

Departamento de Investigación del Hospital Municipal de Infecciosos
Sección Inmunoquímica: J. Gras. Barcelona

Electroforesis en papel de las proteínas de sueros normales y patológicos (*)

por **J. Gras**

(Recibido para publicar el día 28 de marzo de 1952)

Desde hace dos años, se han desarrollado y adquirido gran difusión, diversas técnicas para llevar a cabo la electroforesis de las proteínas del suero en papel (3, 5, 11, 12, 13, 14), en lugar de hacerlo en forma libre en medio líquido, como se hacía en el aparato clásico de Tiselius. La electroforesis en papel presenta ventajas prácticas junto con un gran interés teórico, pues permite una separación absoluta de las fracciones, practicar la electroforesis bidimensional, posibilidad de estudiar las relaciones entre proteínas y otros componentes del suero, aparte de que, al trabajar con cantidades tan pequeñas de líquido permite hacer con mayor facilidad estudios electroforéticos en líquido cefalorraquídeo, orina y aun humor acuoso. Hemos creído interesante, dadas las diferencias de ciertas condiciones técnicas que pueden influir en el valor de alguna de las fracciones (globulinas α y β , cuyo componente lipídico influye en el índice de refracción, y por ello en el diagrama obtenido por electroforesis clásica) (15, 17, 22), estudiar los valores normales, así como sueros patológicos en condiciones en que se presentan variaciones de una u otra de las fracciones globulínicas.

Material y Métodos

La técnica seguida ha sido la de Wunderly (19, 20), con su aparato y utilizando papel Munktell n.º 20, en las condiciones

(*) Este trabajo ha sido posible gracias a la ayuda prestada por Don J. D. Saridakis, profesor de nuestro Departamento de Investigación.

que ya hemos expuesto en otra ocasión (7). Los sueros normales proceden de médicos, estudiantes y enfermeras de edad oscilante entre 20 y 40 años. Los sueros patológicos corresponden a enfermos de los distintos Servicios del Hospital Municipal de Infecciosos y de la clínica Médica del Prof. A. Pedro-Pons.

Resultados

Se ha obtenido el diagrama electroforético en veintiséis sueros normales, cuyos resultados exponemos a continuación: en la

TABLA I
Valor porcentual de las distintas fracciones de proteínas del suero obtenido por electroforesis en papel, en 26 sueros humanos normales

N.º	Albúmina	GLOBULINA		
		$\alpha_1 + \alpha_2$	β	γ
1	66'53	10'51	8'02	14'38
2	71'98	9'86	8'85	8'60
3	76'64	7'52	5'23	10'58
4	74'69	7'55	7'70	10'03
5	75'06	5'42	7'41	12'09
6	77'05	4'69	6'75	11'49
7	64'90	11'10	9'40	14'57
8	62'29	11'07	7'92	18'70
9	67'82	9'14	10'84	12'17
10	72'26	9'35	9'94	8'41
11	65'04	10'10	11'56	13'28
12	62'65	13'65	7'34	16'35
13	58'73	13'07	7'81	20'38
14	63'66	11'72	8'26	16'50
15	66'37	9'92	9'49	14'19
16	68'94	8'87	9'33	12'83
17	58'18	14'90	10'39	16'51
18	54'88	13'07	15'09	16'94
19	63'91	11'05	7'87	17'15
20	63'56	11'59	9'25	15'57
21	63'91	12'12	10'02	13'94
22	64'60	10'56	6'98	17'83
23	64'36	11'52	6'09	18'02
24	70'73	10'47	5'54	13'24
25	67'17	6'53	8'80	17'48
26	66'44	8'60	6'96	17'98
Promedio	66'63	10'10	8'71	14'58
σ	5'56	2'63	2'149	3'105

figura 1 presentamos la curva y la copia del desarrollo en papel de uno de ellos. El promedio de valores para las distintas fracciones en los mismos, resulta: Alb. = 66,63 %; glob. $\alpha_1 + \alpha_2 =$

10,10 % ; glob. β = 8,71 % ; y glob. γ = 14,58 %. Como se ve, la albúmina es más elevada que la obtenida con la electroforesis clásica, hecho que discutiremos más adelante.

Se han investigado sesenta y seis sueros patológicos. En todos ellos se observa el hecho general discutido por nosotros en traba-

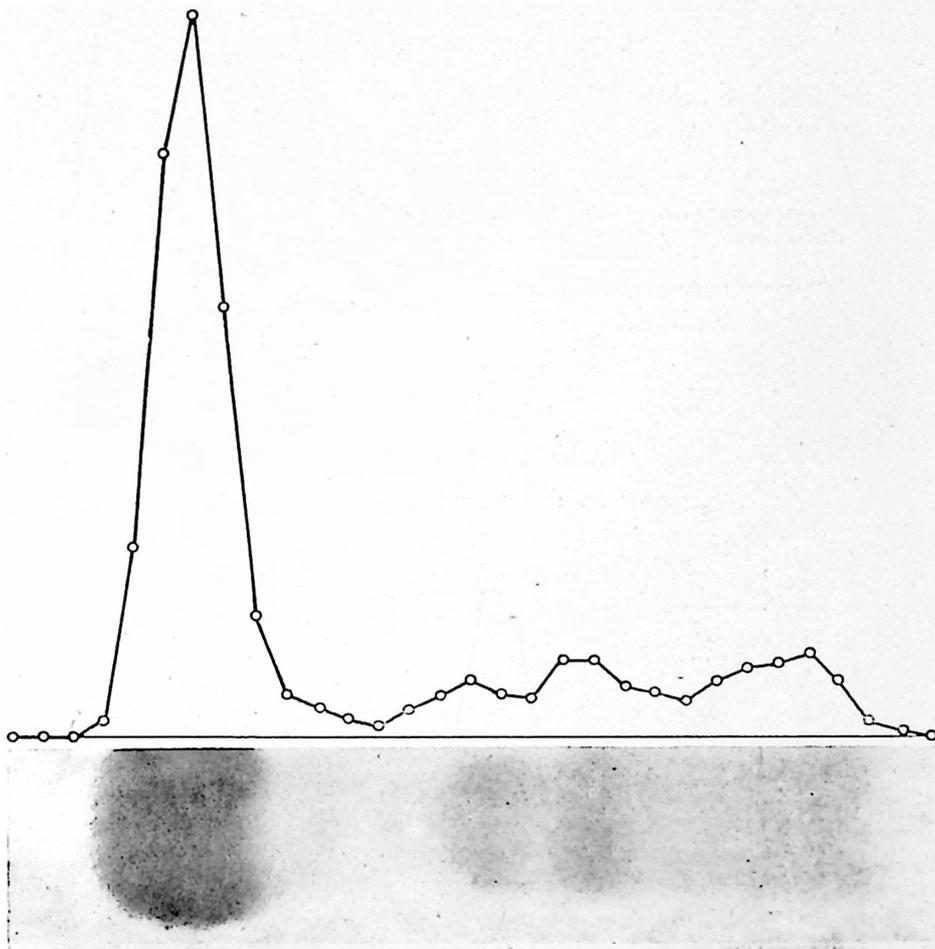


Fig. 1. — C E. 67. — Normal

jos anteriores (6, 8) de la disminución del porcentaje de albúmina y aumento del de las globulinas.

En los sueros estudiados por el momento, se confirma el aumento dominante y exclusivo de globulina γ en las cirrosis (fig. 2, 4b y 4c) y Kala Azar (fig. 4e), en las neoplasias y abscesos hemos encontrado un aumento más o menos grande de todas las

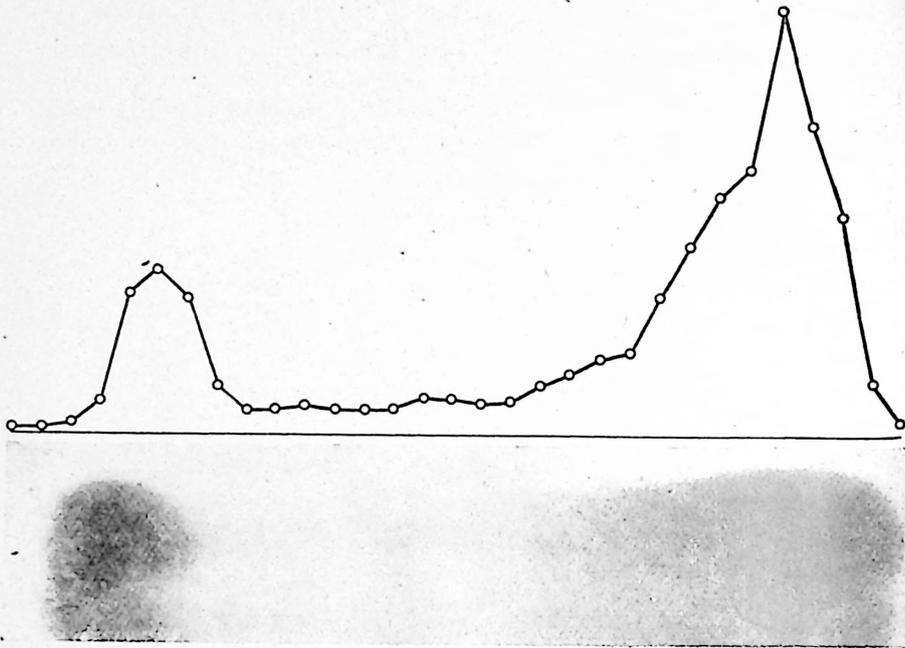


Fig. 2. — C. E. 68. — M. B. Cirrosis hepática

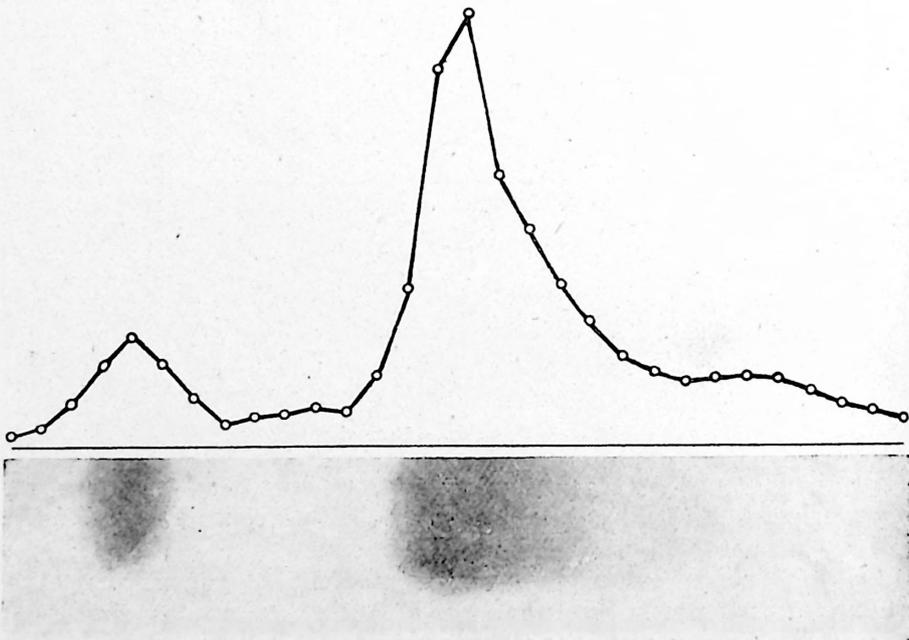


Fig. 3. — C. E. 31. — V. V. Nefrosis

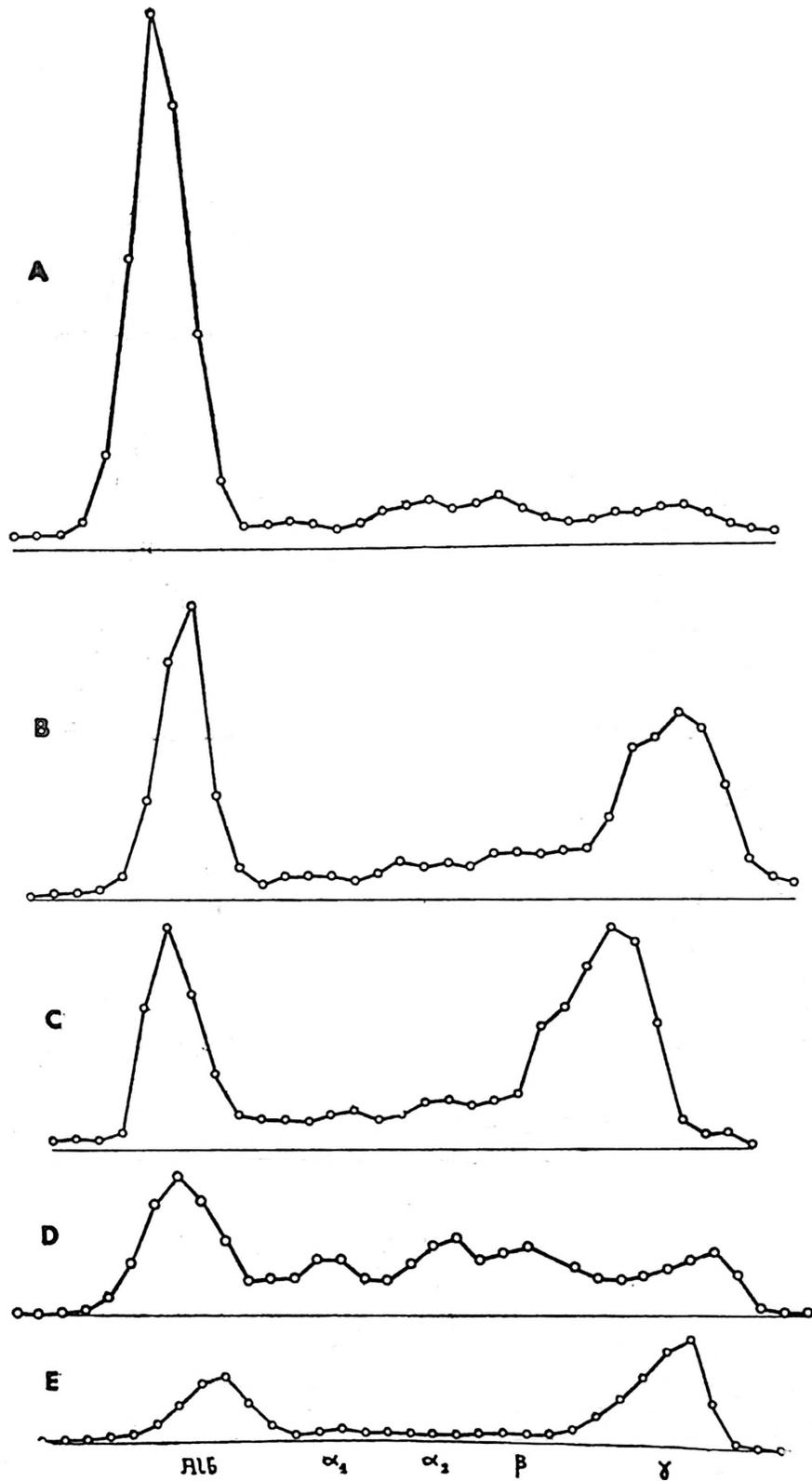


Fig. 4.--- A). C. E. 29 A. C. Normal. B). C. E. 30 L. S. Cirrosis hepática. C) C. E. 70 Cirrosis hepática. D) C. E. 72 M. S. Neoplasia con hipoproteinemia. E) C. E. 160 J. M. Kala Azar sin hiperproteinemia

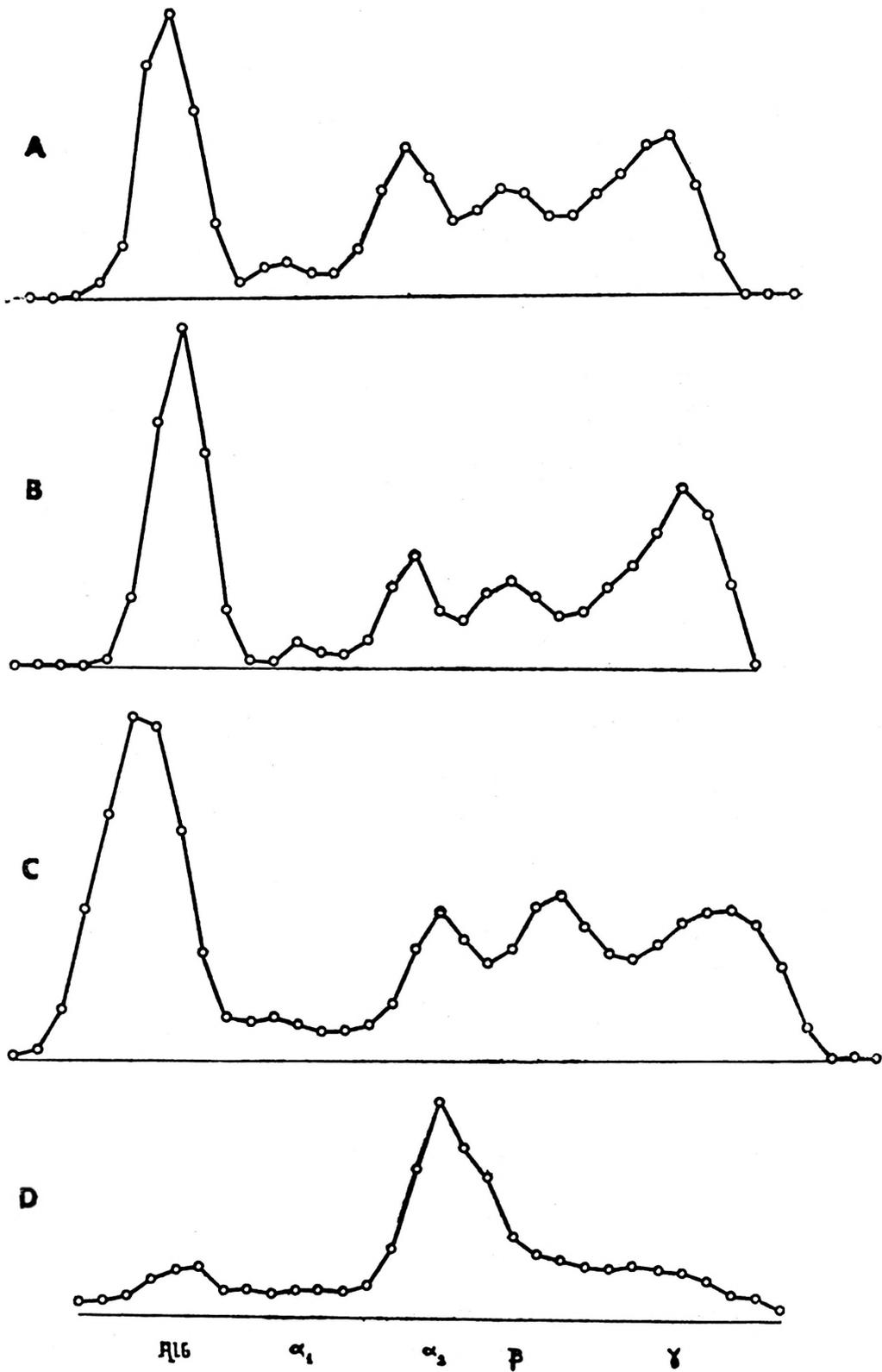


Fig. 5.—A) C. E. 41 D. P. Absceso epidural. B) C. E. 42 J. M. Neoplasia labio.
C) C. E. 44 D. R. Neoplasia. D) C. E. 32 Nefrosis

fracciones globulínicas (fig. 4 d, 5 b y 5 c), y en los dos casos de nefrosis estudiados (fig. 3 y 5d) un gran aumento de la globulina α_2 y también de la β , con un marcado descenso de la albúmina. Estas observaciones son las que con más seguridad e interés pueden destacarse en esta serie de sueros patológicos.

Discusión

Como ya hemos señalado, los resultados en sueros normales dan unos valores para el porcentaje de albúmina superiores a los obtenidos con la electroforesis clásica (1, 16, 18). La discusión de esta observación creemos que presenta gran valor para establecer el porcentaje real de estas fracciones en el suero. Dado que la electroforesis clásica y la electroforesis en papel difieren en cuanto al método físicoquímico que se utiliza para la individualización final de las fracciones (índice de refracción, adsorción y elución de un colorante, respectivamente), y que mediante la electroforesis en papel se obtiene una separación absoluta de las fracciones, el hecho de que se obtengan resultados diferentes plantea el problema de cuáles son los que corresponden a la realidad del plasma nativo.

En la electroforesis clásica se conoce que uno de los posibles errores es debido a la influencia de los lípidos de las fracciones α y β en el índice de refracción, y por ello en el diagrama electroforético. Si se deslipidiza el suero, disminuye el porcentaje de estas fracciones (15, 17, 22). Como estas fracciones corresponden a complejos variables entre lípidos y proteínas, cuyo peso molecular aumenta mucho en ciertos procesos patológicos (nefrosis) (2), se comprende que este hecho puede dar lugar a que el porcentaje que se obtenga de estas fracciones no corresponda en realidad al de la proteína propiamente dicha.

En la técnica de electroforesis en papel, que hemos utilizado, la individualización de las fracciones y la determinación de su porcentaje se consigue mediante adsorción de azul de bromofenol, subsiguiente elución del colorante y fometría posterior. Kunkel y Tiselius (14) han comprobado que por miligramo de nitrógeno la albúmina fija más colorante que las globulinas. Debido a ello, deben multiplicarse las lecturas correspondientes a las fracciones globulínicas por un factor. Nosotros hemos utilizado el factor 1.5, como lo hacíamos en el laboratorio de Wunderly. Flynn y Mayo (5) utilizan el factor 1,6, dado por Cremer y Tiselius en 1950. De las gráficas que presentan Kunkel y Tiselius en su trabajo de 1951, parece deducirse que su factor puede aún ser inferior a éstos. La diferencia entre el promedio de valores obtenidos por la electroforesis en papel y la electroforesis clásica cree-

mos que no depende de un posible error en este factor, sino que corresponde realmente a las fracciones que se separan mediante la electroforesis en papel. Esta creencia viene apoyada por los resultados en sueros patológicos, en los que si aumentásemos el factor de las globulinas nos encontraríamos con cifras extraordinarias para las mismas.

Köiw, Wallenius y Grönwall (13) observan que el factor de multiplicación puede variar para las distintas fracciones globulínicas y para los diversos sueros patológicos. Para las globulinas totales de 1.1 a 2.9; sin embargo, encuentran en todos los casos valores superiores de albúmina con la electroforesis en papel que con la técnica de Tiselius.

Hemos estudiado también comparativamente los resultados obtenidos mediante el fraccionamiento con el hiposulfito sódico y la electroforesis en papel. El fraccionamiento con el hiposulfito sódico lo hemos deducido con base teórica suficiente, por el estudio de los puntos de inflexión que se presentan en la curva total de fraccionamiento de esta sal (6, 10). El promedio de valores para los sueros normales se corresponden muy próximamente, así como se observa una correlación aceptable en los sueros patológicos. Además, hemos precipitado, mediante el hiposulfito sódico, dos sueros normales y uno patológico con gran aumento de globulina γ . y estas fracciones precipitadas redisueltas, dializadas y controladas por la electroforesis en papel, han resultado aceptablemente concordantes. El encontrar resultados equiparables por una técnica de fraccionamiento salino y la electroforesis en papel, creemos que va en apoyo de que los porcentajes entre las fracciones obtenidos por la electroforesis en papel corresponden realmente a los preexistentes en el suero nativo.

Nuestros resultados en sueros normales concuerdan con los obtenidos por Wuhrmann y Wunderly con la electroforesis en papel, en Winterthur y Zurich, respectivamente (19), y con alguno de los obtenidos por otros autores con la electroforesis clásica (4).

Por lo que se refiere a los sueros patológicos, aparte del hecho general del descenso del porcentaje de albúmina en todos ellos; con aumento del de globulinas, discutido en anteriores ocasiones y que nos sirvió para formular una ley general de la fisiopatología de las proteínas plasmáticas (8), es interesante destacar el comportamiento de las subfracciones globulínicas, por su importancia para la sistematización de las disproteinemias (9) y su aplicación práctica.

Del número y tipo de sueros patológicos estudiados hasta ahora, resalta el hecho del aumento destacado y prácticamente exclusivo de la globulina γ en las cirrosis (fig. 2, 4b y 4c). Este hecho

es la base del gran número de reacciones de floculación más o menos empíricas que se han descrito. Como es natural, siempre será mucho mejor practicar un fraccionamiento total (electroforesis o hiposulfito sódico) que utilizar algunas de estas reacciones, influenciadas también por otros factores.

En la práctica, ante un caso sospechoso clínicamente de cirrosis hepática, al encontrar un fraccionamiento de globulinas caracterizado por un incremento neto y prácticamente exclusivo de la fracción γ será un dato muy importante en favor de este diagnóstico. Si, por el contrario, se encuentra un fraccionamiento caracterizado por el aumento mayor o menor de todas las fracciones globulínicas, deberemos pensar que nos encontramos frente a un proceso neoplásico o bien un factor inflamatorio sobreañadido. Recuérdense las figuras 4 d, 5 b y 5 c, correspondientes a diagramas electroforéticos de sueros procedentes de enfermos neoplásicos.

Naturalmente que no debe olvidarse que este aumento dominante de globulina γ puede encontrarse en otros procesos (figura 4e, p. ej., y siempre deben valorarse los diagramas electroforéticos o de fraccionamiento con todos los restantes datos de laboratorio y clínicos.

El comportamiento de las fracciones de globulinas α y β es interesante estudiarlo en la electroforesis en papel, pues, como ya hemos señalado, por contener lipoproteínas puede encontrarse una discrepancia con la electroforesis clásica.

Flynn y Mayo (5) observan un caso de nefrosis con gran discrepancia entre la albúmina y la globulina obtenida por electroforesis en papel o libre. En este suero encontraron una gran hiperlipemia que, según los propios autores, podría explicar esta discrepancia. Köiw, Wallenius y Grönwall (13) hacen observaciones similares y las interpretan en el mismo sentido. En los dos sueros nefróticos investigados hemos encontrado un gran aumento de globulina α_2 y β . Observamos también aumento de globulina α y β en otros sueros patológicos que podrán tener quizá un interés diagnóstico, pero que debemos esperar haber estudiado un mayor número de ellos para poder establecer deducciones firmes. De momento, nuestros resultados concuerdan con los de Grassmann, Hannig y Knedel (11, 12).

La electroforesis en papel presenta, pues, además de sus ventajas prácticas, un gran interés teórico, porque, aparte de permitir una separación absoluta de las fracciones, la diferencia entre la misma y la electroforesis clásica, en cuanto al valor del porcentaje normal de las distintas fracciones y sus posibles diferencias en sueros patológicos, revisten, por las razones ya expuestas, un gran valor para el conocimiento de la verdadera proporción entre las fracciones existentes en el suero nativo.

Resumen

Se han estudiado por la electroforesis en papel 26 sueros humanos normales y 66 patológicos. Para los sueros normales se han encontrado los siguientes valores promedio para las distintas fracciones. Alb. = 66.63 % Glob. $\alpha_1 + \alpha_2$ = 10.10 %, Glob. β = 8.71 % y Glob. γ = 14.58 %.

De los resultados obtenidos en los sueros patológicos estudiados hasta ahora se considera como más interesante el confirmar el aumento predominante y casi exclusivo de globulina γ en la cirrosis, el aumento de α_2 y β en las nefrosis y el aumento más o menos grande de todas las fracciones globulínicas en casos de neoplasias. Se discuten las posibles causas y la importancia de encontrar un porcentaje de albúmina superior al de la electroforesis clásica en los sueros normales, así como de las posibles diferencias en los sueros patológicos en relación con su valor teórico para un mejor conocimiento de la proporción entre las fracciones existentes en el suero nativo.

Summary

26 normal and 66 pathological sera were studied with paper electrophoresis. In normal sera the following average values for the distinct fractions were found : Alb. = 66.63 %, glob. $\alpha_1 + \alpha_2$ = 10.10 %. Glob. β = 8.71 %. Glob. γ = 14.58 %.

The results of most importance obtained until now in pathological sera studied in the confirmation of the predominant and almost exclusive increase of glob. γ in cirrosis, the increase of α_2 and β glob. in nephrosis and the greater or lesser increase of all globulinic fractions in cases of neoplasia. The possible causes and the importance of finding a percentage of albumin superior to that of the classical electrophoresis in normal sera are discussed, as well as the possible differences in pathological sera in relation to their theoretical value for a better knowledge of the proportion amount the fractions existing in the native sera.

Bibliografía

- (1) BELLER, M. M., ECKER, E. E. y SPIES, T. D. : Serum proteins in hypoproteinemia due to nutritional deficiency. *J. lab. clin. Med.*, 32, 130, 138, 1947.
- (2) BOURDILLON, J. : Osmotic pressure study of protein fractions in normal and in nephrotic subjects. *J. Exp. Med.*, 69, 819, 830, 1939.
- (3) CREMER, H. D., TISELIUS, A. : Elektrophorese von Eiweis in Filtrierpapier. *Biochem. Z.*, 320, 273, 282, 1950.
- (4) DOLÉ, V. P. : cit. por 11.
- (5) FLYN, F. V. y MAYO, P. : Microelectrophoresis of protein on filter-paper. *Lancet*, 261, 235, 238, 1951.
- (6) GRAS, J. : Curvas de fraccionamiento con hiposulfito sódico en sueros humanos normales y patológicos. *R. esp. Fisiol.*, 7, 265, 280, 1951.

Agradecemos sinceramente al Dr. Wunderly todas las atenciones que nos deparó durante nuestra estancia en su laboratorio para aprender la técnica que hemos utilizado en este trabajo. Nos complacemos en agradecer también a las señoritas Emilia Casals y Ana María Arce la ayuda prestada en la realización práctica del mismo.

- (7) GRAS, J. : La electroforesis en papel de las proteínas del suero. *Laboratorio*. Mayo, 1952. (En prensa).
- (8) GRAS, J. : Fisiopatología general de las proteínas plasmáticas. Planteamiento y discusión de su ley fundamental. *R. esp. Fisiol.*, 6, 275, 337, 1950.
- (9) GRAS, J. y BACARDI, R. : Sistemática de las alteraciones de la proteinemia, *Med. clin.*, 18, 159, 162, 1952.
- (10) GRAS, J. y SALAZAR, M. : Curvas de fraccionamiento con sulfito e hiposulfito sódico de las proteínas del suero. I. Sueros humanos normales. *R. esp. Fisiol.*, 6, 113, 124, 1950.
- (11) GRASSMANN, W., HANNIG, K. y KNEDEL, M. : Über in Verfahren zur elektrophoretischen Bestimmung der Serumproteine auf Filtrierpapier. *Deut. med. Woch.*, 76, 333, 336, 1951.
- (12) KNEDEL, M. : Über die klinische Anwendung eines neuen Elektrophoreseverfahrens bei Lebererkrankungen. *Med. Monats.*, 10, 707, 709, 1951.
- (13) KOIW, E.; WALLENIUS, G. y GRONWALL, A. : Paper electrophoresis in clinical chemistry. A comparison with Tiselius original method. *Scandi. Jour. clin. Lab. Invest.*, 4, 47, 54, 1952.
- (14) KUNKEL, C. y TISELIUS, A. : Electrophoresis of proteins on filter paper. *Jour. Gen. Physiol.* 35, 89, 118, 1951.
- (15) LONGSWORTH, L. G. y MAC INNES, D. H. : An electrophoretic study of nephrotic sera and urine. *J. Exp. Med.* 71, 77, 82, 1940.
- (16) MARTIN, D. H. : An electrophoretic study of the components of the serum proteins in cirrhosis of the liver. *Brit. J. Exp. Path.*, 30, 231, 236, 1949.
- (17) MOORE, D. H. ROBERTS, J. E., COSTELLO, M. y SCHONBERGER, T. W. : Factors influencing the electrophoretic analysis of human serum. *J. Biol. Chem.* 180, 1147, 1158, 1949.
- (18) REINER, M., FENICHEL, R. L. y STERN, K. G. : Electrophoretic studies of the protein distribution in normal human serum. *Ac. Haemat.*, 3, 202, 210, 1950.
- (19) WUNDERLY, CH. : Comunicación personal.
- (20) WUHRMANN, F., WUNDERLY, CH. : Die Bluteiweisskörper des Menschen. Benno Schwabe, Basilea, 1952.
- (21) WUHRMANN, F., WUNDERLY, CH. y NICOLA, P. : Über die Heterogenität des Globulin im krankheitshalber veränderten Blutserum. *Klin. Woch.*, 28, 667, 672, 1950.
- (22) ZELDIS, L. J., ALLING, E. L., McCOORD, H. B. y KULKA, J. F. : Plasma protein metabolism. Electrophoretic studies. The influence of plasma lipids on electrophoretic patterns of human and dog plasma. *J. Exp. Med.*, 82, 411, 430, 1945.

CRITICA DE LIBROS

«Principles of Human Physiology» (STARLING).—
C. LOVATT EVANS. — J. & A. Churchill Ltd.
Londres, décima edición, 1949, 1.193 págs., 693
figuras.

En 1912 se publicó la primera edición de la obra clásica de Starling y luego revisada en otras tres ediciones. Poco después de la muerte de Starling, el colaborador que le sucede en la cátedra y continuador de su obra, el Prof. Lovatt Evans, de sobra conocido por los lectores españoles, como uno de los grandes prestigios de la Fisiología moderna, sigue revisando el libro de Starling que, gracias a él, ha continuado siendo una de las obras de texto más completas y de mayor utilidad para el estudio de esta ciencia.

Innecesario parece hacer la crítica de esta última edición de una obra clásica conocida de todos. Por eso, nos limitaremos a un comentario breve. Ante todo, hemos de destacar una característica del libro — que las sucesivas revisiones no solamente han conservado sino que han mejorado — y que revela las cualidades de maestro que unánimemente se han reconocido siempre al Profesor Lovatt Evans. Nos referimos a la unidad de criterio con que se recogen y ordenan los complejos conocimientos de la Fisiología. El incesante progreso científico impone continuamente la ampliación de los libros de texto con adiciones múltiples y detallistas y no es raro ver libros de texto en los que después de revisiones sucesivas desmerece notablemente la calidad de la primitiva edición de la obra.

El añadir datos múltiples sobre investigaciones modernas tiene el riesgo de citar sin crítica trabajos contradictorios de un modo que no permite formarse una idea clara de lo que se estudia; y tiene también el inconveniente de incluir en un mismo libro temas o capítulos interpretados según teorías discordantes. Coordinar los conocimientos con integración certera es algo que sólo logran autores de una dilatada experiencia docente. Además, la especialización moderna en la investigación, y la necesaria separación que

imponen los métodos de estudio, en Bioquímica sobre todo, conduce a una división forzada aun dentro de la Fisiología. Especialización indudablemente necesaria en el campo de la investigación experimental. Pero lo que la investigación exige separar se ha de reunir de nuevo en la enseñanza, porque, de lo contrario, carecería de unidad la exposición de los conocimientos fundamentales. El Prof. Lovatt Evans acierta plenamente a resolver todas estas dificultades y acredita así su reconocida fama de maestro.

Se podría objetar una relativa insuficiencia de adquisiciones recientes y de citas bibliográficas modernas. Pero lo que esto suponga de pérdida de detalles de interés secundario se compensa de sobra por lo que gana con ello la unidad del libro. Y mucho más cuando la obra realmente se puede decir que está al día.

La extensión del libro ha aumentado en esta última edición, que contiene, además, 60 nuevas figuras.

La revisión del capítulo de sentidos especiales es obra del Prof. Hartridge.

J. JIMÉNEZ-VARGAS

«Human Personality and its Minor Disorders».—
WILLIAM HARROWES. — E. & S. Livingstone,
Ltd., Edimburgo, 1949, 258 páginas.

Con estilo de agradable lectura y profundo sentido práctico, el autor expone un concepto de la personalidad humana, basado en el estudio de personas normales que describe con «sentido común objetivo no dogmático», siguiendo los principios del Profesor Meyer.

Estudia detalladamente la personalidad normal. Y estudia después las alteraciones leves de la personalidad humana agrupadas en categorías: estados de ansiedad, estados de tensión, hipocondría, neurastenia e histeria. Incluye una serie de preguntas que, además de facilitar la aplicación práctica de todo lo expuesto, permiten comprenderlo mejor y reflejan el profundo conocimiento que el autor tiene de la personalidad normal y patológica.

La completa bibliografía que añade cita principalmente los trabajos del Profesor Meyer.

F. PRANDI



SIR CHARLES SCOTT SHERRINGTON (*)

El 4 de marzo de 1952, murió Sir Charles Scott Sherrington. El iniciador de la moderna neurofisiología, nació en Londres el 17 de noviembre de 1857. Transcurrieron sus primeros años en Yarmouth. En Ipswich (Norfolkshire), donde estudió sus primeras letras. Su interés por la fisiología del sistema nervioso se despertó al conocer los estudios experimentales de Ferrier que en 1873 observó la parálisis por extirpación de las áreas motoras y los efectos motores de la excitación de estas mismas áreas corticales, y al admirar después en 1881 las demostraciones experimentales de Goltz sobre la decorticación experimental. De allí nació su primer trabajo de Neurofisiología, estudiando el sistema nervioso en los animales decorticados de Goltz, con la colaboración de Langley profesor de Fisiología de Cambridge. Trabajó en Cambridge hasta que fué nombrado lector de Fisiología en St. Thoma's Hospital de Londres en 1890. Al año siguiente pasó a la Brown Institution de la Universidad de Londres, y cuatro años después a la Cátedra de Fisiología de Liverpool. Durante este período había estudiado las degeneraciones ascendentes de la medula en las lesiones experimentales, la distribución periférica de las fibras en las raíces posteriores de los nervios espinales, la innervación recí-

(*) Agradecemos a Allan Chappelow B. A., el envío del clisé.

proca, y el sistema propioceptivo muscular. Después se dedicó al estudio de los reflejos en el animal espinal y la rigidez de descerebración.

En 1897 en una monografía sobre sistema nervioso central en la 7.^a edición del «Textbook of Physiology» de Foster introduce el término de sinapsis. En 1900 escribió los capítulos de medula en el libro de Schaefer. En 1906 apareció su obra magistral «The integrative action of the nervous system».

En 1913, profesor de Fisiología en Oxford, en colaboración con Liddell inicia sus estudios sobre el reflejo de tracción y desde entonces continúa una serie ininterrumpida de publicaciones sobre la acción refleja.

La muerte de Sherrington deja un verdadero vacío en el campo de la neurofisiología.