UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO DEPARTAMENTO DE CLÍNICA MÉDICA DISCIPLINA DE REUMATOLOGIA

PROJETO DE PESQUISA

AVALIAÇÃO DA ELETROFORESE DE PROTEÍNAS COMO FERRAMENTA DIAGNÓSTICA EM HOSPITAL TERCIÁRIO

ALUNA: ISABELA BOTELHO LOPES BUENO

ORIENTADOR: PROF DR RENÊ DONIZETI RIBEIRO DE OLIVEIRA

Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto Universidade de São Paulo

1. Resumo

Introdução. A eletroforese de proteínas séricas (EFP) é um método laboratorial simples e acessível, usado para separar em frações e quantificar as proteínas presentes no soro, com base nas suas cargas elétricas. Em um campo elétrico as proteínas com cargas negativas migram em direção à extremidade positiva (ânodo) e se separam de acordo com a carga. No soro humano, podem ser distinguidos dois grupos de proteínas: albumina e globulinas. A albumina tem maior carga negativa e por isso percorrerá maior distância. No total, são vistas 5 bandas distintas na eletroforese de proteínas: albumina, alfa 1 globulina, alfa 2 globulina, betaglobulina e gamaglobulina. Uma elevação ou decréscimo de cada uma das cinco bandas identificadas na eletroforese de proteínas caracteriza padrões que podem ser relacionados com algumas doenças específicas ou grupos de doenças e, dessa forma, tornar-se uma ferramenta útil para a suspeição clínica e orientação de uma investigação diagnóstica. Objetivos. Avaliar a freguência das alterações encontradas na EFP que geraram hipóteses ou contribuíram para uma definição diagnóstica, além de correlacionar as alterações encontradas em cada banda da EFP com uma doença específica e dessa forma avaliar potenciais marcadores diagnósticos ou prognósticos a serem estudados futuramente. **Métodos.** Serão avaliados todos os exames de EFP colhidos no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP, no período de 01/01/2018 a 31/12/2021. A partir dos resultados de EFP, serão incluídos pacientes com alteração na EFP e idade maior que 18 anos, sendo excluídos os pacientes que não tiveram seguimento por no mínimo um ano na clínica que solicitou o exame. Os pacientes selecionados serão avaliados quanto a dados demográficos, diagnósticos prévios, hipóteses diagnósticas no momento da solicitação da EFP e diagnósticos posteriores, se relacionados com a realização da EFP. As EFP serão avaliadas em relação a alterações nas formas e na quantificação proteica em cada uma das bandas retratadas na EFP. Pretendemos obter 5 grupos de indivíduos, de acordo com alterações em cada uma das 5 bandas da EFP.

2. Introdução

As proteínas são formadas por sequências de aminoácidos unidos por ligações peptídicas. A combinação e quantidade de aminoácidos em cada molécula de proteína confere a ela um peso e carga elétrica distinta¹.

A EFP séricas é um exame laboratorial simples que consiste na separação e quantificação das proteínas presentes no soro com base em suas cargas elétricas². O custo de um exame de EFP é de R\$ 7,40.

O soro humano, rico em proteínas, é colocado sobre um meio de acetato de celulose ou gel de agarose e é submetido à ação de um campo elétrico gerado por um polo positivo (ânodo) e um polo negativo (cátodo). As proteínas irão migrar em direção ao ânodo, percorrendo distâncias diferentes de acordo com sua carga elétrica e peso molecular. Após coradas, são visualizadas como 5 bandas distintas: albumina, alfa 1 globulina, alfa 2 globulina, betaglobulina e gamaglobulina^{2,3}.

A albumina é aquela que percorrerá maior distância pois é a mais pesada (50-70% do total do peso do soro) e a com maior carga negativa. A maioria das imunoglobulinas (IgM, IgG, IgD e IgE) estão localizadas na região gama².

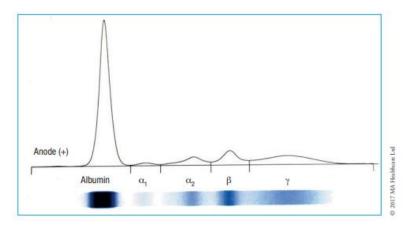


Figura 1 Lee AY, Cassar PM, Johnston AM, Adelstein S. Clinical use and interpretation of serum protein electrophoresis and adjunct assays. Br J Hosp Med (Lond). 2017;78(2):C18-C20.

A EFP pode fornecer várias informações úteis para guiar uma investigação diagnóstica, dependendo de qual banda se encontrar alterada⁴.

Cada banda na EFP é composta por um grupo de proteínas, como ilustrado na figura abaixo:

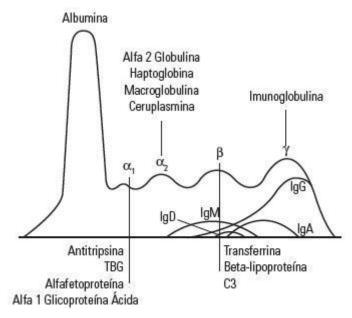


Figura 2 Seric proteins electrophoresis: clinical interpretation and correlation. Rev. méd. Minas Gerais ;2008; 18(2): 116-122.

Uma elevação ou decréscimo notado em cada uma das bandas fornecidas pela EFP pode ser relacionado com alguma condição clínica ou grupo de doenças como exemplificado da tabela abaixo²:

ELETROFORESE	DIMINUIÇÃO	ELEVAÇÃO
ALBUMINA	 ✓ Inflamação ✓ Desnutrição/má absorção ✓ Síndrome nefrótica ✓ Doença renal ✓ Doença hepática ✓ Gravidez ✓ Hemodiluição 	√ Desidratação
ALFA-1 (alfa1lipoprteína; alfa1antitripsina; alfafetoproteína)	✓ Deficiência de alfa1- antitripsina✓ Doença hepática	 ✓ Tumor hepático ✓ Tumor de células germinativas ✓ Gravidez ✓ Estados inflamatórios
ALFA-2 (α2- macroglobulina; haptoglobina; ceruloprasmina)	 ✓ Doença hepática ✓ Hemólise ✓ Desnutrição ✓ Doença de Wilson 	 ✓ Estados inflamatórios ✓ Uso de esteróides ✓ Insuficiência adrenal ✓ Síndrome nefrótica ✓ Diabetes Mellitus Severa
BETA-1 (transferrina; β1- lipoproteína)	✓ Desnutrição	 ✓ Deficiência de ferro ✓ Gravidez ✓ Estados inflamatórios ✓ Hiperlipidemia
BETA-2 (C3; β2microglobulina)	✓ Consumo de complemento	✓ Estados inflamatórios

Beta-Gama (fibrinogênio, PCR, IgM, IgA)		✓ Doença hepática✓ Estados inflamatórios
Gama (IgG, IgM, IgA, IgD, IgE)	 ✓ Imunodeficiência humoral hereditária ✓ Doença renal ✓ Sepse ✓ Infecções virais ✓ Amiloidose ✓ Leucemia 	 ✓ POLICLONAL infecção inflamação ✓ MONOCLONAL discrasia de células plasmáticas Mieloma Múltiplo Linfoma Macroglobulinemia de Waldenstrom

O grupo da alfa1globulina, por exemplo, tem seu pico formado predominantemente pela proteína alfa1 antitripsina. Sabe-se que a alfa1antitripsina é codificada por dois alelos codominantes M e Z. A homozigose ZZ gera níveis insuficientes de alfa-1-antitripsina e está relacionada com surgimento de uma forma progressiva de cirrose hepática e enfisema grave na primeira infância. Dessa forma, em um caso de suspeição diagnóstica, a EFP pode ser um método útil de triagem e se, identificado que a fração alfa-1 estiver deprimida persistentemente, pode indicar a necessidade de prosseguir investigação com dosagem de alfa1antitripsina e teste fenotípico^{1,5}.

A fração 3 do complemento (C3) migra na banda beta2. Sabemos que a deficiência de C3 predispõe a infecções por microrganismos encapsulados e também está associada a doenças autoimunes. Dessa forma, a identificação de depressão na banda beta2 pode ajudar no diagnóstico precoce de uma deficiência de C3 e pode ser benéfica do ponto de vista de vacinação precoce, prevenindo óbito por meningococcemia^{6,7}.

A avaliação da EFP pode diferenciar quadro de inflamação aguda de inflamação crônica. Na inflamação crônica encontramos diminuição leve a moderada da banda de albumina associada a elevação de gamaglobulina e uma alfa 2 globulina normal ou elevada. Enquanto em um quadro de inflamação aguda há decréscimo da albumina somado a uma elevação da alfa 2 globulina, sendo esse um resultado inclusive mais confiável que a dosagem de PCR e VHS pois sofre menos influência de medicações⁸.

Além disso, a interpretação da EFP é particularmente útil em casos de distúrbios de imunoglobulinas, contemplado na fração gama, que compreende as 5 classes de imunoglobulinas – IgG, IgA, IgM, IgD e IgE. Um decréscimo ou ausência dessa fração (hipogamaglobulinemia e agamaglobulinemia, respectivamente) sugere uma imunodeficiência congênita ou adquirida, na qual a ausência de um ou mais classe específica de anticorpos pode resultar em infecções frequentes, eventualmente fatais. De outro lado, um aumento policional dessa fração, representado por uma curva de base alargada, remete

a uma resposta imunológica simultânea a determinado estímulo antigênico, seja ele inflamatório, imune ou infeccioso³.

Já um pico monoclonal da fração gama, representado por uma curva de base estreita e anormalmente elevada, remete à produção de imunoglobulinas por um único clone plasmocitário produtor de uma classe específica de imunoglobulina e sugere entidades clínicas como mieloma múltiplo, gamopatia monoclonal de significado indeterminado, macroglobulinemia de Waldenstrom, dentre outros. Além de propiciar suspeição diagnóstica em casos assintomáticos, corroborar o diagnóstico em casos sintomáticos que apresentam queixa clínica de fadiga e dor óssea, além de evidência radiográfica de fraturas e lesões líticas, a eletroforese de proteínas também é um exame útil para acompanhamento de reposta ao tratamento^{3,8,9}.

3. Justificativa

A EFP é um exame barato, de fácil execução e acessível, que pode prover informações úteis para a suspeição de doenças, indicando a necessidade de realização de outros testes ou corroborando diagnósticos. Dessa forma, consiste em uma ferramenta bastante útil na prática clínica. Não dispomos de dados sobre a relevância, em termos de contribuição para diagnósticos, da EFP séricas em hospitais gerais. Suspeitamos de que, devido ao seu baixo custo e à quantidade de informações que traz, uma avaliação da frequência em que o exame contribui para os diversos diagnósticos é de interesse em termos médicos gerais e de economia em saúde.

4. Objetivos

- Principal:

- Avaliar a frequência de alterações na EFP que resultou em hipótese ou contribuiu para definição diagnóstica

- Secundários:

- Avaliar a frequência de resultados alterados nas EFP realizadas em um hospital terciário
- Avaliar quais bandas mais frequentemente resultaram alteradas e as quais doenças se relacionaram às alterações
- Buscar padrões de alterações na EFP, reconhecidos ou inéditos, que podem se tornar biomarcadores de diagnóstico ou prognóstico em futuros estudos

5. Pacientes e métodos

5.1 - Delineamento e população do estudo

Trata-se de uma coorte retrospectiva. Serão avaliados todos os exames de EFP colhidos no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP, no período de 01/01/2018 a 31/12/2021.

A partir dos exames realizados, serão eleitos para o estudo os pacientes que tiverem resultados alterados da EFP. Assim, os critérios de inclusão no estudo serão: a presença de alterações no exame de EFP e idade maior que 18 anos. Serão excluídos pacientes que não tiveram seguimento por no mínimo um ano na clínica que solicitou o exame.

As informações que serão coletadas dos prontuários médicos na instituição estão na Ficha de coleta de dados (ANEXO A) e têm como marco temporal o momento da solicitação da EFP. Com relação à EFP serão avaliadas alterações nas formas e na quantificação proteica em cada uma das bandas retratadas na EFP. Pretendemos obter 5 grupos de indivíduos, de acordo com alterações em cada uma das 5 bandas da EFP (Figura 1). Se houver número suficiente de indivíduos por grupo, precederemos a nova subdivisão, levando em conta elevação ou diminuição da concentração proteica em cada banda. Para cada grupo (ou subgrupo), serão anotadas as hipóteses diagnósticas e os diagnósticos definitivos, bem como se o exame de EFP contribuiu para hipótese e definição diagnóstica.

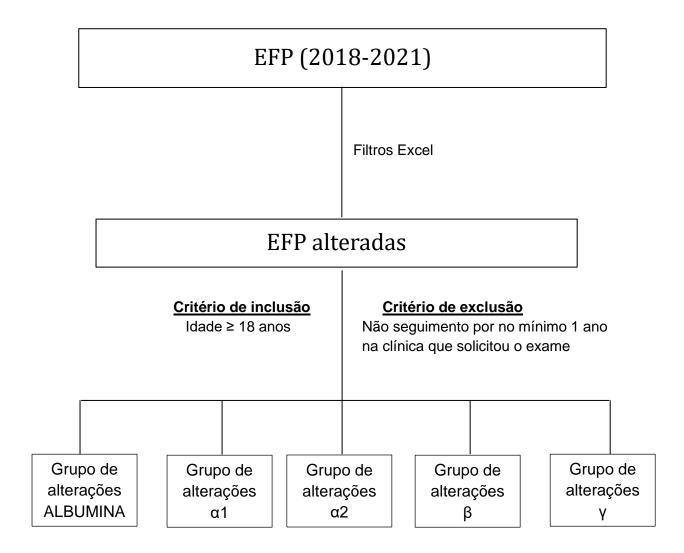


Figura 1: Fluxograma do estudo

5.2 - Análise estatística:

Variáveis categóricas serão expressas em números absolutos e percentagens. Variáveis contínuas serão apresentadas por medida central e medida de dispersão, a depender da natureza de suas distribuições. O teste exato de Fisher será utilizado para comparação das frequências de variáveis categóricas; caso haja mais de um grupo em comparação, procederemos ao teste do Qui-quadrado. Se as variáveis contínuas tiverem distribuição normal, precederemos aos testes T de Student ou ANOVA; se diferente da normal, aos testes de Mann-Whitney ou Kruskal-Wallis. O valor de p<0,05 será utilizado para significância estatística.

5.3 - Aspectos éticos:

O presente projeto será submetido à aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

Este estudo terá como metodologia análise de prontuários. Por esse motivo, será solicitada ao CEP a dispensa da aplicação do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Para todos os pacientes selecionados não haverá risco, dano, limitação ou comprometimento do tratamento caso esse ainda seja realizado nesta instituição. Há o risco mínimo de vazamento de dados, porém com o objetivo de minimizar esse risco os dados obtidos dos prontuários serão sigilosos e cada paciente receberá um código alfanumérico, garantindo o anonimato.

6. Orçamento

Material Consumível

Item Descrição	Quantidade	Preço Unitário R(\$)	Total (R\$)
Caneta esferográfica azul	04	R\$ 1,50	R\$ 6,00
Caneta esferográfica vermelha	02	R\$ 1,50	R\$ 3,00
Caneta marca texto	02	R\$ 9,90	R\$ 19,80
Caderno pautado 200 fls	01	R\$ 15,10	R\$ 15,10
Impressão	20	R\$ 0,50	R\$ 10,00

TOTAL R\$ 53,90

Fonte: Financiamento próprio

7. Cronograma

Este projeto será realizado em 9 meses, sendo as etapas distribuídas da seguinte forma:

4° Trimestre de 2022	Apreciação pelo CEP.
1° Trimestre de	Coleta de dados.
2023	Análise dos resultados.
2° Trimestre de	Análise dos resultados.
2023	Preparação de manuscritos.

8. Referências

- McPherson RA. Proteínas específicas. In: Henry JB. Diagnósticos cínicos e tratamento por métodos laboratoriais. 18ª ed. São Paulo: Manole; 1999. p.245-60.
- Lee AY, Cassar PM, Johnston AM, Adelstein S. Clinical use and interpretation of serum protein electrophoresis and adjunct assays. *Br J Hosp Med (Lond)*. 2017;78(2):C18-C20. doi:10.12968/hmed.2017.78.2.C18
- 3. Silva, RO; Lopes, AF; Faria, RM. Seric proteins electrophoresis: clinical interpretation and correlation. *Rev. Med. Minas Gerais* ;2008; 18(2): 116-122.
- 4. Firkin F. Screening for multiple myeloma. Aust Prescr 2009;32:92-4.
- 5. Larson PH. Serum proteins: diagnostic significance of electrophoretic patterns. Hum Pathol. 1974 Nov; 5(6):629-40.
- Okura Y, Kobayashi I, Yamada M, Sasaki S, Yamada Y, Kamioka I, et al. Clinical characteristics and genotype-phenotype correlations in C3 deficiency. J Allergy Clin Immunol 2016;137:640–4
- 7. Franco-Jarava C, Dieli-Crimi R, Vila-Pijoan G, Colobran R, Pujol-Borrell R, Hernández-González M. Serum protein electrophoresis and complement deficiencies: a veteran but very versatile test in clinical laboratories. *Clin Chem Lab Med.* 2019;57(8):e179-e182.
- 8. VASCONCELOS, José Tupinambá Sousa (Ed.). Livro da sociedade brasileira de reumatologia. Barueri : Manole, 2019.
- 9. Wheeler SE, Shurin MR. Alpha, beta, gamma of serum proteins: a long history of successfully resolved problems Journal of Immunopathology November-2017;1(1):1-7.

ANEXO A – Ficha de coleta de dados

Nome:	Registro:		
DN://	Caucasiana □ Neg	ra □ Mulata □ Amarela	
1º Atendimento:// Tempo de Sintomas:			
Data da coleta da EFP://			
DIAGNÓSTICOS PRÉVIOS			
□ Doenças hepáticas:			
□ Doenças renais:			
□ Doenças pulmonares:			
□ Doenças Cardiovasculares:			
□ Doenças Hematológicas:			
□ Doenças neurológicas:	_		
□ Doenças endócrinas:			
□ Doenças reumáticas autoimunes:			
□ Diabetes mellitus			
□ Dislipidemia:			
□ SIDA			
□ Outras imunodeficiências:			
TRATAMENTOS ATUAIS			
□ Anti-hipertensivos □ Hipolipemiantes			
□ Hipoglicemiantes □ Corticosteroides (dose	anti-inflamatória)	 Levotiroxina 	
□ Corticosteroides (dose imunossupressora) □ Imu	_		
□ Antibióticos □ Antifúngicos □ Outros			
HIPÓTESES DIAGNÓSTICAS ATUAIS (da coleta da E	FP):		
ELETROFORESE DE PROTEÍNAS	-1-		
□ Albumina □ □ Alfa 1 □ □ Alfa 2 □ □ Be			
□ Presença de anormalidades da curva (pico, duplicidad	ıe):		
DIAGNÓSTICOS FINAIS:			
DIAGNUSTICUS FINAIS:			



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO MESTRADO PROFISSIONAL EM MEDICINA FMRP-USP



Ribeirão Preto, 10 de outubro de 2022.

Assunto: Projeto de pesquisa

Programa: Mestrado Profissional em Medicina FMRP-USP

Candidata: Isabela Botelho Lopes Bueno Orientador: Renê Donizeti Ribeiro de Oliveira

Parecer

O projeto AVALIAÇÃO DA ELETROFORESE DE PROTEÍNAS COMO FERRAMENTE DIAGNÓSTICA EM HOSPITAL TERCIÁRIO, trata-se de um projeto bem justificado, de relevância científica e para a organização do serviço de reumatologia. A equipe executora é qualificada para a execução do mesmo, e o cronograma é factível de ser executado dentro do prazo do mestrado profissional. Pelos aspectos mencionados, meu parecer é favorável.

Sobre os aspectos éticos, no momento da submissão ao comitê de ética, recomendo acrescentar que há o risco de vazamento de dados (como em qualquer estudo), descrevendo o que os pesquisadores irão fazer para minimizar este risco.

Prof. Dr. João Marcello Fórtes Furtado

Parecerista

Membro da CCP do Programa de Pós-Graduação Mestrado Profissional em Medicina FMRP-USP