

EVALUACION DEL METODO DEL BIURET PARA LA CUANTIFICACION DE LAS PROTEINAS TOTALES EN EL LIQUIDO CEFALORRAQUIDEO

Claudia Hidalgo Quesada *

RESUMEN

Se evaluó un método para la determinación de las proteínas totales en el líquido cefalorraquídeo, basado en la reacción del biuret, modificando el reactivo para su cuantificación en el suero. La prueba dio un coeficiente de variación intracorrída de 1,4% a 2,1% para niveles de 0,59 g/l a 2,62 g/l. Esta variación es menor que la encontrada en otros métodos, incluyendo el turbidimétrico. La linealidad del método se conserva hasta una concentración de 7,0 g/l. El método evaluado (y) correlacionó bien con otro procedimiento basado también en el principio de biuret (x): $r = 0,9953$; $y = -0,0645 + 1,0428x$; $n = 51$. La técnica demostró ser rápida y sencilla, lo cual la hace aplicable a los exámenes de emergencia.

Palabras clave: proteínas - líquido cefalorraquídeo - biuret -espectrofotometría - trastornos del sistema nervioso central.

INTRODUCCION

La determinación de las proteínas totales en el líquido cefalorraquídeo (LCR), forma parte de los estudios bioquímicos realizados a este material clínico y, junto con el análisis de glucosa en el líquido, constituye un parámetro importante para la diferenciación de trastornos neurológicos o patologías relacionadas

con el sistema nervioso central (SNC). La cuantificación de estas proteínas pone de manifiesto el aumento en la permeabilidad de la barrera hematoencefálica o el aumento local en la producción de inmunoglobulinas.

El aumento en la permeabilidad de dicha barrera es el producto de una alta presión intracranéana ocasionada por un tumor cerebral, una hemorragia intratecal, o bien debido a una inflamación bacteriana o viral de las meninges; encefalitis o poliomielitis. El mayor incremento de proteínas totales ocurre durante las meningitis bacterianas.

La síntesis intratecal aumentada de inmunoglobulinas, particularmente Ig G, ocurre en enfermedades desmielinizantes del SNC, especialmente en la esclerosis múltiple (7).

Los métodos para la determinación de proteínas totales deben ser muy sensibles debido a la baja concentración de proteínas presentes en el LCR. Además, el método debe ser rápido y sencillo, ya que la mayoría de los análisis de LCR revisten el carácter de emergencia.

Los métodos utilizados con mayor frecuencia son los turbidimétricos; los basados en la unión con un colorante (Lowry y sus variantes) y los métodos del biuret (4,7).

En este estudio se evaluó un procedimiento basado en la prueba del biuret, modificando el reactivo empleado en la determinación de proteínas totales en el suero. Este método se comparó con el empleado actualmente en los laboratorios de los hospitales de la Caja Costarricense del Seguro Social (C.C.S.S.); el cual también se basa en el principio del biuret.

* Trabajo realizado en el Departamento de Análisis Clínicos, Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica.

MATERIALES Y METODOS

Equipo:

Para las determinaciones espectrofotométricas se utilizó un espectrofotómetro Shimadzu UV 160 (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japón). Las muestras de líquido cefalorraquídeo se transfirieron con pipetas automáticas (Clinipette, Boehringer, West Germany).

REACTIVOS Y SOLUCIONES:

Reactivo de biuret modificado: En un frasco volumétrico de un litro se disolvieron 3,0 g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$, 5,0 g de yoduro de potasio y 1,0 g de EDTA. $2\text{H}_2\text{O}$, en 500 ml de agua destilada. Posteriormente se agregaron 100 ml de NaOH 6 mol/l, con agitación constante y se llevó a un litro con agua destilada. Este reactivo es estable por aproximadamente cinco meses, conservado a temperatura ambiente y protegido de la luz.

Tartrato alcalino: En un frasco volumétrico de un litro se disolvieron 9,0 g de tartrato de sodio y potasio y 5,0 g de yoduro de potasio en 800 ml de agua destilada. Luego se adicionaron 100 ml de NaOH 6 mol/l y se llevó hasta la marca con agua.

Reactivo de biuret según el Laboratorio de Reactivos del Hospital San Juan de Dios: En un balón aforado de un litro se disolvieron 1,5 y de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 1,0 de yoduro de sodio y 6,0 g de EDTA. $2\text{H}_2\text{O}$ en 500 ml de agua destilada. Se adicionaron 300 ml de NaOH 2,5 mol/l y se llevó a un litro con agua.

Patrón de proteínas totales:

a.) Patrón concentrado: Se obtiene con una muestra de suero humano fresco o un pool de sueros. Este no debe ser icterico y debe estar libre de hemólisis y

turbiedad, con una relación normal entre la albúmina y las globulinas (1,3 a 1,8). Luego se determina la concentración de proteínas totales por medio de un método de biuret correctamente estandarizado. Este patrón se almacena entre 2 y 4° C.

b.) Patrón diluido: El patrón concentrado se debe diluir hasta obtener una concentración de 1,0 g/l, utilizando solución salina isotónica (0,145 nmol/l).

OBTENCION DE LAS MUESTRAS:

Las muestras se obtuvieron de pacientes internados en el Hospital San Juan de Dios (San José), a los cuales se practicó una punción lumbar con el fin de lograr un análisis completo del líquido cefalorraquídeo. Estos análisis preliminares se realizaron en el Laboratorio Clínico del Hospital San Juan de Dios. Los volúmenes restantes se conservaron sin preservantes y en refrigeración (2 a 4°C), con el fin de utilizarlos para el presente estudio.

Antes de los ensayos, se centrifugó cada muestra de LCR durante cinco a diez minutos a 2000 g. El análisis de proteínas se llevó a cabo en el líquido sobrenadante.

PROCEDIMIENTOS

Proteínas totales en LCR utilizando el método en estudio

En tubos marcados como "muestra", "patrón" y "blanco" se depositaron 0,5 ml de LCR, 0,5 ml de patrón diluido de proteínas (1,0 g/l) y 0,5 ml de solución salina isotónica (0,145 nmol/l), respectivamente. Posteriormente se agregó a cada tubo 1,5 ml de reactivo de biuret modificado; después de agitarlos se incubaron a 37° C durante diez minutos. Seguidamente se leyeron las absorbancias a una longitud de onda de 540 nm, contra el blanco de reactivos.

Si la muestra no es incolora es necesario preparar un blanco de muestra sustituyendo el reactivo de biuret por tartrato alcalino. Se leen las absorbancias, usando el reactivo de tartrato como blanco.

CALCULOS:

Proteínas totales g/l = $\frac{A_m - A_p}{A_p} \times C_p$, donde A_m y A_p son las absorbancias del desconocido y del patrón, respectivamente, y C_p es la concentración del patrón g-l.

Si se usa blanco de muestra, el cálculo se realiza de la siguiente manera:

Proteínas totales
$$g/l = \frac{(A_m - A_{bm})}{A_p} \times C_p$$

donde A_m , A_{bm} y A_p son las absorbancias del desconocido, del blanco del desconocido y del patrón, respectivamente, y C_p es la concentración del patrón en g/l.

ESTUDIO COMPARATIVO:

Para realizar un estudio de correlación y regresión lineal, se analizaron 51 muestras de LCR por el método de biuret en estudio y por el método de biuret utilizado en el Laboratorio del Hospital San Juan de Dios.

RESULTADOS

Espectro de absorción:

Se determinó el espectro de absorción de dos muestras de LCR de 1,36 g/l y 3,25 g/l y de un patrón de 1,0 g/l de proteínas totales obteniéndose curvas similares con una meseta de absorción máxima situada entre 538 y 555 nm.

ESTABILIDAD DEL PRODUCTO FINAL COLOREADO:

Este color se hace estable después de cinco minutos una vez agregado el

reactivo de biuret, tanto en los patrones como en las muestras de concentración normal y las de alta concentración de proteínas. Esta estabilidad se obtiene a temperatura ambiente y a 37°C.

EFFECTO DE LOS VOLUMENES DE LA MUESTRA Y DEL REACTIVO SOBRE LA LINEALIDAD:

Se ensayaron las siguientes combinaciones de volúmenes de LCR y de reactivo de biuret: a) 1,5 ml de muestra y 0,6 ml de reactivo, b) 1,5 ml de muestra y 1,0 ml de reactivo de biuret c) 1,0 ml de muestra y 1,0 ml de reactivo de biuret, d) 0,5 ml de muestra y 1,5 ml de reactivo. Se seleccionó la alternativa d) por presentar alta linealidad y una adecuada sensibilidad.

LINEALIDAD:

La linealidad se conservó hasta una concentración de 7,0 g/l de proteínas, tanto en una matriz proteica (patrón de suero) como en la matriz propia del LCR.

EFFECTO DEL EDTA CONTENIDO EN EL REACTIVO DE BIURET:

Se observó que las mezclas de líquido cefalorraquídeo con el reactivo de biuret utilizado para cuantificar proteínas totales en suero, presentaban turbiedad después del período de incubación. Para eliminar dicho problema se añadió EDTA, pues, se ha demostrado que esta sal secuestra los iones de calcio y magnesio causante de esta turbiedad, debido a que forman hidróxidos insolubles (2). Se eligió la concentración de 1,0 g/l de EDTA, pues conforme se aumenta la concentración se pierde sensibilidad.

PRECISION:

En el cuadro 1 se muestra la precisión dentro de una misma corrida y la precisión día a día con dos pools de LCR: uno con concentración normal y otro con concentración alta de proteínas.

PRUEBAS DE RECUPERACION:

En el cuadro 2 se indica la recuperación analítica de proteínas totales (0,25 a 4,00 gl) agregadas a un pool de LCR. Esta recuperación mostró un promedio de 104,7%.

Comparación de método de biuret modificado con el de biuret empleado en los hospitales de la C.C.S.S.

Se analizaron 51 muestras de LCR, obteniéndose una buena correlación entre ambos métodos.

La línea de regresión obtenida fue: $y = 0,0645 + 1,0428x$, el coeficiente de correlación, r , fue 0,9953 y S_{yx} fue de 45,9 mg/l.

Al realizar una comparación entre el método utilizado en la actualidad y el método evaluado, se demostró que este último proporciona valores más altos (Figura 1).

Intervalo de referencia preliminar basado en los valores obtenidos de los LCR de los pacientes:

El intervalo de referencia fue de 0,31 a 0,67 gl (media + dos desviaciones estándar). Este se logró a partir del estudio de las muestras de LCR obtenidas de 63 pacientes adultos que no presentaron síntomas clínicos ni evidencias de resultados de laboratorio que hicieran sospechas de un posible diagnóstico de meningitis.

DISCUSION

La determinación de proteínas totales en el LCR se puede realizar por varios

métodos, pero es necesario considerar el poco volumen de la muestra, lo cual limita la elección. Hace varios años, las técnicas más usadas en nuestro país, para propósitos de rutina, eran las turbidimétricas; sin embargo, tenían como desventaja el volumen de muestra requerido. Además, era necesaria la formación de un precipitado homogéneo de partículas y que el material usado como patrón tuviera un modelo de precipitación similar al de las mezclas normales y anormales de proteínas. (4,7)

En anteriores trabajos se han hecho revisiones de otras técnicas aplicadas a la cuantificación de proteínas en el LCR, entre ellas las basadas en la reacción de Folin-Ciocalteu (reacción de los fenoles), la técnica de Lowry y sus variantes, que combina la reacción de biuret seguida de la adición del reactivo de los fenoles (1,5). Este último método posee una alta sensibilidad, pero no es específico, ya que en él reaccionan otros compuestos no proteicos presentes en el líquido cerebroespinal, y según se ha calculado, estos ocasionan un error, al aumentar el resultado en cantidades que van de 0,03 a 0,09 gl (2).

El método evaluado en el presente trabajo se basa en la reacción de biuret. En un experimento anterior donde se usó el método de biuret con desproteinización, (1) los autores observaron que la intensidad del color del complejo proteína-biuret era similar para las diferentes fracciones proteicas, lo cual es una ventaja sobre los métodos de Lowry usados para la comparación. Con la técnica utilizada en este estudio, los valores de referencia obtenidos oscilaron entre 0,31 y 0,67 gl (media = dos desviaciones estándar), los cuales son mayores que los obtenidos con el método de Folin-Lowry (2) y los obtenidos con el método turbidimétrico (7), los cuales fluctúan entre 0,15 y 0,45 gl.

Esas diferencias pueden ser causadas por sustancias no proteicas presentes (proteasas, peptonas o péptidos), las cuales también reaccionan con el reactivo de biuret.

El método propuesto se comparó con otro de biuret conocido y el coeficiente de correlación obtenido fue 0,9953 y la ecuación de la línea de regresión fue $y=0,0645 + 1,0428x$ (Figura 1).

Cuando se emplea la reacción del biuret no se presenta el problema que ocasiona la utilización de suero como patrón de proteínas totales, mientras que en método turbidimétrico la albúmina produce más turbiedad que las globulinas (3,7).

Con las modificaciones introducidas, el volumen de LCR, necesario para el análisis, es menor que el requerido en el método comparativo, y se logra linealidad hasta una concentración de 7,0 gl de proteínas totales en el líquido espinal.

Por otra parte, se reduce el tiempo de incubación, lo cual es una ventaja en cuanto a la obtención de resultados, que por lo general tienen el carácter de emergencia.

La precisión dentro de una corrida por el método evaluado de 2,1% y 1,4%, para muestras con concentraciones de proteínas de 0,52 gl y 2,61 gl, respectivamente, y la precisión día a día fue de 5,1% y 3,8% para unos niveles de proteínas de 0,59 gl y 2,83 gl, respectivamente (Cuadro 1). Esta reproducibilidad es buena comparada con la obtenida por el método turbidimétrico, que se considera aceptable si sus valores oscilan entre 5 y 10% (1) y también con la obtenida por Karlsson y Alling por medio del método de Folin y Lowry (3). Estos autores obtuvieron un coeficiente de variación intracorrida de 1,94% y un coeficiente de variación entre corridas de 4,85% a niveles cercanos a 0,56 gl de proteínas.

En conclusión, la técnica de biuret evaluada representa un método sencillo, rápido y con buena reproducibilidad para la cuantificación de las proteínas totales en el LCR y podría ponerse en práctica en los laboratorios de los hospitales del país, como parte de los análisis bioquímicos de emergencia que se practican en el líquido cerebroespinal.

SUMMARY

Evaluation studies were performed on a method for the determination of the total proteins in the cerebrospinal fluid, procedure based on the biuret technique, modifying the composition of the reagent for its quantification in serum. The procedure consists in measuring the absorbance of 0,5 ml of sample with 1,5 ml of the modified biuret reagent, at 540 nm, after an incubation period of ten minutes. The test gave a within-run precision (CV) of 1,4% to 2,1% for samples containing total proteins at 0,52 gl to 2,61 gl, and a day to day precision (CV) of 3,8% to 5,1% for levels of 0,59 gl to 2,83 gl. This variability is smaller than the one found through other methods, the turbidimetric one, included. The linearity of the method keeps until a concentration of 7.0 gl. The evaluated method (y) correlated well with another procedure based also on the biuret principle (x): $r= 0,9953$; $y = 0,0645 + 1,0428x$; $n = 51$. The evaluated technique proved to be quick and simple, which makes it applicable when doing emergency tests.

Key words : proteins - cerebrospinal fluid - biuret - spectrophotometry - disorders of the central nervous system.

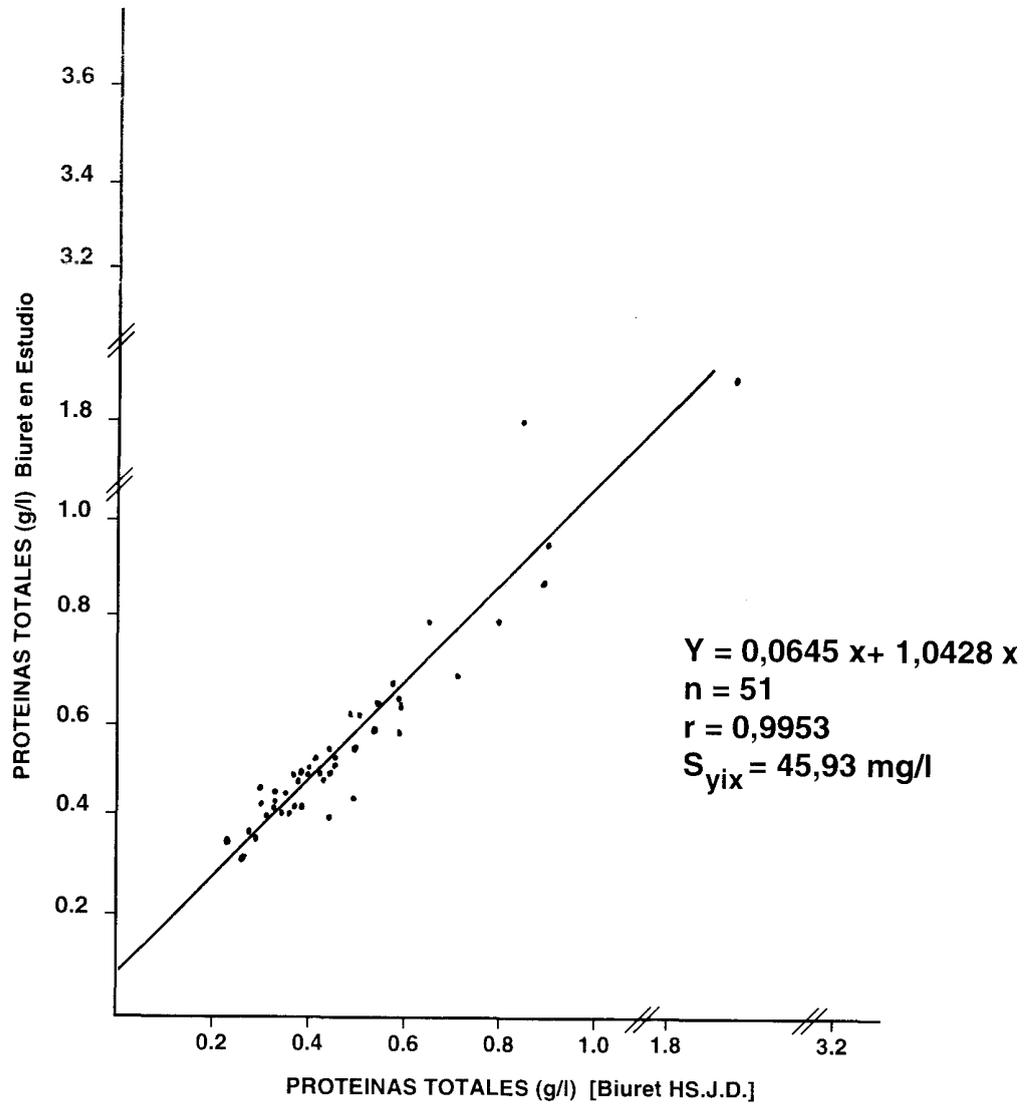


Fig. 1. Comparación entre las concentraciones de proteínas totales del LCR, obtenidas por el método de biuret en estudio con las obtenidas por el método de biuret empleado en el Laboratorio del Hospital San Juan de Dios.

Cuadro 1. Precisión para proteínas totales en el líquido cefalorraquídeo, determinadas por el método de biuret en estudio.

	Proteínas totales(g-1)		n	XCV,%
	Media	Desviación Estándar		
Dentro de corrida	0,52	0,011	20	2,11
	2,61	0,036	20	1,38
Día a día	0,59	0,030	18	5,08
	2,83	0,108	15	3,82

Cuadro 2. Recuperación de proteínas agregadas al líquido cefalorraquídeo, determinada por el método de biuret.

Agregado	Proteínas totales (g-1)		Recuperación %*
	Observado	Calculado	
0	0,46	0,46	-
0,25	0,71	0,71	100,0
0,50	1,01	0,96	110,0
1,00	1,50	1,46	104,0
2,00	2,59	2,46	106,5
3,00	3,61	3,46	105,0
4,00	4,56	4,46	102,5

Media = 104,7

* Recuperación (%) = 100 (valor observado - 0,46) cantidad de proteína agregada.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Blijenberg BG, Roetering HA, Zwang L, Leijnse BH. Spinal fluid protein revisited: a reappraisal of the biuret procedure. *J Clin Chem Biochem* 1985; 23: 225-30.
- 2.- Cannon DG, Olitzky GO, Inkpen JA. Proteins. En: Henry RJ, Cannon DC, Winkilman JW, eds. *Clinical Chemistry: Principles and technics*. 2a ed. New York: Harper and Row, 1974: 422-8.
- 3.- Karlsson B, Alling C. A comparative study of three approaches to the routine quantitative determination of spinal fluid total proteins. *Clin Chim Acta* 1980; 105: 67-73.
- 4.- Krystal G, Lam y, Schreiber WE. Application of a silverbinding assay to the determination of protein in cerebrospinal fluid. *Clin Chem* 1989; 35(5): 860-4.
- 5.- Macart M, Gerbaut L. An improvement of the Coomassie Blue dye binding method allowing an equal sensitivity to various proteins: application to cerebrospinal fluid. *Clin Chim Acta* 1982; 122:93-101.
- 6.- Schosinsky H, Jiménez M, Vargas M, Brilla E, Gutiérrez A, Vinocour E. *Manual de técnicas de Laboratorio: Química Clínica*. 8a ed. San José, Costa Rica: Of Publ Universidad de Costa Rica, 1988.
- 7.- Silverman LM, Christenson RH, Grant GH. Amino acids and proteins. En: Tietz NW, ed. *Textbook of Clinical Chemistry*. Philadelphia: WB Saunders, 1986: 607-15.