

Isoformas de la transferrina: Utilidad clínica de su determinación

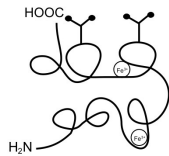
E M^a Deschamps, A Miña, MA Ciegues
 Servicio de Inmunología. Hospital Central Universitario de Asturias
 Rev. Digan Biol. v.52 n.1 Madrid ene.-mar. 2003

Introducción

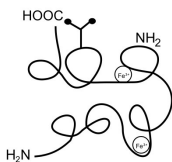
La transferrina (Tf) es una glicoproteína transportadora de hierro (Fe^{3+}), sintetizada y metabolizada principalmente en los hepatocitos. Está formada por una única cadena polipeptídica de 679 aminoácidos con una masa molar de 79.500 g/mol y un punto isoeléctrico (pI) que puede variar entre 5,4 y 5,9. Cada molécula de transferrina consta de dos lóbulos de similar estructura interna e independientes para la fijación de Fe^{3+} ; el lóbulo N-terminal contiene los residuos 1-336 y el C-terminal los residuos 336-679. Cada lóbulo a su vez está plegado, formando dos dominios. 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 posición terminal 1-4.

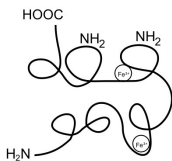
Representación
 esquemática de
 diferentes
 isoformas de la
 transferrina
 (Modificado de
 Jeppsson y
 Aguzzi, 1996)



Tetrasialotransferrina



Disialotransferrina



Asialotransferrina

El gen que codifica la síntesis de transferrina, se localiza en el brazo largo del cromosoma 3 (región q21-25), mide aproximadamente 3-3.5 kb y la secuencia de DNA contiene 17 exones separados por 16 intrones.

Isoformas de la transferrina

Modificaciones en la estructura molecular de la transferrina le confieren su microheterogeneidad, presentando diversas isoformas que pueden ser identificadas por electroenfoque debido a su diferente pI.

Estas isoformas de la molécula de transferrina, han sido diferenciadas como consecuencia de tres tipos de variaciones:

1. Secuencia de aminoácidos de la cadena polipeptídica correspondientes a su polimorfismo genético.
2. Composición de la cadena de carbohidratos.
3. Grado de saturación de hierro.

1. - Secuencia polipeptídica

Entre las variantes genéticas descritas, las más importantes son:

1.1 La variante designada como Tf C, es la más importante en la población caucasiana. De esta variante se han descrito 16 subtipos, donde la Tf C1 muestra una alta prevalencia (> 95%) y tiene un pI de 5.4.

1.2 La variante alélica designada como Tf B, migra más rápido (más anódica) que la variante C y posee un pI de 5.2.

1.3 La variante alélica Tf D, migra más lentamente (más catódica) que la variante C, tiene un pI de 5.7. Esta comparación de pI se hace teniendo en cuenta que tengan el mismo contenido de hierro y la misma composición de carbohidratos.

2. - Composición de las cadenas de carbohidratos

Las dos cadenas de carbohidratos varían en su grado de ramificación, presentando estructuras con 2 ó 3 ramificaciones externas o antenas. Cada antena termina con un residuo de ácido siálico (ácido N-acetilneuramínico) cargado negativamente, que contribuye a la carga total de la glicoproteína. El contenido en ácidos siálicos puede variar de cero a ocho y determina la heterogeneidad de la molécula de transferrina, dando lugar a las distintas isoformas que resultan con variaciones en su pI de 0.1 unidades de pH por cada residuo de ácido siálico unido a la cadena glucídica.

La isoforma más prevalente contiene cuatro residuos de ácido siálico (pI 5.4), el resto lo constituyen las formas pentasialo-Tf y trisialo-Tf y pequeñas cantidades (<2.5%) de las isoformas que contienen menos de tres residuos de ácido siálico.

Las isoformas asialotransferrina (pI 5.9), mono-Tf (pI 5.8) y disialo-Tf (pI 5.7) se denominan con el término de transferrina deficiente en carbohidratos (TDC).

3. - Contenido en hierro

Cada molécula de transferrina puede contener un máximo de dos moléculas de hierro (Fe^{3+}) dependiendo del aporte de hierro al organismo. El pI de la molécula de Tf disminuye aproximadamente en 0.2 unidades de pH por cada ión unido de Fe^{3+} .

Microheterogeneidad de la Transferrina en líquidos biológicos y su aplicación clínica

La microheterogeneidad de Tf se observa, además de en suero, en otros fluidos biológicos como el líquido cefalorraquídeo (LCR), amniótico o sinovial. Salvo en el LCR, hay un predominio de la tetrasialotransferrina con cantidades inapreciables de las isoformas asialo-Tf, monosialo-Tf y disialo-Tf.

Esta microheterogeneidad puede ser utilizada en el diagnóstico de situaciones como las pérdidas de LCR, pacientes alcohólicos y el síndrome de glicoproteínas deficientes en carbohidratos.

Detección de pérdidas de LCR

El LCR llena el espacio subaracnoideo bañando el cerebro y la médula espinal. Si las membranas que rodean el sistema nervioso central (SNC) están dañadas, el LCR puede escaparse del espacio subaracnoideo a través de la nariz o del oído:

- La rinorrea por pérdida nasal de LCR, puede deberse a una fístula entre el espacio subaracnoideo y la cavidad nasal o entre el espacio subaracnoideo y el oído medio o cavidad mastoidea.

Los pacientes con rinorrea pueden adquirir una infección que, a través de la fístula, se transmite al espacio subaracnoideo dando lugar a graves meningitis recurrentes y/o encefalitis.

- La otorrea u otorragia por secreción o pérdida de LCR dentro del oído medio, indicaría una comunicación entre el oído medio y el espacio subaracnoideo. El riesgo de padecer una otorrea de este tipo consiste en sufrir episodios de otitis media seguidos de meningitis recurrentes con pérdida de audición. Una otorrea de LCR puede manifestarse como una rinorrea de LCR cuando este fluido alcanza la nariz a través de la trompa de Eustaquio.

Más del 80% de los casos de rinorrea y otorrea de LCR resultan de lesiones traumáticas en la cabeza, y el resto por causas no traumáticas como tumores, defectos congénitos o infecciones. La detección temprana de la pérdida de LCR puede prevenir complicaciones neurológicas.

Se debería sospechar la presencia de fístulas en pacientes que presentan secreciones nasales o en el oído (intermitentes o permanentes), similares al agua, que pueden ser confundidos con rinitis u otitis.

El método ideal para confirmar una pérdida de LCR debería ser altamente sensible, con capacidad para una identificación absoluta de pequeñas cantidades de LCR y sin riesgos para el paciente.

Actualmente, los métodos de laboratorio más fiables para confirmar rinorrea u otorrea de LCR son los que detectan la $\beta 2$ - Tf o asialotransferrina, llamada anteriormente proteína tau (t). Esta variante de la Tf se encuentra específicamente en LCR, perilinfa y humor acuoso del ojo y es producida por la actividad de la enzima neuraminidasa presente en el cerebro. Esta enzima elimina

el ácido siálico de la Tf resultando la formación de la $\beta 2$ -Tf que es la isoforma totalmente desializada.

Pacientes alcohólicos

El consumo excesivo de alcohol está directamente relacionado con enfermedades cardíacas, hepáticas y también con el riesgo de accidentes.

El diagnóstico es difícil porque no existe un síntoma o signo patognomónico característico de esta adicción.

Los parámetros bioquímicos que se utilizan normalmente en el diagnóstico o estudio de abuso de alcohol son:

- Etanol en sangre: considerado actualmente como marcador de consumo reciente.
- Volumen corpuscular medio (VCM): es capaz de detectar hasta un 30% pacientes alcohólicos. También está aumentado en otras condiciones, como en patologías tiroideas, deficiencias de folato y enfermedades hepáticas de origen no alcohólico. La respuesta de abstinencia es lenta, tardándose dos meses en volver al intervalo de referencia tras el cese de la ingesta.
- Gamma-glutamilttransferasa (-GT): su síntesis es estimulada por el alcohol. Aparecen niveles elevados en 80-88% de pacientes alcohólicos que ingieren más de 50 g de etanol diarios. No obstante también se han constatado valores altos en pacientes que toman barbitúricos o en enfermedades hepáticas no relacionadas con el alcohol.
- Aminotransferasas (GOT, GPT): aumentan en situaciones de lesión hepatocelular, siendo el cociente GOT/GPT > 1.5 sugestivo de hepatopatía alcohólica.

Todos estos marcadores carecen de la suficiente sensibilidad para detectar el abuso antes de que se presenten complicaciones orgánicas.

Se ha comprobado que el consumo excesivo de etanol, da como resultado la aparición en suero de las isoformas de TDC asialotransferrina, monosialotransferrina y disialotransferrina. La TDC mide un efecto acumulado de consumo de alcohol, apareciendo después de la toma regular de 50-80 g de etanol al día durante al menos una semana y normalizándose tras 15 días de abstinencia (vida media de TDC).

En el 81% de alcohólicos crónicos existe un aumento de TDC (con un consumo de etanol >60g/día). No está aumentado en pacientes control o en pacientes con enfermedad hepática de etiología no alcohólica.

Se producen falsos positivos en pacientes con insuficiencia hepática severa, principalmente debido a cirrosis biliar primaria y hepatitis crónica activa. Sin embargo, la gran mayoría de pacientes no consumidores de alcohol, con enfermedad hepática, no tienen esta Tf anormal. Nuevos hallazgos indican que las isoformas TDC en alcohólicos carecen de una o de las dos cadenas glucídicas enteras y no sólo del ácido siálico.

Síndrome de glicoproteínas deficientes en carbohidratos

Es un síndrome multisistémico con una herencia autosómica recesiva. Se caracteriza clínicamente por retraso psicomotriz y mental, neuropatía periférica, hepatopatía temprana, nefropatía, anomalías en la coagulación y tejidos cardíaco, adiposo, piel y esqueleto.

Desde el punto de vista bioquímico, el síndrome de glicoproteínas deficientes en carbohidratos (SGDC), afecta con mayor intensidad a la Tf que a otras glicoproteínas, lo que conduce a valores extremadamente altos de TDC en todos los pacientes. También, está incrementado en el 25% de los portadores sanos (heterocigotos).

Teniendo en cuenta la clínica y los patrones electroforéticos de la TDC se han descrito cinco tipos de SGDC:

- Tipo Ia y Ib: ambos poseen el mismo patrón caracterizado por dos bandas anormales, que corresponden a las isoformas disialotransferrina y la asialotransferrina. En estas moléculas se produce la pérdida completa de la cadena glucídica y no sólo del ácido siálico. Se diferencian por el enzima deficitario; el tipo Ia es deficiente en fosfomanomutasa (PMN) y el tipo Ib en fosfomanosa isomerasa (PMI). Hay que señalar que pacientes alcohólicos y portadores de galactosemia sin tratar pueden presentar un patrón similar.

- Tipo II: la banda tetrasialotransferrina es sustituida por una banda ancha de disialotransferrina. Aquí no se produce la pérdida total de la cadena glucídica sino del ácido siálico y de los dos primeros glúcidos. Se caracteriza por un déficit de N-acetilglucosaminiltransferasa II. No obstante la intolerancia hereditaria a la fructosa puede dar un patrón de transferrina indistinguible de los SGDC tipo II.

- Tipo III: en el patrón electroforético se observa un ligero aumento de las fracciones tri-, di-, mono- y asialotransferrina.

- Tipo IV: no se observa la banda de asialotransferrina característica del tipo I.

Métodos utilizados para la identificación de las isoformas de la transferrina:

Teniendo en cuenta la falta de disponibilidad de anticuerpos específicos contra TDC, para su determinación se requiere la separación previa de las fracciones TDC de las no TDC.

Debido a la microheterogeneidad de la Tf y para reducir el número de sus isoformas, el primer paso para el análisis de TDC sería la saturación de la Tf con Fe⁺³ in vitro. De este modo las isoformas sólo son debidas al contenido en ácido siálico y a las variantes genéticas.

Los métodos de separación se basan en la diferencia de carga de las distintas isoformas y pueden ser agrupados en electroforéticos y cromatográficos:

1.- Métodos electroforéticos

1.1 Electroforesis de alta resolución en geles de agarosa seguida de inmunofijación y posterior tinción del gel con colorantes habituales para proteínas o inmunofijación seguida de inmunotransferencia. Este último procedimiento puede ser realizado utilizando directamente un anticuerpo anti-Tf humana marcado, o utilizando dos anticuerpos, el primero anti-Tf humana sin marcar y un segundo anticuerpo marcado, que reaccionaría frente al primero.

Ambos procedimientos solamente deben utilizarse para la detección de pérdidas de LCR, ya que en el caso de pacientes alcohólicos y SGDC se produce la pérdida completa de la cadena

de carbohidratos, pudiéndose unir el tampón de barbital a los NH₂ libres, alterando así la carga de las isoformas en estos pacientes confiriéndoles diferente patrón de migración y por tanto se obtendrían resultados alterados.

1.2 Isoelectroenfoque (IEF): las isoformas se separan en geles de agarosa o de poliacrilamida que contiene un gradiente de pH. La visualización de las bandas se puede realizar mediante fijación inespecífica, inmunofijación seguida de tinción de plata o mediante inmunotransferencia. Las bandas pueden ser posteriormente cuantificadas por densitometría y la expresión de los resultados puede hacerse en valores absolutos para cada banda (mg/L), en porcentajes en relación con la Tf total o como un cociente disialotransferrina / tetrasialotransferrina.

Para una interpretación correcta es necesario utilizar un control positivo y otro negativo. Como control positivo se utiliza un LCR normal o un suero tratado con neuraminidasa. La banda totalmente desializada de este control sirve de referencia e indica el pI donde debe aparecer la banda patológica.

Como control negativo debe utilizarse el suero del paciente diluido, para comprobar si tiene bandas infrecuentes debidas a la presencia de variantes genéticas.

El IEF seguido de inmunotransferencia es el método de referencia y permite ver el patrón de migración de las distintas isoformas de TDC en pérdidas de LCR y en pacientes alcohólicos. Así mismo, con este método es posible detectar las posibles variantes genéticas y la detección de pacientes con SGDC.

1.3 Electroforesis capilar: se produce la separación de las distintas isoformas en función de su carga y se visualizan mediante la medida de la absorbancia en la región UV. El resultado suele expresarse como porcentaje de la Tf total. En el cromatograma se ven los distintos picos en función del tiempo de retención, permitiendo la identificación de variantes genéticas de Tf y de SGDC.

2.- Métodos cromatográficos

2.1 Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC): Está basado en la cromatografía de intercambio iónico, y la separación de las isoformas se logra en función de su carga. Las fracciones se cuantifican por espectrometría a 460 nm. Los resultados pueden expresarse como porcentaje de la Tf total o en valores absolutos (mg/l), si se utiliza un calibrador.

En el cromatograma obtenido se pueden visualizar las distintas isoformas de la Tf por ello podemos detectar la presencia de variantes genéticas, muestras envejecidas (donde se observan picos en posiciones atípicas) que darían resultados falsos positivos en pacientes alcohólicos y en SGDC. Se trata de un método útil y fácil de realizar en laboratorios de rutina.

2.2 Cromatografía de intercambio aniónico: Es el método normalmente utilizado en los kits comerciales. Requiere una separación previa en microcolumnas, de la fracción de TDC y posteriormente se cuantifica por distintos sistemas de detección como: turbidimetría, nefelometría, enzimoimmunoensayo y radioimmunoensayo. Sus resultados se expresan en cantidad absoluta o como porcentaje de Tf total. En el eluido la TDC es cuantificada sin visualizar el patrón de isoformas por lo que no podemos detectar la presencia de variantes genéticas. En estos casos, podrían obtenerse resultados falsamente incrementados de TDC en pacientes homocigotos D y heterocigotos CD. Tampoco sería posible detectar portadores de SGDC.

2.3 Cromatografía de afinidad a lectina: Utiliza columnas de Sepharosa cubiertas con lectinas Allomyrina dichotoma (allo A) o Trichosanthes japonica (TJA). Pueden separar TDC-Allo A correspondiendo a disialotransferrina y TDC-TJA correspondiendo a asialotransferrina.

2.4 Cromatografía líquida de inmovilizada afinidad seguida de espectrometría de masas: Recientemente se ha publicado un nuevo método que consigue la separación de las isoformas de Tf en función de la pérdida glucídica. En este método no se requiere el pretratamiento con sobrecarga de hierro porque la separación se produce en función de la masa. Se utiliza una columna de inmovilizada afinidad que tiene anti-Tf humana de conejo. El eluido contiene sólo las isoformas de Tf que después van al espectrómetro de masas donde se separan en función de su masa como: a-oligosacáridoTf, mono-oligosacáridoTf y di-oligosacáridoTf.

Recomendaciones metodológicas

En base a los trabajos publicados sobre el tema, en las pérdidas de LCR se recomienda recurrir a electroforesis de alta resolución o a IEF seguido de inmunotransferencia (método de referencia). Para detectar pacientes alcohólicos en el laboratorio de rutina son útiles los kits comerciales, aunque cualquier resultado sospechoso precisa su confirmación por IEF o por HPLC. En la detección de pacientes con SGDC, hay una menor experiencia debido a que es una patología poco frecuente. Podría utilizarse una cuantificación de TDC por los procedimientos de rutina y los casos positivos deberán ser confirmados mediante IEF, método que además permitirá proceder a su clasificación.

E M^a Deschamps, A Miña, MA Ciegues
Servicio de Inmunología.
Hospital Central Universitario de Asturias
Rev. Digan Biol. v.52 n.1 Madrid ene.-mar. 2003

Para texto completo remitirse:

[Http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S003479732003000100005&lng=es&nrm=iso&tlng=es](http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S003479732003000100005&lng=es&nrm=iso&tlng=es)