

Determinación de proteínas plasmáticas ^(*)

ALBERTO SOLS

INTRODUCCION

La complejidad de las proteínas hace que su determinación constituya un verdadero problema para el laboratorio. Ningún componente plasmático cuenta con más procedimientos distintos propuestos y — relativamente — con menos procedimientos garantizados.

En el campo de las proteínas es muy rápido el avanzar de los últimos años. La ultracentrífuga abrió un camino. Otro la electroforesis. Hace poco se ha llegado a «fotografiar» moléculas proteicas con el microscopio electrónico (71). También se multiplican los trabajos polarográficos. Recientemente se ha propuesto una forma de expresión cuantitativa: el «índice de proteínas» de MÜLLER y DAVIS.

Estos métodos de investigación han venido a valorizar muchas reacciones empíricas. Precisamente al proponer una nueva decía recientemente MACLAGAN que «como el método electroforético no es asequible por ahora para uso clínico, no hay que insistir en la conveniencia de disponer de un medio sencillo de demostrar un exceso de esta proteína», refiriéndose a la γ globulina. Un año antes KABAT y colaboradores habían encontrado la dependencia de las reacciones del oro coloidal y cefalina-colesterina en suero de la misma γ globulina. Y en 1942, SCHERLIS y LEVY encontraron relación inversa entre contenido de α globulina y longitud de la banda de coagulación del WELT-

(*) Texto de la Conferencia pronunciada el 5 de abril de 1946 en el 1.º Curso Monográfico de la Cátedra de Fisiología de la Facultad de Medicina de Barcelona.

MANN, hecho confirmado por WUHRMANN y WUHDERLY en el mieloma.

Nos ocuparemos exclusivamente de determinaciones cuantitativas y entre ellas haremos incapié en las que ofrecen un interés práctico atendiendo al doble criterio de *posibilidad y facilidad* de ejecución y exactitud suficiente para la Clínica.

En los libros de análisis clínicos suele ser un mal capítulo el de las proteínas. Se explica en parte por el hecho de que las mejores técnicas de que hoy se dispone para uso clínico son posteriores a la mayoría de ellos, o al menos a sus primeras ediciones. Una excelente revisión de conjunto fué publicada por HATZ en 1938 en la obra dirigida por BENNHOLD. Salvo interés particular no haremos ninguna referencia bibliográfica anterior a esta publicación.

FRACCIONAMIENTO

Las proteínas plasmáticas se dividen en tres grupos fundamentales: albúmina, globulinas y fibrinógeno. Los datos que habitualmente interesan en clínica son ante todo el contenido total de proteínas del suero y el cociente, la relación entre albúmina y globulinas del mismo. Como *valores normales* en cuanto a proteína total se han dado desde un mínimo inferior a 60 gr. por mil hasta un máximo próximo a 100. En realidad los límites de oscilación normal son mucho menores y estos mínimos y máximos son exagerados y achacables a la diversidad de técnicas utilizadas. Los verdaderos valores normales están prácticamente comprendidos entre 70 y 80 gramos por mil. El cociente A/G normal es constantemente superior a uno, con un máximo de dos a cuatro según las técnicas utilizadas. HARRISON da como valores normales de 1,2 a 4,0, ordinariamente alrededor de 2, y KING (1946) da de 1,3 a 4,0, en plasma (en suero serían ligeramente más altos por exclusión de la fibrinoglobulina). Entre las técnicas que dan valores más altos figura la ultracentrifugación, y entre las que los dan más bajos, la electroforesis. GUTMAN y colaboradores sostienen que los verdaderos cocientes normales son más altos de lo hasta ahora conocido por errores en la ejecución del fraccionamiento salino. Cocientes alrededor de uno o inferiores tienen en clínica un gran valor diagnóstico y pronóstico. En cuanto al fibrinógeno

el valor normal está en las inmediaciones de tres gramos por mil, habiéndose dado como límites desde 1 hasta 5, aunque también con técnicas distintas.

Un problema fundamental de concepto se plantea con frecuencia sobre la *distinción entre albúmina y globulinas* del suero. Mientras un progreso definitivo de su conocimiento no tenga lugar creemos que debe aceptarse universalmente el concepto clásico, tal como lo expresa, por ejemplo, ALDER en el *Handbuch der normalen und pathologischen Physiologie*: «Se designa globulina a la parte de las proteínas que es precipitable por semisaturación con sulfato amónico», siendo albúmina lo que queda en solución en estas condiciones. Desgraciadamente, la semisaturación de sulfato amónico no conduce a resultados absolutamente constantes; pero no hay que dar mucha importancia a impugnaciones del tipo de las de MACHA-BOEUF y TAYEU (40 y 72) que pretenden haber obtenido con una serie de técnicas distintas — 7 en el primer trabajo — otros tantos resultados diferentes, a lo que llegan por una parte forzando artificialmente las condiciones técnicas y por otra sin dar siquiera un resultado duplicado que afiance la objetividad de la diferencia de resultados.

Las demás sales utilizadas para el fraccionamiento de las proteínas séricas tienen su base en la equivalencia — al menos supuesta en principio — con el sulfato amónico, y su razón de ser en presentar determinadas ventajas de orden técnico. Así introdujo HOWE el sulfato sódico para simplificar la determinación de fracciones proteicas por la del nitrógeno de las mismas. Recientemente CAMPBELL y HANNA han sustituido a este fin el sulfato sódico por el sulfito sódico que presenta considerables ventajas, ya que sustituye las tres horas a 37° que requería el sulfato sódico por diez minutos a la temperatura ambiente. Posteriormente se ha propuesto una técnica que utiliza sulfato sódico a la temperatura ambiente (HILL y TREVORROW); desconocemos sus resultados. Ultimamente, PILLEMER y HUTCHINSON han introducido un nuevo precipitante específico de las globulinas: el metanol. Según los autores es superior a los precipitantes salinos, ya que sólo con él han obtenido precipitar las globulinas sin trazas de albúmina revelable electroforéticamente. En cambio resulta engorroso el tener que operar a tempe-

ratura comprendida entre 0 y + 1.º c. La concentración de metanol es 42,5 %. Hay que tamponar a pH 6,7-6,9.

Por fraccionamiento por precipitación salina se han distinguido clásicamente diversas fracciones globulínicas en plasma y suero. Así, en el primero y con sulfato amónico, a 27 % de saturación de éste precipita el fibrinógeno, a 33 % la euglobulina, a 40 % la pseudoglobulina I y a 48 % (aproximadamente, a semisaturación) la pseudoglobulina II. También se ha pretendido fraccionar las albúminas. ROCHE y colaboradores han aislado tres distintas. Por electroforesis, HOCH y MORRIS encuentran dos por lo menos, si bien poco diferenciadas. Por el momento sólo tiene interés el fraccionamiento de globulinas.

MÉTODOS

Toda *clasificación de métodos generales* de determinación de proteínas es un tanto artificial y no facilita la comprensión del problema. Comenzaremos por la gravimetría como procedimiento base al que deben referirse los demás. El procedimiento directo de averiguar cuántos gramos de proteína hay en un suero es pesarla después de separarla de los demás componentes del mismo. Estos métodos se han utilizado y se utilizarán siempre. Entre las múltiples variaciones técnicas hay un substrato general en las de los últimos años que presenta considerables ventajas y consiste en el empleo de filtros de vidrio o porcelana porosos, de tara constante y de más cómodo manejo que el papel de filtro, que, además, tenía el inconveniente de adsorber cantidades variables de albúmina, al efectuar el fraccionamiento (58). Probablemente la técnica de más solvencia sin grandes dificultades de ejecución es la de PLÖRNER (54), que precipita las proteínas de 1 c. c. de suero con 40 c. c. 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 en la forma usual. Para el fraccionamiento emplea sulfato amónico, determinando proteínas en el filtrado en la misma forma. En nuestra experiencia, el único inconveniente práctico encontrado es la lenta filtrabilidad de los líquidos de lavado.

Posteriormente han propuesto métodos más complicados NEDVED y WOLDRICHOWA y ROBINSON y HODGEN. En cambio DESBORDES ha propuesto un método muy sencillo para totales. Consiste en precipitar las proteínas de 1 c. c. de suero en un tubo de centrífuga con 9 c. c. de acetona; después de centrifugar y decantar se deja el tubo en la estufa hasta el día siguiente, en cuyo tiempo el precipitado se retrae al secarse desprendiéndose del fondo del tubo, al que queda unido solamente por su periferia; con un ligero golpe se desprende la «pastilla» de proteínas desecadas, cuyo peso en miligramos corresponde a gramos por mil de suero. El método que propone para determinar el cociente (globulina), sobre no ser tampoco muy preciso (ya que el aislamiento de las proteínas dista bastante de ser completo: sólo para la delipidación exige BOYD tres veces más acetona) es, además, engorroso y expuesto a errores de consideración.

Después de la gravimetría figura en primer lugar entre los procedimientos que permiten una determinación más exacta de proteínas, el de la **determinación del nitrógeno** que forma parte de las mismas. Se parte en estos métodos de la oxidación del nitrógeno proteico según los principios del método de Kjeldahl, para terminar por la determinación del nitrógeno por volumetría (acidimetría o yodometría) o colorimetría (nesslerización). La técnica de HOWE era entre éstas la más ortodoxa y muy utilizada como método patrón; incluso es preferida por algunos a las mejores técnicas gravimétricas. Pero en realidad su bondad radica en su excelente concordancia con dichas técnicas gravimétricas que son en principio las únicas técnicas patrón.

Sin embargo se ha indicado varias veces que esta concordancia no es absolutamente constante. Ultimamente COOK, a raíz de discrepancias encontradas, ha procedido a un examen analítico riguroso sobre gran cantidad de plasma humano normal (mezclas de plasma de varios sujetos). Encuentra que la proporción de nitrógeno en las proteínas totales del plasma va de 13,3 a 15,9 con media de 15,2 %. Y en las globulinas de 13,5 a 15,9 con media de 14,3. Concluyendo dice: «Se sugiere que como las proteínas plasmáticas son una mezcla compleja, en todo trabajo de precisión los valores deben expresarse en gramos de nitrógeno»... «Los resultados así obtenidos serán me-

nos equívocos que en la forma usualmente empleada hasta ahora»... «Para fines prácticos, y tratándose de personas normales, el N total del plasma multiplicado por 6,25 da un resultado razonablemente preciso».

La tendencia actual es, como decíamos, la substitución del sulfato sódico por el sulfito sódico y la más sencilla nesslerización en lugar de las volumetrías. Estas dos directrices recoge, por ejemplo, el micrométodo utilizado por KING (1942 ; en su libro expone nesslerización y volumetría). Entre nosotros GRAS ha simplificado considerablemente el dispositivo clásico del micro-Kjeldahl sobre la base de matraces con cuello independiente, intercambiable.

La refractometría se utiliza en muchos laboratorios clínicos por su extraordinaria sencillez. En cuanto a exactitud ha sido y es una de las más severamente criticadas. En realidad, todos los componentes del suero participan en la refracción del mismo y, por tanto, sus variaciones falsearán los resultados obtenidos calculando sobre la base de un valor medio para el conjunto de componentes no proteicos. Así una urémia, una hiperglucemia, una retención de cloruros, pueden dar lugar a errores del orden de tres gramos por mil. Mucho más puede influir un aumento de la lipemia. A este respecto hay que tener en cuenta la rigurosa necesidad de practicar la extracción en ayunas si se va a utilizar la refractometría. La suma de una serie de factores puede dar errores tan considerables que, según VAN SLYKE pueden llegar hasta 15 gramos por mil. Por todo esto no puede considerarse la refractometría del suero como un método propiamente cuantitativo de determinación de sus proteínas, sino sólo como una guía utilizable en la práctica. Aunque desgraciadamente son precisamente los casos patológicos, con considerables alteraciones proteicas los que por alteración concomitante de otros componentes dan errores mayores cuando se utiliza este método.

Por otra parte, los primitivos cálculos de REISS han sido revisados y rechazados, lo que ha venido a explicar la acentuada tendencia a obtener valores elevados. En efecto, REISS partía de un índice de refracción específico de las proteínas demasiado bajo, por lo que los resultados eran demasiado altos. Después de las modificaciones de ALDER y DESEO ha venido la de PLÖTNER, sensiblemente coincidente con la de DESEG

y que es por hoy la que debe regir. En lugar de la vieja tabla de REISS, debe, pues, utilizarse la siguiente fórmula de PLÖTNER:

$$\text{PLÖTNER: } \frac{R - 1,335 \ 28}{0,00189} = \text{g. \%}, \text{ que hemos simplificado para su uti-}$$

lización práctica en la siguiente fórmula fácil de retener en la memoria: Lectura del refractómetro, prescindiendo del 1,3 común a todas las lecturas, o sea, reducida a las tres últimas cifras, menos 353 y partido por 1,9, obteniendo el tanto por mil de proteínas.

Todo esto, desde REISS hasta PLÖTNER es en el supuesto de efectuar las determinaciones a la temperatura de 17,5 grados. Como es engorroso el trabajar en estas condiciones es frecuente en los laboratorios clínicos el hacer las determinaciones de refracción a la temperatura ambiente. PAIC y DEUTSCH dieron unos gráficos con los valores de proteínas correspondientes a refracciones determinadas entre 15 y 27°. Para temperaturas comprendidas entre 15 y 25 grados publicó CISLAGHI unas tablas con los valores calculados. Posteriormente ha dado otras LÖWE de menor valor práctico, pero con cuyo factor de corrección para las diferencias de temperatura se puede modificar fácilmente los valores calculados sobre la base de 17,5 grados. Para ello basta sumar o restar 0,56 multiplicando por la diferencia de la temperatura ambiente y 17,5 grados, al tanto por mil de proteínas (sumar si es superior y restar si es inferior).

Complemento de la refractometría es la refracto-viscosimetría o viscosimetría combinada que determina el cociente albúminas-globulinas en función de que la viscosidad depende fundamentalmente de la fracción globulínica. De los valores de refracción (o proteínas totales) y viscosidad se obtiene mediante una gráfica el cociente albúminas-globulinas. A lo dicho sobre 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 hemos encontrado desviaciones considerables del cociente con respecto a lo obtenido por métodos directos.

Por último, se ha propuesto la viscosimetría simple (FOSTER, BIGURIA y ADAMS) sobre el principio de que el tratamiento con formol eleva su viscosidad y que este cambio depende exclusivamente de las globulinas. Se determina así la concentración de globulinas partiendo exclusivamente de un valor de viscosidad.

En comparación con métodos químicos encuentran los autores diferencias de sólo 0,2 g. %.

Recientemente se ha propuesto (11) la polarimetría para determinación de proteínas totales y albúmina-globulina en líquidos biológicos. Concretamente para el suero hace falta un mínimo de 6 c. c., para obtener, según sus autores, un error de 1 a 2 gr. por mil. Carece por completo de interés, tanto teórica como prácticamente.

HATZ define los métodos colorimétricos como «los más rápidos, pero adoleciendo de las universalmente conocidas faltas e inconvenientes de la colorimetría». Lo de las faltas e inconvenientes de la colorimetría es un tanto relativo. Sobre todo, si se tiene en cuenta nuestro sistema de colorimetría (68). Lo que sí es un inconveniente real, al menos en principio, es lo que LANGE ha calificado de «sensibilidad química», es decir, la falta de constancia en la admitida proporcionalidad entre el componente proteico en que se basa un método colorimétrico y la cantidad total de proteína, albúmina o globulina. En cuanto a proteínas totales (o fracciones obtenidas por precipitación salina) los métodos basados en la reacción del biuret introducidos para el suero por AUTENRIETH (1915-17), muy pronto mejorado por ALBERT por la utilización del ácido tricloroacético y reintroducidos por FINE en 1935 gozan hoy día de bastante predicamento sobre todo en los países anglosajones. Así lo adaptó KINGSLEY a la colorimetría fotoeléctrica y al sencillo comparador (30 y 31) y lo han estudiado varios otros (57, 23, 59, 75). Y en el año último PLIMMER y LOWY encuentran buena concordancia con los métodos basados en la determinación de nitrógeno.

MEHL ha introducido últimamente una nueva modalidad de reacción del biuret en que la precipitación de hidróxido cúprico es evitada por la presencia de glicol etileno en el reactivo de cobre. El método presenta la dificultad de desviar considerablemente de la ley de Beer, desviación que se puede corregir *en parte* según el autor mediante un cálculo a partir de las densidades ópticas a 750 y 545 $m\mu$. El método sería mucho más sensible en los alrededores de 320 $m\mu$.

La determinación de fracciones proteicas se funda en la distinta proporción de ciertos aminoácidos en albúmina y globulinas junto con la fácil determinación colorimétrica de los mismos. Al que con más frecuencia se acude es a la tirosina que,

encontrándose en las globulinas a mayor concentración que en la albúmina, permite deducir la relación entre éstas de modo similar a lo que hace la refractoviscosimetría (26, 76). MILLETTI ha publicado unas tablas y curvas para obtener los valores de proteína y albúmina a partir de las lecturas del colorímetro (entre 15 y 30 mm. con standard a 20). Pero en estos métodos de determinar el cociente sí que hay un considerable riesgo de error por la falta de constancia de estas concentraciones de aminoácidos tomadas como punto de referencia. Así refiere BALINT un caso en que la albúmina tenía mucho más tirosina que la globulina, cuando las medias normales en que se funda la determinación del cociente a partir de proteínas totales y tirosina son respectivamente 4,67 % y 6,7 %. Igualmente desde que se conoce que, dentro de las globulinas, la fracción llamada gama-globulina es particularmente rica en triptófano, salta a la vista la insuficiencia de base de los métodos que se funden en la determinación de este aminoácido. Sobre la variabilidad en el contenido de triptófano puede verse los trabajos de BRUMMER y BALINT y BALINT. Así, pues, la determinación de proteínas totales por colorimetría es buena por su sencillez y fidelidad, mientras que suele carecer de ésta la determinación del cociente.

Los métodos turbidimétricos con su doble modalidad de *nefelometría* y *opacimetría* presentan considerables ventajas en cuanto la cantidad de suero necesaria, sencillez y rapidez de ejecución. Los métodos clásicos han sido los nefelométricos de RUSZNYAK y RONA y KLEINMANN, basados respectivamente en la precipitación con sulfato amónico y clorhídrico y ácido sulfosalicílico, permitiendo el primero un fraccionamiento completo de las proteínas plasmáticas. Ambos han sido muy criticados, pero no han perdido actualidad. Con ácido sulfosalicílico ha propuesto recientemente MAWSON un método para determinación de proteínas totales y albúmina (con fraccionamiento previo con sulfato sódico) por opacimetría semi-absoluta (colorímetro ordinario comparando con una placa gris). Con todo, entre estos dos medios de precipitación fundamentalmente usados es el del ácido sulfosalicílico, aunque muy regular en duplicados, muy poco fiel cuantitativamente. SHANK y HOAGLAND precisan que si bien puede obtenerse una estrecha relación lineal entre densidad óptica y concentración de una determinada albúmina, la relación varía considerablemente de unas albúminas a otras. PLIMER y LOWY,

en el trabajo citado, refieren encontrar buena concordancia entre 4 de 5 métodos comparados; el quinto, que descartan, es el del sulfosalicílico. PLÖTNER (55) insiste en la falta de constancia de la relación enturbiamiento-concentración. Mejores resultados se obtienen a partir de la precipitación con sulfato amónico. LOONEY y WALSH y POJUROWSKY han propuesto métodos para su utilización con colorímetros fotoeléctricos. Y UJSAGHY con el Pufrich.

Nosotros mismos elaboramos un micrométodo opacimétrico (67) sobre la base de precipitación por sulfato amónico y clorhídrico, que permitía la determinación rápida de proteínas totales y globulinas en 0,02 c. c. de suero. Posteriormente hemos suprimido para la determinación de fracciones el standard artificial: Comparamos directamente los enturbiamientos correspondientes a las distintas fracciones, lo que reúne las ventajas de sencillez, rapidez y seguridad. También aquí puede aumentarse la exactitud aplicando nuestro sistema de colorimetría (69) (*).

Hay una serie de métodos basados en la medida del volumen de las proteínas precipitadas: métodos de sedimentación. Se basan en el mismo principio que el clásico método de ESBACH para la albúmina en orina. Como ejemplo citaremos el de RYTAND que precipita con ácido túngstico en tubo de centrífuga con fraccionamiento previo por sulfato amónico. Unos factores transforman volumen de sedimento en proporción de proteínas y albúmina.

Los métodos volumétricos corresponden a la escuela francesa. Se fundan en la oxidabilidad de las proteínas. El primitivo «índice de permanganato» fué pronto substituído por el «índice de cromato», más fiel pero de determinación también más laboriosa. Es aplicable a la determinación del cociente previa separación de las globulinas con sulfato magnésico. El método ha sido sistematizado por CORDEBARD. Recientemente se ha utilizado la titulación con formol (KOPATSCHEK).

El fibrínógeno se determina directa o indirectamente. En el último caso por diferencia entre proteínas totales de plasma y suero por cualquiera de los métodos con sensibilidad suficiente para acusar netamente esta diferencia. Directamente, por precipita-

(*) Opacimetría y colorimetría son ambas absorciometría.

ción del fibrinógeno y su determinación gravimétrica, kjeldahlométrica, colorimétrica, nefelométrica, etc. Entre los precipitantes se ha propuesto últimamente la protamina (MYLON y colaboradores). Recientemente se ha propuesto como consecuencia de la extensión de las técnicas fotoeléctricas la determinación del fibrinógeno en función de la intensidad que alcanza la opacificación que experimenta el plasma cuando se deja formar el coágulo de fibrina (LIAN y colaboradores, NIGAARD, MEUNIER y RAOUL).

Hemos reservado para el final un sistema de determinación de proteínas que ha tomado particular relieve en los últimos años: la densimetría. Se funda en la relación entre peso específico y concentración de proteínas descubierta por MOORE y VAN SLYKE en 1930. La fórmula dada por ellos fué modificada por WEECH y colaboradores en 1936. Los procedimientos utilizados para la determinación de la densidad del suero han sido los picnométricos, el empleo de soluciones de sulfato de cobre de densidades escalonadas en las que se deja caer gotas de suero hasta encontrar en cuál de ellas la gota permanece suspendida indicando tener la misma densidad que el líquido ambiente y la determinación con una sola gota de suero por la velocidad de caída a través de un líquido más ligero.

BARBOUR aplicó el método a la determinación de la seroalbúmina después de separar las globulinas con sulfato amónico, utilizando una nueva fórmula.

A partir de 1940 en que JACOBSEN y LINDESTROM-LANG aplicaron el tubo «gradiente» del último, en que por mezcla de dos líquidos orgánicos se obtiene una columna líquida con densidad distinta a cada altura, se ha multiplicado la utilización de la densimetría singularmente entre los anglosajones. Los métodos basados en este fundamento permiten la determinación rápida con cantidades mínimas de suero. Están singularmente indicados para el trabajo en serie, en el que la economía de tiempo junto a la de material de partida (suero) compensan con creces el trabajo de la preparación y calibración del «gradiente». Esta calibración se efectúa dejando caer en el seno del líquido gotas — liberadas mediante pipeta especial — de varios líquidos de densidades escalonadas. La posición de reposo de estas gotas da puntos de referencia para calcular la densidad de las gotas de sueros introducidas a continuación.

Por otra parte el método basado en el *sulfato de cobre* se ha revalorizado con varios trabajos recientes entre los que figuran en primer lugar los de PHILLIPS, VAN SLYKE y colaboradores, que al extender además su aplicación a la determinación de hemoglobina y valor hematócrito, han dado lugar a una rápida generalización de su uso. Un excelente estudio han hecho posteriormente ATCHLEY y colaboradores. En Inglaterra ha sido estudiado por PLIMMER y por HOCH y MARRACK.

SIMEONE y SANIS han ideado un original procedimiento de densimetría. Utilizan *perlas de vidrio* fabricadas a partir de tubo capilar y de densidad determinada mediante soluciones conocidas. Con una escala de 21 perlas de densidades comprendidas entre 1.0172 y 1.0350 (correspondiente a 35 a 95 g. por mil de proteínas), determinan la densidad del suero observado que perla se mantiene en suspensión en el mismo. El método viene limitado severamente por la dificultad de preparación, calibración y clasificación de las perlas.

Con el incremento de utilización y multiplicación de técnicas se ha revisado el valor de las *fórmulas* clásicas (VAN SLYKE y WEECHS). Estas adolecían de un error de principio: la primera se basaba fundamentalmente en la observación de sueros de nefróticos; la segunda en sueros de perros. Y como la densimetría, como todos los métodos físicos, no es exponente específico de las proteínas, sus resultados no son valorables exactamente, siendo el error posible tanto mayor cuanto más difiera la naturaleza del suero examinado de la de los que sirvieron para elaborar la fórmula de conversión; así, en el último año, se han propuesto las siguientes fórmulas:

	Sulfato de cobre	gradiente
HOCH y MARRACK (19)p %	= (D-1,006) 364 (1)	= (D - 1,007) 366
LLOYD y col.		= (D - 1,0027) 301,1
PHILLIPS, VAN SLYKE y col.	= (D - 1,0079) 389	

Un suero normal de densidad 1,027 da con las distintas fórmulas las siguientes concentraciones de proteínas:

VAN SLYKE	6,86 g. %
WEECHS y col.	6,86 » »
HOCH y MARRACK (1)	7,64 » »
LLOYD y col.	7,32 » »
PHILLIPS y VAN SLYKE	7,44 » »

Ponemos en último lugar la fórmula de PHILLIPS y VAN SLYKE porque tanto HOCH y MARRACK como LLOYD impugnaban la fórmula de VAN SLYKE en su primitiva expresión. Salta a la vista entre las tres propuestas independientemente en el año último y las dos clásicas una diferencia de varios gramos por mil (5 a 7, aproximadamente). Ocupando un lugar intermedio entre las tres precisamente la de PHILLIPS y VAN SLYKE, creemos que es ésta la que procede utilizar de preferencia.

LLOYD y colaboradores afirman encontrar concordancia más estrecha entre gravimetría y densimetría que entre ambas y micro kjedahl. Con todo hay que tener presentes dos *limitaciones*:

Los micrométodos han traído consigo una disminución de la capacidad de discriminación en la apreciación de la sensibilidad. Por pesada de cantidades de suero no inferiores a un c. c. y apreciando la décima de miligramo (la cuarta decimal en la densidad) los tantos por mil de proteína suben por escalones de 0,35 g. Apreciando tres cifras decimales (micropicnometría) los escalones serían de 3,5 g. Los micrométodos suelen apreciar diferencias de densidad intermedias entre la 3.^a y 4.^a decimal (0,0002 — 0,0004), con escalones por tanto del orden de 1 a 2 gramos por mil.

La inespecificidad lleva consigo la posibilidad de errores por variaciones de otros constituyentes del suero, singularmente en casos patológicos, precisamente los de más interés en clínica. Este es el caso de las lipemias, retenciones nitrogenadas, etcétera. En hepáticos refieren LOWY y HUNTER encontrar resultados sistemáticamente bajo, con error medio de 2,4 g. ‰.

En conclusión resaltaremos el interés actual, como métodos sencillos y suficientemente exactos para la mayoría de los fines clínicos, de la densimetría y colorimetría para proteínas totales y de la nesslerización, reacción del biuret y turbidimetría para la determinación de fracciones, singularmente del cociente A/G del suero. Mientras que sigue en primer plano como método de referencia la gravimetría correctamente efectuada.

Bibliografía

1. ATCHLEY, J. — A clinical evaluation of the copper sulfate method for measuring specific gravities of whole blood and plasma. — *J. Lab. Clin. Med.*, 30, 830 (1945).
2. BALINT, P. — Über einem Fall von Hypoproteinämie mit «Paraproteinämie». *Klin. Wschr.*, 540 (1943).
3. Id. y BALINT, M. — Über die chemische Zusammensetzung der menschlichen Bluteiweisskörper. 2. Mitt. Die Unterfraktionen der Plasmaproteine normaler Personen und nichtfiebrnder Kranker. *Biochem. Z.*, 306, 296 (1940).
4. BARBOUR, P. H., jr. — The application of falling-drop method for specific gravity measurement to the determination of serum albumin. *Yale J. Biol. Med.* 14, 107 (1941).
5. BOYD, E. M. — Separation of lipids in gravimetric acetone method for plasma total protein.—*Proc. Soc. Exper. Biol. Med.*, 42, 263 (1939).
6. BRUMMER, P. — Über die Bestimmung des Tryptophans und über den Tryptophangehalt in Serumproteinen. *Acta Soc. Med. fenn., Duodecim A*, 22, 13 (1940).
7. CAMPBELL, W. R. y HANNA, M. I. — Albumin, globulins and fibrinogen of serum and plasma. *J. Biol. Chem.*, 119, 15 (1937).
8. CISLAGHI, F. — Tabelle per il dosaggio refrattometrico delle proteine del siero per temperature tra 15° e 25°. *Diag. Tecnica Lab.*, 2, 120 (1940).
9. COOK, R. P. — The determination of nitrogen and of protein in pooled samples of human plasma. *Biochem. J.*, 40, 41 (1946).
10. CORDEBARD, H. — Le dosage chromométrique des protéides. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 23, 383 (1941).
11. DELCOURT-BERNARD, E. y MULS, B. — Dosage polarimétrique des protides totaux, albumine et globuline dans les liquides biologiques. — *Rev. belge Sci. Méd.*, 13, 53 (1941).
12. FINE, J. — The biuret method of estimating albumin and globulin in serum and urine. *Biochem. J.*, 29, 799 (1935).
13. FOSTER, S., BIGURIA, F. y ADAMS, M. A. — Estimation of serum-globulin by measurement of viscosity of formalin-treated serum: protein partition by physical methods. *J. Lab. Clin. Med.*, 28, 1634 (1943).
14. GRAS, J. — Comunicación personal.
15. GUTMAN, A. B., MOORE, D. H., GUTMAN, E. B., Mc CLELLAN, V. y KABAT, E. A. — Fractionation of serum proteins in hyperproteinemia, with special reference to multiple mieloma. *J. Clin. Invest.*, 20, 765 (1941).
16. HARRISON, G. A. — *Chemical Methodes in Clinical Medicine.* Churchill, Londres (1937-43).
17. HATZ, E. B. — Bestimmungsmethoden der Bluteiweisse (en

- Die Eiweisskörper des Blutplasmas, de BENNHOLD, KYLIN y RUSZNYAK. Steinkopff, Dresden y Leipzig (1938).
18. HILL, R. M. y TREVORROW. — Plasma albumin, globulin and fibrinogen in healthy individuals from birth to adult life. I. A system of microanalysis. *J. Lab. Clin. Med.*, 26, 1838 (1941).
 19. HOCH, H. y MARRACK, J. R. — The estimation of serum proteins. *Biochem. J.*, 39, XXXVIII (1945).
 20. Id., id. — Estimation of serum proteins. — *Brit. Med. J.*, II, 151 (1945).
 21. Id. id. — Estimation of serum proteins by the Linderstrom-Lang gradient. — *Brit. Med. J.*, II, 876 (1945).
 22. Id. MORRIS, C. J. O. R. — Heterogeneity of human serum albumin. — *Nature (London)*, 156, 234 (1945).
 23. HUBER, I. — Stufenphotometrische Bestimmung von Hämoglobin und Plasmaeiweiss in kleinen Blutmengen. Tübingen: Diss. (1940).
 24. JACOBSEN, C. F. y LINDERSTROM-LANG, K. — Method for rapid determination of specific gravity. *Acta Physiol. scand.*, 1, 149 (1940-41).
 25. JENDRASSIK, L. y POLGAR, A. — Beiträge zur Photometrie von Stickstoff, Eiweiss und Eiweissfraktionen. *Biochem. Z.*, 305, 237 (1940).
 26. JOHNSTON, G. W. y GIBSON, R. B. — The determination of blood plasma and spinal fluid proteins. *Am. J. Clin. Path., Techn. Suppl.*, 2, 22 (1938).
 27. KABAT, E. A., HANGER, F. M., MOORE, D. H. y LANDOW, H. — *J. Clin. Invest.*, 22, 563 (1943).
 28. KING, E. J. — Microchemical methods of blood analysis. *Lancet*, I, 207 (1942).
 29. Id. — *Micro-analysis in Medical Biochemistry*. — Churchill, Londres (1946).
 30. KINGSLEY, G. R. — The determination of serum total proteins, albumin and globulin by the biuret reaction. *J. Biol. Chem.*, 131, 197 (1939).
 31. Id. — Adaptation of the direct biuret method for determination of serum-proteins to box comparator colorimetry. *J. Lab. Clin. Med.*, 29, 436 (1944).
 32. KOPATSCHEK, F. — Eine formol-volumetrische und eine formol-potentiometrische Methode zur quantitativen Bestimmung des Serum Eiweisses, *Arch. Tierheilk.*, 75, 204 (1940).
 33. LIAN, C., FRUMUSAN y SASSIER. — Méthode optique pour l'étude de la coagulation sanguine. *Téchnique et résultats. Sang*, 13, 817 (1939).
 34. LINDERSTROM-LANG, K. — Distribution of enzymes in tissue and cells. *Harvey Lect.*, 34, 214 (1938-39).
 35. LLOYD, B. B., CHEEK, E. B., SINCLAIR, H. M. y WEBSTER, G. R. — The densitometric estimation of total serum proteins. *Biochem. J.*, 39, XXV (1945).

36. LÖWE, F. — Optische Messungen des Chemikers und des Mediziners. Steinkopff, Dresden y Leipzig (1943).
37. LOONEY, J. M. y WALSH, A. I. — The determination of globulin and albumin in blood serum by the photoelectric colorimeter *J. Biol. Chem.*, 130, 635 (1939).
38. LOWRY, O. H. y HUNTER, T. H. — The determination of serum protein concentration with a gradient tube. — *J. Biol. Chem.*, 159, 465 (1945).
39. MACLAGAN, N. F. — The thymol turbidity test. — *Brit. J. Exper. Path.*, 25, 234 (1944).
40. MACHABOEUF, M., TAYEU, F. y BATUEL, V. — Comparaison de diverses techniques de séparation et de dosage des globulines et de leurs fractions dans le sérum sanguin. Considerations sur la définition des termes «globulines», «euglobulines» et «pseudoglobulines». — *C. r. Soc. Biol.*, 130, 481 (1939).
41. MAWSON, C. A. — The estimation of the plasma proteins by the salicylsulphonic acid reaction. — *Biochem. J.*, 36, 273 (1942).
42. MEHL, J. W. — The biuret reaction of proteins in the presence of ethylene glycol. — *J. Biol. Chem.*, 157, 173 (1945).
43. MEUNIER, P. y RAOUL, Y. — Le diagnostic chimique des avitaminoses. — Masson, Paris (1942).
44. MILLETTI, M. — Il metodo colorimetrico di Wu-Greenberg per la determinazione della protidemia totale e delle frazioni proteiche del siero. — *Arch. ital. Med. sper.*, 8, 457 (1941).
45. MÜLLER, O. H. y DAVIS, J. S. — Polarographic studies of proteins and their degradation products. 1. The protein index. — *J. Biol. Chem.*, 159, 667 (1945).
46. MYLON, E., WINTERNITZ, M. C. y SÜTÖ-NAGY, G. J. de — *J. Biol. Chem.* 143, 21 (1942).
47. NEDVED, M y WOLDRICHOVA, O. — Détermination des protéines du sang par une nouvelle méthode. — *Sang*, 13, 973 (1939).
48. NYGAARD. — Quantitative determination of blood fibrin by means of the photoelectric principle. — *Scand. Arch. Physiol.*, 84, 195 (1940).
49. PAÏC, M. y DEUTSCH, V. — Graphiques permettant le dosage refractométrique des protéides sériques entre 15 et 27° C. — *Bull. Soc. Chim. biol.*, 20, 1108 (1938).
50. PHILLIPS, R. A., VAN SLYKE, D. D., DOLE, V. P., EMMERSON, K., jr., HAMILTON, P. B. y ARCHIBALD, R. M. — The cooper sulphate method for measuring specific gravities of whole blood and plasma. — Nueva York (1945).
51. PILLEMER, L. y HUTCHINSON, M. C. — The determination of the albumin, and globulin contents of human serum by methanol precipitation. — *J. Biol. Chem.*, 158, 299 (1945).
52. PLIMMER, R. H. A. — Van Slyke's copper sulphate method for,

- measuring specific gravities of whole blood and serum. — *Biochem. J.*, 38, VII (1944).
53. Id. y LOWY, L. — Comparison of methods of estimating blood proteins. — *Biochem. J.*, 39, XVIII (1945).
 54. PLÖTNER, K. — Beiträge zur quantitativen Serumeiweissbestimmung. — *Biochem. Z.*, 286, 429 (1936).
 55. Id. — Das Serumeiweissbild, insbesondere die pathologischen Veränderungen der Albuminfraktion. — *Z. exper. Med.*, 107, 717 (1940).
 56. POJUROWSKI, S. D. — *Biochim.*, 3, 713 (1939).
 57. PROSKE, H. O. y WATSON, R. B. — The protein tyrosine reaction. — *Pub. Health Rep.*, 54, 158 (1939).
 58. ROBINSON, H. W., PRICE, J. W. y HOGDEN, C. G. — The estimation of albumin and globulin in blood serum. I. The errors involved in the filtration procedure. — *J. Biol. Chem.*, 120, 481 (1937).
 59. Id. y HOGDEN, C. G. — The biuret reaction in the determination of serum proteins. I. A study of the conditions necessary for the production of a stable color which bears a quantitative relationship to the protein concentration. — *J. Biol. Chem.*, 135, 707 (1940).
 60. Id., id. — 2. Measurements made by a Duboscq colorimeter compared with values obtained by the Kjeldahl procedure. — *J. Biol. Chem.*, 135, 727 (1940).
 61. Id., id. — The gravimetric determination of blood serum proteins. — *J. Biol. Chem.*, 140, 853 (1941).
 62. ROCHE, J., DERRIEU, Y. y MANDEL, S. — Séparation de trois christalbumines du sérum de cheval. — *C. r. Soc. Biol.*, 138, 665 (1944).
 63. RYTAND, D. A. — A simple rapid method for the determination of total protein and albumin concentrations in blood plasma, serum or other body fluids. — *J. Lab. Clin. Med.*, 24, 439 (1939).
 64. SCHERLIS, S. y LEVY, D. S. — Weltmann serum coagulation reaction. — *John Hopk. Hosp. Bull.*, 71, 24 (1942).
 65. SIMEONE, F. A. y SARRIS, S. P. — A simple method for the determination of serum protein. — *J. Lab. Clin. Med.*, 26, 1046 (1941).
 66. SHANK y HOAGLAND. — *J. Biol. Chem.*, 162, 133 (1946).
 67. SOLS, A. — Micrométodo para la determinación de las proteínas totales y cociente albúminas globulinas en 0,02 c. c. de suero. — *Rev. esp. Fisiol.*, 1, 72 (1945).
 68. Id. — Fórmulas y tablas colorimétricas para corregir las aparentes desviaciones a la ley de Beer. — *Rev. esp. Fisiol.*, 1, 355 (1945).
 69. Id. — Aun no publicado.
 70. STACEY, R. S. — Serum proteins in portal cirrhosis. — *J. Lab. Clin. Med.*, 30, 855 (1945).

71. STANLEY, W. M. y ANDERSON, T. F. — Electron micrographs of protein molecules. — *J. Biol. Chem.*, 146, 25 (1943).
72. TAYEAU, F. y FLORENTIN-MARTIN, M. — Recherches sur le fractionnement des protéides sériques à l'aide du sulfate d'ammonium. — *Bull. Soc. Chim. biol.*, 27, 314 (1945).
73. UJSÁGHY, P. — Einfache Methode zur quantitativen Bestimmung aller Eiweissfraktionen und des Gesamteiweissgehaltes im normalen und pathologischen Liquor. — *Biochem. Z.*, 307, 264 (1941).
74. WEECH, A. A., REEVES, E. B. y GOETTSCH, E. — The relationship between specific gravity and protein content in plasma, serum and trasudate from dogs. — *J. Biol. Chem.*, 113, 167 (1936).
75. WOKES, F. y STILL, B. M. — The estimation of protein by the biuret and Greenberg methods. — *Biochem. J.*, 36, 797 (1942).
76. WUHRMANN, F. y WUNDERLY, Ch. — Elektrophorese-Untersuchungen beim Plasmocytom und ihre klinische Bedeutung. *Schweiz. med. Wschr.*, 75, 234 (1945).