

Análisis bioquímico de mioglobinuria asociada con rabdomiolisis

Biochemical analysis of myoglobinuria associated with rhabdomyolysis

Análise bioquímica de mioglobinúria associada com rabdomiólise

► Agueda Rostagno^{1a}, Jorge Ghiso^{1a,b}

¹ Ph.D.

^a Departamento de Patología, New York University School of Medicine, New York, NY, 10016 USA.

^b Departamento de Psiquiatría, New York University School of Medicine, New York, NY, 10016 USA.

Resumen

La destrucción del músculo esquelético en la condición patológica conocida como rabdomiolisis resulta en la liberación al torrente sanguíneo de elevadas concentraciones de la proteína mioglobina de 17 kDa, la cual filtra libremente a través del glomérulo sobrepasando frecuentemente la capacidad de reabsorción del túbulo proximal. Por lo tanto, la identificación de mioglobina en orina es una herramienta esencial que complementa otros parámetros bioquímicos en el diagnóstico de la enfermedad. En el presente trabajo, mediante la combinación de electroforesis en geles de agarosa e inmunofijación empleando anticuerpos específicos, se provee evidencia directa de la presencia de mioglobina intacta en la orina de un paciente con insuficiencia renal aguda asociada a rabdomiolisis desencadenada por efecto secundario de una terapia reductora de lípidos. Los datos electroforéticos e inmunoquímicos fueron corroborados mediante secuencia N-terminal de aminoácidos, *immunoblot* y espectrometría de masa. La simple combinación de electroforesis e inmunofijación provee una estrategia flexible que puede extenderse a la identificación de diversas proteínas involucradas en proteinurias de sobrecarga.

Palabras clave: proteinograma * proteinurias de sobrecarga * mioglobinuria * rabdomiolisis

Summary

The destruction of skeletal muscle in a condition known as rhabdomyolysis results in the release into the blood stream of large quantities of the 17 kDa myoglobin that freely filtrates through the glomeruli, often overwhelming the capacity of the proximal tubule for reabsorption. As a result, identification of myoglobin in the urine becomes an essential tool to fully complement other biochemical parameters in the diagnosis of the disease. Using a combination of protein electrophoresis in agarose gels and immunofixation with specific

Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana

Incorporada al Chemical Abstract Service.

Código bibliográfico: ABCLDL.

ISSN 0325-2957

ISSN 1851-6114 en línea

ISSN 1852-396X (CD-ROM)

antibodies, direct evidence is provided for the presence of intact myoglobin in the urine of a patient with acute kidney injury due to rhabdomyolysis triggered by undesirable side effects of specific medications. The electrophoretic/immunochemical data was further corroborated by amino acid sequence, Western blot, and mass spectrometry analysis. The simple combination of electrophoresis and immunofixation protocols provides a flexible approach that can be extended to the identification of the various proteins known to be involved in overflow proteinuria.

Key words: *protein electrophoresis * overflow proteinuria * myoglobinuria * rhabdomyolysis*

Resumo

A destruição do músculo esquelético na condição patológica conhecida como rabdomiólise resulta na liberação ao torrente sanguíneo de elevadas concentrações da proteína mioglobina de 17 kDa a qual filtra livremente através do glomérulo ultrapassando frequentemente a capacidade de reabsorção do túbulo proximal. Portanto, a identificação de mioglobina em urina é uma ferramenta essencial que complementa outros parâmetros bioquímicos no diagnóstico da doença. No presente trabalho, mediante a combinação de eletroforese em géis de agarose e imunofixação empregando anticorpos específicos, é fornecida evidência direta da presença de mioglobina intacta na urina de um paciente com insuficiência renal aguda associada a rabdomiólise desencadeada por efeito secundário de uma terapia redutora de lipídeos. Os dados eletroforéticos e imunoquímicos foram confirmados mediante sequência N-terminal de aminoácidos, immunoblot e espectrometria de massa. A simples combinação de eletroforese e imunofixação fornece uma estratégia flexível que pode se estender à identificação de diversas proteínas envolvidas em proteinúrias de sobrecarga.

Palavras chave: *proteinograma * proteinúrias de sobrecarga * mioglobinúria * rabdomiólise*

Introducción

El proteinograma es una técnica versátil del laboratorio de análisis clínicos que se utiliza de forma rutinaria en el estudio de mezclas complejas de proteínas en fluidos biológicos -como suero, orina y líquido cefalorraquídeo- y que se basa en la carga eléctrica diferencial exhibida por los distintos componentes a un determinado pH. En términos generales, el perfil electroforético de proteínas plasmáticas se encuentra delineado por la distribución diferencial de 14 componentes principales (1). En condiciones normales, este perfil electroforético permanece relativamente constante; cambios en el número o concentración de los componentes se encuentran típicamente asociados a procesos patológicos, aunque en ciertos casos simplemente reflejan diferencias genéticas sin connotaciones patológicas. El análisis electroforético de proteínas es utilizado más frecuentemente cuando se investiga la presencia de componentes adicionales, típicamente ausentes en condiciones normales. En estos casos, la técnica se utiliza generalmente en combinación con estrategias de identificación adicionales que requieren el uso de anticuerpos específicos como en el caso de inmunoelectroforesis, inmunofijación, *immunoblot* o ELISA. El ejemplo clásico es la detección e identificación en suero u orina de componentes monoclonales, típicamente moléculas de inmunoglobulinas intactas

o fragmentadas y/o cadenas livianas libres, asociadas con discrasias de células plasmáticas (2).

La metodología es aún más relevante en situaciones en las cuales los componentes proteicos homogéneos no son inmunorreactivos con anticuerpos específicos contra las cadenas livianas o pesadas de moléculas de inmunoglobulinas. Es precisamente en estos casos cuando los datos clínicos juegan un papel preponderante en la selección adecuada del panel de anticuerpos que pueden incluir aquellos que reconocen proteínas asociadas a tumores como α -fetoproteína, lisozima o β 2-microglobulina, así como también moléculas involucradas en daño tisular, como por ejemplo amilasa, hemoglobina o mioglobina. El presente trabajo describe la estrategia bioquímica seguida para la identificación de mioglobina en orina en un caso reversible de rabdomiolisis desencadenada como efecto secundario de terapias reductoras de lípidos.

Materiales y Métodos

DATOS CLÍNICOS DEL PACIENTE

Se trató de un individuo de sexo masculino, de 65 años de edad, con historia de hipertensión y fibrilación atrial paroxismal, medicado con anti-hipertensivos y Coumadin que se presentó a un examen físico de rutina. Después de un análisis bioquímico general que reveló hipercolestero-

lemia e hipertrigliceridemia el paciente comenzó un tratamiento con estatinas suplementado con fibratos. A los tres meses, regresó a la sala de emergencias con síntomas severos de debilidad bilateral en las extremidades inferiores, lo que inicialmente hizo pensar en compresión de la espina dorsal originada por la presencia de un hematoma paraespinal resultante del tratamiento crónico con anticoagulantes. Los resultados del laboratorio al momento de la admisión revelaron elevados niveles séricos de transaminasas, urea y creatinina y orina color té oscuro con proteinuria. Los valores iniciales de creatinfosfoquinasa (CPK) se encontraron sumamente elevados (74.153 U/L) y continuaron aumentando hasta alcanzar un valor máximo tres días después (139.980 U/L). Muestras de suero, orina y líquido cefalorraquídeo fueron colectadas para su posterior análisis electroforético.

ANÁLISIS ELECTROFORÉTICO Y ESTUDIOS DE INMUNOFIJACIÓN.

El análisis electroforético de proteínas y los estudios de inmunofijación fueron realizados de modo semi-automático en soporte de agarosa utilizando el sistema electroforético Hydrasys (Sebia, Inc., Norcross, EE.UU.) de acuerdo con las instrucciones del fabricante (3). Para el análisis proteico se emplearon 10 µL de suero, líquido cefalorraquídeo concentrado 6X (contenido proteico original: 30 mg/dL), u orina de 24 horas concentrada 30X (contenido proteico original: 900 mg/24 h; volumen total 600 mL/24 h). Las muestras se aplicaron manualmente y, después de su difusión pasiva durante 5 min, fueron sometidas automáticamente a electroforesis (pH 8,6, 20W, 20 °C, 7 min), secado (65 °C, 10 min), teñido con negro amido (4 min) y secado final (75 °C, 8 min). Finalmente, los geles resultantes fueron digitalizados mediante el densitómetro Hyrys (Sebia, Inc., Norcross, EE.UU.).

Para el procedimiento de inmunofijación, seis alícuotas comparables de suero, líquido cefalorraquídeo concentrado y orina concentrada fueron separadas electroforéticamente (20W, 20 °C, 9 min) y sometidas cada una de ellas a reacción inmunológica individual con antisueros monoespecíficos contra las cadenas livianas (κ , λ) y pesadas (γ , α , μ) de inmunoglobulinas. Este procedimiento fue seguido por los pasos automáticos de teñido con azul violeta, secado y posterior digitalización. En un experimento paralelo, una muestra de orina concentrada fue sometida al protocolo de inmunofijación usando un anticuerpo policlonal anti-mioglobina (Dako) e idénticas condiciones experimentales como las descriptas más arriba.

DETERMINACIÓN DE LA SECUENCIA N-TERMINAL DE AMINOÁCIDOS

La secuencia N-terminal de la banda homogénea presente en orina se llevó a cabo usando el método de degradación automática de Edman empleando un Se-

cuenciador de Proteínas Procise 494 (Applied Biosystems, Foster City, EE.UU.). La muestra de orina concentrada (10 µL) se separó en geles de agarosa y se transfirió por contacto a membranas de fluoruro de polivinilideno (PVDF, Immobilon-P, Millipore Corp., Bedford, EE.UU.). La membrana fue rápidamente teñida con Azul de Coomassie solubilizado en 50% (v/v) metanol, como se ha descrito previamente (4) y la banda homogénea en la región- β , removida de la membrana y sometida al procedimiento de secuencia.

IMMUNOBLOT

La muestra de orina concentrada (5 µL) fue separada electroforéticamente en geles de 12% SDS poliacrilamida y transferida a membranas de PVDF (1h, 400 mA) usando ácido 3-ciclohexilamino-1-propilsulfónico (CAPS; 10 mM, pH=11,0) conteniendo 10% (v/v) de metanol. Después de la electrotransferencia, la membrana fue bloqueada durante una hora a 37 °C con 3% de leche en polvo en solución fisiológica y subsiguientemente incubada con anticuerpos policlonales de conejo anti-mioglobina (Dako; 1:1000), seguidos por anti-inmunoglobulinas de conejo conjugadas con peroxidasa (Biosource/Invitrogen; 1:5000). El *immunoblot* fue revelado por quimioluminiscencia (ECL) usando el reactivo de detección ECL Western blotting (GE Healthcare) y expuesto a Hyperfilm ECL (GE Healthcare), de acuerdo a protocolos previamente publicados (4).

ESPECTROMETRÍA DE MASA

La masa molecular del componente homogéneo en orina fue determinada por MALDI-TOF, una técnica de ionización para el análisis por espectrometría de masa denominada MALDI por sus siglas en inglés (*Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization*) y TOF por las siglas del detector de iones acoplado al sistema (*Time-of-Flight*). Un microlitro de orina concentrada 30X fue mezclado con 1 µL de una solución 10 mg/µL de ácido α -ciano-4-hidroxicinámico en 50% acetonitrilo/0,1% ácido trifluoroacético. A continuación, 1 µL de la mezcla resultante fue colocado en una placa de aluminio, secado al aire y analizado de modo lineal en un espectrómetro de masa Micromass TofSpec-2E (Bruker Daltonics, Bremen, Alemania) como se describió anteriormente (5). La calibración interna y externa se llevó a cabo usando tripsinógeno (masa promedio = 23.981,9 Da) y mioglobina equina (masa promedio= 16.952,5 Da).

Resultados

El análisis electroforético de proteínas en suero, orina y líquido cerebroespinal del paciente bajo estudio se encuentra ilustrado en la Figura 1. Los valores de proteínas totales de suero (7,5 g/dL) y líquido cefalo-

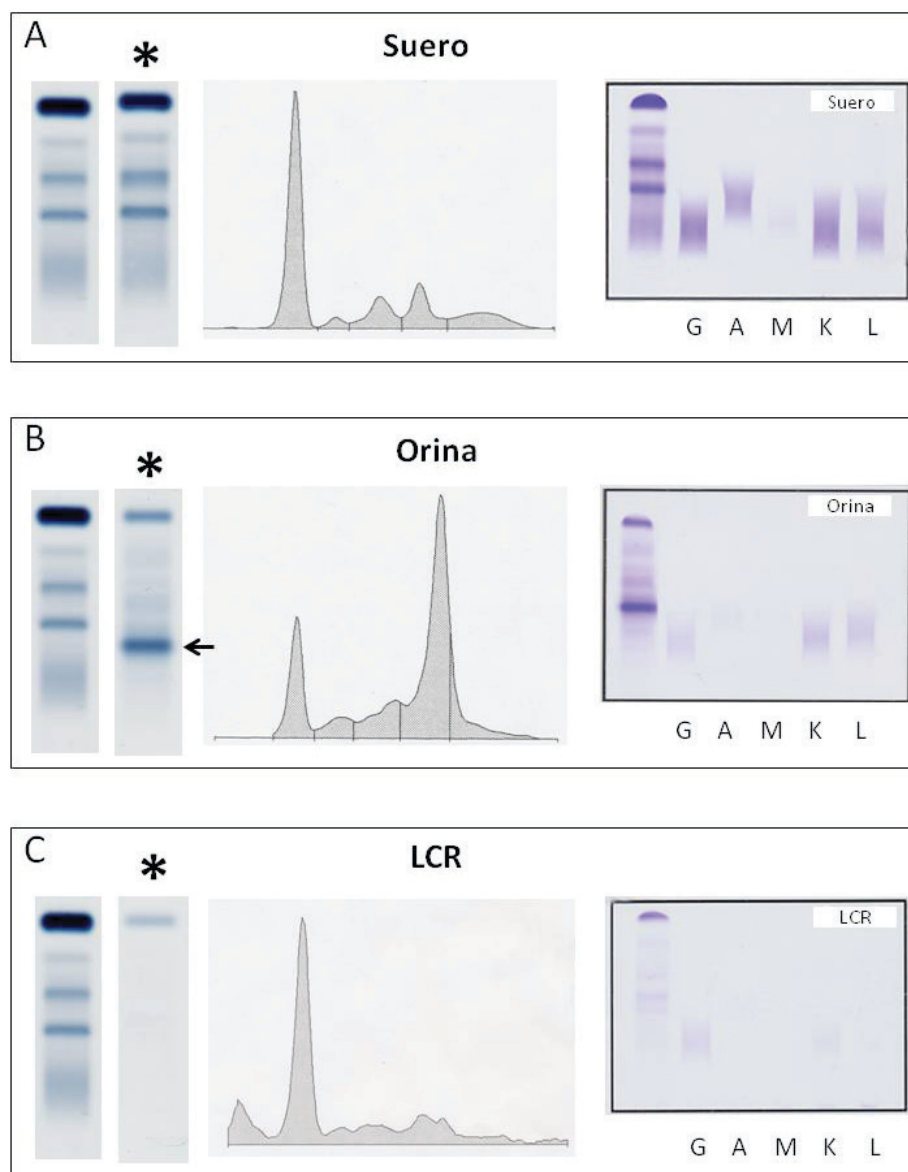


Figura 1. Análisis electrophorético e inmunofijación. Muestras de suero (A), orina (B) y líquido cefalorraquídeo (C) fueron separadas en geles de agarosa utilizando el sistema electroforético Sebia Hydrasys. En todos los casos, los paneles a la izquierda ilustran el perfil electrophorético de los especímenes del paciente -indicados por un asterisco- en comparación con el perfil normal de suero mientras que los paneles centrales indican el análisis densitométrico de los respectivos perfiles. En todos los casos los paneles de la derecha muestran el análisis de inmunofijación; el carril izquierdo denota el perfil electrophorético y los cinco carriles subsiguientes la inmunorreactividad con anticuerpos específicos anti- γ , anti- α , anti- μ , anti- κ , y anti- λ , señalados en la figura como G, A, M, K, y L, respectivamente. La flecha en el uroproteinograma indica el componente homogéneo patológico en la muestra de orina.

raquídeo (30 mg/L) se encontraron dentro de rangos normales y los perfiles electrophoréticos no presentaron anomalías. Este no fue el caso de la muestra de orina. El espécimen de 24 h presentó un color té oscuro, exhibió proteinuria moderada (0,9 g/600 mL) y el perfil electrophorético reveló la presencia de una banda homogénea en la región β , representando aproximadamente el 52% de la proteinuria total. El análisis de inmunofijación de rutina, diseñado para identificar la presencia

de moléculas monoclonales de inmunoglobulinas o de cadenas livianas libres reveló ausencia de inmunorreactividad en los tres tipos de muestras, suero, líquido cefalorraquídeo y orina, dejando el componente homogéneo de orina sin identificar.

La identificación bioquímica del componente homogéneo del uroproteinograma se llevó a cabo mediante la determinación de la secuencia primaria de aminoácidos. Para ello, la orina concentrada fue separada elec-

troforéticamente en soporte de agarosa, transferida a membranas de polivinilideno, teñida y la banda de interés –ilustrada en la Figura 2–removida de la membrana y sometida a degradación de Edman. La secuencia de los diez aminoácidos N-terminales correspondió a GLSDGEWQLV. La búsqueda en el banco de datos del *Swiss Institute of Bioinformatics* (<http://expasy.org/>) reveló que la secuencia obtenida era 100% idéntica a los aminoácidos N-terminales de la mioglobina humana. El análisis de inmunofijación empleando anticuerpos policlonales anti-mioglobina indicó una reacción específica con el componente homogéneo del uroproteinograma (Figura 2), confirmando la identificación del mismo.

Una breve búsqueda bibliográfica indicó que la mioglobinuria está frecuentemente asociada con la presencia de fragmentos proteolíticos de la proteína y no con la aparición de mioglobina intacta, probablemente debido a la acción proteolítica de diferentes enzimas presentes en la orina. Con el objetivo de verificar la integridad molecular de la mioglobina, una muestra concentrada de orina fue separada en SDS-PAGE y sometida a *immunoblot* empleando anticuerpos anti-mioglobina. Como se observa en la Figura 3A, no se detecta heterogeneidad molecular; una sola banda fue detectada por el anticuerpo con una masa molecular en el rango de 17 kDa, compatible con la masa de la molécula intacta. La Figura 3B ilustra el perfil de masa por MALDI-TOF del componente homogéneo que exhibió una masa

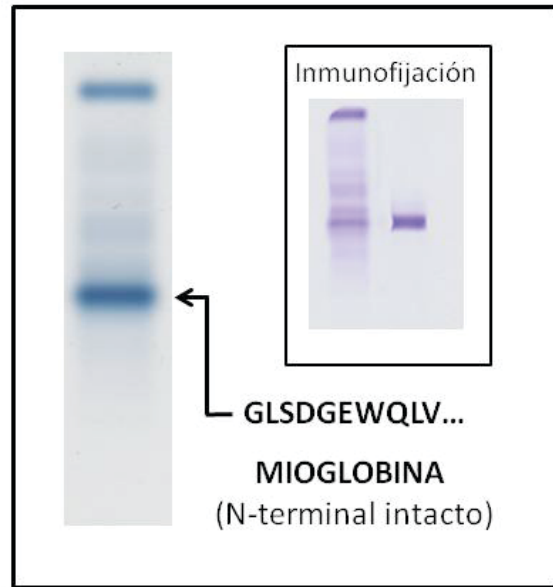


Figura 2. Análisis bioquímico del componente homogéneo urinario. El panel principal ilustra la membrana de PVDF después de la transferencia de la muestra de orina separada por electroforesis. La flecha indica la banda que fue removida de la membrana y sujeta al análisis de secuencia N-terminal que resultó ser GLSDGEWQLV, correspondiente al amino terminal de la molécula de mioglobina. Inserto: ilustra la inmunofijación utilizando anti-mioglobina (carril derecho) en comparación con el perfil electroforético de la muestra de orina (carril izquierdo).

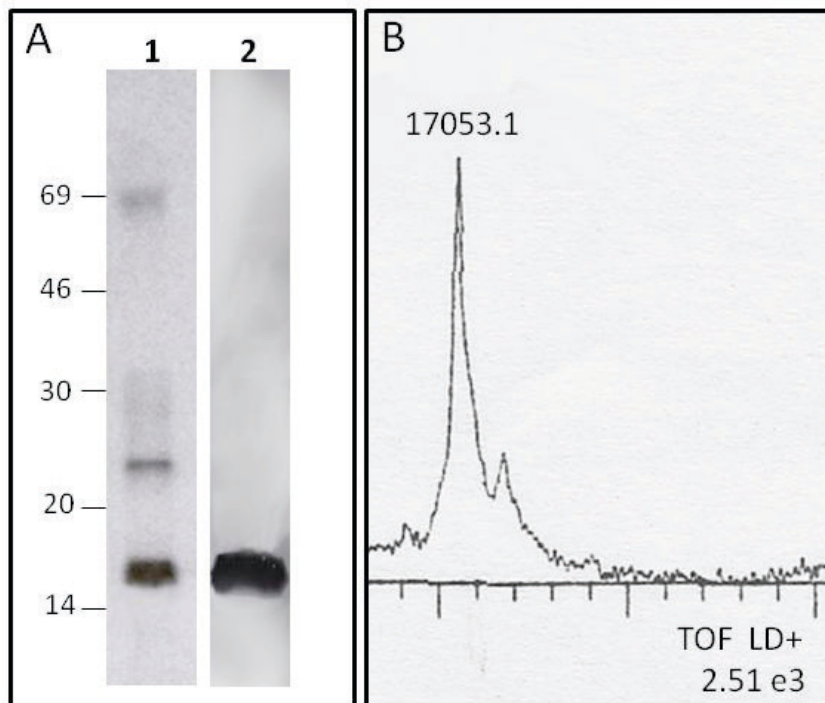


Figura 3. Electroforesis in geles de SDS-poliacrilamida, inmunoblot y espectrometría de masa. (A) La separación de la muestra de orina en geles de SDS-poliacrilamida (carril 1) que ilustra el peso molecular del componente homogéneo predominante en orina y la inmunorreactividad con anticuerpos específicos anti-mioglobina (carril 2). (B) MALDI-TOF análisis del componente homogéneo de la muestra de orina reveló una masa molecular de 17053.1 Da, consistente con la masa teórica de la molécula intacta.

de 17053.10 Da (M+H) consistente con la masa teórica de 17052,63 (M+H), confirmando que la molécula de mioglobina no se encontraba degradada.

Discusión y Conclusiones

El término proteinuria define la presencia de proteínas en orina en niveles superiores a los 150 mg en 24 horas (6). El pasaje de solutos a través de la barrera glomerular es función directa del tamaño, carga y configuración molecular. Elementos con un radio <2 nm filtran libremente, mientras que aquellos que exhiben tamaños mayores son parcial o completamente retenidos. Por lo tanto, las proteínas de masa molecular >40 kDa son casi completamente retenidas mientras que aquellas de masa pequeña filtran libremente. El tamaño molecular no es, sin embargo, el único parámetro que restringe la filtración glomerular. La carga juega también un rol crítico y la membrana basal glomerular, rica en componentes con una carga neta negativa, favorece la retención preferencial de componentes aniónicos.

La mayoría de las proteínas del filtrado glomerular son reabsorbidas y metabolizadas a nivel tubular. Bajo ciertas condiciones patológicas, tanto una síntesis aumentada como una excesiva liberación al torrente circulatorio de proteínas específicas de bajo peso molecular resulta en elevados niveles plasmáticos de las mismas con la subsiguiente saturación del proceso de reabsorción tubular y la aparición de dichas proteínas en orina, originando lo que se conoce como proteinurias de sobrecarga (7). La Tabla I resume las más frecuentes condiciones patológicas asociadas con proteinurias de sobrecarga, así como los respectivos componentes proteicos. Dentro de este grupo el hallazgo más frecuente es la presencia de inmunoglobulinas monoclonales, en particular cadenas livianas libres o proteínas de Bence Jones, típicamente asociadas con la sobreproducción proteica en casos de mieloma múltiple u otros procesos linfoproliferativos. Debido al bajo peso molecular de estas cadenas livianas (25 kDa en el caso de las moléculas intactas y masas moleculares menores si se trata de fragmentos de de-

gradación proteolítica de las mismas), las moléculas filtran masivamente a través del glomérulo sobrepasando la capacidad de reabsorción tubular y siendo, por lo tanto, claramente visibles en orina. Menos frecuente entre las moléculas asociadas a proteinurias de sobrecarga, la presencia de lisozima en orina (8) se encuentra asociada a leucemias de tipo granulocítico o monoblástico, ya que la lisozima, una proteína de 14 kDa, se encuentra en altas concentraciones en granulocitos y monocitos. En estos tipos de leucemias existe una elevada concentración de lisozima en plasma que sobrepasa la capacidad de reabsorción y se traduce en elevados niveles en orina (9-11). Otra proteína que puede ser identificada en las proteinurias de sobrecarga es la β 2-microglobulina (12), típicamente elevada en plasma en desórdenes linfoproliferativos, y cuyos niveles plasmáticos por encima de 6 mg/L son pronósticos de una sobrevida corta (13). Es importante recalcar que tanto la lisozima como la β 2-microglobulina tienen una masa molecular muy similar, una concentración plasmática comparable y ambas se reabsorben a nivel tubular, lo que hace que la presencia de las mismas en orina puede no sólo ser indicativa de proteinuria de sobrecarga –debido a un aumento de concentración plasmática acompañada de una función renal preservada– sino que puede reflejar alteraciones de la reabsorción tubular renal, como en el caso de una proteinuria tubular (14). En este sentido, la β 2-microglobulina es actualmente considerada como un muy buen indicador de disfunción tubular renal, con un amplio uso clínico (15). Entre otras moléculas asociadas a proteinurias de sobrecarga se encuentran la amilasa y la hemoglobina. La proteasa pancreática amilasa, una proteína de 45 kDa de masa molecular, puede aparecer por muy corto tiempo en la orina de pacientes con pancreatitis aguda (12), mientras que la presencia de hemoglobina en orina está asociada primordialmente con anemias hemolíticas de distintos orígenes –incluyendo condiciones autoinmunes, reacciones adversas a transfusiones sanguíneas y hemoglobinuria paroxística– así como también a situaciones traumáticas en las que la destrucción de glóbulos rojos ocurre masivamente y en un corto período de tiempo saturando de manera transitoria los mecanismos de reabsorción tubular. Finalmente, la presencia de mioglobina en orina, como en el caso del presente trabajo, constituye otro ejemplo de proteinurias de sobrecarga. La mioglobinuria puede percibirse a simple vista por el color de la orina cuando los niveles de la proteína en dicho espécimen sobrepasan los 250 mg/L, lo que equivale a la destrucción de más de 100 g de tejido muscular (16). Tanto mioglobinuria como hemoglobinuria son hallazgos frecuentes en pacientes hospitalizados. La mioglobinuria pueden inferirse si el resultado de la tira diagnóstica es positivo para la presencia de sangre en ausencia de glóbulos rojos en

Tabla I. Entidades clínicas y proteínas asociadas a proteinurias de sobrecarga

PROTEINURIAS DE SOBRECARGA	
Gammopatías Monoclonales	Cadenas Pesadas y/o Livianas de Igs
Leucemia Granulocítica Aguda	Lisozima
Enfermedades Linfoproliferativas	β 2-microglobulina
Pancreatitis aguda	Amilasa
Hemólisis	Hemoglobina
Rabdomiolisis	Mioglobina

el sedimento. Este falso positivo resulta porque la tira reactiva, con una sensibilidad del 80% para la detección de rabdomiolisis, no puede discernir entre la presencia de mioglobina y hemoglobina (17).

En sujetos normales los niveles de mioglobina en orina –típicamente inferiores a 0,4 mg/L– se encuentran debajo del límite de detección de la mayoría de los métodos analíticos. En condiciones de ejercicio físico extremo, la concentración plasmática de mioglobina llega a incrementarse hasta 40 veces los valores normales, con la concomitante elevación en orina sin que exista riesgo de insuficiencia renal aguda. Por lo tanto, puede inferirse que valores menores a 15 mg/L son bien tolerados por el riñón. Los síntomas e historia de mioglobinuria son obvios en ciertas situaciones clínicas asociadas con traumas de aplastamiento o quemaduras severas. En aproximadamente la cuarta parte de los casos, particularmente cuando la rabdomiolisis es de origen no traumático, los síntomas son vagos y el análisis bioquímico es indispensable para el diagnóstico. Las formas más leves de rabdomiolisis no causan síntomas musculares mientras que los casos más severos se presentan con intensa mialgia y debilidad muscular, con tumefacción y músculos sensibles al tacto (18). Si la inflamación ocurre en forma aguda, como en el caso de individuos rescatados de edificios colapsados, el movimiento súbito de fluido hacia el torrente circulatorio puede causar hipotensión y *shock*. Otros de los síntomas observados son de naturaleza no específica y son consecuencia tanto de la destrucción muscular como de la condición patológica original (18-20). La liberación de los componentes del tejido muscular hacia el torrente circulatorio causa alteraciones de los electrolitos lo que a su vez puede producir náuseas, vómitos, confusión y hasta inducir coma en los casos más severos. La mioglobinuria de origen no traumático con falla renal aguda es relativamente común en pacientes con sobredosis alcohólicas, historia de adicción a drogas, o por efectos secundarios a tratamientos medicamentosos específicos. En adultos, los casos de daño muscular relacionados al uso de drogas constituyen aproximadamente la mitad del total. En adición al abuso de alcohol y al consumo de sustancias ilegales –incluyendo cocaína, anfetaminas, *Ecstasy* y ácido lisérgico (LSD)– hay más de 200 medicinas que han sido implicadas en el desarrollo de rabdomiolisis (21-23). Diversas drogas antisicóticas, corticosteroides y medicaciones para el tratamiento del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) han sido reportados como agentes capaces de causar rabdomiolisis, pero indudablemente una de las drogas más relevantes son las estatinas, empleadas para disminuir los niveles de colesterol como resultado de su actividad inhibidora de la enzima HMG-CoA reductasa que juega un papel central en la producción de colesterol en el hígado (23). Aunque el riesgo del desarrollo de mio-

patías severas a consecuencia del uso de estatinas es menor del 0,1%, el amplio uso de estos medicamentos hace indispensable el seguimiento de pacientes sometidos a este tratamiento para detectar la posibilidad de daño muscular. Las estatinas difieren entre ellas en su eficiencia para reducir los niveles de colesterol con datos recientes indicando que atorvastatina y rosuvastatina son las más potentes mientras que fluvastatina es la de menor eficacia (24). Las estatinas difieren también en su capacidad de interacción con otros medicamentos, un elemento importante en pacientes sometidos a regímenes terapéuticos combinados. Además, y de modo crítico para el presente estudio, las estatinas difieren entre sí en la frecuencia con que causan severo daño muscular. Un estudio retrospectivo actual que analizó las historias clínicas de más de 250.000 pacientes tratados con estatinas reveló que la incidencia de rabdomiolisis, sin incluir cerivastatina, es de 0,44 por cada 10,000 individuos (25)(26). Por el contrario, el riesgo es más de 10 veces mayor en el caso de cerivastatina, lo que resultó en la suspensión de la producción y venta de la droga en 2001. El riesgo de inducción de rabdomiolisis se encuentra notoriamente aumentado cuando las estatinas empleadas comúnmente (atorvastatina, fluvastatina, lovastatina, pravastatina, o simvastatina) se combinan con el uso de fibratos (fenofibrato o gemfibrozil), como en el caso del presente reporte.

La rabdomiolisis representa el 5-7% de todos los casos de falla renal aguda y, por lo tanto, la mioglobinuria es un hallazgo frecuente en pacientes sometidos a tratamiento de diálisis (27). No está claro hasta el momento porqué la pigmenturia asociada al grupo hemo se asocia con necrosis tubular aguda. La dificultad con que se logra inducir insuficiencia renal aguda en animales de experimentación empleando soluciones de mioglobina o hemoglobina pura, así como la ausencia de patología renal en la mitad de los pacientes que presentan deficiencia de fosforilasa muscular y que desarrollan mioglobinuria espontáneamente, sugiere que deben existir factores adicionales que incrementan la toxicidad renal de las hemoproteínas, incluyendo deshidratación e hipotensión (27) (28).

En adición a la presencia de mioglobina en orina, la rabdomiolisis presenta típicamente alteración en otros parámetros bioquímicos que incluyen incrementos de más de 40 veces los valores normales de mioglobina sérica y de varias enzimas incluyendo CPK (>40 veces el valor normal), así como aspartatoaminotransferasa (AST>4 veces el valor normal) y lactato deshidrogenasa (LDH >2 veces el valor normal) (27). La mioglobina en orina es el primer analito en aumentar; disminuye rápidamente a los pocos días, hecho que refleja su pequeña masa molecular y su vida media de 2-3 horas. La CPK aumenta a las pocas horas de ocurrido el daño muscular pero permanece elevada por unos días más que la mioglobina. Es importante resaltar que la orina

es un ambiente hostil para las proteínas en general ya que contiene enzimas proteolíticas y sales con capacidad de hidrolizar o desnaturalizar las mismas. Como ocurre con otras moléculas proteicas, la mioglobina en orina es susceptible a la degradación enzimática aunque es estable por unos pocos días si la muestra se almacena refrigerada. Por lo tanto, cuanto más rápido se realice el análisis, mejores son las chances de una identificación satisfactoria de los componentes asociados con proteinurias de sobrecargas.

El caso clínico ilustrado en el presente trabajo constituye una combinación de falla renal, compromiso hepático y debilidad muscular que orientó hacia el diagnóstico de rhabdomiólisis, el cual fue confirmado por la identificación bioquímica de mioglobina en orina. En este caso particular, la rhabdomiólisis estaba relacionada al efecto secundario indeseable del tratamiento con estatinas. La medicación fue suprimida y después de aproximadamente dos semanas de hemodiálisis para tratar la insuficiencia aguda el paciente recuperó completamente su función renal y su perfil enzimático se normalizó. Debido a una remanente debilidad bilateral severa en ambas extremidades inferiores que le impedía deambular libremente, fue transferido a una institución de rehabilitación subaguda para tratamiento posterior. En conclusión, el presente reporte resalta la relevancia del laboratorio clínico como elemento crucial en el diagnóstico, enfatizando su papel en casos de proteinurias de sobrecarga. Aunque los componentes homogéneos más frecuentemente identificados en estudios electroforéticos de proteínas consisten en cadenas intactas o truncadas de inmunoglobulinas, la presencia en el perfil electroforético de picos no relacionados debe considerarse en relación a distintas entidades patológicas. Como se ilustró en este caso, simples modificaciones en metodologías de rutina accesibles al laboratorio clínico permiten la identificación de componentes proteicos inusuales en fluidos biológicos.

CORRESPONDENCIA

JORGE GHISO, PH.D.
550 First Avenue, MSB 556
NEW YORK, NY, 10016
Tel: 212-263-7997
Fax: 212-263-0858
jorge.ghiso@nyumc.org

Referencias bibliográficas

1. Laurell CB. Composition and variation of the gel electrophoretic fractions of plasma, cerebrospinal fluid, and urine. *Scand J Clin Lab Invest* 1972; 29(Suppl 124): 71-82.
2. Pizzolato M, Bragantini G, Bresciani P, Pavlovsky S, Chuba J, Vidal R, *et al.* IgG1-k biclonal gammopathy associated with multiple myeloma suggests a regulatory mechanism. *Br J Haematol* 1998; 102: 503-8.
3. Bossuyt X, Bogaerts A, Schiettekatte G, Blanckaert N. Serum protein electrophoresis and immunofixation by a semiautomated electrophoresis system. *Clin Chem* 1998; 4: 944-9.
4. Tomidokoro Y, Lashley T, Rostagno A, Neubert TA, Bøjsen-Møller M, Braendgaard H, *et al.* Familial Danish dementia: Co-existence of ADan and A β amyloid subunits in the absence of compact plaques. *J Biol Chem* 2005; 280: 36883-94.
5. Tomidokoro Y, Rostagno A, Neubert TA, Lu Y, Rebeck GW, Frangione B, *et al.* Iowa variant of familial Alzheimer's Disease: accumulation of posttranslationally modified A β D23N in parenchymal and cerebrovascular amyloid deposits. *Am J Pathol* 2010; 176: 1841-54.
6. Wailer KV, Ward KM, Mahan JD, Wismatt DK. Current concepts in proteinuria. *Clin Chem* 1989; 35: 755-65.
7. Carroll MF, Temte JL. Proteinuria in adults: a diagnostic approach. *Am Fam Physician* 2000; 62: 1333-40.
8. Keren DF. Examination of urine for proteinuria. In: Odder A, editor. *Protein electrophoresis in clinical diagnosis*. Oxford, UK: Oxford University Press; 2003. p. 217-258.
9. Levinson SS, Elin RJ, Yam L. Light chain proteinuria and lysozymuria in a patient with acute monocytic leukemia. *Clin Chem* 2002; 48: 1131-2.
10. Tardy F, Bulle C, Prin L, Cordier J-F, Deviller P. High concentrations of eosinophil-derived neurotoxin in patient's urine mimic lysozyme fa-cathodic bands in agarose gel electrophoresis. *Clin Chem* 1993; 39: 919-20.
11. Abuelo JG. Proteinuria: Diagnostic principles and procedures. *Ann Int Med* 1983; 98: 186-91.
12. Beckett G, Walker S, Rae P, Ashby P. Renal Disease. In: *Lecture Notes: Clinical Biochemistry*. 8th ed. Chichester: John Wiley & Sons; 2010. p. 51-70.
13. Boccadoro M, Pileri A. Diagnosis, prognosis, and standard treatment of multiple myeloma. *Hematol Oncol Clin North Am* 1997; 11: 111-31.
14. Handy BC. Urinary β 2-microglobulin masquerading as a Bence Jones proteins. *Arch Pathol Lab Med* 2001; 125: 555-7.
15. Bethea M, Forman DT. Beta 2-microglobulin: its significance and clinical usefulness. *Ann Clin Lab Sci* 1990; 20: 163-8.
16. Beetham R. Biochemical investigation of suspected rhabdomyolysis. *Ann Clin Biochem* 2000; 37: 581-7.
17. Melli G, Chaudhry V, Cornblath DR. Rhabdomyolysis: an evaluation of 475 hospitalized patients. *Medicine (Baltimore)* 2005; 84: 377-85.
18. Bosch X, Poch E, Grau JM. Rhabdomyolysis and acute kidney injury. *New England J Med* 2009; 361: 62-72.
19. Huerta-Alardín AL, Varon J, Marik PE. Bench-to-bedside review: rhabdomyolysis -an overview for clinicians. *Critical Care* 2005; 9: 158-69.
20. Sauret JM, Marinides G, Wang GK. Rhabdomyolysis. *Am Family Physician* 2002; 65: 907-12.

21. Deighan CJ, Wong KM, McLaughlin KJ, Harden P. Rhabdomyolysis and acute renal failure resulting from alcohol and drug abuse. *QJM* 2000; 93: 29-33.
22. Singhal PC, Rubin RB, Peters A, Santiago A, Neugarten J. Rhabdomyolysis and acute renal failure associated with cocaine abuse. *J Toxicol Clin Toxicol* 1990; 28: 321-30.
23. Elsayed EF, Reilly RF. Rhabdomyolysis: a review with emphasis on the pediatric population. *Pediatr Nephrol* 2010; 25: 7-18.
24. Mills EJ, Wu P, Chong G, Gherent I, Singh S, Akl EA, *et al.* Efficacy and safety of statin treatment for cardiovascular disease: a network meta-analysis of 170 255 patients from 76 randomized trials. *Q J Med* 2011; 104: 109-24.
25. Graham DJ, Staffa JA, Shatin D, Andrade SE, Schech SD, La Grenade L, *et al.* Incidence of hospitalized rhabdomyolysis in patients treated with lipid-lowering drugs. *JAMA* 2004; 292: 2585-90.
26. Golomb BA, Evans MA. Statin adverse effects: a review of the literature and evidence for a mitochondrial mechanism. *Am J Cardiovasc Drugs* 2008; 8: 373-418.
27. Hamilton RW, Hopkins MBr, Shihabi ZK. Myoglobinuria, hemoglobinuria, and acute renal failure. *Clin Chem* 1989; 35: 1713-20.
28. Blacher Y, Fong JSC, DeChadarevian JP, Drumond KN. Muscle extract infusion in rabbits: a new experimental model for crush syndrome. *Circ Res* 1981; 49: 114-24.

Aceptado para su publicación el 14 de agosto de 2012