

Departamento de Investigación del Hospital Municipal de Infecciosos
Sección Inmunoquímica
(Dr. J. Gras)

Estudio del espectrograma del complejo cupro-potásico (biuret) de la globulina gamma normal y patológica

por
J. Gras

(Recibido para publicar el 23 de julio de 1958)

El estudio de las posibles variaciones cualitativas de la globulina gamma presenta un interés particular, dado que puede aportar nuevos datos tanto para la comprensión fisiopatológica de los trastornos del metabolismo de las proteínas plasmáticas como para sumarlas a las variaciones cuantitativas de la misma, con el fin de enriquecer en sentido clínico el valor de estas variaciones. Se ha señalado la existencia de diferencias de orden químico entre las globulinas gamma de los sueros normales y las de diversos sueros patológicos (1, 2, 4, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 15). Se conoce también la posibilidad de obtener diferencias en la absorción del complejo biuret según sea la mayor o menor fijación de cobre a la proteína o en mezclas de péptidos, por lo que consideramos de interés el estudio de la curva de absorción del complejo Cu-K-globulina gamma (biuret), en globulinas gamma aisladas de sueros humanos normales o patológicos.

Material y Métodos

Se han examinado 93 globulinas gamma, de las cuales sólo hemos valorado el espectrograma de 72, pues en 14 de ellas la

concentración obtenida fué pequeña y la intensidad cuantitativa de absorción expresada en $\bar{E} \times 100$ era inferior a 20, y en las 7 restantes se presentaba alguna aberración probablemente por error de lectura. Además se estudiaron 7 globulinas gamma, 3 de ellas procedentes de mezclas distintas de suero de caballo, una de suero de cordero, otra de pavo y otra de cobayo, con el fin de estudiar en las mismas la influencia de la concentración sobre la curva del espectrograma.

La globulina gamma ha sido obtenida por precipitación mediante hiposulfito sódico, diálisis frente a suero fisiológico y ulterior control electroforético (7); las concentraciones de la solución de globulina gamma han oscilado alrededor de 8 gramos por 1.000, pues las de concentración inferior no las hemos tenido en cuenta. El reactivo de biuret utilizado ha sido el de Weichselbaum, añadiendo a 5 c.c. de la solución de globulina gamma 5 c.c. del reactivo y manteniendo la mezcla en baño a 45-50 grados durante 10 minutos. Las lecturas para la obtención del espectrograma se han efectuado en el espectrofotómetro de Unicam (SP 600) a partir de las 350 $m\mu$.

Resultados

En todas las soluciones de globulina gamma estudiadas, la curva del espectrograma presentaba dos máximos de absorción, el primero alrededor de 365 $m\mu$ (365 en el 95 por 100 de casos, y en los restantes, 360 ó 370) y el segundo a los 540-560 $m\mu$ (uno u otro aproximadamente en la mitad de los casos). En 9 globulinas gamma procedentes de sueros normales, el primer máximo ha sido siempre superior al segundo, mientras que en las de los sueros patológicos se observa una clara tendencia a igualarse e incluso a que el segundo máximo sobrepase al primero. En la figura 1 presentamos la curva correspondiente a una globulina gamma normal comparativamente a la procedente de un suero de un enfermo de cirrosis hepática. En esta enfermedad es en la que se presenta más clara esta tendencia, ya que en otros procesos en los que también existe una gran hipergammaglobulinemia no se presenta este hecho tan acentuado, como se observa en las figuras 2 y 3, correspondientes a globulinas gamma de un kala-azar y de un plasmocitoma.

Una forma de estudiar cuantitativamente estas diferencias consiste en calcular los cocientes segundo máximo/primer máximo ($2.^{\circ} \text{ ma}/1.^{\circ} \text{ ma}$, coc. A), que nos dará una expresión de la relación entre ambos que acabamos de señalar, y el cociente primer mínimo/primer máximo ($1.^{\circ} \text{ mi}/1.^{\circ} \text{ ma}$, coc. B), que

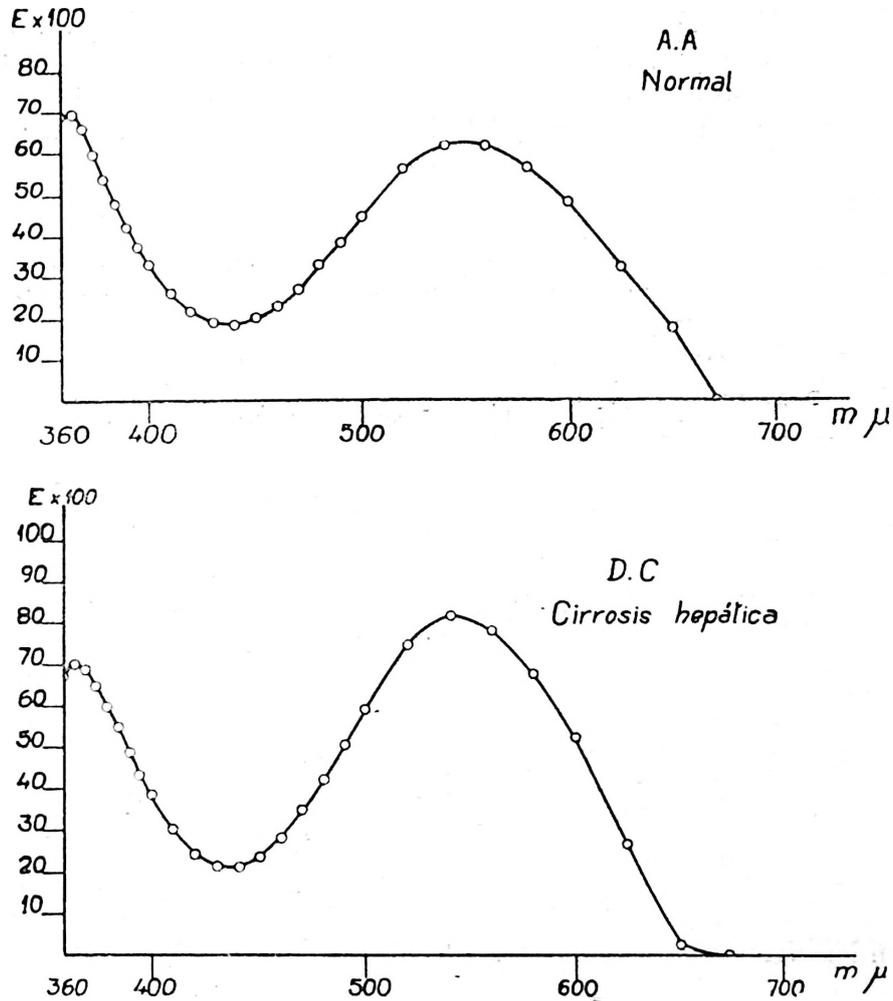


Fig. 1. — Espectrograma del complejo cupro-potásico de la globulina gamma normal y de un caso de cirrosis hepática, con acentuada desviación.

nos indicará las variaciones en la intensidad de caída del primer máximo. Los valores promedio de estos cocientes y sus límites se presentan en el cuadro 1. En los nueve sueros normales el promedio del cociente A es de 0,817, con unos límites de 0,737-0,916. El valor promedio del cociente B es de 0,302, con unos límites de 0,236-0,446.

En una serie de 22 globulinas gamma procedentes de enfermos de cirrosis hepática de varios tipos, el promedio obtenido para el cociente A ha sido de 1,015, con unos límites de 0,904-1,200. El valor mínimo corresponde casi al máximo del de las

globulinas gamma normales, lo que indica el claro predominio del segundo máximo de la globulina gamma en estos procesos, que, como indica el promedio, en muchas de ellas supera al primero. Para el cociente B ocurre a la inversa, pues el promedio resultante es de 0,252, inferior al normal, con unos límites de 0,195-0,305.

TABLA I

Valores promedio y límites de los cocientes segundo máximo/primer máximo (cociente A) y primer mínimo/primer máximo (cociente B) del espectrograma del complejo Cu-K-globulina gamma

Diagnóstico	N.º ca-sos	Cociente A		Cociente B	
		Promed.	Límites	Promed.	Límites
Normales	9	0,817	(0,737 - 0,916)	0,302	(0,236 - 0,446)
Cirrosis	22	1,015	(0,904 - 1,200)	0,252	(0,195 - 0,307)
Plasmocitomas.	2 ¹	1,037	(1,013 - 1,068)	0,251	(0,247 - 0,254)
Macroglobulina.	1	0,851		0,234	
Nefritis-nefrosis	5	0,861	(0,778 - 0,952)	0,300	(0,223 - 0,289)
Infecciones	8	0,923	(0,874 - 0,965)	0,238	(0,214 - 0,284)
Varios	17	0,919	(0,841 - 1,094)	0,252	(0,202 - 0,318)

(1) Tres determinaciones

Hemos estudiado la globulina gamma procedente de dos sueros de plasmocitoma, de las que se han hecho tres determinaciones, obteniéndose un promedio para el cociente A, de 1,037, con unos límites de 1,013-1,068, y para el cociente B un promedio de 0,251, con unos límites de 0,247-0,254. Como vemos, se observa el mismo desplazamiento que se presenta en las cirrosis, si bien es más difícil de valorar porque, aunque

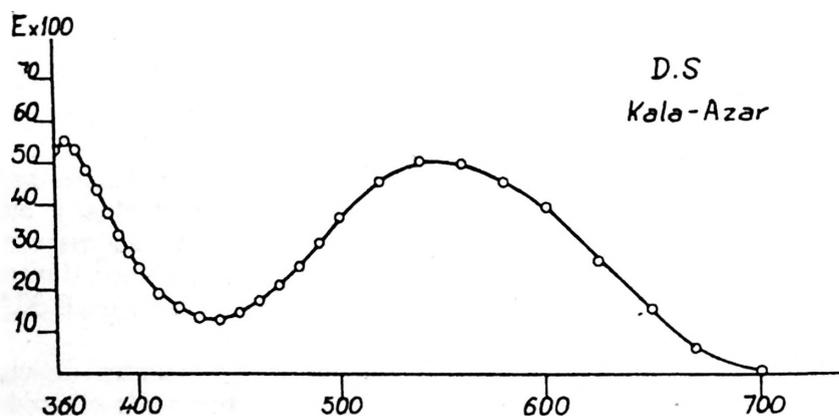


Fig. 2. — Espectrograma del complejo cupro-potásico de la globulina gamma procedente de un caso de Kala-Azar.

el promedio resulte superior al de las cirrosis, el máximo obtenido es menor, y deberá confirmarse en un número mayor de casos. Estudiada una macroglobulina, que electroforéticamente se comportaba como globulina gamma (6), se obtuvo el valor de 0,851 para el cociente A y 0,234 para el B, valores dentro de los límites de los de la globulina gamma normal.

En un grupo de 5 enfermos afectados de nefritis o nefrosis, 2 de ellos examinados en dos ocasiones, se han obtenido los siguientes valores: 0,861 para el cociente A, con unos límites

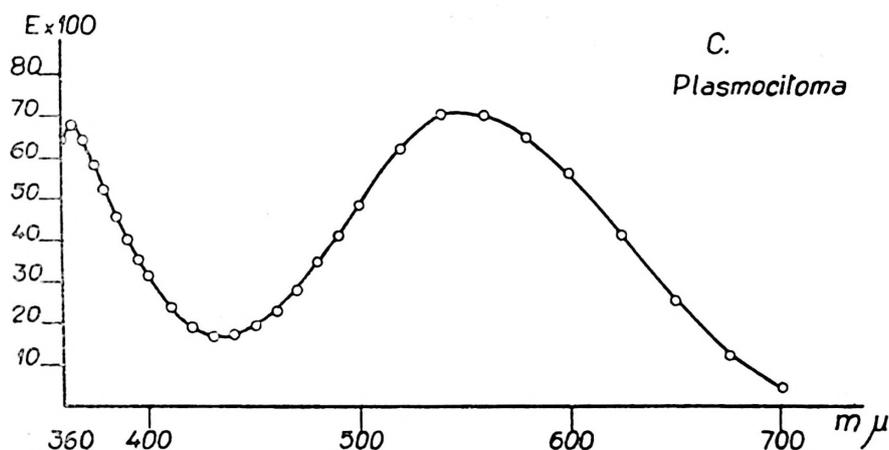


Fig. 3. — Espectrograma del complejo cupro-potásico correspondiente a una globulina gamma de un plasmocitoma.

de 0,778-0,952, y 0,300 para el promedio del cociente B, con unos límites de 0,223-0,289, muy próximos a los de los sueros normales.

En el cuadro 3 se presentan también los datos correspondientes a 8 globulinas gamma obtenidas de enfermos con procesos infecciosos, en los que el promedio del cociente A resultó igual a 0,923 (límites: 0,874-0,965) y el del cociente B de 0,238; el cociente A resulta superior al normal, pero no llega a alcanzar el promedio obtenido en las cirrosis, a pesar de que algunos de los sueros presentan hiperproteinemias con hiper-gammaglobulinemia del orden de las halladas en el grupo de cirróticos. Observando los valores individuales se comprueba que en ningún caso llegan a sobrepasar el valor de 1,0, lo que, por el contrario, ocurre con frecuencia en las cirrosis. El último grupo de los expuestos en el cuadro corresponde a una serie de 17 globulinas gamma procedentes de enfermos afectados de procesos diversos. En este grupo el valor promedio del cociente A es de 0,919 (límites: 0,841-1,094) y para el cocien-

te B de 0,256 (límites : 0,219-0,318). En este grupo se observa la máxima dispersión de valores que podría quizás responder a su heterogeneidad clínica ; la diferencia entre valor máximo y mínimo hallado es de 0,253, y la diferencia máxima que le sigue es de 0,174 en la serie de nefritis y nefrosis.

TABLA II

Valores de los cocientes A y B en globulinas gamma animales a distintas concentraciones

Globulina gamma	g. o/oo	Cociente A	Cociente B
Caballo	42,70	1,051	0,248
	21,35	0,984	0,194
Mezcla 1	7,00	1,080	0,246
	3,50	0,990	0,240
Mezcla 1	4,55	0,998	0,228
	1,57	0,973	0,237
Mezcla 2	7,87	1,000	0,233
	3,71	0,962	0,207
Cordero	8,08	1,005	0,224
	3,30	0,982	0,229
Pavo	8,99	0,916	0,230
	2,59	0,917	0,183
Cobayo	5,04	0,920	0,290
	3,48	0,864	0,252

TABLA III

Promedio expresado en $E \times 100$ de los valores del 1.^{er} máximo, 2.^o máximo y 1.^{er} mínimo en globulinas gamma de sueros normales y de cirrosis hepática

	N.º	Conc. Prom, g o/oo	1. ^o Máximo	2. ^o Máximo	1. ^o Mínimo
Normal	7	8,5	61,5	57,6	17,8
Cirrosis	9	9,7	51,3	50,5	12,5
			360 m μ	560 m μ	440 m μ

Para comprobar si estas diferencias en el comportamiento del espectrograma entre sueros normales y patológicos podían ser debidas a diferencias en la cantidad de globulina gamma de las soluciones utilizadas, examinamos los espectrogramas obtenidos en globulinas gamma procedentes de mezclas de sueros de caballos, de suero de un cordero, de pavo o de cobayo, a distintas concentraciones y en concentración mitad en series paralelas, tal como se presenta en el cuadro 2. En conjunto, los resultados son más altos que los obtenidos en los sueros humanos normales, pero las diferencias en cada serie paralela son pequeñas y, desde luego, no corresponden a las grandes diferencias en concentración.

Discusión.

De los resultados expuestos se deduce claramente cómo el espectrograma del complejo cupropotásico de la globulina gamma de los sueros patológicos, especialmente en el caso de la cirrosis hepática para el material estudiado, se diferencia del de la globulina gamma normal en que el segundo máximo de absorción situado alrededor de las 540-560 $m\mu$ tiene tendencia a igualar y aun sobrepasar al primero, situado alrededor de las 360 $m\mu$. Este hecho no puede ser debido a un efecto de concentración de las soluciones de globulina gamma utilizadas, porque se ha trabajado en condiciones muy próximas, alrededor de los 8 g. por 1.000, y por las comprobaciones presentadas en el cuadro 2 llevadas a cabo con globulinas gamma procedentes de sueros animales, estudiadas paralelamente a distintas concentraciones. Este hecho podría ser debido a un descenso absoluto del primer máximo o, por el contrario, a un aumento del segundo. En el cuadro 3 presentamos los valores promedio de estos máximos y del primer mínimo correspondientes a siete globulinas gamma de sueros normales y nueve de enfermos de cirrosis hepática; hemos escogido este grupo por ser del que tenemos una serie mayor de determinaciones dentro de las globulinas gamma patológicas con aumento de este cociente. De la observación de dicho cuadro se comprueba cómo lo que parece realmente ocurrir es un descenso en los valores de extinción correspondiente al primer pico de la curva, pues tanto el promedio del primer máximo como el del primer mínimo son menores que los correspondientes a las globulinas gamma normales, mientras que el promedio del segundo máximo es muy igual en ambos grupos. Esta comprobación tiene además interés, pues indica que este segundo máximo, que es el habitualmente utilizado en el uso de la

reacción del biuret para la dosificación cuantitativa de proteína total y de las distintas fracciones, es muy constante y que por ello no hay prácticamente error en el uso de un mismo factor para sueros normales y patológicos.

LIEBEN y JESSERER (12) estudiaron el complejo cúprico que se forma por la reacción del biuret, con la caseína, la oxamida y la malonamida, llegando a la conclusión de que el color violeta de dicha reacción está constituido por un componente rojo y otro azul; cuando existe poco cobre, se formaría predominantemente el complejo rojo, que correspondería a un átomo de cobre por dos de biuret, y un exceso de cobre daría lugar al complejo azul con nueva adición de átomos de cobre, átomos que estarían unidos en forma diferente y cuyo complejo correspondería por cada átomo de cobre a dos de biuret. Esta investigación la llevaron a cabo mediante el fotómetro de Pulfrich, observando las correspondientes extinciones con los filtros S47 y S72, es decir, un filtro azul para valorar el componente rojo y uno rojo para el azul. Según ellos, pues, una menor fijación de dos átomos de cobre daría lugar al componente azul.

ETTISCH y SCHULZ (5), estudiando también la reacción del biuret en la caseína y en condiciones similares a las de LIEBEN y JESSERER, comprobaron que sólo una parte de los átomos de nitrógeno de la proteína reaccionaban con el Cu. Para ellos la formación de complejos con este metal es la medida de los cambios irreversibles que el álcali produce en la proteína.

EMMRICH (4) estudió las variaciones en la extinción de la reacción del biuret efectuada en suero normal y valorada con el fotómetro de Pulfrich, el color violeta con el filtro S53, el rojo con el S47 y el azul con el S72. Por una parte relacionó los valores de extinción para el filtro S53, o sea del color violeta, con la concentración de la proteína total, a lo que denomina índice de biuret. Modificaciones pronunciadas de este índice las comprobó en 17 casos de 150 sueros patológicos, y en todos ellos se trataba de casos patológicos graves, en general con edemas. Por lo que se refiere a la relación de extinción para los diversos filtros entre sí, encuentra que es la misma dentro de ciertos límites para todos los sueros, comprobando para unos pocos sueros que presentaban valores para el componente azul más altos.

PLEKHAN (14) ha investigado espectrofotométricamente los complejos de biuret en dipéptidos y tripéptidos de glicocola, en mezclas de ambos y en la albúmina, caseína y gelatina. Comprueba que en estas mezclas el máximo de absorción puede variar con la adición de mayor cantidad de cobre y que en algunos casos la curva obtenida corresponde a la adición de

los componentes individuales de la mezcla, pero que en algunos casos la curva final no corresponde exactamente a dicha adición. Los complejos cúpricos del biuret para las proteínas parecen ser mezclas de los complejos biuret del tipo de los tri y tetrapéptidos en la relación de 90-95 a 10-5 por 100, respectivamente. El máximo de absorción del complejo correspondiente a la seroalbúmina es de 555 $m\mu$; el de la gelatina, a 565 $m\mu$, y el de la caseína, a 560 $m\mu$. En la referata que hemos podido examinar, no se habla de si el autor estudia la zona de 360 $m\mu$ en la que personalmente hemos encontrado el otro máximo de absorción.

En nuestros resultados personales, el máximo de absorción comprobado a las 540-560 $m\mu$ correspondería al componente violeta de los autores anteriores; el componente azul no lo hemos comprobado, puesto que nuestra curva desciende hasta 0 a partir de este segundo máximo, quizás por poner a 0 el espectrofotómetro con el reactivo del biuret que utilizamos. El componente rojo tampoco lo comprobamos, porque nuestra curva presenta precisamente un mínimo de absorción a las 440 $m\mu$, es decir, en la zona del azul, y presenta otro máximo de extinción en la zona del violeta, que no es mencionado por los autores cuyos trabajos hemos sintetizado.

Nos parece que nuestros resultados, dado que trabajamos siempre en concentraciones constantes de la sal de cobre, condiciones constantes de pH , y que hemos comprobado no dependen de la concentración de globulina gamma, pueden interpretarse como debidos a que por modificaciones estructurales de la globulina gamma, se forman complejos cupropotásicos en las globulinas gamma patológicas, distintos a los de las normales, con extinciones diferentes en la zona del violeta y prácticamente iguales en la zona del verde.

Bajo el punto de vista clínico es interesante destacar que de las globulinas gamma patológicas estudiadas, las que presentan una mayor y más constante tendencia a la anormalidad son las de los sueros cirróticos. La macroglobulina estudiada presenta unos cocientes dentro de los límites de la normalidad, mientras que los dos plasmocitomas examinados presentan cocientes elevados, con promedio superior de las cirrosis, pero con límite máximo inferior al máximo de aquéllas. Las globulinas gamma de los sueros de nefritis y las de los procesos infecciosos muestran valores próximos a los normales. Estos resultados hacen pensar que la descaracterización química de la globulina gamma es distinta en diversos procesos patológicos, lo que revela el interés de profundizar en el estudio de las variaciones cualitativas de la misma, pues puede

aumentar nuestros conocimientos fisiopatológicos y quizás ser de utilidad en el diagnóstico clínico.

Resumen

En este trabajo estudiamos el espectrograma del complejo cupropotásico (biuret) de la globulina gamma. Se valoran 72 espectrogramas de globulinas gamma procedentes de sueros humanos normales o patológicos y 7 procedentes de sueros animales. Las soluciones de globulina gamma se han obtenido por precipitación mediante el hiposulfito sódico de esta globulina, diálisis frente a suero fisiológico y ulterior control electroforético de su pureza. El reactivo de biuret utilizado ha sido el de WEICHSELBAUM y el espectrograma se ha obtenido en el espectrofotómetro de Unicam a partir de las 350 m μ .

En todas las soluciones de globulina gamma investigadas, la curva del espectrograma presentaba dos máximos de absorción, el primero alrededor de 365 m μ y el segundo a las 540-560. En 9 globulinas gamma de sueros normales el primer máximo fué siempre superior al segundo, mientras que en la de los sueros patológicos se observó una clara tendencia a igualarse, incluso a que el segundo máximo sobrepasase al primero. En la figura 1 se presenta la curva correspondiente a una normal y a la de un enfermo de cirrosis hepática; en esta enfermedad es en la que se presenta más clara esta tendencia, ya que en otros procesos con gran hiper-gammaglobulinemia no se presenta este hecho tan acentuado, como se comprueba en las figuras 2 y 3 correspondientes a globulinas gamma de un kala-azar y de un plasmocitoma.

Hemos valorado el espectrograma calculando los cocientes segundo máximo/primer máximo (cociente A) que nos expresa la relación entre ambos que acabamos de señalar y el cociente primer mínimo/primer máximo (cociente B) que nos indica las variaciones en la intensidad de caída del primer máximo. Los valores promedio de estos cocientes y sus límites se presentan en el cuadro 1. Las variaciones más significativas corresponden a las del cociente A. El promedio de este cociente en las 9 globulinas gamma normales es de 0,817, el de 22 globulinas gamma correspondientes a sueros de cirrosis hepáticas de varios tipos es de 1,015. En esta serie se ha comprobado el valor máximo obtenido para este cociente, que es de 1,200. El promedio de las 2 globulinas gamma de sueros de plasmocitoma estudiados es de 1,037, es decir, superior al promedio de las de las cirrosis, pero con un límite máximo inferior al de aquéllas. Una macroglobulina estudiada presenta un valor dentro de los límites de los de las globulinas gamma normales; dentro de este grupo deberemos esperar a tener mayor número de determinaciones para que estas observaciones tengan más valor.

El valor promedio del cociente A en una serie de 5 globulinas gamma correspondientes a enfermos afectados de nefritis o nefrosis es de 0,861, y el de una serie de 8 globulinas gamma obtenidas de enfermos con procesos infecciosos de 0,923, o sea próximos a los valores normales.

Para descartar la posible influencia de la concentración en globulina gamma sobre estas diferencias examinamos los espectrogramas de globulinas gamma procedentes de mezclas de suero de caballo, de suero de un cordero, de pavo y de cobayo, a distintas concentraciones en series paralelas tal como se presenta en el cuadro 2. Los valores obtenidos son más altos que los de las gammas humanas normales, pero las diferencias en cada serie paralela son pequeñas y no corresponden a las grandes diferencias de concentración.

El hecho del aumento del cociente primer máximo/segundo máximo es debido a un descenso absoluto del primero, como se comprueba en el cuadro 3, en el que presentamos los valores promedio de estos máximos y del primer mínimo correspondientes a 7 globulinas gamma de sueros normales y de 9 de enfermos de cirrosis hepática. Esta comprobación tiene también interés, pues indica que el segundo máximo que es el habitualmente utilizado en el uso de la reacción del biuret para la dosificación cuantitativa de la proteinemia total y de las distintas fracciones, es muy constante y que por ello no hay, prácticamente, error en el uso de un mismo factor para sueros normales y patológicos.

Se sintetizan trabajos anteriores de autores que estudian el complejo biuret de diversas proteínas y péptidos en los que se señala que ese complejo puede variar en sus características espectrales según la mayor o menor absorción de cobre en su formación, que no todo el nitrógeno de la proteína reacciona para dar lugar a este complejo y que la constitución del mismo puede variar también por otras condiciones. Se señala que los resultados personales obtenidos, dado que se trabaja siempre en concentraciones constantes de la sal de cobre, condiciones constantes de pH, concentraciones próximas de globulina gamma y que además se ha comprobado que no dependen de la concentración de esta globulina, pueden interpretarse como debidos a que por modificaciones estructurales de la globulina gamma se forman complejos cupropotásicos en esas globulinas patológicas distintos a los de las normales, con extinciones diferentes en la zona del violeta y prácticamente iguales en la del verde.

* * *

Agradecemos a la Srta. A. Arce su valiosa colaboración en la realización de este trabajo.

Summary

A study of the spectrogram of cupri-potassium complex (Biuret) of the normal and pathological gamma globulin

The spectrogram of the cupri-potassium complex (biuret) of gamma globulin is studied in this paper. 72 spectrograms of gamma globulins from human sera and 7 from animal sera are valued. The gamma globulin solutions have been obtained precipitating this globulin with sodium hyposulfite ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$), dialysing against saline solution and final electrophoretic control of its purity. The biuret reagent utilized is WEICHSELBAUM's and the spectrogram has been obtained with Unicam's spectrophotometer beginning at 350 $\text{m}\mu$.

Spectrogram curve of all gamma globulin solutions investigated presents two absorption maxima, one near 365 $\text{m}\mu$ and the other at 540-560 $\text{m}\mu$. In 9 gamma globulins of normal sera the first maximum was always surpassing the second, whilst in these of the pathological sera we observed a clear tendency to equality and in many cases the second maximum surpass the first. In figure 1 we show the curve of a normal one and of a patient with liver cirrhosis; in this disease that tendency is clearest, since in other processes with great increase of gamma

globulin this phenomenon is less pronounced, as we see in figures 2 and 3 corresponding to the gamma globulins of a kala-azar and a plasmocytoma.

The spectrogram has been valued calculating the quotients of second maximum/first maximum (quotient A), which expresses the relation between both pointed out right now, and the quotient first minimum/first maximum (quotient B) indicating the variations of fall intensity of the first maximum. The average values of these quotients and their limits are presented in table 1. The most significative variations correspond to these of quotient A. Quotient average in the 9 normal gamma globulins is 0.817, that of 22 gamma globulins corresponding to sera of different types of liver cirrhosis is 1.015. In this series, the highest value obtained for this quotient — 1.200 — has been verified. The average of the two gamma globulins from plasmocytoma sera studied is 1.037, namely higher than the average of these of cirrhosis, but with a maximal limit lower than their's. A studied macroglobulin presents a value in the limits of variation of normal globulins; in these two groups we are waiting for more determinations in order to give a greater value to these observations.

Quotient A average value in a series of 5 gamma globulins corresponding to nephritis or nephrosis patients is 0.861, and this of a series of 8 gamma globulins from patients with infectious processes is 0.923, that is to say, nearly the normal values.

In order to discard the possible influence of gamma globulin concentration on these differences, we examined spectrograms of gamma globulins proceeding from mixtures of horse sera, lamb sera, turkey and guinea pig sera, at different concentrations in parallel series (see table 2). The values obtained are higher than these of normal human gammas, but differences in each parallel series are small and do not correspond to the great differences of concentration.

The phenomenon of increase of the quotient first maximum /second maximum is due to an absolute fall of the first, shown in table 3, where we present the average values of these maxima and of the first minimum corresponding to 7 gamma globulins of normal sera and 9 of liver cirrhosis patients. This verification is interesting, for it indicates that the second maximum, generally used employing biuret reagent for quantitative titration of total protenaemia and the different fractions, is very constant, and for this reason, there is practically no error using the same factor for normal and pathological sera.

Former papers of authors who study the biuret complex of diverse proteins and peptides are synthesized, were is pointed

out that this complex may vary its spectral characteristics according to a greater or smaller copper absorption in its formation, that not all the protein's nitrogen reacts in a way to produce this complex and that its constitution may vary also due to other conditions. The author signals that his personal results, seeing that he works always with constant concentrations of copper salt, constant pH conditions, similar gamma globulin concentrations — having verified furtherwise they do not depend from the concentration of this globulin — may be explained in the sense that pathological gamma globulins forms cupri potassium complexes, different from these of normal ones, with diverse extinctions in the violet zone and practically identical in the green.

Bibliografía

- (1) BOLEET, A. J., ROZHIN, I y SIMPSON, W.: *J. Clin. Invest.*, **36**, 51, 1957.
- (2) CUMMINGS, A. J., y FLYNN, F. V.: *J. Clin. Path.*, **8**, 153, 1955.
- (3) EMMRICH, R.: *Zschr. ges. inn. Med.*, **4**, 178, 1949.
- (4) EMMRICH, R.: *Zschr. ges. inn. Med.*, **5**, 402, 1950.
- (5) ETTISCH, E., y SCHULZ, G. V.: *Biochem. Z.* **245**, 189, 1932.
- (6) GRAS, J.: *R. esp. Fisiol.*, **13**, 275, 1957.
- (7) GRAS, J. y SALAZAR, N.: *Plasmas*, **2**, 18, 1954.
- (8) JIRGENSON, B.: *Biochem*, **71**, 148, 1957.
- (9) JIRGENSON, B., y COOPER, J. A.: *Clínica Chimica Acta*, **1**, 16, 1956.
- (10) JIRGENSON, B., y SIRZTZKY, S.: *J. Amer. Chem. Soc.*, **76**, 1367, 1954.
- (11) JIRGENSON, B., y SIROZKY, S.: *Arch. Biochem. Biophys*, **52**, 400, 1954.
- (12) LIEBEN, F., y JESSERER, H.: *Biochem*, **z. 285**, 36, 1936.
- (13) MULLER, H. J., y KUNDEL, H. G.: *J. Exp. Med.* **104**, 253, 1956.
- (14) PLEKHAN, M. I.: *Exc. Med. II.* **5**, 3433, 1952.
- (15) PUTNAM, F. W.: *Science* **122**, 275, 1955.
- (16) SCHOENBACH, E. B., WEISSMAN, N., y ARISTEAD, E. B.: *J. Clin. Invest.*, **30**, 762, 1951.

