

Estudio clínico y experimental de la disproteïnemia hepática

F. Pons Romero* y M. Pérez Miranda

RESUMEN

En el presente trabajo se ha estudiado la disproteïnemia hepática por medio de una técnica inmunoquímica cuantitativa en una serie de ratas con lesiones hepáticas tóxicas por Cl_4C y otra serie de ratas a las que se había practicado una hepatectomía standard del 75 %. Junto a este estudio experimental se ha analizado la disproteïnemia en una serie de enfermos afectos de hepatitis crónica y de cirrosis.

Este análisis inmunoquímico ha sido completado con un estudio de la persistencia plasmática de la IgG marcada con yodo 131 en la serie de ratas con lesiones experimentales, y un análisis del depósito de gamma globulina en el parénquima hepático de estos animales.

Los análisis obtenidos nos han permitido valorar las variaciones de la albúmina transferrina y de las tres inmunoglobulinas, en los diversos tipos y grados de afectación hepática. Comprobando que en las lesiones iniciales sólo están aumentadas la IgA e IgM mientras que la IgG tarda más tiempo en aumentar presentando sus máximos valores en los últimos estadios lesionales. La albúmina y transferrina descienden conforme las lesiones son más avanzadas. Estas variaciones fueron independientes del tipo de lesión hepática inducida.

La alteración de las inmunoglobulinas en los enfermos hepáticos ha mostrado una estrecha correlación con el tiempo de protrombina, encontrándose un aumento precoz de la IgA e IgM cuando las alteraciones del tiempo de protrombina eran poco marcadas, mientras que en los pacientes con grandes alteraciones de la protrombina el incremento de las inmunoglobulinas era más homogéneo.

Estos resultados son concordantes con los obtenidos mediante el marcaje de IgG con yodo 131 y sugieren la posibilidad de que cuando hay mayor incapacidad funcional hepática existe también un déficit catabólico más marcado para las inmunoglobulinas.

La disproteïnemia es una característica común de todas las enfermedades crónicas del hígado. Gracias a ella tiene cier-

to valor diagnóstico la electroforesis del suero y las llamadas pruebas de función hepática. La reciente incorporación de técnicas inmunoquímicas para el estudio de las proteínas, tales como la inmunoelectroforesis y la inmunodifusión radial^{13, 20}, han permitido conocer mejor

(*) El presente trabajo ha sido realizado con una Beca de Iniciación a la Investigación del Ministerio de Educación y Ciencia.

las alteraciones de las diversas proteínas séricas en las enfermedades del hígado. Sin embargo, por razones técnicas y, sobre todo, por la importante función que poseen las Igs en su calidad de anticuerpos, se han valorado en estos trabajos, casi exclusivamente, las modificaciones que experimentan las inmunoglobulinas, sin apenas considerar las alteraciones del resto de las fracciones proteicas.

Las primeras determinaciones cuantitativas de las Igs, permitieron establecer unos criterios que permitían relacionar determinados cuadros histopatológicos con los diversos patrones de alteración de las Ig. Sin embargo, trabajos posteriores muestran resultados contradictorios^{10, 16}, negándose en la actualidad el valor diagnóstico de estas determinaciones²⁵.

La diversidad de los resultados obtenidos por estos autores puede deberse, en parte, a que las Igs son una fracción más de los componentes proteicos plasmáticos, por lo que para su valoración exacta se requiere el conocimiento del resto de las fracciones proteicas. De otra parte, algunos autores han llamado la atención recientemente sobre el aumento progresivo de las Igs a medida que se acentúa la severidad de las lesiones hepáticas^{21, 30}. Dado que no ha podido demostrarse una relación entre el incremento de las Igs y un aumento de su síntesis por las células inmunocompetentes, en el curso de lesiones hepáticas crónicas, pudiera ser que la relación del hígado con el nivel de Igs se deba más al papel que éste pueda desarrollar como lugar de catabolismo de las mismas que a su influencia sobre la síntesis. De forma que el mayor o menor incremento de Igs, se pudiera deber a una mayor o menor afectación de la función catabólica del hígado.

El mecanismo de esta función catabólica no está totalmente esclarecido, aunque su existencia ha sido demostrada experimentalmente⁷. Los resultados obtenidos hasta ahora en Clínica, han arrojado resultados contradictorios. Creemos que es-

to puede deberse a las diferencias en las técnicas utilizadas por los diversos autores, y a la dificultad que entraña la valoración del estadio evolutivo en que se encuentran las lesiones de la heterogénea casuística clínica utilizada.

La hipótesis de que el aumento de las Ig que tiene lugar en las enfermedades hepáticas pueda tener un origen metabólico, en el sentido de un déficit de la función destructora del hígado, estaría de acuerdo con la demostrada correlación que existe entre la intensidad del grado de insuficiencia hepática y la elevación sérica de las inmunoglobulinas^{22, 23}. El estudio detallado de esta correlación proporcionaría útiles criterios para la valoración de las enfermedades hepáticas.

En el presente trabajo, mediante una técnica de inmunoelectroforesis cuantitativa, parcialmente elaborada por nosotros, hemos analizado simultáneamente varias fracciones plasmáticas, incluidas las Ig, en el suero de varios lotes de ratas a las cuales se les había provocado dos tipos de lesiones hepáticas experimentales, una tóxica, de evolución y tendencia progresiva, con tetracloruro de carbono y otra atóxica y regresiva, mediante la realización de hepatectomía standard del 75 %.

Con objeto de poder valorar el factor catabólico del hígado, se valoró el tiempo de persistencia intravascular de la IgG marcada con I¹³¹ en los diversos lotes de animales. Se hizo, paralelamente, una valoración del depósito de gamma globulina en el parénquima hepático por medio de inmunofluorescencia.

Finalmente, para poder precisar hasta qué punto tenían proyección clínica los hallazgos experimentales, se analizaron mediante inmunoelectroforesis cuantitativa los sueros de enfermos hepáticos crónicos. Los resultados obtenidos se ordenaron tanto según el cuadro histopatológico como según el tiempo de protrom-

bina, que es considerado actualmente como uno de los indicadores más fieles del funcionamiento hepático²⁴.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Producción de lesiones hepáticas

En un grupo de animales se indujo una lesión atóxica y regresiva, mediante la hepatectomía standard del 75 %^{15, 26}. Se utilizó con este propósito un lote de 30 ratas Wistar cuyo peso oscilaba entre 150 y 200 gr. Se obtuvo sangre de estos animales a las 24 y 72 horas y a los 14 días de haber realizado la ablación del parénquima. El otro tipo de lesión hepática fue tóxica y con tendencia a la progresión, mediante la utilización de tetracloruro de carbono el cual se aplicó en dosis de 0,25 ml por vía intraperitoneal^{5, 17}. Este tipo de lesión se indujo a una serie de 45 ratas, siguiendo la sistemática que describimos a continuación. A un primer lote de 10 ratas se les administró una sola dosis del tóxico, produciendo una lesión aguda que denominaremos estadio I; a un segundo lote de 10 ratas se le administraron 10 dosis consecutivas del tóxico durante 20 días, con lo que se alcanzó el "estadio II" de lesión; al tercer lote, que constaba de 25 animales, a los que se les aplicaban 40 dosis por espacio de 3 meses y las lesiones obtenidas fueron consideradas estadio III. Al final de cada período se hizo examen histopatológico de las lesiones producidas.

2. Estudio inmunoelectroforético de los sueros

Cada uno de los sueros de animales con lesiones hepáticas experimentales fue analizado tanto por inmunoelectroforesis simple¹³, como por inmunoelectroforesis cuantitativa tal como lo describiremos a continuación.

a) Producción de antisueros: el inmunosuero de rata se obtuvo mediante la in-

munización de conejos, con pool de suero de rata normal, mezclados a partes iguales con adjuvante completo de Freund. Los animales recibieron durante 4 semanas una dosis de 0,5 ml cada 7 días y fueron sangrados a la semana de la última inyección.

b) Inmunoelectroforesis cuantitativa: para el análisis cuantitativo de las diversas fracciones proteicas se ha utilizado la técnica descrita por Alfonso^{1, 2} con las modificaciones que describimos a continuación: 6 microlitros de suero se depositaban en pocillos de 2 mm de diámetro, excavados en el centro de la preparación de agar, e inmediatamente se hacía una electroforesis a 220 voltios utilizando buffer veronal pH 8,6. El tiempo de electroforesis era el necesario para conseguir que la albúmina migrara 1,5 cm del pocillo. Finalizada la electroforesis se dejaban difundir las fracciones durante 12 horas, a temperatura ambiente. Pasado este tiempo, se cubrían las preparaciones con un papel de filtro Watman número 3, impregnado homogéneamente con 0,8 ml del antisuero polivalente. En estas condiciones se incubaban las preparaciones durante 48 horas a 37° C. La lectura se hacía por planimetría de las ampliaciones fotográficas de las preparaciones.

3. Análisis de la persistencia intravascular de la IgG marcada con I¹³¹.

a) Obtención de IgG de rata: de un pool de sueros de rata normal se aisló la fracción gamma, por precipitación con sulfato amónico al 33 %. La fracción fue posteriormente eluída en columna de Sephadex G-200²⁸, se recogió el eluido en un colector de fracciones y se realizó posteriormente control inmunoelectroforético de cada uno de los tubos, separando aquellos que contenían IgG exclusivamente.

b) Marcaje de la IgG con I¹³¹: se hizo mediante incubación con una solución

de I^{131} con una actividad de 5 milucurios. El yodo libre fue eliminado mediante filtración en Shephadex G-25²⁸.

Las dosis de IgG marcada fueron administradas a los animales por vía intraperitoneal. Los niveles de radioactividad hemática y urinaria fueron valorados cada 24 horas; la sangre se obtuvo por punción cardíaca percutánea (0,50 ml/24 horas). Para evitar errores debidos a la posible captación tiroidea, se administró a los animales lugol por vía oral durante los días que duró la experiencia.

c) Cálculo y valoración de los resultados: con los valores obtenidos de las muestras de sangre y orina se calcularon los siguientes parámetros¹¹:

- 1) Fracción de la dosis retenida en plasma (Qp).
- 2) Tiempo en que la dosis inicial se reduce al 50 % ($T_{1/2}$).
- 3) Velocidad de degradación (K).

4. *Análisis del depósito de gamma globulina en el parénquima hepático.*

La valoración del depósito de gamma globulina en el parénquima hepático de las diversas series de animales se realizó mediante la reacción de inmunofluorescencia.

a) Obtención del inmunosuero de gamma globulina de rata: la fracción gamma del suero de rata se obtuvo mediante precipitación con sulfato amónico, y posterior elución en columna de Sephadex G-200^{12, 29}. Se hizo control inmunoelectroforético de las diversas fracciones. El eluido se concentró por evaporación hasta 20 mg/ml. La gamma globulina de rata, así aislada, se mezcló a partes iguales con adjuvante completo de Freund. La pauta de inoculación de conejos fue la misma que se empleó para la obtención del inmunosuero de rata polivalente.

b) Marcaje del inmunosuero con tiocianato de fluoresceína: en este paso se siguió la sistemática propuesta por Goldman¹².

c) Reacción de inmunofluorescencia: se utilizó la reacción de inmunofluorescencia directa. Los hígados de las diversas series de animales, fueron congelados a -160°C por inmersión en nitrógeno líquido. De las distintas piezas congeladas se realizaron cortes de 8 micras de espesor en criostato. Cada uno de los cortes se mantuvo cubierto con antiglobulina marcada durante 30 minutos a 37°C . Al cabo de este tiempo fueron lavadas con suero fisiológico tres veces consecutivas encontrándose en condiciones de ser estudiadas con el microscopio de inmunofluorescencia.

5. *Estudio clínico*

Fueron analizados 42 sueros de enfermos hepáticos. 12 presentaban una hepatitis crónica; los 30 restantes eran cirróticos. Se utilizaron 20 sueros de individuos sanos, como control. El diagnóstico se basó en la mayoría de los casos en el estudio histopatológico de los hígados por biopsia.

Sistemáticamente se analizaron las diversas pruebas de función hepática. Así como la determinación de SGPT y SGOT, el nivel de bilirrubina y sus fracciones y la prueba de retención de bromofenofaleína²⁴. Junto a estas determinaciones, se valoró sistemáticamente el tiempo de protrombina después de haber administrado parenteralmente 10 mg de Vit K durante un mínimo de 4 días.

En todos los casos se realizó proteograma del suero mediante electroforesis simple en acetato de celulosa¹⁸.

De cada uno de los sueros patológicos se realizó un análisis inmunocuantitativo. Se siguió la misma sistemática que con los sueros de rata.

RESULTADOS

1. Análisis antigénico del suero de rata normal.

El análisis inmunolectroforético del suero de rata normal nos permitió identificar 16 fracciones proteicas, entre las que se encontraban las 4 inmunoglobulinas IgGa, IgGb, IgA e IgM.

El análisis mediante inmunosueros humanos nos ha permitido precisar la comunidad antigénica entre el SHN y SRN entre las siguientes fracciones proteicas: Albúmina, Ceruloplasmina, Haptoglobina, Transferrina e IgG.

2. Resultados de la Inmunolectroforesis cuantitativa.

a) Sueros normales: mediante esta técnica se han cuantificado 8 fracciones proteicas del suero de rata y 8 del humano.

En la figura 1 podemos observar la forma de aparición de los diversos halos de precipitación de las fracciones identificadas.

En las tablas I y II se recogen los valores normales y las desviaciones stan-

dard de las 8 fracciones analizadas en el SRN y SHN. Las fracciones que presentaron mayor desviación fueron la albúmina y la antitripsina en el suero humano, arrojando desviaciones de $(\pm)22$ y $(\pm)26$ respectivamente. Se comprobó que el área de los anillos de precipitación no sufría ningún cambio a partir de las 20 primeras horas de incubación. Se encontró relación final entre las áreas de precipitación y las variaciones de la cantidad de antígeno empleado.

b) Disproteïnemia por lesión tóxica: los resultados de los valores encontrados en los sueros de los animales con lesiones tóxicas experimentales están expresados en tantos por ciento de la normalidad. La figura 2 es la representación gráfica de estos resultados. En las ordenadas se expresan los porcentajes, en las abscisas, las dosis de tetracloruro de carbono que se administraron a las distintas series de animales. Como puede verse en la figura, la disproteïnemia fue más marcada conforme las lesiones eran más avanzadas. La albúmina y transferrina disminuyen de forma casi paralela, presentando sus niveles más bajos en los sueros de

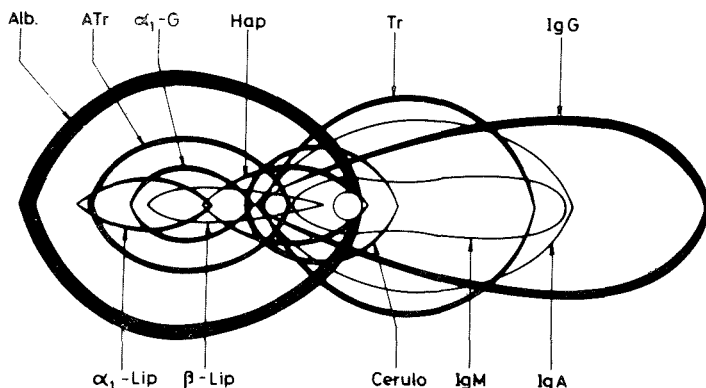


Fig. 1. Esquema de la inmunolectroforesis cuantitativa. Están representadas todas las fracciones que fueron identificadas.

TABLA I
PORCENTO Y DESVIACION STANDARD DE LOS VALORES
OBTENIDOS EN U² DE SRN

SRN	Alb.	Antitrip.	Lipo.	Hapt.	Transf.	IgG	IgA	IgM
8 microlitros	249	130	45	60	73	329	194	130
8 "	250	150	50	75	69	322	210	137
8 "	253	151	54	65	71	320	200	137
8 "	250	150	53	70	70	328	198	134
8 "	254	140	49	60	68	330	200	140
8 "	251	145	60	67	72	225	199	135
8 "	249	150	50	68	69	328	201	139
8 "	252	151	46	65	70	327	197	134
8 "	250	146	49	70	68	329	202	137
8 "	252	139	52	60	71	326	200	140
\bar{X}	251	145,20	50,80	66	70,10	326,4	200,1	136,1
\pm	1,70	6,94	4,29	5,03	1,66	3,24	4,15	3,13

los animales que habían recibido 40 dosis de tetracloruro de carbono (estadio III).

Las inmunoglobulinas presentaron un comportamiento distinto, según los estadios lesionales. La IgA e IgM alcanzaron sus máximos valores en los primeros estadios, tendiendo, más tarde, hacia los

valores normales. La IgG fue la última en aumentar alcanzando los mayores niveles en los últimos estadios lesionales, mientras que en las fases agudas se hallaban dentro de la normalidad.

c) Disprotenemia post hepatectomía: Se analizaron los sueros de estos animales a las 24 y 72 horas y a los 14 días de

TABLA II(*)
INMUNOELECTROFORESIS CUANTITATIVA: VALORES NORMALES

Pool	Albúmina	Antitrip- sina	Haptoglo- bina	Ceruloplas- mina	Transfe- rrina	IgG	IgM	IgA
1	295	170	71	57	146	357	81	188
2	325	125	73	65	132	327	83	191
3	343	125	65	47	150	327	82	163
4	350	183	79	60	138	375	85	187
5	355	145	78	52	143	362	84	198
\bar{X}	333	146	73	56	142	371	83	185
\pm	22	26	6,7	7,1	6,1	5,5	1,4	11

(*) Las cifras corresponden al área de los anillos de precipitación expresada en unidades planimétricas (U²).

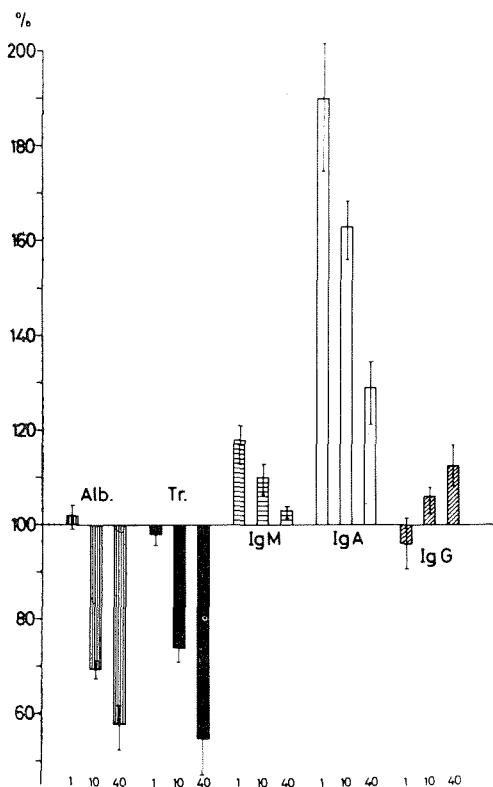


Fig. 2. Representación gráfica de los resultados de la inmunolectroforesis cuantitativa en los diversos grupos de ratas con lesiones tóxicas experimentales.

haber realizado la hepatectomía. Los resultados están expresados en la tabla III. Las mayores variaciones disproteínicas se encontraron a las 72 horas de la hepate-

comía. Las inmunoglobinas que aumentaron más precozmente fueron la IgA e IgM estando ya aumentadas a las 24 horas de la ablación del parénquima. La IgG tardó más en aumentar, y sólo se encontró elevada a las 72 horas de la hepatectomía. Las fracciones analizadas se hallaron dentro de los límites de la normalidad a los 14 días.

3. *Persistencia intravascular de IgG marcada con I¹³¹.*

a) Características de la IgG aislada: en la fig. 4 se reproducen las características inmunolectroforéticas de esta fracción que fue aislada entre los tubos 45 y 50 del eluido en Sephadex G-200. La concentración de IgG en el eluido fue de 1,8 mg/ml por lo que hubo de ser concentrada hasta alcanzar los 17 mg/ml.

b) Características de la dosis administrada: tras la incubación de la IgG con el I¹³¹, se procedió a la separación de la proteína marcada y el yodo libre, mediante elución en Sephadex G-25. Se obtuvo una curva con 2 picos de radioactividad. El primero mostró 1.285.000 CPM/ml/m y correspondía a la proteína marcada. El conjunto de esta fracción fue dividida en cantidades de 0,5 ml con una actividad de 792.728 CPM/ml/m. Con cada una de estas muestras se inocularon las distintas series de animales.

c) Resultados: la persistencia hemática fue determinada diariamente en cada uno de los tres lotes de animales. En la tabla IV se reproducen los resultados obte-

TABLA III

RESULTADOS EN TANTO POR CIENTO DE LA NORMALIDAD A LAS 24 Y 72 HORAS Y A LOS 14 DIAS DESPUES DE LA HEPATECTOMIA

	24 horas	72 horas	14 días
Albúmina	89 % ± 3,5	93 ± 3,2	968 ± 7
IgG	97 % ± 6,2	108 ± 4	101 ± 2,2
IgA	112 % ± 5,1	126 ± 7	112 ± 8,2
IgM	128 % ± 6	130 ± 5,2	104 ± 4,5

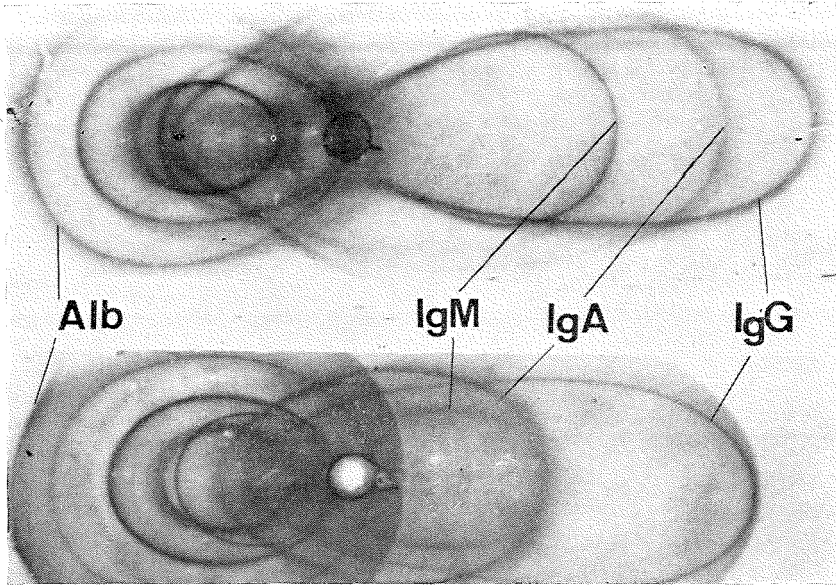


Fig. 3. Inmunoelectroforesis cuantitativa de un suero de rata con cirrosis tóxica perteneciente al estadio II (preparación superior) en comparación con un suero de rata normal.

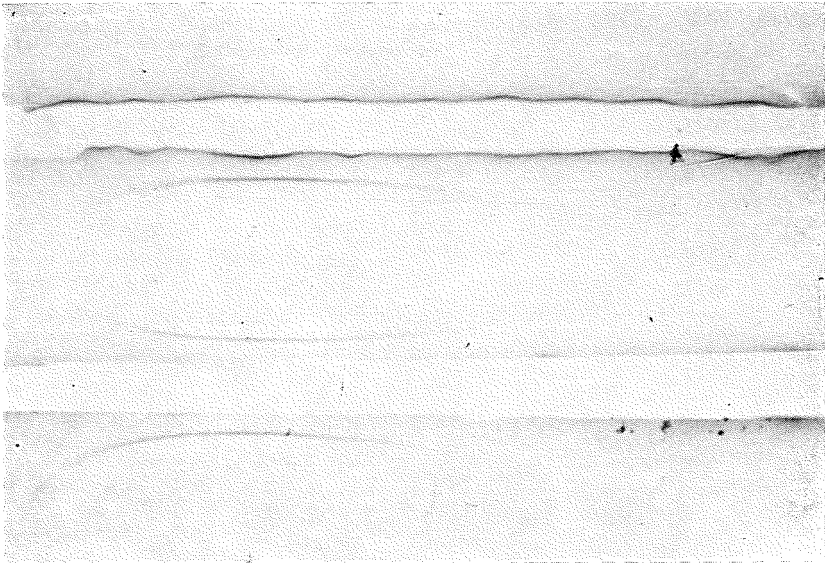


Fig. 4. Inmunoelectroforesis simple de la preparación de IgG que se empleó para el marcaje con Iodo 131.

TABLA IV

Día	Cirrosis		Hepatectomía		Controles	
	Qp+ %	K++	Qp %	K	Qp %	K
1	75	29,6	80	18,5	38	30,7
2	50	26	55	23,7	26	35
3	38	22,6	42	30	14	46,5
4	28	20	32	37	10	71,4
5	20	10,3	22	31,8	7	66
6	14	6,6	18	27,5	4	51,4
7	12	3,3	14	5,5	2,4	24
Promedio	—	16,9	—	20	—	46,5
	$T_{1/2} = 2,93$ días		$T_{1/2} = 2,41$ días		$T_{1/2} = 1,5$ días	

Qp % : Porcento de la dosis de persistencia plasmática.

K: Constante de degradación.

nidos en cada uno de los grupos: Puede comprobarse en ella cómo la degradación promedio fue mucho mayor en el grupo de animales de control que en el de los animales con lesiones hepáticas

experimentales. En la figura 5 están representados simultáneamente los valores encontrados para los $T_{1/2}$, y persistencia intravascular en las tres series de animales.

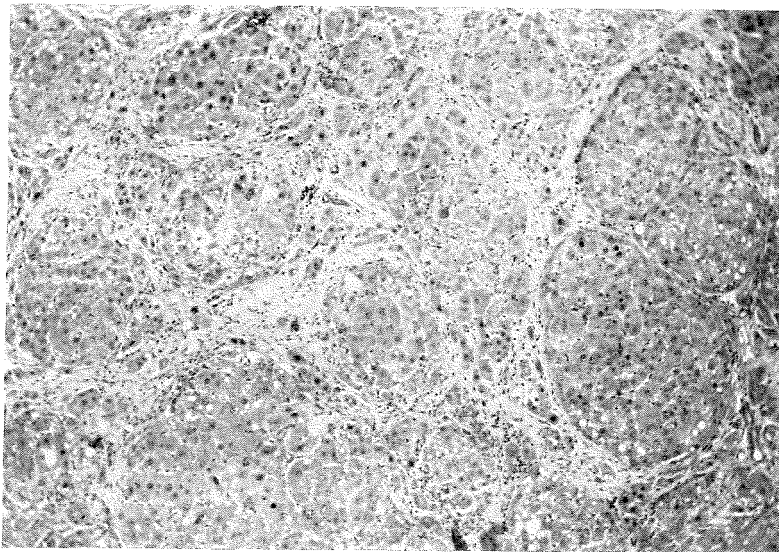


Fig. 5. Representación gráfica de la persistencia plasmática (Qp) de la IgG marcada con I_{131} en los tres grupos de ratas.

Resultados del estudio histopatológico.

a) Lesiones tóxicas: las alteraciones histológicas en los hígados de esta serie de animales, oscilaron desde cambios degenerativos citoplasmáticos y nucleares tales como degeneración hidrópica vacuolar o picnosis, que se encontraron en las ratas pertenecientes al primer estadio, hasta llegar a cuadros cirróticos claramente establecidos con extensiva fibrosis, neoformación de nódulos y proliferación de canalículos biliares en los hígados pertenecientes al estadio III.

En el estadio intermedio, estadio II, pudieron precisarse junto a cambios degenerativos nucleares y citoplasmáticos

idénticos a los observados en el primer estadio, cierto inicio de fibrosis periportal.

b) Estudio del análisis histológico en la serie de ratas hepatectomizadas: las alteraciones más marcadas las encontramos en las ratas que fueron sacrificadas a los 3 días de haberse realizado la hepatectomía. Estos cambios consistieron fundamentalmente en un marcado aumento del número de mitosis; más raramente se observaron algunos hepatocitos vacuolados y aumentados de tamaño. A los 14 días de la resección el hígado presenta una arquitectura normal. El número de mitosis había disminuido considerablemente respecto a las lesiones observadas a los 3 días.

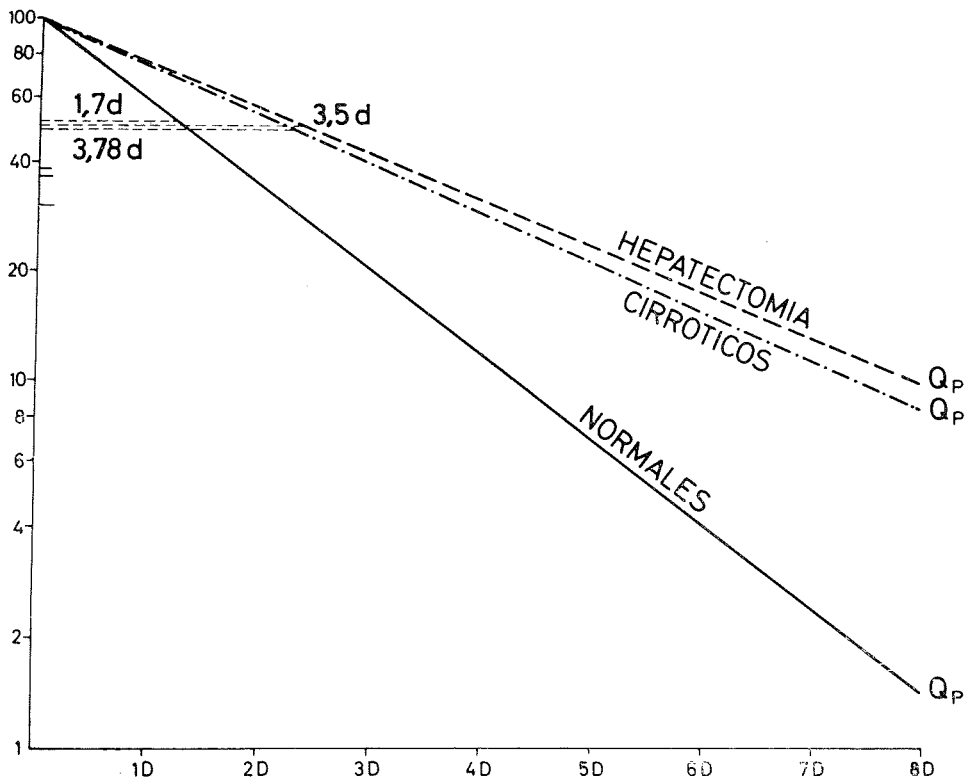


Fig. 6. Preparación histológica de los hígados de las ratas pertenecientes al estadio III.

Resultados del análisis por inmunofluorescencia.

a) Separación de la fracción gamma del inmunosuero: el inmunosuero frente a gamma globulina de rata presentó un poder precipitante hasta la dilución 1/32. La especificidad real del mismo pudo ser comprobada por inmunoelectroforesis. La fracción gamma de este inmunosuero se obtuvo, a su vez, mediante precipitación con sulfato amónico. La concentración final obtenida fue de 10 mg/ml. Para una correcta incubación con el Isotiocianato de fluoresceína hubo de concentrarse hasta 25 mg/ml. Tras la separación cromatográfica en DEAE se obtuvieron 3 picos de elución. El mayor título precipitante se encontró en las fracciones II y III de la misma.

b) Depósito de gamma globulina en el parénquima hepática: las diferencias de depósito encontradas entre los tres grupos de ratas, que han sido objeto de nuestro estudio, fueron significativas. Sólo pudo constatarse en las dos series patológicas, la fluorescencia fue más intensa que en las normales. No pudieron precisarse claras diferencias en la forma de la precipitación ni en la de su localización.

Resultados de la disproteinemia en enfermos hepáticos.

a) Análisis de los datos clínicos y analíticos: el estudio clínico permitió sepa-

rar a los enfermos en dos grupos: cirrosis y hepatitis crónica. En el primer grupo, la prueba de retención de la bromofenotaleína fue patológica en todos los casos con una media del 24 % de retención. El índice de protrombina, arrojó un promedio de 61 ± 10 . En las hepatitis, la evolución fue más corta que en los cirróticos. El índice de protrombina presentó un promedio de 72 ± 8 , siendo patológico en el 61 % de los casos. El análisis del proteinograma no nos permitió establecer claras diferencias entre ambos grupos.

b) Análisis inmunoquímico cuantitativo de los sueros normales: los resultados obtenidos con los sueros de control están reproducidos en la tabla I. En ella se expresan las áreas de precipitación de cada una de las fracciones determinadas.

c) Análisis inmunoquímico cuantitativo de la disproteinemia hepática: en la tabla V, A, se reproducen los resultados de cada fracción expresados en tantos por ciento de la normalidad. De las Igs fue la IgM la que se encontró más elevada, presentando valores más altos en el grupo de hepatitis. La IgG se encontró más incrementada en el grupo de cirrosis. La IgA no mostró diferencias significativas. El resto de las fracciones estaba disminuido en ambos grupos, excepto la ceruloplasmina, que se encontró algo disminuida en la cirrosis, 91 %, y ligeramente aumentada en las hepatitis crónicas. La haptoglobina no ofreció variaciones valorables.

TABLA V

	A) Según tipo anatómico		B) Según índice de protrombina			
	Hep. Cr.	Cirrosis	30-50	50-70	70-90	90-100
Albúmina	36 ± 16	45 ± 18	26 ± 9	35 ± 16	40 ± 29	74 ± 15
Antitripsina	69 ± 6	60 ± 5	55 ± 15	60 ± 20	62 ± 15	70 ± 6
Haptoglobina	95 ± 8	100 ± 4	91 ± 6	93 ± 3	92 ± 10	100 ± 8
Ceruloplasmina	106 ± 7	91 ± 6,5	80 ± 12	89 ± 10	88 ± 2,5	98 ± 8
Transferrina	86 ± 10	71 ± 9	76 ± 6	82 ± 15	93 ± 6	99 ± 4
IgM	144 ± 15	128 ± 15	160 ± 2	137 ± 15	127 ± 5	104 ± 4
IgA	120 ± 18	130 ± 25	123 ± 15	122 ± 17	130 ± 12	107 ± 3
IgG	106 ± 4	119 ± 9	118 ± 4	113 ± 8	103 ± 6	104 ± 3

d) Características de la disproteinemia según el índice de protrombina: los resultados de los valores ordenados según el índice de protrombina están expresados en la tabla V, B. Se puede observar como la albúmina ofrece un marcado descenso aún cuando el índice de protrombina no se encuentre muy alterado. En cambio la transferrina disminuye de forma paulatina y paralela a dicho índice. De las inmunoglobulinas es la IgM la que aumenta más precozmente. La IgG aumenta de forma paulatina conforme el índice de protrombina va descendiendo. La IgA ofrece un comportamiento irregular.

DISCUSIÓN

En el presente trabajo se han analizado las Igs junto con otras fracciones proteicas, con objeto de establecer la correlación existente entre la insuficiencia hepática y las alteraciones proteicas. Para estudiar la disproteinemia inducida experimentalmente en ratas fue necesario llevar a cabo un análisis inmuno-electroforético previo del suero de rata normal. Para mejor identificar las fracciones se realizó un estudio de la comunidad antigénica de este suero con el suero humano normal. Para ello se utilizaron tanto inmunosueros humanos polivalentes como monoespecíficos. Pudimos comprobar comunidad parcial entre seis fracciones proteicas. De las inmunoglobulinas, sólo presentó comunidad antigénica IgG. El número de fracciones comunes superó a las encontradas por otros autores⁴. Una vez identificadas las fracciones del suero de rata normal, se procedió a la determinación cuantitativa de las mismas, para lo cual se empleó un método de inmuno-electroforesis cuantitativa parcialmente elaborado por nosotros, y basado en el descrito por Afonso^{1, 2}. Esta técnica presenta la ventaja, sobre otros métodos inmunoquímicos cuantitativos, de que permite tasar varias fracciones simultáneamente, mediante el empleo de un solo suero polivalente. Utilizando varios pools pudieron identificarse 8 fracciones proteicas tanto en el suero humano normal como en el suero de rata normal. En el suero humano normal, las fracciones que mostraron valores individuales más dispares fueron la albúmina y la antitripsina, arrojando desviaciones standard de ± 26 y ± 22 de los valores medios correspondientes. Estas variaciones individuales parecen corresponder a diferencias reales, entre distintos sueros normales y han sido encontrados también con otros métodos de determinación distintos del utilizado por nosotros²⁷.

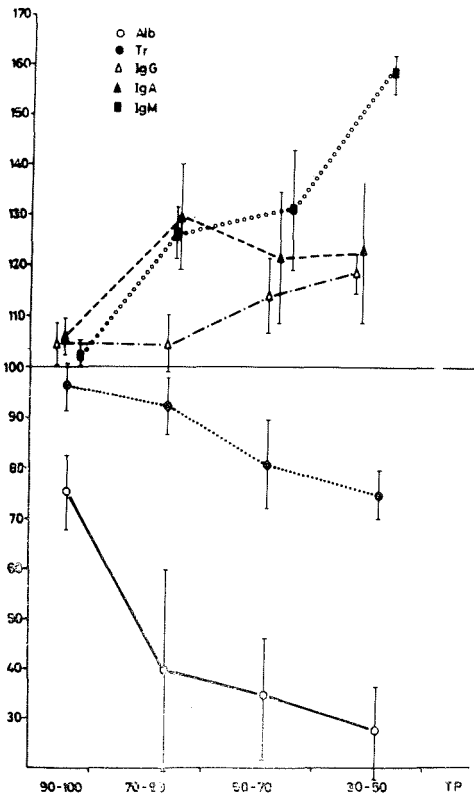


Fig. 7. Promedio de los valores y desviaciones standard de la albúmina, transferrina, IgG, IgA, e IgM agrupados de acuerdo con el índice de protrombina.

En los sueros de rata la dispersión de valores fue menor. Las fracciones que presentaron mayor variabilidad fueron las α -1-lipoproteína, la antitripsina y la IgA.

Todos los valores han sido referidos en tantos por ciento de la normalidad, con relación a los pools de sueros normales estudiados. Como en la actualidad disponemos de soluciones standard, con cantidades conocidas de proteínas, su empleo nos hubiera permitido comunicar los resultados en mgr. Sin embargo creemos que esto carece de valor práctico puesto que los valores individuales son tan distintos de unos laboratorios a otros que siempre es necesario incluir como control un grupo de sueros normales para comunicar los propios valores normales.

Por medio de esta técnica inmunoquímica-cuantitativa, se analizaron los sueros de varios lotes de ratas con lesiones experimentales. A una primera serie se le produjeron lesiones tóxicas por tetracloruro de carbono de tendencia progresiva. Se eligió este tóxico por ser de uso muy común en hepatología experimental y en consecuencia las alteraciones que provoca, tanto histológicas como bioquímicas, han sido muy estudiadas^{3, 71}. A otra serie se le produjo una lesión standard del 75 % con lo que provocamos una lesión en la que las alteraciones se debieran exclusivamente al déficit de parénquima hepático²⁶.

El análisis de las proteínas de estos animales nos ha permitido relacionar los diversos patrones de alteración de las inmunoglobulinas y de otras fracciones proteicas con los diversos grados de afectación hepática. Hemos comprobado que las fracciones anódicas, albúmina y transferrina arrojan los valores más bajos en los estadios lesionales más avanzados, llegando incluso al 50 % en la serie de ratas que presentan un cuadro cirrótico ya establecido. De otra

parte, en la serie de ratas hepatectomizadas las cifras de albúminas más bajas, se presentaron a las 72 horas de haber producido las ablaciones del parénquima, normalizándose a los 14 días de la misma. Estos hallazgos son completamente concordantes con los encontrados en Clínica y en otros trabajos experimentales y pueden explicarse considerando que es el hígado el lugar donde se sintetizan estas proteínas^{14, 19, 23}.

El comportamiento de las Ig mostró distintos patrones según el grado de afectación hepática. En las lesiones agudas, tanto tóxicas como por hepatectomía, son las IgA y la IgM las que se encontraron más incrementadas. Si observamos los resultados obtenidos en los estadios lesionales de más larga evolución, vemos cómo el aumento de las Ig se va haciendo más homogéneo, de forma que la IgG, que en la primera serie se encontraba dentro de los límites de la normalidad, aparece ya incrementada, en estas series, mientras que la IgA e IgM, aunque aumentadas, arrojan cifras que se acercan más a los valores normales. Los valores encontrados en las 72 horas de la hepatectomía son semejantes a los encontrados en el segundo estadio de lesión por tetracloruro de carbono caracterizado por un aumento más homogéneo de las tres Ig.

Este incremento de las Ig en las lesiones hepáticas, puede ser atribuido a un aumento de su síntesis por las células inmunocompetentes que infiltran el hígado. Sin embargo, esta hipótesis aunque ha sido muy discutida, no ha podido ser confirmada⁶. Otra explicación alternativa sería admitir un fracaso, en el hígado enfermo, de una posible función catabólica de las inmunoglobulinas. El hecho de que sea el hígado el lugar de destrucción de estas fracciones proteicas ha podido ser demostrado por Cohen. La posibilidad de que el incremento de las inmunoglobulinas en la insuficiencia hepática estaría en relación con un déficit en su función catabólica

igual que el descenso de la albúmina lo está con una disminución en su síntesis tiene, por tanto, una base experimental que la apoya.

Esta posibilidad estaría de acuerdo también con nuestros resultados, dado que las inmunoglobulinas que aumentan más precozmente son aquellas de turnover más corto, IgA e IgM. De otra parte esta hipótesis explicaría los hallazgos inmunológicos en la serie de ratas hepatectomizadas en las cuales las variaciones de Igs sólo pueden justificarse por una disminución de su destrucción, dado que en el hígado de estos animales no existe ningún tipo de reacción mesenquimal y la insuficiencia hepática que aparece se debe exclusivamente a la disminución del parénquima²⁶.

Los resultados que hemos obtenido mediante el marcaje de la IgG con I¹³¹ ponen de manifiesto una notable disminución de la capacidad de eliminar de la circulación sanguínea esta Igs, en aquellos animales en los que se indujo una lesión hepática independientemente de la naturaleza de la misma. Los resultados de este estudio son concordantes con otros trabajos de fisiología experimental y constituyen a nuestro juicio un argumento a favor de la intervención directa del hígado en el catabolismo de la Igs⁷. Los estudios del turnover de las Ig en Clínica humana han dado resultados contradictorios hasta ahora^{8, 9}. Creemos que el origen de estas discrepancias se debe a la diversidad de las alteraciones funcionales que en cada caso presentaban los enfermos^{9, 22} y al empleo de preparados de gamma globulina comercial no purificada, que ha sido usada, en general, sin previo control inmunoelectroforético.

El análisis mediante inmunoelectroforesis no nos permitió precisar claras diferencias del depósito de inmunoglobuli-

nas en los diferentes grupos de animales. Con estos resultados confirmamos, en cierto sentido, los hallazgos de otros autores⁶ que no han podido encontrar correlación entre el depósito de gamma globulina y el aumento de las mismas en el suero de los enfermos.

El estudio de la casuística clínica ha consistido en el análisis inmunológico de 8 fracciones proteicas, incluidas las Igs, en 42 sueros de enfermos hepáticos: 12 hepatitis crónicas y el resto cirrosis. De una parte los resultados fueron ordenados según el diagnóstico de la lesión, lo que nos permitió precisar algunos detalles diferenciales tales como pequeñas diferencias en el comportamiento de la ceruloplasmina que en las hepatitis crónicas se encuentra ligeramente aumentada en contraste con la cirrosis que está algo disminuída. El comportamiento de la IgG e IgM también han sido distintos en ambos grupos anatomoclinicos. La IgG está más aumentada en la cirrosis, mientras el incremento de la IgM predomina en la hepatitis crónica.

La alteración de las inmunoglobulinas ha mostrado, por otra parte, una estrecha correlación con las del tiempo de protrombina. Se ha encontrado un predominio de IgM e IgA cuando las alteraciones de protrombina eran poco marcadas mientras que en los pacientes con grandes alteraciones de la protrombina el incremento de las tres inmunoglobulinas era más homogéneo e intenso. Ello está en concordancia con los resultados experimentales y viene a apoyar la interpretación de que cuando hay mayor incapacidad funcional existe también mayor inhibición del catabolismo de las inmunoglobulinas y, en consecuencia, hay una mayor elevación sérica de las mismas.

SUMMARY

Clinical and Experimental Study of Hepatic Dysproteinemia

In this work a study of liver dysproteinemia was made by immunochemical technique on a series of rats with hepatotoxic lesions produced by CCl_4 and another series in which a standard 70% hepatectomy was carried out. Serum dysproteinemia in a series of patients with chronic hepatitis and liver cirrhosis was also investigated.

Immunochemical analysis was also completed by a study of plasmatic levels of IgG labelled with I_{131} and the deposit of gamma globulin in the liver parenchyma of the rats with experimental lesions.

With the results obtained we have been able to evaluate the variations of serum albumin, transferrin and immunoglobulin levels in the different grades of hepatic involvement. In the initial stages only IgA and IgM was found

to be increased later attaining maximal values in the final stages of liver damage. Albumin and transferrin levels decrease with advancing liver damage. These variations were independent of the type of lesion provoked.

Alteration of immunoglobulin levels in patients with liver disease have shown a close correlation with prothrombin time. We have found an early increase of IgA and IgM levels when prothrombin time was altered very little whereas in those patients with prolonged prothrombin time the increment of the gamma globulin was homogeneous.

These results match with those, obtained by IgG labelled with I_{131} , and suggest the possibility of there existing a deficiency of catabolism of the immunoglobulins with increased liver functional incapacity.

BIBLIOGRAFÍA

1. AFONSO, E. *Clin. Chim. A.*, 14: 567, 1956.
2. AFONSO, E. *Clin. Chim. A.*, 17: 133, 1967.
3. BENGMARK, S. y R. OTSSON. *Lab. Invest.*, 11: 199, 1962.
4. BENJAMIN, C. y M. WEINER. *J. Immunol.*, 91: 331, 1963.
5. CAMERON, G. R. *J. Pat. Bact.*, 42: 1, 1936.
6. COBURG, A. J. E. y E. SEIFERT. *Act. Hep. Splid.*, 18: 1, 1971.
7. COHEN, S. y T. FREEMAN. *Biochem. J.*, 76: 475, 1971.
8. DYKES, P. *Clin. Sci.*, 34: 161, 1968.
9. EISEMMENGER, J. y R. SLATER. *J. Clin. Invest.*, 32: 565, 1953.
10. FEIZI, T. *Gut.*, 9: 193, 1968.
11. FREEMAN, T. *The use of radioactive Iodine as a Trace Label for Plasma Proteins*. Protides of the Biological Fluids. H. Peeteis Editor, pág. 211, 1966. Elsevier Pbl. C. Amsterdam.
12. GOLDMAN, M. *Fluorescent Antibody Methods*. Academic Press, New York, 1968.
13. GRABAR, P. y C. A. WILLIAMS. *Bioch. Acta*, 10: 193, 1955.
14. HEREMANS, J. *Gastroent.*, 22: 582, 1959.
15. HIGGINS, G. M. y R. M. ANDERSON. *Arch. Path.*, 12: 186, 1931.
16. HOBBS, J. R. *Proc. Roy. Soc. Med.*, 60: 1250, 1967.
17. KINOSHITA, Y. y T. SASAGAWA. *Immunocytochemical Investigation of Carbon Tetrachloride Induced Cirrhosis of the Liver Rats*. The Proceed. URD Wehl. Congress Gastroent., 236: 1968.
18. KOHN, J. *The Biochem. J.*, 65: 9, 1957.
19. LEON, L., M. D. MILLER y F. WILLIAMS. *J. exp. Med.*, 99: 125, 1954.
20. MANCINI, G. y A. C. CARONARA. *Immunochem.* 2: 235, 1968.
21. PÉREZ MIRANDA, M. *Electrophoretische und Immunochemische Differential Diagnose des Leberparenchymschadens*. Inaugural Dissertation. Erlangen Nürnberg, 1968.
22. RAMSÖE, K. y H. WESTERGAARD. *Saend. J. Gast.* 29th. 1970.
23. ROTHSCHILD, M. A. *Prot. Biol. Fluids.*, 267, 1966.
24. SHERLOCK, S. *Disease of the Liver and Biliary System*. Blackwell Scientific Publications, Oxford Fourth Edition, 1960.
25. SHERLOCK, S. *Amer. J. Med.*, 5: 693, 1970.
26. SICOT, C., S. ERLINGER y J. BENHAMOU. *Press. Med. Mis Point.*, 7926: 1201, 1971.
27. STÖRIKO, K. *Blut. Band*, 16: 200, 1968.
28. TALMAGE, D. W. y GLAMAN. *Methods in Immunology and Immunochemistry*. Acad. Press., New York, 1: 390, 1968.
29. WEIR, D. M. *Experimental Immunology*. F. A. Davis C., Philadelphia, 1967.
30. WILSON, I. D., G. ONSTAD y Jr. R. J. WILLIAMS. *Gastroent.*, 1: 59, 1969.

