

ESTUDI ELECTROFORÈTIC DE LES PROTEÏNÚRIES

Comunicació presentada el dia 16 de març de 1967 per

J. PERMANYER

Cap de Laboratori de la Clínica B (secció de Bioquímica)
de la Facultat de Medicina de la Universitat de Barcelona

i

A. COROMINAS

Cap de departament d'Electroforesi i Immunoelectroforesi de la Clínica
Mèdica B de la Facultat de Medicina de la Universitat de Barcelona

L'aplicació a la clínica de l'anàlisi electroforètica de les proteïnes urinàries és relativament recent. L'electroferograma del sèrum fa temps que s'ha imposat en clínica, sobretot amb les noves tècniques de l'acetat de cel·lulosa per la seva senzillesa tècnica i reproductibilitat. Així, a la Clínica Mèdica B de la Facultat de Barcelona (Professor Dr. M. Soriano) diàriament es fan una mitjana de 15 a 20 electroforesis de sèrum amb tires d'acetat, la qual cosa ha donat lloc a troballes insospitades per a la clínica, tals com: malalts de cirrosi hepàtica, endocarditis maligna lenta, mielomes, macroglobulinèmies, etc., i també últimament hem descobert un cas de bisalbuminèmia de gran interès genètic pel nombre de membres compromesos.

En l'orina, la manca d'una concentració proteica adient fa necessària una preparació prèvia abans de fer el seu dipòsit en la cinta d'acetat. La relativa migrada quantitat de proteïnes de l'orina s'ha de portar a una concentració al voltant d'uns 30 g/l, xifra que permet d'obtenir una imatge bastant completa dels diferents tipus de proteïnes. La recollida de l'orina s'ha de fer mitjançant l'afegit d'una substància conservadora com l'azida de sodi a la proporció del 0,1 g/l, posat ja directament en el flascó col·lector. Altres mitjans preservatius poden ésser un cristall de timol o el mertiolat sòdic.

La tècnica emprada per nosaltres per a obtenir l'electroferograma de les proteïnes urinàries és molt senzilla i suficient per a la clínica.

En l'orina filtrada es dosifica la quantitat de proteïnes per litre. Segons que doni una xifra per sobre o per sota de 4 g/l, la manera d'actuar és diferent. En el primer cas es treballa amb l'orina nativa; en el segon, amb un concentrat de l'orina. Així, doncs, si la quantitat de proteïnes és de 4 o més g/l, no cal fer cap concentració. Directament amb una pipeta de 0,05 cc es posen 3 μ l sobre el cantell d'un porta i es fa una primera empremta sobre la tira d'acetat degudament preparada com és d'habitud. Sobre aquesta es calquen una sobre l'altra les empremtes que calguin per a assolir una quantitat de líquid amb un contingut absolut de proteïnes semblant al que tindria un sèrum d'uns 30 g/l, en el qual cas només fem una empremta de 3 μ l. Així, per exemple, amb una orina amb 6 g/l farem 5 empremtes de 3 μ l cada una. No cal dir que cada empremta

ha d'ésser feta en el lloc precís, car, si no és així, s'obtenen franges poc definides.

En l'altra contingència, quan l'orina té una quantitat inferior a 4 g/l de proteïnes, o com en el cas de la proteïnúria fisiològica, que només és de 20-40 mg/l, cal fer una concentració per a obtenir una orina que contingui les proteïnes necessàries per a fer l'empremta en les condicions assenyalades en el cas anterior. El concentrat d'orina es pot obtenir per diferents mitjans més o menys complicats que necessiten un utilatge especial i que tenen una sèrie de desavantatges per a ésser emprats com a mètode de rutina en un laboratori clínic. Citem, entre d'altres, els mètodes de liofilització, ultrafiltració, diàlisi al buit, diàlisi contra solució macromolecular, evaporació al buit a 37° amb evaporador rotatiu, etc. De tots aquests, els més emprats són l'ultrafiltració i la diàlisi, amb un sac de cel·lulosa que conté l'orina contra polivinilpirrolidona en pols o bé contra una solució macromolecular hipertònica de polietilènglicol al 60 per cent, segons la tècnica de REVILLARD i MANUEL.

Des de fa prop de dos anys nosaltres utilitzem el mètode de MACFARLANE, de tècnica molt senzilla, econòmica i amb molt bona reproductibilitat.

Tallem uns 20 cm d'un tub de diàlisi (*Visking dialysis tubing* núm. 32, de la casa Dade de Miami), i amb un cordill fem un nus en un dels caps. Per l'altre cap introduïm 100 ml d'orina filtrada, i és nuat immediatament. Així tenim llest el sac de diàlisi. En un gran vas de precipitats (de 2 litres de cabuda) hom disposa una capa d'uns tres centímetres de sucre corrent (sacarosa). Sobre aquesta capa de sucre hom col·loca el sac de diàlisi, que acabem d'envoltar amb més sucre. El dispositiu és col·locat a la gelera a +4°, o bé a la temperatura de l'habitació. També hem provat de posarlo a l'estufa a 37°. Aquesta última modalitat sembla ésser la millor, puix que és més ràpida. Passades unes hores (de 4 a 12), segons el grau de concentració que hom desitgi, es treu el sac i es renta la part externa per treure'n les restes de sucre enganxades. Hom recull en un tub l'orina concentrada i mesura el volum; després és centrifugada o filtrada. Amb el sobrenedant o amb el filtrat es fan les empremtes d'acord amb la seva taxa de proteïnes i en la forma abans descrita.

L'economia del mètode és evident, puix que l'utilatge és senzill; el quilogram de sucre, barat, si és comparat amb el preu de la polivinilpirrolidona o del polietilènglicol.

Quant a la reproductibilitat, podem veure amb aquests diagrames electroforètics que corresponen a un sèrum natiu i el mateix sèrum diluït a l'1/400 i concentrat per aquest mètode. Hom pot veure la manca de desnaturalització, així com la perfecta concordança de les franges de l'un i de l'altre. Amb la P.V.P. s'esdevé a vegades el pas d'algunes molècules de

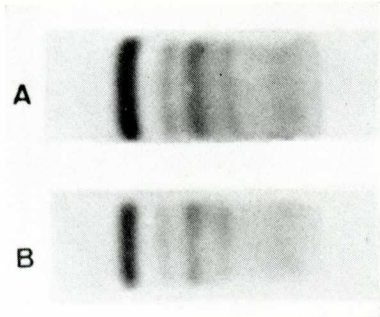


FIG. 1. — Demostració que no es desnaturalitzen les proteïnes en la diàlisi contra la sacarosa. A) Electroforesi del sèrum natiu. B) Electroforesi del mateix sèrum concentrat després d'una dilució a l'1/400 amb aigua destil·lada.

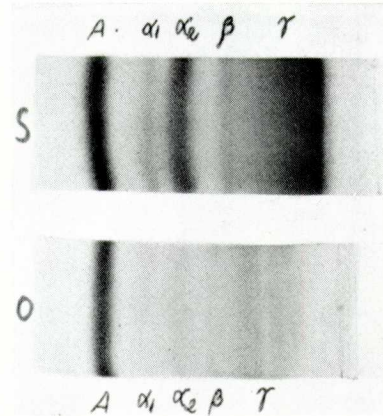


FIG. 2. — Proteïnograma sèric (dalt) i urinari (baix) en un cas de síndrome nefròtica. Proteïnèmia, 52 grams per litre. Proteïnúria, 19 grams per litre. Vegeu la típica imatge de filtració selectiva

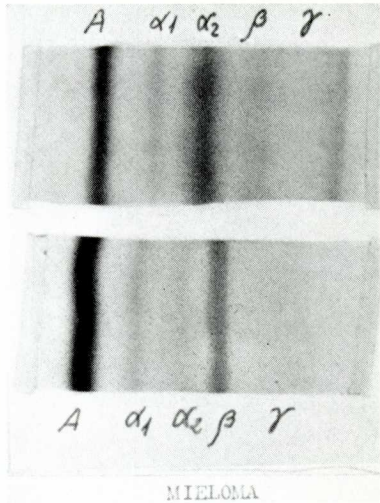


FIG. 3. — Electroforesi de les proteïnes del sèrum (dalt) i de l'orina (baix) en un cas de nefritis lúpica. Proteïnèmia, 60 g. per litre. Proteïnúria, 3,5 g. per litre. Vegeu important augment de globulina alfa 2 i gamma del sèrum. La imatge urinària correspon al tipus de filtració no selectiva.

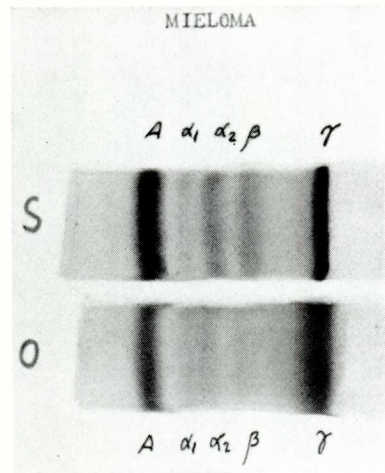


FIG. 4. — Proteïnograma de sèrum i d'orina en un mieloma de globulina gamma.

l'interior del sac de diàlisi, la qual cosa, a més de pertorbar la concentració, dóna lloc a un principi de desnaturalització. L'escola de TRAEGER ha substituït el P.V.P. pel polietilè-glicol.

Abans de tot és bo de recordar que normalment s'eliminen per l'orina de vint-i-quatre hores uns 40 mg de proteïnes, dels quals un 30-40 per cent és albúmina, i un 60-70 per cent són globulines. És per això, doncs, que el mot albúmina és impropï quan hom es refereix a les proteïnes de l'orina. En l'orina i per mitjans immunoquímics i immunoelectroforètics han estat identificats uns 15 components proteics. Gairebé la totalitat tenen llur representant en el sèrum i s'han posat de manifest emprant un immunosèrum antisèrum humà normal. Com a dada curiosa direm que unes proteïnes denominades línies exteriors a les zones α_1 , β i γ que es troben normalment en el sèrum a l'estat de traces i d'habitudo no visibles han estat identificades primer en l'orina creient un temps que eren pròpies d'ella. Hom ha proposat d'anomenar-les «microglobulines sèriques».

Actualment poden demostrar-se en l'orina proteïnes que semblen estar absents en el sèrum. Es tracta dels uromucoides, de la post- α -globulina i de certes proteïnes solubles dels teixits renals i de les vies urinàries.

El conjunt de les proteïnes identificades en l'orina és molt semblant al del liquor. En l'orina s'han trobat totes les proteïnes del sèrum, llevat les Ig M i β -lipoproteïnes de grandària molecular.

Assenyalem com a més fàcilment identificables i més conegudes les següents proteïnes:

- Pre-albúmina i albúmina.
- Zona de la α_1 -globulina: α_1 -lipoproteïna; α_1 -glicoproteïna (inhibidor de la tripsina) serummucoide.
- Zona de la α_2 -globulina: α_2 -globulina ràpida; haptoglobina; ceruloplasmina; α_2 -glicoproteïna.
- Grup de les β -globulines: Siderofilina; hemopexina; β_1 -globulina.
- Grup de les γ -globulines: γ -globulina i post- γ -globulina.

L'estudi experimental de la permeabilitat glomerular en l'home demostra que l'aclariment d'una substància macromolecular en relació amb la creatinina varia en relació inversa del seu pes molecular. El glomèrul en condicions normals fa, doncs, un triatge de les proteïnes segons llur estructura i llur pes molecular, a part d'altres factors encara no ben coneguts. Aquesta filtració va acompanyada d'una reabsorció tubular i fins i tot d'una secreció tubular de proteïnes. En condicions patològiques es troben uns tipus de proteïnúries que l'electroforesi ha individualitzat i que nosaltres podem veure en la tècnica senzilla de l'acetat de cel·lulosa.

Segons l'escola de Lió podem classificar-los de la forma següent:

— *Proteïnúria de filtració selectiva.*

Es presenta principalment en la síndrome nefròtica amb histologia òpticament normal.	{	<p>Predomini d'albumina.</p> <p>$\alpha_1 > \alpha_2 \cdot \alpha_1/\alpha_2$ superior a 1 i fins a 2.</p> <p>Una β molt marcada corresponent a la siderofilina.</p> <p>Poca γ-globulina o no gens.</p>
--	---	--

Recordeu que aquesta imatge és la contraposada com un negatiu de la del sèrum corresponent. Vegeu la figura 2.

— *Proteïnúria no selectiva.*

Es presenta en glomerulonefritis aguda, subaguda o crònica. Síndrome nefròtica de mal pronòstic.	{	<p>Electroferograma semblant al d'un sèrum diluït. Totes les fraccions del sèrum guardant una proporció semblant amb ell. És degut al pas de totes les proteïnes sense distinció del pes molecular, llevat la Ig M i les β-lipoproteïnes que no travessen el filtre glomerular. La relació $\alpha_1/\alpha_2=1$ o inferior com en el sèrum. γ-globulines superior al 10 per cent. Vegeu la figura 3.</p>
--	---	---

— *Proteïnúria tubular.* Així anomenada perquè s'observa en estat de puresa en les tubulopaties congènites de l'infant i tubulopaties de l'adult (Disfunció tubular de Butler i Flyn).

<p>Tubulopaties congènites per dèficit enzimàtic.</p> <p>Acidosi tubular d'Albright.</p> <p>Galactosèmia congènita.</p> <p>Tubulopatia de la malaltia de Wilson.</p> <p>Cistinúria.</p> <p>Malaltia de Hartnup, etc.</p> <p>Insuficiència renal aguda en la fase poliúrica.</p> <p>Proteïnúria en els qui han sofert un empelt de ronyó.</p> <p>Hipertiroïdisme. Alguns mielomes i sobretot en les pielonefritis cròniques.</p>	{	<p>L'albumina representa solament un 30 per cent.</p> <p>Importància de la pre-albumina i de la post-γ-globulina.</p> <p>La fracció globulínica més important és la α_2 (30 %).</p> <p>α_2 i β desdoblades.</p>
---	---	--

Vistos els tipus fonamentals de les proteïnúries patològiques i el de la fisiològica, farem repàs d'algunes de llurs aplicacions clíniques i de llurs possibilitats en el futur.

a) En el curs favorable d'una síndrome nefròsica un tipus de proteïnúria fisiològica, que qualitativament amb l'àcid acètic i calor no apareix, és senyal de guariment o de remissió completa. En canvi, quantitats anormals d'albúmina o de siderofilina en l'uoproteïnograma tradueixen una remissió incompleta. Aquest augment de siderofilina correspon amb una franja de β molt marcada. La importància de la siderofilina com a punt de referència en l'evolució de la síndrome nefròsica fa que alguns autors practiquin en forma senzilla una demostració particular d'aquesta globulina mitjançant unes plaques de gelosa (Immuno-plates) que tenen incorporades l'antisèrum específic contra la serofilina. En un excavat es diposita l'orina i es deixa en cambra humida a 37° . La difusió en sentit radial de l'antigen dóna lloc a la formació d'un precipitat circular el diàmetre del qual està en relació amb la concentració de siderofilina.

Hem dit que el tipus de proteïnúria selectiva es presenta en la síndrome nefròtica; les més selectives corresponen als casos de pronòstic relativament favorable que histològicament donen imatges mínimes. En canvi, quan evoluciona vers la insuficiència renal o apareix en el curs d'una glomerulonefritis subaguda o crònica, la proteïnúria és menys selectiva, i correspon a lesions difuses greus i de tipus proliferatiu. Aquests fets són molt remarcats en la infància i no tant en l'adult. La selectivitat d'una proteïnúria i la seva relació amb les lesions histològiques és d'un gran interès i, segons TRAEGER i col·laboradors, una prova més sensible que la hematúria microscòpica.

b) En una proteïnúria intermitent de poca quantitat i aparentment aïllada, l'estudi de l'uoproteïnograma de l'orina del dia i de la nit (repòs) és particularment útil. Quan els dos uoproteïnogrames són idèntics, això és una prova a favor d'una lesió orgànica. En canvi, si es comprova una proteïnúria fisiològica pura en l'orina de repòs, és una dada a favor del caràcter funcional, ortostàtic de la proteïnúria. Cal advertir que, segons TRAEGER i col·laboradors, bé que el tipus de la proteïnúria fisiològica no ha estat vist en cap nefropatia, és massa aviat per a assegurar que aquest traçat pugui per ell sol afirmar la integritat del ronyó.

c) En el curs d'una gestació serveix per a diferenciar la nefropatia gravídica amb un tipus de proteïnúria selectiva, de la pielonefritis gravídica amb un tipus de proteïnúria poc selectiva i semblant a la proteïnúria tubular de les pielonefritis cròniques. Hi ha una tercera forma semblant a la primera, però que se'n separa per l'augment de la globulina γ . Cal dir, però, que l'estudi de les proteïnúries de l'embaràs és a vegades molt dificultós d'interpretar.

d) La troballa en l'uroproteïnograma d'una disglobulinúria (HAMBURGER) amb una franja de proteïna de Bence-Jones pot ésser el símptoma inicial al descobriment d'un mieloma o d'una paraproteïnèmia. D'altra banda, la confirmació d'una banda anòmala en l'uroproteïnograma trobada abans en el sèrum referma la natura mielomatosa de la malaltia (vegeu figura 4).

BIBLIOGRAFIA

- BUTLER, E. A. i altres. 1962. — «Clin. Chim. Acta.», 7, 34.
 CHARVET, F.; MANUEL, Y. i DELABARRE, E. 1963. — «J. Med. Lyon.», 44-215.
 HERMANN, M. G. i VAUX-SAINT CYR, CH. DE. 1963. — «J. d'Urologie et Nephrologie». 69-53.
 LAROCHE, C. i altres. 1963. — «J. d'Urologie et Nephrologie». 69-41.
 MC. FARLANE, H. 1964. — «Clin. Chim. Acta.», 9-376.
 Mlle. Ch. de VAUX-SAINT CYR i HERMANN, M. G. 1963. — «J. d'Urologie et Nephrologie». 69-49.
 TRAEGER, J.; REVILLARD, J. P. i MANUEL, Y. 1966. — «La Revue du Praticien». 16-4027.
 PERMANYER, J. J.; BONASTRE, R. i COROMINAS, A. 1966. — *Estudio electroforético de las proteinurias*. Comunicació «XIV Jornadas Asociación Nacional Análisis Clínicos» Pamplona, julio 1966.

DISCUSSIÓ

Dr. DOMINGO

El tema, tot i el seu interès clínic, té un abast netament fisiològic i pot ésser considerat una contribució al complicat tema del cicle de les proteïnes.