

**TÈCNICA DE CONCENTRACIÓ DE LIQUIDS
PER A L'OBTENCIÓ D'ELECTROFOREGRAMES**

Comunicació presentada el dia 28 d'abril de 1962 pel doctor

EDUARD FORNELLS

Director del Laboratori dels Dispensaris de Malalties
Professionals i de la Clínica del Treball
de Barcelona

L'estudi de les proteïnes i en particular de les fraccions proteiques té, en Biologia i sobretot en Medicina, cada dia més interès pràctic.

Podem dir sense por d'exagerar que actualment el fraccionament proteic té tant d'interès com l'examen morfològic sanguini, i pensem que la seva pràctica no tardarà gaire a ésser tan freqüent com la d'un vulgar hemograma o velocitat de sedimentació globular. Però l'estudi d'aquest fraccionament com a examen quotidià està limitat fins ara, almenys entre nosaltres, al sèrum sanguini. Així, quan es tracta d'altres líquids biològics, com són orina, líquid cefalo-raquidi, sinòvia, etc., de contingut proteic feble, aquesta determinació és considerada com a privativa de centres d'investigació i no assequible a la pràctica diària.

Pensem que aquest fet és degut a les dificultats que els analistes oposem a aquests tipus d'exàmens, a causa, sens dubte, dels problemes tècnics que llur realització comporta. Això no obstant, estem plenament convençuts que tant el seu interès teòric com pràctic és equivalent, o superior en alguns casos, al que ens proporciona el mateix sèrum sanguini.

Personalment ens interessà d'obtenir fraccionaments en L.C.R., i fa un xic més de dos anys començarem a treballar en aquest assumpte. Com a problemes fonamentals havíem de resoldre dues qüestions: primera, la concentració del líquid fins a nivells en què els electroforegrames obtinguts fossin avaluables, i segona i principal, que comptàvem únicament amb petites quantitats d'un producte que, de més a més, era molt pobre en contingut proteic, sobretot quan es tractava de líquid ventricular. Assajàrem diverses tècniques descrites en la literatura, sobretot alemanya, algunes amb resultats acceptables, i en comunicarem una nota prèvia el febrer de l'any 1961.

Avui, en aquesta breu comunicació, no pretenem pas d'exposar les proves i els mètodes que hem seguit, sinó únicament d'exposar-vos, després d'un breu resum sobre els fonaments tècnics de concentració, el mètode que finalment hem adoptat i adaptat, fàcilment realitzable amb qualsevol líquid, i amb els resultats que us ensenyarem a continuació. Projectió núm. 1: Es tracta d'un L.C.R. normal. Projectió núm. 2: L.C.R. amb augment d'alpha sub dos i de gamma. Correspon a una fase de començament d'una

criptococosi cerebral. Projectió núm. 3: L. ventricular, amb un discret augment de gamma. En el L.V. és on la prealbúmina existeix en més proporció. Projectió núm. 4: Es tracta d'una orina normal en la qual amb mètodes ordinaris no es trobaven proteïnes. L'electroforesi és defectuosa perquè únicament es dialitzaren 75 ml d'orina.

L'experiència que tenim en aquest moment és encara reduïda: es limita a 211 fraccionaments en L.C.R., ultra alguns sèrums i orines.

FONAMENTS TÈCNICS

La dificultat primordial en l'obtenció d'aquests electroforegrames és la necessitat de concentrar el líquid problema de manera que les proteïnes no sofreixin desnaturalització. Per això tots els mètodes han d'ésser efectuats en fred. Fonamentalment els principis en què es basen són els següents:

1. Precipitació en fred, generalment amb acetona, i redissolució. Estudiad sobretot en L.C.R. per BUCHER, MATZELT, PETTE i d'altres. Són mètodes molt delicats i, per tant, exposats a modificacions proteïques. Nosaltres no en tenim experiència.

2. Ultracentrifugació (WESSELMENN, EWERBECK, BUSCHER i molts d'altres) és un bon mètode, però necessita un utilatge costós, propi únicament de centres d'investigació. Tampoc no hi tenim experiència.

3. Evaporació al buit. Citat per BOOY, MATTHES, PLICKTHUM, etc. Necessita també utilatge especial. És de factura lenta i de final imprecís. Hem treballat quelcom amb aquesta tècnica, però sense resultats pràctics.

4. Diàlisi a través de membranes semipermeables de celofana, col·lodió o filtres especials, ja sia utilitzant com a força dialitzadora únicament la pressió osmòtica de macromolècules (dextran, goma aràbiga...), o bé coadjuvant amb pressió positiva (que utilitzen ESSER, HEINTZLER, LASS i TERPE), o bé amb pressió negativa (EWERBECK, ROSSI, SCHNEIDER). També amb pressió negativa contra solució salina concentrada (KAWAT, LANDOW, MORE).

Són tècniques no gaire complexes i de resultats brillants. Els nostres primers proteïnogrames foren obtinguts dialitzant a través de celofana i amb goma aràbiga a la congeladora, a 4 graus centígrads. L'lur principal inconvenient, a la nostra manera de veure, és degut a la lenta realització i a la dificultat per a recollir el dialitzat final quan treballem amb poc líquid.

5. Ultrafiltració al buit. (MIESS, SCHÖNENBERG i WESSELMANN, EWERBECK, SCHEID i SCHEID, etc.). En aquest principi es basa la tècnica que seguidament descriurem. Està inspirada en la de SCHÖNENBERG i WESSELMANN i en la de MIESS. Les principals diferències introduïdes consisteixen en la forma i en la fabricació del filtre, en el tipus de recipient de buit, i sobretot en el fet que ultrafiltrem directament contra buit i no contra solucions salines o gluco-salines. Aquesta darrera modificació és la que simplifica considerablement el mètode i no comporta modificacions estructurals en les fraccions, almenys en allò que l'electroforesi sobre paper pot posar de manifest. Hem arribat en aquesta conclusió practicant ultrafiltració de sèrums prèviament diluïts; sèrums normals i diversament patològics, contra solucions salines i contra buit. Els resultats han estat sempre reproductibles i idèntics als fraccionaments previs. Això demostra que les variacions iòniques consecutives a l'equilibri de Donan no són tan intenses com per a produir alteracions irreversibles en les fraccions proteiques.

Com a cambra de filtrat utilitzem el dispositiu que es veu en la següent projecció (núm. 5), consistent en un doble tub adaptat per un tap de goma perforat. Al tub interior, sense fons, s'adapta el filtre prèviament preparat, mitjançant un fil elàstic de goma verge. Es fa el buit a la cambra que resta entre els dos tubs i el filtre, a través de la sortida lateral del recipient exterior. Preparem el filtre utilitzant com a motlle un tub d'assaig curt, el fons del qual ha estat prèviament estirat de manera que tingui la forma de fons de sac cònic i no esfèric. És molt important que el diàmetre interior d'aquest motlle sigui algunes dècimes de mil·límetre més gran que no el diàmetre exterior del tub que servirà de suport al filtre. Així l'adaptació del filtre al seu suport serà perfecta i sense fer plecs.

En aquest motlle es col·loca una petita quantitat de col·loidió al 20 o 25 %. El col·loidió comercial no ens dóna resultat; per això el que utilitzem, el preparem nosaltres mateixos. Seguidament imprimim al tub-motlle moviments ràpids de rotació en diverses posicions per tal que el col·loidió s'endureixi formant una fina capa homogènia en tota la superfície del continent. Un cop obtinguda la duresa apropiada, cosa que ens succeeix al cap de 30 o 40 minuts, col·loquem el filtre al seu suport, el lliguem i l'introduïm en un bany de formol a l'1 % durant algunes hores. Hem de confessar que el problema que ens ha costat més de resoldre ha estat l'obtenció, de forma sistemàtica, de filtres utilitzables, és a dir, filtres que no es trenquin en fer el buit, que s'adaptin perfectament al suport, i sobretot que tinguin la duresa apropiada per a permetre una ultrafiltració total i ràpida.

Com a sistema de buit utilitzem el que es veu en la projecció núm. 6. Consisteix en una cambra central de distribució en la qual comunica la conducció de la trompa de buit, que en aquest cas és una trompa d'aigua metàl·lica, suficient per a obtenir pressions negatives de 67 cm Hg., una conducció que va en un dipòsit de buit la finalitat del qual és de fer d'esmorteïdor i de reservatori de buit per a mantenir una ultrafiltració a pressió constant les hores que calguin, un manòmetre de pressions negatives i les vàlvules de sortida que comunicaran mitjançant tubs de goma a les cambres d'ultrafiltració.

Per a la metòdica de la filtració col·loquem el líquid problema a l'interior del filtre. És suficient amb uns 7 o 8 ml de L.C.R., si aquest és normal, o 15 ml de L. ventricular. Si aquests líquids són hiperproteics, les quantitats poden ésser més petites. Connectem el buit amb una tensió mitjana de menys 25 o menys 30 cm de Hg; pressió amb la qual normalment, en unes dues hores, filtren uns 15 ml de líquid. El final de la ultrafiltració no necessita control, car la concentració del líquid a aquesta pressió no sobrepassa mai els límits òptims per a obtenir un bon electroforegrama.

Un cop filtrat, hom recull el concentrat del fons del filtre, amb un capillar o pipeta Pasteur, amb la qual tot seguit es realitza l'extensió sobre el paper d'electroforesi, com si es tractés d'un sèrum sanguini. Si volem diferir la pràctica de l'electroforesi a un altre moment, ens limitem a tancar els extrems del capillar a la flama i conservem la congeladora a $+ 4^{\circ} \text{C}$. A partir d'aquest moment totes les operacions successives són idèntiques a les que es fan en el sèrum sanguini, i per això no les descriurem.

No cal dir que a partir d'aquest dialitzat es poden practicar, doncs, proteïnogrames, lipoproteïnogrames, mucoproteïnogrames, en fi: totes les mateixes operacions que es puguin fer amb sèrum directament, amb l'avantatge, en molts de casos, que les bandes surten millor, ja que la concentració obtinguda és superior a la normal del sèrum; talment, que nosaltres fem servir aquest artifici de concentració en determinats sèrums per a obtenir mucos i lipoproteïnogrames més contrastats. Amb el mateix L. C. R. hem obtingut mucogrames força expressius.

Quant als lipoproteïnogrames, utilitzem la tècnica de pretinció que GRAS RIERA descriu per al sèrum, amb les variants següents: A) Hom pot fer aquesta pretinció directament en el líquid abans de concentrar, però d'aquesta forma els lipogrames obtinguts no són gaire expressius, a part que cada vegada es fa malbé un filtre. B) Tinció després de la concentració, amb la qual s'obte-

nen excel·lents resultats. Com que disposem de molt poc concentrat, tenyim dins un capillar amb una petita dilatació central ampullar (projecció núm. 7) en la qual prèviament hem col·locat un pols de negre sudan. Col·locat el líquid en contacte amb el colorant, tanquem els extrems del capillar a la flama i escalfem al bany maria a 56 °C mitja hora, agitant de tant en tant per rotació entre les mans. Per separar després les restes de colorant (projecció núm. 8), un cop tallats novament els extrems del capillar, fem passar, com es veu a la figura, mitjançant pressió positiva el concentrat tenyit d'un capillar a l'altre, a través d'un petitíssim disc de paper de filtre. Això no obstant, i per acabar de separar algunes partícules de colorant que hagin pogut passar per defecte tècnic, tanquem aquest nou capillar d'un extrem i centrifuguem. Llavors es comprova per transparència el nivell en què han quedat les partícules, i es talla el capillar de manera que se separin i es puguin menysprear.

Farem notar que en el L. C. R. normal únicament s'aprecien les alpha lipoproteïnes, i no les beta.

En fi: aquesta és la nostra modesta experiència tècnica que podem aportar al tema exposat. No cal dir que estem enterament a la vostra disposició per a aclarir qualsevol dubte que hagi pogut quedar.