

Departamento de Investigación del Hospital Municipal de Infecciosos
Barcelona

Producción de disproteinemias experimentales en conejos mediante la inyección de tinta china o rojo congo

por J. Gras y A. Foz

(Recibido para publicar el día 15 de diciembre de 1950)

La producción experimental de disproteinemias mediante sustancias de acción sobre el S.R.E. ha sido relativamente poco estudiada; muchos de los trabajos se refieren exclusivamente a las variaciones del fibrinógeno y en los que se estudian las restantes fracciones los resultados son poco demostrativos (2-4-5-10-11). Por la importancia que la producción de estas disproteinemias puede tener para contribuir al esclarecimiento de problemas concernientes al origen y fisiopatología de las proteínas plasmáticas nos interesó emprender su estudio. Presentamos en este trabajo los resultados obtenidos mediante la inyección de tinta china y rojo congo en conejos en los cuales se ha producido una disproteinemia con hipo o hiperproteinemia cuantitativa, ésta menos manifiesta, y un descenso de la fracción albúmina.

Material y métodos

Como animal de experimentación se ha utilizado el conejo común, albino o no, de unos 1.500 a 2.000 gramos de peso. La alimentación a que han sido sometidos ha sido la habitual en nuestros estabularios, si bien cuidando que en cada lote fuese uniforme en el curso de toda la experiencia. Antes de iniciar la inyección de colorante, los animales se han mantenido en un período basal previo de un mes de duración como promedio y en el que se practicaron determinaciones que sirven de control a las obtenidas en el período en el que los animales son sometidos a las inyecciones. En algunos de ellos se sigue también un período posterior de recuperación. El trabajo ha sido llevado a cabo en un total de 83 animales, pero en los protocolos se presentan únicamente los datos correspondientes a 47. Esto se debe a que han

de restarse del total 5 que fueron sometidos únicamente a extracciones sanguíneas, a dosis y ritmos iguales a los sometidos a experiencia, para comprobar que estas extracciones no influyen en la proteinemia y los restantes 30 por haberse perdido el animal en fases iniciales de las experiencias, a consecuencia de la punción cardíaca, o después de la inyección del rojo congo en los lotes en que se inyectaba a dosis elevadas.

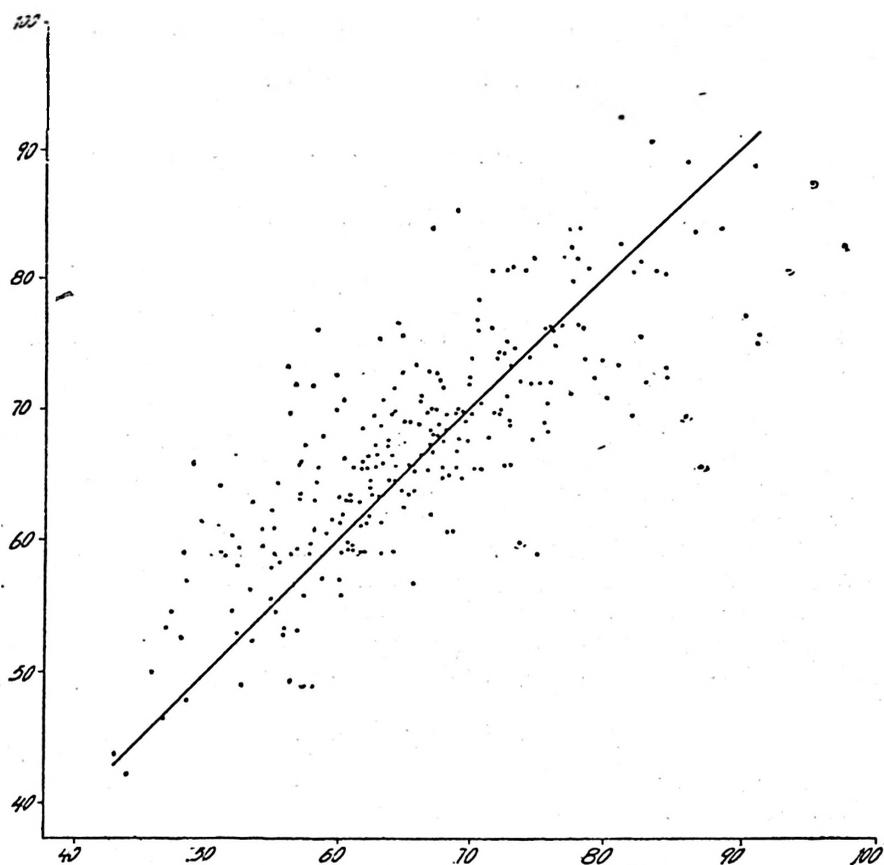


Fig. 1

Gráfico comparativo de los valores de proteinemia total en g. %100, obtenidos por refractometría y por gravimetría. Como se toma como patrón la refractometría todos los valores de esta se encuentran en la línea recta, por lo que no se han representado. Los puntos que aparecen a lo largo de esta recta corresponden a valores gravimétricos.

Como sustancias de experimentación se han utilizado la tinta china en suspensión al 2 % por inyección diaria intravenosa, subcutánea e intraperitoneal, alternativamente, y el rojo congo Merck para uso intravenoso y rojo congo Merck indicador a concentra-

ciones y dosis variables según los lotes y que se especificarán posteriormente.

Como métodos de determinación de la proteinemia se han utilizado el refractométrico y el gravimétrico. Para el primero se ha seguido la fórmula de Reiss con la corrección de temperatura propuesta por Sols (8). Para el gravimétrico la técnica de Plötner (7), modificada, substituyendo los lavados por filtración por lavados por centrifugación. Se han practicado en el transcurso de este trabajo 244 determinaciones comparativas entre ambos métodos cuyos resultados están expuestos gráficamente en la figura 1. Como puede verse en la misma, aunque las determinaciones aisladas pueden presentar discrepancias, debe aceptarse un paralelismo correcto, cuando el número de determinaciones es suficientemente grande.

Para la determinación del cociente albúmina-globulinas se ha utilizado la técnica refractoviscosimétrica (R. V.) y la precipitación por sulfato amónico siguiendo la pauta de la técnica de Plötner con la modificación antes indicada. Se han practicado 238 determinaciones paralelas, observándose una dispersión bastante grande de valores, comprensible, si se tiene en cuenta que la primera técnica no da valores reales; sin embargo, en las determinaciones seriadas y numerosas se observó un paralelismo en el sentido de las oscilaciones, con tendencia a dar valores superiores a la refractoviscosimetría, principalmente en los cocientes altos.

La mayoría de gráficas y de valores que se dan, corresponden a la refractoviscosimetría, pues es la técnica con la que se han hecho mayor número de determinaciones; creímos más interesante utilizar una técnica fácil que permita prodigar las determinaciones, controlada, como hemos indicado, por la gravimetría, que utilizar una técnica más compleja que sólo nos permitiese número escaso de determinaciones, principalmente teniendo en cuenta que nos interesa más que la exacta precisión de los valores absolutos, la comparación de los mismos entre el período basal y el de experiencia.

Finalmente se llevaron a cabo experiencias en algunos conejos, en los que se hizo el fraccionamiento con sulfito sódico y la determinación de proteínas por la reacción del biuret con el electrofotómetro de Evans, técnica de la que al iniciar este trabajo (1945) no teníamos experiencia personal.

Resultados

1. *Experiencias con tinta china.*

Con tinta china se han estudiado 9 animales. La inyección se ha realizado con suspensión al 2 %, inyectada por vía intrave-

nosa, subcutánea o intraperitoneal en días consecutivos. Como ya hemos dicho, antes de empezar la serie de inyecciones, los animales han sido estudiados durante un período de 22 días, período en el que se han realizado determinaciones de proteinemia total e índice albúmina-globulina, al menos una vez por semana, para así poder valorar los resultados encontrados a lo largo de la experiencia, comparándolos con los de este amplio período basal en sus valores más frecuentes y en la amplitud de las oscilaciones.

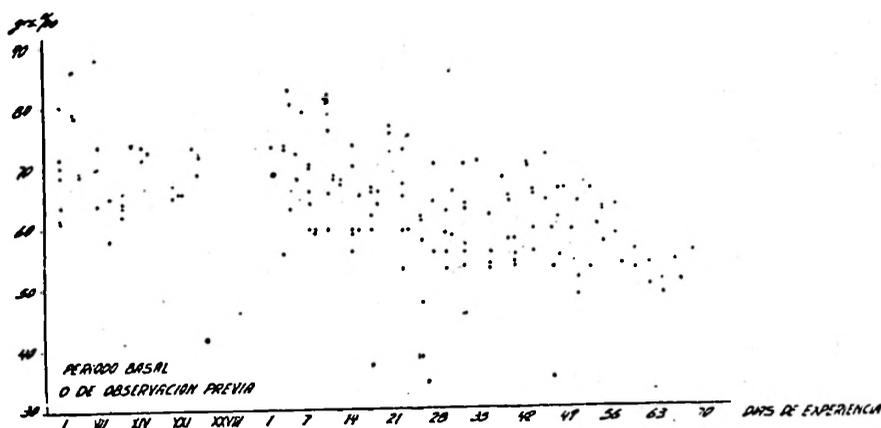


Fig. 2

Valores de la proteinemia total en 9 conejos sometidos a las inyecciones de tinta china

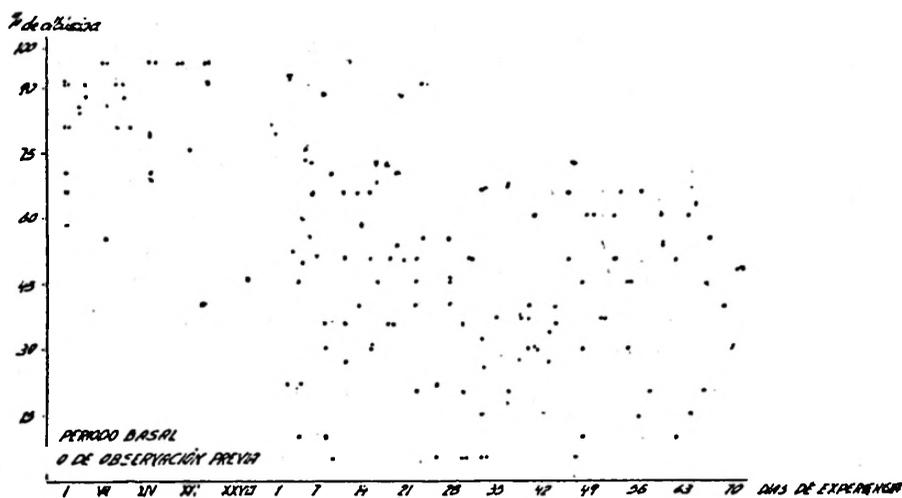


Fig. 3

Valores del porcentaje de albúmina (R. V.) en 9 conejos sometidos a las inyecciones de tinta china

Después de este período preliminar de observación, la experiencia se ha prolongado en algunos conejos hasta 68 días, en otros hasta la muerte del animal (lo que ha ocurrido entre los 30 y 61 días), y, finalmente, en dos de ellos se interrumpieron las inyecciones en los días 66 y 68 para estudiar el período de recuperación.

El conjunto de resultados obtenidos vienen expresados gráficamente en las figuras 2 y 3 y en el cuadro.

CUADRO I

Variación del porcentaje de valores de proteinemia total superiores a 74, entre 74 y 62 e inferiores a 62 g. ‰ en los conejos sometidos a inyecciones de tinta china.

Período de observación	Cifras de proteínas expresadas en g. ‰			N.º de determinaciones
	Super. d 74	Entre 74 y 62	Inferior a 62	
Período basal	11'1 ‰	72'2 ‰	16'6 ‰	36
Semanas 1 a 3	15'3 ‰	56'4 ‰	28'5 ‰	39
Semanas 3 a 6	4'0 ‰	36'3 ‰	59'0 ‰	44
Semanas 6 a 10	0'0 ‰	30'5 ‰	69'5 ‰	36

Del examen de la figura 2 y cuadro n.º 1 se deduce claramente la tendencia a la hipoproteinemia, como consecuencia de la inyección prolongada de tinta china. En las tres primeras semanas, período al cual quedan limitados numerosos trabajos que estudian la relación entre el bloqueo experimental del sistema retículo-endotelial y la producción de anticuerpos, las oscilaciones son quizá más amplias que en el período basal y se inicia una hipoproteinemia que, a partir de la tercera semana, se hace mucho más manifiesta, y que, pasadas seis semanas, se presenta ya, aproximadamente, en el 70 % de las determinaciones.

Estas modificaciones en la proteinemia total se acompañan de un descenso marcado del porcentaje de albúmina, demostrable claramente cuando el descenso de proteinemia total es aún muy discreto. En estas condiciones disminuye el índice albúmina-globulinas y se llega con gran frecuencia a la inversión del mismo. En todo el curso de la experiencia se mantiene este descenso del porcentaje de albúmina, si bien con valores que oscilan entre límites bastante amplios. Estos resultados se exponen en la figura 3.

2. Experiencias con rojo congo.

Con rojo congo Merck, para uso intravenoso, hemos inyectado un total de 20 conejos con soluciones acuosas a concentraciones

del 1 al 6 %, exclusivamente por vía intravenosa. Con esta sustancia, a pesar de que algunos de los períodos de inyección se han prolongado durante setenta días, se llega a dosis tóxicas que matan al animal con rapidez, sin que se produzca una disproteinemia valorable.

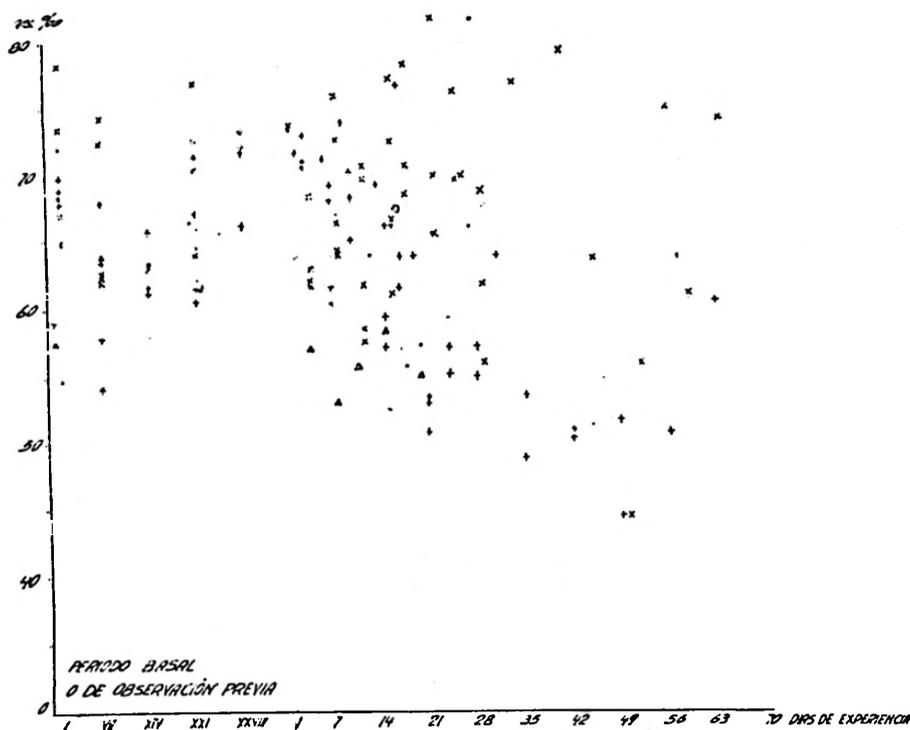


Fig. 4

Valores de la proteinemia total en conejos sometidos a las inyecciones de R. C. indicador Merck. * = Lote de 2 conejos, inyectados el 1.º día con 5 c.c. de R. C. I. al 1 ‰, el 2.º día con 3 c.c. R. C. I. al 1 ‰ y los siguientes con 5 c.c. de R. C. uso intravenoso al 1 ‰. x = Lote de 5 conejos inyectados diariamente con 2 c.c. de R. C. I. al 1 ‰. + = Lote de 4 conejos inyectados diariamente con 4 c.c. R. C. I. al 1 ‰. Δ = Conejo inyectado diariamente con 6 c.c. de R. C. I. al 1 ‰.

Con rojo congo Merck indicador se han estudiado 15 conejos, inyectando por vía intravenosa una solución acuosa al 1 ‰ (a concentraciones superiores se obtienen suspensiones que producen choques mortales en el conejo), y en cantidad variable de 1 a 6 cc., según los lotes.

En esta experiencia se comprueba, en cuanto a la proteinemia total, una gran dispersión de valores en el período en que los conejos están sometidos a las inyecciones. Este hecho destaca claramente en la gráfica de la figura 4; se observa que así como en

el período basal el 80.9 % de las determinaciones corresponden a valores comprendidos entre 60 y 75 g./1.000, con solamente un 4.7 y 14.2 % de valores por encima o por debajo, respectivamente, de estos límites, encontramos en el período de experiencia, en 86 determinaciones, un 50 % entre 60 y 75 g./1.000 y un 8.9 y 34.8 %, respectivamente, por encima o por debajo de estos

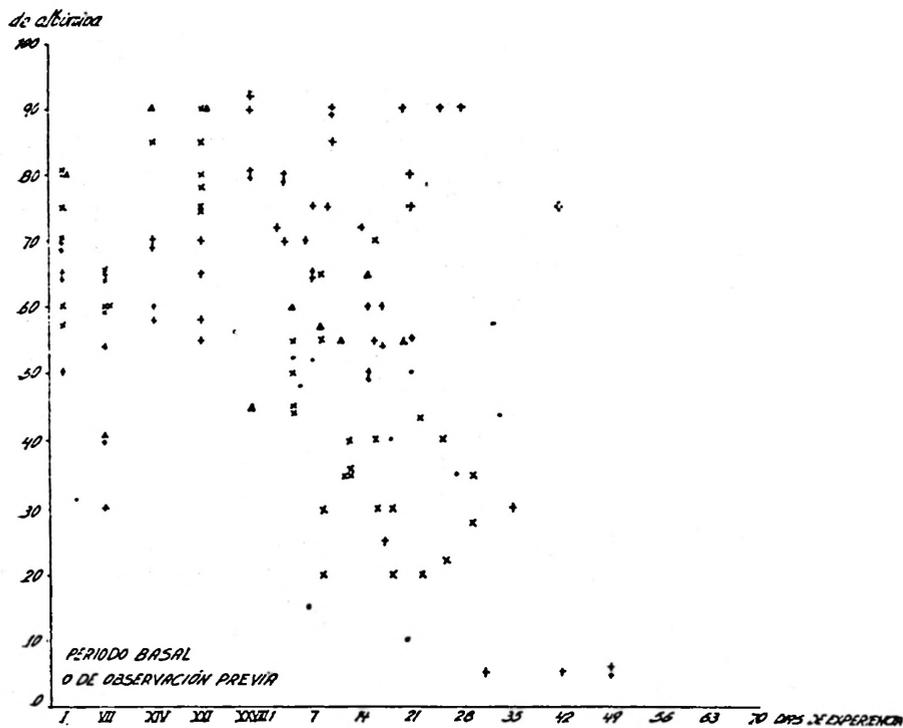


Fig. 5

Valores del porcentaje de albúmina (R. V.) en conejos sometidos a las inyecciones de R. C. Indicador Merck. La expresión de los puntos en la gráfica corresponde a las indicaciones dadas en la fig. 4

límites, es decir, que hay una clara dispersión de valores con aumento preferente de los situados por debajo de 60 g./1.000.

Es muy interesante contrastar esta dispersión de valores de la proteinemia total con los resultados en la variación del porcentaje de albúmina. Estas variaciones están expresadas gráficamente en la figura 5. En contraste con la gráfica de proteinemia total se observa en ésta un claro descenso en los valores del porcentaje de albúmina. Consideramos a esta observación de gran interés y por ello la discutiremos después.

Se estudiaron también tres conejos en los que las determinaciones de proteínas y fracciones se llevaron a cabo mediante la técnica del biuret y sulfito sódico y lectura con el electrofotómetro de Evans. Los resultados obtenidos son similares a los de la serie

CUADRO II

Días	Peso	Refractometría	Biuret			
		Proteínas	Proteínas totales	Albúmina	Globulinas	
I	2.415	56'5	54'80	37'75	17'05	
VI		56'5	53'3	28'8	24'5	
6	2.445	49'0	47'36	20'63	26'73	
9		54'6	51'00	33'79	17'21	
11	2.500	56'5	53'62	23'40	30'22	
15		58'3	55'24	20'80	34'44	
19		62'0	55'56	23'24	32'32	
23		56'74	23'88	32'87		
27		2.565	58'3	57'18	22'25	34'93
34			58'3			
37			58'00			
41		56'5	57'50	15'27	41'23	
44			55'24	26'00	29'24	
48		63'9	59'80	15'59	44'21	
55	2.775	65'8	57'68	27'30	30'38	
III		71'3	61'42	18'03	43'39	
VI	2.560	63'9	59'14	11'37	47'77	
X		66'0	59'15			
XVII		73'2	68'56	40'14	28'43	
XXV		63'9	58'50	39'16	19'34	
XXXI		67'6	65'64	40'62	25'02	

Datos correspondientes al C. 81 inyectado diariamente con 5 c.c. de R. C. I. al 1%. El primer período de cifras romanas corresponde al basal y el último al de recuperación. Las inyecciones se practicaron durante el período expresado por cifras arábigas.

que acabamos de exponer. Sin embargo, presentamos el protocolo de uno de ellos (cuadro 2) para mayor claridad. Puede verse en este cuadro como la proteinemia total oscila alrededor de valores similares a los del período basal, aunque en el período de recuperación presenta una tendencia neta al aumento. Junto a este

comportamiento de la proteinemia total, se observa claramente como la albúmina desciende y la globulina aumenta.

En todos los animales estudiados se siguió la curva de peso para poder controlar si la disproteïnemia aparecida podía atribuirse o no a un estado general de hiponutrici3n. En la serie inyectada con tinta china se observ3 la p3rdida de peso de los 30 a los 60 d3as del per3odo de inyecci3n. Es precisamente en esta fase cuando la hipoproteïnemia se hace m3s acusada, pero, sin embargo, tanto juzgando por la proteinemia total como por la disminuci3n del porcentaje de la albúmina, debemos aceptar que la disproteïnemia se hab3a iniciado ya antes de comenzar la p3rdida de peso. Este hecho se observa m3s claramente en la serie de conejos tratados con rojo congo indicador, en la cual, de los 15 conejos tratados, s3lo en dos de ellos se observ3 una p3rdida de peso.

Tampoco puede considerarse a esta disproteïnemia consecuencia de las repetidas sangr3as a que se someten los animales para las determinaciones, pues, como ya hemos indicado, en un lote de 5 animales sometidos únicamente a estas extracciones no se comprob3 modificaci3n cualitativa ni cuantitativa de la proteïnemia.

Dado el largo per3odo de experiencia y las repetidas punciones card3acas a que fueron sometidos los animales para la extracci3n de sangre, un gran n3mero de ellos murieron a consecuencia de la punci3n. Sin embargo, en alguno de ellos se sigui3 un per3odo de recuperaci3n en el cual pudo comprobarse la reversi3n del estado de disproteïnemia producida. Como ejemplo puede servir el protocolo expuesto en el cuadro 2.

En tres de los conejos muertos por punci3n, en los que se pudo hacer la necropsia reciente, se hizo por el doctor Ciscar un estudio histol3gico para comprobar el estado del h3gado, por el valor que este hecho tiene en la discusi3n del significado de nuestras experiencias. En estos conejos no se pudo comprobar una alteraci3n histol3gica del par3nquima hep3tico; por el contrario, en las c3lulas de Kupffer y en S.R.E. de distintos3rganos, principalmente del bazo, se comprob3 la presencia de la substancia colorante inyectada en cantidad mayor o menor

Discusi3n

De estas experiencias que acabamos de describir se deduce claramente la posibilidad de producir en conejos un estado de hipoproteïnemia por la inyecci3n prolongada de tinta china, hipoproteïnemia que se debe fundamentalmente a un descenso de la fracci3n albúmina.

Con rojo congo Merck indicador se ha producido tambi3n una

evidente disproteinemia con hipoproteinemia, hiperproteinemia o valores globales normales, pero con el signo típico de toda disproteinemia, es decir, el desequilibrio entre las fracciones a expensas del descenso de la albúmina (3).

Por el contrario, con rojo congo Merck para uso intravenoso no se ha producido disproteinemia, a pesar de llegarse a administrar dosis tóxicas para el animal.

Uno de los hechos que creemos interesante destacar, de nuestras experiencias, es el distinto comportamiento del rojo congo para uso intravenoso y del rojo congo indicador. A pesar de no habernos sido posible obtener datos concretos de las diferencias entre ambos productos, creemos que una gran parte de este distinto comportamiento puede ser debida a la diferencia en el grado de dispersión de las soluciones de uno y otro.

El mejor conocimiento de estas disproteinemias experimentales producidas por substancias que se fijan en el S. R. E., puede repercutir beneficiosamente en el conocimiento de la relación entre la génesis de los anticuerpos y dicho sistema. Como es sabido, una de las técnicas más empleadas en el estudio de este problema consiste en comprobar las diferencias en la producción de anticuerpos en animales sanos y animales sometidos a la inyección de substancias de este tipo. Los resultados de estas experiencias han sido bastante discordantes (1), y tenemos la impresión de que mientras el estímulo antigénico no se realice hasta el momento en que se haya establecido claramente una disproteinemia que podamos mantener durante todo el período en que se lleva a cabo la formación de los anticuerpos, no podrán obtenerse resultados definitivamente valorables.

Nos interesa también destacar los resultados de nuestras experiencias en lo que se refiere a su importancia para el esclarecimiento del problema del lugar de origen de las proteínas plasmáticas. Madden y Whipple (6) aceptan que la albúmina se generaría en el hígado y por el contrario la globulina tendría su origen en el S. R. E. Se basan para esta concepción, aparte de otras razones, en los trabajos que demuestran la producción de hipoproteinemia, con descenso de la fracción albúmina, por la inyección de substancias de acción tóxica sobre la célula hepática. Sin embargo, estas experiencias no son absolutamente demostrativas, puesto que ha podido comprobarse que estas substancias poseen además acción lesiva sobre el S. R. E., no solamente del hígado, sino también de los otros órganos (9). La concepción de Madden y Whipple es discutible por diversas razones, pero en este momento nos interesa solamente señalar que nuestras experiencias van también en contra de dicha interpretación, ya que hemos conseguido la producción experimental de hipoproteinemias o disproteinemias sin hipoproteinemia total, pero con disminución

acentuada de la fracción albúmina, mediante sustancias de acción predominante sobre el S. R. E., y como ya hemos señalado antes, sin perturbación histológica del parénquima hepático.

Estas experiencias, a nuestro parecer, son un dato más a favor de la génesis, tanto de la albúmina como de la globulina, en el S. R. E., extra e intrahepático; la disminución de la albúmina es un hecho general en toda disproteïnemia, sea del tipo que sea, y puede interpretarse, y nosotros interpretamos, no como demostrativo de un origen distinto para estas fracciones, sino, más bien, de su interdependencia genética (3).

Señalamos finalmente, como dato importante en apoyo de esta interpretación, el hecho comprobado en este trabajo de que con una misma sustancia se pueden obtener estados de disproteïnemia, con hiperproteïnemia, hipoproteïnemia o cifras totales dentro de los valores normales, pero lo que se produce constantemente, sea cual sea la modificación de la proteïnemia total, es un descenso de la fracción albúmina.

Agradecemos a la señorita Ana María Arce la constante ayuda prestada en la realización práctica de este trabajo.

Resumen

Se estudia la producción experimental de disproteïnemias en el conejo por inyección de tinta china y rojo congo.

En un lote de nueve conejos inyectados con tinta china se ha comprobado la producción de una hipoproteïnemia a expensas de la disminución de la fracción albúmina.

En un lote de 18 conejos inyectados con rojo congo Merck indicador, se comprueba la producción de un estado disproteïnémico caracterizado por una gran dispersión de valores, por lo que se refiere a la proteïnemia total, pero con un descenso constante de la fracción albúmina.

En un lote de 20 conejos inyectados con rojo congo Merck para uso intravenoso no se ha conseguido la producción de variaciones significativas de la proteïnemia total ni de las fracciones.

En la discusión de este trabajo se considera que los resultados obtenidos van a favor de la génesis, tanto de la albúmina como de la globulina, en el S.R.E. Se destaca el hecho comprobado de que con una misma sustancia se pueden obtener estados de disproteïnemia, con hiperproteïnemia, hipoproteïnemia o cifras de proteínas totales dentro de los valores normales, pero en los que se presenta siempre como hecho característico un descenso de la fracción albúmina.

Summary

The experimental production of disproteïnemia in rabbits by injections of Chinese Ink or Congo Red is examined in this paper.

In a group of 9 rabbits injected with Chinese Ink the production of an hypoproteïnemia was shown at the expense of a decrease in the albumin fraction.

In 18 rabbits treated with Congo Red (Merck indicator) a state of disproteinemia was established, characterized by a dispersion of the values of total proteinemia but with a constant fall in the albumin fraction.

In the case of 20 rabbits treated by Congo Red (Merck intravenous) it was found impossible to effect significant variations in total proteinemia nor in the fractions.

In the commentary on this experiments it may be considered that the results obtained indicate the genesis for both albumin and globulin in R.E.S. A point of great interest is the fact observed that with the same substance conditions of disproteinemia can be produced in conjunction with hyperproteinemia, hypoproteinemia or values of total proteinemia within the normal range; however a characteristic which is always present is the fall of the albumin fraction.

Bibliografía

- (1) BERASATEGUI, G.: *Arch. Cardio Hemat.*, 6, 394. 1925.
- (2) DU BOIS, A. H.: *C. R. Soc. Biol.* 188, 637. 1931.
- (3) GRAS, J.: *R. esp. Fisiol.* 6, 275. 1950.
- (4) HELD, A., y BEHR, C. H.: *Klin. Woch.* 13, 1120. 1934.
- (5) JAFFE, R. M.: *The reticulo-endothelial System*. Handbook of Hematology de H. DOWNEY, Vol. II, pág. 977. Paul B. Hoeber, New York, 1938.
- (6) MADDEN, S. C., y WHIPPLE, G. H.: *Physiol. Rev.* 204, 194. 1940.
- (7) PLOTNER, R.: *B. Zeitschr.* 286, 429. 1936.
- (8) SOLS, A.: *R. esp. Fisiol.* 2, 175, 1946.
- (9) STASNEY, J., y HIGGINS, G. M.: *Folia Haematol.* 55, 93, 1956.
- (10) VILLAR CASO, J., RIVERO FONTÁN y ZOFMAN: *Med. Clínica* 11, 418. 1948.