

Electroforesis de las fracciones protéicas*

por

Onofre Lorente Roldán

No pretendo que esta modesta disertación sobre la electroforesis de las proteínas plasmáticas, sea considerada como un intento de enseñanza, de esta nueva faceta del análisis físico-químico, que tanto promete al diagnóstico de muchísimas enfermedades, pues son cada día más numerosas las excelentes obras didácticas, que sobre esta materia se están publicando por los más notables investigadores de todo el mundo. Es solamente el fruto que he obtenido de la puesta en limpio de mi cuaderno de apuntes, de todo lo que fuí ensayando sobre proteínas plasmáticas, de cuantas obras he consultado para plasmar una visión de conjunto, haciendo una pequeña historia de como se fueron descubrien-

*Trabajo que presentó el autor, farmacéutico de Jerez de la Frontera (Cádiz) a la Academia Brasileira de Medicina Militar, para optar al «Premio Profesor Casares Gil» instituido por el Doctor D. Gerardo Majella Bijos, General Farmacéutico y Académico Correspondiente de la Real Academia de Farmacia. El trabajo obtuvo el galardón a que concurría.

do estas distintas fracciones protéicas y sus aislamientos por diferentes métodos, hasta llegar a la electroforesis y su aplicación al diagnóstico clínico, escogiendo siempre las técnicas más sencillas que pueden ser realizadas en pequeños laboratorios incluso de tipo rural, o por estudiantes que deseen iniciarse en esta sugestiva práctica de análisis clínico, que nos abre tan insospechados horizontes.

Si así logro conseguirlo, o por lo menos despertar esta afición entre todos los compañeros de mi profesión, me doy por satisfecho, por haber podido con eso, contribuir aunque muy modestamente a la magnífica idea del Doctor Farmacéutico brasileño D. Gerardo Majella Bijos, de estrechar aún más, los lazos que siempre existieron de amistad entre los farmacéuticos de España y los farmacéuticos Hispano-Americanos.

* * *

Para hacer un diagnóstico lo más completo posible, siempre ha dispuesto el médico, ya sea éste clínico o internista, fundamentalmente, de los datos y síntomas que va obteniendo de su paciente, mediante la exploración física, el examen con aparatos adecuados, el historial clínico, pero como información complementaria, requiere, la que le suministra el laboratorio mediante un análisis de sangre.

Este se ha venido haciendo, refiriéndolo casi exclusivamente a su expresión celular, esto es, se le practicaba recuento y fórmula leucocitaria, velocidad de sedimentación, etc., que es lo que ha constituido siempre la hematología clásica, y aún así, tan solo con esto, ha sido tal la utilidad que estos análisis han prestado al clínico, que con el estudio sistemático de miles y miles de ellos, debidamente ordenados desde el año 1912 por el Doctor Victor Schilling, profesor de la Universidad de Berlín, le fue posible la confección del famoso cuadro hemático que lleva su nombre, «El Hemograma de Schilling», mediante el cual, pudieron ser enunciadas las leyes y reglas que rigen el curso biológico de las variaciones leucocitarias, durante las enfermedades, en sus tres fases fundamentales. Fase de NEUTROFILIA, en el apogeo de la lucha de nuestro organismo con la enfermedad. Fase MONOCITARIA, cuando comienza a hacer crisis la enfermedad por efecto de nuestras propias defensas y Fase LINFOCITARIA con su discreta EOSINOFILIA, cuando cesa la enfermedad y durante la convalecencia. Expresiones citológicas estas, de innegable valor, tanto diagnóstico, como pronóstico y también en muchos casos como sintomático.

Hoy, gracias a los conocimientos que se van teniendo cada vez más profundos, acerca de la composición íntima de la sangre, por el desarrollo de las ciencias físico-químicas, la hematología, va ensanchando su horizonte, para aportar al médico, nuevas informaciones de ella, pero ahora, no en el sentido celular, sino en su expresión líquida, o sea en lo que respecta al plasma, ese líquido tan maravilloso que cumple funciones específicas tan importantes, distribuídas cada una de ellas en las distintas sustancias de que está compuesto y que se denominan «FRACCIONES DE PROTEÍNAS PLASMÁTICAS» como son:

EL FIBRINÓGENO.—Que por su gran condensación molecular proporciona viscosidad al plasma para constituir el soporte laxo donde las células hemáticas van suspendidas. Interviene también directamente en el fenómeno de la coagulación de la sangre, con todo su cortejo de enzimas y fermentos.

LA ALBÚMINA.— Que por su naturaleza coloidal, actúa como un maravilloso dializador, intercambiando el agua a través de los tejidos, para mantener constante la presión oncótica, regulando el volumen del plasma (siendo ésta la razón de estar tan ligada la velocidad de sedimentación y el volumen hematócrito, a la proporción que de esta proteína contiene una sangre). Sirve también de vehículo de transporte de los más diversos elementos por el torrente circulatorio, así, copulándose con las grasas forma las lipoproteínas, con los azúcares las glucoproteínas, y a los metales como al cobre y al hierro, y a los metalóides como al yodo al fósforo y al azufre, etc. y finalmente

LAS GLOBULINAS.—Que por su carácter de anfólitos, como veremos más adelante, mantienen constante el equilibrio ácido-básico, haciendo de amortiguador tamponado. Desempeñan un importantísimo papel en la inmunidad, pues ya sabemos que los anticuerpos están formados exclusivamente por las globulinas; y otras múltiples funciones más, que se han ido descubriendo a medida que se han logrado individualizar más subfracciones de estas proteínas. Subfracción globulina alfa 1, globulina alfa 2, globulina beta y globulina gamma.

El estudio de estas sustancias ha sido hasta hace poco, un campo privativo casi exclusivamente del investigador, pero en la actualidad entra ya de lleno en el quehacer diario y trabajo de rutina del laboratorio, toda vez que se dispone de técnicas, unas más o menos sencillas u otras más o menos engorrosas, con o sin la ayuda de aparatos especiales, para la práctica de un proteinograma, pero que todas ellas conducen a resul-

tados prácticamente iguales. Llamándose **PROTEINOGRAMA**, a la expresión numérica o gráfica del contenido total de proteínas que contiene un suero o el plasma, y a la proporción absoluta o relativa en que se encuentran sus distintas fracciones. Diferenciándose así las **DISPROTEINÉMIAS** cuando la proporción de proteína total está alterada, clasificándose estas en **HIPERPROTEINÉMIAS** e **HIPOPROTEINEMIAS** y dentro de esta clasificación ver si el espectro de sus distintas fracciones también se encuentra en las proporciones normales y poder así, con el estudio sistemático de los proteinogramas, establecer las leyes y reglas por las que se rija el curso biológico de las variaciones de estas sustancias en las distintas enfermedades, para que nos puedan servir como pronóstico o como diagnóstico y en muchos casos como sintomático, al igual que Víctor Schilling distingue en sus hemogramas, cuando hay leucocitosis o leucopenias y dentro de esto, si las diferentes estirpes leucocitarias (basófilos, eosinófilos, mielocitos, metamielocitos, cayados, segmentados, linfocitos y monocitos) se encuentran en las proporciones debidas, esto es, si existe Neutropenia o Neutrofilia, Eosinopenia o Eosinofilia, etc.

Las primeras investigaciones que se hicieron acerca de las proteínas hemáticas, puede decirse que datan desde la misma fecha en que se descubrió el microscopio, pues con él pudieron observar, que la sangre estaba formada de dos partes, una constituida por los elementos celulares, que más tarde se fueron diferenciando por sus simpatías tintoriales (simpatía por los colorantes básicos, por los ácidos o por los neutros) y otra parte líquida a la que se le llamó Plasma.

Ya en el año 1771 el profesor inglés Sir William Hewson, consigue la primera separación neta de una de las proteínas existentes en el plasma por un procedimiento bastante rudimentario y original. Agitando con su bastón sangre fresca de caballo, observó como recogía una parte sólida, de aspecto fibroso y de consistencia lardácea, que se le fue haciendo como un ovillo o madeja liada a la punta del bastón, quedando el resto de la sangre sin esa facultad de coagularse ya espontáneamente, como le es peculiar. A esta fracción de proteína separada se le llamó **FIBRINÓGENO**.

Dejando en reposo esta sangre, fue decantando sus elementos celulares quedando en la superficie, sobrenadando, un líquido de color vinoso, más o menos amarillento, al que se le dio el nombre de suero. Por tener este suero las mismas propiedades que la clara de huevo, esto es, de coagularse con el calor y con los ácidos, se dijo que la proteína con que estaba formado era exclusivamente **ALBÚMINA**.

En el año 1850, los profesores Panus y Denis observan en esta misma albúmina, otras proteínas con características diferentes, que ponen de manifiesto al diluir el suero con agua destilada y tratándolo después con una solución de una sal neutra procedente de un radical ácido débil. Precipita así una parte de esta proteína, quedando en solución otra fracción capaz de coagularse nuevamente si se trata con otra solución de una sal neutra procedente de un radical ácido fuerte. A la fracción que precipitó primeramente se le llamó GLOBULINA por la creencia de que procedía de los glóbulos de la sangre. Quedando así clasificadas las proteínas del plasma, en FIBRINÓGENO, ALBÚMINA Y GLOBULINA.

Esta clasificación, así como también, las técnicas que fueron poniéndose en práctica para su fraccionamiento mediante precipitaciones con diferentes sales neutras, como sulfatos, sulfitos, hiposulfitos, mezclas de fosfatos, etc. se mantuvieron hasta la aparición de la electroforesis y su aplicación al plasma o al suero por Tiselius en el año 1937.

De forma que para la confección de un proteinograma disponemos en la actualidad de dos métodos fundamentales, que son: El fraccionamiento salino y la electroforesis sobre papel o microelectroforesis, aparte de otros métodos empleados en los grandes laboratorios de investigación y en los laboratorios farmacéuticos industriales para obtener proteínas en grandes cantidades con fines medicinales, a partir de sangre de animales pues de todos es conocida la inmunoterapia mediante la Gamma-globulina liofilizada obtenida mediante la electroforesis libre, en un tubo en forma de U seguida de diálisis o también mediante la Ultracentrífuga.

PROTEINOGRAMA POR FRACCIONAMIENTO SALINO

Está fundado en la propiedad que hemos visto poseen las soluciones de las distintas sales neutras a diferentes concentraciones, de precipitar las fracciones protéicas que hemos enumerado. Interviniendo como factores fisicoquímicos, la temperatura, el pH, la fuerza iónica y la constante dieléctrica.

Gras y Salazar estudiaron la curva de precipitación producida en un suero, al ser tratado por soluciones de hiposulfito sódico a concentraciones crecientes, consistiendo su técnica en ir añadiendo a volúmenes constantes de un suero, volúmenes también constantes de soluciones de hiposulfito de sosa a partir del 1% hasta el 70% de saturación, con un incremento de concentración de 1 gr. entre solución y solución.

Llevando los resultados obtenidos a un sistema de coordenadas, en la que expresemos, las concentraciones de hiposulfito en el eje de las abscisas, y el tanto por ciento de las proteínas que van precipitando en el eje de las ordenadas (fig. n.º 1). Vemos que esta curva está formada

Curva de fraccionamiento salino con
Hiposulfito Sódico

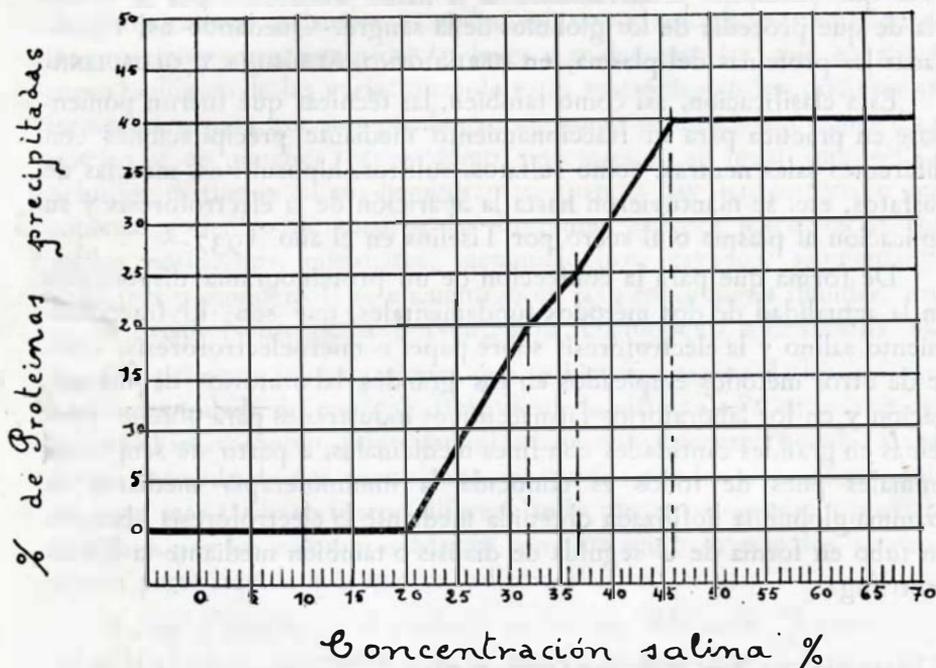


Fig. 1

por cinco tramos; tres de ellos en dirección ascendente, que nos muestran, cómo va aumentando la precipitación de las proteínas a medida que es mayor la concentración salina, y las otras dos que siguen la dirección paralela al eje de las abscisas, que nos expresan que el aumento de concentración salina no da lugar a precipitación alguna, que son las porciones comprendidas entre la concentración cero al 20%, y la otra a partir de la concentración 46% hasta la saturación del 70%.

Este curva nos da por tanto cuatro puntos de inflexión, correspondientes a las concentraciones salinas del 20, 32, 37 y 46% que nos

marcan la existencia de cuatro fracciones de proteínas bien diferenciadas por esta propiedad, denominadas: ALBUMINA, GLOBULINA ALFA, GLOBULINA BETA Y GLOBULINA GAMMA, las mismas que también se nos diferencian idénticamente con la electroforesis, aunque con esta técnica, se sigue para separarlas, un camino completamente diferente.

La técnica detallada para este fraccionamiento salino, así como también empleando otras sales neutras, sulfato amónico, sulfito sódico, mezclas de fosfatos; etc. las podemos encontrar en la magnífica obra «PROTEÍNAS PLASMÁTICAS» del Dr. J. Gras, o en «EL DIAGNÓSTICO HEMATOLOGICO» de Ciscar y Farrera Valenti o en la última edición de «ANÁLISIS CLÍNICO» de Suárez Peregín.

Estas técnicas son todas lentas y laboriosas de practicar pues requieren la preparación de cuatro soluciones salinas exactamente dosificadas, con productos químicamente puros, o purificados por nosotros de antemano con carbón activo y tituladas nuevamente, para la separación de las cuatro fracciones. Seguidamente hay que hacer la valoración de las proteínas por técnicas colorimétricas mediante el reactivo de biuret o mediante un Kjeldahl o gravimétricamente.

Como en el trabajo diario de laboratorio, se van eligiendo métodos, que al par de ser suficientemente sensibles, sean rápidos y fáciles de practicar, el método electroforético sobre papel o sea la Microelectroforesis, es la más recomendable para la práctica de los proteinogramas.

PROTEINOGRAMA POR ELECTROFORESIS

El fundamento de la electroforesis es el mismo que el de la electrolisis de las sustancias cristaloides. Recordaremos que cuando se disuelve en el agua una sal, un ácido o una base, siempre hay un número determinado de moléculas que se disocian; consistiendo esta disociación en la separación o descomposición de la molécula, en sus elementos más simples, los iones. Cuando se hace pasar la corriente eléctrica a través de ellos, estos iones se orientan y comienzan a migrar trasladándose hacia un polo o hacia el otro de la corriente, llamándose aniones a los que lo hacen hacia el polo negativo y cationes a los que lo hacen hacia el polo positivo.

La electroforesis, es el mismo fenómeno, pero aplicado a las sustancias coloides.

Las proteínas, como tales sustancias coloidales y que están forma-

das por la agrupación de un determinado número de moléculas de aminoácidos (generalmente un número muy alto), tienen en su fórmula, como su nombre indica, grupos funcionales AMINO (NH_2) y grupos funcionales ÁCIDO (COOH) (Fig. núm. 2-A).

Al disolverse estas sustancias en agua, sufren un fenómeno llamado hidrólisis, que consiste en la combinación del grupo amino con una molécula de agua, transformándose así el Nitrógeno que actuaba como trivalente, en pentavalente (es el mismo fenómeno que le ocurre al amoníaco gaseoso NH_3 , al disolverse en el agua, que se convierte en Hidró-

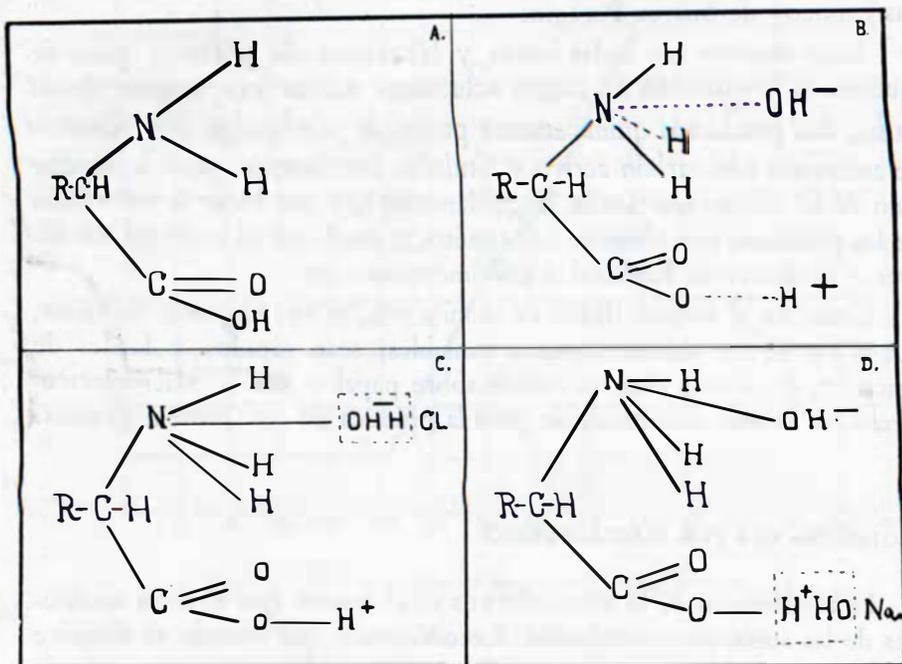


Fig. 2

xido amónico NH_4OH) pasando el Nitrógeno de trivalente a pentavalente (Fig. B).

En el caso de los aminoácidos, la molécula adquiere una función oxhidrilo con su correspondiente carga negativa a más de su función ácida con su correspondiente carga positiva. Tienen estos cuerpos por lo tanto reacción ANFOTERA (como todos los cuerpos o sustancias muy ricos en proteínas la leche, la sangre, que hacen virar al papel de tornasol,

tanto al rojo como al azul). Son por lo tanto ANFOLITOS como decíamos antes, o como le llaman los alemanes ZWITERIONES, que quiere decir iones hermafroditas.

Al pasar la corriente eléctrica a través de ellos se disocian en partículas llamadas micelas, que pueden ser observadas sobre fondo oscuro, con su clásico movimiento Browniano, y orientándose, también comienzan a migrar hacia un polo o hacia el otro de la corriente, comportándose como tales micelas aniónicas o catiónicas, según el predominio de sus cargas respectivas con relación al medio en que se mueven. Siendo así, que si agregamos al medio electrolítico donde estas micelas se muevan, una solución tamponada a un pH menor que siete, mediante la adición de un ácido, iremos neutralizando las cargas negativas e irán quedando en predominio (Fig. núm. 2-C) las cargas positivas, migrando por tanto las micelas hacia el polo negativo. Si por el contrario, agregamos una solución tamponada a un pH mayor que 7, (Fig. núm. 2-D) mediante una solución de sosa, se irán neutralizando las cargas positivas y quedando en predominio las cargas negativas, migrando entonces las micelas hacia el polo positivo.

Haciendo tanteos, llegaremos a un pH tal en el que las micelas se comportarán eléctricamente neutras y no se desplazarán hacia ningún polo. A este punto se le llama PUNTO ISOELÉCTRICO, que es constante para cada sustancia y es necesario e imprescindible de conocer para la práctica de la electroforesis.

Si una vez conocido este punto isoeléctrico, ajustamos el medio electrolítico a un pH ligeramente alcalino, que para el caso de los sueros es de 8,6, todas las micelas de las proteínas hemáticas migrarán en masa hacia el polo positivo, que es lo que constituye la electroforesis, con una velocidad que será función del número de cargas predominantes y de su volumen molecular. Así la albúmina, formada por la agrupación de un número de moléculas de aminoácidos, menor que las demás proteínas, migrará más rápidamente, luego le seguirá la globulina alfa sub-uno, luego la alfa sub-dos, luego la beta y finalmente la globulina gamma, todas en perfecta formación, al igual que como describe el Doctor Segovia Profesor de la Facultad de Medicina de Sevilla tan gráficamente, «cómo se desplazaría una gran manada de cabezas de ganado de diversas clases, que pastan en una pradera y disponen trasladarlos a otro lugar. Ellos solos se van agrupando poco a poco, por rebaños de la misma especie y avanzando a lo largo del camino, al paso que le es peculiar a cada uno».

Tiselius aplicó este fenómeno al suero, simplificando la técnica, sustituyendo aquel célebre tubo en forma de U. por una banda de papel de filtro impregnada de una solución tampón a un $\text{pH} = 8,6$ y en el centro de la cual colocó una pequeña porción de suero sanguíneo. Hizo pasar la corriente eléctrica y las proteínas se fueron separando como en el simul de los rebaños.

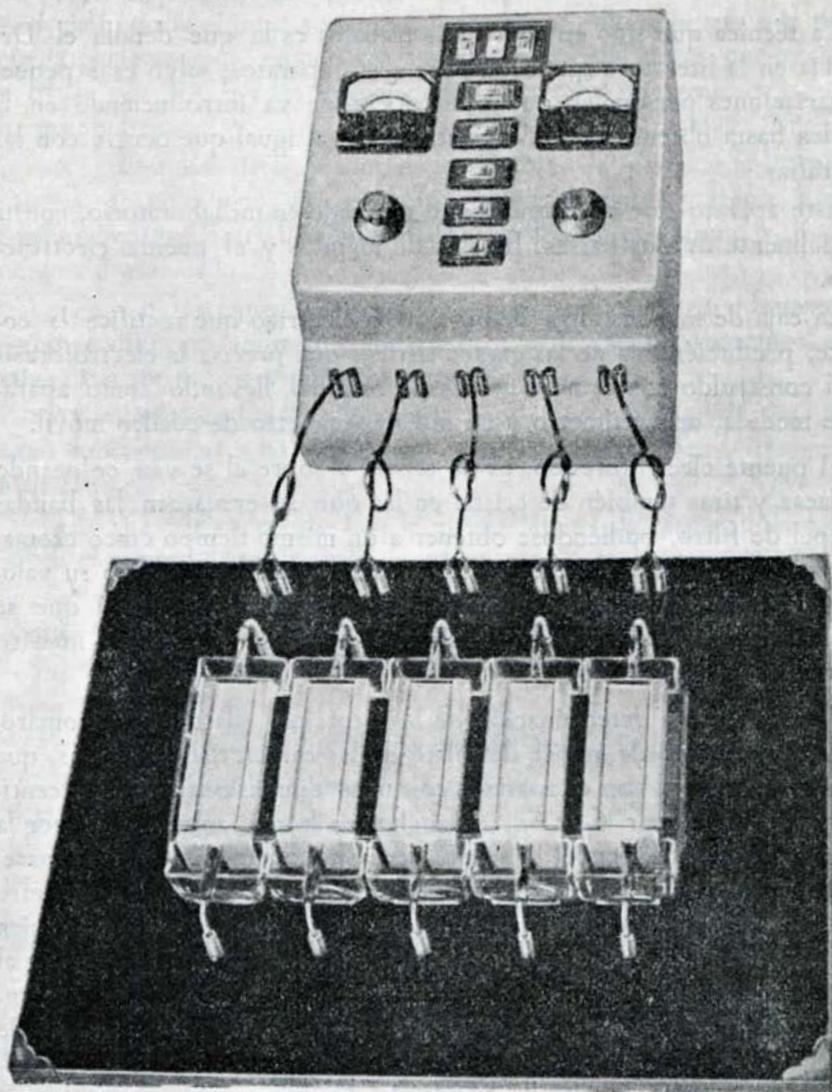
Pasado un cierto tiempo suspendió el paso de la corriente para sorprender a las proteínas en plena formación, retiró la banda de papel de filtro y fijó a las proteínas sumergiéndolas en una solución de bicloruro de mercurio que precipita a estas sustancias y la tiñó seguidamente con una solución de un colorante adecuado como es el azul de bromofenol, azocarmín o negro de anilina y finalmente la decoloró por sucesivos lavados, quedando solamente teñida la banda con el espectro donde se encuentran las proteínas como veremos en los cromatogramas que se adjuntan.

Disponemos en la actualidad de múltiples aparatos para la práctica de la electroforesis sobre papel, desde los más costosos de marcas extranjeras o el nacional del Dr. Segovia, (Fig. núm. 3) hasta el más económico y sencillo que nosotros mismos podemos fabricarnos casera-mente como describe en la revista «Laboratorio» el Profesor de la Facultad de Farmacia de Granada Doctor Monteoliva.

El papel cromatográfico más recomendable para el trabajo ordinario puede ser el Whatmann número 1 o el Schleicher y Schüll núm. 2.043 cortado en las dimensiones apropiadas según el aparato con que trabajemos.

La solución tamponada a un $\text{pH} = 8,6$ se obtiene disolviendo:

| | |
|---|----------|
| Veronal sódico | 9,81 gr. |
| Acetato sódico cristalizado | 6,47 » |
| Solución N/10 de ac. clorhídrico | 60 c.c. |
| Agua destilada c. s. p. | 1.000 » |
| Ajustar su pH exactamente con HCl o con $\text{CO}_3 \text{Na}_2$ | |

**MODELO C**

Caja de mandos y puente electroforetico (sin fanal)
Capacidad maxima. 50 determinaciones simultaneas (10 puentes)

(Fig. 3)

PRACTICA ELECTROFORÉTICA PARA EL FRACCIONAMIENTO DE LAS PROTEINAS

La técnica que sigo en todos mis trabajos es la que detalla el Dr. Segovia en la literatura que acompaña a sus aparatos, salvo esas pequeñas variaciones personales que cada operador va introduciendo en la práctica hasta obtener bellos cromatogramas al igual que ocurre con las fotografías.

Este aparato que es el que tengo montado en mi laboratorio, consta esencialmente de dos partes. La caja de mandos y el puente electroforético.

La caja de mandos aloja al dispositivo eléctrico que rectifica la corriente, produciéndola de las características que precisa la electroforesis y está construido conforme a un diseño original, llevando como aparatos de medida, un voltímetro y un miliamperímetro de cuadro móvil.

El puente electroforético, es de cristal y sobre él se van colocando las placas y tiras también de cristal en las que se enmarcan las bandas de papel de filtro, pudiéndose obtener a un mismo tiempo cinco cromatogramas de los cuales se escogen los cuatro mejores, uno para su valoración como se dirá más adelante, otro para unirlo al dictamen que se entrega al paciente, otro para el fichero del médico y otro para nuestro arch.vo.

Para hacer una determinación de las proteínas plasmáticas, tomaremos cinco bandas de papel de filtro de las características dichas, que incluso suministran con el aparato, con unas dimensiones de 28 centímetros de largo por 6 y $\frac{1}{2}$ de ancho, en la que colocaremos por la cara más satinada del papel el suero a ensayar, operación que efectuaremos con una pipeta muy fina (puede servir la del Hemoglobinómetro de Sahli), cuidando de no dejar huella de rayado sobre el papel, o bien con un pincel de retocar del n.º 00, en forma de trazo perpendicular al diámetro mayor de la banda de papel, a una distancia de unos diez centímetros del extremo de la derecha, y de una longitud dicho trazo de 2 y $\frac{1}{2}$ a 3 centímetros, cuidando de que sus extremos queden equidistantes de los bordes del papel. Siguiendo la pauta que vamos describiendo veremos que las distintas fracciones proteicas se desplazarán hacia el extremo izquierdo, quedando el cromatograma en forma de espectro perfectamente centrado en la banda. Inmediatamente que vamos depositando el suero o a lo mas tardar un minuto, sumergimos el papel en la solución también, quitando el exceso de líquido enjugándolo sobre papel de filtro ordinario, cuidando de no tocar con el papel de filtro el

trazo que hemos marcado con el suero, quedando así la banda solo humedecida con la rigidez suficiente para que al colocarlo sobre el puente quede perfectamente enmarcada sin tocar al cristal, libre por el centro y fijada por los bordes acanalados; Operación que realizaremos en la forma siguiente.

1.º Después de bien limpias las láminas de cristal y las tiras acanaladas, se coloca una de las láminas sobre el puente y frente a los correspondientes electrodos. Sobre ella y en los bordes laterales, dos tiras de cristal acanalado.

2.º Colocaremos la banda de papel con el suero y humedecida como se dijo, cuidando de centrarla bien para que sus extremos sobre salgan del puente en segmentos iguales.

3.º Se pisan los laterales de la banda con otro par de tiras acanaladas superpuestas a las anteriores, cuidando que la banda quede bien estirada.

4.º Cerrar todo esto con la última lámina de cristal, que se coloca sobre el segundo par de tiras.

5.º Colóquense los tanques llenos de la solución tampón, sumergiendo en ellos los extremos de la banda de papel.

6.º Emplácense los electrodos, que quedarán sumergidos en la parte central del tanque.

7.º Repetir igual operación con los demás puentes.

8.º Conectar los puentes electroforéticos con la caja de mandos.

9.º Conectar la caja de mandos con la red, y tapar los puentes con el fanal.

10.º Manejar los mandos del voltímetro y del miliamperímetro, hasta ver las agujas indicando el voltaje y la intensidad deseada.

Las primeras prácticas las podremos hacer a 80 o 90 voltios y con un tiempo de electroforesis de diez horas y según el resultado obtenido podremos aumentar el voltaje o disminuirlo así como también el tiempo, consiguiendo así obtener cromatogramas más o menos estirados y definidos.

Pasado el tiempo asignado a la experiencia, se procede a la retirada de la banda para su desecación y fijación inmediata mediante el calor a fin de que las proteínas no se difundan borrándose el contorno de sus fracciones para lo cual se lleva a una estufa a 100º o se mantiene con movimiento de vaivén sobre un infernillo eléctrico a una altura prudencial hasta su completa desecación.

Coloración.—Los métodos más usados son el del Azul de bromofenol o el de Negro Amido, dando tanto uno como otro muy buenos resultados.

AZUL DE BROMOFENOL—Se coloca la banda una vez seca, en una cubeta plana de unos veinte centímetros de longitud, donde se le añade hasta cubrirla una solución de azul de bromofenol al 1 % en alcohol metílico saturado de cloruro mercúrico, manteniéndola durante unos diez minutos, escúrrase bien y pasese a otra cubeta con una solución de cloruro mercúrico al 1 % en alcohol metílico, agítese para activar el lavado y mantengase sumergida durante otros diez minutos.

Pasese a otra cubeta con una solución de cloruro de mercurio al 1 % pero, ahora en alcohol etílico, durante otros diez minutos, con lo cual la banda quedará completamente decolorada y quedando sólo teñida a manera de espectro las distintas fracciones protéicas y finalmente, lívese con alcohol metílico puro para eliminar el cloruro mercúrico. Dejar secar al aire libre y una vez seco recortar el electrocromatograma dejando el marco que se desee.

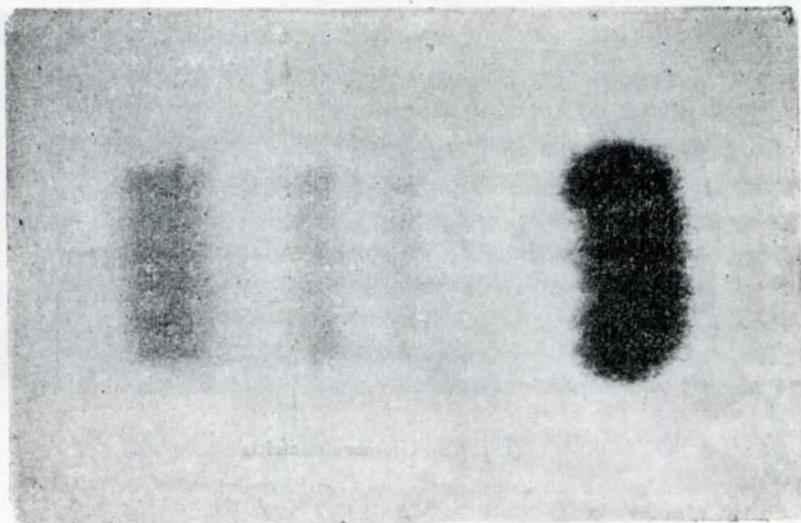
NEGRO AMIDO —Este método es mucho más económico porque se requiere una solución del colorante Amideschwarz 10 B en la proporción de 0,50 gr. en 100 c.c. de alcohol metílico diluido al 50% con agua destilada más 10 c. c. de ácido acético glacial y como decolorante solo una solución de ácido acético diluido al 10 %.

Se coloca la solución de negro amido en una cubeta plana y se sumerge en ella la tira durante 15 minutos con agitación frecuente. Se lava con agua corriente hasta que no suelte más color y se termina la decoloración con la solución de ácido acético calentada al baño de maría hasta que aparezca teñido solo el espectro proteico y con el fondo blanco. Si quedase el fondo algo azul, se repite el lavado con la solución de acético sobre el B. M. una, dos o tres veces más. Se sacan del baño, se ponen sobre un papel de filtro para quitar el exceso de humedad y se dejan secar al aire.

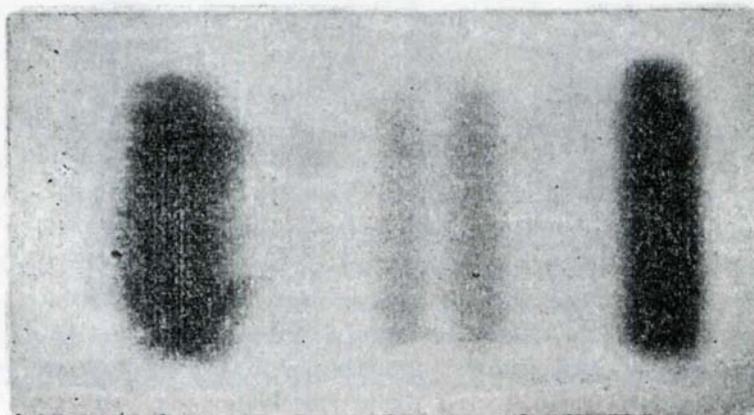
En el electrocromatograma normal observaremos que la primera mancha de la izquierda, correspondiente a la albumina está intensamente teñida, siguiéndole las otras cuatro fracciones, globulina alfa-uno, globulina alfa-dos, globulina beta y globulina gamma, debilmente teñidas, en identidad creciente.

El Mieloma, el Linfocitoma y la Endocarditis dan un electrocromatograma típico. La mancha de la albúmina está algo disminuída, las

correspondientes a las globulinas alfa uno, alfa dos y beta se conservan como en la normal y en cambio la gamma globulina aumenta cinco o seis veces más de lo normal.



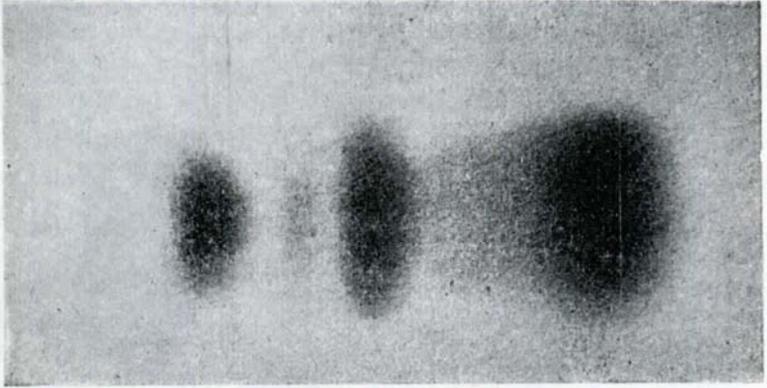
(Fig. 4) Electrochromatograma normal



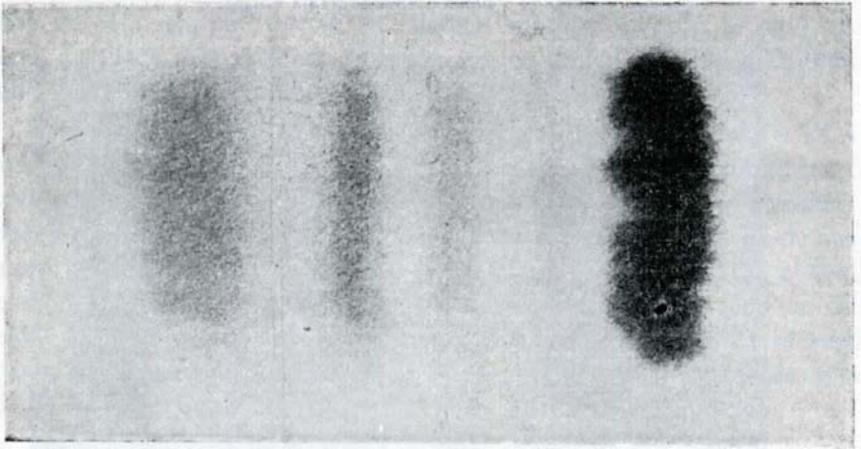
(Fig. 5) Linfogranuloma

En las Nefrosis, Glomerulonefritis etc. es característico que la mancha de la albúmina, está exageradamente disminuída, la globulina alfa-uno es normal, la globulina alfa-dos aumentada y el resto casi normal.

Las Neoplasias del tubo digestivo se caracterizan dando un electrocromatograma casi normal pero con la fracción albúmina disminuída con relación al resto de las demás fracciones.



(Fig. 6) Glomerulonefritis

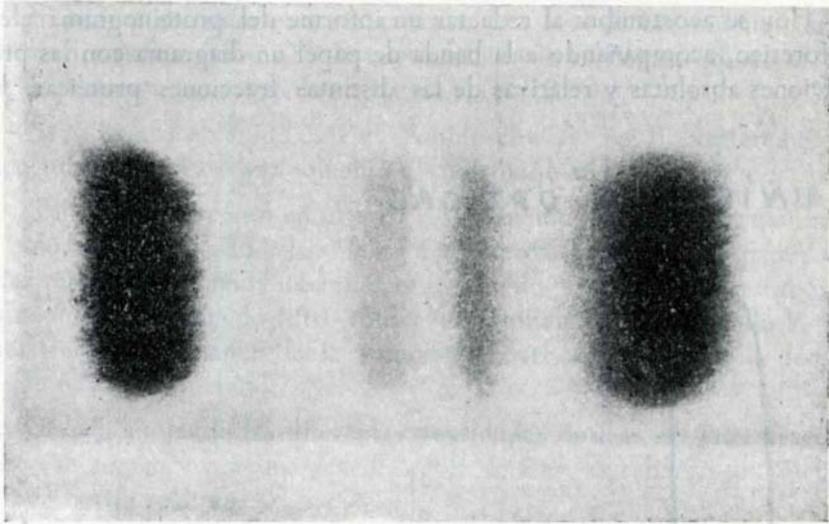


(Fig. 7) Cáncer de estómago

Y las Cirrosis Hepáticas con la gamma globulina aumentada.

Según lo expuesto, con un poco de práctica, se puede juzgar por los electrocromatogramas a qué enfermedad corresponde, pero para su

interpretación completa, para redactar un informe, acompañaremos a más del espectro, una curva y un diagrama con las proporciones tanto ab-



(Fig. 8) Cirrosis hepática

solutas como relativas de las distintas fracciones, así como también el tanto por ciento de la proteína total.

Las primeras expresiones o representaciones gráficas que se hicieron de estos cromatogramas, fueron mediante las curvas llamadas de Gaus, sobre papel milimetrado. Para su trazado, se requiere un planímetro (fig. núm. 9) o un aparato lector de tipo fotométrico, con el que se van tomando dimensiones de las manchas milímetro a milímetro, o densidades ópticas, se van plotando sobre papel milimetrado construyéndose con esto una curva que encierra un área cuyo valor total representaría el 100 por 100 de las proteínas totales, y el valor de las distintas fracciones, estaría representado por el área de cada cresta. Estos valores hay que calcularlos luego por técnicas trigonométricas, descomponiendo el área total, mediante tangentes o secantes, para transformarlos en triángulos, trapecios o figuras poligonales cuyas áreas se calculan mediante el teorema correspondiente, de los triángulos, trapecios, etc.

Todos estos cálculos, siendo muy exactos, son bastantes laboriosos y expuestos a errores personales, por lo que estas curvas están hoy en desuso.

Hoy se acostumbra al redactar un informe del proteinograma electroforético, acompañando a la banda de papel un diagrama con las proporciones absolutas y relativas de las distintas fracciones protéicas, las

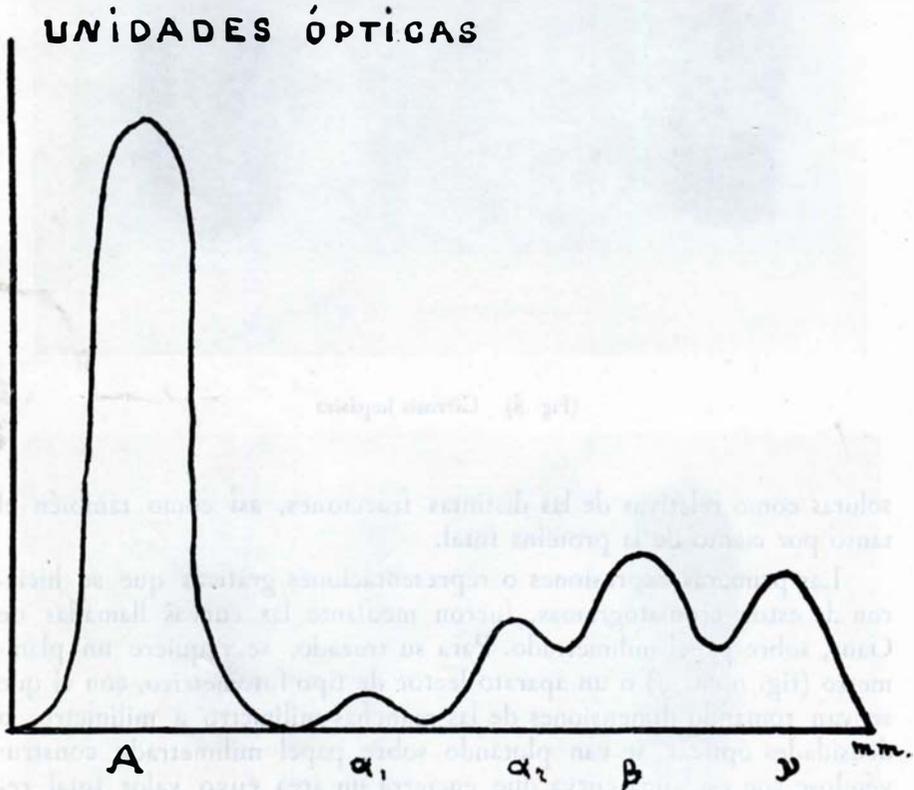


Fig. 9

cuales se calculan a partir del electrocromatograma por el método de corte y elución.

Consiste en cortar uno de los cromatogramas (para eso se hacen cinco de cada suero problema) por la línea de mínima densidad de color, obteniendo así cinco tiras de papel, cada una de ellas con la fracción

Con estos cálculos obtenemos el valor relativo de las cinco fracciones proteicas, pero el informe completo tendremos que expresarlo refiriéndolo también a las cantidades absolutas, o sea al tanto por ciento en gramos que contiene un suero en cada fracción, para poder calcular cuando existen DISPROTEINEMIAS como decíamos al principio y para lo cual tendremos que valorar el suero problema en su riqueza de proteínas totales, operación que se realiza por múltiples métodos, siendo el *que mejor resultado dio en nuestras manos* el de Gornall (fotocolorimétrico).

TECNICA.—Poner en un tubo de ensayo 0,20 c.c. de suero problema, bien centrifugado y libre de hemolisis, agregar 1,80 c.c. de suero fisiológico mezclar y añadir seguidamente 8 c.c. del reactivo de Gornall. Dejar reposar 30 minutos para el total desarrollo del color, llenar con esto el tubo del fotocolorimetro y practicar la lectura con filtro verde a 522 milimicrones, en comparación con una disolución de concentración cero, usada como patrón «blanco» preparada con 2 c.c. de suero fisiológico más 8 c.c. del reactivo.

Con la cifra de transmisión que se obtenga, búsquese en la tabla de calibración, el valor correspondiente.

REACTIVO DE GORNALL (biuret). En un matraz aforado de 1.000 c.c. póngase 1,50 gr. de Sulfato cuprico cristalizado y 6,00 gr. de Tartrato sódico potásico. Añádanse aproximadamente 500 c.c. de agua destilada y disuélvase totalmente. Añádanse sin dejar de agitar 300 c.c. de una solución de hidróxido sódico al 10 % y finalmente añádase 1,00 gr. de Yoduro potásico completando con agua destilada hasta la marca.

CALIBRACION Y CONTROL DE PROTEINAS TOTALES.—Hay que proceder a la valoración de las proteínas totales de una mezcla de sueros normales por el método gravimétrico, que no precisa de un destilador Kjeldahl y es menos complicado.

De una mezcla de varios sueros normales recientes, bien centrifugados y libres de hemolisis, tomamos 1 c.c. exactamente medido y lo vamos añadiendo gota a gota a un vaso de precipitado mediano conteniendo 10 c.c. de alcohol etílico de 95°. Llevar a un B. M. hirviendo durante unos cinco minutos, tapándolo con un cristizador o tapadera de caja de petri invertida, conteniendo agua fría, para condensar los vapores del alcohol.

Filtrar el alcohol hirviendo a través de un papel de filtro del Cresselius previamente desecado durante diez minutos a 100° y tarado exac-

tamente. El líquido que pasa puede enturbiarse por enfriamiento, cosa que no debe inquietarnos ya que es debido a los lípidos extraídos por el alcohol hirviendo. Verter sobre las proteínas precipitadas, agua destilada hirviendo arrastrando siempre las pequeñas partículas que pudieran quedar adheridas al vaso de precipitado. Estas aguas pueden seguir saliendo algo turbias por lo que seguiremos lavando hasta que salgan limpias.

Hacer pasar por el filtro 10 ó 20 c.c. de alcohol hirviendo, para deshidratar. Secar el filtro durante 45' a 100° y pesar exactamente.

El peso encontrado multiplicado por 100 nos dará el % de proteínas totales. Calcular el volumen necesario de este suero que tendremos que medir, para que en él, estén contenido 1 gr. de proteínas. Retirar exactamente este volumen, llevarlo a un matraz aforado de 100 c.c. y completar hasta la marca con solución de cloruro sódico al 9/1000.

Distribuir en tubos de ensayo limpios y secos en la forma siguiente:

| | | | | | | | | | | |
|----------------------------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---------|
| Del líquido del matraz | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 c.c. |
| Sol. ClNa al 9/1000 | 9 | 8 | 7 | 6 | 5 | 4 | 3 | 2 | 1 | 0 " |

Estas soluciones contienen por c.c. respectivamente:

| | | | | | | | | | | |
|-------------------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|-----|
| Miligramos de proteínas | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10. |
|-------------------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|-----|

Añadir a otra batería de tubos conteniendo 2 c.c. respectivamente, de estas soluciones, 8 c.c. del reactivo de Gornall y preparar al mismo tiempo un «blanco» con 2 c.c. de la solución de ClNa mas 8 c.c. del reactivo. Dejar reposar 30', pasar estos líquidos a los tubos del Fotocolorimetro previamente numerados marcando con una B al «blanco», practicar la lectura con filtro Verde a 522 milimicrones, en comparación con la concentración cero marcada con la B.

Represéntese gráficamente sobre papel milimetrado, colocando en las abscisas los miligramos % y en las ordenadas las densidades ópticas. Unanse los puntos donde convergen y obtendremos una línea recta.

Una vez conocida la cantidad en gramos de proteínas totales que contiene un suero y las proporciones relativas de sus distintas fracciones obtenidas por electroforesis, podemos transformar estos valores en cifras absolutas por otra sencilla regla de tres y para proporcionar al Clínico estos datos adoptaremos los modelos de Proteinogramas que se adjuntan.

En un suero normal nos dio para la albúmina el 65 % de la proteína total. El 5 % para la globulina alfa-uno. El 6 % para la globulina alfa-dos. El 9 % para la globulina beta. Y el 15 % para la globulina gamma. DIREMOS:

La proteína total calculada por el método de Gornall fueron 7,00 g.

Si el 100 % son 7,00 gr., el 65 % que arroja la albúmina serán 4,55 gr.

Si el 100 % son 7,00 gr., el 5 % que arroja la alfa-uno serán 0,35 gr. y así sucesivamente.

Figura 10

| COCIENTE A/G $\frac{4,55}{2,45} = 1,85$ | Albúmina | GLOBULINAS | | | | PROTEINAS TOTALES |
|--|----------|------------|------------|---------|----------|----------------------|
| | | α_1 | α_2 | β | γ | |
| Grms. X 100 cc. de SUERO | 4,55 | 0,35 | 0,42 | 0,63 | 1,05 | 7,00 |
| % de la TOTAL | 65 | 5 | 6 | 9 | 15 | 100 |

Proitienograma normal.

Figura 11

| COCIENTE A/G $\frac{1,99}{7,51} = 0,26$ | Albúmina | GLOBULINAS | | | | PROTEINAS TOTALES |
|--|----------|------------|------------|---------|----------|----------------------|
| | | α_1 | α_2 | β | γ | |
| Grms. X 100 cc. de SUERO | 1,99 | 0,19 | 0,66 | 0,76 | 5,90 | 9,50 |
| % de la TOTAL | 21 | 2 | 7 | 8 | 62 | 100 |

Mieloma
J. C.

Figura 12

| COCIENTE $\frac{A}{G}$ $\frac{0,70}{4,30} = 0,16$ | Albúmina | G L O B U L I N A S | | | | PROTEINAS TOTALES |
|--|----------|---------------------|------------|---------|----------|----------------------|
| | | α_1 | α_2 | β | γ | |
| Grams. X 100 cc. de S U E R O | 0,70 | 0,25 | 2,45 | 0,75 | 0,85 | 5,00 |
| % en la T O T A L | 14 | 5 | 49 | 15 | 17 | 100 |

Nefrosis A. N.

Figura 13

| COCIENTE $\frac{A}{G}$ $\frac{2,38}{2,58} = 0,91$ | Albúmina | G L O B U L I N A S | | | | PROTEINAS TOTALES |
|--|----------|---------------------|------------|---------|----------|----------------------|
| | | α_1 | α_2 | β | γ | |
| Grams. X 100 cc. de S U E R O | 2,38 | 0,35 | 0,45 | 0,64 | 1,14 | 4,96 |
| % en la T O T A L | 48 | 7 | 9 | 13 | 23 | 100 |

Cáncer de Estómago
J. M.º M.

Figura 14

| COCIENTE $\frac{A}{G}$ $\frac{1,21}{4,57} = 0,26$ | Albúmina | G L O B U L I N A S | | | | PROTEINAS TOTALES |
|--|----------|---------------------|------------|---------|----------|----------------------|
| | | α_1 | α_2 | β | γ | |
| Grms. X 100 cc. de S U E R O | 1,21 | 0,29 | 0,41 | 0,75 | 3,12 | 5,78 |
| % de la T O T A L | 21 | 5 | 7 | 13 | 54 | 100 |

Cirrosis Hepática
P. P.

En los sueros normales la albúmina se encuentra en una proporción alrededor de los 4,50 gr. por cada 100 de suero.

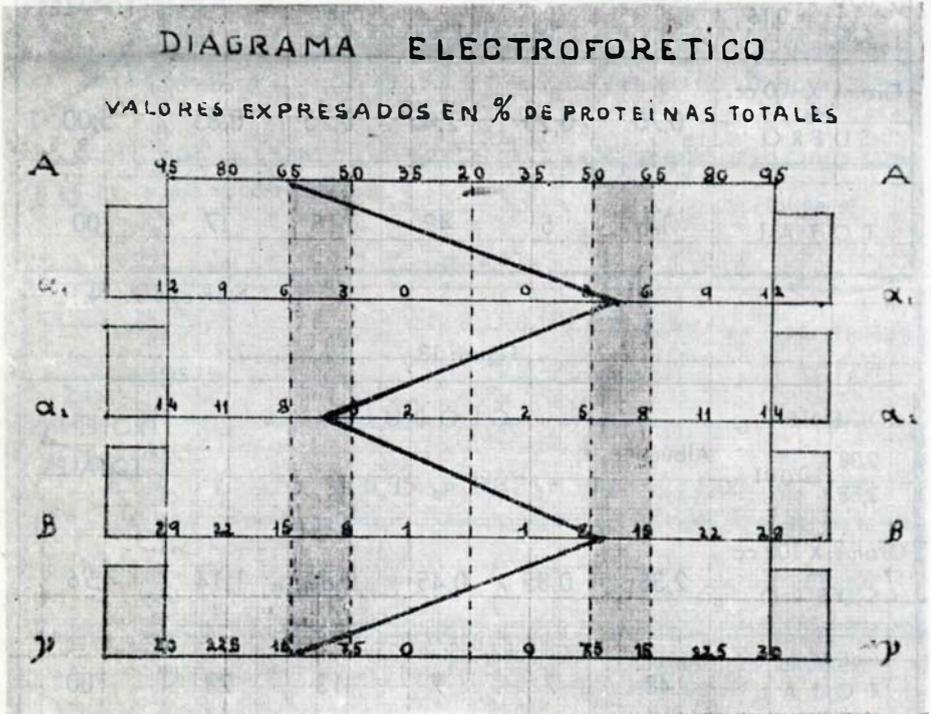


Figura 15

Las tres fracciones siguientes, alfa beta y gamma, alrededor de 1,00 gr. por cada 100 c.c. de suero, que vienen a completar los 7,00 gr. de proteínas totales.

Dividiendo la cifra de albúmina por la suma de las tres fracciones de globulina, nos dá un cociente A/G que cuando el suero es normal, está comprendido entre 1,5 y 2.

El segundo proteinograma es una HIPERPROTEINEMIA típico en el Mieloma, las proteínas totales arrojan una cifra de 9,50 gr. por cada 100 c.c. de suero, dán lose esto en todos los procesos inflamatorios, en los Linfogranulomas, en las Endocarditis etc. La albúmina está disminuida. Las globulinas alfa y beta se conservan alrededor de lo normal

y en cambio la gamma-globulina aumenta cinco veces más de lo normal. El cociente A/G es menor que la unidad.

El tercer proteinograma es una HIPOPROTEINEMIA, característico de las Nefrosis y Glomerulonefritis. Albúmina exageradamente disminuida y

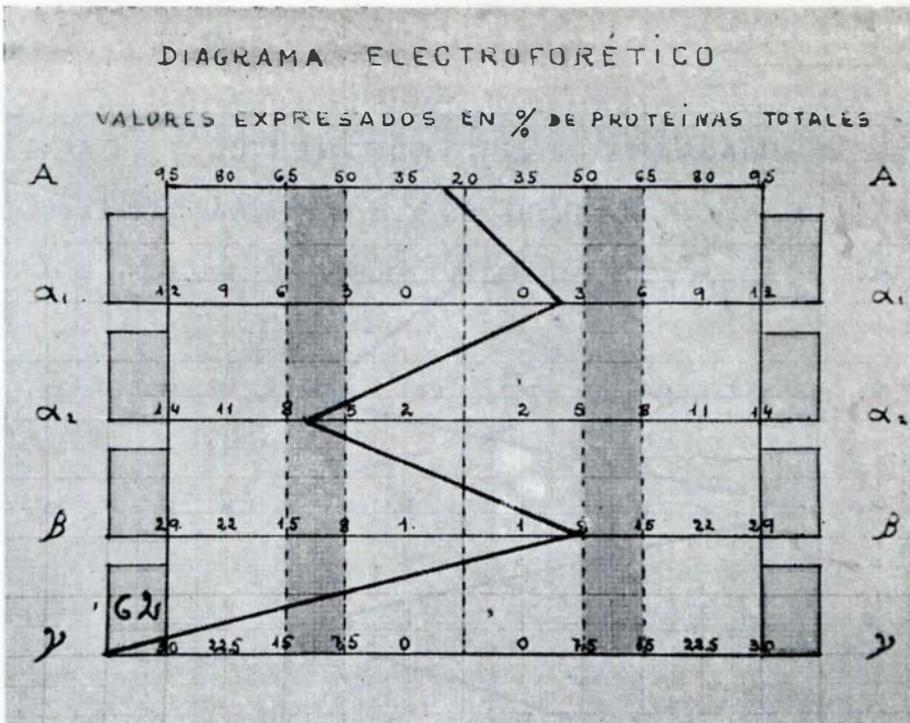


Figura 16

la globulina alfa-dos aumenta a más del doble. El cociente A/G es menor que la unidad. Observemos que esto ocurre, tanto en las Hiperproteinemias como en las Hipoproteinemias.

El cuarto es otra Hipoproteinemia, propia de las Neoplasias del tubo digestivo. Albúmina ligeramente disminuida y las demás fracciones, prácticamente igual a la unidad. El cociente $A/G = 0,87$.

El quinto diagrama es otra Hipoproteinemia, clásica de las Cirrosis Hepáticas por tener la globulina gamma muy aumentada, igual que en Mieloma, pero con la gran diferencia de que allí la gamma-globulinemia cursa con una Hiperproteinemia.

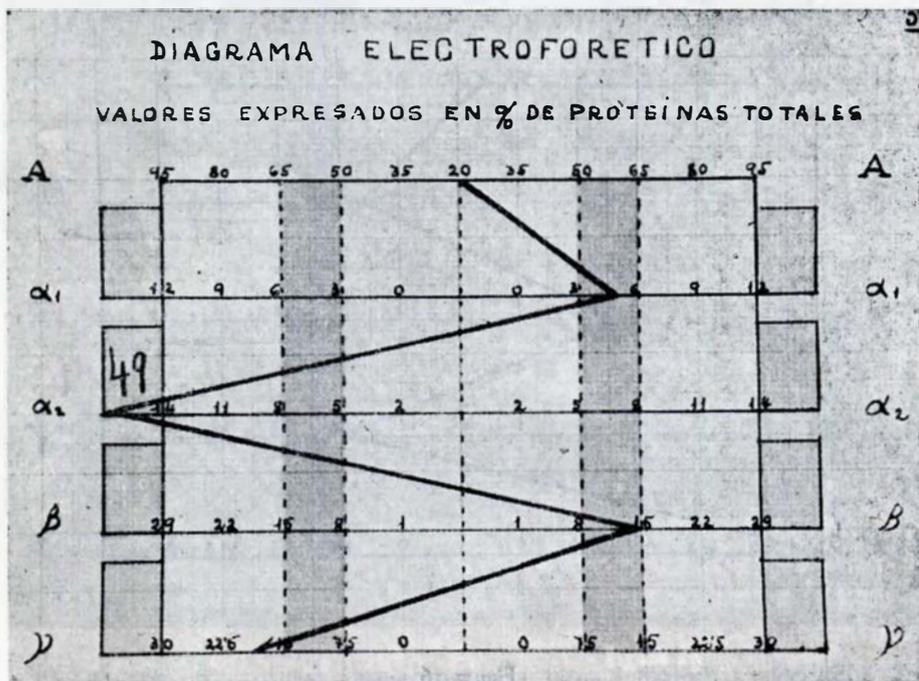


Figura 17

Otra forma de representar los cromatogramas es mediante las curvas que emplea el Doctor Segovia, que al par de ser muy expresivas, se trazan rápidamente, y al primer golpe de vista podemos apreciar si existe una Disproteinemia cuando las crestas de dichos trazos caen o no dentro de la zona milimetrada algo más obscura.

Consisten como puede verse en cinco sistemas de coordenadas dobles y combinadas de tal forma que están simétricamente dispuestas a partir del eje central. Cada coordenada está destinada a una fracción

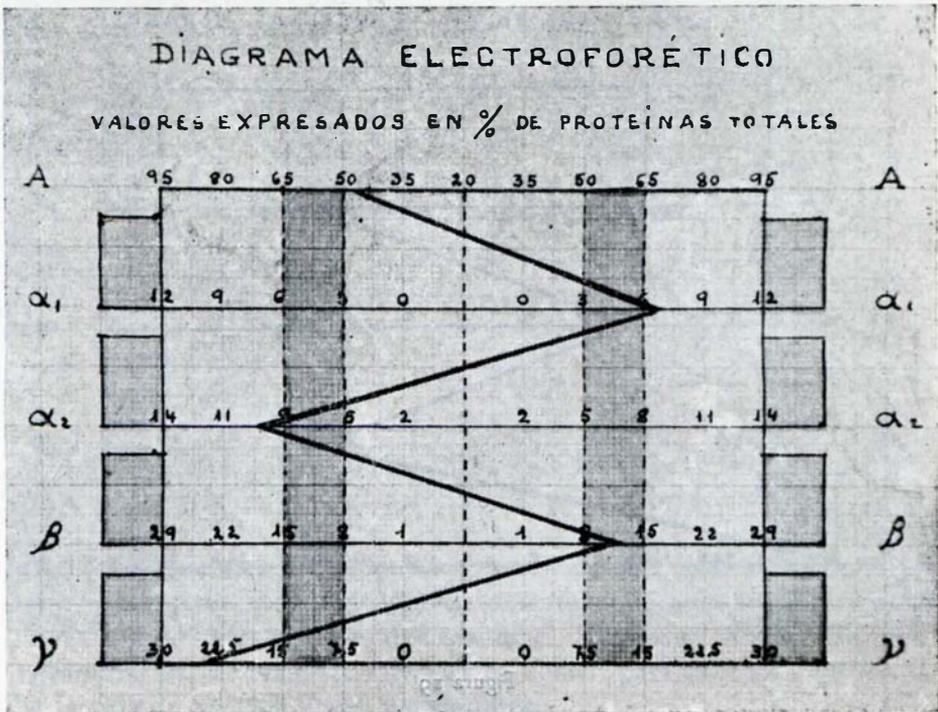


Figura 18

proteica en la que va marcada las distintas proporciones normales y patológicas de cada fracción, llevando a más un casillero adicional donde marca con la cifra que arroje, las proporciones de proteínas exageradamente altas.

Empieza marcando la fracción albúmina indistintamente a la izquierda o la derecha del eje central, siguiendo luego con las demás fracciones por su orden electroforético, alternándolas de una a otra coordenada.

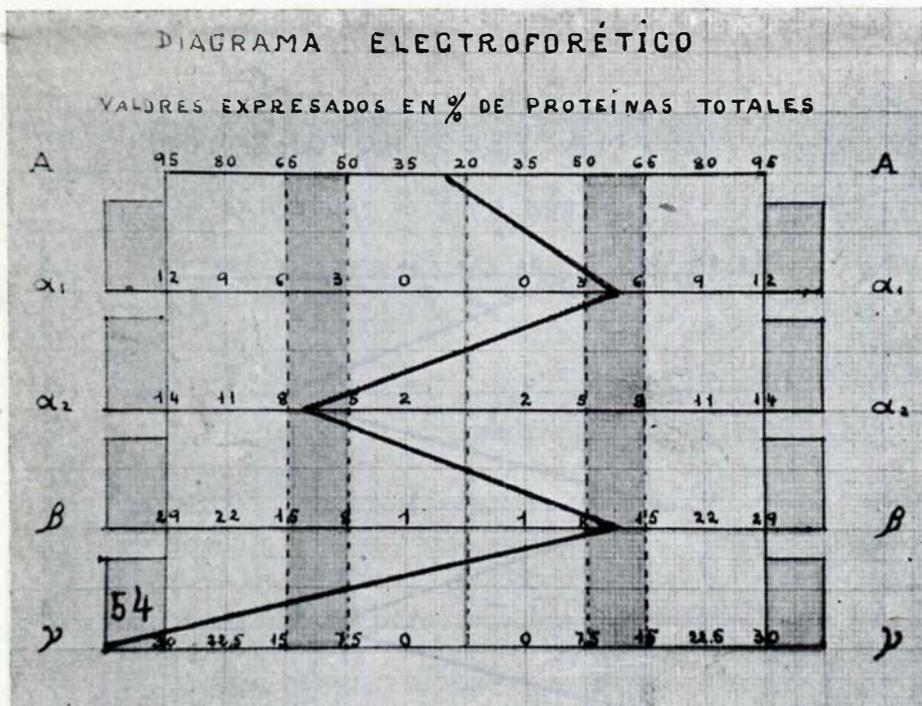


Figura 19

Uniendo después todos los puntos obtiene una línea quebrada, cuyos vértices caerán o no, dentro de las zonas algo más oscuras, que corresponden a los límites normales.