

UTILIDAD DE LOS METODOS INMUNOQUIMICOS EN EL ESTUDIO DE LA SELECTIVIDAD DE PROTEINAS EN PACIENTES CON SINDROME NEFROTICO

INSTITUTO DE NEFROLOGIA

Dr. Orlando Vega Cruz,* Lic. Eusebio Delgado Pérez,** Dra. Aracelys Mederos Oviedo*** y Dr. Julio C. Más Martín****

Se estudiaron 34 pacientes, 17 niños y 17 adultos, procedentes del Instituto de Nefrologia y de los hospitales pediátricos "William Soler", "Pedro Borrás" y del Hospital Pediátrico de Centro Habana bajo el diagnóstico clínico de síndrome nefrótico. Se realizó en ellos un estudio de la selectividad de las proteínas en orina con diferentes métodos, y sus resultados se relacionaron con los hallazgos anatomo-patológicos. Existió una mayor tendencia a encontrar proteinuria selectiva en los pacientes portadores de cambios mínimos y glomerulosclerosis focal, lo cual fue significativo en el grupo de niños. En la mayoría de los casos, cuando el índice de selectividad fue inferior a 0.25, la respuesta al tratamiento esteroideo resultó positiva. Se infiere que los métodos inmunoquímicos cuantitativos son los más adecuados para el estudio de la selectividad de proteínas en el síndrome nefrótico y de gran utilidad para la clínica.

INTRODUCCION

Para determinar la selectividad de las proteínas en pacientes con síndrome nefrótico, se han utilizado diferentes métodos como: tamizaje 1.2

* Especialista de II Grado en Laboratorio Clínico. Jefe del Laboratorio Clínico. Instituto de Nefrologia.

** Licenciado en Ciencias Biológicas. Investigador Aspirante. Laboratorio Clínico. Instituto de Nefrologia.

*** Especialista de I Grado en Laboratorio Clínico. Laboratorio Clínico. Hospital "Joaquín Albarrán".

**** Especialista en Patología Clínica. Profesor Titular. Hospital "Joaquín Albarrán".

molecular,³⁻⁵ métodos inmunoquímicos (inmunodifusión radial y doble inmunodifusión), además las técnicas de electroforesis de alta resolución en geles de agarosa y poliacrilamida.⁶ Con estos métodos se designa la proteinuria como altamente selectiva, en los casos en que son filtradas en exceso las moléculas pequeñas, y pobemente selectiva en los casos en que escapan las moléculas de gran tamaño.

Clinicamente, reviste mayor interés el estudio de los aclaramientos relativos de proteínas diferenciales, puesto que se ha comprobado que en los pacientes que presentan proteinuria de naturaleza existe una mayor probabilidad de que respondan positivamente al tratamiento esteroideo mientras que, en la no selectiva, es casi siempre inútil dicho procedimiento terapéutico, por lo que es de gran interés su caracterización, aplicando los métodos más adecuados para determinar el tipo de tratamiento a imponer.

El objetivo de nuestro trabajo fue determinar la utilidad de los métodos inmunoquímicos para el diagnóstico de la proteinuria selectiva en pacientes con síndrome nefrótico.

MATERIAL Y METODO

Se estudiaron 34 pacientes con síndrome nefrótico, 17 adultos procedentes de la consulta externa y salas del Instituto de Nefrología y 17 niños provenientes de los hospitales pediátricos "William Soler", "Pedro Borrás" y Pediátrico de Centro Habana.

La extracción de la sangre se realizó por punción venosa después de 8 horas de ayuno y se tomó una muestra de orina por micción espontánea.

Para la determinación de las proteínas totales en suero se utilizó el método del Biuret.⁷ La determinación de proteínas totales en orina se realizó inicialmente como método de orientación del ácido sulfosalicílico al 20 % y para la cuantificación, el método del Biurét.⁷

La electroforesis en suero y orina se realizó por el método de Wybenga et al.⁸

Se empleó el método de doble inmunodifusión (Ouchterlony),⁹ para la determinación cualitativa de las diferentes proteínas en la orina.

La determinación cuantitativa de las proteínas en suero y orina se realizó por inmunodifusión radial.¹⁰ Para el suero se utilizaron placas Tri y M Partigen del Instituto Behring. En el caso de la orina se usaron placas M y Tri Partigen cuando la concentración de las proteínas totales estuvo por encima de 1 g/L y placas L Partigen cuando la concentración fue inferior a ésta. En cada placa se utilizó el patrón comercial recomendado al respecto.¹¹

La concentración de las muestras fue determinada mediante la recta de regresión hallada a partir de las concentraciones de los patrones.

Para hallar el índice de selectividad nos basamos en los criterios de Cameron y Blandford.³

Se tomó el criterio de que la proteinuria era altamente selectiva cuando el índice de selectividad era menor que 0.15, moderadamente selectiva cuando estaba entre 0.15 y 0.25 y no selectiva cuando estaba por encima de 0.25.¹²

Se hizo un análisis de regresión estadística con el fin de determinar si existía asociación lineal alguna entre los diferentes índices de selectividad.

Se revisaron las historias clínicas de adultos y niños con el propósito de obtener los diagnósticos clínicos y anatomo-patológicos para relacionarlos con nuestros resultados.

RESULTADOS Y DISCUSION

La figura 1 muestra la relación entre el índice de selectividad inmunoglobulina G/transferrina [I(IgG/T)] y la respuesta al tratamiento esteroideo, tanto en niños como en adultos.

De los 17 niños estudiados, 11 respondieron al tratamiento y en 6 no se obtuvo respuesta, para el 64,2 y el 35,8 % respectivamente.

Del total de 11 con buena respuesta, 9 poseían un I(IgG/T) inferior a 0,15; 1 entre 0,15 y 0,25 y el otro por encima de 0,25.

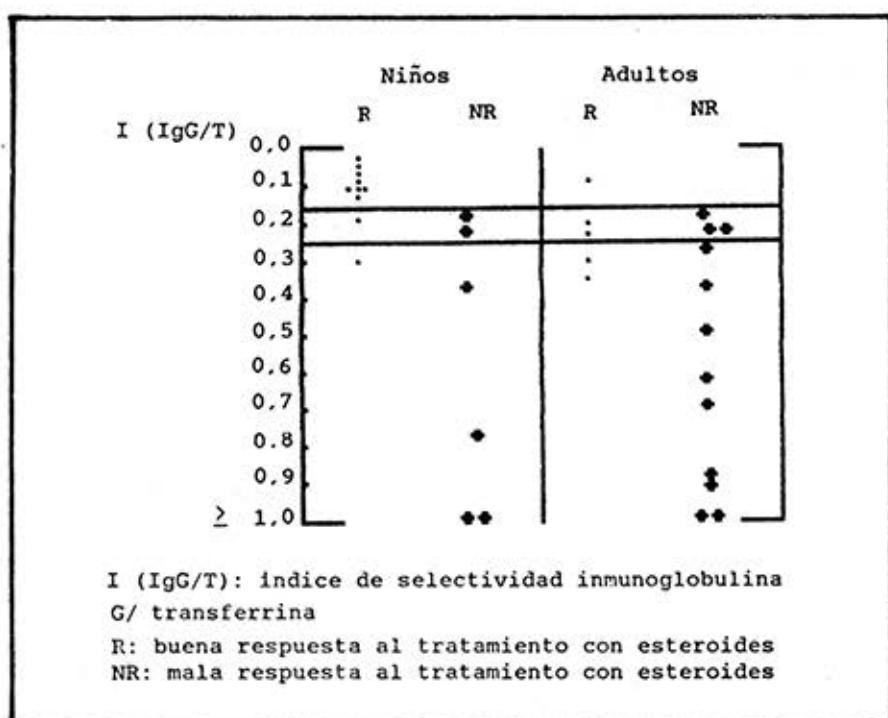


FIGURA 1. Relación entre la selectividad y la respuesta a los esteroides.

Entre los niños que no respondieron al tratamiento esteroideo: 2 presentaron un I(IgG/T) entre 0.15 y 0.25 y el resto superior a 0.25.

En el caso de los adultos, existió un comportamiento diferente. De los 17 casos estudiados, 5 respondieron al tratamiento esteroideo (29.41 %) y 12 no respondieron a dicho tratamiento, para el 70.59 %.

De los 5 con buena respuesta, sólo 1 presentó un I(IgG/T) por debajo de 0.15, 2 pacientes de 0.15 a 0.25 y los 2 restantes, por encima de 0.25.

De los 12 pacientes que no tuvieron respuesta al tratamiento esteroideo, 3 tuvieron un I(IgG/T) entre 0.15 y 0.25 y el resto por encima de 0.25.

De acuerdo con nuestros resultados, la mayor incidencia de proteinuria selectiva correspondió al grupo de niños estudiados, lo que concuerda con los resultados obtenidos por otros investigadores.^{3,13} Esto se debe a que, en los niños, el patrón histico más frecuente es el daño mínimo,^{14,15} mientras que en los adultos hay una mayor tendencia a presentar una lesión glomerular mayor, debido a que, con el transcurso de la enfermedad, según se ha reportado,¹⁶ disminuye el grado de selectividad.

Cuando el I(IgG/T) fue inferior a 0.25, obtuvimos una mayor respuesta al tratamiento esteroideo en ambos grupos, pero con una mayor tendencia en el grupo de niños. Esto pone de manifiesto que, con un I(IgG/T) inferior a 0.25 el tratamiento esteroideo es generalmente efectivo.

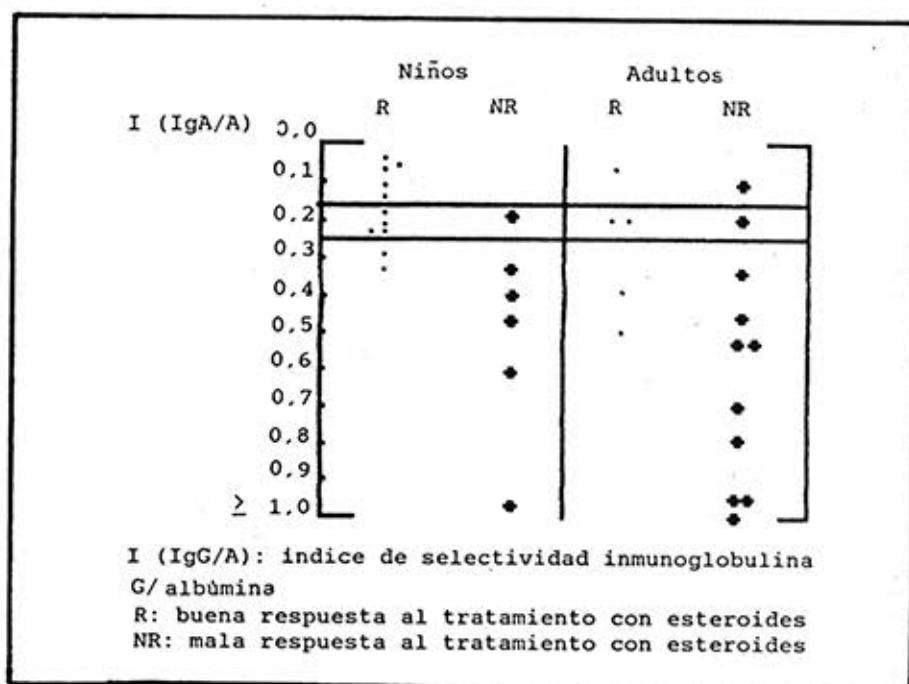


FIGURA 2. Relación entre la selectividad y la respuesta a los esteroides.

La figura 2 señala la relación entre el índice de selectividad inmuno-globulina G/álbumina [I(IgG/A)] y la respuesta al tratamiento esteroideo, tanto en niños como en adultos.

De los 11 niños que respondieron, 5 tuvieron un I(IgG/A) inferior a 0.15; 4 entre 0.15 y 0.25 y 2, superior a 0.25.

De los pacientes que no tuvieron respuesta, sólo 1 presentó un I(IgG/A) entre 0.15 y 0.25, el resto excedió a 0.25.

Los adultos presentaron, del total de pacientes con respuesta, sólo 1 con un I(IgG/A) inferior a 0.15; 2 con este indicador entre 0.15 y 0.25 y los otros 2, superior a 0.25.

Del total de los que no tuvieron respuesta, 1 presentó un I(IgG/A) por debajo de 0.15, otro entre 0.15 y 0.25 y los 9 restantes, por encima de 0.25.

Los resultados hallados con el I(IgG/A) son similares a los encontrados con el I(IgG/T), como lo señalan ambos gráficos, por lo que ambos índices son adecuados para el estudio de la selectividad de las proteínas en la orina.

La figura 3 muestra la correlación entre el I(IgG/T) y el I(IgG/A), donde el coeficiente de correlación fue de 0.73 para una $p < 0.001$, lo que demuestra que existe una correlación lineal entre ambos índices.

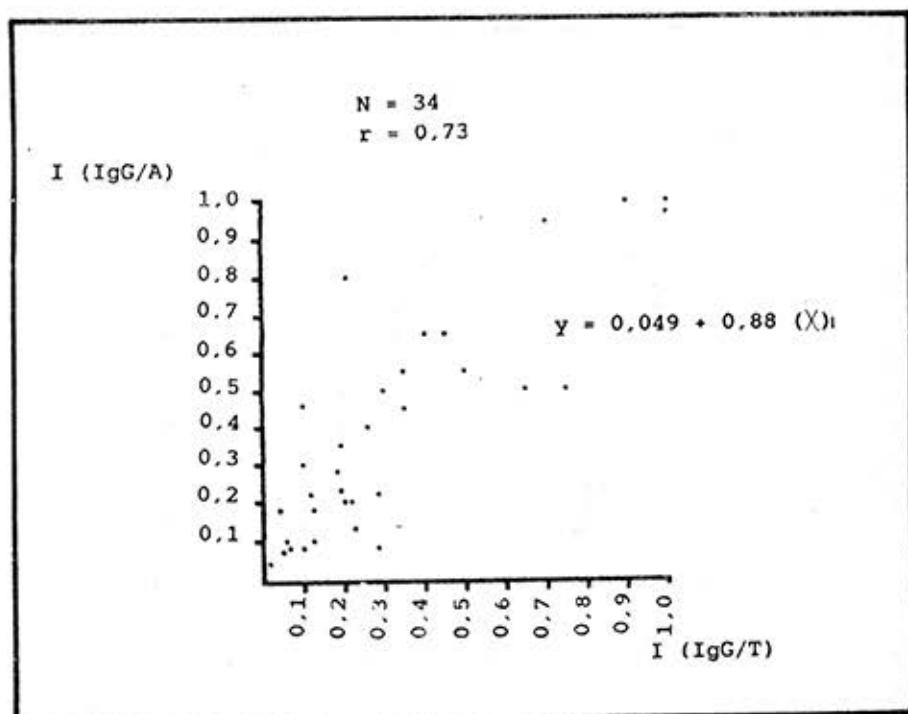


FIGURA 3. Correlación entre el índice de selectividad I(IgG/T) y el índice de selectividad I(IgG/A).

La figura 4 muestra la correlación determinada entre el índice de selectividad obtenido a partir de la electroforesis de proteínas Gamma G/albumina y el I(IgG/T).

La figura 5 señala la correlación entre el índice Gamma G/albumina y el I(IgG/A). En ambos gráficos se pone de manifiesto la no existencia de correlación lineal alguna entre los índices de selectividad obtenidos por métodos inmunoquímicos y electroforéticos, lo que demuestra que el método de electroforesis convencional no es adecuado para el estudio de la selectividad de las proteínas en el síndrome nefrótico. Salabarria obtuvo resultados similares al compararlos con el método de tamizaje molecular.¹⁷

La figura 6 presenta la distribución del I(IgG/T) según el diagnóstico anatomo-patológico. Del total de 34 pacientes estudiados, 13 presentaron, en el estudio histológico, cambios mínimos (38.24 %); 9 pacientes fueron clasificados como glomerulosclerosis focal y otros 9, como glomerulonefritis proliferativa mesangial (26.47 % en ambos casos); 2 pacientes clasificados como nefritis lúpica (5.88 %) y 1 paciente con síndrome nefrótico postrasplante renal (2.94 %).

Dentro de los pacientes con cambios mínimos, 7 presentaron un I(IgG/T) inferior a 0.15; 3 pacientes entre 0.15 y 0.25 y los 4 restantes, superior a 0.25.

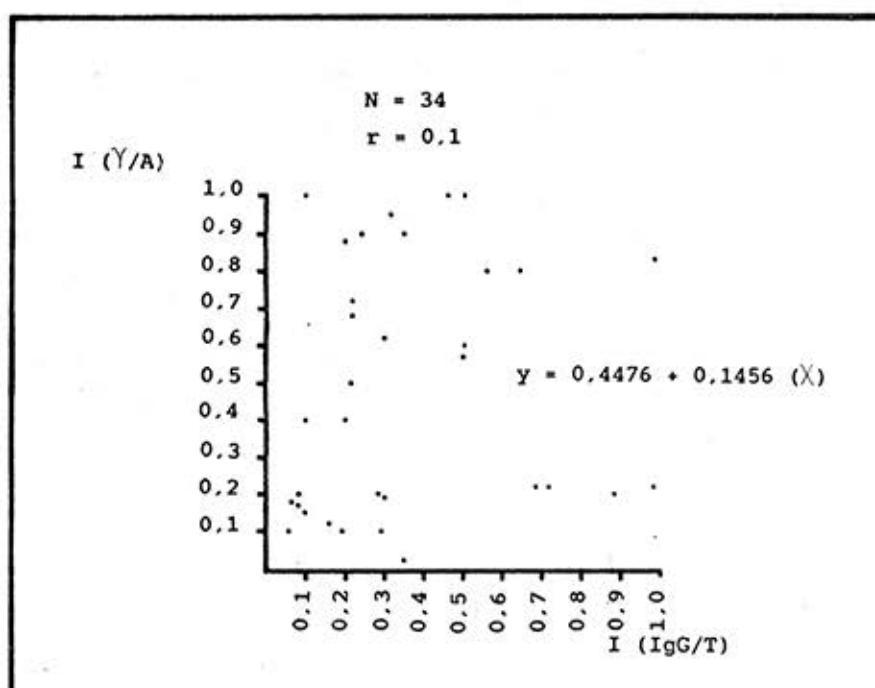


FIGURA 4. Correlación entre el índice de selectividad I(IgG/T) y el índice de selectividad I(Y/A).

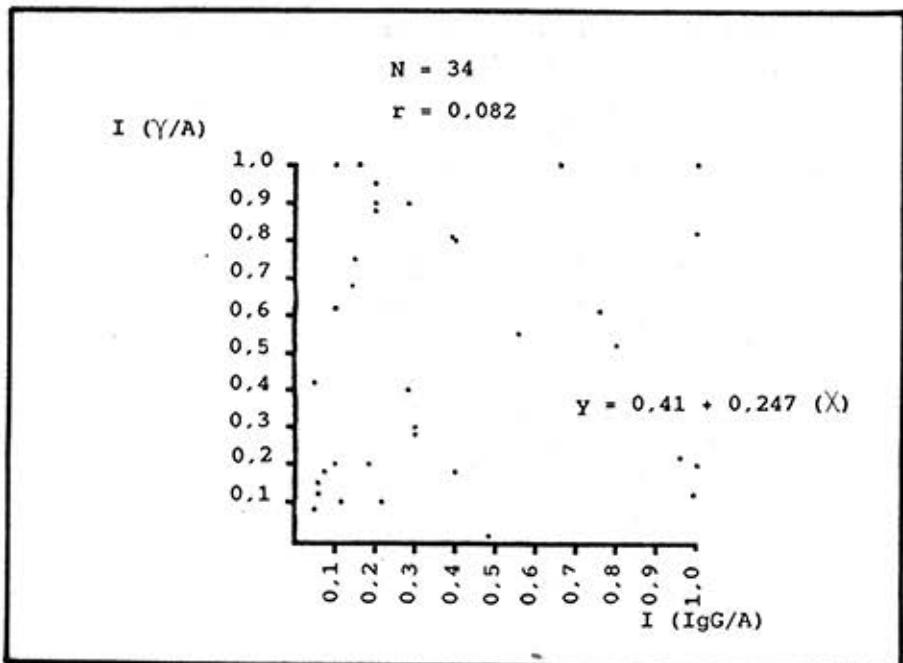


FIGURA 5. Correlación entre el índice de selectividad I(IgG/A) y el índice de selectividad I(γ /A). Además se incluye en la figura 1 paciente con síndrome nefrótico postrasplante renal.

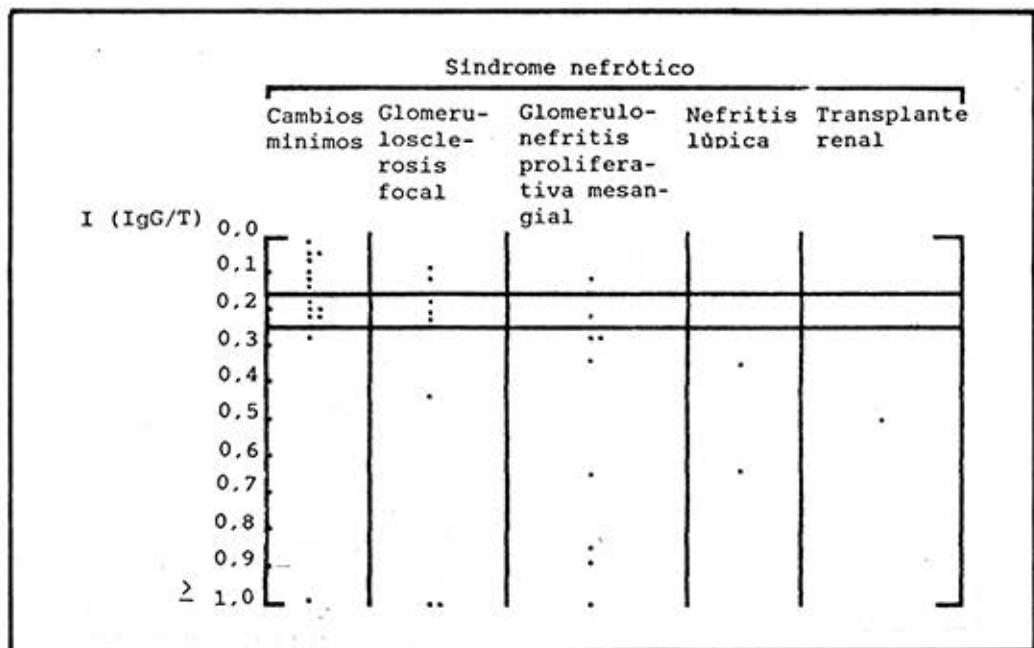


FIGURA 6. Distribución del índice de selectividad según el diagnóstico anatomo-patológico.

En el caso de la glomerulonefritis proliferativa mesangial, un paciente presentó un I(IgG/T) por debajo de 0.15; otro entre 0.15 y 0.25 y los 7 restantes, por encima de 0.25.

En la figura 6 se puede observar que la mayor cantidad de proteinuria selectiva se encuentra en el cambio mínimo y en la glomerulosclerosis focal, mientras que en la glomerulonefritis proliferativa mesangial, la nefritis lúpica y el síndrome nefrótico postrasplante renal, la tendencia ^{18,19} fue a no ser selectiva.

El anexo muestra la relación entre los índices de selectividad obtenidos por el método de inmunodifusión radial y la detección cualitativa de proteínas en la orina (doble inmunodifusión).

En el primer grupo de pacientes estudiados, distribuidos según la clasificación anatomo-patológica, con cambios mínimos, de 13 sujetos, 2 presentaron proteínas en la orina hasta una masa molecular relativa (MMR) de 160 000 y 1 sólo proteinuria de hasta 185 000 de MMR.

En el segundo grupo, con glomerulosclerosis focal, 2 pacientes presentaron proteinuria hasta una MMR de 160 000 y los 7 restantes hasta una MMR de 185 000.

En el tercer grupo, con glomerulonefritis proliferativa mesangial, 4 pacientes presentaron proteínas en orina hasta una MMR de 185 000 y 5 una MMR de 800 000.

Tanto en el grupo de nefritis lúpica como en el del síndrome nefrótico postrasplante renal se encontraron proteínas hasta una MMR de 185 000.

De estos resultados podemos inferir que, a medida que aumenta el daño glomerular, se encuentran proteínas de mayor masa molecular relativa en la orina de los pacientes afectados y se llegan a detectar proteínas como la alfa 2 macroglobulina de MMR de 800 000 en algunos pacientes con glomerulonefritis proliferativa mesangial. Este método es útil, pues nos puede orientar de forma cualitativa hacia la comprensión del grado de selectividad y por ende del grado de daño glomerular que puede presentar un paciente.

CONCLUSIONES

1. De los grupos estudiados, correspondió al de los niños la mayor incidencia de proteinuria selectiva, mientras que en los adultos, la tendencia fue de presentar proteinuria no selectiva.
2. El patrón histológico más frecuente en los niños fue el daño mínimo. Los adultos, por lo general, presentaron lesiones glomerulares mayores.
3. Cuando el índice de selectividad fue inferior a 0.25, tanto el I(IgG/T) como el I(IgG/A), detectamos una mejor respuesta al tratamiento esteroideo, con una mayor tendencia a la respuesta positiva en el caso de los niños.
4. Existe una correlación lineal entre los I(IgG/T) e I(IgG/A), por lo que ambos índices son adecuados para el estudio de la selectividad. El

- I(IgG/T) es el mejor índice de selectividad, porque tiene una mayor correlación con la respuesta al tratamiento.
5. No existe correlación alguna entre la selectividad hallada por métodos inmunoquímicos y la selectividad determinada por la electroforesis de proteínas en acetato de celulosa, por lo que este último método no es adecuado para este fin.
 6. El método de doble inmunodifusión orientó de forma cualitativa a la comprensión del grado de selectividad de la proteinuria estudiada.
 7. El método inmunoquímico cuantitativo (inmunodifusión radial), es el más adecuado para el estudio de la proteinuria selectiva en pacientes con síndrome nefrótico, por su gran utilidad para la clínica.

ANEXO. Relación entre los índices de selectividad I(IgG/T) e I/IgG/A) y la determinación cualitativa de las proteínas en orina (método de doble inmunodifusión) según la clasificación histológica

No.	I(IgG/T)	I(IgG/A)	Cambios mínimos						BIC	2M
			ALB	Transf	HAP	IgG	CER			
1	1.0	0.28	+	+	+	+	+	+	+	+
2	0.14	0.11	+	+		+	+			
3	0.05	0.1	+	+	+	+	+	+		
4	0.06	0.16	+	+	+	+	+			
5	0.1	0.48	+	+	+	+	+	+		
6	0.03	0.05	+	+	+	+	+	+		
7	0.045	0.084	+	+	+	+	+	+		
8	0.23	0.37	+	+	+	+	+	+		
9	0.1	0.08	+	+	+	+	+			
10	0.17	0.27	+	+	+	+	+	+		
11	0.13	0.22	+	+	+	+	+	+		
12	0.13	0.18	+	+	+	+	+	+		
13	0.29	0.07	+	+	+	+	+	+		
Glomerulosclerosis focal										
14	0.18	0.34	+	+	+	+	+	+	+	
15	0.76	0.49	+	+	+	+	+	+	+	
16	1.0	1.0	+	+	+	+	+	+	+	
17	0.42	0.66	+	+	+	+	+	+	+	
18	0.1	0.3	+	+	+	+	+	+	+	
19	0.13	0.23	+	+	+	+	+	+	+	
20	0.22	0.28	+	+	+	+	+	+	+	
21	1.0	0.89	+	+	+	+	+	+	+	
22	0.2	0.24	+	+	+	+	+	+	+	

(Continúa)

(Continuación)

Glomerulonefritis proliferativa mesangial								
23	0.29	0.69	+	+	+	+	+	+
24	0.30	0.50	+	+	+	+	+	+
25	0.35	0.30	+	+	+	+	+	+
26	0.68	0.35	+	+	+	+	+	+
27	0.87	0.23	+	+	+	+	+	+
28	0.90	0.73	+	+	+	+	+	+
29	1.00	0.89	+	+	+	+	+	+
30	0.14	0.18	+	+	+	+	+	+
31	0.20	0.20	+	+	+	+	+	+
Nefritis lúpica								
32	0.38	0.55	+	+	+	+	+	+
33	0.66	0.54	+	+	+	+	+	+
Trasplante renal								
34	0.50	0.55	+	+	+	+	+	+

Leyenda: ALB: albúmina 66.000. Transf: transferrina 90.000. HAP: haptoglobina 100.000. IgG: inmunoglobulina G 156.000. CER: ceruloplasmina 160.000. B1C: B1 del complemento 185.000. α 2M: macroglobulina 800.000.

SUMMARY

This paper deals with the study of 34 patients, 17 children and 17 adults, coming from the Institute of Nephrology and "William Soler" and "Pedro Borrás" Pediatric Hospitals, and Centro Habana Pediatric Hospital, with clinical diagnosis of nephrotic syndrome. A study of selectivity of proteins in urine was performed by different methods, and results obtained were related to anatopathological findings. There was a higher tendency to find selective proteinuria in patients carriers of minimum changes and focal glomerulosclerosis, which was significant in the group of children. In most of the cases, when selectiveness index was lower than 0.25, positive response to treatment with steroids was obtained. It is inferred that quantitative immunochemical methods are the most adequate ones for the study of selectivity of proteins in nephrotic syndrome and of great usefulness for clinics.

RESUME

On a étudié 34 malades (17 enfants et 17 adultes) provenant de l'Institut de Néphrologie et des hôpitaux pédiatriques "William Soler", "Pedro Borrás" et de l'Hôpital Pédiatrique de Centro Habana, avec le diagnostic clinique de syndrome néphrotique. On a réalisé une étude de la sélectivité des protéines dans l'urine suivant différentes méthodes et on a établi le rapport entre les résultats et les trouvailles anatopathologiques. Il a été constaté une tendance plus marquée à la protéinurie sélective chez les sujets porteurs de changements minimaux et de glomérulosclérose focale, ce qui a été significatif parmi les enfants. Dans la plupart des cas, quand l'indice de sélectivité a été inférieur à 0.25 la réponse au traitement par

stéroïdes a été positive. On infère donc que les méthodes immunochimiques quantitatives sont les plus adéquates pour l'étude de la sélectivité de protéines dans le syndrome néphrotique et d'une grande utilité pour la clinique.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. HARDWICKE, J. A.: Estimation of renal permeability to protein on Sephadex G 200. *Clin Chem Acta* 12:89, 1965.
2. MAC LEAN, P. R.; J. S. ROBSON: Simple method for determining selectivity of proteinuria. *Lancet* 1: 539, 1967.
3. CAMERON, J. S.; G. BLANDFORD: The simple assessment of selectivity in heavy proteinuria. *Lancet* 2: 242, 1966.
4. GELL, P. G. H.: The estimation of the individual human serum proteins by an immunological method. *J Clin Pathol* 10: 67, 1957.
5. MAC LEAN, P. R.; J. J. B. PETRIE: A comparison of gel filtration and immunodiffusion in the determination of selectivity of proteinuria. *Clin Chem Acta* 14: 367, 1966.
6. HAMBURGER, J. ET AL.: *Nefrologia*. Vol. 1. Barcelona, Ed. Toray 1982, p. 164.
7. DOUMAS, B. T.: Standards for total serum protein assays. A collaborative study. *Clin Chem* 21: 1159, 1975.
8. WYBENGA, D. R.: *Electroforesis*. En: Henry, R. J.; D. C. Cannon (Eds.) 2da ed. Barcelona, Ed. Jims, 1980, p. 95.
9. GRAS, J.: *Proteínas Plasmáticas*. 3ra. ed. Barcelona, Ed. Jims, 1967, p. 54.
10. MANCINI, G. ET AL.: Immunochemical quantitation of antigens of single radial immunodiffusion. *Immunochem* 2:235, 1965.
11. Manuales de instrucción del Instituto Behring para inmunoplacas Tri. M y L Partigen. West. Germany.
12. BLACK, D.; N. F. JONES: *Enfermedades Renales*. Barcelona, Ed. Espax, 1981, p. 432.
13. CAMERON, J. S. ET AL.: Selectivity of proteinuria in children with nephrotic syndrome. *Lancet* 1: 463, 1965.
14. BLAINEY, J. D. ET AL.: The nephrotic syndrome. Diagnosis by renal biopsy and biochemical analyses related to the response to steroid therapy. *Quart J Med* 29: 235, 1960.
15. MCENERY, P. T.; C. F. SSTRIFE: *Síndrome Nefrótico en la niñez*. *Clin Pediatr North Am* 4: 851, 1982.
16. MILLS, R. J. ET AL.: Significance of variation in selectivity of proteinuria. *Lancet* 1: 373, 1973.
17. SALABARRIA, J. R.: Selectividad de la proteinuria en el síndrome nefrótico. Tesis para optar por el título de especialista en Laboratorio Clínico. Instituto de Nefrología. Ciudad de La Habana, 1974.
18. ADENIYII, H. ET AL.: Selectivity of proteinuria and response to prednisolone and immunosuppressive drugs in children with malarial nephrosis. *Lancet* 1: 644, 1970.
19. DRUMMON, D. I.: Proteinuria. *Clin Med North Am*: enero, 1971.

Recibido: 5 de enero de 1988. Aprobado: 3 de marzo de 1988.

Dr. Orlando Vega Cruz. Instituto de Nefrología. Ave 26 y Boyeros, Ciudad de La Habana, Cuba.