

IGORGAS

INSTITUTO CONMEMORATIVO GORGAS
DE ESTUDIOS DE LA SALUD

Banco de Suero del ICGES

Epidemiología descriptiva e Integridad Proteica



90 IGORGAS
INSTITUTO CONMEMORATIVO GORGAS
DE ESTUDIOS DE LA SALUD
Años
de Ciencia al Servicio de la Salud

Instituto Conmemorativo Gorgas de Estudios de la Salud

Banco de sueros del ICGES: Epidemiología descriptiva e integridad proteica
Investigadores: Moreno Velásquez, Ilais; Solís, Mairim Alexandra; Contreras,
Rodolfo; Carrera, Jean Paul; Gómez Quintero, Beatriz; Motta Borrel, Jorge
Alejandro. 56 p; 28x21.5 cm.

Panamá: Instituto Conmemorativo Gorgas de Estudios de la Salud

ISBN 978-9962-699-24-8

Índice

Equipo investigador	4
Institución Financiadora	5
Lista de abreviaturas	6
1. Introducción.....	8
2. Bancos de Suero	10
3. Estudios epidemiológicos en sueros humanos derivados de biobancos	13
4. Bancos de Suero en Panamá.....	17
5. Justificación	21
6. Objetivos.....	22
7. Metodología.....	23
8. Resultados y Discusión	35
9. Perspectivas futuras.....	47
10. Consideraciones éticos	48
11. Agradecimientos.....	49
12. Referencias	50

Equipo investigador

Ilais Moreno V.

Investigadora principal
Instituto Conmemorativo Gorgas

Mairim A. Solís

Investigadora
Instituto Conmemorativo Gorgas

Rodolfo Contreras

Jefe de la Unidad de Banco de Suero
Instituto Conmemorativo Gorgas

Jean Paul Carrera

Investigador
Instituto Conmemorativo Gorgas

Beatriz Gómez

Investigadora
Instituto Conmemorativo Gorgas

Jorge Motta

Investigador asociado
Instituto Conmemorativo Gorgas

Institución Financiadora

Presupuesto de Inversión asignado por el Ministerio de Economía y Finanzas (Código SINIP 9044.053)

Lista de abreviaturas

BCA	Ensayo de Absorbencia de Ácido Bincincónico
BS	Banco de Suero
DIETS	Departamento de Investigación y Evaluación de Tecnologías Sanitarias
ENT	Enfermedades No Transmisibles
ET	Enfermedades Transmisibles
ECV	Enfermedad Cardiovascular
HDL	Lipoproteína de alta densidad
ICGES	Instituto Conmemorativo Gorgas de Estudios de la Salud
LDL	Lipoproteína de baja densidad
MARU	Middle American Research Unit
MINSA	Ministerio de Salud
RIQ	Rango intercuartil
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida de dodecil sulfato de sodio
VLDL	Lipoproteína de muy baja densidad



1. Introducción

El origen del Banco de Suero (BS) del Instituto Conmemorativo Gorgas de Estudios de la Salud (ICGES), se remonta al período comprendido entre 1928-1989, cuando el Laboratorio desarrollaba sus actividades investigativas subsidiado por el gobierno de los Estados Unidos de Norte América. Igualmente, parte de su historia está ligada a las actividades de investigación en la medicina tropical del “Middle American Research Unit” (MARU), establecido en la antigua Zona del Canal de Panamá entre los años 50s y 70s. En 1972 el MARU cierra sus puertas, y parte de sus programas y de su BS fueron transferidos al ICGES.

Actualmente, la Unidad de BS es una componente funcional de la Dirección General del ICGES siendo el resultado de más de 80 años en la investigación científica. Es considerado como el único banco de sueros del país con una colección de muestras biológicas humanas y de diferentes especies de animales, que superan las 200,000. Muchas de estas muestras fueron colectadas en diferentes puntos de la geografía nacional; otras son el resultado de relaciones de cooperación con países del área, como producto de la vigilancia de enfermedades de importancia para la salud pública humana como la animal.

Con el transcurso de los años, las muestras han sido sujetas a traslados y a cambios de temperatura, que pudieron haber influido en la integridad proteica de las mismas. Ya que estas muestras constituyen un recurso valioso desde el punto de vista histórico de la investigación de enfermedades transmisibles (ET) en el país y en el marco de la celebración de los 90 años del ICGES se diseñó el presente estudio. El objetivo general fue caracterizar la información sociodemográfica de las muestras de suero humano incluidas en la Unidad del BS del ICGES y estandarizar la evaluación de la integridad proteica de las mismas.

Con los resultados obtenidos, se busca apoyar a levantar perfiles históricos utilizando este material que generen hipótesis para propulsar nuevas investigaciones científicas a futuro.

Por otra parte, esta información generada, será de utilidad para apoyar la implementación del primer Biobanco de investigación en Panamá.

2. Bancos de Suero

Desde las últimas décadas, la utilización de biobancos en el área de epidemiología ha realizado contribuciones importantes a la ciencia, validando la importancia biológica de investigaciones previas, identificando causas no determinadas de enfermedad, aportando en la predicción, pronóstico y diagnóstico de patologías y permitiendo, además, la participación de poblaciones genética y ambientalmente distintas, en estudios epidemiológicos a través de la colaboración internacional.

Una definición simple y generalmente aceptada, descrita en el año 2008, define al biobanco como aquel que contiene material biológico humano y datos asociados que son conservados para uno o más propósitos en la investigación (1). Recientemente, la definición propuesta comprende dos partes constituidas por: a) el material biológico que es recolectado, procesado y guardado en el tiempo y b) la base de datos, que incluye la información demográfica y clínica para cada muestra asociada al inventario del banco (2).

El uso de biobancos en la investigación, ha generado polémicas a nivel ético-teórico en los últimos años, particularmente con el advenimiento de la nueva era de los “omics” en la epidemiología molecular. A nivel internacional, el consentimiento de los participantes es usualmente requerido para salvaguardar muestras en un biobanco, sin embargo, la naturaleza del consentimiento y cómo se obtiene varían considerablemente (3), tema que ha sido debatido a nivel internacional

Por un lado existe el consentimiento abierto o a futuro. Se considera que el consentimiento abierto o consentimiento de investigación a futuro es válido a nivel ético y debe ser recomendado para la investigación en el biobanco, siempre y cuando cumpla con los siguientes criterios (4) :

- Protección de la confidencialidad.
- Los participantes del estudio tienen derecho a abandonar el estudio.
- Los nuevos estudios de investigación o cambios en la autoridad legal o ética del biobanco son aprobados por el Comité de Bioética.

En teoría, el consentimiento abierto o futuro, plantea un dilema. En el ámbito de la predicción, es muy poco probable que los participantes de un estudio se beneficien directamente de la investigación a través del biobanco, ya que existe una brecha en tiempo en cuanto al desarrollo del tratamiento. No obstante, en salud pública, los intereses de los participantes se ven reflejados con la participación en estudios poblacionales de larga escala y los resultados derivados de ella.

Por otra parte, existen los consentimientos informados cerrados o específicos, en los cuales se determina a priori las pruebas a realizar a través del tiempo en que se conservarán las muestras biológicas. Empero, es casi imposible identificar al momento en que se recoge la data (cuestionario y fluidos), los biomarcadores potenciales de interés investigativo que podrían suscitarse a futuro para la prevención, tamizaje o detección de diversas patologías. Esta última posición fue catalogada como la “Americana”, contra la posición “Europea”, que ha sugerido un consentimiento general “abierto o a futuro” como el estándar internacional (5) y que también es abogada por muchos expertos (3, 6).

Es esencial que la investigación mantenga el equilibrio entre los beneficios y el riesgo del uso de biobancos y, por ende, los argumentos a favor o en contra deberían ser tomados con base en información relevante sobre los beneficios y riesgos asociados a la participación del individuo en un proyecto de estudio (4).

A nivel global, algunos países líderes en investigación han apoyado el consentimiento abierto, siempre que los riesgos de daños estén controlados y protegidos por un sistema de codificación segura y, por las leyes que protegen la confidencialidad de la información personal (4). Suecia, Estonia y Reino Unido abogan por el consentimiento abierto, seguido de la aprobación de una Junta de Revisión Ética para futuros estudios de muestras conservadas en el biobanco (4). En Islandia, es el Comité Nacional de Bioética quien otorga el permiso (4). Mientras tanto, Alemania, Canadá, Noruega y Holanda permiten la investigación a través del biobanco siempre que las muestras no sean identificables (4, 7). En América Latina, hasta donde conocemos, pocos países tienen estudios que involucran biobancos. Recientemente se ha diseñado la cohorte de Maule en Chile con el fin de investigar las enfermedades crónicas en 10,000 participantes seguidos

por 10 años y que comprende un biobanco el cual guardará 50 alícuotas por participante (8).

3. Estudios epidemiológicos en sueros humanos derivados de biobancos

En los últimos 40 años, la comprensión de la epidemiología de las enfermedades no transmisibles (ENT), la historia natural, y su genética ha sido mejorada gracias a encuestas transversales seriadas representativas a nivel nacional, como la *Encuesta Nacional de Salud y Nutrición* (NHANES) (9), cohortes longitudinales tales como el estudio ARIC (*Atherosclerosis Risk in Communities*) (10), registros nacionales, como el *Swedish Twin Registry* (11) y cohortes específicas de enfermedades (12). Estos estudios han depositado especímenes biológicos, que permiten el seguimiento de biomarcadores de enfermedad con el tiempo. Estas muestras almacenadas son recursos valiosísimos que pueden dar una idea no sólo de las tendencias seculares en la prevalencia de enfermedades, sino también del uso de biomarcadores en la asociación, predicción y pronóstico de patologías.

No obstante, en estudios con largos periodos de almacenamiento de muestras biológicas, la re-calibración de las medidas de laboratorio y equivalencia de las pruebas a través del tiempo son preocupaciones claves; particularmente, cuando las tendencias en la prevalencia de la enfermedad son de interés al investigador. Entre las razones de la baja reproducibilidad de los valores de medición a lo largo del tiempo se incluyen cambios en los procedimientos de medición de laboratorio, temperaturas oscilantes en el almacenamiento de muestras, diferencias en los procesamientos de las muestras, número de veces de descongelación, degradación de la muestra durante el almacenamiento, evaporación debida a viales mal sellados, y / o uso de diferentes tipos de muestras (suero vs plasma) (13,14,15). En estudios epidemiológicos, incluso una pequeña diferencia sistemática de este tipo podría resultar en errores de clasificación sustanciales.

Existe una escasez de estudios sobre los efectos del almacenamiento de muestras a largo plazo. Uno de ellos, fue realizado en la cohorte prospectiva ARIC, en cuyo tiempo de seguimiento de 25 años se obtuvieron 5 visitas con recolección de muestras sanguíneas (1987-1989, 1990-1992, 1993-1995, 1996-1998 y 2011-2013) en 200

participantes. Este estudio, dirigido a medir las correlaciones de los analitos examinados a lo largo del tiempo, incluyó ocho biomarcadores en el análisis: creatinina, ácido úrico, glucosa, colesterol total, colesterol HDL, colesterol LDL, triglicéridos y proteína C reactiva de alta sensibilidad. Los biomarcadores fueron medidos nuevamente en muestras que se habían almacenado a -70 ° C desde su recogida. Los investigadores demostraron que las muestras almacenadas durante aproximadamente 25 años estaban altamente correlacionados con los valores originales, excepto para la creatinina y ácido úrico que mostraron sesgos importantes (13).

Recientemente, un estudio estimó el efecto de almacenamiento en las lipoproteínas a un largo plazo (> 10 años) en muestras de suero congelado de 152 pacientes a -20 grados centígrados (*Tabla 1*). El efecto de almacenamiento sobre las lipoproteínas se estimó utilizando análisis de regresión longitudinal y se desarrolló un factor de corrección de la desintegración lipídica. Los investigadores reportaron un modesto efecto de desintegración en el almacenamiento de las lipoproteínas y sugieren que es poco probable que la desintegración observada afecte significativamente la estratificación del riesgo cardiovascular. Los autores concluyeron que muestras de suero almacenadas a largo plazo (> 10 años) podrían utilizarse para obtener modelos de predicción de riesgo cardiovascular, incluso sin aplicar un factor de corrección de decaimiento (14).

No obstante, existe evidencia que indica que los números absolutos del colesterol total y los triglicéridos parecen disminuir menos en comparación con los niveles de HDL colesterol (15). Por otro lado, en el contexto de las enfermedades cardiovasculares (ECV), los múltiples estudios realizados utilizando diferentes biomarcadores almacenados en biobancos han producido asociaciones comparables (puntos estimados con similar fuerza de asociación), reforzando el argumento contra la subestimación de la degradación de las muestras cuando el análisis es a nivel poblacional (16).

En otro estudio reciente se analizaron las tendencias seculares de veinticinco años en los lípidos (colesterol total, LDL-c, HDL-c y triglicéridos) y factores de riesgo modificables de ECV en una Cohorte multiétnica del estudio CARDIA (The Coronary Artery Risk

Development in Young Adults), 1985-2011 (17). La *Figura 1* ilustra los resultados principales.

<i>n</i> = 152	Subcohorts				
	1 (<i>n</i> = 30) 1985–1989	2 (<i>n</i> = 31) 1990–1994	3 (<i>n</i> = 30) 1995–1999	4 (<i>n</i> = 30) 2000–2004	5 (<i>n</i> = 31) 2005–2009
Age ^a	51 ± 14.4	50 ± 13.5	52 ± 14.5	58 ± 12.1	59 ± 12.6
Female ^b	16 (53.3)	19 (61.3)	17 (56.7)	25 (83.3)	21 (67.7)
RF positive ^b	26 (86.7)	23 (74.2)	25 (83.3)	23 (76.7)	25 (80.6)
DAS28 ^a	5.6 ± 1.2	5.3 ± 1.4	4.8 ± 1.6	4.9 ± 1.0	5.0 ± 1.2
BMI ^a	26 ± 3.8	27.1 ± 4.6	25.6 ± 3.3	26.2 ± 3.0	26.6 ± 6.8
Smokers ^b	14 (46.7)	6 (19.4)	10 (33.3)	9 (30.0)	9 (29.0)
Statin use ^b	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (6.7)	2 (6.7)	9 (29.0)
Glucocorticosteroid use ^b	3 (10.0)	3 (9.7)	5 (16.7)	17 (56.7)	17 (54.8)
Baseline lipoprotein levels					
TC (mmol/L) ^a	4.2 ± 1.2	4.5 ± 1.5	5.4 ± 1.0	5.3 ± 1.2	5.2 ± 1.2
HDL-c (mmol/L) ^a	0.6 ± 0.2	0.9 ± 0.3	1.0 ± 0.3	1.1 ± 0.2	1.2 ± 0.4
TC:HDL-c ^a	7.2 ± 1.9	5.5 ± 1.6	5.9 ± 1.4	5.1 ± 1.2	4.5 ± 1.2
Treatment during follow-up					
B-DMARDS ^b	9 (30.0)	13 (41.9)	10 (33.3)	17 (56.7)	3 (9.7)

(i) Abbreviations: RF, rheumatoid factor; DAS28; disease activity index 28 joints, BMI: body mass index, TC, total cholesterol; HDL-c, high-density-lipoprotein cholesterol, B-DMARDS; biological disease modifying anti-rheumatic drugs.

(ii) ^aData presented as mean ± SD, ^bData presented as *n* (%).

Tabla 1. Características y biomarcadores de las sub-cohorte de pacientes con Artritis Reumatoide atendidos en el Centro Médico Nijmegen, , Universidad de Rabdou del año 1985 al 2009. (14)

Los análisis transversales indican que las tendencias de colesterol total y LDL-colesterol, inicialmente favorables, pudiesen estar invirtiéndose aún luego de ajustar por factores de riesgo modificables. Los autores sugieren investigar más a profundidad los cambios en la dieta y la poca adherencia al tratamiento como potencial influencia de los cambios de las tendencias observadas en el período de tiempo analizado (17).

Por otro lado, un grupo de investigadores analizó biomarcadores del complemento en muestras congeladas en plasma -80 grados por un periodo de 6 a 10 años (18). Con la excepción de cinco de diecisiete analitos, el tiempo de almacenamiento se correlacionó significativamente con las concentraciones plasmáticas medidas. Los investigadores sugieren que la información sobre el tiempo de almacenamiento debe considerarse como una variable importante al analizar los datos para buscar asociaciones de estos biomarcadores y enfermedad.

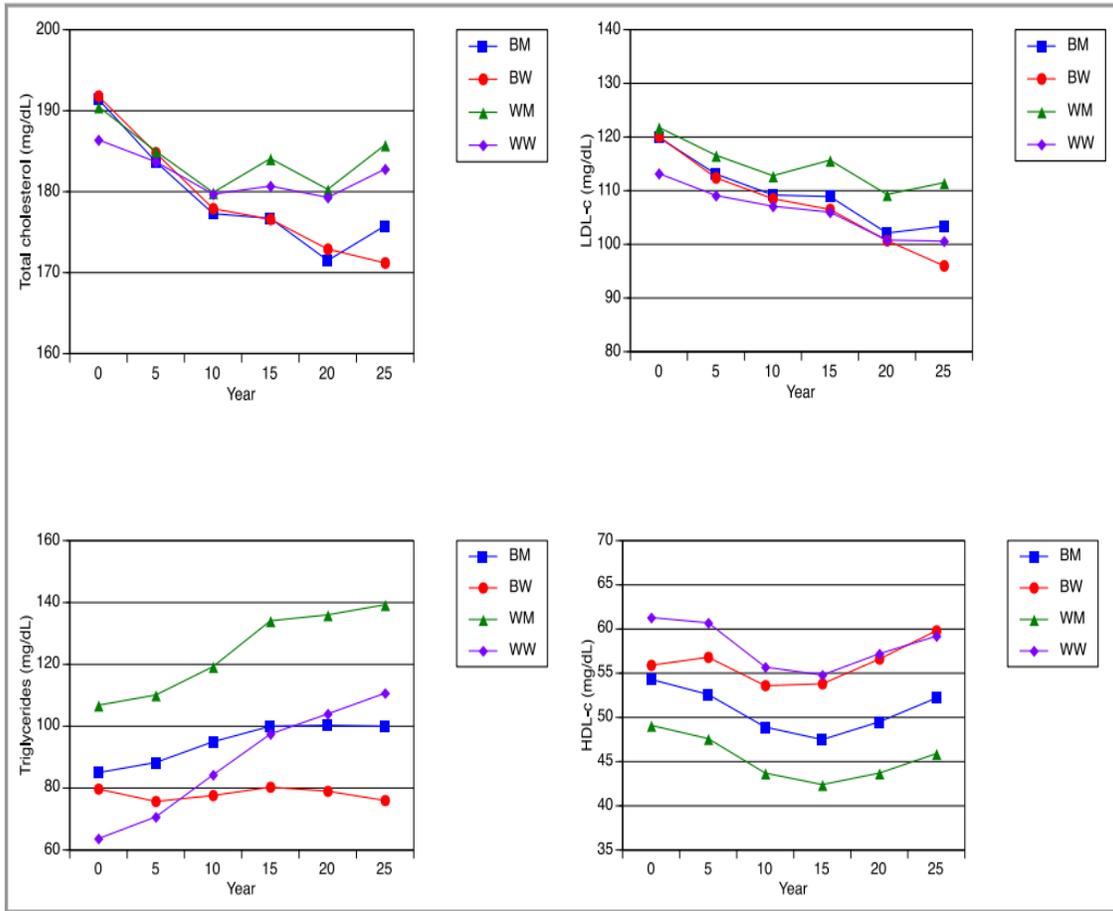


Figura 1. Tendencias seculares del promedio de lípidos plasmáticos en estudio CARDIA según etnicidad a lo largo de 25 años de seguimiento, 1985-2011 (ajustadas por edad). BM black men, BW, black women, WM, White men, WW, White women (17).

4. Bancos de Suero en Panamá

En Panamá, la ley 68 del año 2003 regula los derechos y obligaciones de los pacientes, en materia de información y de decisión libre e informada. En el artículo 3 se especifica que haya de parte de la persona declaración expresa sobre sus opciones concerniente a la autonomía de decisión de los procedimientos de su propio estado de salud y enfermedad, así como la confidencialidad de la información relacionada con su proceso. Por otra parte, el artículo 5 establece el derecho de las personas a conocer toda la información obtenida sobre su propia salud.

En cuanto al derecho a la intimidad, el artículo 13 establece que toda persona tiene derecho a que se respete la confidencialidad de los datos que hacen referencia a salud. Este artículo establece el incumplimiento del deber de confidencialidad como punible.

En materia de investigación, Panamá no cuenta con un biobanco establecido hasta la fecha; sin embargo, existe la Unidad del Banco de Suero (BS) del ICGES. La Unidad de BS, es una componente funcional de la Dirección General del ICGES y es el resultado de más de 80 años en la investigación científica, y es considerada como el único banco de sueros del país con una colección de muestras biológicas humanas y de diferentes especies de animales, que superan las 200,000. Muchas de estas muestras fueron colectadas en diferentes puntos de la geografía nacional; otras son el resultado de relaciones de cooperación con países del área, como producto de la vigilancia de enfermedades de importancia para la salud pública humana como la animal.

El origen del BS del ICGES, se remonta al período comprendido entre 1928-1989, cuando el Laboratorio del ICGES desarrollaba sus actividades investigativas subsidiado por el gobierno de los Estados Unidos de Norte América. Igualmente, parte de su historia está ligada a las actividades de investigación en la medicina tropical del MARU, establecido en la antigua Zona del Canal de Panamá entre los años 50s y 70s. En 1972 el MARU cierra sus puertas, y parte de sus programas y de su banco de sueros fueron transferidos al ICGES. El MARU, junto con sus colaboradores, pasó a formar parte del cuerpo científico del laboratorio del ICGES cuando esa unidad fue transferida a la República de Panamá en

1977 al entrar en ejecución los Tratados Torrijos-Carter del Canal de Panamá. Se fusionaron los dos bancos de suero.

En Panamá, se cuenta con un precedente de usos de bancos de suero en investigación (19). Según el documento “*50th Annual report of the Gorgas Memorial Laboratory-1978*”, en 1978, el Ministerio de Salud (MINSAL) realizó una encuesta serológica al azar en el país en 1% de la población panameña a mayores de 1 año. Se les extrajo muestras de sangre a todos los residentes de viviendas seleccionadas al azar y se registró información epidemiológica. Se documentó que 6,089 muestras fueron transportadas al laboratorio dentro de un periodo de 24 horas post-colección provenientes de áreas urbanas de 8 de las 9 provincias del país. Los sueros fueron separados en alícuotas y conservados en el banco de sueros del GML. Conjuntamente, los datos fueron sistematizados de manera electrónica. La visión de la encuesta serológica era identificar prevalencias de anticuerpo a enfermedades y documentar cambios periódicos en las tasas de infección.

SEROLOGICAL SURVEY OF PANAMA

In June 1978, the Ministry of Health initiated a random serologic survey of the entire country to sample 1 percent of the Panamanian population over 1 year of age. Results will permit a detailed sero-epidemiologic analysis of immunity against diseases for which Panama currently has immunization programs (polio, measles, rubella, mumps, diphtheria, pertussis and tetanus). All residents of the randomly selected households were bled and basic epidemiological information obtained; 6,089 bloods were transported to the laboratory within 24 hours of collection from the urban areas of eight of the nine provinces of Panama. Sera were separated, aliquoted into 1-dram vials and logged into the GML serum bank and the data into the computer. The remaining 14,000 bloods will be obtained during the next dry season.

In addition to providing immediately useful information regarding distribution of immunity against preventable diseases, the serologic survey has several valuable potential uses. The sera can be tested to identify high antibody prevalence groups or areas infected with specific diseases under study (SLE, yellow fever, Chagas', et cetera). These sera will serve also to document periodic changes in infection rates, since there are sera in the laboratory serum file from a similar random population-based survey conducted in 1966.

[Encuesta serológica de Panamá \(19\)](#)

En los años 80's, el BS fue una unidad de servicio del Laboratorio Conmemorativo Gorgas, asignada temporalmente al Departamento de Virología Clínica de la División de Ciencias del Laboratorio.

En el año 1981, se inició la transferencia de colecciones de suero en un intento por centralizar en un solo lugar las colecciones de suero existentes en los diferentes departamentos.

Entre los logros recientes de la Unidad de BS, están la dotación de la infraestructura requerida y de los equipos de laboratorio necesario para la adecuada preservación de la colección histórica de sueros y el desarrollo de actividades investigativas. Una vez instalado y equipado el “Nuevo Banco de Suero del ICGES”, se dio inicio al proceso de implementación de altos estándares en el control de calidad de todos los procesos en esta unidad operativa, tendientes a mejorar la preservación adecuada de la colección histórica de muestras biológicas.

En la actualidad el BS posee un sistema de alertas de fallas y el monitoreo de las temperaturas de cada uno de los equipos de congelación, vía Internet. Este sistema cuenta con un procedimiento que genera un registro histórico de las temperaturas máximas y mínimas alcanzadas por congelador, lo que permite monitorear las variaciones de las temperaturas de treinta (30) congeladores y de dos (2) áreas de laboratorio a intervalos de 15 minutos las 24 horas los 365 días del año.

Asimismo, el sistema eléctrico del BS está acoplado a una planta eléctrica de emergencia de doscientos cincuenta (250) kilovoltios amperios (KVA), la cual tiene la capacidad de generar energía eléctrica y suministrarla a áreas críticas del edificio de investigación del ICGES, incluyendo todos los congeladores y sistema de aire acondicionado central y aires acondicionados de respaldo, lo que garantiza el suministro de energía eléctrica ininterrumpida a esta unidad operativa durante apagones y fluctuaciones eléctricas.

Hoy por hoy, el BS contempla esfuerzos para reunir el perfil requerido para la creación de la Unidad de Biobanco, debido a que tiene el espacio físico y la infraestructura requerida; la vida útil de esta unidad se estima en más de 15 años; cuenta con equipos de

laboratorio necesarios para realizar pruebas serológicas y de biología molecular; los procedimientos que se realizan en esta unidad operativa cumplen con altos estándares de control de calidad; cuenta con los procedimientos operativos estandarizados para todas las tareas que se realizan; posee el personal técnico capacitado; se han desarrollado las políticas, procedimientos y programas para la inspección de equipos, mantenimiento preventivo, reparación y calibración de los equipos; brinda servicios de preservación de material biológico a otros departamentos, unidades y proyectos, pero con ciertas limitaciones debido a la falta de equipos de crio-preservación.

5. Justificación

Ante la gran colección de suero humano en el BS del ICGES, se hace necesario sistematizar la información y conocer la epidemiología en cuanto a variables de perfil sociodemográfico de las muestras allí contenidas. Por otro lado y con el transcurso de las décadas, las muestras han sido sujetas a traslados y a cambios de temperatura, que pudieron haber influido en la integridad proteica de las mismas por lo que es necesario evaluar la integridad proteica de las mismas.

Hoy en día, las herramientas para la investigación de muestras de suero permiten la identificación de un gran número de proteínas. Mediante el uso de complejas estrategias es importante verificar la preparación de la muestra en sí y el control de la calidad de la muestra al principio del proceso analítico. Por lo tanto, el conocimiento sobre el número, concentración relativa de proteínas o, de modo general, la distribución de varios constituyentes de un biomaterial bien definido y constante es sustancial para un análisis exitoso y uso futuro en investigación de las muestras del BS del ICGES.

Más allá, los resultados del estudio serán utilizados como apoyo para la implementación a futuro de un biobanco de investigación en Panamá.

6. Objetivos

1.1. Objetivo principal

Caracterizar la información epidemiológica y estandarizar la evaluación de la integridad protéica de las muestras de suero humano incluidas en la Unidad del Banco de Sueros del ICGES.

1.2. Objetivos específicos

- Caracterizar epidemiológicamente las muestras de suero disponibles, según variables sociodemográficas.
- Estandarizar la metodología para evaluar la integridad proteica de las muestras humanas del Banco de Suero.

7. Metodología

a. Diseño y Ámbito del estudio

Estudio observacional de análisis de bases de datos y del suero contenido en el Banco de Sueros del ICGES.

b. Población y Fases del Estudio

FASE 1: Epidemiología

Se estudiaron los datos sociodemográficos de personas cuyo suero se encuentra incluido en la base de datos de la Unidad de BS.

Criterios de Inclusión: Toda muestra identificada como suero humano contenida en el BS del ICGES que contenga trazabilidad para la siguiente información epidemiológica: fecha de recolección de la muestra, sexo, edad, lugar de procedencia.

Criterios de exclusión: Muestras de suero humano cuya trazabilidad epidemiológica no sea posible.

Para la adquisición de los datos se diseñó una hoja de recogida de datos en formato Excel específica para este estudio, la cual incluyó las siguientes variables sociodemográficas: sexo, edad, lugar de procedencia, año de recolección de la muestra.

Para determinar la viabilidad del presente estudio, se solicitó al Jefe de la Unidad de BS, con anuencia del Director del ICGES, una lista de todos los sueros con la información epidemiológica antes mencionada. El flujograma para la selección de las muestras a estudiar se encuentra detallado en la *Figura 2*. En total, existen **n= 22,350** muestras de suero humano con información epidemiológica cuyas fechas de recolección se encuentran distribuidas entre los años 1959 y el 2001.

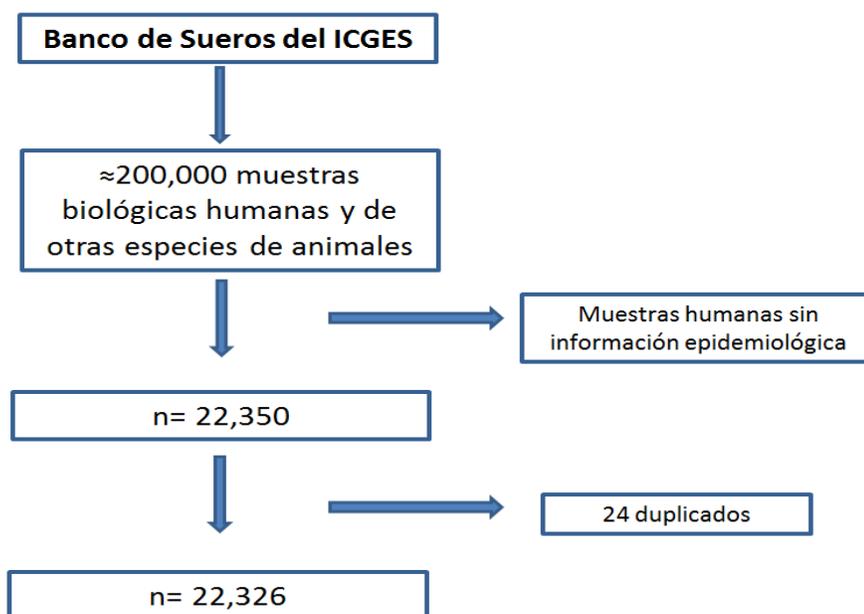


Figura 2. Flujograma de muestras con información epidemiológica contenidas en el BS

FASE 2: Sub-muestra y evaluación de la integridad proteica

El objetivo de la Fase 2 del presente estudio fue la de sistematizar la metodología que permita caracterizar la integridad proteica de las muestras humanas del BS, para así garantizar su utilidad para estudios posteriores. Para ello, utilizando el programa estadístico Stata versión 14, se seleccionó aleatoriamente una sub-muestra para validación de la integridad de las muestras crio-preservadas. Dicha sub-muestra tuvo representatividad por década de recolección. De acuerdo a los cálculos de muestreo simple para poblaciones finitas, asumiendo la diferencia de proporciones de suero entre cada década, el tamaño mínimo de la muestra por década necesario para garantizar una $\alpha=0.05$ fue el siguiente (*Tabla 2*).

Sin embargo, para realizar el análisis de la integridad proteica de las 1909 muestras, fue necesario estandarizar los procedimientos de análisis, proceso nunca antes realizado en

Década	Tamaño mínimo de muestra requerido
<1960	206
≥1960 y <1970	366
≥1970 y <1980	293
≥1980 y <1990	359
≥1990 y <2000	357
≥2000	328

Tabla 2. Tamaño mínimo de muestra requerido, según década

el ICGES. Para ello, ocho muestras de suero que no pertenecían a la sub-muestra fueron aleatoriamente seleccionadas para un análisis preliminar de la integridad de la proteína y para mejorar las técnicas de análisis previo al análisis del total de las muestras. El número de muestras seleccionadas aleatoriamente con representatividad por década se encuentran descritas en la *Tabla 3*. Dichas muestras fueron evaluadas a ciegas por el investigador en el laboratorio para evitar el “sesgo de expectativa del observador”.

Para validar la integridad proteica en la composición de las muestras de suero, se utilizó el método de electroforesis en gel de poliacrilamida de dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) teñido con Azul de Commassie. El SDS-page es un detergente anionico que desnaturaliza las proteínas, elimina las estructuras secundarias y terciarias, por lo que la desnaturalización resulta en un fraccionamiento según la diferencia de peso, la longitud de la cadena, y la forma de la proteína. Este método de electroforesis es utilizado comúnmente para analizar proteínas. Sin SDS, las distintas proteínas que tienen masas moleculares similares migran de forma diferente debido a diferencias en la proporción carga/masa, ya que cada proteína tiene un punto isoeléctrico distinto. En este procedimiento, el SDS alineará las proteínas de forma que las proteínas sean separadas por tamaño durante la electroforesis.

Suero	Año de recolección	ID de las muestras*
1	1959	177
2	1959	165
3	1959	311
4	1971	188
5	1979	520
6	1986	852
7	1997	086
8	2000	960

*El ID de las muestras se cifró según los últimos tres números del ID de la muestra correspondiente.

Tabla 3. Tamaño mínimo de muestra requerido, según década

La electroforesis es un método de separación basado en la movilidad de las biomoléculas en una fase líquida sometida a un campo eléctrico. Las moléculas que posean carga negativa migrarán hacia el polo positivo de un aparato electroforético y viceversa. La inclusión de una matriz sólida, además de la fase líquida, permite agregar un nuevo punto de separación y versatilidad en la electroforesis (20). De esta manera, no solo las biomoléculas pueden ser separadas por su carga, sino también por su tamaño (21).

Las muestras de suero son de alta complejidad y comprenden un amplio rango de concentración de proteínas. Es por ello que en este estudio, para normalizar la expresión de las bandas entre muestras de suero, se cuantificó la concentración de proteína de cada muestra previa al análisis de SDS-PAGE, por medio del Ensayo de Absorbancia de Ácido Bincincónico (BCA). La composición de las bandas de las muestras del Banco de Suero fue comparada con un suero control comercial. Con los resultados de la absorbancia, se pudo hacer la comparación de la corrida utilizando el mismo volumen proteico vs la misma concentración proteica, para así optimizar el análisis de integridad proteica. La integridad de proteína se valoró como una variable dicotómica.

c. Metodología de Laboratorio

Materiales y Métodos

i. Suero Humano

Ocho (8) muestras de suero (520, 188, 165, 311, 852, 960, 177, 086) fueron aleatoriamente seleccionadas para un análisis preliminar de la integridad de la proteína y para mejorar las técnicas de análisis previo al análisis del total de las muestras. Las muestras de suero se encontraban almacenadas en congeladores a una temperatura de -86°C , fueron separadas en alícuotas por el custodio del Banco de Suero del ICGES, y entregadas a los investigadores. Se procedió a desnaturalizar las proteínas en las muestras a 95°C por 5 min, teñidas con Laemmli Sample Buffer y cargadas al pocillo correspondiente en el sistema de electroforesis. Las proteínas en las muestras de suero fueron separadas por SDS-PAGE y teñidas con Azul de Commassie (*Figura 3*).

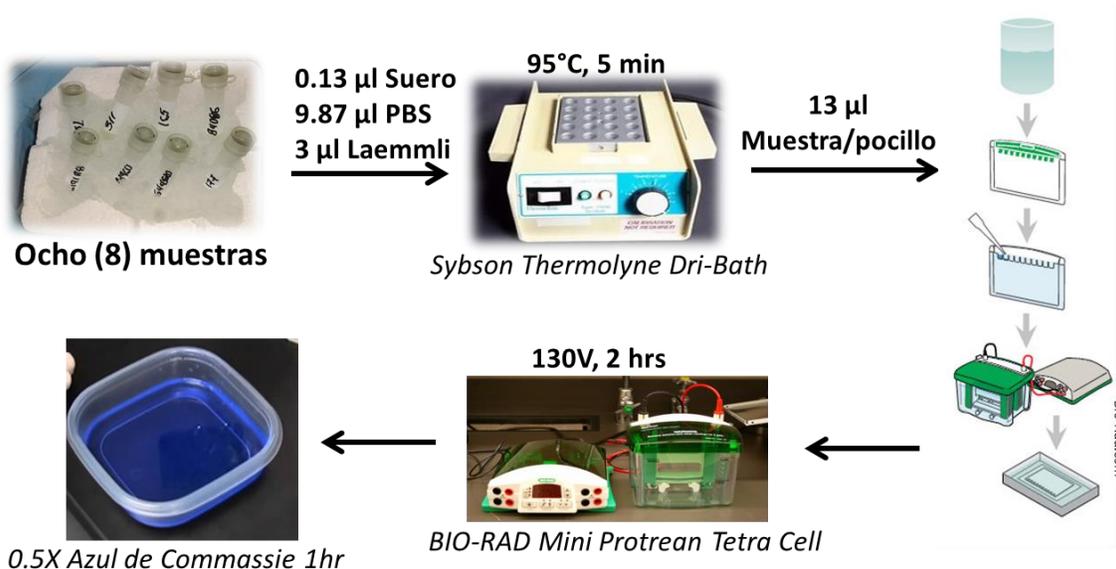


Figura 3. Resumen del procedimiento utilizado para análisis de integridad proteica en suero humano. Ocho muestras de suero mantenidas en hielo fueron desnaturalizadas a 95°C por 5 min y añadidas al pocillo correspondiente en el sistema de electroforesis a 130 V por 2 horas. Terminada la corrida, el gel que contiene las muestras fue teñido con 0.5x Azul de Commassie.

Debido a la alta concentración proteica contenida en el suero, las muestras fueron diluidas 80 con tampón fosfato salino (PBS, por sus siglas en ingles) para el posterior análisis de cuantificación proteica por el Ensayo de BCA. Posterior a la cuantificación proteica se procedió a la tinción de las muestras de suero con 4x Laemmli Sample Buffer y el agente reductor β -mercaptoethanol (Bio-Rad, CA, USA) para su posterior corrida por SDS-PAGE (Figura 4).

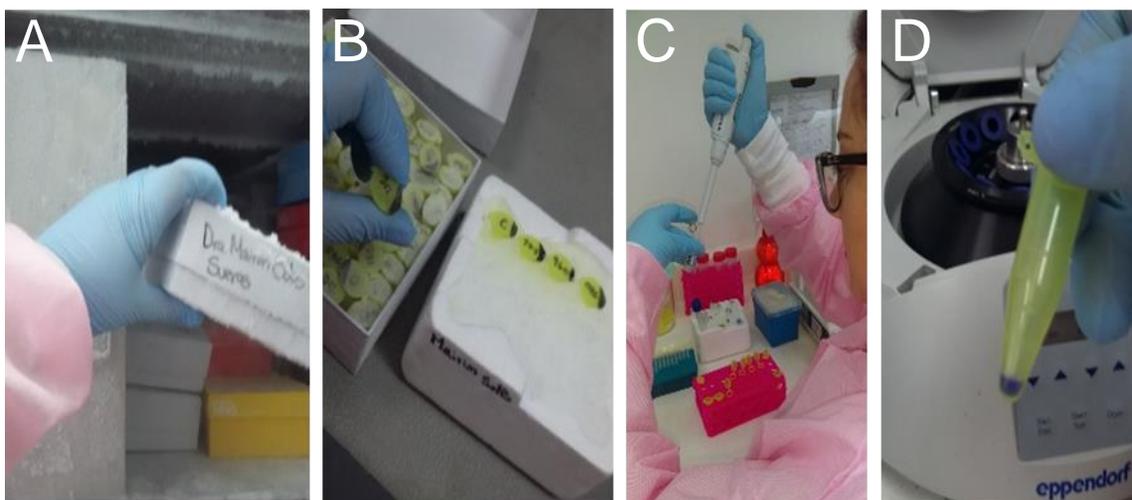


Figura 4. Preparación de muestras de suero. (A) Muestras de suero almacenadas a -86°C; (B) Muestras de suero procesadas en hielo para su preservación; (C) Dilución y preparación de muestras de suero; (D) Preparación de muestras de suero con Laemmli Sample Buffer.

ii. Ensayo de Ácido Bicincónico

Las muestras de suero humano fueron cuantificadas por el ensayo de ácido bicincónico (Pierce BCA Protein Assay kit, Thermo Scientific, IL, USA). El ensayo de Ácido Bicincónico (BCA) es una formulación compatible con detergentes a base de ácido bicincónico para la detección colorimétrica y la cuantificación de la proteína total. Este método combina la conocida reducción de Cu^{+2} a Cu^{+1} por las proteínas en un medio alcalino, obteniendo una detección colorimétrica altamente sensible y selectiva del catión

cuproso. Para este estudio, una curva estándar de Albumina fue construida con una dilución seriada de 0 µg/ml a 2000 µg/ml. Luego, 10 µl de muestra de suero y 200 µl de Reactivos BCA A y BCA B (50:1) fueron añadidos a un plato de 96 pocillos, incubados por 30 min a 37°C en oscuridad y analizados por un lector de absorbencia a 490 nm (ELx808 Absorbance Microplate Reader, BioTek Instruments, VT, USA) (Figura 5).

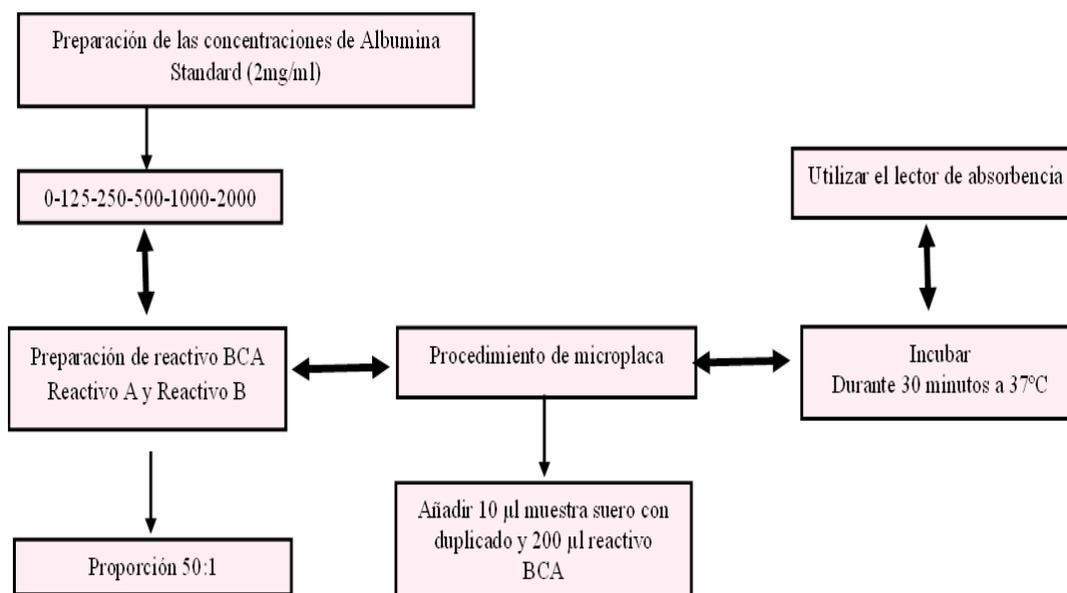


Figura 5. Flujograma de procedimiento estandarizado para el ensayo de Ácido Bicincónico (BCA) de muestras del Banco de Suero del ICGES.

iii. SDS-Page

Se visualizó la integridad de las bandas de proteína de las muestras de suero a través de SDS-PAGE con tinción de Azul de Commassie utilizando el sistema de electroforesis y transferencia Mini-Protreat Tetra Vertical Electrophoresis Cell (Bio-Rad, Figura 6A). Brevemente, se unieron dos placas de vidrio para un grosor de 1 mm, introduciéndolo firmemente en el soporte de fundición junto a la tira de goma para evitar escape de líquido (Figura 6B-6D). Se verificó la ausencia de escape en el sistema por medio de la adición

de H₂O DD (*Figura 6E*). Se procedió a la preparación del gel separador al 10% (H₂O DD, 1.5 Tris pH 8.8, 40% Acrilamida, 10% SDS, 10% Persulfato de Amonio y TEMED), e inmediatamente se añadió entre los vidrios para la solidificación del gel (*Figura 6F-6J*). Alcohol fue añadido para eliminación de burbujas dentro del sistema (*Figura 6K*). Luego de solidificado el gel, se procedió a lavar el alcohol entre los vidrios con agua. Se preparó y añadió el stacking gel (H₂O DD, 0.5 Tris pH 6.8, 40% Acrilamida, 10% SDS, 10% Persulfato de Amonia y TEMED) al sistema y se insertó inmediatamente entre los vidrios el peine formador de pocillos (*Figura 6L-6O*).



Figura 6. Procedimiento estandarizado de SDS-PAGE para muestras del Banco de Suero del ICGES.

Describe los procedimientos para preparación del gel. (A) Partes del equipo de electroforesis; (B-E) Ensamblaje de los vidrios; (F-K) Preparación del gel separador; (L-M) Preparación del gel stacking; (N-O) Montaje del peine de pocillos.

Solidificado el gel, se separa de la base que sostiene las placas de vidrio (*Figura 7A*), luego se fijan en la unidad de funcionamiento de gel, se inserta en el tanque de electroforesis (*Figura 7B*), se procede a llenar la cámara con 1x Running Buffer, previamente preparado (*Figura 7C*), y se retira el peine de los vidrios ya sumergidos en el buffer (*Figura 7D*).

Una alícuota de 15 μg de suero fue mezclada con Laemmli y colocadas al pocillo correspondiente (*Figura 7E-7H*). El sistema de SDS-Page se conectó a la fuente de corriente a 100 V hasta que el frente entró en el gel separador. Luego se subió el voltaje a 120 V dejando la muestra correr por aproximadamente dos horas o hasta que la muestra se llegue al extremo inferior del gel (*Figura 7K*). Una vez finalizada la transferencia, se tiñe el gel de electroforesis mediante su inclusión en solución de tinción que contiene Azul de Commassie.

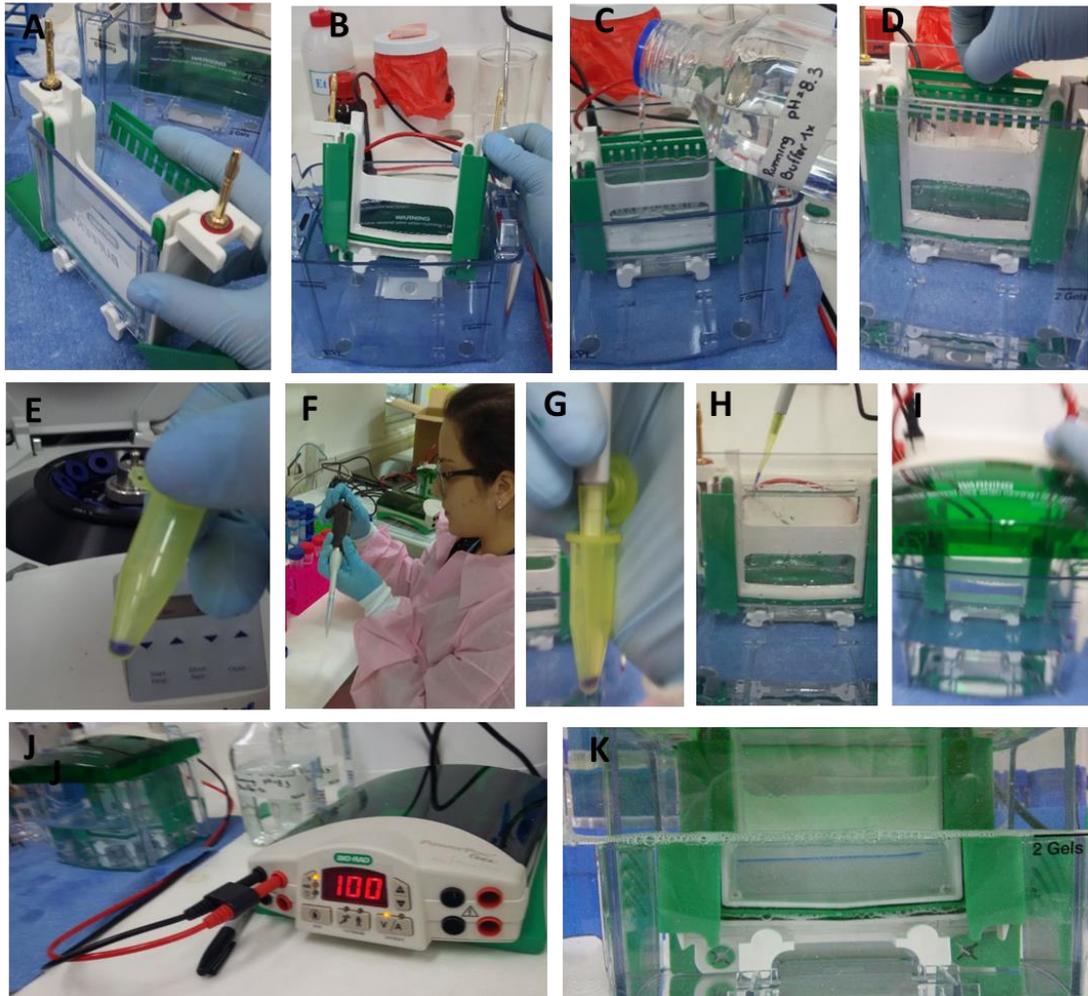


Figura 7. Procedimiento para ensamblaje del sistema de electroforesis, colocación de los vidrios con el gel, añadiendo las muestras, y corrida. (A-B) Ensamblando los vidrios al sistema de electroforesis; (C) añadiendo Running Buffer a la cámara de electroforesis; (D) removiendo peine del gel; (E-H) añadiendo las muestras al gel; (I) Tapa con electrodos es cuidadosamente insertada a la cámara; (J) Cámara es conectada a la fuente de energía y ajustada a 100 V; (K) Muestras corriendo por el gel se visualiza en la línea azul.

iv. Tinción de Gel por Azul de Commassie

La tinción del gel se realizó con 0.5x Azul de Commassie (Sigma Aldrich, MO, USA) preparado en metanol y ácido acético (*Figura 8A-8C*). El gel fue introducido en un recipiente con suficiente azul de commassie, cubriendo el gel completamente, por un periodo de una hora agitándose (*Figura 8D*). Pasado la hora, se procede a la distinción añadiendo el buffer para desteñir (H_2O DD + Metanol+ Ácido acético) durante 25 a 30 minutos agitándose (*Figura 8E*). Un indicador de que el gel está lo suficientemente desteñado es que se vea completamente blanco y se reduce el tamaño. Se diluye el buffer para desteñir con H_2O DD y se deja reposar por 24 horas. Pasadas las 24 horas, el buffer para desteñir es reemplazado con uno fresco, dejándolo reposar por 3 horas. El gel es lavado varias veces con H_2O DD, hasta remover todo residuo del tinte. Se procede a retirar el gel del H_2O DD para pasarlo a un cobertor de plástico para rotularlo (fecha, orden de muestras en pocillos) y fotografiarlo (*Figura 8F*).

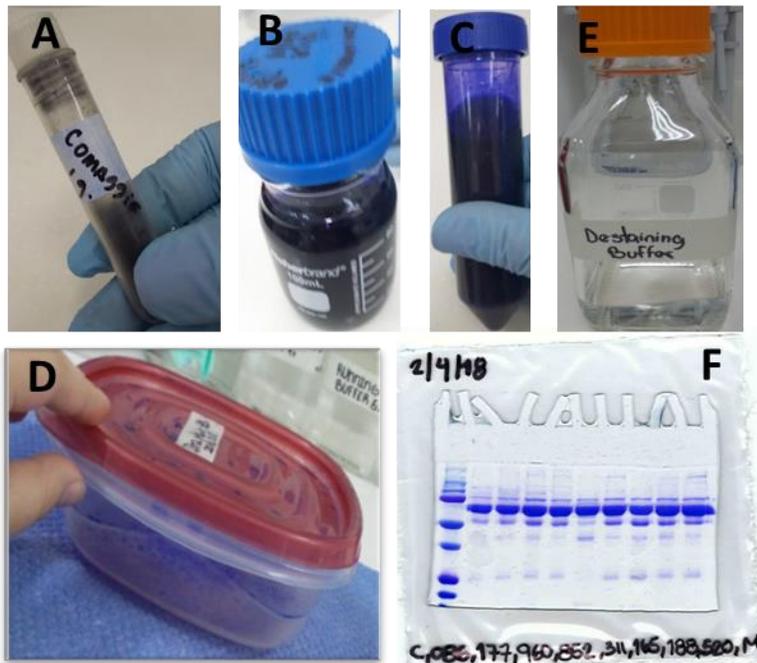


Figura 8. Flujograma de procedimiento estandarizado para el ensayo de Ácido Bicincónico (BCA) de muestras del Banco de Suero del ICGES

8. Resultados y Discusión

a. Epidemiología descriptiva

La *Tabla 4* detalla el número de muestras según variables sociodemográficas.

Década	< 1960	1960-1969	1970-1979	1980-1989	1990-1999	≥2000
Total (n=22,326)						
n	446	7,927	1,240	5,487	5,007	2,219
H/M (n)	221/225	3,746/4,181	633/607	2,935/2,552	2,362/2,645	1,091/1,128
Relación H/M	0.98	0.89	1.04	1.15	0.89	0.97
Edad	13 (8-27)	13 (9-30)	20 (12-33)	30 (20-43)	25 (12-39)	25 (11-39)
Hombres (n=10,988)						
n	221	3,746	633	2,935	2,362	1,091
Edad	12 (8-27)	13 (9-30)	21 (13-33)	30 (20-43)	25 (12-38)	23 (10-37)
Mujeres (n=11,338)						
n	225	4,181	607	2,552	2,645	1,128
Edad	13 (8-26)	14 (9-30)	20 (12-35)	30 (19-43)	25 (12-39)	28 (13-41)

H: Hombres, M: Mujeres. Edad: mediana (rango intercuartil)

Tabla 4. Distribución de sexo y edad según década en las muestras del BS-ICGES

Del total de participantes incluidos en el presente estudio (n=22,326), el 49.2% (n=10,988) pertenecían al sexo masculino mientras que el 50.8% (n=11,338) al sexo femenino. La mediana de edad, rango intercuartil (RIQ) de toda la población fue 23 (11-37) años. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre la edad y el sexo ($p=0.9$).

Al analizar los datos sociodemográficos según década de recolección, se encontró que el mayor número de muestras provienen de la década de los 60s y 80s. Asimismo, este grupo tiene la mediana de edad más alta para ambos sexos. Se podría especular que parte de estas muestras provienen de la encuesta serológica realizada en 1978 (19), además de otros estudios sero-epidemiológicos realizados previamente en 1967 por el Instituto de Nutrición de Centroamérica y Panamá (INCAP) (22). Este último estudio, involucró muestras de sangre y orina y fue realizado en 600 familias provenientes de 30 localidades a nivel nacional, utilizando un método de selección al azar. La muestra incluyó un grupo de soldados procedentes de dos bases militares de los Estados Unidos Como resultado de esta encuesta, se realizó un estudio de sero-prevalencia de Brucelosis, el cual fue publicado en 1973 (23).

De acuerdo con el área geográfica, el 60.4% de las muestras contenidas en el BS corresponden a personas cuya residencia fue la capital del país, seguidas por la provincia de Bocas del Toro (9.02%) y Colón (6.21%) (*Figura 9*).

Alrededor del 4.6% de las muestras provienen del extranjero, probablemente como resultado de cooperación regional entre países en programas de investigación científica, vigilancia epidemiológica y referencia.

Como se puede apreciar en la *Figura 10*, el mayor porcentaje de las muestras del extranjero provienen de países latinoamericanos. Bolivia se posiciona en el primer lugar, con un porcentaje de 37.42%, seguido por Perú (24.40%) y Guatemala (17.45%). Las muestras son producto de cooperación entre países relacionados a la investigación de enfermedades transmisibles como es el caso de la fiebre hemorrágica boliviana y el dengue.

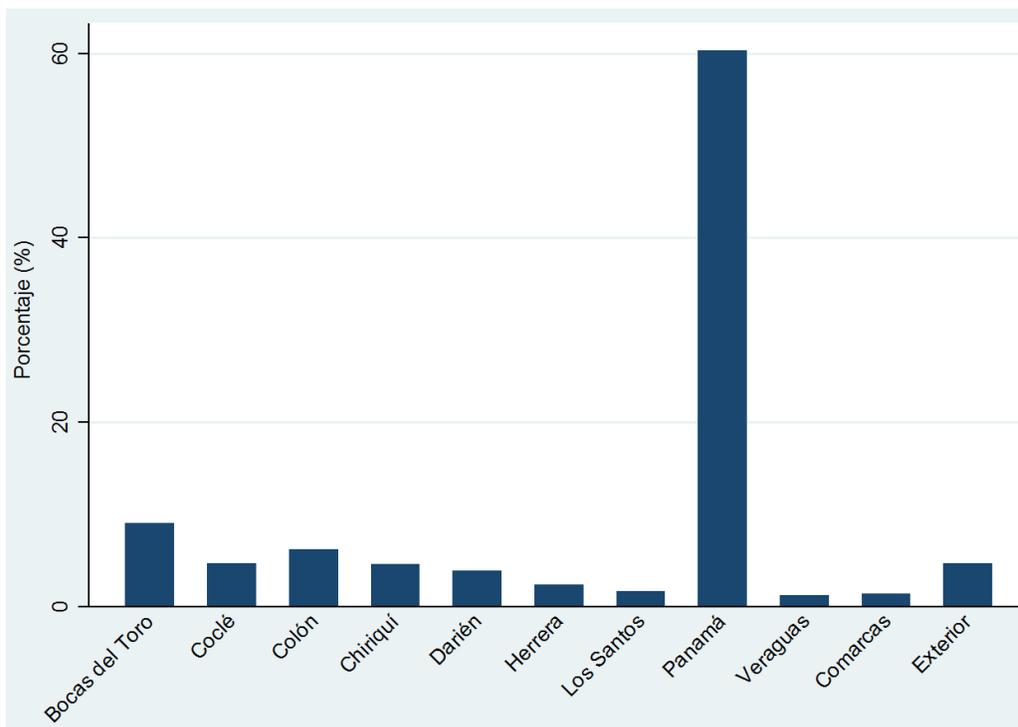
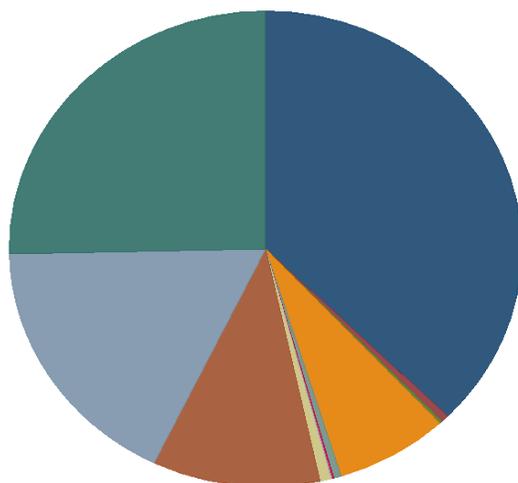


Figura 9. Distribución de las muestras del BS según origen de residencia

Alrededor del 4.6% de las muestras provienen del extranjero, probablemente como resultado de cooperación regional entre países en programas de investigación científica, vigilancia epidemiológica y referencia.

Al evaluar las muestras que provienen del extranjero, según década (*Tabla 5*), se pudo apreciar que la década de los 70s concentra la mayor cantidad de extracción de muestras de suero. Esta década es particularmente importante por el auge en el diagnóstico e investigación de agentes virales como el dengue, fiebre amarilla, así otras enfermedades parasitarias (miasis por *Dermatobia hominis*). No existen muestras conservadas en el BS provenientes del extranjero con información sociodemográfica de la década de los 60s.

n=1037



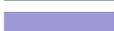
	Bolivia (37.42%)		Brasil (0.48%)
	Canadá (0.19%)		Colombia (7.14%)
	Costa Rica (0.48%)		Cuba (0.10%)
	El Salvador (0.10%)		España (0.68%)
	Estados Unidos (10.6%)		Guatemala (17.45%)
	Perú (25.4%)		

Figura 10. Distribución de las muestras del BS-ICGES según país de origen.

Década	n=1037 (%)	Países
1960-1970	10 (0.96%)	Costa Rica, Colombia
1970-1980	829 (79.95%)	Guatemala, Perú, Bolivia
1980-1990	191 (18.42%)	Canadá, E.U, Cuba, El Salvador, Guatemala, Colombia, Brasil, Bolivia, Perú
1990-2000	7 (0.67%)	España

Tabla 5. Distribución de Países de origen según década de las muestras del BS-ICGES.

b. Estandarización de la Integridad Proteica

Por medio de este estudio se demostró preliminarmente que las muestras de suero humano preservadas en el Banco de Suero ICGES muestran integridad en su composición proteica. Del mismo modo, se logró estandarizar los procedimientos operativos para el análisis de expresión de bandas proteicas en muestras de suero por medio del análisis de SDS-page, que servirán como plataforma para estudios proteicos más específicos como lo son el Western Blot y Proteómica. Durante la estandarización del procedimiento, se comparó la corrida de SDS-PAGE utilizando la misma cantidad de volumen de muestra de suero versus la corrida utilizando la misma concentración proteica de las muestras.

Nuestros resultados demostraron que la utilización de las muestras de suero a una dilución de 10x para el análisis de expresión de bandas por SDS-PAGE, refleja una sobreabundancia de concentración proteica que no permite visualizar con claridad la división de las bandas (*Figura 11*).

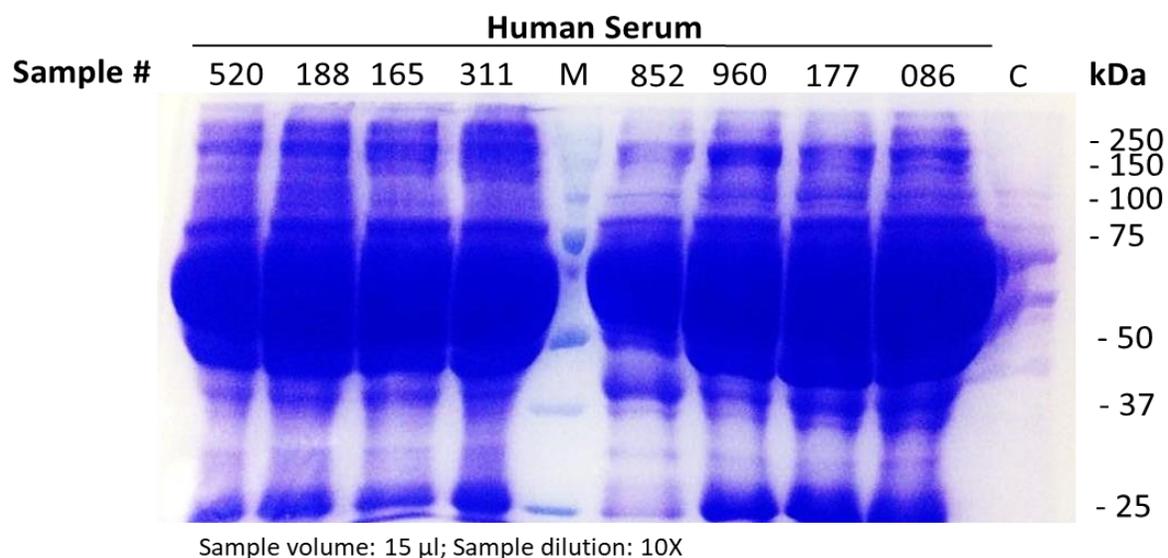


Figura 11. Resultados de SDS-PAGE de las ocho muestras de suero humanas diluidas 10X. Las muestras de suero fueron diluidas 10 veces, teñidas con Laemmli y β -mercaptoethanol y desnaturalizadas previo a la corrida por SDS-PAGE. M: Marcador de 250 kDa (Bio-Rad).

Es por ello, que se procedió a realizar una corrida de SDS-PAGE utilizando una muestra de suero con dilución seriada. De este modo definiríamos la dilución más óptima para nuestras muestras de suero. Nuestros resultados demostraron que una dilución de 80x alcanza una óptima claridad en la división de las bandas (*Figura 12*). Al repetir el análisis de SDS-Page con nuestras 8 muestras de suero a una dilución de 80x, pudimos corroborar una mayor claridad en la división y expresión de las bandas de proteína (*Figura 13*), indicándonos preliminarmente que las muestras de suero con diferentes décadas de almacenamiento han mantenido la integridad en la composición de bandas proteicas en comparación al suero control (Sigma Aldrich, MO, USA). Sin embargo, aún quedaba por elucidar, si la diferencia en la abundancia de cada banda entre las muestras era debido a la biología de la muestra de suero, o debido a la añadida de distintas concentraciones de proteína en el mismo volumen de suero. Esto se debe a que en el mismo volumen de muestra (13µl) varía la concentración proteica.

Para elucidar esto, procedimos a la cuantificación proteica de cada muestra de suero por medio del ensayo de BCA. Por medio de este análisis buscábamos optimizar la corrida del gel obteniendo mayor claridad de la abundancia proteica contenida en las bandas presentes en las muestras de sueros.

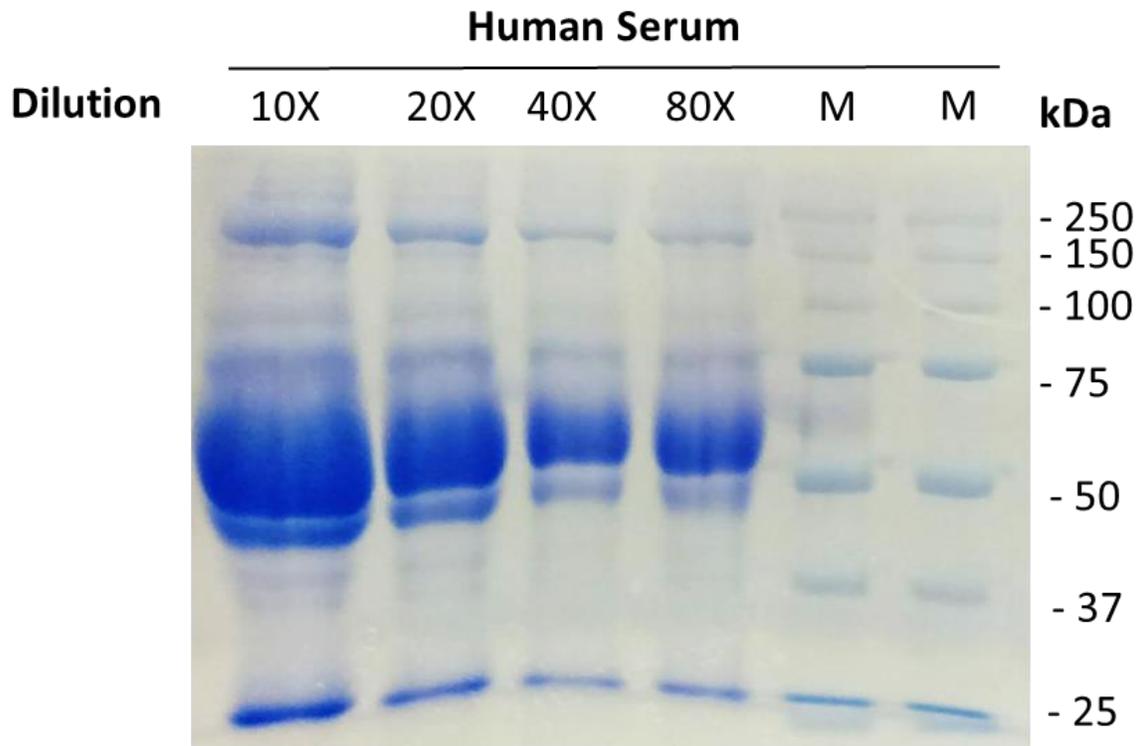


Figura 12. Resultados de SDS-PAGE de una muestra de suero humana con dilución seriada a un rango de 10X a 80X. Las muestras de suero fueron diluidas a la concentración correspondiente, teñidas con Laemmli y β -mercaptoethanol y desnaturalizadas previo a la corrida por SDS-PAGE. M: Marcador de 250 kDa (Bio-Rad).

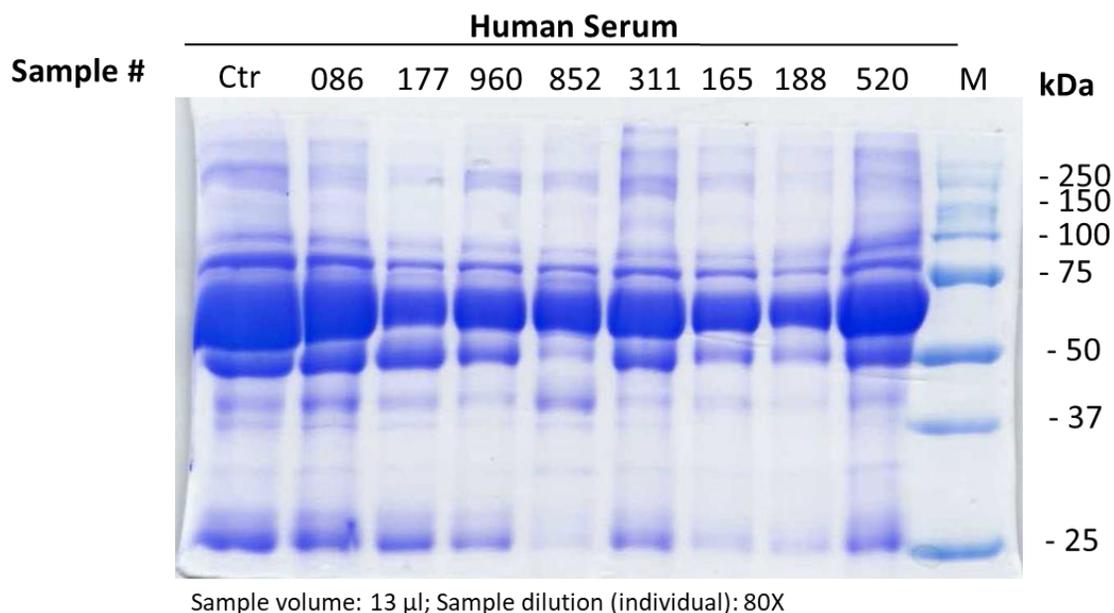


Figura 13. Resultados de SDS-PAGE de las ocho muestras de suero humanas diluidas 80X. Las muestras de suero fueron diluidas 80 veces, tenidas con Laemmli y β -mercaptoethanol y desnaturalizadas previo a la corrida por SDS-PAGE. M: Marcador de 250 kDa (Bio-Rad).

Para realizar la cuantificación proteica de las muestras, primeramente, se construyó una curva estándar con la proteína estándar de albumina, con la cual se podría calcular el R^2 y la ecuación para el cálculo de concentración proteica (Tabla 6 y Figura 14). La preparación de patrones de albumina diluida fue de 0, 125, 250, 500, 1000, y 2000 $\mu\text{g/ml}$. El R^2 deseado era de >0.98 . (Figura 10). Una vez calculada la concentración proteica se procedió a añadir el respectivo volumen de la muestra para 15 μg de proteína a la corrida de SDS-PAGE (Figura 15).

Muestra ID	OD490	Proteina (mg/ml)	Total (µg)	Cargado µg	Cargado Volumen	Promedio Volumen	5X Laemmli	ddH2O	Vol. Final (µl)
Control	0.257	0.890	71.16	15	16.86	16.50	4	29.50	50
Control	0.265	0.930	74.36	15	16.14				
86	0.272	0.965	77.16	15	15.55	15.84	4	30.16	50
86	0.265	0.930	74.36	15	16.14				
177	0.191	0.560	44.76	15	26.81	26.69	4	19.31	50
177	0.192	0.565	45.16	15	26.57				
960	0.231	0.760	60.76	15	19.75	19.75	4	26.25	50
960	0.231	0.760	60.76	15	19.75				
852	0.139	0.300	23.96	15	50.08	49.67	4	0.00	50
852	0.14	0.305	24.36	15	49.26				
311	0.229	0.750	59.96	15	20.01	20.96	4	25.04	50
311	0.216	0.685	54.76	15	21.91				
165	0.297	1.090	87.16	15	13.77	14.06	4	31.94	50
165	0.288	1.045	83.56	15	14.36				
188	0.17	0.455	36.36	15	33.00	33.37	4	12.63	50
188	0.168	0.445	35.56	15	33.75				
520	0.157	0.390	31.16	15	38.51	37.57	4	8.43	50
520	0.161	0.410	32.76	15	36.63				

Tabla 6. Cuantificación proteica por Ensayo de Ácido Bicínico

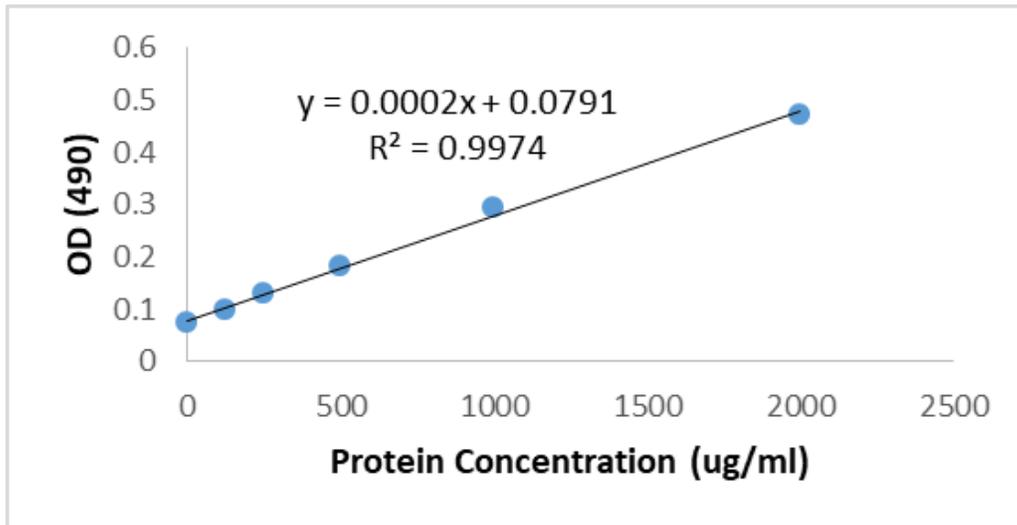


Figura 14. Curva estándar de concentración proteica de albumina bovina. Las muestras fueron diluciones seriadas, y analizadas por el Ensayo de Ácido Bicínico con un lector de absorbencia a 490nm.

Cuantificar proteicamente las muestras de suero nos permitió realizar los cálculos de dilución de las muestras para añadir la misma cantidad de proteína en cada muestra de suero (15 $\mu\text{g/ml}$). Nuestros resultados demostraron que la corrida de SDS-PAGE de muestras de suero con la misma concentración proteica, permite visualizar con claridad la división de las bandas de proteína y que además nos permite de una manera preliminar distinguir las diferencias en abundancia de diversas proteínas según el peso molecular (Figura 16).

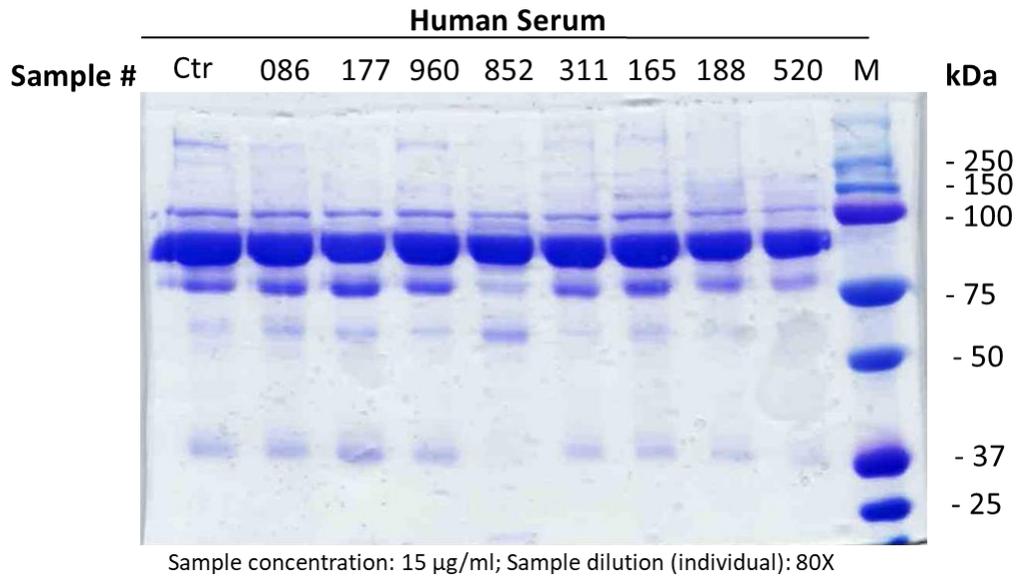


Figura 15. Resultados de SDS-PAGE de las ocho muestras de suero humanas a una concentración de 15 µg/ml diluidas 80X. M: Marcador de 250 kDa (Bio-Rad).

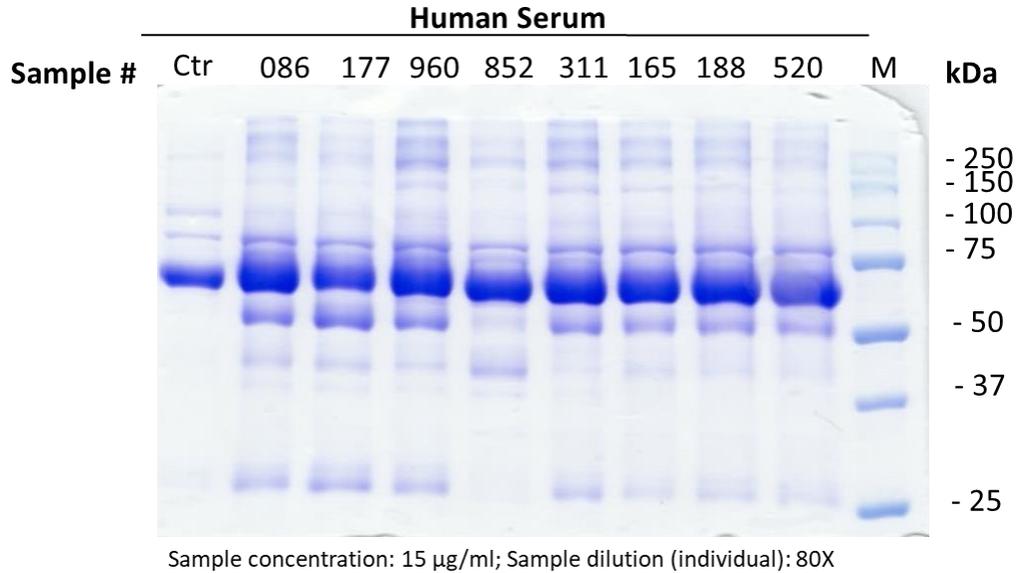


Figura 16. Resultados de SDS-PAGE de las ocho muestras de suero humanas diluidas 80X. Las muestras de suero fueron diluidas 80 veces y cuantificadas para añadir 15 µg/ml, tenidas con Laemmli y β-mercaptoethanol y desnaturalizadas previo a la corrida por SDS-PAGE. M: Marcador de 250 kDa (Bio-Rad).

En el presente estudio, pudimos demostrar que un análisis preliminar de las bandas proteicas por medio de SDS-PAGE, es una estrategia óptima para la detección del patrón de proteínas separadas en muestras de suero, como previamente publicado (24). SDS-PAGE es un método adecuado para la detección preliminar de posibles valores atípicos o muestras que deben ser consideradas para posteriores análisis más específicos como Western Blot o Proteómica. Igualmente, SDS-PAGE es una metodología para optimizar estrategias analíticas cuando las conclusiones pueden ser extraídas únicamente del patrón de proteínas sin ningún conocimiento de las proteínas separadas (24). Adicionalmente, esta metodología nos permite determinar preliminarmente posibles dianas de proteínas que varían en abundancia entre las muestras. Esto permite en un futuro, realizar western blot de proteínas específicas localizadas en algún peso molecular, y determinar las funciones de dichas proteínas, cuyos resultados podrían ser indicadores del estado de salud del paciente. La caracterización de los péptidos del suero sanguíneo puede proporcionar información valiosa sobre la fisiología y procesos patológicos (25).

SDA-PAGE nos permite visualizar diferencias en abundancia proteica. Sin embargo, queda por elucidar si ajustar la concentración proteica total de las muestras no altera algún indicador del estado fisiológico de dicho paciente. Por ejemplo, que el paciente tiene una condición de salud en donde la cantidad de proteína es menor al rango normal.

9. Perspectivas futuras

Como sucede en muchos de los países de la región, en Panamá los estudios epidemiológicos relacionados con factores de riesgo de muchas de las enfermedades que incluyen biomarcadores son escasos y, además, no se cuenta con mediciones repetidas.

Los datos longitudinales, a diferencia de los datos transversales en serie, permiten comprender mejor los efectos tanto del tiempo como del envejecimiento poblacional. En ese sentido, el material del BS, es un recurso que permitiría explorar factores y generar hipótesis que puedan haber atenuado tendencias favorables o contribuir a las tendencias adversas de biomarcadores tanto de las ENT y ET en una población expuesta a la llamada transición epidemiológica.

Muestras biológicas preservadas en condiciones óptimas de congelamiento son ideales para la evaluación del genoma, transcriptoma, y proteoma. Sin embargo, la biodegradación de bioespecímenes congelados puede ser influenciado por factores independientes de la metodología de recolección, como lo son los ciclos de congelamiento-descongelamiento (26). Nuestro estudio, además de caracterizar las muestras en su epidemiología descriptiva, demostró experimentalmente una estrategia para validar la calidad de las muestras, informando sobre el estado de las muestras congeladas a través de las décadas en el BS del ICGES. Mas aún logramos caracterizar la integridad proteica de las muestras humanas del BS en una fase piloto, lo cual garantiza la utilidad de esta metodología para estudios posteriores.

10. Consideraciones Éticas

El presente estudio obtuvo la no objeción del MINSA así como la aprobación del Comité de Bioética de la Investigación del ICGES el 10 de agosto del 2017. Toda la información obtenida de los datos secundarios ha sido utilizada estrictamente para cumplir con el objetivo de esta investigación. Los resultados obtenidos han sido analizados y presentados en este informe sin alteraciones que obedezcan a intereses del grupo investigador.

11. Agradecimientos

El equipo investigador desea dar un especial agradecimiento al Dr. José Santamaría por el apoyo con insumos para la realización de la fase piloto del estudio y a la estudiante Cindy Fu por el apoyo en la realización de los experimentos. Se agradece a Evelyn Hernández del BS por la asistencia brindada.

IMV es apoyada por el Sistema Nacional de Investigación (SNI), Panamá.

12. Referencias

1. Kauffmann F, Cambon-Thomsen A. Tracing biological collections: between books and clinical trials. *Jama*. 2008;299(19):2316-8.
 2. Artene SA, Ciurea ME, Purcaru SO, Tache DE, Tataranu LG, Lupu M, et al. Biobanking in a constantly developing medical world. *TheScientificWorldJournal*. 2013;2013:343275.
 3. Elger BS, Caplan AL. Consent and anonymization in research involving biobanks: differing terms and norms present serious barriers to an international framework. *EMBO reports*. 2006;7(7):661-6.
 4. Hansson MG, Dillner J, Bartram CR, Carlson JA, Helgesson G. Should donors be allowed to give broad consent to future biobank research? *The Lancet Oncology*. 2006;7(3):266-9.
 5. Hansson MG. Ethics and biobanks. *British journal of cancer*. 2009;100(1):8-12.
 6. Wendler D. Consent for research with biological samples: one-time general consent versus a gift model. *Annals of internal medicine*. 2012;156(8):596-8.
 7. Maschke KJ. Navigating an ethical patchwork--human gene banks. *Nature biotechnology*. 2005;23(5):539-45.
 8. Ferreccio C, Roa JC, Bambs C, Vives A, Corvalan AH, Cortes S, et al. Study protocol for the Maule Cohort (MAUCO) of chronic diseases, Chile 2014-2024. *BMC public health*. 2016;16:122.
 9. The National Health and Nutrition Examination Survey Analytic and Reporting Guidelines. Hyattsville, MD: Centers for Disease Control and Prevention (CDC). National Center for Health Statistics (NCHS), 2004. http://www.cdc.gov/nchs/about/major/nhanes/nhanes2003-2004/analytical_guidelines.htm. Acceso Abril 2017.
 10. The Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study: design and objectives. The ARIC investigators. *Am J Epidemiol*. 1989;129(4):687-702.
 11. Magnusson PK, Almqvist C, Rahman I, Ganna A, Viktorin A, Walum H, et al. The Swedish Twin Registry: establishment of a biobank and other recent developments. *Twin Res Hum Genet*. 2013;16(1):317-29.
 12. Baldassarre D, Nyssonen K, Rauramaa R, de Faire U, Hamsten A, Smit AJ, et al. Cross-sectional analysis of baseline data to identify the major determinants of carotid intima-media thickness in a European population: the IMPROVE study. *Eur Heart J*. 2010;31(5):614-22.
 13. Parrinello CM, Grams ME, Couper D, Ballantyne CM, Hoogeveen RC, Eckfeldt JH, et al. Recalibration of blood analytes over 25 years in the atherosclerosis risk in communities study:
-

impact of recalibration on chronic kidney disease prevalence and incidence. *Clin Chem.* 2015;61(7):938-47.

14. Arts EE, Popa CD, Smith JP, Arntz OJ, van de Loo FA, Donders R, et al. Serum samples that have been stored long-term (>10 years) can be used as a suitable data source for developing cardiovascular risk prediction models in large observational rheumatoid arthritis cohorts. *Biomed Res Int.* 2014;2014:930925.

15. Stokes YM, Salmond CE, Carpenter LM, Welby TJ. Stability of total cholesterol, high-density-lipoprotein cholesterol, and triglycerides in frozen sera. *Clin Chem.* 1986;32(6):995-9.

16. Danesh J, Kaptoge S, Mann AG, Sarwar N, Wood A, Angleman SB, et al. Long-term interleukin-6 levels and subsequent risk of coronary heart disease: two new prospective studies and a systematic review. *PLoS Med.* 2008;5(4):e78.

17. Schreiner PJ, Jacobs DR, Jr., Wong ND, Kiefe CI. Twenty-Five Year Secular Trends in Lipids and Modifiable Risk Factors in a Population-Based Biracial Cohort: The Coronary Artery Risk Development in Young Adults (CARDIA) Study, 1985-2011. *J Am Heart Assoc.* 2016;5(7).

18. Morgan AR, O'Hagan C, Touchard S, Lovestone S, Morgan BP. Effects of freezer storage time on levels of complement biomarkers. *BMC Res Notes.* 2017;10(1):559.

19. Gorgas Memorial L, Gorgas Memorial Institute of T, Preventive M, United S. Annual report of the Gorgas Memorial Laboratory. Washington: U.S. Govt. Print. Off; 1978.

20. Smithies O. Zone electrophoresis in starch gels: group variations in the serum proteins of normal human adults. *Biochem J.* 1955;61(4):629-41.

21. Los métodos experimentales que permiten el estudio de las macromoléculas de la vida: historia, fundamentos y perspectivas. Los métodos experimentales que permiten el estudio de las macromoléculas de la vida: historia, fundamentos y perspectivas. Acceso Septiembre 2018.

22. Evaluación nutricional de la población de Centro América y Panamá, Panamá- 1966. <https://bd.sica.int/index.php/catalog/34/study-description#page=overview&tab=study-desc>. Acceso Octubre 2018.

23. Kourany M, Martinez R, Vasquez MA. [Seroepidemiological survey of brucellosis in Panama]. *Bol Oficina Sanit Panam.* 1973;75(1):65-72.

24. Grunert T, Marchetti-Deschmann M, Miller I, Muller M, Allmaier G. Comparing the applicability of CGE-on-the-chip and SDS-PAGE for fast pre-screening of mouse serum samples prior to proteomics analysis. *Electrophoresis.* 2008;29(21):4332-40.

25. Biosa G, Addis MF, Tanca A, Pisanu S, Roggio T, Uzzau S, et al. Comparison of blood serum peptide enrichment methods by Tricine SDS-PAGE and mass spectrometry. *J Proteomics*. 2011;75(1):93-9.
26. Shabihkhani M, Lucey GM, Wei B, Mareninov S, Lou JJ, Vinters HV, et al. The procurement, storage, and quality assurance of frozen blood and tissue biospecimens in pathology, biorepository, and biobank settings. *Clin Biochem*. 2014;47(4-5):258-66.