

UNIVERSIDAD MOTOLINIA
Facultad de Ciencias Químicas

Criofibrinógeno.
Su Importancia en Clínica

T E S I S

Para obtener el título de

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

SARA DE LOURDES PALOMARES FLORES

México, D. F.

1 9 6 1



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

194
SARA DE LOURDES PALOMARES FLORES

Criofibrinógeno.

Su Importancia en Clínica



TESIS PROFESIONAL

MEXICO

1961

A mis padres, señor Ismael Palomares Viguera y señora María Flores de Palomares, con cariño y veneración.

A mis queridos hermanos Ismael, Mario y José Luis.

*Al señor doctor Enrique García
Moreno C. con toda mi gratitud,
por su sabia dirección y ayuda
eficaz.*

A mis maestros

y compañeras.

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Hematología del Instituto Nacional de Cardiología.

Por el permiso que para ello me fué otorgado en la Dirección, mi más cumplido reconocimiento.

CONTENIDO

Introducción

Material

Métodos

Hallazgos

Resumen

Bibliografía

INTRODUCCION

Se sabe que si se suspenden en su propio suero eritrocitos lavados no se forma rouleaux, y su sedimentación disminuye de manera importante respecto de la que manifiestan cuando están suspendidos en su propio plasma. Sin embargo, no es definitiva la demostración de que exista una relación directa entre la concentración de fibrinógeno en una muestra de sangre y la eritrosedimentación de ella. Por otra parte, los eritrocitos lavados en solución salina fisiológica suspendidos en solución de su propio fibrinógeno en suero salino fisiológico, a concentración de fibrinógeno análoga a la que éste tiene en el plasma del que se le separa, se sedimentan de modo similar a como lo hacen en su propio plasma.

Morrison (51) encontró que al tratar gelatina con sulfato de amonio se separan varias fracciones de aquélla, algunas bajo la acción de soluciones poco concentradas de la sal, y otras sólo a concentración mayor de la misma. El investigador observó, asimismo, que si se suspenden levaduras o eritrocitos en suspensiones de las fracciones de gelatina antes citadas la sedimentación de las células es mayor en las suspensiones de gelatina que se separa bajo la acción de soluciones poco concentradas de sulfato de amonio. De manera similar, Morrison encontró que del plasma de mujeres con embarazo en su últi-

mo trimestre se puede separar una fracción de fibrinógeno bajo la acción de concentración de $16 \frac{2}{3}\%$ de sulfato de amonio, y otra fracción —la única usual en individuos normales— bajo la acción de concentración de 20 a 25% de sulfato de amonio. Denominó "contractinógeno" a la fracción de fibrinógeno que precipita bajo la acción de $16 \frac{2}{3}\%$ de sulfato de amonio, y descubrió que esta fracción provoca eritrosedimentación acentuada, en contraposición con la otra fracción de fibrinógeno, que provoca mínima eritrosedimentación.

El autor mencionado planteó que se tratara de alteraciones cualitativas del "complejo fibrinógeno", y no de síntesis de proteínas nuevas, diferentes. Observó que el "contractinógeno" aumenta hasta concentración equivalente a $\frac{1}{3}$ del total del fibrinógeno circulante, en individuos con eritrosedimentación acelerada, y que existe relación directa entre la concentración de "contractinógeno" y la eritrosedimentación.

Lo que es más importante para fines del trabajo que la autora presenta a la consideración del H. Jurado como tesis para aspirar al título de Químico Farmacéutico Biólogo de la Universidad Motolinia, Morrison observó que 1.—El "contractinógeno" precipita cuando el plasma es enfriado. 2.—La cantidad de precipitado depende de la cantidad de "contractinógeno" y del tipo de éste, así como del grado de enfriamiento a que es sometido. 3.—Este fenómeno es reversible. 4.—El fenómeno explica algunos efectos de la temperatura sobre la eritrosedimentación. 5.—El "contractinógeno", en solución acuosa, coagula más rápidamente y se retrae más que el fibrinógeno. 6.—El "contractinógeno" coagula en el transcurso del tiempo, pese a la presencia en el plasma de anticoagulantes del tipo del citrato y del oxalato; es posible que esto explique el que la eritrosedimentación se acorte en muestras de sangre en las

que la determinación se hace varias horas después de haberse obtenido la muestra. 7.—La desviación del "complejo fibrinógeno, con aparición en la circulación de compuestos que precipitan con concentraciones bajas de sulfato de amonio se manifiesta en clínica por la aceleración de la eritrosedimentación y de la retracción del coágulo.

Lewis, Smith y von Korff (44) encontraron que la inyección a conejos por vía intravenosa de 2 ml. de endotoxina de *Meningococo* (diluída al 1:200), de *Serratia marcescens* (0.2 mg.), o de *Shigella paradysenteriae* (0.1 mg.) provoca en algún momento durante las 6 horas subsecuentes la aparición en la circulación de una substancia —presente en el plasma pero no en el suero— que en presencia de heparina (0.1 mg./ml.) floclula a 4° C. en 15 a 20 minutos, y que se redisuelve al calentarse. Esto no sucede a plasmas con citrato o con oxalato, pero sí al plasma con citrato al que se le agrega heparina. Encontraron, asimismo, que la fracción no coagulable de preparaciones crudas de fibrinógeno ("contractinógeno"), no coagula, o casi no coagula, con tirosina, y es insoluble en el frío; esta característica aumenta añadiéndole heparina.

Lewis y colaboradores encontraron la substancia precipitable por heparina y frío en humanos, en concentración mayor en enfermos con fiebre reumática aguda que en normales, con disminución de su concentración durante el tratamiento de aquéllos con salicilato y esteroides. El contractinógeno y el criofibrinógeno parecen ser la misma substancia, estrechamente relacionada al fibrinógeno.

Smith y von Korff (65) encontraron que el contractinógeno aumenta durante el curso de enfermedades que producen inflamación aguda, o necrosis. Godal (19) hizo un estudio mi-

nucioso de lo que él llama complejo fibrinógeno, con sustancias más puras.

En el Laboratorio de Trombosis del Instituto de Cardiología se confirmó lo observado por Lewis y colaboradores, y se encontró que en individuos normales, y en enfermos con fiebre reumática activa que están siendo tratados, no es posible poner de manifiesto la presencia del criofibrinógeno.

Los estudios que se presentan ante el H Jurado como tesis para aspirar al grado de Químico Farmacéutico Biólogo, se hicieron como parte de una investigación para evaluar el hallazgo de criofibrinógeno como dato de actividad de la fiebre reumática.

El procedimiento que se siguió para poner en evidencia la presencia de criofibrinógeno es simple. Sin embargo, en el curso de esta investigación se hizo notoria la necesidad de un método sencillo para medir cantidades pequeñas de proteínas en muestras de plasma, de plasma diluido o de fracciones del plasma. Para ello, se intentó fijar muestras de materiales diversos con proteínas a tiras de papel, colorearlas, lavarlas y medir espectrofotométricamente el color fijado por las proteínas. Dicho procedimiento, y los resultados que con él se obtuvieron, se explican con algún detalle en esta tesis.

MATERIAL

Se hicieron estudios en: 1.—87 individuos normales seleccionados al azar de la Consulta de la Campaña contra la Fiebre Reumática, y de los Servicios de Internamiento del Instituto Nacional de Cardiología. Este grupo estuvo integrado por 70 mujeres y por 17 varones, cuya edad osciló entre 4 y 65 años. 2.—26 niñas cuya edad osciló entre 4 y 12 años, con promedio de 8 años, en quienes sobre base objetiva adecuada se estableció el diagnóstico de fiebre reumática activa y evolutiva, y quienes al momento de ser estudiadas estaban ya siendo tratadas. 3.—12 enfermos con fiebre reumática activa que aún no habían sido tratados cuando se les hicieron estudios.

A los individuos del primer grupo se les hizo encuesta preliminar con el objeto de recabar de manera grosera y aproximada, información sobre la incidencia de hallazgo de "criofibrinógeno" en la población que es vista en el Instituto Nacional de Cardiología. Consecuentemente, en estas personas sólo se hizo busca de criofibrinógeno mediante el método que se detalla en el capítulo correspondiente.

En los enfermos del segundo y del tercer grupo se hicieron los estudios siguientes: 1.—Cuenta de leucocitos. 2.—Lec-

tura de eritrosedimentación y hematocrito (volumen globular porcentual). 3.—Búsqueda de criofibrinógeno. 4.—Cuantificación de proteínas totales por el método de Kjeldahl. 5.—Cuantificación de proteínas totales por evaluación espectrofotométrica de la cantidad de colorante absorbido por muestras de plasma o de suero fijadas en tiras de papel por calor (en lo subsecuente se hará mención de este método como cuantificación colorimétrica de proteínas). 6.—Fraccionamiento de proteínas séricas por electroforesis en papel, y cuantificación de las fracciones por evaluación espectrofotométrica de la cantidad de colorante absorbido por las fracciones fijadas en tiras de papel por calor (en lo subsecuente se hará referencia a este método como electroforesis cuantitativa de las proteínas). 7.—Cuantificación de fibrinógeno por evaluación espectrofotométrica del color desarrollado con el reactivo fenol de Folin Ciocalteau por la tirosina liberada por hidrólisis alcalina del fibrinógeno lavado obtenido por manipulación con trombina de muestras de plasma de los individuos en estudio.

En esta tesis se señalan sólo los resultados de los estudios que se hicieron para poner en evidencia la presencia de criofibrinógeno, y de los ensayos que se hicieron para valorar la cuantificación de proteínas por evaluación espectrofotométrica del color fijado por proteínas fijadas en tiras de papel.

MÉTODOS

En este capítulo se hace descripción detallada de los métodos que se emplearon en el curso de este trabajo para hacer diversas evaluaciones de proteínas. Se describen, asimismo, algunos datos numéricos que permiten apreciar de manera gruesa la validez relativa para cuantificación de proteínas de algunos de los métodos que para tal fin se emplearon, y que fueron comparados entre sí.

BUSQUEDA DE CRIOFIBRINOGENO

Se obtuvo muestra de sangre por punción venosa, y se empleó como anticoagulante mezcla de 1.2 mg. de oxalato de amonio y 0.8 mg. de oxalato de potasio por cada ml. de sangre. Se separó el plasma de las muestras de sangre mediante centrifugación. A dos muestras de plasma se les agregó heparina (0.025 mg. de heparina por 1 ml. de plasma). Una muestra de plasma con heparina y otra de plasma sin heparina fueron incubadas a 37° C., y muestras similares fueron incubadas a 4° C., durante 24 horas. Se hizo búsqueda, por observación a simple vista de las muestras, de precipitado de criofi-

brinógeno en todas las muestras, antes de incubación y después de ella. En las muestras en las que se encontró precipitado de críofibrinógeno, éste fué separado por centrifugación del plasma sobrenadante sin críofibrinógeno, y el precipitado de críofibrinógeno fué lavado 4 ó 5 veces con solución helada de cloruro de sodio al 0.85% en agua, y finalmente resuspendido hasta un volumen conocido, de solución de cloruro de sodio al 0.85% en agua. En las muestras de plasma con heparina incubada a 37° C., en el plasma sin críofibrinógeno (vide supra), y en la suspensión de críofibrinógeno en solución fisiológica, se hicieron las determinaciones siguientes

A.—Cuantificación de proteínas por el método de Kjeldahl.

B.—Cuantificación colorimétrica de proteínas.

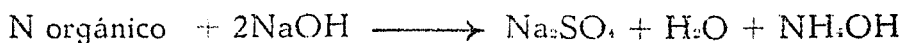
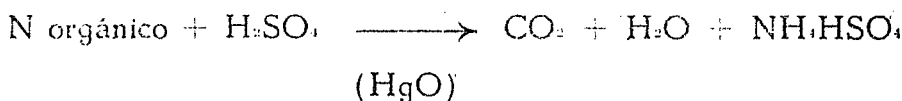
C.—Electroforesis cuantitativa de las proteínas.

D.—Cuantificación de fibrinógeno.

CUANTIFICACION DE PROTEINAS METODO DE KJELDAHL (35,36).

En el procedimiento de Kjeldahl los compuestos nitrogenados cuyo nitrógeno se encuentra en forma de amida o amina son sometidos a digestión completa, hasta aclaración de la solución por expulsión total del carbono. Durante la digestión del compuesto orgánico con ácido sulfúrico en ebullición, y sulfato de potasio, usando óxido mercúrico como catalizador, por hidrólisis y oxidación se forman sales de amonio. En un segundo estado, se alcaliniza con hidróxido de sodio y se libera amoníaco del sulfato de amonio, que se destila con arras-

tre de vapor de agua hasta una solución de ácido bórico. Posteriormente, por titulación se cuantifica la cantidad de amoníaco liberada.



El nitrógeno de los compuestos tipo aminas aromáticas, hidroxilamina, hidrazina, hidrazona, ozononas, nitroso, azo, o de los nitro compuestos, no es cuantificado por este procedimiento salvo que la muestra sea primero reducida, para convertir dichos grupos en aminas (57). Los nitratos (2) o los nitritos se logran cuantificar por este método si se escapa nitrógeno del ácido nítrico formado, y se le reduce a amoníaco (67). Tratándose de las proteínas, que por lo general no contienen estos grupos, durante la digestión se pueden formar anillos heterocíclicos o aromáticos que resisten la degradación y, por ello, si se busca una recuperación total, deben ser sometidos a hidrólisis reductora antes de ser digeridas (32). Puede perderse nitrógeno de la mezcla de digestión por volatilización, particularmente si la temperatura de ebullición se eleva demasiado, por adición de sales, o por prolongar en exceso los períodos de digestión (71).

En el curso de este trabajo no se empleó selenio como catalizador, como fuera recomendado por primera vez por Lauro (42, 43), debido a que si bien la acción catalítica del selenio es proporcional a la cantidad que de él se emplee (31), durante la digestión prolongada con selenio la recuperación de nitrógeno es incompleta (64,75) o lenta (75), tanto más cuan-

to más selenio se emplee (8,9). Su empleo obliga, en general, a efectuar la digestión durante tiempo y a temperaturas críticas tales, que el método se hace difícil y poco reproducible (13, 18, 12, 75), y porque interfiere cuando la cantidad de sulfato de potasio empleada es superior a 12 g. (13).

Además de un buen catalizador, la digestión de compuestos nitrogenados implícita en el método de Kjeldahl requiere una cantidad apropiada de sulfato de potasio (20), al grado que la concentración de sulfato de potasio y ácido sulfúrico, (58) en presencia de un catalizador adecuado es, el factor determinante de la eficiencia de la hidrólisis. Es decir, existe una relación definida entre la concentración de ácido sulfúrico, sulfato de potasio, y el tiempo de digestión, y la recuperación de nitrógeno.

Parece deseable emplear compuestos de mercurio como catalizadores (75), y la omisión de ellos provoca disminución en la recuperación del nitrógeno de compuestos considerados como refractarios (compuestos con anillo heterocíclico). En ausencia de selenio, la cantidad de sulfato de potasio y óxido mercúrico y el tiempo de digestión no son críticos por lo que respecta a pérdida de nitrógeno (75). La Asociación de Químicos Agrícolas Oficiales (Association of Official Agricultural Chemists), de los Estados Unidos de Norteamérica recomienda el empleo de una mezcla de digestión que incluye los compuestos mencionados, en la proporción que se detalla a continuación, para la digestión durante 3 horas (3): 25 ml. de ácido sulfúrico, 15 g. de sulfato de potasio, y 0.6 de óxido mercúrico.

Reactivos.—Se emplearon los siguientes:

1.—Agua destilada.

2.—Ácido sulfúrico concentrado, grado analítico (H_2SO_4).

- 3.—Oxido mercúrico, grado analítico (HgO).
- 4.—Sulfato de potasio, grado analítico ($\text{K}_2\text{SO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$).
- 5.—Solución indicadora de ácido bórico (H_3BO_3) al 2%, preparada mezclando las siguientes soluciones 500 ml. de solución de ácido bórico al 0.4% en agua; 1 ml. de solución de rojo de metilo al 0.1% en alcohol etílico, y 8 ml. de solución de verde de bromo cresol al 0.6% en alcohol etílico, aforando hasta 1,000 ml. con agua.
- 6.—Solución de hidróxido de sodio (NaOH) al 50% en agua.
- 7.—Solución patrón de sulfato de amonio ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) que contenga 1 mg. de nitrógeno por ml. (4.719 g. de la sal, disuelta hasta 1,000 ml. en agua).

Digestión.

Con micropipetas aforadas se vaciaron 0.3 ml. de la muestra en estudio (plasma, plasma sin criofibrinógeno, suspensión de criofibrinógeno) en tubo de vidrio Pyrex o Jena "Duran 50" de 22 por 175 mm. y, en orden sucesivo se agregaron 1 ml. de ácido sulfúrico, 200 mg. de sulfato de potasio y 5 mg. de óxido mercúrico. Durante los estudios preliminares las muestras se hicieron por duplicado, para cotejar las variaciones de los resultados, y siempre se hizo determinación simultánea de fondo, para lo cual se emplearon los reactivos mencionados, con omisión de la muestra con proteínas.

Los tubos se colocaron en un digestor diseñado para el objeto en este laboratorio (García Moreno y de Anda, por publicar). Es recomendable el empleo de la gradilla para digestión con calentamiento eléctrico descrita por Southerland y Free-

man (66) cuando se desean hacer veinte o más determinaciones simultáneas. Durante la primera hora de digestión se mantuvo, mediante reóstato, temperatura de aproximadamente 100° C. hasta evaporación total del agua que, en general, es apreciable por la aparición de vapores más densos, y hasta achicharramiento de la materia orgánica. Durante las 2 horas subsecuentes se mantuvo temperatura de 250° C. y durante la última hora se mantuvo temperatura de 300 a 360° C., hasta aclaramiento completo de la solución. Terminada la digestión, se dejó que los tubos se enfriaran antes de proceder a la destilación de las muestras.

En general, es conveniente que la digestión se haga en matraces de Kjeldahl o en tubos de dimensiones apropiadas (22 por 175 mm.), que se colocan directamente sobre la flama, o en calentador eléctrico, a temperatura tal que la ebullición no sea turbulenta, con posibilidad de que se pierda muestra por saltar líquido al exterior del recipiente, ni que haya pérdida de la muestra por volatilización (26).

Destilación.

Se empleó un modelo en una pieza de aparato para destilación de micro-Kjeldahl, con generador de vapor eléctrico, construído según especificaciones del Comité de Aparatos de Microquímica (1). Para especificaciones de aparatos para destilación semimicro de Kjeldahl consultar: (30, 33, 54).

La destilación misma se hizo siguiendo los pasos que se describen en seguida:

- 1.—Conectar el regulador de voltaje a una toma de corrien-

te eléctrica. Conectar el calentador de inmersión al regulador de voltaje. Llevar la palanca de contacto del regulador de voltaje a posición de cierre del circuito. Ajustar el regulador de voltaje en forma tal que permita el paso de la corriente eléctrica necesaria para calentar hasta ebullición el agua del generador de vapor. Dejar que éste pase hasta la cámara de destilación.

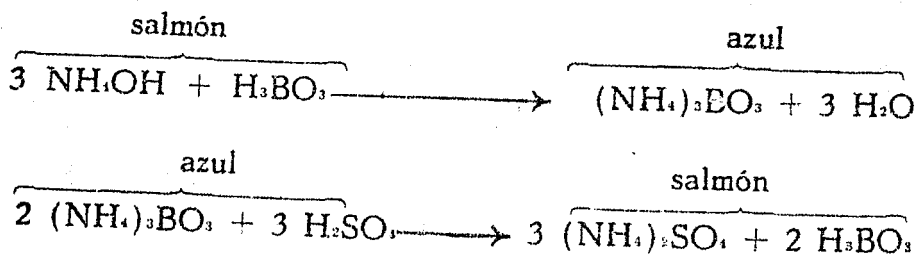
- 2.—Poner en el extremo del condensador un matraz Erlenmeyer de 125 ml. conteniendo 5 ml. de indicador, de manera que el vapor borbotee en el indicador.
- 3.—Abrir la llave del embudo y la llave del drenaje.
- 4.—Transferir cuantitativamente la muestra por analizar, ya fría, del tubo de digestión al embudo del destilador ayudándose con un agitador y procurando que el líquido pase directamente a la cámara y no se extienda en la pared del embudo.
- 5.—Enjuagar 3 ó 4 veces, con porciones de 1 ml. de agua destilada, el tubo de digestión, dejando pasar el líquido de lavado a la cámara antes de agregar la siguiente porción de agua.
- 6.—Agregar 10 ml. de solución de hidróxido de sodio al 50% con una pipeta con orificio de salida ancho —para vaciar con rapidez— y *cerrar de inmediato las dos llaves*.
- 7.—Dejar destilar el tiempo necesario —aproximadamente 6 minutos— para recoger unos 15 ml. de destilado o recoger destilado hasta que el indicador cambie de color (de salmón a azul).
- 8.—Sin interrumpir el vapor, bajar el matraz Erlenmeyer para que el extremo del condensador quede unos 2 cm.

arriba del nivel del líquido, y lavar la punta de aquél con un poco de agua destilada.

- 9.—Dejar que la destilación continúe unos 2 minutos más.
- 10.—Separar el matraz Erlenmeyer y proceder a la titulación.
- 11.—Lavar el aparato.

Titulación.

La titulación implica las reacciones siguientes



o sea que el amoníaco del destilado es fijado por el ácido bórico, virando el color del indicador de salmón a azul; el borato de amonio formado se titula por adición de solución valorada de ácido sulfúrico, hasta neutralización, con cambio del color del indicador de azul a salmón.

Cálculos.

Los cálculos se hicieron según la fórmula que se detalla en seguida:

$$\frac{(\text{vol. probl.} - \text{vol. testigo}) \times 0.0143 \times 14}{\text{vol. de la muestra.}} \times 100 = \begin{array}{l} \text{mg. de nitró-} \\ \text{geno en 1000} \\ \text{ml. de mues-} \\ \text{tra.} \end{array}$$

vol. probl. = Volumen de solución ácido valorado necesario para neutralizar la muestra (ml.).

vol. testigo = Volumen de solución ácido valorada necesario para neutralizar el testigo. (ml.).

0.0143 = Normalidad del ácido sulfúrico.

14 = Equivalente del nitrógeno.

vol. de la muestra = Volumen de la muestra problema al iniciarse la digestión. (ml.).

mg. de nitrógeno \times 6.25 = mg. de proteínas totales.

CUANTIFICACION COLORIMETRICA DE PROTEINAS (60).

Este procedimiento implica la aplicación de una cantidad determinada del material cuyo contenido de proteínas se desea cuantificar en una zona limitada de una tira de papel, la fijación de las proteínas a la tira de papel mediante calor, la tinción selectiva y cuantitativa de las proteínas, la remoción del exceso de colorante, la separación del colorante de la tira de papel, y la evaluación colorimétrica de la cantidad de colorante.

Este procedimiento exige que la substancia que se emplee como colorante desarrolle intensidad de color tal que obedezca la ley de Beer cuando se apliquen procedimientos colorimétricos para evaluarla.

En la literatura se ha sugerido el empleo de numerosas substancias para colorear proteínas en tiras de papel. Las más comúnmente usadas han sido el diazo colorante negro amido 10B o negro naftaleno 12B 200 (22, 23, 24, 25), con peso molecular de 572 y fórmula elemental $C_{22}H_{18}O_6N_6S_2$; el azul de bromofenol con peso molecular de 169.6 y fórmula elemental $C_{19}H_{10}O_5Br_3S$ (5, 15), el azo carmín B, con peso molecular de 627 y fórmula elemental $C_{23}H_{20}O_6N_3S_3Cl$ (39, 72, 73); el escar-

lata neococina acilan (50), Ponceau 2 B (63), y el verde brillante S.F. (17, 41). Numerosos autores, a partir del análisis de la curva de extinción de diferentes colorantes, han elegido como más ventajosa la tinción de proteínas séricas con negro amido (6, 25, 53) o, en su defecto, con azul de bromo fenol. Uno de los inconvenientes del empleo del negro amido es la dificultad para separar el colorante de la tira de papel. Así, el coeficiente de extinción de una tira de papel Whatmann No. 1 después de tinción con negro amido, bromofenol, y verde brillante, y decoloración subsecuente —después de un período de lavado de 4 horas—, es de 0.07, 0.005 y 0.02 (25). Los tres colorantes mencionados tiñen la albúmina más intensamente que las globulinas, en grado tal que el factor de corrección correspondiente al negro amido se ha calculado en 1.4 (74), 1.6 (56), 1.7 (7), y 2.2 (59). Se ha encontrado que si la concentración de las albúminas del suero se cuantifica arbitrariamente como la unidad el factor de corrección por el cual se deben multiplicar los resultados de cuantificación de gama globulinas es 1.1 cuando se emplea bromofenol, 1.6 cuando se emplea negro amido y 1.8 cuando se emplea el verde carmín (56). Sobre regularización de métodos es recomendable consultar a Sunderland (77), Petters (55) y Carolin (26). Se ha encontrado que el negro brillante S.F. se puede separar completamente del papel, (14, 61) y que tiñe uniformemente todas las fracciones de proteínas séricas (10), pero su solución en agua acidulada con ácido acético no es estable (77). El verde de lissamina es otro colorante que tiñe de manera uniforme las fracciones de proteínas séricas (21). La tinción distinta de las diversas proteínas séricas por un colorante determinado se hace menos evidente cuando la evaluación de la intensidad de la coloración se hace por el método de transparencia que no por el método de separación del co-

lor. Existen datos (16, 40), que sugieren que la adsorción es uno de los factores que explican la unión del colorante a las proteínas. Es plausible que la adsorción no sea similar para todas las fracciones proteicas, y es plausible que la separación también difiera en magnitud.

En cualquier caso, es obvio que la cuantificación depende de la coloración, y que aquélla sólo es válida cuando ésta es proporcional a la concentración del sustrato.

La cuantificación de las proteínas fijadas en las tiras de papel se puede hacer por separación del color y evaluación colorimétrica de él, o por fotometría directa (Método de transparencia). Existen actualmente diversos aparatos comerciales capaces de hacer evaluaciones por fotometría directa. Se han hecho estudios comparativos minuciosos en método análogos de coloración y comparación de resultados mediante fotometría directa (4). Se han sugerido la adición de Tween 80 al 1% en acético al 10% en metanol (29) para mejorar la separación, y la adición de 0.005% de albúmina para preimpregnar la celulosa de proteínas y disminuir la absorción y el error de ese método (40), en esta forma es posible obtener rectas que cruzan el punto de unión de coordenada y abcisa en gráficas de correlación de concentración contra extinción. En el curso de este trabajo se hicieron mediciones con el registrador automático de extinción y calculador simultáneo de las áreas circunscritas en la curva, "Spinco Modelo R"; sin embargo, los datos que tiene interés presentar son los que se obtuvieron por evaluación espectrofotométrica del colorante separado de las tiras de papel.

Reactivos.

- 1.—Solución de cloruro de sodio al 0.85% en agua.
- 2.—Solución amortiguadora conteniendo 15.4 g. de dietilbarbiturato de sodio y 2.76 g. de ácido dietilbarbitúrico en agua, por 1000 ml. de solución. Esta solución debe tener pH de 8.6, y fuerza iónica de 0.075.
- 3.—Alcohol metílico, grado analítico.
- 4.—Solución colorante de azul de bromofenol al 0.1% en alcohol metílico.
- 5.—Solución de ácido acético glacial al 5% en agua.
- 6.—Solución de bicarbonato de sodio al 0.5% en agua.

Procedimiento.

Humedecer una tira de papel en solución amortiguadora, sobre una placa de vidrio tratada con silicona. Quitar el exceso de humedad con papel filtro No. 7706.

Con pipeta calibrada para transferir desde 1 hasta 10 microlitros medir volumen seleccionado de la muestra en estudio y extenderlo en forma de película en la placa correspondiente del aplicador (Spinco Par. No. 300-805). Transferir la muestra del aplicador a la tira de papel. Suspender la tira horizontalmente sujetando los extremos a la gradilla, y secar a 120° C. durante 30 minutos. Fijar por inmersión en metanol por 30 minutos. Teñir por inmersión en solución de azul de bromofenol durante 30 minutos. Lavar durante 6 minutos, 3 veces, en solución de ácido acético diluido. Inmediatamente después del último lavado, quitar el exceso de humedad compri-

miendo la tira de papel entre dos tiras de papel filtro No. 7706 Inmediatamente después, suspender la tira horizontalmente en el horno, y secar a 120° C. durante 15 minutos.. Recortar las porciones coloreadas, colocar cada una de ellas en un tubo de 16 por 150 mm., añadir 10 ml. de solución de bicarbonato de sodio, colocar los tubos en gradilla y agitar durante 30 minutos en agitador rotatorio a 150 r.p.m. con radio de $\frac{3}{4}$ de pulgada. Transferir la solución coloreada a celdillas de 1 cm. de longitud de paso de onda y determinar densidad óptica a $575 m_{\mu}$ de longitud de onda. Se empleó para ello un espectrofotómetro Beckman B.

ELECTROFORESIS CUANTITATIVA

DE LAS PROTEINAS

Hardy (27) denominó cataforesis al transporte por corriente eléctrica de sustancias disueltas. Michaelis (49) denominó electroforesis a la migración de iones coloides en un campo eléctrico. König (37, 38) fué el primero en emplear papel como sostén de iones a movilizar en un campo eléctrico. El procedimiento de separación de iones sostenidos en diversos medios, en un campo eléctrico, ha recibido diferentes nombres: partición cromatográfica con voltaje aplicado (28), electroforesis en papel (11,72), microelectroforesis (15), y microionoforesis (15), ionografía (46, 48), electrocromatografía (68), electroforesis en zona (70), electrocromatoforesis (47) y electromigración (47). Se ha hecho costumbre hablar de ionoforesis para connotar movimiento de iones en un campo eléctrico y de electroforesis para designar al movimiento de partículas coloides en un campo eléctrico. Esto es obviamente arbitrario, puesto que los coloides dissociables migran como iones de dimensiones coloidales, o los coloides pueden absorber iones del medio y así participar indirectamente en la conducción. La velocidad de migración de las partículas coloides en la electroforesis libre es del mismo orden de magnitud que

la de los iones comunes. El efecto inhibitor que su tamaño ejerce sobre la movilidad de los coloides es compensado por el número de cargas del coloide. En general, se habla de electrocromatografía y de electrocromatoforesis (11) cuando el procedimiento implica un compuesto cromatográfico, y se habla de electroreoforesis para designar movimientos en los que la evaporación se regula (45). La forma clásica libre o "ancestral" de electroforesis corresponde al método original según Tiselius, Philpot y Svensson (34).

En el curso de este estudio se empleó el procedimiento B sugerido por la Division Spinco de la Beckman Instruments (69).

Material y equipo.

- 1.—Tiras de papel filtro (Beckman, Spinco Division No. 300-846 S&S 2034 A mgl.).
- 2.—Mechas. Tiras de papel filtro grueso (Beckman, Spinco No. 300-831).
- 3.—Voltaje: 2.5 miliamperios.
- 4.—Horno, a 120-130° C.
- 5.—Celda para electroforesis unidimensional en tira de papel colgante, según Durrum (Spinco Beckman).
- 6.—Fuente de poder para corriente continua regulada, con salida de voltaje constante de 2 a 50 miliamperios.

Reactivos.

- 1.—Solución amortiguadora conteniendo 15.4 g. de dietilbarbiturato de sodio y 2.76 g. de ácido dietilbarbitúrico en agua, por 1000 ml. de solución. Esta solución debe tener pH de 8.6, y fuerza iónica de 0.075.
- 2.—Alcohol metílico, grado analítico.
- 3.—Solución colorante de azul de bromofenol al 0.1% en alcohol metílico.
- 4.—Solución de ácido acético glacial al 5% en agua.
- 5.—Solución de bicarbonato de sodio al 0.05% en agua.

Procedimiento.

Se empleó el descrito como procedimiento B en el manual de instrucciones Spinco (69).

La evaluación del color se hizo de la manera siguiente:

- 1.—Recortar los segmentos de la tira de papel correspondientes a las bandas de albúmina, globulinas alfa 1, alfa 2, beta y gama.
- 2.—Colocar cada porción en un tubo de 16 por 150 mm., y añadir 10 ml. de solución de bicarbonato de sodio al 0.05%.
- 3.—Agitar durante 30 minutos, en agitador rotatorio a 150 r.p.m., con radio de 3/4 de pulgada.
- 4.—Transferir la solución coloreada a celdillas de 1 cm. de longitud de paso de onda, y determinar densidad óptica a 575 m_μ de longitud de onda.

5.—Calcular concentración de proteínas como gramos por 100 ml. de plasma. Para ello se hicieron determinaciones por el método de Kjeldahl de la cantidad total de proteínas en la muestra que se sometió a electroforesis.

CUANTIFICACION DE FIBRINOGENO

La cantidad de fibrina (lavada y alcalinizada) que se precipita del plasma con trombina (62), en presencia de partículas de vidrio, se determinó colorimétricamente por la adición de reactivo fenol de Folin Ciocalteau. La densidad óptica del color desarrollado es directamente proporcional a la concentración de la tirosina en el fibrinógeno, y puede ser comparada con el color desarrollado por una cantidad conocida de tirosina (solución patrón).

Reactivos.

- 1.—Vidrio molido.
- 2.—Solución de trombina comercial de 1000 U/ml.
- 3.—Solución de hidróxido de sodio al 10% en agua.
- 4.—Solución de carbonato de sodio al 20% en agua.
- 5.—Solución reactivo fenol de Folin Ciocalteau.
- 6.—Solución patrón de tirosina (200 mg. de tirosina por 1000 ml.) en una solución de 0.1 N. de ácido clorhídrico.

Procedimiento.

En un tubo de ensaye de 14 por 125 mm. se ponen 0.5 ml. de vidrio molido, 10 ml. de solución de cloruro de sodio al 0.85% y 0.05 ml. de solución de trombina. Se agregan 0.5 ml. de plasma, y el tubo se agita con movimiento oscilatorio suave.

Se pueden usar volúmenes de plasma tan pequeños como 0.1 ml. Con una preparación activa de trombina, la coagulación es completa en 2 ó 3 minutos y la fibrina coagulada se adhiere a las partículas de vidrio. Si la coagulación continúa después de haber cesado la agitación, la fibrina se adhiere al tubo, formando un coágulo. 10 minutos después de haber mezclado trombina y muestra el tubo se centrifuga por 5 minutos a 2,000 r.p.m., y el sobrenadante se desecha. El coágulo se lava con 10 ml. de solución de cloruro de sodio al 0.85%, exprimiéndolo cuidadosamente contra las paredes del tubo con un agitador de vidrio. La fibrina es separada por centrifugación breve, decantando el sobrenadante. Se le agrega 1 ml. de solución de hidróxido de sodio al 10%, y la mezcla se pone a ebullición por 10 minutos, con evaporaciones mínimas, si se hace en baño maría cubierto.

Se enfría el tubo y se agregan 7 ml. de agua, seguidos de 3 ml. de solución de carbonato de sodio al 20% y de 1 ml. de reactivo fenol de Folín Ciocalteau.

Se desarrolla color de manera completa en 10 minutos. Se diluye 1 ml. de la solución con 3 ml. de agua y la intensidad de color se lee en el espectrofotómetro a 650 m μ .

La lectura se hace contra un blanco, y se regula mediante un patrón, que se prepara con 1 ml. de solución patrón de tirosina al que se le agregan 1 ml. de solución de hidróxido

de sodio, 6 ml. de agua, 3 ml. de carbonato de sodio y 1 ml. de reactivo fenol de Folin Ciocalteau, diluyendo de esta mezcla 1 ml. con 3 ml. de agua y leyendo la intensidad de color después de 10 minutos.

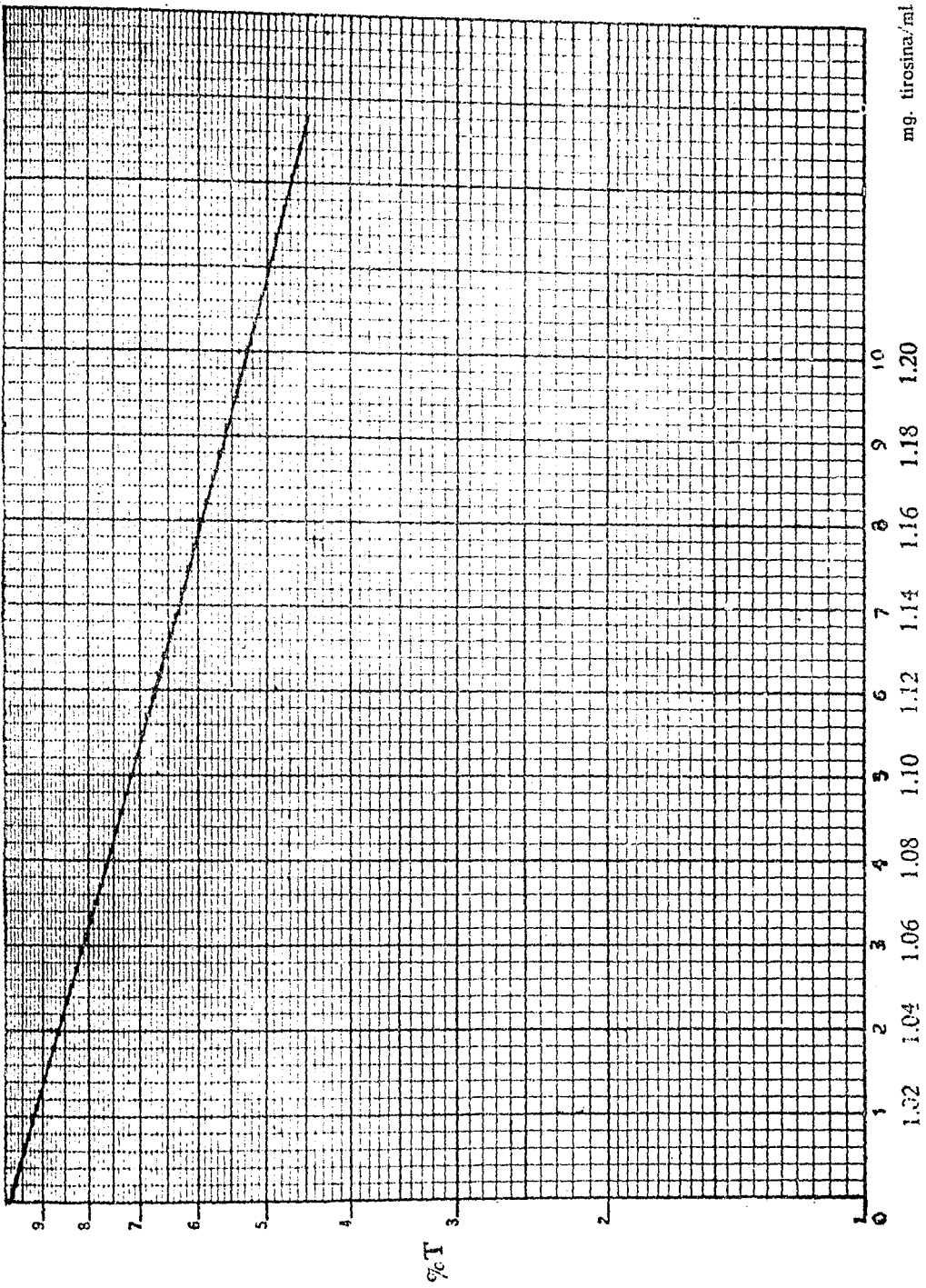
La densidad óptica desarrolla color que es directamente proporcional a la concentración de fibrinógeno o tirosina, dentro del rango de 0 a 0.35 mg. de tirosina.

Curva de calibración.

Se miden cantidades diversas de tirosina, diluida en agua, y se les agrega agua hasta volumen total de 7 ml. Se agrega 1 ml. de solución de hidróxido de sodio al 10% a cada muestra, seguido de 3 ml. de carbonato de sodio al 20% y de 1 ml. de solución reactivo fenol de Folin Ciocalteau. Después de 10 minutos, se diluye 1 ml. con 3 ml. de agua, y la intensidad de color se lee contra un blanco, a una longitud de onda de 650 $m\mu$.

Los valores de tirosina (mg./100 ml.) de la curva son transferibles a valores de fibrinógeno, multiplicados por 11.7, factor de concentración de tirosina contenida en el fibrinógeno.

Cuando las muestras en las que se determina fibrinógeno se obtienen con oxalato sódico líquido, se hace corrección para dilución multiplicando los hallazgos por el factor correspondiente, de 1.08.



HALLAZGOS

Como fué señalado en la introducción, y en el capítulo correspondiente a material, en esta tesis se señalan únicamente los hallazgos referentes a la presencia o ausencia de críofibrinógeno en los individuos que fueron sometidos a estudio, y aquellos referentes a la evaluación del procedimiento de cuantificación de proteínas fijadas y coloreadas en tiras de papel.

I.—Críofibrinógeno.

- a).—De los 87 individuos seleccionados al azar, con diagnóstico de fiebre reumática activa y evolutiva que al momento de ser estudiados ya habían tenido tratamiento profiláctico, se hizo búsqueda de críofibrinógeno, y en ninguno de ellos se encontró la proteína anormal.
- b).—De las 26 niñas en quienes sobre base objetiva adecuada se estableció el diagnóstico de fiebre reumática activa y evolutiva y quienes al momento de ser estudiadas estaban ya siendo tratadas, la presencia de la proteína anormal fué negativa.

c).—En los 12 enfermos con fiebre reumática activa que aún no habían sido tratados al momento de ser estudiados en quienes se hizo búsqueda de criofibrinógeno, se encontró la proteína anormal.

II.—Evaluación espectrofotométrica de color fijado por proteínas fijadas en tiras de papel.

Para fines de brevedad se presenta solamente una sola curva de calibración de las muchas que se obtuvieron para evaluación de proteínas totales, albúmina, fibrinógeno y globulinas, así como los datos estadísticos pertinentes.

Debe aclararse que los datos que se presentan sobre proteínas totales, albúmina y fibrinógeno fueron escogidas al azar, y no presentan una idealización o un promedio del total de los datos que se obtuvieron.

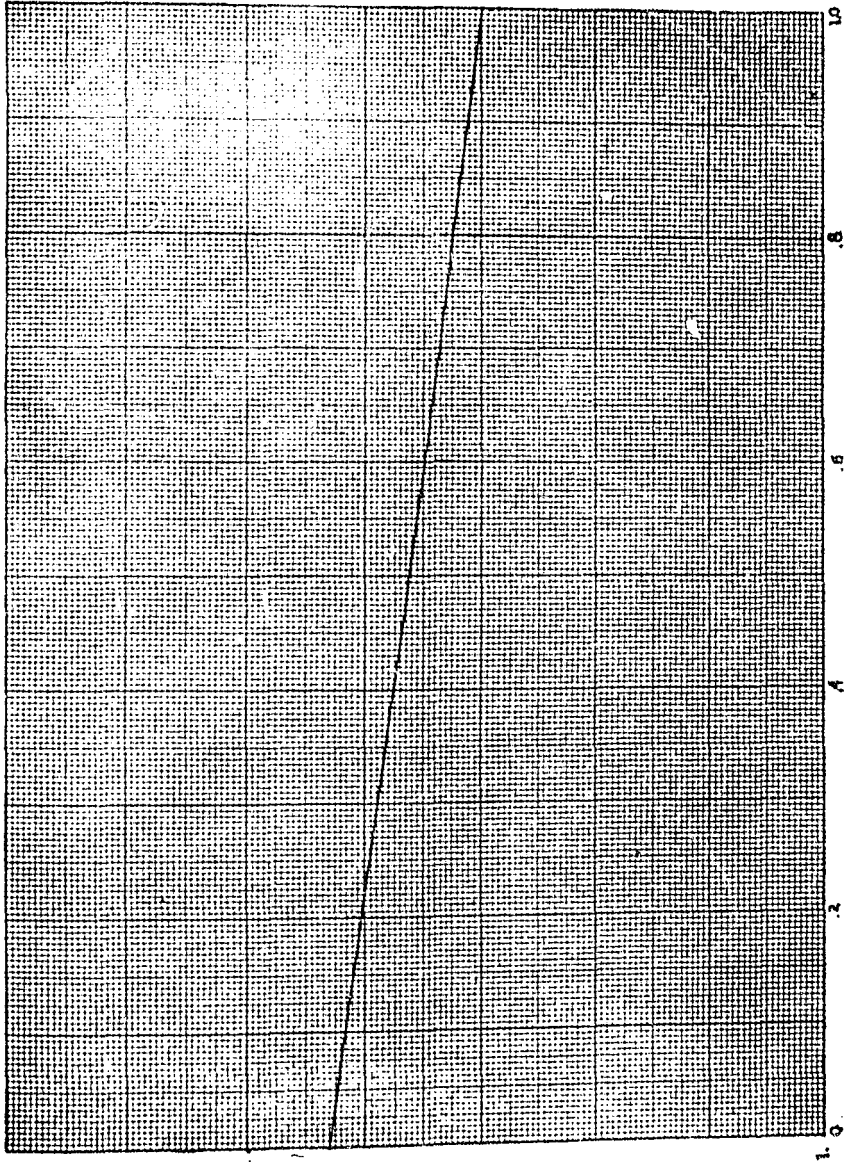
Se calcularon las regresiones de acuerdo con el método de los números cuadrados en virtud de que las variancias resultaron eterógenas, se calculó la regresión ponderada.

Esta recta se determina por la fórmula que abajo se indica, este procedimiento cuantifica la cantidad de información que proporciona cada determinación, de acuerdo con la variancia de determinaciones repetidas en las mismas condiciones. Es este procedimiento el más riguroso para el cálculo de regresiones, aun cuando, habitualmente no se emplea por lo laborioso.

$$b = \frac{\sum (F_i x_i y_i) - (\sum f_i x_i) (\sum f_i y_i / n)}{\sum p_i x_i^2 - (\sum f_i x_i)^2 / n}$$

$$a = \frac{(\sum f_i y_i) - (b \sum f_i x_i)}{n}$$

Rotavirus Isolates



ml.

do.

Proteínas totales

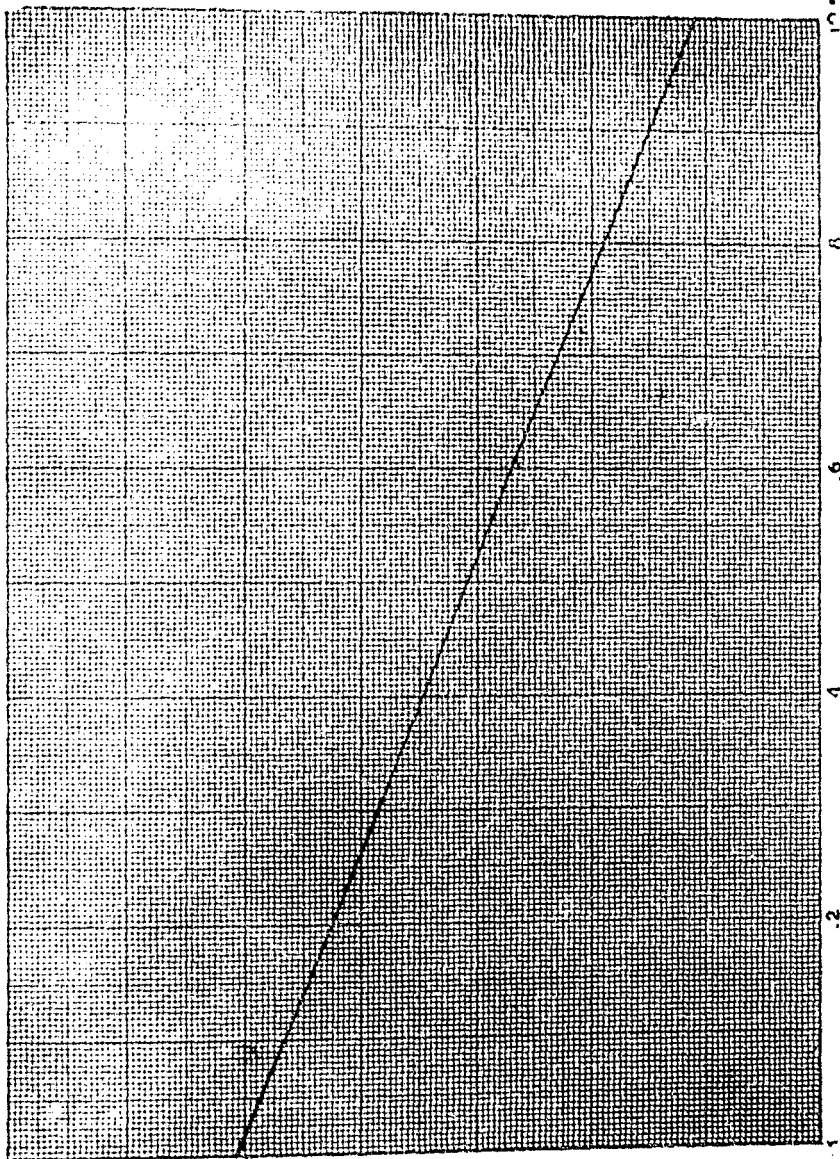
n	Xi	$\sum xi$	$\sum xi^2$	$\sum \log. yi^2$	$\sum \log. yi^2$	S ²	Wi
5	42	210	8820	9.2065	16.9522	.00022	5000
6	84	504	42336	10.4609	18.2396	.00024	5000
6	126	756	92256	9.7406	15.9296	.02328	47.40
6	168	1008	169344	8.83175	13.0964	.01926	51.80
6	210	1260	264600	8.2292	11.2923	.00102	1000
29	630	3738	580356	46.4648	75.5081	.04402	11099.20

fi	Fixi ($\sum yi$)	n (Fixi)	Fi $\sum xi^2$	fi $\sum yi^2$	Fi $\sum yi$
2.250	962.08	522.50	19845.0	37.9425	20.71
2.700	1186.27	680.40	114307.2	49.2469	28.24
.025	30.68	18.90	2306.4	.3982	.24
.029	34.62	29.23	4911.1	.3798	.24
.540	933.19	680.40	132884.0	6.0978	4.44
5.544	3145.84	1931.43	274253.7	94.0672	53.92

$$Y = 1.86 - .003X$$

I

1000 ml. water



do.

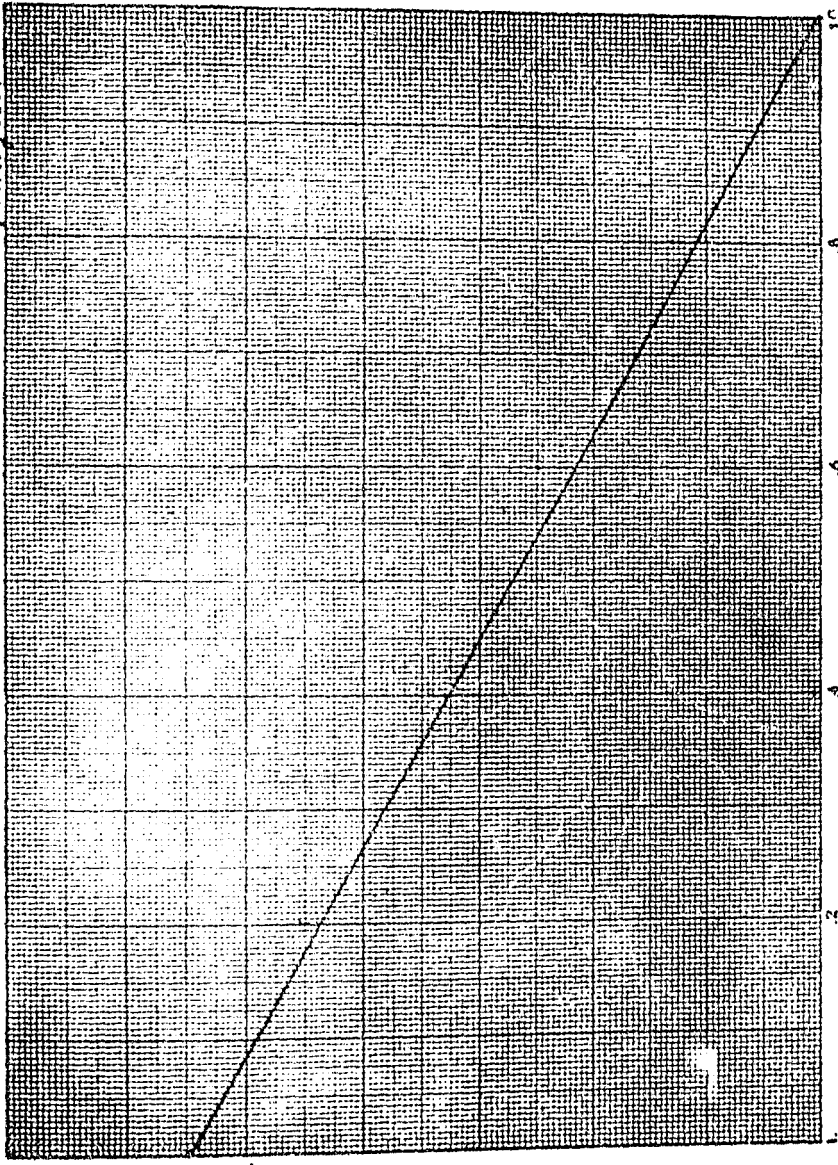
Albúmina

n	Xi	Σxi	Σxi^2	$\Sigma \log. yi$	$\Sigma \log. yi$	S ²	Wi
6	30	180	5400	10.9772	20.0852	.3693	2.7
6	60	360	21600	9.7886	15.9545	.0145	68.9
6	90	540	48000	9.2622	14.3023	.0008	1250
5	120	600	72000	6.7583	9.1369	.0006	1666
5	150	750	112500	6.1695	7.6243	.0029	344
28	450	2430	260100	42.9556	67.1033	.3881	3331.6

fi	Fixi (Σyi)	n (Fixi)	Fi Σxi^2	Fi Σxi^2	Fi Σyi
.0048	1.5807	.8640	25.92	.09641	.0527
.1240	72.8272	44.6400	2678.4	1.9783	1.2138
2.2511	1876.5125	1215.5940	108052.8	32.2009	20.8502
2.5003	2027.6233	1500.1800	180021.6	22.8450	16.8998
.5162	477.7044	387.1500	580725.0	3.9357	3.1847
5.3964	4456.2481	3148.8240	871403.72	61.0563	42.2012

Y 2.018 - .006X

Calvinofenol



do.

Fibrinógeno

n	Xi	Σxi	Σxi^2	$\Sigma \log. yi^2$	$\Sigma \log. yi^2$	G ²	Wi
4	10	40	400	7.6656	14.6908	.00018	5555
4	20	80	1600	6.6003	10.8933	.00076	1315
4	30	120	2600	6.2048	9.6269	.00070	1428
4	40	160	6400	4.8453	5.9971	.00206	485
4	50	200	10000	.6533	.2146	.01596	63
20	150	600	22000	26.0193	41.4227	.01966	8846

Fi	Fixi (Σyi)	n (Fixi)	Fi Σxi^2	Fi Σyi^2	Fi Σyi
2.51	192.42	100.4	1004.0	36.8734	192.41
.59	7.79	47.2	426.0	6.4271	3.89
.64	11.91	76.8	1664.0	6.1612	3.97
.21	11.01	33.6	1344.0	1.2553	1.01
.02	0.65	4.0	200.0	.0043	.01
3.97	223.78	26.20	5132.0	50.7268	201.29

Y. 2.05 — .009X

RESUMEN

- I.—a) En ninguno de los plasmas de individuos normales y de enfermos con fiebre reumática activa, en diferente etapa de tratamiento profiláctico se encontró criofibrinógeno.
- b) En el plasma de todos y cada uno de los enfermos con fiebre reumática activa, sin tratamiento, se encontró criofibrinógeno.

II.—Es factible cuantificar proteínas dentro del rango de 15 a 350 μ g. mediante fijación de la muestra en tiras de papel, coloración y evaluación espectrofotométrica subsecuente del colorante fijado, siempre que se empleen patrones adecuados para fines comparativos, en cada tira en la que se apliquen las muestras problemáticas.

BIBLIOGRAFIA

- 1.—Anal. Chem.—23(3): 525-528, marzo de 1951.
- 2.—Anal. Chem.—22:354, 1954.
- 3.—A. O. N. C. Methods of Analysis: 27, 1945
- 4.—Bier, Milan. Ed.—Electrophoresis, 1959.
- 5.—Bleck, R. J.—Durrum, E. L. and Zweig, C. A.—A Manual of Paper Chromatography and Paper Electrophoresis, 2ed., 1938.
- 6.—Blondheim, S. H.—J. Lab. Clin. Med.—45:740, 1955.
- 7.—Böhle, E. and Fischer, H.—Klin. Wechschr. 31:798, 1953.
- 8.—Braddstret, R. B.—Chem. Rev.—27:331, 1940.
- 9.—Braddstret, R. B. Ind. Eng. Chem. Anal. Ed. 12, 657, 1940.
- 10.—Caspani, R. and Magistretti, M. Plasma (Milan) 2, 1, 1954.
- 11.—Cremer, D. and Tiselius, A.—iochem. Z.—320-273, 1950.
- 12.—Dalrymple, R. S.—King, G. B.—Ind. Eng. Chme. Anal. Ed. 17, 403-4, 1945.
- 13.—Davis, C. F.—Wise, M.—Cereal Chem. 10: 488, 1933.
- 14.—Discombe, G.—Jones, R. F. and Winstanley, D. P.—J. Clin. Pathol. 7:107, 1954.
- 15.—Durrum, E. L.—J. Am. Chem. Soc. 72: 3943, 1950
- 16.—Eberhard, H.—Röntgenu.—Laboratoriumspraxis 9:249, 1956.
- 17.—Franglen, G. T.—Martin, N. —Biochem. J.—57: 626, 1954; J. Llin. Pathol. 78, 1954.
- 18.—Gmider, S. R.—Coleman, P. A.—Cereal Chem. 11:414-30, 1934.
- 19.—Godal.—Scandinavian. J. of Clin. and Lab. Inv. 2:156, 1960.
- 20.—Gumig, J. —Z. Anal. Chem. 28:188, 191, 1889.
- 21.—Gorringe, J. A.—Clin. Chim. Acta 2, 353, 1957.

- 22.—Grassman, W.—Hanning, K. and Knedel, M.—Deut. Med. Wochschv. 75:333, 1951.
- 23.—Grassman, W. and Hanning K.—Z. Physiol. Chem. Hoppe-Seyler's. 290-1, 1952.
- 24.—Grassman, W., and Hanning, K.—Z. Physiol. Chem. Hoppe-Seyler's. 292, 32, 1953.
- 25.—Grassman, W., and Hanning, K.—Klin. Wochschv.—32:538, 1954.
- 26.—Gronow, R.—Arztl. Labor. 2:23, 1956.
- 27.—Hardy, N. B.—J. Physiol. (London) 24:388, 1899.
- 28.—Haugaardand, G.—Kroner, T. T.—J. Am. Chem. Soc. 70:2135, 1948; U.S. Patent 2:555, 487, febrero 27, 1948.
- 29.—Heide, K. and Biels, H.—Arztl. Labor. 2:360, 1956.
- 30.—Houge, J. L.—Bulson, R. A.—Bright, H. A.—J. Acc. Natl. Burean. Stds. 43(3): 201, septiembre, 1949.
- 31.—Illarignow, W. W.—Solowje WA. Na.—Z. Anal. Chem.—100:328, 1935.
- 32.—Journal, R.—Ind. Eng. Chem. Anal. Ed. 17, 246, 1945.
- 33.—Kirk, P. I.—Inc. Chem. Anal. Ed. 8(3):223, mayo 15, 1954.
- 34.—Kirk, P., and Duggan, E.—Anal. Chem. 26, 163, 1954.
- 35.—Kjeldahl, J.—Anal. Chem.—22:336, 1883.
- 36.—Kjeldahl, J.—Medd. Carlsberg. Lab. 2:1 1883.
- 27.—Klabusitzky and König, P.—Arch. Expte. Pathol. Pharmakol. Nauhwn-Schmie-deberg's.—192-271, 1939.
- 28.—König, P.—Actas III Congr. Sudam, Chimie.—2:334, 1937.
- 39.—Körver, G.—Klin. Wochschv.—28:693, 1950; 21:1036, 1953.
- 40.—Kraft and Biel.—Arztl. Labor. 2:397, 1956.
- 41.—Kühnand.—Hawusch, A.—Klin. Wochschv.—35:1067, 1957.
- 42.—Lauro, M. F.—Ind. Eng. Chem. Anal. Ed. 3:401-1, 1931.
- 43.—Lauro, M. F.—Ciland. Saap. 10:1933, 1949.
- 44.—Lewis, T.—Smith, R. T.—V. Korff, R.—P. S. E. B. M. 86:813, 1954.
- 45.—Macheboeuf, M.—Chem. Weekbld.—49:237, 1953.
- 46.—McDonald, H.—Urbini, M. and Williamson, M.—Science. 112, 227, 1950.
- 47.—McDonald.—J. Chem. Educ. 29:429, 1952.
- 48.—McDonald.—Marbach, E. and Urbini, M.—Clin. Chimists. 17-23, 1953.
- 49.—Michaelis, L.—Biochem. 2:16-81, 1909.

- 50.—Michl, H.—Mundsh.—Chem. 83:738, 1952.
- 51.—Morrison, L.—Am. J. of the Medical Sciences. 211, 1946.
- 52.—Ogge, L. Wilfis. Co.—J. Ecs. of Agric. Chem. 33(1):100, 1950.
- 53.—Pagnall, P.—Clin. Chlm. Acta. 2:381, 1957.
- 54.—Parmas, I. K.—Wagner, R.—Pregl, F.—Grandt.—J. Cuant. Org. Micro. Anal. 4 ed. 78, 82, 1946.
- 55.—Peeteres, M. and Vuylateke, P.—3a. College, St. Jans. Hosp. Brogge (Bolg.) 238, 1955.
- 56.—Pezolds, P. A. and Peiser, H./Klin. Wochschv.—31:982, 1953.
- 57.—Pierce, N. C.—Haenisch, E. L./Sonc. Inc. New York Ed. 3, 140-144, 1950.
- 58.—Phelps, I. K.—Vandt, H. W.—Assoc. off Agric. Chem. L. 3:218-229, 1919.
- 60.—Putnam, W.—Ed. The Plasma Proteins. (1), 1969.
- 61.—Putnam, W.—Ed. The Plasma Proteins. (1), 1959.
- 62.—Ratnoff, D.—Menzie, C. J. of Lab. and Clin. Med. 37:316, 1951.
- 63.—Röttger.—Klin. Wochschv. 31:85, 1953.
- 64.—Sandstedt, R. M.—Cereal. Chem. (1:157-7, 1932.
- 65.—Amith, R. T.—Von Korff, R. N.—J. Clin. Inves. 36:596, 1957.
- 66.—Southernland, E. N. Freeman, M. E.—Med. Techns. Bulletin 1 (6) 18. noviem-
bre, diciembre. 1950.
- 67.—Sutton, F.—Mitchell, A. D.—Col. Anal. 12th. ed 83 Blekestom, Phil. 1935.
- 68.—Strain, H. and Sollvan.—J. Anal. Chem. 23:916, 1951.
- 69.—Technical Bulletin R. I.—M-5 Spinco Beckman Inst. I. N. C. abril 1951.
- 70.—Tiselius.—Abstr. 12th. Intern. Conf. Pure and Appl. Chem. New York. 67:1951.
- 71.—Tristang, G. R.—The Proteins, ed Newrath y Bailey 1: Part Ap. 186, 1953.
- 72.—Turba, F. and Turba, M.—Naturwissenschaften 38:188, 1951.
- 73.—Turba, F. and Enenkel, H.—Naturwissenschaften 37:93, 1950.
- 74.—Weely, R. H. and Neill, F.—Nature, 176, 33, 1955.
- 75.—Willete, C. O.—Col. M. R. Ogg C. L.
- 76.—Wunderly.—"Die Papieroelektrophorese", Sauerlander, Harau. Switzerland, 1954.
Ed. española. Ed. Cientifico Médica. Barcelona, 1955.
- 77.—Wunderly, L./pitton, A. and Grella, P.—Gazz. Sanit. 27:358, 1956.