

ARTÍCULO ORIGINAL

Comparación entre los tipos de proteinuria en una población pediátrica

Factorovich, A.M.

Laboratorio de Química Clínica, Laboratorio Central, Hospital de Niños Dr. Ricardo Gutiérrez. CABA, Argentina.

Contacto: Factorovich A. M.; adrifactor@yahoo.com.ar

RESUMEN

La proteinuria es un dato relevante en el diagnóstico y seguimiento de la enfermedad renal. Las de origen renal pueden ser causadas por defectos a nivel glomerular, tubular, mixtos o mielomatosas. La manera de identificar cada uno de estos perfiles proteicos es por el Uroproteinograma, método cualitativo que permite, mediante una corrida electroforética, separar las proteínas presentes en la orina. Este método puede variar su sensibilidad cambiando los soportes de corrida y los colorantes utilizados. La β_2 microglobulina es una proteína marcadora de daño tubular. Comparar los tipos de proteinuria visualizados en uroproteinogramas, realizados en una población pediátrica, utilizando dos soportes: agarosa con coloración de plata coloidal y dodecilsulfato de sodio-Agarosa coloreado con violeta ácido, y evaluar cuales nos brindan mayor información sobre el daño renal. Evaluar si el dosaje de β_2 microglobulina es un método confirmatorio para la proteinuria de tipo tubular. Se analizaron 38 muestras de orina de 24 hs. sin concentrar, que llegaron durante un año al laboratorio central del Hospital de Niños "Dr. Ricardo Gutiérrez" con pedido de uroproteinograma. Estos se realizaron por una técnica con soporte de dodecilsulfato de sodio-Agarosa coloración violeta ácido y otra con soporte agarosa con coloración de plata coloidal. Para ambos métodos se emplearon kits comerciales. Conjuntamente al uroproteinograma se realizó en 27 de las 38 muestras recibidas, un ensayo de micro partículas, para el dosaje de β_2 microglobulina. Cuando se trabajó con dodecilsulfato de sodio-agarosa se observó un aumento en los patrones fisiológicos, tubulares y mixtos, y una disminución de los patrones glomerulares respecto al otro método. La β_2 microglobulina mostro valores elevados en 12 de las 27 muestras analizadas de las cuales sólo el 67 % se asoció con patrón tubular o mixto cuando se empleó agarosa con coloración de plata. Cuando se utilizó dodecilsulfato de sodio-agarosa el 100 % presentó estos patrones. Un 20 % de las 15 muestras, con valor de β_2 microglobulina dentro del rango de referencia, presentaban proteinuria tubular o mixta cuando se utilizó dodecilsulfato de sodio-agarosa. El dodecilsulfato de sodio-agarosa resultó ser una herramienta fundamental para el diagnóstico de las proteinurias en especial las tubulares, pudiendo diferenciar entre completas e incompletas. El dosaje de β_2 microglobulina no resultó en todos los casos ser un método confirmatorio de la tubulopatía, ya que en un 20 % de los casos se obtuvieron valores normales por presentar tubulopatías incompletas (presencia de α_1 microglobulina).

Palabras clave: uroproteinograma, dodecilsulfato de sodio-agarosa, coloración de plata, β_2 microglobulina.

ABSTRACT

Proteinuria is an important piece of information for the diagnosis and follow up of renal disease. Those ones of renal origin may be caused by defects in glomerular, tubular, mixed and myeloma causes level. How to identify each one of these protein profiles is through the use of urinary protein electrophoresis, a qualitative method which allows, by electrophoretic run, to separate the proteins present in the urine. By changing run supports and the used dyes, sensitivity of this method may be varied. The β_2 microglobulin is a tubular injury marker protein. To compare the types of proteinuria observed in uroproteinogramas performed in a pediatric population, using two different techniques: a) agarose colloidal silver staining and; b) sodium dodecyl sulfate - agarose, and to evaluate which one gives us more information about kidney damage. Evaluate if the measure of β_2 microglobulin, confirm the tubular proteinuria. Thirty-eight samples of 24 hours unconcentrated urine were analyzed, which arrived during one year to the Central Laboratory at Children's Hospital "Dr Ricardo Gutierrez" with order to urinary protein electrophoresis. Those ones were performed by using sodium dodecyl sulfate

agarosa technique and agarose gel with colloidal silver staining. Commercial kits were used for both methods. Along with the urinary protein electrophoresis, a micro particle enzyme immunoassay was performed in 27 of the 38 received samples, for the assay of $\beta 2$ microglobulin. Comparing the two methods, working with sodium dodecyl sulphate agarose, it were observed an increase in physiological, tubular and mixed patterns, and a decrease in glomerular patterns. The $\beta 2$ microglobulin showed elevated values in 12 of the 27 analyzed samples of which, 67 % was only associated with tubular or mixed pattern when using agarose with silver staining. When sodium dodecyl sulfate -agarose was used, 100 % of samples presented these patterns. When using sodium dodecyl sulfate -agarose, 20 % of the 15 samples with normal value of $\beta 2$ microglobulina showed mixed or tubular proteinuria. Sodium dodecyl sulfate -agarose proved to be an essential tool for the diagnosis of proteinurias, specially the tubular ones, allowing to differentiate between completed and incomplete ones. The $\beta 2$ microglobulin assay did not prove in all cases, to be a confirmatory method for the tubulopathy, since normal values were obtained on 20 % of cases due to incomplete tubulopathies (presence of α_1 microglobulin).

Key words: urinary protein electrophoresis, Sodium dodecyl sulfate -agarose colloidal silver staining, $\beta 2$ microglobulin.

ISSN 1515-6761 Ed. Impresa
ISSN 2250-5903 Ed. CD-ROM
Código Bibliográfico: RByPC
Fecha de Recepción:
20/05/2014.
Fecha de Aceptación:
26/05/2014

Introducción

La proteinuria es uno de los datos más relevantes en el diagnóstico y seguimiento de la enfermedad renal. En numerosas ocasiones es un hallazgo de laboratorio de gran utilidad para la intervención médica.

Se la puede clasificar en fisiológica, transitoria, intermitente y persistente. Esta última es la más importante desde el punto de vista clínico. Según su origen pueden ser prerrenales, también llamadas overflow; renales, que pueden ser causadas por defectos a nivel glomerular, tubulares o mixtos, y las postrenales^{1,2,3,4,5}.

Estudios realizados en pediatría muestran que entre el 5 % y el 15 % de la población en edad escolar presenta proteinuria, pero cuando estos niños son estudiados exhaustivamente solo el 0,1 % tiene proteinuria persistente. Una vez confirmada la proteinuria es necesario determinar donde se localiza el daño renal para realizar un adecuado tratamiento^{5,6}.

El uroproteínograma es un método cualitativo que permite, mediante una corrida electroforética, separar las proteínas presentes en la orina. Es una herramienta muy rica en cuanto a la información que ofrece sobre el funcionamiento y posibles lesiones estructurales renales.⁷

Este método puede variar su sensibilidad cambiando los soportes de corrida y/o los colorantes utilizados. Los soportes pueden ser acetato de celulosa, agarosa, agarosa de alta resolución, dodecilsulfato de sodio-Agarosa (SDS-Agarosa), dodecilsulfato de sodio- poliacrilamida (SDS-Page). Este último es utilizado por lo general en investigación y no en laboratorios de diagnóstico y seguimiento.

Los colorantes posibles listados en orden creciente de sensibilidad son: Amido Schwartz, Violeta ácido, Coomassie Blue y coloración con metales pesados como Plata y Oro (Tabla I). Dentro de las técnicas disponibles encontramos una diferencia fundamental en cuanto a la forma de separación de las proteínas que puede ser por su carga eléctrica o por su peso molecular. Si la separación es por peso molecular cada banda corresponde a una única proteína las cuales se ordenan de menor a mayor peso molecular dentro de la

corrida electroforética. Si la separación es por carga eléctrica cada banda esta constituida por un grupo de proteínas, alguna de ellas de origen tubular y otras glomerular. Por este motivo es necesaria una persona entrenada para una correcta interpretación del resultado (Fig. 1).

Las técnicas pueden realizarse en forma manual o automatizada.

La muestra de orina que se utiliza para el Uroproteínograma es de 24 horas ya que la excreción de las diferentes fracciones proteicas no es pareja a lo largo del día, dependiendo esta del ejercicio, ingesta, hidratación, y otras causas^{1,8}.

Según la técnica utilizada y la proteinuria del paciente puede requerirse la concentración previa de la orina. Hay que tener en cuenta que durante este proceso se pueden perder proteínas de bajo peso molecular, lo que llevaría a un resultado erróneo.

Los tipos de proteinuria que se pueden observar en un uroproteínograma son fisiológica, Glomerular, tubular, mixto y mielomatosa.

La proteinuria glomerular de acuerdo a las proteínas presentes, puede clasificarse en tres tipos: alta selectividad,

Tabla I. Variaciones metodológicas del uroproteínograma.

	Con concentración	Sin concentración	
Soporte	Acetato Agarosa Agarosa-HR	Acetato Agarosa Agarosa-HR	SDS-Agarosa
Colorante	Amido S Violeta ácido Coomassie Blue	Ag/Au	Amido S Violeta ácido
Tipo de separación	Carga	Carga	PM

Agarosa-HR, Agarosa de alta resolución; Ag, plata; Au, oro
PM, Peso Molecular; Amido S: Amido Schwartz

selectividad intermedia, y escasa selectividad.

En el caso de proteinurias tubulares las proteínas presentes tienen un peso molecular menor a 65000 daltons. Estas son la β_2 microglobulina, la proteína ligadora de retinol, la lisozima, la α_1 microglobulina. La presencia de cualquiera de éstas marca una proteinuria tubular. Hace unos años se incorporó el concepto de proteinuria tubular incompleta en el cual se encuentran presentes proteínas de peso molecular comprendido entre 30.000 y 65.000 Daltons y proteinuria tubular completa cuando aparecen proteínas de peso molecular comprendido entre 10.000 y 65.000 Dalton⁹.

En la proteinuria mixta se observan proteínas presentes cuando hay daño glomerular y tubular, con posible predominio de unas u otras.

En la proteinuria mielomatosa se observan cadenas livianas monoclonales. Este perfil no se encuentra en la población pediátrica

La β_2 microglobulina es una proteína de bajo peso molecular (11800 daltons) que es utilizada como marcador de proteinuria tubular.

Es inestable a pH menor a 5,5 y temperatura ambiente.¹⁰ Su detección se realiza por técnicas de inmunoensayo.

Los objetivos del presente trabajo fueron: 1) comparar los tipos de proteinuria visualizados en los uroproteíogramas, realizados en una población pediátrica, utilizando dos métodos diferentes: soporte de agarosa con coloración de plata coloidal (agarosa-plata) y dodecil sulfato de sodio-agarosa con coloración de violeta ácido (SDS-agarosa), y evaluar cuales nos brindan mayor información sobre el daño renal.

2) Evaluar si el dosaje de β_2 microglobulina es un método confirmatorio de la proteinuria tubular.

Materiales y métodos

Se analizaron 38 muestras de orina de 24 horas sin concentrar que llegaron al laboratorio central del hospital de niños "Ricardo Gutiérrez" con pedido de uroproteíograma durante un año.

Tabla II. Características comparativas los dos métodos.

CARACTERÍSTICAS	AGAROSA-COLORACION Ag	SDS-AGAROSA
SOPORTE	AGAROSA	SDS-AGAROSA
COLORACION	ARGENTICA	VIOLETA ACIDO
SEPARACION	POR CARGA	POR PM
PROCEDIMIENTO	MANUAL	AUTOMATIZADO

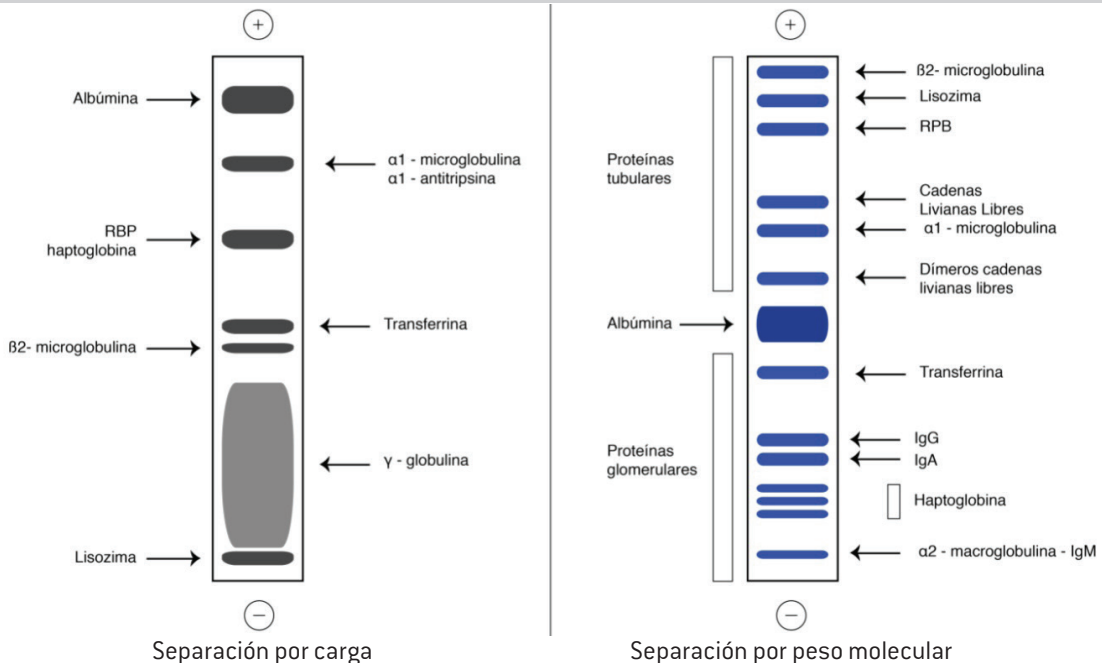
Ag, Plata; SDS, Dodecilsulfato de sodio; PM, Peso Molecular.

Tabla III. Patrones electroforéticos de las 38 muestras procesadas.

	PF	PGAS	PGSI	PGES	PM	PT
COLORACION ARGENTICA	7	16	7	2	4	2
SDS-AGAROSA	10	8	4	1	9	6

SDS Agarosa, Dodecilsulfato de sodio-Agarosa; PF, Proteinuria Fisiologica; PGAS, Proteinuria Glomerular de alta selectividad; PGSI, Proteinuria glomerular de selectividad intermedia; PGES, Proteinuria glomerular de escasa selectividad; PM, Proteinuria Mixta; PT, Proteinuria tubular.

Figura 1. Bandas proteicas según método de separación.



Para dicho análisis se emplearon dos técnicas. Primera técnica: agarosa-plata para la cual se utilizó n kit comercial Titan gel Silver Stain de la línea Helena Laboratorios, que se realizó en forma manual.

Segunda técnica: SDS-agarosa , que se efectuó con un kit comercial Hidragel 5 Proteinurie de la empresa Sebia. El colorante empleado fue violeta ácido; Utilizando un equipo Hydrys Focusing – Sebia en forma semiautomatizada [Tabla II].

El análisis de los resultados fue realizado por el mismo personal idóneo en las dos técnicas.

El dosaje de β_2 microglobulina se realizó en 27 de las 38 muestras recibidas, en un equipo AxSYM System (Abbott) con un kit de enzimoimmunoensayo de micro partículas (MEIA) de la misma empresa.

Resultados

En las 38 muestras procesadas se encontraron patrones electroforéticos correspondientes a proteinurias fisiológicas, glomerulares (alta, media y baja selectividad), tubulares y mixtas.

Al analizar en forma comparativa los patrones electroforéticos hemos visto, en algunos casos, discrepancia entre los métodos utilizados.

Cuando las proteínas fueron separadas según su peso molecular encontramos mayor prevalencia de patrones fisiológicos, tubulares y mixtos y una menor prevalencia de patrones glomerulares [Tabla III y fig. 2].

El dosaje de β_2 microglobulina resulto elevado en 12 (44 %) de las 27 muestras analizadas (Valor de referencia < 157 $\mu\text{g/l}$). De estas 8 (67 %) presentaban patrón tubular o mixto utilizando agarosa – plata, 12 (100 %) presentaban estos patrones usando SDS-agarosa. En las 15 muestras con valores de β_2 microglobulina dentro del rango de referencia el 100% se asoció a proteinuria fisiológica o glomerular con la técnica de agarosa - plata, pero sólo 12 (80 %) se asociaron a estas proteinurias cuando se utilizó SDS-agarosa y 3 (20 %) a proteinuria tubular o mixta [Tabla IV].

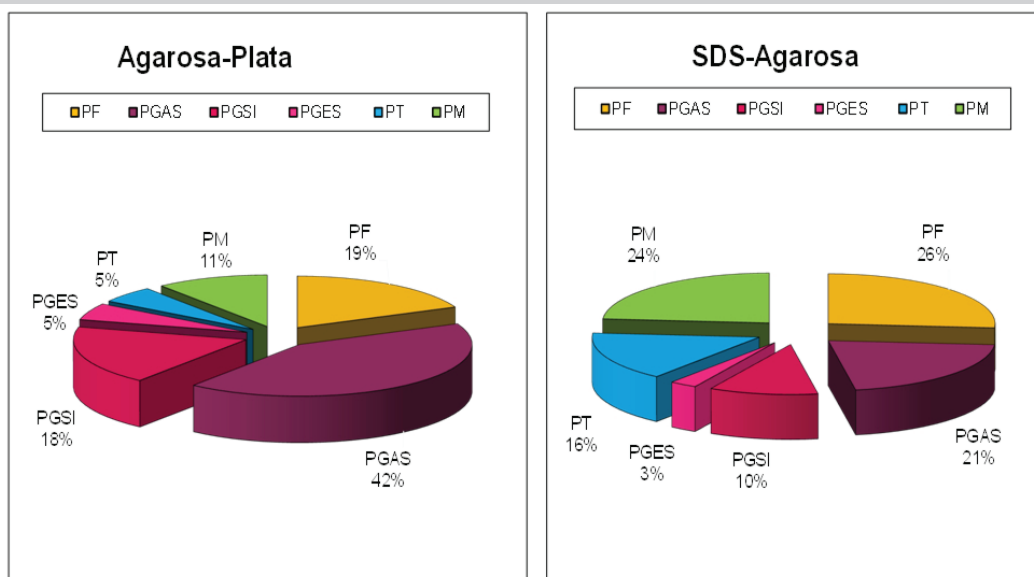
Discusión

La técnica de agarosa con coloración de plata es un proceso manual con un tiempo de coloración según el inserto de alrededor de 3- 5 minutos, hasta la aparición de bandas. Esto conlleva en algunos casos a una sobre coloración que provoca una interpretación errónea de los resultados clasificando como proteinurias glomerulares a proteinurias que son fisiológicas.

Tabla IV. Valoración de β_2 microglobulina.

Tipo de proteinuria	β_2 microglobulina Aumentada n= 12		β_2 microglobulina Normal n=15	
	tubular o mixta	Glomerular o Fisiologica	tubular o mixta	Glomerular o Fisiologica
AGAROSA-PLATA	8 (67%)	4 (33%)	0	15 (100%)
SDS-AGAROSA	12 (100%)	0	3 (20%)	12 (80%)

Figura 2. Resultados.



SDS Agarosa, Dodesilsulfato de sodio-Agarosa; PF, Proteinuria fisiológica; PGAS, Proteinuria glomerular de alta sensibilidad; PGSI, Proteinuria glomerular de sensibilidad intermedia; PGES, Proteinuria glomerular de escasa sensibilidad; PM, Proteinuria mixta; PT, Proteinuria tubular

En esta técnica la proteína marcadora de daño tubular es la β_2 microglobulina y ocasionalmente aparecen la transtiretrina y/o lisozima.

La falta de asociación encontrada entre el dosaje de β_2 microglobulina elevado con proteinuria tubular o mixta con la técnica de agarosa - plata, podría explicarse por la mayor sensibilidad de la técnica inmunológica y/ o por la inestabilidad de la β_2 microglobulina. Por el método MEIA se detectaron valores por encima del rango de referencia, que por su sensibilidad no llegaron a detectarse en la corrida electroforética.¹¹

Utilizando la técnica de SDS-Agarosa se observó un aumento de los perfiles fisiológicos, tubulares y mixtos. El caso de los dos últimos perfiles, podría explicarse por la detección de un mayor número de proteínas de bajo peso molecular (β_2 microglobulina, Proteína ligadora de retinol, Lisozima, α_1 microglobulina y cadenas livianas) cuando se utiliza esta técnica. La presencia de cualquiera de ellas marcaría una proteinuria tubular o mixta.

Otros autores demostraron que a mayor número de proteínas marcadoras de daño tubular se obtiene una mejor clasificación de las proteinurias y si una de las proteínas es la α_1 microglobulina mejoraban mucho los resultados.^{10,12}

Esto justifica los casos en los cuales la β_2 microglobulina mostro valores normales y el patrón electroforético marcó proteinuria tubular utilizando SDS-agarosa.

La disminución del patrón glomerular empleando esta técnica se debe en parte a una reclasificación del perfil a proteinuria fisiológica. Esto se explica por una sobrecoloración utilizando la técnica agarosa-plata.

Por otra parte proteinurias glomerulares se reclasificaron como tubulares y mixtas por la detección de proteínas de bajo peso molecular distintas de la β_2 microglobulina sumadas a la disminución de la coloración de la albumina.

Cuando se utilizó SDS-agarosa un 20 % de los pacientes mostró proteinuria tubular o mixta con valores normales de β_2 microglobulina. Esto se explica por la presencia de otras proteínas de bajo peso molecular.

Al realizar esta técnica visualizamos un número mayor de microproteínas, lo que facilita la clasificación de patrones tubulares y mixtos.

La disposición de las proteínas dentro de la corrida electroforética hace que la interpretación de los resultados sea más sencilla. La automatización la convierte en una técnica fácilmente estandarizable y reproducible.

Por los resultados obtenidos observamos que por esta técnica se tiene una mejor correlación con el daño renal que empleando la técnica de separación por carga eléctrica.

Debemos aclarar que al trabajar con población pediátrica estas muestras están exentas de proteinuria mielomatosa por la cual deberían hacerse trabajos para evaluar la utilidad de la técnica en adultos.

El SDS-agarosa resultó ser una herramienta fundamental para el diagnóstico de las proteinurias en especial de las tubulares, pudiendo diferenciar entre completas e incompletas.

El dosaje de β_2 microglobulina no resultó ser un método

confirmatorio de la tubulopatía, ya que en un 20 % de las muestras obtuvimos valores normales por presentar tubulopatías incompletas (presencia de α_1 microglobulina).

Referencias bibliográficas

1. Alegre J, Alles A, Angerosa M, Bianchi ME, Dorado E, Etchegoyen MC, Fayad A, Greloni G, Inserra F, I Mazziotta D, Pennacchiotti G, Rosa Diez G, Torales S, Torres ML, Varela F, Villagra A. Documento de Consenso, Implicancia de la Proteinuria en el Diagnóstico y Seguimiento de la Enfermedad Renal Crónica. ABA-FBA-CUBRA-SAN30082013.pdf
2. Escalante-Gómez C, Zeledón-Sánchez F, Ulate-Montero G. Proteinuria, fisiología y fisiopatología aplicada. Acta Médica Costarricense.2007;49/2:83-89
3. Le Carrer D y Boucraut J. La orina, electroforesis de proteínas y la inmunofijación: Illustrated Interpretaciones. sebia. En:Hartier Diffusion ed. Paris: LEC,1994
4. Osatinsky R. Proteinuria. Bioquímica y Patología Clínica.1993; 57:25-30
5. Verocay Murell MC, Rebori Gilene A, Velasco Suárez. Significado de la Proteinuria en el niño y adolescente. Arch. med. interna [Montevideo] 2012;34(1):12-16
6. Govantes JM y Sánchez Moreno A. Proteinuria. Asociación Española de Pediatría http://www.aeped.es/sites/default/files/documentos_13-3.pdf
7. Tomlinson PA. Low molecular weight proteins in children with renal disease.. Pediatr Nephrol. 1992; Nov;6(6):565-71.
8. Madalena I, Pandolfo M, Facio ML, Garlatti C, Alejandro M, Bresciani P, Angerosa M, Pizzolato M. Proteinuria: lesión estructural renal y comparación de métodos. Acta Bioquím Clín Latinoam 2013; 47 (1): 85-93
9. Siede WH, Regeniter A. Proteinuria – Diagnóstico e Interpretación Mediante Proteínas Marcadoras. http://www.newscientific.com/wp-content/uploads/2013/11/CCa-ro_Proteinuria_ES_040601.pdf.
10. Tomlinson PA, Dalton RN, Hartley B, Haycock GB, Chantler C. Low molecular weight protein excretion in glomerular disease: a comparative analysis. Pediatr Nephrol. 1997 Jun;11(3):285-90.
11. Facio M, Madalena L, Bresciani P, Pandolfo M, Kairúz A, Alejandro ME, Fraind S, Angerosa M, Pizzolato M. Evaluación del perfil tubular renal mediante electroforesis en gel de poliacrilamida. Acta Bioquím Clín Latinoam 2006; 40 (3): 383-90
12. Madalena L, Facio ML, Bresciani P, Fraind SA, Alejandro ME, Pandolfo M, Angerosa M, Toblli JE, Pizzolato M. Excreción de proteínas de bajo peso molecular en pacientes con proteinuria a cadena liviana como marcadoras de disfunción renal. Acta Bioquím Clín Latinoam 2004; 38 (1): 17-22