

## ESTUDIO ELECTROFORETICO DE LAS PROTEINAS SERICAS DE BOVINOS CON LINFOSARCOMA\*

Luis Rafael Neira R.; Fernando Lozano A.; Olga Mariño J.\*\*

### 1. INTRODUCCION

En Colombia se desconoce casi totalmente, en el campo de la Medicina Veterinaria, el valor de la separación electroforética de las proteínas séricas como ayuda diagnóstica y en las escasas ocasiones en que se utiliza, se hace como un examen sofisticado y complejo, sin tener en cuenta que puede utilizarse dentro de las pruebas rutinarias de los laboratorios clínicos.

\* Contribución del Programa Patología-Toxicología, División de Ciencias Veterinarias, Instituto Colombiano Agropecuario ICA.

\*\* Respectivamente: Médico Veterinario M.S. Programa de Patología, Médico Veterinario Zootecnista M.S.; Ph.D., Servicio Nacional de Diagnóstico, y Microbióloga Ph.D. Programa Enfermedades Infecciosas. Laboratorio de Investigaciones Médicas Veterinarias A.A. 29743 Bogotá.

En Medicina humana se han establecido los patrones electroforéticos de las proteínas séricas para algunas entidades patológicas dentro de las cuales se incluye la leucemia linfocítica humana (3).

En Medicina Veterinaria existen estudios que han demostrado alteraciones de las proteínas séricas de bovinos con linfoma, dependiendo del estado evolutivo de la enfermedad (5,6).

La finalidad del presente trabajo fue la de estudiar electroforéticamente las alteraciones que presentan las proteínas séricas de bovinos enfermos de linfoma y dar a conocer el valor de esta técnica como ayuda diagnóstica para esta enfermedad.

### 2. REVISION DE LITERATURA

El suero sanguíneo humano es separado rutinariamente en cinco bandas diferentes por las técnicas electroforéticas estandarizadas, usadas en la mayoría de la

laboratorios clínicos. Las fracciones individuales han sido llamadas: Albúmina, Alfa-1 Globulina, Alfa-2 Globulina, Beta Globulina y Gamma-Globulina (3,8). En las distintas especies animales varía la movilidad de la albúmina y de las diferentes globulinas. El suero bovino es separado generalmente en cuatro bandas simples: albúmina, alfa, beta y gamma globulinas, aunque algunos reconocen la diferenciación de la zona gamma en gamma-1 y gamma-2 (4, 5, 10, 11).

### 2.1 Albúmina

Se ha demostrado que **el hígado es el principal sitio de síntesis de la albúmina**. Es importante como un factor nutricional en el metabolismo protéico en los tejidos. **Su función mas importante bajo las condiciones vasculares normales es la estabilización del volumen sanguíneo y la regulación del cambio de fluidos intra y extravascular.** La fracción albúmina migra como una banda simple y compacta con el mayor movimiento hacia el anodo y casi siempre está patológicamente disminuída en enfermedades que afectan su metabolismo. La deficiencia crónica de proteína, las alteraciones en la síntesis y la excesiva pérdida debida a permeabilidad vascular alterada, deberán ser consideradas en el diagnóstico diferencial. En algunos casos de deficiencia renal aguda con hipoalbuminemia, los niveles bajos parecen resultar de una redistribución temporal de la albúmina sérica en el tejido intersticial (2,3). En los bovinos adultos, el promedio normal de la fracción albúmina es de 41.2% (11).

### 2.2 Alfa-Globulina

En el suero sanguíneo humano, esta fracción es separada rutinariamente en

dos bandas prominentes, denominadas alfa-1 y alfa-2 globulinas.

La banda alfa-1 globulina está compuesta de una mezcla heterogénea de proteínas y cerca del 90% pueden ser consideradas en los tres principales componentes, los cuales han sido designados: alfa-1 lipoproteína, alfa-1 antitripsina y ácido glicoproteínico (orosomucoide).

Electroforéticamente, la fracción alfa-1 globulina es la segunda migración anodal. El promedio normal en humanos adultos es de 3.4%.

Esta fracción está casi siempre aumentada patológicamente en inflamaciones crónicas, enfermedades degenerativas crónicas y neoplasias malignas. Parece que el ácido glicoproteínico (orosomucoide) es el responsable de la elevación de esta fracción (3,8).

La banda alfa-2 globulina parece ser mas heterogénea que las demás fracciones. Tres de los principales componentes parecen representar cerca del 80% de esta fracción. Estos componentes han sido designados alfa-2 macroglobulina, alfa-2 lipoproteína y haptoglobulina. Entre otros componentes importantes la ceruloplasmina, una glicoproteína unida al hierro con actividad de oxidasa, la cual se ha encontrado deficiente en degeneración hepatolenticular (Enfermedad de Wilson). La colinesterasa, otro componente, existe por lo menos en cinco fenotipos. Electroforéticamente, la fracción alfa-2 globulina es la tercera en la migración anodal. El promedio normal en humanos adultos es de 8.0% y está casi siempre patológicamente elevada en procesos inflamatorios agudos, destrucción de tejidos, necrosis,

permeabilidad vascular alterada y neoplasia (3). En el suero sanguíneo bovino la fracción alfa-globulina forma una sola banda, es la segunda en la migración anodal y tiene un promedio de concentración en los animales adultos de 12.90/o (11).

### 2.3 Beta-Globulina

El 90/o de esta fracción involucra los principales componentes: beta-lipoproteínas, transferrina, hemopexina, plasminógeno, componentes del complemento y beta-2 glicoproteínas I y II. En esta fracción han sido identificados varios de los factores de la coagulación. Electroforéticamente la fracción beta-globulina es la cuarta en la migración anodal. La concentración promedio normal en humanos adultos es de 9.50/o y rara vez está significativamente alterada cuando se evalúa con las coloraciones rutinarias. Es más factible que esté alterada en asocio con disturbios de gamma-globulinas que debido a cambios en su componente principal no lipoprotéico. Se ha encontrado depresión prominente de la fracción c-3 de complemento en glomerulonefritis aguda, lupus nefrítico y lupus eritematoso sistémico. La fracción C-4 del complemento se ha encontrado disminuída en edema angioneurótico (3). En el suero de bovinos adultos la concentración promedio normal de la fracción beta-globulina es de 11.80/o y es la tercera banda en la migración anodal (11).

### 2.4 Gamma-Globulina

Recientemente se ha tratado de establecer una nomenclatura internacional para su designación y así fueron adoptados los símbolos: (  $\gamma$  ) para gamma-globulinas (inespecíficos) e Ig para inmu-

noglobulinas pero actualmente los dos se utilizan indistintamente. Cada molécula (monómero) consta de cuatro cadenas polipeptídicas, dos pesadas y dos livianas, unicas por puentes disulfuro y uniones no covalentes. Las dos cadenas livianas comunes para todas las principales clases, son de tipo designados Kappa (  $\kappa$  ) y Lamda (  $\lambda$  ).

151-2

Las cadenas pesadas son inespecíficas para cada clase y han sido designadas gamma (  $\gamma$  ) para IgG, (  $\alpha$  ) para IgA, (  $\mu$  ) para IgM y (  $d$  ) para IgD, las cuatro más importantes clases de gamma-globulinas que representan más del 990/o de la fracción (2,3). La fracción gamma puede contener una quinta inmunoglobulina designada IgE.

La hormona tiroideoestimulante y el factor estabilizador de la fibrina, parecen estar presentes en la fracción gamma (3). Un disturbio específico de una clase de gamma-globulina resultará en una elevación o disturbio en el pico máximo del componente. Una elevación heterogénea (policlonal) de todas las clases o formas moleculares de una clase, causará una obliteración de las áreas de relativamente baja densidad entre las fracciones gamma y beta y en algunos casos entre las bandas beta y alfa-2. En neoplasias primarias del tejido linfoplasmocítico, la proteína producida es usualmente homogénea (respuesta monoclonal) y aparece como una banda angosta, usualmente en la región de migración de gamma-globulinas normales. Sin embargo, hay excepciones para cada situación. Valores bajos se encuentran en agammaglobulinemia congénita e hipogammaglobulinemia, así como en hipogammaglobulinemias secundarias debido a interferencia con el sistema retículo endo-

telial. La concentración promedio normal en humanos adultos es de 12.6% (3,8). En el suero de bovinos adultos el promedio normal de la fracción gammaglobulina es de 34.1% dentro de la cual se han identificado tres clases antigénicas distintas, IgG, IgA e IgM y se considera inminente la presencia de IgE (1, 4, 10, 11).

### 3. MATERIALES Y METODOS

Los sueros utilizados en este estudio fueron obtenidos de 87 bovinos Holstein de 3 a 6 años de edad, clínicamente normales, de una finca lechera del municipio de Sopó donde se han presentado casos clínicos de linfosarcoma y de siete bovinos que llegaron al Laboratorio de Investigaciones Médicas Veterinarias del ICA con diagnóstico clínico de linfosarcoma, los cuales fueron posteriormente sangrados y sacrificados, comprobándose por necropsia e histopatología la presencia de la forma adulta de linfosarcoma bovino. Los bovinos fueron sangrados mediante punción yugular, tomándose alícuotas de 10 ml de sangre sin anticoagulante para la obtención de los respectivos sueros.

#### 3.1 Presencia de Anticuerpos

Los anticuerpos séricos específicos contra el virus del linfosarcoma bovino se detectaron mediante la prueba de inmunodifusión en gel de agar (7), utilizando la glicoproteína gp58 del virus como antígeno específico\*. Para cada muestra se utilizaron sueros controles positivos y negativos y de acuerdo con la presencia o no de anticuerpos se conformaron dos gru-

\* Pitman Moore, Inc, Washington Crossing, N.J. 08560

pos de animales: I (sin anticuerpos) y II (con anticuerpos). Los bovinos a los cuales se les comprobó linfosarcoma por necropsia e histopatología, conformaron el grupo III.

#### 3.2 Proteínas Séricas Totales

Las proteínas séricas totales se determinaron mediante el sistema de refracción de la luz, para lo cual se utilizó el refractómetro de Golber\*. Los valores resultantes se expresaron en mg/dl.

#### 3.3 Fraccionamiento Electroforético

Para la evaluación de los diferentes componentes proteínicos del suero se utilizó la técnica de electroforesis en tiras de acetate celulosa. La cuantificación de cada fracción se realizó mediante el análisis densitométrico y su respectiva graficación con el equipo Digiscreen Scanner-R\*\*. Cada muestra se trabajó por duplicado y los valores para cada fracción proteínica se expresaron como porcentajes del total de las proteínas; luego se convirtieron en cantidades absolutas (mg/dl), se promediaron y se determinaron las desviaciones standard para cada grupo.

## 4. RESULTADOS Y DISCUSION

### 4.1 Presencia de Anticuerpos

De los 87 bovinos procedentes de la finca problema se obtuvieron los siguientes resultados: En 26 animales no se de-

\* T.S. Meter, American Optical Company, Buffalo, New York

\*\* Gelman Instrument Company, P.O. Box 1448, Ann Arbor, Michigan.

tectaron anticuerpos específicos contra el virus del linfoma bovino y estos animales conformaron el grupo I. El grupo II lo constituyeron los 61 animales restantes, los cuales presentaron anticuerpos específicos contra el virus del linfoma bovino. Los siete bovinos en los cuales se comprobó linfoma bovino por necropsia e histopatología también presentaron anticuerpos específicos contra el virus del linfoma bovino y constituyeron el grupo III.

La presencia de anticuerpos específicos contra el virus del linfoma bovino en un animal, significa necesariamente contacto con el virus. Como aun no existen vacunas contra el linfoma bovino es lógico suponer que donde se presenten

animales con anticuerpos, existe el virus, produciendo o no (portadores sanos) la enfermedad. Por otra parte, se sabe que las formas juvenil, tímica y cutánea del linfoma bovino no inducen la formación de anticuerpos (9); por lo tanto, aunque actualmente se considera el diagnóstico serológico como el más apropiado, es necesario recurrir a otras pruebas diagnósticas para confirmar la presencia de la enfermedad.

#### 4.2 Proteínas Séricas Totales

Las concentraciones de proteínas séricas totales de los grupos de bovinos I, II y III (Tabla 1) se presentan promediadas y con una desviación standard.

**TABLA 1. FRACCIONAMIENTO ELECTROFORETICO DE LAS PROTEINAS SERICAS EN BOVINOS. GRUPO I: CONTROL, GRUPO II: SEROLOGICAMENTE POSITIVOS AL VIRUS DEL LINFOSARCOMA BOVINO. GRUPO III: ENFERMOS DE LINFOSARCOMA**

Grupo	No. de Bovinos	Albumina		GLOBULINAS						Proteína Total
				ALFA		BETA		GAMMA		
		o/o	mg/dl	o/o	mg/dl	o/o	mg/dl	o/o	mg/dl	
I	26		3059.50		904.09		814.36		2779.74	7557.69
		40.48	±	11.96	±	10.78	±	36.78	±	±
			39.86		99.90		110.74		477.75	452.70
II	61		2786.56		1156.41		835.41		2867.52	7645.90
		36.45	±	15.12	±	10.93	±	37.50	±	±
			379.45		168.42		185.48		341.71	515.94
III	7		2874.23		1410.63		781.98		2033.16	7100.00
		40.42	±	19.96	±	11.12	±	28.69	±	±
			779.24		581.46		217.16		739.35	1683.25

El contenido promedio de proteínas séricas totales establecido internacionalmente para los bovinos es de 7000 mg/dl (11). Trabajos recientes indican que dependiendo del estado evolutivo del linfoma bovino se forman proteínas anormales (paraproteínas), de naturaleza gamma G, que pueden ser demostradas por inmunoelectroforesis (6), pero generalmente sin modificar el contenido proteico total del suero. Las variaciones observadas en el contenido de proteínas séri-

cas totales en los tres grupos (Fig. 1), nos demuestra que aunque puede presentarse alguna elevación en caso de linfoma, no debe considerarse como un parámetro de mucho valor en el diagnóstico de esta enfermedad puesto que se presentan variaciones individuales, dependiendo no solo del estado evolutivo de la enfermedad sino de cualquier otro factor fisiológico o patológico que pueda alterar el contenido proteico total del suero.

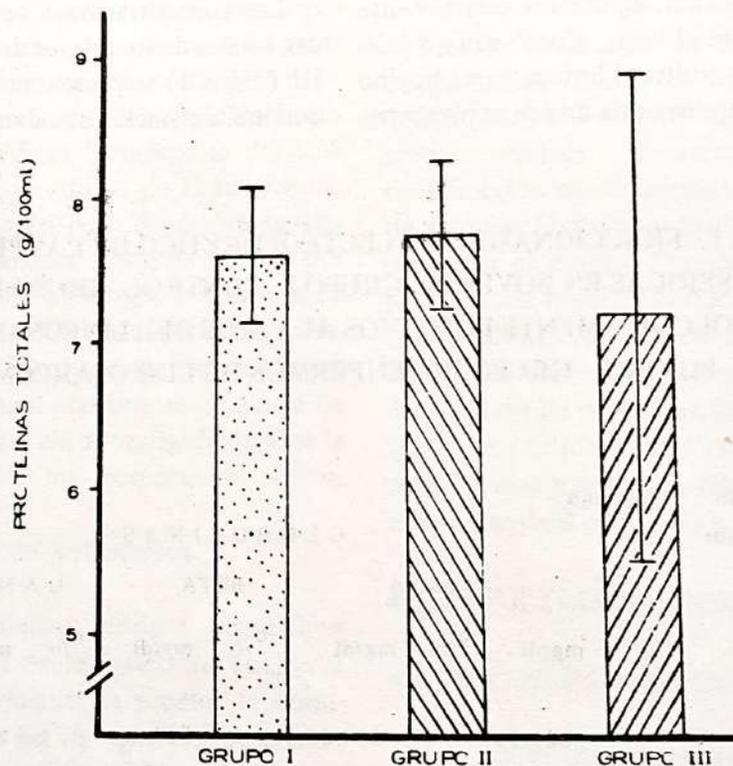


FIGURA 1 Concentración de las proteínas séricas totales en tres grupos de bovinos Holstein. Grupo I: Control; Grupo II: Serológicamente positivos al virus del linfoma bovino; Grupo III: Enfermos de linfoma.

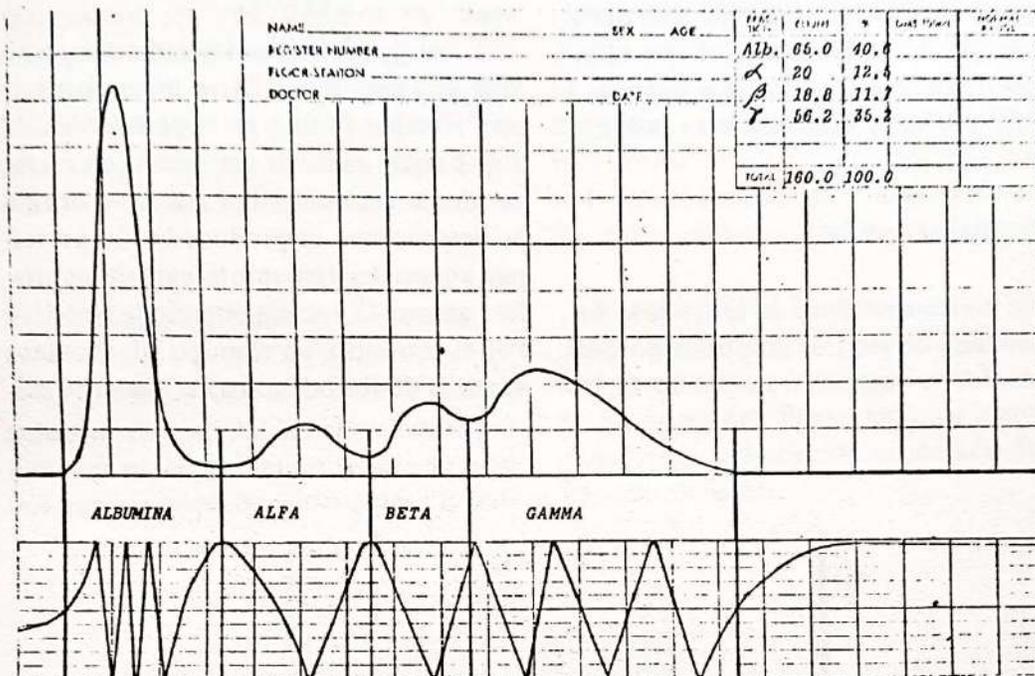


Figura 2. Graficación y cuantificación electroforética de las proteínas séricas de un bovino Holstein adulto del grupo control

### 4.3 Fraccionamiento Electroforético

Con la técnica electroforética utilizada en este trabajo, el suero de los bovinos se separó en cuatro bandas simples: albúmina, alfa, beta y gamma-globulinas; las cuales fueron graficadas y cuantificadas (Figura 2). La albúmina y las diferentes globulinas (Tabla 1), se presentan para cada grupo como porcentajes promedios y su conversión a cantidades absolutas (mg/dl).

#### 4.3.1 Albúmina

Llama la atención el ligero descenso que presentó esta fracción en el grupo II (Figura 3). Esta disminución se puede re-

lacionar con el hecho de que el haber un incremento en cualquiera de las fracciones globulínicas, lo hace inicialmente a expensas de la albúmina (6). En los bovinos de los grupos I y III, la fracción albúmina se encontró dentro de los valores normales dados para los bovinos (Tabla 1).

#### 4.3.2 Alfa-Globulina

En el grupo I, la fracción alfa-globulina se encontró dentro de los valores normales (Tabla 1). En los bovinos que presentaron anticuerpos específicos contra el virus del linfoma (grupo II) se apreció un aumento moderado de esta fracción, el cual se hizo mucho más evidente en los

bovinos muertos de linfosarcoma (grupo III) (Figura 4). Esta alteración de la fracción alfa-globulina es similar a la del patrón electroforético descrito por Kelsey (3) para la leucemia linfóide humana y parece que en linfosarcoma bovino el incremento de esta fracción es progresivo a medida que va evolucionando la enfermedad.

#### 4.3.3 Beta-Globulina

Las concentraciones de la fracción beta-globulina de los tres grupos de bovinos estudiados se mantuvieron dentro de los

valores normales dados para los bovinos (Tabla 1, Figura 5).

#### 4.3.4 Gamma-Globulina

En el grupo II (serológicamente positivos) se presentó un ligero incremento de esta fracción (Tabla 1), al parecer debido a que según estudios anteriores (6), en los estados iniciales del linfosarcoma bovino se desencadena la producción de proteínas anormales (paraproteínas) de naturaleza gamma-G, incrementando la fracción. Por el contrario, en el grupo III, (bovinos muertos de linfosarcoma) se presentó dis-

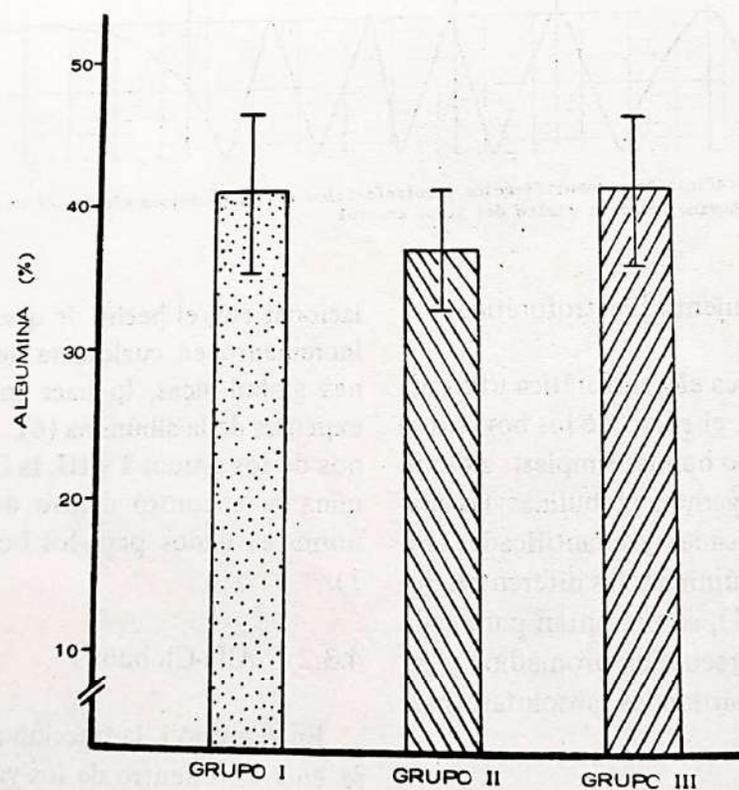


FIGURA 3 Concentración de la fracción albúmina en tres grupos de bovinos Holsteins. Grupo I: Control. Grupo II: Serológicamente positivos al virus del linfosarcoma bovino. Grupo III: Enfermos de linfosarcoma

minución marcada de la fracción gamma-Globulina (Figura 6) reflejándose así la acción inmunodepresora a nivel humoral del virus del linfoma bovino (12), la cual parece ser mas evidente en casos avanzados o finales de la enfermedad. Esta disminución de la fracción gamma-globulina es otro de los componentes del patrón electroforético descrito por Kelsy (3) para la leucemia linfocítica humana.

## 5. CONCLUSIONES

El principal objetivo de este trabajo consistió en estudiar las alteraciones presentadas en las proteínas séricas de bovinos con presencia de anticuerpos específicos

contra el virus del linfoma y de bovinos clínicamente e histológicamente enfermos de linfoma, mediante el fraccionamiento electroforético y su cuantificación. Al comparar los resultados de estos grupos con los del grupo de bovinos sin anticuerpos (grupo I), se establecieron dos clases de alteraciones en el perfil electroforético de los bovinos infectados con el virus del linfoma, dependiendo de la fase evolutiva de la enfermedad.

El primero, en los bovinos serológicamente positivos pero aparentemente sanos, consistió en la elevación moderada de las fracciones alfa-globulina y gamma-globulina y disminución moderada de la fracción albúmina.

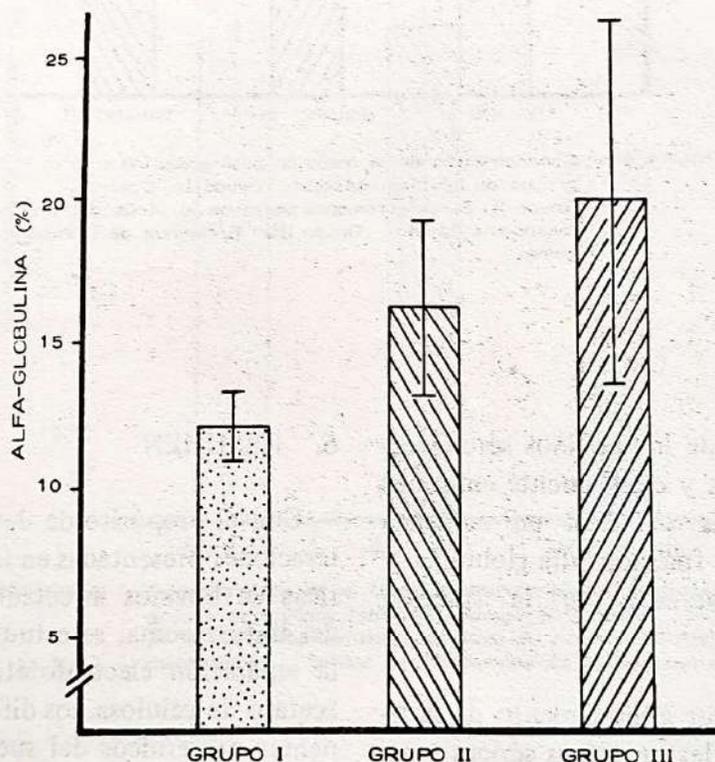


FIGURA 4 Concentración de la fracción alfa-globulina en tres grupos de bovinos Holstein. Grupo I: Control. Grupo II: Serológicamente positivos al virus del linfoma bovino. Grupo III: Enfermos de linfoma.

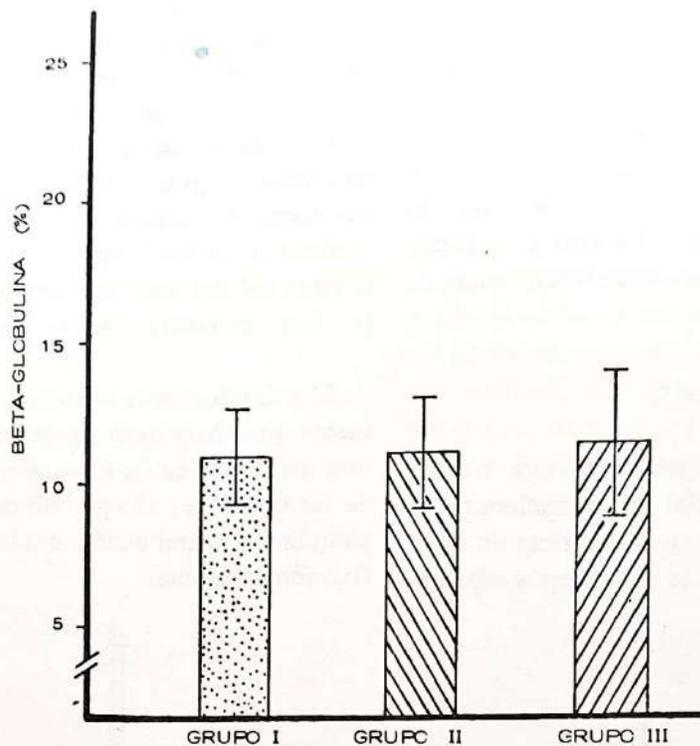


FIGURA 5 Concentración de la fracción beta-globulina en tres grupos de bovinos Holstein. Grupo I: Control. Grupo II: Serológicamente positivos al virus del linfoma bovino. Grupo III: Enfermos de linfoma.

El segundo de los bovinos serológicamente positivos y clínicamente enfermos de linfoma consistió en aumento marcado de la fracción alfa-globulina y disminución marcada de la fracción gamma-globulina.

Con un mayor conocimiento de la fisiopatología de las proteínas séricas y estandarizando correctamente el patrón electroforético, se puede utilizar en nuestro medio esta técnica como un sistema confiable de ayuda en el diagnóstico del linfoma bovino.

## 6. RESUMEN

Con el propósito de determinar las alteraciones presentadas en las proteínas séricas de bovinos infectados con el virus del linfoma, se estudiaron mediante la separación electroforética en tiras de acetato de celulosa, los diferentes componentes proteínicos del suero de 61 bovinos serológicamente positivos al virus del linfoma y clínicamente normales (grupo II), de siete bovinos positivos al virus del linfoma presentando clínicamente la forma adulta de la enfermedad

(grupo III) y de un grupo de 26 bovinos serológicamente negativos al virus del linfoma sanos (grupo I). Se demostró que dependiendo de la fase evolutiva de la enfermedad se presentan alteraciones características.

En el grupo II hubo aumento de las fracciones alfa y gammaglobulinas con li-

geros descenso de la albúmina. En el grupo III, fue mas notorio el incremento de la fracción alfa globulina y por el contrario la fracción gamma-globulina presentó una disminución marcada. En los bovinos del grupo I los valores para cada fracción se encontraron dentro de los patrones normales.

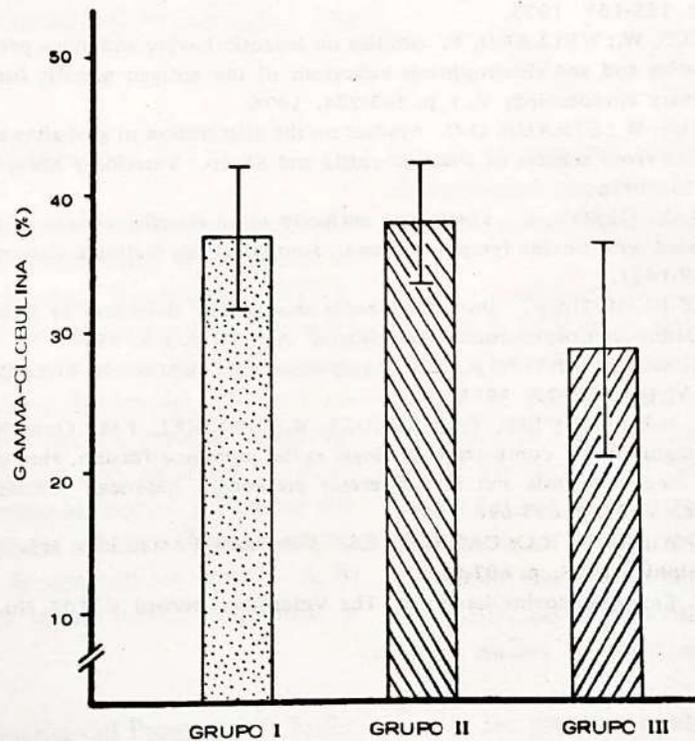


FIGURA 6 Concentración de la fracción gamma-globulina en tres grupos de bovinos Holstein. Grupo I: Control. Grupo II: Serológicamente positivos al virus del linfoma bovino. Grupo III: Enfermos de linfoma.

## BIBLIOGRAFIA

1. BUTLER, J.E. Review of the bovine immunoglobulins. *Journal of Dairy Science*, V. 54, p. 1315-1316. 1971.
2. GANONG, W.F. Review of Medical Physiology 6th ed. Lange Medical Publications. San Francisco. 1973. p. 830-832.
3. KELSEY, R.L. Interpretation of routine electrophoresis patterns of serum proteins in health and disease. *Clinical Electrophoresis*. Masonic Medical Center. Illinois. p. 5-34 1971.
4. LOWENSTEIN, H.; BEJERUM, O.J.; WEEKE, E.; WEEKE, B. Characterization of bovine whey proteins by crossed immunoelectrophoresis. *Scandinavian Journal of Immunology* V. 4, p. 155-161. 1975.
5. MATTHAEUS, W.; WELLAND, F. Studies on leucotic bovine and ovine precipitating serum antibodies and the electrophoresis behaviour of the antigen specific for leucotic cattle. *Veterinary Microbiology* V. 1, p. 263-274. 1976.
6. MATTHAEUS, W.; STRAUB, O.C. Studies on the distribution of globulins and on abnormal globulins from serums of leucotic cattle and Sheep. *Veterinary Microbiology* V. 1, p. 363-373. 1976.
7. MILLER, J.M.; OLSON, C. Precipitating antibody to an internal antigen of the C-type virus associated with bovine lymphosarcoma. *Journal of the National Cancer Institute* v. 49, p. 1459-1461.
8. MILLIPORE BIOMEDICA. Immunoglobulin abnormality detection by immunoelectrophoresis. Millipore Corporation. Massachusetts. Ar. 710, p. 1-3. 1974.
9. OLSON, C.; BAUMGARTNER, L.E. Lymphosarcoma (Leukemia) of cattle. *Bovine Practitioner* V. 10. p. 15-22. 1975.
10. PFEIFFER, N.E.; MCGUIRE, T.C.; BENDEL, R.E.; WEIKEL, J.M. Quantitation of bovine immunoglobulins: comparison of single radial immunodiffusion, zinc sulfate turbidity, serum electrophoresis and refractometer methods. *American Journal of Veterinary Research* V. 38, p. 693-698. 1977.
11. SCHAIM, O.W.; JAIN, N.C; CARROL, E.J. *Veterinary Hematology* 3rd. Lea and Febiger Philadelphia. 1975. p. 602-616.
12. TYLER, L. Enzootic Bovine Leucosis. *The Veterinary Record* V. 103, No. 10, p. 194-198. 1978.