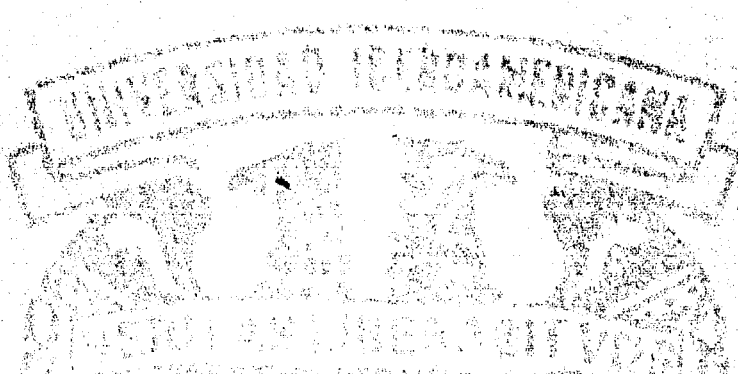


BIBLIOTECA FAC. DE QUIMICA
UNIVERSIDAD IBEROAMERICANA.
INCORPORADA A LA U. N. A. M.
ESCUELA DE CIENCIAS QUIMICAS



ELECTROFORESIS DE LAS PROTEINAS
DEL LIQUIDO CEFALORRAQUIDEO
POR MICROZONA EN DIVERSAS
NEUROPATIAS

1969

HORTENSIA PEREZ GROVAS G.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

UNIVERSIDAD IBEROAMERICANA.
INCORPORADA A LA U.N.A.M.
ESCUELA DE CIENCIAS QUIMICAS

ELECTROFORESIS DE LAS PROTEINAS
DEL LIQUIDO CEFALORRAQUIDEO
POR MICROZONA EN DIVERSAS
NEUROPATIAS

TESIS PROFESIONAL

HORTENSIA PEREZ GROVAS G .

MEXICO, D.F.

1969

A MIS PADRES:

Dr. Pedro Pérez Grovas.

Hortensia C. de Pérez Grovas.

A MI ESPOSO:

Ing. Hipólito López Castro.

RECONOCIMIENTO

Deseo manifestar mi agradecimiento a todos aquellos que en una u otra forma me ayudaron a la elaboración de este trabajo y muy particularmente al Hospital de Neurología y a su Director, el Sr. Dr. Manuel M. Velasco Suárez, por haberme facilitado las muestras de líquido cefalorraquídeo; a Laboratorios Clínicos de México por permitirme la ejecución del trabajo técnico en sus dependencias; a Beckman Instruments -- por acceder a mi solicitud de reproducir algunas fotografías de su Manual de Instrucción, a la Sra. Q. F. B. Araceli Sánchez de Corral por la dirección del trabajo y a los Sres. Isabel A. Escobar, Q. F. B., Elisa Castillo, Q. F. B. y Dr. Alberto Zimbrón, por los consejos y ayuda que amablemente me brindaron.

I. Introducción.

II. Generalidades.

III. Material y Método

IV. Resultados.

V. Discusión.

VI. Resumen.

VII. Bibliografía consultada.

INTRODUCCION

La utilidad de la separación de las fracciones protéicas en los distintos productos biológicos, en relación al diagnóstico de numerosos padecimientos y a otras aplicaciones dentro de las ciencias médicas, resulta evidente en los numerosos trabajos que en los últimos años se han publicado sobre este asunto.

De los líquidos biológicos, indudablemente el más amplia y profundamente estudiado es el suero sanguíneo; la electroforesis de sus proteínas se aplica ya con éxito en el diagnóstico de las disproteinemias, como el mieloma múltiple, la macroglobulinemia de Waldenström y otras.

En cuanto a otros líquidos biológicos, los estudios electroforéticos son más reducidos. De ahí que las aplicaciones clínicas de las determinaciones electroforéticas de las proteínas de esos líquidos se encuentren tan limitadas que podemos decir que aún se hayan en su fase experimental. En el caso particular del líquido cefalorraquídeo, los factores determinantes que han influido seguramente en lo que se refiere al escaso número de estudios realizados, son la dificultad de obtenerlo en condiciones de normalidad, las grandes cantidades de líquido

que se requieren habitualmente para la determinación y la carencia de -- una técnica tipo para llevarla al cabo.

Hemos considerado pues de interés el estudio experimental cuyos resultados expondremos y cuyos fines primordiales son los siguientes:

1. La técnica; principalmente en lo que se refiere a la concentración de proteínas del líquido cefalorraquídeo, con la mira de que los resultados obtenidos en estos estudios sean comparables.

2. La investigación de las modificaciones que diversos trastornos neurológicos pudieran ejercer sobre las fracciones proteicas del líquido, y

3. La corroboración de las cifras que se consideran como normales en cuanto a la concentración de las fracciones proteicas del líquido.

Como se verá en el curso de la exposición que continúa, el único de estos propósitos que creemos haber logrado adecuadamente es el primero.

Por lo que se refiere al segundo punto, es indudable que sólo una casuística numerosa, que no ha estado a nuestro alcance, podrá dar los resultados buscados. En cuanto al tercer propósito, dado que nuestras investigaciones se realizaron en líquidos cefalorraquídeos de pacientes con enfermedades neurológicas, la única base sobre la cual pudi-

mos evaluar la posible normalidad, fue la de que las cifras de proteínas totales se hallaran dentro de los límites normales y resulta evidente la fragilidad de la suposición de que a proteínas totales normales correspondan fracciones proteicas también normales.

De acuerdo con lo anterior creemos que la utilidad de -- este trabajo se reduce a la enunciación de una standarización de la técnica para la separación de las fracciones proteicas en líquidos cefalorraquideos y que los resultados obtenidos en cuanto a cifras normales y en cuanto a su modificación en distintos padecimientos deben tomarse con todas las reservas del caso y sólo comparativamente a otros estudios -- practicados o por practicar.

GENERALIDADES

El fenómeno del desplazamiento de las sustancias contenidas en una solución, como efecto del paso de una corriente eléctrica, es conocido desde hace más de un siglo. Los primeros estudios en relación con este fenómeno fueron practicados por Hittort en 1853, y -- Oliver Lodge en 1866.

Las bases teóricas para estos estudios fueron las observaciones de un físico ruso, Reuss, quien en 1807, descubrió la migración producida por la acción de un campo eléctrico en las partículas de arcilla suspendidas en agua. Estos experimentos, seguidos por los de numerosos investigadores, permitieron la división de los coloides en dos grandes grupos, aniónicos y catiónicos, según se desplazasen a uno u otro polo por la acción del paso de la corriente eléctrica.

El primero en estudiar el desplazamiento de las partículas de albúmina en un campo eléctrico y en observar que existía un pH en el cual la proteína no se desplaza ni al ánodo, ni al cátodo, es decir, que se comporta como una partícula eléctricamente neutra, fue Sir William Hardy en 1899, quien dió el nombre de punto isoelectrico a ese

pH.

Sin embargo, las aplicaciones prácticas se iniciaron con los experimentos de Field y Teagle, quienes en 1907, en un soporte de gelosa cuyos extremos estaban sometidos a un potencial eléctrico, separaron la toxina de la antitoxina diftérica.

El aprovechamiento de lo que hoy llamamos electroforesis para la separación de las distintas fracciones protéicas en una solución se inició con el estudio de Tiselius en 1937, quien utilizó un tubo en U de Nernst, logró el desplazamiento de las proteínas y pudo determinar ópticamente el plano de separación de las fracciones protéicas.

El procedimiento de Tiselius presentaba ciertos inconvenientes para su aplicación rutinaria, sobre todo en problemas de tipo clínico: la técnica era tediosa, difícil de practicar, costosa y requería de grandes cantidades de material biológico para el análisis. Estos inconvenientes fueron subsanándose poco a poco, por la introducción de soportes más firmes que la delicada columna líquida del aparato de Tiselius.

Entre los soportes que fueron empleados entre 1937 y 1950, podemos mencionar a la gelosa, la gelatina, la gasa de algodón, la lana de vidrio, la fibra de amianto y el papel filtro.

La utilización de este último soporte fue en realidad lo que permitió que la electroforesis se desarrollara en forma considerable.

Su empleo se debió inicialmente a König (1937), quien logró en ese soporte separar un pigmento amarillo del veneno de una serpiente. Sólo hasta 1950 pudo comprobarse definitivamente la importancia de la electroforesis sobre papel para la separación de sustancias macromoleculares mezcladas.

De 1950 a la fecha, los trabajos que se han publicado sobre la separación electroforética de las fracciones proteicas de los líquidos biológicos, principalmente del suero sanguíneo, son innumerables.

La introducción del acetato de celulosa como soporte fue preconizada por Kohn en 1957, usando las membranas de los filtros bacteriológicos con ciertas modificaciones. Las membranas de acetato de celulosa son blanquecinas, opacas y tienen una superficie muy lisa; son quebradizas cuando están secas, pero humedecidas soportan tensiones considerables. Cuando se las sumerge en líquidos clarificadores adecuados, pueden adquirir una transparencia absoluta, tanto a la luz visible como a la ultravioleta. Ni el alcohol, ni el éter, ni el benceno, ni los ácidos diluidos afectan a las membranas de acetato de celulosa, las que son resistentes aún al ácido clorhídrico concentrado, que sin embargo las convierte en celulosa. Los álcalis diluidos no las dañan, pero modifican su transparencia. Las membranas de acetato de celulosa pura tienen poros cuyo tamaño varía de 0.5 a 3 micras, y desde su introducción por Kohn han sido empleados con éxito como medio soporte para la electroforesis de las

proteínas.

Las membranas de acetato de celulosa tienen las siguientes limitaciones: no deben emplearse en tanques verticales, ya que los resultados no han sido satisfactorios; no deben usarse con un amortiguador que contenga solventes de la celulosa; la corriente no debe exceder de 0.4 miliamperios por centímetro de membrana, o superficie a menos que se empleen técnicas de enfriamiento; los colorantes tampoco deben tener sustancias solventes de la celulosa.

El fenómeno de la migración de sustancias disueltas, como efecto del paso de una corriente eléctrica, así como sus aplicaciones prácticas, han recibido muy diversas denominaciones: Hardy lo llamó "catoforesis"; Michaelis (1909), le dió el nombre de "electroforesis"; Hashimoto (1952), denominó "papirograffa" específicamente al procedimiento que utilizaba el papel filtro como soporte. Durrum (1951), la denominó "microelectroforesis" y "microionoforesis" y Spiegler en 1951 y MacDonald en 1952, la llamaron "electromigración".

En realidad, sólo se conserva hasta la fecha el nombre de "electroforesis", al que con frecuencia se le agrega el calificativo de "de zona", en contraposición a la electroforesis libre, en la cual no se produce una separación real de las distintas fracciones, sino diversos puntos con gradientes de índice de refracción que nos traducen las diferencias de concentración entre los diversos componentes. En la elec-

troforesis de zona, que se lleva a cabo con una solución amortiguadora -- que embebe el soporte, se obtiene una separación efectiva de las distintas fracciones en las diversas zonas.

La mención de la teoría y los principios de la electroforesis, así como de los conceptos básicos de electricidad y electrónica necesarios para comprender el proceso, salen de nuestro propósito. Hay numerosos tratados en los cuales vienen explicados en forma integral.

MATERIAL Y METODOS

MATERIAL BIOLÓGICO.

Las muestras de LCR fueron obtenidas de pacientes internados en el Hospital Nacional de Neurología de la Secretaría de Salubridad y Asistencia.

En ningún caso se hicieron punciones especiales para este estudio, sino que se aprovecharon los líquidos extraídos en la práctica de procedimientos diagnósticos, principalmente la ventriculografía y la neumoencefalografía.

Las punciones fueron en ocasiones ventriculares y en ocasiones lumbares, y se realizaron siempre en decúbito lateral. En el caso de las punciones lumbares se tomó en cada caso la presión del líquido empleando un raquimanómetro de Ayer. Mencionamos en los cuadros -- que concentran nuestros resultados dichas presiones y en el caso de algunas punciones ventriculares, las obtenidas en los mismos pacientes en -- ocasión de punciones lumbares que les fueron practicadas en fecha distinta, pero cercana a la punción ventricular.

Los volúmenes de L C R extraídos variaron entre 7 y --

25 ml. Los diagnósticos que mencionamos en el curso de este trabajo es tuvieron basados no sólo en la impresión clínica, sino corroborados por - biopsias, necropsias, reacción de desviación de complemento para la cig terculosis y otros procedimientos de gabinete.

PROCEDIMIENTOS.

La secuela que seguimos para el estudio de cada uno de - los L C R puede resumirse de la siguiente manera:

- a) Determinación de las proteínas totales del L C R.
- b) Concentración del contenido proteico del líquido
 - diálisis
 - liofilización
- c) Electroforesis
 - electroforesis propiamente dicha
 - transparentación y secado de la membrana
- d) Lectura de los patrones electroforéticos y cálculo de los porcentos.

DETERMINACION DE PROTEINAS TOTALES:

La determinación de proteínas totales en las muestras de L C R, se hizo en todos los casos por un procedimiento nefelométrico, -- modificación del de Kingsbury, Clark, Williams y Post, para la determinación de las proteínas urinarias, aunque en algunas ocasiones se hicieron simultáneamente determinaciones por el procedimiento de Kjeldahl, para

comprobar los resultados.

La técnica nefelométrica seguida con el L C R fue la siguiente:

- 1. En un tubo de ensaye de 20 x 150 mm. se depositaron con una pipeta 2 ml de L C R.**
- 2. Se agregó una gota de suspensión de goma Gatti.**
- 3. Se añadieron 6 ml de solución acuosa de ácido sulfosalicílico al 3%.**
- 4. Se agitó por inversiones repetidas del tubo previamente tapado.**
- 5. Se dejó reposar durante 5 minutos y se agitó nuevamente por inversión.**
- 6. Se pasó a una celdilla de colorímetro y se leyó en Coleman Jr. a 440 milimicronez de longitud de onda; el 100% de transmitancia se fijó con agua destilada.**
- 7. La conversión de la lectura colorimétrica a concentración de proteínas se hizo en una tabla calibrada a partir de una gráfica que se obtuvo de las lecturas de patrones con concentraciones conocidas de proteínas y se trazó en papel semilogarítmico.**

Previamente a la determinación de proteínas totales, los L C R fueron centrifugados a 3,000 revoluciones por minuto durante 5 minutos y decantados a un tubo limpio con el objeto de descartar elementos figurados, principalmente eritrocitos en los líquidos contaminados con sangre.

CONCENTRACION DEL CONTENIDO PROTEICO DEL LIQUIDO.

El problema más importante en relación al estudio electroforético de las proteínas del L C R, reside en la baja concentración de estas sustancias en el mismo. Este problema no existe en el suero sanguíneo, ya que la concentración proteica en él es muy elevada y puede correrse la curva electroforética directamente con el suero íntegro.

En el L C R en cambio, las concentraciones de proteínas son hasta 200 veces menores que las del suero y es indispensable aumentar dichas concentraciones para hacer posible el estudio.

Muchos son los procedimientos que se han ensayado para aumentar la concentración de proteínas. Mumenthaler y Märki han hecho una revisión muy extensa de los mismos: evaporación al vacío, diálisis, ultrafiltración por varios procedimientos, precipitación con acetona y otros. De acuerdo con el trabajo de los autores mencionados, todos estos procedimientos implican ciertas pérdidas de las proteínas y la posibilidad de una desnaturalización, por lo menos de algunas fracciones, lo que indudablemente ocasiona resultados erróneos. Ellos preconizan la bondad de la filtración al vacío. En nuestro trabajo decidimos inicialmente ensayar la liofilización como procedimiento de concentración. Sin embargo, los patrones electroforéticos obtenidos con L C R concentrados en esa forma eran completamente inútiles, ya que era imposible distinguir en ellos los perfiles de las diferentes fracciones.

Pensamos que lo pudiera deberse al aumento de concentraciones de determinados iones, especialmente sodio y cloro, y de sales como consecuencia de la liofilización, que interferían en la migración de las moléculas protéicas. De acuerdo con esa idea, dializamos previamente a la liofilización el L C R, empleando una membrana de celulosa y -- agua destilada. Después de comprobar la pérdida de sales, procedimos a la liofilización.

Para cerciorarnos de que el proceso de la diálisis y el de la liofilización consiguiente no produjeran modificaciones en el contenido proteico que pudieran falsear los resultados, hicimos un fraccionamiento electroforético en varios sueros sanguíneos; primero íntegros, segundo liofilizados y redisueltos y tercero, dializados, liofilizados y redisueltos. Los resultados que obtuvimos con las tres variantes fueron muy semejantes y las diferencias obtenidas fueron prácticamente despreciables.

De acuerdo con los ensayos preliminares que realizamos, encontramos que la concentración óptima final en el líquido para obtener un electroforograma adecuado, en lo que se refiere a la separación de las fracciones y a la facilidad de lectura en el densitómetro, era la de alrededor de 5 g %. Con concentraciones inferiores a esa, mientras más bajas, las fracciones porcentualmente menores eran más difícil de apreciarse, aunque podrían usarse concentraciones hasta de 2 g %, con resultados todavía útiles. Con concentraciones superiores a 5 g, se obtuvieron

electroforogramas correctos pero no mejores y, por otra parte, esto implicaba la necesidad de una mayor cantidad de líquido.

Así pues, hicimos nuestros cálculos para obtener en el líquido dializado, liofilizado y rediluido, una cantidad de proteínas aproximada a la de 5 g %.

Por otra parte, encontramos también que la cantidad en que debería hacerse la redilución era, por lo menos de 0.05 ml; en cantidades menores la dilución resultaba imperfecta.

Finalmente, como resultado de los experimentos previos que antes mencionamos, nos dimos cuenta de que en el proceso de diálisis y liofilización se perdía aproximadamente un 25% del contenido proteico del líquido biológico sometido a esos procesos.

Basándonos en lo anterior, calculamos la cantidad de líquido por dializar de la manera siguiente:

Para obtener la concentración ideal de 5 g %, era necesario que en los 0.05 ml indispensables de material redisuelto, hubiera 0.0025g de proteínas. Así pues, había que buscar la cantidad de líquido que tuviera 0.0025 g. de proteínas de acuerdo con su concentración inicial y tomando en consideración el 25% de pérdida de material proteico durante el proceso.

La fórmula para determinar el volumen fue la siguiente:

$$V = \frac{2.5 \times 100}{0.75 C}$$

en la cual V representa el volumen y C la cantidad inicial de proteínas de líquido en mg x 100 ml. El factor 2.5 representa la cantidad de proteínas en miligramos que se requieren en los 0.05 ml del material rediseñado y el factor 0.75 se empleó para considerar el 25% de pérdida.

Así pues, por ejemplo: si la concentración inicial de proteínas en el líquido era de 40 mg %, tendríamos que:

$$V = \frac{2.5 \times 100}{0.75 \times 40} = \frac{250}{30} = 8.33 \text{ ml.}$$

En los casos en que la cantidad de líquido disponible no era suficiente utilizamos la mayor cantidad cercana a la ideal y calculamos nuestra concentración final.

DIALISIS.

Una vez determinada la cantidad de líquido necesaria, ésta se depositó en un tubo de celulosa para diálisis de 3 cm de diámetro aproximado (Dialyser tubing cellulose NO - 44 65 - A - 2 de Arthur H. Thomas Company), que se cerró herméticamente con hilo; la bolsa así formada se suspendió en un vaso de precipitados de 500 ml lleno de agua

destilada, que se cambió en varias ocasiones con intervalos de aproximadamente 30 minutos hasta que la adición a ella de unas gotas de solución 1/20 N. de AgNO_3 en HNO_3 dil. no señalara ningún precipitado blanco. Habitualmente esto se logró con 4 ó 5 cambios de agua. En seguida las bolsas se colocaron en estufa a 37°C por el tiempo necesario para que su superficie exterior estuviera completamente seca.

LIOFILIZACION.

El líquido dializado, convenientemente agitado por inversiones de la bolsa se colocó en ampolletas estériles y químicamente limpias de 10 ó 20 ml. de capacidad, en cantidades de 5 - 10 ml. de líquido respectivamente.

El líquido contenido en las ampolletas se congeló en una mezcla de hielo seco - alcohol y se procedió a liofilizarlo en un aparato USIFAOID.

Como ya dijimos en las líneas anteriores, el material -- obtenido por la liofilización, se redisolvió siempre en 0.05 ml del mismo líquido. El error relativo a esta adición por el contenido inicial de proteínas en L C R es despreciable.

Una vez redisueltos los L C R concentrados por medio -- de diálisis y liofilización de la manera indicada anteriormente, dichas --

muestras se colocaron en una membrana de parafilm, poniendo una gota - de cada una de ellas sobre la membrana, colocada en una superficie dura. Es necesario dejar un espacio suficiente entre gota y gota con el objeto de maniobrar con el aplicador sobre cada una de ellas, sin tocar a las adyacentes. Inmediatamente después de colocar las distintas gotas correspondientes de cada muestra sobre el parafilm, deben taparse las diferentes - gotas con una cubierta que suministra la casa Beckman, la cual debe colocarse invertida sobre la gota, presionando moderadamente sobre el parafilm. Las muestras deben conservarse cubiertas todo el tiempo, excepto cuando se toman con el aplicador, ya que las modificaciones en la concentración por la evaporación que pueda producirse, afecta los resultados.

ELECTROFORESIS.

Para el procedimiento electroforético empleamos el aparato de celdilla de microzona de Beckman (Modelo R - 101), que emplea como soporte membranas de acetato de celulosa. La celdilla mencionada permite un control preciso de las variables importantes en la electroforesis, como el gradiente potencial, la corriente del amortiguador, el tamaño de la muestra, así como la uniformidad en la aplicación de la misma, la humedad, el nivel de la solución tampón y la duración de la separación electroforética.

Unicamente con el fin de que el procedimiento de electroforesis que mencionamos a continuación pueda ser comprendido fácilmente, vamos hacer una descripción somera del aparato.

Este consta fundamentalmente de una fuente de poder -- (duostato) y una celdilla. La fuente de poder es capaz de suministrar -- una corriente constante entre 2 y 50 miliamperes o un voltaje constante -- entre 0 y 500 voltios. Desde el punto de vista funcional, los elementos principales de que consta son los siguientes (Fig. 1):

1. Selector de salida. Se usa para elegir el tipo de regulación de poder deseado, ya sea voltaje constante o corriente constante. Se emplea también para seleccionar los límites del voltaje o de la corriente deseados.
2. Selector de poder y control de voltaje. Sirve para encender la fuente de poder y para ajustar la salida a modo de obtener con precisión el voltaje o corriente deseadas dentro de los límites seleccionados -- en el selector de salida.
3. Selector de la escala. Este control indica si la escala mide voltaje o corriente en miliamperios. Puede elegirse entre dos límites, tanto para el voltaje como para el amperaje. En el voltaje se pueden seleccionar de 0 a 500 voltios y de 0 a 150 voltios y en el amperaje -- de 0 a 50 miliamperios y de 0 a 15 miliamperios. Cuando se --

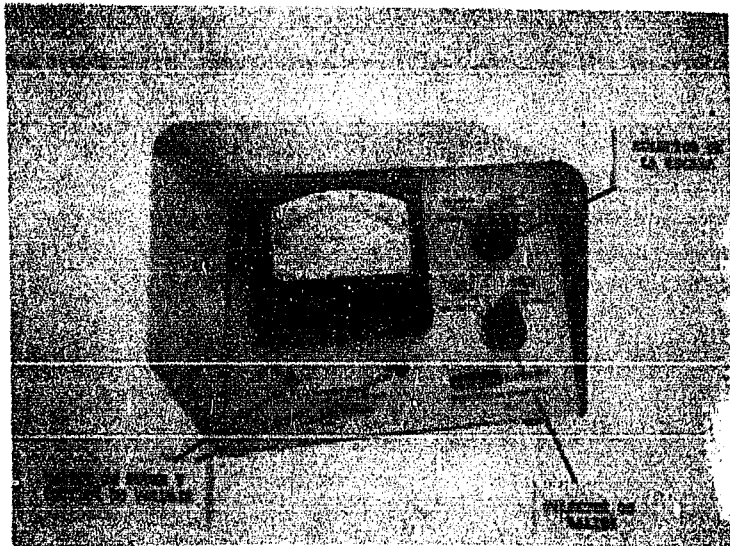


Figura # 1. Fuente de Poder.

Reproducida por cortesía de la Casa Beckman.

Instruments Inc., por conducto de Beckman.

Instruments de México, S. A. de C. V.

usan los límites 0 - 500 voltios ó 0 - 50 miliamperios, la lectura se hace en la escala superior; para 0 - 150 voltios ó 0 - 15 miliamperios en la escala inferior.

4. Controles de corriente. Debajo de la escala hay dos botones, uno rojo y otro negro. Se emplean cuando se conectan dos celdillas a la fuente de poder y se desea medir la corriente solamente en una.
5. Tornillo de la aguja. Para corregir la posición del cero en la escala, si es necesario, hay un tornillo debajo de la misma.

CELDILLA.

La celdilla del aparato de microzona (Fig. 2) consta de tres partes principales: el recipiente, el puente y la cubierta (Fig. 3).

El recipiente está dividido en dos compartimientos para la solución amortiguadora, con capacidad conjunta de 265 - 285 ml que se conectan automáticamente por medio de un sifón al levantar el puente, permitiendo que el nivel de la solución tampón sea el mismo en ambos. Al colocar el puente en el que se montan las membranas de acetato de celulosa, el sifón queda interrumpido y se evita el paso de líquido de un compartimiento a otro durante el proceso.

La corriente eléctrica pasa a través de dos terminales que se extienden en la celdilla hasta un par de electrodos de platino, que

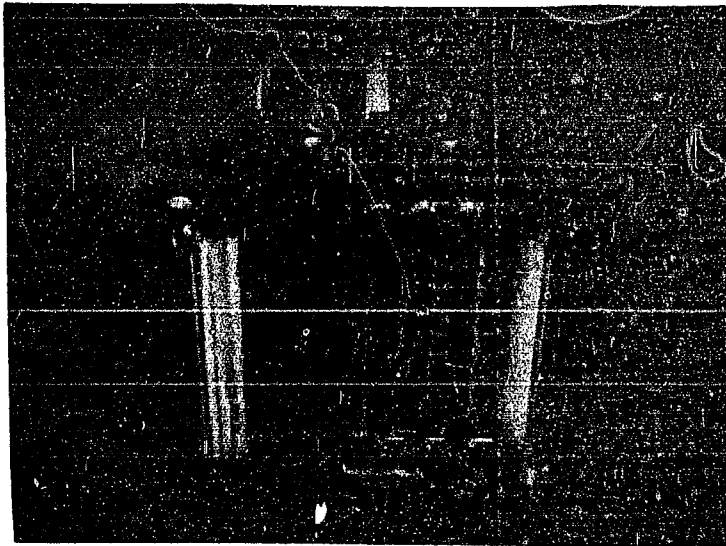


Figura # 2. Celdilla.

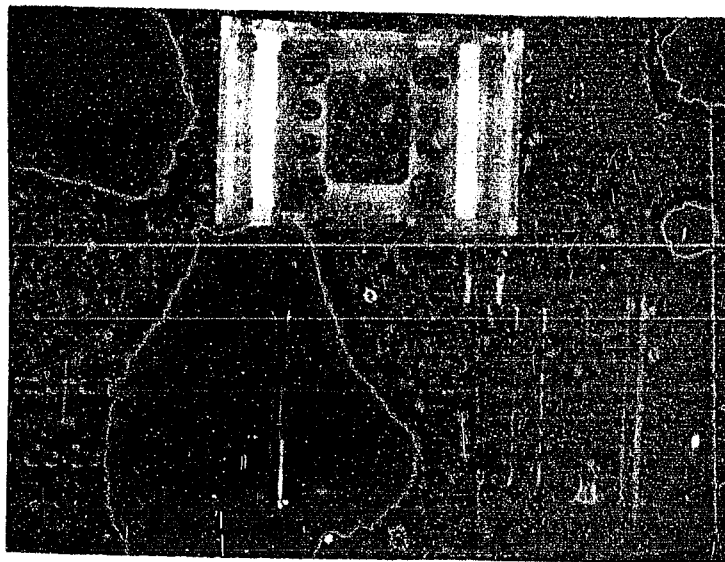


Figura # 3. Recipiente, puente
y cubierta.

llegan al fondo de la misma, uno a cada lado del centro. Cualquiera de los electrodos puede funcionar como ánodo, si se conecta al polo positivo de la fuente de poder. Existe un sistema de filtros dentro de cada compartimiento para evitar que la corriente llegue a la membrana.

El puente sirve para suspender en él las membranas de acetato de celulosa y sobresale inmediatamente por encima de la celdilla y arriba de la solución amortiguadora. Tiene en los extremos dos guías embisagradas que permiten doblar la membrana e introducir sus bordes en el amortiguador sin tocar los filtros a que nos referimos en el párrafo anterior. Con el objeto de que la membrana se sostenga plana y firmemente, existen dos monturas, una de ellas fija y la otra móvil, esta última mantenida a tensión por medio de un resorte que permite ajustar la tensión sobre la membrana.

La cubierta de la celdilla se coloca por encima de la membrana y tiene una serie de hendiduras para la aplicación de las muestras y de muescas que permiten orientar el sitio preciso para el aplicador.

La membrana en la que se efectúa la electroforesis está hecha de un acetato de celulosa esponjoso, con un espesor muy uniforme de 130 micras y espacios esféricos de diámetro constante de menos de dos micras e intercomunicados. Como la membrana es muy porosa, per-

mite libertad a la corriente. El acetato de celulosa, a diferencia del papel filtro, no absorbe las proteínas, con lo cual se obtienen perfiles mucho más precisos.

OBTENCION DEL ELECTROFOROGRAMA.

Para el manejo del aparato es necesario tener en cuenta las siguientes instrucciones de tipo general:

1. Las membranas deben tomarse siempre por sus extremos y nunca directamente con las manos, sino con pinzas o guantes de hule perfectamente secos.
2. Como las membranas son quebradizas cuando están secas, no deben doblarse en ángulo.
3. El marcado de cada una de las muestras en la membrana, debe hacerse después del proceso en etiquetas adheridas a la envoltura protectora; nunca debe escribirse sobre la membrana misma.
4. Las membranas tienen dos filas de agujeros que sirven para montarlas en el aparato. Independientemente de estos, existe un agujero más que sirve para referirse a los números de las muestras. Al insertar la membrana en la celdilla, aquella debe quedar orientada de manera que el agujero de referencia quede alineado con la muesca que corresponde a la muestra número 1.
5. El puente tiene cuatro agujeros de ajuste para modificar la tensión -

del resorte y consecuentemente variar la presión que ejerce sobre la membrana. Si ésta queda ondulada en el centro hay que mover el brazo del resorte más cerca de la montura movable. Si, por el contrario, se produce desgarramiento en los agujeros, el brazo debe moverse --- alejándolo de la moldura.

6. La celdilla debe colocarse de manera que los electrodos queden frente al operador. Para lograr que el ánodo esté en el electrodo de la de re cha deberá colocarse el cable a la conexión roja. Si se desea el - - ánodo a la izquierda, a la conexión negra.

APLICACION DE LAS MUESTRAS.

El aparato viene provisto de un aplicador que facilita la colocación de las muestras en la membrana, asegurando que la forma y tamaño de todas ellas sea uniforme. Su capacidad es de 0.25 microlitros. La cubierta de la celdilla, en el centro, tiene tres rendijas y a lo largo del borde izquierdo de cada una de ellas ocho muescas para la selección de las tiras que están alineadas con ocho números en el borde izquierdo de la cubierta de la celdilla.

El aplicador tiene una aguja de selección que puede insertarse en cualquiera de las ocho muescas numeradas de tal manera que se obtienen ocho posiciones precisas del extremo del aplicador a lo ancho -

de la membrana.

El aplicador está provisto asimismo de un jinete que debe apoyarse firmemente en una de las tres rendijas de aplicación para poder la hacer en forma precisa.

Es indiferente el empleo de cualquiera de las tres rendijas, pero nosotros empleamos siempre la rendija más cercana al extremo derecho de la celdilla, con lo cual obtuvimos una mejor resolución de los componentes proteicos.

La aplicación de las muestras debe hacerse lo más rápidamente que sea posible, para evitar la evaporación que se produce cuando se quita la tapa de la celdilla y también para que la difusión de la muestra en la membrana sea mínima antes de aplicar la corriente.

Para la aplicación de las muestras se siguen los siguientes pasos:

- 1. Poner una gota de la muestra por procesar en un pedazo de papel parafilm colocado sobre una mesa.**
- 2. Sacar el extremo del aplicador apretando el botón blanco y tomar una pequeña cantidad de la muestra colocada en papel parafilm, pasando lentamente dicho extremo sobre la superficie de la gota sin romper la tensión superficial. Esto se logra más fácilmente apoyando el jinete del aplicador sobre la mesa en la que están colocadas las mues-**

tras.

3. Retraer el extremo del aplicador apretando el botón rojo.
4. Colocar el jinete del aplicador sobre la última muesca a la derecha - (para emplear la rendija central). Seleccionar el número de muestras e insertar el gozne de selección de tiras en la muestra adyacente al número. Quitar completamente la mano del aplicador para evitar que su extremo se agite.
5. Oprimir el botón blanco. El extremo debe caer rápidamente pandeando la membrana al ser golpeada. Esperar de 5 a 7 segundos; presionar el botón rojo para retraer el extremo y levantar cuidadosamente el aplicador de la cubierta de la celdilla.
6. Examinar con una lupa para verificar si la muestra ha quedado aplicada correctamente sobre la membrana.

PROCEDIMIENTO.

Preparación de los Reactivos:

1. Solución Amortiguadora. Se empleó una solución de barbitol sódico con una fuerza iónica de 0.075 a pH 8.6. Esta solución se preparó - invariablemente a partir del reactivo amortiguador Beckman B - 2, el cual debe disolverse en un litro de agua destilada fría. Como la - disolución requiere varias horas, es indispensable hacerla el día anterior a aquel en que se vaya a necesitar. Si se emplea agua caliente-

aproximadamente a 80^o centígrados y agitación energética, el tiempo de disolución puede acortarse a 30 - 60 minutos, pero en ese caso, habrá que esperar hasta que la solución se enfríe a la temperatura ambiente para usarla. Para retardar en lo posible el crecimiento de hongos en la solución amortiguadora, ésta debe conservarse en el refrigerador; antes de emplearla será necesario también dejar que alcance la temperatura ambiente.

2. Solución fijadora y colorante. La fórmula de esta solución es la siguiente:

Colorante Ponceau S	0.2% (por peso)
Acido tricloracético	3.0% (por peso)
Acido sulfosalicílico	3.0% (por peso)

La casa Beckman tiene en el comercio frascos de 30 ml de esta solución, cuyo contenido debe diluirse en 250 ml de agua destilada para su empleo en el procedimiento. Como se requieren unos 100 ml para llenar el recipiente, el resto puede conservarse durante varios días siempre que se guarde en frascos cerrados y no se mezcle con la solución ya usada. La solución usada puede emplearse también varias veces guardándola igualmente en frasco cerrado.

3. Enjuague de ácido acético. Este enjuague es una solución de ácido acético en agua destilada al 5% por volumen. Conviene preparar ca-

da vez entre 3 y 5 litros.

4. Solución transparentadora. Esta solución debe prepararse diariamente de la siguiente manera: en un matraz se mezclan 25 ml de ácido acético glacial y 75 ml de alcohol metílico J. T. Baker, calidad reactivo.

El motivo por el cual empleamos el alcohol metílico en lugar del etílico, recomendado por la casa Beckman, fue que en las membranas que nosotros usamos (Gelman), se logró una mejor transparencia con el alcohol metílico.

5. Enjuague de alcohol. Para este enjuague se usó siempre el alcohol metílico J. T. Baker, calidad reactivo; de cualquier modo, es necesario emplear para este enjuague alcohol del mismo tipo del que se use para la preparación de la solución transparentadora.

PREPARACION DEL APARATO PARA LA ELECTROFORESIS.

La distribución de los aparatos y bandejas en la mesa de trabajo, queda ilustrada en la figura 4.

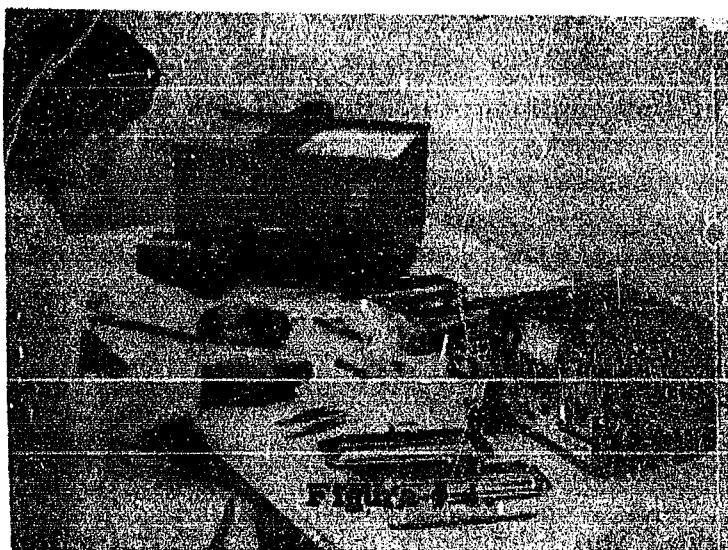
1. Colocar en una bandeja de lavado alrededor de 50 ml de solución tampón.
2. Colocar sobre dicha solución la membrana de acetato de celulosa en que se va a correr la electroforesis, durante 20 minutos. Primeramente la membrana debe flotar sobre la superficie del amortiguador

sin que éste salpique sobre su cara superior, el tampón debe atravesar la membrana únicamente por acción capilar. Toda membrana en que haya gotas de la solución amortiguadora sobre su cara superior debe desecharse.

Para lograr buenos resultados, conviene tomar la membrana con unas pinzas y deslizarla suavemente por un extremo de la bandeja hasta que quede suspendida en la solución tampón en toda su longitud. En el momento en que la membrana se encuentre flotando sobre la solución tampón en su totalidad, se suelta el extremo tomado con las pinzas para dejarla flotando en libertad. Habitualmente -- cuando la membrana está en contacto con el amortiguador, se encurva ligeramente hacia arriba, pero ese encurvamiento desaparece gradualmente a medida que el humedecimiento de la membrana se hace uniforme.

Es importante que no quede ninguna burbuja de aire entre la membrana y la solución amortiguadora. En caso de que éstas se formen, es necesario levantar con las pinzas uno de sus extremos y dejarla caer nuevamente para que flote.

Cuando se forman esas burbujas suele aparecer sobre -- ellas, en la membrana, una pequeña mancha blanca que desaparece gradualmente a medida que la membrana se humedece. Después de que la membrana ha permanecido en contacto por unos segundos y se



**Distribución de los aparatos y
bandejas para el proceso.**

**Reproducida por cortesía de la casa Beckman
Instruments Inc., por conducto de Beckman
Instruments de México, S. A. de C. V.**

ha humedecido uniformemente, hay que sumergirla de inmediato agitando ligeramente la bandeja. No es aconsejable que la membrana permanezca flotando sobre el tampón por un tiempo largo.

Mientras tanto proceder a los siguientes pasos:

3. Colocar la celdilla con las terminales de los electrodos frente al operador. Quitar la cubierta superior y la cubierta de la celdilla. Poner el punete sobre los bordes de un vaso pequeño cerca de la celdilla.
4. Empezar a llenar con la solución amortiguadora la celdilla poniendo el sifón de nivelación, en posición horizontal y vertiendo la solución en uno de los extremos del sifón (Ver Fig. 5). Dejar que la solución de bar caiga en el tubo rápidamente para evitar la formación de burbujas dentro del sifón, y después liberar el sifón lentamente y continuar llenando la celdilla hasta que la solución llegue a un punto entre las dos líneas marcadas " Fluid Level ".

La solución amortiguadora debe verterse en cada una de las dos mitades de la celdilla. Al terminar debe limpiarse cuidadosamente cualquier gota de tampón que haya podido quedar en la división central de la celdilla alrededor del sifón, pues, si existe solución amortiguadora sobre la división central, ésta conducirá corriente de uno a otro de los recipientes y por lo tanto disminuirá la que pasa a través de la membrana.

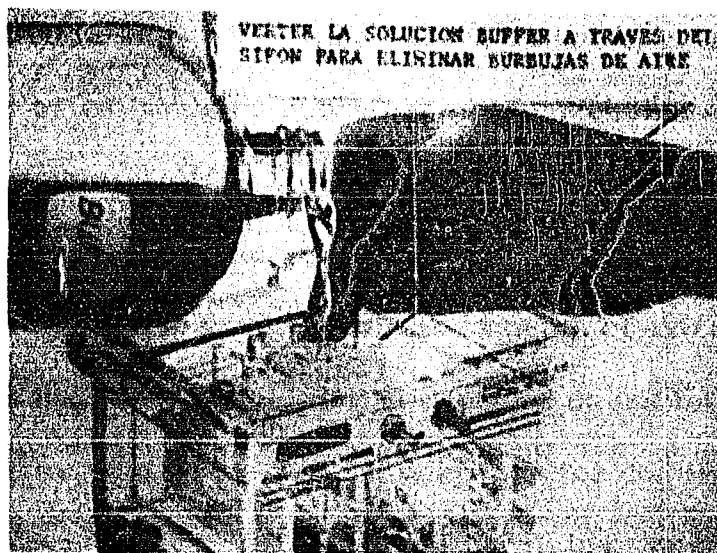


Figura # 5.

**Llenado de la celdilla con la
solución amortiguadora**

**Reproducida por cortesía de la casa Beckman
Instruments Inc., por conducto de Beckman
Instruments de México, S. A. de C. V.**

5. Volver a colocar la cubierta de la celdilla y la cubierta superior.
6. Poner a un lado de la celdilla tres bandejas y verter, en la primera de ellas, alrededor de 100 ml de la solución fijadora y colorante; en la segunda, alrededor de 40 ml de ácido acético al 5% y en la tercera, 40 ml de alcohol metílico.
7. Colocar una bandeja más y en ella una placa de vidrio limpia. Verter dentro de la bandeja unos 100 ml de solución transparentadora.

Nota: Todas estas bandejas deben permanecer cubiertas excepto cuando están en uso.

8. Verificar si el extremo del aplicador está en condiciones de ser usado. Es necesario revisar cuidadosamente el extremo del aplicador con una lupa antes de iniciar el depósito de las muestras sobre la membrana. Hay que asegurarse de que los dos listones del extremo del aplicador estén perfectamente paralelos, ya que en caso contrario los resultados pueden alterarse. Es necesario también asegurarse de que dichos listones estén conformados de modo que ambos entren en contacto con la membrana en toda su longitud; para ello se requiere que se encuentren ligeramente encurvados hacia abajo y en su parte central de modo que ésta sea la primera que pegue a la membrana.
9. Instalación de la membrana en la celdilla. Después de que la membrana se ha humedecido en la solución amortiguadora durante 20 mi-

nutos como se señaló en el paso # 2, se toma cuidadosamente con --
unas pinzas por uno de sus extremos y se coloca entre dos secantes--
sin hacer presión sobre ellos, para que se absorba el exceso de la --
solución de barbital.

Colocar el puente de manera que el elevador quede opueso
al operador. Dejar abiertas las guías de las membranas más allá --
de su posición vertical.

Tomar nuevamente la membrana con unas pinzas y observ
var si se ha curvado en forma notable; en éste caso hay que ponerla
en el puente con la parte cóncava hacia arriba.

Fijar los pequeños agujeros de uno de los extremos de la
membrana sobre la fila de dientes del soporte movible y presionar --
hacia adentro el nivelador de tensión colocado en uno de los extremos
del soporte movable. Simultáneamente, tirar de la membrana hacia
el soporte fijo e introducir la otra fila de agujeros sobre la fila de --
dientes de ese soporte fijo. Asegurarse de que la membrana descanse
perfectamente sobre los dos soportes. Cerrar cuidadosamente las
guías del puente para asegurar la membrana en ese lugar.

10. Colocación del puente en la celdilla. Debe hacerse cuidadosamente:
para evitar que la solución amortiguadora salpique sobre la membran
a al soltar el sifón. Asegurarse de que los extremos de la membran
a estén sobre el tampón sin tocar la superficie de la celdilla. El --

uente puede colocarse en la celdilla en cualquier sentido, pero de manera que el agujero de referencia de la membrana quede alineado con la muesca de selección # 1. Cerrar la celdilla de inmediato con la cubierta y la tapa.

11. Conexión de la celdilla al dústato. La celdilla debe colocarse de manera que las terminales de los electrodos queden frente al operador. Con el dústato apagado, conectar el cable a las terminales de los electrodos de las celdillas.

Si se desea que el ánodo quede en el electrodo de la derecha, el otro extremo del cable debe ir al contacto rojo del dústato. Si, por el contrario, se desea que quede en el de la izquierda, debe ir al contacto negro.

El contacto no usado debe conectarse en la parte de atrás del dústato y es indispensable que las cuatro clavijas de la celdilla queden incluidas en el contacto para asegurarse de que el circuito está cerrado.

El dústato no debe prenderse sino hasta después de la aplicación de las muestras. Debe dejarse que la celdilla y la membrana entren en equilibrio (2 minutos), antes de proceder a aplicar las muestras.

12. Aplicación de las muestras. Debe hacerse tan rápidamente como sea posible para evitar la evaporación de las muestras sobre la membrana, mientras no se ha puesto la cubierta superior, y asimismo para

Impedir que se difundan antes de aplicar la corriente.

El extremo del aplicador debe mantenerse retraído cuando no esté en uso, ya que esa parte del aparato es muy frágil y cualquier distorsión de los listones por un golpe accidental redundará en una aplicación inadecuada de las muestras.

Para aplicar éstas, ha de procederse en la forma siguiente:

- a) Quitar la tapa de la celdilla y el capuchón que cubre la muestra.
- b) Sacar el extremo del aplicador presionando sobre el botón blanco del mismo y tomar una pequeña cantidad de la muestra moviendo lentamente dicho extremo sobre la superficie de la gota, sin romper la tensión superficial. Esto se facilita si se apoya el jinete del aplicador sobre la mesa y se mueve el extremo sin perder ese punto de apoyo.
- c) Retraer el extremo del aplicador presionando el botón rojo y, poniendo el aplicador sobre la celdilla de manera que el jinete descansa en la última muesca a la derecha, seleccionar el número de tira en que se desea aplicar; insertar el gozne de selección en la muesca correspondiente. Retirar la mano del aplicador para evitar cualquier agitación innecesaria.
- d) Oprimir el botón blanco; el extremo del aplicador debe caer rápidamente curvando la membrana al golpearla. Esperar de 5 a 7 segundos y presionar el botón rojo con el objeto de retraer el extremo.

Finalmente, quitar cuidadosamente el aplicador de la cubierta.

- e) **Cerciorarse de que la muestra ha quedado adecuadamente en la membrana, observando con una lupa el extremo del aplicador. Si ha sido así, debe observarse un espacio claro entre los listones, cuando menos en la mayor parte de su longitud. Si existe una película contínua entre los listones, debe repetirse la aplicación, en el mismo sitio, durante unos segundos para lograr una aplicación correcta.**
- f) **Inmediatamente después de la aplicación de cada muestra deberá lavarse el extremo del aplicador con una corriente de agua de un frasco lavador y después secarlo, aplicando suavemente varias capas -- de tejido absorbente sobre el extremo. Para impedir que la nueva -- muestra se diluya con agua que pudiera quedar entre los listones, antes de aplicar esa nueva muestra, habrá que descargar la primera -- toma sobre tejido absorbente y cargar nuevamente la muestra para -- su aplicación.**

Todas las muestras utilizadas para este trabajo se corrieron por duplicado y siempre en presencia de un testigo de suero, -- también por duplicado. Como la membrana tiene capacidad para ocho carreras, en cada membrana se corrieron tres muestras de L C R y la -- de suero. La aplicación se hizo en la forma ya indicada.

ELECTROFORESIS PROPIAMENTE DICHA.

Una vez que se han depositado todas las muestras en la membrana, se procede a la electroforesis propiamente dicha, cuidando los siguientes puntos:

1. Ajustar el control y encender el duóstato.

- a) Colocar el " switch " selector de salida (figura # 1), en voltaje constante, de 0 - 300V.
- b) Colocar el selector de la escala en voltímetro 0 - 500 V.
- c) Dar vuelta al " switch " de poder y control de voltaje (output adjust) hacia la derecha, hasta que se encienda la luz piloto.
- d) Cuando el duóstato esté caliente, dar vuelta a ese ajuste de salida hacia la derecha, hasta que en la escala se lean 250 V. (centro de la escala, arriba). En ese momento empezar a tomar el tiempo de la electroforesis.

2. Verificar la Corriente Inicial.

- a) Cambiar el selector de la escala a 0 - 15 M A.
- b) Si la celdilla está trabajando correctamente, con una membrana adecuada y el amortiguador recomendado, la lectura en el extremo izquierdo en la escala inferior debe ser entre 3.5 y 5.8 M A. Si la lectura no se estabiliza dentro de esos límites debe buscarse la causa.

3. Dejar Correr el Duóstato Durante 20 Minutos.

Cuando ese tiempo está por terminar, leer nuevamente el amparaje. Si la electroforesis ha progresado normalmente la lectura debe dar entre 4.5 y 9.5 M A.

4. Detener la Electroforesis.

- a) Quitar la corriente dando vuelta hacia la izquierda al switch de poder y control de voltaje, hasta que se apague.
- b) Retirar de la celdilla el contacto del duóstato.
- c) Quitar inmediatamente las dos cubiertas de la celdilla y proceder de inmediato al fijado y teñido de la membrana.

FIJADO Y TEÑIDO DE LA MEMBRANA.

1. Retirar la membrana del puente. Retirar la membrana del puente, -- liberando las gufas y tomando uno de sus extremos con unas pinzas, -- al mismo tiempo que se disminuye la tensión.
2. Sumergir la membrana en el líquido fijador y colorante. Esto debe -- hacerse rápidamente iniciando la inmersión por uno de los ejes de la membrana para que la parte central de la misma entre inmediatamen te en contacto con el líquido. Debe evitarse la presencia de burbujas en el área de los patrones electroforéticos.
3. Dejar sumergida la membrana durante 10 minutos.

4. Extraer la membrana del líquido fijador y colorante por medio de unas pinzas y pasarla al enjuague de ácido acético al 5%. Agitar la bandeja durante unos segundos, en seguida cambiar el ácido acético. Repetir esta operación tres o cuatro veces. Los cambios de ácido acético deben hacerse, vertiendo el contenido en la bandeja y poniendo el nuevo sin retirar la membrana del recipiente. Después del tercero o -- cuarto enjuague, el fondo de la membrana debe estar completamente blanco.

TRANSPARENTACION Y SECADO DE LA MEMBRANA.

1. Después del último enjuague con ácido acético, retirar la membrana de la bandeja deslizándola sobre el borde de ésta para eliminar el -- exceso de ácido.
2. Depositar la membrana en la bandeja con el enjuague de alcohol y agitar ésta durante un minuto.
3. Sacar la membrana del enjuague de alcohol deslizándola sobre el borde de la bandeja y pasarla a la que contiene la solución transparentadora, en cuyo fondo debe haberse colocado previamente una placa de vidrio, sobre la cual descansará la membrana. Agitar suavemente -- durante un minuto.
4. Con la membrana todavía sumergida, colocar ésta sobre la placa de --

vidrio, tomando con las pinzas uno de sus extremos y uniendo éste - al extremo de la placa; en seguida tomar con las pinzas ambos extremos juntos, el de la placa y la membrana, y levantarlos inclinados - para permitir que escurra el líquido durante unos segundos.

Finalmente, tomar con los dedos enguantados toda la placa y sacarla junto con la membrana de la solución.

Descansar un extremo de la placa sobre tejido absorbente y sostener ésta inclinada para que escurra la mayor cantidad de - líquido posible.

5. Colocar la placa junto con la membrana en el horno a $100 - 110^{\circ} \text{C}$ -- hasta que esté completamente seca, lo cual se logra en 10 a 15 minutos, al final de los cuales no debe notarse el olor a ácido acético - en la membrana. El horno debe estar convenientemente ventilado para que escapen los vapores de ácido acético.
6. Sacar la placa de vidrio del horno, dejarla que se enfríe y desprender con una navaja una de las esquinas de la membrana; a partir de esa - esquina, separar toda la membrana cuidadosamente y colocar ésta - en un sobre de plástico.

La muestra queda así lista para ser leída de inmediato en el densitómetro o puede guardarse para leerse posteriormente.

LECTURA DE LOS PATRONES ELECTROFORETICOS.

Para la lectura de los patrones electroforéticos empleamos el Analítrol R - B de Beckman que reúne las funciones del densitómetro y las de un integrador automático en una sola operación (Fig. # 6).

El densitómetro mide y grafica la cantidad de luz absorbida por el material distribuido por el patrón electroforético, cuando se coloca la membrana frente a la celdilla fotoeléctrica.

El integrador trabaja simultáneamente con el anterior, - suministrando automáticamente un patrón dentado que representa la superficie que está bajo la curva graficada por el densitómetro, de tal manera que una saliente, es decir una unidad de integración, corresponde a 0.1 cm^2 .

Para el procedimiento de microzona se requiere un accesorio para adaptar el Analítrol a los registros de las membranas usadas; ese accesorio es el modelo R - 102 de Beckman.

Los pasos del procedimiento, en el Analítrol provisto del accesorio mencionado, después de cerciorarse de que el aparato esté correctamente conectado a la corriente y de que la rendija está abierta a su máxima amplitud (4 mm) son los siguientes:

1. Encender los interruptores de corriente y de foco en el aparato. (Ver Fig. # 7).

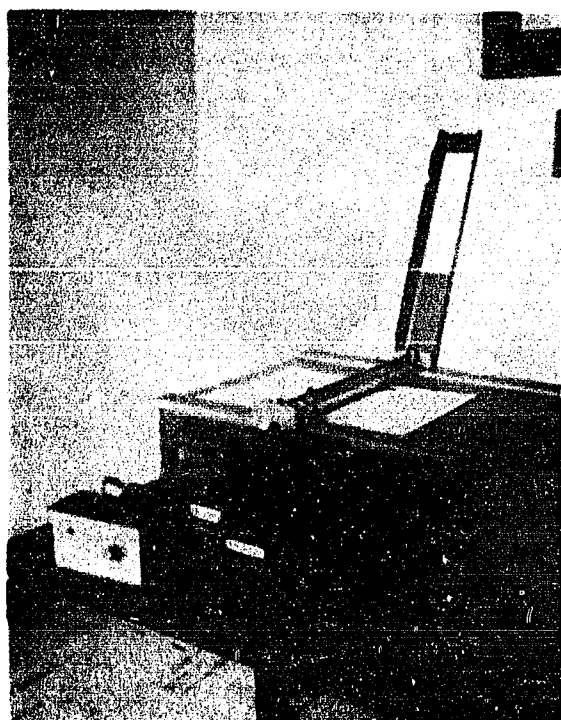


Figura # 6.

Analitrol.

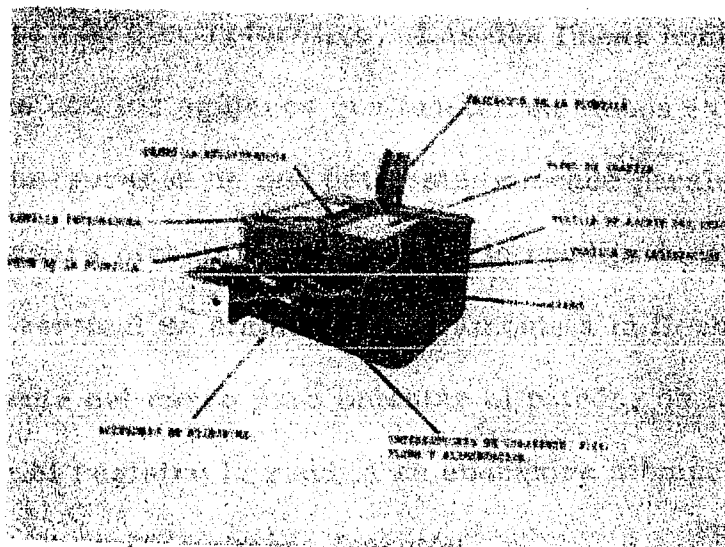


Figura # 7.

**Distribuciones de los controles
en el Analitrol.**

2. Quitar el protector de la plumilla y llenar ésta con dos o tres gotas - de tinta. Cerciorarse de que la tinta fluya adecuadamente; en caso- contrario, limpiar la plumilla y volverla a llenar.
3. Sacar el botón de la plumilla e insertar el papel de gráfica en el mar- gen frontal del aparato. La plumilla debe permanecer levantada has ta que se haya realizado la calibración.
4. Insertar la membrana en el carro. La parte de atrás de éste, la que tiene ganchos, tiene grabadas tres líneas para orientar correctamente el patrón electroforético. Las dos líneas horizontales están ali- neadas con los agujeros que existen en ambos extremos del patrón, - para asegurarse de que éste está colocado paralelamente al carro y que pasará directamente frente a la rendija durante el registro. La línea vertical se emplea conjuntamente a la flecha que está grabada - en frente del carro para orientar al patrón, de tal manera que al empezar el registro la rendija se encuentra siempre a unos 6 mm a la izquierda de la primera fracción.
5. Colocar la membrana de manera que la primera fracción que se quie ra registrar quede a la izquierda. Aunque es indiferente empezar - por cualquiera de los extremos del patrón, en nuestro trabajo rutina riamente empezamos el registro con la fracción de albúmina o la de prealbúmina cuando ésta existía.

6. Sosteniendo el carro con los ganchos frente a uno, de modo que los -- más grandes queden hacia arriba, deslizar la membrana completa-- mente bajo esos ganchos grandes y después bajo los pequeños hasta que los agujeros en ambos extremos de la primera tira del patrón -- queden alineados con las dos líneas horizontales grabadas de que ha-- blábamos antes; la línea vertical grabada debe seccionar en dos la -- primera fracción a la izquierda del patrón.
7. Insertar el carro en el accesorio de registro. Para ello es necesario voltear el carro de manera que la flecha que tiene grabada señale ha-- cia arriba y en seguida colocarlo en la guía inferior y deslizarlo en -- el accesorio, desde el lado derecho hasta que la línea inicial empie-- ce a ser visible a la derecha del marco. Con estas precauciones la membrana queda de modo que la rendija caiga sobre una porción cla-- ra de la membrana más o menos 6 mm a la izquierda del patrón.
8. Calibración del Analitrol.
 - a) Encender el interruptor de la pluma.
 - b) Dar vuelta a la perilla de calibración en sentido contrario a las mane-- cillas del reloj, hasta el tope.
 - c) Poner la plumilla de registro en la línea del cero del papel de gráfica por medio de la perilla de ajuste del cero.
 - d) Dar vuelta a la perilla de calibración hasta el tope, en el sentido de -- las manecillas del reloj.

- e) Ajustar con la perilla del punto de calibración de modo que la plumilla se mantenga por encima de ese punto de calibración que, en el caso de emplear el accesorio de microzona, corresponde al número grabado en el filtro de densidad neutral calibrada, el cual puede verse en la parte interior del protector de la plumilla.
- f) Los ajustes del cero y del punto de calibración se afectan uno al otro, por lo cual es necesario repetir los pasos b) a e), haciendo las correcciones indispensables, hasta que las lecturas sean constantes.
- g) Una vez que se ha corregido la calibración, empujar el botón liberador de la plumilla para que ésta baje al punto de calibración; en seguida, dar vuelta a la perilla de calibración en sentido contrario al de las manecillas del reloj para que la pluma vuelva al cero.
9. Encender el interruptor de alimentación y el interruptor de pluma del aparato. Asegurarse de que las plumillas funcionen adecuadamente. Terminar con el registro de la primera muestra.
10. Colocar la envoltura de la membrana para hacer los registros de las muestras subsiguientes hasta la número 4. Para las siguientes, voltear el sobre de la membrana y volverlo a colocar en el carro.
11. Calcular los porcentajes de los componentes proteicos del patrón, -- procediendo de la manera siguiente:
- a) Trazar en la gráfica obtenida en el Analítrol una línea vertical que par

ta del punto más bajo de cada uno de los accidentes de la gráfica y - que llegue, por abajo, más allá del trazo del integrador, como está indicado en la figura # 8.

- b) Contar el número de salientes marcadas por el integrador que correspondan a cada uno de los accidentes, es decir, los comprendidos entre cada dos líneas verticales trazadas como se señaló en el punto - a). Hay que recordar que estas salientes están organizadas en grupos de diez y que cada una equivale a 0.1 cm^2 del accidente correspondiente.
- c) Sumar el número total de salientes obtenidas en la curva en cuestión y sacar el valor porcentual de cada uno de los accidentes en relación a ese valor total.

En la gráfica que ponemos como ejemplo en la figura 8, - el accidente que corresponde a la pre-albúmina mide 0.3 cm^2 ; el correspondiente a las albúminas, 7.1 cm^2 ; y los que corresponden a las alfa¹, alfa², beta y gamaglobulina, 1.1, 1.2, 1.6 y 2.5 cm^2 , respectivamente. Por lo tanto, en conjunto suman 13.8 cm^2 . Las equivalencias porcentuales son:

pre albúmina	-	2.17%
albúmina	-	51.45%
alfa ¹ globulina	-	7.97%
alfa ² globulina	-	8.70%

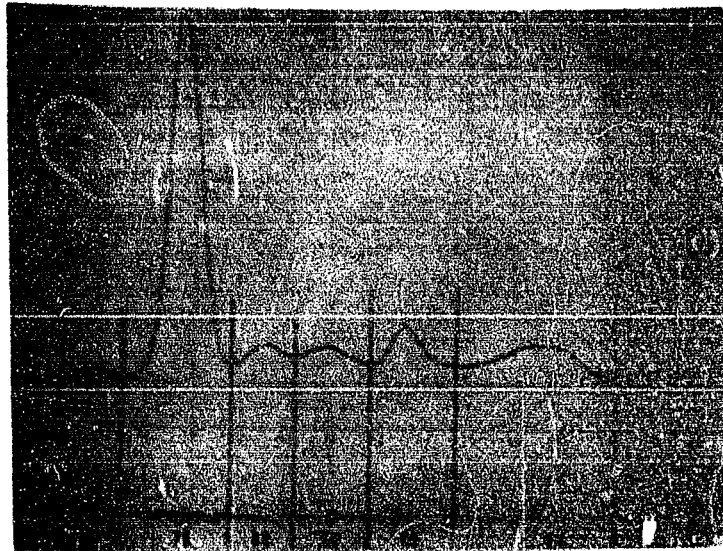


Figura # 8

Trazado de las verticales en la gráfica para
la obtención de la superficie de las -
fracciones.

beta globulina	-	11.60%
gama globulina	-	18.11%

RESULTADOS.

En los cuadros I al VII han quedado condensados nuestros hallazgos en relación a las concentraciones de las diversas fracciones electroforéticas de las proteínas de los líquidos cefalorraquídeos.

Hemos tratado de agrupar en cada cuadro los líquidos correspondientes a pacientes con diagnósticos semejantes. Así, en el cuadro I, el diagnóstico fue en todos los casos de hidrocefalia; en el cuadro II, de cisticercosis cerebral; el cuadro III corresponde a enfermos con tumores cerebrales de índole diversa; en el IV, se agrupan a los pacientes con síndrome epiléptico; en el V a los que han tenido accidentes vasculares cerebrales o traumatismo craneo-encefálico. En el último cuadro, el VI, han quedado todos los enfermos con diagnósticos distintos a los anteriormente mencionados.

Por lo que respecta a las columnas de cada uno de esos cuadros, la primera corresponde a nuestro número de identificación; la segunda al diagnóstico; la tercera, al sitio en que se practicó la punción; la cuarta a la presión inicial, cuando se obtuvo el dato; la quinta, a la concentración de proteínas totales expresadas en mg por 100 ml y las siguientes al porcentaje de las fracciones proteicas en este orden: preal-

búmina, albúmina, alfa 1, alfa 2, beta y gamablobulinas.

Finalmente, el cuadro número VII, hemos dividido nuestras determinaciones en relación a la concentración de las proteínas totales en los líquidos cefalorraquídeos. De los 85 que estudiamos, 50 tenían concentraciones de proteínas dentro de los límites normales, en 13, éstas eran elevadas y en 22, bajas. Independientemente de los diagnósticos clínicos en cada caso señalamos en ese cuadro, el promedio porcentual de cada una de las fracciones proteicas, las cifras máximas y mínimas que encontramos y la desviación tipo a pesar de que las grandes diferencias de líquido a líquido y el pequeño número de casos estudiados, - restan validez a este último dato.

CUADRO No. I

No.	Diagnóstico	Punción	Presión Inicial	Proteínas Totales	Pre Alb.	Alb.	Alfa 1 Globulinas	Alfa 2 Globulinas	Beta Globulinas	Gama Globulinas
42	Hidrocefalia comunicante	ventricular	-	33	5.0	44.4	6.4	9.7	15.8	18.7
43	Hidrocefalia obstructiva	lumbar	-	25.9	5.6	46.3	9.9	9.9	21.2	7.1
45	Hidrocefalia comunicante.	lumbar	-	95	3.3	38.7	8.7	13.4	15.3	20.6
52	Hidrocefalia obstructiva	lumbar	-	51.6	2.6	33.6	3.5	7.3	10.3	42.5
59	Hidrocefalia obstructiva	ventricular	-	39	4.2	44.2	4.2	-	8.4	39
79	Hidrocefalia comunicante	lumbar	140	28	3.8	48.2	2.8	6.7	20.3	18.3
87	Hidrocefalia comunicante.	ventricular	170	316	2.3	73	6.3	6.1	12.3	-
62	Hidrocefalia comunicante	ventricular	-	6.02	63.8	26.5	-	-	19.7	-
99	Hidrocefalia y espina bífida	ventricular	-	59	3.3	55	2.8	6.7	20	12.2
102	Hidrocefalia obs. Trombosis, vena Cava, sup.	ventricular	-	360	-	68	5	7.8	10.7	8.1
100	Hidrocefalia									

100

CUADRO No. II

No.	Diagnóstico	Punción	Presión Inicial	Proteínas Totales	Pre Alb.	Alb.	Alfa 1 Globulina.	Alfa 2 Globulina.	Beta Globulina	Gama Globulinas
41	Cisticercosis	lumbar	180	31	5.0	49.9	6.6	-	17.2	30.3
30	Cisticercosis	lumbar	100	14	9	50	17	-	14	10
38	Cisticercosis	ventricular	250	22.3	17	43.4	7.7	3.3	17.4	21.2
39	Cisticercosis	ventricular	240	6.4	18.2	52.2	5.5	-	16.6	7.4
40	Cisticercosis	lumbar	115	40	2.1	58.6	3.1	6	11.1	19.1
60	Cisticercosis	ventricular	40	20.7	8.5	50.1	4.1	-	14.2	23.1
73	Cisticercosis cuarto ventrículo	lumbar	128	13	10.5	58.8	5.9	5.6	6.9	11.2
83	Cisticercosis	ventricular	-	33	3.2	38.6	5.8	13.2	21.2	17.9
64	Cisticercosis Epilepsia postraumática.	lumbar	130	58.48	3.9	49.1	4.4	7.8	10.7	24.1
92	Cisticercosis	lumbar	130	54	-	72	-	-	4	24
93	Cisticercosis ventrículo cisternal	lumbar	-	12.5	16	41	-	-	7	36
68	Cisticercosis con cráneo hipertensivo	ventricular	-	6.0	25.1	40.4	10.7	-	23.8	-
100	Cisticercosis	ventricular	240	4.5	75	25	-	-	-	-

CUADRO No. III

No.	Diagnóstico	Punción	Presión inicial	Proteínas Totales	Pre Alb	Alb.	Alfa 1 Globulina	Alfa 2 Globulina.	Beta Globulina	Gema Globulina
16	Glioma	lumbar	60	39	7.8	45.2	17.3	-	14.4	15.3
20	Astrocitoma grado I	lumbar	-	90	1.7	58.3	10.0	-	20.9	9.1
25	Gliostoma múltiple	lumbar	-	85	2.9	32.7	10.2	-	10.2	44.0
44	Astrocitoma Frontal. grado VI-III	lumbar	-	73	2.4	62.5	4.3	5.4	13.9	11.5
53	Astrocitoma	ventricular	-	26.16	5.6	59.1	4.8	6.9	11.8	11.8
65	Astrocitoma	lumbar	-	17.5	8.4	31.7	16.6	-	16.6	26.7
57	Adenoma cranoéfabo de hipófisis.	ventricular	230	33	9.5	52.3	14.6	-	16.1	7.5
84	Glioma del Puente.	lumbar.	180	10	3.7	66.7	7.8	9.9	9.9	2.0
63	Médulo blastoma	ventricular	270	6.02	-	100	-	-	-	-
97	Médulo blastoma a nivel del vermis - cerebeloso	ventricular	-	28	5	56.6	5	4.4	27	3

CUADRO No. IV.

No.	Diagnóstico	Punción	Presión Inicial	Proteínas Totales	Pre Alb.	Alb.	Alfa 1 Globulina	Alfa 2 Globulina	Beta Globulina	Gamma Globulina
21	Epilepsia Postraumática	lumbar	140	20.77	6.2	54.5	16.1	-	15	8.2
28	Epilepsia mixta.	lumbar	160	18.7	8.9	54.5	12.9	-	11.9	11.9
31	Epilepsia Anoxia neonatorum.	lumbar	80	14.0	12.2	56.3	12.2	-	19.3	-
32	Epilepsia Postraumática.	lumbar	90	15.20	16.3	60	12.7	-	11	-
33	Epilepsia Postraumática con quiste Parencefálico	lumbar	110	30	4.6	56.2	19.6	-	15	4.6
35	Epilepsia Focal	lumbar	130	12.9	16.0	55.2	17.0	-	10.2	1.6
47	Epilepsia mixta	lumbar	-	26.9	7.2	62.3	9.2	-	15	6.3
54	Epilepsia focal por malformación vascular	lumbar	155	17.54	7	67	5	3	9	9
58	Status Epiléptico.	lumbar	125	6.45	4.2	44.2	4.2	-	8.4	39
75	Epilepsia temporal	lumbar	-	23	1.3	71.6	7.4	7.4	8.6	3.7
77	Epilepsia generalizada tipo gran mal	lumbar	110	33	2.4	50.6	4.7	7.1	20	15.2
71	Epilepsia focal	lumbar	150	21	5.7	58.7	7.8	6.4	12.2	9.2
89	Epilepsia	lumbar	-	15	4.5	60	10.2	5.9	12.7	6.7

CUADRO No. V

No.	Diagnóstico	Punción	Presión Inicial	Proteínas Totales	Pre Alb.	Albúminas	Alfa 1 Globulinas.	Alfa 2 Globulinas	Beta Globulinas	Gama Globulinas.
12	Hematomas subdural.	lumbar	80	15.2	5.8	94.2	-	-	-	-
19	Trombosis de la arteria cerebral media izquierda.	lumbar	70	21.5	8.1	43.2	-	-	18.9	29.8
48	Hematomas temporal.	lumbar	-	30	3.8	50.4	4.4	8.2	18.8	14.4
105	Accidente vasculo cerebral.	lumbar	-	0.99	-	91	-	-	3.0	6.0
29	Traumatismo cráneo encefálico.	lumbar	80	11.7	9.4	52	14.6	-	12	12
74	Traumatismo cráneo encefálico.	lumbar	80	21	7.1	65.2	9.1	-	16.1	4.5

CUADRO No. VI

No.	Diagnóstico	Punción	Presión Inicial	Proteínas Totales	Pre Alb.	Alb.	Alfa 1 Globulina.	Alfa 2 Globulina	Beta Globulina	Gama Globulina.
9	Síndrome cráneo hipertensivo.	ventricular	-	34	6.1	26.7	13	-	11.5	40.7
13	Síndrome cráneo hipertensivo.	ventricular	-	120	3.4	55.9	7.9	6.3	11.3	15.2
26	Atrofia cerebral difusa.	lumbar	160	14	7.9	42.4	19.5	-	19.5	10.7
46	Atrofia cerebral difusa.	lumbar	120	9	7	48	12	-	27	6
56	Atrofia cerebral difusa.	lumbar	-	64	4	46.1	4	10.5	22.5	12.9
69	Atrofia óptica.	lumbar	160	15	11.4	59	7.2	4.3	10.1	8
72	Atrofia cerebelosa.	lumbar	170	26.5	6	50	4.3	5.6	24.1	10
27	Enfermedad de Pick.	lumbar	140	9.4	6.9	43.7	18.8	-	21.8	9.8
51	Enfermedad de Pick.	lumbar	90	28	7.7	59.4	8.8	-	16.4	7.7
22	Síndrome de Dyke Davidoff.	lumbar	140	11.16	7.4	46.9	18.5	-	18.5	8.7
85	Brote psicótico por ingestión de tóxicos.	lumbar	150	24	3	59	5.7	6.7	19	6.6
91	Deficiencia Mental.	lumbar	-	13	5.5	78	-	-	7.4	9.1
23	Síndrome de Alzheimer	lumbar	140	11.16	13.0	45.2	16.2	-	14.3	11.0

95	Neurosis de Ansiedad	lumbar	75	9.5	-	92	-	-	-	8
108	Paresia del VI par Craneano.	lumbar	-	15	11	53	12	-	13	11
15	Corea de Huntington	lumbar	110	16	9.1	42.7	19.4	-	16.4	12.4
37	Encefalitis	lumbar	130	29.2	2.3	46.3	17.2	-	12.4	22.1
55	Inflamación granulomatosa crónica compatible con TB	ventricular	350	158	1.6	59	4.8	7	13.8	13.8
76	Encefalitis	lumbar	-	42	-	27.1	-	-	11.7	61.2
90	Corea de Huntington	lumbar	50	21	-	81.0	-	-	7.5	11.5
10	Enfermedad de Parkinson	lumbar	-	17.5	-	50	21.5	-	25	3.5
11	Mongolismo	lumbar	-	16.3	6.9	62.6	18.6	-	11.6	-
78	Cerebelitis post infecciosa.	lumbar	110	35	3.3	56.4	4.2	13.2	14.4	8.5
80	Atrofia músculo progresiva.	lumbar	-	21	2.9	51.8	5.1	11.3	22.7	6.2
88	Atrofia muscular crónica.	lumbar	-	20	4.7	58.0	10.0	5.3	15.3	6.7
101	Hereditaxia de Pierre Marie	lumbar	110	19.5	5.3	70.0	5.3	5.3	14.1	-
107	Síndrome de Arnold Chiari.	ventricular	-	9.5	10.6	62.0	10.6	-	10.6	5.2
									16.8	11.5

CUADRO VII

	Proteínas Normales (50 casos)				Proteínas Altas (13 casos)				Proteínas Bajas (22 casos)			
	Promedio	Máxima	Mínima	D.S.	Promedio	Máxima	Mínima	D.S.	Promedio	Máxima	Mínima	D.S.
Prealbúmina	6.2	17.0	0	+ - 6.2	2.3	4.0	0	+ - 2.2	13.9	75	0	-
Albumina	54.6	96.2	27.1	+ - 12.2	53.9	73.0	32.7	+ - 14.0	51.8	100.0	25.0	+ - 21.0
Alfa ₁ globulina	9.04	21.5	0	+ - 4.07	5.5	10.2	0	+ - 5.3	8.4	18.8	0	+ - 7.9
Alfa ₂ globulina	3.2	13.2	0	-	6.0	13.4	0	+ - 3.8	0.7	9.9	0	+ - 0.3
Beta globulina	15.8	27.0	0	+ - 4.07	13.5	22.5	4.0	+ - 3.8	13.0	27.0	0	+ - 5.1
Gamma globulina	12.5	40.7	0	+ - 12.4	18.4	46.9	0	+ - 7.2	12.9	39	0	+ - 4.6

DISCUSION

Varios investigadores han realizado la electroforesis de las proteínas del L C R en condiciones normales. Los resultados que han obtenido muestran diferencias más o menos notables en cuanto al porcentaje de las distintas fracciones proteicas, diferencias que pueden explicarse, en parte, por la variedad de sistemas empleados para la concentración de las proteínas en el líquido y en parte por la diversidad de técnicas usadas en el procedimiento electroforético propiamente dicho.

Por otra parte, los estudios que mencionamos no son estrictamente comparables, por el hecho de que en ellos intervinieron líquidos de procedencias diversas, es decir, cisternales, ventriculares o lumbares, y desde tiempo atrás se han señalado las diferencias de composición en general y por lo que a la concentración de las proteínas se refiere en particular, de los L C R obtenidos por punciones en diferentes sitios.

Finalmente, debe mencionarse el hecho de que esos líquidos considerados como normales no fueron obtenidos de sujetos absolutamente sanos y que es difícil asentar hasta que punto los padecimientos o las circunstancias que indicaron o permitieron la obtención del L C R, han podido influir en la composición proteica del mismo.

Muchas de estas objeciones y críticas son válidas en relación al trabajo que presentamos, pues, efectivamente y como queda consignado en los cuadros que condensan nuestros resultados, las procedencias de los líquidos que utilizamos en nuestra investigación fueron variadas por lo que al sitio de la punción se refiere y, a mayor abundamiento, prácticamente todos los casos clínicos correspondieron a padecimientos neurológicos o con repercusiones neurológicas, de tal suerte que la única base que tenemos para juzgar de la "normalidad" de un L C R, en nuestro estudio, es la de que la concentración de las proteínas totales se hallara dentro de los límites normales, y tenemos que aceptar que esa base no implica necesariamente que la concentración de las distintas fracciones proteicas tenga que ser consecuentemente normal.

Por otra parte, no podemos afirmar que en los casos estudiados haya algún patrón electroforético característico que corresponda a algún padecimiento o a algún grupo de padecimientos neurológicos en forma específica. Dentro de cada uno de los grupos que hicimos, en forma bastante arbitraria, existen casos en que las concentraciones de proteínas totales eran normales y otros eran altas o bajas. Después de todo, como ha sido aceptado desde hace mucho tiempo, la composición del L C R es la expresión de la composición del suero sanguíneo y las modificaciones que pueden observarse en circunstancias patológicas son el resultado de la eficacia con que funcionan los plexos coroides, cuya permea

bilidad es, en última instancia, la responsable de la composición del - -
L C R.

Así pues, debemos aceptar que la electroforesis de las -
proteínas del L C R puede ser de utilidad para el diagnóstico como una -
parte del examen completo del mismo y que todos los datos que éste su -
ministre, positivos y negativos, deben valorarse conjuntamente.

La técnica para la concentración de las proteínas que he -
mos descrito, en nuestra opinión, responde a su objeto. Su realización -
es bastante sencilla y, de acuerdo con los experimentos que mencionamos
en su oportunidad, no produce modificaciones en el líquido de importancia
desde el punto de vista clínico. El empleo de esa técnica y la aplicación
de la microzona en membranas de acetato de celulosa para la electrofore -
sis, permite la uniformidad indispensable para el juicio de los resultados.

Mumenthaler, en el acucioso estudio que publicó sobre la
electroforesis del L C R y en el cual toma en cuenta investigaciones prac -
ticadas por sus predecesores, admite que en lo básico todos los resulta -
dos coinciden y que las diferencias cuantitativas que se observan pueden
explicarse en virtud de los motivos señalados antes, que Mumenthaler - -
analiza extensamente en su trabajo.

En el cuadro VIII, hemos condensado los datos que inclu -
ye el autor mencionado. En las primeras tres columnas están anotadas -
las cifras mínima y máxima y la media aritmética halladas por los inves -

CUADRO VIII

	Mínima	Máxima	Media	Mumenthaler Media
Prealb.	1.2	7.6	4.3	4.4
Albumina	46.0	67.3	57.3	49.2
Alfa 1	2.6	7.7	5.7	6.5
Alfa 2	2.6	12.0	7.3	8.1
Beta	7.7	25.8	13.9	16.5
Tau	3.6	8.0	6.2	9.7
Gamma	6.3	18.0	11.0	5.6

tigadores a que se refiere el estudio de Mumenthaler y que corresponden a veintiuna publicaciones, que incluyen unos 700 casos. La última columna expresa la media aritmética de los 17 casos estudiados por el propio Mumenthaler.

Comparando los resultados de ese cuadro, con los del cuadro VII que corresponden a los de nuestro estudio, podemos hacer las siguientes consideraciones:

1. Además de las fracciones proteicas que aparecen por la electroforesis del suero sanguíneo, en la del L C R es frecuente hallar, según Mumenthaler y otros, por lo menos dos fracciones más, a las que denominan prefracción V y fracción Tau respectivamente. Más raras veces informa el hallazgo de otra fracción gama y de una tercera fracción en el campo de las alfa globulina. Nos referiremos más adelante a la prefracción V. En cuanto a las otras tres, no aparecieron en ninguno de nuestros líquidos. La fracción Tau, que para varios autores es específica del L C R, parece pues corresponder a algún artificio de técnica ya que sólo ocho de los veintiún trabajos mencionados antes, hacen relación de su hallazgo. En el mismo caso probablemente se hallan las otras dos fracciones a que hace referencia Mumenthaler.
2. La prefracción V del autor antes citado, corresponde a la que nosotros, siguiendo a otros investigadores, llamamos prealbúmina. Mu-

chos afirman que no puede asegurarse que se trate de una fracción proteica propia del líquido, ya que pudiera ser también la consecuencia de una tensión iónica determinada en relación a la solución amortiguadora empleada o a algún otro factor introducido artificialmente. En apoyo de este punto de vista están los experimentos que han logrado obtener una fracción prealbúmina en el suero sanguíneo, corriendo la electroforesis en un Tampón de pH9.

De nuestros 85 casos, la prealbúmina estuvo presente en 75, o sea en el 88.3%. Esta proporción es mucho más elevada que la que encuentran los autores analizados por Mumenthaler, cuyos hallazgos positivos para esta fracción son mucho más bajos. De acuerdo con Steger (citado por Mumenthaler), la concentración de la prealbúmina es mayor en el líquido ventricular y va disminuyendo en dirección lumbar. Por su parte Wunderly menciona un estudio de Bauer en el que la prealbúmina aparece en un 15.4% en los líquidos ventriculares y solamente en 2.9 - 4.5 en los líquidos cisternales. Este autor deduce que la presencia de prealbúmina está en relación con un efecto especial de los elementos estructurales del sistema nervioso central.

Por nuestra parte, no hemos podido hallar una relación definida ni por lo que se refiere a casos con prealbúmina ni en lo referente a la concentración de esta fracción y el sitio de la punción para la obtención del líquido. De acuerdo con la división que hemos hecho en rela-

ción con las proteínas totales, los líquidos que las tenían dentro de los límites normales mostraron prealbúmina en 92% de los casos, mientras -- que los que las tenían aumentadas sólo en 82% y las que las tenían dismi- nuídas en 85% .

En nuestros líquidos normoproteinorráquicos las cifras - mínima y máxima que hallamos fueron de 0 y 17.0% con un promedio de 6.2% y una desviación tipo de \pm 6.2, un poco mayores que las que se - - mencionan en el cuadro VIII. En los trece L C R con proteínas totales-- altas el promedio hallado fue de 2.3% con una desviación tipo de \pm 2.2 y los veintidos líquidos hipoproteinorráquicos mostraron un promedio de -- 13.9%. En estos últimos hubo dos casos con concentraciones de prealbú- mina muy elevados (75% y 63.8%) lo cual, aunado al corto número de ca sos, da una desviación tipo absurda.

De las consideraciones anteriores resulta que la única -- conclusión posible, con las reservas obligadas, es que en apariencia y -- por lo que se refiere a los casos estudiados por nosotros, la prealbúmina aparece en cantidades menores en los L C R con proteínas totales por - encima de lo normal y mayores cuando hay hipoproteinorraquia.

3. De la comparación de los resultados que obtuvimos en líquidos con -- concentraciones de proteínas normales y los expuestos en el cuadro- VIII, podemos deducir que con excepción de que nosotros no hallamos nunca la fracción Tau, los porcentajes de las otras distintas fraccio-

nes son comparables.

La diferencia más señalada se refiere a la betaglobulina, fracción en que nuestros resultados son definitivamente más bajos -- que los del punto de comparación.

4. En nuestros casos, la alfa 2 globulina parece estar aumentada cuando existe hiperproteinorraquia y disminuida en el caso contrario.

— O —

Los valores considerados como normales por los diferentes autores para las cifras porcentuales de las fracciones proteicas en el L C R son muy semejantes. Las que mencionamos a continuación están tomadas del trabajo de Mumenthaler, con ligeras modificaciones para cerrar las cifras y sin mencionar desde luego las que corresponden a la fracción Tau que nosotros no pudimos encontrar en ningún caso:

Prealbúmina	0 a 8%
Albúmina	45 a 65%
Alfa 1 globulina	3 a 8%
Alfa 2 globulina	3 a 12%
Betaglobulina	8 a 25%
Gamaglobulina	7 a 18%

Estos límites son un poco más amplios que los tomados en cuenta por otros autores, pero consideramos que corresponden más exactamente con la realidad en un mayor número de casos y son, por otra parte, muy semejantes a los de las fracciones correspondientes en el sue

Comparativamente pues a esos límites normales, los ca -
sos condensados en el cuadro 1 y que corresponden a hidrocefalias, en -
su mayoría quedan dentro de esos límites. Uno de ellos (No. 62), con
8.02 mg % de proteínas totales, muestra una cifra porcentual anormal- -
mente alta de prealbúmina (53.8%). La albúmina estuvo por encima de
lo normal en tres de once casos coincidiendo dos de ellos con cifras muy
elevadas de proteínas totales. En tres también, las cifras de albúmina -
estuvieron por debajo de lo normal, con concentraciones de proteínas to-
tales moderadamente elevadas.

En cuanto a la alfa 1 globulina, en nueve de los once ca-
sos las proporciones fueron normales o muy cercanas a los límites de - -
normalidad. En uno no apareció esa fracción y en otro más la proporción
fue bastante elevada (18.4%).

En tres de los once casos no hubo alfa 2 globulina. En -
los otros ocho las proporciones estuvieron dentro o muy cerca de los lí-
mites normales.

Las gamablogulinas estuvieron elevadas en tres casos, -
ausentes en dos y bajas en sólo uno.

En todos los casos, las betablogulinas fueron normales.

Los casos de cisticercosis agrupados en el cuadro 2, fueu -
ron catorce en total. De ellos, seis tuvieron proteínas totales dentro de

límites normales, dos fueron altas y seis bajas. La prealbúmina fue normal en seis casos y elevada en el resto. En un caso (No. 100) con proteínas totales de 4.5 mg % el 75% de ellas era prealbúmina.

La fracción albúmina estuvo dentro de límites normales o muy cerca de ellos en todos los casos menos en el señalado en el párrafo anterior, en el que fue de 25%. La alfa 1 globulina faltó en tres de las muestras y estuvo elevada en otras tres. La alfa 2 no se encontró en 9 de las 14 muestras (64%); en el resto estuvo dentro de límites normales. La betaglobulina fue normal en diez casos, faltó en uno y en los otros tres fue discretamente inferior a lo normal. La betaglobulina estuvo aumentada en la mitad de los casos y ausente en dos de ellos.

El cuadro III condensa los resultados de los once casos de tumores. Seis de ellos tuvieron proteínas totales normales, en tres estuvieron elevadas y en los dos restantes bajas. La prealbúmina fue prácticamente normal en todos los casos y estuvo ausente en uno. La albúmina estuvo elevada en dos casos y baja en dos más. La alfa 1 globulina fue alta en 5 de los 11 casos y no existió en dos. La alfa 2 faltó en 7 casos (64%) y fue normal en el resto. La beta globulina no existió en un caso y fue prácticamente normal en los demás. La gammaglobulina faltó en dos casos, fue baja en dos más y elevada en otros dos.

El siguiente cuadro corresponde a los casos de epilepsia. Uno sólo de los catorce casos tuvo proteínas totales bajas. La prealbú-

mina estuvo ausente en un caso y elevada en tres. La albúmina estuvo discretamente aumentada en tres casos. La alfa 1 globulina resultó elevada en 8 casos (57%) y fue normal en el resto. La alfa 2 faltó en 8 casos -- (57%) y fue también normal en los demás. La beta globulina estuvo dentro de límites normales en todos los casos y la gamaglobulina no existió en 2 casos, resultó baja en 6 y elevada en uno.

El cuadro V comprende 6 casos de accidentes vasculares cerebrales y traumatismos craneoencefálicos, en cuatro de los cuales la concentración de proteínas totales era normal y en los otros dos, - baja, muy ligeramente en un caso y extraordinaria en el otro (menos de 1 mg%). Las modificaciones importantes en los porcentajes de las distintas fracciones, fueron la elevada proporción de albúmina en dos casos y la ausencia de alfa 1 globulina en tres casos y de alfa 2 en cinco.

En el cuadro VI se agruparon todos los diagnósticos que no pudieron ser incluidos en ninguno de los anteriores. En virtud de que no existe ninguna base para considerarlos en conjunto, no hacemos ninguna alusión a los resultados de ese cuadro.

————— 0 —————

Las consideraciones enunciadas en las líneas anteriores apoyan la aseveración que hicimos de que no podemos deducir modificaciones características del electroforograma para determinados padeci-

mientos o grupos de padecimientos neurológicos, basándonos en los resultados que obtuvimos. Las alteraciones que pudimos hallar en forma más consistente, fueron la elevación del por ciento de prealbúmina en el 57% y la ausencia de alfa 2 globulina en el 64% de los casos de cisticercosis; la ausencia de alfa 2 globulina en el 64% de tumores cerebrales y la elevación de la alfa 1 globulina y la ausencia de alfa 2 globulina, cada una en el 57% de los casos de epilepsia.

En cuanto a las causas de estas alteraciones, la única que podemos mencionar es la deficiencia selectiva de los plexos coroides para la filtración de determinadas fracciones.

R E S U M E N

1. Se hicieron determinaciones electroforéticas de las frac ciones proteicas de 85 L C R obtenidos de pacientes del Instituto Nacional de Neurología.
2. Se describe la técnica utilizada para la concentración de proteínas del L C R que combina dialisis y liofilización.
3. Se propone una técnica de electroforesis por microzona en membranas de acetato de celulosa semejante a la que se emplea para el suero sanguíneo.
4. Se hace una revisión comparativa de los resultados obte nidos en nuestros experimentos y en otros estudios simi lares.
5. No se ha podido llegar a ninguna conclusión respecto a - las alteraciones que los padecimientos neurológicos de - los casos que estudiamos tengan sobre las concentracio nes porcentuales de las distintas fracciones proteicas.

BIBLIOGRAFIA CONSULTADA:

- Wunderly, Ch., La Electroforesis en Papel, 2a. edición, Editorial Científico - Médico, Barcelona, 1960.
- Tapia Hernández, L. P., Estudio para Determinar Valores de Proteínas Normales Sericas en México; Tesis, México, 1962.
- La Electroforesis de las Proteínas; sus aplicaciones en la clínica, Boletines de Laboratorios Clínicos de México, Enero 1962.
- Kohn, J., A Cellulose Acetate Supporting -- Medium for Zone Electrophoresis, Clin. Chimica Acta 2, 297, 1957.
- Kohn, J., Membrane Philter Electrophoresis Colloquium sobre Proteínas en Líquidos Orgánicos, Brujas, 1957.
- Taber, C. W., Taber's Cyclopedic Medical Dictionary, F. A. Davis, Co., Philadelphia, 1963.
- Gras, J., Proteínas Plasmáticas, Editorial Jims, Barcelona, 1967
- Nerenberg, S. T., Electroforesis, Editorial Jims, Barcelona, 1968.

- Kolmer, J. A.,
Spaulding, H. y Robinson, H. W., Métodos de Laboratorio,
Traducción de la 5a. edición inglesa,
Editorial Interamericana,
México, 1955.
- Examen del Líquido Cefalorraquídeo,
Boletines de Laboratorios Clínicos,
Nov. - Dic. de 1962.
- Mumenthaler, M. y Märki, H.,
Übersichten Ufer die Liquorelektrophorese,
Klinische Wochenschrift,
35 : 1, 1957
- Slater, R. J. y Kunkel, H. G.,
Filter Paper Electrophoresis with
Special Reference to Urinary Proteins,
J. Lab. & Clin. Med., 41 : 619,
1953.
- Griffiths, L. L.,
The Electrophoresis of Serum and
other Body Fluids in Filter Paper,
J. Lab. & Clin. Med., 41 : 188,
1953.
- Castagnino, J. M.,
La Electroforesis sobre Papel de
Filtro,
Bioquímica Clínica 1 : 63,
1967.
- Balado, R. F. y col.,
Microelectroforesis sobre Acetato
de Celulosa gelificado,
Bioquímica Clínica 1 : 116, 1967.
- Kohn, J.,
A Micro - electrophoretic Method
Nature, 181 : 839, 1958.

- Armstrong, S. H.,

Preparation and Properties of --
Serum and Plasma Proteins XI.,
J. Am. Chem., 69 : 416, 1947.

- Dole, V. P.,

A Theory of Moving Boundary --
Systems formed by Strong Elec--
trolytes, J. Am. Chem., 67 : -
1119, 1945.