

# DETERMINACION DE LA SERINA Y LAS GLOBULINAS ALFA, BETA Y GAMA EN EL SUERO SANGUINEO, POR METODOS QUIMICOS

CIFRAS NORMALES EN NUESTRO MEDIO

MANUEL MORANTE MIRANDA.

## INTRODUCCION

Dada la trascendencia que cada día está tomando en la apreciación clínica de los procesos morbosos, los resultados obtenidos en el Laboratorio y los cambios radicales que se están obteniendo con los nuevos adelantos, en lo que se refiere a la importancia de determinados análisis, para el diagnóstico, pronóstico y adecuada terapéutica de los enfermos, es que el estudiante y el médico sienten una inquietud cada día mayor hacia la bioquímica y dentro de ésta hacia la obtención de técnicas que permitan efectuar dosajes importantes con métodos exactos y sencillos para su aplicación en el uso cotidianos de la práctica hospitalaria.

Hasta hace poco tiempo se consideraba que la sangre contenía tres tipos de proteína o mejor dicho que las proteínas sanguíneas eran solamente: el fibrinógeno, la serina y la globulina; esto en el plasma. En el suero en el que se ha eliminado el fibrinógeno sólo quedarían la serina y la globulina; pero con el advenimiento de la electroforesis se ha visto que la globulina no es solamente una sino que tiene 3 fracciones (alfa, beta, gama) que sufren variaciones en su proporción según los diferentes estados patológicos sin que exista cambio manifiesto en la cifra total de proteínas y en algunos casos ni siquiera la cifra total de globulinas, por todo lo cual es muy importante determinar estas fracciones.

Pero como decía no hace mucho MACLAGAN refiriéndose a la gama-globulina "el método electroforético no es asequible por ahora para su uso clínico y hay que insistir en la conveniencia de dis-

poner de un medio sencillo para demostrar un exceso de esta proteína" es prácticamente imposible, sobre todo en nuestro medio; el efectuar dosajes fraccionados de proteínas por la electroforesis y ello me ha inclinado a realizar este trabajo en el que se pone de manifiesto que por un método químico sencillo y al alcance de cualquier laboratorio escasamente equipado se puede llegar a saber en qué cantidad se encuentran estas fracciones proteicas tan importantes a la luz de los conocimientos actuales.

El método que he empleado además de que con él se puede llegar al conocimiento del porcentaje de las fracciones globulínicas; tiene la ventaja de ser también aplicable, cuando sólo se quiere determinar la cifra total de proteínas o la cantidad de serinas y globulinas; que, es lo que con más frecuencia solicitan actualmente los clínicos y cirujanos; y que, según la experiencia obtenida en el Laboratorio Central del Ejército, donde ha sido controlado con métodos como el micro-Kjeldahl, demuestra tener bastante exactitud.

En este primer trabajo he efectuado 50 determinaciones en sujetos aparentemente sanos con la finalidad de encontrar las cifras promedio normales en nuestro medio, dejando para un trabajo posterior la determinación en procesos patológicos generales y en especial en enfermedades propias de nuestro medio como la Anemia de Carrión.

Vayan en estas primeras páginas mi agradecimiento al Profesor Dr. Alberto Guzmán Barrón que me ha dirigido en la confección del presente trabajo y me ha brindado los medios y las facilidades necesarias para llegar a terminarlo. También agradezco al personal Profesional y subalterno del Laboratorio Central del Ejército que en todo momento brindó su colaboración.

Igualmente, mi agradecimiento al personal del Laboratorio del Hospital Daniel A. Carrión, por las facilidades brindadas.

Mi reconocimiento y gratitud a las personas que han ayudado a la mejor presentación de este trabajo.

#### MÉTODOS EMPLEADOS

En este capítulo se consignan las condiciones del trabajo, en lo que se refiere a los sujetos en los que se han efectuado las determinaciones y la técnica seguida con su fundamento.

### 1º Muestras:

Para este trabajo se han extraído las muestras a los soldados que concurren al Banco de Sangre del Hospital Militar San Bartolomé, como donadores para dicho Banco; sujetos, que periódicamente son revisados y que aún más, antes de ir al Laboratorio como donadores son seleccionados en forma minuciosa por el médico de la Unidad correspondiente; como los más aptos para tal fin por su peso y talla; y de acuerdo con la vigilancia de su estado de salud que en ellos se ha controlado.

A estos individuos al llegar al Banco se les hace un historia clínica (que se encuentran en los archivos de ese Servicio), sobre procesos morbosos anteriores en especial de enfermedades infecto-contagiosas, venéreas y procesos alérgicos típicos; siendo descartados todos aquellos que representan algún peligro para el futuro receptor.

Por tener este estudio la finalidad de encontrar las cifras promedio normales, hemos sido aún más exigentes en la selección de los sujetos y por ello, sólo se ha extraído la muestra a los individuos que por lo menos desde hacía dos años no habían sufrido ninguna enfermedad infecto-contagiosa ni habían presentado nunca proceso alérgico alguno; por todo esto podemos decir que los dosajes han sido efectuados en "sujetos normales y aparentemente sanos, cuyas edades fluctúan entre los 18 y 24 años y que están sometidos a un régimen higiénico-dietético debidamente controlado".

Estos sujetos cinco horas o más; antes de que se les efectúe la extracción habían ingerido un desayuno de té y pan, que para este trabajo no tiene ninguna importancia, por lo que, podemos decir que se encontraban en ayunas.

Se han efectuado los dosajes en mezclas de sueros o "pools", para lo cual se extraían 5 o 6 cc. de sangre la que se dejaba coagular espontáneamente a la temperatura ambiente, hasta el día siguiente en que se mezclaban íntimamente los sueros obtenidos; de estos pools se efectuaban tres determinaciones simultáneas y se sacaba el promedio que es el que se consigna en este trabajo. También se han realizado determinaciones en un sólo suero, en estos casos se hacían los dosajes el mismo día de la extracción, después que la muestra había coagulado espontáneamente y el coágulo se había retraído.

Débase anotar que la sangre era extraída, previa desinfección de la zona que se iba a punzar; con agujas número 17 o 18 esterili-

zadas al seco y que se recibía la muestra en tubos estériles y secos, evitando en todo momento la hemólisis para que los resultados no fueran falseados por las proteínas de los corpúsculos sanguíneos.

## 2.<sup>o</sup> Técnica:

La técnica seguida es la de WOLFSON, COHN, CALVARY e ICHIBA (49), con ligeras modificaciones, para hacerla más fácil y por ello utilizable en cualquier Laboratorio y que tiene la gran ventaja de trabajar con solamente 1,4 cc. de suero para todas las determinaciones.

### a) Reactivos:

I) *Solución de sulfato de sodio al 23.00%.*—Disuélvase exactamente 23.00 grs. de sulfato de sodio anhidro en agua destilada a 37°C. Añádase agua destilada hasta completar 100 cc. y guárdese en una incubadora a 37°C.

II) *Solución de sulfito de sodio al 28.00%.*—Disuélvase exactamente 28.00 grs. de sulfito de sodio anhidro en agua destilada a 28°C. Es difícil hacer soluble esta sal pero puede ser disuelta si se agita bastante en baño de maría a 30°C. el recipiente en que se está preparando la solución y agréguese agua destilada hasta completar a 100 cc.; guárdese a la temperatura ambiente en época de calor o en estufa de 28° a 37°C. en las épocas de frío intenso.

III) *Solución salina de sulfato de amonio.*—En un frasco de a litro disuélvase 193 gramos de sulfato de amonio (Q.P.) en más o menos 500 cc. de agua destilada; añádase 40 gramos de cloruro de sodio, disuélvase y complétese con agua destilada hasta 1.000 cc.; guárdese a la temperatura ambiente.

IV) *Reactivo biuret según WEICHSELBAUM.*—Previamente prepárese una solución titulada exactamente de NaOH 0,2N. Disuélvase 90 gramos de sal Rochelle (tartrato doble de sodio y potasio) en 400 cc. de la solución 0,2 normal de NaOH. En seguida a la solución anterior agréguese 10 gramos de  $\text{CuSO}_4 + 5\text{H}_2\text{O}$ . Cuando el sulfato de cobre se haya disuelto completamente, añádase 10 gramos de yoduro de potasio y complétese a 2 litros con la solución 0,2N de soda. Guárdese en una botella con tapa de jebes encerada o mejor esmerilada.

V) *Reactivo Span-eter.*—Mézclese 1 cc. de Span 20 (3) con 99 cc. de éter sulfúrico Q.P. Fíltrese a través de un papel moderadamente endurecido en un frasco de diluir a 100 cc. y complétese con éter sulfúrico a 100 cc.; guárdese en un frasco herméticamente cerrado.

*Fundamento:* La solución de sulfato de sodio al 23,0% se ha llegado a establecer después de los estudios de MAJOUR, (31) el que llegó a la conclusión de que las mejores concentraciones para determinar la albúmina más la alfa-globulina se encontraban entre 18,5 y 26,8 grs.% de sulfato de sodio; de acuerdo con sus comparaciones con el método electroforético. A resultados semejantes también llegó MILNE (36) en 18 casos estudiados.

Para obtener el valor de albúmina pura WOLFSON y Col., han modificado el procedimiento original de precipitar con *sulfito de sodio* y filtrar lentamente a través de un papel de filtro endurecido; ellos separan la globulina por centrifugación lo que proporciona mayor rapidez. Basándose en el trabajo de KINGSLEY (23) quien utilizaba el éter para disminuir la densidad de la globulina precipitada por el sulfato de sodio que con este procedimiento después de la adición del éter y breve centrifugación; la globulina se separa en una masa compacta, debajo de la fase de éter y encima de la fase sulfato de sodio. Pero no siendo posible aplicar esta técnica cuando se usa *sulfito* por falsear los valores hubo de recurrirse a una pequeña cantidad de un activante superficial adecuado (el Span 20) que se agrega al éter para la separación total de las globulinas por centrifugación y no altera los valores de la albúmina.

Este procedimiento fué controlado con el método de la filtración y los resultados obtenidos se encuentran en el cuadro 1, sacado del trabajo de WOLFSON y Col. (49).

Sustancia activante superficial es aquella, que marcadamente reduce la tensión superficial o interfacial. Químicamente es un compuesto en el cual una porción de su molécula es hidrofílica y la otra es lipofílica.

Muy conocidos en el comercio son los activantes ATLAS, que son complejos de éster y éster-éter no iónicos, siendo su punto de partida químico alcoholes hexahídricos, alhilenos óxido y ácidos grasos (3).

El carácter hidrofílico de estos agentes activantes es proporcionado por grupos libres hidroxilo y oxietileno; mientras que la

CUADRO N° 1

Muestra	Valores en gramos por 100 cc.		
	Filtración	Span-Eter	Diferencia
1	3,5	3,5	0,0
2	3,4	3,4	0,0
3	3,2	3,2	0,0
4	2,9	2,8	-0,1
5	4,1	4,3	0,2
6	3,8	3,8	0,0
7	3,4	3,4	0,0
8*	1,0	1,0	0,0
9*	0,2	0,1	-0,1
10*	0,3	0,4	0,1
Promedios	2,58	2,59	

Los marcados con \* corresponden a síndromes nefróticos.

porción lipofílica se encuentra en la gran cadena de los ácidos grasos usados.

Típicos de los agentes activos ATLAS son los productos denominadas SPAN y TWEEN. Los materiales tipo Span son esencialmente porciones del éster de los ácidos grasos comunes (laurico, palmítico, esteárico y oleico) y anhidros hexitol derivados del sorbitol.

Sabiendo que la solubilidad de un compuesto está limitada por su tensión superficial, cuando una sustancia o compuesto no es soluble en el grado deseado; un agente de enlace o solvente mutuo es añadido para solubilizarlo, siendo esta la finalidad por la que se agrega Span 20 en la determinación de la albúmina pura por el sulfito de sodio al 28%.

Para la determinación de la gama globulina, ha sido modificado el procedimiento que existía, ya que en los trabajos de COHN y Col. (7), (8) y de JAGER y Col. (21) se recomienda el agregado lento de la solución precipitante para evitar concentraciones localizadas excesivas siendo por ello la precipitación lenta y demorando 24 horas.

Por los trabajos ya citados de COHN, quedó demostrado que el precipitado con solución 1,39 M. de sulfato de amonio contenía un

90% de gama globulina; fué preferido al de MULFORD (39) que utilizaba el etanol con un rendimiento de sólo el 37% de gama globulina.

Siguiendo WOLFSON estos estudios llega a encontrar que si la solución de sulfato de amonio tenía también una concentración final de 4,0 grs.% de cloruro de sodio en el precipitante se obtenían valores exactos; dado que a una menor concentración resultó una pobre recuperación de las gamas globulinas añadidas, y la concentración aparente del suero era demasiado baja cuando fueron comparados con chequeos electroforéticos; así como también un aumento en la concentración salina llevó a una alza excesiva de las gama globulinas del suero, lo que indicaba una precipitación de apreciable cantidad de la beta globulina del suero.

Es por esto que ellos (49) propugnan la solución (III) salina de sulfato de amonio después de haber efectuado numerosos estudios en casos normales y patológicos con dicha solución y obteniendo siempre resultados muy satisfactorios.

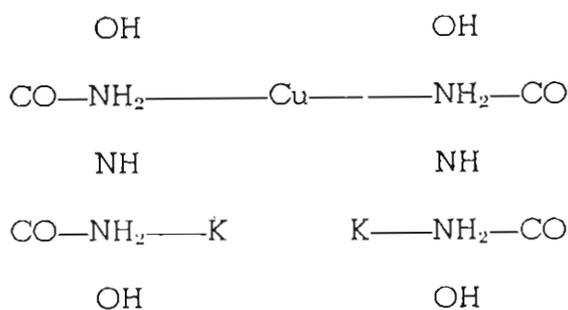
El reactivo de biuret de WEICHELBAUM se basa en la conocida reacción del biuret de los cuerpos proteicos y que debe su nombre a que el factor o cuerpo intermedio biuret formado al calentar la urea a  $180^{\circ}\text{C}$ . produce la reacción; o sea que calentando urea, a la llama en un tubo de ensayo; hasta la efervescencia, aparecerá formado en el fondo del recipiente un sólido blanco: el biuret; si luego se enfría el tubo y se disuelve el biuret con 3 o 4 cc. de soda al 10% y se añade solución al 0,5% de sulfato de cobre gota a gota obtendremos un color púrpura violeta.

La prueba del biuret está dada por aquellas sustancias cuyas moléculas contienen dos grupos carbamílicos, unidos directamente o a través de un átomo de nitrógeno o carbono. Basándose en esta propiedad diremos que hay sustancias que no son urea pero que contienen estos grupos ( $\text{CONH}_2$ ) y por eso responderán a la reacción (16).

Las proteínas responden positivamente desde que ellas son parejas de grupos  $\text{CONH}$  en su molécula (16) igualmente responderán todas sus fracciones que en última instancia no son sino cadenas de dichos grupos en diferentes disposición y distintas uniones; es decir que esta reacción está basada en que las proteínas con el sulfato de cobre en medio alcalino desarrollan un color rojo violeta en sus diferentes tonalidades, o sea que si nosotros colocamos dos o tres cc. de una solución de albúmina de huevo

en un tubo de ensayo y le añadimos un volumen igual de solución de hidróxido de sodio al 10%, mezclamos bien y agregamos la solución de sulfato de cobre al 0,5% gota a gota mezclando bien entre cada gota; se producirá un color púrpura violeta o rojo violeta (11). El color depende de la naturaleza de la proteína; las proteosas y las peptonas, dan un franco color rojo clavel, mientras que el color producido por la gelatina no está lejano del azul.

Según SCHIFF el final de la reacción en la prueba del biuret depende de la formación de un compuesto cobre-potasio-biuret (cupri-potassium-biuret o biuret potassium cupric hidroxide). Esta sustancia fué obtenida por dicho autor en forma de largas agujas rojas y le da la siguiente fórmula:



WEICHELBAUM ha hecho un estudio para determinar el óptimo de alcalinidad del reactivo para la producción de un complejo biuret proteínas séricas ópticamente claro y estable. Esta concentración de álcali la encontró ser aproximadamente 0,2N y bajo condiciones experimentales logra obtener un complejo biuret de sero proteínas que permanece ópticamente claro y estable por un mínimo de cinco días, lo que ha comprobado con lecturas espectrofotométricas.

Como la solución alcalina de tartrato cúprico puede sufrir autoreducción (45) se añade 5 gramos de yoduro de potasio por litro al reactivo para prevenir dicha autoreducción. Este reactivo de biuret se ha encontrado estable hasta por 17 meses guardado en el Laboratorio en una botella pyrex.

La concentración total de cobre en el reactivo es de 0,5% en sulfato de cobre, que está en gran exceso, o sea más allá de lo necesario para formar el complejo biuret con la proteína empleada, pero que se ha encontrado ser una ventaja en el colorímetro

visual cuando se trabaja con sueros ictericos o hemolizados. Esta concentración de cobre permite también una gran concentración de proteína para la formación del complejo "biuret proteína" obediendo la ley de BEER, encontrándose que el coeficiente de extinción es constante para los valores proteicos de 0,0040, 0,140 grs. % de proteínas del complejo biuret.

b) *Standardización:*

I) La solución standard de proteína puede ser cualquiera de las siguientes:

1. Una muestra de suero normal humano, de contenido proteico determinado exactamente por el método de Kjeldahl.

2. Solución de albúmina comercial, que aunque cara tiene la ventaja de tener una concentración de proteína de más o menos 25 grs. % y permite preparar bien los standards con concentrados de proteínas en exceso, de suero normal. Igualmente en el caso de usar esta solución su concentración proteica debe ser determinada por el método de Kjeldahl en forma exacta.

II) Usando solución salina normal como diluyente, preparar standards con concentrados de proteína de más o menos 1,0, 2,0, 4,0, 6,0 8,0 grs. % cc. Determinese el concentrado de cada standard diluido por el procedimiento de proteína total que se indica en páginas posteriores y constrúyase la curva standard con los datos obtenidos o hállese el factor correspondiente.

En este trabajo se ha standardizado el aparato o mejor dicho se ha hallado el factor con el cual se tenía que trabajar en la siguiente forma:

a) En varios pools de suero hicimos las determinaciones de la concentración de proteínas totales por el método del micro-Kjeldahl, que había sido ya standardizado con patrones importados.

b) En los mismos sueros simultáneamente se determinaron las lecturas colorimétricas al Klett, que resultaban al ser tratados dichos sueros como lo indica la técnica que a continuación expon-dremos usando el reactivo de Weichselbaum, para las proteínas totales.

c) Se efectuaron los cálculos de las diferentes diluciones en que se estaba trabajando, para poder correlacionar los valores y sabiendo que: la concentración entre la lectura da el factor, hallamos el valor 0,038.

d) Sabiendo que esta reacción está basada en una propiedad común a todas las fracciones y que las diluciones en las diferentes determinaciones de dichas fracciones son equivalentes, es posible aplicar el factor hallado anteriormente, a todas las lecturas.

Debemos anotar, una vez más, que no nos ha sido necesario confrontar los resultados obtenidas con la electroforesis ya que este chequeo ha sido efectuado por autores de reconocida capacidad y han encontrado valores equivalentes como puede apreciarse en el cuadro 5 de páginas adelante.

c) *Procedimiento:*

1. *Proteína total del suero.*

a) Pipetéese 0,2 cc. de suero en un tubo y dilúyase a 5 cc. con 4,8 cc. de agua destilada. Mezclar bien por inversión.

b) Transfírase 3 cc. a otro tubo y agréguese 3 cc. del reactivo de biuret, mezclando bien por agitación.

c) Prepárese un blanco, con 3 cc. de agua destilada y 3 cc. de biuret. Guárdese este blanco para su uso en la determinación de albúmina más alfa globulina (paso 2f) y en la determinación de la gama globulina (paso 8g).

d) Déjese la solución en reposo por lo menos 30 minutos (puesto que el color una vez desarrollado es bastante estable, las lecturas pueden hacerse hasta las 24 horas).. Léase en el colorímetro fotoeléctrico o en el espectrofotómetro, con onda larga de 540 milimicrons (los autores usaron el colorímetro fotoeléctrico Evelyn, nosotros hemos usado el fotocolorímetro Klett con filtro verde).

2. *Sero-albúmina más alfa-globulina.*

a) Colóquese 4,6 cc. de solución de sulfato de sodio al 23,0% (1) en un tubo de prueba. Esta solución es mejor no pipetearla, dada su definida tendencia a cristalizarse, en las pipetas especialmente en épocas frías. Es conveniente usar pequeños tubos graduados a 4,6 cc., y llenarlos en una bureta grande previamente calentada a pequeña temperatura.

b) Pipetéese 0,4 cc. de suero y mézclese íntimamente con la solución anterior, por inversión.

c) Agréguese aproximadamente 2 cc. de éter y agítese vigorosamente por 30 segundos. Centrifúguese de 5 a 10 minutos a 1.500 o 2.000 rpm.

d) A continuación, insértese cuidadosamente una pipeta a través de la capa de éter y debajo de la globulina empacada "packed", inclinando el tubo para separar el precipitado de la pared del mismo.

e) Sáquese 1,5 cc. de centrífugo claro y transfíerese a otro tubo, al que se le agrega 1,5 cc. de agua destilada y 3,0 cc. de biuret. Se mezcla bien agitándolo, se deja 30 minutos en reposo y se lee en el colorímetro fotoeléctrico con onda larga de 540 milimicrons.

f) El blanco es aquel preparado en el paso 1-c.

### 3. Sero-albúmina pura.

a) Colóquese 9,6 cc. de la solución de sulfito de sodio al 28,0% (II) en un tubo de ensayo. Se sugiere un procedimiento similar al usado en el paso 2-a, para realizar esta determinación.

b) Pipetéese en el tubo anterior 0,4 cc. de suero y mézclese completamente por inversión.

c) Agréguese más o menos 2 cc. del reactivo Span-éter (V) y agítese vigorosamente por 30 segundos. Centrifúguese de 5 a 10 minutos a 1.500 o 2.000 rpm.

d) Después de la centrifugación, introducir una pipeta a través de la capa de Span-éter y debajo de la globulina empacada, inclinando el tubo para separar el precipitado.

e) Sáquese 3 cc. de centrífugo claro y transfíerese a otro tubo al que se le agrega 3 cc. de biuret, mezclándose bien, por agitación.

f) Prepárese un blanco con 3 cc. de sulfito de sodio al 28,0% y 3 cc. del reactivo biuret.

g) Después de dejarlo 30 minutos en reposo léase en igual forma que los anteriores.

### 4. Gama-globulina.

a) Pipetéese 9,6 cc. de la solución salina de sulfato de amonio (III) en un tubo resistente, y añádase 0,4 cc. de suero sobre la solución salina. Mézclese estos componentes con mucho cuidado, lentamente repitiendo varias veces la inversión. Continúese mezclando por uno o dos minutos, hasta que el desarrollo gradual de la turbidez haya alcanzado el máximo.

b) Sáquese un centímetro cúbico de la mezcla anterior y deséchese.

c) Tápese con un corcho el tubo, asegurándolo lo mejor posible y centrifúguese a 2.250 o 2.750 rpm. durante 30 minutos.

Si después de ésto el líquido está algo turbio, enfríese el tubo por algunos minutos en el caño de agua fría y centrifúguese nuevamente. Resultados exactos se obtienen solamente cuando el líquido está completamente claro y cristalino.

d) Voltéese suavemente el tubo (sin corcho) con sumo cuidado de no remover el precipitado. En esta primera decantación no debe intentarse desalojar todo el líquido.

e) Vuélvase el tubo sin corcho a la centrífuga y hágase girar a 2.250 o 2.750 rpm. durante 5 minutos. Después inviértase nuevamente el tubo y déjese permanecer en esta posición sobre una toalla o papel de filtro por varios minutos.

f) En seguida agréguese 3 cc. de biuret y 3 cc. de agua destilada, agítese rápidamente por 30 segundos, déjese en reposo por 15 minutos y centrifúguese nuevamente para eliminar cualquier residuo turbio, decantando el líquido a otro tubo.

g) Prepárese el blanco o úsese el preparado en el paso 1-c.

h) Después de permanecer por lo menos 30 minutos en reposo léase en el fotocolorímetro en igual forma que los anteriores.

i) Dividase el valor obtenido entre 3 para obtener la concentración de la gama globulina del suero en estudio.

El procedimiento expuesto es la forma como se han efectuado las determinaciones, en este estudio; pero, en la técnica original en los pasos 2-a y 2-b se indica 2,3 cc. de sulfato de sodio para 0,2 de suero y más o menos 1 cc. de éter, cantidades que nosotros hemos duplicado para que la extracción del 1,5 cc. de centrífugo claro sea más fácil; cosa semejante ha ocurrido con los pasos 3-a, 3-b y 3-c para extraer con facilidad los 3 cc. de centrífugo claro; modificaciones que no alteran en nada la técnica original sino brindan una mayor facilidad para el trabajo.

#### d) *Hallazgo de valores.*

##### 1. *Proteínas totales.*

La lectura del paso 1-d, restando el blanco y multiplicando por el factor nos da el valor de las proteínas totales.

##### 2. *Sero-albúmina.*

La lectura del paso 3-g, restando el blanco y multiplicando por el mismo factor que el anterior.

##### 3. *Globulina total.*

Réstese el valor de la proteína total hallado en (1.) el valor de la sero albúmina hallado en (2).

4. *Relación albúmina-globulina.*

Divídase el valor hallado en (2.) entre el valor encontrado en (3.).

5. *Alfa-globulina.*

Réstese el valor de la serina hallado en (2.) del valor de la serina más alfa-globulina encontrado en el paso 2-e.

6. *Beta más gama-globulina.*

Réstese el valor de la albúmina más alfa-globulina obtenido en el paso 2-e del valor de la proteína total hallado en el paso 1-d.

7. *Gama-globulina.*

Es el valor hallado en el paso 4-1.

8. *Beta-globulina.*

Réstese el valor de gama-globulina anterior del valor de beta más gama-globulina obtenido en el paso (6.)

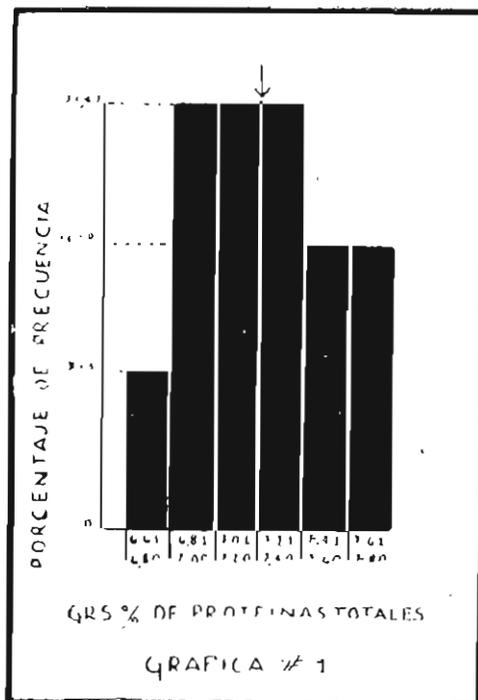
## RESULTADOS OBTENIDOS

A continuación se exponen las cifras promedios halladas en los dosajes citados en el capítulo anterior.

CUADRO N<sup>o</sup> 2

Muestra	P. T.	S. A.	S. G.	Alfa	Beta	Gama	I. A/G.
P <sub>1</sub>	7,07	3,75	3,32	1,04	1,50	0,78	1,13
P <sub>2</sub>	7,34	4,78	2,56	0,80	0,74	1,02	1,86
P <sub>3</sub>	6,86	3,75	3,11	0,98	1,03	1,10	1,20
P <sub>4</sub>	7,52	4,35	3,17	0,94	1,43	0,80	1,37
S <sub>1</sub>	7,73	4,57	3,16	0,83	1,13	1,20	1,44
P <sub>5</sub>	7,75	4,86	2,89	0,77	1,03	1,09	1,68
S <sub>2</sub>	6,84	4,45	2,39	1,03	0,68	0,68	1,86
S <sub>3</sub>	6,84	4,01	2,83	1,02	0,83	0,98	1,41
P <sub>6</sub>	7,06	4,53	2,53	0,97	0,88	0,68	1,75
S <sub>4</sub>	7,29	4,48	2,81	0,91	1,23	0,67	1,59
S <sub>5</sub>	7,60	4,59	3,01	0,96	0,87	1,18	1,52
P <sub>7</sub>	7,06	3,86	3,20	0,95	1,09	1,16	1,20
P <sub>8</sub>	6,75	4,28	2,47	1,02	0,74	0,71	1,73
P <sub>9</sub>	7,35	4,51	2,84	0,88	1,01	0,95	1,58
Media	7,21	4,34	2,87	0,93	1,01	0,93	1,51
Cifra inf.	6,75	3,75	2,39	0,77	0,68	0,67	1,13
Cifra sup.	7,75	4,86	3,32	1,04	1,50	1,20	1,86

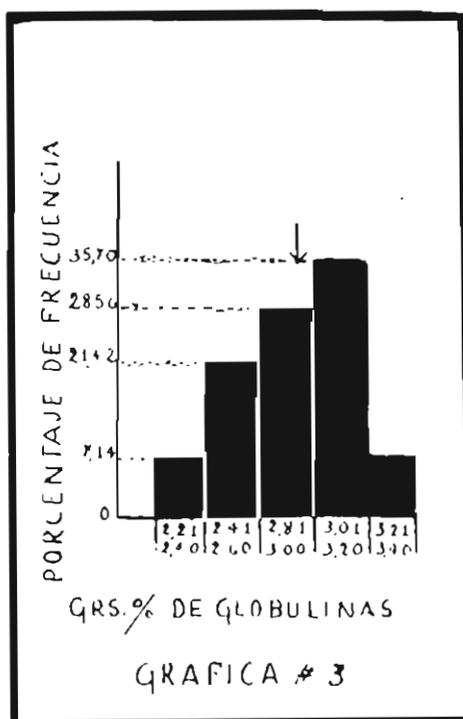
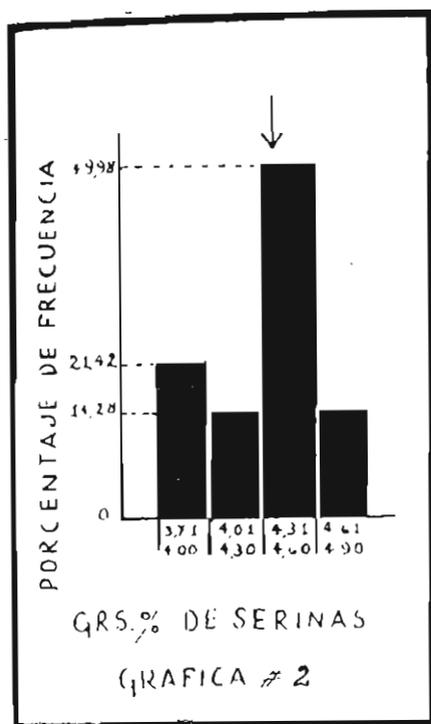
Si se estudia cada una de las fracciones dosadas se verá para las proteínas totales que la mayor frecuencia de casos se encuentran entre 6,80 grs. % y 7,40 grs. %; solamente existe un valor de 7,14 en % por debajo del límite inferior y un 28,56% en valores más altos que el señalado; lo cual se puede apreciar mejor en la gráfica 1.



Si se revisan ahora las cifras correspondientes a las sero-albúminas, podremos construir la gráfica 2 en la que se aprecia que el 49,98% de las cifras se encuentran entre 4,30 y 4,60 grs. %, mientras que por debajo de ellas solo tenemos un 35,70% y por encima un 14,28%.

Al pasar a estudiar las cifras correspondientes a las globulinas encontramos que el mayor porcentaje de casos han arrojado cifras entre 2,41 y 3,20 grs. % lo que representa el 85,68% de todos los dosajes y que escasamente el 14,32% se encuentra por encima o por debajo de dichas cifras, lo que se puede ver en la gráfica 3.

Toca ahora revisar cada una de las fracciones de la sero-globulina, es así como al estudiar las cifras de la alfa-globulina

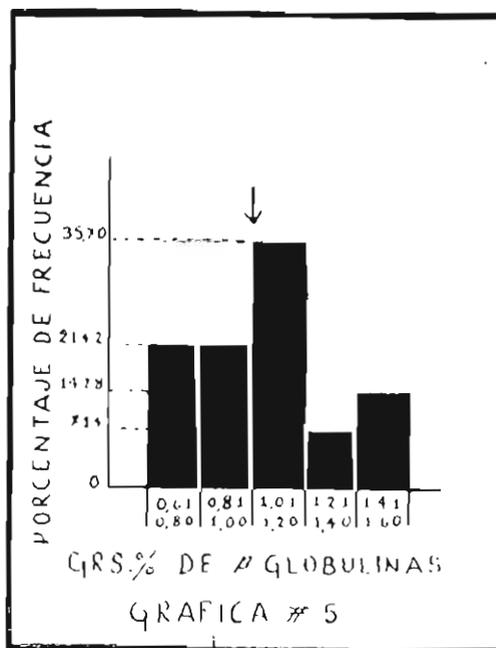
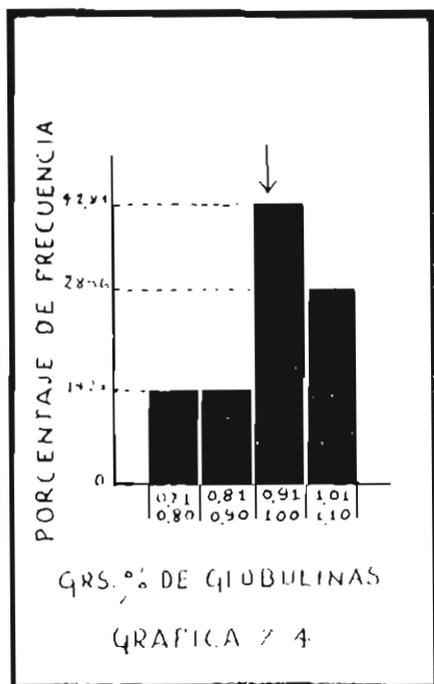


se aprecia que el 42,84% se encuentran entre 0,90 y 1,00 grs.%, límites bien ajustados a la cifra media que es de 0,93 grs.% y que tanto por encima como debajo de esos límites se encuentran valores en igual proporción 28,58% a cada lado; con estos valores está confeccionada la gráfica. 4.

Con las cifras correspondientes a la beta-globulina se hace la gráfica 5 en la que se aprecia que dentro de 1,01 a 1,20 grs.% se encuentra el 35,70% de los resultados mientras que tanto los superiores como los inferiores se encuentran repartidos en porcentajes menores.

En lo que se refiere a las cifras de gama-globulina observamos algo que parece paradójico, ya que alrededor de la cifra media de 0,93 grs. % se encuentra el menor porcentaje de 14,28 mientras que por encima de 1,00 grs.% encontramos el porcentaje de 42,84 lo mismo que por debajo de 0,90 grs.%.

Esto se puede interpretar como que las cifras límites normales se encuentran entre 0,60 grs.% y 1,20 grs.% debido a lo cual



la repartición es casi uniforme en los resultados obtenidos; todo esto se encuentra representado en la gráfica 6.

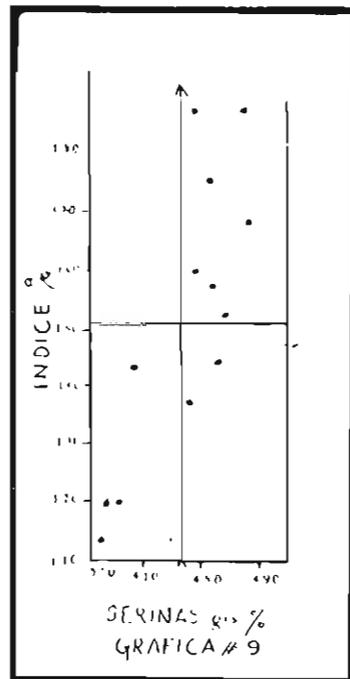
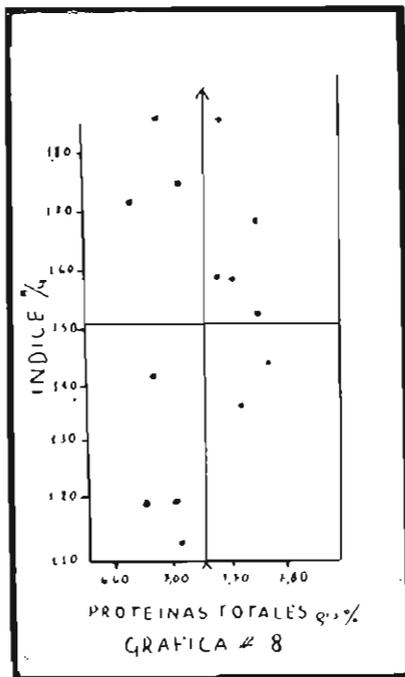
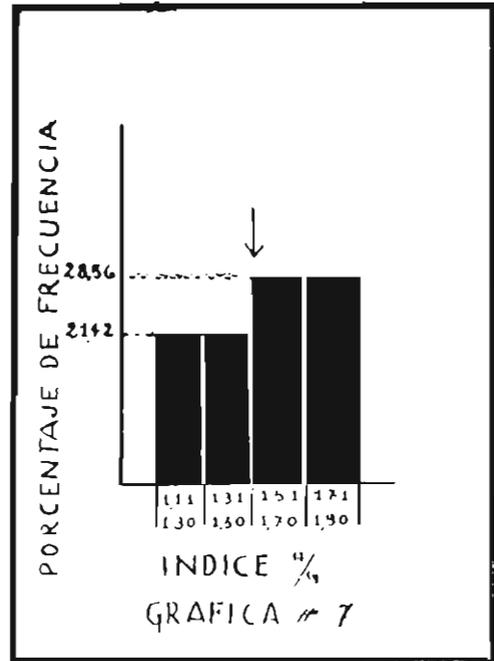
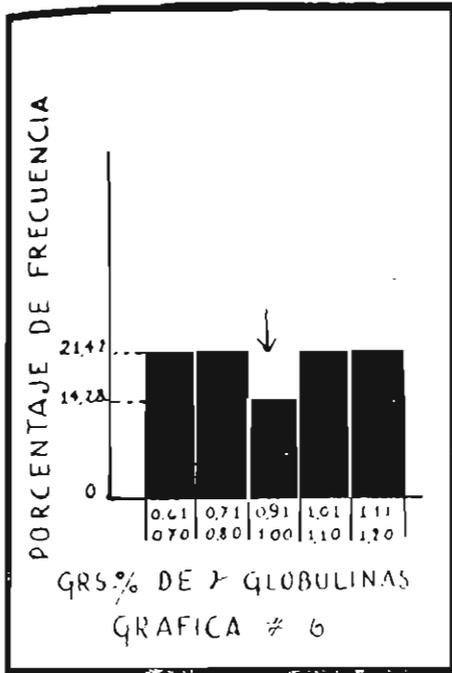
Después de haber hecho esta revisión a los valores de las fracciones proteicas hay que ver que frecuencia arrojan las cifras correspondientes al índice albúmino-globulina que por el cuadro 2 se sabe que fluctúa entre 1,13 y 1,86 con una cifra media de 1,51 ésto, se puede apreciar en la gráfica 7 construida como todas las anteriores con los valores porcentuales de frecuencia según el cuadro 2; y ahí se observa que la mayor frecuencia está por encima de 1,50 ya que representa el 57,12% de los casos estudiados.

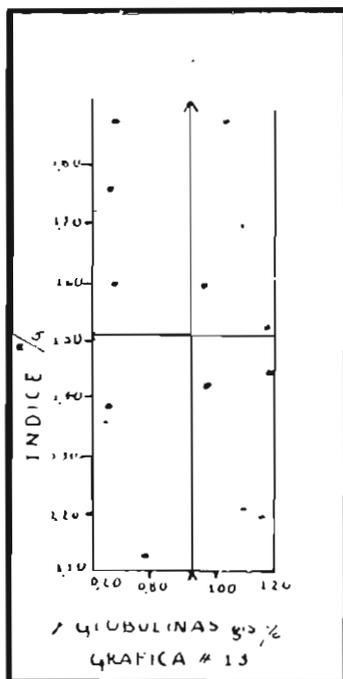
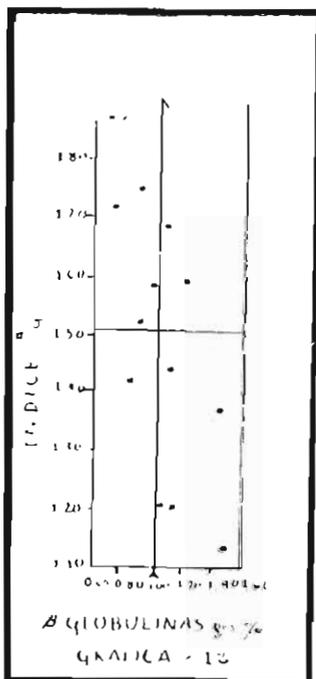
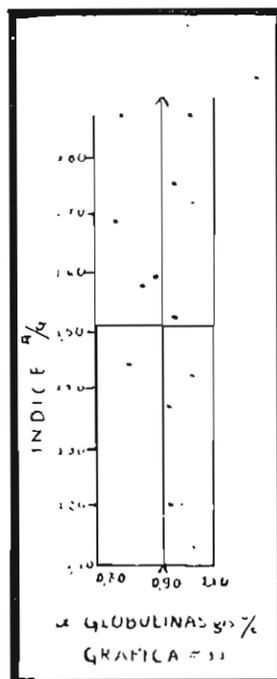
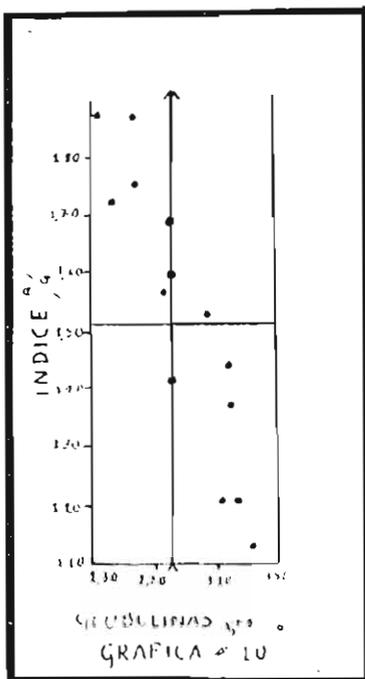
Si ahora se estudian las gráficas 8, 9, 10, 11, 12 y 13 que representan las relaciones existentes entre las diferentes fracciones dosadas y el índice albúmino-globulinas; y donde los puntos representan el resultado de cada caso estudiado.

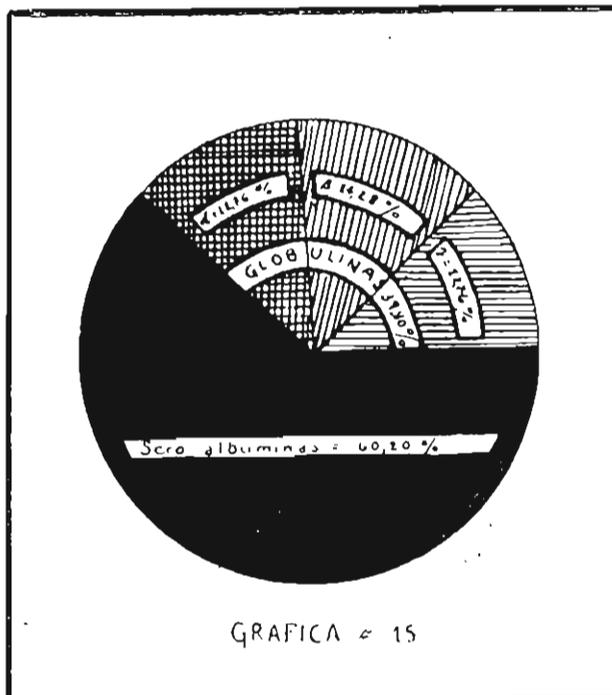
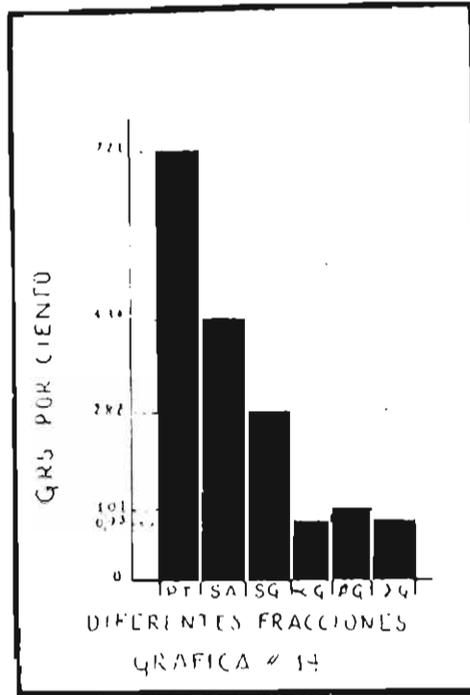
En estas gráficas podemos apreciar lo siguiente:

1º No existe relación entre la cantidad total de las proteínas y las variaciones del índice albúmino-globulinas.

2º Cuanto mayor es la cantidad de sero-albúmina mayor es el índice albúmino-globulinas; pero no existe una relación fija, ya que varios valores no siguen esta regla.







3º En lo que se refiere a las globulinas, la relación es más constante ya que solo hay un caso en que existiendo una ligera alza de la cifra de globulinas le corresponde un índice superior al promedio; mientras que, el resto de valores se encuentran en relación inversa, es decir a mayor cantidad de globulinas, menor índice albúmino-globulinas.

4º Del estudio de los valores del índice y de las distintas fracciones globulínicas se ve que no existe ninguna relación entre las variaciones de un valor y otro.

Falta apreciar en forma gráfica las distintas cifras, tanto absolutas como relativas, correspondientes a cada una de las fracciones proteicas estudiadas; para lo cual se construye la gráfica 14, y mejor aún, la gráfica 15, en la que el círculo representa la cifra normal de proteínas totales, o sea el 100%, en un sujeto normal; y cada fracción está indicada en forma de que se aprecie que porcentaje representa dentro del conjunto proteico. Esta forma de expresar los resultados en porcentaje es muy importante, ya que si en muchos casos como se verá en páginas posteriores, la cifra total de proteínas no se encuentra alterada; si lo están las diferentes fracciones, alteración que se aprecia mejor cuando se expresan los resultados en porcentaje que cuando se hace en gramos por ciento.

Todos los histogramas anteriores han sido confeccionados según las reglas de estadística tomadas del trabajo de HURTADO (19).

#### CIFRAS ESTADISTICAS

	<i>Valor medio</i>	<i>Desviación standard</i>	<i>Coefficiente varia.</i>	<i>Valores extremos</i>
P. T.	7,21 ± 0,086	0,31 ± 0,060	4,2%	6,75—7,75
Alb.	4,34 ± 0,097	0,35 ± 0,068	8,1%	3,75—4,86
Glob.	2,87 ± 0,079	0,29 ± 0,056	10,1%	2,39—3,32
A-Gb.	0,93 ± 0,002	0,08 ± 0,001	9,0%	0,77—1,04
B-Gb.	1,01 ± 0,066	0,24 ± 0,047	23,76%	0,68—1,50
G-Gb.	0,93 ± 0,050	0,19 ± 0,037	20,43%	0,67—1,20
I. A/G.	1,51 ± 0,058	0,21 ± 0,041	13,81%	1,13—1,86

P. T.	=	Proteínas totales.
Alb.	=	Sero-albúminas.
Glob.	=	Globulinas totales.
A-Gb.	=	Alfa-globulinas.
B-Gb.	=	Beta-globulinas.
G-Gb.	=	Gama-globulinas.
I. A/G	=	Índice albúmino-globulinas.

Las cifras del cuadro anterior se han hallado siguiendo las reglas establecidas en los métodos estadísticos (19).

#### DISCUSION

La complejidad de las proteínas sanguíneas ha hecho que su determinación constituya un verdadero problema para el laboratorista, más ahora que con los nuevos medios con que se cuenta para investigaciones científicas; tales, como la ultracentrífuga y en especial la electroforesis, muchos de los procedimientos que se tenían por exactos hasta hace muy pocos años se encuentran descartados.

Sin embargo, es conveniente que se haga una revisión somera y valoración de los diferentes métodos que han sido más usados, para la determinación de las proteínas sabiendo que el criterio que sirve para valorizar un método de aplicación rutinaria está dado por su rapidez, facilidad de ejecución y exactitud clínica (5).

Comencemos por la gravimetría que es, un método directo de saber cuanto proteína hay en un suero; por pesada después de haberla separado de los otros componentes del mismo suero; existen múltiples variaciones técnicas para este método, pero, en los últimos años se han impuesto las que usan filtros porosos de porcelana o de vidrio, de tara constante y de más cómodo manejo que el papel de filtro que además tiene el inconveniente de absorber cantidades variables de albúminas, al efectuar el fraccionamiento (44). La técnica de más solvencia y sin grandes dificultades de ejecución es la de PLOTNER que precipita las proteínas de 1 cc. de suero con 40 cc. de alcohol tamponado a pH 4 y ebullición de 15 minutos, recoge el precipitado en un filtro de vidrio poroso (G-4) y lo lava con agua caliente, alcohol y éter que eliminan totalmente los demás componentes del suero terminando

por la desecación y pesada. El inconveniente que tiene según SOLS es la lentitud de la filtración en los líquidos de lavado.

Posteriormente DESBORDES ha propuesto un método más sencillo, pero que sólo permite determinar proteínas totales con exactitud, y consiste en precipitar las proteínas de 1 cc. de suero en un tubo de centrífuga con 9 cc. de acetona; después centrifugar y decantar; dejando el tubo en la estufa hasta el día siguiente, en cuyo tiempo el precipitado al secarse se retrae, desprendiéndose del fondo del tubo, al que queda unido solamente por su periferia; con un ligero golpe se desprende la pastilla de las proteínas desecadas, cuyo peso en miligramos corresponde a gramos por mil de suero. El método que propone para la determinación de las globulinas, sobre no ser muy preciso, es además, engorroso y expuesto a errores de consideración.

Después de la gravimetría existe también, la determinación del nitrógeno que forma parte de las proteínas y es bastante exacto. Se parte en este método de la oxidación del nitrógeno proteico según los principios del método de Kjeldahl, para terminar con la determinación del nitrógeno por volumetría o colorimetría. La técnica de HOWE es entre todas la más ortodoxa y muy utilizada como patrón e incluso es preferida por algunos a las mejores técnicas gravimétricas. Pero en realidad su bondad radica en su excelente concordancia con las técnicas gravimétricas.

La refractometría se utiliza en muchos laboratorios clínicos por su extraordinaria sencillez. Pero en lo que a exactitud se refiere ha sido y es una de las más severamente criticadas (44), (43). En realidad todos los componentes del suero participan en la refracción del mismo y, por lo tanto, sus variaciones falsearán los resultados obtenidos calculando sobre la base de un valor promedio para el conjunto de componentes no proteicos. Así, una uremia, una hiperglicemia y una retención de cloruro pueden dar lugar a errores de 3 gramos por mil, mucho más aún puede influir una hiperlipemia y si seguimos viendo los factores que pueden alterarla veremos como dice VAN SLYKE, que pueden llegar hasta 15 gramos por litro. Por todas estas razones la refractometría no puede considerarse como un método cuantitativo, sino como orientador para la práctica cotidiana; aunque desgraciadamente en los estados patológicos que es cuando más se necesita saber la cifra exacta de la proteinemia, existe concomitantemente a la alteración

proteica otras alteraciones bioquímicas que van a falsear completamente los resultados.

Un método complemento del anterior y más complejo es el de la viscosimetría combinada o refracto-viscosimetría; que determina el coeficiente albúmina-globulina en función de que "la viscosidad depende fundamentalmente de la fracción globulina". Pero, a lo dicho sobre la falta de seguridad de la refractometría hay que agregar aquí la menor precisión de las determinaciones de viscosidad. Particularmente en sueros con considerables alteraciones proteicas SOLS ha encontrado desviaciones considerables del coeficiente con respecto a lo obtenido por métodos directos.

FOSTER, BIGURIA y ADAMS, han propuesto la viscosimetría simple sobre el principio de que al tratar un suero con formol se eleva su viscosidad y que este cambio depende exclusivamente de las globulinas; determinando la concentración de globulina por el valor de la viscosidad. En comparación con métodos químicos encuentran los autores diferencias de solamente 0,2 grs. %.

Los métodos turbidimétricos con su doble modalidad de nefelometría y opacimetría han presentado grandes ventajas en lo que se refiere a la cantidad de suero necesaria, sencillez y rapidez de ejecución; pero, como sostienen SHANK y HOAGLAND, si bien se puede obtener una estrecha relación lineal entre la densidad óptica y la concentración de determinada albúmina, la relación varía considerablemente de unas albúminas a otras. En 1940 en un trabajo que publicó PLOTNER, insiste en la falta de constancia de la relación enturbamiento-concentración; sin embargo autores como LOONEY y WALSH (28) han adoptado estos métodos al colorímetro fotoeléctrico y autores modernos como BERRY y PERKINS (5) lo consideran de mucha exactitud después de compararlo con otros métodos.

RYTAND utiliza la sedimentación para sus dosajes; precipitando con ácido tungstico en un tubo de centrífuga el suero, previo fraccionamiento por sulfato amónico y aplicando determinados factores transforma el volumen del sedimento en proteínas y albúmina.

Los métodos volumétricos de la escuela francesa son hoy descartados por la mayoría de los autores por lo cual, sólo los mencionamos.

En los últimos años ha tomado particular relieve la determinación de las proteínas por la densimetría que se funda en la

relación que existe entre el peso específico y la concentración de proteínas y descubierta por MOORE y VAN SLYKE en 1930. La fórmula que dieron estos autores fué modificada en 1936 por WEECH y COL.

Entre estos métodos tenemos el del tubo gradiente propugnado por JACOBSEN y LINDESTROM-LANG, en el que por mezcla de dos líquidos orgánicos se obtiene una columna líquida con densidad distinta a cada altura; teniendo la ventaja de poderse trabajar con cantidades mínimas de suero y facilita los dosajes cuando hay que trabajar en serie, compensando en esa forma la preparación bastante laboriosa de los tubos.

PHILLIPS y VAN SLYKE han revalorizado estas técnicas utilizando el sulfato de cobre para las determinaciones pero, HOCH y MARRACK (18) demuestran que el gran error que da este método impide una debida interpretación y proponen una nueva fórmula lo mismo que LLOYD y COL. que proponen otra y aún VAN SLYKE ha cambiado su fórmula original; es por esto que si nosotros aplicamos las fórmulas citadas a un suero normal con densidad 1,027 se tendrá como concentración de proteínas valores diferentes, según la fórmula con la cual se trabaje; esto se aprecia en el cuadro siguiente:

Van Slyke .....	6,86 grs. %
Weechs y col. ....	6,86 " "
Hoch y Marrack .....	7,64 " "
Lloyd y col. ....	7,32 " "
Phillips y Van Slyke .....	7,44 " "

Los métodos colorimétricos para la determinación de las proteínas sanguíneas que se usan con más frecuencia son tres:

a) Los que previa digestión exotérmica de las proteínas con ácido sulfúrico y un catalizador, terminan con la neslerización.

b) Los que usan el reactivo de fenol de Folin, para medir la tirosina y el triptófano; componentes de la molécula proteica intacta, después de haberla hidrolizada en álcali o en ácido.

c) Los que utilizan la reacción del biuret, ya explicada en páginas anteriores en su mecanismo íntimo.

Los métodos que siguen los principios: a) y b) han sido revisados por WEICHSELBAUM (48) y los encuentra muy laboriosos

y que requieren mucha experiencia para que se obtenga buenos resultados al trabajar con ellos.

Es necesario ver como ha ido evolucionando la reacción del biuret a través de los diferentes estudios realizados con ella. Fué primeramente introducida por RIEGLER (42) para la determinación de las proteínas en la orina; posteriormente FINE, HILLER y AUTENRIETH (14), (17), (1), (2) modifican y perfeccionan el método concluyendo todos en que la reacción era digna de confianza; que el error no excedía del 5% en manos experimentadas; también encuentran que cantidades iguales de albúmina y globulina producían colores violeta prácticamente de igual intensidad, lo que representa el primer paso para usarlo en el dosaje actualmente tan importante de las fracciones; sin embargo estos autores encuentran la dificultad de un standard estable; es por esto abandonado y porque creen que sólo es utilizable para el dosaje de los peptidos de enlace y no de las proteínas. Las objeciones a los primitivos métodos fueron revisadas por ROBINSON y HOGDEN (40) y utilizando la técnica de KINGSLEY (25) dicen que es excelente para la determinación de las proteínas en el suero y que no tiene ninguna de las objeciones que se le han hecho a los métodos que utilizan el reactivo de fenoles de FOLIN; su sola desventaja es la dificultad técnica y de tiempo en las manipulaciones; pero logran hacer evitable la turbidez en el complejo biuret-proteína. Otro inconveniente es que requiere una gran standarización del modo en que se va a trabajar para ser de uso en la rutina del laboratorio.

En la experiencia de Weichselbaum la última modificación de Kingsley en la cual propone el uso de éter etílico como extractor del color del biuret para prevenir la turbidez es aún insatisfactoria y en su opinión "requiere también estricta standarización para ser de uso general en el laboratorio clínico promedio". Además también según su experiencia el reactivo de una "sola pieza" de Kingsley, es de limitada estabilidad.

Posteriormente MEHL (33) propuso el uso de un reactivo de biuret conteniendo glicoletileno el cual él declara: forma un compuesto con el cobre soluble en álcali y de tal naturaleza que el cobre aún reacciona con las proteínas formando el complejo biuret-proteína. Esta adición de glicoletileno permite el uso del reactivo de una sola pieza, el que se vuelve completamente estable.

Este autor declara que con el uso de albúmina de huevo, el tiempo para una completa producción del color del complejo es

de 90 minutos y permanece estable por 20 horas. Las lecturas del complejo con proteínas séricas son hechas entre los 20 y los 45 minutos con la declaración hecha por el autor de "que los cambios en las lecturas son relativamente pequeños y los valores razonablemente consistentes pueden ser obtenidos en tiempos definidos" y que en "plasma la turbidez evoluciona en casi una hora". Este autor advierte que los valores para las proteínas plasmáticas son casi 15% menores que aquellas de la albúmina de huevo a igual concentración, lo que él postula puede ser debido a un incompleto desarrollo del color del complejo, en el caso de las proteínas sanguíneas. De acuerdo con Weichselbaum creemos, que las anteriores declaraciones de Mehl, excluyen este método de su uso en el laboratorio de rutina hospitalaria.

WEISCHSELBAUM dice "la reacción del biuret ofrece la mejor posibilidad como un exacto y rápido método colorimétrico para la determinación de las sero-proteínas; si según los hallazgos de Robinson y Hodgen, un reactivo de una sola pieza puede ser ideado, el cual pueda ser añadido directamente a las proteínas o diluciones de proteínas, con la formación de un complejo biuret relativamente permanente y ópticamente claro el cual, obedezca a las leyes de Beer-Lambert". En sus estudios lo logra encontrar, ya que tal complejo se forma al efectuarse la reacción entre las proteínas y una sal cúprica orgánica, por ejemplo la sal doble de cobre de tartrato de sodio y potasio.

Con todo esto se había logrado vencer ya gran parte de las objeciones que se le hacían al método del biuret; faltaba sin embargo encontrar un standard colorimétrico estable, para los laboratorios que utilizan el colorímetro visual y es HILLER (17) el que con los primitivos métodos del biuret usa como standard el compuesto biuret-carbamiluria como el mejor para ese tipo de colorímetro; pero las tentativas de Weichselbaum fueron infructuosas al usar este compuesto (E.K.C. mp. 191-192°C) desde que el aspecto visual del complejo biuret con este compuesto es diferente del de las proteínas con el biuret. Basado en la creencia de Robinson y Hogden de que el suero de conejo preservado con timol era relativamente estable (41), creyó que esta limitada estabilidad sería mejorada si se disponía de una mejor fuente de proteínas y encontró que el suero humano o de cualquier animal en úrea al 30% y agregado de pequeñas cantidades de timol permanece es-

table y ópticamente claro, en la refrigeradora o a la temperatura del cuarto hasta por doce meses.

Es por ello que WOLFSON y Col. en la técnica descrita utilizan el reactivo de biuret de WIECHSELBAUM, después del fraccionamiento proteico por ellos propuesto, por ser el más exacto y utilizable tanto en colorímetro visuales como en colorímetros fotoeléctricos.

Desde hace unos cuantos años la determinación más exacta de las proteínas se hace por la electroforesis, habiendo permitido constatar que no solamente existen tres fracciones de proteínas sino seis o más; este método, se basa (27) en que las proteínas son moléculas tan grandes que tienen las propiedades de los coloides y que aunque no pasan a través de las membranas dializadoras poseen una carga eléctrica como la de los amino-ácidos y que con ellas puede suceder lo mismo que pasa a una solución salina, por ejemplo, de cloruro de sodio, la cual al ser influenciada por la corriente eléctrica se disociará completamente en sus iones cloro y sodio que irán al polo positivo y negativo respectivamente; es decir que si una sustancia coloidal es expuesta a una corriente eléctrica las moléculas migrarán al polo de carga opuesta y si estas moléculas tienen diferente tamaño, como las proteínas; migrarán con diferentes velocidades hacia el polo de signo contrario.

Si se tiene una proteína que sea homogénea, migrará como una unidad y si es heterogénea o una mezcla capaz de fraccionarse en sus diferentes compuestos, las moléculas de movimiento más lento irán detrás y las de movimiento más rápido irán delante. TISELIUS aplicó este principio prácticamente y encontró que los fluidos son raramente homogéneos en su composición.

Así el plasma sanguíneo en un aparato de Tiselius demuestra la existencia de diferentes fracciones porque ellas migran a diferentes velocidades. Se ha llegado a tomar un grabado de este fenómeno, obteniéndose figuras semejantes a un electrocardiograma con una serie de elevaciones y depresiones; tal como se puede apreciar en las gráficas A y B (en las que la parte negra representa el área de cada una de las fracciones) y que corresponden a esquemas electroforéticos de sueros humanos: normal y patológico respectivamente. Aplicando determinadas fórmulas a las áreas obtenidas se llega a conocer la cantidad en gramos por ciento de la fracción en estudio que existe en el suero problema.

Durante la guerra COHN fué capaz de separar las fracciones serina y globulina de la sangre y pudo asegurar la pureza de la

serina; puesto que poniéndola en el aparato de Tiselius migró como una unidad; cosa que no sucede con la globulina que está compuesta de tres fracciones principales: alfa, beta y gama; que sumadas a las ya conocidas complicó más la bioquímica sanguínea, por ello, DUBUISSON (13) en 1946 decía: "no obstante el análisis de los compuestos protídicos, queda aún incompleto, pues ninguno de estos métodos (ultracentrífuga y electroforesis) nos permite todavía descomponer los diversos elementos que entran en la constitución de las cuatro familias proteicas (serina, alfa, beta y gama)".

Entre todos los estudios realizados con la electroforesis se van a citar algunos para poner de manifiesto en forma más clara, la importancia de este descubrimiento y las posibilidades de aplicación de la técnica descrita, ya que ella en muchos casos puede reemplazar a la electroforesis.

KABAT, MOORE y LANDOW (22) al efectuar estudios electroforéticos en líquidos céfalo-raquídeo concentrados, encontraron que las proteínas de estos presentaban similitudes con las proteínas plasmáticas, de los mismos sujetos, a tal punto que las alteraciones de estas últimas producían cambios similares en los diagramas del líquido cerebro espinal. Sin embargo en la neurosífilis observaron, como excepción; un aumento sorprendente de la gama-globulina en el líquido céfalo-raquídeo sin un cambio correspondiente en la sangre.

MOORE (38) estudia los diagramas electroforéticos de diversas especies animales y encuentra diferencias marcadas entre ellos y aún entre los animales de la misma especie pero de distinto sexo, como por ejemplo, el suero del gallo es diferente en la tasa de gama-globulina del suero de la gallina.

Otros autores como COHN (6) estudian las proteínas humanas en comparación con las de los animales y encuentran grandes similitudes en la gama-globulina humana y la equina; que hace que por las similitudes físicas y sobre todo por las de carácter de antígeno surjan posibilidades de orden práctico interesantes (45).

Los estudios electroforéticos en el terreno de la endocrinología también se aplican, para explicarse porque en los animales de experimentación se encuentra alza de las globulinas y es así que MOORE, LEVIN y LEATHEM (37) en ratas que normalmente no presentan alfa-globulina al ser hipofisectomizadas encuentran que el aumento global de las globulinas se debía a que había aparecido

la alfa-globulina, lo cual hace suponer que el sistema hormonal tenga un papel preponderante en la regulación de la proporción de estas fracciones y aún más acaso en su formación; y que debe hacerse estudios de la proteinemia fraccionada en síndromes endócrinos humanos que tal vez nos explicarían muchos puntos que hasta ahora se encuentran en el incógnito.

En lo referente a la inmunidad que se encuentra ahora en pleno auge igualmente se han efectuado trabajos, y ha sido posible seguir las variaciones que sufren los sueros de los animales de estudio durante el período de inmunización. La formación de anticuerpos que en algunos es precoz en otros aparece tardíamente y en cantidades insignificantes.

En sueros maternos y fetales LONGSWORT y Col. han hecho estudios electroforéticos y han puesto de relieve que las proteínas séricas en el feto son diferentes de las proteínas observadas en la sangre de la madre. Esta durante los períodos terminales del embarazo, aunque presenta una proteinemia total que no es muy distinta de los valores normales da una relación albúmino-globulinas muy baja. En la sangre fetal la sero-albúmina es menor que en los adultos, pero las concentraciones tanto relativas como las absolutas de la gama-globulina son mucho más altas que las de la sangre maternal y que las de los adultos en general. Desde que es un hecho conocido que la gama-globulina incluye muchos de los factores de la inmunidad o anticuerpos, el resultado de las investigaciones arriba mencionadas tienen especial interés en lo que se refiere al estado de inmunidad natural del recién nacido.

Entre los anticuerpos y la gama-globulina normal no existe otra diferencia fundamental sino la que se refiere a su capacidad de reaccionar con el antígeno específico (26). Pero, la gama-globulina de los sueros normales es diferente de la de los sueros inmunes desde el punto de vista antigénico (47).

El significado biológico de la gama-globulina en los procesos inmunitarios ha sido destacado por varios autores. La investigación científica ha llegado a demostrar que la gama-globulina no es en sí una fracción completamente homogénea, presenta un comportamiento electroforético complicado. Es el componente de menor movilidad, pero esta varía según sea la fuente de origen que proceda: JAMESON y ALVAREZ-TOSTADO (20) han llegado al fraccionamiento de la gama-globulina en diversos componentes que han denominado A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, B, C y D; esta última con una modalidad

insignificante o nula; todo esto nos da una idea de lo mucho que se está trabajando en estas investigaciones tan importantes por su gran trascendencia clínica.

Estudios recientes de DAVIS y Col. (12) han demostrado que la gama-globulina tiene una marcada acción anticomplementaria. Dicha acción es abolida por la presencia de las otras sero-proteínas. Sin embargo cuando existe una gran cantidad de gama-globulina, los sueros pueden presentar en sí, propiedades anticomplementarias que interfieren las pruebas de fijación del complemento.

Hay que recordar también los trabajos de COOPER (10) y DAVIS, MOORE, KABAT y HARRIS que han hecho la observación de que las reaginas sífilíticas están contenidas en las dos fracciones de menor movilidad electroforética de los sueros (beta y gama); lo cual abre un nuevo campo en la sífilografía.

Todo lo que se acaba de exponer es un ligero esquema de todas las proyecciones que tiene la electroforesis, relacionándola únicamente con las proteínas séricas, ya que también se han hecho estudios en otros líquidos orgánicos; pero, para evitar una extensión innecesaria al trabajo hay que ver las aplicaciones clínicas más importantes del dosaje proteico fraccionado.

Primero se transcribirá, lo que MASSE y BISERTE (32) en su trabajo "las aplicaciones clínicas de la electroforesis para diferenciar las proteínas del suero" dicen: "patológicamente podemos observar interesantes modificaciones en el *electroproteinograma* en numerosas afecciones. Señalaremos solamente las observaciones de los edematosos (hipoalbuminemia); en el curso de la nefrosis lipóidica (hipoalbuminemia muy marcada, hiper-alfa o hiper-beta globulinemia muy intensas hiperfibrinogenia e hipoglobulinemia); en la amilosis renal (hipoalbuminemia, hiper-alfa y beta y globulinemia); en el mieloma (beta y gama mieloma); en la cirrosis hepática (hiper-globulinemia); en el kala-azar (desdoblamiento de las albúminas y muy fuerte hipergama); etc."

METCOFF (35) expone en forma sintética los principales cambios por él observados en diferentes estados patológicos, en el cuadro; que en la página siguiente reproducimos.

	<i>Albúmina</i>	<i>Alfa-Globulina</i>	<i>Beta-Globulina</i>	<i>Gama-Globulina</i>
AUMENTAN		Nefrosis.	Sind. nefrótico.	Piasma fetal.
		Cirrosis.	Cirrosis.	Cirrosis.
		Hepatitis arsenical.	Melástasis de carcinoma hepático.	Enfermedad de Addison.
		Escarlatina.	Mieloma múltiple.	Mieloma múltiple.
		Desnutrición.		Nefritis aguda.
		Tuberculosis.		Periarteritis nudosa.
	Diabetes melitus.		Lupus eritematoso.	
			Leucemia aguda.	
			Reumatismo articular agudo.	
DISMINUYEN		Cirrosis.		Síndrome nefrótico.
		Carcinoma hepático con metástasis.		Desnutrición con hipoproteinemía.
		Glomerulo nefritis crónica con albuminuria.		
		Síndrome nefrótico.		
		Tuberculosis crónica.		
	Malaria.			

En el siguiente cuadro se exponen los resultados obtenidos por la Dra. LEYTON (26) en diferentes estados patológicos en comparación con el valor normal por ella determinado.

Nº	Diagnóstico	Proteína total en gramos %	Porcentajes relativos de las fracciones separadas			
			Alb.	Alfa-G	Beta-G	Gama-G
1	Obesidad	7,82	56,50	9,60	18,30	15,60
2	Linfogran. inguinal	7,17	48,60	9,30	14,60	27,50
3	Linfogran. ingual	7,52	37,85	8,80	15,55	37,80
4	Tifus exantemático	5,64	35,70	10,00	17,80	36,50
5	Tifoidea	6,38	41,00	15,20	6,80	37,00
6	Reumatismo	7,45	37,20	11,80	13,50	37,50
7	Nefroesclerosis mal.	6,43	35,00	15,80	23,40	25,80
8	Nefrosis	5,88	14,80	35,20	23,50	26,50
9	Nefrosis	5,45	27,30	25,20	20,20	27,30
10	Nefrosis y T.B.C. dif.	4,10	15,80	29,20	36,40	18,60
11	Normal	5,74	53,00	11,20	11,60	13,20

Los valores de las fracciones están expresados en porcentaje y no en gramos %; que es la forma acostumbrada entre nosotros.

Estudiando el cuadro anterior a grandes rasgos se aprecia que las alteraciones que presentan las diferentes muestras no habrían podido ser puestas de manifiesto por el único examen de la cifra total de proteínas que en algunos casos está normal. En lo que se refiere a las fracciones globulínicas lo importante se puede resumir así: a) el aumento neto experimentado por las alfa y beta globulinas en los sueros correspondientes a enfermos con síndromes renales y b) a los porcentajes de la gama-globulina que en general son superiores a los valores normales; excepto en el caso de la obesidad. Existe la posibilidad; dice, la autora del cuadro; que un contenido de gama-globulina superior a lo normal pueda interpretarse en parte como un índice de resistencia a la enfermedad, como podrían ser interpretados, por ejemplo, los casos 2, 3, 4 y 5. Pero otras veces, como en la enfermedad reumática se trata de fracciones globulinas patológicas, como la P<sub>2</sub> de Green (50).

En otros trabajos efectuados por MADRID (30) y Col. se refieren a casos de hepatitis, cirrosis e icterias obstructivas, en todos los cuales han observado una franca inversión de la reacción A/G. En algunos casos de cirrosis BAYER (4) describe un nuevo componente, cerca de la gama-globulina que lo identifica con el componente T de los sueros antitóxicos y Leyton lo interpreta diciendo: "si intrínsecamente este factor presentara características de globulina anticuerpo, podría tal vez pensarse en que la célula hepática al degenerarse, actuaría como un endoantígeno, dando lugar así a una respuesta de tipo inmunológico"; esto nos explicaría el que en muchos casos se acentúa las reacciones de floculación que se utilizan como pruebas funcionales hepáticas, no interpretándose ya como un mayor daño celular sino por un mayor poder de defensa del sujeto; cosa que había sido prevista por algunos autores. Mayor valor puede dársele a esta posibilidad si desde que sabemos que las reacciones, tipo test de Hanger o similares; están dadas por la mayor o menor tasa de gama-globulina y es factible que en ellas también intervenga el componente T de Bayer que tan cerca de la gama-globulina aparece en algunos procesos hepáticos, en el estudio electroforético del suero.

Sería extender demasiado este trabajo si se continuara citando la importancia del fraccionamiento proteico por la electroforesis; importancia que en la actualidad nadie la puede poner en duda y

más bien va incrementándose cada día el número de investigadores que siguen esos estudios con la finalidad de aportar mejores medios a los médicos en general para facilitarles el diagnóstico y tratamiento adecuado de los pacientes a su cargo.

Es por esto, que habiendo encontrado un método al alcance de cualquier laboratorio elemental, como lo es la técnica de WOLFSON, COHN, CALVARY e ICHIVA, se halla efectuado este estudio ya que este método químico tiene la gran ventaja de haber sido chequeados con la electroforesis dando resultados semejantes tal como se puede apreciar en el siguiente cuadro.

Nº de muestras	Método de fraccionamiento	Valor en gramos en 100 cc.					Relación A/G
		Albu- mina	Glob Tot	Alfa Glob	Beta Glob	Gama Glob	
4	Químico	2,40	3,58	1,15	0,94	1,49	0,67 (8)
	Electroforético	2,48	3,53	1,13	0,92	1,48	0,70
10	Químico	2,41	5,24	—	—	—	0,46
	Electroforético	2,42	5,14	—	—	—	0,47 (9)

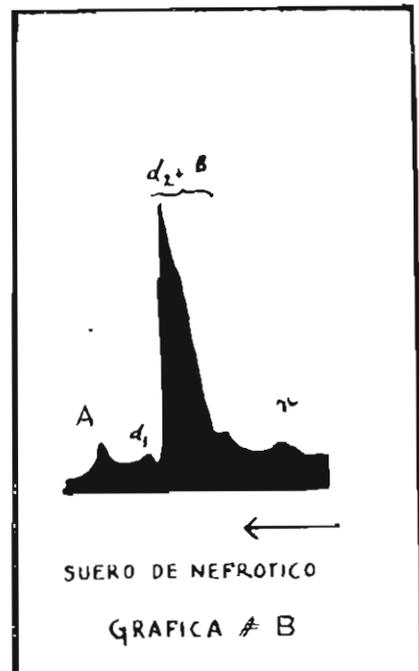
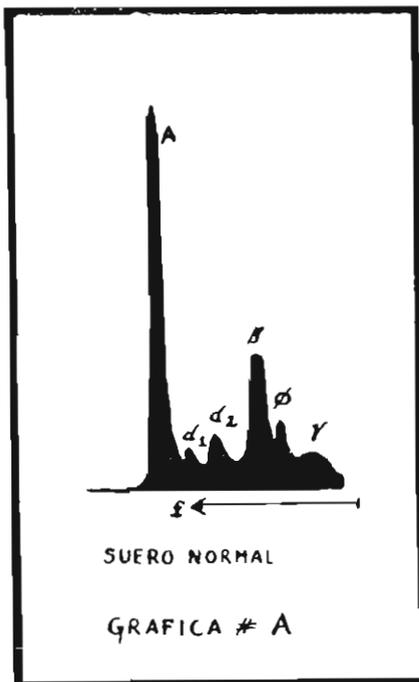
No ha sido posible hacer una comparación entre las cifras halladas por este método y las de otros trabajos nacionales ya que en ellos solo se consigna la cifra de proteínas totales, serinas y globulinas y no las de las fracciones globulínicas; pues, este estudio, no se ha efectuado anteriormente en nuestro medio; sin embargo en el siguiente cuadro se exponen los valores de los cuatro trabajos nacionales encontrados.

Autores	Nº de casos	Cifras en gramos %			
		P.T.	Alb.	Glob.	IA/G
Guzmán Barrón (15)	102	6,60	—	—	—
Llaque Sierra (29)	109	7,80	—	—	—
Merino César (34)	20	6,55	4,30	2,27	1,95
Salas A. (43)	35	8,38	4,97	3,40	1,44
Nosotros	50	7,21	4,34	2,87	1,51

Las cifras anteriores no se pueden comparar por tratarse de métodos diferentes, muchos de los cuales; actualmente están des-

cartados por haberse comprobado que daban valores erróneos. En lo que se refiere a los valores extranjeros no se efectúa comparación, porque las condiciones de raza, vida y alimentación son diferentes y se sabe la importancia que tienen estos factores en la proteinemia.

Por lo revisado se ve que, las diferentes técnicas utilizadas en la determinación de esos compuestos tan complicados y de tanta importancia vital denominados proteínas séricas; a través de los tiempos han ido evolucionando constantemente y desechándose muchas por erróneas; comprobándose también la importancia de la electroforesis y aún más el gran acierto de WOLFSON y Col. al haber descrito una técnica de fácil aplicación que puede sustituir a la electroforesis, y que no solamente para dicha determinación se puede utilizar; sino, según últimos trabajos, cuando el fraccionamiento se realiza en grandes cantidades de muestra se pueden obtener las fracciones en tal estado de pureza y cantidad; que tienen aplicación clínica, como medios terapéuticos; puntos que no se amplían más porque no corresponden a la finalidad del presente trabajo que es, el de determinar las cifras medio normales de las diferentes fracciones en nuestro país, con la técnica de WOLFSON y col.; propendiendo a su difusión por la gran trascendencia que tiene en la medicina práctica y especulativa.



## CONCLUSIONES

1ª La determinación cuantitativa de las proteínas del suero sanguíneo y sus fracciones albúmina y globulina es de gran utilidad en la clínica, pero los métodos empleados, hasta hace poco tiempo, han sido o muy laboriosos o inexactos. Nosotros hemos estudiado el método que utiliza la reacción del biuret, con la fórmula de Weinschelbaum, aplicando el método de Wolfson y colaboradores con excelentes resultados. La técnica es sencilla, aplicable a la colorimetría directa o a la fotocolorimetría, y da valores de acuerdo con la realidad.

2ª Desde hace pocos años en trabajos de investigación inmunológica y clínica se están empleando los datos obtenidos en la determinación de las fracciones de sero-globulinas; efectuados por la electroforesis, cuyo uso general es difícil por el elevadísimo costo del aparato. Recientemente se han propuesto técnicas químicas, controladas con la electroforesis, una de las que nosotros hemos estudiado, utilizando para nuestras determinaciones sueros de soldados sanos y cuyos resultados son los que siguen:

3ª La cifra normal de proteínas totales en el medio militar nacional, por este método es de  $7,21 \pm 0,08$  grs. %, teniendo como límites 6,75 y 7,75 grs. %.

4ª La cifra que corresponde a la sero-albúmina varía entre 3,75 y 4,86 grs. %, teniendo como media  $4,34 \pm 0,09$  grs. %.

5ª El valor  $2,87 \pm 0,07$  grs. % es la cifra normal de las globulinas totales con variaciones normales de 2,39 a 3,32 grs. %.

6ª Las cifras de las fracciones globulínicas varían en la siguiente forma: para la alfa-globulina de 0,77 a 1,04 grs. % con una media de  $0,93 \pm 0,002$  grs. %; para la beta-globulina de 0,68 a 1,50 con una media de  $1,01 \pm 0,06$  grs. % y para la gama-globulina de 0,67 a 1,20 grs. % con una media igual a la de la alfa-globulina, o sea  $0,93 \pm 0,05$  grs. %.

7ª El índice de relación albúmina-globulina varía entre 1,13 y 1,86 siendo su media de  $1,51 \pm 0,05$ ; índice cuya determinación es de mucha importancia.

8ª El método que hemos comentado es de fácil ejecución y capaz de realizarse en casi todos nuestros laboratorios clínicos, como auxilio en el diagnóstico, pronóstico y terapéutica de varios procesos morbosos y ser útil para controlar las alteraciones que experimentan las fracciones proteicas en estados patológicos pro-

pios de nuestro país, de manera especial en la enfermedad de Carrión, con sus diversas formas clínicas.

9ª Consideramos el presente trabajo como preliminar ya que continuaremos nuestras investigaciones con miras a comprobar su utilidad en la medicina práctica.

### CASUÍSTICA

En el siguiente cuadro se explican las marcas utilizadas en las muestras con las que se ha realizado el trabajo.

Marca de la muestra	Cantidad de sueros	Nº de las historias clínicas del B.S.
P <sub>1</sub>	Siete	489-490-491-492-493-497-498
P <sub>2</sub>	Cinco	509-510-511-515-516
P <sub>3</sub>	Cinco	521-524-526-527-528
P <sub>4</sub>	Cinco	545-546-547-548-549
P <sub>5</sub>	Cinco	558-559-560-561-563
P <sub>6</sub>	Cinco	574-575-576-577-578
P <sub>7</sub>	Cuatro	583-584-585-586
P <sub>8</sub>	Cuatro	587-588-589-590
P <sub>9</sub>	Cinco	596-597-598-600-603
S <sub>1</sub>	Uno	552
S <sub>2</sub>	Uno	564
S <sub>3</sub>	Uno	570
S <sub>4</sub>	Uno	572
S <sub>5</sub>	Uno	579

### BIBLIOGRAFIA

- 1.—AUTENRIETH, W. y MINK, F., citado por Kingsley.
- 2.—AUTENRIETH, W., citado por Kingsley.
- 3.—*Atlas Surface active Agents*. Industries Chemical Department. Copyright, 1948; by Atlas Powder Company. Printed in U.S.A.
- 4.—BAYER, R., citado por Leyton.
- 5.—BERRY, T. J.; PERKINS, E. J. *Chn. Patol.* 17, 847, (1949).
- 6.—COHN, E. J., citado por Leyton.
- 7.—COHN, E. J., CcMEEKIN, T. L., ONCLEY, J. L., NEWELL, J. M. y HUGHES, W. L. *J. Am. Chem. Soc.* 62, 3386, (1940).
- 8.—COHN, C. y WOLFSON, W. Q. *J. Lab. and Clin. Med.*, 32, 1203, (1947).
- 9.—COHN, C. y WOLFSON, W. Q. *J. Lab. and Clin. Med.*, 33, 367, (1948)
- 10.—COOPER, J. A. *Proc. Soc. Exper. Biol. and Med.*, 57, 248, (1944).

- 11.—CORONA, L. *Trat. de Quim. Normal y Pat. de la sanare.* IV Ed. Pág. 677; Edt. Ziq-Zaq. Chile.
- 12.—DAVIS y Col. *J. Immunol.* 49, 223, (1944).
- 13.—DUBUISSON, M. *L'Algérie Médicale*, N° 5, 395, (1946).
- 14.—FINE, J. *Biochem. J.* 29, 799, (1935).
- 15.—GUZMÁN BARRÓN, A. *Conferencias IV Cong. Sud. de Quim.* Pág. 97. Santiago de Chile, Casilla 12967.
- 16.—HAWK, P. B., OSER, B. L. y SUMMERSON, W. H. *Practical Physiological Chemistry.* 12ª ed. Pág. 156, (1947) The Blakiston Company. Philadelphia. Toronto.
- 17.—HILLER, A. *Proc. Soc. Exper. Biol. and Med.* 24, 385, (1927).
- 18.—HOCH, H. y MARRACK, J. Citado por Berry y colaboradores.
- 19.—HURTADO, A. *Anal. Facult. Med.* XXVIII N° 3. Edt. Med. Peruana. Lima-Perú.
- 20.—JAMESON, E. y ALVAREZ-TOSTADO, C. *J. Amer. Chem. Soc.* 65 (1), 459, (1943).
- 21.—JAGER, B. V. y NICKERSON, M. *J. Clin. Investigation*, 27, 231, (1948).
- 22.—KABAT, E. A., MOORE, D. H. y LANDOW, H. *J. Clin. Investigation*, 21, 571, (1942).
- 23.—KINGSLEY, G. R. *J. Biol. Chem.* 131, 197, (1939).
- 24.—KINSLEY, G. R. *J. Biol. Chem.*, 133, 731, (1940).
- 25.—KINSLEY, G. R. *J. Lab. y Clin. Med.* 27, 840, (1942).
- 26.—LEYTON, G. R. *Electroforesis en el estudio de antígenos y anticuerpos.* Santiago, Chile. Imp. Univer. (1948).
- 27.—LEWIS, H. B. *Protein.* General Basic Science of the Depart of Biol. Chem. University of Michigan Medical School. (Gentileza Dr. Vives).
- 28.—LOONEY, J. M. y WALSH, A. I. *J. Biol. Chem.* 130, 635 (1939).
- 29.—LLAQUE SIERRA, H. Tesis. Lima. (1930).
- 30.—MADRID, M. y Col., citado por Leyton.
- 31.—MAJOOR, C. L. H. *J. Biol. Chem.* 169, 583 (1947).
- 32.—MASSE, L. y BISERRTE, G. *La semaine des hopitaux.* 24 Anne N° 67,, 2168 (1948).
- 33.—MEHL, J. W. *J. Biol. Chem.* 157, 173 (1945).
- 34.—MERINO, C. Tesis. Lima. (1939).
- 35.—METCOFF, J. y STARE, E. *J. New. Engl. J. Med.* 236, 26-35 y 68-75, (1947).
- 36.—MILNE, J. J. *J. Biol. Chem.* 169, 595, (1947).
- 37.—MOORE, D. H. y Col., *J. Biol. Chem.* 153, 349, (1944).
- 38.—MOORE, D. H. *J. Biol. Chem.* 61, 21, (1945).
- 39.—MULFORD, D. J., *Ann. Rev. Physiol.* 9, 327, (1947).
- 40.—ROBINSON, H. W. y HOGDEN, C. G. *J. Biol. Chem.* 135, 727, (1940).
- 41.—ROBINSON, H. W. y HOGDEN, C. G. *J. Biol. Chem.* 135, 727, (1940). II Part.
- 42.—RIEGLER, E. Z. *Anal. Chem.* 53, 242, (1914).
- 43.—SALAS, A. Tesis. Lima. (1938).
- 44.—SOLS, A. *Rev. Esp. Fisiol.*, II, 175, (1946).
- 45.—SHAFFER, P. A. y SOMOGYI, M. *J. Biol. Chem.* 100, 695, (1933).
- 46.—TAYLOR, H. L. y Col. *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.* 50, 328, (1942).
- 47.—TREFFERS, H. P. y Col. *J. Exper. Med.*, 75, 135 (1942).
- 48.—WEICHSLEBAUM, T. E. *Am. J. Clin. Path.* 16, (T. S. 10, 40), (1946).
- 49.—WOLFSON, W. Q; COHN, C.; CALVARY, E. e ICHIBA, F., *Am. J. Clin. Path.*, 18, 723, (1948).
- 50.—GREEN, A. A. *J. Amer. Chem. Soc.*, 60, 1108, (1938).