

ORIGINALES

SEPARACION DE FRACCIONES ANTIGENICAS POR LOS PROCESOS CONTINUOS

C. BAENA CAGNANI.

Director del Instituto de Alergia Universidad Nacional de Córdoba (Rep. Argentina). De la cátedra de Enfermedades Infecciosas.

Profesor: Doctor VILLAFANE LASTRA.

S. PAGLINI.

Jefe de la Sección Investigación del Instituto de Alergia Universidad Nacional de Córdoba. Hospital Italiano.

Dentro de los factores etiológicos de las alergias inhalatorias, el polvo de habitación constituye el de más valor por su incidencia (casi más del 60 por 100 de los casos) y por su patogénesis, ya que el mismo es, desde el punto de vista antigénico, uno de los más completos.

Desde hace mucho está probado por los estu-

dios clínicos e inmunológicos cómo este antígeno, o hablando más específicamente, alergeno, crea a través del tiempo, en organismos sensibles, los síntomas característicos de las enfermedades alérgicas como las rinitis anuales inhalatorias, el asma bronquial, conjuntivitis, dermatitis por inhalación, etc.

Desde los trabajos de KERN en 1921, quien fué el primero que llamó la atención sobre él, su comprobación por las pruebas cutáneas inmediatas a través de los trabajos de STULL-COOKE-SHERMAN, las importantes aportaciones de ROWE y JIMÉNEZ DÍAZ, se han realizado una serie de investigaciones a los fines de establecer las sustancias constituyentes de este complejo factor alergénico.

En el mismo entran una serie de factores que JIMÉNEZ DÍAZ ha esquematizado de la siguiente manera:

COMPONENTES DEL POLVO EN RELACION CON EL ASMA

1. Sustancias inorgánicas no o sólo excepcionalmente alergénicas	Metales, carbón, sílice, etc.	
		Productos dérmicos animales (caballo, gato, perro, oveja, etc.).
		Productos dérmicos humanos.
		Suero humano.
		Plumas de ave.
		Colas de pescados.
		Insectos (cimex, eférmera, carcoma).
		Restos de alimentos (huevo).
		Seda.
	Domésticas.....	
		Algodón, crin vegetal, miraguano y yute.
		Lino, rayón, cáñamo y esparto.
		Piretrum (crisantemos).
		Raíz de lirio de Florencia y colas vegetales.
		Restos de alimentos y maderas.
		Pólenes, plantas, tabaco y hongos del aire.
		Hongos parásitos (merulius, etc.).
	Vegetales.....	
		Harinas leguminosas, drogas y sustancias químicas, polvo de tabaco, aserrín de madera, fibras textiles, esparto, etc.
	Profesionales....	
2. Sustancias orgánicas eventualmente alergénicas		
3. Sustancia "X", alérgenos propios del polvo.		

De su constitución antigénica, compleja y variable, dependen las modificaciones de los síntomas clínicos, como lo demuestra una experiencia realizada por nosotros, en que el aumento de algunos de sus componentes durante una época del año, el verano, como son los productos dérmicos animales, insectos, piretrum, pólenes,

hongos, etc., que modifican en más su acción antigénica, hace que estos enfermos exacerbén toda su sintomatología.

Dentro de sus componentes esenciales se encuentran los lípidos en gran cantidad, como se prueba en el desengrase con éter o tetracloruro de carbono, mucoproteínas, proteínas, etcétera.

SHERMAN y STULL lograron separaciones de fracciones antigénicas por métodos químicos en ambrosía (pólenes), mostrando tres fracciones distintas y con las siguientes conclusiones:

1.^a Que las fracciones 1 y 2 tenían en los tests pasivos transferidos evidentemente reacciones independientes; asimismo la fracción 1 era mil veces reactiva, mientras la fracción 2 era sólo cien veces.

2.^a Los sueros de conejos inyectados con la fracción 1 dieron reacciones específicas con esta fracción en pruebas de precipitina, sensibilización pasiva de cobayo y sensibilización pasiva de la piel humana. Solamente uno de tres conejos inyectados con la fracción 2 produjo precipitinas, pero éstas fueron específicas para la fracción 2.

3.^a Que los pacientes sensibles al polen de ambrosía tratados con las fracciones separadas crearon un anticuerpo bloqueador a la fracción inyectada, pero no a la otra fracción.

4.^a La fracción 1 fué un antígeno más activo que la fracción 2, tanto en el hombre como en los conejos.

ALÉS REINLEIN, JIMÉNEZ DÍAZ y ORTIZ MASLLORENS, en un reciente trabajo sobre separación antigénica de polvo usando el método de precipitación en gel en dos dimensiones de OUDIN-OUCHLERLONY, y que permite separar los componentes de una mezcla antigénica, encontraron:

1.^o Aproximadamente de seis a siete componentes inmunológicamente diferenciales.

2.^o La mayor parte de estos componentes, identificables como productos humanos presentes en todos los polvos estudiados.

3.^o Componentes similares en polvos de distintos orígenes.

4.^o Dentro de los distintos polvos de graneros, el gluten es la fracción más activa; asimismo los diferentes glútenes como los del trigo y centeno se comportaban inmunológicamente igual.

Nosotros hemos realizado, sobre extractos antigénicos de polvo llevados a alta concentración, la separación de trece fracciones por electroforesis continua; las hemos recogido individualmente y con las mismas obtuvimos pruebas cutáneas de distinta intensidad en enfermos que tenían historias clínicas francamente positivas a polvo: de asma bronquial, rinitis y conjuntivitis.

MATERIAL Y MÉTODO.

La técnica analítica conocida como proceso continuo cumple, como quizá ninguna otra, tres postulados fundamentales en toda técnica analítica de importancia, y que son: separación, purificación y detección de los componentes de una mezcla compleja. De ahí que encaremos el estudio de este extracto con dicha técnica, que es la que en estos momentos nos puede hacer arribar a una conclusión más o menos cierta.

El material empleado fué un extracto de polvo de habitación de aproximadamente 20.000 unidades Stull-Cooke, que concentramos diez veces para obtener luego, en el goteo, suficiente cantidad de antígeno para la experiencia.

La concentración se hizo por deshidratación en bolsa

de papel celofán y en corriente de aire. El aparato con que se realizó la experiencia fué diseñado por uno de nosotros, trabajando a un voltaje de 270 voltios y 4 m. a. El papel cortina fué de 360 por 260 mm., y con 13 picos colectores de material, de la marca Schleichs Schüll 2.043 b. Se usó búffer de veronal-veronal sódico a pH 8,6 y fuerza iónica de 0,06. El desarrollo se efectuó durante ciento veinte horas (cinco días).

La solución búffer, así como los tubos colectores y hoja de papel de filtro, fueron previamente esterilizados para así precavernos, dentro de cierta medida, de probables infecciones al inyectar lo coleccionado.

RESULTADOS.

Los 13 tubos conteniendo solución búffer, y los principios constituyentes del extracto de polvo, fueron experimentados clínicamente y a la vez se comenzó el estudio químico para así conocer, dentro de las posibilidades de nuestro laboratorio, su composición química.

Del laboratorio.—Conocido es el hecho que la gran mayoría de los antígenos son proteínas por excelencia. Hacia esos constituyentes dirigimos nuestras experiencias, ya avaladas por anteriores, precipitando 5 ml. de extracto con 27 ml. de acetona, y comprobamos que este precipitado, sometido a la electroforesis sobre papel de filtro, presentaba varios constituyentes proteicos, siendo uno de ellos de migración catódica y los demás anódica (fig. 1).

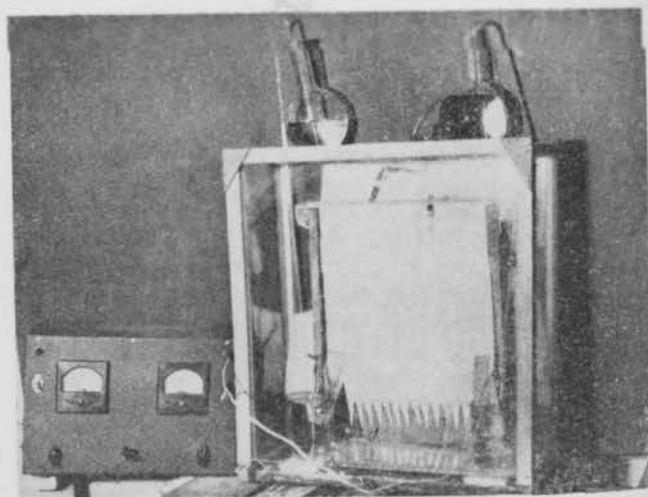


Fig. 1.

Interrumpido el proceso continuo, teñimos el papel con azul de bromo fenol y certificamos aquella experiencia anterior, pues una gran estela (trailing) se había orientado hacia el cátodo, correspondiendo dicha estela a los picos 10, 11 y 12.

Los tubos conteniendo los líquidos colectados fueron tratados con acetona para comprobar así la presencia o ausencia de proteínas. Usamos dicho solvente orgánico por ser enérgico deshidratante y precipitante de proteínas y que ya nos había evidenciado su bondad en las experiencias comentadas anteriormente (fig. 2).

Así pudimos comprobar que el tubo número 1 prácticamente permaneció límpido, demostrando

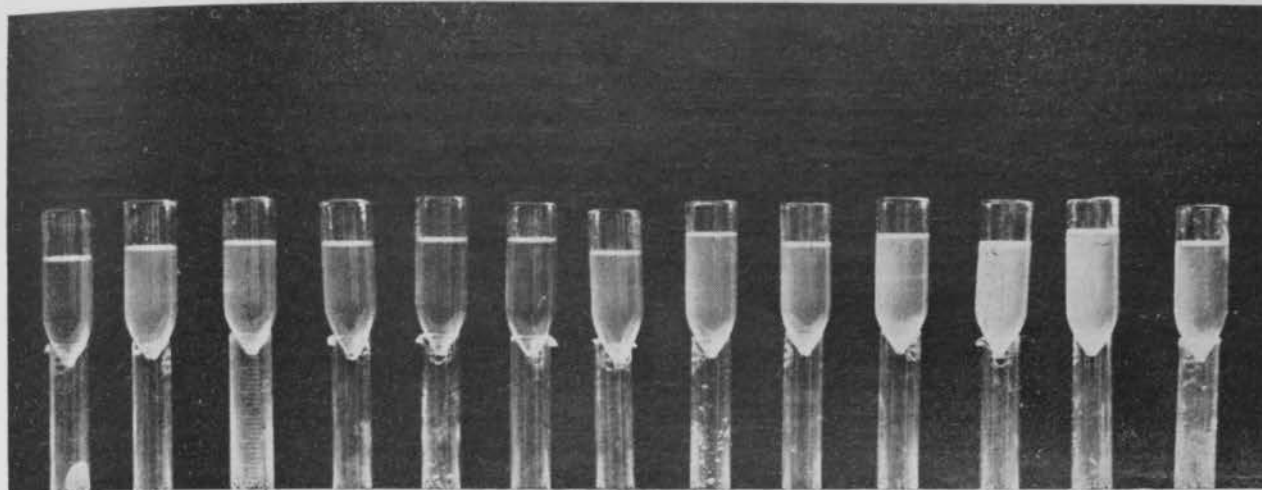


Fig. 2.

do ausencia de proteínas. Los tubos 2, 3 y 4 mostraron turbidez en orden decreciente, mientras que los números 5 y 6 permanecieron lípidos. A partir del número 7, la turbidez aumenta hasta el número 11, para decrecer sin desaparecer en el 12 y 13.

Experiencias similares con el ácido fosfotúngstico nos dieron idénticos resultados.

A efectos de tener una referencia, comparamos la separación del extracto de polvo con una de suero sanguíneo humano, y decimos que el mayor contenido proteico es el correspondiente al equivalente a la gamma globulina, que se sitúan en tubos equivalentes.

Los estudios desde el punto de vista químico se prosiguen con la identificación de los aminoácidos libres y los obtenidos por hidrólisis, así como también sobre el contenido de glucoproteínas.

OBSERVACIONES EN LA CLÍNICA Y COMENTARIOS.

Sobre un total de 11 enfermos que habían sido exhaustivamente estudiados, y a los cuales se les diagnosticaron afecciones alérgicas de etiología francamente a polvo, se efectuaron las pruebas cutáneas.

A raíz de que la cortina de papel sobre la cual se realizó la electroforesis continua estaba dividida en 13 picos colectores, se recogió lo obtenido de cada uno de ellos en tubos separados.

La testificación se inició con polvo concentrado (aproximadamente 20.000 unidades Stull-Cooke), dilución de trabajo 4.000 unidades, y luego las fracciones anteriormente citadas.

Las pruebas cutáneas logradas en la clínica no coincidieron con las pruebas que, a través del laboratorio, nosotros suponíamos encontrar, pues pensábamos que los tubos que contenían mayor cantidad de proteínas serían responsables de reacciones cutáneas de más intensa positividad.

Con el material obtenido de los tubos, en los cuales, por ejemplo, no había mayor cantidad de proteínas (tubos 3, 4 y 7) o mínimas cantida-

des (tubos 5 y 6), las reacciones cutáneas fueron marcadamente positivas; en cambio, aquellos tubos que mayor contenido proteico presentaron, como el 10, 11 y 12, dieron un promedio de positivities reducidas en las pruebas cutáneas.

Las pruebas de transferencia pasiva efectuadas con el contenido de los 13 tubos dieron resultados similares.

Estos hechos clínicos nos permiten formular los siguientes comentarios:

1.º No hubo correlación entre la cantidad de proteínas y la positividad de las pruebas cutáneas.

2.º A pesar de no haber sido probado químicamente, consideramos que hay diferencias cualitativas en las proteínas, basados únicamente en la ubicación que tomaron en el campo eléctrico.

3.º No podemos descartar que junto con la mínima cantidad de proteínas presentes en algunos de los tubos se encuentren otras sustancias que sean realmente las responsables de la intensa positividad de las pruebas cutáneas y que otros autores y nosotros aún no hayamos tenido en cuenta.

El estudio de avanzada mediante procesos continuos y el estudio químico cualitativo de cada uno de los tubos abre un inmenso campo de investigación a la inmunología. Indudablemente esta comunicación previa plantea un sinnúmero de interrogantes que el inmunólogo podrá contestar en trabajos futuros.

CONCLUSIONES.

Consideramos que con este método le hemos dado al inmunólogo, a través del laboratorio, la posibilidad de usar fracciones de antígenos complejos y con las cuales podrá estudiar las propiedades de los antígenos que reaccionan con los anticuerpos sensibilizantes cutáneos, los que forman el anticuerpo bloqueador y los que actúan en forma inespecífica.

RESUMEN.

Se considera que el antígeno del material conocido como polvo de habitación es uno de los de mayor complejidad y asimismo el de mayor incidencia etiológica en las alergias de tipo inhalatorias.

Con los métodos comunes para obtener extracto de polvo, y a través de la deshidratación en papel de celofán y al aire corriente, se lo lleva a altas concentraciones.

Se emplea un aparato para realizar procesos continuos, ideado por uno de nosotros (S. P.), y cuya descripción da todos los detalles técnicos. El papel cortina del mismo se divide, arbitrariamente, en 13 picos colectores.

Con el material recogido en cada uno de ellos se realizan las pruebas cutáneas en enfermos cuyas historias clínicas son francamente positivas para alergias inhalatorias a polvo y, en alguno de ellos, las pruebas de transferencia pasiva.

De las observaciones clínicas se deduce: la no coincidencia entre cantidad de proteínas e intensidad en la positividad de las pruebas cutáneas, la existencia de diferencias cualitativas en las proteínas, en razón a su migración en el campo eléctrico, y la posibilidad de que las responsables de esa positividad sean otras sustancias no tenidas en cuenta.

En conclusión, creemos haber dado un método de laboratorio de gran aplicación en la inmunología y en la clínica para separar fracciones de antígenos que se pueden recoger aisladamente para realizar los estudios de las distintas propiedades de los anticuerpos sensibilizantes cutáneos, bloqueadores e inespecíficos.

SUMMARY

It is thought that the antigen of the material known as household dust is one of the most complex type, and, in addition, the most frequent cause of allergy by inhalation.

A high concentration of this material was obtained by the usual methods of preparing dust extract by means of cellophane and air dehydration.

An apparatus devised by one of the writers (S. P.) was used to carry out continuous processes; its description in the text includes every technical detail. Its curtain paper is conventionally divided into 13 collecting peaks.

With the material obtained in each of these, skin tests were carried out on patients whose clinical histories disclosed a marked positive reaction of allergic type to dust. In some of them, passive transfer tests were performed.

From the clinical observations it was concluded that: there was no correlation between amount of protein and degree of positivity in skin tests; there were qualitative differences in proteins regarding migration in the electric field, and finally, the factors responsible for

positivity might be other substances not taken into account.

To sum up, writers believe that they have devised a laboratory method, extremely useful in immunology and clinical medicine, for the separation of antigen fractions which may be collected in isolation in order to carry out work on the different properties of skin sensitising, blocking and non-specific, antibodies.

ZUSAMMENFASSUNG

Das Antigen, welches im als Zimmerstaub bekannten Material enthalten ist, soll nicht nur eines der kompliziertesten darstellen, sondern auch bei den Allergien durch Einatmung ätiologisch das häufigste sein.

Mittels der gebräuchlichen Methoden zur Sammlung von Staubextrakt, durch Dehydratation in Zellophanpapier und in gewöhnlicher Luft werden hohe Konzentrierungen erreicht.

Es wird ein Apparat mit allen technischen Einzelheiten beschrieben, welcher von einem von uns (S. P.) zur Ausführung von fortlaufenden Verfahren erfunden wurde. Das als Vorhang dienende Papier ist willkürlich in 13 Sammelspitzen getrennt.

Mit dem in jeder Spitze gesammelten Material wurden Hautproben bei Patienten mit einer Krankengeschichte von offenkundig positiver Einatmungsallergie auf Staub angestellt und bei einigen auch passive Übertragungsproben durchgeführt.

Aus den klinischen Beobachtungen geht folgendes hervor: Es besteht kein Übereinstimmen von Proteinmenge und Intensität des Positivitätsgrades bei den Hautproben; es bestehen keine qualitativen Unterschiede zwischen den Proteinen bezüglich ihrer Fortbewegung im elektrischen Feld und es besteht die Möglichkeit dass andere, nicht in Betracht gezogene Substanzen ursächlich für diese Positivität verantwortlich sind.

Rückschliessend glauben wir eine Versuchsmethode von grosser Verwendungsmöglichkeit in Immunologie und Klinik zur Trennung von Antigenfraktionen welche einzeln aufgegriffen werden können erbracht zu haben, womit die verschiedenen Eigenschaften der kutan-sensibilisierenden, blockierenden und unspezifischen Antikörper studiert werden können.

RÉSUMÉ

On considère que l'antigène du matériel connu comme "poussière de chambre" est un des plus complexes et même d'une plus grande incidence étiologique dans les allergies type inhalatrices.

Avec les méthodes communes pour obtenir extrait de poussière, et à travers de la deshydratation sur papier célophane et à de hautes concentrations.

On emploie un appareil pour réaliser des processus continus, conçu par un de nous (S. P.), et dont la description donne tous les détails techniques. Son papier rideau se divise, arbitrairement, en 13 bacs collecteurs.

Dans chacun d'eux, avec le matériel recueilli, on réalise les preuves cutanées chez des malades dont les histoires cliniques sont franchement positives d'allergie inhalatrice de poussière et, dans certains, les preuves de transference passive.

Des observations cliniques on déduit: la non coïncidence entre quantité de protéines et intensité dans la positivité des preuves cutanées, l'existence de différences qualitatives dans les protéines en raison de leur migration dans le champ électrique, et la possibilité de que les responsables de cette positivité soient d'autres substances dont on n'ait pas tenu compte.

En conclusion, nous croyons avoir donné une méthode de laboratoire de grande application dans l'immunologie et en clinique pour séparer des fractions d'antigènes, que l'on peut recueillir isolément, pour réaliser les études des différentes propriétés des anticorps sensibilisants cutans, bloqueurs et non spécifiques.

SOBRE EL COMPORTAMIENTO DE LA ONDA U Y DEL ESPACIO TU EN LA HIPERTENSION ARTERIAL (*)

J. VARELA DE SELJAS, M. FERNÁNDEZ ARENAS
y A. ESQUIVEL JIMÉNEZ.

Instituto de Investigaciones Clínicas y Médicas. Instituto Nacional de Cardiología. Madrid.

En un trabajo anterior¹ señalamos la frecuencia con que la onda U y el espacio TU se alteran en la hipertensión arterial. Se partía en dicho trabajo de la revisión de trazados electrocardiográficos, hallando que con gran frecuencia las alteraciones de la onda U y del espacio TU se presentaban en casos de hipertensión arterial. Ahora nos ha parecido que podría tener interés estudiar en los casos existentes de hipertensión el comportamiento de la onda U y del espacio TU, considerando el electrocardiograma, el grado de alteración vascular (según las modificaciones del fondo de ojo), las alteraciones hemodinámicas consecutivas a la hipertensión y el grado de alteración renal.

Del trabajo anterior sacamos la impresión de que las alteraciones de la onda U y del espacio TU eran independientes de otras alteraciones electrocardiográficas asociadas con la hipertensión, y que en muchos casos la onda U y el es-

pacio TU se podrían alterar precozmente y que además de su valor diagnóstico tenían cierto valor pronóstico. Esto coincide en parte con afirmaciones de otros autores².

MÉTODOS.

Para el presente estudio hemos seleccionado 81 casos de hipertensión arterial, todos ellos bien estudiados, en los que se pudo enjuiciar con unidad de criterio las alteraciones del fondo de ojo, alteraciones electrocardiográficas y afectación renal.

Las alteraciones de fondo de ojo se clasificaron, según el criterio de KEITH y WEGENER³, en cuatro grupos. Grupo I, estrechamiento ligero o esclerosis de las arterias retinianas; los casos con fondo de ojo normal se incluyeron también en este grupo. Grupo II, esclerosis moderada o avanzada de las arterias retinianas con aumento del reflejo a la luz y compresión de las venas en los entrecruzamientos arteriovenosos: signo de GUNN. Grupo III, retinitis angioespástica con exudados y/o hemorragias. Grupo IV, retinitis angioespástica con exudados o hemorragias y edema papilar.

Las alteraciones del electrocardiograma se dividieron en cuatro grupos. Grupo I, trazado normal (en lo referente a los componentes normales del electrocardiograma sin tener en cuenta el estado de la onda U y del espacio TU). Grupo II, trazados con R alta y/o T aplana-da que excedían los límites señalados por KOSMAN y JOHNSTON⁴ o con una relación R : T mayor que 10 : 1. Grupo III, trazados con depresión del segmento ST, atribuible a la hipertensión. No se incluyeron aquellos casos en los que existía o se sospechaba efecto digitalico. Grupo IV, trazados con un patrón de predominio y sobrecarga ventricular izquierda en las derivaciones precordiales. En este grupo se incluyeron seis casos con bloqueo intraventricular.

Tres casos de fibrilación auricular, en los cuales la onda U era claramente visible, pese al trastorno del ritmo, se incluyeron en el grupo correspondiente, de acuerdo con las alteraciones del complejo ventricular.

El grado de insuficiencia cardíaca se valoró dividiendo los casos en cuatro grupos. Grupo I, casos bien compensados. Grupo II, casos con taquicardia, dilatación cardíaca y/o hipertrofia. Grupo III, casos en que a las alteraciones del grupo anterior se sumaban estertores finos en bases pulmonares y/o edemas maleolares. Grupo IV, casos con insuficiencia cardíaca congestiva.

El tamaño radiológico de la silueta cardíaca se estudió en oblicua anterior izquierda, dividiendo los resultados en cuatro grupos. Grupo I, silueta cardíaca de tamaño normal. Grupo II, el borde del ventrículo izquierdo se proyecta sobre los cuerpos vertebrales. Grupo III, el borde del ventrículo izquierdo llega hasta la punta de las apófisis espinosas. Grupo IV, el borde del ventrículo izquierdo sobrepasa la punta de las apófisis espinosas.

La función renal se estudió mediante la prueba del aclaramiento ureico de Van Slyke y análisis del sedimento urinario. Los casos con alteraciones urológicas se estudiaron más detenidamente, utilizando pruebas de excreción y la urografía. Dividimos los resultados en tres grupos. Grupo I, casos en los que las cifras de aclaramiento eran superiores al 60 por 100. Grupo II, casos en los que las cifras del aclaramiento oscilaban entre un 30 y un 60 por 100. Grupo III, casos con cifras inferiores al 30 por 100. El sedimento urinario se consideró patológico por la presencia de albúmina, cilindros granulosos y hematias.

Partiendo de las cifras de la presión arterial diastólica se hicieron dos grupos: casos con presión diastólica inferior a 115 mm. Hg. y casos con presión diastólica superior a 115 mm. Hg.

RESULTADOS.

Tomando como base de estudio cada uno de los grupos mencionados, el comportamiento de la onda U y del espacio TU fué el siguiente:

(*) Presentado en el III Congreso Nacional de Medicina Interna. Madrid, junio 1958.