

Departamento de Investigación del Hospital Municipal de Infecciosos
Sección Inmunoquímica: J. Gras

Curvas de fraccionamiento con hiposulfito sódico en sueros humanos normales y patológicos*

por J. Gras

(Recibido para publicar el 13 de diciembre de 1951)

Trabajando en la curva de fraccionamiento mediante sulfito sódico de las proteínas del suero se nos ocurrió que podría ser interesante, por su mayor solubilidad, estudiar la curva de fraccionamiento con el hiposulfito sódico, sal que no había sido utilizada por ningún investigador. Del estudio de la primera serie de doce sueros normales (4) llegamos a la conclusión de que por los puntos de inflexión encontrados podían separarse cuatro fracciones; resultaba por lo tanto que permitía, con base teórica suficiente, obtener un número de fracciones equiparables a la electroforesis, debido seguramente a que el incremento de precipitación por incremento de concentración salina es pequeño, por lo que resultaba interesante proseguir su estudio tanto bajo un punto de vista teórico como por su posible aplicación práctica a la determinación aislada de fracciones u obtención de las mismas con fines terapéuticos.

Material y Métodos

Los detalles de técnica son los expuestos en nuestro primer trabajo, con algunas diferencias. Las soluciones de hiposulfito se prepararon a concentraciones más bajas y más altas, es decir desde 20 a 55 gr. %, con un incremento de concentración igualmente de un gramo entre solución y solución. Debe tenerse en cuenta que al añadir el suero se produce una ligera dilución de estas soluciones; por lo que las concentraciones reales a las que se practica

* Este trabajo, algo modificado, corresponde a la comunicación presentada al Congreso Internacional de Patología Clínica, desarrollado en Londres en julio de 1951.

el fraccionamiento son algo inferiores y son las que se expresan en las gráficas y cuadros que se acompañan.

Estas soluciones de hiposulfito pueden mantenerse a la temperatura del laboratorio, excepto las soluciones de concentración superior a 52 gr. %, que en ambiente frío pueden cristalizar y deben ser en este caso conservadas a 30°. Esta concentración está muy por encima del punto de inflexión correspondiente a la separación de la albúmina, por lo que cuando interesa solamente hacer un fraccionamiento simple no se presenta este inconveniente.

La dilución del suero, las condiciones de mezcla y el tiempo de permanencia antes de la filtración han sido las mismas a las descritas en el trabajo antes citado. La filtración ha sido llevada a cabo con filtros Albet, números 240, 242 y 252; con este último número resulta la filtración más económica, pero las características del mismo no son tan constantes y en algunas remesas la filtración es defectuosa; con una buena remesa de los mismos hemos tenido que efectuar el pase por el mismo filtro unas tres o cinco veces trabajando con sueros normales, y unas dos veces trabajando con sueros patológicos. Con los filtros números 240 y 242, la filtración es más rápida, pero menos efectiva, por lo que han de repetirse más veces los pases por el mismo filtro.

Hemos determinado el pH mediante electrodo de quinhidrona en todos los filtrados correspondientes a varias curvas de fraccionamiento, habiendo comprobado que en todos los filtrados oscila únicamente entre 9'4 y 9'9. Este pH es próximo al que comprobaron Roche, Derrien y Moutte (13) para el sulfito sódico, 8'8 a 8'9.

En los filtrados se ha determinado la concentración de proteína mediante la reacción del biuret con reactivo de Weichselbaum. La lectura final se ha llevado a cabo en todos los sueros con el electrofotómetro de Evans. Como hemos practicado la lectura fotométrica, no se utilizó la solución de timol urea.

En la expresión gráfica de las curvas se han seguido las siguientes normas. En el eje de ordenada se expresa la solubilidad (S) en gramos % de proteína del filtrado, en el eje de abscisa la concentración (C) en gramos % de hiposulfito sódico. Las curvas han sido diferenciadas de acuerdo con Majoor (8, 9); en el diagrama de diferenciación los valores corresponden a incremento de precipitación por cada incremento de concentración salina.

Los sueros normales proceden de médicos, estudiantes y enfermeras de edad oscilante entre 19 y 35 años. En total hemos obtenido la curva de fraccionamiento aislada en 35 sueros normales y en 141 sueros humanos patológicos.

Resultados

En la curva promedio obtenida del fraccionamiento aislado de los doce primeros sueros estudiados aparecían (4) tres puntos de inflexión en las concentraciones de 30.7, 35.5 y 42.4 gr. % de hiposulfito sódico. Para mayor seguridad acerca de la posición de estos puntos hicimos un estudio ulterior en doce sueros normales más investigando concentraciones intermedias alrededor de estos puntos de inflexión. Con esta serie se obtuvo la curva promedio expuesta en la figura 1, en la cual se observan también tres puntos de inflexión en las concentraciones 31.6, 36.4 y 44.1.

CUADRO I

Valores del promedio de S, desviación standard y error cuadrático medio correspondiente al fraccionamiento de 35 sueros normales (Fig. 2.)

S	σ	ϵ	S	σ	ϵ
68'52	4'38	1'03	51'17	2'21	0'40
67'42	4'10	0'99	50'01	2'81	0'55
67'41	4'60	1'05	48'95	2'76	0'48
66'43	4'44	1'04	48'82	2'72	0'48
63'07	5'03	0'87	47'73	2'52	0'46
64'13	4'21	0'71	47'42	3'02	0'53
62'51	3'61	0'63	46'53	3'07	0'54
60'78	3'71	0'66	46'43	2'99	0'52
59'75	3'27	0'56	45'22	3'47	0'60
56'50	3'42	0'62	45'04	3'84	0'71
56'50	2'57	0'44	43'72	3'88	0'67
54'87	2'86	0'50	42'82	4'24	0'86
54'55	2'43	0'41	41'63	4'22	0'73
53'38	2'47	0'43	41'41	4'66	0'88
51'56	2'64	0'45	38'64	4'62	0'85

Además de confirmar la existencia de los puntos de inflexión, esta serie resulta interesante porque al haber efectuado determinaciones a concentraciones intermedias alrededor de los mismos, su comprobación presenta una mayor seguridad.

Finalmente, con las curvas de fraccionamiento obtenidas en una nueva serie de once sueros normales, sin concentraciones intermedias, hemos calculado la curva promedio, conjuntamente con los sueros anteriormente fraccionados, o sea, en un total de 35 sueros normales. Esta curva se expone en la figura 2. En la misma se presentan puntos de inflexión en las concentraciones 30.7, 35.5 y 44.1. Esta curva presenta dos puntos más de inflexión en las concentraciones 26.8 y 28.8 insinuados en las curvas obtenidas a base de las series de doce sueros. En algunos de los sueros patológicos se observan también estos puntos de inflexión. Des-

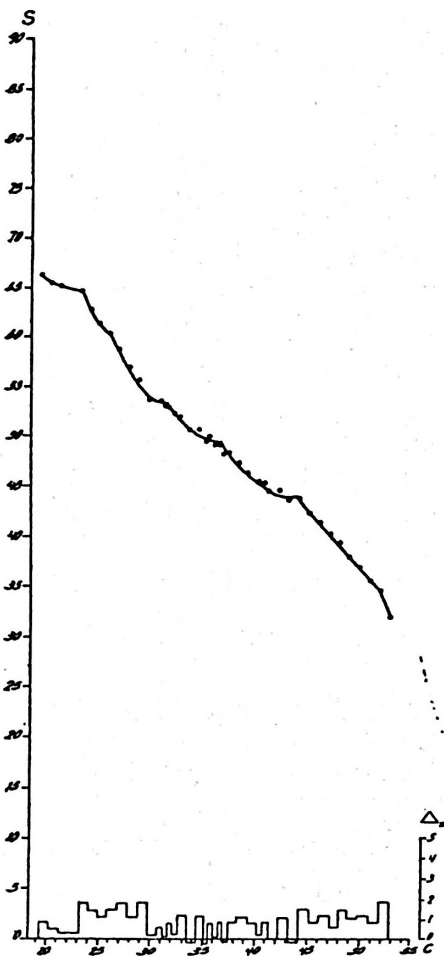


Fig. 1. — Curva promedio de 12 sueros humanos normales.

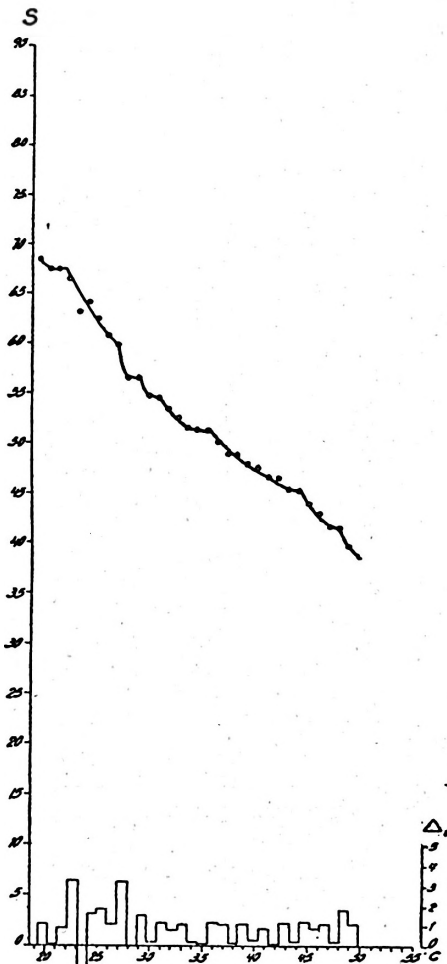


Fig. 2. — Curva promedio de 35 sueros humanos normales.

pués de la concentración del 44.1, puede observarse otro punto de inflexión que se presenta también en algunos de los sueros patológicos y que serán valorados posteriormente.

Calculamos la desviación standard y el error cuadrático medio para cada uno de los puntos de esta curva promedio de los 35 sueros fraccionados separadamente. Hemos podido comprobar que entre las concentraciones 28.8 y 42.4, que es la zona intermedia de la curva y en la que aparecen los puntos de inflexión, se encuentran los valores más bajos de desviación standard y error cuadrático medio (cuadro I); este hecho establece la realidad de la existencia de estos puntos de inflexión.

CUADRO II

Estudio comparativo del valor normal en suero de las fracciones obtenidas mediante la curva de fraccionamiento con $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ y por lo electroforesis

	N.º de observ.	Alb. ‰	Globulinas ‰		
			α	β	γ
Electroforesis . . .					
Beiler, Ecker y Spies, 1947. . .	7	59'5	13'8	13'4	13'4
Reiner, Fenichel y Stern, 1949	20 ⁽¹⁾	53'6	15'5	14'1	15'7
	60 ⁽²⁾	56'8	15'9	12'8	14'4
Martin, 1949 ⁽³⁾		58'6	12'4	13'1	11'7
Wunderly, 1950 ⁽³⁾		67'50	4	11	16
Promedio		60	11'4	13'1	14'2
$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$					
Gras, 1951	35	65'73	9'23	4'93	20'38
En g ‰.		45'04	6'13	3'38	13'97

⁽¹⁾ Dadores profesionales.

⁽²⁾ Dadores familiares.

⁽³⁾ Deducido de los límites dados en (7) y (4) respectivamente y por lo tanto, deben tomarse como aproximados.

Del estudio de todas estas curvas creemos que está justificado aceptar que la curva de fraccionamiento con el hiposulfito sódico *presenta tres puntos de inflexión principales, que separan cuatro fracciones; estos puntos se encuentran en las concentraciones 30.7, 35.5 y 44.1 g. % de hiposulfito sódico.* Calculando mediante estos puntos y a base de los valores promedio de las 35 curvas obtenidas, el valor correspondiente a cada una de estas fracciones en cifras absolutas y porcentuales hemos obtenido resultados equiparables a los obtenidos electroforéticamente en sueros normales. Presentamos estos valores, comparativamente con algunos electroforéticos, en el cuadro II. Los datos electroforéticos están

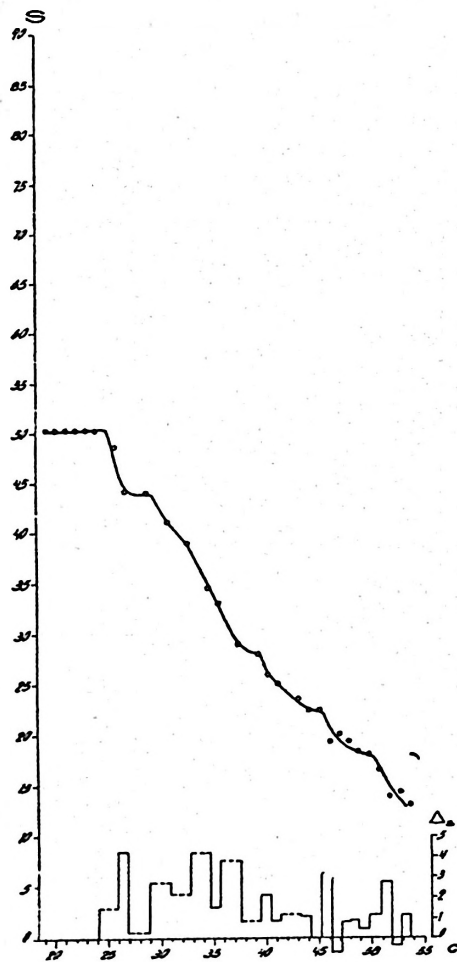


Fig. 3. — C. 109 M. C. Nephritis. Nefrosis.

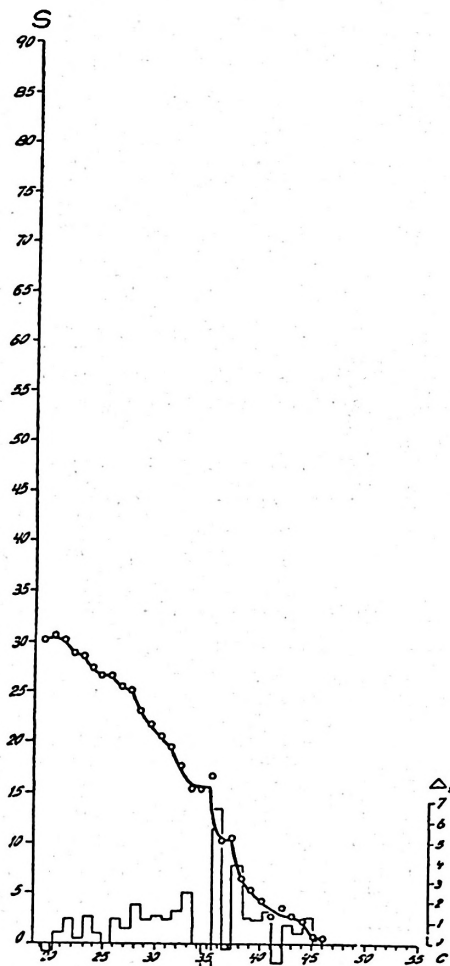


Fig. 4. — C. 253. J. V. Nefrosis.

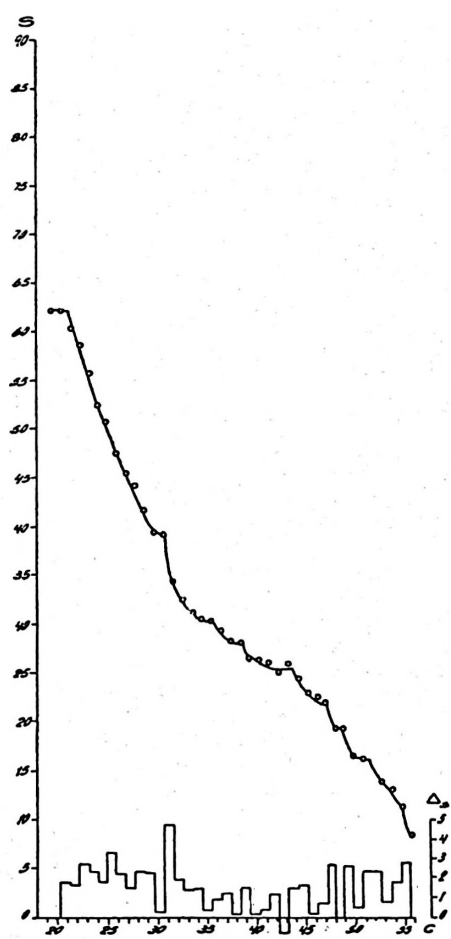


Fig. 5. — C. 241. J. C. Neoplasia hepática.

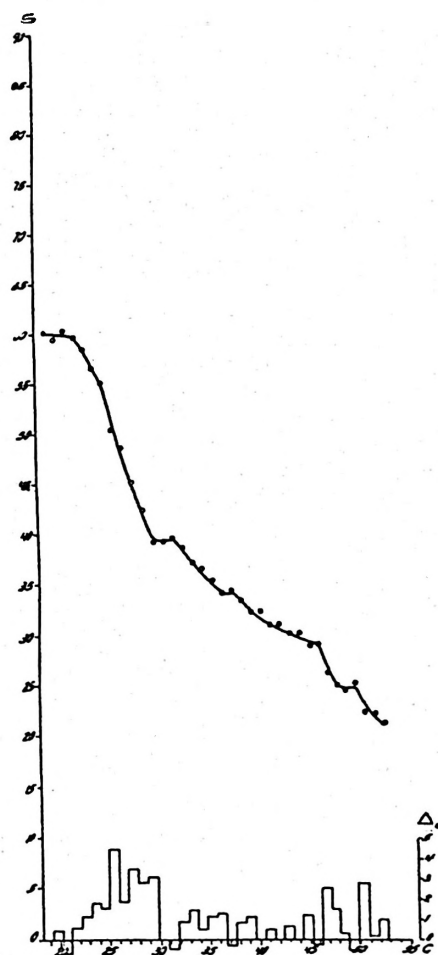


Fig. 6. — C. 217. B. C. Neoplasia de recto.

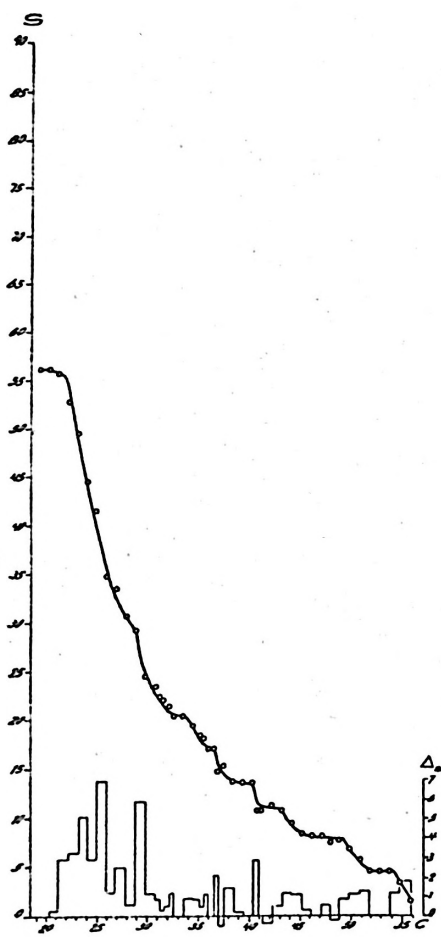


Fig. 7. — C. 220. A. B. Cirrosis hepática.

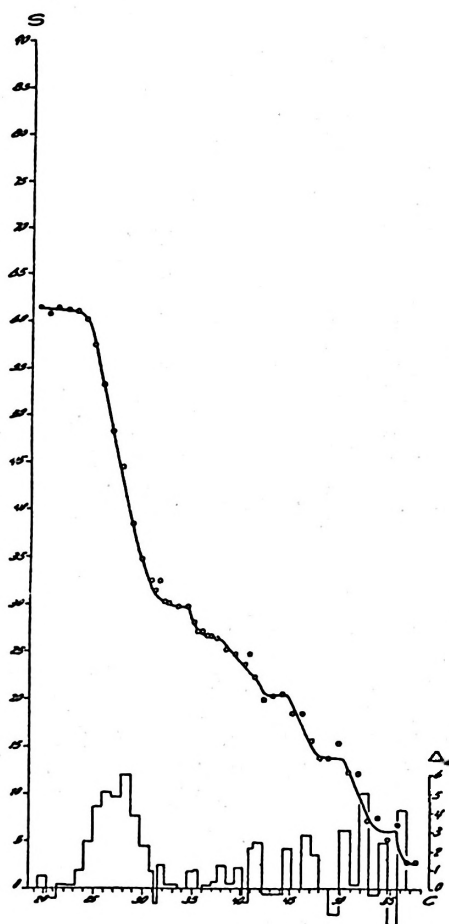


Fig. 8. — C. 226. M. G. Cirrosis hepática.

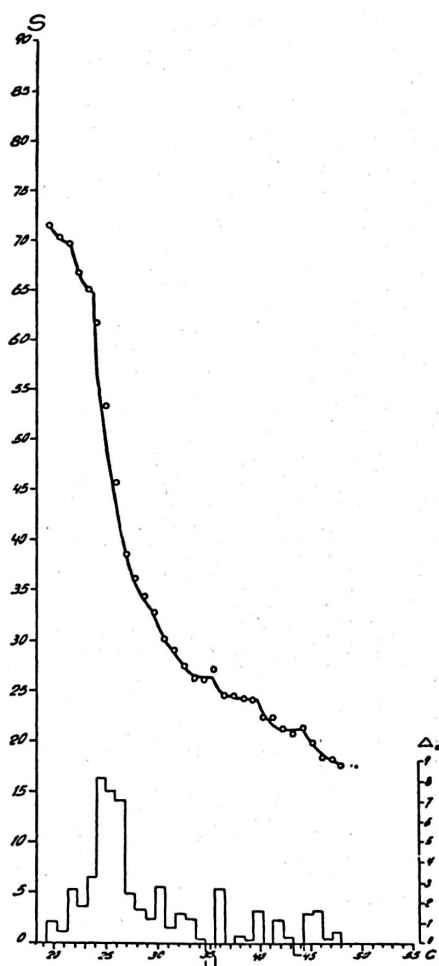


Fig. 9. — C. 254. M. P. Cirrosis hepática.

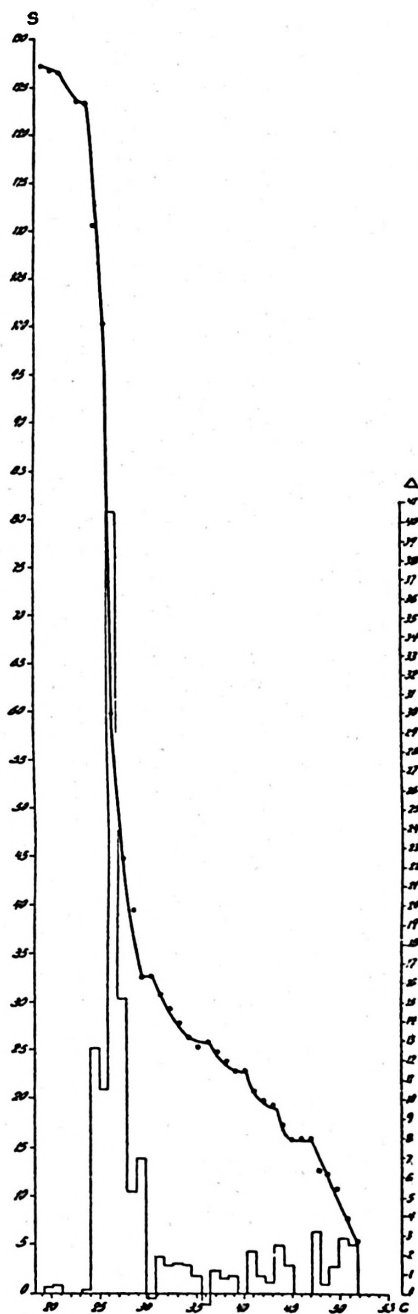


Fig. 10. — C. 90. E. L. Plasmocitoma.

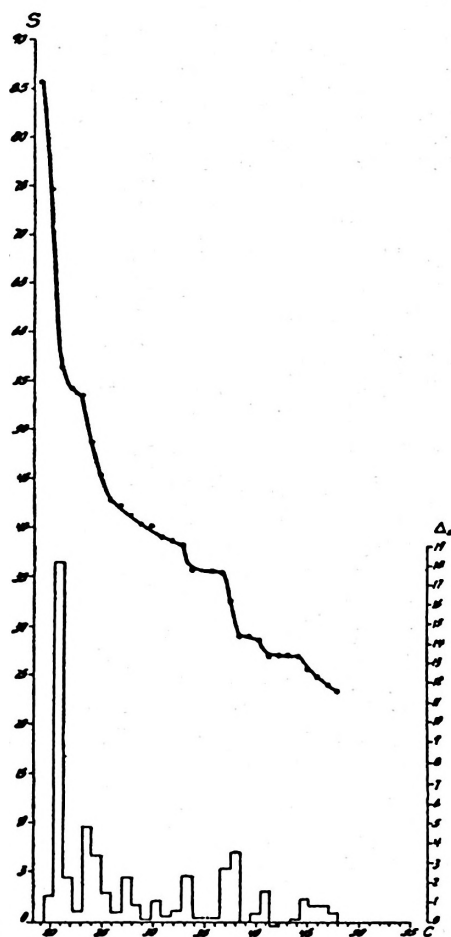


Fig. 11. — C. 70. A. F. Plasmocytoma.

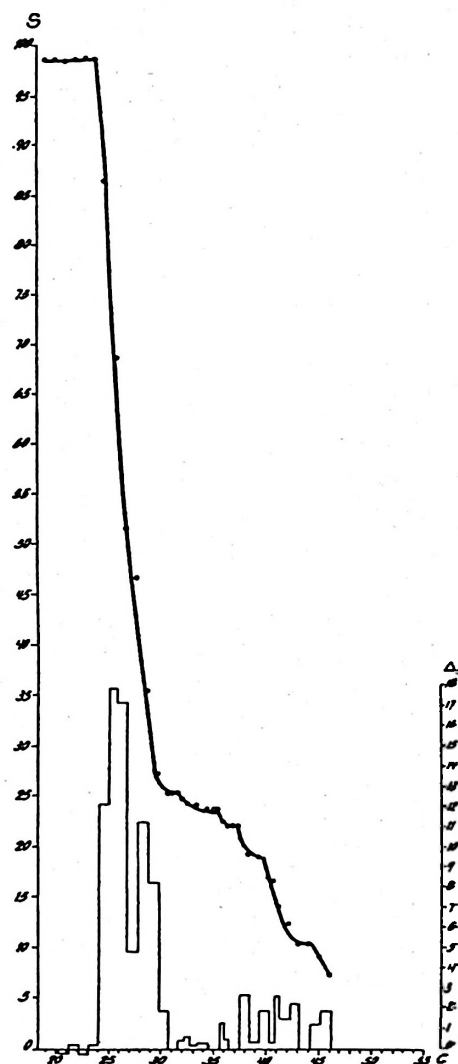


Fig. 12. — C. 153. A. V. Plasmocytoma.

tomados de autores que han trabajado en suero para que resulten más comparables con los nuestros obtenidos también en suero.

Estas diferencias dependen principalmente de la globulina β y son de un orden que podría ser explicado, como sugiere Majoor para sus resultados con el sulfato sódico, por la influencia sobre el diagrama electroforético de los lípidos que acompañan a esta fracción. Como se sabe, ha sido posible probar que por la extracción de los lípidos del suero esta globulina disminuye (Zeldis, McCoord y Kulka (16), Moore, Roberts, Costello y Schonberger (11), Longsworth y Mac Innes (6). Para mayor seguridad estamos estudiando comparativamente el fraccionamiento con el hiposulfito sódico y la electroforesis en papel. De momento los resultados promedio de la primera serie de 22 sueros normales estudiados dan valores próximos a los obtenidos mediante esta sal. Sin embargo este punto será objeto de una publicación ulterior cuando se haya investigado más ampliamente, principalmente en sueros patológicos.

Del estudio comparativo de estos resultados obtenidos con el hiposulfito sódico y los que obtuvimos con el sulfito sódico (4) resultan equivalentes a los de los autores que han examinado comparativamente el fraccionamiento salino y la electroforesis (Majoor (8, 9), Kibrick y Blomstein (5), Milne (10), Ardry (1).

Hemos practicado, hasta el momento, la curva de fraccionamiento en 141 sueros patológicos por el interés que presenta bajo un punto de vista clínico y también teórico para la comprobación de la persistencia de los puntos de inflexión obtenidos en los sueros normales, así como para la valoración de los puntos de inflexión secundarios. Exponemos algunas de ellas en las figuras 3 a 12, correspondientes a varios pacientes afectados de plasmocitoma, neoplasias, cirrosis hepática y nefritis con componente nefrótico, como ejemplo de sueros con hiperproteinemia, hipoproteinemia o con variación ligera o nula de la proteinemia total.

El estudio detallado en cada uno de estos procesos patológicos será llevado a cabo cuando tengamos recogido mayor material. De momento destacan varios hechos interesantes, dos de tipo general y otros de tipo clínico. En relación con el plasmocitoma es interesante señalar, como se observa en las figuras 10 a 12, que mediante la curva de fraccionamiento con hiposulfito sódico pueden separarse tipos distintos de plasmocitoma; en algunos de estos enfermos la curva fué repetida hasta tres veces a intervalos distintos de tiempo, manteniéndose en cada caso el comportamiento correspondiente de la misma. Se confirma también el aumento de globulina γ en la cirrosis (figs. 7, 8, 9) y en las curvas de los dos sueros nefróticos el mayor incremento de precipitación, en la zona de las β y α globulinas junto con una albúmina muy baja.

Uno de los hechos de interés teórico es la persistencia de los puntos de inflexión descritos para los sueros normales y el otro

la caída constante de las curvas en la zona de las globulinas. Para observar el primero de ellos con mayor claridad escogimos al azar 17 curvas de fraccionamiento en sueros patológicos de tal manera que incluyesen sueros disproteinémicos con hiperproteinemia, hipoproteinemia o proteinemia total ligeramente modificada, para dar mayor valor a los resultados.

Hemos encontrado que prácticamente todos los sueros patológicos, independientemente del valor de la proteinemia total, presentan puntos de inflexión situados muy próximos a las concen-

CUADRO III

Situación de los puntos de inflexión en las curvas de sueros patológicos, expresada por las concentraciones correspondientes de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$.

N.º curva	Prot. g. %	GLOBULINAS							Albúmina		
				γ	β			α			
70	86'12	23'04		32'16	36'48			40'32	44'16		
75	84'82		25'92	30'72	35'52				44'16		
89	45'34		26'88	29'76		39'36	*	*	*		
90	127'23			30'72	36'48			40'32	43'20	47'04	
104	80'11			30'72	*				42'24		49'92
137	68'73	23'04	27'87	31'68	37'44			40'32	46'08		
153	98'79			31'68	35'52	37'44	39'36	44'16			
165	41'27	24'—	25'92	31'20		38'40	42'24	45'12		49'92	
169	53'62		26'88	32'64		38'40		43'20	48'96		
174	60'44		27'84	29'76	33'60	38'40	40'32	45'12		51'84	
176	106'27			31'68	34'56		39'36	42'24	46'08		
179	52'16	24'96	29'76	32'16	36'48			42'24		51'84	
180	60'93			32'16	37'44		41'28		48'96		
181	100'25			30'72	37'44			42'24	48'—	51'84	
183	53'13	24'—	26'88	31'68	36'96			43'20	46'08	48'—	50'88
203	48'25		26'88	30'72	34'56			43'20	48'96		
204	124'44	21'12	27'84	31'68	37'44		41'28	43'20	48'—		
Promedio		23'36	27'26	31'28	36'14	38'40	40'53	43'58	46'08	48'27	51'04

* En esta zona faltan determinaciones.

traciones 30.7, 35.5 y 44.1, que son las descritas en el promedio de los sueros normales. Calculando el promedio de estos sueros patológicos, hemos obtenido 31.2, 36.1 y 43.4, promedio desplazado muy ligeramente del normal (cuadro III); además en la serie de doce sueros normales fraccionados con concentraciones intermedias se encuentran puntos situados casi idénticamente a los del promedio de estos sueros patológicos.

Esta observación es una nueva prueba de la existencia real de estos puntos de inflexión y por lo tanto de las fracciones que delimitan. Además, es de interés práctico, ya que demuestra que puede llevarse a cabo la separación de estas fracciones por la preci-

pitación a la concentración correspondiente, sin necesidad de obtener la curva total, y sin un error apreciable.

Otros puntos de inflexión se encuentran en los sueros patológicos, algunos de los cuales se insinúan en los sueros normales. De momento parece debe aceptarse, al menos para algunos de ellos, como correspondientes a la existencia de subfracciones que por estar aumentadas en sueros patológicos, se hacen más visibles (véase por ejemplo las figuras 10, 11 y 12).

El otro punto interesante es que en todos los sueros patológicos se encuentra como hecho característico una caída de la curva en la zona de las globulinas y no hemos encontrado nunca que la curva persista alta en esta zona para caer después en la zona de la albúmina; esto corresponde a un desequilibrio entre las fracciones a expensas de la albúmina. Esta observación confirma las anteriores de Wuhrmann y Leuthard (15) y nuestras (4), obtenidas respectivamente mediante la curva de fraccionamiento con la mezcla de fosfatos y con sulfito sódico. Este hecho fué discutido ampliamente conjuntamente con una revisión de la literatura en una publicación anterior (3).

Discusión

Del estudio original de la curva de fraccionamiento con hiposulfito sódico de las proteínas del suero se deduce la existencia en la misma de tres puntos de inflexión principales, que se presentan a las concentraciones de 30.7, 35.5 y 44.1 gr. %. Hemos llegado a esta conclusión estudiando las curvas promedio del fraccionamiento de dos series de doce sueros y la curva promedio del total de 35 sueros humanos normales fraccionados aisladamente. El hecho de haber obtenido aisladamente la curva de fraccionamiento de cada uno de los sueros nos ha permitido calcular la desviación standard y el error cuadrático medio de cada uno de los puntos de la curva que presentamos y, como ya hemos señalado, el estudio de estos factores estadísticos creemos que apoya la existencia real de estos puntos de inflexión. La existencia de los mismos está apoyada también por su persistencia en los sueros patológicos, a pesar de una gran variación de la proteinemia total, tanto en el sentido de la hiperproteinemia como de la hipoproteinemia. La valoración de los puntos de inflexión secundarios es un poco más difícil, pero para algunos de ellos, principalmente apoyados en lo que se observa en el caso del plasmocitoma, parece debe aceptarse que corresponden a la existencia de subfracciones que por estar incrementadas en los sueros patológicos se hacen más visibles.

Determinando a base de los puntos de inflexión principales obtenidos en los sueros normales el valor cuantitativo y porcentual

de las fracciones delimitadas por los mismos, se obtienen resultados equiparables a los de la albúmina y globulinas α , β y γ electroforéticas. Como hemos indicado, la discrepancia que existe entre el fraccionamiento con el hiposulfito sódico y la electroforesis es de un orden que podría ser explicado por el incremento que la porción lipídica de las globulinas α y β produce en el área correspondiente a estas fracciones en el diagrama electroforético.

Para una mayor seguridad acerca de este punto estamos iniciando el estudio comparativo del fraccionamiento con hiposulfito sódico y la electroforesis en papel. De momento los valores normales promedio obtenidos con esta última técnica resultan próximos a los obtenidos con el hiposulfito sódico. Sin embargo, no puede llegarse a una conclusión definitiva hasta haber llevado a cabo un estudio más extenso, principalmente en sueros patológicos, así como la investigación electroforética de cada una de las fracciones aisladas por el hiposulfito.

De momento nos parece que debe aceptarse que el fraccionamiento con hiposulfito sódico presenta ventajas teóricas y prácticas frente a todas las sales propuestas hasta ahora. Del primer tipo, por la aceptable coincidencia de las fracciones deducidas de los puntos de inflexión que se presentan en su curva con los obtenidos por electroforesis. Del segundo tipo, porque su gran solubilidad hace muy fácil preparar sus soluciones, trabajar con ellas a temperatura ambiente sin peligro de cristalización, a las concentraciones utilizadas para la precipitación de las diferentes fracciones y por su rapidez de precipitación; todo ello sin perturbar la determinación de proteínas en el filtrado por las técnicas de Kjeldahl o del biuret.

Resumen

Se estudian las curvas de fraccionamiento del suero con hiposulfito sódico, tal propuesta por primera vez en un trabajo anterior. Por las curvas promedio de una serie de 12 y otra de 35 sueros normales se afirma la existencia de tres puntos de inflexión principales a las concentraciones de 30.7, 35.5 y 44.1 g.% de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$. Por el estudio estadístico y por su persistencia en los sueros patológicos se valora la existencia real de los mismos. Calculando a base de estos puntos el valor absoluto y porcentual de las fracciones que delimitan se encuentran resultados equiparables a los electroforéticos.

Se ha obtenido la curva de fraccionamiento en 82 sueros patológicos y se ha confirmado mediante las mismas la existencia de tipos diferentes de plasmocitoma, el aumento de γ globulina en las cirrosis y en dos sueros nefróticos el mayor incremento de precipitación en la zona de las globulinas β y α . Hasta el momento no se ha observado ninguna curva patológica que no descienda en la zona de las globulinas.

Finalmente se considera que el fraccionamiento con hiposulfito sódico presenta ventajas teóricas y prácticas frente a todas las sales propuestas hasta ahora. Del primer tipo, por la aceptable coincidencia de las

fracciones deducidas de los puntos de inflexión que se presentan en su curva, con los obtenidos por electroforesis. Del segundo tipo porque su gran solubilidad es fácil preparar sus soluciones y trabajar a temperatura ambiente; por su rapidez de precipitación, y no perturbar la determinación de proteínas en el filtrado por las técnicas de Kjeldahl o del biuret.

Summary

The fractioning curves of serum with sodium thiosulphate, a salt suggested the first time in an earlier paper, are studied. From the average curves of a series of 12 and another of 35 sera the existence of three main points of inflection is established at the concentrations of 30,7, 35,5 and 44,1 g% of $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$. Their actual existence is confirmed by statistical studies and by its persistence in pathological sera. Calculating on the basis of these points, the absolute and percentage values of the fractions delimited by the results are found equivalents to the electrophoretic ones.

The fractioning in 82 pathological sera has been obtained and by means of them it has been confirmed the existence of different types of plasmocitoma, the increase in γ globulin in cirrhosis of the liver and in two nephrotic sera the increase in precipitation in the β and α zone. Up to now no pathological curve, that does not descend to within the globulin zone, has been observed.

Finally, it may be considered that the fractioning with sodium thiosulphate offers theoretical and practical advantages over all salts so far suggested. Theoretically on account of the satisfactory coincidence of the fractions deduced from the inflection points found in its curve, with the electrophoretic ones. Practically because of its great solubility it is possible to prepare its solutions easily and work at room temperature; furthermore it precipitates rapidly and does not disturb the protein determination in the filtrate by Kjeldahl or biuret reaction.

Bibliografía

- (1) ARDRY, R.: Technique de précipitation des protéines suppléant à l'électrophorèse. *Bull. Soc. Ch. Biol.*, **32**, 237, 244, 1950.
- (2) BIELER, M. M., ECKER, E. E. y SPIES, T. D.: Serum proteins in hypoproteinemia due to nutritional deficiency. *Jour. Lab. Clin. Med.*, **32**, 130, 138, 1947.
- (3) GRAS, J.: Fisiopatología general de las proteínas plasmáticas. *R. esp. Fisiol.*, **6**, 275, 337, 1950.
- (4) GRAS, J. y SALAZAR, M.: Curvas de fraccionamiento con sulfito e hiposulfito sódico de las proteínas del suero. I. Sueros humanos normales. *R. esp. de Fisiol.*, **6**, 113, 124, 1950.
- (5) KIBRICK, A. C., y BLUMSTEIN, M.: Fractionation of serum into albumin and alfa, beta and gamma globulin by sodium sulphate. *J. Biol. Chem.*, **176**, 983, 987, 1946.
- (6) LONGSWORTH, L. G. y MAC INNES, D. H.: An electrophoretic study of nephrotic sera and urine. *J. Exp. Med.*, **71**, 77, 82, 1940.
- (7) MARTIN, D. H.: An electrophoretic study of the components of the serum proteins in cirrhosis of the liver. *Brit. Jour. Exp. Path.*, **30**, 231, 236, 1949.

- (8) MAJOOR, C. L. H. : The possibility of detecting individual proteins in blood serum by differentiation of solubility curves in concentrated sodium sulphate solutions. *Yale J. Biol. Med.*, **18**, 419, 441, 1946.
- (9) MAJOOR, C. L. H. : The possibility of detecting individual proteins in blood serum by differentiation of solubility curves in concentrated sodium sulphate solutions. II. Comparison of solubility curves with results of electrophoresis experiments. *J. Biol. Chem.*, **169**, 583, 594, 1947.
- (10) MILNE, J. : Serum protein fractionation : A comparison of sodium sulphate precipitation and electrophoresis. *J. Biol. Chem.*, **169**, 595, 599, 1947.
- (11) MOORE, D. H., ROBERTS, J. B., COSTELLO, M. y SCHONBERGER, T. W. : Factors influencing the electrophoretic analysis of human serum. *J. Biol. Chem.*, **180**, 1147, 1158, 1949.
- (12) REINER, M., FENICHEL, R. L. y STERY, K. G. : Electrophoretic studies on the protein distribution in normal human serum. *Act. Haematol.*, **3**, 202, 210, 1950.
- (13) ROCHE, J., DERRIEN, J. y MOUTTE, M. : Le sulfite de sodium agent de précipitation des globulines sériques. *C. R. Soc. Biol.*, **130**, 1301, 1306, 1939.
- (14) WUHRMANN, F., WUNDERLY, CH. y NICOLA, P. : Über die Heterogenität des Globulin im krankheitshalber veränderten Blutserum. *Klin. Woch.*, **28**, 667, 672, 1950.
- (15) WUHRMANN, F. y LEUTHARD, F. : Neue untersuchungen zur Kenntniss der Plasmaliweiss Körper. *Helv. Med. Act.* **6**, 539. 543. 1938.
- (16) ZELDIS, L. J., ALLING, E. L., MCCOORD, A. B. y KULKA, J. F. : Plasma protein metabolism. Electrophoretic studies. The influence of plasma lipoids on electrophoretic patterns of human and dog plasma. *J. Exp. Med.*, **82**, 411, 430, 1945.