

UNIVERSIDAD DE LA REPUBLICA ORIENTAL DEL URUGUAY

ANALES

DE LA

FACULTAD DE
QUIMICA Y FARMACIA



VOL. 4

1 9 5 5

HERALDO J. BIANCHI
Ingeniero Químico

ESTUDIO COMPARATIVO
DE LAS PROTEINAS DEL SUERO
Y DEL LIQUIDO CEFALORRAQUIDEO
EN INDIVIDUOS NORMALES Y EN PORTADORES
DE AFECCIONES DEL SISTEMA NERVIOSO

Método electroforético * **

OLGA VÁZQUEZ DE NEGROTTO, CONSTANCIO CASTELLS,
ELISA BALEA y ALBA PUPPO

Instituto de Neurología. Instituto de Patología.
Facultad de Medicina, Montevideo

La determinación cualitativa y cuantitativa de los componentes proteicos de los líquidos del organismo ha sido actualizada en los últimos tiempos por el estudio de la migración de las moléculas proteicas, bajo la acción de un campo eléctrico, sobre todo desde que, en 1937, Tiselius sistematizara el estudio electroforético (1).

En 1950 Durrum (2) y colaboradores, Grassman, Macheboeuf y colaboradores (3) utilizan un método mucho más simple que el costoso y complicado de Tiselius apoyándose en el desarrollo alcanzado por la cromatografía de partición sobre papel, creando el procedimiento de electroforesis sobre papel, también llamado microelectroforesis, para la sangre y que posteriormente fué aplicado al líquido céfalorraquídeo por Schneider y Wallenius (4).

Recordando brevemente los principios de la electroforesis, diremos que está basada en el hecho que las proteínas son coloides elec-

* Trabajo presentado al Congreso Panamericano de Bioquímica de San Pablo. Diciembre 4 de 1954.

** Comunicación presentada a la Sociedad de Neurología y Neurocirugía de Montevideo, sesión del 3 de diciembre de 1954.

trolitos, cuyo punto isoeléctrico es variable para las distintas fracciones, de tal manera que si al estado de solución, se la somete a la acción del campo eléctrico, se produce su movilización hacia uno o otro electrodo según el pH de la solución.

La movilidad será tanto mayor cuanto más alejado esté ese pH de su punto isoeléctrico o, en otros términos, cuanto mayor sea la carga neta de las partículas. Es decir, que si sometemos el líquido céfalorraquídeo o el suero sanguíneo a un gradiente de potencial, la mezcla proteica original que ellos contienen se irá separando gradualmente en sus diversas fracciones, cuya velocidad de migración no es la misma, ya que el valor de la carga neta no es igual. La separación será tanto mayor cuanto mayor sea el tiempo transcurrido.

La velocidad de migración de las moléculas no depende de su peso molecular. En efecto, la albúmina tiene un peso molecular de 70.000 y las distintas fracciones globulínicas, a pesar de tener pesos moleculares aproximadamente iguales (alrededor de 176.000), migran con distinta velocidad de manera tal que, manteniendo constante temperatura, presión, pH de la solución, potencial eléctrico y tiempo, el desplazamiento de las partículas proteicas estará ligado a su carga neta. La mayor movilidad corresponde a las albúminas cuya carga neta es mayor. Los desplazamientos se hacen siguiendo las leyes generales de electricidad.

Mientras que en el suero sanguíneo la determinación de las fracciones proteicas permite el empleo directo de ese líquido ya que su concentración en albúmina es elevada (65/75 grs. ‰), no sucede lo mismo con el líquido céfalorraquídeo en el cual la cantidad de prótidos es muy baja. Normalmente oscila entre 0,20 grs. y 0,40 grs. por mil, y en los distintos estados patológicos pueden existir aumentos que difícilmente alcanzan al nivel sanguíneo y por lo tanto, en la inmensa mayoría de los casos no es posible visualizar el espectro electroforético trabajando con el líquido céfalorraquídeo tal como se obtiene del organismo. De ahí que la primera operación a realizar en todo estudio electroforético sea su concentración, concentración que dependerá de la tasa proteica inicial que tenga el líquido. Esta operación presenta cierta dificultad debido a la rapidez con que se desnaturalizan las proteínas.

Los procedimientos de concentración del líquido céfalorraquídeo son diversos: Kabat y colaboradores (5) (6) recurren a la diálisis bajo presión de nitrógeno (250 mm. de Hg.), contra solución fisiológica; Ever-

beck (7) indica la ultrafiltración ya propuesta por Scheid (citado por Kabat) o la diálisis de concentración contra soluciones coloidales; Esser (8) propone la diálisis contra tampón de Michaelis con eliminación de agua mediante pentóxido de fósforo; Büchner (9) y colaboradores emplean la sal sódica del ácido etilenodiaminotetracético y provocan la precipitación proteica en el líquido céfalorraquídeo mediante acetona, redisolviendo el precipitado con solución tampón de Michaelis.

Caspani (11) concentra la solución con corriente de aire frío, luego la dializa contra solución coloidal de polisacáridos.

Nosotros hemos realizado la concentración del líquido céfalorraquídeo utilizando distintos procedimientos.

Técnica.

Adoptamos últimamente la concentración por diálisis contra solución coloidal de Kollidon al 10-15 %, método que realiza rápidamente la extracción del agua y la reducción de sales conservando constante el pH.

La proporción del líquido céfalorraquídeo debe ser tal que nos permita obtener un residual cuyo contenido en prótidos sea superior a 4 mg., condición indispensable para conseguir un electroforograma claro.

El líquido recientemente extraído, separado de sus elementos celulares por centrifugación, es dispuesto en sacos de celofán y éstos a su vez colocados en la solución de Kollidon a baja temperatura a fin de evitar procesos proteolíticos.

Cuando el volumen líquido alcanza alrededor de 0,1 - 0,2 mil, se extrae del saco de celofán la muestra que será utilizada para la separación de las distintas fracciones proteicas por el método electroforético.

Técnica electroforética.

Es la misma que la empleada para el suero sanguíneo. El modelo de aparato utilizado para la electroforesis sobre papel, está representado en la figura 1.

Está construido en material plástico y consta de una cámara rectangular que presenta, en la zona media longitudinal, un tabique vertical que la divide en dos cubetas que se comunican entre sí por la parte lateral inferior.

Lleva además dos electrodos en comunicación con el dispositivo que nos permitirá regular el voltaje y densidad de corriente necesaria para provocar la separación de las fracciones proteicas.

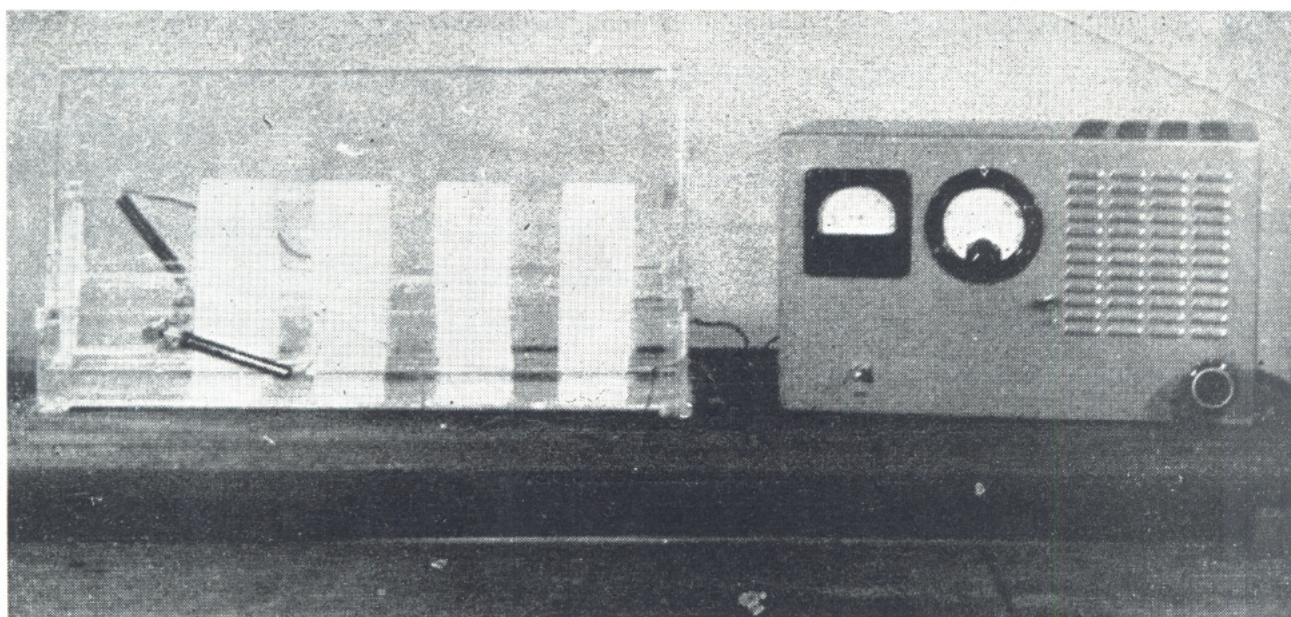


Fig. 1.— Aparato para microelectroforesis.

En la cuba va colocado el soporte que mantiene suspendidas las bandas de papel: además una cubierta cierra totalmente el sistema.

Papel.

Usamos el Whatmann N^o 1: pueden usarse el 2 y 4 espeso o el Munkel N^o 20.

Se cortan bandas de papel de longitud y ancho determinado (7 x 30 cms.). Para obtener dos diagramas se traza en la parte media, una línea vertical y en ella se marca la posición en la cual se dispondrá el líquido céfalorraquídeo y el líquido sanguíneo.

Se impregnan dichas bandas con sol. tampón veronal-veronal sódico, pH 8, 6; se saca el exceso apoyándolas sobre papel de filtro y luego se dispone el suero y el líquido céfalorraquídeo en el lugar previamente marcado. Pronto la banda se la suspende en el sistema electroforético, cuidando que sus extremos queden sumergidos en la solución tampón, que presenta nivel igual en las dos cubetas, con el fin de igualar las fuerzas hidrostáticas que obran sobre el papel. Se coloca la cubierta correspondiente.

El desplazamiento electroforético debe hacerse en una cámara cuya atmósfera saturada de solvente se encuentra en equilibrio con el fijado con la banda: de lo contrario se producirán evaporaciones que determinarán desniveles de potencial en la banda de papel lo que tendría gran influencia en el desplazamiento de las fracciones proteicas.

Se espera 10 minutos y se hace pasar una corriente eléctrica de débil intensidad.

Hemos trabajado a 100 volt. aproximadamente durante 7 horas, habiendo colocado en el sistema corrientemente 4 bandas 7 x 30 y utilizando tampón veronal-veronal sódico pH 8,6.

Después se saca el papel, se deja secar a la temperatura ambiente a 105° C. durante dos minutos y se procede al revelado, utilizando solución de azul de bromofenol (al 2 por mil en alcohol etílico) saturada de bicloruro de mercurio. En esa solución quedará la banda 5 a 10 minutos. Se saca en seguida el exceso de colorante con ácido acético diluído y se deja secar a la temperatura ambiente.

Se lee la intensidad de coloración que corresponde a las distintas fracciones proteicas mediante un fotómetro al cual va anexado un dispositivo que permite el desplazamiento de la banda de dos en dos milímetros.

Conociendo la densidad óptica, y sabiendo que cada una de ellas, corresponden a un espacio de bandas de 2 milímetros se levanta el gráfico correspondiente en papel milimetrado. Se determinan las áreas de cada fracción por planimetría y se calcula luego el porcentaje relativo de las distintas fracciones.

Resultados (fig. 2).

Realizando estas operaciones hemos podido obtener en el suero y en el líquido provenientes de enfermos que nos consultaron en el Instituto de Neurología, un proteinograma (realizado en el Instituto de Patología de la Facultad de Medicina) en el que es posible poner en evidencia como ya lo han adelantado Enselme y Tigaud (12):

1º) El grupo de las albúminas que dosificamos en conjunto es el más veloz de los prótidos salvo la fracción X y dentro de ellas se puede distinguir: a) Una albúmina incolora bien cristalizada (cristalalbúmina de Hewitt, o albúmina B de Kekwick conteniendo cantidades ínfimas de glúcidos). b) Una albúmina bien ligada a glúcidos (seroglicoides de Hewitt). c) Albúminas bien ligadas a diversos cuerpos, porciones aniónicas de ácidos grasos, ácidos aromáticos, ácidos biliares, vitaminas C, K y P.

2º) Globulinas. a) Globulina α dividida a su vez en dos grupos α_1 y α_2 lipoproteínas de pequeñas moléculas. b) Globulinas, β lipoproteínas de gran molécula entre las cuales en algunos serogramas obtuvimos las fracciones β_1 y β_2 . c) Las globulinas γ , grupo de sostén de los anticuerpos.

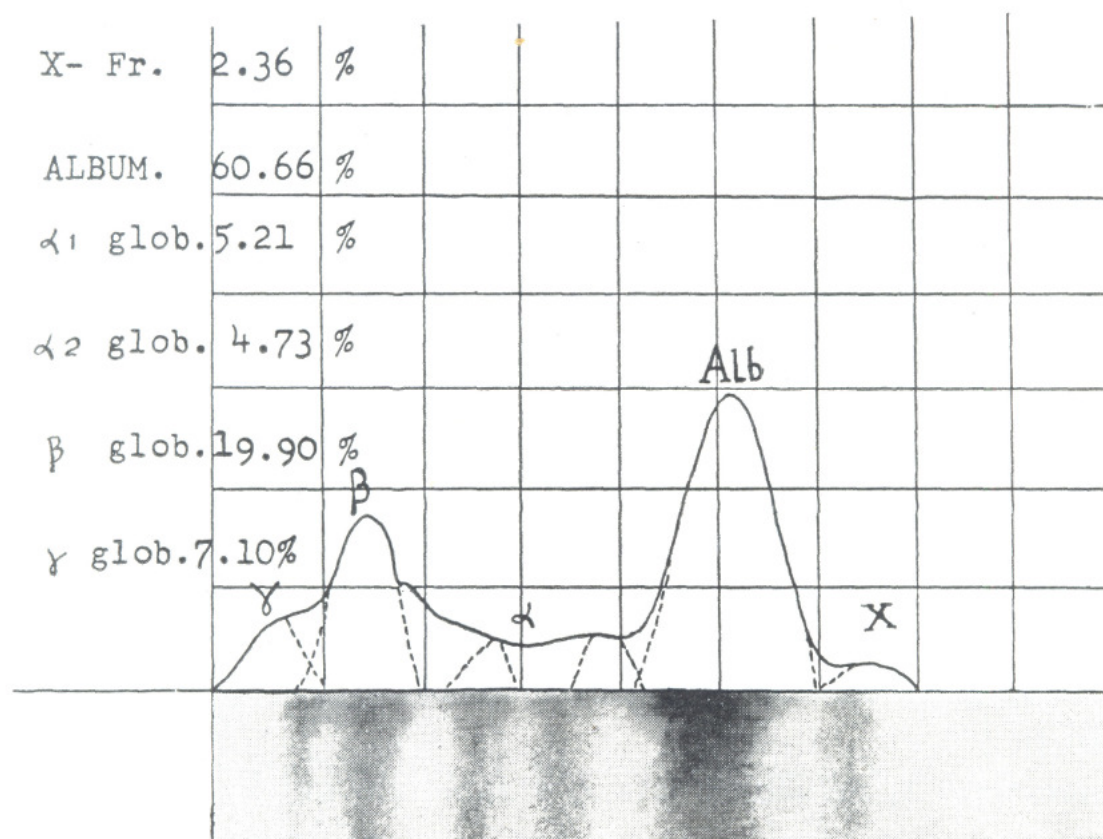


Fig. 2.—Electroproteinograma de un L. C. R. con fracción X.

3º) En algunas de las muestras de líquidos obtenidos, observamos una fracción más veloz que la albúmina y a la cual Kabat (6-7) que fué el primero en ponerla en evidencia, denominó factor X o prefracción proteica.

Hacemos notar desde ya que ni en los serogramas correspondientes, ni en ninguno de los otros 90 practicados, fué posible poner en evidencia la prefracción o factor V de los autores alemanes.

Comentarios.

En el estudio comparativo del proteinograma del líquido céfalorraquídeo y del suero observamos:

A) **Sujetos normales.**— Se trata de sujetos que consultaron por pequeños síntomas, ligera astenia, decaimiento, que desaparecieron con tratamientos totalmente anodino.

1º) Los valores relativos de la fracción albúmina en el líquido céfalorraquídeo oscilan entre 52 y 64 % siendo estos en la gran mayoría de los casos superiores al del suero sanguíneo del mismo individuo.

2º) De las fracciones globulinas en el líquido céfalorraquídeo existe un predominio de la fracción β en relación con la γ y α hecho este que está de acuerdo con los hallazgos de Caspani (11) y Kabat (6).

3º) El cociente A/G del líquido céfalorraquídeo oscila entre 1,11 y 1,79.

4º) El valor del cociente en el suero sanguíneo correspondiente oscila entre 1,05 y 1,72 acercándose sus valores a los del líquido céfalorraquídeo.

B) En siete casos hemos encontrado en el líquido céfalorraquídeo fracción X. De estos siete casos, tres corresponden a enfermedad de Parkinson, uno a parálisis facial periférica virósica, uno a mielosis, otro a epilepsia focal y el restante a una miopatía.

La concentración del factor X varió entre 2,36 y 5,71 %.

En los 7 líquidos céfalorraquídeos en que se encontró prefracción, el examen citoquímico fué normal, salvo en un caso en que existían una discreta reacción citológica (parálisis facial periférica virósica).

Esta prefracción encontrada por nosotros y que muy pocos autores destacan, no fué hallada como dijimos más arriba, en ninguno de los serogramas examinados.

C) En dos de nuestros enfermos, uno portador de un granuloma eosinófilo demostrado por examen histológico y en otro, portador de una reticuloendoteliosis, comprobamos una elevada proporción de γ globulina en sangre (41 y 36 % respectivamente) mientras que en el líquido céfalorraquídeo la proporción de γ globulina era de 5 y 13 % respectivamente.

En el resto de los estudios realizados si bien en algunas de nuestras observaciones encontramos diferencias netas entre el proteinograma del líquido céfalorraquídeo y de la sangre, no podemos sacar conclusiones, ya que generalmente la modalidad clínica diferente podría inducirnos a error. Estas comprobaciones necesitan ulteriores confirmaciones que nos proponemos realizar.

Conclusiones.

El estudio comparativo de la electroforesis sobre papel, de sangre y líquido céfalorraquídeo nos ha permitido:

1º) Establecer el modelo electroforético normal del líquido céfalorraquídeo.

2º) Poner en evidencia en el líquido céfalorraquídeo una fracción proteica, fracción X de Kabat, o fracción V de los autores alemanes, o prefracción proteica que no se encuentra en el suero sanguíneo.

3º) La existencia de hipergammaglobulinemias aisladas que no se acompañan de aumento correlativo en el líquido céfalorraquídeo.

4º) Modificaciones en el proteinograma electroforético, con aumentos de globulina, aún con cantidades de proteínas (por dosificación colorimétrica) dentro de los límites normales y que podrían explicar en líquidos aparentemente normales las reacciones positivas de globulinas (Pandy Nonne Appelt).

El estudio que acabamos de realizar nos permite deducir que existe formación probable de una parte de las proteínas del líquido céfalorraquídeo en las estructuras del sistema nervioso y que de esta manera podrían considerarse como específicas del mismo.

Por otra parte, la barrera hematoliquidiana permite mantener tasas de globulinas normales en el líquido céfalorraquídeo cuando existen grandes aumentos en la sangre.

El estudio electroforético comparativo de sangre y líquido céfalorraquídeo, a pesar de los trabajos ya realizados, se encuentra aún en una etapa de investigación. Es necesario reunir mayor cantidad de datos para poder precisar su valor diagnóstico y pronóstico en las diversas afecciones del sistema nervioso central; de la misma manera su estudio permitirá ahondar en problemas de fisiopatología del líquido céfalorraquídeo.

Bibliografía

- (1) Tiselius and Kunkel H. G.; Proteins paper electrophoretic; J. Gen Physiol. 35: 80, 1951.
- (2) Durrum J.; Una técnica microelectroforética y microionoforética; J. Am. Chem. Soc. 72: 2943, 1950.
- (3) Machebouef N. and Robeyrothe; Revue d'Hematologie; 7: 400, 1952.
- (4) Schneider; Electrophoretic studies en C. S. F. proteins, Scand. J. Clin. and Lab. Invest. 3: 145, 1951.
- (5) Kabat E. A., Freedman D. A., Murray e, Knaub V.; Am. J. Soc. 219: 55, 1950.
- (6) Kabat E. A., Landow E. H. e Moore D. H.; Proc. Soc. Exper. Biol. Med. 49: 260, 1952.
- (7) Scheid K. F. e Scheid E.; Arch. Psychiatr. 117: 219, 641, 1944.
- (8) Esser H., Heinrler F. e Wild H.; Klin. Wschr. 30: 228, 1952.
- (9) Bucher Th., Matzelt D.; Klin. Wschr. 30: 325, 1952.
- (10) Everbeck H.; Klin. Wschr. 28: 692, 1950.
- (11) Caspani R.; Posibilidad de aplicación de resultados electroforéticos en el estudio del líquido céfalorraquídeo normal. Minerva Médica, Vol. 1: 21, 50, 1346-48 junio 1952.
- (12) Enselme J. y Tigaud J.; Comment interpréter les resultats de l'electrophorese du serum humaine, Journal de Méd. de Lyon. 815, 1005-1015, 20-12-53.