

T-6

CARLOTA ESCOBAR P.

Estudio de las Proteínas Séricas en Grupos Normales y en diversos Casos Patológicos por Microelectroforesis

INSTITUTO DE NUTRICION
DE CENTRO AMERICA Y
PANAMA
GUATEMALA. C. A.

GUATEMALA, 1952

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia

Estudio de las Proteínas Séricas en Grupos Normales y en diversos Casos Patológicos por Microelectroforesis

**TESIS presentada a la Junta Directiva de la
Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de
la Universidad de San Carlos de Guatemala,
por CARLOTA ESCOBAR P., en su investidura
de QUIMICO BIOLOGO.**

**Trabajo efectuado en el INSTITUTO DE NUTRICION DE CENTRO
AMERICA Y PANAMA, bajo la dirección del Lic. José Méndez de la Vega, Jefe de la Sección de Estudios de Proteínas del INCAP y Profesor de la Universidad de San Carlos de Guatemala.**

**Trabajo financiado en parte por donación de Nutrition Foundation,
New York, al INCAP, para estudios especiales en Proteínas.**

GUATEMALA, AGOSTO DE 1952

JUNTA DIRECTIVA
DE LA
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA
DE LA
UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

<i>Decano</i>	Lic. Carlos L. Ovalle.
<i>Vocal 1º</i>	Lic. José Méndez de la Vega.
<i>Vocal 2º</i>	Ing. Julio Beltranena S.
<i>Vocal 3º</i>	Lic. Héctor Brolo.
<i>Vocal 4º</i>	Br. Roberto Quezada.
<i>Vocal 5º</i>	Br. Miguel Canga A.
<i>Secretario</i>	Lic. Raúl Valdeavellano P.

Tribunal que practicó el Examen General Privado:

<i>Decano</i>	Lic. Carlos L. Ovalle.
<i>Examinador</i>	Lic. Enrique Herrarte.
<i>Examinador</i>	Lic. Mario Villanueva.
<i>Examinador</i>	Lic. Jorge Aycinena.
<i>Secretario</i>	Lic. Raúl Valdeavellano P.

DEDICO ESTE ACTO:

A MIS PADRES:

VENTURA ESCOBAR A.

In memoriam.

MELECIA v. de ESCOBAR

A MIS HERMANOS:

VENTURA, AIDA y GLADYS

A MI TIA:

MARIA ESCOBAR

A MIS PROFESORES, COMPAÑEROS Y AMIGOS.

Y EN ESPECIAL A:

ANGELA DE LEON; y

VICTOR MANUEL MONROY

**QUIERO EXPRESAR POR ESTE MEDIO
MI AGRADECIMIENTO AL:**

LIC. JOSE MENDEZ DE LA VEGA,

**Por su valiosa cooperación y guía en
el desarrollo de este trabajo de Tesis.**

AL:

DOCTOR NEVIN S. SCRIMSHAW

Y AL:

**INSTITUTO DE NUTRICION DE
CENTRO AMERICA Y PANAMA,**

Por haber hecho posible su realización.

INDICE

	Pág.
INTRODUCCION A LA ELECTROFORESIS	9
REVISION DE LA LITERATURA	13
PARTE EXPERIMENTAL:	
Aparatos y Materiales	15
METODO ELECTROFORETICO:	
Diálisis	19
Preparación de la celda electroforética	19
Llenado de la celda	20
Compensación y electroforesis	22
Interpretación de diagramas	23
RESULTADOS	27
DISCUSION	33
SUMARIO	37
BIBLIOGRAFIA	39

INTRODUCCION A LA ELECTROFORESIS

La aplicación de los principios y técnicas fisicoquímicas en estos últimos años, han aumentado el conocimiento de las proteínas. El uso de la técnica electroforética se ha difundido rápidamente y ha despertado el interés en todas las ramas científicas ya que no sólo se pueden determinar cualitativa y cuantitativamente las fracciones protéicas de una mezcla compleja, sino que se pueden aislar dichas fracciones en forma pura.

La electroforesis se puede definir como la migración o movimiento de partículas cargadas de electricidad en un campo eléctrico. Todas las moléculas, partículas, iones, etc., cargados con electricidad positiva se moverán hacia el electrodo negativo y las de carga negativa hacia el electrodo positivo. Ahora bien, la velocidad de migración está relacionada a la carga eléctrica de la sustancia y siendo las moléculas, iones, etc., de diverso tamaño, las más pequeñas presentarán más superficie y por lo tanto tendrán más carga eléctrica, moviéndose más rápidamente en el campo electroforético.

Las proteínas se comportan como iones anfóteros, de tal manera que si una proteína se coloca en solución básica se carga de electricidad negativa y se moverá hacia el electrodo positivo; lo contrario resultaría en presencia de solución ácida, es decir que en este caso se movería hacia el electrodo negativo por haberse cargado positivamente. En última instancia cuando la proteína se lleva al punto isoeléctrico, cuando las cargas positivas y negativas son iguales, las moléculas proteicas permanecen inmóviles, siendo esto una característica de las proteínas en el punto isoeléctrico.

cialmente que en lugar de observar el movimiento electroforético en un medio líquido se hace en un medio sólido. Este método ha sido desarrollado separadamente por E. C. Durrum en los EE. UU., Tiselius, Svensson y Brattsten en Suecia y por Wieland (52) y Turba (51) en Alemania. El sólido usado en este tipo de electroforesis es el papel filtro.

La determinación de proteínas en el suero y plasma sanguíneo por el método electroforético de la observación de linderos de acuerdo con las técnicas de Tiselius, Longsworth, Leutscher, Wiedeman y otros ha tomado gran importancia en los laboratorios de investigación y laboratorios clínicos. Las principales dificultades que se encuentran en esos métodos son el alto valor de los aparatos, el tamaño de la muestra y el tiempo requerido en la experimentación. El micrométodo desarrollado por Labhart y Staub (20) y la manufactura de aparatos de precio más reducido han resuelto en parte esas dificultades. La casa Kern y Co. de Suiza ha manufacturado un aparato de microelectroforesis (LK-30) de acuerdo con las indicaciones de Labhart y Staub.

El propósito del presente trabajo de Tesis es el de investigar, por medio del aparato de Microelectroforesis LK-30, los niveles proteicos en grupos de la población de la ciudad de Guatemala, así como la apreciación de esta técnica en diversos casos patológicos.

REVISION DE LA LITERATURA

El estudio de la electroforesis es relativamente nuevo. Principió con las observaciones del físico ruso Reus (22) en 1807 quien observó la electroforesis del agua a través de la arcilla, notando que esta se movía en dirección opuesta al agua. Porret (31) observó el paso del agua a través de una vejiga urinaria bajo la influencia de una corriente galvánica y extendió sus estudios al papel filtro impregnado de albúmina, siendo posiblemente este trabajo uno de los primeros en la electroforesis al papel. Hardy (16) reportó que las partículas de albúmina de huevo desnaturalizada cargadas negativamente, pueden volverse positivas al agregar ácido, cambiando así la dirección de migración.

La electroforesis moderna se desarrolló con los trabajos de Tiselius, Theorell, Svensson, Philvot, McInnes, Longsworth, Shedlovsky, Reiner, etc.

Varios trabajos de revisión de la electroforesis, de sus principios y técnicas han sido presentados por varios autores. Stern y Reiner (41) estudian la aplicación de la electroforesis en medicina. Reiner (33) también estudia la electroforesis en la aplicación a problemas médicos y Albery (6), (7) revisa los métodos y cálculos así como la teoría de la electroforesis.

Longsworth (24) discute los principios, métodos ópticos, aparatos y la determinación de constantes en la aplicación de la medida del índice de refracción en la electroforesis. Lewis (22) en su monografía "Electroforesis en Fisiología" hace una revisión completa de los principios de la electroforesis y su aplicación en el campo de la biología. Abramson, Moyer y Gorin (5) en su libro "Electroforesis de las Proteínas" presentan una revisión de la aplicación de la electroforesis en el estudio de las sustancias proteicas.

Muy poco se encuentra en la literatura con respecto a la microelectroforesis. Labhart y Staub (20) describen la nueva microtécnica de electroforesis haciendo notar en su trabajo las ventajas de ese método. Describen el sistema óptico que consiste principalmente en un prisma interferométrico que substituye al sistema "schlieren", que es el utilizado en los aparatos de macroelectroforesis. Los autores presentan una comparación entre el micro y el macro método, habiendo encontrado un error medio de 2.5%. Lotmar (26) revisa el sistema óptico de interferometría utilizado en electroforesis.

Longsworth (25) presenta un estudio sobre la interferometría en electroforesis utilizando el interferómetro de Rayleigh modificado por Svensson (46), (47). También hace ver la utilidad de este sistema y la ventaja que presenta al aumentar la precisión de los análisis. "Con el método interferométrico es posible trabajar con cantidades más pequeñas de material, una consideración importante en el estudio de muchas sustancias biológicas".

Braybon (10) explica la formación de las franjas en la interferometría, utilizando para la descripción al interferómetro de Michelson.

Varios aparatos se han empleado para determinar las proteínas séricas por medio de microelectroforesis. Kropp (18) utilizó el aparato de Antweiler en la determinación de proteínas séricas en la infancia. Ewerbeck y Levens (14) utilizaron también el aparato de Antweiler en la determinación de proteínas séricas en suero fetal. Hartmann y Schumacher (17) estudiaron las variaciones sistemáticas y biológicas de las proteínas plasmáticas utilizando el aparato de Antweiler.

Schaub y Alder (34) utilizaron el aparato de microelectroforesis de la Casa Kern y Co. (LK-30) en el estudio de sueros humanos normales y en casos clínicos.

PARTE EXPERIMENTAL

Aparatos y Materiales.

- a) Aparato de microelectroforesis modelo LK-30 de la Casa Kern y Co., Araau, Suiza, con todos sus accesorios (Fig. N° 1);
- b) Cuarto oscuro, material fotográfico y máquina de ampliación;
- c) Film Kodak Super XX;
- d) Tubo de dializar (celofán); y
- e) Soluciones Buffer.

Solución Stock para el Buffer de Michaelis.

Acetato de Sodio	19.43	grs.
Barbital Sódico (Veronal Sódico) ..	29.43	grs.
Agua Destilada c. s. p.	1000	c. c.

Buffer de Michaelis para determinaciones en suero.

Solución Stock	200	c. c.
Solución de Cloruro de Sodio al 8.5% ..	20	c. c.
Acido Clorhídrico 1 N	3	c. c.
Agua Destilada c. s. p.	1000	c. c.

Este buffer tiene un pH de 8.5 y una fuerza iónica de 0.1 μ .

Muestras.

Se estudiaron un grupo de 23 hombres adultos sanos y un grupo de 25 mujeres adultas sanas, siendo la mayor

parte de ellas del personal de los Laboratorios del INCAP y estudiantes de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Se estudiaron también un grupo de enfermos del Hospital General y varios casos de mujeres embarazadas.

Las sangres fueron obtenidas en ayunas por punción venosa e inmediatamente fueron pasadas al laboratorio para su estudio. Se tuvo mucho cuidado en extraer las sangres con jeringas secas para evitar hemólisis.

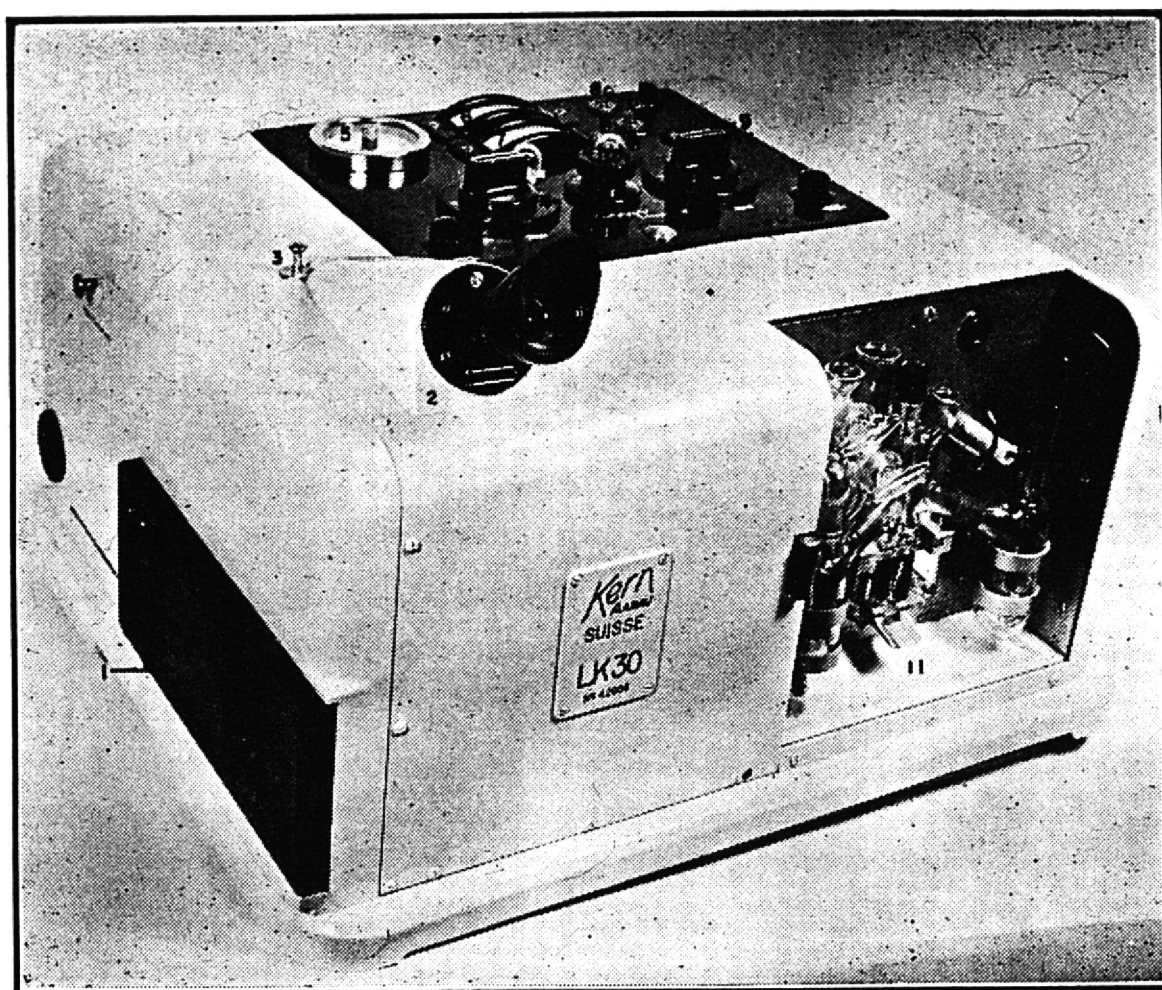


Figura Nº 1.

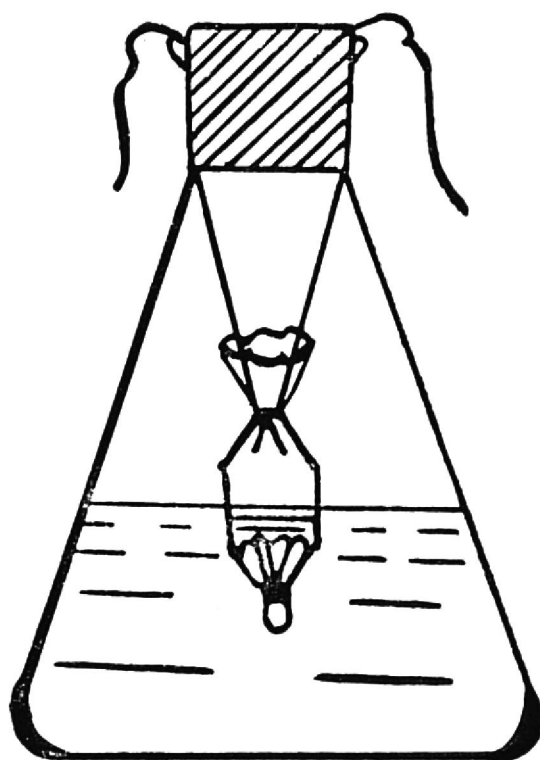


Figura Nº 2.

METODO ELECTROFORETICO

Diálisis.

Un pedazo de tubo de celulosa de unos 10 cms. de largo y de 1 pulgada de diámetro se coloca en agua destilada por 5 minutos para suavizarlo, uno de los extremos doblados en la forma que indica la Fig. N° 2, es atado fuertemente con hilo y probado con agua para asegurarse que no haya ninguna salida o rotura. El tubo es lavado nuevamente.

El suero a analizar se diluye con Buffer de Michaelis, según la concentración de proteínas; en sueros normales se usaron diluciones de 1:4 a 1:5 y en sueros patológicos en los que las proteínas séricas eran bajas se usaron diluciones más concentradas 1:3.

1.5 c. c. a 2 c. c. de esta dilución es colocada en el tubo de dializar y atada en el extremo libre con hilo dejándolo suficientemente largo en los extremos. Este tubo así preparado es introducido en un Erlenmeyer de 500 c. c. conteniendo 200 c. c. de Buffer de Michaelis (Fig. N° 2). La diálisis se lleva a cabo en refrigerador a temperatura de 2 a 5° C, durante 48 horas. El buffer debe de ser cambiado 1 ó 2 veces durante el período de diálisis.

Preparación de la celda electroforética.

La parte inferior de la celda (Fig. N° 3, 12; y Fig. N° 4, C) se engrasa cuidadosamente usando vaselina blanca; uno de los extremos de esta pieza está marcado con el color rojo, este extremo se debe de colocar a la derecha. La parte media de la celda (Fig. N° 3, 11; y Fig. N° 4, B) se coloca sobre la parte inferior, poniendo la parte de la laca oscura hacia afuera. Se manipula la parte media

moviéndola de un lado a otro para eliminar todas las burbujas de aire de la unión engrasada.

La parte superior de la celda (Fig. N° 3, 10; y Fig. N° 4, A) es engrasada cuidadosamente y la parte media es colocada en el aparato haciendo la unión con el extremo inferior de la parte superior de la celda que comunica con los vasos de los electrodos. La parte media de la celda se mueve de un lado a otro para eliminar las burbujas de aire de la unión.

Una vez puestas las partes de la celda en el aparato de electroforesis se procede a llenar la celda para correr el experimento.

Llenado de la celda.

Con una jeringa provista de una aguja larga y de punta roma (la Casa provee esos utensilios con el aparato) se llena la celda por la rama izquierda (Fig. N° 3, 14) con la solución de proteína dializada y que se ha llevado a temperatura ambiente por 12 horas. Se prefiere, si la solución de suero es suficiente, llenar las dos ramas de la celda completamente hasta el nivel de la unión de la celda con la parte superior de los vasos de los electrodos (Fig. N° 3, 10). Si no se tiene suficiente suero se llenan hasta la mitad de las ramas, luego se coloca el pistón 9 (Fig. N° 3) en su posición, se cierran las llaves 6 y 7 (Fig. N° 3), se coloca un poco de buffer (*) en el embudo 8 (Fig. N° 3) y se abre la llave 7 (Fig. N° 3) poco a poco para que el buffer pase al vaso del electrodo y empuje, por la presión que ejerce el líquido a la solución de suero hacia la rama derecha (Fig. N° 3, 15) hasta el nivel de la unión (Fig. N° 3, 10). El nivel del suero se controla observando la

* El buffer utilizado en el llenado de la celda y vasos de los electrodos es el mismo buffer con el que se ha dializado la muestra. A este buffer se le debe extraer el aire por medio del vacío aplicando la máquina de succión por 10 minutos.

columna por los espejos 13 (Fig. N° 3). Una vez efectuado este paso se mueve la parte inferior de la celda (Fig. N° 3, 12) hacia la derecha para cortar la columna. Se vacía el excedente de la solución de suero de la rama izquierda (Fig. N° 3, 14) por medio de la jeringa antes mencionada. Esta rama es lavada con agua destilada y luego con el buffer, por último se llena con el propio buffer.

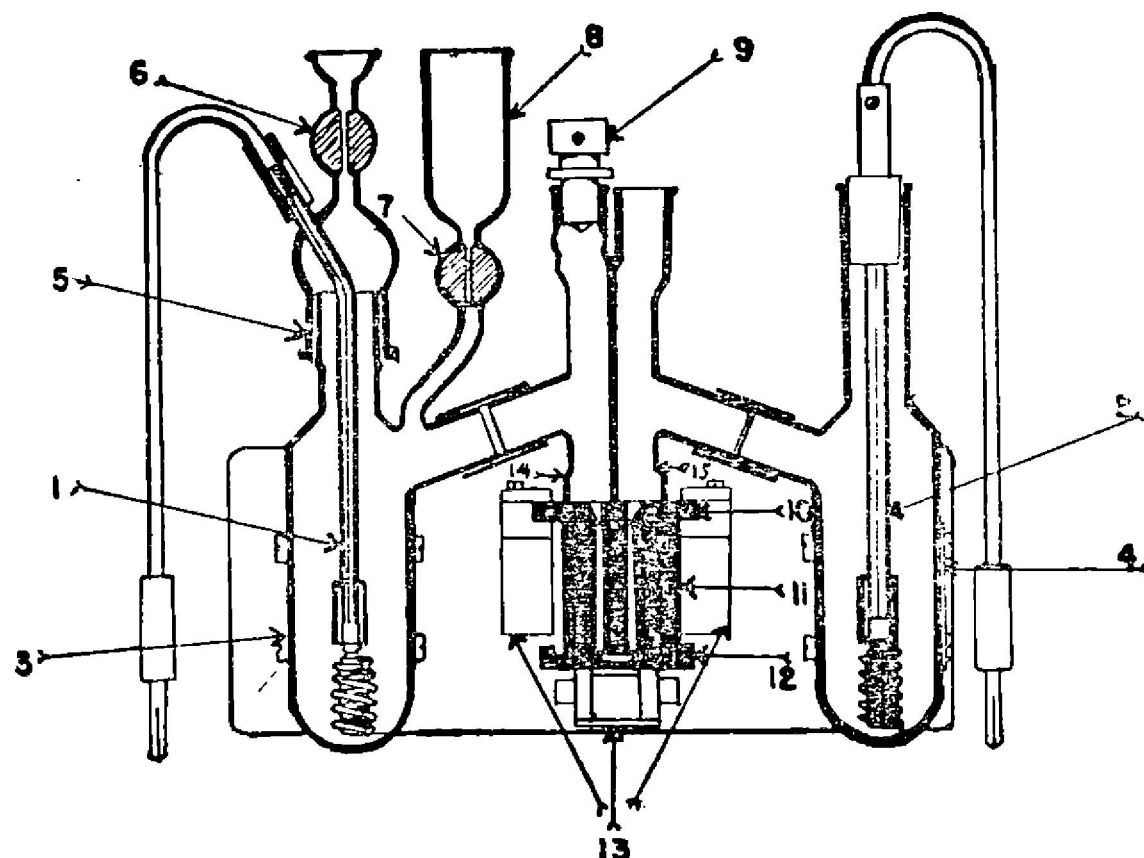


Figura N° 3.

- 1) Electrodo izquierdo.
- 2) Electrodo derecho.
- 3) Vaso del electrodo izquierdo.
- 4) Vaso del electrodo derecho.
- 5) Unión del electrodo izquierdo.
- 6) Llave del electrodo izquierdo.
- 7) Llave del embudo del llenado.
- 8) Embudo de llenado.
- 9) Pistón de compensación.
- 10) Parte inferior de la región superior de la celda.
- 11) Parte media de la celda.
- 12) Parte inferior de la celda.
- 13) Espejos.
- 14) Brazo izquierdo.
- 15) Brazo derecho.

Cuando ya se ha llenado la rama izquierda de la celda con el buffer, se mueve la parte media de la celda hacia la izquierda para cortar las dos columnas en el punto 10 (Fig. N° 3) y se procede a lavar el excedente de la rama derecha tal como se ha indicado para la izquierda. Se aconseja lavar cada rama por lo menos con 3 porciones de buffer. Efectuado este paso se procede a llenar los vasos de los electrodos y luego se colocan bien engrasados el electrodo izquierdo y las llaves 6 y 7 y el pistón 9 (Fig. N° 3). Se llena completamente el aparato hasta nivel de las llaves y se cierran.

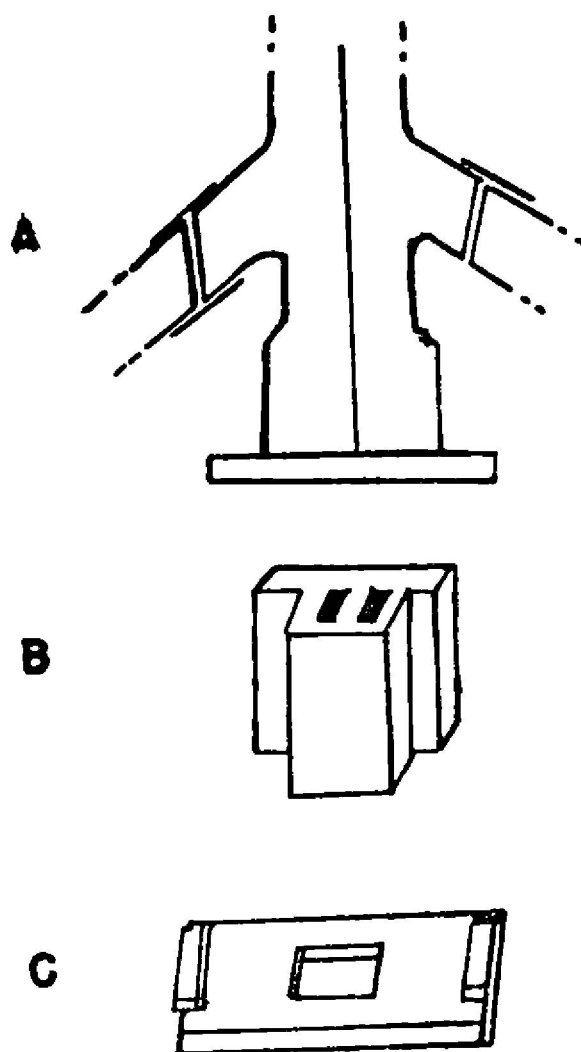


Figura N° 4.

- A) Parte superior de la celda.
B) Parte media de la celda.
C) Parte inferior de la celda.

Compensación y electroforesis.

El aparato se conecta por medio del conmutador 4 (Fig. N° 1) y la luz de sodio se enciende por medio del botón 8 (Fig. N° 1). Se espera unos minutos para que la luz llegue a su máximo y luego se observa por medio del ocular 2 (Fig. N° 1). La celda se coloca a su posición inicial y se principia a mover lentamente el pistón compensador hasta que se observe por el ocular los límites entre el buffer y la solución de proteína. Se continúa la compensación hasta

llevar los linderos completamente a visibilidad (Fig. N° 5, A). Los electrodos se conectan con el aparato y se procede a la electroforesis conectando la corriente directa (Fig. N° 1, 9) haciendo pasar una corriente de 3.5 miliamperios y 60 voltios para que el producto sea de 200 a 210 milivatios, que puede ser regulado por medio del botón 10 (Fig. N° 1) y del miliamperímetro y voltímetro (Fig. N° 1, 6 y 7). La electroforesis se continúa por 30 a 45 minutos observando de vez en cuando, por el ocular del aparato (Fig. 1, 2) el progreso del experimento.

Cuando las bandas de interferencia han recorrido suficiente o sea que se haya corrido el experimento por 30 ó 45 minutos, se toman fotografías, dando la exposición necesaria según el film utilizado, por medio del obturador 3 (Fig. N° 1). En el presente trabajo se usó film Kodak Super XX con una exposición de 15 segundos. Cada vez que se tome una fotografía se necesita desconectar la corriente directa para que en el tiempo de exposición no se muevan las franjas.

Interpretación de diagramas.

La fotografía obtenida de la electroforesis es ampliada unas 5 veces por medio de una máquina de ampliación ordinaria de fotografía, sobre papel milimetrado. Se utiliza para este objeto la fotografía del limbo descendente (Fig. N° 5), poniendo la fracción de la albúmina al lado derecho. La fotografía se proyecta sobre el eje de la abscisa y se marcan los centros de las bandas claras con puntos. Si el número de bandas de la fracción de la albúmina es muy numeroso y es imposible ponerlas en el papel debido a que no se han separado lo suficiente, se prosigue marcando todos los puntos visibles y después se cuentan todas las franjas al microscopio y por diferencia se conoce el número de franjas que no se pudieron marcar.

Los puntos marcados en la abscisa se colocan también en las ordenadas aumentado un mismo incremento entre cada punto. Según el número total de franjas, así será el tamaño del incremento; para 40 franjas se utilizan 3 mm. y para 60 franjas, 2 mm. de incremento. Una vez colocados todos los puntos en el papel se unen cada punto por medio de una regla y se obtiene así un gráfico con curvas separadas para cada fracción (ver Figs. Nos. 6 y 7). Para determinar las fracciones en el gráfico se observan los puntos de inflexión de las curvas y se marcan en estas inflexiones las separaciones entre fracción y fracción. Líneas paralelas a la abscisa se traza pasándolas por los puntos de inflexión y por los puntos extremos de la curva. Luego con una regla que tenga graduación en milímetros y de una longitud de 200 mm. se coloca sobre la gráfica haciendo coincidir el cero de la regla con una de las líneas extremos y la marca 200 mm. en la otra línea extremo (ver Figs. Nos. 6 y 7). Se leen las cantidades equivalentes para cada fracción tomando nota de las lecturas de la regla, que substrayéndolas de las lecturas anteriores se obtienen las cantidades correspondientes para cada fracción; para obtenerlas por ciento se divide cada cantidad por dos. La Casa fabrica una pequeña escala especial con una graduación que da los resultados directamente en porcentaje.

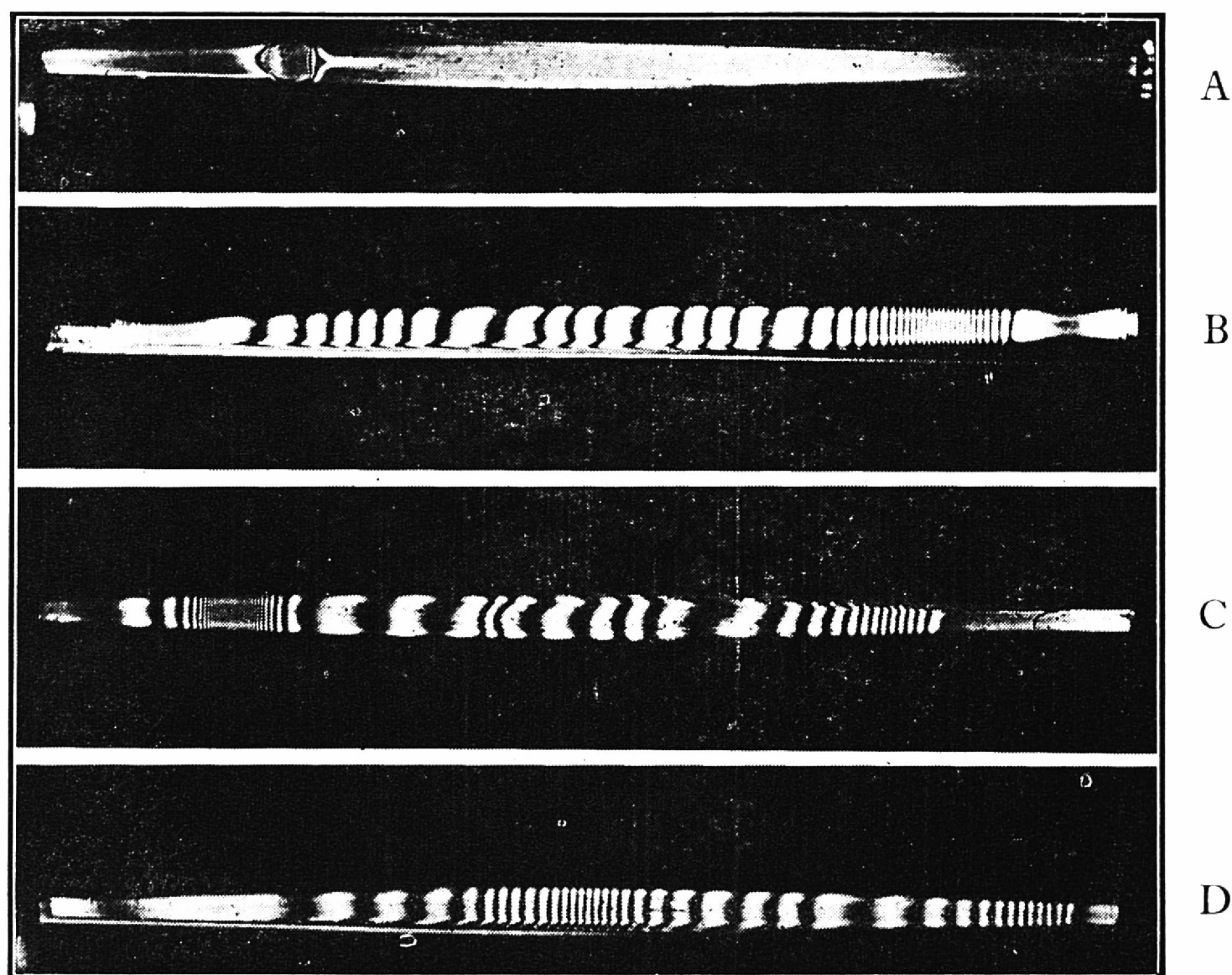


Figura Nº 5.

- A) Fotografía de la iniciación de la electroforesis. Dilución 1:5 con buffer de Michaelis; pH 8.65.
- B) Fotografía de un suero normal. Dilución 1:5 con buffer de Michaelis; pH 8.55. Corriente 3.5 M. A. y 62 Volts. Tiempo de electroforesis 38 minutos.
- C) Fotografía de un suero anormal. Mieloma Múltiple, "Gamma Mieloma". Dilución 1:5; pH 8.7. Corriente 3.5 M. A. y 62 Volts. Tiempo de electroforesis 48 minutos.
- D) Fotografía de un suero anormal. Mieloma Múltiple, "Beta Mieloma". Dilución 1:6; pH 8.51. Corriente 3.2 M. A. y 66 Volts. Tiempo de electroforesis 35 minutos.

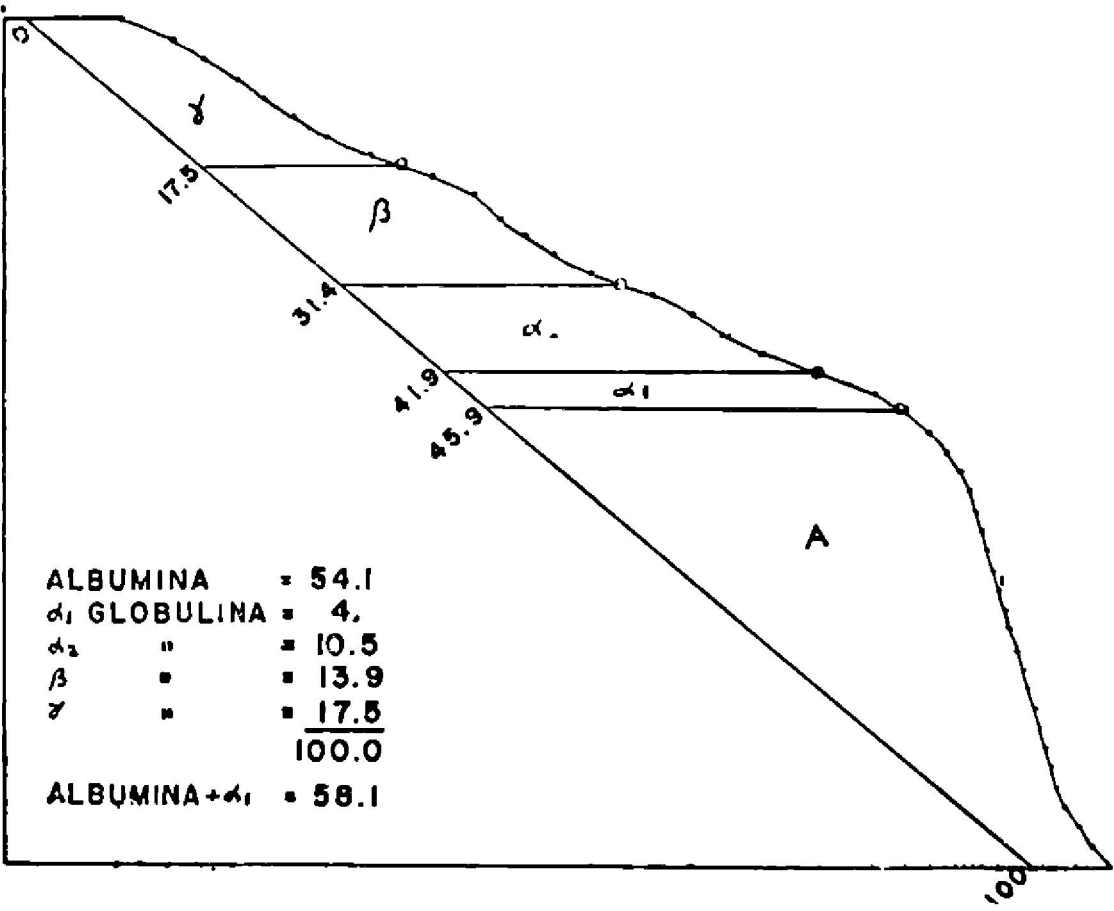


Figura N° 6.

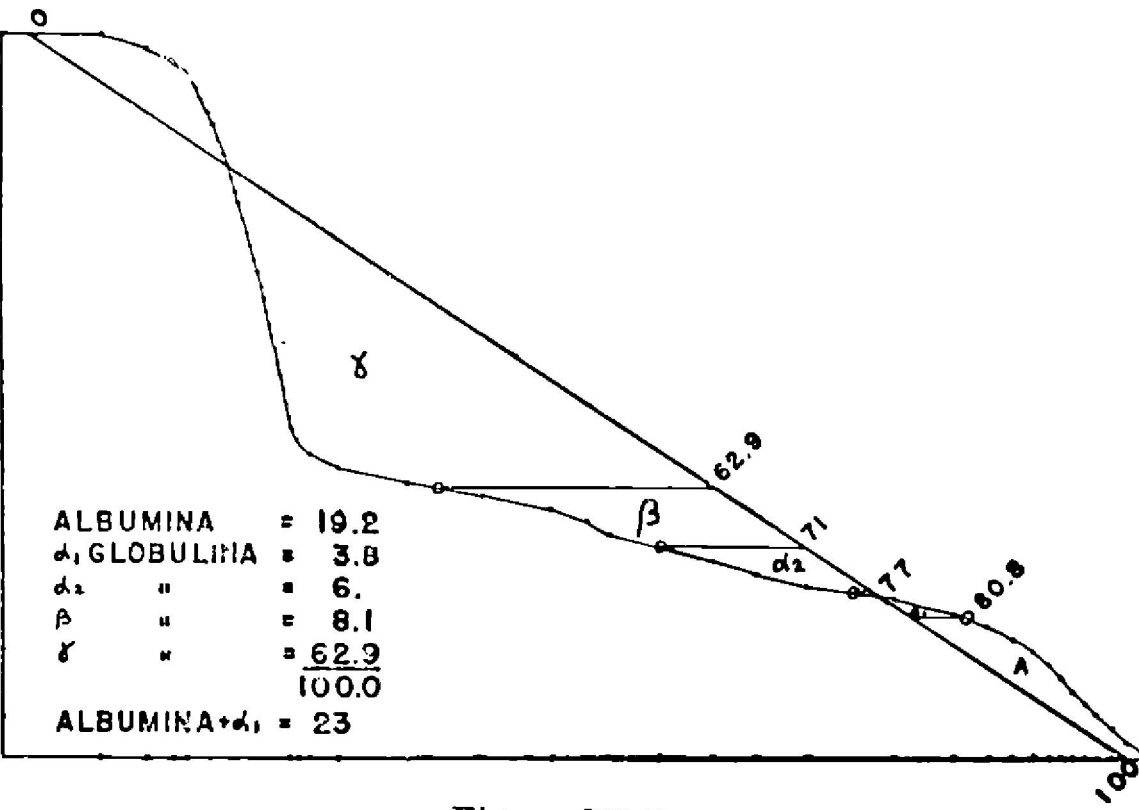


Figura N° 7.

RESULTADOS

La Tabla N° 1 da los resultados obtenidos en el estudio de un grupo de adultos normales de la ciudad de Guatemala, constituido por 23 hombres y 25 mujeres, entre las edades de 18 a 40 años; además se dan los resultados del grupo combinado, que hemos denominado "adultos". En la Tabla N° 2 se da el estudio estadístico del análisis de variación (39) entre los grupos de hombres y mujeres.

Se puede observar que no se encontró ninguna diferencia estadística en las fracciones de albúmina, albúmina y alfa prima globulina, alfa prima globulina, alfa segunda globulina, beta globulina y la relación albúmina-globulina.

La única "F" significativa al nivel del 5%, pero que no es significativa al nivel del 1%, corresponde a la fracción de la gamma globulina. Esta diferencia no parece ser una diferencia real, sino que es debido a que en el grupo de los hombres se obtuvieron 3 casos que presentaron una gamma globulina extremadamente baja. Al recalcular estos resultados excluyendo los casos antes mencionados no se obtuvo diferencia estadística en la fracción gamma-globulina, siendo el valor de F de 2.16. En la Tabla N° 1 aparecen subrayados los valores obtenidos al excluir los casos mencionados anteriormente.

En los diferentes casos clínicos que se estudiaron se reportan casos muy interesantes, por ejemplo los casos 10, 11 y 12 de la Tabla N° 3, que corresponden a casos de Mieloma Múltiple diagnosticados hematológicamente y radiológicamente. El caso 10 nos da una distribución normal de las fracciones de proteínas y se puede considerar como Mieloma "tipo normal". El caso 11 presenta una beta globulina aumentada y se considera como un Mieloma "tipo beta" y por último el caso 12 presenta una gamma globulina anormalmente elevada y se puede considerar como

un Mieloma "tipo gamma". La relación albúmina-globulina en los casos 11 y 12 está completamente invertida y la fracción albúmina disminuída mientras que en el caso 10 es normal. La fotografía C de la Fig. N° 5 muestra el cuadro interferométrico del Mieloma "tipo gamma" (caso 12), mientras que la D da la del caso 11 Mieloma "tipo beta". La Fig. N° 7 muestra el diagrama obtenido del caso de Mieloma "tipo gamma" que es completamente diferente al obtenido en el caso de sueros normales (Fig. N° 6).

En las afecciones hepáticas, casos 1, 3, 7 y 8, se observa una inversión de la relación albúmina-globulina y disminución de la albúmina. Las fracciones de globulina permanecen normales en su distribución con excepción de la globulina gamma que se encuentra en todos los casos muy elevada. Únicamente en el caso de la colecistitis calculosa se observó un aumento en la fracción de beta globulina.

El caso 4, tuberculosis pulmonar-gastritis aguda, presenta una inversión de la relación albúmina-globulina, disminución de la albúmina y un aumento únicamente en la gamma globulina.

El caso 6, cáncer pancreático presenta una inversión de la relación albúmina-globulina, disminución de la albúmina y un aumento de la beta globulina.

El caso 2, hernia inguinal aguda, y el caso 5, úlcera péptica, presentan una ligera inversión de la relación albúmina-globulina con una disminución ligera de la albúmina y un aumento en la gamma globulina.

El caso 9, de sífilis, no presentó ninguna modificación en la distribución de las fracciones de proteínas.

En los casos de embarazo (casos 13, 14 y 15) se observa una disminución de la albúmina con inversión de la relación albúmina-globulina y un aumento consistente en la fracción beta globulina, así como un ligero aumento en la fracción alfa dos globulina.

TABLA N° 1.

PORCENTAJE RELATIVO DE LAS PROTEINAS Y SUS FRACCIONES EN SUEROS NORMALES

		Proteína Total °	N° Observ.	Albúmina	Album.+ Alfa ₁ Glob.	Alfa ₁ Glob.	Alfa ₂ Glob.	Beta Glob.	Gamma Glob.	A/G
Hombres	x	7.70	23	56.12	62.33	6.26	9.91	14.96	12.75	1.29
	s	0.32		3.22	3.68	1.27	2.00	2.33	4.15	0.17
	x		20	<u>55.63</u>	<u>61.59</u>	<u>6.00</u>	<u>9.69</u>	<u>14.82</u>	<u>13.84</u>	<u>1.26</u>
	s			3.22	3.34	1.21	1.99	2.44	3.24	0.18
Mujeres	x	7.60	25	55.29	60.90	5.54	9.50	14.14	15.50	1.26
	s	0.49		4.62	4.72	1.54	1.52	2.65	4.10	0.20
Adultos	x	7.65	48	55.69	61.57	5.88	9.70	14.54	14.18	1.27
	s	0.37		3.92	4.45	1.45	1.73	2.44	4.28	0.22
	x		45	<u>55.44</u>	<u>61.19</u>	<u>5.75</u>	<u>9.58</u>	<u>14.44</u>	<u>14.76</u>	<u>1.26</u>
	s			3.99	4.34	1.37	1.73	2.54	3.77	0.20

x = Promedio. s = Desviación Standard.

° Promedio de proteína sérica total en la ciudad de Guatemala, reportado por Castellanos (11).

TABLA N° 2.

ANALISIS DE VARIACION DE LAS PROTEINAS Y SUS FRACCIONES EN SUEROS NOMALES DE MUJERES Y HOMBRES ADULTOS

	Albúmina	Albúm.+ Alfa ₁ Glob.	Alfa ₁ Glob.	Alfa ₂ Glob.	Beta Glob.	Gamma Glob.	A/G
d. f.	47	47	47	47	47	47	47
F.	0.50	1.26	3.03	0.66	1.32	5.27°	0.25

d. f. == Grados de libertad.

F. == Valor F de Fischer (39).

° == Significativo al 5% F. == 4.05

° == Significativo al 1% F. == 7.21

TABLA N° 3.

PORCENTAJE RELATIVO DE LAS PROTEINAS SERICAS Y SUS FRACCIONES EN CASOS CLINICOS

Caso N°	Prot. Tot. °	Albúm.+ Alfa, Glob.	Albúmina	Alfa, Glob.	Alfa ₂ Glob.	Beta Glob.	Gamma Glob.	A/G	Diagnóstico
1		27.5	18.7	8.8	10.5	9.1	52.9	0.23	Atrofia amarilla del hígado.
2		51.6	43.0	8.6	6.1	13.8	28.5	0.75	Hernia inguinal aguda.
3		39.2	31.2	8.0	10.8	17.0	33.0	0.45	Cirrosis hepática.
4		43.1	34.8	8.3	11.3	15.0	30.6	0.53	T.B.C. pulm., Gastrit. aguda.
5		49.9	44.2	5.7	15.1	13.2	21.8	0.79	Úlcera gástrica.
6		40.1	31.7	8.4	11.7	33.9	14.3	0.46	Cáncer pancreático.
7		41.8	34.2	7.6	7.2	30.0	21.0	0.52	Colecistitis calculosa.
8		29.0	20.8	8.2	9.5	10.5	51.0	0.26	Cirrosis atrófica.
9		62.4	57.1	5.3	7.6	12.7	17.3	1.33	Sífilis.
10	5.70	59.4	53.7	5.7	15.4	14.7	10.5	1.16	Mieloma múltiple.
11	8.32	30.2	24.2	6.0	8.8	55.2	5.8	0.32	Mieloma múltiple.
12	11.12	22.9	19.4	3.5	6.1	8.0	63.0	0.24	Mieloma múltiple.
13	5.55	53.0	47.0	6.0	13.5	18.7	14.8	0.89	Embarazo, 32 semanas.
14	6.71	48.1	41.7	6.4	14.8	24.6	12.5	0.72	Embarazo.
15	5.33	48.2	41.4	6.8	15.0	23.9	12.9	0.71	Embarazo, 32 semanas.

° = Gramos por ciento.

TABLA N° 4.

	Buffer pH	Albúmina	Alfa ₁ Glob.	Alfa ₂ Glob.	Beta Glob.	Gamma Glob.	Nº de Casos
Dole y Braun (13)	Sod. Barb. 8.6	63.6	4.8	7.6	12.7	11.8	15
Armstrong et al (8)	Michaelis 8.6	58.8	5.6	9.2	14.2	12.2	20
Sterling y Rickets (40)	Michaelis	60.3	4.0	9.7	12.8	13.2	10
Seibert et al (37)	Michaelis 8.5	53.3	8.0	10.4	13.8	14.2	43
Hartman y Shumacher (17)	Sod. Barb. 8.6	63.6	6.0	5.8	13.1	11.5	130
Cooper et al (12)	Sod. Barb. 8.6	60.0	3.6	9.1	12.5	14.9	13
Gray y Barron (15)	Sod. Barb. 7.8	<u>64.0</u>		7.0	14.5	14.4	5
Bieler et al (9)	Sod. Barb. 8.6	59.5		<u>13.8</u>	13.4	13.4	7
Reiner et al (32)	Sod. Barb. 8.6	56.8	7.2	8.7	12.8	14.4	60
Schaub y Alder (34)	Michaelis 8.5	54.3	8.8	10.6	11.7	14.6	15
Resultados del presente trabajo	Michaelis 8.5	55.4	5.8	9.6	14.4	14.8	45
Castellanos (11) Adultos de la ciudad de Gua- temala	Método químico	57.9		<u>14.3</u>	12.1	15.7	76

DISCUSION

Varios autores han apuntado las ventajas del uso de la técnica microelectroforética.

Kropp (18) indica que el aparato de microelectroforesis de Antweiler subsana las dificultades, de una muestra grande y del tiempo necesario para completar la electroforesis, encontrados con los aparatos ordinarios de electroforesis. Hartmann y Schumacher (17) también discuten las ventajas del aparato de Antweiler.

Schaub y Alder (34) usaron el aparato de Kern y Co., en la determinación de las proteínas del suero normal y en varios casos clínicos, concluyendo que el método es excelente, que se elimina el uso del termostato y que es de manipulación sencilla requiriendo menos personal, menos tiempo y muestras mucho más pequeñas.

En la interpretación de diagramas se utilizó la fotografía del limbo descendente de acuerdo con las indicaciones de la casa manufacturera, aunque Stern et al (42) al revisar las anomalías y artefactos en la electroforesis, apuntan que el diagrama obtenido del limbo descendente presenta más dificultades por el gran número de anomalías y artefactos, siendo la principal la beta anomalía. Aberty (6) recomienda el uso del limbo ascendente para el cálculo electroforético. En algunos de nuestros diagramas se ha observado la beta anomalía, especialmente cuando se utiliza el buffer de barbitol sódico.

En este trabajo se ha preferido el buffer de Michaelis debido a que con este buffer no se obtienen las anomalías épsilon y delta reportadas con el buffer de Longsworth (42). El buffer de Longsworth no se puede utilizar con el aparato de Kern debido a que no se obtiene una buena separación de las anomalías épsilon y delta y por lo tanto

se alterarían completamente los resultados. Con el buffer de Michaelis no se puede obtener una buena separación entre la albúmina y la fracción alfa prima globulina y aunque en este trabajo se reportan ambas fracciones la separación no es exacta, siendo por eso que también se incluyen los valores de albúmina-alfa prima globulina. Con el buffer de Longsworth se puede obtener una buena separación entre las fracciones albúmina y alfa prima globulina y puede servir para su determinación exacta.

Los niveles proteicos en grupo de población normal de la ciudad de Guatemala reportados por Castellanos (11), (Tabla N° 4), difieren un poco de los resultados reportados en el presente trabajo, diferencia que es explicable ya que el método utilizado por él es el de precipitación por medio de soluciones de sulfato de sodio, que no es específico debido a que en la precipitación se arrastra no sólo la fracción requerida sino que parte de otras fracciones.

En la Tabla N° 4 se dan también los resultados obtenidos por otros autores utilizando métodos electroforéticos y se puede apreciar una buena relación entre los resultados reportados en este trabajo y los reportados por ellos.

Stern y Reiner (41) reportan en cirrosis un aumento de la gamma y beta globulinas y una disminución de la albúmina y alfa globulina. Luetscher (27), (28) encontraron en cirrosis una baja en albúmina y aumento en beta y gamma globulina, siendo estos cambios más acentuados en ascitis. Gray y Barron (15) reportan en afecciones hepáticas una baja en la fracción albúmina un aumento hasta de 100% de la gamma globulina y cambios irregulares de la alfa y beta globulinas. Reiner (33) encontró una disminución en la albúmina, aumento en la gamma globulina y aumento menos frecuente en la beta globulina. Schaub y Alder (34) observaron en casos de afecciones hepáticas un aumento en la gamma globulina.

Los resultados reportados en este trabajo (casos 1, 3, 7 y 8, Tabla N° 3) concuerdan satisfactoriamente con los antes mencionados.

Stern y Reiner (41) observaron en casos de tuberculosis como primer cambio electroforético una elevación de la fracción alfa globulina y luego una baja de la albúmina y elevación de la beta y gamma globulina. La elevación de la gamma globulina es posiblemente debido a un aumento en la resistencia a la enfermedad. Seibert y Nelson (35), (36) encontraron una disminución de la albúmina y elevación de la alfa y gamma globulina. En general el caso 4 de tuberculosis pulmonar presentado en este trabajo cae entre el marco de los cambios electroforéticos de esa enfermedad.

En los casos de embarazo, los resultados concuerdan en parte con los reportados por Castellanos (11) que encontró una disminución de la albúmina, inversión de la relación albúmina-globulina y aumento en la fracción alfa globulina. También Moore et al (29) encontraron una baja en albúmina y una elevación de las fracciones alfa y beta globulinas.

SUMARIO

En el trabajo presentado se ha estudiado la distribución de los diversos componentes proteicos del suero normal humano en 23 hombres y 25 mujeres adultos. Los resultados obtenidos en el grupo de hombres no difieren significativamente del grupo de mujeres.

Los resultados obtenidos para todo el grupo de "adultos" son: Albúmina: 55.44 ± 3.99 por ciento, alfa₁ globulina: 5.75 ± 1.37 por ciento, alfa₂ globulina: 9.58 ± 1.73 por ciento, beta globulina: 14.44 ± 2.54 por ciento, gamma globulina: 14.76 ± 3.77 por ciento en términos de concentración relativa. La relación albúmina-globulina es de 1.26 ± 0.20 .

Se estudian también varios casos clínicos y se discuten las ventajas de la microtécnica electroforética.

CARLOTA ESCOBAR P.

Vº Bº,

Lic. José Méndez de la Vega.

Imprímase,

Lic. Carlos L. Ovalle,
Decano.

BIBLIOGRAFIA

- 1.—*Abramson H. A.*—"Cataphoretic velocity of mammalian red blood cells". *J. Gen. Physiol.* 12:711, 1929.
- 2.—*Abramson H. A.*—"Electrokinetic phenomena". New York Chemical Catalog Co. Inc. Reinhold Publishing Corp. 1934.
- 3.—*Abramson H. A., y Grossman E. B.*—"Electrokinetic Phenomena IV. A Comparison of electrophoretic and streaming potentials". *J. Gen. Physiol.* 14:563, 1931.
- 4.—*Abramson H. A. y Moyer L. S.*—"Electrical charge of mammalian red blood cells". *J. Gen. Physiol.* 19:601, 1936.
- 5.—*Abramson H. A., Moyer L. S., y Gorin M. H.*—"Electrophoresis of proteins". Reinhold Publishing Corporation, New York. 1942.
- 6.—*Alberty R. A.*—"An introduction to electrophoresis". Part I; Methods and calculations. *J. Chem. Education.* 25:426, 1948.
- 7.—*Alberty R. A.*—"An introduction to electrophoresis". Part. II; Analysis and theory. *J. Chem. Education.* 25:619, 1948.
- 8.—*Armstrong S. H., Budka J. E., y Morrison K. C.*—"Quantitative interpretation of electrophoretic schlieren diagrams of normal human plasma proteins". *J. Am. Chem. Soc.* 69:416, 1947.
- 9.—*Bieler M. M., Ecker E. F. y Spies T. D.*—"Serum proteins in hypoproteinemia due to nutritional deficiency". *J. Lab. Clin. Med.* 32:130, 1947.
- 10.—*Braybon J. E. H.*—"A method for the adjustment of the compensator plate of Michelson interferometer". *J. of Sci. Instruments.* 27:331, 1950.

- 11.—*Castellanos E.*—“Estudio de las proteínas del suero y sus fracciones en grupos normales de la ciudad de Guatemala”. Tesis. Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Guatemala, 1950.
- 12.—*Cooper G.R., Graig H. W y Beard J. W.*—“Electrophoretic analysis of syphilitic biologic false positive and normal human serums”. *Am. J. Syphilis, Gonorrhea, Venereal Disease.* 30:555, 1946.
- 13.—*Dole V. P. y Braun E.*—“The electrophoretic patterns of normal plasma”. *J. Clin. Invest.* 23:708, 1944.
- 14.—*Ewerbeck H., y Levens H. E.*—“Elektrophoretische Untersuchungen am Fetalserum”. *Klin. Wochenschrift.* 28:582, 1950.
- 15.—*Gray S. J. y Barron Guzmán E. S.*—“The electrophoretic analysis of serum-proteins in disease of the liver”. *J. Clin. Invest.* 22:191, 1943.
- 16.—*Hardy W. B.*—“On the coagulation of proteid by electricity”. *J. Physiol.* 24:288, 1899. Tomado de la referencia 22, pág. 5.
- 17.—*Hartmann F., y Schumacher G.*—“Untersuchungen über systematische und biologische Schwankung bei elektrophoretischen Untersuchungen am Serumeiweisskörpern”. *Z. Naturforsch.* 5b:361, 1950.
- 18.—*Kropp H.*—“Elektrophoretische Serumeiweissuntersuchungen im Kindersalter”. *Monatsschrift für Kinderheilkunde.* 98:159.
- 19.—*Kryt H. R.*—“Die Methoden zur Bestimmung der Ladungsgrösse kolloider Teilchen”. *Kolloid Ztschr.* 37:358, 1925.
- 20.—*Labhart J. y Staub H.*—“Micro-electrophoresis”. *Helv. Chim. Acta,* XXX:1954, 1947.
- 21.—*Lamm O. Z.*—*Physik Chem.* A143:117, 1929. Tomado de la Referencia N° 5, pág. 57.

- 22.—*Lewis L. A.*—“Electrophoresis in Phisiology”. Charles C. Thomas. Publisher Springfield. Hill. 1950.
- 23.—*Longsworth L. G.*—“Modification of the “schlieren” method for use in electrophoretic analysis”. J. Am. Chem. Soc. 61:529, 1939.
- 24.—*Longsworth L. G.*—“Optical methods in electrophoresis. Principles, apparatus, determination of apparatus constants and application to refractive index measurements”. Ind. Eng. Chem. Anal. Ed. 18:219, 1946.
- 25.—*Longsworth L. G.*—“Interferometry in Electrophoresis”. Anal. Chemi. 23:346, 1951.
- 26.—*Lotmar W.*—“Interferometer arrangements for micro-electrophoresis”. Helv. Chim. Acta. 32:1847, 1949.
- 27.—*Luetscher J. A. Jr.*—“Electrophoretic analysis of proteins of plasma and serous effusions”. J. Clin. Invest. 19:313, 1940.
- 28.—*Lutscher J. A. Jr.*—“Electrophoretic analysis of proteins of plasma and serous effusions”. J. Clin. Invest. 20:99, 1941.
- 29.—*Moore D. H., DuPan R. M., y Buxton C. L.*—“An electrophoretic study of maternal, fetal and infant sera”. Amer. J. Obstet. and Gynecol. 57:312, 1949.
- 30.—*Moyer L. S.*—“A suggested standard method for the investigation of electrophoresis”. J. Bact. 31:531, 1946.
- 31.—*Porret.*—“Curious galvanic experiments”. Ann. Philosophy 74:1816, Ref. 22, pág. 5.
- 32.—*Reiner M., Fenichel R. L., y Stern K. G.*—“Electrophoretic studies on the protein distribution in normal human serum”. Acta Haematologica 3:202, 1950.
- 33.—*Reiner M.*—“Application of electrophoresis to medical problems”. Med. Annals of the District of Columbia. XXI:11, 1952.

- 34.—*Schaub F.*, y *Alder A.*—“Microelectrophoresis as Clinical method”. *Schweizerische Medizinische Wochenschrift.* 81:483, 1951.
- 35.—*Seibert F. B.* y *Nelson J. W.*—“Electrophoretic study of the blood protein response in tuberculosis”. *J. Biol. Chem.* 143:29, 1943.
- 36.—*Seibert F. B.*, y *Nelson J. W.*—“Electrophoresis of serum proteins in tuberculosis an other chronic diseases”. *Am. Rev. Tuberc.* 47:66, 1943.
- 37.—*Seibert F. B.*, *Seibert M. V.*, *Atno A. J.* y *Campbell H. W.*—“Variation in protein and polysaccharide content of serum in the chronic diseases, tuberculosis, sarcoidosis and carcinoma”. *J. Clin. Invest.* 26:90, 1947.
- 38.—*Shaughnessy H. J.* y *Criswell K. I.*— “Studies on salt action. X. The influence of electrolytes upon the visibility and electrophoretic migration of *Bacterium coli*”. *J. Gen. Physiol.* 9:123, 1925.
- 39.—*Snedecor G. W.*—“Métodos de estadística”. Acme Agency. Buenos Aires. Pág. 252, 1948.
- 40.—*Sterling K.*, y *Ricketts W. E.*—“Electrophoretic studies of the serum proteins in biliary cirrhosis”. *J. Clin. Invest.* 28:1469, 1949.
- 41.—*Stern K. G.* y *Reiner M.*—“Electrophoresis in Medicine”. *Yale J. Biol. Med.* 19:67, 1946.
- 42.—*Stern K. G.* y *Reiner M.*—“Boundary anomalies and artifacts in electrophoresis”. *J. Electrochemical Soc.* 97:213, 1950.
- 43.—*Svedberg T.*, y *Jette E. R.*—“Cataphoresis of Proteins”. *J. Am. Chem. Soc.* 45:954, 1923.
- 44.—*Svensson H.*—“Direct photographing of electrophoresis diagrams”. *Kolloid Z.* 87:180, 1939.
- 45.—*Svensson H.*—“Theory of observation method of crossed slites”. *Kolloid Z.* 90: 141, 1940.

- 46.—*Svensson H.*—"An interferometric method for recording refractive index derivative in concentration gradients". *Acta Chem. Scand.* 3:1170, 1949.
- 47.—*Svensson H.*—"Optical arrangement for getting simultaneous records of the refractive index and its derivative for stratified solutions". *Acta Chem. Scand.* 4:399, 1950.
- 48.—*Tiselius A.*—"Study of electrophoresis of proteins by the moving boundary method". *Nova Acta Regiae Soc. Sci. Upsala.* IV, 7 (4), 1930.
- 49.—*Tiselius A.*—"A new apparatus for electrophoretic analysis of colloidal mixtures". *Tr. Faraday Soc.* 33:524, 1937.
- 50.—*Toepler A.*—Poggendorfs. *Ann. Phys. Chem.* 131:33, 1867. 127:556, 1866. 128:126, 1866. 131:180, 1867. Tomado de la Referencia N° 5, pág. 64.
- 51.—*Turba F., y Enenkel A. J.*—"Electrophoresis of proteins in filter paper". *Naturwiss* 37:93, 1950.
- 52.—*Wieland Th.*—"The retention analysis and its usefulness in the quantitative evaluation of paper chromatograms and paper ionopherograms of syntetic amino-acid mixtures". *Angew. Chem.* 60:313, 1948.