



Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Química

Monografía:

"PROTEINAS PLASMATICAS, SERICAS Y EN OTROS FLUIDOS CORPORALES. PROTEINOGRAMA Y ALTERACIONES. CUANTIFICACION Y SEPARACION DE DIFERENTES FRACCIONES".

T E S I S

Que para obtener el título de
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

p r e s e n t a :

BLANCA LUZ GUZMAN ARCINIEGA



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

CLAS TESIS 1978
ABO M.C. 258 ~~2018~~ 214
PCONA _____
FRDC _____
S _____



JURADO ASIGNADO ORIGINALMENTE SEGUN EL TEMA.

PRESIDENTE

Q.F.B. Oscar Amor Dodero

VOCAL

Q.F.B. Guadalupe Leticia Carrasco Rivera

SECRETARIO

Q.F.B. María Elena Bustamante Calvillo

1er. SUPLENTE

Q.F.B. Luz María Hernández Beltrán

2do. SUPLENTE

Q.F.B. Esther Gutiérrez Hidalgo

LUGAR DONDE SE REALIZO EL TEMA:

LABORATORIO 301 FACULTAD DE QUIMICA

Prof. Asesor del tema:

Sra. Q.F.B. MA. ESTHER GUTIERREZ HIDALGO

SUSTENTANTE.

BLANCA LUZ GUZMAN ARCINIEGA

Con profundo cariño y reconocimiento
a quienes nunca han reparado en brindarme
su apoyo, ejemplo y estímulo

A MIS PADRES

Sr. Nereo Guzmán Romero y
Sra. Consuelo Arciniega de Guzmán.

Con mucho cariño a mis hermanos:
Ma. del Carmen, Nereyda, Jaime,
Jorge, Enrique y Araceli.

A la memoria de mi estimado maestro
Q.E.P.D. Q.F.B. RAMON GUEVARA ESTRADA

Siempre me ha distinguido con
su estimación y atenciones
al maestro Q. Othón Canales V.

Con agradecimiento sincero a la maestra
Q.F.B. Ma. Esther Gutiérrez Hidalgo por
su valiosa asesoría y sin cuya ayuda no
se hubiera realizado el presente trabajo.

A TODOS MIS MAESTROS.

Al Sr. Dr. Héctor Hernán Tovar Acosta
quien me distinguió con su orientación
y estímulo durante mi carrera.

Al Sr. Dr. Héctor E. Peralta Hurtado
por la ayuda y estimación que siempre
me ha brindado.

PARA TI RAFAEL
CON TODO MI CARIÑO.

I N D I C E

Introducción

- 1.- ANTECEDENTES DE LA INVESTIGACION DE LAS PROTEINAS EN LOS --
FLUIDOS CORPORALES.
 - 1.1. Historia.
- 2.- GENERALIDADES DE AMINOACIDOS, PROTEINAS Y SU METABOLISMO
 - 2.1. Antecedentes históricos.
 - 2.2. Digestión de las proteínas.
 - 2.3. Digestión de las nucleoproteínas.
 - 2.4. AMINOACIDOS
 - 2.4.1 Absorción de
 - 2.4.2 Reserva de aminoácidos, intercambio y síntesis de las pro--
teínas.
 - 2.4.3 Conversión de proteínas en
 - 2.4.4. Utilización de aminoácidos para la síntesis de substan--
cias químicas necesarias al organismo.
 - 2.4.5. Vías metabólicas específicas de los
 - 2.4.6. Obtención de la energía por medio de los
 - 2.5.- Conversión de proteínas en grasas y carbohidratos.
 - 2.6.- Proteínas tisulares y su síntesis.
 - 2.7.- Regulación de la síntesis proteínica por los genes.
 - 2.8.- Formación de las proteínas plasmáticas.
- 3.- FISILOGIA Y PATOLOGIA DE LAS PROTEINAS
 - 3.1.- Introducción
 - 3.2. Patología de las proteínas del plasma.
 - 3.3.- Generalidades
 - 3.4. Importancia clínica de las proteínas del plasma y suero.
 - 3.5. Significado clínico de las proteínas del suero.
 - 3.6. Relación A/G. albúmina/globulina en varias enfermedades.

- 3.7. Glicoproteínas y mucoproteínas
- 3.8. Crioglobulinas del suero y su importancia clínica.
- 3.9. Macroglobulinas y macroglobulinemias.
- 3.10. Amiloide.
- 3.11. Proteínas de Bence Jones
- 4.- TECNICAS DE FRACCIONAMIENTO PROTEICO.
- 4.1. Generalidades
- 4.2. Ultracentrifugación
 - 4.2.1. Descripción del tamaño. Unidades de Svedverg.
- 4.3. Fraccionamiento Salino
 - 4.3.1. Generalidades
 - 4.3.2. Bases teóricas del fraccionamiento salino
 - 4.3.3. Precipitación salina y solubilización salina.
 - 4.3.4. Efectos de la fuerza iónica
 - 4.3.5. Influencia del pH
 - 4.3.6. Efectos de la temperatura sobre la solubilidad
 - 4.3.7. Efectos de la constante dieléctrica sobre la solubilidad.
 - 4.3.8. Desnaturalización de las proteínas.
 - 4.3.9. Fraccionamiento salino, razón albúmina globulina.
- 4.4. Ultrafiltración.
- 4.5. Electroforesis.
 - 4.5.1. Concepto.
 - 4.5.2. Estimación de las fracciones proteínicas.
 - 4.5.3. Electroforesis en capa fina
 - 4.5.4. Aplicación de la muestra y de la electroforesis.
 - 4.5.5. Electroforesis en gel de almidón.
 - 4.5.6. Electroforesis en disco usando geles de acrilamida
- 4.6. Cromatografía

4.6.1. Introducción

4.6.2. Historia

4.6.3. Definición

4.6.4. Generalidades

4.6.5. Clasificación de los métodos cromatográficos

4.6.6. Cromatografía de adsorción

4.6.7. Cromatografía de partición.

4.7.- DIVERSAS TECNICAS CROMATOGRAFICAS

4.7.1. Cromatografía en columna.

4.7.2. Cromatografía en papel

4.7.3. Cromatografía en capa fina

4.7.4. Cromatografía en capa fina contra cromatografía en papel.

4.7.5. Cromatografía en capa fina contra otras técnicas cromatográficas.

4.7.6. Cromatografía de gases

4.7.7. Otras técnicas cromatográficas.

4.7.8. Cromatografía de intercambio iónico.

4.7.9. Cromatografía de filtración sobre geles.

4.8. Inmunolectroforesis

4.8.1. Antecedentes

4.8.2. Método estándar de Inmunolectroforesis.

5.- TECNICAS DE CUANTIFICACION DE PROTEINAS

5.1. Métodos instrumentales fisicoquímicos y técnicas de fraccionamiento proteico.

5.2. Métodos químicos y fisicoquímicos de cuantificación de las proteínas.

5.3. Comparación entre diversos métodos de cuantificación de proteínas.

5.4. Determinación de proteínas por el método del Biuret

5.5. Determinación de proteínas del suero por el método de Kjeldahl.

5.6. Método de Kjeldahl Nesslerización

- 5.7. Métodos de determinación de fibrinógeno en plasma.
- 5.8. Métodos de determinación de albúmina y globulina totales.
- 5.9. Determinación de albúmina y globulinas totales por técnicas de precipitación.
- 5.10. Ensayo nefelométrico de globulinas totales.
- 5.11. Fraccionamiento salino de globulinas en suero.
- 5.12. Precipitación de globulina gamma con sulfato de amonio.
- 5.13. Métodos de cuantificación de albúmina en suero.
- 5.14. Determinación de globulinas totales de acuerdo a su contenido en triptófano.
- 5.15. Determinación de globulinas totales en suero. (método de Goldenberg y Drewes).
- 5.16. Identificación de crioglobulinas (Stefanini y Dameshek, 1955)
- 5.17. Determinación de proteínas por el método de Folin-Lowry
- 5.18. Por medición del peso específico.
- 5.19. Por medio del reactivo de Folin-Ciocolteau
- 5.20. Por medida del índice de refracción.
- 5.21. Por medición con luz ultravioleta.
- 5.22. Métodos de determinación de proteínas en líquido cefaloraquídeo.
- 5.23. Reacciones cualitativas de proteínas en líquido cefaloraquídeo.
- 5.23.1 Reacciones de Nonne-appelt y Ross Jones
- 5.23.2 Reacción de Pandey.

6.- COMUNICACION DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS

7.- INTERPRETACION DE RESULTADOS DESDE EL PUNTO DE VISTA FISIOLÓGICO Y PATOLÓGICO.

- 7.1. Valores normales e interpretación para proteína total, albúmina y globulina.
- 7.2. Cambios de las diversas fracciones globulínicas en diferentes enfermedades.

8.- Bibliografía.

Monografía."PROTEINAS PLASMATICAS, SERICAS Y EN OTROS FLUIDOS CORPORALES. PROTEINOGRAMA Y ALTERACIONES. CUANTIFICACION Y SEPARACION DE DIFERENTES FRACCIONES".

Introducción.

El conocimiento de las proteínas del plasma se inició a mediados del siglo pasado desde el punto de vista fisicoquímico, -- con el estudio de sus características de solubilidad. Con el tiempo con la ayuda de diferentes métodos analíticos se fueron identificando algunas de las distintas fracciones existentes en el suero.

Starling en 1895 hizo investigaciones con referencia a la presión oncótica de las proteínas, ésto fué el inicio de su valoración en fisiopatología, así como en inmunología a través de los trabajos hechos con relación a la concentración de sueros antitóxicos y de aquellos que mostraban cierta relación con los anticuerpos cuyo conocimiento estaba también en sus primeros pasos.

La importancia de sus alteraciones en patología humana se desarrolló principalmente a partir de la segunda y tercera décadas de nuestro siglo al generalizarse la técnica refractométrica y la de fraccionamiento según Howe; interés que se ha incrementado en los últimos años gracias al impulso dado por los métodos electroforéticos que permiten realizar el examen del proteinograma como un elemento más, de la química clínica.

El presente trabajo monográfico intenta reunir la información disponible sobre el tema y facilitar la revisión del mismo a quienes deseen proseguir su estudio.

1. ANTECEDENTES DE LA INVESTIGACION DE LAS PROTEINAS EN LOS FLUIDOS CORPORALES

Las proteínas del plasma han sido objeto de estudio e investigación por bioquímicos y clínicos, ya que comprenden a un grupo de sustancias con gran variedad de funciones y propiedades biológicas muy importantes.

El plasma es el medio viscoso a través del cual los glóbulos rojos son transportados y alimentan a los diferentes tejidos del organismo, reflejo y guardían del medio interno, que a través de millares de componentes contribuyen a los requerimientos de nitrógeno, así como a las defensas contra la invasión y ataque de cuerpos extraños y al mantenimiento del pH del cuerpo, además del balance osmótico y regulación de la actividad y función celular.

Como componentes de un sistema metabólico dinámico, las proteínas del plasma varían en diferentes enfermedades y su determinación y fraccionamiento ha sido objeto de estudio en los últimos cien años (26).

1.1 Historia

El estudio del suero fué conocido desde la antigüedad observando la sinéresis o retracción del coágulo y refiriéndose al hecho de que la sangre poseía poderes curativos y de rejuvenecimiento.

Así los egipcios se bañaban con sangre y los romanos bebían - ésta de gladiadores muertos, sin embargo los hebreos sancionaban el hecho de los "bebedores de sangre" y escrúpulos religiosos similares se levantaron en contra de los primeros intentos de transfusión sanguínea.

Mucho tiempo después, las funciones del plasma fueron conocidas y las proteínas fueron estudiadas debido a su gran valor y fácil aislamiento.

Así la albúmina del suero y fibrina de la sangre fueron analizadas por Liebig y Mulder a finales de 1830 introduciendo el término de proteína que proviene del griego protos que significa lo primero.

El estudio de los componentes del suero empezó hace cien años, cuando varios investigadores observaron un precipitado sobre una solución ligeramente acidificado.

Panus en 1851 designó a dicho precipitado como caseína del suero, para diferenciarla de la ya descubierta albúmina del suero.

Schmidt en el mismo año, dió el nombre de globulina a la fracción proteica insoluble que precipitaba y era similar a la obtenida con solución de cloruro de sodio y más tarde otros investigadores emplearon diferentes sales para la precipitación de estas globulinas.

El uso de la precipitación fraccionada con sulfato de amonio como un método de separación de proteínas del suero es atribuido a Hofmeister.

Un procedimiento para la cristalización de albúmina del suero de caballo por precipitación por este método fué reportado en 1894.

En el transcurso de esta centuria, se observó que las globulinas totales podían ser fraccionadas por diálisis contra agua y por precipitación salina.

El término de euglobulina fué utilizado para la fracción que

precipitaba por diálisis contra agua entre 0.28 y 0.33% de saturación con sulfato de amonio.

El término pseudoglobulina, a la fracción que precipita entre 0.34 y 0.46% de saturación con sulfato de amonio.

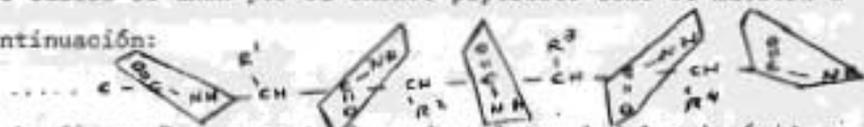
Más tarde, una serie de términos fueron desarrollados y otros procedimientos fueron descritos, no es de sorprender, que el fraccionamiento de mezclas complejas de proteínas como lo es el suero ha sido muy confuso, especialmente previo el desarrollo de aparatos fisicoquímicos para la caracterización de las diferentes fracciones.

Entre los años comprendidos a 1920 y 1925 fraccionamientos de suero tales como el de Howe con sulfato de sodio fueron agregados al manual de laboratorio clínico, y el interés en la variación de los componentes del plasma en enfermedades fué despertando inquietud por los investigadores.

Los términos de euglobulina y pseudoglobulina fueron redefinidos por Howe en función de la solubilidad que presentaban con soluciones de sulfato de sodio, muchos otros sistemas de caracterización de las proteínas del plasma por precipitación fraccionada con sales fueron propuestos, así mismo otros métodos de precipitación fueron estudiados por Gutman (26).

2. GENERALIDADES DE AMINOACIDOS, PROTEINAS Y SU METABOLISMO.

Las proteínas están formadas por unidades de 1-aminoácidos, - los cuales se unen por el enlace peptídico como se muestra a continuación:



En la figura R representa la cadena lateral del aminoácido y puede ser uno de los 23 grupos posibles, éstos se disponen al ternados a cada lado de la cadena, si se unen dos aminoácidos constituyen un dipéptido, tres un tripéptido y muchos de ellos formarán un polipéptido. El peso molecular de las proteínas oscila entre 5,000 y muchos millones; a pesar de tanta compig jidad se ha logrado determinar la secuencia de los aminoáci-- dos de varias proteínas.

Las proteínas se dividen en dos grupos generales:

I.- Fibrilares y II.- Globulares

Las proteínas fibrilares, están formadas por cadenas filamento_s unidas lateralmente por diferentes tipos de enlaces para formar una estructura estable e insoluble, ejemplos de ellas - son la queratina, la miosina y la colágena, las proteínas glo- bulares son de configuración elíptica, con gran cantidad de do- bles a lo largo de la cadena polipeptídica, las biológica-- mente activas como los antígenos y las enzimas son proteínas - globulares.

Linus Pauling del Instituto Tecnológico de California, recibió el premio Nobel en Química, por su contribución al conocimien- to estructural de las proteínas por estudios hechos con rayos X de proteínas nativas y polipéptidos sintéticos, proponiendo una estructura que represente la máxima estabilidad teórica, -

en la cual se consideraron las restricciones estereoquímicas - utilizando las longitudes de los enlaces y ángulos de unión necesarios; esta estructura se le denomina hélice alfa.

Conteniendo aminoácidos en forma espiral, su estabilidad se mantiene por puentes de hidrógeno, entre los grupos carboxilo y los imino de cada tercer residuo peptídico a lo largo de la cadena, conteniendo 3.5 residuos de aminoácidos por cada vuelta completa del espiral.

Otro tipo de estructura es la configuración encontrada en la seda, en el músculo y en las fibras contráctiles, aquí dos o más cadenas están unidas lateralmente por puentes de hidrógeno, observándose estructuras ordenadas o cristalinas.

Para definir a una macromolécula complicada como lo es una proteína se han señalado cuatro niveles estructurales básicos:

Estructura Primaria.- Que representa la combinación de los aminoácidos en una ordenación característica por medio de uniones peptídicas.

Estructura Secundaria.- Con este término se designa la estructura alfa helicoidal en dirección de las manecillas del reloj, la espiral está estabilizada por puentes de hidrógeno entre los grupos carboxilo e imino de las uniones peptídicas.

Estructura Terciaria.- Con objeto de comprimir la larga cadena espiral en forma globular, se efectúan enrollamientos o dobles para dar una estructura rígida compleja, la estabilización de esta estructura se debe a diferentes reactividades entre los grupos R de los residuos aminoácidos.

La estructura terciaria es importante para determinar la es-

estructura fina de una proteína, y puede contribuir a la determinación de las propiedades catalíticas específicas en las proteínas biológicamente activas.

Estructura Cuaternaria.- Define el grado de polimerización de una unidad protéica, este tipo de estructura se encuentra habitualmente en las enzimas reguladoras.

Además se agrupa a las proteínas basándose en su estructura o función en:

Proteínas estructurales.- El miembro más importante de este grupo es la colágena de la piel, cartílago y hueso, compuesta de haces paralelos de fibrillas individuales muy insolubles en agua, formadas de aminoácidos poco comunes como glicina, prolina o hidroxiprolina. Cada cable está formado de tres cadenas polipeptídicas retorcidas paralelamente en un sistema helicoidal izquierdo, de tal forma enrollado que constituye un conjunto extremadamente fuerte con una superhélice derecha que se mantiene estable gracias a los enlaces de hidrógeno entre cadena y cadena.

Proteínas contráctiles.- Se encuentran en numerosos tejidos, en el músculo, mitocondrias y cloroplastos, la proteína contráctil más investigada es la del músculo esquelético y está compuesta de miosina (globular con peso molecular aproximado de 600,000) y de actina, proteína fibrosa que puede asumir forma globular. La actina se denomina actina-G y solamente es estable en soluciones de baja fuerza iónica.

Anticuerpos.- En el plasma sanguíneo, existe un grupo de proteínas conocido como gammaglobulinas. Algunas de éstas se originan en el bazo y células linfáticas, como respuesta a un

material heterólogo llamado antígeno, las proteínas neoformadas se llaman anticuerpos, poseen estructura terciaria estabilizada por las interacciones entre sus cadenas laterales.

Proteínas sanguíneas.- Además de las gammaglobulinas, hay --- otros tres tipos de proteínas que juegan un papel en la conservación de la vida de los vertebrados, el primer grupo es el de las albúminas que representan el 50% de las proteínas plasmáticas totales, juegan un papel relativamente pasivo en la conservación de la vida de los vertebrados, el primer grupo es el de las albúminas que representan el 50% de las proteínas plasmáticas totales, juegan un papel relativamente pasivo, mantienen la presión osmótica de la sangre, tiene capacidad amortiguadora del pH. La seroalbúmina tiene un peso molecular de 67,000 es globular típica con una configuración alfa helicoidal baja, y su estructura es terciaria.

2.1.- Antecedentes históricos

El conocimiento del metabolismo de aminoácidos y proteínas, tiene sus bases en las primeras investigaciones hechas sobre nutrición.

En 1914 Osborne y Mendel, demostraron que la rata requería de dos aminoácidos en la dieta triptofano y lisina. Posteriormente Rose de la Universidad de Illinois demostró que se necesitaban además otros ocho aminoácidos con carácter de indispensables.

La segunda guerra mundial proporcionó el estímulo y material necesarios, para identificar los aminoácidos requeridos por el hombre, se hicieron experimentos a base de administrar una dieta especial a voluntarios masculinos, manteniéndolos en equilibrio nitrogenado.

Estos estudios demostraron que la lisina, triptofano, fenilalanina, treonina, valina, metionina, leucina, e isoleucina, eran indispensables.

Se dice que un individuo o animal están en equilibrio nitrogenado, cuando el nitrógeno consumido por día en la dieta es igual a la cantidad de nitrógeno escretado; se puede medir fácilmente si se administra una dieta sintética constituida por una mezcla de ellos, entonces el nitrógeno escretado se cuantifica tanto en la orina como en las heces.

Un animal adulto puede mantenerse en equilibrio nitrogenado, si se le proporciona una cantidad de nitrógeno adecuada para mantener sus mínimas necesidades metabólicas, sin embargo, -- este nitrógeno no puede proporcionarse simplemente como NH_3 -- sino que debe ingerirse en forma de aminoácidos indispensables. Si en la dieta se omite alguno de ellos, el animal degradará las proteínas de sus tejidos para sus necesidades y -- el balance nitrogenado será negativo, o sea, el nitrógeno escretado en la orina y heces será superior al proporcionado en la dieta, cuando el aminoácido omitido se añade a la dieta el individuo vuelve nuevamente a su equilibrio.

La fiebre y las enfermedades en general, colocan al individuo en un balance nitrogenado negativo, así como una dieta nitrogenada inadecuada.

Por otro lado, un animal en crecimiento que continuamente está aumentando la cantidad de proteínas de su cuerpo, tendrá -- un balance nitrogenado positivo, o sea, que la cantidad de nitrógeno que toma es mayor a la cantidad escretada.

Como una consecuencia importante dentro de los trabajos nutri

cionales realizados, en cuanto a los aminoácidos indispensables, se observó que los animales no podían elaborarlos, por lo menos en la cantidad requerida.

Podemos formularnos la pregunta: los animales carecen de la capacidad necesaria para elaborar el esqueleto carbonado de estos aminoácidos indispensables?; la respuesta aparentemente es que sí, ya que si a un animal al que se le proporciona una dieta carente en fenilalanina, por ejemplo y ésta se sustituye -- por ácido fenil pirúvico, el cetoácido análogo de la fenilalanina, la dificultad está en la síntesis de anillo aromático -- que posee el aminoácido; puede concluirse, que ciertos tipos -- de esqueletos carbonados no son fácilmente sintetizados por -- los animales superiores.

Puesto que solamente la mitad de los aminoácidos naturales -- son indispensables para los animales, se vé claramente que el resto puede ser sintetizado, a estos aminoácidos se les llama dispensables.

La síntesis no incluye solamente la formación del esqueleto carbonado sino también la transferencia de átomos de nitrógeno de los aminoácidos de la dieta para completar los aminoácidos indispensables; por consiguiente las reacciones metabólicas se referirán a la síntesis de los esqueletos carbonados -- de los aminoácidos dispensables y a la manera por medio de la cual éstos aminoácidos adquieren los átomos de nitrógeno (5).

Responsable de la Inanición. - Existe un síndrome llamado ---- "Kwaskiorkor" muy común en los trópicos en donde viven ingiriendo una adecuada dieta en calorías pero deficiente en proteína animal, este padecimiento está caracterizado por anemia,

aumento de peso, edema y otras alteraciones; es especialmente severa en niños.

Cuando un individuo ingiere una dieta baja en proteínas pero calóricamente adecuada, declina la excreción de urea y de sulfatos orgánicos e inorgánicos, la pérdida de ácido úrico disminuye en un 50%, la eliminación de creatinina no es afectada y la excreción del nitrógeno total sufre una baja de 3.6 gramos al día durante la inanición. En el caso de que la dieta sea calóricamente inadecuada, se provocará un balance nitrogenado negativo producido por la deficiencia de los aminoácidos esenciales.

En una dieta inadecuada en calorías los promedios de excreción de nitrógeno de urea son cerca de 10 gramos por día ya que las proteínas se catabolizan para obtener energía.

La mayor parte de la proteína metabolizada durante la inanición completa proviene del hígado, bazo y músculo así como del corazón y cerebro.

La glucosa de la sangre baja después de una disminución consiguiente del glucógeno del hígado manteniéndose abajo de los niveles normales produciéndose síndromes hipoglucemiantes por gluconeogénesis y cetosis. En este caso el cerebro empieza a utilizar cuerpos cetónicos para obtener energía y la grasa neutra es rápidamente catabolizada.

Por lo anterior, el balance nitrogenado no se debe mantener por debajo de los diez aminoácidos esenciales; aunque la histidina y la arginina no son esenciales, sí se requieren para un crecimiento normal.

Otros aminoácidos en el cuerpo pueden sintetizarse en vivo --

dentro del organismo, en cantidad suficiente por aminación o interconversión en el metabolismo de carbohidratos y grasas. Cuando cualquiera de los aminoácidos necesarios para la síntesis de una proteína es inadecuado, la proteína no se sintetiza, entonces los otros aminoácidos que vienen en las proteínas son desaminados y el nitrógeno excedente se secreta en forma de urea, ésto es probablemente la razón del balance nitrogenado negativo cuando un simple aminoácido esencial se omite en la dieta (5).

J. r. Digestión de las proteínas

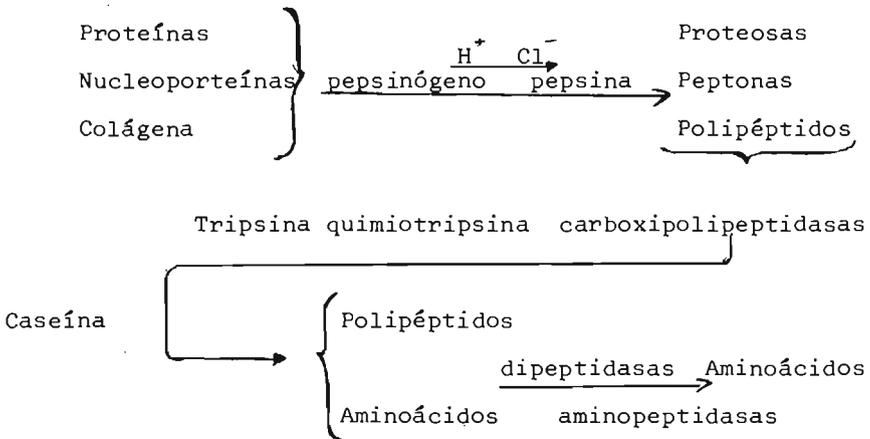
Las proteínas corporales están formadas por 23 aminoácidos diferentes, 13 de los cuáles se sintetizan en el organismo y 10 son considerados esenciales por venir necesariamente en la alimentación ya que el organismo no los sintetiza (10).

Las proteínas son digeridas directamente de los alimentos que se consumen, su catabolismo se inicia en el estómago por acción de un grupo de enzimas que se activan en presencia del ácido clorhídrico del jugo gástrico, estas enzimas son el pepsinógeno que se transforma a pepsina activa y la gastricaína, éstas transforman a las proteínas a proteosomas, peptonas y polipéptidos (10).

Mamíferos jóvenes secretan renina la cual hidroliza parcialmente el caseinógeno (proteína de la leche) dándonos caseína soluble, que en presencia de sales de calcio se forma un coágulo de caseinato de calcio el cual es rápidamente digerido enzimáticamente. La existencia de renina en el humano no ha sido bien establecida, de tal modo, que este papel se atribuye a la pepsina (15).

La digestión continúa en el intestino, ahí los productos de de gradación por la acción enzimática de la tripsina y quimiotripsina provenientes del jugo pancreático y carboxipolipeptidasas del jugo intestinal se reducen hasta polipéptidos y algunos -- aminoácidos.

Finalmente los polipéptidos por acción de aminopolipeptidasas y dipeptidasas del jugo intestinal se hidrolizan hasta amino-- ácidos (10).



2.3.- Digestión de nucleoproteínas

La parte protéica es removida de las nucleoproteínas por el ácido clorhídrico del estómago y digerida con las otras enzimas - del alimento.

Los ácidos nucleicos libres son hidrolizados enzimáticamente primero a nucleótidos en el intestino por las nucleasas pancreáticas, los nucleótidos se rompen en nucleósidos y ácido - fosforico por medio de enzimas que están localizadas en la luz del intestino (5,15).

Los productos finales de degradación son pentosas, purinas y pirimidinas las cuales son absorbidas y catabolizadas a través

del metabolismo de los ácidos nucléicos (15,5).

2.4. AMINOACIDOS.

2.4.1.- Absorción de aminoácidos

La absorción de las proteínas en el aparato digestivo después de que han sido hidrolizados por las enzimas digestivas y liberados como aminoácidos, se lleva a cabo dentro de los capilares del intestino y entran a la circulación portal para ser acarreados a la circulación general y al hígado (10,15).

En sangre y en líquido extracelular se encuentra una pequeña cantidad de aminoácidos, su concentración total es aproximadamente de 30 mgs/100ml.

Dicho de otra forma, la concentración de los 23 aminoácidos es sólo 1/3 de la concentración de glucosa, esta disminución se debe a que los aminoácidos son absorbidos por las células con gran rapidez (10).

La absorción es más rápida que una simple difusión, por lo que puede esperarse que están involucrados procesos activos (10,5).

Después de la ingestión de las proteínas en la dieta, hay un aumento transitorio en el contenido de nitrógeno de los aminoácidos de la sangre portal, los aminoácidos son metabolizados más rápidamente que sus isómeros, los cuales son aparentemente absorbidos solamente por difusión pasiva.

Hay tres tipos de transporte, uno que transporta aminoácidos neutros, otro aminoácidos básicos y otro prolinas, hidroxiprolinas y algunos otros de ellos.

La absorción de aminoácidos es rápida en el duodeno y yeyuno pero baja en el íleo, aproximadamente el 50% de las proteínas

digeridas provienen de la comida ingerida, 25% están contenidas en los jugos digestivos y el otro 25% son de las células de des-
camación de la mucosa, algunas de las proteínas ingeridas en-
tran al colón y son eventualmente digeridas por acción bacte-
riana, la proteína en este caso no proviene de la dieta pero -
sí de bacterias y residuos celulares.

En niños algunas de las proteínas no digeridas son también ab-
sorbidas, los anticuerpos proteínicos contenidos en el claustro
materno, contribuyen a la inmunidad pasiva de los infantes con-
tra las infecciones entrando a la circulación del intestino, -
proteínas extrañas que entran a la circulación provocan la --
formación de anticuerpos y la reacción inmunológica ocurre so-
bre subsecuente entrada de mayor cantidad de proteínas, lo que
puede causar síntomas alérgicos.

Esta es la evidencia de que las células de la mucosa de los ani-
males jóvenes absorben completamente a las proteínas por pino-
citosiis y éstas son las células maduras que normalmente pier-
den la facilidad de absorber las proteínas por este proceso.

La situación es probablemente similar en humanos; los niños --
son con frecuencia alérgicos a las proteínas alimenticias como
las presentes en el huevo, esta respuesta va disminuyendo a --
través del crecimiento, sin embargo, algunos adultos desarro-
llan síntomas alérgicos después de la ingestión de ciertas co-
midas y en estos individuos la absorción de la proteína total
persiste presumiblemente (15).

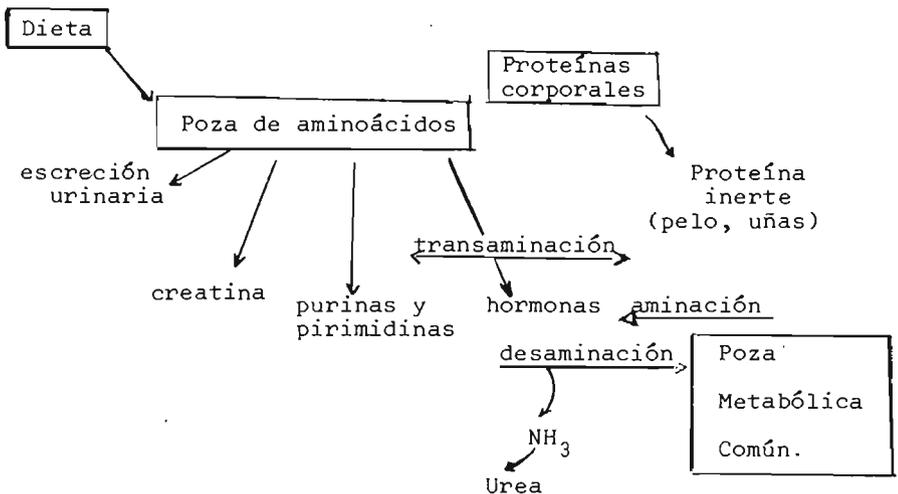
2.4.2 Reserva de aminoácidos. Intercambio y síntesis de las pro- teínas.

Los aminoácidos después de su absorción dentro de la sangre, -
difunden a través de los fluidos corporales y así alcanzan to-

das las células de los tejidos del cuerpo.

Al mismo tiempo muchas de las proteínas tisulares (proteínas estructurales y funcionales) continúan desintegrándose para dar aminoácidos, los cuales al mismo tiempo entran en la circulación y forman parte de la llamada "reserva de aminoácidos", este rompimiento de proteína se lleva a cabo en gran escala. Ninguna distinción funcional existe entre los aminoácidos que derivan de la comida y los que se obtienen de los tejidos, de la poza de aminoácidos comunes, son tomados por las células - (cada célula de acuerdo con sus necesidades específicas) para ser construídos a la estructura celular requerida.

Si una célula toma tantos aminoácidos como los que pierde ---- existe lo que se llama un "equilibrio dinámico", si la pérdida es mayor, las células se alteran y destruyen, si la ganancia - es mayor las células crecen.



El grado de síntesis de proteínas puede ser calculado de acuer

do al grado de incorporación del nivel isotópico de aminoácidos.

En animales experimentales esta interconversión se ha calculado y se ha visto que es mayor en mucosa intestinal, después -- de riñón, hígado, cerebro y músculo.

Cada especie proteínica constantemente es perdida y resintetizada a un grado característico, algo de esta interconversión -- refleja la renovación de las células y reemplazamiento de proteínas secretadas como sucede en la mucosa intestinal.

En el hombre, el intercambio de proteína envuelve el rompimiento y resíntesis de 80 a 100 g de tejido proteínico por día, -- cerca de la mitad ocurre en el hígado, en un promedio general las proteínas del plasma son completamente reemplazadas cada 15 días.

La poza o reserva de aminoácidos no tiene una realidad anatómica, pero representa una habilidad de construcción de unidades de aminoácidos.

Así la reserva contiene no sólo todos los aminoácidos libres de la sangre y fluídos biológicos, sino también aminoácidos -- los cuales habrán sido liberados por el rompimiento de una -- porción de las proteínas tisulares.

La reserva constantemente sufre disminución debido a:

- 1).- Gran escala de desaminación, en donde los grupos amino son transformados a urea, dejando un residuo no nitrogenado.
- 2).- Aminoácidos y derivados tales como creatinina que son perdidos en orina y otras secreciones biológicas.
- 3).- Los aminoácidos continuamente deben de formar proteínas -- tales como el pelo, los cuales no son parte del sistema diná-

mico de proteínas.

De otra forma, la poza de aminoácidos está siempre siendo resta
blecida, por aminoácidos derivados de:

- 1).- Reaminación de ciertos residuos no nitrogenados
- 2).- Aminación de fragmentos apropiados derivados de carbohi-
dratos y rompimiento de grasas los cuales están presentes en la
reserva metabólica común.
- 3).- Aminoácidos provenientes de proteínas de la dieta, absorbi
das a través del intestino hacia la sangre.

A estos cambios se les ha designado como "metabolismo contínuo
de aminoácidos".

Los residuos no nitrogenados los cuales quedan libres posterior-
mente a la desaminación de los aminoácidos se usan en algunos -
otros caminos metabólicos.

Los aminoácidos formados por rompimiento endógeno de las pro--
teínas no tienen el mismo camino de aquellos derivados de pro-
teínas ingeridas, éstos últimos constituyen la reserva común -
de aminoácidos que suplen a las necesidades del organismo.

En el riñón, la mayoría de los aminoácidos filtrados son reab
sorbidos pero en enfermedades tales como el síndrome de Fanco-
ni de aminoaciduria, se presenta un defecto en la absorción de
los túbulos renales provocando la presencia de aminoácidos en
la orina.

Así podemos decir que la síntesis de proteínas es mayor que -
el rompimiento de ellas a todas las edades, que existen, ya -
sea por el pelo, por la orina en forma de hormonas protéicas
y proteínas no absorbidas, que provienen de secreciones di--
gestivas y secretan por las heces.

2.4.3 Conversión de proteínas en aminoácidos

Todas las células sintetizan más proteínas que las indispensables para mantener la vida, de esta manera si se necesitan --- aminoácidos en otro sitio del cuerpo, algunas proteínas celulares pueden transformarse en aminoácidos y ser transportados -- en tal forma, este proceso es catalizado por enzimas llamadas "catepsinas" que existen en todas las células sobre todo en -- los lisosomas, la cantidad de proteínas en las células depende del equilibrio entre la síntesis y la destrucción, incluso las proteínas que circulan en la sangre pueden ser transformadas en aminoácidos, pues las absorben las células reticulo-- endoteliales y quizá otras. Las enzimas que contienen, las -- desdoblan también a ácidos aminados.

Por el cambio constante de ellos, las proteínas en todos los tejidos del cuerpo se mantienen en equilibrio moderado entre sí.

Si se pierde proteína de un tejido o del plasma sanguíneo, -- gran parte de las presentes en el resto del cuerpo se convierten en aminoácidos que son transportados al sitio en que se necesitan para formar otras nuevas, existiendo así un equilibrio entre aminoácidos y proteínas plasmáticas (10).

2.4.4 Utilización de aminoácidos para la síntesis de sustancias químicas necesarias al organismo.

Casi todas las reacciones metabólicas en las células necesitan de sustancias químicas especiales para efectuarse y la -- mayor parte de ellas se sintetizan con aminoácidos (10).

Por ejemplo, la contracción muscular, exige de gran cantidad de adenina y creatina, las células sanguíneas necesitan abun-

dante "hem" para formar hemoglobina y los riñones requieren -- abundante glutamina que se utiliza en la elaboración de amoníaco, la mayor parte de estas substancias son sintetizadas a partir de los aminoácidos, así mismo, este es el origen de muchas hormonas secretadas por glándulas endócrinas, entre ellas adrenalina y tiroxina, formadas a partir de la tirosina, histamina elaborada a partir de la histidina, diversas hormonas hipofisarias que son proteínas de tamaño grande, la hormona paratiroidea que consiste de una proteína pequeña y la insulina un polipéptido de cadena muy larga (10).

Un ejemplo de utilización de aminoácidos lo podemos ejemplificar con la ingestión de glicina, en el cual se marcan con isótopos los átomos de carbono y nitrógeno. Después de la absorción de las mezclas de la glicina, la marcada y la ya presente en los fluidos orgánicos, se estudian los cambios sufridos por este aminoácido; se ha comprobado así que suceden como sigue:

- 1).- Algunos aminoácidos son incorporados a las proteínas de los tejidos o del plasma a grados variables con cada proteína.
- 2).- Otros son utilizados para la construcción de compuestos no proteínicos que contienen glicina, como parte de su estructura. Ej. glutatión, ácido glicocólico y ácido hipúrico.
- 3).- Algunos de ellos son convertidos reversiblemente a aminoácidos como serina y cistina.
- 4).- Otros son usados en la síntesis de constituyentes en los cuales la glicina es un precursor específico. Ej: creatina, hem, pigmentos biliares, purinas, colina (probablemente por vía serina).

5).- El sobrenadante es desanimado, el amoníaco es convertido y excretado como urea o usado para aminación de varios cetoácidos para formar otros aminoácidos e indirectamente excretados como iones (NH_4) en la orina.

6).- El residuo no proteínico que resulta de las reacciones de desaminación es así mismo desasimilado como CO_2 y H_2O , produciendo energía o convertido a glicógeno o glucosa (15).

2.4.5.- Vías metabólicas específicas de los aminoácidos.

En adición a la formación de unidades de todas las proteínas - en los tejidos, incluyendo a las enzimas y muchas de las hormonas, los aminoácidos tienen especial función en la formación - de otros componentes del cuerpo, algunos de ellos con funciones metabólicas específicas muy importantes (15)

Metionina, cistina, cisteína son aminoácidos que contienen azúfre provenientes de Coenzima A, taurina y otros compuestos biológicamente activos.

Metionina es convertida a S- adenosil- metionina, la cual es activada por un agente metilante en la síntesis de compuestos tales como epinefrina, acetil colina y creatina, ésto representa la mayor donación de grupos metilo activos los que pueden a su vez ser sintetizados de un derivado del ácido fórmico enlazado a derivados de ácido fólico y cianocobalamina.

Los aminoácidos que contienen azufre como metionina, cisteína y cistina son las fuentes de obtención de los sulfatos en la orina, aparte de trazas de vitaminas conteniendo azufre como tiamina y biotina.

Una cierta cantidad de compuestos de azufre son excretados --

(como azufre urinario neutro) pero la mayor parte de la excreción urinaria es en forma de sulfatos acompañados de cantidades correspondientes de cationes como Na, K, NH_4 , y H.

Los sulfatos etereos en la orina y ésteres sulfatados son derivados de sulfato orgánico ($\text{R-O-SO}_3\text{H}$) formados en el hígado por fenoles endógenos y exógenos, incluyendo estrógenos y otros -- esteroides, índoles y drogas (5,15).

Podemos referirnos también a la glicina como unidad fundamental, a la arginina, que forma parte del ciclo responsable de la formación de urea, y provee de un grupo amídico para la síntesis de creatina.

A la histidina como precursor de la histamina etc.

De los aminoácidos aromáticos la fenilalanina el cual es indispensable y puede ser convertido irreversiblemente a tirosina, la cual a la vez es precursor de la tiroxina, noradrenalina y por consiguiente de adrenalina y pigmentos melanina del pelo y la piel.

La metionina uno de los aminoácidos indispensables puede ser convertido irreversiblemente a cisteína, éste es ya un aminoácido dispensable.

La cisteína es rápidamente convertida a cisteína bajo condiciones de oxidación y la reacción es reversible bajo condiciones reductoras, proteínas conteniendo grupos SH libres como la cisteína, frecuentemente es oxidada al correspondiente disulfuro (15).

2.4.6. Obtención de la energía por medio de los aminoácidos

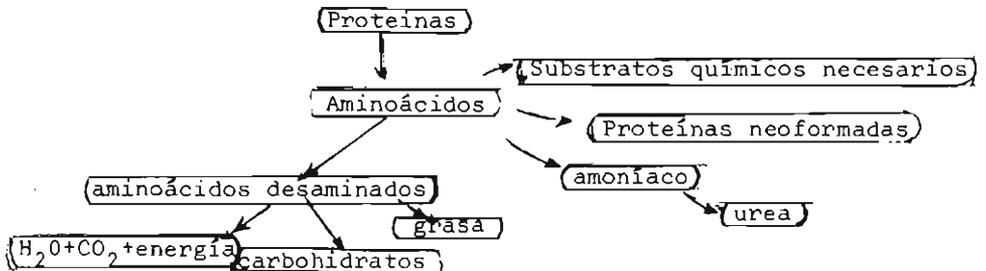
Además de ser usados los aminoácidos para la síntesis de proteínas y otras substancias químicas, algunos de ellos se em--

plean para obtener energía.

El primer paso en este fenómeno es eliminar el radical amino, este procedimiento se llama "desaminación" y tiene lugar en el hígado, el radical amino eliminado se convierte en amoníaco que se combina con anhídrido carbónico y forma urea, la secretada por los riñones en la orina; una vez más el hígado es importantísimo en el proceso metabólico.

Volviendo a las fórmulas de los aminoácidos se aprecia que al eliminar el radical amino de algunos de ellos, quedan aún compuestos químicos muy complicados, ciertos aminoácidos pueden ser utilizados por el organismo a causa de su naturaleza y en consecuencia, se excretan directamente en el tubo digestivo y se expulsan en las heces, sin embargo, al menos el 60% de los aminoácidos desaminados tienen estructura química lo bastante sencilla para participar en las reacciones celulares donde intervienen la glucosa y los cetoácidos.

A menudo se oxidan directamente para formar agua y anhídrido carbónico, proceso durante el cual se libera energía, si no se necesita ésta por el momento pueden transformarse en grasas o carbohidratos y después utilizarse con fines energéticos en forma de ceotácidos o glucosa.



2.5.- Conversión de Proteínas en Grasas y Carbohidratos

Las células corporales necesitan elaborar aproximadamente 45g de proteínas al día, para sustituírlas destruídas por el desgaste natural.

Si la ingestión de aminoácidos excede a la cantidad necesaria para este fin, el exceso se desamina y se convierte en grasas o carbohidratos o bien se utiliza como fuente energética, en otras palabras, las proteínas no se almacenan en el cuerpo - como tales, ni cuando están en exceso (10).

2.6.- Proteínas Tisulares y su Síntesis

Las funciones principales de las proteínas en las células son dos principalmente:

- a).- Proporcionan casi todos los elementos estructurales
- b).- Constituyen las enzimas que regulan las diversas reacciones químicas celulares, en consecuencia la función dependerá del tipo de proteínas que contienen.

Cada célula es capaz de sintetizar sus propias proteínas, reguladas por los genes del núcleo (10).

2.7.- Regulación de la Síntesis Proteínica por los Genes.-

El núcleo de las células del cuerpo humano contiene 46 cromosomas dispuestos en 23 pares, a su vez, cada cromosoma consta de muchos centenares de moléculas de ácido desoxirribonuclético, se acepta que cada molécula es un gen individual y que su -- función depende de su naturaleza química intrínseca y también de su posición en el filamento cromosómico.

Un gen nuclear regula la elaboración de un tipo correspondiente de ácido ribonucléico, que pasa al citoplasma celular, tienen -

una composición algo distinta del ADN (ácido desoxirribonucleico) del gen nuclear, los genes plasmáticos a su vez actúan como "plantillas" para regular la elaboración de proteínas por los ribosomas en el citoplasma, como las proteínas desempeñan las funciones estructurales y enzimáticas celulares, los genes nucleares y del plasma regulan indirectamente la función global de la célula (10).

2.8.- Formación de las Proteínas Plasmáticas

Las principales proteínas del plasma con gran importancia desde el punto de vista fisiológico son: las albúminas, la globulina y el fibrinógeno.

Las albúminas crean la presión oncótica del plasma, las globulinas proporcionan los cuerpos inmunizantes (anticuerpos) y el fibrinógeno se utiliza en la coagulación de la sangre.

Casi todas estas sustancias se forman en el hígado y después pasan a la sangre, aunque una pequeña parte, sobre todo de las globulinas es elaborada por células reticuloendoteliales, plasmáticas y linfocitos grandes.

Las proteínas plasmáticas son idénticas a la mayor parte de las intracelulares, excepto que han salido a la sangre circulante.

Se ignora el mecanismo en virtud del cual salen de las células hepáticas y plasmáticas, pero en lo que se refiere a los linfocitos grandes se ha observado que la membrana celular se rompe y vacía su contenido en la linfa, cabe que actúe un mecanismo semejante en el caso de las células hepáticas y plasmáticas (10).

3.- FISILOGIA Y PATOLOGIA DE LAS PROTEINAS.

3.1 Introducción

Se denomina fisiología general de las proteínas plasmáticas el estudio de las modificaciones de sus diferentes fracciones con sideradas en conjunto y sin tener en cuenta aquellas que presentan una función específica en particular.

El estado metabólico de las proteínas dentro del organismo es lo que se conoce como "Proteinemia" y éste puede ser establecido por medio de un "Proteinograma", gracias a los métodos instrumentales que hacen posible la determinación cuantitativa de las distintas fracciones presentes en el plasma.

De acuerdo a lo anterior se ha permitido plantear y formular una ley general que explique los puntos acerca del origen, metabolismo y mecanismo de regulación de la proteinemia.

Esta ley permite una definición funcional de disproteinemia y asocia a sus alteraciones en tres tipos fundamentales:

1.- Seudoproteinemias.- Conocidas como falsas proteinemias

2.- Disproteinemias.- En este grupo están incluidas las hipoproteinemias y las hiperproteinemias.

3.- Paraproteinemias.- Que se refieren a las alteraciones cualitativas de las distintas fracciones proteínicas (19)

3.2. Patología de las Proteínas del Plasma.

En estados de enfermedad el total de proteínas y la razón entre las diferentes fracciones proteínicas puede cambiar constantemente.

El nivel del total de proteínas del suero hallado en jóvenes y adultos de edad mediana sanos es de 6.0 y 8.2 g/100 ml. de suero

ro, en plasma la presencia de fibrinógeno aumenta este valor en 0.2 a 0.4 gr/100 ml., una variación diurna de 0.5 gr/100 - ml refleja pequeños cambios en la razón entre el líquido vascular y el no vascular en el curso de la actividad diurna. En estados de deshidratación, pueden aumentar en un 10 a 15%, ascenso que se refleja en todas las fracciones.

La deshidratación puede estar causada por disminución en la ingestión de agua, como ocurre en franca privación de agua o excesiva pérdida de agua como en vómitos y diarreas graves, en la enfermedad de Addison y Acidosis diabética, la cantidad absoluta de proteínas en suero no varía pero su concentración aumenta a causa de la disminución del volúmen del agua.

En mieloma múltiple el total de proteínas puede aumentar a más de 10g/100 ml. y este aumento se debe casi por completo a la presencia de niveles señaladamente elevados de proteínas del mieloma (formas anormales de globulina gamma), las cantidades de las otras fracciones proteínicas prácticamente no -- están alteradas.

La hipoproteinemía está caracterizada porque los niveles del total de proteínas están por debajo de 6.0 gr/100ml. Se encuentra en muchos estados de enfermedad no relacionados entre sí, en el síndrome nefrótico pueden perderse en la orina grandes masas de albúmina como resultado del escape de las moléculas de albúmina a través del riñón dañado, en síndrome de retención de sal, retorna agua para diluir la sal retenida, lo que resulta dilución de todas las fracciones proteínicas, pacientes con quemaduras graves, hemorragias extensas o heridas

abiertas pierden grandes cantidades de ellas, el agua es reemplazada por el cuerpo más rápidamente que las proteínas y con ello se produce una disminución en la concentración total, un período largo de baja ingestión o absorción deficiente puede afectar el nivel y la composición de las proteínas del suero, como sucede en el sprue y otras formas de mala absorción intestinal, al igual que la carencia aguda de proteínas (Kwashiorkor), en estas condiciones el hígado no tiene materia prima para sintetizar nuevas proteínas del suero a fin de reemplazar las que se han perdido en el cambio normal.

En general, pueden ocurrir cambios en la concentración total en una, en varias o aún en todas las fracciones, también es posible que ocurran cambios significativos en las distintas fracciones sin cambios en la concentración total.

En ocasiones el médico puede solicitar sólo un valor para el total de proteínas en suero, sin embargo es más común que solicite los valores de las fracciones de albúmina y el total de globulinas y de la razón albúmina/globulina (A/G). En jóvenes y adultos de edad mediana sanos, la cantidad de albúmina puede variar de 3.8 a 4.7 g/100 ml. y el total de globulinas de 2.3 a 3.5 g/100ml. El intervalo hallado para la razón albúmina/globulina es de 1.1 a 1.8 con un promedio de 1.5, las globulinas suelen separarse por medio de métodos de fraccionamiento salino, pero pueden estimarse por la suma de las fracciones separadas electroforéticamente, las albúminas pueden estimarse por separado en virtud de su capacidad de enlace con ciertos colorantes.

3.3. Generalidades

El valor del metabolismo nitrogenado para conocer la situación clínica de un paciente está expresado por medio de las pruebas clínicas de laboratorio:

- 1).- Determinación de urea (nitrógeno no proteínico)
- 2).- Cuantificación de las proteínas del suero.

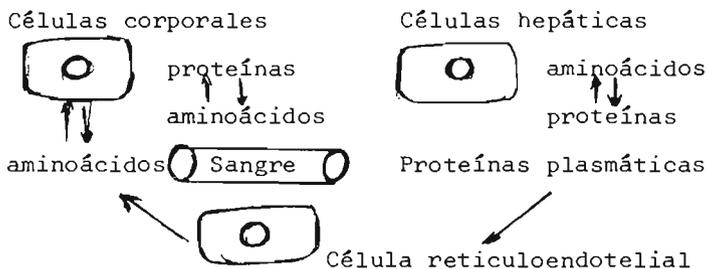
El estado dinámico que existe entre aminoácidos y proteínas se le ha llamado "equilibrio dinámico" o balance nitrogenado, en el caso del estado de salud, el individuo ingiere la misma cantidad de nitrógeno que excreta, como las proteínas en las células constantemente sufren rompimiento a aminoácidos, parte de ellos se utilizan en la síntesis de nuevas proteínas; en el caso de que sea necesaria proteína exógena los aminoácidos de reserva (poza metabólica) se desamina en el hígado y son -- usados para las necesidades del organismo, o excretados directamente en la orina en forma de urea y ácido úrico.

Si la ingestión de nitrógeno está por debajo del nivel requerido para mantener las necesidades del organismo resultará un balance negativo.

El caso de balance positivo se observa frecuentemente en niños y mujeres embarazadas pues están siendo necesitadas gran cantidad de proteínas, ya sea por formación de nuevas (neoformación) o exceso de utilización (8).

Además que el hígado ejerce una acción amortiguadora para los aminoácidos igual a lo que sucede con la glucosa, cuando la concentración de ellos es muy elevada gran parte es absorbida por las células hepáticas donde probablemente pueden almacenarse.

Como resultado de ésto, los aminoácidos se encuentran en estado de flujo continuo de una parte del cuerpo a otra; si la concentración de aminoácidos de las células en una determinada zona disminuye mucho, entran aminoácidos de la sangre, éstos son substituídos por otros que a su vez son liberados por otras células; este intercambio puede representarse de la siguiente manera:



Investigaciones recientes han comprobado que las hormonas corticoadrenales participan en el movimiento de los aminoácidos de una zona del cuerpo a otra, ignorándose la naturaleza de esta función.

Se acepta que aumentan la permeabilidad de la membrana celular facilitando su penetración y estimulan por ello su traslado rápido entre los tejidos, cuando se lesiona una porción del cuerpo y son requeridos para la reparación celular aumenta mucho la secreción corticoadrenal y la movilidad resultante proporciona el equilibrio de las proteínas necesarias al organismo.

Cuando la concentración de proteínas sanguíneas disminuye, para poder mantener la presión oncótica normal, aumenta la elaboración de ellas por el hígado, se ignora el mecanismo de --

este efecto que tiene gran valor para mantener la dinámica circulatoria normal, pues si la presión oncótica sanguínea excede de la normal o es inferior a ella el transporte de líquidos en los espacios tisulares se torna anormal (10)

3.3. Importancia clínica de las proteínas del plasma y suero

La sangre está constituida por formas celulares de partículas en suspensión en un líquido llamado plasma, que es una mezcla de sustancias orgánicas e inorgánicas simples y complejas disueltas en agua.

Si se recoge sangre sin anticoagulante en recipientes con superficies siliconizadas o no polares, el líquido que se separa se llama plasma natural, éste guarda estrecha semejanza con el plasma que existe en la sangre circulante, sin embargo con frecuencia se usa anticoagulante como oxalato, citrato, EDTA y heparina para preparar muestras de plasma porque está modificado por la presencia de las sustancias agregadas (anticoagulantes) y por la pérdida parcial del calcio enlazada por oxalato en el caso de usar este anticoagulante.

Si se deja que la sangre coagule, el líquido que se separa se llama suero, el cual carece de la proteína fibrinógeno presente en el plasma, pues ha sido transformado a fibrina insoluble en el proceso de coagulación.

En varios estudios clínicos es mucho más cómodo usar suero en vez de plasma.

El plasma o suero está constituido en un 9.2 a 9.3% de agua; del 7 al 8% de solutos presentes, las proteínas son las que están en máxima concentración, aproximadamente de 6.5 a 8.5 gr/100 ml. de plasma o suero, sin embargo, a causa de su alto

peso molecular, se calcula que existe aproximadamente 0.8 a -- 1.10 nM/ml. En trabajo clínico, las concentraciones de proteí-- nas se dan en gramos por 100 ml. de volúmen del suero (16).

3.5. Significado clínico de las proteínas del suero.-

Los valores normales de proteínas totales son de 6 a 8% para albúmina, 3.5 a 5.6% para globulina, 1.5 a 3.1% para la rela-- ción albúmina/globulina y 0.2 a 0.4 gr. para el fibrinógeno. La albuminuria es un tipo de padecimiento que es debido a una alteración de albúmina en el plasma e indica una anormalidad -- del riñón debida a un aumento en el plasma, debida a un aumen-- to en la permeabilidad del glomérulo, la albúmina siendo una -- molécula grande es excretada en grandes cantidades, y la rela-- ción A/G disminuye marcadamente.

3.6. Relación A/G albúmina/globulina en varias enfermedades

Existen cambios en relación con albúminas y globulinas en -- ciertos padecimientos, en el edema nefrítico la albúmina del plasma se encuentra disminuída por lo tanto hay disminución -- en el cociente A/G, en el caso de edema natural y en el beribe-- ri la albúmina disminuye y la globulina permanece normal, en desnutrición la albúmina dismiuye y la globulina permanece normal, en mieloma múltiple la albúmina no se altera o dismi-- nuye y la globulina también permanece normal, en nefrosis la albúmina es baja y la globulina puede estar normal o aumenta-- da, en el caso de toxemia del embarazo la albúmina está dis-- minuída y la globulina está normal o aumentada.

La cantidad de albúmina es más importante que la de globulina en el equilibrio del volúmen sanguíneo y en el balance de los

líquidos después de una hemorragia la globulina es más rápidamente regenerada. La inmunidad depende de la fracción globulínica unida a los anticuerpos.

La desnutrición es la causa más común de hipoproteinemia aunque hay absorción normal de proteínas no pueden ser sintetizadas en padecimientos hepáticos, un metabolismo anormal es encontrado en diabetes melitus, anemia perniciosa y hiperparatiroidismo, - el control de la diabetes y el tratamiento de anemia perniciosa con extracto de hígado es seguida de un aumento en las proteínas, en hiperparatiroidismo los aumentos de proteínas vuelven al nivel normal con un tratamiento adecuado, en cáncer del estómago, del hígado y del páncreas se produce una disminución - de las proteínas plasmáticas, así mismo se observa disminución en nefrosis o en estados de nefritis debido a un aumento del - volumen sanguíneo y albuminuria.

La hipoproteinemia en el embarazo puede deberse a inadecuados hábitos alimenticios maternos con un consecuente consumo de - energía del feto e hipervolemia.

Ciertos venenos tales como benceno, tetracoloro de carbono y - fosgeno causan hipoproteinemia debida al daño hepático que -- ocasionan, el tetracloruro de carbono es muy tóxico y ocasionalmente fatal en el hombre; en animales de experimentación - esta acción es letal, debida al daño profundo que produce en el riñón (16).

Las siguientes enfermedades están asociadas con hipoproteinemia:

1.- Desnutrición

a) dietaria

- b) endémica y esporádica
- 2.- En infección crónica, pelagra, beriberi, etc.
- 3.- Dificultades en absorción
 - a) idiopáticas
 - b) diarreas
 - c) fístula intestinal
 - d) cáncer del estómago o del páncreas
- 3.- Por una utilización inadecuada
 - a) anemia perniciosa incontrolada
 - b) diabetes mellitus no regulada
- 4.- Enfermedades del riñón
 - a) nefrosis (todos los tipos)
 - b) glomerulonefritis crónica
 - c) riñón amiloide
- 5.- Trastornos del hígado
 - a) cirrosis
 - b) cáncer
- 6.- Dilución de las proteínas
 - a) exceso en la administración de fluidos
- 7.- Pérdida de proteínas por:
 - a) hemorragia aguda o crónica
 - b) lesiones cutáneas, quemaduras extensas
 - c) shock quirúrgico traumático
- 8.- Trastornos del corazón
- 9.- Hipertiroidismo
- 10.- Envenamiento crónico
 - a) benceno
 - b) tetracloruro de carbono
 - c) fosgeno (gas de guerra)
 - d) fósforo
- 11.- Toxemias del embarazo

La hiperproteinemia con disminución simultánea de albúminas y con aumento en las globulinas ocurre en enfermedades del hígado tales como cirrosis, cáncer, hemoconcentración, etc. junto

con cirrosis y glomerulonefritis aguda siendo la causa más común en tales cambios.

La hiperproteïnemia está relacionada con hiperglobulinemia ya que las estructuras reticuloendoteliales son se supone el sitio de origen de globulinas, enfermedades en donde se altera este sistema causa con frecuencia hiperproteïnemia, los altos valores son mostrados en enfermedades en donde se afectan estas estructuras como sucede en leucemia monocítica aguda, -- mieloma múltiple y Kala-azar.

Ocurre hiperproteïnemia en infecciones crónicas, especialmente aquellas de naturaleza supurativa tales como abscesos del hígado, bronquiositosis, tuberculosis, ostiomielitis crónica, endocarditis, lupus eritematoso diseminado y periartritis nudosa. En estados de deshidratación la albúmina está aumentada sólo temporalmente en estados iniciales de deshidratación después de que las globulinas han sido aumentadas temporalmente.

El edema de deshidratación se explica como sigue: la albúmina se pierde y la dilución de la fracción remanente ocurre cuando se inyecta solución salina u otros flúidos resultando insuficiente la presión osmótica que ejercen las proteínas para prevenir la formación de edema.

Los siguientes padecimientos están asociados con hiperproteïnemias

1. Deshidratación debida:

a) ingestión insuficiente de agua

b) pérdida de flúidos.

c) obstrucción intestinal y fístula

2.- Diarrea, especialmente en niños

- 3.- Cólera
- 4.- Acidosis diabética
- 5.- Vómitos
- 6.- Calenturas
- 7.- Insolación
- 8.- Infecciones fulminantes
- 9.- Enfermedad de Adisson
- 10.- Enfermedades involucradas con el sistema reticuloendotelial
- 11.- Mieloma múltiple
- 12.- Leucemia monocítica
- 3.- Infecciones crónicas
 - a).- Supurativas
 - b).- Tuberculosis ulcerativa
 - c).- Sífilis
 - d).- Linfopatía venérea
 - e).- Endocarditis bacteriana aguda
 - f).- Malaria
 - g).- Enfermedad de Hansen (lepra)
 - h).- Kala-azar
 - i).- Shistosomiasis
 - j).- Filariasis
 - k).- Tripanosomiasis
- 4.- Enfermedades crónicas inflamatorias (de etiología desconocida).
 - a).- Periartritis nudosa
 - b).- Lupus eritematoso
 - c).- Artritis reumatoide

d).- Sarcoidosis

5.- Enfermedades del hígado

a).- cirrosis del hígado temprana

b).- cáncer primario de hígado

Existen ciertas enfermedades en que se presenta hiperglobulinemias con hipoalbuminemias simultáneamente:

1.- Enfermedades del hígado

a) cirrosis

b).- cirrosis primaria

c).- cirrosis secundaria del corazón

d).- cáncer

e).- cáncer primario

f).- cáncer metastático

2.- Nefritis Glomerular Aguda

3.- Combinación de dos enfermedades, una causa aumento de globulinas y la otra disminuye la albúmina, como:

1.- Con aumento de globulina

a).- Sífilis

b).- Tuberculosis

c).- Linfopatía venérea

d).- Periarteritis nudosa

e).- Endocarditis bacteriana aguda

f).- Mieloma múltiple

2.- Disminución de albúmina

a).- Nefritis

b).- Malnutrición

c).- Diarrea (8).

3.4. Fisiología de las proteínas del plasma

Las proteínas plasmáticas desempeñan varias diferentes funciones en el organismo aparte del papel nutritivo, ya que constituyen una porción del fondo común de aminoácidos del cuerpo, - así las proteínas son una forma de almacenamiento de aminoácidos, si se necesitan éstos pueden descomponerse en el hígado y producirse nuevos aminoácidos que se usan en la construcción de otras proteínas, o también, pueden ser desaminados para formar ceotácidos, los cuales pueden mobilizarse para procurar - energía calórica o transformarse en carbohidratos y lípidos. Actúan también como proteínas de transporte, muchos metabolitos vitales como iones metálicos, hormonas y lípidos ~~son~~ son transportados por todo el cuerpo enlazados a proteínas específicas y llevados por ellas, algunas de ellas desempeñan una función específica tal como sucede con las enzimas, anticuerpos inmunes y las diversas proteínas asociadas con la coagulación de la sangre.

Otra función muy importante es de naturaleza físicoquímica ya que por ser moléculas coloidales no son difusibles, esto es, no pueden atravesar las membranas de las distintas paredes capilares como pueden hacerlo otros solutos en la sangre.

Así quedan atrapadas en el sistema vascular y ejercen una presión osmótica coloidal la cual sirve para mantener un volumen normal de sangre y un contenido normal de agua, en el líquido intertiscial y los tejidos, la fracción de albúmina es la más importante en el mantenimiento de la presión osmótica normal o presión oncótica.

Si la concentración de albúmina desciende a niveles bajos, es capará agua de los vasos capilares y entrarán en el líquido -

extracelular y los tejidos con producción de edema.

Las proteínas del plasma intervienen también en el mantenimiento del balance ácido básico de la sangre, como componentes anfóteros, funcionan como amortiguadores para reducir al mínimo cambios súbitos en el pH de la sangre (16,20).

3.7. Glicoproteínas y mucoproteínas .-

Las proteínas conjugadas que contienen una mitad de carbohidrato complejo enlazado a la cadena de proteína se denominan como glucoportcínas y mucoproteínas.

Se conoce un gran número de estas fracciones que presentan -- considerable variación individual en su composición y propiedades, la cadena de carbohidrato enlazada a la proteína está constituida por las hexosas galctosa o manosa, hexosaminas (aminozúcares), glucosamina o galactosamina, las metilpentosas fucosa y un ácido siálico, como el ácido N'acetil neuramínico, el ácido siálico está situado en un extremo de la cadena del carbohidrato, el otro extremo de la cadena está enlazada por medio del enlace peptídico a una de las cadenas de la molécula de proteína.

Para facilitar su clasificación, las proteínas enlazadas a -- carbohidratos que contienen menos del 4% de hexosaminas se denominan glucoproteínas, y las que contienen más de 4% de hexosaminas y de 10 a 75% de carbohidratos en total, se les conoce como mucoproteínas, estas proteínas conjugadas difieren de las albúminas y globulinas en que no precipitan por los ácidos sulfosalisílico y perclórico.

Se encuentran mucoproteínas de interés clínico en suero y orina. Electroforéticamente, la mayoría de las mucoproteínas emigran con la movilidad asociada a la globulina alfa uno, aunque se pueden encontrar mucoproteínas individuales entre todos los grupos electroforéticos, se identifican también por su capacidad para dar reacción positiva con el reactivo de Schiff, el color rosa característico se debe a la reacción entre la porción de carbohidrato de la mucoproteína y el reactivo, el mucoide que se encuentra en mayor cantidad en el suero es el orosomucoide, tiene un peso molecular de 40,000 aproximadamente y es bastante ácido, con punto isoeléctrico a pH 2.3, -- también hay presentes otras mucoproteínas en cantidades variables.

Entre las verdaderas glicoproteínas se encuentran proteínas del suero tan importantes como transferrina, ceruplasmina, -- haptoglobina y protrombina, aunque estas proteínas pueden identificarse mejor con el uso de técnicas inmunoeléctricas, se acostumbra analizarlas aprovechando las propiedades específicas de cada una de ellas, las mucinas se encuentran junto con mucopolisacáridos en el moco, secreción elaborada para lubricar los revestimientos y cavidades de muchos órganos.

Normalmente se encuentra una pequeña cantidad de esta sustancia en la orina, y son eliminadas cantidades mayores en estados inflamatorios del tracto genitourinario.

Las mucoproteínas constituyen alrededor del 1 al 2% del total de todas las proteínas del suero, el intervalo de concen-

concentración que se informa presente en suero normal depende del método de medición usado, el intervalo más aceptado es de 75 a 135 mgs/100 ml (valor medio de 120 mgs/100 ml), en esta cantidad están incluidos el orosomucoide y varios componentes menos definidos, más una porción de las glicoproteínas. Aumentos en los niveles del suero se asocian con la presencia de enfermedades inflamatorias agudas, artritis, tuberculosis, carcinoma, linfosarcoma, sin embargo, este aumento presupone función hepática y adrenal normales en pacientes con manifiesta enfermedad activa aguda. A causa de la gran dispersión en los valores normales, de la insuficiencia de técnicas analíticas disponibles y de la naturaleza no específica de los procesos que conducen a valores elevados, la determinación de mucoproteínas -- del suero tiene escaso valor como diagnóstico clínico, no obstante esta determinación puede ser útil al médico por proporcionarle datos de colaboración; en los casos de artritis reumatoide los valores pueden variar de 100 a 400 mgs/100ml, en infecciones agudas de 120 a 450 mgs/100 ml.

Las mucoproteínas del suero se aíslan de otras proteínas en virtud de su solubilidad en ácido perclórico, el cual precipita otras proteínas del suero.

Se precipitan entonces las mucoproteínas con ácido fosfowolfrámico, después de lo cual pueden ser determinadas por la medición de su contenido proteínico por los métodos de Folín, del biuret o de Kjeldahl o por una técnica nefelométrica si se mide la cantidad de carbohidrato se puede informar el resultado en términos de la concentración presente o convertirlo en mucoproteína total bajo el supuesto de que la mucoproteína con-

tración que se informa presente en suero normal depende del método de medición usado, el intervalo más aceptado es de 75 a 135 mgs/100 ml (valor medio de 120 mgs/100ml.) en esta cantidad están incluidos el orosomucoide y varios componentes menos definidos, más una porción de las glicoproteínas. Aumentos en los niveles del suero se asocian con la presencia de enfermedades inflamatorias agudas, artritis, tuberculosis, carcinoma, linfoma, sin embargo, este aumento presupone función hepática y adrenal normales en pacientes con manifiesta enfermedad activa aguda. A causa de la gran dispersión en los valores normales, de la insuficiencia de técnicas analíticas disponibles y de la naturaleza no específica de los procesos que conducen a valores elevados, la determinación de mucoproteínas del suero tiene escaso valor como diagnóstico clínico, no obstante esta determinación puede ser útil al médico por proporcionarle datos de colaboración; en los casos de artritis reumatóide los valores pueden variar de 100 a 400 mgs/100ml., en infecciones agudas de 120 a 450 mgs/100 ml.

Las mucoproteínas del suero se aíslan de otras proteínas en virtud de su solubilidad en ácido perclórico, el cual precipita otras proteínas del suero.

Se precipitan entonces las mucoproteínas con ácido fosfotungstácico, después de lo cual pueden ser determinadas por la medición de su contenido proteínico por los métodos de Folin, del biuret, de Kjeldahl o por una técnica nefelométrica si se mide la cantidad de carbohidrato se puede informar el resultado en términos de la concentración presente o convertirlo en mucoproteína total bajo el supuesto de que la mucopro-

tiene 12% de carbohidrato; se dispone también de métodos para determinar hexosas enlazadas a proteínas del suero, así como hexosaminas del suero, el procedimiento para determinación de mucoproteínas que aquí se presenta está basado en uno ideado por Winzler, por este método se separan y se miden por su contenido de tirosina con el reactivo de Folin-Ciocolteau (se asumen que la mucoproteína contiene en promedio 4.2% de tirosina).

3.8. Crioglobulinas del suero y su importancia clínica

Con este nombre se conocen a las proteínas anormales presentes, en el suero, y que pueden precipitar o gelificar cuando se enfría el suero a baja temperatura pero que se redisuelven al volver a calentar el suero a 37°C, estas globulinas no son de origen hepático, sino que son producidas por alguna parte del sistema reticuloendotelial, a menudo se asemejan a células del plasma o de la médula ósea.

Algunas crioglobulinas son indistinguibles de las verdaderas globulinas gamma inmunes, mientras que otras presentan características distintas, emigran electroforéticamente entre las globulinas beta y gamma, su peso molecular varía de 100,000 a 1,800,000 y su contenido de nitrógeno es del orden de 14 a 16%.

La presencia de crioglobulinas está asociada con varios estados clínicos diferentes, se hallaron primero asociados con mieloma múltiple pero también se encuentran en Kala-Azar, lupus eritematoso, linfosarcoma, artritis reumatoide y otras enfermedades autoinmunes y a menudo también con esclerosis vascular y defectos de plaquetas en la coagulación de la sangre.

En la crioglobulinemia esencial, las crioglobulinas no acom--

pañan a ningún estado de enfermedad bien definido, clínicamente las crioglobulinas presentan los rasgos del síndrome de Raynaud, intolerancia al frío, púrpura, gangrena y úlceras en la piel.

Las crioglobulinas tienden a gelificar en la sangre cuando ésta circula en los dedos de los pies y manos, menoscabando la circulación en estas regiones pudiéndose producir muerte por bloqueo de los vasos sanguíneos en órganos vitales tan importantes como los riñones, el cerebro y los pulmones; los síntomas específicos dependen de la cantidad presente y del grado de respuesta antiinflamatoria.

3.9 Macroglobulinas y macroglobulinemias

Una pequeña porción menos del 4 al 5% de las proteínas totales del suero está representada por moléculas de gran tamaño, con pesos moleculares cerca de 1,000.000, estas proteínas son llamadas macroglobulinas.

El nivel normal presente en plasma es aproximadamente de 0.2 gr/100ml, con variación de 0.07 a 0.43 g/100ml, en un número muy pequeño de individuos se pueden hallar niveles considerablemente altos, la macroglobulinemia es una enfermedad metabólica caracterizada por pérdida de peso y susceptibilidad a las infecciones y en ella está involucrado todo el sistema reticuloendotelial, la imagen electroforética del suero es similar a la correspondiente al mieloma múltiple, se hallan en ocasiones proteínas de Bence Jones y algunas de las macroglobulinas se comportan como crioglobulinas, con el menoscabo consiguiente del flujo de sangre en las extremidades. La macroglobulinemia secundaria es más frecuente y está asociada con otros pad

cimientos como leucemia, linfosarcoma y artritis reumatoide. La macroglobulinemia se diagnostica por medio de la ultracentrifugación en una muestra de suero, también se pueden aislar por filtración en geles utilizando Sephadex 200 o por cromatografía en capa fina, las imágenes electroforéticas pueden proporcionar prueba confirmatoria y el nivel aumentado de macroglobulinas se demuestra por la presencia de arcos de precipitación densos con antisueros Anti IgM.

El ensayo Sia es un simple ensayo basado en el hecho de que -- las globulinas IgM tienen menor solubilidad en agua que contiene baja concentración de sales, por este procedimiento se agrega lentamente 0,1 ml. de suero, de modo que resbale por las paredes de un tubo de ensayo a una solución conteniendo 5.0ml. - de fosfato amortiguador 0.01 M. a pH de 7.1, si hay presentes macroglobulinas a niveles de más de 0.7 gr/100ml., se forma un precipitado que se redissuelve con NaCl con una punta de una espatula.

Los sueros de pacientes normales, con mieloma y artritis no -- dan precipitados y los sueros lipémicos sólo producen opalescencia nebulosa, los sueros de pacientes con malaria y Kala-azar dan resultados positivos.

3.10 Amiloide

Como resultado de una enfermedad supurativa crónica de largo término y de otros padecimientos se deposita en los vasos sanguíneos y en la mayoría de varios órganos un tipo de sustancia proteinácea anormal llamada amiloide. Muestras histológicas de este tejido se tiñen de yodo acuoso y el color se vuelve azul a acidificar, a causa de esta reacción semejante a la

que presenta el almidón se le llamó "amiloide", la cual no es almidón sino que se cree es una glicoproteína compleja que -- contiene ácido condroitínsulfúrico, ocurriendo degeneración amiloidea como secuela de enfermedad como en el caso de artritis reumatoide, sífilis, tuberculosis y enfermedad de Hodgkin. La substancia amiloide tiene la propiedad de absorber colorantes como el rojo congo y azul de Evans, esta propiedad de absorber colorantes se usa en la detección química del amilóide para confirmar diagnósticos hechos por examen histológico de biopsias.

La más común de ellas es la amiloidosis secundaria y la primaria, que es muy rara y va acompañada de enfermedad previa.

3.8. Proteína de Bence Jones

Como proteína de Bence Jones se designan a un grupo de proteínas anormales presentes en la orina del 35 al 65% de pacientes con mieloma, que precipitan a altas temperaturas y se redisuelven al ser calentadas nuevamente y se les ha llamado también Piroglobulinas (18).

4. TECNICAS DE FRACCIONAMIENTO PROTEICO

4.1 Generalidades

Todos los líquidos biológicos contienen una mezcla heterogénea de proteínas, muchas de las cuales sólo están presentes en -- pequeñas cantidades, por lo que la separación química o física de los componentes proteínicos de las mezclas es lo que se conoce como "FRACCIONAMIENTO PROTEICO".

El primer fraccionamiento data de los últimos cien años y fue -- llevado a cabo por solubilización salina con sulfato de amonio, a la fracción que precipitó con un 50% de saturación se le llamó albúmina, encontrándose que esta es soluble en agua en ausencia de sales, sin embargo las globulinas requerían de sales neutras para lograr su completa solubilización.

Subsecuentemente se encontró que sólo una porción de las globulinas es insoluble en agua pura, a esta porción se le llamó -- euglobulina o verdadera globulina; ha sido definida como la -- fracción precipitada a partir de una solución diluida o por acidificación con CO_2 .

Varios de los métodos de fraccionamiento han sido aplicados a las proteínas en plasma y otros líquidos corporales y en materia de fraccionamiento se han empleado otras sales diferentes del sulfato de amonio, el cual ha sido usado desde 1901 y fue popularizado por Howe en 1921. Campbell y Hanna en 1937 recomendaron el uso del sulfito sódico y por último el uso de éter se introdujo posteriormente por Wolfson, Cohn y colaboradores. Entre otras sales usadas en técnicas de fraccionamiento se pueden mencionar sulfato de magnesio, hiposulfito de sodio y fosfato de sodio.

Los métodos de precipitación salina casi han desaparecido del uso del laboratorio clínico desde la década pasada.

El uso de diferentes solventes orgánicos en fraccionamiento - como estanol, propuesto por Cohn y el metanol por Pillimer y Hutchinson, éter por Keicwick y Mackey es adaptable al amplio procedimiento y se ha encontrado una aplicación comercial importante, pero el aprovechamiento general no es práctico porque hay necesidad de trabajar a temperaturas por debajo de 0°C.

Un nuevo concepto fué expresado con el advenimiento de la --- electroforesis desarrollada por Tiselius en 1937; la cual se basa en el principio de que en una mezcla de proteínas al aplicar una diferencia de potencial, cada una responderá de acuerdo con su carga eléctrica superficial en forma característica a un pH determinado.

La velocidad de migración dependerá principalmente de la densidad de carga de la molécula de la proteína, la fuerza iónica - del amortiguador, la forma y en menor grado la masa de la molécula, éstos son factores que ejercen efecto sobre la rapidez de su movimiento.

La utilidad de este método se debe a que pueden escogerse diferentes valores de pH con el consiguiente efecto sobre la carga eléctrica de la molécula proteínica, lo cual hace posible la - valoración del número de componentes de una proteína; además - de que puede medirse la movilidad electroforética de las diferentes proteínas.

A este método se le llamó electroforesis de límite móvil y fué durante muchos años un método muy valioso para el análisis --- cuantitativo de mezclas complejas de proteínas, pero presenta

algunos inconvenientes.

Con el tiempo se desarrollaron otros tipos de electroforesis, la electroforesis de zona que se efectúa sobre soportes sólidos (papel filtro, gel de almidón, gel de poliacrilamida, --- etc); con estos materiales se han ido obteniendo mayor número de bandas electroforéticas.

Se vió que el acetato de celulosa presentaba mayores ventajas que el papel en cuanto a rapidéz, simplicidad y alto poder de resolución y el gel de agar a la vez ofrecía ventajas sobre el acetato de celulosa, además del uso de soportes plásticos en lugar de vidrio.

Sin embargo el uso de gel de agar tiene el inconveniente principalmente en la preparación y almacenamiento de las tiras, -- los geles de almidón y poliacrilamida poseen gran exactitud.

Con el uso de amortiguadores como el barbital sódico, la electroforesis sobre discos de acrilamida se separan las proteínas en bandas muy delgadas o discos y permite realizar el análisis con cantidades mínimas de mezclas complejas de proteínas, ob--teniéndose de 20 a 30 bandas en contraste con los otros méto--dos donde se obtenían de 5 a 7 bandas electroforéticas.

Así fué identificado el componente de mayor movilidad electroforética como la fracción de albúmina y se identificaron otros tres componentes llamándoseles arbitrariamente globulina alfa, beta y gamma.

Se identificó un componente diferente entre la globulina alfa y la gamma; también se identificaron componentes en suero normal y anormal. La electroforesis es un simple reemplazamiento

de las técnicas de precipitación salina para determinar la relación albúmina/globulina y la cantidad de proteínas totales y ha sido establecida como un método de elección de fraccionamiento protéico en el laboratorio clínico, con sus limitaciones quizá por el costo del equipo. (1)

Otras técnicas de fraccionamiento protéico han sido limitadas y sus aplicaciones son altamente especializadas en Química Clínica.

Mediante el empleo de la ultracentrífuga inventada en 1925 por T. Svedberg; pueden obtenerse fuerzas centrífugas que superan 250,000 veces la fuerza de la gravedad y debido a esto puede usarse para separar dos o más substancias en solución, que difieran en densidad y algunas veces en configuración molecular. Las altas fuerzas gravitacionales hacen que las moléculas sedimenten de las soluciones y que se opongan a la fuerza de difusión, que mantiene uniformemente dispersas a las moléculas en la solución.

La medida de separación de las partículas es evaluada mediante sistemas ópticos de índice de refracción en diferentes posiciones a lo largo de la celda, las medidas se toman mediante fotografías a intervalos de tiempo determinados durante la centrifugación, el sistema impulsor de la ultracentrífuga produce velocidades constantes sin vibración.

Para determinar el número de componentes por ultracentrifugación se determina el número de fronteras, tomando en cuenta -- los picos de los gradientes diferentes de concentración observados: (el área bajo el pico será proporcional a la cantidad de proteína presente en ese punto).

Estas medidas de velocidad de sedimentación pueden darnos información sobre el peso molecular de la proteína, su estado de pureza y la composición de una mezcla; ya que proteínas diferentes sedimentarán a velocidades diferentes.

La ultracentrifugación no es recomendable en laboratorio clínico de rutina por ser un instrumento caro y con poco rendimiento práctico, es útil en ayuda al estudio de lipoproteínas, macroglobulinas e inmunoglobulinas que contienen cadenas pesadas de globulinas.

Otro de los métodos usados en la separación de proteínas es la cromatografía, que puede definirse como la técnica de separación de una mezcla de solutos basándose esta separación en la diferente velocidad con que se mueve cada uno de ellos, a través de un medio poroso, arrastrados por un disolvente en movimiento.

En el caso de las moléculas de proteína, la separación se basa en las diferencias en tamaño, forma y carga de la molécula en cuanto afectan a la velocidad de flujo por diversos tipos de medios cromatográficos.

Esta técnica aprovecha aquellas propiedades que permiten la resolución de mezclas por medio de la separación de alguno o todos los componentes en zonas de concentración o en diferentes fases de las que estaban inicialmente presentes, independientemente de la naturaleza de la fuerza o fuerzas causantes del movimiento de la sustancia de una fase a otra.

En 1906 el biólogo ruso Tswett utilizó una columna de vidrio rellena de sulfato cálcico finamente dividido, provista de una llave en el extremo inferior, e indicó que cuando una mezcla de pigmentos verdes de plantas colocadas en lo alto de la columna

al agregarle éter de petróleo aparecían una serie de bandas horizontales de distintos colores que correspondían a cada uno de los pigmentos de la mezcla y que indicaban la separación de cada uno de los componentes del pigmento a lo largo de ella.

Este experimento, fué sin duda la primera aplicación de una columna de adsorción cromatográfica.

A causa de diferencias en el tamaño, forma y composición química, proteínas diferentes se adsorberán a diferente velocidad - en diversos adsorbentes y ser eluidos por lo tanto a distinta velocidad.

Se podrán separar unas proteínas de otras y obtenerse así en forma muy pura por medio de regulación del pH, tipo de amortiguador empleado, concentración, con la debida elección de adsorbentes y soluciones eluyentes.

Entre los adsorbentes usados figuran resinas de intercambio iónico y materiales de filtración molecular (cribas) así como geles de sephadex y bio-rad.

En los métodos cromatográficos existen dos fases una estacionaria y otra móvil, la separación de sustancias depende del movimiento relativo de la fase móvil a la fase estacionaria y la distribución de las sustancias que son separadas entre las dos fases.

También pueden dividirse dependiendo si la fase estacionaria es sólido o líquida.

Si es un sólido el método se denomina cromatografía de adsorción y si es un líquido cromatografía de partición.

En general, son cuatro tipos principales de cromatografía que pueden dividirse en otros:

1).- Cromatografía en fase líquido-sólido

- a) Cromatografía de absorción clásica
- b) Cromatografía de intercambio iónico

2) Cromatografía gas-líquido

3) Cromatografía líquido-líquido

- a) Cromatografía de partición
- b) Cromatografía en papel
- c) Cromatografía en capa fina

4.- Cromatografía de gases

Existe también la cromatografía de filtración por geles.

El objeto de la cromatografía en todos los casos es la separación de mezclas, en sus componentes a base de las diferencias específicas en sus propiedades físicas.

En la cromatografía en papel las propiedades físicas que determinan la separación en cada caso son la velocidad de difusión, la solubilidad del soluto y la naturaleza del disolvente, en la cromatografía en sistema líquido-líquido, las separaciones se basan en las diferencias en solubilidad entre dos fases líquidas, uno de los líquidos es usualmente acuoso y el otro un disolvente orgánico.

La solubilidad puede modificarse por cambios en la fuerza iónica o el pH de cada una de las dos fases líquidas.

En el sistema de filtración en gel la separación se debe a diferencias de signo y densidad de carga iónicos.

En la capa fina, que así mismo se basa en la velocidad de difusión, y la solubilidad de las sustancias que interesan, en disolventes a medida que los componentes de la muestra emigran por medios como por ejemplo gel de sílice.

Una adecuada resolución precisa de proteínas del plasma es posible utilizando la cromatografía de intercambio iónico con el uso de columnas de DEAE celulosa y DEAE sephadex.

Los métodos cromatográficos demandan más especialización técnica y son más lentos además que requieren de un equipo caro para separar y cuantificar las diferentes fracciones por lo que su uso es limitado (16)

4.2 ULTRACENTRIFUGACION

Las centrifugas de laboratorio pueden producir fuerzas centrífugas de 500 a 4,000 tantos la fuerza de gravedad, (ésto es -- 500-4,000 xg), lo cual es suficiente para efectuar separaciones de precipitados en 10 a 15 minutos.

La fuerza obtenida está gobernada por dos factores:

- 1).- El radio de rotación que es fijo para cada centrifuga
- 2).- La velocidad de rotación o velocidad angular, que puede variarse a voluntad.

Entonces mediante el empleo de la ultracentrífuga inventada por T. Svedverg en 1925 pueden obtenerse campos centrífugos que superan 250,000 veces la fuerza de gravedad.

Se necesitan velocidades muy altas del orden de 30,000 a ---- 100,000 r.p.m. para producir fuerzas centrífugas de 50,000- - 200,000 x g pero aún con el uso de ultracentrífugas se necesitan horas o días para obtener separación o aislamiento de las soluciones en estudio.

La velocidad de sedimentación se expresa por el coeficiente de sedimentación S y es función del peso y forma de la partícula:

$$S = \frac{dx/dt}{w^2 x}$$

X= distancia desde el centro de rotación

W= velocidad angular en radianes / segundo

t_s tiempo en segundos.

Las proteínas poseen coeficientes de sedimentación en un intervalo de 1×10^{-13} segundos, y recibe el nombre de unidad -- Svedverg.

Así un coeficiente de sedimentación de 8×10^{-13} seg. se indicará como 8 S.

Una unidad Svedverg se puede definir como la velocidad de la molécula que se sedimenta por unidad de campo gravitacional o sea (1×10^{-13} seg/dina/g).

Sabiendo el coeficiente de difusión se pueden calcular los pesos moleculares por la siguiente ecuación que relaciona a S con el peso molecular:

$$PM = \frac{RTS}{D(1-V_p)}$$

V= Volúmen

D (1-Vp)

R= constante de los gases

T= temperatura absoluta

S= unidad Svedverg

D=constante de difusión

p= densidad de la solución

Para la determinación del número de componentes por ultracentrifugación se determina el número de fronteras, tomando en cuenta los picos de los gradientes de concentración.

Y así no es necesario medir los coeficientes de difusión usando la fórmula anterior.

Aunque el coeficiente de sedimentación aumenta con el peso molecular no es proporcional al mismo, ya que influye la resistencia a la fricción del disolvente y la forma de la partícula.

No obstante como indicamos se puede calcular el peso molecular a partir del coeficiente de sedimentación por medio de la ecuación de Svedverg

R. viene siendo una constante y está referida a ergios x mol x grado.

La Ultracentrífuga se usa clínicamente para demostrar la presencia de macroglobulinas en pacientes con macroglobulinemia de Waldstrom y en pacientes con mieloma, además se usa para aislar lipoproteínas del plasma y en su asociación con enfermedad arterioesclerótica.

En realidad el estudio de proteínas por ultracentrifugación viene siendo un método de investigación más que de uso clínico.

Las proteínas del suero pueden separarse en tres grupos de sedimentación:

1.- Proteínas con densidad menor de 1.063

2.- Proteínas con densidad mayor de 1.2

3.- Proteínas intermedias con densidades entre 1.063 y 1.20

Gofman describió un método de flotación que se aplica a proteínas del suero como útil herramienta en diagnóstico clínico, -- sin embargo por ser muy larga no se usa en trabajo de rutina. Este investigador demostró que las fracciones más ligeras se separan más fácilmente por adición de una sal al suero, para aumentar su densidad de 1.063 y así podrán flotar sobre el -- suero con la solución salina.

Estas fracciones se caracterizan por sus valores S de estas -- proteínas a las que se les denomina FDL (proteínas con fracción de densidad ligera) y se separan en subclases:

S \gt 0-10
f

S \gt 10-20
f

S \gt 20-400
f

S \gt 400
f

Las proteínas con densidades de 1.063 a 1.200 contienen también lípidos, emigran electroforéticamente como globulinas alfa y se designan como alfa uno, alfa dos y la fracción de densidad alta FDA.

Gofman ha insistido en que la fracción S_f 12-20 es de máximo interés pues el aumento está relacionado con enfermedad arterioesclerótica y la incidencia en infartos del miocardio.

Otro índice usado es la razón entre las fracciones de lipoproteínas beta y lipoproteínas alfa (razón b/) en suero, en -- adultos jóvenes es de 2.5 a 3.0 aproximadamente y en personas con arterioesclerosis puede ascender a 8.0 ó 9.0.

Las fracciones FDL y FDA difieren principalmente en su contenido en triglicéridos.

Los quilomicrones son glóbulos de lípidos rodeados por una -- membrana de proteína, pueden variar de 0.1 a 1.5 micras de -- diámetro, después de ser transportados por la sangre y linfa del hígado, los glóbulos de triglicéridos son destruidos y -- las moléculas de grasa son transferidas a las lipoproteínas -- alfa y beta con la depuración del plasma, las proteínas beta -- normales son las de la clase S_f 0-12. Cuando enlazan triglicéridos para transporte a los tejidos o depósitos de grasa, se convierten en fracciones FDL de las clases 12-20, 20-100 y -- 100-400, según la cantidad del triglicérido.

Una vez depositadas las grasas, las proteínas regresan a la -- clase de S_f 0-12, el colesterol y sus ésteres son transporta-- dos de modo similar, los fosfolípidos ayudan al transporte de otra clase de lípidos.

No se conoce todavía el papel de las lipoproteínas alfa, su -

concentración en el suero es constante, mientras que las lipoproteínas beta varían durante el día y también con la edad.

Otra técnica de flotación ayuda al diagnóstico de enfermedades tales como arterioesclerosis, enfermedad cardíaca, diabetes y enfermedad del transporte de lípidos, sin embargo, la técnica no se usa en trabajo de rutina por ser muy larga. (16)

4.2.1.- Descripción del Tamaño. Unidades de Svedverg.- La de terminación del peso molecular es fácil en el caso de macromoléculas y la forma tridimensional real sólo se conoce en unas cuantas.

Por ello es caso común compara moléculas grandes en términos de la velocidad con la cual se mueven por una solución en un campo centrífugo.

La medida que se usa es la constante de sedimentación dada en unidades de Svedverg (S) y describen la velocidad alcanzada -- por unidad de fuerza aplicada, por una partícula que se mueve a través del medio líquido.

La determinación del peso molecular no es fácil en el caso de macromoléculas y la forma tridimensional real, sólo se conoce en unas cuantas.

Por ello es caso común comparar moléculas grandes en términos de la velocidad con la cual se mueven en una solución en un campo centrífugo.

Los principios físicos en que está basada la sedimentación -- son:

1.- Principio de Arquímedes que dice que la fuerza neta sobre un objeto en un medio líquido depende de la diferencia entre la masa del objeto y la masa del líquido que desaloja. Algo sus--

El volumen parcial específico es el aumento de volumen cuando 1.0 g de soluto seco se añade a un volumen intésamente grande de solvente; para la mayor parte de las proteínas en agua se aproxima a 0.74.

Para obtener resultados los más exactos posibles es necesario que los valores de S y D resulten a partir de medidas realizadas a diversas concentraciones de proteína y sean extrapolados a dilución infinita.

Estas medidas de velocidad de sedimentación pueden darnos valiosa información sobre el peso molecular de la proteína, su estado de pureza y la composición de una mezcla de proteínas, ya que proteínas diferentes sedimentarán a velocidades diferentes.

La densidad está gobernada a la vez por su estructura cuaternaria y por la naturaleza de grupos postéticos enlazadas a la proteína.

En el caso de los lípidos de densidad menor a la del agua, la velocidad de sedimentación será menor, por ser proteínas con lipoproteínas de baja densidad.

Debido a ésto se clasifican:

- 1.- Las albúminas como proteínas S_{4-5} , pues sedimentan a valores Svedverg de 4.3, 4.5 aprox.
- 2.- Las globulinas gamma inmunes (PmM. 165,000) sedimentan de 6.8 a 7.5 se les llamará 7 s.
- 3.- Otras globulinas gamma (del tipo de macroglobulinas) IgM - se designan 19 S y 30 S. (hay que aclarar que no hay una correlación entre la clase electroforética y la clase en base a la velocidad de sedimentación).

pendido en el agua y que gira en el rotor de una centrífuga, se hundirá hacia la periferia, si es que es más denso que el agua y flotará si es de menor densidad.

Una macromolécula dada puede hundirse, flotar o moverse según la densidad relativa de ella y del medio.

Para evitar tener diferentes coeficientes de sedimentación para la misma molécula, es costumbre corregir los datos de modo que se puede obtener la constante que describe la velocidad de sedimentación en agua pura.

El segundo factor determinante de la fuerza es el campo centrífugo el cual depende del radio del rotor y del cuadrado de la velocidad angular.

Los aparatos comerciales de rutina pueden acelerar muestras, hasta de 250,000 tantos la aceleración de la gravedad (250,000 x g).

Aunque no se puede comparar directamente las constantes de sedimentación y peso molecular es útil tener una idea aproximada de los intervalos correspondientes.

El valor de 2 S será obtenido en el caso de proteínas casi esféricas con peso molecular de 10,000, moléculas largas y delgadas con constantes de sedimentación de 2 S pueden tener un peso molecular de más de 50,000.

La unidad 4 S corresponde de manera aproximada a un P.M. de -- 50,000 para proteínas esféricas, 8 S a 160,000 y 16 S a 400,000. Los pesos moleculares de moléculas largas y delgadas con las mismas constantes son mayores (9).

4.3 FRACCIONAMIENTO SALINO.

4.3.1 Generalidades

Las proteínas en solución, forman soluciones coloidales, las moléculas están cargadas a causa de grupos químicos ionizados en su superficie, algunas moléculas del agua que les rodea como disolvente, están más o menos enlazadas en las moléculas -- proteícas.

Estos fenómenos dan a las proteínas ciertas propiedades de solubilidad que pueden modificarse drásticamente por la presencia de otros iones cargados.

El medio más antiguo y todavía importante de diferenciar y separar proteínas se basa en estas relaciones de solubilidad (16).

4.3.2 Bases Teóricas del Fraccionamiento Salino

La solubilidad de una proteína depende la fuerza iónica, constante dieléctrica, pH, temperatura del solvente y es distinta para cada proteína en particular.

A pesar de estas grandes diferencias existe un hecho en la solubilidad de aminoácidos, péptidos y proteínas que es común -- a todos ellos, son más solubles en un medio de una elevada -- constante dieléctrica, tales como el agua y muy insolubles en medios no polares. Incluso disolventes tan relativamente polares como el alcohol metílico, el etílico, y la acetona actúan como precipitantes cuando se añaden en cantidades moderadas.

Los fraccionamientos salinos con sales neutras, se llevan a cabo siempre en medio acuoso, por lo que el factor disolvente, es siempre la misma constante dieléctrica del solvente.

Los factores de pH y temperatura se mantienen constantes dentro de ciertos límites y no son la base fundamental de separación de una u otra proteína, aunque el pH es de gran valor du-

rante todo el proceso del fraccionamiento.

Queda como factor fundamental "la naturaleza de la sal y su -- concentración", en la que se implica el concepto de Fuerza Iónica.

La acción de una sal sobre la solubilidad de una proteína es -- distinta en general, según la concentración de la sal.

A débiles concentraciones de sal se ejerce un efecto disolvente y a elevadas concentraciones se ejerce un efecto precipitante.

La interacción entre sal y proteína a débiles concentraciones de sal es mucho más específica y los factores de constitución molecular de la proteína que los determinan son cada vez mejor conocidos y presentan gran valor para el subfraccionamiento en disolventes no acuosos, con el objetivo final de obtener una - proteína en estado de pureza.

Por el ~~contrario~~ a concentraciones elevadas de la sal neutra la interacción es menos específica y relativamente insensible a - las características químicas específicas de la proteína, depende de dos factores no tan específicos como son el tamaño -- general y la forma de la molécula protéica.

La solubilidad de una proteína varía con el pH, siendo mínima en su punto isoeléctrico.

Es posible separar una proteína de otra por precipitación a pH variables, pero en las técnicas de fraccionamiento salino el - pH se mantiene constante dentro de límites más o menos estrechos, según sea la mayor o menor precisión requerida para cada método, por tanto, la influencia de este pH está en la mejor - separación de las distintas fracciones de proteínas constituyentes de la mezcla.

Si situamos una proteína en la región ácida fuera de su punto isoeléctrico, actuará como cación en caso contrario como anión.

Si se sitúa una mezcla de proteínas a un pH intermedio entre los puntos isoeléctricos de dos de ellas, cabe la posibilidad de que entre el cación de una y el anión de otra se produzcan complejos insolubles.

Debido a este hecho es muy importante en todo fraccionamiento trabajar a un pH en que se evite la formación de complejos, es decir, que todas las proteínas existentes en la mezcla posean una carga eléctrica netamente positiva o negativa.

El fraccionamiento salino en presencia de una mezcla amortiguadora de fosfatos presenta la gran ventaja de mantener el pH constante. Sin embargo trabajar a un pH de 6.5 próximo al punto isoeléctrico de las globulinas gamma, no cumple con seguridad la condición anterior. En este aspecto son preferibles los fraccionamientos con sulfito o con hiposulfito de sodio que se desarrollan a pH superiores (19)

Propiedades de solubilidad de las proteínas.

La solubilidad de las proteínas no sólo depende de la variedad de grupos residuales de los ácidos aminados y de la manera en que se pliega la cadena peptídica, sino también de las propiedades del solvente en cual se encuentra la proteína.

Los 4 factores principales que afectan la solubilidad se relacionan todos con las estructuras secundaria y terciaria de las proteínas.

Esos factores son: a) la fuerza iónica, b) el pH, c) la temperatura, y de la constante dieléctrica del solvente. Natural-

mente la hidrólisis de los enlaces peptídicos para valores extremos de pH también modifica la estructura primaria.

4.3.3 Precipitación Salina y Solubilización Salina.

4.3.4. Efectos de la fuerza iónica.

La solubilidad de los solutos ionizables tratándose de proteínas o de sales inorgánicas sencillas, se modifica por la presencia de otros iones. Cada ión en solución, se encuentra rodeado por una atmósfera iónica de carga opuesta, esta atmósfera puede -- modificar la solubilidad de una sustancia iónica dada.

Aunque el efecto de las sales neutras sobre la solubilidad de las proteínas se haya medido muchas veces en términos de saturación por ciento de una solución, de una sal como el sulfato de amonio en realidad el efecto de dichas sales sobre la solubilidad de las proteínas no tiene nada que ver con el grado de saturación de la solución respecto a la sal neutra, sino que dependen más estrechamente de la fuerza iónica de la solución, la cual se puede calcular por la siguiente ecuación:

μ = fuerza iónica

$$\mu = \frac{1}{2} (c_1 z_1^2 + c_2 z_2^2 + c_3 z_3^2 + \dots + c_j z_j^2)$$

c = concentración molar por litro del ión

z = número de cargas del ión o valencia

Σ = Suma de los productos $c_i z_i^2$ para cada ión presente en la solución

Por lo tanto la fuerza iónica toma en cuenta además de la concentración del ión, su valencia. Esto es muy importante pues los efectos de la atmósfera iónica para iones divalentes o -- trivalentes o para otros iones, guardan relación con el cuadrado de las cargas por lo tanto los efectos interiónicos ejercido por iones polivalentes, son muy superiores para la misma molaridad que los efectos ejercidos por iones monovalentes.

En general la solubilidad de la proteína aumenta con fuerza --

iónicas relativamente bajas de sales neutras en tanto que con fuerzas iónicas muy altas se disminuye su solubilidad.

El efecto facilitador de las sales neutras se conoce como Solubilización salina o "salting out", en tanto que la disminución de la solubilidad en el caso de fuerzas iónicas elevadas constituye la Precipitación salina o "salting in". La solubilización salina estabiliza los grupos cargados en las proteínas, - representando una competencia entre la proteína y la sal respecto al agua.. Al aumentar la concentración de la sal transforma al agua por desplazamiento en agua de hidratación alrededor de los iones cargados de la sal, ésto significa formación de agregados proteínicos que precipitan.

Las proteínas solubles en agua o en soluciones salinas diluídas, pueden dividirse en dos grandes grupos: las albúminas y las globulinas, según el efecto que ejercen las sales neutras sobre su solubilidad. Las albúminas son muy solubles en soluciones acuosas de fuerza iónica baja, pero presentan el fenómeno de precipitación salina o salen de la solución por efecto de fuerzas iónicas muy altas de sales neutras.

Las globulinas son insolubles en agua pura, pero pueden disolverse por solubilización salina por efecto de fuerzas iónicas bajas de sales neutras.

Es posible producir una nueva precipitación salina con una -- fuerza iónica mayor. Para distinguir las albúminas de las globulinas, antiguamente se hacía con sulfato de amonio saturado, para precipitar las albúminas en tanto que las globulinas precipitaban con una saturación al 50%. Esta clasificación de -- proteínas solubles, en albúminas y globulinas, resulta ambigua.

pues muchas proteínas presentan características de solubilidad intermedias entre ambos extremos.

4.3.5 Influencia del pH.- Se conoce como punto isoeléctrico de una proteína el pH, en el cual dicha proteína en un campo eléctrico no se desplaza ni hacia el cátodo ni hacia el ánodo.

Teóricamente es el pH para el cual la carga neta de todos sus grupos diferentes presentes como guanidina e imidazol es igual a cero. La superficie de la proteína, siempre posee una carga eléctrica que depende del pH, de los electrolitos presentes y del solvente, en particular el agua, así como de los puentes de hidrógeno que posea. Existe una serie de condiciones entre todos estos factores, en el que la suma de las cargas positivas es igual a la suma de las cargas negativas. En este momento aunque la carga total sea máxima distinta de la carga neta, el número de moléculas de proteína que tienen carga neta positiva o negativa es mínimo o nulo.

El punto isoeléctrico coincide con la solubilidad mínima de -- las proteínas, en algunos casos, pueden producirse cúmulos de carga del mismo signo, que contribuyen a cierto rechazo me--
molecular localizado, incluso para el punto isoeléctrico.

Las moléculas protéicas son muy grandes, su estructura es va--
ridada, las hay de estructura terciarias y secundarias.

El punto isoeléctrico condiciona a una configuración dada de -
las cargas sobre la superficie protéica y dependen en cierta -
medida de la naturaleza de los demás iones presentes en la solu--
ción.

Las cargas positivas y negativas de la molécula protéica -- atraen iones de carga opuesta formando una atmósfera iónica -- que ocasiona cierto enmascaramiento de las cargas sobre la -- proteína.

Esto produce rechazo de otras moléculas protéicas, para -- concentraciones salinas bajas, en cambio facilita la agrega-- ción en concentraciones altas.

Ciertos iones debido a factores electrostáticos y estéricos. En algunos lugares de la superficie protéica, extraños de car-- ga opuesta pueden ser atraídos o fijados con mucha fuerza. Esta fijación iónica por las proteínas es libremente reversi-- ble y puede modificar la distribución de las cargas y de la -- carga global. Por esta razón no se observa movimiento de la -- proteína en su punto isoeléctrico, para muchas proteínas los efectos de otros iones son despreciables, pero en algunos -- casos por ejemplo: en la albúmina del suero el pH isoeléctri-- co varía muchísimo al cambiar la composición iónica de la solu-- ción, la albúmina sérica es capaz de fijar iones como cloro, fosfato, tiocianato, produciendo desviación de su pH isoeléct-- rico. Como ejemplo de esta función, se sabe que varios fárma-- cos y antibióticos se fijan a la albúmina del suero y se cree que son transportados en la sangre bajo esta nueva forma. El punto isoeléctrico verdadero de una proteína será el pH para el cual los efectos de otros iones son mínimos o nulos, cons-- tituyendo en realidad el punto isoiónico.

4.3.4 Efectos de la temperatura sobre la Solubilidad

Algunas proteínas no presentan ningún cambio en solubilidad

por debajo de 35°C . Otras cambian su solubilidad a temperaturas inferiores de 35°C , pero todas las proteínas sufren un fenómeno de desnaturalización cuando la temperatura pasa de 35°C provocándose alteración total al llegar a los 80°C , su solubilidad disminuye hasta desaparecer, observándose coagulación posterior.

4.3.7. Efectos de la constante dieléctrica sobre la Solubilidad

Ciertas sustancias orgánicas como alcoholes, éteres y cetonas actúan sobre soluciones acuosas de proteínas, disminuyendo también su afinidad por el solvente, haciendo que se disuelvan menos, inversamente los solventes orgánicos como el dimetil sulfóxido y la formamida elevan las constantes dieléctricas de las soluciones acuosas y también aumentan la solubilidad de las proteínas.

4.3.8. Desnaturalización de las proteínas.

Si se rompen los enlaces intra e intercadena de las proteínas, éstas sufren modificaciones estructurales superficiales y profundas, lo que constituye la desnaturalización, que puede obedecer a varios fenómenos químicos y físicos diferentes: calor, valores extremos de pH, radiaciones ultravioleta, presión, detergentes u otros agentes tensoactivos (que rompen los puentes de hidrógeno), solventes orgánicos además de iones pesados.

La desnaturalización se calcula midiendo: disminución de la solubilidad, aumento de reactividad de grupos residuales de la cadena peptídica, pérdida de actividad biológica, cambios en forma y tamaño que se producen por alteraciones de viscosidad y coeficiente de sedimentación, cambios de espectros de absorción, de fluorescencia y de la dispersión rotatoria espe-

offica (14)

4.3.9. Fraccionamiento salino. Razón albúmina/globulina.-

Las albúminas son solubles en agua, mientras que las globulinas no; si se agrega una solución de electrolito de baja concentración (0.1M) a una globulina, ésta se disolverá por salinación. Los cationes y aniones del electrolito enlazan grupos reactivos de la proteína rompiendo los enlaces que mantenían unidas a las micelas de proteína, con lo cual pueden disolverse las moléculas de proteínas individualmente, la concentración de sal, en el plasma es aproximadamente de 0.15 M, -- adecuada para mantener a las globulinas en solución; cuando -- la concentración aumenta a niveles de concentración 2 M, las globulinas se vuelven insolubles precipitando por salinación, el nivel del electrolito para precipitar las globulinas, varía según la proteína y el electrolito de que se trate; también depende del pH y de la temperatura.

El sulfato de amonio fué la primera sal usada en investigaciones de proteínas y enzimas, todavía sigue en uso; a las -- proteínas que precipitan a un tercio de concentración de esta sal se les llamó euglobulinas o verdaderas globulinas, al aumentar la concentración de la sal precipitan las seudoglobulinas y a una concentración de 50% todas las globulinas se -- vuelven insolubles quedando en solución las albúminas. Esta sal, no es usada en trabajo clínico de rutina ya que interfiere en la reacción del biuret y es evidente que no puede -- usarse en la técnica de Kjeldahl para determinación de nitrógeno. Las sales más utilizadas en química clínica de rutina son: el sulfato y sulfito sódico. El primero se empleó en --

1901 más tarde Howe en 1921 recomendó el uso de esta sal al 22% por volumen para precipitar a las globulinas. En 1940 Kingsley introdujo el uso de éter para precipitar globulinas y separar las albúminas sin recurrir a la filtración. Por dispersión cuidadosa de éter dietílico en la mezcla del suero más solución de sal las micelas insolubles atrapaban éter de modo que al centrifugar flotaban sobre la solución de albúminas como una película compacta.

Posteriormente, se comparó la fracción de albúmina obtenida por electroforesis, con la separada por Howe y resultó que la técnica de Howe daba valores más altos debidos a que con las albúminas estaban incluidas las globulinas alfa 1 y alfa 2. Estos estudios efectuados por Majoor y Milne, demostraron que para liberar la fracción de la albúmina de todas las fracciones de globulinas, la concentración de sulfato sódico tenía que ser de 26 a 27% por volumen (1.9M); desgraciadamente esta concentración excede de la solubilidad de sulfato sódico a temperatura ambiente y la solución ha de mantenerse a 37°C para evitar cristalización de la sal. Con el empleo del sulfato sódico al 26% la razón A/G es del orden de 1.1 a 1.8, siendo 1.4 en promedio y éste valor concuerda en valores obtenidos por el método electroforético. Campbell y Hanna usaron sulfato sódico al 27% PV. (2.2M), esta sal es más soluble que el sulfato y actúa como amortiguador, controlaron el pH en la reacción de precipitación.

Reinhold propuso el uso de una mezcla de ambas sales, posteriormente con el uso de concentraciones distintas de ambas sales ha

sido posible separar todas las fracciones globulínicas.
La separación electroforética es la más sencilla y se conside-
ra la más exacta (16).

4.4 ULTRAFILTRACION

La filtración ordinaria se usa para separar partículas pequeñas pero visibles, suspendidas en un disolvente o en una solución, la suspensión original se vierte en un embudo que sostiene un papel filtro o una membrana cuyos poros son lo suficientemente pequeños para impedir el paso de las partículas suspendidas, pero lo bastante grandes para permitir el flujo rápido del disolvente o la solución.

Cuando más pequeñas son las partículas que van a separarse, tanto menor ha de ser el tamaño medio de los poros del papel. En la ultrafiltración el tamaño del poro es tan pequeño que -- con esta técnica pueden separarse solutos macromoleculares del disolvente, electrolitos y otros solutos. El tamaño de las macromoléculas que pueden separarse dependerá del tamaño del poro.

En la aplicación de la ultrafiltración en el laboratorio, comúnmente se desea separar una proteína de un ión que la acompaña o para concentrar una solución de proteínas.

Las membranas del ultrafiltro se preparan de ordinario de colodión o viscosa, son permeables a todos los solutos pequeños -- pero impermeables a proteínas de peso molecular de 20,000 a --- 40,000 o más. Ahora se dispone de membranas de filtración de -- microporos preparadas por varios fabricantes, se ofrecen con -- gran variedad de tamaños de poro, uno de estos materiales es --- Sephadex una forma polimerizada de dextrán, preparada como finos glóbulos que contienen poros muy pequeños.

A causa del pequeño tamaño del poro, el flujo del agua o de la -- solución por el ultrafiltro es muy lento. Para acelerar el --

proceso se suele efectuar la filtración bajo presión positiva o negativa..

Si se vierte una solución a través de una columna de este material, el disolvente y las moléculas pequeñas pueden entrar en los poros y quedan así atrapados temporalmente en las partículas de dextrán, mientras las moléculas de proteínas más grandes, fluyen por el material en la columna y pueden recogerse exentas de iones y moléculas pequeñas del interior de los poros (16).

4.5 ELECTROFORESIS

4.5.1 Concepto.

Se entiende por electroforesis un método electroanalítico basado en la migración de las partículas cargadas, bien sean iones o de naturaleza coloidal, al ser sometidas a la acción de un campo eléctrico, se extrae la información necesaria a partir de la distinta velocidad o del desplazamiento de dichas partículas.

Es un método tanto cualitativo como cuantitativo, basándose en la valoración cuantitativa de la cantidad total de la sustancia localizada en una área determinada. Lo que determina al método no es el potencial aplicado, que nunca es un dato crítico, sino el medio en el que se desarrolla y sobre todo las técnicas de caracterización y detección de la movilidad de las partículas, en el caso de determinaciones cuantitativas, las técnicas de valoración de las mismas (22).

Consideraciones Teóricas generales.

Las consideraciones generales sobre la movilidad y conductividad de los iones pueden aplicarse a las partículas cargadas en suspensión, en las que habrá que tenerse en cuenta su mayor peso y volumen y sobre todo su superficie de separación con el medio, donde se crean algunos efectos electrocinéticos de interfase que se verán más adelante. También influyen algunos fenómenos físicos, en especial cuando se trata de electroforesis de zona, como son los fenómenos capilares, evaporación del disolvente etc.

El paso de la corriente eléctrica a través de un electrolito obedece a la ley de Ohm.

$$I = \frac{E - E_0}{R}$$

Donde R es la resistencia, E el potencial aplicado y E_0 el potencial de descomposición del electrolito, esta resistencia depende de una serie de factores:

$$R = \frac{l}{\kappa \cdot S}$$

En donde l es la distancia entre los electrodos, S su superficie y κ la conductividad específica (inversa de la resistencia) que depende especialmente de la concentración.

Para proporcionar un valor comparativo de la conductividad se define la conductividad equivalente:

$$\Lambda \text{ conductividad equivalente} = \frac{1000 \kappa}{C}$$

donde C es la concentración en equivalentes por litro y mejor aún la conductividad equivalente a dilución infinita Λ_0 .

La conductividad se relaciona con la movilidad de los iones o velocidad de desplazamiento de los mismos bajo un campo eléctrico unidad (IV/cm) por:

$$\kappa = \frac{CF}{1,000} (u + v)$$

Donde F es el faraday (96,5000 coulombios) y u y v las movilidades del anión y del catión, respectivamente.

Se designa como número de transporte la fracción de corriente por cada ión:

$$t_c = \frac{t_c}{t_c + t_a} = \frac{v}{u + v}$$

cumpliendo $t_c + t_a = 1$. Los números de transporte y las movilidades iónicas cumplen $u/v = t_c/t_a$.

Las partículas en suspensión en un disolvente pueden adquirir cargas eléctricas debidas al fenómeno de adsorción sobre superficie de iones presentes en el medio. Otras macromoléculas poseen una carga debido a su ionización propia, y en algunos casos depende del pH el que posean una carga positiva o una carga negativa; indudablemente existe un valor del pH para el que se comportan como partículas neutras y a éste se le llama el pH isoelectrico.

El tamaño de las partículas puede alcanzar desde el dominio de los precipitados macroscópicos en suspensión hasta las disoluciones coloidales y puede ser tanto de origen mineral como de origen orgánico.

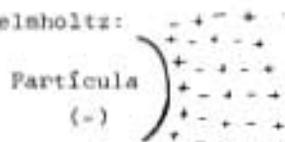
En la medida de la conductividad de un medio donde existen -- partículas dispersas cargadas, el valor obtenido será la suma de la conductividad del electrolito intergranular y la de dichas partículas.

Si se conoce la conductividad específica del electrolito intergranular se conocerá la verdadera aportación de la conductividad de la partícula dispersa. Esta conductividad específica se expresa como:

$$K_p = \frac{FC^p}{1000} = (u_p + v)$$

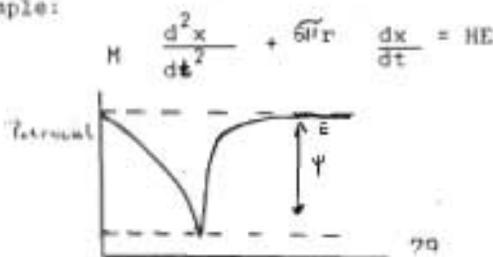
donde C^p es la concentración por litro de la masa transportadora por 1 faraday y u_p la movilidad de la partícula por extrapolación se puede conocer la conductividad límite y se puede conocer también el coeficiente de ionización por la relación: Por otra parte, la pared de la partícula cargada en contacto con los iones del medio da lugar a la atracción sobre ella de

los que tienen carga opuesta y a la vez éstos atraen otros de signo opuesto y así sucesivamente, determinando una disposición estratificada cada vez más difusa conforme se avanza hacia el seno de la disolución. A esta primera capa se le ha llamado la doble capa de Helmholtz:



Aunque hoy se habla más bien de doble capa difusa. El hecho primordial a que da lugar este fenómeno es el establecimiento de una diferencia de potencial entre la pared de la partícula y el seno de la disolución, que se puede considerar como un potencial E , entre la pared de la partícula y el seno de la disolución (potencial termodinámico); un potencial entre la primera capa de iones fijados a la pared y el seno de la disolución (potencial electrocinético). Como vamos a ver, es este potencial el responsable del comportamiento eléctrico de las partículas.

Si se considera una partícula cargada sometida a un campo eléctrico H , se puede establecer el valor de la resistencia a desplazarse en un medio dado siguiendo la ley de Stokes $R = 6\eta r v n$ en donde r es el radio de la partícula, v la velocidad de la misma y n la viscosidad del medio. La fuerza con que es atraída la partícula viene dada por EH , siendo E la carga de la partícula. Si se desprecian las interacciones electrostáticas se cumple:



Donde m es la masa de la partícula, Δr su desplazamiento y t el tiempo invertido en el mismo. La integral de esta ecuación es:

$$v = \frac{HE}{6\pi\eta r} \left[1 - \exp\left(-\frac{6\pi\eta v}{m} \cdot t\right) \right]$$

Y como el valor de $\frac{6\pi\eta v}{m}$ es muy pequeño:

$$v = \frac{HE}{6\pi\eta r}$$

Por otra parte, el potencial electrocinético es un medio en -- que la fuerza iónica es prácticamente cero viene dado por:

$$\Psi = \frac{E}{D}$$

Donde D es la constante dieléctrica de dicho medio.

Así pues, para un campo eléctrico unidad:

$$V_0 = \mu = \frac{E}{6\pi\eta r} = \frac{\Psi D}{6\pi\eta r}$$

A este valor V_0 se le denomina movilidad electroforética y como puede observarse no depende del campo aplicado, es decir, - todas las partículas que tengan el mismo potencial electrocinético deben tener la misma movilidad en ese medio cualquiera que sea su tamaño.

Si tenemos en cuenta la influencia de la doble capa; siguiendo las teorías de Debye y Huckel el valor anterior de la movilidad electroforética se puede corregir para dar:

$$V_0 = \left[\frac{E}{6\pi\eta r} \right] \left[\frac{1}{1 + \kappa r} \right]$$

donde:

$$\kappa = \frac{1}{d} = \sqrt{\frac{2N e^2 \eta^2 M}{1000 D R T}}$$

En las que d es el espesor de la doble capa de Helmholtz, M la fuerza iónica, e la carga del electrón, D la constante dieléctrica, N el número de Avogadro y T la temperatura absoluta, R la constante de los gases. Para el caso de la electroforesis de zona se cumple:

$$V_o = \frac{Ed}{6\pi r^2 n}$$

En donde se vé que al disminuir la fuerza iónica, por aumentar el espesor de la doble capa, aumente la movilidad.

En general, podemos decir que la migración electroforética está afectada por una serie de factores agrupados del siguiente modo:

- 1).- factores propios de la naturaleza de la partícula electroforética, como su carga, forma tendencia a la asociación etc.
- 2).- factores que dependen del medio en que tienen lugar la migración tales como concentración electrolítica, temperatura, -- constante dieléctrica, pH, posibilidad de formar complejos, -- etc.
- 3).- Las características del campo eléctrico aplicado como: -- intensidad, distribución del campo, etc. en especial el pH tiene una importancia capital ya que las partículas electroforéticas suelen presentar una carga positiva o negativa según sea -- el valor del mismo (22,4).

En la mayoría de las proteínas el punto isoeléctrico está del lado ácido y varía desde 4.6 para las albúminas, hasta 5.1 a -- 6.2 para las globulinas. A pH por debajo del pI, las cargas -- positivas exceden en número a las cargas negativas, la proteína se comporta como un ión positivo (catión), las soluciones -- contendrán entonces iones positivos (protones), sin embargo a valores del pH fisiológicos las cargas negativas estarán en ma -- yoría y la proteína se comportará como un anión, análogo al Cl y HCO₃. Diferentes proteínas variarán en su carga positiva o negativa neta por unidad de superficie si se coloca una solu -- ción de proteínas entre un par de electrodos conectados a una

fuerza de poder, las proteínas emigrarán al cátodo o ánodo según su carga neta, a velocidades que dependerán de la cantidad de carga, del tamaño y forma de las moléculas individuales.

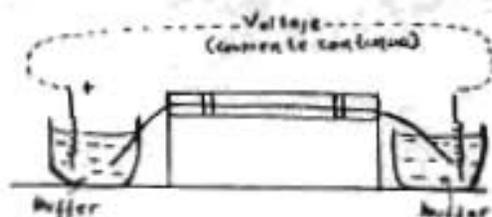
A pH de 8.6 todas las proteínas del suero tienen carga negativa, pero las albúminas emigran con más rapidez y así se separan de las globulinas, estas globulinas pueden separarse aún en tres o más fracciones llamadas alfa, beta y gamma, de las cuales las gamma son las que se mueven con más lentitud y en condiciones apropiadas pueden ser separadas en subfracciones.

Existen diferentes tipos de electroforesis los cuales se han dividido en forma general en dos: Electroforesis de límite móvil y Electroforesis de zona; ésta última se divide en varias de acuerdo al soporte en donde se verifica en: Electroforesis sobre papel, sobre geles de acrilamida, almidón, gel de agar, acetato de celulosa, poliacrilamida y gel de cianogoma; electroforesis en capa fina, electroforesis de disco en gel de poliacrilamida.

Veremos brevemente el fundamento de los diferentes tipos de electroforesis y como se llevan a cabo (16).

En la electroforesis libre, las sustancias que están por separarse se hallan en solución y son capaces de difundirse en el momento en que la corriente se desvía o cesa; en la electroforesis de zona, la separación se realiza sobre un soporte, tal como el gel de almidón o una tira de papel de filtro.

En la electroforesis sobre papel se empapa éste cuidadosamente con una solución amortiguadora apropiada para efectuar la separación y se sumergen sus extremos en dos cubetas que contienen la misma solución buffer y un dispositivo tal como indica la siguiente figura:



Aparato para electroformación de alto voltaje.

Cuando pasa la corriente, el soporte actúa como puente entre las dos cubetas que contienen la solución amortiguadora y cualquier substancia de la mezcla, cargada eléctricamente, emigrará en la dirección que corresponda al dipolo de carga opuesta. En muchos casos las moléculas sin carga pueden poseer movilidad electroforética por formar iones complejos con los iones de la solución amortiguadora. Muchas moléculas de azúcares pueden separarse gracias a esta propiedad.

Después de un tiempo apropiado se suspende la corriente y se saca el papel del aparato. Una vez seco el papel, los compuestos incoloros ya separados puede revelarse de la misma manera que la cromatografía sobre papel.

La velocidad de migración de una substancia durante la electroforesis es función de varios factores: voltaje, estructura del ión y sus características particulares.

Es necesario poner sobre el papel un agente "inmóvil" es decir, un compuesto que no tenga movilidad electroforética, puesto que hay tendencia de las substancias a moverse en dirección opuesta a las del movimiento electroforético debido al fenómeno de electroosmosis, la distancia recorrida por una substancia durante la electroforesis se representa por su mayor M , que es la distancia recorrida por el compuesto en cuestión respecto al agente inmóvil.

[La técnica de electroforesis en papel puede aplicarse sobre ti-

ras de acetato de celulosa, éstas son más transparentes su estructura es mucho más uniforme y el tamaño del poro menor que el papel filtro ordinario, lo que permite una resolución mejor.]

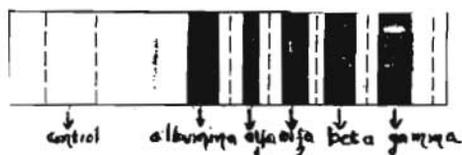
Este carácter junto a la posibilidad de fraccionar muestras - muy pequeñas, confiere a esta técnica un gran valor en el diagnóstico clínico, para analizar proteínas séricas, líquido cefalorraquídeo, orina etc.(24).

Las muestra problema se aplica sobre el soporte, en forma de línea delgada por medio de un aplicador designado para cada sistema particular usado.

Una vez preparado el sistema, se conecta la cámara a una fuente de poder, con el punto de aplicación del suero cercano al electrodo negativo.

Entonces se hace pasar una corriente eléctrica de 10 a 30 miliamperios y un potencial de 200 a 300 voltios, (la corriente y voltaje varían de acuerdo al aparato usado), durante 30 a 45 minutos hasta que la migración deseada haya sido alcanzada. La solución amortiguadora más común es la barbital a un pH 8.6 -- con fuerza iónica de 0.05. Se prepara disolviendo 1.84 grs. de ácido dietilbarbitúrico y 10.26 g. de solución de barbital sódico en agua y aforando a un litro. Se agrega timol como -- conservador.

Patrón electroforético normal de suero humano:



Después de realizada la separación electroforética, se pone la tira en una solución colorante, durante varios minutos, después

se lava varias veces con ácido acético al 5% o en un solvente similar, la intensidad de color de cada banda es proporcional a la cantidad de proteína presente. El teñido de las tiras de acetato de celulosa se hace generalmente usando colorante Ponceau S, la solución de teñido usualmente contiene un fijador - para prevenir un deslave de la proteína. La solución se prepara disolviendo un gramo de Ponceau S, 37.5 g de ácido tricloroacético, y 37.5 g de ácido sulfosalicílico en agua hasta hacer un volúmen de 500ml.]

4.5.2. Estimación de las fracciones proteínicas.-

Se lava la tira con objeto de quitar el exceso de colorante y seca, se cortan en las secciones correspondientes a cada fracción y se transfieren por separado a un tubo se disuelven en etanol-cloroformo 1:9 más una parte de ácido fórmico y 9 partes de dimetilsulfóxido, se mide la absorbancia de las fracciones separadas en un fotómetro a 520nm, leyendo contra un blanco o control.

El contenido total de proteína se determina por un refractómetro o por la reacción del biuret y por medio de sencillos cálculos de regla de tres se puede obtener la cantidad correspondiente a cada fracción e informarse los datos ya sea en porcentaje o en gramos.

Diferentes tiras de acetato de celulosa pueden requerir pequeños cambios en cuanto a las soluciones aclarantes para obtener resultados óptimos.

Fig. Electroforesis de acetato de celulosa de suero humano normal.

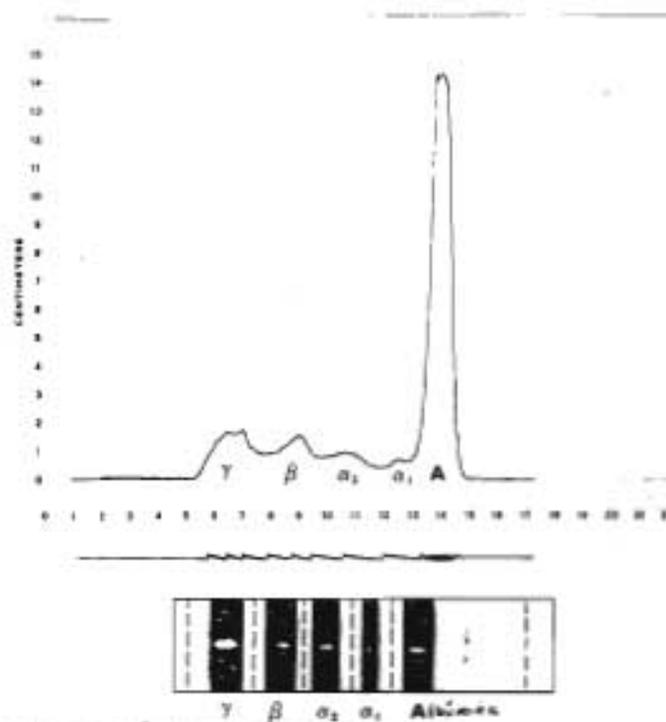


Fig. Electroforesis en acetato de celulosa
de suero normal humano.

Las lecturas también se pueden hacer directamente con el uso de un densitómetro lo que evita tener que solubilizar cada fracción. (1)

4.5.3.- Electroforesis en capa fina.-

Este tipo de electroforesis en capa fina tiene varias ventajas sobre la de papel, es un método más simple y rápido.

Generalmente se usan como soportes Kieselguhr, sílica gel, celulosa y aluminio. Si la superficie es celulosa, las placas no pueden ser tratadas con reactivos fuertes, si se emplea el aluminio, se puede esperar barrido de los colorantes. En general se obtienen los mejores resultados con Kieselguhr y sílica gel. Solventes.- Se usan butanol, acetona y piridina que no interfieren con el reactivo revelador, pues se pueden eliminar durante el secado.

4.5.4.- Aplicación de la Muestra y de la Electroforesis.-

La placa debe secarse antes de aplicar la muestra, con una micropipeta en la forma de una pequeña línea, cuando la placa se moja con la solución amortiguadora debe tenerse cuidado de

no prolongar demasiado este proceso en las placas sujetas a -
electroforesis, generalmente se emplea un período no mayor de
una hora, después del corrimiento se secan a 110°C aproximada-
mente y los colores de los compuestos separados se revelan con
un reactivo adecuado.

4.5.5 ELECTROFORESIS EN GEL DE ALMIDON

En la electroforesis de acetato de celulosa y de papel, el medio es inerte en esta electroforesis no lo es. La estructura del poro del gel sirve como un tamizador molecular para separar componentes de una solución en base al tamaño molecular. La diferencia entre el papel y el almidón es apreciable cuando se separan globulinas puesto que una banda en papel se resuelve en varias sobre gel. El almidón que es comunmente adquirible está altamente polimerizado para formar geles y de ahí que debe ser primero hidrolizado.

Amortiguadores.- La mayoría de los investigadores usan un pH de 8 al 10 para amortiguador.

Poulick describió un sistema discontinuo en el que empleó como amortiguador tris-citrato a pH de 8.7 y borato sódico a pH 8.5, en este sistema las proteínas empiezan a emigrar en el gel -- tris-citrato y completaron su migración en el borato del recipiente. Los iones borato del recipiente tienen una migración más rápida que los de la proteína en el gel; de ahí que los -- invaden y los pasan. La interfase de boratos-tris aparece como una línea amarilla, se requiere afinar el margen de cada banda al usar hidróxido de litio se obtienen bandas afinadas que al usar hidróxido de sodio en el amortiguador.

Electroforesis.- El gel se prepara y se vierte en el soporte que contiene la placa de gel en el fondo. El exceso de gel se oprime hacia afuera del soporte con una hoja de silicón -- plástico que se va lentamente presionando empezando desde un lado, de tal manera que no haya atrapamiento de burbujas, el

gel se enfría a la misma temperatura, conforme se va usando la capa deberá ser cubierto para prevenir evaporación. Cuando ya está lista la placa, se remueve cuidadosamente sin romper el gel, las placas del gel pueden ser usadas en posición horizontal o vertical, cuando se usa horizontalmente, la muestra se aplica en una banda delgada de papel filtro grueso o como una suspensión manchada en gramos de almidón. Con el método vertical la mezcla se aplica dentro de una huella marcada en el gel, la ventaja de esta aplicación es que la muestra problema no puede absorber en el papel los granos de almidón. Si la muestra se aplica primero en el papel, la tira se inserta en el gel y se deja descansar sobre él insertándose dentro del gel por presión; mientras que es retirada la navaja lentamente. Después de que el papel está en su lugar, la superficie del gel es presionada evitando el atrapamiento de aire, cuando se usa almidón la mezcla del suero-almidón se deposita en la huella del gel.

La corriente usada es generalmente de 2 miliamperios por centímetro de ancho de gel, durante 5 a 6 horas o de 0.7 miliamperios por centímetro. Cuando se deja correr durante toda la noche. El gel no deberá calentarse a más de 37°C. Después de la electroforesis el gel se tiñe sosteniendo el gel en una placa de plástico ya que es muy frágil.

Cuantificación.- Antes de proceder a la cuantificación el gel debe quedar libre del teñido de fondo y hacerse transparente, para ello se sumerje durante una hora una solución que contenga 15% de glicerol, y 3% de ácido acético en agua. Puede emplearse un densitómetro provisto de planillas integradas. Un gel delgado puede guardarse indefinidamente.

4.5.6 ELECTROFORESIS EN DISCO USANDO GELES DE ACRILAMIDA

La electroforesis de disco es un perfeccionamiento de aquella sobre gel, en la cual la mezcla de las proteínas se halla en un campo eléctrico a un gradiente de pH sobre un gel de poliacrilamida; las proteínas se separan en bandas muy delgadas o discos, esto permite realizar análisis de gran resolución, empleando cantidades mínimas de mezclas complejas de proteínas (13). La electroforesis de disco fué introducida por Ornstein y Davis, esta técnica es muy conocida debido a que las bandas se apilan como discos concentrados. El aumento en la resolución de discos de gel sobre la electroforesis en papel es evidente del hecho de que la electroforesis de suero humano comunmente separa cinco bandas de proteína, mientras que la electroforesis de disco resuelve más de 20 bandas diferentes, es más simple y rápida.

La mayoría de las ventajas de la electroforesis en disco provienen de la habilidad de hacer un gel a una concentración exacta, un aumento en la concentración de gel produce un decremento en el tamaño del poro, por esto las separaciones se llevan a cabo en virtud de su propiedad como un tamizador molecular. Un pequeño poro de gel se prepara con una mezcla de 20 a 40% de acrilamida en agua, metil n-bisenilamida, tetrametiletileno de diamina, persulfato de amonio y tris-HCL, se coloca en un tubo vertical (aproximadamente de 70 x 5 mm) que está cerrado en la parte inferior con una recubierta de plástico removible.

El uso del separador de un poro de gel mayor, que contiene ---

aproximadamente 3% de acrilamida en agua, se coloca en la parte superior del poro de gel pequeño. La mezcla de gel de poro -- grande y unos pocos de microlitros de suero se vierte en la -- parte superior del gel separador junto con amortiguador de tris glicina de pH 8.3, después de remover la cubierta de plástico del fondo, el tubo del gel se coloca verticalmente.

Se hace pasar una corriente de 5 miliamperes a través del tubo durante 30 minutos, después se saca del tubo y se tiñe.

Los iones glicinato en el amortiguador, se agrupan en la parte superior de los iones cloruro en el gel amortiguador cuando una corriente pasa a través del tubo de gel, los iones de la proteína migrarán hacia el gel de poro grande, con una movilidad intermedia entre el glicinato y los iones cloruro. Los iones -- glicinato tienen una movilidad menor que los de la proteína en el gel de poro amplio, al pasar la corriente se mantiene un límite afectado y fijo en la interfase de estos iones.

Los iones de la proteína que emigran a través del gel separador formarán discos discretos, los cuales se observarán como un -- amontonamiento en la interfase de gel de poro pequeño. Cuando los iones de la proteína emigran hacia el gel de poro pequeño, su movilidad disminuye, porque debido a su tamaño tiene una acción tamizante.

Los iones glicinato empiezan a alcanzar a los iones de la proteína y formarán un límite en la interfase de los iones cloruro. El gel de amortiguador tris-HCl se transforma en un gel - amortiguador de trisglicina, de pH 9.5 y es a este pH que las proteínas continúan emigrando como una serie de discos; en conclusión las condiciones siguientes deben de cumplirse para ob-

tener una técnica exitosa:

- a).- El ión en el gel amortiguador que corre debe tener la movilidad más alta que todos los iones en la dirección de la migración y debe ser la de un ácido fuerte, de tal manera que no sea afectada por el pH.
- b).- El ión que invade las proteínas debe ser un ácido débil de tal manera que su movilidad aumentará cuando cambia el pH del gel amortiguador que corre.
- c).- La presencia de un gel separador para permitir el amontonamiento de discos de proteína (*).

4.6 CROMATOGRÁFIA

4.6.1. Introducción.

Desde el principio de la ciencia química, se presentó el problema en cuanto a la determinación de la pureza en una sustancia dada y el de la identificación del número de componentes de un sistema, así como la resolución del mismo en sus partes para que de ese modo pudieran ser caracterizados y cuantificados. Los químicos antiguos usualmente resolvían estos problemas por cristalización fraccionada o por destilación.

Debido a que en algunos casos los componentes son muy parecidos entre sí, en cuanto a sus propiedades físicas y químicas, durante los años de 1940 el uso instrumental de la cromatografía se hizo extensivo, siendo uno de los avances principales -- en todos los campos de la química (4).

4.6.2 Historia

La cromatografía de proteínas presentaba algunas dificultades, fué hasta 1950 que empezaron a publicarse trabajos con resultados satisfactorios.

La aplicación de la cromatografía al estudio de las proteínas plasmáticas, se incrementó después de los trabajos hechos por Haber y Peterson, quienes desarrollaron la cromatografía en derivados de la celulosa, de los cuales han resultado particularmente interesantes la dietilaminoetil celulosa (DEAE-celulosa) y la carboximetilcelulosa (CM-celulosa).

Gracias a ésto se pudo estudiar el cromatograma normal del suero total observándose el subfraccionamiento de las diversas -

fracciones electroforéticas y siendo difícil la caracterización de un cromatograma típico debido a la variación en cuanto al tipo de eluyente utilizado, gradiente de pH y fuerza iónica con que se desarrollaba.

Adquirió particular interés en el aislamiento y purificación de una determinada proteína con individualización biológica y fisicoquímica y también para el subfraccionamiento de las diversas fracciones, motivo por el cual poseen gran importancia (19). Faltey, Mac. Coy y Goulian simplificaron la técnica de Sabers y Peterson estudiando cromatogramas normales y patológicos utilizando una solución amortiguadora de fosfato a pH 8.0, 0.01 M, con solución de fosfato monosódico 0.3 M.

Estudiaron varios sueros de pacientes con plasmocitoma señalando la posibilidad de subdividir las diversas fracciones globulínicas, siendo esta técnica cromatográfica particularmente indicada para el estudio de la distribución de las glicoproteínas, lipoproteínas, estudio de enzimas como fosfatasas ácida y alcalina, proteína fijadora de la tiroxina y en la diferenciación entre la albúmina yodada con I¹³¹ y la albúmina nativa.

Speer, Prager y colaboradores estudiaron el cromatograma de sueros humanos en columnas de DEAE celulosa agregando glicocola al amortiguador de fosfatos, obteniendo el subfraccionamiento de todos los componentes electroforéticos, habiendo conseguido el fraccionamiento de isoanticuerpos principalmente del sistema ABO y Rh así como de diversos componentes del complemento.

Tiselius y colab. consiguieron el subfraccionamiento de la albúmina bovina en columnas de fosfato cálcico en tres sub---

fracciones e igualmente para la globulina gamma humana, pudiéndose diferenciar globulinas normales y patológicas de algunas macroglobulinas (19).

4.2) Definición

La cromatografía puede definirse como la técnica de separación de una mezcla de solutos, se basa en la diferencia de velocidad con que se mueve cada uno de los solutos a través de un medio poroso por medio de un disolvente en movimiento.

El biólogo ruso Twsett fué probablemente la primera persona que advirtió las posibilidades de este método utilizó una columna larga de vidrio llena de sulfato cálcico finamente dividido, provista de una llave en el extremo inferior. Este investigador indicó que cuando una mezcla de pigmentos verdes de plantas se pone en una columna y a continuación se agrega éter de petróleo, aparece una serie de bandas horizontales de diferentes colores, que corresponden a cada uno de los pigmentos de la mezcla lo que indica que ha habido una separación a lo largo de la columna.

Para describir este fenómeno se introdujo el término de cromatografía que literalmente significa "escribir en color", esta separación no tiene que ver con el color de los compuestos, sino con la diferente afinidad de adsorción de los pigmentos en relación al medio de la columna, así los que adsorben más débilmente avanzan con mayor rapidéz.

Este experimento fué sin duda la primera aplicación de una columna de adsorción cromatográfica.

Aunque Twsett investigó este fenómeno, posteriormente quedó relegado a una mera curiosidad de laboratorio, hasta que Mar-

tin y Synge introdujeron la cromatografía de reparto. Los medios usados en esta modificación contienen una cierta cantidad de agua y las separaciones que en ellas se llevan a cabo dependen de la distribución continua o coeficiente de reparto de -- los componentes de la mezcla a separar entre el agua de la columna y el disolvente que fluye continuamente hacia la parte inferior. Las separaciones por cromatografía de reparto son particularmente interesantes para los compuestos solubles en agua, debido a ésto es por lo que el método ha alcanzado importancia en la separación de sustancias de origen biológico, -- sin embargo es muy difícil obtener una identificación formal -- con cantidades muy pequeñas de muestra.

En 1944 Consden, Gordon y Martín describieron la cromatografía de papel, en las que las separaciones se llevaban a cabo (principalmente por el coeficiente de reparto) sobre tiras en un sistema de columna abierta, con la cromatografía en papel pueden identificarse de manera segura cantidades del orden de microgramos.

El concepto de columna abierta se ha extendido por la introducción de la cromatografía en capa fina en la que las separaciones se realizan en un material soportado sobre placas de vidrio. Los principios de este método se describieron hace 25 años, pero no tuvo aplicación universal hasta que Stahl en el año de 1958 generalizó el procedimiento e indicó sus aplicaciones.

La última de las técnicas cromatográficas es la cromatografía de gases, su desarrollo es similar al de la cromatografía en

columna, en la que un gas reemplaza al disolvente líquido. Debido a ésto las separaciones han de realizarse dentro de una columna cerrada. Es particularmente interesante para la separación de mezclas de gases, líquidos o sólidos volátiles sus aplicaciones se han desarrollado rápidamente desde que Martin y James describieron sus primeros experimentos en 1952 (24).

4.4.4 Generalidades.

Cuando se distribuye un soluto entre volúmenes iguales de dos líquidos inmiscibles, la relación de concentraciones del soluto entre las dos fases en equilibrio a una temperatura determinada recibe el nombre de coeficiente de reparto.

Una mezcla de substancias que posean diferentes coeficientes de reparto pueden separarse cuantitativamente por un proceso conocido como de distribución en contracorriente, en el que se producen muchas etapas de reparto sucesivas.

En todos los casos de cromatografía la separación está basada en un proceso de reparto múltiple o uno continuo de adsorción-desorción. (13)

El que haya cromatografía depende del hecho de que durante el paso por un sistema cromatográfico, se multipliquen muchas veces las pequeñas diferencias del coeficiente de reparto, o en la adsorción-desorción de cada uno de los componentes de la mezcla. Cuanto mayor sea este factor de multiplicación mayor es la facilidad con que se separan los componentes y mejor el poder de resolución.

Siguiendo este criterio, se compara muy a menudo la cromatografía con la destilación fraccionada y se aplica el concepto de plato teórico. Un plato teórico es una unidad de la columna de destilación en la que hay un equilibrio entre el vapor as

cedente y el líquido que cae. Naturalmente, a mayor número de platos mayor es la eficacia de la columna.

Análogamente, podemos considerar que un sistema cromatográfico está formado por una serie de dichos platos hipotéticos, siendo cada uno de ellos una unidad dentro del sistema empleado.

La ventaja principal de la cromatografía es que se puede conseguir una alta eficacia debido al gran número de platos teóricos.

Como en ese sistema cromatográfico se establece el equilibrio muy rápidamente se pueden llevar a cabo separaciones en un tiempo muy corto (24).

El principio de reparto ha sido perfeccionado aún más en la cromatografía de intercambio iónico en la que los diferentes aminoácidos de una proteína por ej. se separan de acuerdo a su comportamiento ácido-básico.

Los materiales de uso más común en la cromatografía de proteínas son derivados de celulosa preparados sintéticamente. La dietil amino etilcelulosa (DEAE celulosa) contiene el grupo $\text{Et}-2\text{-NH}-\text{C}_2\text{H}_5\text{-R}$ cargado positivamente a pH de 7,0 y contiene así un intercambiador aniónico.

La carboximetilcelulosa (CM- celulosa) contiene grupos cargados negativamente ($\text{R}-\text{CH}_2\text{-COO}$) y es un intercambiador catiónico. La mezcla de proteínas se eluye con amortiguadores a pH creciente o decreciente o bien manteniendo constante el pH y variando la fuerza iónica.

La proteína que aparece en el eluido, que se recoge en fracciones pequeñas se valora ópticamente por su capacidad de absorción de la luz en la región del ultravioleta.

En la cromatografía gas-líquido se emplea un "transportador - gaseoso" inerte por ejemplo el nitrógeno con objeto de barrer los vapores de la mezcla problema a temperatura elevada, a través de un largo tubo capilar calentado y cuya superficie interna se halla recubierta de una fase líquida estacionaria, constituida por una parafina de punto de fusión elevado o por una grasa de silicona, los vapores se distribuyen entre la fase líquida y la fase gaseosa, según sus coeficientes individuales de reparto gas-líquido; ya que han sido separados de la fase gaseosa que abandona la columna pueden ponerse de manifiesto por métodos físicos extremadamente sensibles.

Mediante el uso de ellos se registran en una gráfica los cambios en las propiedades de ionización de la fase gaseosa cuando se expone una fuente productora de radiación, la gráfica muestra una serie de picos separados, cada uno de los cuales corresponde a cada sustancia separada.

Este tipo de cromatografía puede utilizarse en la separación de compuestos volátiles a temperaturas hasta 300°C . (13)

4.6.5.-Clasificación de los Métodos Cromatográficos.

El hecho común de todos los métodos de cromatografía, es que existen dos fases una estacionaria y otra móvil. La separación de las sustancias depende del movimiento de la fase móvil en relación a la fase estacionaria y a la distribución de las sustancias a separar por medio de las dos fases. Si la estacionaria es sólida se denomina cromatografía de adsorción y si es líquida cromatografía de partición.

En general existen cuatro tipos diferentes, se clasifican a su vez en:

- 1.- Cromatografía de líquido- sólido
 - a) de: adsorción clásica (columna de Tswett)
 - b) de: intercambio iónico
- 2.- de: gas-sólido
- 3.- de: líquido-líquido
 - a) de: partición clásica
 - b) en papel
- 4.- gas-líquida (GLC)

El material sólido que sirve como fase estacionaria en la cromatografía de adsorción se llama adsorbente. La fase sólida es la que soporta al líquido en la cromatografía de partición.

Después de que las sustancias del cromatograma han sido separadas por desarrollo se identifican o visualizan. Si las sustancias en el cromatograma son lavadas, se denomina separación por elusión y a las sustancias que se separan al principio se les denomina muestra. (4).

4.6.6. Cromatografía de Adsorción

La cromatografía de adsorción es la forma más antigua de cromatografía en donde dos o más sustancias pueden separarse dependiendo de factores tales como 1) la fuerza con la cual cada componente de la mezcla es adsorbido y 2) la solubilidad del componente en el adsorbente usado (4).

No se debe confundir la adsorción con la absorción, que consiste en la penetración de una sustancia en el seno de otra.

Al escribir, el papel adsorbe tinta, mientras que una esponja absorbe agua.

Las separaciones llevadas a cabo en un disolvente líquido se -

denominan cromatografía líquido-sólido y si el disolvente es un gas se llaman cromatografía gas-sólido.

En el sentido cromatográfico el término adsorción se limita a las interacciones que implican enlaces de hidrógeno o fuerzas electrostáticas cuando las interacciones son iónicas el proceso se denomina intercambio iónico.

Los centros adsorbentes o activos provienen principalmente de los defectos (grietas, filos, etc.) de la red cristalina, donde las fuerzas electrostáticas están proyectadas parcialmente hacia el exterior. La adsorción es debida justamente a la interacción de estas fuerzas con las interiores del soluto. Cuanto mayor sea la separación de cargas del soluto (mayor momento dipolar), mayor será la adsorción. Desde el punto de vista práctico la cromatografía líquido-sólido se aplica en la separación de sustancias de media o baja polaridad.

La regla general es elegir la polaridad del disolvente análoga a la de la muestra a emplear y en la mayoría de los casos adsorbentes poderosos (activos) para sustancias no polares y adsorbentes con menos actividad para sustancias más polares *24).

Hablando en general, para estos procesos cromatográficos la adsorción más fuerte ocurre con solventes no polares, tales como éter de petróleo la más débil por moléculas altamente polares como el alcohol.

El término polaridad en cromatografía está relacionado y puede ser aplicado a solventes, solutos y adsorbentes. El agua es un solvente muy polar, el alcohol, cetonas y otros compuestos orgánicos oxigenados son menos polares, los hidrocar-

buros son los menos polares de todos.

Para la elección del adsorbente, éstos deben ser insolubles en el solvente empleado, pueden reaccionar más fuertemente cuando la sustancia que va a ser separada no cataliza la descomposición de los compuestos que necesitan separarse.

La adsorción es un fenómeno de superficie, se necesita que el polvo usado para la cromatografía sea lo suficientemente pequeño en tamaño de partícula para que dé una área de superficie amplia.

Entre los adsorbentes más comunes se pueden mencionar alúmina, sílica gel y óxido de magnesio.

Los adsorbentes se clasifican de acuerdo a la fuerza con que adsorben a las sustancias y ésta puede estar influenciada por el solvente empleado. El área de superficie es otro factor, - así como la cantidad de soluto capaz de ser adsorbido.

Como adsorbentes débiles están la sucrosa, inulina, talco, almidón, entre los adsorbentes intermedios están el carbonato de calcio, fosfato de calcio, magnesia y como adsorbentes fuertes alúmina, tierra de fullerés, sílica gel y carbón.

Ciertos adsorbentes como sílica gel, alúmina, silicato de magnesia, etc. pueden obtenerse comercialmente, se activan antes de su uso, por calentamiento óptimo, en el caso de la alúmina cerca de 400°C . El tiempo de calentamiento es importante puesto que si se prolonga pierde actividad.

La cromatografía de adsorción es un proceso de fraccionamiento delicado, las reacciones químicas que ocurren ocasionalmente - en la presencia de adsorbentes son como sigue: isomerización y

polimerización de olefinas con sílica gel, acetilación de azúcares, oxidación de ácidos grasos, polarización de acetona y alcohol diacetónico, diarreglos de beta y alfa betacetonas - insaturadas con albúmina, aminolisis y oxidación de aminoácidos con carbón.

Los sólidos activos usados como columna de empaquetamiento -- cromatográfico pueden ser buenos catalizadores.

Algunas adsorciones pueden ser irreversibles en ese caso la recolección de solutos es incompleta.

4.6.7.- Cromatografía de partición

Martin y Synge decidieron recurrir a un sostén de la fase líquida estacionaria usando sílica gel saturada con agua y empaquetada dentro de una columna, pusieron aminoácidos acetilados en cloroformo dentro de la columna y los eluyeron con cloroformo adicional.

Los aminoácidos acetilados se distribuyeron entre la fase estacionaria acuosa de la sílica gel y la fase móvil del cloroformo, viajando hacia la fase de la columna y fueron separados en diferentes fracciones diluídas..

Principio.- La cromatografía de adsorción se basa en la afinidad de los compuestos de una mezcla entre la superficie del sólido y la solubilidad de la muestra en el solvente. En la cromatografía de partición el adsorbente sólido es reemplazado por un líquido estacionario.

El movimiento de las sustancias en el cromatograma depende de sus concentraciones relativas en la fase móvil y la estacionaria.

Las sustancias disueltas, atraviesan y reatruviesan las bandas

de interfase; el grado al cual un soluto se mueve en un sistema tal, dependerá de su solubilidad en las dos fases.

Esto se expresa como un coeficiente de partición K , definido como: la concentración del soluto presente en una fase, dividida entre la concentración del soluto en la segunda fase, después de que el equilibrio ha sido establecido.

Esta es una constante a una temperatura dada, cuando la fase cercana es saturada con respecto a la sustancia disuelta.

La concentración del soluto en la fase móvil en los sistemas de cromatografía por definición en el numerador estará la fase móvil y en el denominador la estacionaria: Así S , es la concentración de soluto y el coeficiente de partición será:

$$K = \frac{S \text{ móvil}}{S \text{ estacionaria}}$$

Soportes.- En la cromatografía de adsorción el material sólido que sirve como fase estacionaria es llamado adsorbente; en la cromatografía de partición el material sólido actúa como soporte del líquido, el papel filtro puede usarse como fase estacionaria y el proceso se identificará como cromatografía en papel. Cuando el material que se separa es distribuido entre la fase móvil gaseosa y la fase líquida inmóvil, en el soporte sólido, el proceso es conocido como cromatografía gas-líquido. Ambos sistemas han sido métodos de análisis y es posible eliminar el soporte y permitir que el disolvente fluya a través del otro a manera de goteo. La técnica de extracción común es la base de la de contracorriente de Craig, en la cual cantidades de series de extracciones de dos fases solventes provocan una sucesión o dicho de otra manera, vienen suces

sivamente, sin embargo, ésto no es una separación en el sentido cromatográfico. El soporte sólido debe ser inerte hasta donde sea posible en relación a las sustancias que han de ser separadas, adsorbiendo y reteniendo; la fase estacionaria expone una superficie grande a la móvil e impide el flujo del solvente.

Los soportes sólidos más comunmente usados en cromatografía de partición son: sílica gel, polvo de celulosa, tierra de diatoméas, almidón, perlas de vidrio, etc.

Sistema solvente.- La separación de las sustancias por el método de partición depende de los solventes en las fases móvil y estacionaria.

El sistema del solvente simple es un par equilibrado de líquidos virtualmente inmiscibles, uno es la fase móvil y el otro estacionaria.

Para provocar cambios el solvente debe estar equilibrado por una mezcla de solventes en un embudo de separación antes de su uso. Cada fase consiste principalmente en un componente más pequeño que el otro.

Las fases individuales se usan para la separación y desarrollo de la cromatografía. El soporte se equilibra con la fase estacionaria. En el caso de la cromatografía en columna, se realiza sobre una mezcla del soporte con la fase estacionaria equilibrada. En la cromatografía de partición normal, ésta es la fase más polar. En donde la fase estacionaria es no polar la fase móvil si lo es. El proceso se denomina "cromatografía en fase reversa".

La fase móvil es el solvente eluido, la distribución de las mezclas de solutos en sí mismas entre la fase móvil y estacionaria, así como la posición relativa de cualquiera de los solutos es determinada por su solubilidad relativas en las dos fases.

Los solventes deben de ser puros, ya que las impurezas pueden causar cambios en la distribución del soluto.

La temperatura de equilibrio debe ser la misma que la empleada en el proceso cromatográfico, con el objeto de prevenir cambios en la solubilidad (4).

4.V. DIVERSAS TÉCNICAS CROMATOGRAFICAS

Se discutirán cuatro tipos principales de cromatografía: en columna, en papel, en capa fina y la cromatografía de gases. Estas cuatro categorías dependen del aparato usado, la cromatografía de partición dependerá de las condiciones individuales empleadas.

4.V.1 Cromatografía en columna.-

Este tipo de cromatografía está basado en el principio de reparto antes descrito, en lo que la separación se consigue mediante gran número de etapas de reparto separadas, de dimensiones microscópicas cada una, mediante una columna de (10 a 100 cm. de longitud) rellena de gránulos de una substancia inerte, insoluble e hidratada, tal como el almidón. Los gránulos de almidón contienen una capa de agua estrechamente ligada, que actúa como fase acuosa estacionaria, a través de la cual fluye un solvente inmiscible a medida que desciende por la columna por acción de la gravedad. Cada gránulo de almidón actúa como proceso de reparto que ocurren en las zonas microscópicas de una columna por acción de la gravedad. Cada gránulo de almidón actúa como un embudo de separación microscópico. Los procesos de reparto que ocurren en las zonas microscópicas de una columna de almidón no están definidos específicamente, en cuanto a dimensiones ni cada etapa microscópica se completa hasta el punto de equilibrio. No obstante, el número total de etapas es tan enorme que los diferentes componentes de la mezcla descenderán en la columna a velocidades diferentes a medida que el solvente saturado de agua fluya en descenso por la columna. El líquido que sale por el fondo de la --

columna, llamado "eluato" se recoge en pequeñas fracciones mediante un colector automático de fracciones y se analizan químicamente.

Como expresión gráfica de la cantidad de substancia analizada aparecerán una serie de picos, cada uno de los cuales corresponde a cada componente en particular.

Son numerosos los adsorbentes empleados en la cromatografía en columna.

Las separaciones pueden realizarse por reparto, adsorción o intercambio iónico. Puede usarse cualquier medio adsorbente, siendo los más generales la celulosa, gel de sílice, celita y Kieselguhr (para separaciones por reparto) alúmina, óxido de magnesio, óxido cálcico y carbón activado (para las separaciones por adsorción y de intercambio iónico).

En todos los casos sólo pueden obtenerse óptimos resultados si se tiene cuidado en la selección del medio. El estudio físico del adsorbente ha de ser de tal manera que permita el empaquetamiento uniforme de la columna y el flujo libre de disolvente a través de ella (24).

En este método un medio sólido empaquetado dentro de una columna, con varias substancias se introduce la mezcla de solutos y se agrega solvente el cual pasa dentro de ellas, los solutos son diluidos y el solvente percolado a través de ella. Los métodos de columna son usuales para la separación de compuestos puros de mezclas.

La cromatografía en columna usualmente se hace en vidrio para facilitar la observación de la fase sólida y el nivel del solvente, la inspección de burbujas de aire y canalizaciones, adg

más de la observación de sustancias coloridas y del movimiento de estas bandas.

Para el uso del laboratorio, la longitud de la columna varía entre 2 y 150 cms. pudiendo variar el diámetro, el radio y la longitud, pero usualmente esta última debe ser por lo menos -- diez veces el diámetro interno, este radio depende generalmente de la facilidad o dificultad de la separación y puede estar determinada empíricamente. El tamaño de la columna y la calidad del empaquetado está determinado por la cantidad de soluto que va a ser separado.

Varias sustancias que han usado como soportes incluyendo perlas de vidrio y lana, papel filtro y discos de vidrio para acomodar grandes volúmenes de solvente, las columnas deben ser - apropiadas con recipientes conectados a la parte alta con largas columnas o material finamente dividido.

Se puede presionar para forzar la elusión del fluido a través de la columna y ésta debe ser empacada convenientemente ya que si se hace en forma inadecuada puede provocar un desarrollo - irregular.

Las columnas pueden ser tratadas por las técnicas de empaquetamiento por secado, en donde pequeñas cantidades de adsorbente se agitan fuertemente hacia abajo para tapar la columna aplicando vibración hasta el nivel de adsorbente, volviéndose --- constante o por taponamiento del adsorbente con un tapón o tope.

Este procedimiento se repite hasta que la altura de la columna sea obtenida. Poniendo una pequeña perla de lana vidrio en lo alto de la columna se provocan alteraciones en la superficie -

del adsorbente.

La columna se lava entonces con el solvente inicial usado en el proceso de elución.

En el empaquetamiento húmedo el adsorbente y solvente se mezclan y se ponen dentro de la columna, el adsorbente permite el asentamiento y forma una especie de capa en la parte alta; durante el asentamiento el exceso del solvente es secado y se agrega una mezcla adicional, el proceso se continúa hasta que se obtenga la altura deseada.

El empaquetado seco puede ser llevado a cabo por introducción del solvente dentro de un tubo y agregando la mezcla o el adsorbente seco en una fina capa a través del embudo para la adsorción, el tubo se tapa suavemente, cuando se ha removido el exceso de solvente se elimina y se cubre la tapa de la columna con un tapón de lana de vidrio para prevenir la evaporación durante la elución.

Una vez preparada la columna debe cuidarse que la superficie sea plana y de esta manera puede humedecerse con el solvente, la superficie así no estará seca hasta que todo el proceso de adsorción sea completo.

Cuando la columna se seque es conveniente separarla de las paredes del tubo y se hará correr más solvente adicional hacia abajo en los espacios formados, completando el proceso.

Desarrollo. Elución y Detección de solutos.-

Se aplica en la parte superior de la columna solución tan concentrada como sea posible sin que se altere el empaquetado del material a estudiar, los más usados para la elución, así como el material de empaquetado de la columna depende de los

solutos que se vayan a separar y del tipo de cromatografía a emplear.

Las sustancias coloridas pueden ser detectadas por observación directa, sin embargo, muchas sustancias pueden ser separadas sin ser coloridas, utilizando varias de sus propiedades físicas, tales como fluorescencia, absorción óptica, pH, métodos químicos y hasta fisiológicos (4).

4.7.2 - Cromatografía en papel

El mismo principio aplicado en la cromatografía en columna es principalmente, el implicado en este tipo de cromatografía.

La celulosa de las fibras del papel está hidratada. A medida que un disolvente conteniendo una mezcla de diferentes componentes asciende por capilaridad por el papel, mantenido en posición vertical (o desciende en la cromatografía descendente), se producen multitud de distribuciones microscópicas de los componentes entre la fase que fluye y la fase estacionaria -- acuosa, ligada a las fibras del papel. Al final del proceso los diferentes componentes han recorrido distancias diferentes desde su origen el papel se seca, se pulveriza con un revelador químico adecuado y se calienta con objeto de localizar las sustancias estudiadas.

La cromatografía de papel de una mezcla de compuestos puede realizarse en dos direcciones sucesivas utilizando un papel cromatográfico cuadrado y empleando dos sistemas disolventes -- distintos, en estas condiciones se obtiene un mapa bidimensional de los diferentes componentes estudiados (13).

La cromatografía en papel como la conocemos fué desarrollada -- del sistema de partición.

Consden, Gordon y Martin en 1944 trataron de separar productos de hidrólisis parciales de proteínas de lana, introduciendo -- una idea nueva de reemplazamiento de las columnas de polvo de celulosa con un puente suspendido en papel en un recipiente de vapor.

La técnica básica no ha sufrido cambios fundamentales, sin embargo una importante variedad de aparatos comerciales son usuales y adecuados, no se requiere de equipo caro y pueden obtenerse buenos resultados.

Aparato.

El requerimiento básico es una cámara o tanque con una corriente bien sellada para prevenir el escape de vapores del solvente y mantener una atmósfera de solvente saturado.

El papel pasa a través de una varilla de vidrio o tira para mantener el papel bien sostenido a través debido a un aumento de peso, cuando este es saturado con el solvente.

El flujo gravitacional empieza cuando el frente del solvente ha pasado sobre la varilla de vidrio.

El solvente es colocado en la parte alta de la cámara para saturar la atmósfera de la cámara. En la cromatografía ascendente el solvente de la parte superior también sirve con un solvente de desarrollo.

Cuando se permite que el solvente corra en una sola dirección desarrollando así el cromatograma en esta dirección el proceso se llama dimensional simple.

Cuando se logra el corrimiento en dos direcciones entonces recibe el nombre de bidimensional, ésto puede hacerse girando el papel 90° y volviendo a efectuar la separación.

Las condiciones principales a satisfacerse son las siguientes: el recipiente para el solvente debe ser de capacidad suficiente para completar el cromatograma sin interrupción; solvente y fase vapor deben estar siempre en equilibrio, el papel debe -- estar suspendido libremente, deben de evitarse cambios de temperatura.

El material básico de papel usado, es la alfa celulosa de alta pureza.

El trabajo original fué hecho con papel Whatman No. 1 el cual sigue usándose todavía. Los fabricantes ahora lo han sustituido por productos cuyas propiedades físicas y químicas están -- controladas rigurosamente en su manufactura y se obtienen pureza y uniformidad.

Los papeles deben ser clasificados de acuerdo a la anchura, -- grado de fluidez, fuerza, pureza, absorbancia y tratamiento -- previo. Cuando las manchas sean localizadas con luz ultravioleta no puede usarse un papel opaco. Papeles gruesos se -- usan para separaciones en gran escala ya que acomodan más material sin aumento en el área de la mancha original.

Desarrollo y Secado.

Cuando el desarrollo ha sido llevado a cabo durante el tiempo deseado, el papel se saca del tanque y se seca, por sostenimiento del papel en una percha, adecuadamente colocado en -- horno a elevadas temperaturas.

En cualquier caso, los papeles no deben tocarse unos con otros si se están secando más de uno simultáneamente.

Análisis.- El método usado para el análisis de las fracciones después del desarrollo y secado, depende del soluto. Comumen

te, se emplean soluciones coloridas, los colores visibles de los compuestos en sí mismos, procedimientos de análisis radioactivo, fluorescencia, absorción ultravioleta y absorción -- infrarroja. Los últimos tres métodos requieren de instrumentación especial y técnicas fotográficas (4).

4.4.3.1.- Cromatografía en capa fina (TLC).

Los primeros investigadores que usaron un fijador de capa fina en un soporte rígido inerte como adsorbente cromatográfico -- fueron Tzimalov y Scjraiber en 1938, ellos aplicaron la muestra por rocío delgado (soportes), polvo seco adsorbente como una -- mancha central y desarrollo del cromatograma por goteo del solvente dentro de la mancha central, así que los componentes se -- movieron en anillos a diferentes velocidades, debido a que la -- capa de adsorbente es fácilmente alterada, se encontraron difi-- cultades en el desarrollo de muchos cromatogramas y el análi-- sis de los componentes separados.

Meinhard y Hale mezclaron el adsorbente con almidón el cual actúa como unión para sostener el adsorbente al vidrio, sin em-- bargo fué hasta 1950 cuando Stahl observó métodos combinados -- de preparación de platos y demostró que la cromatografía en -- placa fina puede ser aplicada a una serie de variedades de se-- paraciones y la convirtió en una técnica popular.

Introdujo una medida de estandarización en la metodología em-- pleada, adsorbentes y aparato utilizado para la preparación de capas.

Bosquejo del método.- El plato de cromatografía es una capa delgada de adsorbente de cualquier anchura en un soporte inerte.

Se usan comunmente platos de vidrio aunque pueden emplear

también de plástico o mezclas de varios materiales.

La muestra en un solvente volátil, se aplica con una pipeta o jeringa sobre la placa, se deja secar; el plato se coloca verticalmente o por lo menos en una posición hacia arriba con un volúmen pequeño de solvente y dentro de una cámara sellada -- adecuadamente para que se desarrolle un cromatograma ascendente. Algunas veces, con objeto de obtener resultados cuantitativos rápidos el plato se coloca verticalmente o por lo menos en posición hacia arriba con un volúmen pequeño de solvente y dentro de una cámara sellada adecuadamente para que se desarrolle un cromatograma ascendente. Algunas veces con objeto de obtener resultados cuantitativos rápidos el plato se coloca en una cámara sellada, pero ésto afecta la calidad de los resultados. Al final del corrimiento el solvente se evapora y las manchas separadas se identifican.

Teñido.-- A la fase estacionaria en la cromatografía en capa fina se le llama generalmente adsorbente, aún cuando esta funcione como soporte.

En sistemas de partición, todos los tipos de adsorbentes usados en la cromatografía en columna deben ser usados para preparar capas delgadas pero es necesario que su tamaño sea muy pequeño.

Aplicación.-- En general, los métodos usados para localizar --- sustancias en cromatografía en papel son aplicables a la cromatografía en capa fina; reactivos corrosivos en forma de rocío pueden utilizarse para carbonizar en un horno. La mayoría de - las sustancias orgánicas no volátiles en capas inorgánicas. - Como regla general los métodos de cromatografía en capa fina - son de 10 a 100 veces más sensibles que aquéllas sobre papel.

4.7.4.- Cromatografía en capa fina contra cromatografía en papel.

La similitud en principios y técnicas de la cromatografía en capa fina y la cromatografía en papel, permiten compararlos ambos. La cromatografía en capa fina tiene las siguientes diferencias sobre la segunda mayor rapidéz, mejor resolución; frecuentemente sustancias que parecen ser homogéneas en la cromatografía en papel, pueden dar dos o más manchas que en la cromatografía en capa fina, necesita más reactivos y temperaturas más altas, separan sustancias hidrofóbicas, tales como lípidos e hidrocarburos, que son difíciles de manejar en papel, con la cromatografía en capa fina, hay mayor dificultad en el registro de los anolitos y conservación de cromatogramas delgados; el R_f no se reproduce además los platos tienen mayor costo en relación al papel.

4.7.5.- Cromatografía en capa fina contra otras técnicas cromatográficas

La cromatografía en gas líquido es la más sensible dentro de las técnicas cromatográficas, es una herramienta muy poderosa, por medio de la cual se obtienen información con relativa facilidad, que por otras técnicas cromatográficas. Por este medio pueden separarse una mezcla e identificar los componentes a distintos tiempos de retención y alturas de los picos y área, lo que puede traducirse a datos cuantitativos.

El procedimiento es susceptible de adaptarse a la automatización, los instrumentos son marcados primeramente introduciendo las mezclas automáticamente en sucesión y a intervalos predeterminados, los picos trazados en el registrador de las tiras son capaces de resolverse por computación, un instrumento automáti-

co incluye análisis cuantitativos de los componentes, de una cualidad distinta, desafortunadamente, esta instrumentación sofisticada es costosa más que otras técnicas cromatográficas que pueden realizarse con equipo barato.

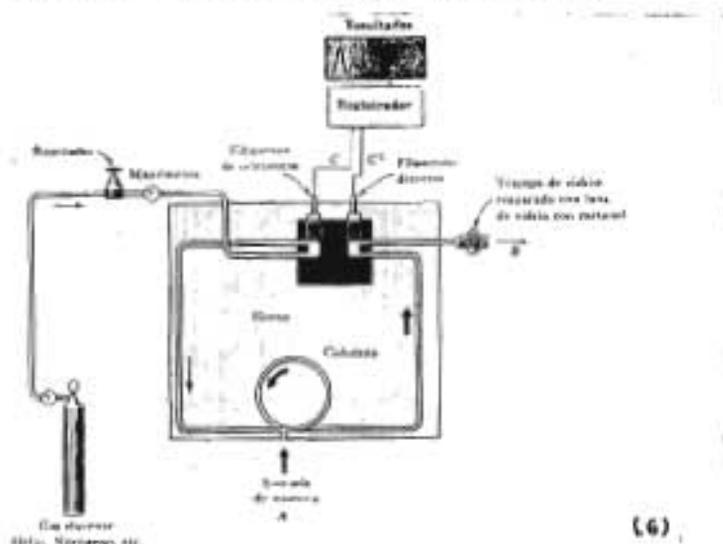
4.7.6.- Cromatografía de Gases.

Generalidades.- En los sistemas de cromatografía anteriormente descritos se emplean líquidos en la fase móvil, cuando es utilizado un gas, la técnica se le llama cromatografía de gases. La cromatografía de gases puede ser de adsorción o partición, cuando la columna se rellena con un adsorbente como carbón activado y los componentes de la mezcla son separados a través de la fase gas sobre la superficie del sólido, la técnica se llama cromatografía gas-sólido.

Cuando la columna se prepara con un sólido inerte, recubierto de una capa delgada de un líquido no volátil como fase estacionaria y la separación de los componentes se hace entre la fase gas y el líquido estacionario de acuerdo a los coeficientes de partición, la técnica se llama cromatografía gas-líquido (4).

Desarrollada principalmente en 1951, esta técnica se ha convertido en el método más rápido y más exacto para analizar cualquier sustancia volátil. En forma resumida, el método consiste en inyectar la sustancia volátil en una columna que contiene un sólido inerte que sirve como soporte al líquido adsorbente. La base para la separación de los componentes de la sustancia volátil estriba en la diferencia de coeficiente de partición de los componentes al ser eluidos por un gas inerte como el helio a través de la columna. El aparato empleado es --

simple, como puede verse en el siguiente diagrama:



(6)

La columna se lava con el gas acarreador para eliminar cualquier material que se haya inyectado antes y obtener una línea basal estable. La muestra se introduce en A. El gas acarreador transporta la substancia volátil inyectada en la columna, donde los componentes sufren una partición en el líquido de absorción y se separan; al pasar una fracción por el instrumento o aditamento detector adecuado, manda éste una señal al aparato de registro, quien a su vez transforma esta señal en una gráfica, en la que cada vértice obtenido representa un compuesto. Se describen aquí dos clases de aditamentos detectores, para dar al estudiante una idea de la técnica.

La celdilla de conductividad térmica es un aditamento detector basado en el principio de que el calor de un alambre caliente se elimina por conducción cuando un gas pasa junto a él. Dos serpentines de alambre delgado con un coeficiente alto de re-

sistencia de temperatura se colocan en dos partes de un bloque metálico (C₁ y C). En el circuito de C₁ y C se colocan las resistencias eléctricas adecuadas para formar un puente de Wheatstone. Cuando la corriente pasa por él, los alambres C₁ y C se calientan. La temperatura de equilibrio final de dichos -- alambres depende de la conductividad térmica del gas que pasa por el alambre en espiral.

Si el gas es el mismo, los alambres tendrán la misma temperatura y la misma resistencia, por lo que el puente estará equilibrado; si ahora pasa un gas eluyente a través de C₁ mientras -- por C sigue pasando solamente el gas acarreador, (antes de -- eluir los componentes de la muestra) la temperatura de los -- alambres será diferente, la resistencia habrá cambiado y el -- puente de Wheatstone estará desequilibrado. La medida de este desequilibrio se hace con un potenciómetro que lo registra como ya se indicó.

El segundo tipo de aditamento detector es el de ionización de llama de hidrógeno que tienen una gran sensibilidad, respuesta líneal bastante constante y no es sensible al agua. Teórica-- mente, cuando se quema materia orgánica en llama de hidrógeno, se producen electrones y iones.

Los iones negativos y los electrones se mueven en un campo de -- alto voltaje hacia el ánodo, y producen una corriente pequeña, que, por medio de un circuito apropiado, se convierte en una -- corriente eléctrica capaz de medirse. La corriente eléctrica es directamente proporcional a la cantidad de materia quemada (6).

Comentario del método.- El principio de la cromatografía gas-líquido es como la cromatografía de partición. Una pequeña cantidad de la mezcla se inyecta dentro de la columna. Inmediatamente se vaporiza por medio de elevada temperatura en la cámara y se extiende a lo largo de la columna por medio del gas acarreador. La columna se llena con la fase estacionaria en un soporte inerte. La mezcla volatilizada se separa de sus componentes por la fase estacionaria y los componentes se mueven a través de la columna a diferentes velocidades se ponen en contacto con el marcador el cual responde con cambios en la señal eléctrica.

La señal es amplificada y registrada en unas tiras. El lapso de la inyección y la aparición de cada pico es llamado tiempo de retención, el cual es característico para una sustancia dada en condiciones dadas.

El área y altura del pico registrada en la tira puede servir para cuantificar los componentes (4).

Introducción de la muestra.- Los líquidos se inyectan a través de una parte sellada, los sólidos se introducen disueltos en solventes volátiles.

Muestras de gases pueden introducirse con una jeringa delgada de nylon o silicón el objetivo básico es el colocar la solución conteniendo la muestra, dentro del aparato lo más rápidamente posible, la inyección debe ser lo suficientemente caliente para que se vaporice la mezcla rápidamente.

Columna.- El tubo usado para la columna es usualmente de vidrio, acero inoxidable, aluminio o cobre, el diámetro de la columna puede variar la longitud de la columna, columnas gran-

des producen mejores separaciones.

La mayoría de las columnas miden alrededor de 6 pies de largo, teniendo un diámetro interno de 1/8 a 1/4 de pulgada y contienen de 5 a 10 g de soporte de recubrimiento.

Marcadores.- Los marcadores deben ser sensibles, capaces de dar rápida respuesta, poseen una señal alta del radio registrador. Existe gran variedad de ellos la mayor parte son conductores térmicamente, producen ionización de flama o capturan electrones. Los de ionización de flama son los más comúnmente usados.

Registro de señales.- El aparato de cromatografía de gases está conectado a un electrómetro que simplifica la obtención de la señal y la lleva a un registrador sensible a las tiras del instrumento; este está equipado con un atenuador que es un potenciómetro con resistencia variable capaz de reducir las señales, éstas son retenidas en el detector sobre el registrador siendo particularmente útil cuando se desea saber la cantidad de muestra analizada.

Temperatura del horno.- El control de temperatura en gas-líquido es muy importante. La columna se calienta con aire circulante por medio de un abanico que va a un horno de diseño apropiado.

En cromatografía isotérmica, la temperatura de la columna permanecerá constante; muchos instrumentos tienen un programador que puede aumentar la temperatura en forma lineal y constante, de esta manera los componentes de la mezcla son eluidos selectivamente dependiendo de sus diferencias en volatilidad.

Soporte sólido.- Como en otros sistemas de cromatografía de --

partición las funciones del soporte sólido para distribuir la fase líquida frecuentemente poseen una superficie amplia, los más comunmente usados son las tierras de diatomeas, perlas de vidrio, hélices metálicas y teflón.

Fase estacionaria.- El material usado para la fase estacionaria líquida debe ser no volátil, las temperaturas máximas operantes pueden determinarse de acuerdo con los bajos puntos de ebullición de los sólidos, cualquier columna nueva requerirá un reacondicionamiento y control de la temperatura (4)

4.7.7.- Otras técnicas cromatográficas.- La mayor parte de los sistemas cromatográficos presentes empleados han sido presentados anteriormente, existen otros dos tipos de cromatografía que se les ha encontrado un uso muy importante: la cromatografía de resinas de intercambio iónico y la filtración por geles.

4.7.8.1.- Cromatografía de intercambio iónico

La atracción electrostática de iones con carga opuesta sobre una superficie polielectrolítica, es el principio sobre el cual se basa la cromatografía de intercambio iónico. Los derivados de la celulosa han tenido mucho éxito como medio de intercambio en la purificación de proteínas.

El principio básico implica una interacción electrostática entre los iones que se intercambian y la carga normal sobre la superficie de la resina. Estas reacciones se consideran como un proceso en equilibrio y requieren la difusión de un ión dado a la superficie de la resina y de ahí al sitio donde se va a efectuar el intercambio, luego el intercambio mismo y, finalmente, su difusión hacia fuera de la resina. La velocidad de movimiento de un compuesto ionizable hacia abajo de la columna está en función de su grado de ionización, la concentración de otros iones y las afinidades relativas de los diferentes iones presentes en la solución para sitios cargados de la resina.

Ajustando el pH del solvente de elución y la fuerza iónica, los iones detenidos electrostáticamente se eluyen selectivamente para lograr la separación deseada (6).

Las separaciones de intercambio iónico se llevan a cabo con materiales especiales de estructura porosa e insolubles. Es-

tos contienen grupos reactivos que están asociados a iones hábiles capaces de intercambiarlos con el medio que les rodea. Como su nombre lo indica, la cromatografía de intercambio iónico se emplea en la separación de sustancias iónicas, tanto orgánicas como inorgánicas, de polielectrolitos, como enzimas, proteínas, hormonas, virus, ácidos nucleicos y otras sustancias biológicamente importantes.

Generalmente se emplean tres tipos de materiales: resinas, gels y celulosa de intercambio iónico. La diferencia entre ellos se debe a la naturaleza de los grupos cambiadores incorporados.

El interés inicial por el fenómeno de intercambio iónico se centró principalmente en el endurecimiento de aguas. Se encontró que ciertos minerales, silicatos notablemente complicados, conocidos como zeolitas tenían la propiedad de eliminar los iones calcio y magnesio de las aguas duras, desplazándolos por iones sodio, de esta forma actuaban como intercambiadores iónicos. Sin embargo, su empleo es limitado por ser inestables a cambios de pH, siendo posible muy raramente la recuperación del producto absorbido (24).

Este tipo de cromatografía consiste esencialmente en el intercambio reversible de iones entre las fases sólida y líquida - sin cambio radical de la estructura de la fase sólida, un rango importante de resinas sintéticas con propiedades de iones intercambiables se han vuelto de gran valor, estas resinas sintéticas con sostén de una matriz insoluble de alto poder polímero con grupos polares unidos, siendo grupos que confieren propiedades de intercambio iónico a estas resinas.

El fundamento de esta técnicas es parecida a la de la cromato-

grafía de adsorción la cual ha sido particularmente útil en la separación de materiales biológicos tales como aminoácidos, pirinas, pirimidinas, alcaloides que poseen grupos ionizables (4).

4.7.9.1.- Cromatografía de filtración sobre geles.

La técnica de cromatografía de filtración sobre geles fué introducida en 1959 siendo un tipo particular de cromatografía líquido-líquido que ya fué discutida con detalle en el capítulo IV (ver ultrafiltración) (24).

4.0 IMMUNOELECTROFORESIS

4.0.1 Antecedentes.

La identidad de una proteína homogénea puede establecerse por dos métodos: Es posible medir la movilidad electroforética por la distancia que recorre la proteína en un medio de soporte -- adecuado (o sobre este medio), bajo condiciones fijas de pH, fuerza iónica, diferencia de voltaje y tiempo de aplicación. El valor que se obtiene es función de la naturaleza electroquímica de la proteína.

También se puede buscar la reacción de esta proteína con un antisuero específico, estableciendo su identidad por observación de precipitados o floculados. Esta reacción se basa sobre la estructura molecular de la proteína.

Durante mucho tiempo, las reacciones antígeno-anticuerpo se -- llevaron a cabo en medios líquidos, en estudios como la prueba de aglutinación de Widal para el diagnóstico de las enfermedades intestinales.

En 1946 Oudin estudió las reacciones antígeno-anticuerpo que tenían lugar en el interior de un gel y mostró que, si los reactivos son mezclas de antígenos y anticuerpos distintos, las diferencias de concentración y de velocidad de difusión tienen -- como resultado zonas de precipitación diferentes en el gel, cada zona correspondiendo a un complejo antígeno-anticuerpo individual.

Oudin utilizaba la difusión simple, o sea sólo un reactivo, el antígeno difundía por el gel en el cual se había incorporado -- directamente el otro reactivo.

En 1948 en forma independiente, Outcherlony y Elek idearon la

doble difusión en gel; en este caso, tanto el antígeno como el anticuerpo difunden a través del gel, desde puntos separados, y las zonas de reacción donde coinciden se presentan como línea o como arcos de precipitación (20).

Grabar y Williams en 1953 desarrollaron un método simple pero extraordinariamente útil para identificar antígenos en mezclas complejas, combinando la electroforesis con la precipitación en gel de agar.

La mezcla de antígeno se introduce en un pequeño pozo practicado en el agar, que se ha colocado sobre una placa semejante a un portaobjetos.

Se mantiene un campo eléctrico a través de la placa durante 1 a 2 horas, las proteínas emigran según su movilidad electroforética.

La corriente eléctrica se interrumpe una vez que se han separado las proteínas, entonces se introduce el antisuero se elimina por lavado la proteína sobrante preparada contra el suero entero en un canal cuyo eje es paralelo al de la migración electroforética.

Los anticuerpos y los antígenos marchan entonces unos a otros y se forman bandas de precipitación en la intersección de sus fuentes de difusión.

Por medio de la inmunolectroforesis se pueden identificar -- hasta 30 antígenos diferentes en el suero humano y distinguir proteínas que no se podrían descubrir por otros métodos (30). La inmunolectroforesis de proteínas de suero es útil en la identificación de antígenos específicos.

Ciertas anomalías se deben a la ausencia de algún antígeno específico, a la disminución del antígeno específico o a

aumento del antígeno específico.

Un exceso del antígeno puede notarse por la aparición de una banda gruesa de precipitación.

Ciertas para-proteinemias pueden ser demostradas por un desplazamiento o engrosamiento de la línea de precipitación.

La inmunoelectroforesis de proteínas de suero es útil en la identificación de antígenos específicos.

Ciertas anomalías se deben a la ausencia de algún antígeno específico, a la disminución del antígeno específico o a un aumento del antígeno específico.

Un exceso del antígeno puede notarse por la aparición de una banda gruesa de precipitación.

Ciertas paraproteinemias pueden ser demostradas por un desplazamiento o engrosamiento de la línea de precipitación.

La inmunoelectroforesis, técnica que depende tanto de la movilidad electroforética como de la doble difusión en gel de agar, permite una magnífica resolución de los componentes antigénicos de las mezclas complejas de antígeno (como las proteínas del plasma humano) en realidad fué su descubrimiento lo que proporcionó la primera prueba de que las inmunoglobulinas humanas podrían ser subdivididas en varias clases (IgG, IgM, IgA) (29). La separación de las proteínas del suero por medio de un campo eléctrico es el principio en el cual está basada la inmunoelectroforesis, la cual depende de la carga neta de las moléculas proteicas y en menor grado de su tamaño.

La mayoría de las proteínas tiene carga neta negativa a pH 8 y emigran hacia el ánodo, la velocidad con que emigran las proteínas en un campo eléctrico es afectada también por la fuerza ió-

nica del amortiguador electrolítico y por la naturaleza del material empleado como medio de sostén.

Algunos materiales (como el agar y el acetato de celulosa) tienen una carga negativa, que fija a los iones positivos del amortiguador, provocando un flujo de dicho amortiguador hacia el cátodo. A esto se le conoce como electroendosmosis, fenómeno que hace que algunas proteínas del plasma como la inmunoglobulina G emigre hacia el cátodo.

Otros medios de sostén como la agarosa no producen electroendosmosis, provocando así que todas las proteínas del plasma emigren hacia el ánodo a pH 8 (30).

El gel puede secarse como película delgada, que constituye un registro permanente, también se puede fotografiar o proyectar.

Casi siempre se utilizan las microtécnicas de Sheideger (1955) y Wieme (1959) recurriendo a gel de agar sobre portaobjetos, o geles del comercio en cubetas de plástico poco profundas. El gel también puede depositarse sobre tiras de películas fotográficas.

Se han empleado también geles de acrilamida, pero las dificultades técnicas son mayores, ya que es difícil obtener buenos polímeros; además la sustancia es tóxica.

4.8.2.- METODO ESTANDAR DE INMUNOELECTROFORESIS.

EQUIPO Y REACTIVOS NECESARIOS

No. 1.- EQUIPO DE INMUNOELECTROFORESIS ESTANDAR

- a) Gel estándar para electroforesis
- b) Recipiente de inmunogel o platos equivalentes para inmunoelectroforesis.
- c) Cámara de incubación a temperatura ambiente o equivalente.
- d) Mechas con puentes de 0.05 pulgadas de anchura o equivalente.
- e) Cámara fotográfica con 4 pulgadas menos o sistema equivalente para captar y registrar las bandas de inmunoprecipitina, tal como la Polaroid MP-3.
- f) Inmuno-glo o caja de observación equivalente
- g) Pipeta de Wintrobe
- h) Soporte plástico de 5 a 7 pulgadas de ancho
- i) Bomba de aspiración de agua

No 2.- REACTIVOS PARA LA INMUNOELECTROFORESIS DE GEL

- a) Amortiguador de barbital sódico pH 8.6 y fuerza iónica de - 0.05
- b) Solución salina normal al 0.9%
- c) Colorante para proteínas que se prepara poniendo un gramo de rojo de tiazida en 100 mililitros de ácido acético al 10%
- d) Solución de ácido tánico al 1%

Mezcla de Buffer- Agarosa.- Se prepara disolviendo lentamente por calentamiento 350 mgs de agarosa y 2 gotas de azul de bromo fenol en buffer barbital 25 ml y 25 ml de agua destilada.

Procedimiento.- Llenar las cámaras de electroforesis con el -- amortiguador barbital.

2.- Preparación de la placa de inmunolectroforesis.

a). Poner la muestra problema dentro de la cámara inmunogel marcándola con un nombre o con un número y también marcar los surcos de anticuerpo. Señalar el punto medio marginal y una migración anódica de 3.2 cm desde el punto límite.

b) Conectar la tira con 30 ml de amortiguador de agarosa caliente que permita el calentamiento de la muestra.

c) Usando una guía cortar los surcos del eje a 5 pulgadas de distancia del patrón con el gel para abrir o cerrar el patrón de antígeno.

d) Marcar el lado donde se colocan los pozos de antígeno usando pipeta de Wintrobe, conectar la cámara a la válvula de succión acuosa o de agua cortando los pozos del antígeno y removiendo el gel en una sola operación.

e) Poner el inmunolectroplato en la cámara electroforética -- llenada con el amortiguador de barbitol.

No. 3 FASE ELECTROFORÉTICA

a) Colocar en las perforaciones dos microlitros del antígeno de la muestra usando una jeringa Hamilton.

b) Provocar la migración a 150 volts de fuerza electromotriz hasta que la albúmina teñida sea movida 3.2 cm a partir del punto de origen .

c) Remover el inmunolectroplato de la celda electroforética y ponerla en un soporte plástico.

Lavado

d) Lavar los inmunolectroplatos sumergiéndolos durante 6 horas en un tanque con cloruro de sodio al 1%, se pasa a otro tanque donde permanecen otras 16 horas. Así se eliminan del gel to--

das las proteínas que no han reaccionado, quedando sólo aquellas que precipitaron como arcos en los sitios de reacción antígeno-anticuerpo.

No. 4 FASE DE INMUNODIFUSION

- a) Llenar el correspondiente recipiente de anticuerpo en su surco correspondiente, con 100 microlitros de antisuero.
- b) Poner el inmunoelectroplato en una cámara de incubación por 16 horas.

No.5 FOTOGRAFIA

- a) Poner los inmunoelectroplatos sobre una película de 5 a 7 - pulgadas de ancho y meterlos en ácido tánico por 10 minutos para intensificar las bandas de precipitación
- b) Inmediatamente después ponerlas en agua
- c) Fotografiar dos veces el inmunoelectrofotograma con una cámara inmuno-glo, con lentes de 4 pulgadas o con una cámara Polaroid MP-3 e iluminación en un campo oscuro.
- d) La revelación de los puntos es suficiente para la finalización de la prueba, los actuales electrofotogramas pueden ser procesados por teñido.

HUMEDECIDO Y TEÑIDO

- a) Mojar los inmunoelectroplatos en agua destilada durante 24 horas con objeto de separar el ácido tánico sobrante, entonces ponerlos en solución salina normal durante 48 horas. El humedecido remueve el exceso de proteína y las sales amortiguadoras.
- b) Secar el inmunoelectroplato en un horno a 60 grados centígrados
- c) Después de que los platos están completamente secos, pueden procesarse exactamente como electrofotogramas de proteína y -

teñirse con rojo de tiazida durante 30 minutos, seguido de un proceso de decolorado y secado.

5.- TECNICAS DE CUANTIFICACION DE PROTEINAS

5.1 Métodos Instrumentales Fisicoquímicos y de Fraccionamiento Proteico.

La identificación, caracterización y separación de las proteínas del plasma, fué grandemente facilitada con el advenimiento de la ultracentrífuga analítica, ideada por Svedverg y del aparato de electroforesis de Tiselius, aplicándose principalmente al estudio de las proteínas del suero.

La primera investigación del suero en la ultracentrífuga, fué hecha por Uppsala y Pedersen en 1930, pero la fuerza del campo centrífugo fué demasiado baja para lograr una separación completa de albúmina y globulina.

Con el desarrollo de la ultracentrífuga por Von Mutzenbecker, se demostró la separación de dos componentes principales (4,5 S y 6,8 S), ya que una pequeña cantidad era de un alto peso molecular (17 S).

Mac. Farlane fué el primero en investigar por este método analítico el suero normal del hombre, del caballo y de la vaca. El también inició el estudio del suero humano patológico y de mezclas artificiales de albúmina y globulina.

En su trabajo y en el anterior de Pedersen, un gran avance fué hecho con relación a una proteína desconocida, la cual variaba con la densidad y la dilución del suero y se encontraba asociada con lípidos.

Algo más tarde Gofman y colaboradores la identificaron observando que flotaba sobre la solución y la llamaron lipoproteína de baja densidad, gracias al uso de la ultracentrífuga de Svedverg.

Pedersen también descubrió una proteína fetal de bajo peso molecular, que poseía una movilidad electroforética similar a la de la globulina alfa uno, encontrada en fetos de bovinos, equinos y suero de ovejas.

El principal avance obtenido por el uso de la ultracentrífuga, fué el abandono del concepto de las proteínas como un sistema de coloides heterogéneo, gracias al conocimiento de sus pesos moleculares definidos.

En la misma época en que Uppsala realizó sus investigaciones, Tiselius desarrolló el aparato de electoforesis de bandas móviles estableciendo medidas precisas en la purificación de -- proteínas y de mezclas, tales como las del suero, así él descubrió a las diferentes fracciones globulínicas llamándolas - alfa, beta y gamma y las subdividió a su vez en alfa 1, alfa 2, beta 1, beta 2, gamma 1, gamma 2, etc. Como resultado del descubrimiento del aparato de Tiselius investigadores posteriores hicieron una mejor elección de diferentes soluciones reguladoras, para utilizarlas en el aparato, con fines de investigación en las separaciones fisicoquímicas de proteínas, con ésto ha sido posible la obtención de una mayor exactitud en los resultados.

Otros investigadores tales como Kendall, Neurath, Mc. Mecken y Green intentaron la purificación de albúmina de suero y el fraccionamiento de globulinas, usando sulfato de amonio. Desafortunadamente, se obtuvieron resultados confusos, debido a la variedad de procedimientos y nomenclatura aplicados por -- los diferentes investigadores que usaron los métodos de frac-

cionamiento salino.

Por el año de 1941, un estudio electroforético hecho por Svensson del fraccionamiento de suero de caballo, conejo y vaca, demostraron la heterogeneidad de muchas fracciones globulínicas obtenidas a través de diferentes procedimientos.

Posteriormente, bajo la presión de los tiempos de la segunda guerra mundial se necesitó de un procedimiento eficaz de separación, desarrollándose el método del etanol frío para el fraccionamiento de proteínas en los laboratorios de E.J. Cohn.

El impacto de este nuevo procedimiento en la historia de las proteínas plasmáticas, fué aún mayor que el desarrollo de los métodos de ultracentrifugación y electroforesis.

La albúmina del suero no fué solo aislada por primera vez, sino que se hizo posible su uso, al grado de haberse realizado cerca de 400,000 transfusiones al año.

El resultado inmediato, fué una explosión de investigaciones de las propiedades físicas de la albúmina del suero, las cuales hicieron que adquiriera mayor importancia desde el punto de vista fisicoquímico más que desde el estructural.

El fibrinógeno y la gamma globulina, fueron altamente purificados gracias al uso de iones metálicos específicos, permitiendo el fraccionamiento fino del plasma y la purificación de otros componentes secundarios, sin embargo muchas de las sustancias presentes en el plasma, no han podido ser descritas por la falta de un método de análisis adecuado de fraccionamiento.

Poco después de la segunda guerra mundial, empezó a disminuir el uso del aparato de electroforesis y la ultracentrífuga ana-

lítica se convirtió en un instrumento de gran valor comercial. Debido al bajo costo de la electroforesis en papel, se facilitó el resurgimiento del estudio de las proteínas plasmáticas en diferentes enfermedades, utilizándose principalmente en la caracterización de proteínas anormales del plasma.

El refinamiento en las técnicas de electroforesis de zona, particularmente el método de gel de almidón de Kunkel, contribuyó al fácil aislamiento de los diferentes componentes del plasma, especialmente por poseer actividad biológica específica.

La aplicación hecha por Gofman de la ultracentrífuga, facilitó el aislamiento y caracterización de lipoproteínas de suero, que eran obtenidas por el método del etanol, debido a su importancia en relación con aterogénesis y otros padecimientos relacionados con los lípidos. Gran variedad de estudios clínicos y de literatura han sido publicados.

La ultracentrifugación se ha utilizado como ayuda en la clarificación de anticuerpos de alto peso molecular y macroglobulinas patológicas.

La técnica de fraccionamiento más reciente que promete gran aplicación rápida y precisa, es la cromatografía en resina de intercambio iónico, desarrollada por Saber y Pederson.

Con la aplicación de nuevas técnicas y mayor conocimiento de las proteínas plasmáticas, las investigaciones pudieron ser enfocadas a resolver problemas de interés médico y metabólico. Por ejemplo los factores envueltos en coagulación de la sangre, las funciones de las proteínas enlazadas a metales y además la significancia y evaluación clínica de enzimas y hormonas presentes en el plasma.

Un ejemplo de gran importancia, es el reciente descubrimiento del control genético de proteínas del suero, ésto se inició en el año de 1955 con Smithies, quien desarrolló el método de --- electroforesis en gel de almidón, con el descubrimiento en relación a las deficiencias de globulinas del suero hereditarias, presentes en humanos normales. Este hecho fué discutido en la comparación filogenética de las proteínas del plasma humano, - siendo objeto de gran interés particularmente al desarrollo del conocimiento de las globulinas del plasma humano.

Los avances en el conocimiento de las proteínas del plasma, durante los últimos años, no debe hacernos olvidar dos áreas de vital importancia con el estudio de su biosíntesis y al conocimiento de su estructura.

Diversas técnicas isotópicas, han contribuído al esclarecimiento de las vías metabólicas de proteínas del suero, e interconversión del mecanismo de biosíntesis de más lento desarrollo.

Sin embargo, el verdadero avance empezó a observarse, mediante el cultivo de tejidos y técnicas de partición celular.

Del mismo modo se conocieron los detalles en la secuencia de péptidos terminales del plasma y diversas fracciones proteínicas tales como la albúmina, gamma globulina y fibrinógeno.

En ciertos casos un análisis total de aminoácidos era requerido, basándose en métodos inadecuados. En la actualidad el uso de equipo automático de gran valor, ha hecho posible la determinación exacta de aminoácidos, como cualquier otro método de análisis rutinario de proteínas.

El conocimiento estructural de carbohidratos y diversas técnicas enzimáticas, han proporcionado ayuda al estudio de la es-

Un ejemplo de gran importancia, es el reciente descubrimiento del control genético de proteínas del suero, éste se inició en el año de 1955 con Smithies, quien desarrolló el método de --- electroforesis en gel de almidón, con el descubrimiento en relación a las deficiencias de globulinas del suero hereditarias, presentes en humanos normales. Este hecho fué discutido en la comparación filogenética de las proteínas del plasma humano, - siendo objeto de gran interés particularmente al desarrollo del conocimiento de las globulinas del plasma humano.

Los avances en el conocimiento de las proteínas del plasma, durante los últimos años, no debe hacernos olvidar dos áreas de vital importancia con el estudio de su biosíntesis y al conocimiento de su estructura.

Diversas técnicas isotópicas, han contribuído al esclarecimiento de las vías metabólicas de proteínas del suero, e interconversión del mecanismo de biosíntesis de más lento desarrollo.

Sin embargo, el verdadero avance empezó a observarse, mediante el cultivo de tejidos y técnicas de partición celular.

Del mismo modo se conocieron los detalles en la secuencia de péptidos terminales del plasma y diversas fracciones proteínicas tales como la albúmina, gamma globulina y fibrinógeno.

En ciertos casos un análisis total de aminoácidos era requerido, basándose en métodos inadecuados. En la actualidad el uso de equipo automático de gran valor, ha hecho posible la determinación exacta de aminoácidos, como cualquier otro método de análisis rutinario de proteínas.

El conocimiento estructural de carbohidratos y diversas técnicas enzimáticas, han proporcionado ayuda al estudio de la es-

estructura de las proteínas.

Así Parters, descubrió la forma de separación de antígeno combinado al anticuerpo, situado en gamma globulina de conejo, -- apareciendo una nueva área de exploración de la estructura submolecular (19).

5.2 Métodos Químicos y Fisicoquímicos de Cuantificación de las Proteínas.

Las principales proteínas que se encuentran en el plasma son - las albúminas, las globulinas y el fibrinógeno.

Las proteínas del suero están formadas por las fracciones de - albúmina y globulina del plasma, ya que la mayor parte del fibrinógeno se separa durante la coagulación necesaria para separar al suero.

Estas dos fracciones pueden separarse con una solución de sulfato de sodio al 27%, lo que precipita a las globulinas y deja las albúminas en solución, las albúminas posteriormente se determinan en el filtrado obtenido durante la separación.

Un análisis semejante de las proteínas totales del suero, corregido para el nitrógeno no protéico, puede usarse para medir la cantidad total de albúminas y globulinas.

La concentración de globulinas se obtiene restando de la cantidad total de proteínas, la correspondiente de las albúminas, -- determinada por el análisis directo.

A menudo se expresan la concentración de estas dos fracciones protéicas principales, indicando la relación que existe entre albúmina y globulina conocida como relación A/G, pudiéndose -- llevar a cabo una separación apropiada de ambas fracciones.

En 1921 Howe introdujo un método clínico para la separación - apropiada de albúminas y globulinas del suero.

En este procedimiento a un mililitro de suero se agregaba solución de sulfato de sodio al 22.2%, lo que da una concentración final de 21.5%, encontrándose que no se precipitaban todas las

globulinas, por lo que los valores obtenidos eran demasiado elevados para las albúminas y en consecuencia demasiado bajos para las globulinas, es decir la relación A/G era muy alta.

Este método no ha sido modificado en muchos laboratorios, por lo que es necesario conocer el método de separación usado en el análisis de proteínas del suero, principalmente cuando estos resultados van a servir de base para un diagnóstico o para un tratamiento en particular.

El valor normal de esta relación es de aproximadamente 2.1:1, en muchos padecimientos esta relación está alterada o invertida.

La determinación electroforética de proteínas del suero, se basa en la migración de partículas cargadas eléctricamente en una solución electrolítica, cuando se hace pasar una corriente eléctrica a través de la solución.

Cuando los diversos componentes de una mezcla como lo es el plasma, se colocan en una solución con un pH superior o inferior a su punto isoeléctrico, emigran a diferentes velocidades debido a que poseen cargas superficiales, peso molecular y forma distintas (11).

El número de las diferentes fracciones encontradas depende del método de análisis usado, pues éste puede estar gobernado por los propósitos del diagnóstico particular, para el cual la determinación ha sido hecha.

En algunos casos, es suficiente el determinar sólo el de las proteínas del suero total. Esto puede ser realizado con un refractómetro o por un método colorimétrico simple, usando el reactivo del biuret.

La simple separación de las proteínas en las fracciones de albú-

mina y globulina, puede realizarse por métodos de fraccionamiento salino.

Por este método, una solución concentrada de sulfato de amonio se agrega al suero, de tal modo que pueda ajustarse que precipiten las moléculas de globulinas y las albúminas de menor tamaño permanecen en solución. Después de que han sido separadas, las albúminas son determinadas en solución por la reacción del biuret.

La globulina se determina restando la proteína total a la albúmina presente.

Sin embargo, la separación no es completamente clara y por lo tanto el método no es del todo satisfactorio. Debido a esto se han elegido métodos de separación de las fracciones de albúmina y globulina por métodos químicos puros.

Usualmente el valor de proteína total y de albúmina es medido directamente y la globulina calculada por sustracción, pero para otros propósitos es preferible determinar separadamente a la albúmina.

La albúmina es una especie molecular simple, pero la globulina por otro lado, está compuesta de un número de distintas proteínas. Para su separación y determinación, uno de los diferentes tipos de electroforesis es comúnmente empleado.

Usando acetato de colulosa, las globulinas se separan en alfa 1, alfa 2 beta y gamma. Existen otras fracciones encontradas en el suero.

En el plasma hay otra fracción protéica, el fibrinógeno ausente en el suero. Este debe ser separado y determinado en plasma.

En la electroforesis generalmente se utiliza suero, pero algunas veces se producen interferencias causadas por el fibrinógeno en la cuantificación de las otras fracciones proteicas. Las globulinas beta y gamma constan de un número de especies con funciones distintas, muchos de los anticuerpos inmunes del cuerpo se ha visto que contienen fracciones de gamma globulina, otras proteínas encontradas con la fracción globulínica incluyen el enlace de proteína con otras moléculas, como sucede con la hemoglobina, haptoglobina, transferrina, las cuales son determinadas por inmunodifusión o inmunolectroforesis.

Existen un número de otras proteínas conteniendo otras especies moleculares en el suero, estas incluyen a lipoproteínas, glicoproteínas y mucoproteínas (3).

Para determinar las proteínas del suero, plasma u orina, se puede recurrir a métodos sencillos y rápidos que el Kjeldahl, sin embargo, este procedimiento sigue siendo el patrón por el que se rigen otros.

Para la normalización de otros métodos, se utilizan como patrones sueros normales o patológicos, en los cuales se ha determinado el nitrógeno total y el nitrógeno no proteínico por el método de Kjeldahl.

En la determinación de proteínas totales, albúmina y globulina, se utiliza el método del Biuret el cual fué adaptado del de Kingsley, siendo el primero que describió un método práctico para aplicar la reacción del Biuret, a la determinación cuantitativa de la concentración de proteínas séricas.

En 1904, Kingsley introdujo el uso de éter para efectuar una rápida separación de albúminas y globulinas mediante soluciones

salinas y demostró que la precipitación por salinización se podía efectuar a la temperatura ambiente.

El reactivo de Biuret de Kingsley, fué modificado por Weichelbaum (1946) para mejorar la estabilidad y disminuir la formación de turbidez del suero.

Poco después de la introducción del método electroforético para la separación de las proteínas, se puso en claro que la solución de sulfato sódico al 21.5% propuesta por Howe, o la solución de sulfato amónico a media saturación usada en la mayoría de los laboratorios para la separación por salinización de las globulinas, distaba bastante de efectuar una separación completa.

Major y Milne mejoraron la exactitud del procedimiento de separación por salinización, mediante el uso de concentraciones mayores de sulfato sódico. Sin embargo, las soluciones utilizadas por ellos cristalizaban fácilmente a la temperatura ambiente y por lo tanto requería emplearlas a 37°C.

Esta desventaja se superó en el método presente, utilizando -- una mezcla de sulfato y sulfito sódicos, cuyas solubilidades son aditivas. La solución mixta se puede usar en combinación con éter para la rápida separación de globulinas y albúminas, teniendo la ventaja de estar bien amortiguada por el sulfito sódico, mientras que las soluciones de sulfato sódico están sometidas a cambios en el pH en cuanto se contaminan con pequeñas cantidades de ácido o álcali. Esta ha sido una causa ocasional de error en la aplicación de los métodos antiguos (4). En los primeros métodos de determinación de globulina gamma del suero, era preciso utilizar numerosas sales a diferentes

concentraciones. Entre estas se contaba con la solución de sulfato amónico al 33% de saturación.

La técnica de utilización de esta solución se modificó y es la base de varios de los métodos cuantitativos actuales.

Otro tipo de métodos de precipitación, aprovecha la turbidez - producida al combinarse las proteínas con ciertos metales pesados como cinc, cobre, cadmio y bario, en condiciones estables de temperatura, pH y concentraciones de proteínas y reactivos. Wolfson y Cohn idearon un procedimiento con el separaban las proteínas séricas en cuatro fracciones similares a las fracciones electroforéticas; el procedimiento se basa en la insolubilidad que presenta la globulina gamma en una solución de sulfato amónico al 33% de saturación. El pH se ajusta al punto --- isoelectrico (6.4), agregando cloruro de sodio, para obtener - el máximo de recuperación (25)

Para la determinación de fibrinógeno se han aplicado todos los tipos de métodos de valoración de proteínas: gravimétrico, -- Kjeldahl, electroforesis, refractometría, nefelometría y colorimetría con éxito variable.

Los métodos empleados con más frecuencia en los laboratorios - clínicos, consisten en el precipitación del fibrinógeno del -- plasma en forma de fibrina y análisis del coágulo por determinación de la cantidad de nitrógeno por el método de Kjeldahl, o con la ayuda de otros métodos colorimétricos de proteínas. Uno de los primeros métodos utilizados para la separación de fibrina a partir del plasma utilizados fué el procedimiento de sarrollado por Cullen y Van Slyke quienes añadieron cloruro --

cálcico a plasma oxalatado y determinaron la cantidad de nitrógeno en el coágulo por el método Kjeldahl, valor que se expresa como proteína multiplicándolo por el factor 6.25.

Gram desarrolló un método semejante para usarlo con sangre citratada.

Bang ha modificado el método de Gram, convirtiéndolo en un procedimiento más rápido mediante el uso de solución de trombina y lavado con alcohol y éter para desecarlo rápidamente, antes de separar el coágulo.

Un método colorimétrico ampliamente usado durante muchos años, consiste en la combinación de la técnica de Cullen y Van Slyke para la separación del coágulo y utilización del reactivo de fenol.

Existen ciertos errores inherentes a los métodos iniciales, que han puesto de relieve estudios recientes, en los que se empleó trombina purificada para la conversión del fibrinógeno en fibrina, así como los datos del fraccionamiento de las proteínas sanguíneas de Cohn y colaboradores.

Saifer y Newhouse determinaron el fibrinógeno, empleando un procedimiento microfotométrico con ninhidrina en condiciones reguladas.

Como los reactivos del Biuret y Biuret-Fenol se han empleado con éxito en el análisis de proteínas y son accesibles a la mayor parte de los laboratorios de análisis clínicos, el método que se describe se encontró útil y comparativamente rápido. El coágulo de fibrinógeno se separa del plasma según Bang y la proteína se determina por el método de Lowry o por la técnica usual del Biuret (25 vol. III).

Las proteínas totales en líquido cefaloraquídeo, se han podido determinar colorimétricamente, mediante el uso del reactivo del Biuret, de Nessler, de Folin-Ciocolteau y el de Ninhidrina. Nefelométricamente, con sulfato de amonio, ácido sulfosalicílico o ácido tricloroacético, e inmunquímicamente. A excepción de los métodos mencionados en último lugar, el resto necesita de un volumen de muestra de 0.5 a 2.5 ml.

Daughaday, Lowry, Rosebrough y Fieldas teniendo en cuenta las dificultades existentes para la obtención de tan grandes volúmenes de líquido cefaloraquídeo, como se necesitan para la mayoría de los métodos de análisis, idearon un método que solamente necesita de 0.2 ml. de muestra. Esta técnica analítica se -- basa en observaciones anteriores hechas por Merrior, Lowry, Rosebrough, Farr y Randall, acerca del incremento de color inducido por los iones cúpricos en presencia del reactivo fenólico de Folin-Ciocolteau, de proteínas en cuya composición entrase a formar parte la tirosina.

Knights, Mc. Donald y Plompuu describieron una ultramicrotécnica colorimétrica que necesita únicamente de 0.05 ml. de muestra.

Hasta el momento, no existe ningún método exacto y preciso de determinación de proteínas totales en líquido cefaloraquídeo que pueda adaptarse a la rutina diaria de los laboratorios de análisis clínicos.

Los métodos que se emplean usualmente varían tanto en exactitud como en complejidad.

Los resultados obtenidos mediante la determinación del nitrógeno por el método de Kjeldahl se admiten como referencia, pa

ro como se requiere de 15 ml. de muestra, lo cual resulta difícil llevarlo a cabo, además tarda mucho tiempo, ya que sólo para la digestión ácida se requiere de 2 a 3 horas.

Se han efectuado numerosas tentativas para encontrar una técnica precisa sencilla y práctica. Así, se ha recurrido al método de equivalencia de Jonhston-Gibson, añadiéndole iones cúpricos.

Daughaday, Lowry, Rosebrough y Fieldas, adaptaron un reactivo cuprofenólico a la determinación directa de proteínas. Estos investigadores restan una cantidad constante de 6 mgs. de proteínas por cada 100 ml de la cifra de proteínas totales obtenida, para corregir de esta manera el color producido por las -- sustancias cromógenas no protéicas.

Sin embargo, Sevensmark demostró, que pueden producirse errores hasta de 39 mgs. en 100 ml, pese a la aplicación del factor de corrección de Daughaday. Este autor estima necesario -- determinar las cifras de corrección individualmente, si se quiere evitar errores, lo cual complica el procedimiento.

Zondag, Van Boltezelver y Reider, han recomendado precaución al aplicar los métodos de equivalencia de la tirosina, en la -- determinación directa de proteínas del líquido cefaloraquídeo, ya que existen muchas drogas de uso común que interfieren sensiblemente la reacción colorida.

No obstante, la mayor sensibilidad de estos procedimientos, - permite realizar los análisis con volúmenes pequeños de muestra, lo cual explica que el método de Daughaday esté especialmente indicado para pediatría.

También se han empleado numerosos métodos del Biuret para de-

terminación de proteínas en el líquido cefaloraquídeo, la mayoría de ellas dan cifras mayores a las obtenidas por el método de Kjeldahl.

Si bien los resultados obtenidos con el método del Biuret, -- ideado por Goa, resultan comparables a los conocidos por el -- método de Johnston-Gibson.

Meulemans se ocupó de la determinación nefelométrica de proteínas en el líquido cefaloraquídeo y coincidiendo con investigadores anteriores, llegó a la conclusión de que los métodos -- turbidimétricos que emplean ácido sulfosalicílico, no proporcionan resultados precisos, ya que las cifras obtenidas dependen notoriamente de las concentraciones relativas de albúminas y globulinas. Puesto que el grado de turbidez es mayor con las albúminas que con las globulinas. Por ello, Meulemans publicó dos procedimientos perfeccionados (25 vol. V.)

En general, se han descrito numerosos métodos para la determinación de las proteínas séricas, de entre ellos, el método -- universalmente reconocido como típico, es la determinación de nitrógeno en Kjeldahl; una técnica excelente para su empleo, ha sido descrita recientemente por Hiller, Flazin y Van Slyke.

Se usan también los métodos basados en la apreciación de la densidad especialmente desde la introducción del método del sulfato de cobre por Phillips y colaboradores, sin embargo, la densidad del suero puede estar afectada por otros componentes. Se han empleado métodos gravimétricos, pero se necesita demasiado tiempo para ser utilizados en análisis clínicos.

La refractometría es también inadecuada para el trabajo clínico, debido a los grandes errores que pueden surgir sobre todo de la interferencia de los lípidos.

Las técnicas basadas en la determinación de tirosina, arginina u otro aminoácido, componente específico de las proteínas, están sujetas a errores a causa de las diferencias en el valor cromógeno de las distintas proteínas séricas. Ya que el complejo - proteínico sérico experimenta cambios en el transcurso de las enfermedades, por lo que pueden presentarse marcadas diferencias en reactividad.

El reactivo fenólico de Folin, usado tras el tratamiento preliminar del reactivo cúrpico-alcalino, es extraordinariamente sensible, pero adolece del inconveniente anterior.

La Ninhidrina se ha empleado con éxito como reactivo altamente sensible para la determinación de proteínas séricas totales.

La reacción del Biuret, tiene numerosas ventajas sobre otros procedimientos, para la medición de las proteínas séricas. Robinson y Hogden, han descrito un excelente método para la aplicación de la técnica del Biuret, requiere más tiempo que el procedimiento descrito aquí, porque las proteínas se separan primero por precipitación, antes del tratamiento con el reactivo del Biuret.

Gornall, Bardawill y David describieron un reactivo del Biuret modificado, para la determinación separada del albúminas y globulinas.

El método más ampliamente aceptado, es el electroforético de Tiselius.

Las cifras medias de albúmina, obtenidas por el método de pre-

precipitación salina que usa la mezcla de sulfato-sulfito sódicos, son casi idénticos con las del método electroforético, éste se comprobó en más de 100 sueros patológicos. Las diferencias raramente exceden de 0.5 gr., un valor que puede anticiparse sobre la base de la precisión del método electroforético.

El método de salinización se desvía del electroforético, más allá de este límite solamente cuando las cifras de gamma globulina dan valores extremadamente elevados (8gr/100 ml o mayores), por lo que la albúmina medida por este método es demasiado baja.

El sulfato sódico, a concentraciones elevadas, fué usado por Major y Milne a temperaturas de 37°C, empleando la filtración para la separación de la globulina.

Wolfson, Cohn y colaboradores, usaron el sulfito sódico en solución al 28%, pero esta técnica resulta complicada y en consecuencia menos conveniente que la mezcla de sulfato-sulfito. El uso del sulfito sódico como reactivo para fraccionamiento de proteínas, fué introducido por Campbell y Hanna.

Los presentes autores, encontraron que el sulfato sódico, fosfato sódico y el sulfato magnésico, usados para la precipitación por salinización de las globulinas, interfieren con la aplicación de la reacción del Biuret.

Cohn y colaboradores, han descrito diversos métodos, basados en el empleo del alcohol para la separación de las diferentes fracciones proteínicas, según los principios desarrollados en los laboratorios de Cohn. En estos procedimientos el control preciso de las temperaturas en la zona de -5° es esencial en todas las fases de la separación, salvo que se disponga de equipo ade

cuadramente refrigerado, suelen ser poco precisos los resultados obtenidos por este método. Lo mismo puede decirse del método de Fillimer y Hutchinson que sustituye el etanol por metanol -- (25 vol. IV.)

Se han utilizado diversos métodos para determinar la cantidad del total de proteínas en el suero o en otros líquidos biológicos en general no existe un método del todo satisfactorio, el de elección depende de la naturaleza de la proteína y ---- de los otros componentes presentes, así mismo, también de la rapidéz, exactitud y sensibilidad que se busque en el ensayo (23).

Uno de los métodos clásicos es el de Kjeldahl, en que la muestra se digiere con ácido sulfúrico y calor el nitrógeno de las proteínas con la mayor parte de los componentes nitrogenados se convierte en sulfato amónico, el amoníaco liberado se determina alcalinizando la solución, la que se destila hasta hacerla ácida y se titula o bien se le hace reaccionar con el -- reactivo de Nessler, para obtener una coloración mensurable. Si hay compuestos de nitrogeno distintos, será necesaria hacer una corrección, esta suele consistir en retirarlos por precipitación y determinar el nitrógeno no proteíco que se sustrae - del contenido en las proteínas de la muestra así puede calcularse la cantidad existente, si se conoce la proporción de nitrógeno presente en ellas.

En el suero humano, el factor de corrección para proteínas totales es 6.54 (17).

El análisis de nitrógeno por el método de Kejlldahl, se basa en que las proteínas contienen de 12 a 18% de nitrógeno por peso, ya que las mezclas han sido oxidadas a monóxido de carbono y

a iones amonio por calentamiento con ácido sulfúrico concentrado, se determina el NH_3 por varios métodos:

Titulación Kejldahl.- La adición de exceso de álcali a la solución ácida conteniendo iones amonio, causa la formación de amoníaco, se destila el vapor del amonio y se pasa a un sistema cerrado dentro de una solución valorada, en donde se titula.

En la prueba de Nessler, a las soluciones alcalinas conteniendo estos iones se les agrega yoduro mercúrico potásico, ---- (reactivo de Nessler) se produce una coloración naranja, debido al complejo formado, pudiéndose medir cuantitativamente a 440 nm en un fotocolorímetro (16).

La determinación de proteínas por el método del Biuret utiliza un reactivo alcalino de sulfato de cobre, la reacción depende de los enlaces peptídicos que caracterizan la proteína (17).

Este método se basa en que los compuestos que contienen dos o más enlaces peptídicos dan un color que va del púrpura característico, al azul con solución alcalina diluída de sulfato de cobre (16).

La prueba del biuret es posible reproducirla para cualquier -- proteína dada, requiriéndose grandes cantidades de ésta (1 a 20 mg) para el desarrollo del color.

El método de Folín-Ciocolteau, es otro de los métodos cuantitativos usados es sensible a mezclas conteniendo hasta 5 microgramos de proteínas.

El color formado por el reactivo de Folín-Ciocolteau se debe a la reacción de la proteína con el reactivo alcalino de cobre, como sucede en la reacción del biuret, a la reducción de las - sales fosfomolibdato-fosfotungstato del reactivo por la tirosii

na y triptofano (aminoácidos presentes en las diferentes proteínas) (16).

Otros métodos consisten en medir el enturbiamiento producido al añadir a una solución de proteínas un precipitante, éste es el utilizado con frecuencia para orina y líquido cefaloraquídeo. También se ha utilizado la medición del peso específico o del índice de refracción de la solución, con riesgo de que los componentes no proteínicos modifiquen estos valores, o por la medición de algún grupo o enlace característico presente en la molécula tales como el hidroxifenilo o uniones peptídicas (17).

En la determinación nefelométrica, las proteínas se mezclan con ácido tricloroacético a bajas concentraciones, ácido sulfosalicílico o ferrocianuro de potasio en ácido acético para producir la turbidez.

Bajo condiciones controladas de temperatura, concentración y tiempo de exposición a agentes precipitantes, el resultado se puede conocer por la turbidez leída a una densidad óptica de 500 nm.

En el ensayo espectrofotométrico de proteínas, los residuos de tirosina y triptofano exhiben una absorción ultravioleta aproximadamente de 275-280 nm, así la concentración de la proteína en una solución pura deber ser proporcional a su absorción.

Un número de proteínas puras en solución en cantidad de un -- miligramo de proteína por mililitro exhiben una densidad óptica especial a 280 nm.

Las ventajas de este ensayo son: rapidez, no hay destrucción de las enzimas, desafortunadamente otros compuestos presentes en materiales naturales exhiben esta misma absorción, específicamente los ácidos nucleicos, que presentan una absorción máxí

ma a 260 nm y continúan exhibiendo absorciones a una longitud de onda de 280 nm; debido a ésto se necesita hacer correcciones si la absorción está entre 260-280nm (23)

5.3. COMPARACION ENTRE DIVERSOS METODOS DE CUANTIFICACION DE PROTEINAS.

Se escoge la técnica en función del material que se va a analizar y del tipo de información que se busca.

a).- En el análisis de Kjeldahl para nitrógeno total, la cuantificación se hace después del aislamiento y precipitación adecuados, o bien, aplicando una corrección en función del nitrógeno no proteico.

Puede emplearse un factor de conversión para gramos de proteínas por gramos de nitrógeno.

b).- Método del Biuret.- Se utiliza una proteína conocida para construir una curva patrón.

c).- Método de Lowry.- Utiliza la modificación del método de -- Folin-Ciocalteu basado en presencia de tirosina y triptofano de las proteínas.

d).- Medición de absorción con luz ultravioleta.- A una longitud de onda de 280/260 milimicras después de eliminar las sustancias no proteínicas por diálisis o por fraccionamiento.

Debe emplearse un coeficiente de extinción apropiado para el estudio de proteínas especiales ($1.55 \times 280 - 0.775 \times 164$)= microgramos por mililitro de proteínas presentes.

e).- Medición de la densidad de una solución después de una purificación apropiada.

f).- Medición del índice de refracción de una solución de proteína.

g).- Pesada directa de la muestra purificada y deshidratada

h).- Incorporación de ácidos aminados radioactivos al material precipitándolo con ácido tricloroacético al 5%, en caliente, con la finalidad de medir la síntesis de proteínas en los estu-

dios metabólicos.

Se han utilizado los métodos a, b, c, y e además de f en análisis de alimentos y tejidos con objeto de ir verificando la purificación de ellos.

Los métodos g), h) e i) sólo pueden aplicarse a sustancias bastante puras o cuando es posible introducir un factor de conversión para la presencia de sales y otras sustancias no proteínicas.

Los métodos espectrofotométricos más usados son el de Lowry (sensibilidad entre 1 y 200 microgramos) y el de Biuret (sensibilidad de 0.25 a 200 miligramos).

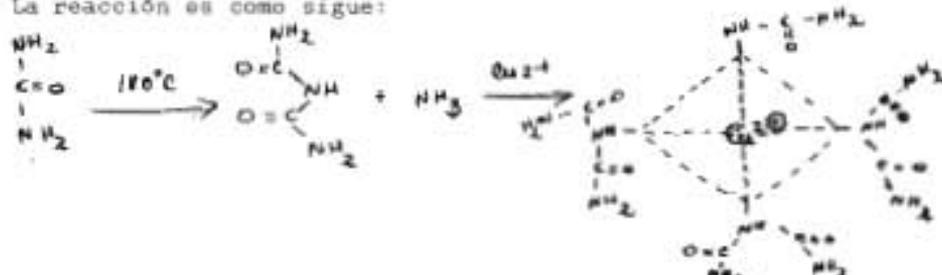
Los otros dos métodos espectrofotométricos (280/280) con sensibilidad de 0.05 a 200 miligramos). Y el método Delta 215/225 sensibilidad de 10 a 100 mgs. exige un espectrofotómetro más sensible.

El inconveniente más grave de estas técnicas, se relaciona con el hecho de que las distintas proteínas, muestran espectros de absorción diferentes y que ningún patrón proteínico único basta para estudiar cualquier proteína.

La mejor manera es preparar una curva patrón de referencia con la propia proteína que se quiere estudiar pero esto no siempre es posible pues no se dispone de muestras precisas de cada proteína problema (14).

5.4. DETERMINACION DE PROTEINAS POR EL METODO DEL BIURET

Cuando la urea es calentada a cerca de 180°C , se descompone dándonos un producto llamado "biuret", el cual en presencia de cobre en solución alcalina forma un complejo violeta rojizo. - La reacción es como sigue:



Esta reacción es la base en la determinación de proteínas en suero y en otros líquidos biológicos (4).

Fundamento del método.- Todas las proteínas contienen enlaces de péptido, si se trata una solución de proteínas con iones cobre en un medio moderadamente alcalino, se forma un complejo quelato coloreado de composición desconocida, entre el ión cobre y los grupos carboxilo y amino, de los enlaces de péptido ocurre una reacción semejante entre el ión cúprico y el compuesto orgánico biuret por ello se le llamó: "reacción del biuret". Aminoácidos y dipéptidos nos pueden dar la reacción, pero tri péptidos, polipéptidos y proteínas dan productos de color rosa a violeta rojizo.

En la práctica un ión cúprico enlaza a cuatro o seis enlaces de péptido por medio de enlaces coordinados, la intensidad del color producido es proporcional a la cantidad de enlaces peptídicos.

Así este método se considera un procedimiento colorimétrico simple y rápido para la cuantificación de proteínas, este reactivo tiene un período de estabilidad limitado ya que las sales de --

cobre son susceptibles a la autoreducción con formación de hidróxido de cobre (23).

Weichelbaum usó el tartrato de sodio y potasio como estabilizador y yoduro de potasio para prevenir autoreducción, sin embargo es inestable en almacenamiento prolongado.

Gornall retuvo el tartrato como estabilizador observando que el yoduro de potasio era innecesario ya que la autoreducción ocurría cuando se utilizaba sulfato de cobre impuro.

El reactivo de Benedict ha sido utilizado también, ya que contiene citrato como agente estabilizador, siendo de baja alcalinidad, este procedimiento usa solución de hidróxido de sodio al 3%, lo cual es una ventaja ya que el máximo de color producido en la reacción del biuret se lleva a cabo cuando la concentración final de sosa está entre 1.2 a 2.8.

La absorción máxima del complejo proteína-biuret en el espectro visible ocurre a 545 milimicras.

La proteína total en suero normal es determinada por la reacción del Biuret, aumentos sutiles pueden ser determinados por el método de Kjaeldahl.

La reacción del biuret ha sido adaptado al autoanalizador usando el reactivo descrito por Weichelbaum.

Muchos investigadores han aportado datos acerca del método de los que pueden citarse: Kingsley (1942), Mehl (1945), Weichelbaum (1946) y Reinhold (1953).

Principalmente en relación a la modificación y cambios en la composición del reactivo (12).

El método de Reinhold está dado y es recomendado para el uso de rutina diaria.

La refractometría es también inadecuada para el trabajo clínico, debido a los grandes errores que pueden surgir sobre todo de la interferencia de los lípidos.

Las técnicas basadas en la determinación de tirosina, arginina u otro aminoácido, componente específico de las proteínas, están sujetas a errores a causa de las diferencias en el valor cromógeno de las distintas proteínas séricas. Ya que el complejo - proteínico sérico experimenta cambios en el transcurso de las enfermedades, por lo que pueden presentarse marcadas diferencias en reactividad.

El reactivo fenólico de Folin, usado tras el tratamiento preliminar del reactivo cúrpico-alcalino, es extraordinariamente sensible, pero adolece del inconveniente anterior.

La Ninhidrina se ha empleado con éxito como reactivo altamente sensible para la determinación de proteínas séricas totales.

La reacción del Biuret, tiene numerosas ventajas sobre otros procedimientos, para la medición de las proteínas séricas. Robinson y Hogden, han descrito un excelente método para la aplicación de la técnica del Biuret, requiere más tiempo que el procedimiento descrito aquí, porque las proteínas se separan primero por precipitación, antes del tratamiento con el reactivo del Biuret.

Gornall, Bardawill y David describieron un reactivo del Biuret modificado, para la determinación separada del albúminas y globulinas.

El método más ampliamente aceptado, es el electroforético de Tiselius.

Las cifras medias de albúmina, obtenidas por el método de pre-

precipitación salina que usa la mezcla de sulfato-sulfito sódicos, son casi idénticos con las del método electroforético, esto se comprobó en más de 100 sueros patológicos. Las diferencias regularmente exceden de 0.5 gr., un valor que puede anticiparse sobre la base de la precisión del método electroforético.

El método de salinización se desvía del electroforético, más allá de este límite solamente cuando las cifras de gamma globulina dan valores extremadamente elevados (8gr/100 ml o mayores), por lo que la albúmina medida por este método es demasiado baja.

El sulfato sódico, a concentraciones elevadas, fué usado por Major y Milne a temperaturas de 37°C, empleando la filtración para la separación de la globulina.

Wolfson, Cohn y colaboradores, usaron el sulfito sódico en solución al 2%, pero esta técnica resulta complicada y en consecuencia menos conveniente que la mezcla de sulfato-sulfito. El uso del sulfito sódico como reactivo para fraccionamiento de proteínas, fué introducido por Campbell y Hanna.

Los presentes autores, encontraron que el sulfato sódico, fosfato sódico y el sulfato magnésico, usados para la precipitación por salinización de las globulinas, interfieren con la aplicación de la reacción del Biuret.

Cohn y colaboradores, han descrito diversos métodos, basados en el empleo del alcohol para la separación de las diferentes fracciones proteínicas, según los principios desarrollados en los laboratorios de Cohn. En estos procedimientos el control preciso de las temperaturas en la zona de 5°C es esencial en todas las fases de la separación, salvo que se disponga de equipo ade

cuadamente refrigerado, suelen ser poco precisos los resultados obtenidos por este método. Lo mismo puede decirse del método de Pillimer y Hutchinson que sustituye el etanol por metanol -- (25 vol. IV.)

Se han utilizado diversos métodos para determinar la cantidad del total de proteínas en el suero o en otros líquidos biológicos en general no existe un método del todo satisfactorio, el de elección depende de la naturaleza de la proteína y ---- de los otros componentes presentes, así mismo, también de la rapidez, exactitud y sensibilidad que se busque en el ensayo (23).

Uno de los métodos clásicos es el de Kjeldahl, en que la muestra se digiere con ácido sulfúrico y calor el nitrógeno de las proteínas con la mayor parte de los componentes nitrogenados se convierte en sulfato amónico, el amoníaco liberado se determina alcalinizando la solución, la que se destila hasta hacerla ácida y se titula o bien se le hace reaccionar con el -- reactivo de Nessler, para obtener una coloración mensurable. Si hay compuestos de nitrógeno distintos, será necesaria hacer una corrección, esta suele consistir en retirarlos por precipitación y determinar el nitrógeno no proteico que se sustrae - del contenido en las proteínas de la muestra así puede calcularse la cantidad existente, si se conoce la proporción de nitrógeno presente en ellas.

En el suero humano, el factor de corrección para proteínas totales es 8.54 (17).

El análisis de nitrógeno por el método de Kjeldahl, se basa en que las proteínas contienen de 12 a 18% de nitrógeno por peso, ya que las mezclas han sido oxidadas a monóxido de carbono y

a iones amonio por calentamiento con ácido sulfúrico concentrado, se determina el NH_3 por varios métodos:

Titulación Kejldahl.- La adición de exceso de álcali a la solución ácida conteniendo iones amonio, causa la formación de amoníaco, se destila el vapor del amonio y se pasa a un sistema cerrado dentro de una solución valorada, en donde se titula.

En la prueba de Nessler, a las soluciones alcalinas conteniendo estos iones se les agrega yoduro mercúrico potásico, ----- (reactivo de Nessler) se produce una coloración naranja, debido al complejo formado, pudiéndose medir cuantitativamente a 440 nm en un fotocolorímetro (16).

La determinación de proteínas por el método del Biuret utiliza un reactivo alcalino de sulfato de cobre, la reacción depende de los enlaces peptídicos que caracterizan la proteína (17).

Este método se basa en que los compuestos que contienen dos o más enlaces peptídicos dan un color que va del púrpura característico, al azul con solución alcalina diluída de sulfato de cobre (16).

La prueba del biuret es posible reproducirla para cualquier -- proteína dada, requiriéndose grandes cantidades de ésta (1 a 20 mg) para el desarrollo del color.

El método de Folin-Ciocolteau, es otro de los métodos cuantitativos usados es sensible a mezclas conteniendo hasta 5 microgramos de proteínas.

El color formado por el reactivo de Folin-Ciocolteau se debe a la reacción de la proteína con el reactivo alcalino de cobre, como sucede en la reacción del biuret, a la reducción de las - sales fosfomolibdato-fosfotungstato del reactivo por la tirosi

na y triptofano (aminoácidos presentes en las diferentes proteínas) (16).

Otros métodos consisten en medir el enturbiamiento producido al añadir a una solución de proteínas un precipitante, éste es el utilizado con frecuencia para orina y líquido cefaloraquídeo. También se ha utilizado la medición del peso específico o del índice de refracción de la solución, con riesgo de que los componentes no proteínicos modifiquen estos valores, o por la medición de algún grupo o enlace característico presente en la molécula tales como el hidroxifenilo o uniones peptídicas (17).

En la determinación nefelométrica, las proteínas se mezclan con ácido tricloroacético a bajas concentraciones, ácido sulfosalicílico o ferrocianuro de potasio en ácido acético para producir la turbidez.

Bajo condiciones controladas de temperatura, concentración y tiempo de exposición a agentes precipitantes, el resultado se puede conocer por la turbidez leída a una densidad óptica de 500 nm.

En el ensayo espectrofotométrico de proteínas, los residuos de tirosina y triptofano exhiben una absorción ultravioleta aproximadamente de 275-280 nm, así la concentración de la proteína en una solución pura deber ser proporcional a su absorción.

Un número de proteínas puras en solución en cantidad de un -- miligramo de proteína por mililitro exhiben una densidad óptica especial a 280 nm.

Las ventajas de este ensayo son: rapidez, no hay destrucción de las enzimas, desafortunadamente otros compuestos presentes en materiales naturales exhiben esta misma absorción, específicamente los ácidos nucleicos, que presentan una absorción máxi

ma a 260 nm y continúan exhibiendo absorciones a una longitud de onda de 280 nm; debido a ésto se necesita hacer correcciones si la absorción está entre 260-280nm (23)

5.3. COMPARACION ENTRE DIVERSOS METODOS DE CUANTIFICACION DE PROTEINAS.

Se escoge la técnica en función del material que se va a analizar y del tipo de información que se busca.

a).- En el análisis de Kjeldahl para nitrógeno total, la cuantificación se hace después del aislamiento y precipitación adecuados, o bien, aplicando una corrección en función del nitrógeno no proteico.

Puede emplearse un factor de conversión para gramos de proteínas por gramos de nitrógeno.

b).- Método del Biuret.- Se utiliza una proteína conocida para construir una curva patrón.

c).- Método de Lowry.- Utiliza la modificación del método de -- folin-Ciocolteau basado en presencia de tirosina y triptofano -- de las proteínas.

d).- Medición de absorción con luz ultravioleta.- A una longitud de onda de 280/260 milimicras después de eliminar las sustancias no proteínicas por diálisis o por fraccionamiento.

Debe emplearse un coeficiente de extinción apropiado para el -- estudio de proteínas especiales ($1.55 \times 280 - 0.775 \times 154$)= microgramos por mililitro de proteínas presentes.

e).- Medición de la densidad de una solución después de una purificación apropiada.

f).- Medición del índice de refracción de una solución de proteína.

g).- Pesada directa de la muestra purificada y deshidratada

h).- Incorporación de ácidos aminados radioactivos al material precipitándolo con ácido tricloroacético al 5%, en caliente, -- con la finalidad de medir la síntesis de proteínas en los estu-

dios metabólicos.

Se han utilizado los métodos a, b, c, y e además de f en análisis de alimentos y tejidos con objeto de ir verificando la purificación de ellos.

Los métodos g), h) e i) sólo pueden aplicarse a sustancias bastante puras o cuando es posible introducir un factor de conversión para la presencia de sales y otras substancias no proteínicas.

Los métodos espectrofotométricos más usados son el de Lowry (sensibilidad entre 1 y 200 microgramos) y el de Biuret (sensibilidad de 0.25 a 200 miligramos).

Los otros dos métodos espectrofotométricos (280/260) con sensibilidad de 0.05 a 200 miligramos). Y el método Delta 215/225 sensibilidad de 10 a 100 mgs. exige un espectrofotómetro más sensible.

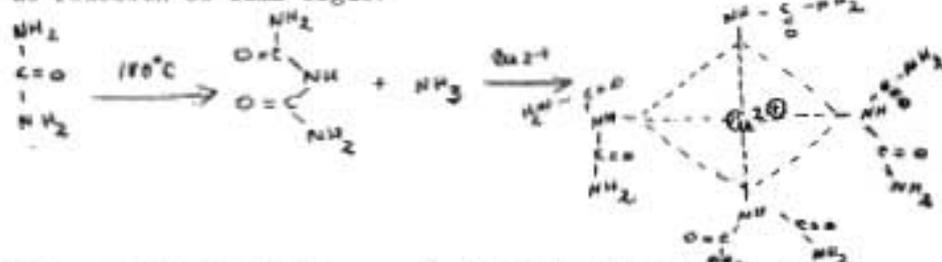
El inconveniente más grave de estas técnicas, se relaciona con el hecho de que las distintas proteínas, muestran espectros de absorción diferentes y que ningún patrón proteínico único basta para estudiar cualquier proteína.

La mejor manera es preparar una curva patrón de referencia con la propia proteína que se quiere estudiar pero esto no siempre es posible pues no se dispone de muestras precisas de cada proteína problema (14).

5.4. DETERMINACION DE PROTEINAS POR EL METODO DEL BIURET

Cuando la urea es calentada a cerca de 180°C , se descompone dándonos un producto llamado "biuret", el cual en presencia de cobre en solución alcalina forma un complejo violeta rojizo. -

La reacción es como sigue:



Esta reacción es la base en la determinación de proteínas en suero y en otros líquidos biológicos (4).

Fundamento del método.- Todas las proteínas contienen enlaces de péptido, si se trata una solución de proteínas con iones cobre en un medio moderadamente alcalino, se forma un complejo quelato coloreado de composición desconocida, entre el ión cobre y los grupos carboxilo y amino, de los enlaces de péptido ocurre una reacción semejante entre el ión cúprico y el compuesto orgánico biuret por ello se le llamó: "reacción del biuret". Aminoácidos y dipéptidos nos pueden dar la reacción, pero tri péptidos, polipéptidos y proteínas dan productos de color rosa a violeta rojizo.

En la práctica un ión cúprico enlaza a cuatro o seis enlaces de péptido por medio de enlaces coordinados, la intensidad del color producido es proporcional a la cantidad de enlaces peptídicos.

Así este método se considera un procedimiento colorimétrico simple y rápido para la cuantificación de proteínas, este reactivo tiene un período de estabilidad limitado ya que las sales de --

cobre son susceptibles a la autoreducción con formación de hidróxido de cobre (23).

Weichelbaum usó el tartrato de sodio y potasio como estabilizador y yoduro de potasio para prevenir autoreducción, sin embargo es inestable en almacenamiento prolongado.

Gornall retuvo el tartrato como estabilizador observando - que el yoduro de potasio era innecesario ya que la aureducción ocurría cuando se utilizaba sulfato de cobre impuro.

El reactivo de Benedict ha sido utilizado también, ya que contiene citrato como agente estabilizador, siendo de baja alcalinidad, este procedimiento usa solución de hidróxido de sodio al 3%, lo cual es una ventaja ya que el máximo de color producido en la reacción del biuret se lleva a cabo cuando la concentración final de sosa está entre 1.2 a 2.8.

La absorción máxima del complejo proteína-biuret en el espectro visible ocurre a 545 milimicas.

La proteína total en suero normal es determinada por la reacción del Biuret, aumentos sutiles pueden ser determinados por el método de Kjaeldahl.

La reacción del biuret ha sido adaptado al autoanalizador usando el reactivo descrito por Weichelbaum.

Muchos investigadores han aportado datos acerca del método de los que pueden citarse: Kingsley (1942), Mehl (1945), Weichelbaum (1946) y Reinhold (1953).

Principalmente en relación a la modificación y cambios en la composición del reactivo (12).

El método de Reinhold está dado y es recomendado para el uso de rutina diaria.

Por este método las globulinas precipitan en una solución de sulfato y sulfito de sodio en proporción de 3:1, la solución final tendrá una concentración cercana al 26%.

Kingsley introdujo el primer método al laboratorio clínico sensible, sencillo y práctico, desde entonces ha llegado a ser el método de elección para medición de proteínas debido a su simplicidad, precisión y exactitud.

Con la mayoría de los métodos basados en la reacción del biuret se pueden determinar proteínas en un intervalo de concentración de 0.5 a 5 mgs en la porción alícuota que se mide, se dispone de gran número de modificaciones al procedimiento sólo variando en pormenores y en la composición del reactivo usado para formar la coloración.

El método actualmente utilizado se basa en el procedimiento de Reinhold en el que se usa la fórmula de Weichelbaum y servirá de ejemplo a esta técnica de cuantificación de proteínas del suero (16)

5.5. DETERMINACION DE PROTEINAS DEL SUERO POR EL METODO DE KJELDAHL

La valoración de proteínas del suero se presta a algunas abreviaciones atrayentes, las proteínas totales, por ejemplo, se pueden medir por medición del índice de refracción y las proteínas totales y la fracción de albúmina separadamente por la reacción del biuret.

Sin embargo, se ha observado que el método Kjeldahl no es sólo rápido sino también sumamente fiel y reproducible aunque para fines clínicos la relación albúmina/globulina proporciona datos bastante menos útiles que los obtenidos separando la albúmina y las diversas fracciones por electroforesis, la mejor manera de valorar proteínas del suero en laboratorio clínico es por lo tanto hallar las proteínas totales por el método de Kjeldahl y las diversas fracciones por electroforesis (17).

Fundamento del método.- Como todas las proteínas contienen nitrógeno se pueden determinar por medición del nitrógeno presente en la proteína aislada, hasta hace poco se ha aceptado que el 16% de la masa de proteínas del suero era nitrógeno y de ello se deduce:

$$\text{Proteína} = \frac{1.0}{16} \times N = 6.25 \times N$$

Nuevos estudios han indicado que podría acercarse este valor a 6.45, sin embargo, en el presente se ha convenido en seguir utilizando este factor.

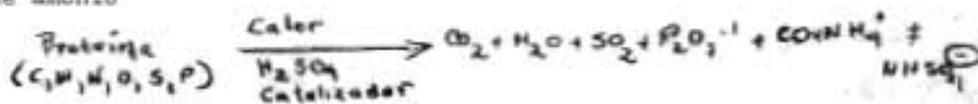
En trabajo preciso se emplea ácido tricloroacético o ácido wolfrámico para precipitar las proteínas, pues el nitrógeno proteico se separa con el líquido sobrenadante.

El precipitado lavado, se transfiere a tubos de digestión de Kjeldahl y la materia orgánica se oxida por calentamiento con

ácido sulfúrico, a reflujo con o sin adición de catalizadores como sulfato de cobre y sulfato de mercurio, selenio o dióxido de selenio para acelerar las reacciones de oxidación.

Para una buena oxidación debe de calentarse de 340°C a 360°C , - aproximadamente agregando sulfato de amonio para acelerar el -- punto de ebullición del ácido sulfúrico.

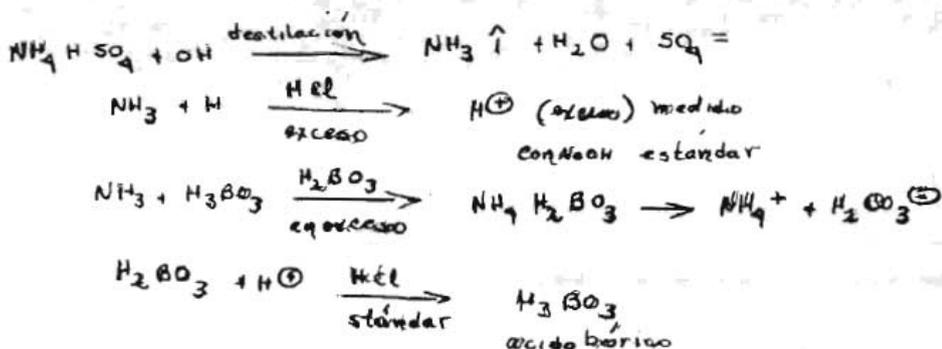
Por este método los elementos carbono, nitrógeno, oxígeno, hidrógeno, de las proteínas son oxidados a dióxido de carbono, monóxido de carbono, agua y SO_2 y el nitrógeno se convierte en sulfato de amonio



El cual se mide por adición de alcalí en exceso y destilación - del amoníaco liberado, que se recogen en ácido valorado, o por destilación del amoníaco y recogida del mismo en ácido bórico y medición del amoníaco atrapado como $\text{NH}_4\text{H}_2\text{BO}_3$ y se valora con -- HCL.

También puede medirse el amoníaco formado en la digestión del Kjeldahl por Nesslerización directa del digesto o del amoníaco destilado, sin embargo no se recomienda ninguno de estos procedimientos pues su precisión es mucho menor que la de los otros métodos de valoración dados antes y los catalizadores cobre y mercurio interfieren en la reacción de Nessler.

En la práctica la reacción de Kjeldahl se efectúa directamente en una alícuota del suero y el valor de nitrógeno total se corrige del nitrógeno no proteínico determinado aparte por una reacción para NNP.



El método Kjeldahl es demasiado lento, para análisis de rutina de gran número de muestras, se usa principalmente como un método de referencia con el cual se comparan otros métodos, pues posee alta precisión y gran exactitud (16).

El contenido de nitrógeno de la mayoría de las fracciones proteínicas en suero varía considerablemente, debido a ésto el valor del nitrógeno de Kjeldahl no podrá usarse como un patrón -- absoluto para la cuantificación de proteínas del suero, si es que puede haberlo, sin embargo, es práctica convencional calibrar otros métodos con respecto a él (16).

Kjeldahl introdujo su método en 1883 usando una mezcla de ácido sulfúrico y ácido fosfórico para la digestión y permanganato de potasio fué agregado para oxidar compuestos alcalinos los -- cuales eran resistentes a la oxidación.

El uso de sales de cobre hace al digesto inadecuado para cualquiera de las determinaciones ya sea nesslerización directa o determinación gasométrica de amoníaco.

La comparación de las técnicas diferentes de Kjeldahl deben hacerse usando sustancias puras de cantidad de nitrógeno conocida.

El factor más importante por este método es el tiempo de digestión, para muestras de suero se recomienda para continuar el ca

lentamiento por media hora o dos horas después de que la mezcla esté clara; la validez de la determinación de proteína basada en el análisis de nitrógeno total descansa en dos bases:

- a).- Se obtiene una completa y casi constante cantidad de nitrógeno de proteína en el análisis.
- b).- Constancia en el contenido de nitrógeno de las distintas proteínas en una muestra biológica (1).

5.4. METODO KJELDAHL NESSLERIZACION.

En la determinación, se calienta fuertemente la mezcla de digestión para descomponer las sustancias nitrogenadas, adicionando solución de Nessler para obtener el color amarillo característico, cuya intensidad se mide en un fotocolorímetro.

En la segunda determinación el nitrógeno no proteínico es determinado por el método Kjeldahl descrito anteriormente, este procedimiento se conoce como digestión y nesslerización (18).

En una modificación a este método las proteínas se rompen en soluciones de amoníaco y el amoníaco se determina por medio de una solución de hipoclorito alcalino (1).

En cálculo de proteína total será:

$$\text{Proteína total} = (\text{Proteína total} - \text{NNP}) \times 6.25.$$

La albúmina se determina precipitando a la globulina con sulfato de sodio y al filtrado conteniendo la albúmina se trata por digestión y nesslerización para la determinación de nitrógeno total.

$$\text{Albúmina} = (\text{nitrógeno total} - \text{NNP}) \times 6.25$$

La globulina es determinada como sigue:

$$\text{Globulina} = (\text{proteína total} - \text{albúmina}) \quad (18)$$

5.7.5.- METODOS DE DETERMINACION DE FIBRINOGENO EN PLASMA

El fibrinógeno es una glicoproteína del plasma de aproximadamente un peso molecular de 330,000, la cual es sintetizada en hígado.

La molécula es un dímero consistente de tres pares de cadenas de polipéptidos que se cree están unidos por enlaces disulfuro.

(4).

El fibrinógeno es uno de los factores proteínicos del plasma que intervienen en el proceso de coagulación de la sangre. La concentración de fibrinógeno en plasma es de 200 a 400 mgs. por 400 ml (0.2 a 4.0 g/100 ml) no hay nada de fibrinógeno en suero, pues se separa como fibrina en el proceso de coagulación.

La conversión de fibrinógeno a coágulo de fibrina ocurre en dos fases:

Durante la primera fase o enzimática sucede una interacción compleja de protrombina con otros factores de coagulación en presencia de iones calcio, produciendo cuatro enlaces de péptido en la molécula de fibrinógeno y así mismo, producir dos pares de cadenas de péptido pequeñas designada como fibrinopéptido A y B, carbohidrato libre y un monómero de fibrina.

En la segunda fase o fase de polimerización los monómeros de fibrina unidos por enlace de hidrógeno final se unen para formar una molécula tridimensional insoluble.

En presencia de calcio el coágulo de fibrina es estabilizado por el factor XIII o factor de estabilización de la fibrina. La trombina formada en la segunda etapa de la coagulación actúa sobre el fibrinógeno para escindir de él un fragmento de

péptido, con formación de fibrina insoluble, la cual constituye el coágulo propiamente dicho.

El péptido fibrina escindido de la molécula de fibrinógeno por acción de la trombina contiene un 3% de nitrógeno de la proteína original (4).

Las fibrillas de fibrinógeno se agregan unas a otras con formación de un gel de fibrina tridimensional con enlace transversal, en el caso del plasma se produce un gel incoloro translúcido, pero en la coagulación de la sangre el gel es rojo a causa de eritrocitos atrapados, al dejarlo en reposo, el gel se contrae (sinéresis) y forma una masa más compacta.

En el suero no existe fibrinógeno pues se separa como fibrina en el proceso de coagulación (16).

Existen varios métodos cuantitativos de determinación de fibrinógeno, en algunos se aísla el fibrinógeno como fibrina de las otras proteínas del plasma, se efectúa la coagulación diluyendo el plasma con solución salina y agregando trombina exógena o iones calcio en exceso para vencer el anticoagulante, el coágulo ya aislado y lavado se analiza por algunos de los métodos de determinación de proteínas, medición del nitrógeno por el método Kjeldahl multiplicando el resultado por el factor de 5.95 (16.9%) de nitrógeno o redisolviendo en sosa y midiendo la proteína por los métodos de biuret, Folin-Ciocalteu o del fenol y cobre, de Lowry o por medición de absorción de luz ultravioleta a 280 nm, hay bastante desacuerdo acerca del equivalente de tirosina del fibrinógeno medido por el método de Folin por ello son preferidos los métodos del biuret y del fenol y cobre (16).

Otro grupo de métodos se basan en la adición de suficiente solución salina para causar la precipitación de fibrinógeno solamente y no de alguna proteína del plasma y se mide la turbidez de la suspensión, para ésto, se diluye el plasma 1:10 o -- 1:20 o con una solución salina, sulfito de sodio al 12.5%, sulfato de sodio al 10.5% y sulfito de amonio al 13.4%.

Estos métodos nefelométricos pueden proporcionar resultados relativamente valiosos, en breve tiempo en caso de urgencia, sin embargo no tienen la especificidad de los métodos basados en el aislamiento de fibrina y los resultados con ellos obtenidos en el intervalo de concentración por debajo de 0.1 g/100 ml no -- son muy dignos de confianza.

En general, los métodos de cuantificación se basan en:

- a).- Conversión enzimática de fibrina y trombina.
- b).- Métodos de especificidad inmunológica.
- c).- Métodos de labilidad al calor
- d).- Métodos de determinación electroforéticos

Se podrían citar como fuentes de error en determinaciones químicas la oclusión de otras proteínas del suero, debido a desnaturalización es aconsejable entonces la compresión manual del precipitado, sinéresis prolongada, dilución del plasma antes de -- la coagulación y lavado prolongado del precipitado, pues ésto ayuda a reducir esta fuente de error, además del control del -- pH.

También puede suceder que se haga una recolección incompleta de fibrina a bajas concentraciones de fibrinógeno o de proteínas totales a medida que el coágulo se está formando (4).

Ellie y Stransky describieron un método de turbidez por adi---

ción de trombina al plasma en solución amortiguadora de barbital.

Una prueba rápida de estimación de fibrinógeno en el coágulo - está basada en la toma del tiempo requerido para la formación del coágulo de fibrina después de la adición de trombina al plasma oxalatoado y citratoado.

El tiempo requerido para la coagulación es proporcional a la concentración del fibrinógeno, pero compuestos como heparina o productos de descomposición del fibrinógeno interfieren en la determinación.

Un análisis semicuantitativo rápido es el método de dilución - *titulación) introducido por Schneider en 1952, se prepara diluciones de sangre total en solución de Ringer y el punto final se toma como la dilución mayor en la que ocurre precipitado.

Dentro del segundo grupo de métodos basados en la insolubilidad del fibrinógeno que involucran el fraccionamiento salino, quizá el mejor conocido es el de Campbell y Hanna el cual usa una solución de sulfito de sodio a concentración de 11.9%, seguida de la determinación de nitrógeno por el método Kjeldahl en el precipitado lavado.

Un método rápido y semicuantitativo consiste en utilizar partículas de látex que se recubren con fibrinógeno antihumano y reaccionan directamente con el plasma (Pi test) (8).

Otros métodos de cuantificación de fibrinógeno se llevan a cabo por calentamiento a 50°C, durante 10 minutos, las medidas del precipitado son anotadas para correlacionar otros métodos como el de coágulo de fibrina y técnicas de precipitación con

sulfito de sodio.

Por medio de la electroforesis se observa que el fibrinógeno - tiene una movilidad electroforética intermedia entre las globulinas beta y las gamma, pero la separación es incompleta.

De las determinaciones en base al rompimiento proteínico de fibrinógeno y fibrina se han observado que existen interferencias en la conversión de fibrinógeno a fibrina debidas a la trombina y a los productos de degradación resultantes, puede haber disminución de valores de fibrinógeno en métodos de coagulación de fibrina, así mismo se puede decir que se requiere de una gran sensibilidad en técnicas inmunoquímicas tales como aglutinación de partículas de látex o inmunolectroforesis (4).

5.8.- METODOS DE DETERMINACION DE ALBUMINA Y GLOBULINAS TOTALES

Además de la electroforesis los recursos usados en la determinación de albúmina y globulinas son los siguientes:

- 1.- Separación de albúmina y globulinas totales por técnicas de precipitación.
- 2.- Ensayo nefelométrico de globulinas
- 3.- Determinación de albúmina por "error proteínico de indicadores" utilizando colorantes como anaranjado de metilo.
- 4.- Determinación del total de globulinas basado en el contenido de triptofano.

Estas técnicas han sido aplicadas principalmente a suero y plasma, presentan limitaciones para líquido cefalorraquídeo y orina (4)

5.9. DETERMINACION DE ALBUMINA Y GLOBULINAS TOTALES POR TECNICAS DE PRECIPITACION

En esta técnica la proteína total se determina usualmente por la técnica del biuret; se precipitan las globulinas con soluciones de sulfato de amonio y sulfato de magnesio y las albúminas se determinan en la solución remanente.

Howe en 1921 describió un método para el fraccionamiento proteínico con sulfato de sodio y su procedimiento fué utilizado por muchos años, desde 1901.

El procedimiento de Majeor utiliza sulfato de sodio con una concentración final de 26.8%, emplea la electroforesis de Tiselius con el objeto de separar el precipitado de globulinas que se forma al agregar la solución salina, la solución de proteína sal se agita con éter para disminuir la densidad de las globulinas y posteriormente se centrifuga (4).

La albúmina en la fase acuosa se determina por el método del Biuret y las globulinas totales por diferencia del contenido -

total de proteínas en el suero original.

En 1937 Campbell y Hanna introdujeron el uso de sulfito de sodio para el fraccionamiento del suero y en 1948 Wolfson y colaboradores presentaron una modificación del procedimiento el cual -- sigue usándose aún como procedimiento de referencia.

Una concentración final de 26.9% de sulfito de sodio se usa para la precipitación de todas las globulinas del suero.

Una vez precipitadas se separan de la mezcla de sal-proteína -- por medio de agitación con éter seguida por centrifugación.

Las ventajas del uso de sulfato y sulfito sódico se refieren a su capacidad amortiguadora y además las operaciones que pueden -- llevarse a cabo a temperatura ambiente sin cristalización de la sal.

Debido a la interacción entre proteínas diferentes y de anio-- nes y cationes, los fraccionamientos deben de llevarse a cabo a pH a los cuales todas las moléculas de proteína posean una carga neta del mismo signo, con sulfito de sodio el pH es suficientemente alto de modo de que está por encima del punto iso-- eléctrico de todas las proteínas presentes.

En comparación de los procesos de precipitación con la electro-- forésis de Tiselius, el sulfato de sodio al 26.8% proporciona mejores resultados que el sulfito de sodio al 26.9% pero en -- ambos casos un exceso de agitación con éter desnaturaliza a la proteína y aumenta la cantidad de proteína precipitada provocando resultados erróneos en ambas fracciones.

Las soluciones de sulfito de sodio son inestables ya que con el tiempo el sulfito se oxida a sulfato y la precipitación disminuye, fraccionamientos con sulfato de sodio dan resultados -- más bajos para albúmina que los que dan con anaranjado de meti

lo o por el procedimiento de electroforesis.

Se ha descrito la precipitación de globulinas con ácido tricloroacético, al 2% en etanol, por dos horas a temperatura ambiente para precipitar cuantitativamente las globulinas totales, la albúmina en el sobrenadante es entonces determinada por un análisis Kjeldahl o por la reacción del biuret.

Sin embargo los métodos de fraccionamiento salino han sido propuestos para orina y líquido cefaloraquídeo y su uso frecuentemente provoca un serio error, los resultados obtenidos por fraccionamiento salino usualmente no son comparables con los obtenidos por electroforesis (4).

5.10.- ENSAYO NEFELOMETRICO DE GLOBULINAS TOTALES

Debido a su simplicidad la determinación de precipitados es --- atractiva y diversos métodos han sido propuestos para la determinación del total de globulinas en suero precipitadas con solución de sulfato de amonio saturada sulfato de sodio y sulfito de sodio.

La turbidez puede estar afectada por variaciones en la concentración de proteína, sin embargo, su cuidadoso control puede producir resultados satisfactorios, los autores recomiendan una técnica nefelométrica cuando no existe otra alternativa o cuando se desea una gran exactitud y precisión (4)

5.11.- FRACCIONAMIENTO SALINO DE GLOBULINAS EN SUERO.

Wolfson y colaboradores, fraccionaron las globulinas del suero usando una solución al 22% de sulfato de sodio para precipitar a las beta y gamma globulinas y una solución de sulfato de --- amonio-ácido clorhídrico para precipitar a las gamma globulinas.

Basándose en esto es posible calcular a la albúmina alfa y globulina alfa, beta y gamma, obteniéndose resultados los cuales corresponden a los obtenidos por electroforesis (12).

5.42.-PRECIPITACION DE GLOBULINA GAMMA CON SULFATO DE AMONIO

Varios investigadores han usado sulfato de amonio para precipitar la fracción de globulina gamma, así Wolfson y colaboradores en 1948(12) usaron una solución conteniendo 193 g de sulfato de amonio y 40 g de cloruro de sodio por litro.

De la Huerga y Popper en 1950 emplearon una pequeña diferencia en el reactivo conteniendo 189 grs. de sulfato de amonio y 29.3 g de cloruro de sodio por litro.

Jager y Nickerson en 1948 usaron solución de sulfato de amonio al 33% en saturación ajustando el pH al 7.0 con hidróxido de amonio diluido.

Pillimer y Hutchinson en 1945 demostraron la precipitación de las globulinas con el uso de metanol (12).

5.43.- METODOS DE CUANTIFICACION DE ALBUMINA EN SUERO.-

Los métodos para la estimación de albúmina en suero se clasifican en tres tipos:

- 1).- Análisis de albúmina por la técnica del biuret, después de separar las globulinas por precipitación salina. (método de Reinhold-Kingsley)
- 2).- Medición directa de albúmina por medio de su enlace a colorantes como anaranjado de metilOHABA y verde de bromocresol.
- 3).- Análisis de albúmina después de la separación por procedimientos electroforéticos (16).

La facilidad de enlazarse la albúmina con colorantes se usa también en procedimientos de tñido empleados en electroforesis --

Todas las proteínas y en especial albúmina tienden a reaccionar con muchas especies químicas por medio de fuerzas electrostáticas y terciarias de Van Der Waals y en virtud del enlace de hidrógeno; esta propiedad ha sido usada en intentos para idear métodos por medio de los cuales pudiera medirse albúmina directamente sin previa precipitación de globulinas, el enlace no deberá de afectarse por cambios de pH y de fuerza iónica, además el color enlazado que se obtiene debe de ser diferente del colorante libre; con un desplazamiento sustancial en la longitud de onda de la luz, finalmente el enlace del colorante a otras fracciones proteínicas (globulinas) debe ser despreciable para que tenga mayor validez en la determinación, el color no debe ser interferido por otras sustancias presentes tales como bilirrubina y hemoglobina.

En ocasiones los valores obtenidos rara vez son altos por haberse enlazado el colorante a proteínas diferentes de la albúmina.

El ácido 2,4, hidroxiazobenceno-benzóico fué usado por Ronstein, Ingenito Reynolds y Martinek (1954) y el verde de bromocresol -- por Rodkey (15).

En este método la albúmina es cuantificada por un aumento en absorvancia cuando el suero se agrega a una solución de HABA. (ácido 2,4, hidroxiazobenceno-benzóico) amortiguado a pH de 6.2, en lugar de un amortiguador de acetato para eliminar turbidez, por aumento de la absorvancia, a 485nm para incrementar la sensibilidad y en condiciones controladas de temperatura, debido a la naturaleza termolábil de la interacción HABA-albúmina.

El ensayo HABA tiene la ventaja de ser específico para albúminas

pero a pesar de modificaciones hechas recientemente la sensibilidad es menor que otros métodos, varios materiales como salicilatos, sulfonamidas, penicilina y bilirrubina conjugada interfieren en la reacción. La heparina en cantidades normales de anticoagulante causa turbidez con interferencia en el ensayo. Otro inconveniente es que se tiene que usar para el control de albúmina bovina (fracción V) o mercaptoalbúmina humana ----- hasta que el color sea estabilizado.

Este procedimiento ha sido automatizado y se ha encontrado que está relacionado con la electroforesis en acetado de celulosa (4).

El uso de reactivos colorantes tales como HABA y anaranjado de metilo está bien establecido y se dispone de varios procedimientos normales y de autoanalizador, sin embargo, hay desacuerdo en cuanto a la confiabilidad de los métodos con determinación de enlace a colorantes (16).

El uso de anaranjado de metilo para la determinación directa de albúminas en suero fué descrita en 1953, la albúmina en suero se agrega a una solución de anaranjado de metilo amortiguado a un pH de 3.5 provocando una disminución en la absorbancia a 550 nm lo que da la medida de la albúmina.

El método fué subsecuentemente mejorado por el uso de un suero blanco y por duplicación del radio iónico del colorante.

Sin embargo el anaranjado de metilo enlaza sólo a la albúmina con un mínimo de enlace a globulina gamma, ésto ha sido discutido por varios autores quienes piensan que las beta lipoproteínas así como las globulinas alfa uno y alfa dos son capaces de enlazarse al anaranjado de metilo.

Cuantificaciones por este método han sido descritos pero dan valores ficticios altos de albúmina especialmente a bajas concentraciones (4).

El procedimiento de enlace-colorante con verde de bromocresol (BCG) para la determinación cuantitativa de albúmina en suero fué introducido en 1964.

El suero es diluido con una solución amortiguadora de BCG a pH de 7.0 y la disminución en la absorbancia se lee a 615 nm, la disminución es lineal en concentraciones de albúmina arriba de 5 g/100ml y la hemoglobina y bilirrubina no interfieren mucho a la longitud de onda usada, este método es más sensible que el de anaranjado de metilo o HABA. En separaciones electroforéticas de fracciones de proteínas diferentes a la albúmina no enlazan al BCG. Este procedimiento ya ha sido automatizado.

Estudios en los cuales niveles de albúmina son determinados -- con BCG y electroforesis muestran una excelente correlación.

El procedimiento del verde de bromocresol (BCG) es más específico para la cuantificación de albúmina en suero y 20 veces -- más sensible que el método HABA, es menos afectado por lipemia y altos niveles de hemoglobina y bilirrubina.

En sueros claros con niveles de proteína normales pero relaciones anormales en la relación albúmina/globulina, se encontraron niveles idénticos usando el HABA, verde de bromocresol o -- procedimientos de fraccionamiento salino de Wolfson y Cohn (12) De los tres métodos de enlace con colorantes que han sido discutidos para la cuantificación de albúmina, el verde de bromocresol parece dar la mejor correlación con electroforesis y -- precipitación con ácido tricloroacético al 20% en etanol.

El metabolismo del verde de bromocresol no es afectado por interferencia de otras sustancias como sucede en el procedimiento de HABA y además no se enlaza a otras proteínas como sucede con el anaranjado de metilo.

Azul o violeta de bromocresol y ftaléina similar al BCG se han usado para cuantificar albúmina en suero y orina, observando que salicilatos, bilirrubina y lípidos interfieren con el análisis de albúmina en suero.

Se sabe que la eosina enlaza a las albúminas, pero no puede usarse para el enlace de albúmina en suero o plasma ya que los ácidos grasos libres compiten con los sitios de enlace -- causando una variación en los resultados. (4)

Otras sustancias tales como fenolftaleína, bilirrubina y xyle no además sustancias fluorescentes que se enlazan a las albúminas.

Ha sido propuesto el uso de la fenolfsulftaleína, pero como los niveles de albúmina en suero están por debajo de 1.5 g/100 ml no se aprecia el enlace fácilmente.

Bajo condiciones experimentales la disminución de absorbancia de una solución de bilirrubina en xileno es proporcional a las concentraciones de albúmina arriba de 4g/100ml, en la práctica

los resultados obtenidos son demasiado altos debido al enlace de bilirrubina a betalipoproteínas.

Colorantes fluorescentes tales como 1-anilino-naftalen 8 - ácido sulfónico y vasoflavina se han empleado para enlazar a la albúmina y no a otras proteínas nativas, dando resultados lineales con respecto a la concentración de albúmina presente.

Con el ácido 1-anilino naftalen sulfónico la bilirrubina a niveles de 5 mg por 100 ml o mayores, interfieren por competencia

de los sitios de enlace.

Procedimientos basados con el uso de colorantes fluorescentes no ha podido probar su utilidad ampliamente.

Los procedimientos de enlace con colorantes, se han empleado - en forma limitada para la determinación de albúmina en orina y líquido cefaloraquídeo debido a la baja concentración de proteínas y altos niveles de materiales interferentes. (4).

5.14. DETERMINACION DE GLOBULINAS TOTALES DE ACUERDO A SU CONTENIDO EN TRYPTOFANO

El contenido de triptofano de albúmina de suero humano es de 0.2%, en comparación con 2 a 3% para distintas globulinas del suero, se ha informado una correlación directa entre globulinas totales y triptofano en el suero. El aumento de triptofano en proteínas de algunos sueros anormales es debida a un aumento del nivel de globulina, más que a un aumento de incorporación de triptofano en la proteína.

Es un método propuesto para la determinación de globulinas totales del suero son precipitadas con isopropanol y el triptofano es determinado en el precipitado por la reacción de Tauber-Firchl. Este método da una excelente correlación con globulinas de suero determinadas por fraccionamiento Salino y - Electroforesis. El procedimiento fué posteriormente modificado por precipitación de globulinas del suero con ácido tricloroacético al 2% en etanol y haciendo un ensayo de precipitado para triptofano se usó un suero de contenido de albúmina y globulina, como control y hubo que eliminar las correcciones para cantidades pequeñas de triptofano en albúmina.

Este ensayo de globulinas totales de suero ha sido modificado por Goldenberg y Drewes quienes evaluaron algunas variaciones en la reacción de Hopkins-Cole para triptófano y propusieron un reactivo simple consistente en una mezcla acuosa de ácido glicólico, cobre, ácido sulfúrico, y ácido acético, el cual es agregado al suero después de un corto período de calentamiento; la mezcla de reacción se enfría y la absorbancia del color púrpura resultante se mide a 540 a 560 nm.

Este reactivo de globulina se mantiene estable por un año o más a temperatura de refrigerador.

El método da una buena reproductibilidad de acuerdo a la ley de Beer (4).

El triptófano así como los aminoácidos libres no reaccionan con el reactivo. La bilirrubina a concentraciones arriba de 20 mg/100ml o sueros con lipemia moderada causan una disminución del 5% en los niveles de globulina.

Los resultados obtenidos con este método correlacionan bien con aquellos a base de fraccionamiento de sulfato y electroforesis en papel.

Glucosa, urea, creatinina y colesterol no interfieren con la reacción.

Savory y colaboradores, automatizaron el procedimiento de Goldenberg y Drewes y obtuvieron valores cercanos con aquéllos obtenidos por electroforesis pero no con los obtenidos por diferencia usando el procedimiento HABA para albúmina. La cantidad de gamma globulina agregada al suero fué cuantificada y el coeficiente de variación del procedimiento automatizado fué cerca de 4.5%.

Se ha propuesto un proceso de triptófano fotométrico para la determinación de globulinas totales en líquido cefalorraquídeo, en el cual las globulinas se precipitan con ácido tricloroacético al 10% y se hacen reaccionar con ácido glioxálico.

Alcance del método.- Los métodos de determinación de albúmina en suero, con el empleo de colorantes e indicadores orgánicos no han sido comparados con procedimientos de referencia aceptados (electroforesis) y el método de fraccionamiento salino de Wolfson y Cohn, nosotros pensamos que es inadmisibile el reco-

mendar cualquier método de enlace a colorantes en ausencia de tal comparación.

La determinación de albúmina y globulinas en suero puede llevarse a cabo por determinación directa de globulinas basada en el contenido de triptofano y cálculo del contenido de albúminas por diferencia, no siendo usuales ni recomendados para la determinación de albúminas y globulinas en LCR y orina. Resultados obtenidos con técnicas de fraccionamiento salino y determinación química de las fracciones resultantes no están relacionadas con técnicas electroforéticas o inmunoquímicas (4).

S. 1.5. DETERMINACION DE GLOBULINAS TOTALES EN SUERO

(Método de Goldenberg y Drewes)

Fundamento.- Las globulinas totales en suero se determinan por la reacción con ácido glioxálico en medio ácido, produciéndose un color púrpura el cual es medido fotométricamente.

Reactivos:

Reactivo de Globulina.- En un matraz volumétrico de un litro disolver 1.0 g. de sulfato de cobre pentahidratado en 90 ml de agua. Agregar 400ml de ácido acético glacial seguido de 1.0 g. de ácido glioxálico monohidratado. Mezclar sin retraso, cuidadosamente agregar con agitación 60 ml de ácido sulfúrico concentrado. Enfriar a temperatura ambiente. Diluir a la marca con ácido acético glacial y mezclar. Este reactivo es estable en refrigeración por lo menos un año.

Patrones.- Existen dos alternativas:

a).- Un patrón conteniendo 7.5 grs. de proteína total por 100ml. consistente de 4.5 g de albúmina humana/100 ml y 3.0 g. de gamma globulina humana/100ml.

b).- Un patrón sintético de N-acetil-D-L-triptofano equivalente a 3.0 g de globulina /100 ml de suero como se determina -- por comparación con un suero de referencia cuyo contenido de globulina sea conocido.

Procedimiento: Poner en tubos de prueba:

Reactivo Blanco: 5 ml de reactivo de globulina: para esto 20 microlitros de suero patrón o de patrón sintético se agrega a 5 ml de reactivo de globulina.

Desconocido: 20 microlitros de suero desconocido (con pipeta TC) más de 5 ml de reactivo de globulina.

2.- Mezclar el contenido de todos los tubos y poner en un baño de agua durante 5 minutos.

Enfriar los tubos: enfriar con agua por tres minutos y mezclar (4).

§. 16 IDENTIFICACION DE CRIOGLOBULINAS. (Stefanini y Dameshek 1955)

Las crioglobulinas son proteínas que se separan de la solución o provocan la gelificación del suero o del plasma al bajar la temperatura del cuerpo y desaparecen al subir ésta a 37°C.

En ocasiones, se presentan a temperatura ambiente, pero suele ser necesario refrigerarlas para hacerlas visibles.

Técnica.- Recoger sangre en ayunas y poner el tubo enseguida en agua a 37°C, si no se añade anticoagulante déjese el coágulo - una hora en reposo.

Separar el suero o plasma (oxalato, citrato o heparina) a 3,000 r.p.m. durante diez minutos, llevar alícuotas de 2 ml a cada uno de los dos tubos de ensayo.

Incubar uno a 40°C y el otro a 37°C, durante 4 horas.

Las crioglobulinas no producen cambio alguno a 37°C, en el suero ni en el plasma.

En el tubo de ensayo refrigerado se aprecian dos variaciones.

1).- El plasma o el suero aparecen totalmente coagulados.

2).- El plasma o el suero se hallan divididos en dos capas, la de encima con el plasma o suero normal, levemente teñido de bilirrubina y la de abajo representada por crioglobulinas que se ha depositado en el fondo del tubo.

El aspecto del tubo refrigerado que contiene crioglobulina se normaliza volviendo a calentar a 37°C. (17).

§. 17.- VALDRACION DE MUCOPROTEINA (SEROMUCOIDE), en suero(17).

La mucoproteína es una proteína del suero que contiene alrededor de 20% de hidratos de carbono y constituye del 1 al 2% de las proteínas totales del suero.

Por electroforesis, se mueve como la globulina alfa uno. Quedan en solución cuando se precipita con ácidos perclórico, tricloroacético o sulfosalicílico, pero la precipita el ácido fosfotúngstico.

Este precipitado se puede disolver de nuevo y se valora la mucoproteína con reactivos de carbohidratos o de proteínas.

Técnica.- Añadir 0.5ml de suero, 4.5 ml. de cloruro sódico al 0.85% agitar suavemente.

Agregar a gotas 2.5 ml. de ácido perclórico 1.8M durante la agitación, dejar en reposo 5 minutos justos.

Filtrar por papel Whatman No. 5 cubriendo el embudo con un vidrio de reloj para retardar la evaporación, puede ser necesario repetir la filtración varias veces por el mismo papel, hasta que el líquido salga claro.

Añadir a 5 ml de filtrado 1 ml de ácido fosfotúngstico y agitar despacio.

Dejar en reposo diez minutos.

Centrifugar durante diez minutos a 2,000 revoluciones, desechar el líquido sobrenadante, dejar escurrir el tubo sobre papel filtro.

Lavar el precipitado con 10 ml de ácido perclórico 0.6M, mezclando con una varilla de vidrio, tubo agitador o mezclador -- Vortex.

Centrifugar, desechar el líquido y escurrir.

Añadir 6.5 ml de reactivo alcalino de cobre, agitar hasta que el precipitado se disuelva, poner en otros dos tubos 0.2 ml de tirosina como patrón y 0.2 ml de agua como blanco respectivamente, añadir en cada uno 6.5 ml de reactivo alcalino de cobre.

Agregar 1 ml de reactivo de fenol a cada tubo y mezclar enseguida agitando vigorosamente.

Mantener los tubos una hora en un sitio obscuro, leer con filtro rojo número 86 a 700-705 nm.

Cálculos:

$$\frac{\text{Lectura de incógnita} - \text{Lectura del blanco}}{\text{Lectura del patrón} - \text{Lectura del blanco}} \times 0.026 \times \frac{7.5}{5} \times \frac{100}{0.5} =$$

Lectura del patrón - Lectura del blanco

$$\frac{\text{Lectura de incógnita (neta)}}{\text{Lectura del patrón (neta)}} \times 7.8 = \text{Mgs de Tirosina/100 ml de suero} \quad (17)$$

5.17.- DETERMINACION DE PROTEINAS POR EL METODO DE FOLIN LOWRY

En 1917 Folin y Denis encontraron que el ácido fosfotúngstico-molibdico dá coloración azul con varias sustancias conteniendo un grupo fenólico, en 1922 Wu utilizó esta reacción para la determinación colorimétrica de proteínas del plasma, más tarde - Wu y Ling extendieron el método a orina y líquido cefaloraquídeo. La dificultad de la aparición de turbidez fué después resuelta por el uso del reactivo de Folin-Ciocalteu, el cual contenía sales de litio en lugar de sales de sodio, sin embargo, puede desarrollarse alguna turbidez aún con este reactivo.

Johnston y Gibson desarrollaron la técnica dentro del método de tirosina el cual dá resultados comparables al método de Kjeldahl, pero es más complicado y el tiempo requerido mayor que en otros procedimientos para la determinación de proteínas en líquido cefaloraquídeo.

El tratamiento previo de la proteína con una solución alcalina de cobre se encontró que aumentaba la sensibilidad de la reacción de fenol de 3 al 5%, el color producido entonces resulta de la reducción de los ácidos fosfotúngstico y fosfomolibdico a molibdeno azul y tungsteno azul por el complejo de cobre-proteína y por el triptofano y tirosina de la proteína.

Cerca del 75% del color depende de la presencia del cobre, este procedimiento fué usado para determinar proteínas en líquido cefaloraquídeo con 0.2 ml de muestra.

Las principales fuentes de error cuando se determina proteína en LCR por este método son sustancias no proteínicas presentes que equivalen a cerca de 6.3 mg de proteína por 100 ml de LCR y sustancias tales como salicilatos, clorpromacina, tetraciclina-

nas y varias sulfas, causando variaciones en la sensibilidad -
del método (4).

5.10...- DETERMINACION DE PROTEINAS POR MEDICION DEL PESO ESPECIFICO.

Por este método se vierten gota a gota porciones alícuotas de suero en una serie de soluciones de sulfato de cobre cuidadosamente preparadas y de peso específico exactamente conocido, las gotas ascenderán en soluciones de sulfato de cobre de densidad mayor que las del suero y bajarán rápidamente al fondo de probetas conteniendo soluciones de menor densidad que la del suero, finalmente se hallará una solución de sulfato de cobre en la cual la gota queda en suspensión durante casi un minuto antes de caer al fondo.

En muchos manuales de laboratorio se encuentran nomogramas y tablas, preparados por D. Van Slyke, que relacionan el peso específico de las soluciones de sulfato de cobre con las concentraciones de proteínas, los controles de peso específico de sulfato de cobre son difíciles de mantener.

Los resultados son bastante burdos y están sujetos a grandes errores en caso de sueros lipémicos y de sueros de pacientes con niveles de azúcar y urea anormalmente altos y con relación A/G anormales. Se puede usar también el método para estimar el total de proteínas en sangre (16).

5.14 .- DETERMINACION DEL TOTAL DE PROTEINAS POR MEDIO DEL REACTIVO DE FOLIN CIOLCOLTEAU

Fundamento.- Soluciones de varios tipos de fenoles se comportan como agentes reductores débiles y pueden ser oxidados a compuestos del tipo quinona por muchos agentes oxidantes.

Un reactivo de ácido fosfotungstomolibdico complejo llamado reactivo de fenol ideado por Folín y Ciocolteau oxida compuestos fenólicos en condiciones alcalinas reduciendo su color ini

cial amarillo oro a un azul intenso. Este reactivo se usa para medir compuestos fenólicos y para determinar tirosina, aminoácido que contiene una cadena lateral fenólica. Dado que todas las proteínas contienen tirosina esta reacción ha sido usada para determinar cuantitativamente proteínas en plasma, suero y líquido cefalorraquídeo.

Los métodos en que se emplea el reactivo de fenol presentan la ventaja de ser 5 a 10 veces más sensibles que los procedimientos del biuret, y pueden usarse cuando en la porción alícuota que se dispone sólo hay presente de 0.30 a 1.5 mg de proteína. Son muy adecuados para la determinación de proteínas en muestras que contienen una sola proteína de contenido de tirosina conocido y constante.

Una de las aplicaciones útiles de este método es en la determinación del fibrinógeno en plasma, después de aislar la proteína como un coágulo de fibrina.

En una modificación de la técnica, introducida por Lowry y sus colaboradores se usa el reactivo para determinar cantidades muy pequeñas de proteínas.

A la solución de proteína se agrega ión cúprico en tartrato débilmente alcalino, el complejo de tipo biuret entre el cobre y la proteína se trata a continuación con el reactivo de fenol -- diluido, el complejo de biuret y las cadenas laterales aromáticas de las proteínas se tratan a continuación con el reactivo de fenol diluido; las dos reacciones juntas poseen mayor sensibilidad (16).

5.10.- DETERMINACION DE PROTEINAS POR MEDIDA DEL INDICE DE REFRACCION.

Este método es rápido, directo y sirve bien para sueros claros, materiales tales como glucosa, bilirrubina, colesterol y triglicéidos presentes en cantidades anormales pueden producir resultados erróneos ya que el contenido de nitrógeno no proteínico de suero o plasma es constante y se ha observado que sólo -- una pequeña fracción contribuye a la refracción.

La diferencia entre la refracción de igual peso de lipoproteína y albúmina es mucho menor que la diferencia entre el contenido de nitrógeno.

Sin embargo determinación de proteínas totales de suero lipémico es mayor por refractometría, que por el método de Kjeldahl o Biuret (4).

The American Optical Corporation ideó un refractómetro manual -- para determinación de proteínas del suero, previamente se determina el contenido de proteínas dentro de 0.1 g/100 ml con una gota de muestra.

Los valores normales e interpretación de los niveles de proteínas pueden discutirse más adelante cuando hablemos de las fracciones de proteína junto con albúmina y globulinas. (1).

Fundamento.- El índice de refracción del agua a 20°C es 1,330, si se agrega al agua un soluto, aumentará el índice de refracción, este incremento es directamente proporcional a la concentración en un intervalo doble o triple en soluciones más concentradas (5 a 20% p/v).

Esta proporcionalidad es válida para mezclas de solutos si sus índices de refracción son de magnitud similar, de esta manera, se pueden medir cantidades de proteínas de orina y suero, estas

mediciones son útiles pero no siempre exactas, para sueros claros, no pigmentados y no turbios y cuando no se requiere de una gran exactitud es un método rápido y directo para la medición de proteínas. (16).

5.21. DETERMINACION DE PROTEINAS POR MEDICION CON LUZ ULTRAVIO LETA.

El hecho de que tirosina, fenil alanina presentes en las protei-
nas absorban en el límite de 270 a 290 nm ha sido usado para de-
terminación de concentración de proteínas en solución, además -
en la cuantificación del total de proteína en suero y LCR, no -
pueden obtenerse con este método resultados válidos ya que ocu-
rren variaciones significantes en el contenido de tirosina y --
triptófano junto con varias fracciones de proteína del suero y
especialmente con albúminas y globulinas como corresponde a la
variación entre las fracciones correspondientes a partir de --
sueros diferentes.

Muchos sueros también contienen materiales interferentes no pro-
teínicos como ácido úrico, bilirrubina, tirosina libre y triptó-
fano el cual invalida el uso de este procedimiento. El enlace
de péptido absorbe a una longitud de onda de 200 a 225 nm. (4).
Las soluciones de proteínas en general muestran fuertes bandas
de absorción ultravioleta a 279 y de 210-215 nm, el pico de ab-
sorción a 80 nm es debido a anillos aromáticos de tirosina y -
triptófano y el pico a 215 nm al enlace de péptido. Para la
determinación se usa una dilución 1:100 de suero las lecturas
de 280 nm y una dilución de 1; 1,000 para mediciones a 215 nm,
la absorbancia de otros solutos a esta longitud de onda es des-
preciable debido a la dilución de la muestra. Si se establece
el procedimiento frente a suero normal, es posible derivar va-
lores exactos de proteínas en sueros normales con el uso de --
muestras de 5 a 10 microlitros a causa de las variaciones en -
la concentración de tirosina sérica, sin embargo el método es

menos exacto cuando se usa con sueros que contienen proteínas -
anormales o cuando la relación es A/G anormal. Para medición
de proteínas en el líquido céfalo-raquídeo se ha propuesto un
método en que se efectúan lecturas de absorbancia a 215m μ , debe
mencionarse que a medición precisa de absorbancia en el inter-
valo bajo de luz U.V. presenta problemas técnicos para aplicarse
en análisis de rutina (12).

5.12. - METODOS DE DETERMINACIÓN DE PROTEINAS EN LIQUIDO CEFALO

RAQUIDEO.

Existen tres principales problemas en la determinación del contenido de proteínas en el líquido cefaloraquídeo.

a).- La concentración de proteínas es baja (normalmente de 15-45 mg de proteína por 100 ml).

b).- La concentración de sustancias no proteínicas que interfieren es significativa para la determinación de proteínas.

c).- La concentración de iones inorgánicos es alta.

La mayoría de los métodos de determinación de proteínas en suero y plasma han sido aplicados a líquido cefaloraquídeo pero no han sido todos probados satisfactoriamente.

El método de digestión Kjeldahl es frecuentemente usado como un proceso de referencia pero existe el problema de obtención de un volumen apropiado de muestra (10 a 15 ml) y en la corrección de la gran cantidad no proporcional de nitrógeno no proteínico presente.

La reacción del biuret ha sido usada también, pero los resultados obtenidos generalmente son altos en comparación con otros procesos, la discrepancia es debida al resultado por interferencias con proteozas, peptonas y polipéptidos presentes en altas concentraciones.

Cuando un reactivo de biuret es usado la solución final debe -- centrifugarse antes de medir el color, para quitar el precipitado de hidróxido de calcio y magnesio que se forma.

La precipitación puede prevenirse con el uso de una sal disódica de EDTA (ácido etilendiaminotetracético) leyendo el color de la reacción a 330nm para incrementar la sensibilidad.

Se ha descrito un procedimiento de reacción del biuret, con el que se obtienen sólo resultados comparables a los obtenidos con el método micro-Kejldahl y los nefelométricos.

En este procedimiento la proteína del líquido cefaloraquídeo se precipita con ácido tricloroacético, la reacción del biuret se forma en el precipitado de proteína y el color resultante es leído a 300nm.

En medidas espectroscópicas directas de proteína a 220 a 280 nm, son posibles las interferencias con ácido ascórbico, triptófano, nucleósidos, péptidos y proteosas resultando frecuentemente reacciones falsas y datos elevados.

Antes de usar los métodos directos de espectroscopia, es recomendado que se purifiquen las proteínas en LCR por filtración en --gel.

En 1914 Folin y Denis introdujeron la determinación nefelométrica de proteínas en orina con ácido sulfosalísílico, subsecuente mente esta técnica fué usada en la determinación de proteínas - en líquido cefaloraquídeo (4).

Las dos técnicas más satisfactorias son los métodos nefelométricos y los colorimétricos de Folin-Lowry (4).

La dificultad principal en los métodos nefelométricos es la selección del reactivo de precipitación ideal este reactivo habrá de reaccionar de modo similar con albúminas y globulinas y habrá de producir el mismo grado de turbidez con cantidades iguales de diversas formas proteínicas.

La turbidez deberá ser estable durante tiempo suficiente, reproducirse de un día a otro y de una muestra a otra.

Hasta la fecha no se ha encontrado un reactivo de precipitación.

ideal, la mayoría de ellos producen más turbidez con albúminas (ácido sulfosalicílico) que con globulinas (ácido tricloroacético).

La cantidad de turbidez y la forma de las partículas floculadas dependen de las temperaturas de la manera de mezclar la muestra con el reactivo (16).

Varios autores han usado albúmina bovina recristalizada como un patrón del método nefelométrico de ATC.

En vista de las diferencias en turbidez de las fracciones de proteínas, diferentes autores recomiendan como referencia el uso de suero humano diluido.

Se ha reportado que la turbidez varía directamente con la temperatura, la variación está alrededor del 5% sobre el valor normal a temperatura ambiente (20-25°C) cuando se usa ácido tricloroacético.

Los ácidos tricloroacético y sulfosalicílico producen resultados razonablemente aceptables para el empleo del reactivo del biuret y los procesos de Kjeldahl con previa precipitación de proteína incluso cuando se trata de estudiar el líquido cefaloraquídeo.

Se han obtenido mejores resultados con ATC que con ácido sulfosalicílico (16).

5.23.- REACCIONES CUALITATIVAS DE PROTEINAS EN LIQUIDO CEFALORAQUIDEO

5.23.1. Reacciones de Nonne Appelt y Ross Jones.-

El reactivo es una solución saturada de sulfato amónico en agua, en la reacción de Nonne Appelt se mezclan volúmenes iguales -- (0.5 ml de cada uno) de líquido cefaloraquídeo y sulfato de --

amonio en un tubo de ensayo pequeño, después de tres minutos, se examina si hay opalescencia o turbidez con la reacción de Pandy. En la variante introducida en la reacción de Ross Jones se vierte con cuidado el líquido cefaloraquídeo, de modo que forme una capa sobre la solución de sulfato amónico y se observa la intercara entre las dos soluciones para ver si se forma un anillo de fino precipitado. Con la reacción de Pandy se obtienen resultados más sensibles que con la de sulfato de amonio.

5.13.1 Reacción de Pandy.- El reactivo consiste en una solución saturada de fenol puro en agua de color blanco rosado, en aproximadamente 10 g de fenol (exenta de toda coloración negro pardusca), se suspenden en 100 ml de agua y la mezcla se calienta suavemente a 50°C - 60°C , el reactivo se transfiere a un frasco invertido y se deja sedimentar a temperatura ambiente a (25°C) durante 48 a 72 horas antes de usarlo. El reactivo ha de ser claro incoloro y turbio se guarda a temperatura ambiente en un frasco ambar lejos de luz directa o de corriente de aire (16).

CAPITULO VI

5. COMUNICACION DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS

El nivel del total de proteínas del suero en jóvenes y adultos de edad mediana sanos es de 6.0 a 8.2 ml. en el plasma la presencia del fibrinógeno aumenta este valor en 0.2 a 0.4 gr/100ml, variaciones de 0.5 gr/100ml reflejan cambios entre el líquido vascular y no vascular en el curso de actividad diurna.

La cantidad de albúmina puede variar de 3.8 a 4.7 g/100 ml y el total de globulinas de 2.3 a 3.5 g/100ml, el intervalo para la razón albúmina globulina es de 1.1 a 1.8 con un promedio de 1.5.

Las mucoproteínas constituyen alrededor del 1 al 2% del total de todas las proteínas del suero, el intervalo más aceptado es de 75 a 135 mgs/100 ml (valor medio de 120 mgs) por cada 100 ml, incluyéndose el orosomucoide y varios componentes menos definidos, más una porción de las glicoproteínas la determinación de mucoproteínas tiene escaso valor como diagnóstico clínico, los valores pueden variar de 100 a 400 mgs/100 ml y en infecciones agudas de 120 a 450 mgs/100 ml.

Las macroglobulinas representan del 4 al 8% de las proteínas totales del suero con un peso molecular de 1,000,000.

El nivel normal es de aproximadamente 0.2 gr/100ml. con una variación de 0.07 a 0.43 (12).

CAPITULO VII

7. INTERPRETACION DE RESULTADOS DESDE EL PUNTO DE VISTA FISIOLOGICO Y PATOLOGICO

Las proteínas forman la mayor parte de los solutos contenidos en el plasma, las cuales están constituidas por una mezcla compleja de polipéptidos, algunas de ellas contienen una fracción carbohidrato (glicó y mucoproteínas) o una fracción lípido -- (lipoproteínas) o están unidas a un metal (transferrinas); otras tales como la protrombina y fibrinógeno están contenidas en el fluido sanguíneo y algunos grupos constituyen los anticuerpos circulantes.

La albúmina, fibrinógeno y muchas de las alfa y beta globulinas son sintetizadas en el hígado, otros en el tejido linfoideo y en las células del plasma del sistema retículo endotelial.

Las proteínas del plasma y especialmente la albúmina juegan un importante papel en el balance osmótico entre la sangre y los tejidos, el edema proviene de una posible disminución de la concentración de proteínas en el plasma.

Se han encontrado alteraciones en el patrón normal de las fracciones globulínicas del suero como es indicado por electroforesis. Se ha encontrado en cantidad de condiciones patológicas niveles de albúmina alterados éstos se encuentran disminuidos en desnutrición, en estado de pérdida de proteínas como en la nefrosis, enteropatía exudativa, también cuando hay pérdida de habilidad de síntesis de proteínas en el hígado como sucede en la cirrosis hepática.

Aumentos de lipo y mucoproteínas de las alfa globulinas pueden estar relacionadas con aumento de niveles de lípidos en suero -

como en el caso de hipercolesterolemia.

Los niveles de gamma globulinas pueden estar disminuidos en nefrosis y en ciertas condiciones donde hay dificultad de síntesis en cantidades adecuadas de proteínas, sin embargo, los niveles de globulina gamma varían con la edad por lo que los resultados deben ser interpretados con cuidado (13)'

7.1 VALORES NORMALES E INTERPRETACION PARA PROTEINA TOTAL, ALBUMINA Y GLOBULINA

El rango normal de proteína total es de 6 a 8 grs/100ml siendo el ratio albúmina/ globulina usualmente de 1.5:1 y 2.5:1 (1).

El suero de un adulto sano contiene aproximadamente 3.8 a 4.7 g de albúmina por 100 ml en promedio alrededor de 4.3 g/100ml.

Los valores del total de globulinas varían entre 2.3 a 3.5 g con un promedio de 3.0 g/100ml en hombres y mujeres.

Una ligera variación diurna en el total de proteínas es observado aproximadamente entre 0.5 g/100 ml afectando por igual a todas las fracciones, de lo que resulta que la razón albúmina/ globulina sea bastante constante en cada individuo. En niños recién nacidos la albúmina y la globulina son en promedio de 3.5 a 2.0 g respectivamente por 100ml.

Estos niveles aumentan con lentitud hasta aproximadamente el tercer año de vida, en que alcanzan los valores normales en el adulto para cada fracción.

Aunque en la deshidratación los valores del total de proteínas en suero podrían estar por encima de lo normal y en excesiva pérdida de agua por debajo del normal, la razón de albúminas a globulinas podrían no cambiar prácticamente siempre y cuando ocurra hipoalbuminemia; puesto que ésto refleja de ordinario me

moscabo en la síntesis de albúmina en el hígado o pérdida súbita o crónica de la albúmina por eliminación en la orina.

En la mayoría de las infecciones agudas o crónicas la cantidad de albúmina disminuye moderadamente (3.2 a 4.2grs/100ml) lo que refleja aumento en la descomposición (catabolismo) como resultado de infección y fiebre concomitante. Las globulinas suelen aumentar algo en especial las globulinas gamma, lo que refleja síntesis de anticuerpos contra el agente infectante, en infecciones crónicas los valores de globulinas son más altos en especial los de la variedad gamma.

En condiciones como lupus eritematoso, sarcoidosis y mieloma múltiple se encuentran con mucha frecuencia grandes aumentos (de 2 a 5 grs/100 ml) en las globulinas gamma y en ocasiones en las globulinas beta.

En cirrosis de Laennec en la que hay disminución en el tejido hepático funcional, la albúmina puede bajar hasta niveles del orden de 2.4 grs/100ml o menos y el total de globulinas sube a menudo a 3.5 o 4.0 grs o más.

La razón A/G desciende del valor normal de 1.4 a valores tales como 0.7 a 1.0 siempre y cuando las globulinas estén presentes en concentraciones mayores que las de albúmina y se dice entonces que ha ocurrido una inversión en la razón A/G.

Esta razón aunque un tiempo fué tomada como parámetro de enfermedad, no es muy significativa. Es más importante y fácil definir el cambio absoluto en los niveles de albúmina y globulina respectivamente, que tener en cuenta la razón entre ellos. La relación podría invertirse a causa de ser alto el nivel de globulina aunque el de albúmina fuera normal (12)

En enfermedad renal acompañada de proteinuria ocurre un descenso de la albúmina en suero como resultado de pérdidas urinarias. En el caso de nefrosis lipoide y otros tipos del síndrome nefrótico la albúmina puede bajar a un nivel de 0.9 g/100ml y con frecuencia estando en el intervalo de 1.5 a 2.0 grs/100 ml, porque hay pérdidas urinarias de albúmina del orden de 10 a 30 grs por día, es característica del síndrome nefrótico la elevación en las globulinas alfa dos en suero, acompañada de hipalbuminemia.

El valor bajo de albúmina en suero es una de las causas importantes de formación de edema lo cual puede observarse en el síndrome nefrótico, en inanición, en mala absorción y lógicamente en cirrosis, en cuyo caso la pérdida de albúmina puede deberse a la formación del líquido ascítico (15)

La agammaglobulinemia es una condición relativamente rara, debida con frecuencia a un defecto en el metabolismo, en el cual las gamma globulinas están muy bajas o ausentes las otras fracciones del suero están relativamente normales.

Anticonceptivos orales conteniendo combinaciones de estrógenos progesterona son causa significativa de disminuciones en la cantidad de albúmina y a un contenido menor en el valor de proteína total (1).

La concentración de mucoproteína en suero puede ser mayor o menor que lo normal, un aumento se atribuye a liberación de mucoproteínas por histiocitos como respuesta inmediata a enfermedades infecciosas o proliferativas, pero no parece estar muy justificada prefiriendo la valoración de proteínas a un procedimiento tan fácil como el de velocidad de sedimentación de he

matías para seguir el curso de tales trastornos.

Puede haber disminución en casos de insuficiencia adrenocortical o hepática, es subnormal en ictericia médica y elevada en la quirúrgica según informes constituye uno de los mejores ensayos para la distinción entre las alteraciones hepatocelular y obstructiva del padecimiento (17).

7.2.- CAMBIOS DE LAS DIVERSAS FRACCIONES GLOBULINICAS EN DIFERENTES ENFERMEDADES

La electroforesis y técnicas de fraccionamiento salino detallado han revelado un número interesante de variaciones en las fracciones globulínicas en ciertos padecimientos, ejemplos de patrones electroforéticos proporcionan referencias importantes a estudios de algunos padecimientos en particular.

En nefrosis existe una disminución de albúmina con aumento marcado de la globulina alfa dos y una disminución de la globulina gamma, la globulina beta puede estar aumentada. En casos de enfermedades crónicas del hígado existe comunmente un incremento en globulinas gamma con una disminución marcada de beta-globulinas.

En hepatitis infectiva hay un incremento en globulinas gamma, usualmente sólo en pequeña cantidad con disminución en globulinas alfa uno y alfa dos.

Una tendencia a un pequeño aumento de globulina alfa dos ha sido reportada en diabetes, otros investigadores también han encontrado aumentos de globulinas beta.

En artritis reumatoide existe con frecuencia disminución pequeña o moderada de gamma globulinas con un aumento pequeño en la fracción dos, aumentos similares en las fracciones gamma y gamma dos han sido observadas en lupus eritematoso diseminado y sarcoidosis de Boecké mostrando incrementos en la fracción alfa dos, beta y gamma, este puede ser más marcado en la fracción gamma y puede ser menor en la alfa dos.

Un aumento pequeño o moderado en las fracciones alfa 1 y alfa dos de globulina se observa en ciertos casos de cáncer, se ha

observado disminución en la concentración de las globulinas gamma en leucemia linfocítica en contraste con un aumento en leucemias megalogénicas y monocíticas y la albúmina tiende a caer -- en todos los casos.

Varios patrones electroforéticos son obtenidos en mieloma múltiple, la característica más comunmente encontrada es la presencia de una banda de proteína anormal la cual ha sido llamada -- Proteína M (Sundermann 1957).

Esta aparece como una banda intensa y ancha más comunmente hallada en globulinas gamma, con disminución en la frecuencia entre las globulinas beta y gamma y muy raramente entre beta y alfa dos. Existe también disociación entre la fracción de proteína M en el suero y la proteína de Bence Jones en orina. Sólo ocasionalmente son observadas ambas en el mismo paciente, ordinariamente en pruebas de orina cualitativas.

Sin embargo, la proteína de Bence-Jones, puede ser encontrada - en una alta proporción en orinas de pacientes con paraproteinemias, si la electroforesis se lleva a cabo con suficiente orina concentrada.

En algunos casos de mieloma donde existe proteína de Bence-Jones en la orina, el patrón de globulina del suero es normal, excepto por la tendencia a que existe una disminución de globulinas gamma y beta, con las beta y muy raramente entre las globulinas beta y alfa dos.

Una banda similar intensa se ha observado en macroglobulinemia y ocasionalmente en la región de globulinas gamma. En estas -- condiciones las globulinas gamma normales están reducidas en -- cantidad (hipogamaglobulinemias secundarias)

Fracciones anormales de globulinas pueden estar presentes en -

algunos casos en condiciones de agamaglobulinemia la cual puede ser congénita o adquirida, existiendo inhabilidad para producir anticuerpos siendo la banda observada mayor que la de globulina gamma observada en electroforesis y pudiendo estar inalteradas otras fracciones globulínicas (12).

BIBLIOGRAFIA.

- 1.- Bauer P. John, Achermann C. Philip, Toro Gelson: Clinical Laboratory Methods. Saint Louis. The C.V. Mosby Company. 8a. Ed. Pags 401-411. 1974.
- 2.- Anderson K. Arthur: Essentials of Physiological Chemistry. U.S.A. Wiley International Edition. 4a. Ed. Pags. 135-165. 1973.
- 3.- O'Brien Donough, Ibbot A. Franck, Roderson O. Denis: Laboratory Manual of Pediatric Microbiological Techniques. U.S.A. Harner and Row Publishers. 3a. Ed. Pags 140-141, 238-240, 270-281, 286-288. 1968.
- 4.- Cannon S. Donald, Wilkeman W. James: Clinical Chemistry Principles and Techniques. U.S.A. Bioscience Laboratories. 2a Ed. Pags 92-104, 107-131, 407-458, 480-482. 1974.
- 5.- Canons F. William: Review of Medical Physiology. Los Altos California Lange Medical Publications. 6a Ed. Pags 271-286 1966.
- 6.- Conn Erick, Stumpf P.D: Bioquímica Fundamental. México Editorial Limusa Wiley. 2a. Ed. Pags. 79-86, 98-105, 321-329, 444-452, 456-450. 1969.
- 7.- Fedos José, Soiera Marthas: Métodos Clínicos Químicos de Laboratorio México, D. F. Editorial Atlante, S.A. 1a. Ed. Pags 140-153. 1964.
- 8.- Gradvöllé : Clinical Laboratory Methods and Diagnosis. U.S.A. The C.V. Mosby Company 6a. Ed. Pags 38-56. 1970.
- 9.- Mc. Cylvery R.W: Bioquímica. México, D.F. Nueva Editorial Interamericana 1a. Ed. Pags 15-16. 1972.
- 10.- Dylon Arthur G: Fisiología Humana. México, D.F. Editorial Interamericana, S.A. 3a. Ed. Pags 285-300. 1969.
- 11.- Harner Harold A: Manual de Química Fisiológica. México, D.F. El Manual Moderno S.A. 3a. Ed. Pags 41-43, 344-351, 231-272. 1971.
- 12.- Harold A. Verley: Practical Clinical Biochemistry. New York William Heinemann Medical Books LTD and Interscience Books LTD. 4a. Ed. Pags 231-272. 1969.
- 13.- Leninger Albert L: Bioquímica. Barcelona España. Editorial Omega S.A. Pags. 71-84, 87-91, 117-134, 139-156, 460-462 1972.
- 14.- Rendina George: Técnicas de Bioquímica Aplicada. México, D.F. Nueva Editorial Interamericana. 1a. Ed. Pags. 47-49, 57-62, 64-73. 1974.
- 15.- Wright Samson Applied Physiology. U.S.A. Medical Oxford Publication 11 Ed. Pags 300-418. 1966.

- 16.- Tietz Norbert V: Clínica Clínica Moderna. México, D.F. Nueva Editorial Interamericana. 1a. Ed. Pags 178-248. 1972.
- 17.- Campbell Todd James, Harvley Sanford Arthur: Diagnóstico Clínico por el Laboratorio. Madrid. Manuel Parin Editores 4a. Ed. Pags 440-523. 1966.
- 18.- White L. Wielms, Franckel Sam: Seiverds Chemistry for Medical Technologists. U.S.A. The C.V. Mosby Company. 2a Ed. Pags 144-152. 1965.
- 19.- Cras J: Proteínas Plasmáticas. Barcelona. España. Editorial Jims. 2a Ed. Pags 1-10, 70-72, 257-259. 1960.
- 20.- Lynch, Raphael, Mellor, Sore: Métodos de Laboratorio. México, D. F. Interamericana, S.A. 2a Ed. Pags 79-85, 215-228, 300-304. 1972.
- 21.- Lasela M.P. Alberto: Introduction to Medical Laboratory Methods New York. Harner and Roe Publishers. 1a. Ed. Pags 207-213. 1971
- 22.- Almsro Huertas V: Teoría y Práctica de Electroanálisis. Madrid Editorial Alhambra, S.A. 1a. Ed. Pags 69-88. 1969.
- 23.- Starck John M: Experimental Biochemistry. U.S.A. W.H. Freeman and Company. Pags 69-78. 1964.
- 24.- Abbott David : Introducción a la Cromatografía. España. Editorial Alhambra. 3a. Ed. Pags 1-25, 32-48, 61-72, 73-86. 1973
- 25.- Métodos Seleccionados de Analistas Clínicos Vol. I, II, III, IV Asociación de Analistas Clínicos. Madrid. Editorial Aguilar. Pags Vol I: 126-140, Vol II: 56-57, 126-138, Vol III: 154-157 Vol V: 267-284.
- 26.- Putman W. Franck : The Plasma Proteins. U.S.A. Academic Press Pags 9-20. 1960
- 27.- Cawley L.P. Electroforesis and Immuno-electroforesis. Boston. U.S.A. Little Brown, Editores. Pags. 1-21, 123-132, 190-314. 1960.
- 28.- Dutcherlong, Hand of Immunodifusion and Immuno-electroforesis U.S.A. Ann Arbor Science Publishers.
- 29.- Gordon B.L. : Lo Esencial en la Inmunología. México, D.F. El Manual Moderno, S.A. Pags 43-46. 1973.
- 30.- Davis B.P. Dulbecco R: Tratado de Microbiología. Barcelona. Salvat Editores. Pags 409. 1973