

## Tesis de Posgrado

# Estudio de proteínas urinarias

Zelaya, Margarita Susana

1964

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Químicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

**Cita tipo APA:**

Zelaya, Margarita Susana. (1964). Estudio de proteínas urinarias. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_1239\\_Zelaya.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1239_Zelaya.pdf)

**Cita tipo Chicago:**

Zelaya, Margarita Susana. "Estudio de proteínas urinarias". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1964.

[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_1239\\_Zelaya.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1239_Zelaya.pdf)

1.239  
1239

UNIVERSIDAD NACIONAL DE BUENOS AIRES

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

ESTUDIO DE PROTEINAS URINARIAS

1239

Tesis para optar al título de Doctor en Química

presentada por

Margarita Susana Zelaya

Año 1964

UNIVERSIDAD NACIONAL DE BUENOS AIRES

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

1239

**ESTUDIO DE PROTEINAS URINARIAS**

**RESUMEN de tesis para optar al título de Doctor en Química  
presentada por**

**Margarita Susana Zelaya**

**Año 1964**

El trabajo consta de tres partes, precedido de una introducción sobre los objetivos del mismo, en la que se destaca la necesidad de la aplicación de la electroforesis e inmunolectroforesis en líquidos biológicos, particularmente en el estudio de las fracciones proteicas urinarias.

#### **PARTE I - ESTUDIO ELECTROFORETICO E INMUNOELECTROFORETICO DE LAS FRACCIONES DE LAS PROTEINURIAS.**

- A) Consta de una introducción donde se mencionan los trabajos de diversos autores sobre las distintas fracciones de las proteinurias.**
- B) Se describen las fracciones proteicas del plasma humano normal.**
- C) Se hace una descripción del principio y de la técnica usada para el análisis electroforético e inmunolectroforético de las proteínas urinarias en medio gelificado; la obtención del agar en medio tamporado; la preparación de las placas de agar sobre portaobjetos; el desarrollo electroforético; la precipitación específica; la fijación, lavado, desecado y coloración de las placas.**

#### **PARTE II - VALORACION DE PROTIDOS URINARIOS.**

- D) Consta de una introducción donde se transcribe parte del artículo de Miatello N.R. sobre el examen de la orina con un cuadro sinóptico que resume las proteinurias más comunes.**
- E) Se mencionan los métodos propuestos por varios autores para la valoración de los protidos totales en orinas: Método gravimétrico de Folin y Denis; método volumétrico de Esbach; método volumétrico de Shevsky-Stafford; método titrimétrico de Peters y Van Slyke; método colorimétrico de Hiller, McIntosh y Van Slyke; método nefelométrico de Kingsbury y método de los patrones permanentes de perspax.**

### PARTE III - PARTE EXPERIMENTAL.

#### F) Electroforesis e inmunoelectroforesis de proteínas urinarias.

Se describe el material y los métodos utilizados para la aplicación de esta técnica.

a) Se obtienen concentrados proteicos urinarios en 8 á 10 horas utilizando tubos de diálisis (Visking Dialysis Tubing 1/4" de diámetro ) rodeados de Polivinil Pirrolidona o Carbowax 20M. La concentración proteica obtenida es de 4 á 6 gramos por cien ml. de orina.

b) Se preparan los portaobjetos de vidrio ( 7,8 por 2,8 cm.) cuidadosamente lavados; sobre los que se extienden 1 ml. de agar al 0,5 % que se deja secar en estufa entre 80 y 90 °C.; esto permite que el agar tamponado se adhiera mejor a las placas

Agar tamponado: veronal sódico 9 g.

ácido clorhídrico 0,1 N 65 ml.

azida sódica 0,5 g.

agua destilada hasta 1 litro.

Para el uso se diluyen 50 ml. de buffer con 50 ml. de agua adicionados de 1,5 g. de agar purificado.

Se vierten tres ml. de agar tamponado en cada portaobjetos y una vez frío se practican mediante un sacabocados, dos excavaciones en la masa de agar, colocados aproximadamente en la parte media entre los extremos anódico y catódico de la placa y en línea perpendicular a los bordes laterales.

Luego se efectúa una incisión de 1 mm. en la parte media y a lo largo de la placa, paralelamente al sentido del desplazamiento electroforético, sin levantar el agar.

c) Se procede al sembrado de la placa colocando en la excavación superior de 1 á 5 ul. de suero humano normal y en la inferior

1 á 5 ul. de orina concentrada.

d) Se efectúa el desarrollo electroforético: la solución tampón colocada en las cubetas es de ph. 8,2 .Condiciones de trabajos: 4 mA.; 6 V. por cada portaobjetos; temperatura del laboratorio tiempo de migración 3 á 4 horas.

e) Se fijan las fracciones colocando las placas en ácido acético al 2 % durante 3 á 4 horas.

Se desecan, recubriendo las placas con papel cromatográfico de grano fino y colocándolas en estufa a 37 °C. durante 24 horas.

Se lavan con agua y se colocan en solución colorante durante 3 horas (amidoschwaetz 10 B), lavándose en líquido de lavado durante 2 horas y secando en estufa a 37 °C. 24 horas.

f) Una vez practicada la electroforesis se procede a la siembra del antisuero en la incisión efectuada previamente al desarrollo electroforético. Se colocan las placas en cámara húmeda durante 12 horas, tiempo en que se produce el desarrollo de las reacciones antígeno-anticuerpo. Se sumergen las placas en solución fisiológica durante 3 días siguiendo la misma técnica que para la electroforesis simple.

**g) Interpretación de los resultados del análisis electroforético e inmunoelectroforético de concentrados proteicos urinarios.**

Se efectúa el fraccionamiento paralelo por electroforesis en placa de agar de las proteínas del suero humano normal y de los concentrados proteicos urinarios, observando identidad en el comportamiento electroforético (migran en posiciones idénticas).

Se encuentran en la orina, la albúmina y las globulinas alfa, beta y gamma del suero, siendo la primera la más frecuente, siguiéndole la fracción beta y por último la gamma.

El fraccionamiento inmunoelectroforético paralelo de las proteínas del suero y de los concentrados proteicos urinarios revelan la iden-

tividad inmunológica de las fracciones proteicas del suero y de la orina.

Se visualizan por inmunolectroforesis de los concentrados proteicos urinarios, fraccionamientos globulínicos que no se observan en el fraccionamiento electroforético, tal es el caso de la globulina gamma. Se acompañan veintinueve ampliaciones fotográficas de los resultados obtenidos sobre las placas de agar.

#### H) Valoración de prótidos totales en orina. Ensayo comparativo de diversos métodos.

SE compararon algunos métodos sencillos de valoración de prótidos urinarios con el método de Kjeldahl. Para ello se construyó un tubo de centrifuga especial, diseñado por Mc Kay.

Se determinó por triplicado el contenido de proteínas de sueros humanos por el método de Kjeldahl, utilizando luego dicho suero para determinar el factor de cada uno de los tubos mencionados.

Se consideró la cifra 7,3 como factor para los cuatro tubos usados.

Se realizaron determinaciones comparativas de proteínas de diversas orinas con las siguientes técnicas:

- a) Método volumétrico de Shevsky-Stafford con el reactivo de Tsuchiya.
- b) Método volumétrico de Shevsky-Stafford con el reactivo de Esbach.
- c) Método volumétrico de Esbach con el tubo de Aufrecht.
- d) Método nefelométrico de la formazina.

Se aconseja por su rapidez y exactitud el método de Shevsky-Stafford con el reactivo de Tsuchiya, observando ciertas precauciones que los autores recomiendan.

El método de la formazina si bien acusa resultados satisfactorios tiene el inconveniente de que los tubos testigos son de dificultosa preparación y de vida precaria.

**I) Estudio estadístico.**

**PARTE IV - CONCLUSIONES Y BIBLIOGRAFIA.**

-----



Quiero expresar mi agradecimiento a las personas que han permitido llevar a término este trabajo:

Al Dr. Ventura Morera con quien lo inicié.

Al Dr. Carlos E. Cardini que ha tomado a su cargo la revisión del mismo y muy especialmente al Dr. Juan M. Castagnino cuyo asesoramiento me brindó la posibilidad de efectuarlo.

## INDICE

|   |      |    |
|---|------|----|
| INTRODUCCION  |      |    |
| OBJETIVOS DEL PRESENTE TRABAJO.....   | pág. | 1  |
| I - ESTUDIO ELECTROFORETICO E INMUNOELECTROFORETICO<br>DE LAS FRACCIONES DE LAS PROTEINURIAS  |      |    |
| A) Introducci3n.....  | "    | 2  |
| B) Las fracciones proteicas del plasma humano normal..  | "    | 3  |
| C) Inmunoelectroforesis de prote3nas urinarias.....   | "    | 10 |
| II - VALORACION DE PROTIDOS URINARIOS   |      |    |
| D) Introducci3n.....  | "    | 13 |
| E) M3todos propuestos por varios autores para la valora-<br>ci3n de pr3tidos totales en orina.....  | "    | 15 |
| III - PARTE EXPERIMENTAL  |      |    |
| F) Electroforesis e inmunoelectroforesis de prote3nas uri-<br>narias.....   | "    | 21 |
| G) Interpretaci3n de los resultados del an3lisis electrofo-<br>r3tico e inmunoelectrofor3tico de concentrados protei-<br>cos urinarios..... | "    | 55 |
| H) Valoraci3n de pr3tidos totales en orina. Ensayo compa-<br>rativo de diversos m3todos.....  | "    | 57 |
| I) Estudio estad3stico.....   | "    | 60 |
| IV - CONCLUSIONES.....  | "    | 63 |
| BIBLIOGRAFIA.....   | "    | 65 |

## INTRODUCCION

### OBJETIVOS DEL PRESENTE TRABAJO

#### I

##### Electroforesis e inmunolectroforesis de proteínas urinarias.

Debido a la extensión que ha alcanzado en los últimos años la aplicación de la electroforesis e inmunolectroforesis al ensayo de los líquidos biológicos, y dada la importancia que las variaciones cualitativas y cuantitativas de los componentes proteicos tienen en el curso de algunas enfermedades como la nefritis, nefrosis, y otras, hemos creído de interés hacer un estudio de las fracciones proteicas urinarias utilizando esta técnica. El análisis inmunolectroferético de concentrados proteicos urinarios tiene un especial valor diagnóstico, pues, los resultados obtenidos son de mayor especificidad que los que ofrecen otras técnicas de diagnóstico clínico.

#### II

##### Valoración de proteínas urinarias.

En las determinaciones corrientes de proteínas urinarias, se tropieza en los laboratorios comunes de análisis clínicos con algunos inconvenientes.

El método más corrientemente usado consiste en tratar la orina con el reactivo de Esbach (1) o alguna de sus modificaciones y centrifugar en un tubo graduado (Aufrecht). Los tubos de centrifuga usados comunmente tienen grandes errores de graduación en el extremo inferior (que suele ser redondo en lugar de afilado) e introducen errores concomitantes en la estimación de las proteínas, que son especialmente importantes en casos de orinas con pequeñas cantidades de proteínas.

Con el objeto de salvar esta dificultad y seleccionar un método más exacto y de una sencillez igual o menor que el precitado, realizamos diversos ensayos como resultado de los cuales se aconseja el método que emplea el reactivo de Tsuchiya (2) utilizando tubos de centrifuga especiales diseñados por Mac Kay (2) y propuestos para este método por Shevsky y Stafford (2).

## I

ESTUDIO ELECTROFORETICO E INMUNO-ELECTROFORETICODE LAS FRACCIONES DE LAS PROTEINURIASA - INTRODUCCION

En la orina normal se encuentran proteínas que provienen del suero o del tracto urinario. Varios autores han utilizado la electroforesis libre para estudiar la naturaleza de estas proteínas utilizando orina concentrada por ultrafiltración. Para esos autores la excreción de proteínas por la orina normal es del orden de los 40 mg. por día.

Según Rigas y Heller (3) los constituyentes proteicos de la orina normal tienen una movilidad electroforética del mismo orden que las del suero.

En la orina normal están presentes las proteínas del suero en mínimas cantidades excepto las de alto peso molecular:  $\alpha_2$  lipoproteína,  $\alpha_2$  M globulina y  $\gamma_1$  M globulina que están ausentes. Por inmunolectroforesis de concentrados proteicos urinarios normales se ha demostrado la presencia de esas proteínas con las excepciones mencionadas.

Las primeras electroforesis sobre papel, realizadas por Slater y Kunkel (4) han demostrado que las eliminaciones patológicas repiten todas las fracciones electroforéticas del suero.

Grant (5) en sus trabajos ha demostrado que algunas fracciones del suero no son eliminadas por la orina. Por otra parte, Heremans estudiando la proteína de Tamm y Norsfall (6), llamada orosomucoide por Boyce, Garvey y Norfleet (7), ha puesto en evidencia proteínas de la orina que no se encuentran en el suero. Patte (8) ha estudiado la composición cualitativa de las proteinurias normales y patológicas, lo mismo que Heremans (9) que ha completado este estudio con el del orosomucoide, tres mucopolisacáridos ácidos y un mucopolisacárido neutro y Hartman (10) ha estudiado la proteinuria lordótica. Otros autores, después de haber enumerado las proteínas de la orina del niño normal, demostraron las variaciones que esos componentes proteicos tienen con la edad y las afecciones patológicas.

## B - LAS FRACCIONES PROTEICAS DEL PLASMA HUMANO NORMAL

### Grupo P

A este grupo corresponde una línea de precipitación fina y curvada, electroforéticamente más rápida que la sero-albúmina. La proteína P<sub>1</sub> o prealbúmina se ha aislado del líquido céfallo-raquídeo donde se encuentra en mayor proporción que en el suero. Su constante de sedimentación es 4,2 S, su peso molecular 61.000; contiene 1,1% de glúcidos y es relativamente rica en tirosina, sobre todo en triptofano. Su rol fisiológico es desconocido.

Se encuentra también en esta zona, por lo menos en algunos casos, el trazo de precipitación casi rectilíneo de una lipoproteína rápida, designada con el nombre de P<sub>2</sub>.

### SEROALBUMINA

La banda de precipitación específica de la seroalbúmina es generalmente la primera en aparecer. Su trazo es bien marcado, curvado y se extiende hacia las  $\alpha$  - globulinas. Su peso molecular es de 69.000, y la constante de sedimentación es de 4,5 S. Su heterogeneidad en lo que concierne a los grupos sulfhidrilos libres (se sabe que solamente 7 moléculas, sobre 10 de seroalbúmina tienen un grupo SH libre) no influye sobre la actividad inmunoquímica. Igualmente, el dímero mercurial de la seroalbúmina tiene las mismas propiedades inmunoquímicas que la proteína nativa.

El análisis inmunolectroforético ha sido un medio de estudio de los determinantes antígenicos de la sero-albúmina. En efecto, una hidrólisis enzimática permite separar tres determinantes antígenicos que tienen una movilidad electroforética ligeramente diferente y a cada uno de ellos corresponde un anticuerpo precipitante, dando tres líneas de precipitación distintas.

### $\alpha_0$ - GLOBULINAS

La principal de estas proteínas da un arco de precipitación alargado y fino prácticamente incluido en el de la sero-albúmina. Ha sido llamado seromucoide ácido e identificado como el orosomucoide. Es la sustancia principal contenida en el filtrado tricloracético del suero humano. Tiene una constante de sedimentación 2,9 S y peso molecular estimado en 44.000. El orosomucoide es rico en grupos ácidos (punto isoeléctrico 2,7) y tiene un elevado tenor en glúcidos (17% de hexosas, 10% de hexosamina, 10% de ácido siálico).

Su movilidad electroforética es según Grabar(11) ligeramente mayor que

(22)

la sero-albúmina: pero Schultze y colaboradores la consideran como de movilidad  $\alpha_1$

### $\alpha_1$ - GLOBULINAS

La principal de las  $\alpha_1$  - globulinas da un arco de precipitación neto; es una glicoproteína bien conocida de peso molecular 54.000 y constante de sedimentación de 3,5 S, Contiene 15% de glúcidos de los cuales 6,8% son hexosas. Esta proteína es fuertemente antigénica y se la ha llamado  $\alpha_1$  A-globulina.

En este mismo grupo se nota la presencia de otros trazos de precipitación; uno de ellos se inscribe exactamente dentro de la curvatura de la  $\alpha_1$  A y se ha llamado a esta proteína  $\alpha_1$  B. Por último, se encuentra una proteína más lenta llamada  $\alpha_1$  C.

### $\alpha_2$ - GLOBULINAS

En esta zona muy compleja, existen por lo menos cuatro proteínas cuyos trazos de precipitación son casi paralelos y se pueden definir por su posición con respecto a la excavación donde se ha depositado el inmunosuero utilizado.

- 1) La haptoglobina da un trazo de precipitación fino y neto, de curvatura bien marcada y se encuentra más próximo a la excavación del inmunosuero. Muchos procedimientos permiten la caracterización de esta línea de precipitación.
  - a) La adición de hemoglobina al suero en estudio produce una disminución en la movilidad de la haptoglobina; el complejo haptoglobina-hemoglobina migra con velocidad intermedia entre la haptoglobina y la hemoglobina (que tiene la movilidad de una  $\beta_1$  - globulina).
  - b) La misma adición de hemoglobina da a la línea de precipitación del complejo haptoglobina-hemoglobina, propiedades peroxidásicas. Los reactivos peroxidásicos colorean esta línea y únicamente a ella.
  - c) La absorción del inmunosuero por el suero de cordón deja subsistir los anticuerpos contra una sola  $\alpha_2$  globulina: la haptoglobina.

La haptoglobina es una glicoproteína que contiene 11,3% de hexosas y 5,7% de hexosamina. Puede existir en varias formas en el plasma: al estado de monómero, haptoglobina II, de peso molecular 85.000 se une a la hemoglobina en proporciones equimoleculares como un dímero, haptoglobina I, con un peso molecular de 169.000 donde cada molécula se une a dos de hemoglobina y aún las dos formas pueden coexistir en los sujetos heterocigotas. Estas diferen

cias son constitucionales como lo demuestran los trabajos de Smithies (12).

Este autor, mediante la electroforesis en gel de almidón, ha demostrado que las haptoglobinas tienen un comportamiento diferente según su tipo: la haptoglobina monómera o Hp 1-1 dá una sola banda de movilidad rápida; la haptoglobina dímica o Hp 2-2 provoca la formación de tres a seis bandas más lentas.

El sistema haptoglobina tendrá entonces la siguiente nomenclatura:

|        | Genotipos  |
|--------|------------|
| Hp 1-1 | Hp 1/ Hp 1 |
| Hp 2-1 | Hp 2/ Hp 1 |
| Hp 2-2 | Hp 2/ Hp 2 |

Los genes serían autosómicos, con dominancia incompleta. Posteriormente Smithies (12) llega a la conclusión de que existiría una parte de la molécula común a los tres tipos y que la acción de los genes modificaría algunos elementos estructurales, dando lugar a la mayor o menor polimerización de este componente fundamental. Estos resultados son de gran interés no sólo para la comprensión de todos los fenómenos ligados con la tipología sérica individual, sino también en el estudio de los mecanismos de acción de los genes sobre la síntesis de proteínas.

Los estudios paralelos sobre la actividad inmunoquímica y la movilidad en agar han demostrado que la haptoglobina y el complejo haptoglobina - hemoglobina tienen la misma actividad inmunoquímica que los anticuerpos anti-haptoglobina.

Las diferencias de movilidad electroforética en agar de las haptoglobinas y de los complejos haptoglobina-hemoglobina han sido observados por algunos autores: por una parte después de la electroforesis simple en agar de diversos sueros humanos adicionados de hemoglobina, las placas fueron coloreadas por el reactivo bencidina-agua oxigenada; los trazos obtenidos en la zona  $\alpha_2$  son de movilidad variable de un suero a otro. Por otra parte, por revelación de sueros humanos por un inmunosuero absorbido por el suero de cordón (y no conteniendo más que los anticuerpos contra la haptoglobina y las  $\beta_2$ -globulinas) la única línea de precipitación que se forma tiene una movilidad diferente de un suero a otro.

Según Grabar (11) la movilidad de la haptoglobina depende de ciertas condiciones experimentales variando de acuerdo al agar utilizado.

2) La cervloplasma dá un trazo de precipitación situado generalmente entre la haptoglobina y la  $\alpha_2$  macroglobulina. Es una cuproproteína descubierta por Holmberg y Laurell que tiene un color azul característico en solución concentra

da. Contiene ocho átomos de cobre por molécula; su constante de sedimentación es de 7,1 S, su peso molecular 150.000 y su tenor en glúcidos 9,5%. Sus dos propiedades, riqueza en cobre y actividad oxidásica han sido utilizadas por Uriel para poner en evidencia la ceruloplasmina tanto en el análisis inmuno-electroforético como en la electroforesis simple en agar.

Uriel(23) ha observado que la purificación de la proteína puede entrañar su desnaturalización parcial y modificar su movilidad electroforética, su actividad inmunológica y sobre todo, su poder enzimático.

3) La  $\alpha_2$  macroglobulina se revela por un trazo rápido, denso y fuertemente curvado y tiene un extremo alargado hacia el reservorio de los anticuerpos. Esta proteína es uno de los constituyentes de alto peso molecular del suero, pues su constante de sedimentación es de 20 S y su peso molecular es de 900.000. Es una glicoproteína que contiene 9% de glúcidos, 3,1% de acetilhexosamina y 1,8% de ácido sialico. Es cuantitativamente un componente muy importante pues representa el 2% de las proteínas del suero. Su rol fisiológico es desconocido.

4) Encontramos en esta zona una lipoproteína lenta y otros trazos de precipitación no identificados.

### $\beta_1$ - GLOBULINAS

Hay aparentemente tres  $\beta_1$ -globulinas importantes. Una de ellas, bien conocida es la siderofilina o transferrina, aislada por Koechlin y caracterizada por su capacidad de transportar el hierro en el plasma. La siderofilina es la más lenta de las  $\beta_1$ -globulinas; constituye el 3-5% de las proteínas totales. Tiene un peso molecular de 88.000 y una constante de sedimentación estimada entre 5,5 S a 6,1 S. Contiene 4% de glúcidos. Transporta dos átomos de hierro por molécula.

Diversos autores han estudiado las características y funciones de esta globulina y descrito la existencia de tipos distintos de transferrinas controladas genéticamente.

Es posible que las variaciones de hierro sérico y de siderofilina sean independientes. Grabar ha notado el aspecto normal de la línea de precipitación de la siderofilina en el caso donde el hierro sérico es muy bajo. La capacidad total de fijación del hierro varía poco en los estados patológicos.

Hay otros constituyentes importantes en las  $\beta_1$ -globulinas. Sus características han sido descritas de manera variable. En los primeros trabajos se ha individualizado después de la siderofilina, dos  $\beta_1$ -globulinas de movilidad casi idéntica y cuyas líneas de precipitación se cruzan suavemente. Una ligera-



mente más rápida que la otra ha sido denominada  $\beta_1A$ -globulina, que ha señalado la importancia de sus variaciones cuantitativas en el lupus erimatoso agudo diseminado. La otra proteína ha sido llamado  $\beta_1B$ -globulina.

(24)  
Müller-Eberhard observó que una de las líneas de precipitación de las  $\beta$ -globulinas tiene una movilidad variable según el caso: si el suero es fresco, esta línea, de curvatura marcada, es un poco más lenta que la siderofilina. En los sueros viejos existe una curva más rápida y mucho más próxima al reservorio de anticuerpos. Después de una conservación de algunos días se encuentra una línea de dos curvaturas, la lenta y la rápida, prueba que esos diferentes aspectos son de un mismo constituyente. El hecho es que las proteínas correspondientes a esas dos curvaturas no serían inmunológicamente idénticas pues la curva rápida toca la curva lenta pero es pasada por ella. El antígeno lento sería más completo que el antígeno rápido. Müller-Eberhard (24) ha llamado:  $\beta_1C$ -globulina a la proteína lenta y  $\beta_1A$  la proteína rápida. Ha podido aislar cada una de ellas, probar su naturaleza euglobulínica, determinar sus constantes de sedimentación (9,5S para el compuesto lento, 7S para el rápido) y valorar su tenor en glúcidos (4% para las dos).

Así, podemos afirmar que existen en el suero una  $\beta_1$ -euglobulina de movilidad variable según las circunstancias experimentales, muy sensible al envejecimiento y a la acción del calor.

Es evidente que el nombre de  $\beta_1A$ -globulina es imperfecto puesto que no es la más rápida de las  $\beta_1$ -globulinas al menos en el suero fresco, que no ha sufrido calentamiento. Si bien no podemos dar a esta proteína alguna otra denominación basada sobre la movilidad electroforética, no hay que desconocer los diferentes aspectos de la línea de precipitación de esta proteína y por lo tanto, se denomina a la de curvatura lenta  $\beta_1A$  variedad AC; la de curvatura rápida: A', y la que aún puede aparecer más rápida: A''

En cuanto a la  $\beta_1B$ -globulina, es una pseudo-globulina, probablemente una muco-proteína. Se encuentran también en la zona  $\beta_1$  otros trazos de precipitación actualmente sin identificar.

Recientemente se han localizado en las  $\beta_1$ -globulinas algunas actividades fisiológicas. Son las del plasminógeno y la plasmina.

## $\gamma$ -GLOBULINAS

1) La primera conocida de las  $\gamma$ -globulinas y la más importante, ha sido llamada  $\gamma_1A$ -globulina. da un trazo de precipitación alargado, casi rectilíneo. Ha sido aislada por Heremans (25) que ha establecido sus principales características físico-químicas: glicoproteína (10% de glúcidos) constante de sedimentación

7 S, peso molecular 160.000.

El rol fisiopatológico de la  $\gamma_1$ A-globulina es poco conocido. Se tiende a colocar esta proteína en el grupo de las inmuno-globulinas, es decir, globulinas de rol inmunitario. La  $\gamma_1$ A-globulina es una de las proteínas que, en casos patológicos, sufre más fluctuaciones cuantitativas en uno y otro sentido. Su concentración en el plasma está sujeta a grandes variaciones según la edad.

2) Se encuentra un trazo que parte del reservorio de anticuerpos y se extiende a lo largo de la zona electroforética  $\beta$ , formando una doble curvatura. Es el de la  $\gamma_1$ M-globulina constituida por una glico-proteína (9,8% de glúcido) de constante de sedimentación 19 - 20 S y peso molecular alrededor de 1 millón.

Diferentes autores afirman la existencia de un determinante antigénico común a la  $\gamma_1$ M-globulina y a las  $\gamma$ -globulinas: si bien cada una de estas proteínas tiene uno o varios determinantes antigénicos, un inmunosuero absorbido por las  $\gamma$ -globulinas precipita con la  $\gamma_1$ M-globulina e inversamente.

El rol fisiopatológico de la  $\gamma_1$ M-globulina comienza a ser conocido. Se ha probado en efecto que algunas isohemoaglutininas y que el factor reumático tienen las propiedades inmunoquímicas de la  $\gamma_1$ M-globulina. Se puede admitir actualmente que la  $\gamma_1$ M-globulina comprende toda una variedad de anticuerpos, probablemente aquellos que tienen una constante de sedimentación de 19-20S. Toda la familia de las  $\beta$ 2-macroglobulinas tiene una estructura inmunoquímica de base, pero se diferencian por sus propiedades fisiológicas. Esta familia de proteínas puede ser colocada al igual que las  $\gamma$ -globulinas, en el grupo de las inmunoglobulinas.

3) Existen normalmente otras  $\gamma$ -globulinas; hay un trazo de precipitación paralelo al de la  $\gamma_1$ A-globulina, pero menos extendido hacia el depósito de siembra: este trazo de precipitación es encontrado frecuentemente. Con un inmunosuero especial (suero de mulo, inmunizado con suero humano normal) se pueden encontrar en la zona  $\gamma$ , tres líneas de precipitación casi paralelas a las de la  $\gamma_1$ A y  $\gamma_1$ M-globulinas. Este constituyente está netamente aumentado en ciertos estados patológicos. Se lo designa con el nombre de  $\gamma_{ss}$ -globulina.

El análisis inmuno-electroforético revela una línea de precipitación muy alargada que no solamente ocupa la zona electroforética  $\gamma$  sino, que atraviesa la zona  $\beta$  para llegar a la de las  $\alpha$ 2-globulinas. Esta línea es muy neta y casi derecha, en su porción lenta. En esta porción, se debilita y se aleja del depósito de anticuerpos. Las proteínas que dan esta línea de precipitación tienen la misma estructura antigénica. Las  $\gamma_{ss}$ -globulinas representan actualmente el ejemplo mejor conocido de una familia de proteínas con la misma estructura inmunoquímica de base, pero que se diferencian por sus características físico-

químicas y sus propiedades fisiológicas.

El carácter único de la línea de precipitación de las  $\gamma$  ss-globulinas ha sido largo tiempo tenido por verdadero y constante, salvo en aquellos casos donde un exceso considerable de antígeno o sobre todo de anticuerpos provoca su división secundaria.

Hitzig y Scheidegger han encontrado que en los sueros de recién nacidos aparecen dos líneas de precipitación de  $\gamma$  ss-globulinas y en sueros de enfermos con afecciones que interesan los órganos hemato-poyéticos.

Las  $\gamma$  ss-globulinas tienen un peso molecular de alrededor de 160.000 y una constante de sedimentación de 7 S. Contienen 2,5% de glúcidos.

Un rol fisiológico de las  $\gamma$  ss-globulinas es bien conocido pues están dentro de esta fracción la mayor parte de los anticuerpos. Es difícil asegurar que todas las  $\gamma$  ss-globulinas del suero normal sean anticuerpos: pero en algunos sueros patológicos, hipergamaglobulinemias, se encuentra un aumento de anticuerpos circulantes, por lo menos aquellos que se pueden determinar por los métodos inmunológicos habituales.

## C - INMUNO-ELECTROFORESIS DE PROTEINAS URINARIAS

### Principio:

Las reacciones inmunoquímicas con los productos previamente separados por electroforesis, han sido utilizados por diversos autores que utilizaban una separación electroforética sobre papel o almidón seguida del análisis inmunoquímico en un gel.

Grabar y Burtin (11) han llamado análisis inmuno-electroforético al método que efectúa las dos operaciones: separación electroforética y análisis inmunoquímico en el mismo medio: gel de agar tamponado.

Se efectúa la separación electroforética de los constituyentes proteicos en gel de agar en veronal/veronal sódico como regulador y luego se procede a la difusión lateral en el mismo medio de un inmuno suero precipitante específico de los componentes de la mezcla en estudio.

Los anticuerpos precipitantes de un inmuno suero se unen con los constituyentes antigénicos de la mezcla en estudio formando en el gel de agar, arcos de precipitación específica. Cada antígeno reacciona separadamente con su anticuerpo homólogo dando un arco independiente. Este método permite enumerar los constituyentes antigénicos de una mezcla y definirlos por su movilidad y por su reacción específica con los anticuerpos homólogos.

El análisis inmuno-electroforético, permite utilizar pequeñas cantidades de muestras, del orden de 1 a 5  $\mu\text{l}$  la reacción de precipitación es específica: cada antígeno reacciona solamente con el anticuerpo correspondiente y los compuestos de una mezcla son definidos por su movilidad electroforética y su especificidad antigénica.

Esta técnica permite comprobar las características de homogeneidad de una proteína, determinar un número mínimo de integrantes de la mezcla proteica y confirmar si una determinada proteína es distinta, igual o tiene una cierta relación inmunológica con otra.

### La electroforesis y la inmuno-electroforesis en medio gelificado

El empleo de un medio gelificado tiene la ventaja de que su elevado tenor en líquido (98-99%) permite una electroforesis análoga a la que se obtendría en medio líquido, mientras que su estructura modera la libre difusión de sustancias durante y después de la electroforesis.

#### a) Preparación del agar en medio tamponado

Si no es posible obtener agar muy puro, se pesan 30 gr. de agar comercial de buena calidad y se funde en 400 ml. de agua destilada neutra. Una vez fundido, se vuelca sobre un mármol y se cortan cubos de 1 cm. de lado que se lavan durante tres días con agua destilada neutra, que se cambia dos veces por día. Se vuelve a fundir en baño maría y se conserva en heladera, determinando previamente su extracto seco para conocer la concentración en agar.

Con este producto se prepara una solución de agar al 2,5% en agua destilada neutra, adicionada de un volumen igual de una solución tampón de veronal sódico de  $\text{pH} = 8,2$ . Si la solución no es límpida, se filtra rápidamente por papel de filtro de filtración rápida; se le agrega un antiséptico (mertiolato 1/10.000 ó azida sódica) y se distribuye la solución en tubos, de manera que cada uno contenga un volumen conocido de agar correspondiente al volumen necesario para preparar un número definido de placas. La concentración de agar empleado para formar un gel elástico y resistente es de 1 a 1,5%.

#### b) Preparación de las placas de agar

Se utilizan 3 ml de agar tamponado fundido que se vierten sobre la placa (portaobjetos de 7,8 cm x 2,8 cm). Se practican dos excavaciones aproximadamente en la parte media de la placa donde se efectuará la siembra de la mezcla en estudio.

#### c) Electroforesis.

Las placas son colocadas en el aparato de electroforesis donde se encuentra el buffer de  $\text{pH} 8,2$  y fuerza iónica 0,05. El gradiente de potencial que se usa es de 5 a 6 volts. por cm. La duración de la electroforesis es variable, pero en las condiciones descriptas, en cuatro horas los constituyentes proteicos del suero o de la orina están bien dispersados.

#### d) Precipitación específica

Una vez terminada la electroforesis se procede a la siembra del inmuno suero elegido, en la hendidura practicada previamente a la electroforesis en el centro y a lo largo de la placa, paralelamente al sentido del desplazamiento electroforético. Se disponen las placas sobre un soporte horizontal en una cámara húmeda, registrando los resultados por medio de fotografías sobre papel sensible por exposición y simple contacto. Una vez desarrollados los arcos de precipitación, se lavan las placas con solución fisiológica, durante tres días, cambiando la solución dos veces por día.

### e) Fijación

Esta operación, destinada únicamente a las placas para electroforesis simple, tiene por finalidad inmovilizar en el gel los componentes separados por migración electroforética. Los fijadores usados en general son: solución acuosa de ácido acético al 2%; solución de etanol al 60% conteniendo 2% de ácido acético concentrado; solución de etanol al 96% adicionada de ácido acético (2% de concentración final).

### f) Lavado

En el caso del análisis inmuno-electroforético la fijación no es necesaria pues los complejos específicos antígenos-anticuerpos son insolubles en el medio de reacción, pero sí es necesario la operación de lavado descrita en el punto d).

### g) Desecación

La desecación permite reducir el agar de las placas a una lámina transparente. Se efectúa colocando sobre las placas una hoja de papel de filtro de buena calidad, puesto en la estufa a 37°C durante 24 horas, o exponiéndolos a una corriente de aire.

### h) Coloración de proteínas

#### Solución colorante

|   |         |
|---|---------|
| Negro amido, nigrosina, azo carmín o rojo punzó | 1 g     |
| Acido acético 1 M. . . . .                      | 450 ml. |
| Acetato de sodio 0,1 M . . . . .                | 450 ml. |
| Glicerina. . . . .                              | 100 ml. |

#### Agua de lavado

Acido acético al 2% conteniendo 10-15% de glicerina.

Se sumergen las placas en la solución colorante durante 3 a 4 horas y se lavan dos veces con el agua de lavado durante una hora por vez. Luego se secan a 37°C.

## II

VALORACION DE PROTIDOS URINARIOSD - INTRODUCCION

Miatello V. R. (21) al referirse al examen de la orina se expresa en los términos que transcribimos a continuación:

"El término albuminuria debe reemplazarse por el de proteinuria porque las sustancias proteicas que se eliminan por la orina en condiciones normales y patológicas son varias; en realidad se trata de las mismas proteínas que existen en el plasma, aunque su cantidad y proporciones difieren según las circunstancias.

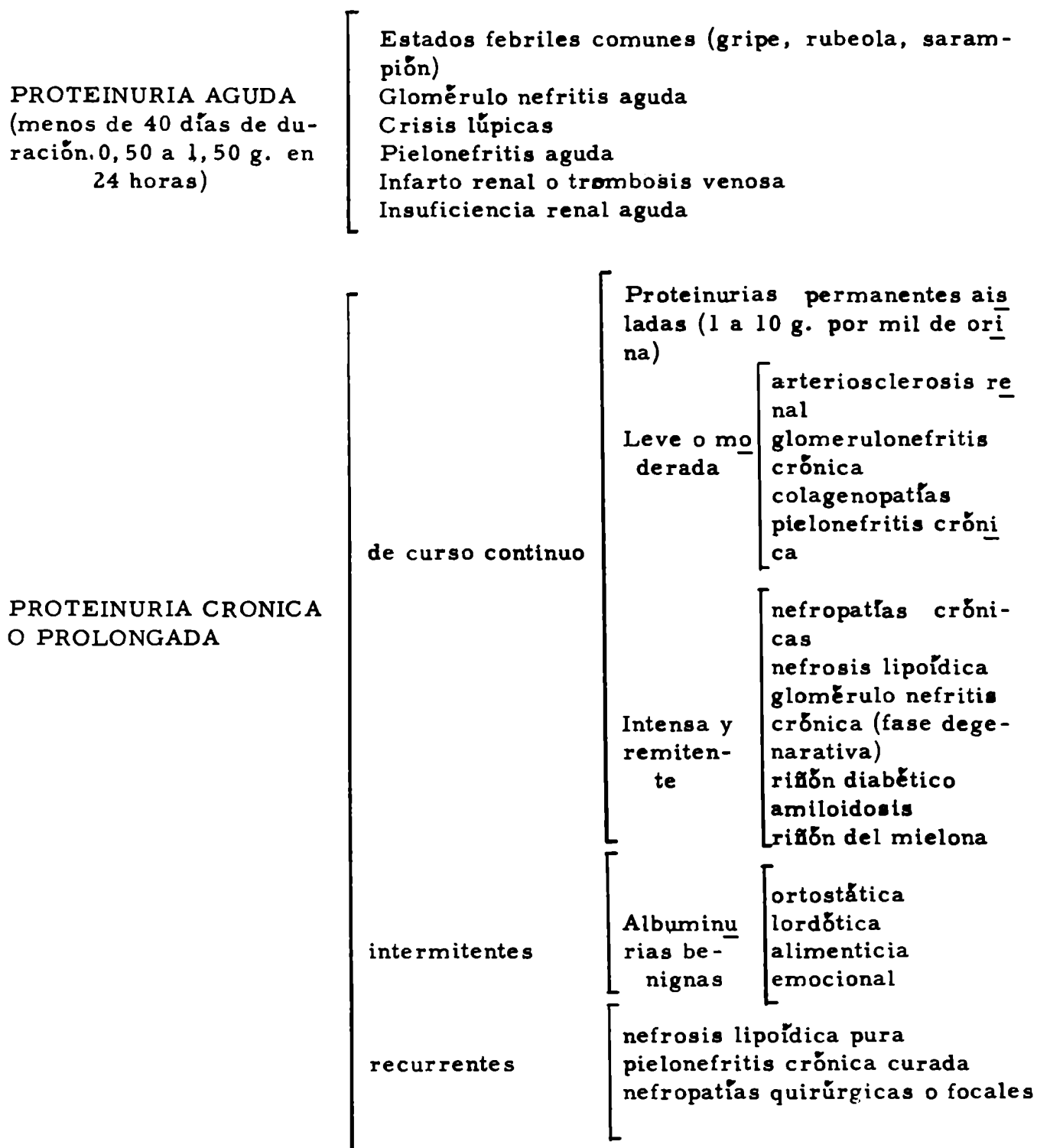
"La disociación electroforética de la proteína que se excreta en condiciones normales ha demostrado que aquella está compuesta por todos los elementos que forman el plasma sanguíneo excepto el fibrinógeno, cuya molécula no filtra porque es muy grande.

"El perfeccionamiento en los métodos analíticos han permitido comprobar la existencia de proteína en el filtrado glomerular en una proporción que oscila entre 10 y 20 mg. por ciento. Esto significa que las proteínas pasan en condiciones normales a través del capilar glomerular acompañando a los 130 ml. de líquido filtrado por minuto; en las 24 horas la cantidad de proteína filtrada sería de 30 g. aproximadamente.

"Aparte de la comprobación de esa cantidad de proteínas en la cavidad capsular, también se demostró que la filtración de las proteínas plasmáticas se produce al nivel de glomérulo. El mecanismo de esta filtración, tanto en condiciones normales como patológicas, fue aclarado recientemente mediante los estudios de la ultraestructura glomerular. Al parecer participan activamente en el mismo los tres constituyentes de la pared capilar; endotelio, membrana basal y epitelio. Pero, de los 30 a 52 g. de proteína filtrados en el glomérulo en las 24 horas, muy poca cantidad se elimina por medio de la orina final. Esto se debe a que la proteína filtrada es reabsorbida casi totalmente a nivel de los túbulos proximales. La reabsorción se hace por un proceso denominado atroci-tosis, que se atribuye a un mecanismo de transporte activo de carácter enzimático, en el que participa el condrioma. De todos modos el aumento anormal de eliminación urinaria de proteínas, proteinuria, se debe fundamentalmente a una mayor filtración glomerular de esas sustancias, por alteración de la permeabilidad de la pared capilar a dichas moléculas proteicas; es mucho menos común que dependa de un defecto en la reabsorción tubular de las proteínas filtradas, consecutivo a una alteración funcional enzimática o a la lesión de los tubos contorneados proximales".

Dicho autor clasifica la proteinuria en relación a su intensidad, duración y evolución.

El cuadro sinóptico siguiente resume las proteinurias más comunes





E - METODOS PROPUESTOS POR VARIOS AUTORES PARA LA  
VALORACION DE LOS PROTIDOS TOTALES EN ORINA

Muchos son los métodos conocidos para la determinación de los protidos en orina. Suelen clasificarse en métodos físicos y químicos. Entre los primeros se encuentran los interferométricos que han alcanzado poca difusión por la mayor ventaja de los métodos químicos; los polarimétricos que resultaron de poca exactitud; los viscosimétricos que ofrecen dificultad en la técnica los refractométricos casi abandonados, por el error que introducen los lípidos y los densimétricos considerados buenos y usados en la actualidad.

Entre los métodos químicos citaremos algunos gravimétricos, volumétricos y colorimétricos.

METODO GRAVIMETRICO DE FOLIN Y DENIS (1914) (15)

Fundamento: Se precipitan las proteínas totales de la orina en medio acético por la acción del calor. El precipitado obtenido, lavado y secado por la acción del calor, se pesa en una balanza de precisión.

VALORACION DE PROTEINA DE BENGE - JONES POR EL METODO DE FOLIN  
Y DENIS

Fundamento: Se precipita la proteína de Bence-Jones en medio acético por la acción del calor (60° C) procediendo a la pesada del precipitado una vez lavado y secado. Se trabaja sobre 10 ml. de orina filtrada dejando el precipitado en estufa de 60°C durante toda la noche. Los detalles de la técnica son iguales a los descritos en el método anterior para las proteínas totales.

METODOS VOLUMETRICOS-DOSAJE POR EL METODO DE ESBACH (1874)(1)

Existen varios modelos de albuminómetro de Esbach, unos cónicos, otros cilíndricos y otros adaptables a la centrifuga como el de Aufrecht.

Se precipitan las proteínas de un volumen conocido de orina por medio de un reactivo ácido (reactivo de Esbach: ácido pícrico 10 g., ácido cítrico 20 g. agua 1000 cc) en un tubo graduado especialmente con ese fin. Se coloca la orina límpida de reacción ácida hasta la marca U y luego reactivo hasta R: mez

clar bien invirtiendo el tubo varias veces; dejar en reposo verticalmente 24 horas, momento en que se hará la lectura en g o/oo, de acuerdo con la graduación alcanzada por el precipitado formado, si se ha usado un tubo adaptable a la centrifuga, es necesario centrifugar hasta el momento en que no haya variación del volumen del precipitado.

La precipitación de las proteínas de la orina mediante el reactivo y albuminómetro de Esbach es muy inexacto. Peters y Van Slyke<sup>(16)</sup> destacan que se obtienen resultados que pueden oscilar entre la mitad y el doble de la cifra real de proteínas contenidas en la orina.

La principal causa de error es la poca densidad que presenta el precipitado obtenido con el reactivo de Esbach; de ahí que Tsuchiya indica el uso del ácido fosfotúngstico y Shevsky y Stafford perfeccionaron el método de Tsuchiya utilizando tubos de centrifuga especiales.

#### METODO VOLUMETRICO DE SHEVSKY Y STAFFORD (1923)(2)

Los autores utilizan el método de Tsuchiya mejorado con el empleo de tubos de centrifuga especiales.

Para los propósitos clínicos ninguno de los métodos usados para la determinación de los prótidos urinarios son satisfactorios. El método de Kjeldhal que es el más exacto requiere mucho tiempo, y en consecuencia no es práctico para los trabajos de rutina.

Pasamos a detallar a continuación un método de precipitación y centrifugación en el cual se combina la simplicidad con un grado más alto de exactitud.

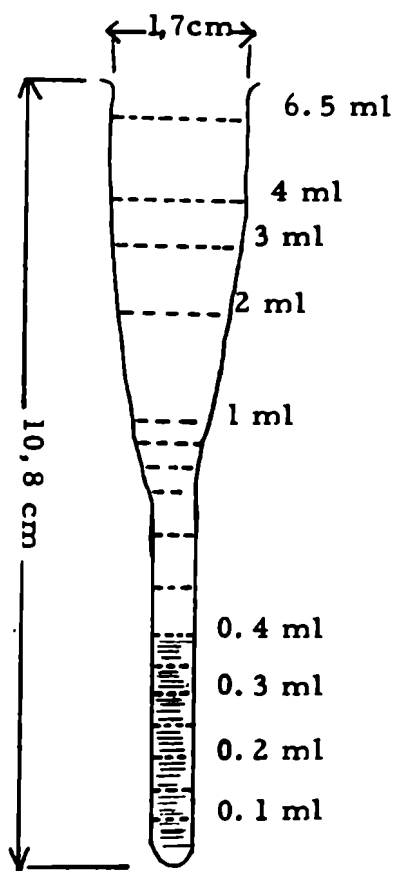
En primer lugar se debe efectuar una determinación cualitativa calentando la orina con ácido acético. Si resulta una nube algo intensa el líquido debe ser diluido. Esto es necesario porque el volumen de precipitado no debe ser mayor de 1 cc. después de la centrifugación.

Reactivo de Tsuchiya: 1,5 g. de ácido fosfotúngstico se mezclan con 5 cc. de ácido clorhídrico concentrado y se lleva a 100 cc. con alcohol de 95%.

Técnica: pipetear 8 cc. del fluido, diluido si es necesario, y colocarlo en un tubo de centrifuga graduado hasta 15 cc. La graduación debe ser con trdada cuidadosamente. Agregar 5 cc. del reactivo de Tsuchiya y mezclar por inversión tres veces.

Exactamente un minuto después de la mezcla centrifugar 15 minutos

TUBO DE MAC KAY



a 1.800 revoluciones. El líquido debe estar aproximadamente a 20°C.

En estas condiciones cada 0,1 cc. del precipitado proteico equivale a 0.036 g. de proteínas por 10 cc. de fluido.

El error que se comete con este método comparado con el de Kjeldahl es aproximadamente del 6 al 8%.

Las condiciones de trabajo son por supuesto arbitrarias, pero no deben ser alteradas pues variaría el factor de transformación. Debe ser respetado el tiempo de centrifugación y el número de revoluciones pues de lo contrario se cometerían errores mayores.

La variación en el peso específico de la orina que contiene las proteínas no introduce un error apreciable en el volumen de precipitado.

El tiempo transcurrido entre la mezcla de la orina con el reactivo y la centrifugación debe ser constante. Los autores estudiaron su efecto encontrando en algunos casos errores apreciables.

#### METODO TITRIMETRICO DE PETERS Y VAN SLYKE (1932)(16)

Fundamento: Se precipitan las proteínas de la orina mediante el ácido tungstico. En el precipitado obtenido, disuelto en hidróxido de sodio, se procede a valorar el nitrógeno por el método de Kjeldahl.

#### METODO COLORIMETRICO DE HILLER, MC INTOSH Y VAN SLYKE (1927)(17)

Fundamento: Previo aislamiento de la proteína por precipitación con ácido tricloracético al 10% se procede, sobre el precipitado disuelto en hidróxido de sodio a efectuar la reacción del biuret. Para la valoración de las fracciones se recurre a la separación mediante el sulfato de amonio a media saturación.

#### METODOS NEFELOMETRICOS (1926)(18)

La dificultad principal de la nefelometría reside en la dificultad de obtener partículas de tamaño constante y uniforme, lo que causa un error en las mediciones efectuadas en distintas muestras.

Se utilizan algunos métodos semiempíricos que permiten obtener resultados satisfactorios como el método de Kingsbury que determina la concentración de las proteínas urinarias por precipitación de las mismas con ácido

sulfosalicílico comparando la turbiedad producida con testigos preparados a base de gelatina. El método detallado es el siguiente:

**Técnica:** Verter con pipeta 2,5 ml. de orina filtrada en un tubo de ensayo graduado a 10 ml. y añadir ácido sulfosalicílico al 3% hasta la marca. Invertir el tubo para mezclar el contenido; dejar reposar 10 minutos y comparar el enturbiamiento con los patrones permanentes.

### Preparación de los patrones permanentes de albúmina

Disolver 20 g. de gelatina calidad "Super X" en hojas, de "Coignet Chemical Products Co.," "Nueva York", en 120 a 140 cc. de agua destilada a 45° - 55° C y añadir agua hasta completar 200 cc. Agregar aproximadamente la mitad de la clara de un huevo y agitar. Calentar a baño maría, durante 30 minutos como mínimo, después de alcanzar los 90°C.

Filtrar en caliente a través de papel Whatman Nro. 4 para obtener una solución perfectamente transparente y ligeramente amarilla. Inmediatamente antes de usarla añadir 0.3 cc. de formol.

La formacina que es la sustancia que hay que suspender en la gelatina se prepara como sigue: disolver 2,5 g. de urotropina en 25 ml. de una solución de sulfato de hidracina al 1% también a la temperatura ambiente. Mezclar, tapar y dejar reposar por lo menos durante 15 horas. Suspender uniformemente el precipitado blanco amorfo invirtiendo el matraz suavemente varias veces. Añadir 14,5 ml. de la suspensión de formacina a 100 ml. de solución de gelatina al 10% a temperatura de 45° - 55°C (a la que se había adicionado la cantidad correcta de formol) y mezclar perfectamente.

Así se logra un enturbiamiento equivalente al que se obtiene con una solución de albúmina de 0,1% o al de una que contenga 100 mg. de ésta en 100 ml. cuando se precipita por 3 volúmenes de ácido sulfosalicílico al 3%. Diluir como sigue esta suspensión para preparar los restantes patrones.

| Suspensión de formacina<br>equivalente a 100 mg. de<br>albúmina por 100 ml. | Gelatina clarificada<br>al 10% | Valor del patrón<br>preparado |
|---|--------------------------------|-------------------------------|
| ml.   | ml.                            |                               |
| 25.0  | 26                             | 0.05% o 50 mg.                |
| 20.0  | 30                             | 0.04% o 40 mg.                |
| 15.0  | 35                             | 0.03% o 30 mg.                |
| 10.0  | 40                             | 0.02% o 20 mg.                |
| 5.0   | 45                             | 0.01% o 10 mg.                |
| 2.5   | 55                             | 0.005% o 5 mg.                |

Poner cada patrón en un tubo de ensayo de las mismas dimensiones que los usados para practicar la prueba con orina. Cerrar el tubo con un tapón encerado y dejar a temperatura ambiente. La gelatina se solidifica al cabo de poco tiempo. En épocas muy calurosas se ponen los tubos en sitio fresco durante algunos días antes de usarlos.

Conservar los patrones en una habitación bien iluminada. Si con el tiempo adquieren color verdoso, pueden decolorarse exponiéndolos a la luz del sol sin que varíe su valor turbidimétrico.

Los patrones pueden comprobarse comparándolos con otros de suero de oveja y de un contenido conocido en proteínas, precipitándolos de la misma manera que en la reacción para la orina. Los patrones que datan de más de 7 meses deben reemplazarse a menos que pruebas reales demuestren que conservan todavía su grado de enturbiamiento original.

En el curso de un año puede producirse una disminución muy pequeña en el valor turbidimétrico de los patrones. En 6 a 8 meses no se produce ningún cambio perceptible.

#### DETERMINACION DE PROTEINAS EN ORINA CON LOS PATRONES TURBIDIMETRICOS PERMANENTES DE PERSPEX (1951)(19)

E. J. King utiliza el método de Kingsbury, pero con una modificación; compara la turbiedad producida con el ácido sulfosalicílico y la orina con los llamados patrones de Perspex.

Aunque los standards de formazina son de fácil preparación y dan resultados aceptables no son de duración permanente; éste se calcula de 6 a 8 meses.

Con el objeto de conseguir standards de mayor duración Haslam aprovechó los que había preparado para la determinación de pequeñas cantidades de cloruros.

Estos patrones son permanentes, es decir que no se verifica ningún cambio en sus propiedades ópticas durante mucho tiempo, y se puede afirmar que permanecen inalterados indefinidamente.

## III

PARTE EXPERIMENTALF - ELECTROFORESIS E INMUNOELECTROFORESIS DE PROTEINAS URINARIASMATERIAL Y METODOS UTILIZADOS

- a) Orinas de 24 hs. a las que se les adiciona azida sódica, conservadas en heladera.  
Para nuestro trabajo utilizamos orinas con cantidades de proteínas que variaban desde 0,50 hasta 6 g o/oo.
- b) Tubos de dialisis (Visking Dialysis Tubing) 1/4" de diámetro.
- c) Polivinil-pirrolidona (P. V. P. )(Plasdone) o Carbowax 20 M para efectuar la concentración.
- d) Agar S. S. purificado.
- e) Suero inmune de caballo anti-suero humano normal, adquirido en el Instituto Pasteur de Paris.

Preparación de los concentrados de orina

La orina centrifugada se coloca en un tubo de dialisis, rodeado de P. V. P. ó Carbowax 20 M y es concentrado hasta alcanzar concentraciones en proteínas similares al suero sanguíneo (8 a 10 horas).

Preparación de las placas de agar

Se preparan los portaobjetos de vidrio (7,8 x 2,8 cm.) cuidadosamente lavados; sobre los que se extienden 1 ml. de agar al 0,5% que se deja secar en estufa entre 80 y 90°; esto permite que el agar tamponado se adhiera mejor a las placas.

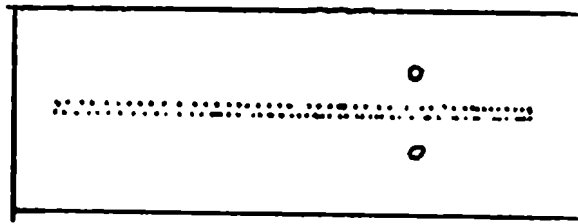
Agar tamponado: veronal sódico 9 g.  
ácido clorhídrico 0,1 N 65 ml  
azida sódica 0,5 g  
agua destilada hasta 1 litro.

Para el uso se diluyen 50 ml. de buffer con 50 ml. de agua adiciona-

dos de 1,5 g. de agar purificado.

Se vierten 3 ml. de agar tamponado en cada portaobjetos y una vez frío se practican mediante un sacabocados, dos excavaciones en la masa de agar, colocados aproximadamente en la parte media entre los extremos anódico y catódico de la placa y en línea perpendicular a los bordes laterales.

Luego se efectúa una incisión de 1 mm. en la parte media y a lo largo de la placa, paralelamente al sentido del desplazamiento electroforético, sin levantar el agar.



### Sembrado de la placa

En la excavación superior se colocan de 1 a 5  $\mu$ l. de suero humano normal y en la inferior de 1 a 5  $\mu$ l. de orina concentrada.

### Desarrollo electroforético

Las placas se colocan en la cubeta con el agar hacia abajo, apoyadas sobre dos láminas de Wetex colocadas en cada uno de los compartimientos anódico y catódico.

La solución tampón colocada en las cubetas es de pH 8,2. Condiciones de trabajo: 4 mA. ; 6 V. por cada portaobjetos; temperatura del laboratorio; y tiempo de migración de 3 a 4 hs.

### Fijación y coloración de la electroforesis simple

Terminada la electroforesis se fijan las distintas fracciones colocando las placas durante 3 a 4 hs. en ácido acético al 2%.

Luego se procede a la desecación, recubriendo las placas con papel cromatográfico de grano fino aplicado uniformemente y con ligera presión de los dedos sobre la placa y se coloca en estufa a 37°C durante 24 horas.

Una vez desecados se quita el papel, se lava con agua y se sumerge



en la solución colorante durante tres horas.

|   |          |
|---|----------|
| Para nuestro trabajo utilizamos: amidoschwartz 10 B | 2,5 g.   |
| metanol   | 200 ml.  |
| ácido acético                                       | 35,5 ml. |
| agua  | 162 ml.  |

Luego se lava durante dos horas en la solución de lavado que se cambia una vez (metanol 450 ml; ácido acético 100 ml; agua 450 ml.)

Se seca la placa en estufa a 37°C durante 24 horas.

### Revelado inmunológico

Una vez practicada la electroforesis se procede a la siembra del anti-suero (suero inmune de caballo anti-suero humano normal) levantando la tirade agar de la incisión efectuada previamente al desarrollo electroforético.

En este surco se siembra el anti-suero 200  $\mu$ l. y se coloca la placa en cámara húmeda a 18-20°C durante 12 hs. tiempo en que se produce el desarrollo de las reacciones antígeno-anticuerpo.

Se lavan las placas sumergiéndolas tres días en solución fisiológica que se cambia una o dos veces por día.

Realizado el lavado, la placa debe desecarse de la misma manera que para la electroforesis simple, es decir, con papel cromatográfico de grano fino, colocado sobre la superficie del agar y depositado en estufa a 37°C durante 24 horas. Se lava con agua y se procede a su coloración como en el caso de la electroforesis simple.



suero

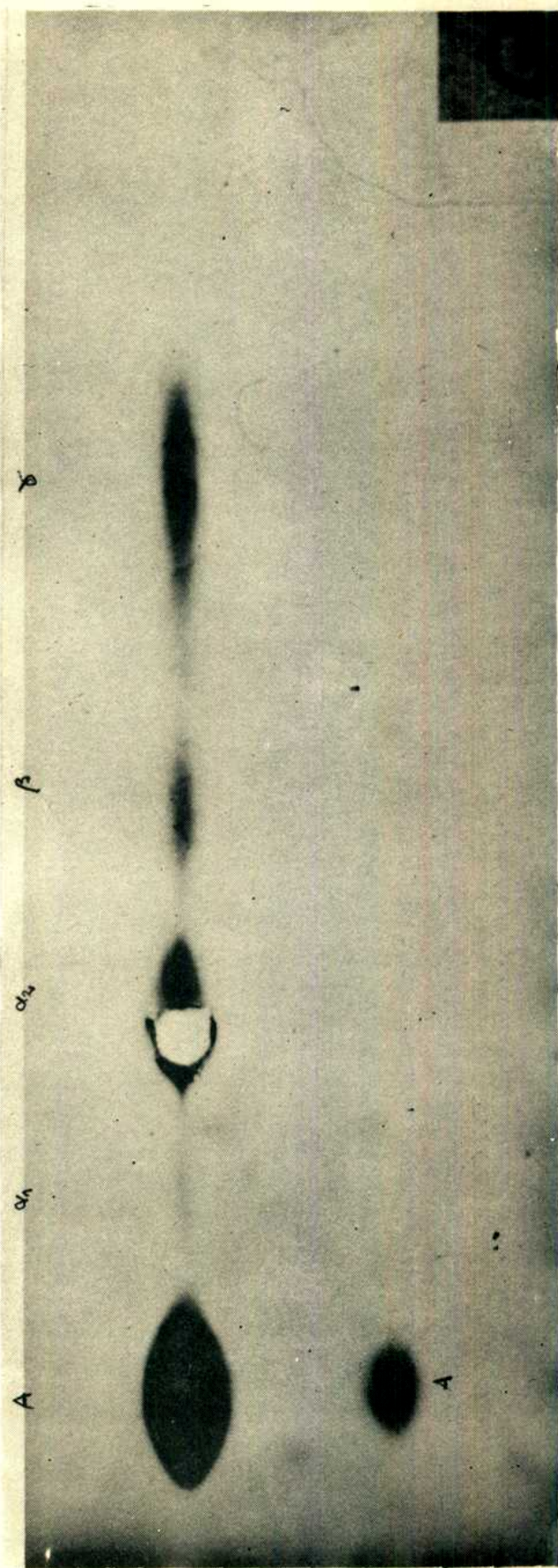
orina

- Ausencia
- + Vestigios
- ++ Presencia neta

(1)

|       | Albumi-<br>na | Globulinas |            |         |
|-------|---------------|------------|------------|---------|
|       |               | $\alpha 1$ | $\alpha 2$ | $\beta$ |
| suero | ++            | +          | ++         | ++      |
| orina | ++            | +          | +          | +       |



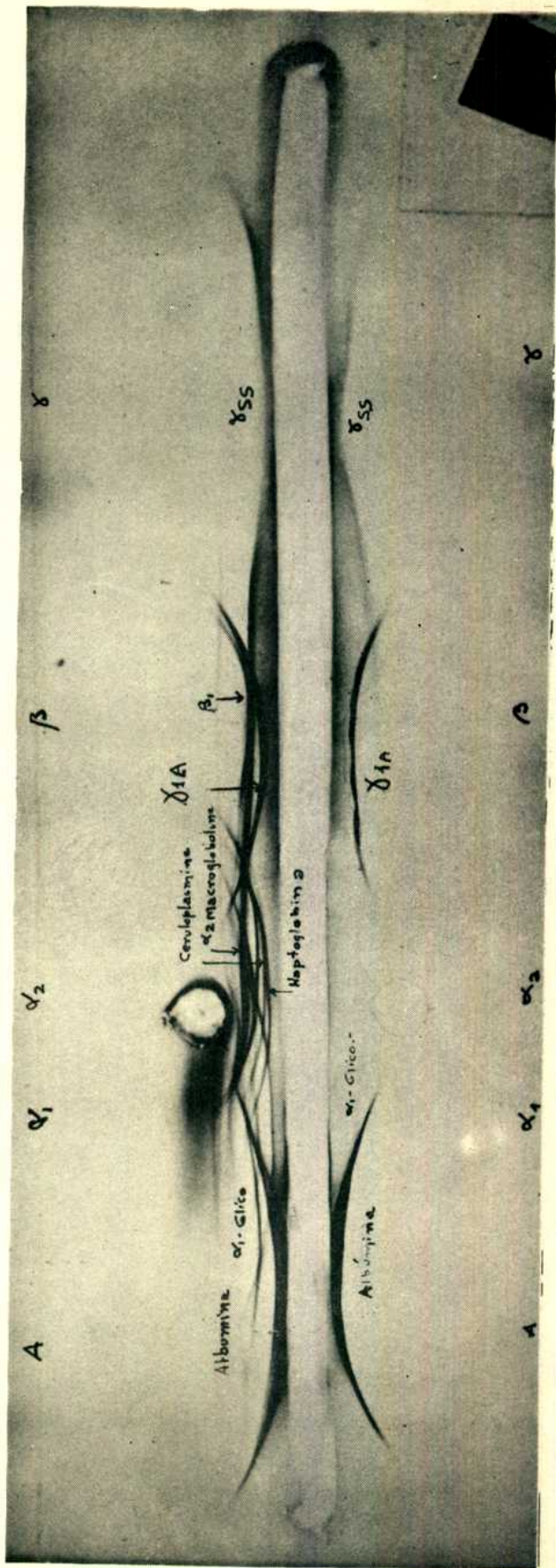


Suero

Orina

(2)

|       | Albumina | Globulinas |            |         |          |
|-------|----------|------------|------------|---------|----------|
|       |          | $\alpha_1$ | $\alpha_2$ | $\beta$ | $\gamma$ |
| Suero | ++       | +          | ++         | +       | ++       |
| Orina | ++       | -          | -          | -       | -        |



suero

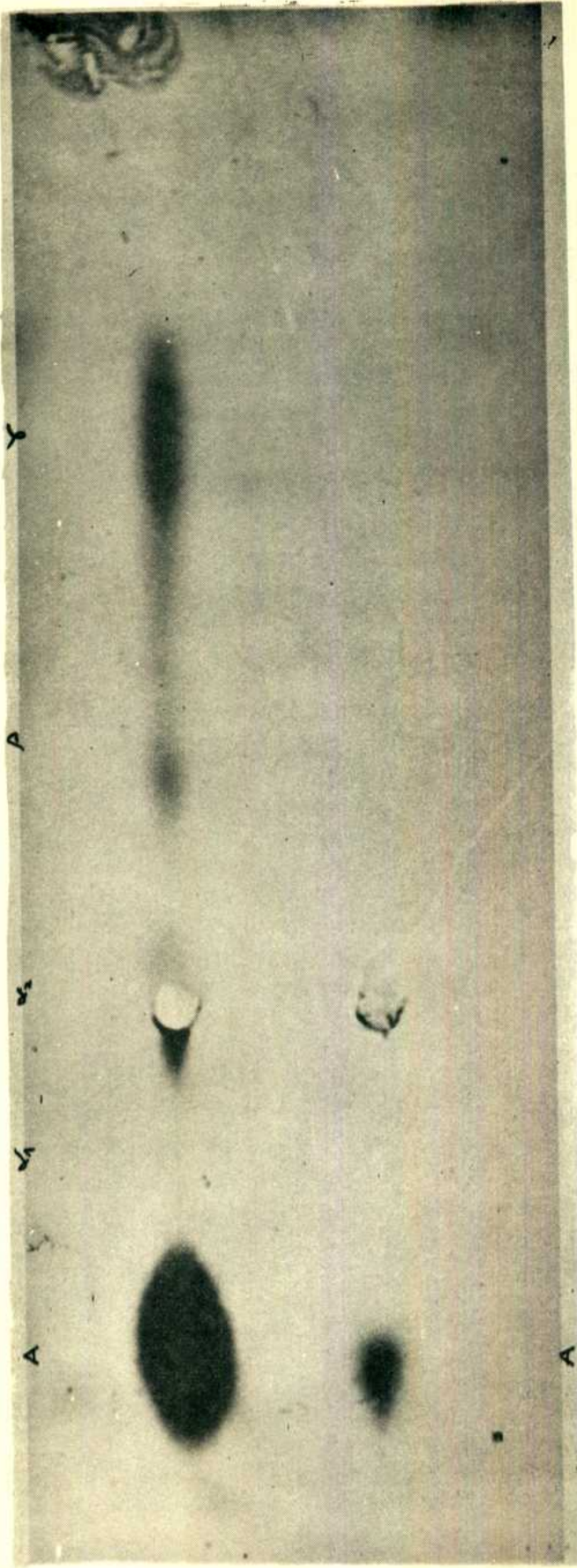
orina

(2)

| P | Ab | α1    |      | α2   |        |               |              | β1      |   |   | Inmunoglobulinas |     |     |
|---|----|-------|------|------|--------|---------------|--------------|---------|---|---|------------------|-----|-----|
|   |    | Glico | Lipo | Lipo | Ma-cro | Cerulo-plasma | Haptoglobina | Side-ro | B | A | γ1A              | γ1M | γss |
|   | ++ | +     | -    | -    | ++     | ++            | ++           |         |   | + | ++               |     |     |
|   | ++ | +     | -    | -    | -      | -             | -            |         |   | - | ++               |     |     |

suero

orina

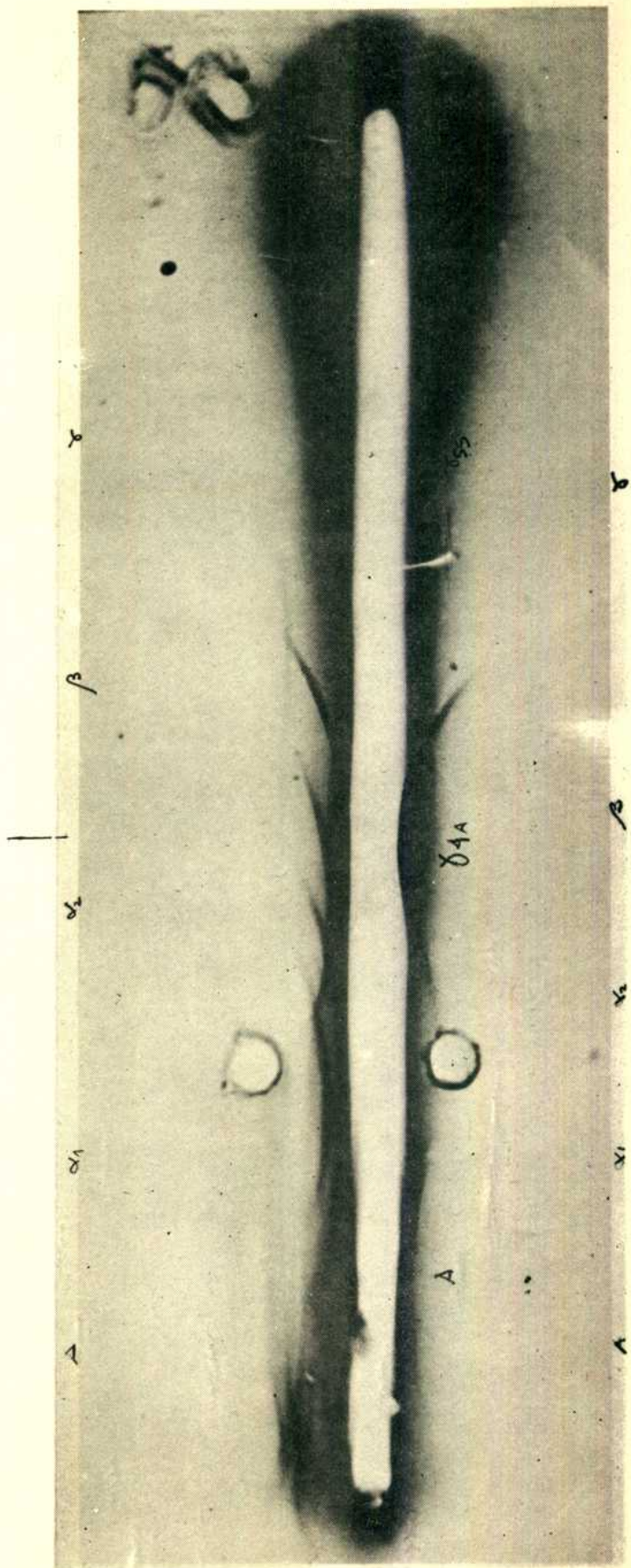


suero

orina

(3)

|       | Albumina | Globulinas |            |         |          |
|-------|----------|------------|------------|---------|----------|
|       |          | $\alpha_1$ | $\alpha_2$ | $\beta$ | $\gamma$ |
| suero | ++       | +          | ++         | +       | ++       |
| orina | ++       | -          | -          | -       | -        |

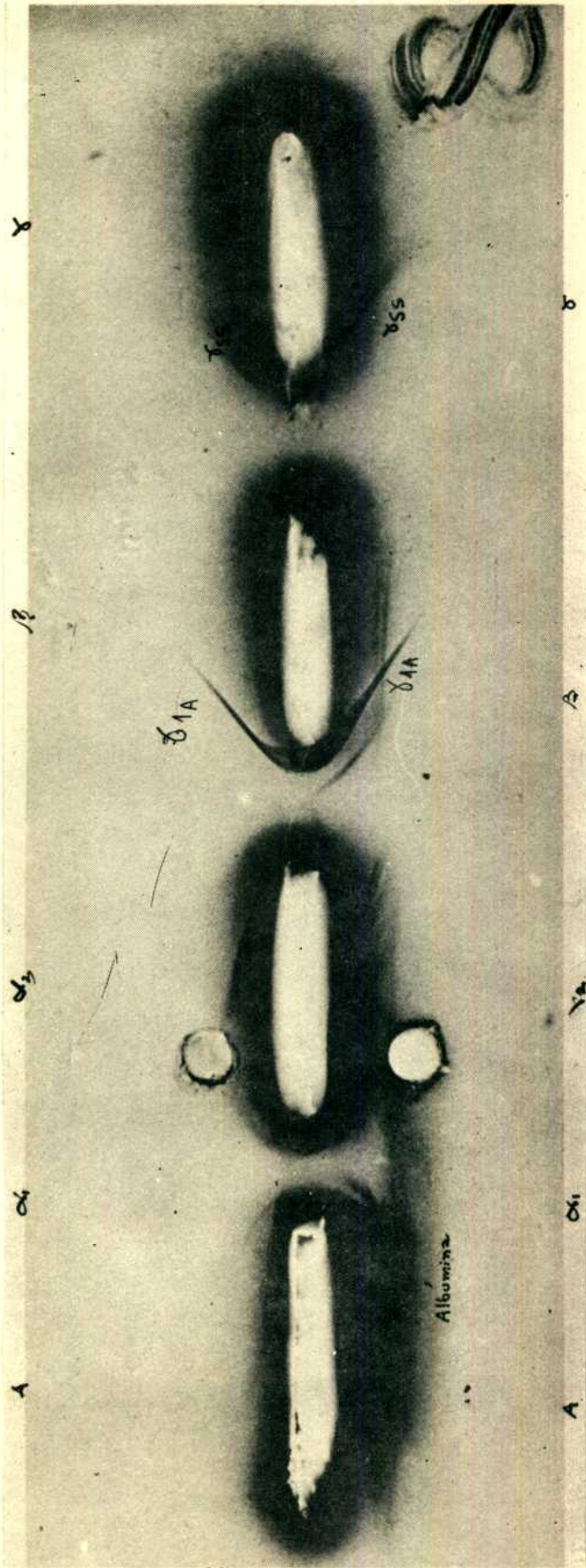


suero

orina

(3)

|       | P | Ab | $\alpha 1$ |      |  | $\alpha 2$ |                |              |         | $\beta 1$ |   |             | Immunoglobulinas |             |  |  |    |
|-------|---|----|------------|------|--|------------|----------------|--------------|---------|-----------|---|-------------|------------------|-------------|--|--|----|
|       |   |    | Gli-co     | Lipo |  | Ma-cro     | Cerulo-pasmina | Haptoglobina | Side-ro | B         | A | $\gamma 1A$ | $\gamma 1M$      | $\gamma ss$ |  |  |    |
| suero |   |    |            |      |  |            |                |              |         |           |   |             |                  |             |  |  |    |
| orina |   | ++ |            |      |  |            |                |              |         |           |   |             |                  | ++          |  |  | ++ |

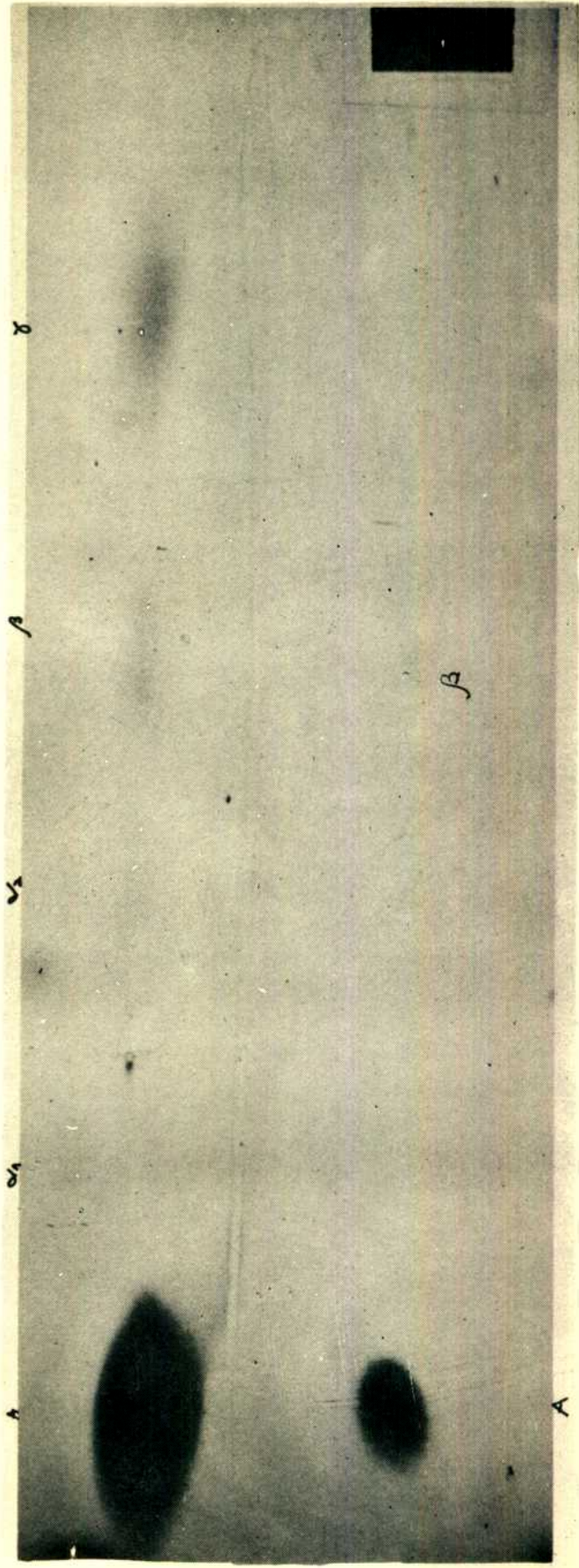


svero

orina

(3)



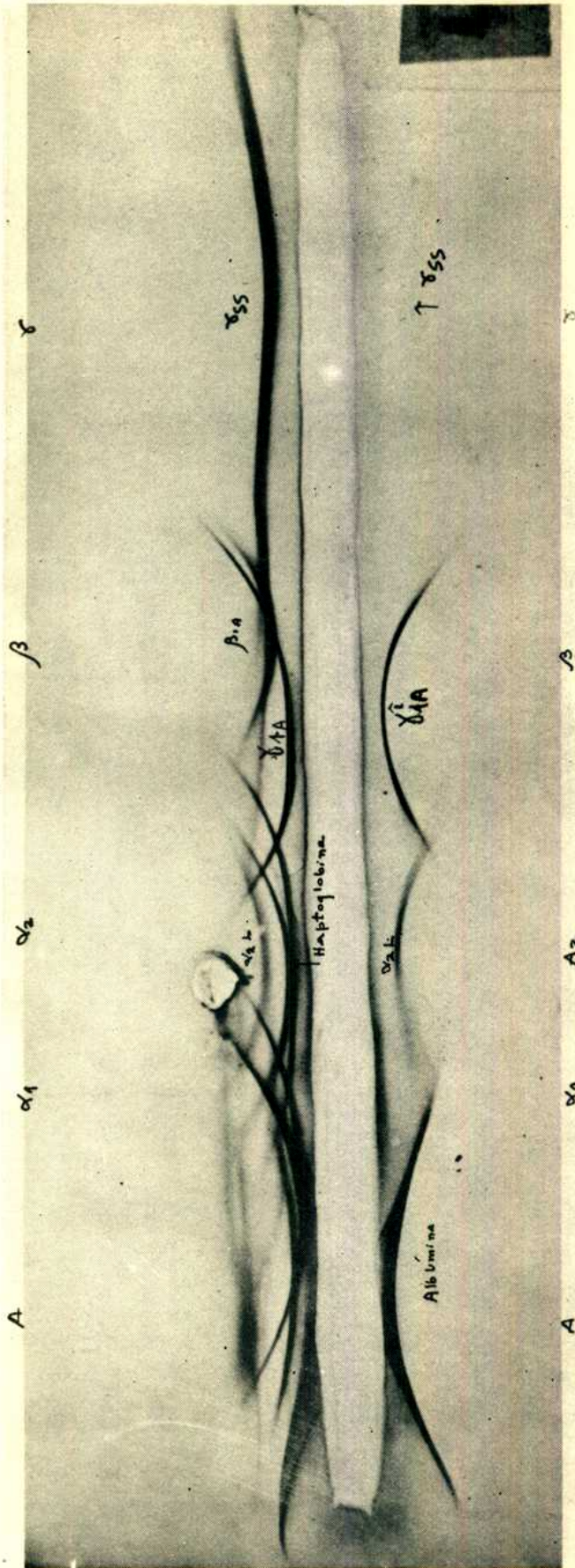


suero

orina

(4)

|       | Albúmina | Globulinas     |                |   |
|-------|----------|----------------|----------------|---|
|       |          | δ <sub>1</sub> | δ <sub>2</sub> | γ |
| suero | ++       | +              | +              | + |
| orina | ++       | -              | -              | - |

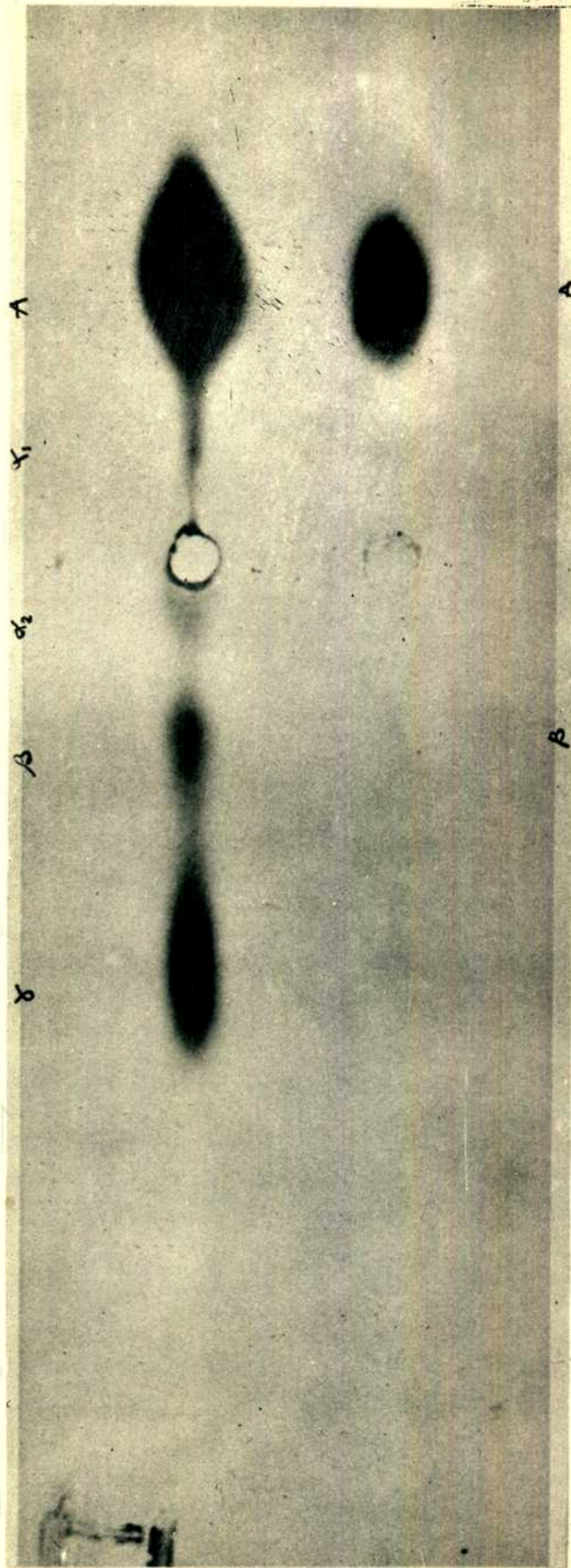


suero

orina

(4)

| p | Ab | $\alpha_1$ |       |  | $\alpha_2$    |                |        | $\beta_1$ |    |               | Inmunoglobulinas |               |    |
|---|----|------------|-------|--|---------------|----------------|--------|-----------|----|---------------|------------------|---------------|----|
|   |    | Glicó      | Li-po |  | Ma-cro plasma | Cervoglobulina | Sidero | B         | A  | $\gamma_{1A}$ | $\gamma_{1M}$    | $\gamma_{ss}$ |    |
|   | ++ |            | ++    |  |               | ++             |        |           | ++ |               |                  | ++            | ++ |
|   | ++ |            | ++    |  |               | -              |        |           | -  |               |                  | ++            | +  |



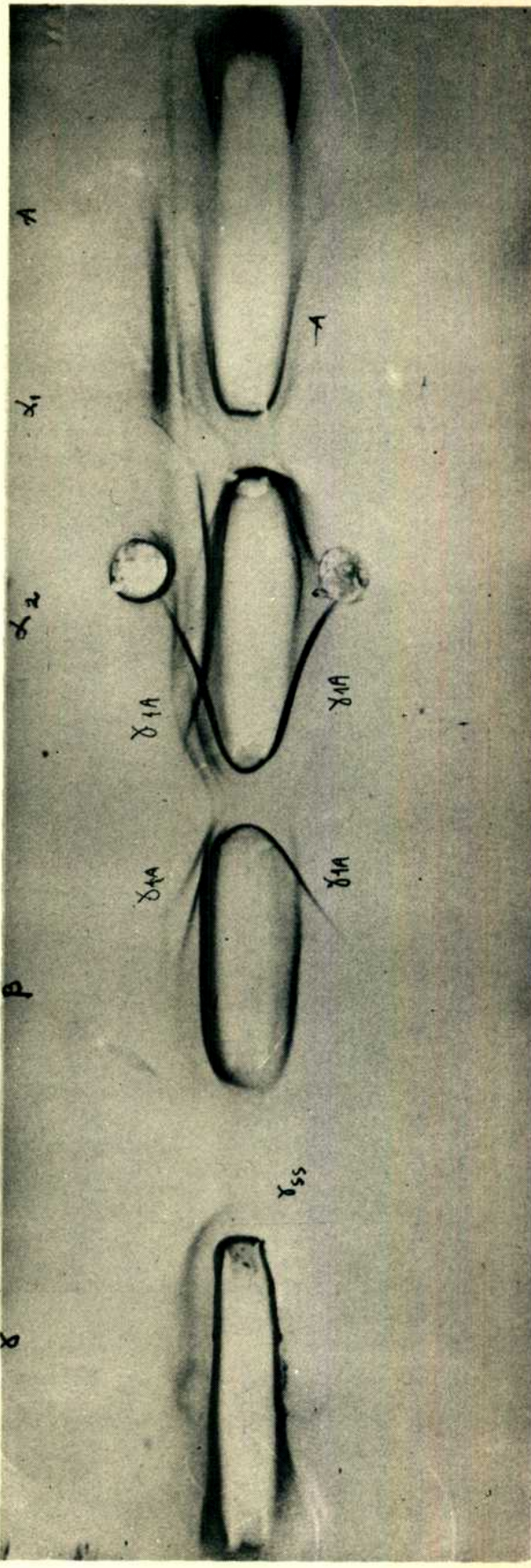
suero

orina

(5)

|       | Albumina | Globulinas |            |         |          |
|-------|----------|------------|------------|---------|----------|
|       |          | $\alpha_1$ | $\alpha_2$ | $\beta$ | $\gamma$ |
| suero | ++       | ++         | ++         | ++      | ++       |
| orina | ++       | -          | -          | +       | -        |

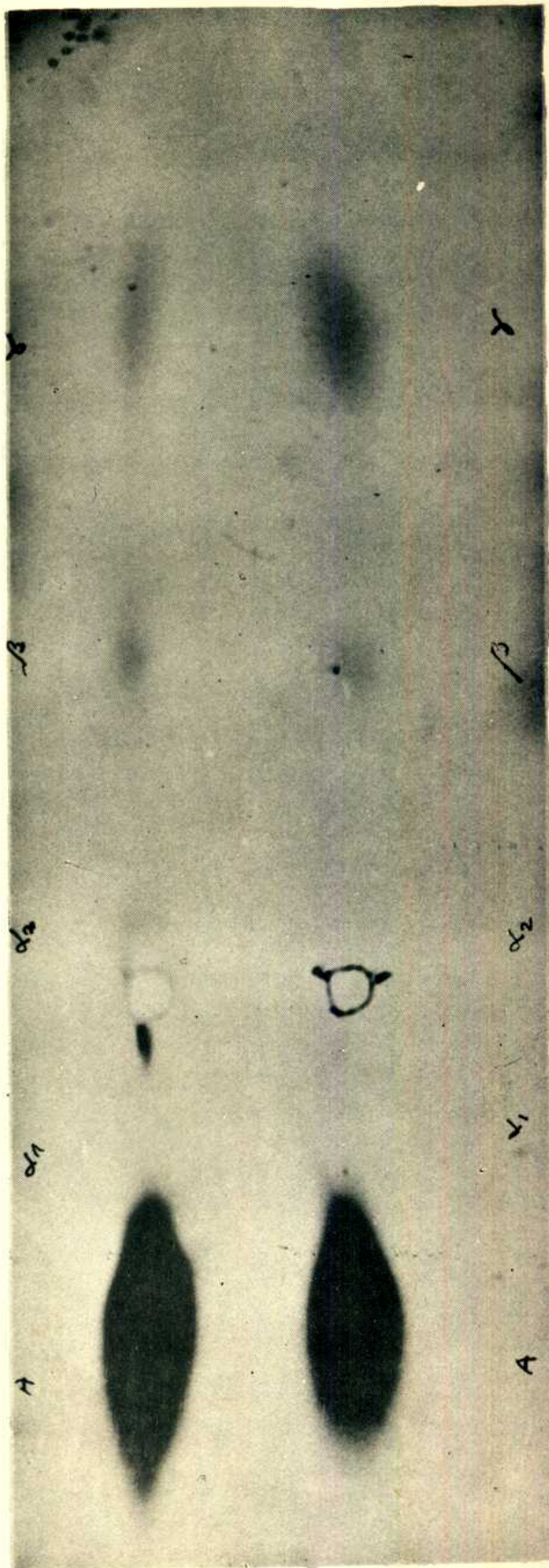




svero

crina

(5)

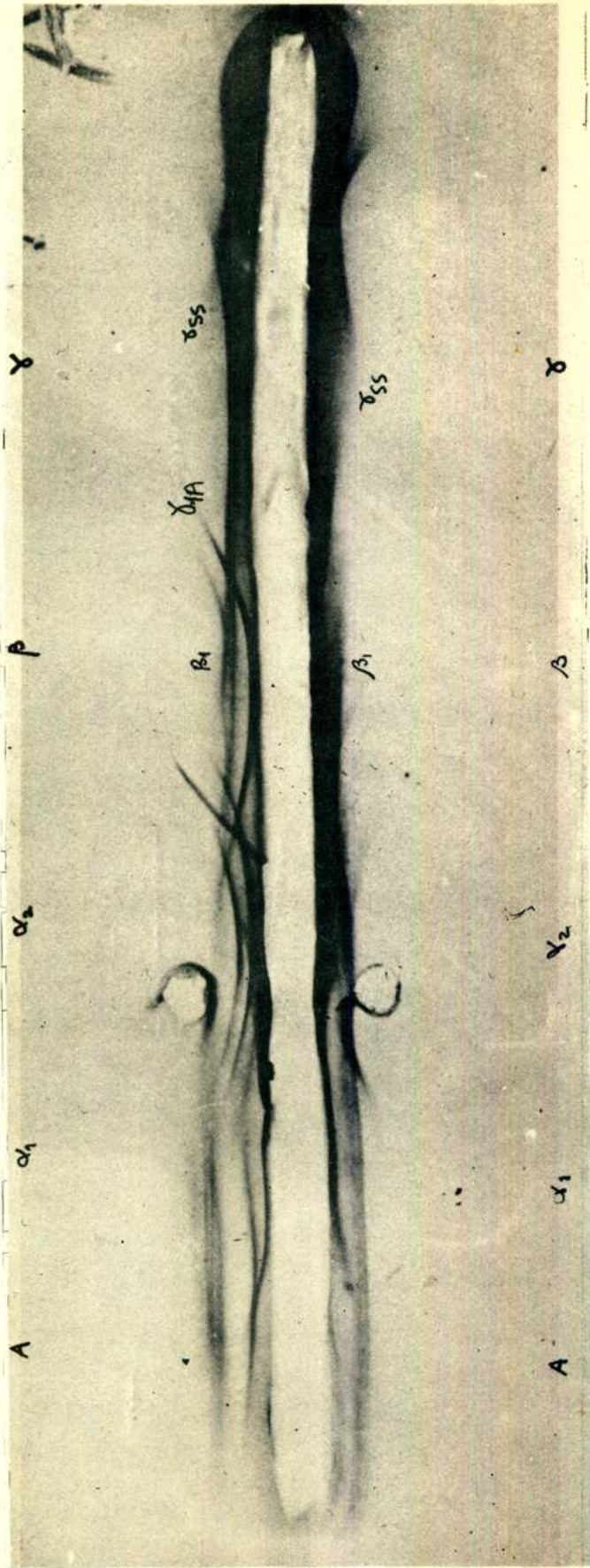


suero

orina

(6)

|       | Albumina | Globulinas |            |         |          |
|-------|----------|------------|------------|---------|----------|
|       |          | $\alpha_1$ | $\alpha_2$ | $\beta$ | $\gamma$ |
| suero | +        | +          | +          | +       | +        |
| orina | +        | +          | +          | +       | +        |

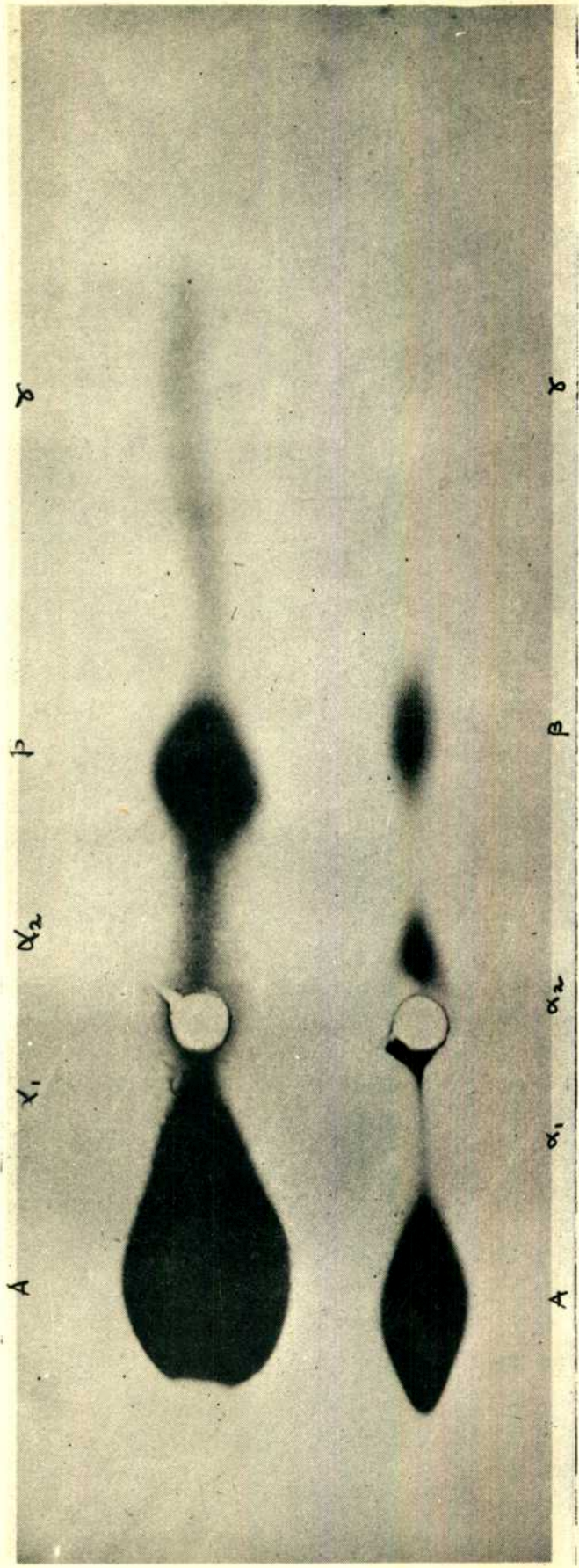


suero

orina

(6)

|       | P | Ab | $\alpha_1$ |      | $\alpha_2$ |               |                     | $\beta_1$ |   |    | Immunoglobulinas |               |               |  |    |
|-------|---|----|------------|------|------------|---------------|---------------------|-----------|---|----|------------------|---------------|---------------|--|----|
|       |   |    | Gli-co     | Lipo | Lipo       | Ma-cro plasma | Cerulo-haptoglobina | Sidero    | B | A  | $\gamma_{1A}$    | $\gamma_{1M}$ | $\gamma_{1S}$ |  |    |
| suero |   | +  |            |      |            |               |                     |           |   | ++ |                  | ++            |               |  | ++ |
| orina |   | +  |            |      |            |               |                     |           |   | +  |                  | -             |               |  | ++ |



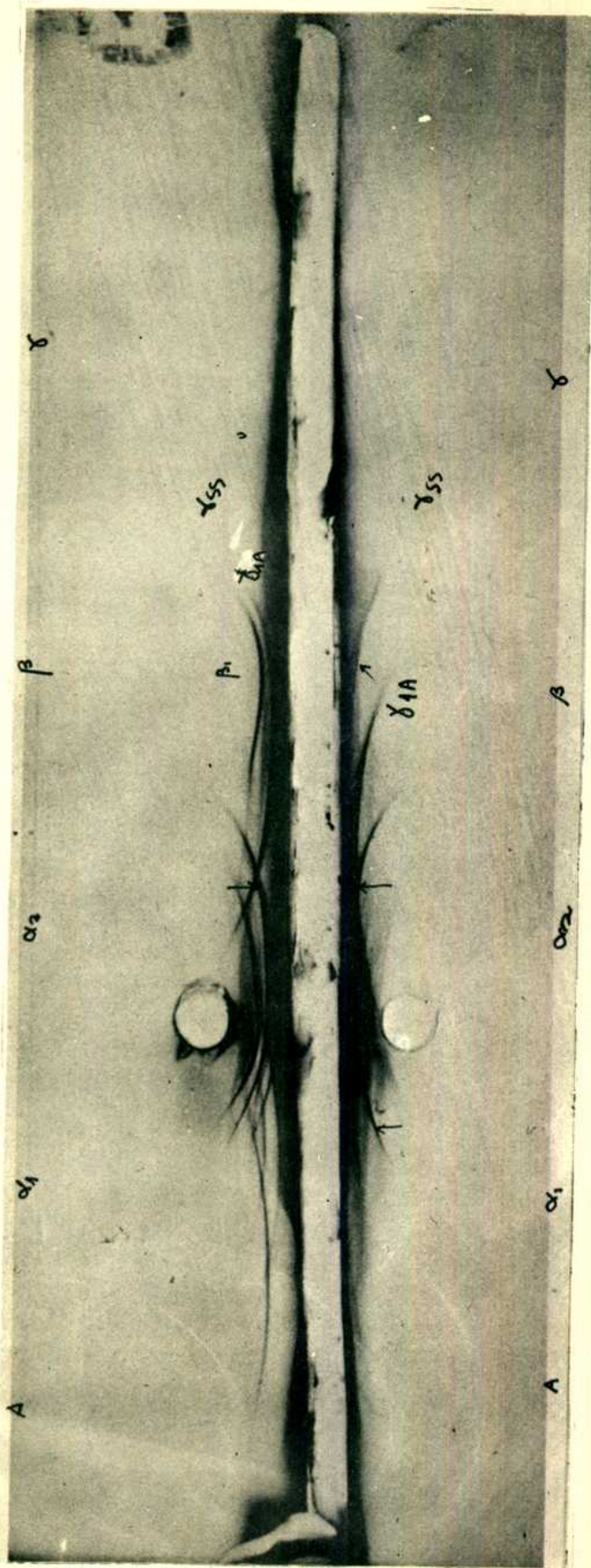
suero

orina

(7)

|       | Albumina | Globulinas |            |         |          |
|-------|----------|------------|------------|---------|----------|
|       |          | $\alpha_1$ | $\alpha_2$ | $\beta$ | $\gamma$ |
| suero | ++       | +          | +          | ++      | +        |
| orina | ++       | +          | +          | ++      | +        |



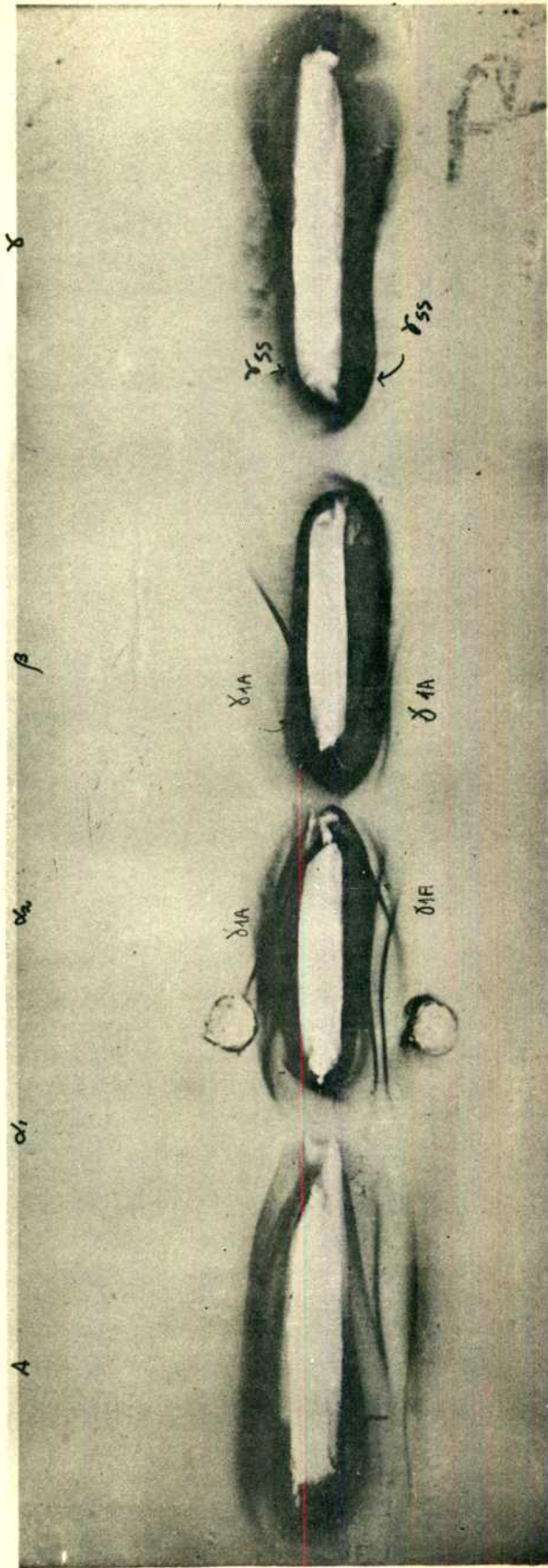


siero

orina

(7)

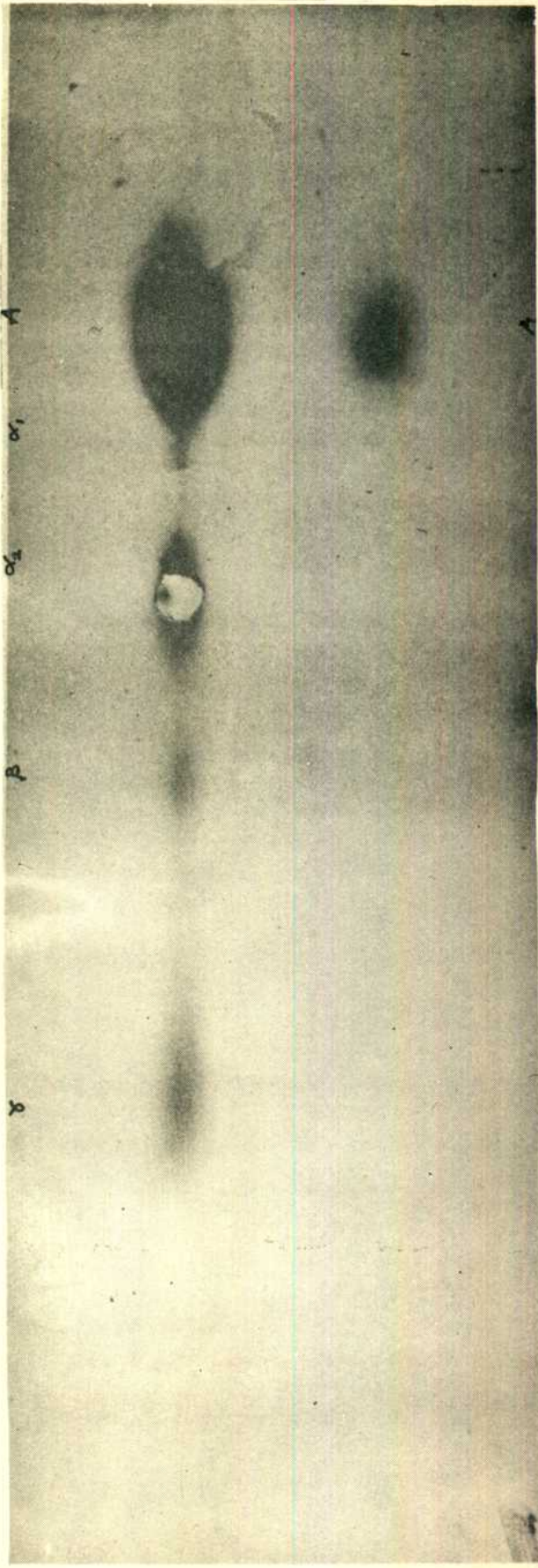
|       | p | Ab | α1     |      | α2   |               |                     | β1     |   |   | Immunoglobulinas |     |     |  |   |
|-------|---|----|--------|------|------|---------------|---------------------|--------|---|---|------------------|-----|-----|--|---|
|       |   |    | Gli-co | Lipo | Lipo | Ma-cro plasma | Cerulo-Haptoglobina | Sidero | B | A | γ1A              | γ1M | γss |  |   |
| siero |   | +  | +      | ?    |      |               | +                   | ?      |   |   |                  | +   |     |  | + |
| orina |   | +  | +      | ?    |      |               |                     | +      | ? |   |                  |     | +   |  | + |



suero

urina

(7)



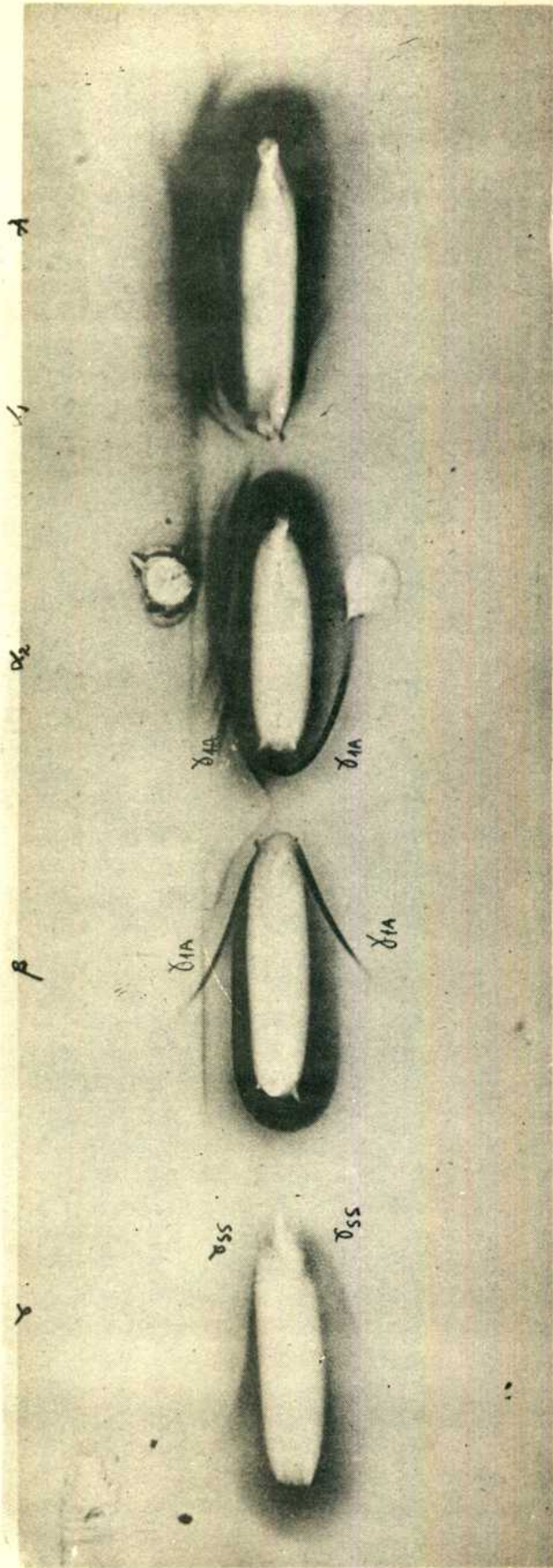
suero

orina

(8)

|       | Albumina | Globulinas |            |         |          |
|-------|----------|------------|------------|---------|----------|
|       |          | $\alpha_1$ | $\alpha_2$ | $\beta$ | $\gamma$ |
| suero | +        | +          | +          | +       | +        |
| orina | +        | -          | -          | -       | -        |



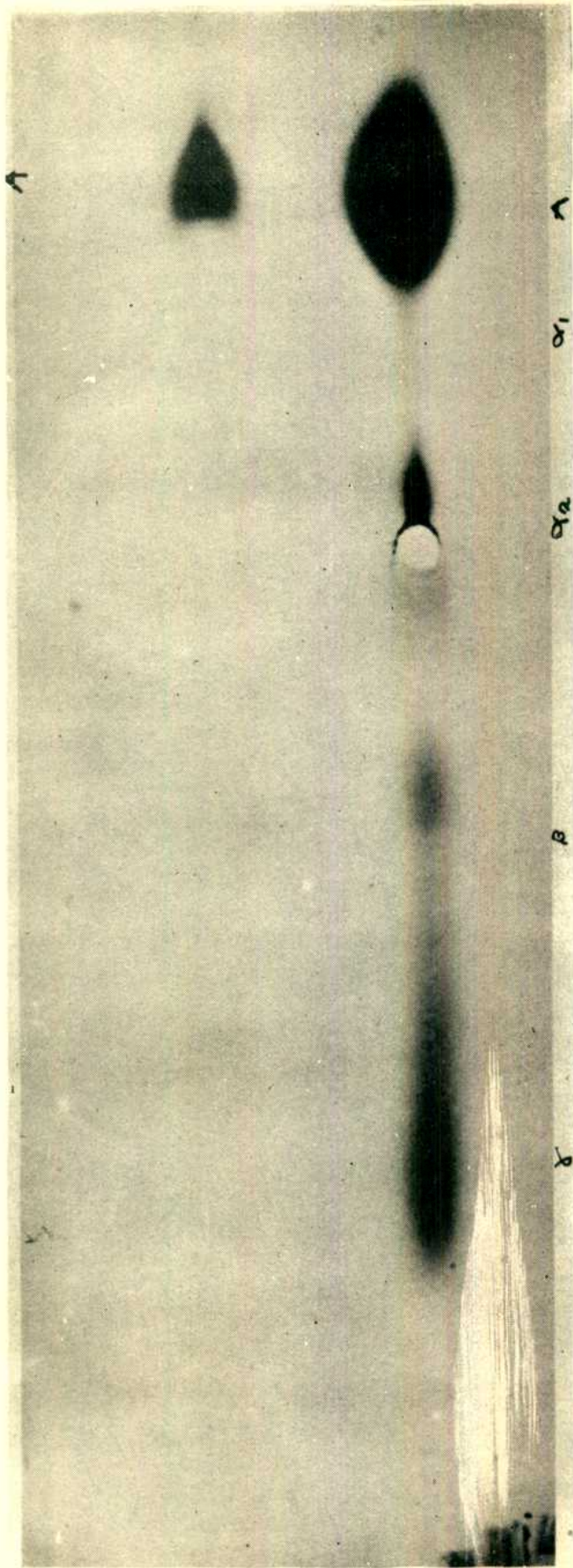


suero

orina

(2')

No se ve la identidad en la albúmina

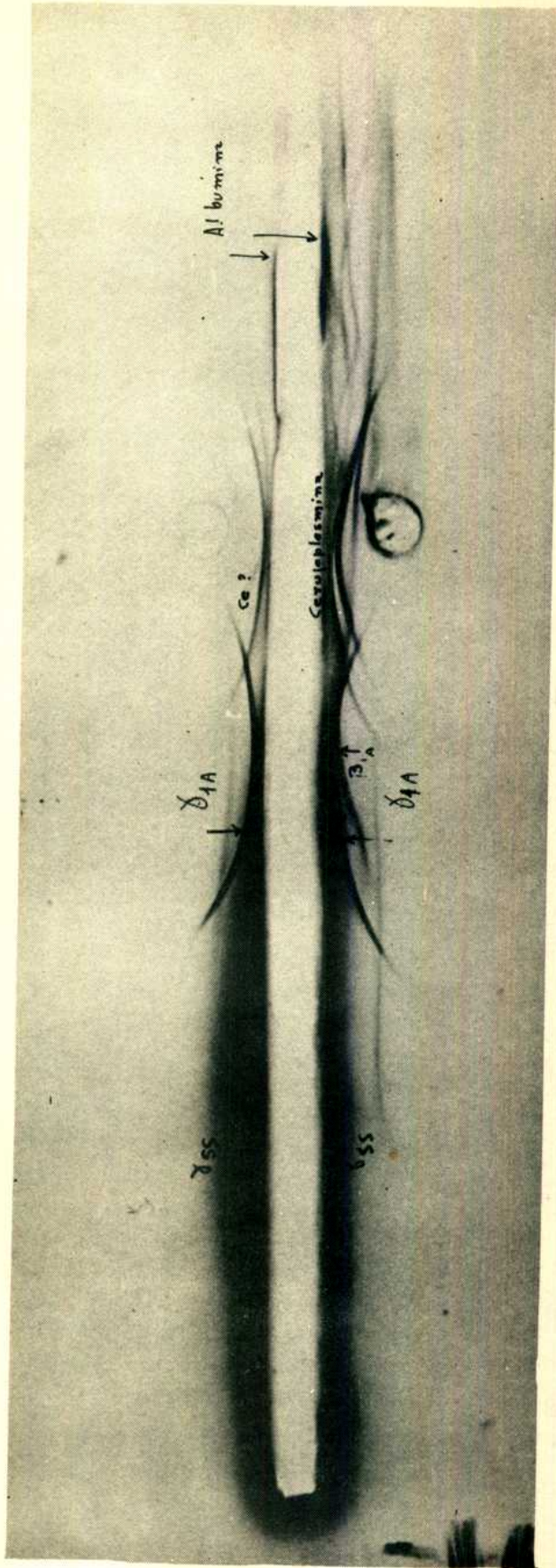


suero

orina

(9)

|       | Albumina | Globulinas |            |         |          |
|-------|----------|------------|------------|---------|----------|
|       |          | $\alpha_1$ | $\alpha_2$ | $\beta$ | $\gamma$ |
| suero | ++       | +          | +          | +       | ++       |
| orina | ++       | -          | -          | -       | -        |

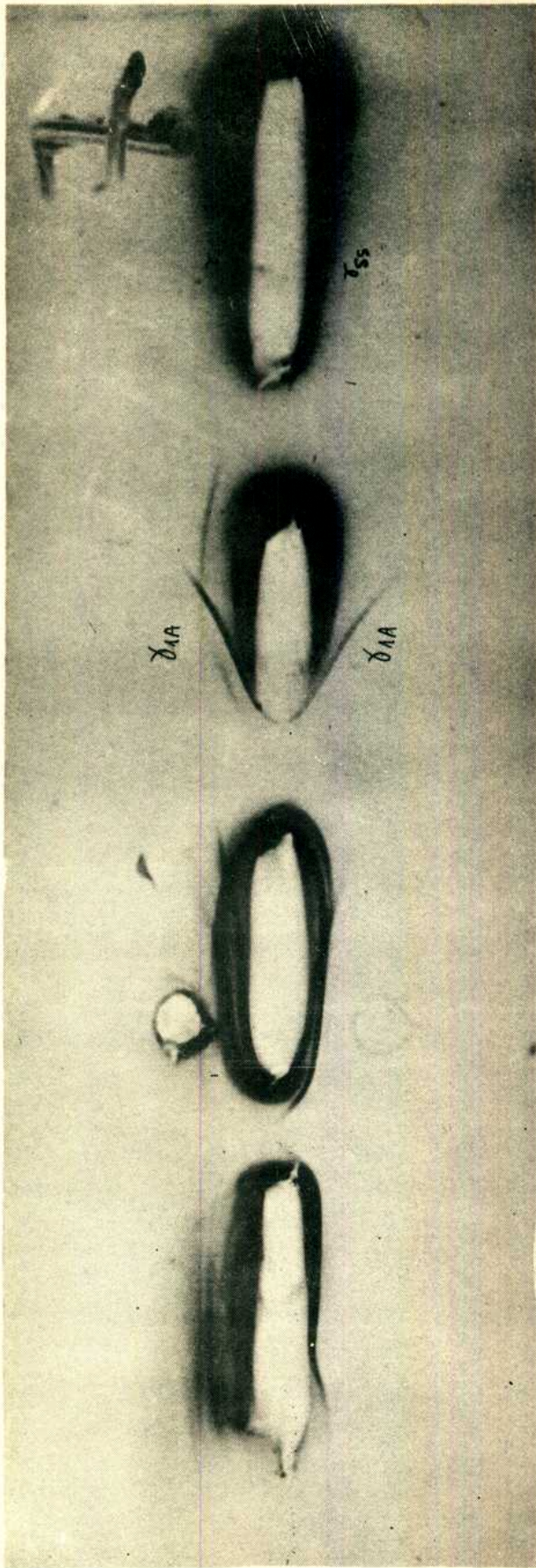


suero

orina

(9)

|       | p | Ab | $\alpha_1$ |      |  | $\alpha_2$ |              |              | $\beta_1$ |   |   | Inmunoglobulinas |               |               |   |
|-------|---|----|------------|------|--|------------|--------------|--------------|-----------|---|---|------------------|---------------|---------------|---|
|       |   |    | Gli-co     | Lipo |  | Lipo       | Ma-croplasma | Haptoglobina | Sidero    | B | A | $\beta_{1A}$     | $\delta_{1M}$ | $\gamma_{ss}$ |   |
| suero |   | +  |            |      |  |            | ++           |              |           | + |   | ++               |               |               | + |
| orina |   | +  |            |      |  |            | +            | ?            |           | - |   | ++               |               |               | + |



svero

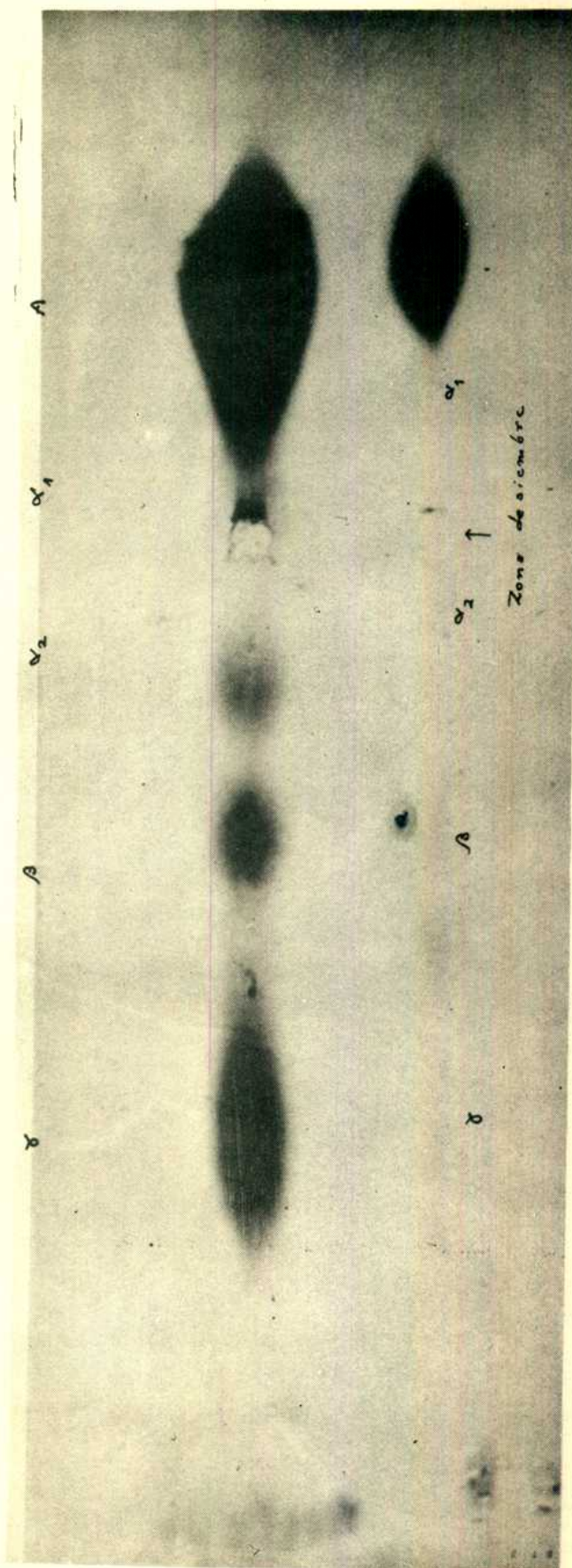
orina

(9')

Líneas de la  $\infty$  incompletas



suero y orina del mismo enfermo

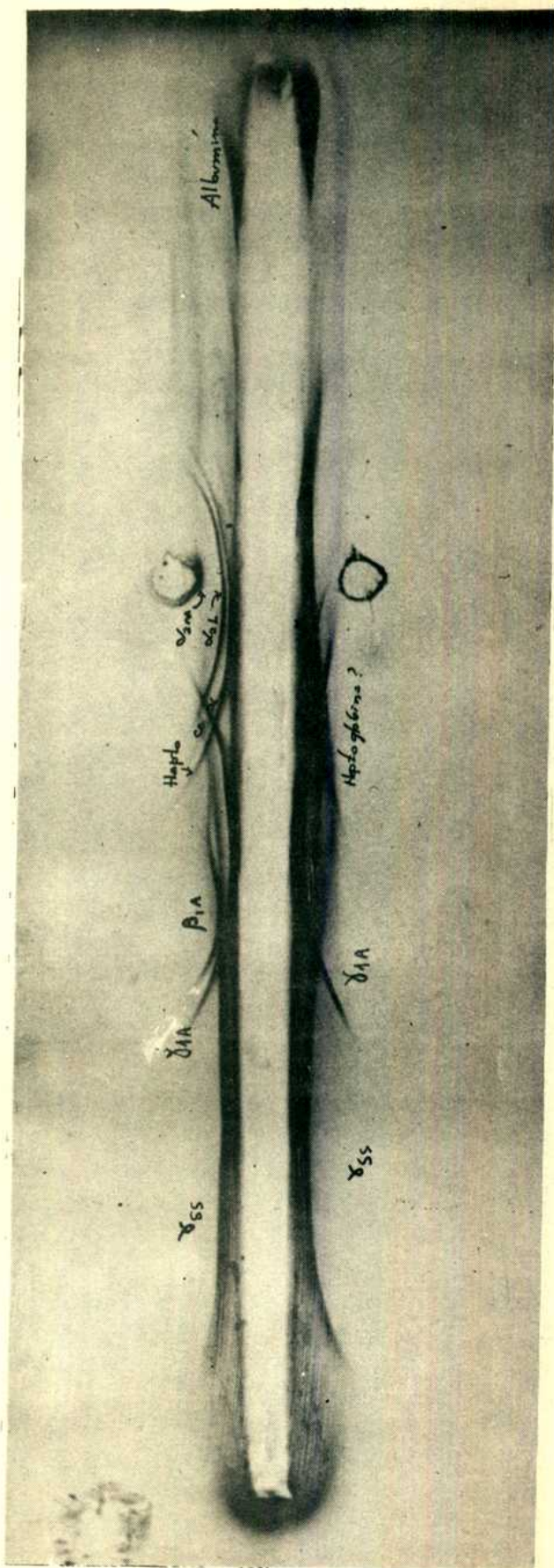


suero

orina

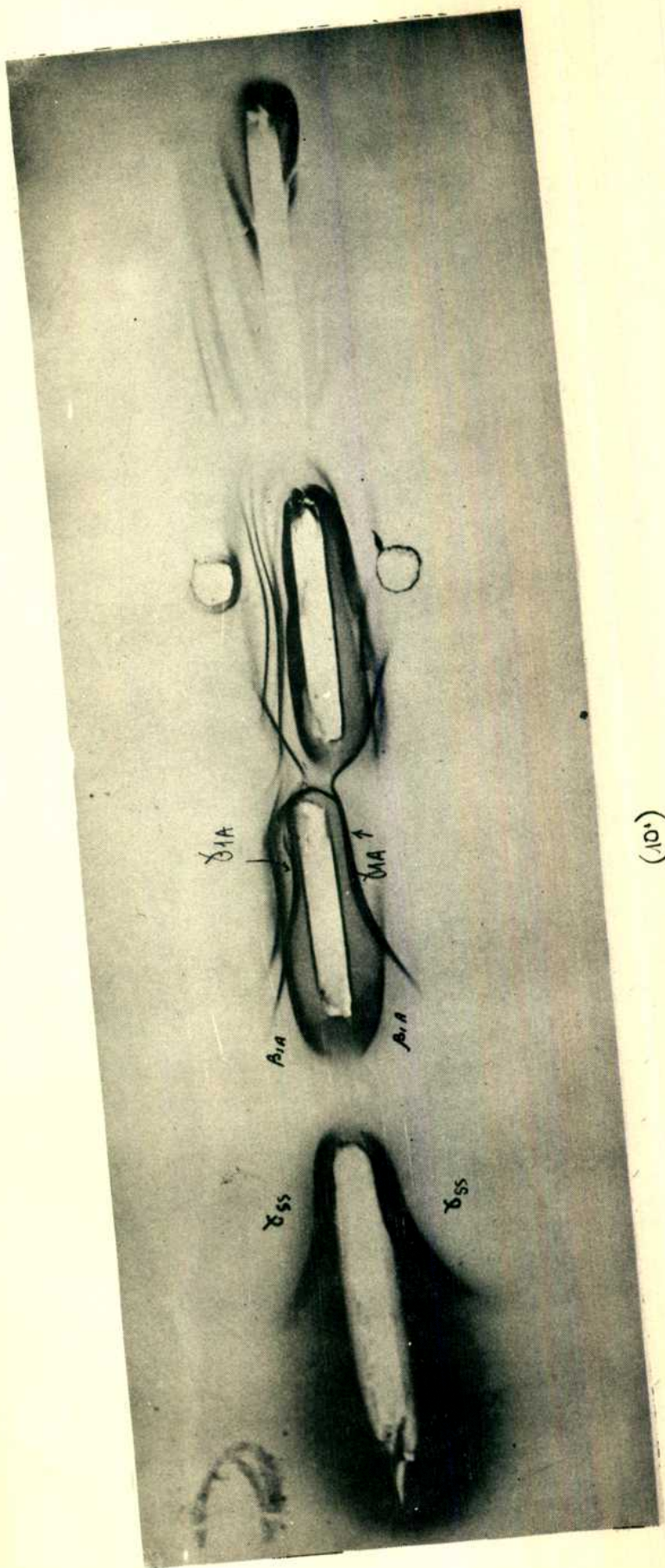
(10)

|       | Albumina | Globulinas |            |         |          |
|-------|----------|------------|------------|---------|----------|
|       |          | $\alpha_1$ | $\alpha_2$ | $\beta$ | $\gamma$ |
| suero | ++       | +          | +          | +       | ++       |
| orina | ++       | +-         | +-         | +       | +-       |



(10)

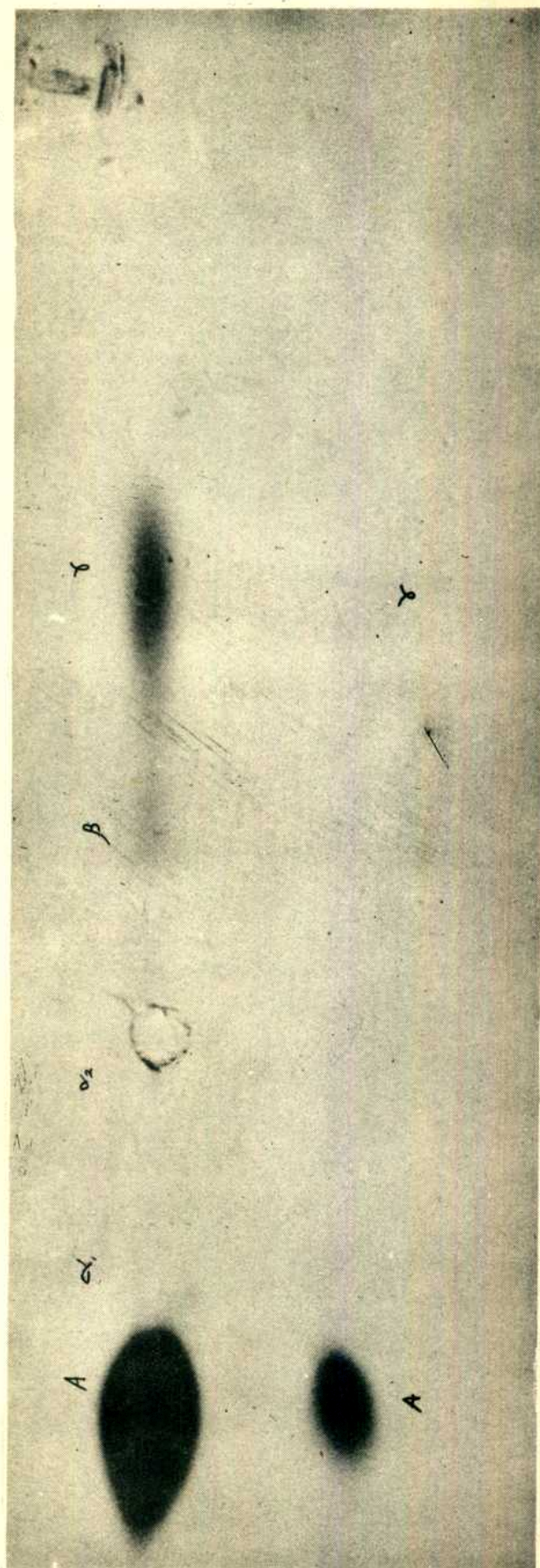
|       | p | Ab | $\alpha_1$ |       |  | $\alpha_2$ |        |              |              | $\beta_1$ |   |   | Inmunoglobulinas |               |               |   |   |   |
|-------|---|----|------------|-------|--|------------|--------|--------------|--------------|-----------|---|---|------------------|---------------|---------------|---|---|---|
|       |   |    | Gli-co     | Li-po |  | Li-po      | Ma-cro | Ceruloplasma | Haptoglobina | Side-ro   | B | A | $\gamma_{IA}$    | $\gamma_{IM}$ | $\gamma_{SS}$ |   |   |   |
| suero |   | +  |            |       |  |            |        |              | +            |           |   | + | ++               |               | +             | + | + |   |
| orina |   | +  |            |       |  |            |        |              |              | +         | ? |   |                  |               | -             | + | + | + |



(10')

Suero

orina



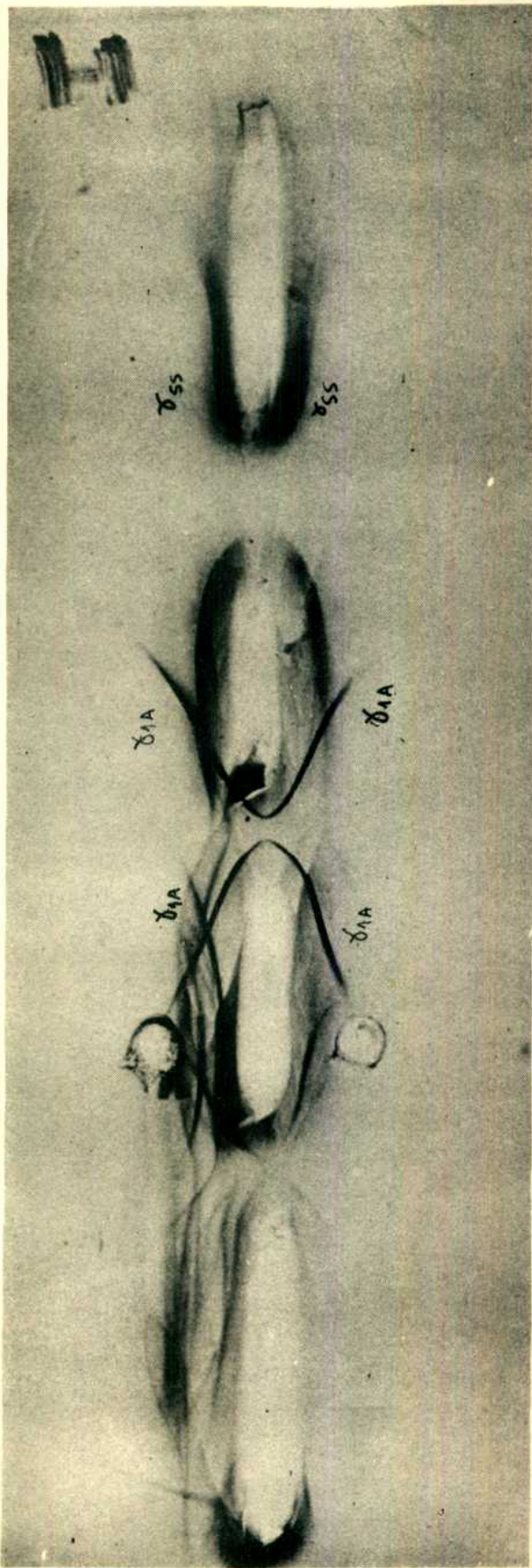
suero

orina

(11)

|       | Albumina | Globulinas     |                |   |   |
|-------|----------|----------------|----------------|---|---|
|       |          | α <sub>1</sub> | α <sub>2</sub> | β | γ |
| suero | ++       | +              | +              | + | + |
| orina | +        | -              | -              | - | + |





(11')

svero

orina

|       | N. | Albúmina | Globulinas |            |           |           |          |
|-------|----|----------|------------|------------|-----------|-----------|----------|
|       |    |          | $\alpha_1$ | $\alpha_2$ | $\beta_1$ | $\beta_2$ | $\gamma$ |
| suero | 1  | ++       | +          | ++         |           | +         | ++       |
| orina | 1  | ++       | +          | +          |           | +         | +        |
| suero | 2  | ++       | +          | ++         |           | +         | ++       |
| orina | 2  | ++       | -          | -          |           | -         | -        |
| suero | 3  | ++       | +          | ++         |           | +         | ++       |
| orina | 3  | ++       | -          | -          |           | -         | -        |
| suero | 4  | ++       | +          | +          |           | +         | +        |
| orina | 4  | ++       | -          | -          |           | +         | -        |
| suero | 5  | ++       | ++         | ++         |           | ++        | ++       |
| orina | 5  | ++       | -          | -          |           | +         | -        |
| suero | 6  | ++       | +          | +          |           | +         | +        |
| orina | 6  | ++       | +          | +          |           | +         | ++       |
| suero | 7  | ++       | +          | +          |           | ++        | +        |
| orina | 7  | ++       | +          | +          |           | ++        | +        |
| suero | 8  | ++       | +          | +          |           | +         | +        |
| orina | 8  | +        | -          | -          |           | -         | -        |
| suero | 9  | ++       | +          | +          |           | +         | ++       |
| orina | 9  | ++       | -          | -          |           | -         | -        |
| suero | 10 | ++       | +          | +          |           | +         | ++       |
| orina | 10 | ++       | ±          | ±          |           | +         | ±        |
| suero | 11 | ++       | ±          | ±          |           | +         | +        |
| orina | 11 | +        | -          | -          |           | -         | ±        |

|       | N. | $\rho$ | $\alpha_1$ |             |    |  | $\alpha_2$ |            |                  |                   | $\beta_1$   |   |    | Inmunoglobulinas |              |               |
|-------|----|--------|------------|-------------|----|--|------------|------------|------------------|-------------------|-------------|---|----|------------------|--------------|---------------|
|       |    |        | Ab         | Gli<br>copo | Li |  | Li-<br>po  | Ma-<br>cro | Cervloplas<br>ma | Haptoglo-<br>bina | Side-<br>ro | B | A  | $\gamma_1$ A     | $\gamma_1$ M | $\gamma_{ss}$ |
| suero | 1  |        | ++         | ++          | +  |  | ++         | ++         | ++               | ++                |             |   | ++ | ++               |              | ++            |
| orina | 1  |        | ++         | ++          | -  |  | -          | ++         | -                | ++                |             |   | -  | ++               |              | ++            |
| suero | 2  |        | ++         | +           | -  |  | -          | ++         | ++               | ++                |             |   | +  | ++               |              | +             |
| orina | 2  |        | ++         | +           | -  |  | -          | -          | -                | -                 |             |   | -  | ++               |              | +             |
| suero | 3  |        |            |             |    |  |            |            |                  |                   |             |   |    |                  |              |               |
| orina | 3  |        | ++         |             |    |  |            |            |                  |                   |             |   |    | ++               |              | ++            |
| suero | 4  |        | ++         |             |    |  | ++         |            |                  | ++                |             |   | ++ | ++               |              | ++            |
| orina | 4  |        | ++         |             |    |  | ++         |            |                  | -                 |             |   | -  | ++               |              | +             |
| suero | 5  |        | ++         |             |    |  |            |            |                  |                   |             |   | ++ | ++               |              | ++            |
| orina | 5  |        | +          |             |    |  |            |            |                  |                   |             |   | -  | ++               |              | +             |
| suero | 6  |        | +          |             |    |  |            |            |                  |                   |             |   | ++ | ++               |              | ++            |
| orina | 6  |        | +          |             |    |  |            |            |                  |                   |             |   | +  | -                |              | ++            |
| suero | 7  |        | +          | +           | ?  |  |            |            |                  | +                 | ?           |   | +  | +                |              | +             |
| orina | 7  |        | +          | +           | ?  |  |            |            |                  | +                 | ?           |   | -  | +                |              | +             |
| suero | 8  |        | ++         |             |    |  |            |            |                  |                   |             |   | +  | ++               |              | +             |
| orina | 8  |        | ++         |             |    |  |            |            |                  |                   |             |   | +  | ++               |              | +             |
| suero | 9  |        | +          |             |    |  |            |            |                  | ++                |             |   | +  | ++               |              | +             |
| orina | 9  |        | +          |             |    |  |            |            |                  | +                 | ?           |   | -  | ++               |              | +             |
| suero | 10 |        | +          |             |    |  |            |            |                  | +                 |             |   | +  | ++               |              | ++            |
| orina | 10 |        | +          |             |    |  |            |            |                  | +                 | ?           |   | -  | ++               |              | ++            |
| suero | 11 |        |            |             |    |  |            |            |                  | +                 |             |   | +  | ++               |              | +             |
| orina | 11 |        |            |             |    |  |            |            |                  | +                 |             |   | -  | ++               |              | +             |



**G - INTERPRETACION DE LOS RESULTADOS DEL ANALISIS ELECTROFORETICO E INMUNOELECTROFORETICO DE CONCENTRADOS PROTEICOS URINARIOS**

- 1) El fraccionamiento paralelo por electroforesis en placas de agar de las proteínas del suero y de los componentes proteicos urinarios, muestran la existencia de fracciones, que migran en posiciones idénticas, lo que indica igualdad en el comportamiento electroforético.
- 2) Las globulinas  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\delta$  del suero, son las que se encuentran en la orina, en la misma forma que la albúmina, siendo ésta la más frecuente, siguiéndole en orden la fracción beta y la menos frecuente es la gamma.
- 3) El fraccionamiento inmunolectroforético paralelo de las proteínas del suero y de los concentrados proteicos urinarios muestran líneas de precipitación en idéntica posición, lo que indica igualdad en el comportamiento antigénico.
- 4) La identidad inmunológica de las fracciones obtenidas de las proteínas del suero y de los concentrados proteicos urinarios se estableció colocando el anti-suero en cuatro receptáculos, habiéndose observado la unión de las líneas de precipitación de las fracciones del suero y de la orina.

Ver fotografías 3', 5', 7', 8', 9', 10', 11'.

Estudiando los proteinogramas de la orina y sus fraccionamientos inmunolectroforéticos, se observa en algunos casos ausencia de globulinas que se visualizan por inmunolectroforesis. Tal es el caso del cuadro de los proteinogramas 2, 3, 4, 5, 8 y 9 donde el proteinograma no revela la presencia de la globulina gamma, apareciendo en cambio nítidamente en el fraccionamiento inmunolectroforético.

Teniendo presente las variaciones del proteinograma del suero y de la orina en la nefrosis, donde el fraccionamiento electroforético nos muestra que en la orina aparecen las mismas fracciones que en el suero, con la particularidad de que la fracción, que se presenta en mayor proporción en la orina es la albúmina y que las globulinas alfa y beta que constituyen la mayor proporción de las existentes en el suero, aparecen en mínima cantidad en la orina; la globulina gamma se encuentra en la orina en proporción similar al suero.

Este es el prototipo del proteinograma plasmático y urinario en la nefrosis. En la nefritis el proteinograma urinario es similar al del suero, con pequeñas diferencias cuantitativas; existiendo una tendencia al aumento de globulina gamma. Caspani, Blackmann y Davis (20) señalaron que precisamente el aumento de globulina gamma en el proteinograma urinario, sería un signo

de mal pronóstico en la nefritis; es decir que la proteinuria constituida casi electroforéticamente por albúmina representará un índice de permeabilidad glomerular sin insuficiencia renal, de mejor pronóstico que la proteinuria en la que aumenta la globulina gamma.

Los mismos autores señalan que el proteinograma urinario de la nefritis podría aportar elementos para el juicio pronóstico; por otra parte Caspani observa que el estudio del proteinograma del suero comparativamente al de la orina puede servir para el diagnóstico diferencial entre la fase aguda o crónica de la nefritis, ya que en el primer caso la proteinuria está casi exclusivamente constituida por albúmina, apareciendo las globulinas, especialmente la gamma en las nefritis crónicas.

De esto se deduce la importancia que puede alcanzar la inmunoelectroforesis de la orina, ya que en muchos casos falta en el proteinograma urinario fraccionamientos globulínicos que se visualizan por el análisis inmunoelectroforético.

## H - VALORACION DE PROTIDOS TOTALES EN ORINA. ENSAYO COMPARATIVO DE DIVERSOS METODOS

En el presente ensayo hemos comparado algunos métodos sencillos propuestos por autores diversos, para la determinación cuantitativa de protidos en orina.

El método de Esbach, que involucra el uso del albuminómetro del mismo nombre, acusa por lo general resultados erróneos (errores que pueden llegar al 50%), ya sea que se utilice el albuminómetro original de ese autor o bien el reactivo del mismo nombre con el albuminómetro de Aufrecht. Este último permite una centrifugación del precipitado, lo cual abrevia el procedimiento; pero los albuminómetros de Esbach-Aufrecht del comercio poseen la extremidad inferior redondeada y una graduación deficiente, lo cual hace prácticamente imposible apreciar pequeños cambios en el contenido de albúmina y por lo tanto contribuye a aumentar el error del método; a pesar de ello este método es ampliamente usado en los laboratorios corrientes de análisis clínicos.

Tratando de salvar el error que se comete usando los albuminómetros de Esbach-Aufrecht del comercio, se compararon algunos métodos sencillos de valoración de protidos urinarios con el método de Kjeldhal.

Para ello se construyó un tubo de centrifuga especial, tal como el que utilizaron Shevsky-Stafford en la técnica descrita en la página 16.

Se determinó por triplicado el contenido de proteínas de sueros humanos por el método de Kjeldahl utilizando luego dicho suero para determinar el factor de cada uno de los tubos de Shevsky-Stafford. Se trabajó con cuatro tubos numerados 1-2-3-4 y con diluciones del suero correspondientes a 0,72 gr. o/oo; 1,44 gr. o/oo; 2,16 gr. o/oo y 2,88 gr. o/oo de proteínas.

Las lecturas en los tubos fueron las siguientes:

| Tubo nro. | Proteínas           |                     |                     |                     |
|-----------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
|           | 0,72<br>gr. por mil | 1,44<br>gr. por mil | 2,16<br>gr. por mil | 2,88<br>gr. por mil |
| 1         | 0,1                 | 0,2                 | 0,3                 | 0,38                |
| 2         | 0,1                 | 0,2                 | 0,3                 | 0,38                |
| 3         | 0,1                 | 0,19                | 0,3                 | 0,38                |
| 4         | 0,1                 | 0,2                 | 0,3                 | 0,38                |

Considerando: Factor  $\frac{\text{concentración}}{\text{lectura}}$  el factor para el tubo

Nro. 1 sería 7, 3; para el  
 Nro. 2 sería 7, 3; para el  
 Nro. 3 sería 7, 4 y para el  
 tubo nro. 4 sería 7, 3. -

Por los resultados que anteceden se consideró la cifra 7, 3 como factor para los cuatro tubos.

Se realizaron luego determinaciones comparativas en diversas orinas albuminúricas, con las siguientes técnicas:

- a) Método volumétrico de Shevsky-Stafford con el reactivo de Tsuchiya.
- b) Método volumétrico de Shevsky-Stafford con el reactivo de Esbach.
- c) Método volumétrico de Esbach con el tubo de Aufrecht.
- d) Método nefelométrico de la formacina.

Los resultados se detallan a continuación:

| Método de Shevsky-Stafford. |        |                         | Método de Shevsky-Stafford. |        |                         | Método de Esbach. | Método de la formazina |
|-----------------------------|--------|-------------------------|-----------------------------|--------|-------------------------|-------------------|------------------------|
| Reactivo de Tsuchiya.       |        |                         | Reactivo de Esbach.         |        |                         | Tubo de Aufrecht. |                        |
| Lectura                     | Factor | Lectura x 7,3 gr. x mil | Lectura                     | Factor | Lectura x 15,6 g. x mil | gr. por mil       | gr. por mil            |
| 0,36                        | 7,3    | 2,63                    | 0,15                        | 15,6   | 2,34                    | ---               | 3,00                   |
| 0,35                        | 7,3    | 2,55                    | ---                         | ---    | ---                     | ---               | 2,50                   |
| 0,25                        | 7,3    | 1,82                    | 0,12                        | 15,6   | 1,87                    | ---               | 2,00                   |
| 0,15                        | 7,3    | 1,09                    | 0,07                        | 15,6   | 1,09                    | ---               | 1,00                   |
| 0,60                        | 7,3    | 4,38                    | 0,24                        | 15,6   | 3,75                    | ---               | 5,00                   |
| 0,10                        | 7,3    | 0,73                    | 0,04                        | 15,6   | 0,62                    | ---               | 0,75                   |
| 0,50                        | 7,3    | 3,65                    | 0,30                        | 15,6   | 4,68                    | ---               | 4,00                   |
| 0,15                        | 7,3    | 1,09                    | 0,08                        | 15,6   | 1,24                    | ---               | 1,00                   |
| 0,18                        | 7,3    | 1,31                    | 0,10                        | 15,6   | 1,56                    | ---               | 1,50                   |
| 0,50                        | 7,3    | 3,65                    | 0,21                        | 15,6   | 3,27                    | ---               | 4,00                   |
| 0,37                        | 7,3    | 2,70                    | 0,20                        | 15,6   | 3,12                    | ---               | 3,00                   |

| Método de Shevsky-Stafford. |        |                           | Método de Shevsky-Stafford. |        |                            | Método de Esbach. | Método de la formazina |
|-----------------------------|--------|---------------------------|-----------------------------|--------|----------------------------|-------------------|------------------------|
| Reactivo de Tsuchiya        |        |                           | Reactivo de Esbach.         |        |                            | Tubo de Aufrecht. |                        |
| Lectura                     | Factor | Lectura x 7,3 gr. por mil | Lectura                     | Factor | Lectura x 15,6 gr. por mil | gr. por mil       | gr. por mil            |
| 0,35                        | 7,3    | 2,55                      | 0,18                        | 15,6   | 2,80                       | ---               | 2,50                   |
| 0,50                        | 7,3    | 3,65                      | 0,22                        | 15,6   | 3,43                       | ---               | 3,50                   |
| 0,15                        | 7,3    | 1,09                      | 0,08                        | 15,6   | 1,24                       | 0,50              | 1,00                   |
| 0,07                        | 7,3    | 0,51                      | 0,04                        | 15,6   | 0,62                       | 0,50              | 0,50                   |
| 0,15                        | 7,3    | 1,09                      | 0,98                        | 15,6   | 1,24                       | 0,70              | 1,00                   |
| 0,25                        | 7,3    | 1,82                      | 0,11                        | 15,6   | 1,71                       | 1,00              | 2,00                   |
| 0,18                        | 7,3    | 1,31                      | 0,08                        | 15,6   | 1,24                       | 0,70              | 1,50                   |
| 0,35                        | 7,3    | 2,55                      | 0,18                        | 15,6   | 2,80                       | 1,50              | 2,50                   |
| 0,58                        | 7,3    | 4,23                      | 0,30                        | 15,6   | 4,68                       | 2,50              | 5,00                   |
| 0,37                        | 7,3    | 2,70                      | 0,18                        | 15,6   | 2,80                       | 1,70              | 3,00                   |
| 0,16                        | 7,3    | 1,17                      | 0,08                        | 15,6   | 1,24                       | 1,00              | 1,15                   |
| 0,03                        | 7,3    | 0,22                      | 0,02                        | 15,6   | 0,31                       | 0,16              | 0,24                   |
| 0,05                        | 7,3    | 0,36                      | 0,02                        | 15,6   | 0,31                       | 0,27              | 0,40                   |
| 0,37                        | 7,3    | 2,70                      | 0,21                        | 15,6   | 3,27                       | 2,50              | 3,00                   |
| 0,02                        | 7,3    | 0,15                      | 0,01                        | 15,6   | 0,15                       | 0,07              | 0,15                   |
| 0,10                        | 7,3    | 0,73                      | 0,05                        | 15,6   | 0,78                       | 0,50              | 0,70                   |
| 0,30                        | 7,3    | 2,20                      | 0,15                        | 15,6   | 2,34                       | 1,60              | 2,40                   |

De acuerdo a los resultados que anteceden, se pone en evidencia cierta relación entre las lecturas de los tubos de Shevsky-Stafford con el reactivo de Tsuchiya y con el reactivo de Esbach.

En todos los casos estudiados las lecturas con los tubos de Shevsky-Stafford y el reactivo de Esbach, fueron aproximadamente la mitad de las lecturas observadas en los mismos tubos, pero con el reactivo de Tsuchiya.

Es así que se buscó para el método de Shevsky-Stafford con el reactivo de Esbach, un factor empírico que multiplicado por la lectura nos aproximara a la concentración real de los prótidos de la orina; para nuestros casos ese factor fué de 15,6.

Resumiendo: Podemos aconsejar por su rapidez y exactitud el método de Shevsky-Stafford con el reactivo de Tsuchiya, observando ciertas precauciones que los autores recomiendan como ser; el tiempo de centrifugación que debe ser de 15 minutos; el número de revoluciones 1.800 y el tiempo transcurrido entre la mezcla de la orina con el reactivo y la centrifugación, que debe ser exactamente 1 minuto.

## I - ESTUDIO ESTADISTICO

$\bar{z}$  : es la media de las desviaciones entre el método considerado y el patrón en nuestra muestra

Es una estimación de  $\mu$ : valor medio de las desviaciones entre el método considerado y el patrón; pero una estimación puntual no tiene mucho sentido sino se da una idea de la magnitud del posible error, por consiguiente se trabajará con los llamados intervalos de confianza.

Están determinados por dos límites donde razonablemente puede esperarse que  $\mu$  esté contenido.

Razonablemente significa con una probabilidad del 95%.

Ejemplo: el intervalo de confianza

$$L_I \leq \mu \leq L_S$$

Significa que

$$P(L_I \leq \mu \leq L_S) = 95\%$$

$L_I$  : límite de confianza inferior)

$L_S$ : límite de confianza superior)

En nuestro caso:

$$L_S = \bar{x} + t_p \frac{S}{\sqrt{n-1}}$$

$$L_I = \bar{x} - t_p \frac{S}{\sqrt{n-1}}$$

donde  $\bar{x}$  : valor medio

$S$  : desvío standard

$n$  : número de lecturas

$t_p$ : cte. que depende de  $n$  y de la probabilidad de que  $\mu$  pertenece al intervalo (95%)

Intervalos de confianza

$$\text{L\u00edmites} \quad L_I = \bar{x} \pm t_p \frac{S}{\sqrt{n-1}}$$

M\u00e9todo de Shevsky-StaffordReactivo de Esbach

$$L_S = 0,0900 + \frac{\sqrt{1,0011}}{\sqrt{26}} \quad 2,06$$

$$= 0,0900 \pm \frac{1,0020}{5,0990} \quad 2,06 = 0,0900 \pm 0,4048$$

$$L_S = 0,4948$$

$$L_I = -0,3148$$

M\u00e9todo de EsbachTubo de Aufrecht

$$L_S = 0,5087 \pm \frac{\sqrt{0,2278}}{\sqrt{14}} \quad 2,14$$

$$= -0,5087 \pm \frac{0,4773}{3,7417} \quad 2,14 = -0,5087 \pm 0,2739$$

$$L_S = -0,2348$$

$$L_I = -0,7826$$

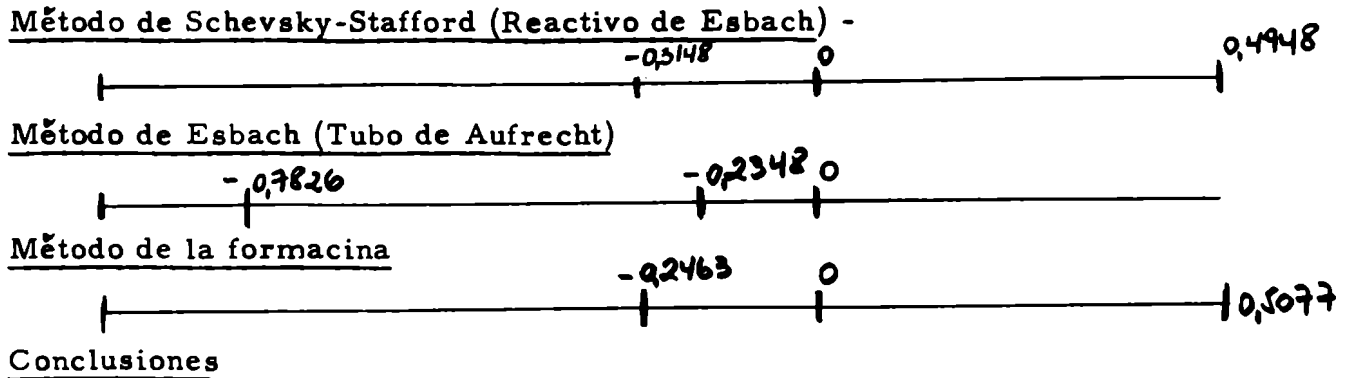
M\u00e9todo de la Formacina

$$L_S = 0,1307 + \frac{\sqrt{0,9131}}{\sqrt{27}} \quad 2,05$$

$$= 0,1307 \pm \frac{0,9556}{5,1962} \quad 2,05 = 0,1307 \pm 0,3770$$

$$L_S = 0,5077$$

$$L_I = -0,2463$$



La hipótesis que no existe desviación entre el método patrón con el de Shevsky Stafford y con el de la Formacina es aceptable. En general sabemos que esa desviación está para el primero entre  $-0,3148$  y  $0,4908$  y para el segundo entre  $-0,2463$  y  $0,5077$ .

Para el método de Esbach (Tubo de Aufrecht) estimamos una desviación permanente que con probabilidad del 95% estará por debajo de los valores del método patrón entre  $-0,7826$  y  $-0,2348$ .

Si a los valores obtenidos por este método se les suma  $0,50$  aproximadamente, se pueden obtener valores más exactos que en los otros dos.

#### Factor 15,6

Haciendo un estudio de dicho factor tal que obtengamos una desviación nula del método de Shevsky Stafford (Reactivo de Esbach) relativo al patrón obtuvimos que está calculado con todas sus cifras exactas, y el error podría producirse en la segunda cifra decimal.



## IV

CONCLUSIONESElectroforesis e inmunolectroforesis de proteínas urinarias.

1. - Se obtienen concentrados proteicos urinarios en 8 a 10 horas utilizando tubos de diálisis (Visking Dialysis Tubing 1/4" de diámetro) rodeados de Polivinil Pirrolidona o Carbowax 20 M. La concentración proteica urinaria obtenida es de 4 a 6 gramos por cien mililitros de orina.

2. - Se efectúa el fraccionamiento paralelo por electroforesis en placa de agar de las proteínas del suero humano normal y de los concentrados proteicos urinarios observando identidad en el comportamiento electroforético (migran en posiciones idénticas).

3. - Se encuentran en la orina la albúmina y las globulinas alfa, beta y gamma del suero, siendo la primera la más frecuente, siguiéndole la fracción beta y por último la gamma.

4. - El fraccionamiento inmunolectroforético paralelo de las proteínas del suero y de los concentrados proteicos urinarios revelan la identidad inmunológica de las fracciones proteicas del suero y de la orina.

5. - Se visualizan por inmunolectroforesis de los concentrados proteicos urinarios fraccionamientos globulínicos que no se observan en el fraccionamiento electroforético, tal es el caso de la globulina gamma.

Valoración de prótidos urinarios

6. - Se compararon algunos métodos sencillos de valoración de prótidos urinarios, con el método de Kjeldahl. Para ello, se construyó un tubo de centrifuga especial, diseñado por Mac Kay.

7. - Se determinó por triplicado el contenido de proteínas de sueros humanos, por el método de Kjeldahl, utilizando luego dicho suero, para determinar el factor de cada uno de los tubos mencionados en el párrafo 6.

Se trabajó con cuatro tubos y diluciones del suero correspondientes a: 0.72 gr o/oo; 1.44 gr o/oo; 2.16 gr o/oo y 2.88 gr o/oo de proteínas.

Los factores para cada uno de los tubos resultaron: 7.3; 7.3; 7.4; y 7.3. Se consideró la cifra 7.3 como factor para los cuatro tubos.

8. - Se realizaron determinaciones comparativas de proteínas de diversas orinas, con las siguientes técnicas:

- a) Método volumétrico de Shevsky-Stafford con el reactivo de Tsuchiya.
- b) Método volumétrico de Shevsky-Stafford con el reactivo de Esbach.
- c) Método volumétrico de Esbach con el tubo de Aufrecht.
- d) Método nefelométrico de la formazina.

9. - Podemos aconsejar por su rapidez y exactitud al método de Shevsky-Stafford con el reactivo de Tsuchiya, observando ciertas precauciones que los autores recomiendan, como ser: el tiempo de centrifugación que debe ser de 15 min., el número de revoluciones 1800 y el tiempo transcurrido entre la mezcla de la orina con el reactivo y la centrifugación, que debe ser exactamente un minuto.

10.- El método de la formazina si bien acusa resultados satisfactorios tiene el inconveniente de que los tubos testigos son de dificultosa preparación y de vida precaria.

*Tsuchiya*

BIBLIOGRAFIA

1. - MARENZI, CARDINI, etc. Bioquímica Analítica Cuantitativa p. 395. Edit. "El Ateneo". Bs. As. (1947).
2. - SHEVSKY y STAFFORD, "A Clinical Method for Determination of Protein in Urine and Other Body Fluids" Arch. Int. Med 32, 222, (1923).
3. - RIGAS D. A. Y HELLER C. G. : J. Clin. Invest. 30, 853 (1951).
4. - SLATER y KUNKEL H. : J. Lab. Clin. Med. 41, 619 (1953).
5. - GRANT G. H. : J. Clin. Path. 10, 360 (1957) y 12, 510 (1959).
6. - TAMMI. y HORSFALL F. L. : J. Exp. Med. 95, 71, (1952).
7. - BOYCE W. H. , GARVEY F. K. y NORFLEET C. M. : J. Clin. Invest. 33, 1287, (1954).
8. - PATTE J. C. : Rev. Fr. Et. Clin. Biol. , 3, 960, (1958).
9. - HEREMANS , J. F. : Acta Med. Scand. , Suppl. 367 (1961).
10. - HARTMANN L. : Rev. Fr. Et. Clin. Biol 3, 1052 (1958).
11. - GRABAR P. y BURTIN P. "Analyse Immuno-Electrophoretic" p. 231 Edit. Masson et. Cie. Paris. (1960).
12. - SMITHIES O. : Biochem. J. 61, 629 (1955).
13. - CLAUSEN J. : "Immuno-electrophoresis. A Survey of its Application in Clinical Chemistry Science Tools 10, Nro. 3, (1963).
14. - GRASS J. : "Proteínas plasmáticas" - Edt. Jims, Barcelona (1961).
15. - FOLIN O. Y DENIS W. : "The Quantitative Determination of Albumin in Urine". J. Biol. Chem. 18, 273 (1914).
16. - PETERS Y VAN SLYKE. : "Cuantitative Clinical Chemistry" Vol II Baltimore (1932).
17. - HILLER A. : "Determinación of Albumin and Globulin in Urine". Soc. Exp. Biol. Med. 24, 385 (1927).
18. - KINGSBURY F. B. : "The Rapid Determination of Albumin in Urine". Lab.

Clin. Med., 11, 981 (1926).

19. - KING E. Y. : "Estimation of Protein in Urine and C. S. F. with Permanent Turbidimetric Standars of Perspex". Bioch. J. 48, 50 (1951).
- 20.- BLACKMANN, S. Y DAVIS B. :J. Clin. Invest. 22, 545 (1943).
- 21.- MIATELLO, MORELLI, etc. : "Nefrología" p. 122 Edit. Intermédica, Buenos Aires (1963).
22. - SHULTZE H. E. : Clin. Chim. Acta 4 , 609 (1959).
- 23.- URIEL J, GRABAR P: Ann. Inst. Pasteur: 90' , 427 (1956).
24. - MULLER - EBERHARD H. J. : J. Exp. Med. 111, 201 (1960).