

Sección de Química Biológica del Instituto «Santiago
Ramón y Cajal»
(Prof. Dr. A. Santos Ruíz)

Estudio polarográfico de la reacción de Fuchs

JESÚS LARRALDE

INTRODUCCION

Habían observado HEYROVSKY y BABICKA (1) siguiendo los trabajos de HERLES y VANCURA, que pequeñas cantidades de albúmina provocaban en las soluciones que contenían iones amonio un importante escalón u onda polarográfica, llamada «prenatrium» por aparecer antes que la deposición del sodio y la atribuyeron a una separación catalítica del hidrógeno de los iones amonio, rebajada su sobretensión por las albúminas.

BRDICKA (2) encontró posteriormente, que la onda albuminoidea depende del pH, de la solución puffer, entre ciertos límites de la concentración de la albúmina, que los iones amonio no son de importancia esencial, y que únicamente se da este efecto en aquellas albúminas que contienen el núcleo de cistina en su molécula.

Introdujo como solución fondo la formada por cloruro amónico, amoníaco y sales de cobalto (3), obteniendo así, con pequeñísimas cantidades de albúmina, un doble escalón que aparece después de la onda del cobalto.

Estudios realizados por este autor con aminoácidos resultante de la desintegración de albúminas, afirmaron la estrecha relación de este hecho con los grupos de cistina o cisteína en ellas contenidas.

Reacción análoga presentan la cistina, cisteína, ácido tioglicólico, glutatión, etc. Hoy se achaca esta reacción a los grupos —S—S— o —SH— comunes a estos cuerpos. Se trata de una reducción catalizada del hidrógeno del grupo —SH— . La separación del hidrógeno está facilitada por el encadenamiento entre el cobalto y el sulfhidrilo en un complejo interno, con formación de un dipolo, en el que la unión del azufre con el hidrógeno se debilita, éste se hace más fácilmente separable, haciéndolo a un potencial más positivo y produciendo en las gráficas polarográficas una onda cuya altura es proporcional a la cantidad de hidrógeno desprendido, o lo

que es lo mismo, a los —SH , que han reaccionado. En el caso de que existan uniones —S—S— , son reducidas previamente en el cátodo a SH .

Esta reacción polarográfica, fundamental en el estudio de las albúminas, permite, a causa de su gran sensibilidad, ser utilizada en determinaciones microanalíticas; con ella se ha determinado la cistina en hidrolizados de diferentes albúminas (5). No hay que olvidar que algunos aminoácidos rebajan la altura de la onda de la cistina (6).

Aun cuando la onda producida por las albúminas se deba a los grupos SH , existe cierta diferencia en las formas de las curvas polarográficas entre la cistina, cisteína, sencillos tioácidos y disulfuros, respecto a las albúminas, diferencia fácilmente comprensible teniendo en cuenta la complicada relación que en estas últimas están los grupos activos. Otra diferencia existe en que las albúminas muestran idéntica reacción frente a las sales complejas cobálticas, hecho que permite separar la acción de cistina, cisteína, glutatión, etc., frente a los cuerpos albuminoideos y estudiar sólo el efecto de éstos.

La altura de la onda polarográfica no crece linealmente con la concentración de los grupos —SH , o —S—S— , sino que tiende hacia un valor límite que viene dado por la saturación de la superficie catódica por las moléculas de albúmina. Este valor límite y su dependencia con la concentración es específico de algunos cuerpos albuminoideos (7).

Consecuencia de la complicación de las moléculas albuminoideas, no son capaces de reaccionar en la superficie del electrodo todos los grupos sulfhidrilos y disulfuros existentes, por esto al ser liberados por diferentes medios se produce una elevación de la onda, cuya altura a su vez nos mide la intensidad de la transformación. De aquí que esta reacción pueda ser utilizada en una determinación cuantitativa, en procesos de desnaturalización, proteolisis y otros.

Así, BRDICKA (8) confirmó esto, en la desnaturalización de la proteína del suero por medio de ácidos y bases, JÍROVEC y WERNIG (9) por la acción de los rayos ultravioletas, TROPP JUHLING y GEIGER (7) por el calor. En todos estos casos, la desnaturalización conduce a un aumento de la onda polarográfica.

La proteolisis de las albúminas puede ser registrada también, como lo ha demostrado BRDICKA (10), al hacer actuar pepsina clorhídrica sobre suero de sangre a 40°C , obteniendo pruebas a diferentes intervalos de tiempo.

Pero el efecto más interesante de la reacción de las albúminas que estudiamos, se refiere a la aplicación para un posible diagnóstico de enfermedades. También debemos a BRDICKA las primeras orientaciones en este sentido (8), (11), (12), (13), (14).

Un suero normal diluido quinientas o mil veces con la solución puffer de cobalto y polacografiado directamente, muestra, respecto a un suero canceroso, una pequeña diferencia en la altura de la doble onda, siendo un poco mayor la que corresponde al suero normal, diferencia que puede aumentarse introduciendo algunas

modificaciones, como desnaturalizar y desintegrar peptídicamente el suero.

Posteriormente K. MAYER, en colaboración con BRDICKA, ha observado que el filtrado después de desalbuminizar los sueros con ácido sulfosalicílico, presenta, en solución puffer de cobaltixamina, una clara reacción de albúmina con la ventaja de acusarse más claramente las diferencias entre los sueros patológicos y normales, si bien aquí, las ondas son inversas, correspondiendo las alturas máximas a los patológicos.

A partir de 1938 son numerosas las experiencias que se han efectuado siguiendo los fundamentales trabajos de BRDICKA, para conseguir un posible diagnóstico del cáncer por métodos polarográficos. Baste citar a TROPP (15), en Praga; BER, HENRIQUES y SCHOUSBOE (16), en Copenhague; KLATT, RUSCH, DIRKEN y MELOCHE, en Wisconsin (17); NORDMARK-WERKE (18), FENKEL (19), WEDEMAYER y DAUR (20), etc. Ahora bien, es de todos conocido que la diferencia existe entre un suero normal y un canceroso, en el examen polarográfico consiste, en la distinta altura de la onda típica, y ocurre, que esta diferencia no sólo se presenta entre sueros normales y cancerosos, sino también entre los primeros y una serie notable de enfermedades y estados especiales. (WALDSCHMIT-LEITZ y MAYER (21), ALBERS (22), CHYREK (23), (19) y otros.) Esto es causa por la que disminuye en gran parte la importancia de estos hechos.

Siguiendo los trabajos de esta Sección (GALLEGO-SANTOS RUIZ) (24), en los que se ha podido comprobar los resultados experimentales de los autores citados y en un intento de dar especificidad a la aplicación polarográfica en el diagnóstico del cáncer, nos fijamos en la conocida reacción de FUCHS (25) (26) (27) (28), de las mejores reacciones serológicas del cáncer.

Esta reacción consiste en la exploración de ciertos procesos proteolíticos que se manifiestan en el suero sanguíneo bajo determinadas condiciones y que producen la destrucción de una fibrina extraña, a la vez que respeta la fibrina de su misma clase. Así, el suero de hombre sano no destruye (o lo hace tan sólo ligeramente) la fibrina humana normal, mientras que por el contrario ataca toda fibrina patológica extraña. A su vez un suero patológico v. g. de cáncer, respeta la fibrina procedente de un enfermo canceroso, mientras que ataca a toda fibrina que proceda de un sujeto normal. Esta reacción es específica, un suero tuberculoso respeta un substrato tuberculoso, pero destruye a substratos precedentes de enfermos de cáncer, sífilis, etcétera.

La comprobación de la reacción puede llevarse a cabo por varios procedimientos, en general. determinando el aumento

del N-no proteico o la disminución del proteico por microkjeldahl (28) por métodos interferométricos, con la ninhidrina (29), empleando reactivos fenólicos para determinar el amoníaco (30) neslerización y fotómetros especiales (31) etc. También se ha usado la determinación de los grupos amino (32) variaciones en el PH (33) y otros.

La existencia de tan diferentes técnicas demuestran que hasta la fecha no se ha encontrado ninguna definitiva. Si bien numerosos investigadores la proponen como segura reacción para el conocimiento del cáncer (34) (35) (36) (37) (38) (39) el inconveniente de su gran dificultad técnica hace que su empleo en la clínica no sea todo lo frecuente que debiera. El método polarográfico, basándose en las consideraciones expuestas puede conducir a resultados extraordinariamente interesantes al simplificar y ajustar su metódica.

En efecto, ya expusimos cómo puede acusarse un proceso proteolítico polarográficamente, ya en la albúmina total, ya en el filtrado, puesto que de haber proteolisis, el suero se habrá enriquecido con grupos -SH., procedentes del substrato objeto de examen y será tanto mayor en enriquecimiento cuanto mayor sea la proteolisis y por tanto la onda polarográfica exponente del fenómeno.

En este sentido conocemos la nota de KOTLJAR y PODROUZEK (40), quienes, empleando fibrina y usando el ultrafiltrado, consiguieron algunos casos positivos. No obstante, el problema básico en esta reacción es una adecuada preparación de substratos y el empleo de fibrina deja sin resolver en gran parte una de las mayores dificultades de la técnica, pues hay que tener en cuenta que la obtención de sangre en sujetos cancerosos no puede hacerse en grandes cantidades, y que a partir de ellas hemos de verificar todas las enojosas y difíciles manipulaciones que exige una buena preparación de fibrina. Siendo sin duda éste uno de los factores que hasta hace poco tiempo aminoraban su difusión. Por esto, teniendo en cuenta que hoy día está reconocido que por los métodos corrientes puede substituirse ventajosamente la fibrina por la albúmina total precipitada del suero, extraordinariamente más fácil de preparar (KÖHLER (31), nos ha parecido interesante ensayar si a la técnica seguida por este autor, es factible aplicar el método polarográfico para la evaluación de los resultados.

PARTE EXPERIMENTAL

Hemos preparado substratos de sujetos corrientes y cancerosos, sin otra afección conocida, en la siguiente forma:

El suero que va a ser transformado en substrato se centrifuga 10 horas después, por lo menos, de la extracción de la sangre. Un volumen de suero limpio se diluye con once veces su volumen de ácido tricloroacético al 2,5 %, verificando la precipitación en tubos de centrifuga.

Después de cierto tiempo, cuando ya ha floculado la albúmina precipitada en forma coposa, se centrifuga empezando suavemente para no aglomerar excesivamente el precipitado. Se lava cinco veces con ácido tricloroacético al 2,5 %, removiendo cada vez el precipitado y el número de veces que haga falta — pero ahora sin remover el precipitado —, con agua destilada para eliminar completamente el ácido tricloroacético, hasta que el agua de lavado, no dé reacción polarográfica.

Entonces se extiende el precipitado obtenido sobre una placa de cristal bien limpia en capa lo más delgada posible y se introduce a secar en una estufa a 37° (nunca más de 40°).

La capa extendida de color verde o amarilla-blancuzca, una vez seca, se arranca con una espátula, obteniéndose en forma de plaquitas cristalinas verdosas. Se pulverizan en un mortero y se guardan en frasquitos de vidrio, con tapón esmerilado para preservarlos de la humedad. Es esencial obtener estos substratos con la máxima delicadeza posible y prepararse un cierto número de ellos a partir de diferentes sujetos sanos y enfermos.

El suero objeto de examen debe obtenerse a partir de sangre extraída a ser posible en condiciones basales y lo más asépticamente. La obtención de este suero se hace después de bien formado el coágulo, para lo que conviene mantener la sangre durante toda la noche en la nevera, o por lo menos durante cinco o seis horas antes de centrifugar. La centrifugación se hará después — a temperatura ambiente — hasta que quede el suero perfectamente claro. Hay que desechar los sueros que aparezcan hemolizados.

Preparados los substratos y obtenido un suero en estas condiciones, se procede a la incubación del suero objeto de examen frente a los substratos conocidos.

Para ello se colocan cinco miligramos de sustrato normal y canceroso en dos tubos de hemólisis estériles, y se añade a cada uno de ellos un centímetro cúbico del suero a investigar perfectamente medido. También se coloca un centímetro cúbico de suero sin sustrato en otro tubo de hemólisis para que sirva de control. Estos tres tubos, bien tapados, se llevan a la estufa de cultivos, donde se mantienen durante seis horas, pasadas las cuales se les añade a cada uno de ellos, un centímetro cúbico de ácido sulfosalicílico al 20 % para desalbuminizar, y transcurridos exactamente diez minutos, se filtra a través de filtros duros. El filtrado obtenido, en el que si hubo proteólisis se habrá enriquecido en grupos —SH o —S—S— , en tanto mayor cantidad cuanto mayor fuera ésta, es analizado polarográficamente, para lo cual se toma 0,4 c. c. del filtrado, se introduce en un vaso electrolítico corriente en polarografía — para polarogramas realizados en contacto del aire y de un volumen aproximado de 20 c. c. — y añadiendo mezcla tampón hasta un volumen total, incluido el líquido a analizar, de 10 centímetros cúbicos, se polarografía.

En los trabajos de KOTLJAR y PODROUZEK (40), los primeros que aplicaron la polarografía a esta reacción, según las citas de HEYROVSKY (41) y BRDICKA (42), el período de incubación con el ultrafiltrado era de veinticuatro horas, pero ellos en la nota original no lo detallan. Nosotros hemos obtenido los mejores resultados con un período de incubación de seis horas.

Estos resultados se explican, porque si bien una mayor duración de este tiempo es posible que mantenga la diferencia de proteólisis, hay que tener en cuenta que, como dijimos en la introducción, la altura de onda polarográfica no guarda relación lineal con la concentración de los grupos activos, tiende hacia un máximo, llegado el cual no aumenta la altura aunque crezca la concentración. Por esto cuanto mayor tiempo de incubación, mayor proteólisis, mayor liberación, por tanto, de grupos activos, que llegan fácilmente al máximo apreciable polarográficamente, y que conducen en una incubación mayor de seis horas a una menor apreciación polarográfica del fenómeno.

La precipitación de las albúminas con el ácido sulfosalicílico que empleamos, en substitución de la ultrafiltración física con

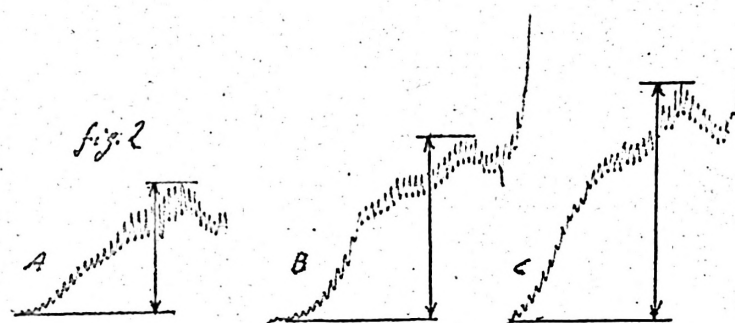
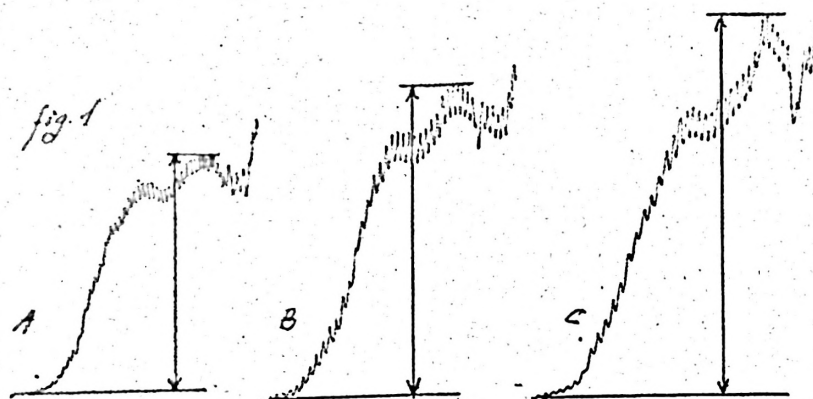
cuatro o cinco atmósferas de presión a través de los aparatos Tiessen (modificación de CROMETZKA y GOTTLEBE (29) usada también por KOTLIAR y PODROUZEK, la hemos llevado a cabo después de ensayar varios reactivos precipitantes de albúminas, entre ellos el ácido tricloroacético empleado por KÖHLER, puesto que éste, así como los otros usados para este fin, producían una fuerte curva polarográfica a las concentraciones con las que había que operar enmascarando las ondas típicas y desvirtuando los resultados. En cambio el ácido sulfosalicílico es inactivo a este respecto.

Hemos ensayado varias soluciones fondo; la que da mejores resultados se obtiene mezclando 1 c. c. de ClNH_4 1 n. con 2 c. c. de Cl_2Co $1,6 \cdot 10^{-3}$ n. y 1 c. c. de OHNH_4 . Esta solución hay que prepararla en el momento de su uso y conviene que tenga un volumen final de 10 c. c. Para ello se pone primero 1 c. c. de cloruro amónico, y después, por este orden, los 2 c. c. de cloruro cobaltoso, los 0,4 c. c. del filtrado a analizar, 5,6 c. c. de agua destilada y finalmente el amoníaco hasta un volumen de 10 c. c. Hasta ahora llevamos realizadas 25 experiencias con resultados positivos. Hemos podido comprobar que se acusan mejor las diferencias en sueros de enfermos no tratados. Por esto las siguientes gráficas que mostramos para exponer nuestros resultados corresponden a enfermos no sometidos a tratamiento (*).

El aparato con el cual realizamos estas experiencias fué el micropolarógrafo de Heyrovsky tipo X, de la casa Nejedly, de Praga. Para detalles de su manejo y de las técnicas polarográficas remitimos a las obras de HEYROVSKY (41), KOLTOFF y LINGANE (43) y a los trabajos de PORTILLO (44) y LUCAS GALLEGO (45). El tiempo de goteo del cátodo capilar de mercurio se reguló a unas veinticinco gotas por minuto, se obtuvieron las gráficas a la temperatura ambiente — prácticamente igual para cada experiencia, pues se obtuvieron las curvas en cada experiencia inmediatamente una después de otra — y con una sensibilidad de 1/50.

Las figuras 1 a 3. son los polarogramas correspondientes al resultado obtenido tratando sueros cancerosos frente a subs-

(*) Hemos de dar las gracias a los profesores Gil y Gil, Piga y Sanz Ibáñez por las facilidades que nos dieron para la obtención de sangre de enfermos cancerosos y al Director del Instituto Hematológico Español, Dr. Elósegui, que nos proporcionó sangre de sujetos normales.



Figs. 1 y 2

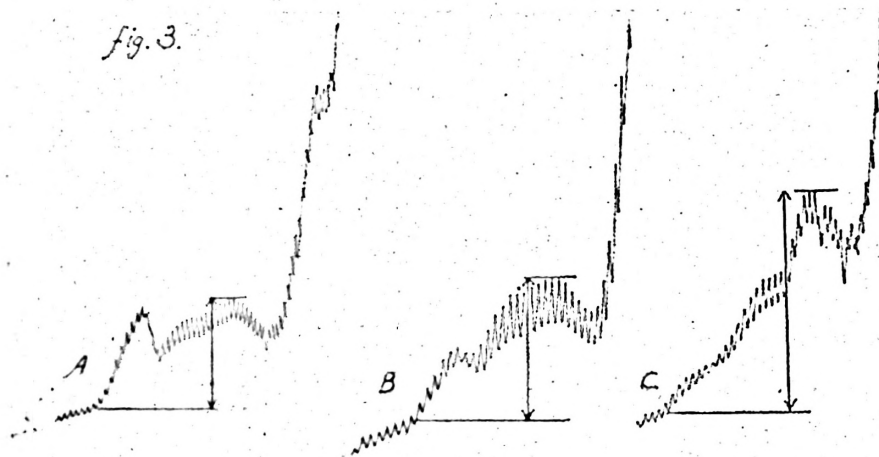


Fig. 3

tratos cancerosos y normales (preparados precipitando la albúmina total de pacientes de dichas enfermedades por medio del ácido tricloroacético al 2,5 %). Después de un período de incubación de seis horas a 37°, precipitación con ácido sulfosalicílico y examen del filtrado.

La figura 4 representa la acción proteolítica de un suero normal frente a substratos normal y canceroso.

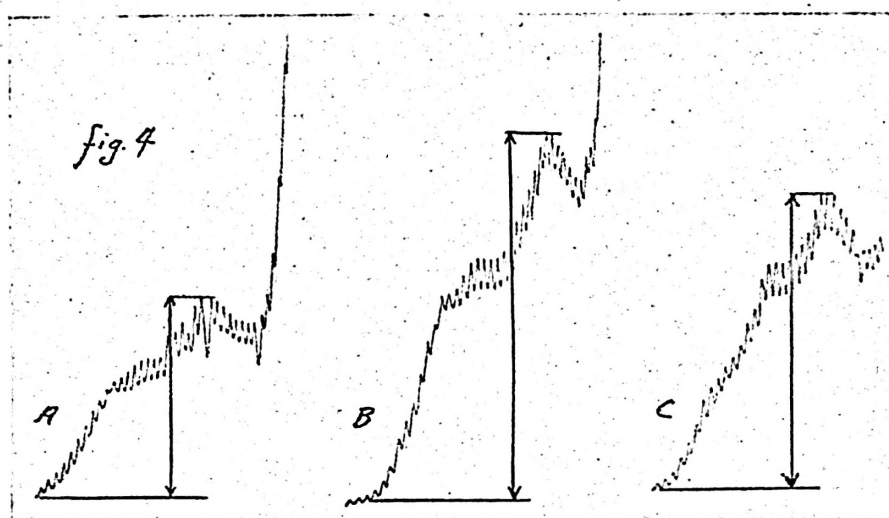


Fig. 4

La curva A de la figura 1 es el polarograma correspondiente al suero control, de sujeto que padecía cáncer de laringe. La B representa el mismo suero después de su incubación frente a un sustrato canceroso — obtenido del suero de enferma de cáncer de mama — y la curva C es el resultado de su incubación con un sustrato normal.

En la figura 2, la curva A representa también el polarograma control del suero de un enfermo con cáncer de laringe. La B es dicho suero después de la incubación frente a un sustrato obtenido de otro enfermo con cáncer de laringe, y la C su efecto sobre un sustrato normal.

En la figura 3 el suero fué obtenido de un caso de cáncer de mama e incubado frente a un sustrato normal y otro canceroso — de enferma también de cáncer de mama —, en el

mismo orden que los anteriores. Es decir: *A*, suero control; *B*, frente a substrato canceroso, y *C*, frente a normal.

La figura 4 muestra los polarogramas obtenidos después de incubar durante seis horas a 37° un suero de sujeto normal frente a substratos canceroso y normal. La curva *A*, es el polarograma del suero control. La *B*, dicho suero frente a substrato canceroso — cáncer de mama —, y la *C*, frente a substrato normal. Se observa aquí que la onda *B* es mayor que la *C*, por ser mayor también en este caso la proteolisis del substrato canceroso, hecho que indica la negatividad de cáncer, ya que el substrato canceroso es más atacado que el normal. La distinta altura de onda entre *C* y *B*, en las gráficas, nos indica la positividad de la reacción de Fuchs; la que existe entre la *B* y la *A*, prueba que también hay proteolisis, aunque menor, frente a substratos de su misma clase.

De nuestras experiencias, que resumimos en las gráficas que acabamos de exponer, se deduce, pues, que en la incubación de un suero normal frente a un substrato canceroso y de suero canceroso frente a substrato normal, empleando la albúmina total como substrato, se produce una proteolisis, que nosotros observamos polarográficamente.

CONCLUSIONES

Estudiando polarográficamente la reacción de FUCHS se ha encontrado:

- 1.° Que da buenos resultados el substrato de albúmina total.
- 2.° Que el empleo de sueros no ultrafiltrados es factible en esta reacción con el método polarográfico, eliminando las albúminas químicamente.
- 3.° Que el período de incubación no debe ser mayor de seis horas.
- 4.° La polarografía constituye un buen medio para demostrar la proteolisis.

Summary

It is studied polarographically the Fuchs reaction in a series of cancerous and normal patients, giving simplifications to the same and proving that the polarography offers a good way in the evaluation of proteolysis employing the total albumin as substract.

Résumé

L'on fait une étude polarographique de la réaction de Fuchs, dans une série de sujets cancéreux et normaux, en apportant des simplifications et montrant que la polarographie constitue un bon moyen d'évaluation de la protéolyse en employant l'albumine totale comme substrat.

Zusammenfassung

Es wird polarographisch die Fuschs'sche Reaktion bei einer Reihe normaler Individuen und Krebskranke studiert. Es werden Vereinfachungen dazu beigebracht und es wird bewiesen, dass die Polarographie eine gute Methode ist um die Proteolyse zu bewerten, wenn man das totale Albumin als Substrat gebraucht.

Bibliografía

1. J. HEYROVSKÝ a. BABICKÁ, J. — XIII. The effect of albumins. Collection 2 : 270 (1930).
2. BRDICKÁ, R. — LXI. The effect of buffer solutions on the reaction of proteins. Collection 8 : 366 (1936).
3. BRDICKÁ, R. — XXXII. Activation of hydrogen in sulphhydryl group of some Thioacids in cobalt salt solutions. Collection 5 : 148 (1933).
4. BRDICKÁ, R. — Polarographische Mikrobestimmung von Zystin und Zystein in Hydrolysaten von einigen Proteinen. Mikrochemie 15 : 137 (1934).
5. ROSENTHAL, H. G. — Über die polarographische Bestimmung der disulfidischen und der sulfhydrylgruppen in biologischen Substanzen. Mikrochemie 22 : 233 (1937).
6. SLADEK, J. a. LIPSCHÜTZ, M. — XLIII., Specific effects of some aminoacids. Collection 6 : 487 (1934).
7. TROPP, C., JUHLING, L. y GEIGER, F. — Polarographische Eiweißuntersuchungen. Hoppe-Seyler's Z., 262 : 225 (1939).
8. BRDICKÁ, R. — Serologische Untersuchungen mit Hilfe der polarographischen Methode und ihre Bedeutung für die Krebsdiagnostik. Acta. internat. Vereinig. Krebsbekämpfung 3. I. 13 (1938).
9. WENIG, K. y JIROVEC, O. — Über die polarographische Reaktion der mit ultravioletten Licht bestrahlten Eiweißstoffe. Biochem Z. 295 : 405 (1938).
10. BRDICKÁ, R. y KLUMPAR, J. — Polarographisches Studium der Denaturierung und proteolytischen Spaltung von Eiweißstoffen. Cas. cl. lekarnictva 17 : 234 (1937).
11. BRDICKÁ, R. — Die Anwendung der polarographischen Methode Professor Heyrovskys für die serologische Diagnostik des Krebs. Revue des Gesundheitswesens 20 : 5 (1938).
12. BRDICKÁ, R. — Zur Frage nach der Natur der polarographisch

- feststellbaren Serumveränderungen bei Krebs. *Klin. Wschr.* 18: 305 (1939).
13. BRDICKA, R. — Critical Remarks concerning the nature of the polarographic serum reactions for cancer. *Acta radiol. et cancerol. Bohemiae et Moraviae* 2: 7 (1939).
 14. BRDICKA, R., NOWAK, F. V. y KLUMPAR, J. — Critical examination of the polarographic test for cancer in deproteinized sera. *Acta radiol. et cancerol. Bohemiae et Moraviae* 2: 8 (1939).
 15. TROPP, C. — Polarographische Serumuntersuchungen in Beziehung zur Krebsreaktion von Brdicka. *Klin. Wschr.* 17: 1141 (1938).
 16. BER, F., ENRIQUES, O. M. y SCHOUSBOE, J. — The Prague Sero Reactions for cancer. *Nature (B.)*, 141: 751 (1928).
 17. KALT, T., RUSCH, H. P., DIRKSEN, A. MELOCHE, Y. M. — *Trans. electrochem. Soc.* 79: 205 (1941).
 18. NORDMARK-WERKE. — Über den praktischen Wert polarographischen Blutsrum untersuchungen. *Materia médica Nordmark*, 4 A. 73 (1938).
 19. FENKEL, R. M. — Polarographische Untersuchungen des Serums Krebskranker *Med. Klin* 25: 840 (1938).
 20. WEDEMEYER, H. E. y DAUR, H. — *Krebsforsch* 49 (10) (1939).
 21. WALDSCHMIDT-LEITZ, E. y MAYER, K. — Erfahrungen zur polarographischen Krebsdiagnose. *Hoppe-Seylers, Z.* 261, 1 (1939).
 22. ALBERS, D. — Nachprüfung der polarographischen Prager Krebsreaktion. *Biochem, Z.* 306: 236 (1940).
 23. CHYTREK, E. — Ist die polarographische Methode spezifisch für die Erkennung eines Karczinoms? *Destch. med. Wschr.* 11: 1190 (1940).
 24. SANTOS RUIZ, A. y LUCAS GALLEG0, J. — *Esta revista* 1: 203 (1945).
 25. FUCHS, H. J. Über proteolytische Fermente im Serum. *Biochem. Z.* 170: 76 (1926) 175: 185 (1926), L. 178: 152 (1926).
 26. YOKOTA, K. — Zur Frage nach dem Vorkommer proteolytischer Fermente im Serum. *Biochem, Z.* 232: 58 (1931).
 27. FUCHS, H. J. — Die Krebsreaktion nach Fuchs. *Z. exper. Med.* 98: 71 (1936).
 28. FUCHS, H. J. y FALKENHAUSEN, W. K. — Eine neue Mikrostickstoffbestimmungsmethode und ihre Anwendung bei der Krebsreaktion. *Biochem. Z.* 245: 305 (1932).
 29. CHROMETZKA, Fr. y GOTTLIBE, P. — *Z. exper. Med.* 86: 436 (1933).
 30. HINSBERG, K. y MUCKE, K. — Untersuchung der colorimetrischen Bestimmung des Ammoniaks und der Ammoniumsalze mit Phenolreagens und ihrer verwendbarkeit bei der Carcinomreaktion nach Fuchs.
 31. KÖHLER, K. — Die enzymahemischen Karzinomreaktion en Die Methoden der Fermentforschung de Bamann y Myrbäk 3004. Verlag. Leipzig. 1941.

32. MINIBEK, H. — Modifikation der Karcinomreaktion nach Fuchs. Z. exper. Med. 96 : 362 (1936).
33. THURNER, L. — Eine Serologische Krebsreaktion. Mschr. Krebsbekpf. 6 : 154 (1937).
34. WOODHOUSE, D. y LEYTON, L. — Lancet (1937), 1, 138.
35. GRIESSMANN, H., KÖHLER, K. y SÖHNEL, W. — Blutuntersuchungen für die Diagnose und zur Prognose des Karzinoms nach Operation sowie für die Behandlung rezidivgefährdeter Kranker. Chirug. 17 : 610 (1938).
36. ALBERS, D., MERTEN, R. y MÜCKE, K. — Erfahrungen mit der Karzinom-Reaktion nach Fuchs. Z. Krebsforsch. 47 : 512 (1938).
37. BERNHARD, FR. y KÖLER, K. — Die Karzinomdiagnose durch Lipasebestimmung im Blutserum und die Karzinomreaktion nach Fuchs. Dtsch. Z. Chir. 248 : 72 (1936).
38. DIECKMANN, H. y SCHMITZ, A. — Beiträge zur serologischen Krebsdiagnostik. Reichsgesah. bl. 8 : 127 (1937).
39. DIECKMANN, H. — Z. Krebsforsch. 50 : 58 (1940).
40. KOTLJAR, A. M. y PODROUZEK, V. — Polarographie Proof. of Proteolysis in Diagnosis with Enzyme Reaction. Nature 142 : 872 (1938).
41. HEYROVSKY, J. — Polarographie. Springer, Wien. (1941).
42. BRDICKA, R. — Polarographie. En Die Methoden der Fermentforschungen de Bamann y Myrbäck 580 Verlag, Leipzig (1941).
43. KOLTHOFF, I. M. y LINGANE, J. J. — Polarography, polarographie analysis and voltametry, amperometric titrations. New-York (1941).
44. PORTILLO, R. — Fundamentos y aplicaciones del método polarográfico. Anales de Fis. y Quím. 278 : 38 (1944).
45. LUCAS GALLEG0, J. — Aplicaciones de la polarografía a la fisiopatología. Tesis Doctoral Facultad de Farmacia. Madrid (1946).

Damos las gracias al doctor Lucas Gallego por su amabilidad al facilitarnos su micropolarógrafo y ayuda en la realización de este trabajo.

Madrid.