

## ESTUDIO ELECTROFORETICO EN PAPEL SOBRE SUEROS DE BOVINOS NORMALES (\*)

Por Fermín de Vega <sup>(1)</sup> y Graciela M. Bade <sup>(2)</sup>

### R E S U M E N

- 1) Se realizó el estudio electroforético sobre papel de suero de 29 bovinos clínicamente normales de 2 y ½ a 3 años de edad, de raza Aberdeen Angus y de ambos sexos.
- 2) Se detallaron estadísticamente los valores de las proteínas totales y fraccionadas en albúmina y globulinas alfa, beta y gamma. Además se registró la relación albúmina globulina (coeficiente proteico).
- 3) Los valores obtenidos se compararon con los aportados por otros autores, llegándose a establecer resultados muy concordantes.

### PAPER ELECTROPHORESIS STUDY IN NORMAL BOVINE SERUM

### S U M M A R Y

1. *Electrophoretic paper study of 29 clinically normal bovine serums was realized. This work was performed in Aberdeen Angus bovine of 2½ - 3 years old and both sexes.*
2. *Statistical values of total proteins, alfa, beta and gamma globulins and their proteic coefficient was detailed.*
3. *Values concordant with other authors was obtained.*

---

(\*) Trabajo realizado en el Departamento de Ciencias Básicas, de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata.

(1) Doctor en Ciencias Químicas. Jefe de Trabajos Prácticos del Departamento de Físico-Química, de la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata. Jefe de Trabajos Prácticos de Física Biológica de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata.

(2) Doctora en Medicina Veterinaria.

## A N T E C E D E N T E S

Luego de una exhaustiva consulta bibliográfica sobre los investigadores que estudiaron en nuestro país las proteínas séricas de los bovinos por vía electroforética, llegamos a la conclusión que debido al escaso número de trabajos realizados, existía la necesidad de confirmar los valores normales siguiendo una determinada técnica, en la cual se tuvieran en cuenta todas las posibles variables que pudiesen tener influencia, a fin de re-

ducir a un mínimo el número de errores cometidos.

Los sueros sobre los cuales se trabajó los obtuvimos personalmente en el frigorífico Swift de La Plata, durante el faenamamiento y luego de una cuidadosa inspección del animal, para asegurarnos sobre su normal estado clínico.

La edad de los bovinos sacrificados oscilaba entre los 2 y  $\frac{1}{2}$  y 3 años, siendo de raza Aberdeen Angus y de ambos sexos.

## MATERIAL Y METODO

Para la ejecución de las corridas electroforéticas se empleó el equipo Elphor.

Previamente se aseguró el normal estado de cada una de las partes básicas del equipo. Comprobado el mismo y para mayor control durante cada experiencia se confirmó siempre la diferencia de potencial y la intensidad de la corriente comunicada por la fuente.

La cantidad de muestra osciló alrededor de los 0,01 ml., dependiendo la misma del dosaje previo de las proteínas totales. El papel usado fue el Schleicher-Schull 2043 B (120 g/cm.<sup>2</sup>) de 32 × 4 cm.

Las corridas se hicieron siempre en 6 tiras sembrando 3 muestras por duplicado.

El tiempo de cada experiencia estuvo comprendido entre las 16 y 17 horas, con un voltaje de 90 voltios y una intensidad de 11 mA. o sea de 0,45 mA/cm. Trabajando con este voltaje e intensidad el efecto Joule se redujo a un mínimo y con el tiempo empleado las separaciones de las distintas fracciones fueron definidas. La

solución buffer empleada fue la de Michaelis constituida por:

Veronal (ácido dietilbarbitúrico) .....	8,712 g.
NaOH .....	11,893 "
CH <sub>3</sub> COONa .....	6,476 "
HCl 0,1 N .....	60 "
Agua destilada .....	1000 "
	pH = 8,6
	f. i. = 0,125

Las drogas tipo primario se pesaron directamente en balanza analítica, en cambio el hidróxido de sodio y el ácido clorhídrico fueron valorados y a partir de su título se calcularon exactamente las cantidades indicadas; el pH fue controlado con un peachímetro Knick.

Para mantener aproximadamente uniforme la fuerza iónica del buffer se invirtió luego de cada corrida la polaridad de los electrodos (esto es posible siempre que ambos sean de platino); además se controló el volumen constante de la solución en la cuba, reintegrándose con agua bidestilada el solvente evaporado.

Otra forma de controlar la fuerza iónica fue midiendo la conductancia de la solución en un puente Philips GM 4249.

Las proteínas luego de la corrida y antes de teñirlas se fijaron por acción del calor en una estufa a 100°C durante 30' y fueron coloreadas con una so-

lución de azul de bromofenol en concentración de 1 mg. % (P/V), en alcohol etílico de 96° saturado de Cl<sub>2</sub>Hg. El tiempo de tinción fue de 15'. El exceso de colorante se eliminó con una solución de ácido acético al 15 % (V/V), en 6 baños consecutivos de 15' cada uno.

Las tiras teñidas y viradas totalmente a medio alcalino con vapores de amoníaco, fueron registradas por densitometría en el aparato Analytrol con integrador automático.

Para el dosaje de las proteínas totales se usó el micrométodo de Gornall modificado por David (1).

## RESULTADOS

Sobre 29 electroferogramas obtenidos de bovinos normales se efectuó el cálculo del porcentaje relativo de

cada una de las fracciones de proteínas séricas. Los valores pueden observarse distribuidos en la tabla N° 1.

TABLA N° 1. PORCENTAJES RELATIVOS DE CADA UNA DE LAS FRACCIONES DE PROTEINAS SERICAS REALIZADAS SOBRE 29 BOVINOS NORMALES

Suero N°	P. T. (*) g. %	Albúmina	Globulinas			Relac. A/G
			alfa	beta	gamma	
1	7,24	57,6	10,0	9,1	23,3	1,360
2	8,80	46,6	9,0	8,0	36,4	0,870
3	10,00	40,8	11,6	10,6	37,0	0,690
4	7,00	40,6	12,2	11,3	36,0	0,700
5	9,60	36,1	14,1	8,5	41,3	0,568
6	7,80	43,0	10,2	6,8	40,0	0,755
7	8,50	47,0	8,5	6,5	38,0	0,887
8	10,80	40,2	8,4	9,8	41,6	0,675
9	10,40	36,4	12,7	6,9	44,0	0,575
10	10,28	34,5	5,5	8,0	52,0	0,528
11	7,90	52,8	8,3	10,4	28,5	1,120
12	8,10	43,7	9,4	7,3	39,6	0,772
13	8,00	56,5	9,3	10,0	24,2	1,283
14	8,00	50,0	7,6	10,2	32,2	1,000
15	8,80	53,1	9,8	7,6	29,5	1,125
16	8,50	34,7	13,8	10,3	41,2	0,530
17	9,60	36,2	14,2	8,6	41,0	0,570
18	9,00	50,8	10,7	10,0	28,5	1,027
19	8,40	59,5	10,3	9,3	20,9	1,562
20	7,20	54,5	8,6	8,6	28,3	1,200
21	8,40	59,1	8,4	12,0	20,5	1,440
22	5,80	59,0	9,6	8,7	22,7	1,540
23	8,00	61,0	7,9	9,2	21,9	1,560
24	6,60	55,0	10,0	10,6	24,4	1,220
25	9,00	53,1	8,3	13,3	25,8	1,130
26	8,00	60,0	6,7	11,6	21,7	1,500
27	8,00	64,0	7,5	9,1	19,4	1,780
28	8,00	61,0	8,5	9,0	21,5	1,560
29	8,00	62,0	9,4	11,0	17,6	1,630

(\*) P. T., proteínas totales.

A partir de las mismas se hizo el estudio estadístico, determinándose el valor medio de cada fracción y su

desviación standard. Los datos figuran en la tabla N° 2.

TABLA N° 2. VALORES MEDIOS DE LAS FRACCIONES DE PROTEINAS SERICAS DE BOVINOS CON SU DESVIACION STANDARD REALIZADAS SOBRE 29 CASOS

Fracciones	$\bar{x}$ (*)	$\sigma$ (**)
— Albúmina	50,4 %	$\pm 9,2$
Globulina alfa	9,4 „	$\pm 2,2$
„ beta	9,4 „	$\pm 1,6$
„ gamma	30,8 „	$\pm 8,3$
Proteínas totales	8,40	$\pm 1,05$
Coefficiente proteico	1,068	$\pm 0,446$

(\*)  $\bar{x}$ , media.

(\*\*)  $\sigma$ , desviación standard.

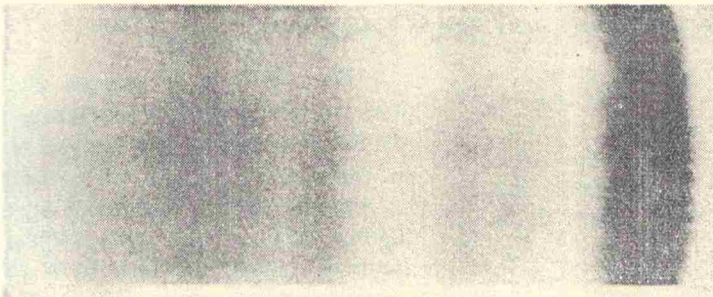
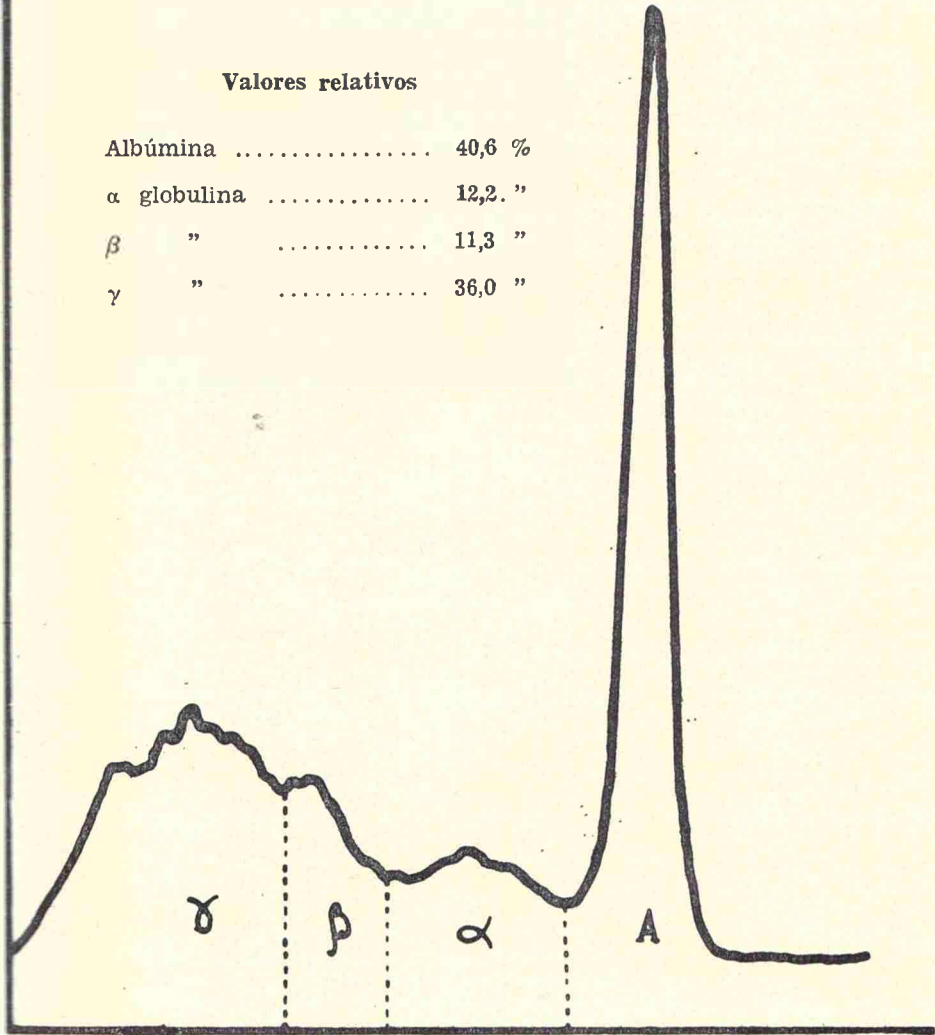
GRAFICO Nº 1

TRAZADO Y CORRIDA ELECTROFORETICA DE UN SUERO NORMAL

Suero de bovino normal                      Fecha: 20 de diciembre de 1969  
Raza: Holando Argentino                      Edad: 3 años

Valores relativos

Albúmina .....	40,6 %
$\alpha$ globulina .....	12,2. "
$\beta$ "     .....	11,3 "
$\gamma$ "     .....	36,0 "



Voltaje 90 Intensidad 9,75 mA (0,75 mA/cm.) Duración 16 hs.  
Proteínas totales 7,00                      Relac. alb./glob. 0,700

TABLA Nº 3 VALORES MEDIOS DE LOS PORCENTAJES RELATIVOS  
DE LAS DISTINTAS FRACCIONES DE PROTEINAS  
EXPRESADAS SEGUN LOS AUTORES

Autores	Año	P. T.	Albú- mina	Globulinas			Relac. A/G
				alfa	beta	gamma	
Boguth, W. (2)	1953		43,8 ± 2,9	13,7 ± 2,5	11,4 ± 1,6	12,4 15,7 ± 1,5	0,779
Ebel, K. (3)	1953		37,5 ± 1,4	13,4 ± 1,3	9,9 ± 1,6	39,0 ± 2,4	0,640
Wehemeyer, P. (4)	1954	7,1	39,6	6,8	7,7	16,9	0,655
Bradish, et al. (5)	1954	7,0	46,6	22,9		30,5	0,872
Rooney, J. R. (6)	1957		52,0	13,0	11,0	9,0 15,0	1,083
Laborie, R. (7)	1958		52,2	13,5 **	12,6	21,6	1,094
Venturoli, M. (8 )	1958		43,4 ± 2,1	14,5 ± 1,5	13,5 ± 0,6	27,0 ± 2,5	0,769
Urroz, G. (9)	1958		38,6	10,8 7,0 ± 1,1 ± 1,2	11,8 ± 1,9	31,8 ± 2,3	0,628
Boguth, W. et al. (10)	1959		45,3	11,6 **	10,6 **	31,5 **	0,862
Perk, K. et al. (11)	1959		46,3 ± 2,4	11,4 ± 0,8	14,0	29,3 ± 2,7	0,828
Sainz Sainz, et al. (12)	1959		43,5 ± 2,4	14,6 *** ± 2,4	13,5 ** ± 1,9	12,7 15,7 ± 1,3 ± 1,5	0,769
Vesselinovitch, S. D. (13)	1959		42,5	11,5	12,6	33,4	0,739
Masselin, J. N. et al. (14)	1961	8,53	43,4	12,0	14,1	30,5	0,766
Mazzini, C A. et al (15)	1961		42,2 ± 6,9	12,6 ± 5,1	17,3 ± 4,4	14,7 13,2 ± 4,3 ± 4,8	0,760 ± 0,240
Garrido Contreras, A. (16)	1967	7,85 ± 0,10	41,8	11,7	15,5	30,7	0,720
Irfan, M. (17)	1967	7,16	43,1	11,0	12,0	33,9	0,756
Rullier, J. et al. (18)	1968	7,8	31,9	16,8	12,9	38,4	0,469
de Vega, F.	1969	8,40 ± 1,05	50,4 ± 9,2	9,4 ± 2,2	9,4 ± 1,6	30,8 ± 8,3	1,068 ± 0,446

\*\* 2 fracciones.

\*\*\* 3 fracciones.

### CONCLUSIONES

Se detallaron los valores obtenidos por otros autores y los hallados en este trabajo en la tabla Nº 3. De su confrontación se dedujo lo siguiente:

a) El porcentaje de albúmina hallado fue discretamente superior al referido por otros.

b) Los valores de las globulinas alfa y beta se encontraron ligeramente por debajo de los anotados en la bibliografía.

c) En cuanto a la gamma globulina, los resultados concordaron teniendo en cuenta el margen de error en cada caso. La gamma globulina se expresó como la suma de la que algunos autores llaman gamma<sub>1</sub> y gamma<sub>2</sub>, dado que si bien en el electroferograma se observó un débil pico de separación, se consideró conveniente expresar la suma, debido a

que no existe una verdadera definición electroforética.

d) Dado que cada autor usó una técnica algo distinta fue necesario comparar nuestro trabajo con el que siguiera etapas básicas semejantes. Así encontramos con gran satisfacción el trabajo realizado por Rooney (6), cuyos resultados se asemejan a los de este estudio.

Finalmente se establecieron como porcentajes relativos normales de las distintas fracciones de proteínas, los siguientes: albúmina 50,4 % ( $\pm 9,2$ ), alfa globulina 9,4 % ( $\pm 2,2$ ), beta globulina 9,4 % ( $\pm 1,6$ ) y gamma globulina 30,8 % ( $\pm 8,3$ ). El coeficiente proteico fue de 1,068 ( $\pm 0,446$ ) y las proteínas totales de 8,40 % ( $\pm 1,05$ ).

#### BIBLIOGRAFIA

1. Gornall, A. G.; Bardawill, C. J. y David, M. M.: *J. Biol. Chem.*, 177: 751 (1949).
2. Boguth, W.: *Papierelktrophoretische serumuntersuchungen bei haussäugetieren*. Zentralblatt für Veterinärmedizin I (mitteilung) band, 1 (2): 168 (1953).
3. Ebel, K. H.: *Papierelktrophoretische untersuchungen der bluteiweiss verhältnisse bei hunden, rinden und kälbern*. Zentralblatt für Veterinärmedizin, 1 (1): 70 (1953).
4. Wehmeyer, P.: *Act Path. Microbiol. Scand.*, 32: 69 (1954).
5. Bradish, C. J.; Henderson, W. M., and Brooksby, J. B.: *Biochem. J.* 56: 329 (1954).
6. Rooney, J. R.: *Paper electrophoresis of bovine serum*. American Journal of Veterinary Research, 18: 67 (1957).
7. Laborie, R.: *De la valeur des reactions hématologiques, sérologiques et bio-électriques, au point de vue du diagnostic de la tuberculose bovine*. *Revue du Corps Vétérinaire de L'armée*, 13 (1): 17 (1958).
8. Venturoli, M.: *Studio elettrofretico di alcune epatopatie bovine*. *Zooprofilassi*, 13: 601 (1958).
9. Urroz, I. G.: *Contribución al estudio electroforético de los valores normales de las proteínas séricas de bovino*. *Rev. de Investigaciones Ganaderas I. N. T. A.*, 4: 149 (1958).
10. Boguth, W.; Habermatz, F. und Schnappauf, H. P.: *Papierelktrophoretische bestimmung der proteingebundenen iohlenhydrate im serum von haus-und laboratoriumstierem*. *Sentralblatt für Veterinärmedizin*, 4 (10), 901 (1959).
11. Perk, K. and Lobl, K.: *A comparative study on the sera proteins and lipids in two breeds of cattle*. *The British Veterinary Journal*, 115 (11): 411 (1959).
12. Sainz Sainz; Pardo, O. y Laglera, A.: *Investigación de las proteínas del suero sanguíneo de los ruminantes por electroforesis en papel*. XVI Congreso Mundial de Veterinaria, 2: 131 (1959).
13. Vesselinovich, S. D.: *The analysis of serum proteins of domestic animals by filter-paper electrophoresis*. A review. *The Cornell Veterinarian*, 49: 82 (1959).
14. Masselin, J. N.; Monesiglio, J. C.; Chiavavalle, A. M. y García, N. N.: *Electroforesis sobre papel a alta presión y voltaje*. Su aplicación al fraccionamiento de proteínas séricas de sueros bovinos normales. *Rev. de Investigaciones Ganaderas*, 12: 197 (1961).
15. Mazzini, C. A. y Frattini, J. F.: *Estudio químico y electroforético en sueros sanguíneos de bovinos normales*. IIº Congreso Nacional de Veterinaria, Buenos Aires, 185 (1961).
16. Garrido Contreras, A.: *Investigaciones electroforéticas e inmunolectroforéticas del suero sanguíneo de las especies ruminantes domésticas*. *Archivos de Zootecnia*, 16 (63): 257 (1967).
17. Irfan, M.: *The electrophoretic pattern of serum proteins in normal animals*. *Research in Veterinary Science*, 8 (2): 137 (1967).
18. Rollier, J. et al.: *Laboratoire et Diagnostic en Médecine Vétérinaire*. Paris, Vigot (1968).