

5

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUADALAJARA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

*Dosificación Rápida de las Proteínas de la
Sangre por el Método del Sulfato de Cobre*

T E S I S

Que para Obtener el Título de
QUÍMICO - FARMACÉUTICO - BIÓLOGO

Presenta

Jorge A. Becerra Fernández



QUÍMICA

GUADALAJARA, JALISCO
MAYO DE 1949.



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.

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE GUADALAJARA

FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS

*Dosificación Rápida de las Proteínas de la
Sangre por el Método del Sulfato de Cobre*

T E S I S

Que para Obtener el Título de
QUIMICO - FARMACEUTICO - BIOLOGO

Presenta

Jorge A. Becerra Fernández



QUIMICA

GUADALAJARA, JALISCO

MAYO DE 1949.

*A mi Madre con profundo
respeto y veneración*

*A mis hermanos
con cariño*

*A mis Maestros
con sincero afecto*

SUMARIO

INTRODUCCION.

PRELIMINARES. - SANGRE.

PROTEINAS.

ALBUMINAS Y GLOBULINAS.

PAPEL DE LAS PROTEINAS EN EL ORGANISMO.

VARIACION DE LAS CONCENTRACIONES.

METODO DEL SULFATO DE COBRE.

- a).- *Fundamento.*
- b).- *Reactivos.*
- c).- *Solución Madre.*
- d).- *Preparación de las soluciones Patrón.*
- f).- *Cálculos.*
- g).- *Correcciones.*
- h).- *Efectos de los Anticoagulantes.*
- i).- *Precisión del Método.*

RESUMEN Y CONCLUSIONES.

BIBLIOGRAFIA.

INTRODUCCION

DOSIFICACION RAPIDA DE LAS PROTEINAS DE LA SANGRE POR EL METODO DEL SULFATO DE COBRE

Dada la importancia que representa para el médico la determinación de la cantidad de proteínas de la sangre, los investigadores clínicos después de innumerables experimentos de laboratorio han puesto en práctica varios métodos tratando de obtener el mejor. La finalidad que pretenden es que éste reúna las condiciones esenciales de prontitud, exactitud y sencillez.

Los métodos de Medes, Page y Van Slyke, de la gota que cae de Barbour y Hamilton, el micrométodo de Kjeldal, el gravimétrico, el de tubo graduado de Linderstrom-Lang, etc.; que habían sido hasta ahora los más empleados, han sido superados ventajosamente por el del Sulfato de Cobre, descubierto por Robert A. Phillips, Donald D. Van Slyke, Vincent P. Dole, Kendall Emerson, Jr., Paul B. Hamilton y Reginald M. Archibald, cuyos trabajos fueron hechos en la Unidad de Investigación de la Marina de los Estados Unidos y en el Hospital del Instituto Rockefeller para la Investigación Médica.

El método del Sulfato de Cobre no requiere aparatos complicados, es muy práctico y sirve principalmente para determinar con rapidez la concentración de las proteínas del plasma sanguíneo por el peso específico de la sangre, cuya densidad puede medirse con exactitud hasta de ± 0.00005 según las escalas de diluciones empleadas.

Los resultados obtenidos por el método aludido se pueden utilizar además que para determinar el aumento o la disminución de las proteínas en el plasma, para medir el contenido de hemoglobina con una

aproximación de 10%, y aunque con menos precisión se puede determinar la velocidad de sedimentación globular midiendo la densidad del plasma y de la sangre total. En consecuencia el método nos sirve:

- 1).—Para el diagnóstico de algunos padecimientos en los que hay disminución o aumento de las proteínas de la sangre.
- 2).—Para decidir si la disminución del volumen del plasma es debido a la pérdida de agua (deshidratación de ciertas afecciones patológicas) o de proteínas del plasma (extravasación en quemaduras, traumatismos, etc.).
- 3).—Como auxiliar en el diagnóstico de los diferentes tipos de anemias y para precisar la gravedad de las hemorragias.
- 4).—Como auxiliar para determinar si en el tratamiento de transfusiones se necesitan emplear soluciones salinas, plasma o sangre total.
- 5).—Para comprobar los resultados de la terapéutica aludida y saber si ha sido adecuada o debe repetirse.
- 6).—Para seleccionar los casos en que es imprescindible tal tratamiento, y los que pueden pasar sin él, cuando la sangre y plasma escasean o es difícil obtenerlos.

Para mayor comprensión del método del Sulfato de Cobre aplicado a la determinación de las proteínas de la sangre, es preciso recordar antes algunas nociones fundamentales que se requieren en el desarrollo de este trabajo.

PRELIMINARES

LA SANGRE

Solamente apuntaré algunas ideas relativas al punto de la tesis ya que de ninguna manera pretendo estudiar el amplísimo campo hematológico.

La sangre en el organismo está constituida por un líquido, el plasma, que tiene en disolución o dispersión gran número de substancias (albúmina, urea, cloruros, glucosa, etc.), y en suspensión los llamados elementos morfológicos (leucocitos, hemates y plaquetas).

También hay substancias químicas que se encuentran en los glóbulos rojos, sea en forma exclusiva como la hemoglobina o en cantidades diferentes de las del plasma, como el potasio que es la base principal de los hemates, mientras que el sodio es la preponderante en el plasma.

Debe tenerse en cuenta, el fenómeno de la coagulación que se verifica fuera de los vasos, pues su complejo mecanismo transforma la composición antes descrita de la sangre. En la sangre coagulada en vez de plasma se encuentra un líquido citrino, más o menos transparente según las circunstancias de su obtención y una masa gelatinosa, coherente, más o menos disgregable a la presión, más o menos retraída constituida principalmente por las mallas de la fibrina en la cual están englobados los elementos morfológicos.

Entonces las investigaciones químicas y físicas podrán realizarse en la sangre coagulada, es decir, en el suero, en el plasma de la sangre incoagulada por la adición de ciertas substancias (oxalatos, citratos, heparina, etc.), o en la sangre total. Rara vez coinciden las cifras medias de las substancias químicas de la sangre total y del suero, pero en cambio las del suero coinciden bastante con las del plasma,



salvo naturalmente las cifras del fibrinógeno o las que pudieran estar relacionadas con la presencia de dicha fracción albuminoidea, como sería en el caso del nitrógeno total, ya que en el suero carece de fibrina.

Las dosificaciones químicas de las sustancias contenidas en los hematies por lo general no tienen importancia práctica y salvo determinados casos las dosificaciones se hacen en el plasma o en el suero.

En cuanto a ciertas cualidades físicas o físico-químicas, si varían según se estudien en una u otra de las formas ya citadas en que se nos presenta la sangre, cuyo hecho debemos desde ahora dejar asentado como una noción indispensable para el estudio de la gravedad específica y de su aplicación, objeto de este trabajo, o sea la determinación de las proteínas por medio de las soluciones de sulfato de cobre las cuales se determinan por el peso específico del plasma,

PROTEINAS

Las proteínas, prótidos o albuminoides, son sustancias de constitución compleja, que contienen siempre nitrógeno (aparte de carbono, hidrógeno, oxígeno y generalmente azufre), formadas fundamentalmente por aminoácidos, enlazados entre sí. Por su elevadísimo peso molecular poseen propiedades coloidales muy acentuadas.

Los aminoácidos son compuestos orgánicos que poseen en la misma molécula grupos carboxilos ($-\text{COOH}$) y aminos ($-\text{NH}_2$).

Se han hecho varias clasificaciones de proteínas.

Según su composición se pueden dividir en proteínas simples o conjugadas. Las primeras son de composición más sencilla (N, C, H, O, y S), reservándose la denominación de albuminoides conjugados o proteidos para aquellas que además del núcleo protéico poseen un grupo prostético unido a aquel. Este puede ser un metal pesado cromógeno y entonces tenemos los cromoproteidos (hemoglobina o Hb, pigmentos biliares, etc.). Si el grupo prostético es un ácido nucleínico tendremos los nucleoproteidos como el ácido úrico.

Hay otras proteínas conjugadas que por ser de menor interés solo mencionaré, como son: las glucoproteínas, fosfoproteínas, lecitoproteínas, y lipoproteínas.

Entre las proteínas simples tenemos las albúminas, las globulinas y el fibrinógeno que son los principales componentes proteicos del plasma sanguíneo. Podemos citar además las glutelinas, las prolaminas, los escleroalbuminoides, las histonas, las protaminas, que aparte de su diferente composición se pueden diferenciar por sus diversas solubilidades.

Aunque en realidad la albúmina y la globulina del cuerpo humano son compuestas por varias albúminas y globulinas diferentes, en la práctica clínica se las considera como una sola. Aún no se ha establecido el origen definido de la albúmina o de las globulinas aunque se cree que el hígado es el principal órgano en donde se sintetiza la sueroalbúmina mientras que la síntesis de las globulinas parece ser un proceso más general del organismo.

Aparte de una alimentación adecuada suficiente en proteínas es indispensable para el equilibrio A-G la integridad del tubo digestivo y del hígado o cuando menos una absorción y una transformación suficiente de parte del intestino y del hígado respectivamente.

El fibrinógeno se cree que se origina en el hígado (comunmente sólo se determina la cantidad de albúmina y globulina y no la de fibrinógeno), y tiene una relación indiscutible con la coagulación de la sangre.

Por fin tenemos las proteínas derivadas del metabolismo albuminoideo o de su hidrólisis. Se citan como derivadas primarias las proteínas coaguladas, las metaproteínas, etc. y entre las derivadas secundarias, las proteosas, peptonas, péptidos, diquetopiperazinas, etc.

La investigación y cuantificación de algunos de estos derivados proteicos del metabolismo humano son de gran importancia para el clínico, por ejemplo, las dosificaciones de urea, creatinina, indol, leucina, tirosina y alcaptona.

Es necesario decir que las proteínas son las integrantes principales de las estructuras celulares y por tanto indispensables para la vida. Además proporcionan al organismo parte de sus calorías necesarias y contribuyen al crecimiento y reposición de las pérdidas nitrogenadas ocasionadas por el catabolismo celular.

Tienen también una acción "buffer", pero otra de sus misiones más importantes es la conservación del equilibrio normal del líquido entre el sistema vascular y los tejidos.

El equilibrio entre la presión osmótica de la molécula albuminóidea y la presión sanguínea en los diferentes tipos vasculares se

creo que el factor principal en el mantenimiento de la distribución normal de los líquidos del organismo, por paso de los tejidos a los vasos o viceversa. Cuando hay un acotamiento o disminución de las proteínas la presión osmótica de las mismas puede ser vencida por la presión venosa, dando como resultado la aparición del edema por vaciamiento del líquido a los tejidos.

La inflamación se puede asociar al edema y entonces el mecanismo coloidal descrito, se asocia al traumatismo de las paredes capilares que permiten el paso de la albúmina y globulina a los tejidos. Esta acumulación aumenta la presión osmótica en ellos e invierte la dirección del líquido en la terminación venosa de los capilares que ordinariamente es centrípeta, en centrífuga.

Normalmente las proteínas del plasma, en el adulto, se mantiene entre 6.6 y 8.0 gramos por 100 c.c. de sangre, correspondiendo de 4.0 a 5.0% a la albúmina y 2.0 a 2.5% a las globulinas. En consecuencia normalmente la relación albúmino-globulínica A-G es de 1.5 — 2.5: 1.

CAUSAS QUE ORIGINAN LA VARIABILIDAD DE LAS CONCENTRACIONES DE PROTEÍNAS EN EL ORGANISMO

Con el objeto de subrayar la utilidad práctica del método que se estudia en el presente trabajo me permito insistir en las circunstancias que hacen variar las cantidades de proteínas.

Pero previamente debemos tener presente que aunque encontremos normal la concentración proteica y la relación A-G, sin embargo esto no indica normalidad en el organismo aunque puede haber coexistencia de padecimientos o causas antagónicas que se compensen. Pueden citarse varios de estos casos por fortuna no frecuentes y en los que la exploración clínica y datos anamnésticos resuelven el problema.

En cambio cuando encontramos valores anormales en las cifras de las proteínas, debemos afirmar que algunos de los factores que controlan la concentración de las mismas, ha sido perturbado.

Transcribo el resumen en que ha hecho Kagan y que citan los autores del presente método sobre las causas de las altas y bajas concentraciones de las proteínas en el plasma.

**CONDICIONES PATOLOGICAS QUE PRODUCEN ANORMALMENTE
ALTAS O BAJAS CONCENTRACIONES DE PROTEINAS
EN EL PLASMA**

CAUSAS GENERALES

ALTAS CONCENTRACIONES:

Debidas casi siempre a la deshidratación o al aumento de globulinas. El aumento de globulinas es común en las infecciones crónicas de las enfermedades del sistema retículo endotelial.

BAJAS CONCENTRACIONES:

Debidas casi siempre a la pérdida mecánica de proteínas por extravasación o excreción renal o a la disminución de la formación de albúminas como resultado de la desnutrición o por enfermedades del hígado.

CAUSAS ESPECIFICAS

ALTAS CONCENTRACIONES:

1.—Deshidratación.

- a. Ingestión insuficiente de líquidos, especialmente cuando van acompañadas de prolongada exposición al sol (botes abiertos).
- b. Pérdidas de líquidos:
 - Por obstrucción intestinal y fístula
 - Diarrea especialmente en niños, también cólera y disentería
 - Vómitos.
 - Acidosis diabéticas graves.
 - Calor intenso y ejercicios
 - Mal de Addison
 - Shock quirúrgico y traumático
 - Quemaduras en las primeras horas (algunos casos)
 - Infecciones fulminantes

BAJAS CONCENTRACIONES:

1.—Escape físico de las proteínas del plasma fuera de la circulación.

Hemorragia aguda o crónica.
Heridas que exudan líquidos o lesiones de la piel (quemaduras)
Albuminuria.
Shock quirúrgico o traumático.

2.—Desnutrición. (disminución de albúminas).

Baja dieta de proteínas.
Deficiencia de vitaminas, beriberi, Pelagra, etc.
Absorción incompleta.
Cáncer del estómago y páncreas.
Anemia perniciosa.
Diabetes Mellitus, irregular.

2.—Enfermedades que involucran al sistema retículo endotelial. (Aumento de globulinas).

Mieloma múltiple.

Leucemia monocítica.

Cirrosis del hígado y cáncer.

3.—Infecciones crónicas. (aumento de globulinas)

Tuberculosis ulcerativa.

Sífilis.

Linfopatía venérea.

Endocarditis bacterial subaguda.

Periarteritis nódosa.

Artritis reumática.

Sarcoide de Boeck.

Lepra.

Kala-Azar.

Schistozomiasis.

Filariasis.

Tripanosomiasis.

Hipertiroidismo.

Toxemias del embarazo.

3.—Condiciones en las cuales la síntesis de la albúmina es retardada, probablemente porque el hígado está dañado. (disminución de albúminas).

Cirrosis y cáncer del hígado.

Envenenamientos crónicos por benceno, fósforo, etc.

METODO DEL SULFATO DE COBRE

METODO DEL SULFATO DE COBRE

FUNDAMENTO

La técnica consiste en dejar caer gotas de plasma (y también sangre total si se quiere investigar la hemoglobina y el hematócrito) en una serie gradual de soluciones de sulfato de cobre, de densidad conocida y ver en cuáles de ellas caen hacia al fondo o se dirigen a la superficie, o se mantienen algún tiempo en el seno del líquido cúprico. Al caer cada gota en la solución queda englobada en una cubierta de proteínato de cobre, permaneciendo sin alterarse ni experimental cambios en su densidad durante 15 o 20 segundos, durante el cual se observa si se dirige al fondo o a la superficie. El tamaño de las gotas no es necesario que sea constante tampoco hace falta corrección de temperatura ya que el coeficiente de expansión de las soluciones de sulfato de cobre es semejante al de la sangre o plasma.

Con este método se pueden medir densidades hasta de ± 0.00005 exactamente diez veces mayor que la precisada. Automáticamente después de cada prueba (dos minutos) la solución de sulfato de cobre queda limpia en virtud de que el material de la gota se asienta en el fondo, en forma de precipitado.

Las soluciones patrones de sulfato de cobre son preparadas por dilución de una solución saturada. Para un trabajo preciso en que se quiera tener una aproximación de ± 0.0002 se usa una serie de 60 soluciones de sulfato de cobre graduadas en intervalos de 0.001 de densidad específica. 20 soluciones cubren la gama de valores del plasma (1.015 a 1.035) y 40 cubren la de los valores de la sangre total (1.035 a 1.075).

Si únicamente se quiere tener una aproximación de ± 0.001 en la determinación de las densidades, sólo se requieren 16 soluciones a intervalos de 0.004 que cubren los valores del plasma y de la sangre total. Y aún se puede usar un equipo mínimo de 6 soluciones para medir la densidad de la sangre.

En casos extremos se puede con una sola solución precisar si determinada sangre tiene una gravedad específica por encima o bajo del nivel normal ver en el caso del examen de densadores.

SOLUCIONES EMPLEADAS

SOLUCION SATURADA DE SULFATO DE COBRE.—Aproximadamente 2 kilos de cristales finos o pulverizados preferentemente, de

Si no hubiera contracción al mezclar la solución patrón con el agua destilada se diluirían 75 c.c. de la solución patrón a 100 c.c. para tener una densidad de 1.075, y así en los casos sucesivos. Sin embargo hay una contracción la cual es corregida empíricamente tomando un c.c. menos de la solución patrón.

La misma corrección de un c.c. sirve para la serie completa de 1.076 a 1.008.

TABLA I

PARA PREPARAR LAS SOLUCIONES DE SULFATO DE COBRE DE DENSIDAD 1.100 VOLUMENES DE AGUA QUE DEBEN AÑADIRSE A 170 gramos DE SULFATO DE COBRE

| Temp. del agua | c.c. de agua para 170 grs. de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ | Temp. del agua | c.c. de agua para 170 grs. de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ |
|----------------|---|----------------|---|
| °C | | °C | |
| 10 | 1003.6 | 26 | 1006.5 |
| 12 | 1003.8 | 28 | 1007.0 |
| 14 | 1004.0 | 30 | 1007.3 |
| 16 | 1004.3 | 32 | 1008.3 |
| 18 | 1004.7 | 34 | 1008.9 |
| 20 | 1005.1 | 36 | 1009.6 |
| 22 | 1005.5 | 38 | 1010.4 |
| 24 | 1005.5 | 40 | 1011.2 |

NOTA.—La solución contiene 1002.4 gramos de agua por 170 gramos de sulfato de cobre. Los volúmenes de agua dados en la tabla son 0.8 c.c. por litro más que los señalados teóricamente, para permitir la adherencia de esta cantidad dentro del frasco después de 2 minutos de escurrimiento.

TABLA III

Que expresa los c.c. de solución saturada de sulfato de cobre que deben tomarse para preparar un litro de solución patrón de densidad específica 1.100.

Temperatura en C° y F° referentes a la temperatura de la solución al tiempo de efectuarse la saturación (después de agitarse 5 minutos).

| TEMPERATURA | | | TEMPERATURA | | | TEMPERATURA | | |
|-------------|------|------|-------------|------|------|-------------|-------|------|
| C° | F° | c.c. | C° | F° | c.c. | C° | F° | c.c. |
| 10 0 | 50 0 | 578 | 20 0 | 68 0 | 486 | 30 0 | 86 0 | 425 |
| 10 5 | 50 9 | 573 | 20 5 | 68 9 | 484 | 30 5 | 86 9 | 423 |
| 11 0 | 51 8 | 568 | 21 0 | 69 8 | 480 | 31 0 | 87 8 | 420 |
| 11 5 | 52 7 | 563 | 21 5 | 70 7 | 477 | 31 5 | 88 7 | 417 |
| 12 0 | 53 6 | 558 | 22 0 | 71 6 | 473 | 32 0 | 89 6 | 414 |
| 12 5 | 54 5 | 553 | 22 5 | 72 5 | 469 | 32 5 | 90 5 | 412 |
| 13 0 | 55 4 | 548 | 23 0 | 73 4 | 466 | 33 0 | 91 4 | 409 |
| 13 5 | 56 3 | 543 | 23 5 | 74 3 | 462 | 33 5 | 92 3 | 406 |
| 14 0 | 57 2 | 539 | 24 0 | 75 2 | 460 | 34 0 | 93 2 | 403 |
| 14 5 | 58 1 | 534 | 24 5 | 76 1 | 456 | 34 5 | 94 1 | 401 |
| 15 0 | 59 0 | 529 | 25 0 | 77 0 | 452 | 35 0 | 95 0 | 398 |
| 15 5 | 59 9 | 525 | 25 5 | 77 9 | 450 | 35 5 | 95 9 | 395 |
| 16 0 | 60 8 | 521 | 26 0 | 78 8 | 447 | 36 0 | 96 8 | 392 |
| 16 5 | 61 7 | 516 | 26 5 | 79 7 | 445 | 36 5 | 97 7 | 390 |
| 17 0 | 62 6 | 512 | 27 0 | 80 6 | 442 | 37 0 | 98 6 | 387 |
| 17 5 | 63 5 | 508 | 27 5 | 81 5 | 439 | 37 5 | 99 5 | 384 |
| 18 0 | 64 4 | 504 | 28 0 | 82 4 | 436 | 38 0 | 100 4 | 381 |
| 18 5 | 65 3 | 500 | 28 5 | 83 3 | 434 | 38 5 | 101 3 | 379 |
| 19 0 | 66 2 | 496 | 29 0 | 84 2 | 431 | 39 0 | 102 2 | 376 |
| 19 5 | 67 1 | 492 | 29 5 | 85 1 | 428 | 39 5 | 103 1 | 373 |
| 20 0 | 68 0 | 488 | 30 0 | 86 0 | 425 | 40 0 | 104 0 | 370 |

TABLA IV

ANTICOAGULANTES

| Observaciones y valores calculados | EFECTOS DE LAS ANTICOAGULANTES | | | |
|--|--|--|---------------------|---|
| | Heparina (0.2 mg. por c.c. de sangre | OXALATOS. - Efectos por mg. añadido a un c. c. de sangre. | | |
| | | OXALATO AMONICO | OXALATO POTASICO | MEZCLA PAUL Y HELLER (1 P. O. A. + 1 P. S. A.) |
| Cambios en la den. del plasma observado. | 0 | 0.0007 | 0.0002 | 0.0003 |
| Cambios en la den. de la san- gre observada. | 0 | 0.0003 | 0.0006 | 0.0004 |
| Cambios en la est. de proteínas del plasma desde Gp | 0 | | | |
| Grs. por c.c. de sangre | 0 | 0.25 | 0.07 | 0.12 |
| Por ciento normal | 0 | 3.4 | 1.0 | 0.7 |
| Cambios de la est. de hemoglobina desde Gp y GB | | | | |
| Grs. por 100 c.c. de sangre | 0 | -0.02 | 0.24 | 0.10 |
| Por ciento normal | 0 | -0.1 | 1.5 | 0.6 |

ANOTACIONES EN LOS FRASCOS

La densidad de la solución patrón no cambia sino hasta que ha recibido aproximadamente una cuarentava parte de su volumen de plasma o suero. Con el cambio baja la densidad de la solución 0.0005.

Un frasco de solución con 28.3495 gramos (4 onzas) de sulfato de cobre sirve para realizar 100 pruebas.

A fin de saber cuando es necesario cambiar una solución de un frasco se les pega una etiqueta con un rayado que forme 100 cuadros. Cada vez que una gota de suero o plasma se deja caer dentro del frasco con un lápiz se marca una señal en uno de los cuadros. Cuando todos los cuadros han sido marcados quiere decir que se han introducido 100 gotas y la solución debe ser renovada.

Otra manera de saber cuando debe ser reemplazada la solución tipo de sulfato de cobre es teniendo 2 controles de comparación, que se hacen de la siguiente manera: 2 frascos con solución de densidad cada uno de 1.020 y 1.020 se les añade 2.5 c.c. de plasma y sangre, respectivamente, formando un precipitado en el fondo. Cuando el volumen del precipitado de las otras soluciones es igual a los frascos controles, la solución tipo debe ser reemplazada.

TECNICA DEL METODO

La sangre se obtiene por punción venosa. (Las ligaduras no deben aplicarse por más de un minuto, la aplicación duradera puede forzar tanto el líquido de la sangre, que la concentración aumenta apreciablemente). En algunos casos de choque la sangre capilar puede contener células en una proporción de 30 a 40% mayor que la sangre venosa, de aquí que la sangre capilar no pueda ser tomada como muestra de la sangre circulante.

Para la desfibrinación de proteínas se ponen 5 c.c. de sangre en un tubo conteniendo 5 miligramos de mezcla de Paul y Heller (3 partes de oxalato amónico más dos partes de oxalato potásico o sea 0.25 c.c. de la solución al 2%) se tapan y centrifugan.

No debe usarse mayor cantidad de oxalato, pues esto aumenta la densidad del plasma.

La heparina (0.2 miligramos por c.c. de sangre) no modifica apreciablemente dicha densidad por lo que éste es el mejor anticoagulante. No es conveniente usar el citrato de sodio.

Para la desficación de hemoglobina y hematócrito se pueden usar la sangre total obtenida directamente de la vena o adicionada con los anticogulantes mencionados siempre que se mezclen suficientemente.

La gota de plasma se deja caer de una altura aproximada de un centímetro de la superficie de las soluciones tipos por medio de un gotero o de una aguja de inyecciones. Es preferible usar gotas pequeñas porque así, es posible ejecutar mayor número de pruebas antes de que la solución de prueba requiera ser cambiada. Por lo tanto se prefiere un gotero de punta fina a uno de punta ancha. Engrasando los lados de la punta con vaselina, también se reduce el tamaño de la gota, especialmente si la vaselina está mezclada con un poco de alcohol caprílico. Cuando la gota es depositada conviene apoyar el gotero en el bordo del frasco haciendo que la punta quede en el centro y a un centímetro de altura de la solución.

La gota depositada rompe la capa superficial de la solución y penetra dos o tres centímetros. La densidad de la gota no cambia apreciablemente sino hasta que ésta ha estado dentro de la solución por unos 10 ó 15 segundos, habiendo bastante tiempo para anotar su comportamiento durante este intervalo. Si la gota es más ligera que la solución de sulfato de cobre, subirá quizás sólo unos pocos milímetros y se sumergirá poco después. Si la gota es de la misma densidad que la solución de prueba, se quedará estacionaria por este intervalo y luego caerá, y por último si la gota es más densa continuará cayendo durante el tiempo indicado anteriormente.

CALCULOS

Las tablas para convertir las densidades del plasma y de la sangre total en concentraciones de proteínas y de hemoglobina, han sido preparadas con métodos comprobados y se presentan en las láminas I y II.

Para calcular las proteínas del plasma se ve únicamente la escala de densidades especificada en la línea de la izquierda que es la que nos interesa en el presente estudio, y de ésta se saca el valor correspondiente en gramos de proteínas por 100 c.c. de sangre.

ECUACION

La ecuación que se menciona en seguida puede servir para la determinación de las proteínas de la sangre sin necesidad de recurrir en auxilio de las láminas I y II.

$$P = 369 (G_p - 1.0065)$$

P — Es la concentración de las proteínas del plasma, en gramos de c.c.

G_p — Es la densidad específica del plasma.

1.0065 — Es la densidad de las proteínas del plasma ultrafiltrado.

En esta ecuación se utiliza la constante 369 en lugar de la constante 343 que se había usado con anterioridad. El valor 343 fué derivado originalmente por Moore y Van Slyke, de observaciones sobre pacientes nefróticos, para usarse con tales pacientes.

CORRECCIONES EN LOS CALCULOS

En las densidades observadas deben verificarse correcciones que tienen por objeto atenuar los cambios de densidad que pueden determinar ya sea la adición de oxalatos o la separación de fibrinógeno. La adición de oxalatos eleva la densidad del plasma y de la sangre total, por otra parte la separación del fibrinógeno por la coagulación cuando no se usa ningún anticoagulante, da sueros que tienen una densidad más baja que la del plasma. Estos defectos son tan pequeños que los errores introducidos por ellos pueden, ordinariamente, pasarse desapercibidos en estudios clínicos.

Las cantidades de proteínas del plasma y hemoglobina pueden ser calculadas con precisión suficiente aplicando los valores de la densidad observada y de la sangre directamente a las tablas.

No es necesario hacer correcciones en el anticoagulante añadido, si éste es heparina y su preparación no pasa de 0.1 ó 0.2 miligramos por c.c. de sangre. Sin embargo si se usa más de un miligramo de mezcla de oxalato por c.c. de sangre o si se desea mayor precisión, se aplican las correcciones siguientes:

Por cada miligramo de la mezcla oxalato-amónico-potásica añadido por c.c. de sangre se restan 0.0004 de la densidad del plasma o de la sangre observada. Los errores causados por la falta de esta corrección pueden desprejarse sin que afecten sensiblemente los resultados.

Si el volumen de sangre es, por ejemplo, menor que 5 y el anticoagulante es de 5 miligramos las concentraciones de oxalato serán mayores y las correcciones serán como sigue:

Para 4 c.c. de sangre añadida se restarán 0 0005
Para 3 c.c. de sangre añadida se restarán 0 0007
Para 2 c.c. de sangre añadida se restarán 0 0010
Para 1 c.c. de sangre añadida se restarán 0 0020

Un error de 0.001 en la densidad del plasma afecta a la cifra de proteínas del plasma en 0.3 gramos por 100 c.c., la suma de errores de 0.001 en las densidades del plasma y sangre total afecta a los resultados en las cifras de hemoglobina en un 5%.

REACTIVOS

PAUL Y HELLER.—Se ponen 3 gramos de oxalato amónico y 2 de oxalato potásico en un matraz aforado de 250 c.c. Ésto se llena hasta el enrase con agua destilada y resulta una solución al 2%.

Para 5 c.c. de sangre se le ponen 0.25 c.c. de esta solución.

Tanto la heparina como el oxalato amónico y el oxalato potásico aislados se pueden usar como anticoagulantes en este método, teniendo cuidado de no poner más de 0.2 miligramos por c.c. de sangre para no modificar su densidad.

EFFECTOS DE LOS ANTICOAGULANTES SOBRE LA DENSIDAD

Después de varias experiencias que se hicieron en el laboratorio tratando numerosas muestras de sangre con los anticoagulantes más usados como son la heparina, el oxalato de amonio, el oxalato de potasio y la mezcla de Paul y Heller y en que las cantidades usadas variaban desde 0.2 a 10 miligramos por c.c. de sangre, se llegó a las siguientes conclusiones:

1).— Cualquiera de los 3 oxalatos pueden ser usados sin tener serios errores en los cálculos, siempre que la cantidad de oxalato esté limitada a 1 miligramo por c.c. de sangre.

2).— El oxalato de amonio es el peor anticoagulante si se quiere calcular las proteínas del plasma. Su efecto sobre el plasma es 3 ó 4 veces mayor que el efecto del oxalato de potasio. La diferencia es debida, según se presume, al hecho de que la sal de amonio se di-

funde más libremente dentro de las células y saca menos agua de ellas dentro del plasma.

El oxalato de amonio es el mejor de los oxalatos para usarse cuando se buscan solamente determinaciones de hemoglobina. Sus efectos sobre la densidad se distribuyen entre las células y el plasma y los valores de la hemoglobina calculada de las densidades de la sangre total y del plasma, son prácticamente inafectadas. (En este caso no deben usarse más de 10 miligramos de oxalato por c.c. de sangre).

3) El oxalato de potasio, tiene relativamente menos efectos sobre la densidad del plasma y más sobre la de la células y sobre la concentración de hemoglobina de la sangre calculada. Esto puede ser atribuido a la gran tendencia de la sal de potasio para sacar agua de las células al plasma.

4) — Para uso general en análisis de densidades, la mezcla de Paul y Haller ofrece maravillosos resultados. Sus efectos sobre ambos valores, proteínas del plasma y hemoglobina de la sangre son moderados y casi iguales.

Los resultados obtenidos de estas pruebas en las que se trataron c.c. de sangre por miligramo de oxalato, están detallados en la tabla III.

PRECISION DEL METODO

En la determinación de la densidad—Haciendo soluciones con intervalos de un décimo, y gr. intervalos de 0.0001 de densidad específica es posible medir la gravedad de la mitad de uno de estos intervalos, obteniéndose una aproximación de ± 0.00005 .

Sin embargo 10 gotas de plasma añadas a 100 cc. de cualquier solución de sulfato de cobre haran descender la densidad de la solución en 0.0001. Por lo tanto estas soluciones serian cambiadas después de 5 pruebas para dar a ellas la precision de ± 0.00005 .

Pero como se podrá ver más abora, el error principal en la estimación de las proteínas del plasma depende de la variabilidad de la composición de la sangre mas que de los errores de las medidas de la densidad.

Exactitud en la estimación de las proteínas del plasma.—La densidad del plasma es determinable fácilmente por el presente método con una aproximación de ± 0.0003 . Este corresponde a 0.1 gramos de proteína por 100 cc. de plasma. En comparación con el método de Kjeldahl cuyo error en el estado normal y muchos estados patológicos oscila de 0 a 0.3 gramos por 100 cc.

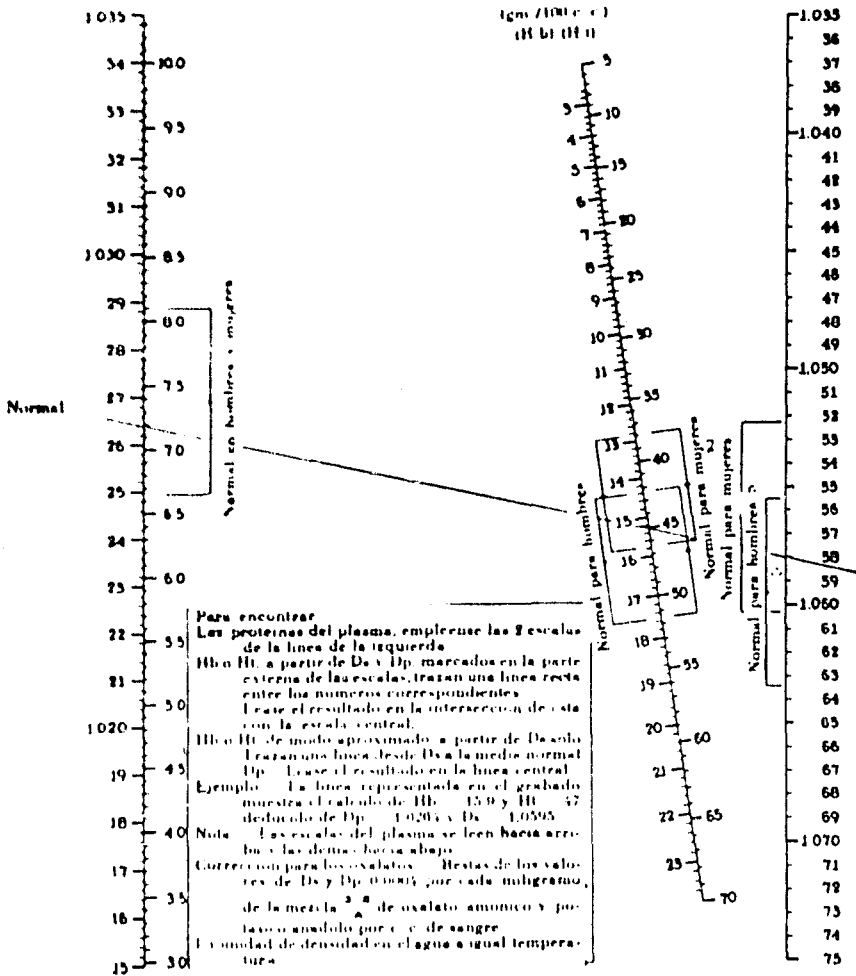
El error mayor de 0.1 gramos se debe a la influencia en la gravedad de los diferentes constituyentes no proteicos. El aumento de la urea y de la glucosa eleva la densidad del plasma tanto como el aumento en proteínas, mientras que una grave hipemia puede bajar la densidad. En nefrosis graves y nefritis Moore y Van Slyke encontraron que el error máximo es de 0.6 gramos de proteínas por 100 cc. de plasma.

Estas condiciones renales, sin embargo con sus grandes variaciones de plasma y lipoides y otros constituyentes no proteínicos ofrecen los más grandes errores que pueden encontrarse.

Lámina para calcular las proteínas del plasma, conociendo su densidad.

Densidad específica de los
proteínas del plasma
(D_p)
(G)

Densidad específica de la sangre
(G_B)



Para encontrar
Las proteínas del plasma, emplearse las 2 escalas
de la línea de la izquierda

Hb o H, a partir de D_p y D_B marcados en la parte
externa de las escalas, trázase una línea recta
entre los números correspondientes

Lease el resultado en la intersección de esta
con la escala central.

Hb o H, de modo aproximado a partir de D_p solo
Trázase una línea desde D_p a la media normal
 D_B . Lease el resultado en la línea central.

Ejemplo: La línea representada en el gráfico
muestra el cálculo de Hb = 15.9 y H = 47
deducido de $D_p = 1.020$ y $D_B = 1.0595$

Nota: Las escalas del plasma se leen hacia arriba
y las demás hacia abajo.

Corrección para los oxalatos: Restas de los valores
de D_p y D_B 0.0005 por cada miligramo
de la mezcla Ca^{++} de oxalato amónico y potasio
por cada mililitro de sangre

La unidad de densidad es el agua a igual temperatura.

FIG. 1.

OBSERVACIONES PERSONALES

Casos tratados para confirmar la exactitud del Método del Sulfato de Cobre

PERSONAS SANAS

| Nombre | Densidad | % de proteínas |
|--------|----------|----------------|
| L.M. | 1.025 | Normal 6.7 |
| I.J. | 1.026 | " 7.5 |
| H.L. | 1.025 | " 6.7 |
| T.G. | 1.025 | " 6.7 |
| L.G. | 1.028 | " 7.8 |
| J.V. | 1.027 | " 7.4 |
| R.P. | 1.026 | " 7.5 |
| A.N. | 1.026 | " 7.5 |
| W.Z. | 1.025 | " 6.7 |
| I.O. | 1.025 | " 6.7 |
| S.L. | 1.025 | " 7.5 |
| R.P. | 1.027 | " 7.4 |
| T.U. | 1.029 | " 8.2 |
| Q.Y. | 1.028 | " 7.8 |
| F.I. | 1.026 | " 7.5 |
| H.K. | 1.026 | " 7.5 |
| B.C. | 1.028 | " 7.8 |
| E.C. | 1.029 | " 8.2 |
| T.F. | 1.026 | " 7.5 |
| A.G. | 1.027 | " 7.4 |

SIFILITICAS

| | | |
|------|-------|----------|
| A.S. | 1.031 | Alta 8.8 |
| L.M. | 1.033 | " 9.6 |
| H.M. | 1.032 | " 9.3 |
| F.P. | 1.032 | " 9.3 |
| M.M. | 1.030 | " 8.5 |
| J.Z. | 1.033 | " 9.6 |
| D.S. | 1.031 | " 8.9 |
| D.C. | 1.032 | " 9.3 |
| E.T. | 1.034 | " 10.0 |
| B.Q. | 1.030 | " 8.5 |

LEPROSAS

| | | | |
|------|-------|------|------|
| N.L. | 1 034 | Alta | 10.0 |
| D.M. | 1 030 | .. | 8.5 |
| T.G. | 1 033 | .. | 9.6 |
| J.P. | 1 031 | .. | 8.9 |
| H.I. | 1 032 | .. | 9.3 |
| C.F. | 1 032 | .. | 9.3 |
| A.B. | 1 032 | .. | 9.3 |
| C.L. | 1 032 | .. | 9.3 |
| M.D. | 1 033 | .. | 9.6 |
| O.B. | 1 034 | .. | 10.0 |

TUBERCULOSAS

| | | | |
|------|-------|------|-----|
| M.A. | 1 031 | Alta | 8.9 |
| A.E. | 1 031 | .. | 8.9 |
| H.D. | 1 033 | .. | 9.6 |
| M.M. | 1 033 | .. | 9.6 |
| A.V. | 1 033 | .. | 9.6 |
| G.B. | 1 030 | .. | 8.5 |

ANEMICAS

| | | | |
|------|-------|------|-----|
| S.D. | 1 018 | Baja | 4.1 |
| E.L. | 1 021 | .. | 5.2 |
| A.N. | 1 016 | .. | 3.3 |
| R.S. | 1 023 | .. | 5.9 |
| O.M. | 1 019 | .. | 4.4 |
| E.O. | 1 019 | .. | 4.4 |
| F.S. | 1 017 | .. | 3.7 |

HERIDAS Y QUEMADAS

| | | | |
|------|-------|------|-----|
| A.N. | 1 023 | Baja | 5.9 |
| T.R. | 1 020 | .. | 4.8 |
| F.M. | 1 019 | .. | 4.4 |
| A.M. | 1 016 | .. | 3.3 |
| A.Y. | 1 018 | .. | 4.1 |

Las tomas de sangre fueron hechas a personas internadas en el Hospital para Tuberculosos de Zozuatán, en el Instituto Dermatológico de Guadalajara y en el Laboratorio de Análisis Químico-biológico del Dr. Angel Leño A. del Castillo

RESUMEN Y CONCLUSIONES

El método del sulfato de cobre es una técnica sencilla y muy exacta para la determinación de las proteínas.

Se pueden verificar rápidamente y no requiere equipo complicado ni costoso.

Los numerosos padecimientos en que varían las cifras de las proteínas y la necesidad de reconocer estas para una atinada terapéutica, hacen de este método uno de los más indispensables para el clínico y el laboratorista.

En las pruebas efectuadas como parte práctica de este trabajo se comprobó la exactitud del procedimiento y así como sus bases teóricas y su aplicación a los casos patológicos señalados en el capítulo respectivo.

Jorge A. Becerra.

BIBLIOGRAFIA

MANUAL DE ANALISIS.— R. R. KRACKE y F. P. PARKER.

ANALISIS CLINICOS.—DR. F. ROMAÑA.

METODOS DE LABORATORIO CLINICO.—KOLMER & BOERNER.—1948.

COPPER SULFATE METHOD FOR MEASURING SPECIFIC GRAVITIES OF WHOLE BLOOD AND FLASMA.—ROBERT A. PHILLIPS, DONALD D. VAN SLYKE, VINCENT P. DOOLE, KENDALL EMERSON JR., PAUL B. HAMILTON y REGINALD M. ARCHIBALD.

H. G. BARBOUR Y W. F. HAMILTON.—J. BIOL. CHEM.—1926.

C. F. JACOBSEN Y LINDERSTROM-LANG.—ACTA PHYSIOL. SCAND.—1940.

V. G. HELLER Y H. PAUL.—J. LAB. CLIN. MED.—1934.

C. T. ASWORTH Y TIGERTT W. D.—J. LAB. CLIN. MED.—1941.

D. D. VAN SLYKE, R. T. DILLON Y R. MARGARIA.—J. BIOL. CHEM.—1934.

B. M. KAGAN.—SOUTH. MED.—1943.

CANNON W. B.—J. AM. MED. ASSOC.—1918.

R. A. PHILLIPS, A. YEOMANS, V. P. DOLE, L. E. FARR, Y VAN SLYKE.—J. CLIN.—1946.

LAS PRUEBAS PRACTICAS DEL PRESENTE TRABAJO FUERON HECHAS EN EL LABORATORIO DE ANALISIS QUIMICO- BIOLOGICOS DEL DR. ANGEL LEARO A. DEL CASTILLO.

MAYO DE 1949.