

Departamento de Investigación  
del Hospital Municipal de Infecciosos  
Sección de Inmunquímica  
(J. Gras) Barcelona

## **Diferenciación química de las globulinas gamma de los sueros normales y patológicos**

**(Índice de nitrógeno amínico)**

por J. Gras

---

(Recibido para publicar el 30 de noviembre de 1954)

Gracias a las técnicas actuales de fraccionamiento mediante hiposulfito sódico, electroforesis libre o en papel, es posible estudiar con facilidad las variaciones del proteinograma del suero o plasma en su aspecto cuantitativo y existe ya un conocimiento extenso de sus variaciones en patología humana.

Un paso más representa el estudio, no tan sólo de estas variaciones cuantitativas, sino la investigación de las características químicas o físicoquímicas de esas diversas fracciones individualizadas, para explorar la posibilidad de encontrar diferencias que nos permitan distinguir, por ejemplo, la globulina gamma correspondiente a un determinado proceso patológico de la de otro distinto; es decir, no contentarnos únicamente con el dato cuantitativo de su mayor o menor aumento en ambos procesos, sino profundizar en sus posibles diferencias cualitativas.

Dada la gran frecuencia del aumento de la globulina gamma en numerosísimos procesos patológicos, el estudio cualitativo de la misma adquiere un interés particular, y por ello lo iniciamos hace dos años; hemos utilizado la posibilidad que nos aporta nuestra técnica de fraccionamiento con el hiposulfito sódico para obtener dicha globulina de una manera fácil, en un alto grado de pureza y en cantidad suficiente para su estudio.

Como primera característica hemos investigado las variaciones de su nitrógeno amínico, determinado mediante la técnica de la formoltitulación de Sørensen, expresado en c. c. de NaOH N/100 por gramo de globulina gamma, indicándolo como índice de nitrógeno amínico. Hemos obtenido resultados que permiten afirmar la posibilidad de diferenciar de esta manera diversos tipos de globulina gamma y que nos aporta, además, un dato de descarterización de la misma en determinados procesos, de indudable interés en fisiopatología.

### Material y métodos

*Obtención de la globulina gamma.* — Para la obtención de la globulina gamma hemos utilizado nuestro método de precipitación por hiposulfito sódico a la concentración de 32 gr. % de esta sal y en la proporción de una parte de suero por 24 de la misma (concentración efectiva 30'5 %) que, como ya demostramos, permite obtener a una primera precipitación una pureza superior al 90 % de globulina gamma electroforética (1). A pesar de ello, se ha practicado un control electroforético de la mayoría de las soluciones obtenidas.

Se ha precipitado un mínimo de 6 c. c. de suero. El precipitado obtenido se redisuelve en 15 c. c. de agua destilada, y si se parte de una cantidad superior de suero, en la proporción correspondiente; en las primeras experiencias observamos la posible influencia del residuo de hiposulfito que queda en la solución sobre la titulación, comprobando que, aparte de las variaciones iniciales de pH, que el variable contenido en el mismo puede producir, no tiene influencia apreciable, con lo que nos evitamos la diálisis del líquido. En 5 c. c. de la solución de globulina gamma obtenida determinamos su contenido mediante la reacción del biuret.

*Titulación.* — Para la formoltitulación del nitrógeno amínico, según Sørensen, hemos adoptado, después de los tanteos iniciales, la pauta expuesta en el cuadro I, por resultar de una gran simplicidad y dar resultados satisfactorios utilizando cantidades diversas de una misma globulina, por lo que resulta una metódica de fácil utilización para obtener una serie larga de determinaciones de mayor valor global.

A virajes más altos de la fenoltaleína del tomado como patrón hemos visto que la cantidad de NaOH gastada no es proporcional a la cantidad de proteína existente en la solución.

Se han practicado duplicados con igual o distinta cantidad de solución de globulina, en gran número de casos. Con ello se comprueba, como se observa en los cuadros, que el índice obtenido es independiente, dentro de los márgenes de error aceptables, de la

cantidad absoluta de globulina que sirve para la titulación. Este hecho, aparte de dar seguridad a los resultados, hace innecesario igualar las concentraciones antes de hacer las titulaciones, y, por tanto, simplifica el método.

El índice de N amínico se obtiene dividiendo los c. c. de NaOH N/100 gastados al titular la solución de globulina gamma, menos los gastados en el blanco formol, por la cantidad de globulina gamma, expresada en gramos, contenida en la cantidad de solución utilizada para la titulación. El índice de N. amínico se expresa, por tanto, por los centímetros cúbicos de solución de NaOH N/100 por gramo de globulina gamma. Esta forma de expresión da cifras fáciles de manejar y valorar.

Se han estudiado 130 globulinas gamma procedentes de sueros normales o patológicos. Las primeras 57 no se valoran, pues en ellas se estudió la metódica y se hicieron sucesivas variaciones; los resultados generales obtenidos en ellas concuerdan, sin embargo, con los posteriores que se valoran.

### Resultados

En los cuadros I, II, III y IV se presenta únicamente una síntesis de los resultados obtenidos hasta ahora, correspondientes, respectivamente, a globulinas gamma de 6 individuos normales, 11 cirróticos, 3 afectos de plasmocitoma, 3 de nefritis, 1 de escle-

CUADRO I

*Metódica adoptada para la titulación del N amínico de las soluciones de globulina  $\gamma$*

| Vaso pp.                                                                                                                      | I<br>Titulación | II<br>Blanco formol | III<br>Patrón viraje |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------|---------------------|----------------------|
| Sol. glob. $\gamma$                                                                                                           | 10 cc.          | —                   | —                    |
| H <sub>2</sub> O dest.                                                                                                        | 10 cc           | 20                  | 20                   |
| H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> N/100                                                                                          | 0'5 cc.         | 0'5 cc.             | 0'5 cc.              |
| Neutralizar con NaOH N/100 hasta viraje inicial de la fenolftaleína                                                           |                 |                     |                      |
| Formol (1)                                                                                                                    | 0'5             | 0'5                 | 0                    |
| NaOH N/100                                                                                                                    | —               | agitar              | 0'2                  |
| Titular con NaOH N/100 el blanco formol hasta viraje igual al del patrón-viraje (III) y después el I hasta viraje igual al II |                 |                     |                      |

(1) Formol al 20 %, neutralizado a viraje inicial de la fenolftaleína.

CUADRO II

| Diagnóstico | Núm. | Nombre             | Sexo | Fecha     | Índice N<br>aminico | mg. glob. $\gamma$ |
|-------------|------|--------------------|------|-----------|---------------------|--------------------|
| Normal      | 6    | A. M. <sup>a</sup> | H.   | 12-II-54  | 16'9                | 38'7               |
|             | 20   | id.                |      |           | 17'3                | 40'9               |
|             |      |                    |      | 8-IV-54   | 17'6                | 20'45              |
|             | 7    | J. O.              | V.   | 22-II-54  | 21'1                | 75'9               |
|             | 8    | J. G.              | V.   | 22-III-54 | 21'6                | 40'66              |
|             | 9    | J. V.              | V.   | 4-III-54  | 16'7                | 42'30              |
|             | 10   | J. M.              | V.   | 4-III-54  | 16'9                | 38'9               |
|             | 21   | E. C.              | H.   | 8-IV-54   | 17-8                | 42'5               |
|             |      |                    |      |           | 14'5                | 21'25              |
|             |      |                    |      |           | 19'7                | 42'50              |
| Promedio    |      |                    |      |           | 18'01               |                    |
| Límite      |      |                    |      |           | 21'6 14'5           |                    |

CUADRO III

| Diagnóstico | Núm. | Nombre | Sexo | Fecha     | Índice N<br>aminico | mg. glob. $\gamma$ |
|-------------|------|--------|------|-----------|---------------------|--------------------|
| Cirrosis    | 2    | A. L.  | V.   | 22-I-54   | 23'01               | 60'6               |
| »           | 12   | J. G.  | H.   | 6-III-54  | 21'47               | 73'1               |
| »           | 13   | A. A.  | V.   | 10-III-54 | 26'15               | 77'24              |
|             | 18   | id.    |      | 6-IV-54   | 29'80               | 24'72              |
|             |      |        |      |           | 25'60               | 82'40              |
| »           | 26   | A. A.  | V.   | 21-IV-54  | 20'40               | 10'26              |
| »           | 19   | J. N.  | V.   | 6-V-54    | 27'50               | 99'30              |
|             | 53   | id.    |      | 25-VI-54  | 24'90               | 49'65              |
|             |      |        |      |           | 27'60               | 14'15              |
|             |      |        |      |           | 23'40               | 14'15              |
| »           | 29   | J. C.  | H.   | 28-IV-54  | 22                  | 81'3               |
|             |      |        |      |           | 22'60               | 81'3               |
| »           | 33   | S. V.  | H.   | 30-IV-54  | 20'51               | 12'33              |
|             |      |        |      |           | 27'43               | 61'65              |
| »           | 35   | M. C.  | V.   | 7-V-54    | 22                  | 89'2               |
| »           | 36   | P. G.  | H.   | 7-V-54    | 16'60               | 10'46              |
|             |      |        |      |           | 18'10               | 52'30              |
|             | 60   | id.    |      | 9-VII-54  | 21'20               | 10'1               |
|             |      |        |      |           | 21'20               | 10'1               |
|             |      |        |      |           | 18'00               | 10'1               |
| »           | 42   | J. M.  | V.   | 14-V-54   | 27'70               | 71'8               |
| »           | 54   | P. G.  | H.   | 2-VII-54  | 26'10               | 37'0               |
| Promedio    |      |        |      |           | 23'01               |                    |
| Límite      |      |        |      |           | 29'8-16'6           |                    |

rodermia, 8 de procesos infecciosos y 3 de procesos neoplásicos. Se deja sin considerar un grupo en el que se incluyen varios procesos patológicos en los que no se observa variación apreciable o bien que consideramos mejor esperar a una casuística más amplia para valorarlos. En los cuadros se encuentran los valores correspondientes a los índices de N amínico, los valores reales de globulina gamma que sirvieron para su determinación, con los duplicados correspondientes cuando éstos se llevaron a cabo, el promedio de cada grupo de sueros y los límites máximo y mínimo hallados en el mismo. Por lo escaso de la casuística no resultaría oportuno un estudio estadístico más cuidadoso.

CUADRO IV

| Diagnóstico                 | Núm. | Nom-<br>bre | Sexo | Fecha     | Índice N<br>amínico | mg. glob. γ |
|-----------------------------|------|-------------|------|-----------|---------------------|-------------|
| Plasmocitoma                | 3    | M. P.       | V.   | 9-II-54   | 34'1                | 94'3        |
| »                           | 43   | J           | V.   | 14-V-54   | 30'9                | 46'11       |
|                             |      |             |      |           | 33'9                | 153'70      |
| »                           | 30   | R. R.       | H.   | 30-IV-54  | 28                  | 16'44       |
| Promedio                    |      |             |      |           | 31'72               |             |
| Límite                      |      |             |      |           | 34'1-28             |             |
| Nefritis-Periar-<br>teritis | 68   | J. J.       | V.   | 14-VII-54 | 50'1                | 77'3        |
| nodosa                      |      |             |      |           | 45'4                | 77'3        |
| Nefritis                    | 69   | M. M.       | H.   | 14-VII-54 | 43'1                | 26'7        |
|                             |      |             |      |           | 33'7                | 26'7        |
| »                           | 83   | J. B.       | V    | 10-XI-54  | 29'1                | 46'3        |
|                             |      |             |      |           | 25'4                | 23'15       |
| Promedio                    |      |             |      |           | 37'8                |             |
| Límite                      |      |             |      |           | 50'1-25'4           |             |
| Esclerodermia               | 52   | M. S.       | H.   | 25-VI-54  | 38                  | 15'9        |

Si comparamos los valores normales obtenidos en el cuadro I (promedio 18'01, límites 21'6-14'5) con los patológicos, vemos que en el grupo de las cirrosis el índice de N amínico se presenta más elevado (promedio 23'01, límites 28'9-16'6), pero no tanto como la heterogeneidad electroforética de su globulina gamma podría hacer presuponer. Netamente más elevado se encuentra en el plasmocitoma (promedio 31'7, límites 34'1-28'0), a pesar de su homogeneidad electroforética. Las cifras más altas se encuentran en el grupo de las nefritis agudas (promedio 37'8, límites 50'1-25'4) y

CUADRO V

| Diagnóstico                   | Núm.     | Nombre | Sexo | Fecha                  | Índice N<br>amínico     | mg. glob. $\gamma$      |
|-------------------------------|----------|--------|------|------------------------|-------------------------|-------------------------|
| Endocarditis<br>abacteriémica | 25       | Fco. T | V.   | 13-IV-54               | 17'3                    | 11'97                   |
| Endocarditis<br>abacteriémica | 58       | S. I.  | H.   | 6-VII-54               | 10'2<br>9'19<br>10'8    | 19<br>19<br>19          |
| Neumonitis                    | 28       | A. C.  | V.   | 28-IV-54               | 21'7                    | 58'5                    |
| Bronquiectasia                | 32       | E. R.  | H.   |                        | 25'6                    | 16'44                   |
| Absceso pul-<br>monar         | 50       | M. V.  | V.   | 23-VI-54               | 25'9<br>24'5            | 79'9<br>79'9            |
| Brucelosis poli-<br>visceral  | 51       | I. R.  | V.   | 23-VI-54               | 25'2<br>25'2            | 70'4<br>70'4            |
|                               | 61       | id.    | V.   | 9-VII-54               | 20'8                    | 87'3                    |
| Kala-Azar                     | 64       | J. A.  | V.   | 13-VII-54              | 24'1<br>18'4            | 92'7<br>92'7            |
| Poliserositis fi-<br>mica     | 65       | P. G.  | H.   | 13-VII-54              | 7'3                     | 81'7                    |
| Promedio<br>Límite            |          |        |      |                        | 19'01<br>25'9-7'3       |                         |
| Neoplasia + tu-<br>berculosis | 15<br>16 | R. O.  | H.   | 25-III-54<br>30-III-54 | 13'33<br>18'70<br>18'50 | 12'64<br>43'15<br>43'15 |
| Neoplasia colon               | 22       | R. J.  | H.   | 13-IV-54               | 12<br>11'6              | 45'6<br>45'6            |
|                               | 67       | S      | V.   | 13-VII-54              | 17'9                    | 26'7                    |
| Promedio<br>Límite            |          |        |      |                        | 15'33<br>18'7-11'6      |                         |

en el suero de un caso de esclerodermia (índice 38'0), en los que no se encontró gran hipergammaglobulinemia.

En el grupo de sueros correspondientes a procesos infecciosos o neoplásicos se observan cifras alrededor de la normalidad, poco elevadas o incluso descendidas.

### Discusión

La técnica adoptada para la determinación del índice N amínico de la globulina gamma lo ha sido desde el punto de vista de obtener resultados valorables fisiopatológicamente más que con el de obtener cifras de un valor absoluto en el orden físicoquímico. En este sentido podrían adoptarse metódicas de una mayor precisión, pero cuya utilización resultaría más engorrosa en el orden práctico. Los datos obtenidos con los duplicados realizados con distintas cantidades de globulina gamma, así como las diferencias obtenidas en el valor del índice en relación con las cantidades reales de globulina gamma utilizadas en cada caso, creemos excluyen que los resultados hallados sean consecuencia de un artificio técnico y son suficientemente demostrativos para que las diferencias obtenidas, en relación con el correspondiente lote de sueros normales, sean valorables fisiopatológicamente, independientemente de los valores absolutos en sí.

Es necesario un estudio más extenso que abarque una casuística superior y en algunos de los procesos el estudio de las variaciones en el orden evolutivo, para confirmar con toda seguridad los resultados expuestos. Son éstos, sin embargo, suficientemente demostrativos de la *posibilidad de diferenciar químicamente, por este índice de N amínico, las globulinas gamma de sueros normales y de algunos sueros patológicos (cirrosis, plasmocitoma, nefritis, etc.)*. Nos da, además, un *índice de descaracterización* de las globulinas patológicas, que no es paralelo con la homogeneidad o heterogeneidad electroforética de las mismas (índice superior en los plasmocitomas con gamma homogénea que en las cirrosis con gamma heterogénea).

Estas observaciones abren un camino para la diferenciación de tipos de globulina gama que puede ser de interés para el diagnóstico en clínica, acopladas a las variaciones cuantitativas de la misma y a sus características electroforéticas.

El hallazgo de las máximas desviaciones del índice en procesos en los que hay razones para suponer la intervención de autoanticuerpos en su patogenia (esclerodermia, nefritis, periarteritis nodosa) puede contribuir a la explicación de la presencia de dichos autoanticuerpos por una acentuada descaracterización de la globulina gamma que en, consecuencia actuaría como una proteína heteróloga y por ello con capacidad antigénica potencial en el propio organismo.

En la realización práctica de este trabajo, ha sido de gran valor la colaboración de la señorita Emilia Casals, colaboración que nos complacemos en manifestar y agradecer.

### Resumen

Se investiga en la globulina gamma de sueros humanos obtenida por precipitación mediante el hiposulfito sódico, las variaciones del índice de N amínico, determinado por la formoltitulación de Sørensen, en sueros normales y patológicos. Se han obtenido los siguientes promedios: normales, 18'01; cirrosis, 23'01; plasmocitoma, 31'7; nefritis agudas, 37'8; procesos infecciosos, 19'01, y neoplásicos, 15'33.

Estos resultados permiten diferenciar químicamente las globulinas gamma de diversos procesos patológicos, da un índice de descaracterización de la globulina gamma que no es paralelo con la homogeneidad o heterogeneidad electroforética de la misma, que puede resultar de indudable interés en clínica para el diagnóstico de determinados procesos y en fisiopatología como un dato más para la explicación de la posible etiopatogenia de los procesos por autoanticuerpos.

### Summary

An investigation has been made into the variations of the amino-N index of the gamma globulin of normal and pathological human sera obtained by the precipitation with  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ; the index has been determined by formol titration of Sørensen. The following averages have been obtained: normals 18'01, cirrhosis 23'01, plasmocytoma 31'7, acute nephritis 37'8, infectious diseases 19'01, and neoplasia 15'33.

These results make it possible to differentiate chemically gamma globulins of various pathological processes; it gives an index of changes of chemical characteristic in gamma globulin which is not parallel to its electrophoretical homogeneity. It may be of considerable interest in the clinical diagnosis of some processes and in physiopathology as a further factor in the explanation of the possible etiopathogeny of diseases with autoantibodies.

### Bibliografía

1. GRAS, J. y SALAZAR, M.: A comparative study of the fractionation with  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  and paper electrophoresis of the serum proteins. *Plasma*, **2**, 1. 1954.