado hemolítico y aumenta en quemaduras agudas, síndrome nefrótico, estados inflamatorios agudos y crónicos, infecciones por estafilococos, mononucleosis infecciosa y procesos neoplásicos. Ésta se ve disminuida en parenquimatosas del hígado, anaptoglobulinemia hereditaria, anemias hemolíticas intra y extravasculares: reacciones post-transfusionales, anemias hemolíticas autoinmunes, coagulación intravascular diseminada, anemias megaloblásticas, hemoglobinopatías y parasitosis.

Al ser analizada en el presente trabajo, ésta presentó picos definidos y simétricos en todas sus condiciones (Fig. 11) destacándose como un mejor pico en Tricina 25 mM pH 8 con CaCl_2 3mM y obtener un tiempo de migración favorable (8.27 minutos) para mezclar con otras proteínas y lograr una buena resolución. También existen pocas técnicas de identificación específica de ésta proteína, sobresaliendo la identificación por método nefelométrico (test) y electroforesis en gel de agarosa; por lo regular, se determina de manera indirecta al medir hemoglobina, debido a que ésta última es transportada junto a la haptoglobina por el torrente sanguíneo, y su disminución tiene gran influencia en

anemias hemolíticas y otras alteraciones sanguíneas, patologías también reportadas en perros.

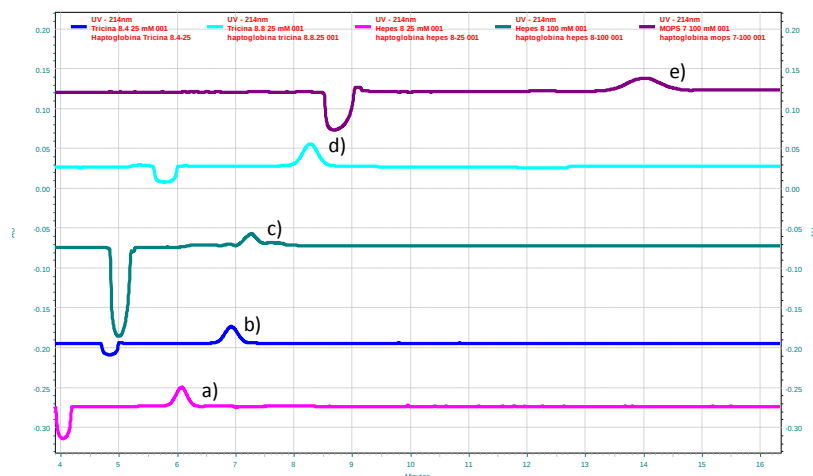


Figura 11. Corrimiento de haptoglobina en 5 condiciones diferentes: a) HEPES 25 mM pH 8, b) Tricina pH 25 mM 8.4, c) HEPES 100 Mm pH 8, d) Tricina 25 mM pH 8.8 y e) MOPS 100 mM pH 7, todas con CaCl_2 3 mM como aditivo.

2.7 Fibrinógeno

El fibrinógeno es convertido en fibrina soluble durante la cascada de coagulación; es sintetizado en el hígado y su incremento revela un daño inflamatorio no específico, mientras que su reducción puede resultar de insuficiencia hepática severa, coagulación intravascular diseminada, o raramente, una deficiencia congénita (Deficiencia del Factor I). La presencia de heparina en sangre puede dar falsa evidencia de reducción de los niveles de fibrinógeno. Tiene un PM de 340 000 daltones con estructura química dimérica (constituida por tres pares de cadenas polipeptídicas denominadas alfa, beta y gamma) unidas en su parte central por puentes disulfuro. El 80-90% del fibrinógeno del cuerpo se encuentra disuelto en el plasma sanguíneo con una concentración media en el perro de 2 a 4 g/l y con una vida media de 3 a 6 días (Murciano, 2008).

En el presente trabajo, el fibrinógeno presentó un pico poco definido bajo dos condiciones (Figura 12) siendo la mejor MOPS 100 Mm pH 7 con CaCl_2 3 mM en un tiempo de migración de 7.97 minutos. En el estudio presentado por Revert et al, 1994, se utilizaron condiciones similares (MOPS pH 7) mediante la prueba de Clauss en suero de humanos, la cual consiste en utilizar un coagulómetro (thrombotimer) para mediante una muestra de sangre, medir los valores de ésta. No se ha analizado por electroforesis capilar. El

fibrinógeno se mide en pacientes que padecen de problemas vasculares/renales; además, puede estar presente en pacientes atacados por mordedura de serpiente, al ser el veneno neuro y/o hemotóxico.

Esta proteína no ha sido analizada mediante electroforesis capilar, y en este trabajo, se presentaron picos muy pequeños, esto probablemente se deba a que el fibrinógeno es una molécula fibrilar que en sus extremos tiene cargas fuertemente negativas, éstos extremos repelen a otras moléculas en un compuesto previniendo la agregación como precursor de la fibrina (Hermes, *et al*, 2005); lo que a su vez, promoverá la aglutinación del fibrinógeno y complicará su lectura al detector. Para facilitar su desplegamiento y por lo tanto, su fácil lectura al detector, se han sugerido aditivos que se agreguen a la pared del sílice y así se promuevan condiciones tales que permitan el desplegamiento del fibrinógeno como el bromuro de dodecil trimetil amonio en lugar de SDS para producir una reversión de la corriente electrosmótica pues migra hacia el electrodo positivo, debido a la absorción de moléculas del surfactante sobre la pared del capilar; también pueden emplearse pares iónicos como tetra alquil aluminio que reduce la capacidad aniónica del analito; urea que aumenta la solubilidad de compuestos hidrofóbicos en agua (Castagnino, 1997).

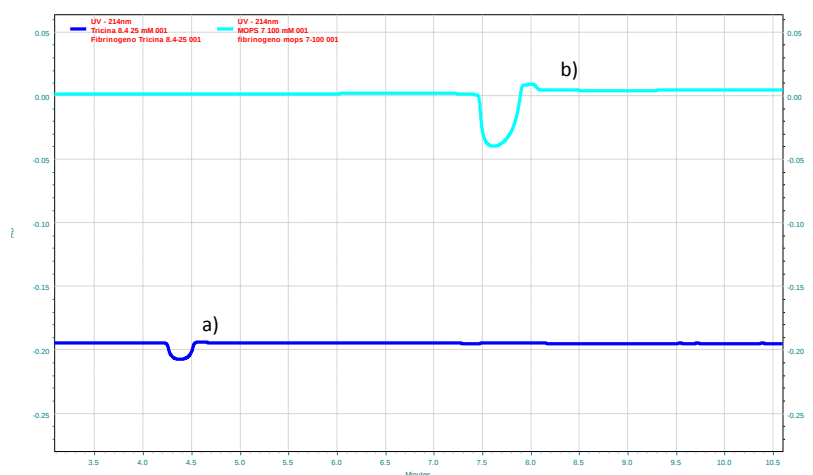


Figura 12. Fibrinógeno en: a) Tricina 25 mM pH 8.4 y b) MOPS 100 mM pH 7, ambas con CaCl_2 3 mM como aditivo.

2.8 Proteína C Reactiva (CRP)

La proteína C Reactiva se sintetiza en el hígado y pertenece al grupo de las proteínas de fase aguda. Las concentraciones de esta proteína aumentan rápidamente y de forma pronunciada en respuesta a una infección o a un daño tisular. La función biológica principal de CRP es la de reconocer patógenos y células dañadas del organismo y mediar su eliminación.

Con respecto a su estructura, la CRP es un pentámero compuesto por cinco unidades idénticas (protómeros), unidas no covalentemente en torno a un poro central. Cada protómero, que no está glicosilado, tiene dos puntos de unión al catión calcio y un puente disulfuro interno. Además, cada subunidad tiene 206 aminoácidos y un peso de 23027 kDa. Una de las características más importantes de la CRP es su afinidad por la fosfocolina (PC); una molécula de PC puede unirse a cada uno de los protómeros. Para que se produzca esta unión es necesario que tenga lugar el cambio conformacional en la proteína que origina la unión de dos cationes calcio por subunidad. Por tanto, el catión calcio es clave en el reconocimiento PC-CRP (Aguirrebengoabengoa, 2006).

La proteína C Reactiva fue analizada en cinco condiciones (Fig. 13), sin embargo, sus picos fueron más simétricos en tres de ellas, la mejor condición se logró en HEPES 25 mM pH 8 con CaCl_2 3 mM a un tiempo de migración de 4.71 minutos. Ésta es una de las proteínas más identificadas, después de la albúmina, ya que su aumento se debe a inflamación por trauma, necrosis tisulares e infecciones bacterianas, situaciones comunes en humanos y animales. Rikihisa et al, 1994 realizaron la identificación de Proteína C Reactiva en suero de perros con erlichiosis mediante electroforesis capilar de zona en buffer de citrato 0.05 M pH 4.2 y sus resultados revelaron su presencia en cantidades tales ($>3000 \mu\text{g/ml}$) que se contemplaba en la fase aguda de enfermedad respiratoria; pero el objetivo de este trabajo, fue probar correrla bajo otras condiciones que fueran similares a las otras 10 proteínas analizadas, a fin de obtener la mayor homogeneidad en cuanto a condiciones se refiere.

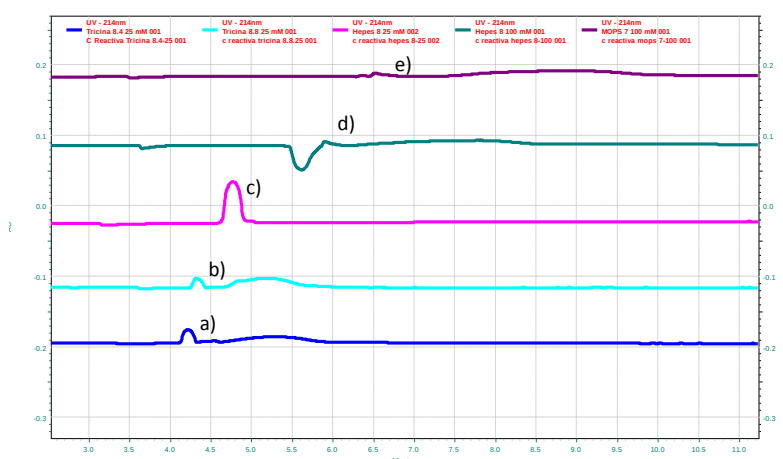


Figura 13. Proteína C Reactiva en 5 condiciones diferentes: a) Tricina 25 mM pH 8.4, b) Tricina 25 mM pH 8.8, c) HEPES 25 mM pH 8, d) HEPES 100 mM pH 8 y e) MOPS 100 mM pH 7, todas con CaCl_2 3 mM como aditivo. Nótese que a medida que aumenta la concentración de cada buffer, aumenta el tiempo de migración de la proteína.

2.9 Transferrina

La transferrina es una glicoproteína transportadora de hierro sintetizada y metabolizada principalmente en los hepatocitos. Está formada por una única cadena polipeptídica de 679 aminoácidos con una masa molecular de 79.500 Da y un punto isoeléctrico (pI) que puede variar entre 5.4 y 5.9. Cada molécula de transferrina consta de dos lóbulos de similar estructura interna e independientes para la fijación de Fe^{3+} ; esta conformación de la molécula permite la firme, aunque reversible, unión del Fe.

La parte glucídica de esta glicoproteína, la constituyen dos cadenas complejas N-enlazadas a los residuos de asparragina (Asn) de las posiciones 413 y 611 del dominio C-terminal. Estas dos cadenas de oligosacáridos varían en su grado de ramificación, pudiendo presentar cada una de ellas entre 2 y 3 cadenas externas o antenas con un residuo de ácido siálico en la posición terminal 1-4.

La Transferrina se caracterizó por ser una de las proteínas con picos más alargados y definidos en el electroferograma cuando se sometió a las condiciones probadas en las diferentes proteínas estudiadas, sin embargo, donde se obtuvo un mejor pico, simétrico y alargado fue en Tricina 25 mM pH 8.8 con CaCl_2 3 mM con un tiempo de migración de 4.86 minutos (Figura 14). Ésta, en combinación con otras proteínas, puede ser

determinante para el diagnóstico de muchas enfermedades, pues disminuye en hipoalbuminemias, síndrome nefrótico, hepatopatías, pero aumenta en anemias. Landers y Prasad, en 1997, realizaron electroforesis capilar de zona de transferrina en buffer de borato 10 mM pH 8.4 obteniendo picos alargados en un tiempo de migración aproximado a los 6 minutos en suero de humanos. Sin embargo; no hay imagen que corrobore dicha información y se utilizaron condiciones diferentes, con la misma finalidad que con las anteriores, dar homogeneidad al tener pocas condiciones para las 11 proteínas estudiadas.

La facilidad o complejidad de una proteína para poder expresarse radica en las cadenas de carbohidratos unidas en su estructura polipeptídica y en su heterogeneidad. Por lo que respecta a la transferrina, ésta es una glucoproteína formada por una cadena simple de polipéptidos, esto le permite expresarse con mayor facilidad por su pequeña o casi nula heterogeneidad. A pesar de que presentó una buena señal con todos los buffer utilizados, fue mejor con Tricina, debido a que su pH (7.4-8.8) trabaja mejor en puntos isoeléctricos como el de la transferrina (5.4-5.9).

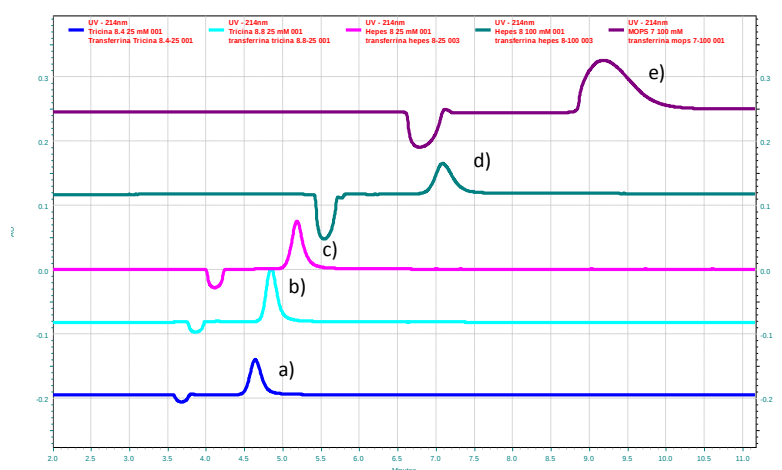


Figura 14. Transferrina en 5 condiciones diferentes: a) Tricina 25 mM pH 8.4, b) Tricina 25 mM pH 8.8, c) HEPES 25 mM pH 8, d) HEPES 100 mM pH 8 y e) MOPS 100 mM pH 7, todas con CaCl_2 3 mM como aditivo.

2.10 IgG

La inmunoglobulina G (IgG) es una de las cinco clases de anticuerpos humorales producidos por el organismo. Se trata de la inmunoglobulina predominante en los fluidos internos del cuerpo, como son la sangre, el líquido cefalorraquídeo y el líquido peritoneal (líquido presente en la cavidad abdominal). Esta proteína especializada es sintetizada por el

organismo en respuesta a la invasión de bacterias, hongos y virus. Es la inmunoglobulina más abundante del suero, con una concentración de 600-1.800 mg por 100 mL.¹ La IgG constituye el 80% de las inmunoglobulinas totales.

La IgG es la inmunoglobulina más pequeña, con un peso molecular de 150.000 Daltons, así puede pasar fácilmente del sistema circulatorio del cuerpo a los tejidos. La síntesis de IgG se controla principalmente por el estímulo de los antígenos. En el caso de animales axénicos (sin microbios), con niveles de IgG muy bajos, el nivel de IgG se eleva en cuanto se les traslada a un ambiente normal. Las cadenas H de la IgG son del isotipo γ , contiene un 2-3% en peso de glúcidos. La IgG es una proteína que aumenta en enfermedades autoinmunes (lupus eritematoso, hepatitis crónica activa, infecciones bacterianas crónicas).

La IgG se analizó satisfactoriamente en tres condiciones (Fig. 15), el mejor pico se obtuvo con HEPES 100 mM pH 8 con CaCl_2 3 mM con un tiempo de migración de 8.94 minutos. Esta también es de las proteínas más analizadas, por tener un alto valor diagnóstico a nivel inmunológico. Existen pruebas estandarizadas mediante test, se han realizado inmunoensayos (inmunoturbidimetría) Western Blotting y electroforesis capilar, éste último, realizado por Chen y Lee en el 2002, mediante enfoque isoeléctrico; y a pesar de no haber alguna imagen del pico obtenido, éste lo describen como definido bajo condiciones similares a las utilizadas en el presente trabajo.

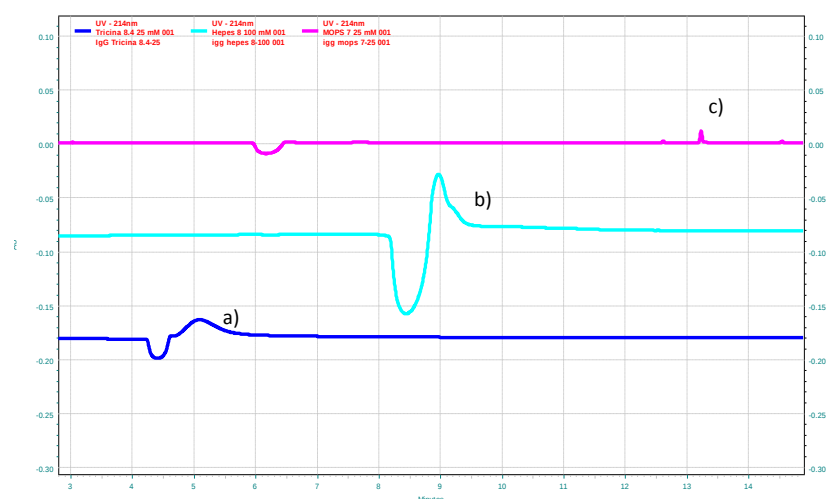
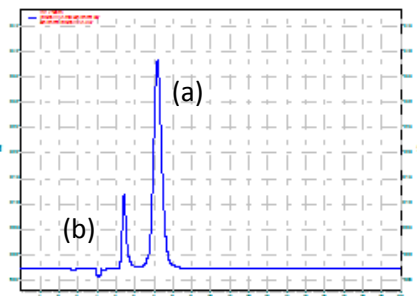
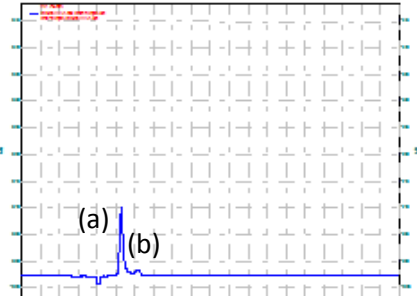
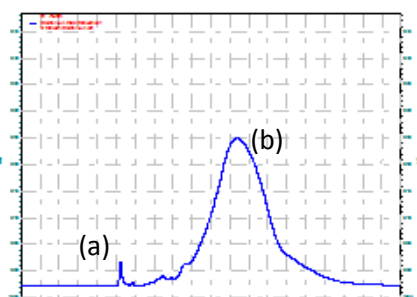
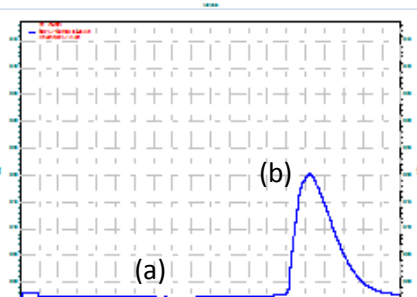


Figura 15. IgG en tres diferentes condiciones: a) Tris-HCl pH 8.4 25 mM, b) HEPES pH 8 100 mM y c) MOPS pH 7 100 mM, todas con CaCl_2 3 mM como aditivo.

3 Análisis de proteínas en mezcla

Una vez analizadas cada una de las proteínas estándar, se mezclaron entre ellas con el fin de obtener una buena resolución en la mezcla (Tabla 7).

Tabla 7. Mezcla de proteínas con las condiciones que mostraron mejor resolución entre picos y su tiempo de migración.

Proteínas	Condiciones	Electroferograma	Tiempo de migración
Albúmina (a)/ Transferrina (b)	Tricina 8.8 25 mM Aditivo CaCl_2 3 mM		1 : 5.41345 min. 2 : 7.16928 min.
Transferrina (a)/ Haptoglobina (b)	Tricina 8.8 25 mM Aditivo CaCl_2 3 mM		1 : 5.26001 min. 2 : 6.15991 min.
Ceruloplasmina (a) / Albúmina (b)	Tricina 8.4 25 mM Aditivo CaCl_2 3 mM		1 : 5.23762 min. 2 : 11.3602 min.
Fibrinógeno (a) / Albúmina (b)	MOPS 7 100 mM Aditivo CaCl_2 3 mM		1 : 7.60803 min. 2 : 15.2227 min.

En la figura 16, se muestra el comportamiento de cada proteína en sus mejores condiciones. Hay algunas proteínas que tienen tiempos de migración parecidos; sin embargo, hay que recordar que se tiene más de una condición para cada una de ellas, de tal manera que es posible analizar mezclas. Al hacer esto, es posible que se pierda eficiencia (forma del pico) para ganar en resolución (separación de picos) cuando se mezclen varias proteínas para poder diagnosticar alguna enfermedad.

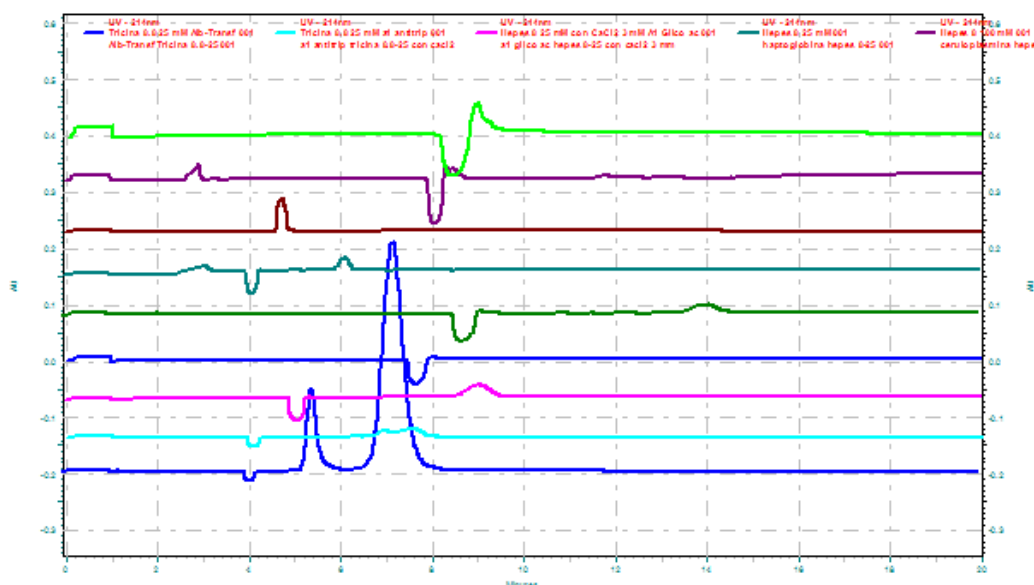


Figura 16. Conjunto de proteínas estándar en diferentes condiciones (pH, buffer y concentración).

4 Parámetros de validación

Con la finalidad de demostrar la utilidad de las metodologías aquí encontradas, se realizó una validación en términos de linealidad, precisión, exactitud (repetibilidad y reproducibilidad) y especificidad en las condiciones óptimas de separación.

4.1 Linealidad

La linealidad se probó preparando tres concentraciones (Tabla 8) de cada una de las 11 proteínas estándar (concentración dependiendo de la existencia de cada proteína), éstas se analizaron por triplicado.

Tabla 8. Concentraciones utilizadas para cada proteína estándar

Proteína	Concentraciones $\mu\text{g/mL}$
Albúmina	500, 1000, 2000
Transferrina	500, 1000, 2000
$\alpha 1$ antitripsina	500, 1000, 2000
$\alpha 1$ glicoproteína ácida	500, 1000, 2000
Complemento	20, 30, 50
Ceruloplasmina	25, 50, 100
C Reactiva	23, 50, 100
Haptoglobina	100, 200, 400
$\alpha 2$ Macroglobulina	100, 200, 500
IgG	500, 1000, 2000
Fibrinógeno	500, 1000, 2000

En la Tabla 9 se muestran los resultados del análisis estadístico practicado a las curvas de calibración de cada proteína.

Tabla 9. Proteínas que mostraron linealidad al realizarse el análisis estadístico.

Proteína	Parámetro	Día 1	Día 2	Día 3
Albúmina	r	0.9859	0.9893	0.9899
	r^2	0.9721	0.9787	0.9798
	B	-229586	-315054.5	-320996.5
	M	3193.52	3312.97	3286.38
Transferrina	R	0.9964	0.9995	0.9994
	r^2	0.9928	0.9990	0.9989
	B	8200.5	-11611.5	-35241.5
	M	1991.6	1977.9	2066.7
$\alpha 1$ Antitripsina	R	0.9991	1.0000	0.9999
	r^2	0.9982	0.9999	0.9998
	B	31410.5	18337.0	4464.0
	M	612.10	615.90	629.04
$\alpha 1$ glicoproteína ácida	R	0.9859	0.9893	0.9899
	r^2	0.9721	0.9787	0.9798
	B	-229586	-315054.50	-320996.50
	M	3193.52	3312.97	3286.38

Complemento	R	0.9976	0.9972	0.9993
	r^2	0.9953	0.9944	0.9986
	B	-17205.7	-4247.0	-8698.6
	M	5047.1	4673.9	4612.0
Ceruloplasmina	R	0.9936	0.9984	0.9949
	r^2	0.9872	0.9968	0.9898
	B	-21329	-24574	-18675.5
	M	2214.9	2313.8	2134.9
Haptoglobina	R	0.99277743	0.98747551	0.98898413
	r^2	0.98560702	0.97510788	0.97808961
	B	-2607.5	14310	9547
	M	1863.075	1816.21429	1824.14714
α 2 macroglobulina	R	0.99918057	0.99997796	0.99989484
	r^2	0.99836182	0.99995591	0.9997897
	B	164667.769	199757.385	182701.154
	M	2446.82962	2304.50231	2350.12192

Las proteínas antes mencionadas tuvieron un comportamiento lineal (Anexo, pag.1), mientras que Proteína C Reactiva, IgG y Fibrinógeno tuvieron un comportamiento atípico que se muestra en las figuras 17, 18 y 19.

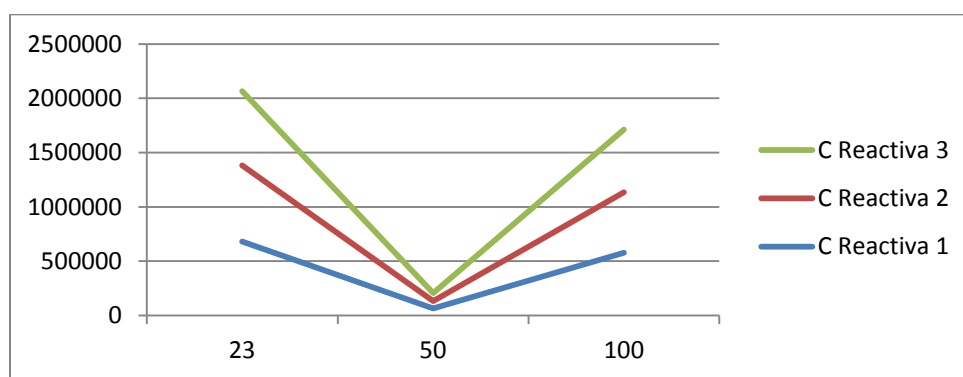


Figura 17. Curva de calibración de proteína C Reactiva en 3 concentraciones diferentes: 23mg/ μ l, 50 μ g/ml y 100 μ g/ml.

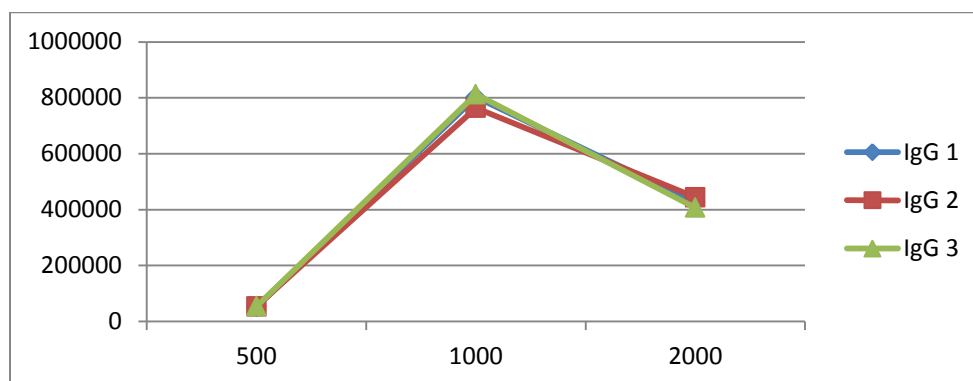


Figura 18. Curva de calibración de proteína IgG en 3 concentraciones diferentes: 500mg/μl, 1000 μg/ml y 2000 μg/ml.

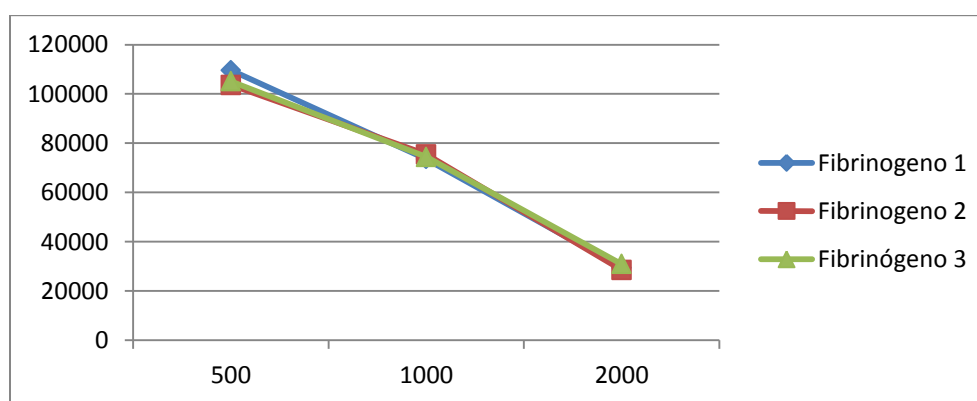


Figura 19. Curva de calibración de proteína Fibrinógeno en 3 concentraciones diferentes: 500mg/μl, 1000 μg/ml y 2000 μg/ml.

Para que una curva de calibración pueda considerarse lineal, debe cumplir con la ecuación de la línea recta ($Y = b + mx$) y que el valor de coeficiente de regresión (r) sea mayor a 0.999. Se espera que conforme vaya aumentando la concentración la respuesta que se está midiendo, en este caso área bajo la curva (ABC) del pico, vaya aumentando; de tal manera que la pendiente de dicha línea debe ser positiva. Ocho de once proteínas presentaron comportamiento lineal con pendiente positiva. Las restantes (C Reactiva, IgG y Fibrinógeno) mostraron un comportamiento no lineal. La proteína C reactiva tuvo una menor respuesta en la concentración no. 2 (50 μg/ml)(Figura 17) a diferencia de la IgG, cuya ABC fue mayor en la concentración 2 (1000 μg/ml) (figura 18); el fibrinógeno mostró una respuesta inversa que la mayoría, al presentar una mayor respuesta a menores concentraciones (Figura 19), esto probablemente se deba a que es una molécula fibrilar que en sus extremos tiene cargas fuertemente negativas, éstos extremos repelen a otras

moléculas en un compuesto previniendo la agregación como precursor de la fibrina (Hermes, *et al*, 2005).

El parámetro de linealidad es útil en la cuantificación de las proteínas pues así se pueden hacer fácilmente interpolaciones para conocer los niveles de analito en alguna muestra; en este caso, los niveles de proteína. El hecho de que tres proteínas no presenten un comportamiento lineal no significa que no puedan cuantificarse. Sólo implica que serán un proceso en el que deberá cuidarse que la concentración de la solución estándar sólo sea muy cercana a la de la muestra.

La linealidad encontrada en el resto de las proteínas fue satisfactoria, ya que $r > 0.9999$ y $r^2 > 0.999$ en 8 de 11 proteínas.

4.2 Precisión

La precisión (DER%) de la curva de calibración del método se evaluó en un solo día – intradía (repetibilidad) y en diferentes días – interdía (reproducibilidad). Los valores obtenidos se muestran en las tablas 10 y 11.

Tabla 10. Variabilidad intradía para cada proteína.

Proteína	Concentración µg/ml	X Promedio	DE Desviación estándar	DER Desviación estándar relativa
Albúmina	500	2216905	5845.72	0.2637
	1000	4498057.33	1926.67	0.0428
	2000	9229832	3240.01	0.0351
Transferrina	500	904468	4140.34	0.4578
	1000	2149076.67	2131.62	0.0992
	2000	3942203.67	482.10	0.0122
α 1 antitripsina	500	322912.67	656.93	0.2034
	1000	666008.33	121.41	0.0182
	2000	1249256.33	1077.81	0.0863
α 1 glicoproteína ácida	500	1058847.67	4005.28	0.3783
	1000	3552147.33	122175.92	3.4395
	2000	6121070	118342.97	1.9334
Complemento	20	89281.67	1332.07	1.4920
	30	126135	3286.18	2.6053

	50	243943	10201.32	4.1818
Ceruloplasmina	25	27812	1085.73	3.9038
	50	101106.67	701.80	0.6941
	100	197553.33	1237.72	0.6265
C Reactiva	23	682543	9328.70	1.3668
	50	61700.33	2831.16	4.5886
	100	567061.67	11713.27	2.0656
Haptoglobina	100	171780.33	14523.36	8.4546
	200	410234.00	1237.55	0.3017
	400	730659.00	930.15	0.1273
$\alpha 2$ Macroglobulina	100	433203.67	5799.50	1.3387
	200	630300.00	5091.74	0.8078
	500	1388105.67	10040.01	0.7233
IgG	500	51356.33	1011.81	1.9702
	1000	806734.00	6511.20	0.8071
	2000	437445.33	16742.54	3.8273
Fibrinógeno	500	110365.67	863.95	0.7828
	1000	74483.67	1062.06	1.4259
	2000	28918.00	572.95	1.9813

Tabla 11. Variabilidad interdía para cada proteína.

Proteína	Concentración $\mu\text{g/ml}$	X Promedio	DE Desviación estándar	DER Desviación estándar relativa
Albúmina	500	2174220	63306.5	2.91
	1000	4473144.33	47250.1	1.06
	2000	9229767.33	92816.0	1.01
Transferrina	500	906215.3	11024.7	1.2
	1000	2129591.3	66436.4	3.1
	2000	3967790.3	69885.2	1.8
$\alpha 1$ antitripsina	500	319800.0	5253.1	1.6
	1000	648752.3	15112.1	2.3
	2000	1242211.3	21653.4	1.7
$\alpha 1$ glicoproteína ácida	500	1054513	4507.84	0.43
	1000	3409374.7	31343.57	0.92
	2000	6095492	86013.02	1.41
Complemento	20	88853.7	3975.0	4.5
	30	128253.0	1635.9	1.3

	50	230508.0	7171.6	3.1
Ceruloplasmina	25	28215.3	1371.4	4.9
	50	98214.7	1883.8	1.9
	100	197697.7	6690.9	3.4
C Reactiva	23	688632.33	11760.87	1.71
	50	69136.33	4642.19	6.71
	100	570378.67	10970.91	1.92
Haptoglobina	100	160187.67	2370.2768	1.48
	200	419494	9591.5776	2.29
	400	725703	3408.868	0.47
$\alpha 2$ Macroglobulina	100	427664.33	4725.9476	1.11
	200	644374	12996.65	2.02
	500	1368809	21915.51	1.60
IgG	500	53374	1238.2799	2.32
	1000	792997.67	25681.114	3.24
	2000	425880.67	18489.453	4.34
Fibrinógeno	500	106144.33	3124.0385	2.94
	1000	74503.667	957.71307	1.29
	2000	29681.333	1210.6863	4.08

La precisión es un parámetro de validación establecido en la Farmacopea Británica y en la USP e incluyen a la repetibilidad y a la reproducibilidad. El parámetro estadístico que lo caracteriza es la desviación estándar relativa (DER) o el coeficiente de variación CV, aunque este último término ya está en desuso. La normatividad mexicana acepta una DER < 15% y permite evaluar la incertidumbre en la estimación de la media, es decir, el error aleatorio que corresponde a la dispersión de los datos alrededor de la media. Los valores obtenidos, con las 11 proteínas, son menores a 15% por lo que se considera que hay repetibilidad.

La reproducibilidad también se evalúa con la DER, pero en este caso se acepta que el valor sea igual al obtenido para la repetibilidad o bien un poco mayor ya que en este caso hay un mayor manipuleo de las muestras, lo que significa una mayor fuente de error. Los valores obtenidos son mayores que la repetibilidad pero menores al 15%, por lo que se considera que si existe reproducibilidad en el método.

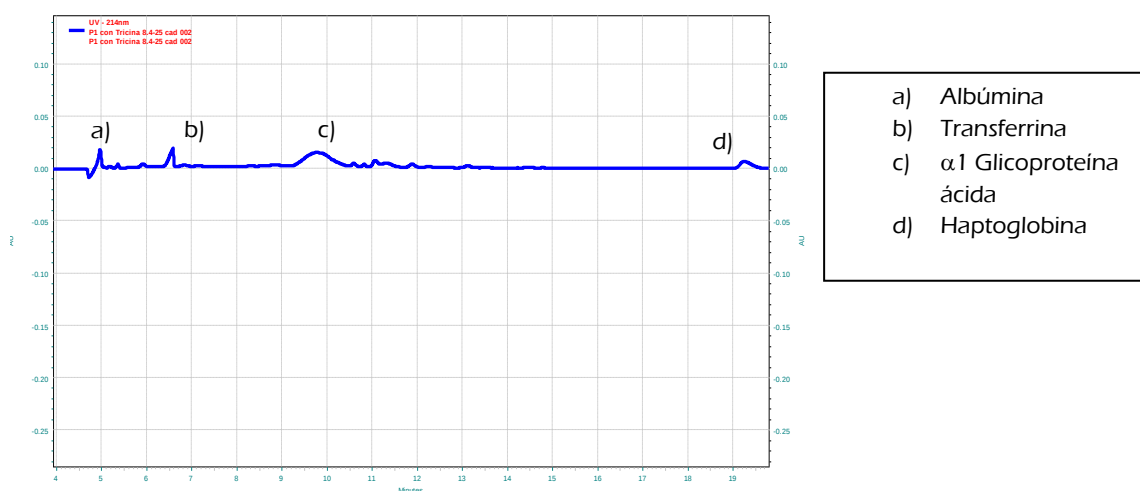
4.3 Especificidad

Para el tratamiento de muestras de orina de pacientes enfermos se utilizó el mismo procedimiento de separación de proteínas que en las muestras que se les agregó proteína estándar. Al correr las muestras mediante electroforesis capilar, no se traslaparon las proteínas entre sí; así que hubo una buena resolución entre picos.

5. Análisis de muestras

Una vez analizadas cada una de las proteínas estándar, se analizaron las muestras de pacientes sanos y enfermos obteniendo:

Figura 20. Paciente con falla renal crónica (Condiciones HEPES 25 mM pH 8 con CaCl_2 3 mM).



Se presume que estas son las proteínas que están presentes en la muestra del paciente con falla renal, debido a la similitud en el patrón electroforético y el tiempo de migración. Además, dependerá del estadio en el que se encuentre la falla renal para manifestar cierto tipo y número de proteínas. La problemática en este tipo de enfermedades radica en que las mediciones de proteínas convencionalmente se realizan en suero, lo que no permite realizar un diagnóstico certero, pues la concentración de proteínas eliminada por orina determinará si la falla es de tipo renal o no y el nivel al que se encuentra el daño (glomerular, tubular o mixto), ya que éstas son proteínas que convencionalmente no se eliminan por esta vía. Por lo regular, este tipo de enfermedades se caracterizan por generar lesiones de tipo mixto, ya que el glomérulo no filtra como debiera por exceder los 34 nm convencionales de diámetro o por cambiar su carga (normalmente es negativa) y al pasar las proteínas por el túbulo proximal, éstas no son reabsorbidas.

Para tener mayor certeza de que fueran correctas las proteínas encontradas en la muestra del paciente, se realizó un spiking que consistió en adicionar a la muestra de orina del paciente enfermo una misma concentración de proteína estándar que se esperaba encontrar, esperando se obtuviera una mayor área bajo la curva en aquellos picos que representaban a cada proteína esperada (Figura 21):

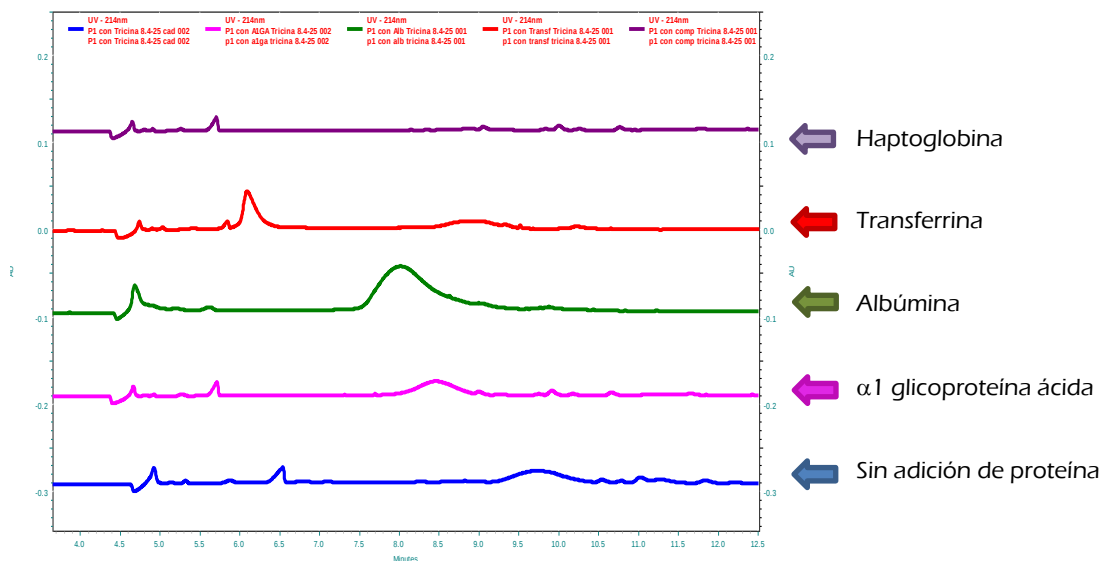
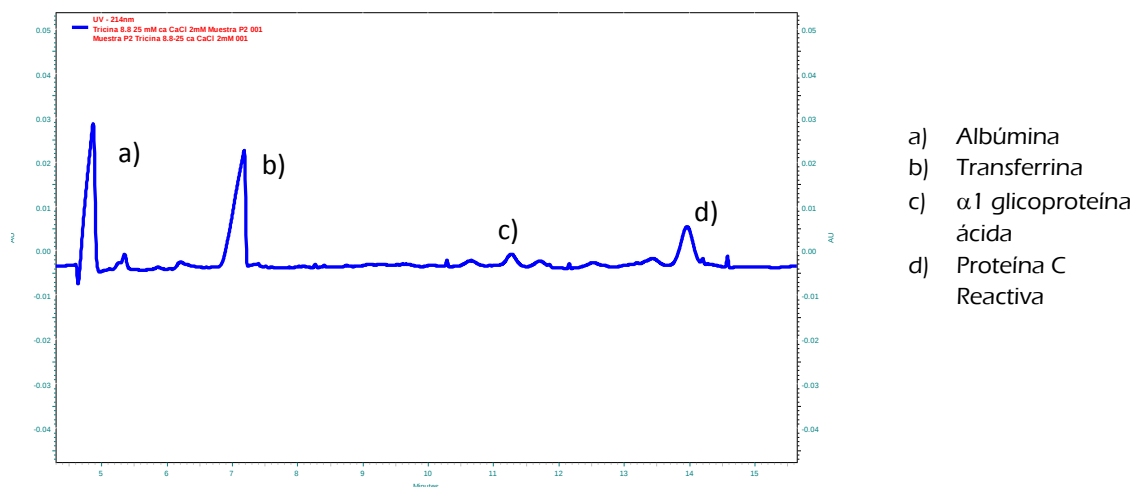


Figura 21. Proteínas esperadas y encontradas en la muestra del paciente con insuficiencia renal.

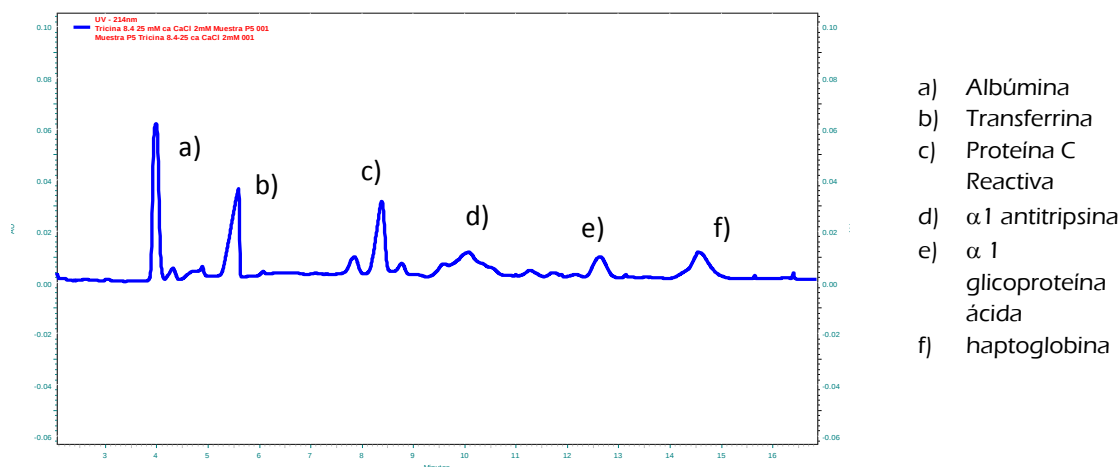
Fueron similares el tiempo de migración (por ejemplo: muestra sin adición de albúmina 6.5 minutos, muestra con adición de proteína 6.93 minutos) y el área bajo la curva aumentó de manera proporcional a la cantidad de proteína adicionada en la muestra (por ejemplo: muestra sin adición de proteína ABC: 110899, con adición de albúmina, el mismo pico tuvo un ABC de 1378065). El tiempo de migración tiende a modificarse ligeramente debido al pH que proporcionan determinadas proteínas, esto promoverá la velocidad del flujo electroosmótico y por lo tanto en el tiempo de migración; sin embargo, tales modificaciones caen dentro del % de error aceptado.

Paciente 2: Síndrome nefrótico (Condiciones: Tricina 25 mM pH 8.8 con CaCl_2 3 mM).



El glomérulo normalmente funciona como un mecanismo de filtrado al ser selectivo con su carga que tiene 3 componentes: el endotelio fenestrado del glomérulo, la membrana basal glomerular y las células epiteliales viscerales (podocitos), éstas, en su mayoría, contienen glicoproteínas cargadas negativamente; cuando circulan proteínas aniónicas, son repelidas, mientras que proteínas catiónicas son atraídas; éste procedimiento es generado en la glomerulonefritis, característica del síndrome nefrótico (Choi y Lee, 2003), debido a esto, la albúmina (cuya carga es negativa) es repelida y se encuentra en menor concentración en orina (como lo muestra el electroferograma) y las proteínas con carga positiva, como las pertenecientes al grupo $\alpha 1$, se encuentran en mayor proporción; además, debido a los complejos inmunes que se presentan en esta enfermedad, éstas pueden ir acompañadas de Inmunoglobulinas G.

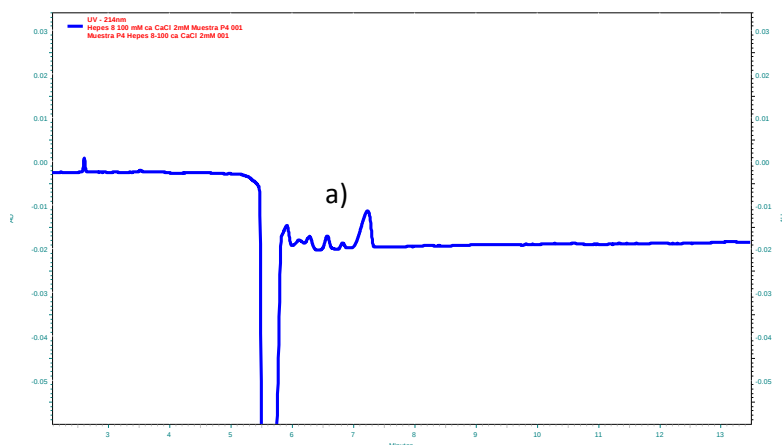
Paciente 3: Piometra (Condiciones Tricina 25 mM pH 8.4 con CaCl_2 3 mM).



Los pacientes con piometra, según Zaragoza, 2001, se caracterizan por tener hiperglobulinemia como consecuencia de la estimulación crónica antigénica del sistema inmune. La albúmina es la primera proteína que comienza a excretarse por vía renal, lo que explica el hallazgo de la hipoalbuminemia. La piometra canina es una enfermedad de carácter hormonal que se caracteriza por producir glomerulopatía por depósito de complejos inmunes responsables de alteraciones renales de gravedad variable dependiendo del grado de progresión, estas anomalías, son difícil de diagnosticar y la biopsia renal no es una alternativa viable, tal suceso es el que presenta el paciente en estudio, y conforme avanza el cuadro mayor será el daño de tipo tubular que provoca la eliminación de otras proteínas que de manera normal se reabsorben a este nivel.

Los 8 pacientes con piometra mostraron un patrón similar de proteinuria; la muestra del paciente con mordedura de serpiente no presentó alteraciones en las proteínas de la orina.

Paciente 4: Paciente clínicamente sano (Condiciones HEPES pH 8 100 mM con CaCl_2 3 mM).



a) IgG

El glomérulo tiene un diámetro de 34 nm (Choi y Lee, 2003). Existen proteínas de bajo peso molecular y diámetro que tienen la capacidad de atravesar al glomérulo, y de no ser así, ser reabsorbidas por el túbulo proximal, tal es el caso de las proteínas de Bence Jones, que son cadenas ligeras de inmunoglobulinas de entre 22.5 y 40 kDa que se encuentran en aproximadamente 40% de los casos y se sugiere, podrían ser las que están presentes en la muestra de paciente sano.

Una vez analizadas las muestras de pacientes sanos y enfermos, se determina que cada una tiene un patrón electroforético diferente dependiendo de las condiciones a las que sea sometida, esto da la oportunidad de manejar las condiciones acorde a las proteínas que desean separarse y así lograr una resolución y sensibilidad mayor en la identificación de las mismas para realizar un diagnóstico con prontitud a pacientes con alguna enfermedad renal.

Conclusiones

Las proteínas tienen un patrón electroforético distintivo dependiendo de su diámetro, de su peso molecular e interacción electrostática, que irá cambiando dependiendo de los aditivos que se agreguen a la muestra antes de ser analizada. Varias de ellas no habían analizado por electroforesis capilar de zona.

Es necesario identificar el tipo de proteína presente en cada muestra para poder encontrar la etiología de la enfermedad y su comportamiento en el organismo para el diagnóstico temprano.

Existen muchas técnicas para realizar la identificación de las proteínas, pero son pocas las que ofrecen el análisis de las proteínas en conjunto, además de ser solamente implementadas en suero de humanos. Esta situación es desfavorable por ser condiciones diferentes entre animales/humanos y suero/orina, debido a esto la necesidad de encontrar una técnica adecuada para eficientizar la caracterización de las mismas.

La electroforesis capilar de zona permite analizar de manera rápida, sensible y eficiente cada proteína que probablemente se encuentra en muestras de pacientes enfermos, y así diagnosticar en fase temprana la enfermedad renal.

Perspectivas

Hacer uso de otras modalidades de electroforesis capilar para mejorar las señales y obtener mejores resultados.

Identificar las proteínas presentes en orina de perros que presenten una enfermedad pero en diferentes estadios de la misma.

BIBLIOGRAFIA

Aguirrebengoa IL. 2006. Desarrollo de métodos de electroforesis capilar para el análisis de formas de glicoproteínas de interés farmacéutico y clínico. Tesis Doctoral. Departamento de análisis instrumental y química ambiental, Instituto de química orgánica general, Madrid.

Alanís C.L.J. 1988. Fundamentos sobre urología clínica en perros y gatos. Ed. UNAM. México, D.F. pp. 1-8.

Altria K.D. 1999. Overview of capillary electrophoresis and capillary electrochromatography. J. Chromatogr 856: 443-63.

Barrera C.R. 2007. Valoración de los distintos métodos laborales empleados en el diagnóstico de la insuficiencia renal crónica en perros. RECVET. Vol. II. No 01-04, enero-abril. <<http://www.veterinaria.org/revistas/recvet>> (Fecha de consulta enero del 2011).

Beckman INC. 1991. Introduction to capillary electrophoresis. Handbook by Beckman Company. USA. pp. 1-11.

Benitez B, Forero D, Arboledas G, Granados J, Fernández W, Arboleda H. 2010. Exploration of genetic susceptibility factors for Parkinson's disease in a South American sample. Journal of genetics.

Beristain D, Zaragoza C. 2009. Incidencia de sexo, edad y raza en perros con proteinuria post-renal: estudio retrospectivo de 162 casos. REDVET (Revista Electrónica de Veterinaria) ISSN 1695-7504. Consulta en línea. Fecha de consulta: 13/junio/09. URL: <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n050509.html>. Cáceres, España. Pp. 1-8.

Bernard A., Lauwerys R. 1983. Latex immunoassay of urinary albumin, J Clin Chem clin Biochem; 21, 1. 1983. Pp: 25-30.

Biogenex. 2004. Anti alpha-1-antitrypsin polyclonal. Doc 932-015P-4, USA.

BSAVA. 2005. Villiers Elizabeth, Blackwood Laura. Manual of canine and feline clinical pathology. 2ª edition. England. Cap. 7

Castagnino JM. 2000. Electroforesis Capilar (Tema de Bioquímica y Fisicoquímica). Revista Bioquímica. Vol. 25. No. 1. Argentina. Pp. 13-32.

Castañón MM, Steyerthal N, Castagnino JM, Garbossa G. 2006. Aplicación de un método de electroforesis capilar al estudio de la glicosilación de albúmina in vitro. Capillary Zone Electrophoresis study of the in vitro albumin glycation process. Acta bioquím. clín. latinoam. v.40 n.4 La Plata.

Ceruloplasmina. 2005. Reactivos para la determinación cuantitativa de ceruloplasmina en el suero humano con método nefelométrico (ref. NPP11L). Radim. SPA. Rev. Pp 1-4.

Chan TM, Herold D. 2006. Chip Electrophoresis as a Method for quantifying total microalbuminuria. Clinical chemistry. Vol. 52. No. 11. pp. 2141-2146.

Chen J, Lee CS. 2002. On-line post-capillary affinity detection of immunoglobulin G for capillary zone electrophoresis. Department of Chemistry and Biochemistry. University of Maryland. College Park 20742. USA. Version online ISSN 1851-6114.

Chicharro M. 2000. Electroforesis Capilar. Métodos actuales de química analítica, desarrollo, instrumentación y Sistema de calidad. Consulta en línea. Fecha de consulta: 12/08/09. URL: http://www.uam.es/personal_pdi/ciencias/manchi/elec-cap/Apuntescurso.pdf.

Ciccone B. 2001. A buffer system for capillary electrophoresis. American Laboratory. USA. pp. 30-33.

Compton J, McClure C, Bonderman P. 2004. The use of o-dianisidine for serum haptoglobin electrophoresis using cellulose acetate. Department of Clinical Pathology. Indiana University School of Medicine. Vol. 9. Pp: 104-105.

Cortelazzo A, Guerranti R, Bini L, Hope-Onyekwere N, Muzzi C, Leoncini R et al. 2010. Efecto de las proteasas del veneno de serpiente sobre las cadenas de fibrinógeno humano. Vol. 8(3). Pp: 120-125.

Cunningham G. J. 2005. Fisiología veterinaria. Tercera edición. Ed. Elsevier-Saunders. Madrid, España. pp 430-437.

Desai M.J., Armstrong D.W. 2003. Separation, identification, and characterization of microorganisms by capillary electrophoresis. Microbiol Mol Biol Rev 67: 38–51.

Escalante C. 2006. Proteinuria, fisiología y fisiopatología aplicada. Acta médica costarricense Vol. 49 No. 002. Consulta en línea. Fecha de consulta: 12/junio/09. URL: [Http://www.actamedica.sa.cr/revistaimpresa/amc/021106.html](http://www.actamedica.sa.cr/revistaimpresa/amc/021106.html). San José, Costa Rica. Pp. 83-89.

Fauchier P, Catalan F. 1988. Interpretive Guide to Clinical Electrophoresis. Helena Laboratories Paris France. Pp: 2-10.

Fernández E, Galván A. 2006. Métodos para la cuantificación de proteínas. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Campus Universitario de Rabanales, España.

Ferrer J, Aznar L, Morales JP, Pereda A, Llopis R, Ribes P, Ferrer V, Martínez M. 1996. Aerosol de Alfa 1 antitripsina en el tratamiento de la fibrosis quística. Anales españoles de pediatría. vol.44 no. 2. Pp 109-111.

Frandsen R. D., Spurgeon T. L. 1995. Anatomía y fisiología de los animales domésticos. Quinta edición. Ed. Mc-Graw Hill interamericana. México, D.F. Pp. 370-372.

Grauer Gregory F. 2005. Early detection of renal damage and disease in dogs and cats. Department of clinical Sciences. College of Veterinary Medicine. Kansas State University. 111B Mosier Hall. Manhattan. KS 66506. USA. Vet Clin North Am Small Anim Pract 35:581-96.

Grauer Gregory F. 2007. Measurement, interpretation, and implications of proteinuria and albuminuria. Department of clinical Sciences. College of Veterinary Medicine. Kansas State University. 111B Mosier Hall, Manhattan. KS 66506. 2007. Vet Clin North Am Small Anim Pract 37:283-95.

Grieve R, 2005. Heska Corporation. Test para la detección rápida de daños en los riñones caninos. Consulta en línea. Fecha de consulta: 7/09/09. URL: <http://www.prnewswire.co.uk/cgi/news/release?id=80525>. Canadá.

Hamilton R, Hopkins B, Shihabi K, 1989. Myoglobinuria, hemoglobinuria and acute renal failure. Clinical Chemistry. Vol. 35. No. 8. pp. 1713 -1720.

Haptoglobina. 2005. Reactivos para la determinación cuantitativa de ceruloplasmina en el suero humano con método nefelométrico (ref. NPP21L). Radim, SPA. Rev. M 318 2005. Pp 1-4.

Harris C. D. 2001. Análisis químico cuantitativo. Segunda edición. Editores Reverte. Barcelona-Bogotá- Buenos Aires- Caracas-México. 22:609-626.

Herráez VJ, Herranz RM, López MI. 2004. ¿Qué es un modelo animal?. Revista Gaceta Óptica. No. 382. Consulta en línea. Fecha de consulta: 22/10/09. URL: http://www.cnoo.es/modulos/gaceta/actual/gaceta382/CNOO_Articulo2.pdf. Pp 20-24.

Heska ERD. 2006. HealthScreen Canine Urine Test (Canada). Veterinary Edition. Consulta en línea. Fecha de consulta: 18/09/09. URL: [http://HESKA_E_R_D_-HealthScreen Canine Urine Test \(Canada\) Veterinary Information from Drugs_com.mht](http://HESKA_E_R_D_-HealthScreen_Canine_Urine_Test_(Canada)_Veterinary_Information_from_Drugs_com.mht). USA.

Jenkins M.A. 2000. Clinical applications of capillary electrophoresis. Mol Biotechnol 15:201-209.

KBC. 1994. Kamiya Biomedical Company. Human alpha 2 macroglobulin ELISA, CAT KT 499. USA.

Kim W, Park H, Park W, Doh J, Heo S, Lee KJ, 1993. Quantitative Analysis of serum proteins separated by capillary electrophoresis. *Clinic chemistry*, 39/4. Pp: 689-692.

Kit nefelometría y turbidimetría, biomedicina, patología clínica e informática. 2010 URL: [http://www.efreecontrol.com/pdf/nsc/Catalogo\(Kits-Otros\)_ES.pdf](http://www.efreecontrol.com/pdf/nsc/Catalogo(Kits-Otros)_ES.pdf), Fecha de consulta: 2010.

Laders P, Prasad R, Oda P, Stout L. 1997. Capillary Electrophoresis of transferrin glycoforms. Patent 5993626. No. 788323,24 (299).

Lehmann R, Koch M, Voelter W., Haring HU, Liebich HM. 1997. Routine serum proteins analysis by capillary zone electrophoresis: clinical evaluation. *Cromatographia*, vol. 45. pp 390-395.

Linhardt R. J., Toida T. 2002. Ultra-high resolution separation comes of age. *Science*; 298: 1441-1442.

Maldonado N. 2003. Frecuencia de casos médico quirúrgicos en una clínica veterinaria de la ciudad de Morelia. Tesis de Licenciatura. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Michoacán, México.

MacGregor M.S., Boag D.E., Innes A. 2006. Chronic kidney disease: evolving strategies for detection and management of impaired renal function. *Q J Med* 99:365-375.

Marks F. 2007. La compañía del perro y sus beneficios. *Revista Sobre Perros*. Consulta en línea. Fecha de consulta: 12/09/09. URL: http://www.sobreperros.com/articulos/compania_beneficios_del_perroMéxico.

Mc Gavin M.D., Zachary J.F. 2007. Urinary system En: *Pathologic basis of veterinary disease*. 4a ed. Edit. Mosby-Elsevier. Missouri, USA. p. 613.

Menéndez F, Menéndez I, Mederos A, Castro J, Barrios B. 1995. Fenotipos alfa 1 antitripsina en pacientes cubanos con artritis reumatoidea. *Rev Cubana Med*; 34(3).

Miyahira JM. 2003. Insuficiencia Renal Aguda. *Rev Med Hered Revista Médica Heredia* Vol. 14 No. 1. Consulta en línea. Fecha de consulta: 13/junio/09. URL: [Http://: www.rmh.pe/revista/2003.html](http://www.rmh.pe/revista/2003.html). Pp. 36-43

Nashabeh W, El Rassi Z. 1991. Capillary zone electrophoresis of a 1 acid glycoprotein fragments from trypsin and endoglycosidase digestions. *Journal of chromatography*. 536. Oklahoma. Pp: 31-42.

Nelson RW, Couto G. 1998. Urinary Tract disorders. *Small Animal Internal Medicine*. St. Louis Missouri: Mosby Inc. EUA. Pp. 572-667.

Núñez O. 1998. Análisis clínicos En: Métodos diagnósticos Modulo 1 del Diplomado a Distancia en Medicina, Cirugía y Zootecnia en Perros y Gatos. Editado por la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México. C.U. México. pp. 30-50.

Odda R.P., Landers J.P. 1996. Introduction to capillary electrophoresis En: *Handbook of capillary electrophoresis*. Oda R.P. and Landers JP, Editors. 2nd. Ed. CRC Press, Boca Raton. Pp. 7-8.

Revert-Murciano J, Martínez-LaHuerta JJ, Ginés A. 1994. El fibrinógeno como factor de riesgo cardiovascular. *Semergen* 24 (4). Valencia. Pp: 290-298.

Riedemann F, Duffau T. 2006. Equivalence study between plasmatic C reactive protein level and antibiotic use in a pediatrics unit. *Rev Chil Pediatr* 77 (6). 2006. Pp: 594-598.

Rikihisa Y, Yamamoto S, Kwak I, Iqbal Z, Kociba G. 1994. C Reactive protein and a 1 acid glycoprotein levels in dog infected with ehrlichia canis. *Journal of clinical microbiology* Vol. 32 no. 4. Pp: 912 a 917.

Rodríguez ML. 2010. Nefrología y urología: pruebas de función renal. <http://www.saludalia.com>, fecha de consulta: 29 dic 2010.

Rodríguez E. 2007. Ética de la Investigación en modelos animales de enfermedades humanas. Rev. Acta Bioética (SciELO, Chile). Vol. 13 No. 1. Consulta en línea. Fecha de consulta 15/07/09. Version online ISSN: 1726-569X URL: <http://www.scielo.cl/scielo.php?pid=S1726-> Chile.

Ross, Michael J. MD, Fan Cheng M, Ross Michael D., Chu Te-HuaTearina, Shi YueYue, Kaufman Lewis, Zhang Weijia, Klotman Mary E., Klotman, Paul E. 2006. Infection Iniciales and inflammatory cascade in human renal tubular epithelial cells. JAIDS Journal of Acquired Immune deficiency Syndromes: Vol. 42-Issue 1 pp. 1-11.

Shreffler DC, Brewer GJ, Gall JC, Honeyman MS. 1967. Electrophoretic variation in human serum ceruloplasmin: a new genetic polymorphism Biochemical genetics 1. Pp: 101-115.

Steinhausen M., Endlich K., Weigman D.L. 1990. Glomerular blood flow. Editorial review. Kidney Int 38:769-784.

Steven S.A., Lowe J. 1998. L'appareil urinaire En: Histologie. Ed Pradet, Chapitre 16. France. pp. 271-299.

Stockham S.L., Scott N.A. 2008. Urinary system En: Fundamentals of veterinary clinical pathology. 2da ed. Edit. Blackwell publishing. Iowa, USA. pp. 417.

Stocking C.J., Slater J.M., Simson C.F. 1998. Applications of Capillary Electrophoresis in Nephrology. Exp Nephrol 6:415-420.

Tizard I. 2006. Inmunología Veterinaria. 6ª. Edición. Editorial Mc Graw Hill Interamericana. USA. Pp: 4-9.

Volanakis E, Barnum Scott R, Giddens M, Galla H. 1985. Renal Filtration and Catabolism of complement protein. N Engl J Med No. 312. Pp: 395-399.

Wu J, Chen Y, Gu W. 2010. Urinary proteomics as a novel tool for biomarker discovery in kidney diseases. Zhejiang University Science Biomed and Biotechnol. no. 11 (4). Pp: 227-237.

Zaragoza C. 2001. Estudio Electroforético de la proteinuria en perros sanos y en perros con enfermedad renal. Tesis Doctoral. Consulta en línea. Fecha de Consulta: 11/09/09. URL: <http://dialnet.unirioja.es/servlet/oaites?codigo=377>. España.

Zaragoza C , Barrera R , Centeno F , Tapia JA, Durán E , González M. 2002. SDS-PAGE y Western blot de las proteínas urinarias en perros con leishmaniasis. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. 25; 768(1). Pp: 105-111.

Ziauddin Ahmed, Jean Lee. 1997. Asymptomatic urinary abnormalities hematuria and proteinuria, medical clinics of North America. vol. 81 issue 3.