

Patrones electroforéticos de proteínas plasmáticas de niños eutróficos en acetato de celulosa gelatinizado

J. L. FERNÁNDEZ YERO Y M. T. GARCIARENA PÉREZ

*Grupo de Inmunología
del Centro Nacional de Investigaciones Científicas, Habana, Cuba.*

Recibido en: Abril de 1973

RESUMEN. El uso tradicional de la electroforesis en papel no responde a las necesidades actuales de la investigación en Inmunología Clínica. La presencia de electroendosmosis y colas en las bandas de corrida disminuye la nitidez y dificulta la determinación de cada fracción en una electroforesis. Futuros trabajos de determinación clínica en niños hacen necesario el conocimiento de los valores normales de las proteínas plasmáticas utilizando el método electroforético. Para eliminar las distorsiones en la corrida se escogió como soporte el acetato de celulosa gelatinizado. Se realizaron ciento veinte electroforesis horizontales, con una distancia entre puentes de once centímetros y coloreándolas con Ponceau S, fueron evaluadas densitométricamente. Se obtuvieron valores de las diferentes fracciones para seis grupos de veinte niños clasificados por edades siguiendo un criterio de desarrollo inmunológico.

ABSTRACT. Traditional use of paper electrophoresis does not solve the current necessities in Clinical Immunology investigation. The presence of electroendosmosis and tails in electrophoretic bands decreases the neatness and makes the determination of each fraction in an electrophoresis difficult. Future works of clinical determination on children will demand knowledge of the normal values of plasma proteins using the electrophoretic method. Gelatinized cellulose acetate was selected to avoid distortion. One hundred and twenty horizontal electrophoreses were made, stained with Ponceau S, and densitometrically quantified. Values of different fractions were obtained from six groups of twenty children classified by age following immunological criteria.

INTRODUCCION

La electroforesis en papel de las proteínas plasmáticas es un método tradicional de diagnóstico e investigación que se ha usado frecuentemente en nuestro medio, pero que pierde vigencia actualmente debido a un prolongado tiempo de corrida, difícil conservación de los resultados y molesto procedimiento.

El uso del acetato de celulosa como soporte para electroforesis, inmunoelectroforesis, inmunodifusión y otros métodos se ha venido generalizando desde hace algunos años debido precisamente al poco tiempo que toma, fácil conservación, sencillez y buenos resultados experimentales como ha sido reportado por Grunbaum y cols.

(1960), Brackenridge (1960 *a, b y c*), Korotzer y col. (1961), Briere y Mull (1964) y otros.

Futuros trabajos de Inmunología Clínica hacen necesario el conocimiento de los valores normales de las proteínas plasmáticas utilizando el método electroforético, y el establecimiento de un pequeño grupo como patrón normal de comprobación.

Para eliminar las distorsiones en la corrida se escogió como soporte el acetato de celulosa y como colorante el Ponceau S por no necesitar corrección para la albúmina como aparece en los trabajos de Korotzer y col. (1961), además de un fácil proceso de coloración.

El estudio de estos valores en un grupo de niños seleccionados en el Regional Maria-nao es el contenido de este trabajo.

MATERIALES Y METODOS

La muestra de plasma se obtuvo por punción con lanceta del pulpejo del pulgar o del talón y se recogió en capilares heparinizados. En cada tira de acetato de celulosa gelatinizado se aplicaron dos muestras con volúmenes entre dos y cinco micro-litros del plasma centrifugado, sin que se observaran alteraciones de los resultados por la doble aplicación en la tira como señalan Grunbaum y Kirk (1960) obteniendo de esta forma una efectiva duplicación del material.

La corrida se realizó en una cámara de electroforesis horizontal durante ciento veinte minutos, una distancia entre puentes de once centímetros y con un voltaje constante de ciento cuarenta voltios.

Para lograr un desplazamiento positivo de las inmunoglobulinas durante la corrida se utilizó un buffer Tris-Veronal, pH 8.8 y fuerza iónica 0.05.

Las tiras se sumergieron durante diez minutos en una solución de 0.5 g de Ponceau S en 100 ml. de ácido tricloroacético al 5%. Se lavaron en ácido acético al 5% hasta obtener una decoloración total del fondo, se deshidrataron en metanol puro durante sesenta segundos y se pasaron por una solución transparentizadora de metanol-ácido acético-glicerol (87:12:1) durante ciento veinte segundos, pegándolas después en un cristal limpio. Las tiras así tratadas se colocaron en un horno infrarrojo a la luz directa y con una temperatura entre 50 y 60 grados C. hasta la transparentización total.

Para su lectura las electroforesis se pegaron en tiras de papel de filtro Whatman 3 mm de tres centímetros de ancho y se evaluaron densitométricamente en un Analytrol B-2 con un filtro de interferencia de 500 milimicras

El grupo de niños analizado se tomó de los policlínicos, hospitales y círculos infantiles del Regional Marianao. El peso y la talla de todos los niños estudiados se encontraba entre el 3 y el 97 percentil utilizando las tablas antropométricas del The Children's Medical Center of Boston.

Los grupos de edades se establecieron con criterios similares a los utilizados por otros investigadores, como Hitzig (1960), Janeway (1966) y Berg (1969) en estudios de desarrollo inmunológico y nutricional.

Se analizaron ciento veinte niños distribuidos en seis grupos de veinte cada uno con los siguientes parámetros de edades:

0 a 45 días	6 meses 1 día a 12 meses
46 días a 3 meses	1 a 3 años
3 meses 1 día a 6 meses	3 a 6 años

RESULTADOS

Se estudiaron seis fracciones mayores en cada electroforesis que son: albúmina, alfa 1 globulina, alfa 2 globulina, beta globulina, fibrinógeno y gamma globulina.

Los valores de la media y la desviación standard para cada fracción aparecen ordenados por grupos de edades en la Tabla I así como las electroforesis con valores más representativos de cada grupo. (Fig. 1-6).

TABLA I

<i>Edad</i>	<i>Alfa 1</i>	<i>Albúmina</i>	<i>Alfa 2</i>	<i>Beta</i>	<i>Fibrin.</i>	<i>Gamma</i>
0-45 d.	46.45 ±7.33	5.04 ±2.60	10.81 ±3.25	12.46 ±3.55	11.02 ±2.54	14.19 ±5.35
46 días a 3 meses	48.07 ±6.81	5.50 ±2.04	14.91 ±3.37	12.20 ±3.24	9.93 ±3.69	9.73 ±4.63
3-6 meses	46.95 ±6.24	5.53 ±2.44	15.95 ±2.43	13.78 ±2.04	8.20 ±4.19	9.59 ±4.11
6-12 meses	46.05 ±10.62	5.07 ±1.82	15.19 ±3.78	13.03 ±2.60	7.42 ±3.61	13.27 ±6.38
1-3 años	41.66 ±7.05	4.24 ±1.72	13.35 ±3.17	13.80 ±2.97	6.98 ±1.58	19.94 ±6.00
3-6 años	43.23 ±6.70	4.18 ±1.81	12.55 ±4.04	12.97 ±3.57	8.80 ±3.95	18.22 ±5.65



FIG. 1. Edad 12 días. Albúmina: 47.40%, Alfa 1: 4.55, Alfa 2: 16.89, Beta: 14.05, Gamma: 8.63, Fibrin.: 8.46, Total: 99.98%.

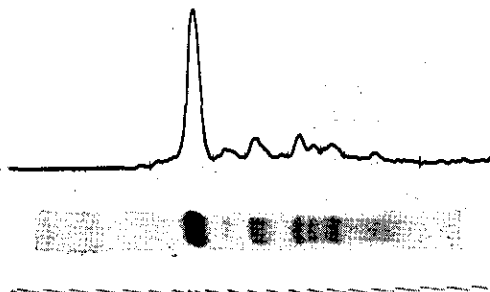


FIG. 2. Edad 2 meses y 15 días. Albúmina: 47.98%, Alfa 1: 9.42, Alfa 2: 13.18, Beta: 12.02, Gamma: 10.06, Fibrinógeno: 7.32, Total: 99.98%.

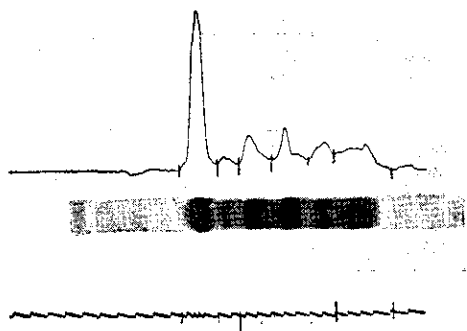


FIG. 3. Edad 5 meses y 5 días. Albúmina: 48.06, Alfa 1: 6.23, Alfa 2: 14.09, Beta: 18.30, Gamma: 8.12, Fibrin.: 5.18, Total: 99.98%.

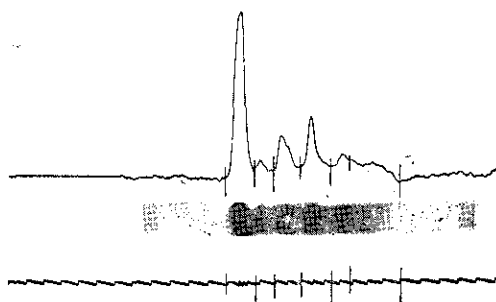


FIG. 4. Edad 7 meses y 15 días. Albúmina: 48.68%, Alfa 1: 4.40, Alfa 2: 13.97, Beta: 17.27, Gamma: 9.74, Fibrin: 5.92, Total: 99.98%.

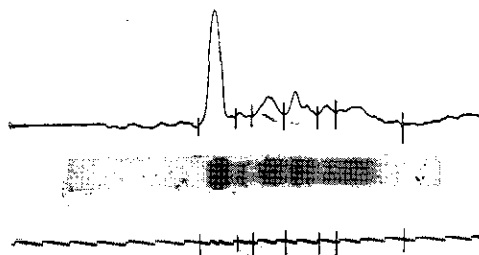


FIG. 5. Edad 2 años y 11 días. Albúmina: 45.00, Alfa 1: 4.50, Alfa 2: 15.75, Beta: 14.06, Gamma: 13.64, Fibrin: 7.03, Total: 99.98%.

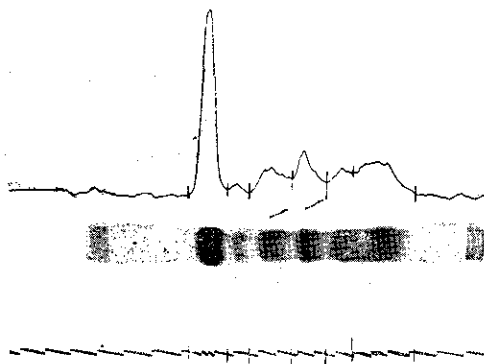


FIG. 6. Edad: 5 años y 8 meses. Albúmina: 43.41%, Alfa 1: 1.45, Alfa 2: 9.47, Beta: 15.54, Gamma: 19.92, Fibrin: 10.19, Total: 99.98%.

Para estudiar el comportamiento de cada fracción en los diferentes grupos de edades se confeccionaron las gráficas del 1 al 6 con los valores de la media y la desviación standard. En las mismas los grupos aparecen ordenados en escala creciente de edades.

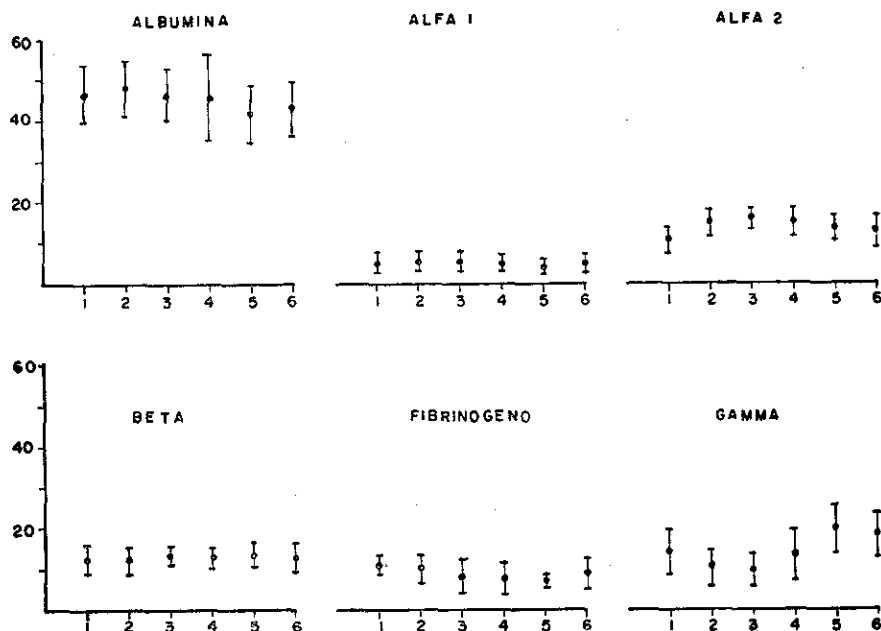


GRÁFICO 1. El valor en por ciento y la desviación standard para cada fracción aparecen ordenadas por edades.

Los resultados así obtenidos se procesaron estadísticamente haciendo todas las comparaciones posibles para ver si las diferencias eran significativas.

El método utilizado fue el análisis de varianza para igual número de observaciones por grupo de edades con superposición de intervalos de la media de cada grupo de edades en cada fracción. Se obtuvieron los siguientes resultados:

1. No se encontraron diferencias significativas (p mayor que 0.05) para albúmina, alfa 1 y beta.
2. Alfa 2: Existen diferencias significativas (p menor que 0.05) entre el grupo 0 a 45 días y los grupos 46 días a 3 meses, 3 a 6 meses y 6 a 12 meses, y entre 3 a 6 meses y 3 a 6 años.

3. Gamma globulina: Existen diferencias significativas entre el grupo de 1 a 3 años y los grupos de 0 a 45 días, 46 días a 3 meses y 6 a 12 meses.

Existen diferencias significativas entre el grupo de 3 a 6 años y los grupos 46 días a 3 meses, 3 a 6 meses y 6 a 12 meses.

Estos resultados concuerdan con los reportados por otros investigadores en cuanto a la aparición de una hipogammaglobulinemia transitoria en el período postnatal.

En el grupo estudiado por nosotros la depresión se encontró entre los 45 días y el año de edad, obteniendo la cifra media más baja en el grupo de 3 a 6 meses.

DISCUSION

Analizando nuestros resultados hemos encontrado desviaciones de la media superiores a las de otros autores, a pesar de haber utilizado un mayor número de individuos.

Hemos tratado de precisar las causas de estas variaciones y su posible efecto sobre la utilidad del método. A continuación discutiremos las que consideramos más importantes.

Caracteres de la muestra:

1. El período de la vida estudiado se caracteriza por cambios en los parámetros morfológicos y fisiológicos del individuo incluyendo los valores plasmáticos de proteínas.
2. Se tomaron para el estudio niños de talla y peso normales que seguían un esquema de vacunación corriente, asistían o no a círculos infantiles y padecieron enfermedades habituales de nuestra población infantil.

Estos factores confieren representatividad a la muestra pero pueden haber sido responsables de la dispersión de los resultados en las fracciones que estudiamos.

La administración de una vacuna, o el reciente padecimiento de un catarro o una amigdalitis pueden cambiar los valores de las inmunoglobulinas de un individuo pero son tan frecuentes que no lo separan de lo que consideramos como nuestra población infantil normal.

Los patrones de conducta y los hábitos alimenticios debidos a la asistencia o no a círculos infantiles o el padecimiento de alergias de poca intensidad no detectadas

pueden introducir variaciones en la relación albúmina-alfa globulinas, pero también son elementos habituales en nuestra población infantil.

Condiciones de trabajo, características del colorante y del soporte. Encontramos que la captación del colorante varía en forma lineal con la cantidad de muestra aplicada hasta un volumen de cinco microlitros. Hallamos también falta de homogeneidad en algunas tiras, así como en la distribución del colorante y una variación no proporcional de las evaluaciones desintométricas al aumentar el volumen de aplicación que no se encuentra por el método de elución y lectura espectrofotométrica y que será objeto de un estudio posterior.

RECONOCIMIENTO

Agradecemos la colaboración prestada para la realización de este trabajo al Instituto de la Infancia, Dpto. de Laboratorio Clínico del Hospital "William Soler", Dirección Nacional de Superación de la Mujer, Dpto. de Bioquímica del Instituto de Endocrinología, Dpto. de Bioquímica Clínica del Centro Nacional de Investigaciones Científicas, y a todos los compañeros de los hospitales, policlínicos y círculos infantiles del Regional Marianao.

REFERENCIAS

- BERG T. The Immunoglobulin development during the first year of life. *Paedriact. Scand.* (Uppsala) 58, 229, 1969.
- BRACKENRIDGE C. J. Optimal staining conditions for the quantitative analysis of human serum protein fractions by cellulose acetate electrophoresis. *Anal. Chem.* 32, 1353, 1960.
- BRACKENRIDGE C. J. Optimal fractionation conditions for quantitative analysis of human protein fractions by cellulose acetate electrophoresis. *Anal. Chem.* 32, 1357, 1960.
- BRACKENRIDGE C. J. Variable dye uptake in the quantitative analysis of abnormal globulins by cellulose acetate electrophoresis. *Anal. Chem.* 32, 1359, 1960.
- BRIERE R. O. Electrophoresis of serum proteins with cellulose acetate. *Amer. J. of Clin. Path.* 42, 547, 1964.
- GRUNEAUM B. W. Microelectrophoresis on cellulose acetate membranes. *Anal. Chem.* 32, 1361, 1960.
- HITZIG W. H. Das Bluteiweissbild beim gesunden Säugling. *Helvet. Paediat. Acta*, 1, 46, 1961.
- JANEWAY C. A. The immunological system of the child. Part I: Development of immunity in the child. *Arch. Dis. Childh.* 41, 358, 1966.
- KOROTZER J. L. Use of cellulose acetate and Ponceau S for electrophoretic serum protein analysis. *Amer. J. of Med. Tech.* 27, 197, 1961.