Con toda estima-
ción y cariño a mi ami-
ga y compañera Mª Luisa

Mª Elena

29 de Abril 6:30 hs P.M.

Universidad Nacional Autónoma de México
UNAM
Biblioteca Central
Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

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.

ESCUELA NACIONAL DE CIENCIAS QUIMICAS

• Estudio de Proteínas Totales, Albúminas y Globulinas del Suero Sanguíneo por el Método Turbidimétrico de Aull y Colab. Comparado con los Métodos de Kingsley y Greember.

T E S I S

Que para obtener el título de:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
p r e s e n t a :
Ma. ELENA PEREZ LORENZO

MEXICO, D. F. 1960

A mis queridos padres, con todo mi cariño.

A mis hermanos:

Héctor, Georgina, Alicia y José Manuel.

A mis abuelitas:

María y Josefina, con todo cariño.

A Alfonso M., con todo cariño.

A mis compañeros y amigos.

A mis maestros.

Al H. Jurado.

Al Q. f. B Horacio Velázquez,
por su dirección y valiosa ayuda.

A la "Beneficencia Española", en cuyo Laboratorio de Análisis Clínicos, se llevó a efecto este trabajo.

• I N D I C E :

			Página.
CAPITULO	I.-	Generalidades.	1
CAPITULO	II.-	Técnicas empleadas.	6
CAPITULO	III.-	Resultados.	15
CAPITULO	IV.-	Conclusiones.	16
CAPITULO	V.-	Bibliografía.	17

I.- G E N E R A L I D A D E S.

Las proteínas plasmáticas consisten en albúminas y globulinas (Euglobulinas y Pseudoglobulinas).

Los valores normales varían de: albúminas de 3.8 a 5.2 gr.% ; globulinas de 1.5 a 3.4 gr.% y fibrinógeno de 0.2 a 0.4 gr.%. La suma de éstas o sea el total de proteínas varía de 6.3 a 8 gr.%. La relación albúmino-globulina es de 1.5 a 2.5.

El sitio de formación de las albúminas y globulinas no esta esclarecido pero se presume que sean formadas en aquellos órganos de los cuales puedan ser difundidos rápidamente a la corriente sanguínea, por ejemplo el higado, bazo y médula ósea. El fibrinógeno parece tener origen únicamente en el higado.

Albúminas y globulinas mantienen una presión osmótica normal en los capilares haciendo guardar un balance correcto entre el plasma y los fluídos de los tejidos. Como el plasma tiene un contenido mas alto de proteínas que los fluídos tisulares se esperaba que éstos pasaran al plasma por ósmosis hasta que ambos fluídos tuvieran la misma densidad.

La presión hidrostática en los capilares arteriales, como quiera, previene el paso de fluídos de los tejidos. Por el contrario la presión hidrostática normalmente causa una corriente de fluídos desde los capilares arteriales al tejido.

Para mantener una presión propia para el balance de los fluídos es necesaria una corriente de éstos desde los tejidos a la corriente sanguínea a través de las vénulas. Esto tiene lugar por la presión hidrostática baja en las vénulas y por la gran concentración de proteínas.

En un estado de falta de proteínas (hipoproteinemia) hay una reducción en la presión osmótica en los capilares venosos y arteriales, lo cual -

contribuye al desarrollo del EDEMA.

En Hipoproteinemia, las albúminas usualmente muestran una mayor disminución que las globulinas.

HIPOPROTEINEMIA.

Envuelve siempre una disminución de albúmina. Un valor total de proteínas menor que 5.5 gr.% favorece la formación de EDEMA.

Ocurre en las siguientes condiciones:

1.- Enfermedades del higado: cirrosis, atrofia amarilla, hepatitis tóxica ó en eclampsia.

2.- Enfermedades renales: con albuminuria prolongada, nefrosis lipoidea.

3.- Enfermedades del tracto intestinal: vómitos y diarrea prolongada.

4.- Enfermedades que causan una mala nutrición: carcinoma, tuberculosis y anemia prolongada.

HIPERPROTEINEMIA.

Se encuentra en las siguientes condiciones:

1.- Pérdida de fluídos: diarrea en niños, vómitos, obstrucción alta del intestino, deshidratación por falta de ingestión de fluídos y pérdida de fluídos por quemaduras extensas.

2.- Enfermedad de Adisson.

HIPERPROTEINEMIA DEBIDA A AUMENTO DE GLOBULINAS.

Se encuentra en:

1.- Infecciones: tuberculosis activas, pneumonía, endocarditis bacteriana, artritis reumática, osteomielitis, linfogranuloma venéreo, sífilis, lepra, lupus eritematoso, dermatomiasitis y sarcoide de Boeck.

2.- Enfermedades parasitarias: malaria, leishmaniasis (Kala-Azar), filariasis, tripanosomiasis y echinostomiasis.

3.- Procesos neoplásicos: mieloma múltiple, leucemia y sarcoide de-Boeck.

RELACION A/G INVERTIDA.

Se invierten en aquellas enfermedades que causan una pérdida de albúmina y un aumento compendado de globulinas. Las enfermedades mas importantes que dan esta inversión de A/G son: nefrosis lipoidea y cirrosis del higado con ascitis.

Ya que el higado juega un papel muy importante en la producción de albúminas y globulinas, es de esperarse una reducción en la producción de estos componentes en las enfermedades hepáticas

En enfermedades parenquimatosas (hepatitis hepatocelular, atrofia amarilla aguda y hepatitis tóxica aguda y en cirrosis) el total de proteínas plasmáticas y particularmente la fracción albúmina esta disminuída.

VALORACION DE PROTEINAS.

HISTORIA.- Uno de los primeros que describió un método práctico para aplicar la reacción del biuret a la determinación cuantitativa de las concentraciones de proteínas séricas fue G.R.Kingsley.

En 1940 Kingsley introdujo también el uso del éter para efectuar la rápida separación de albúminas y globulinas mediante soluciones salinas y demostró que la precipitación por salado se podía efectuar a la temperatura ambiente. El reactivo biuret de Kingsley fué modificado por Weichselbaum (1946) para mejorar su estabilidad y disminuir la formación de turbidez por el suero. Por estas razones la modificación se emplea en el método que se describirá posteriormente.

Poco después de la introducción del método electroforético para la separación de proteínas del suero se puso en claro que la solución de sulfato sódico al 21.5% propuesto por Howe distaba bastante de hacer una separación completa. Butler y Luetchester han mostrado discrepancias en el método y recientemente Dole ha demostrado estos errores y ha comparado con la electroforésis.

Majoor y Milne mejoraron la exactitud del procedimiento de separación por salado (salting-out) mediante el uso de concentraciones mayores de

sulfato sódico concluyendo en que la concentración de 21.5% de sulfato de-- sodio carecía de una justificación teórica y sugirió que la concentración - fuera de 26.8%. El investigó que una concentración de 19.6% separa la globu lina en dos fracciones las cuales recibieron el nombre de Pseudoglobulina y Euglobulina. Sin embargo las soluciones utilizadas por ellos cristalizan fá cilmente a la temperatura ambiente y por tanto se requería emplearlas a --- 37°C. Esta desventaja se ha salvado en el presente método por el uso de una mezcla de sulfato y sulfito sódicos cuyas solubilidades son aditivas. La so lución salina mixta se puede usar en combinación con éter para la rápida se paración de globulinas y albúminas. Tiene la ventaja adicional de estar --- bien amortiguada por el sulfito sódico,mientras que por el contrario las so luciones del sulfato sódico estan sometidas a grandes cambios en el pH en - cuanto se contaminan con pequeñas cantidades de ácido ó álcali. Esta ha si- do una causa ocasional de error en la aplicación de los métodos antiguos.

Cohn y sus colaboradores han descrito diversos métodos basados en - el empleo del alcohol para la separación de fracciones proteícas según los- principios desarrollados en el Laboratorio de Cohn. El control preciso de - las temperaturas en la zona de 5°C. es esencial en todas las fases de la se paración salvo que se disponga de equipo adecuadamente refrigerado y suelen ser poco precisos los resultados obtenidos con este método. Lo mismo puede- decirse del método de Pillemer y Hutchinson que sustituye el etanol por me- tanol. Recientemente ha sido descrito por Rosenfeld y Surgenor el uso de la hematina como reactivo específico para la albúmina.

Ahora bien, para determinar las fracciones alfa,beta y gama globuli nas, Howe utilizó una solución de sulfato de sodio al 22.4%. Sin embargo el sulfato de sodio al 19% parece que separa las fracciones mas eficientemente hasta dar resultados los cuales concuerdan muy bien con las fracciones ---- correspondientes determinadas por electroforésis. Aparentemente la precipi- tación de todas las fracciones de globulinas del suero humano requieren del 26 al 27% de sulfato de sodio. Los datos de Majoor indicaron que la mayor - cantidad de gama globulina es precipitada por 15% de sal. Esto es conforme- a los descubrimientos de Gutman en que la gama globulina (fracción) es sólo parcialmente precipitada a una concentración de 13.5% de la sal, mientras - que el 17.4% destruyó una cantidad importante de beta globulina en adición- a la gama fracción. Además el 15% de sulfato de sodio es aproximadamente —

equivalente a 0.33 de sulfato de amonio saturado con respecto a su purificación.

Jager y Nickerson encontraron una buena correlación entre los valores totales de la proteína precipitada por el método último y los valores de gama globulina valorados por electroforésis. A Hence se le ocurrió que el suero humano puede ser analizado para albúmina y para todas las fracciones de globulina determinando la proteína precipitada con 15, 19 y 26% de sulfato de sodio.

II.- TECNICAS EMPLEADAS.

METODO DE KINGSLEY.

REACTIVOS.-

1.- Reactivo de biuret de reserva según Weichselbaum.

Se disuelven 45 gr. de tartrato sódico potásico (Sal de la Rochelle)- en unos 400 ml. de solución de NaOH 0.2 N. Se agregan con agitación 15 gr.- de $CuSO_4.5H_2O$ en forma de pequeños cristales y se continúa la agitación hasta que la sal cúprica este completamente disuelta. Se adicionan finalmente- 5 gr. de KI y se diluye hasta 1000 ml. con NaOH 0.2N.

2.- Solución diluída para la reacción de biuret.

Se diluyen 200 ml. del reactivo de biuret de reserva hasta 1000 ml. — con NaOH 0.2 N. que contenga.5 gr. de KI por litro.

3.- Hidróxido sódico.

a) Solución 0.2 N. Se prepara a partir de una solución concentrada de- hidróxido libre de carbonato y se valora frente a un ácido 0.1 N.

b) Solución 0.2 N. con 0.5% de KI. A la solución a) se agregan 5 gr. - de KI por litro para obtener b).

4.- Solución de tartrato-yoduro para el blanco de suero.

Se disuelven 9 gr. de sal de la Rochelle en NaOH 0.2 N. con 0.5% de KI y se diluye hasta 1000 ml.

5.- Suero patrón.

Se recolectan sueros normales y patológicos y se normalizan por el método de Kjeldahl o el gravimétrico. Se miden después porciones de 2 ml. que se colocan en tubos de ensaye que se conservan perfectamente tapados en el- compartimiento mas frío de la nevera.

6.- Eter.

Es preferible la calidad reactivo para análisis pero no resulta indispensable. Sin embargo no debe ser excesivo,en ningún caso,su contenido de - alcohol.

PROTEINAS TOTALES.

PROCEDIMIENTO.-

Se miden 5 ml. del reactivo de biuret (ó la mínima cantidad requerida- por la lectura fotométrica) utilizando una pipeta volumétrica ó automática- ; se vierte en una cubeta tipo.

Se agrega 0.1 ml. de suero medido exactamente con una pipeta calibrada- Folin u otra de elevada precisión calibrada para expulsar el contenido total. Se lava la pipeta varias veces con el reactivo biuret y se colocan las cubetas en un baño de agua a 30-32°C, durante 10 min. Se mide después la absorbancia (densidad de color) usando un filtro 555 mu. (se puede sustituir- por un filtro 540 mu). El blanco de biuret se usa para fijar el cero de la- lectura.

1.- Blanco de suero.

Se miden 5 ml. (ó el volumen que de reactivo de biuret en el caso anterior) de la solución blanco de tartrato-yoduro en una cubeta colorimétrica- y se agrega 0.1 ml. de suero. El blanco de suero es esencial solamente cuando se examinan muestras pigmentadas u opalescentes,aunque en todo caso se - mejora la exactitud si se incluye en todas las determinaciones. Empléese la solución de tartrato-yoduro para la fijación del cero.

2.- Blanco de biuret.

Se miden 5 ml. de reactivo de biuret (ó el mismo volumen que en la determinación general) y se agrega 0.1 ml. de agua destilada. Procédase en la forma indicada para el suero.

3.- Patrón de suero.

Se trata un suero de concentración proteínica conocida según las directrices dadas para los sueros problema. Inclúyase también en este caso un — blanco de suero.

CALCULOS.-

Proteínas en gramos por 100 ml. = $(U-Bu)\ \frac{C}{(S - Bs)}$

donde: U = Absorbancia del problema.
S = " " suero patrón.
Bs = " " blanco patrón.
Bu = " " blanco de suero.
C = Concentración de proteína en el suero patrón en gramos por 100 ml.

PROTEINAS TOTALES, ALBUMINAS Y GLOBULINAS.

REACTIVOS.-

1.- Sol. de biuret diluída; Sol. de tartrato yoduro.

2.- Sol. sulfato sulfito.

En un frasco o matraz de 2 litros de capacidad se colocan 208 gr de sulfato sódico y 70 gr. de sulfito sódico. En un recipiente separado que contenga 900 ml. de agua se agregan 2 ml. de H_2SO_4 concentrado y a continuación el agua acidificada se vierte sobre las sales con agitación. Una vez disueltas se pasan a un matraz aforado y se diluye con agua hasta 1000 ml.- El pH tiene escasa importancia, supuesto que sea superior a 7 (antes de la determinación de pH dilúyase a 1 ml. de la solución hasta 25 ml. con agua). Se debe guardar en frascos con tapón de vidrio a temperaturas no inferiores a- 25°C.

3.- Suero patrón.

En la misma forma descrita para proteínas totales.

PROCEDIMIENTO.-

A lo largo de toda la metódica deben mantenerse todas las soluciones y material de vidrio a una temperatura superior a 25°C. Si la temperatura ambiente es bastante inferior puede ocurrir la cristalización del sulfato sódico,

Se miden 9.5 ml. de la solución sulfato-sulfito en un tubo de ensaye. Se añaden despacio y mezclando continuamente 0.5 ml. de suero, se tapa y se-

mezcla por inversión. Inmediatamente se separan 2 ml. de la mezcla para la determinación de las proteínas totales y se añaden a 5 ml. de reactivo de biuret contenido en una cubeta. En el tubo que contiene el resto de la mezcla de suero con la solución sulfato-sulfito se agregan 3 ml. de éter, se tapa y se agita exactamente 40 veces en 20 segundos. Finalmente se centrifuga durante 5 a 10 min. a 2,000 r.p.m.

Se destapa el tubo para permitir la introducción de la pipeta en la solución clara por debajo de la capa de globulina y sin agitar el precipitado, se sacan 2 ml. de la solución que se llevan a una cubeta que contiene — 5 ml. de reactivo de biuret (u otro volumen conveniente).

1.- Blanco de suero.

Se añaden 2 ml. de la suspensión de suero a 5 ml. de la solució tartrato-yoduro y se mezcla. Usualmente se puede omitir este preparado pero se puede incluir si la muestra es opalescente o demasiado pigmentada. De todas formas se gana en precisión con su inclusión rutinaria.

2.- Patrón.

Se tratan 0.5 ml. del suero normalizado en la forma descrita anteriormente y se toman 2 ml. de líquido como se indica en la determinación de proteínas totales. Omítase el resto del procedimiento de fraccionamiento

3.- Blanco de biuret.

Se agregan 2 ml. de la solución sulfato-sulfito a 5 ml. de biuret.

4.- Desarrollo de color.

Se colocan los tubos que contienen las soluciones de biuret y de blanco en un baño de agua a 30-32°C durante 10 min.; después se enfría a la temperatura ambiente durante otros 5 min. y se efectúa la lectura de la densidad de color a 555 mu. (se pueden emplear también 540 ó 565 mu). — Leáse primero el blanco de suero; a continuación con el blanco de biuret ajústese el fotocolorímetro en la posición cero antes de las lecturas de — los problemas.

CALCULOS.-

Proteínas en gramos por 100 ml. = $(V-Bu)\ \frac{C}{(S-Bs)}$

donde: U = Absorbancia del problema.

S = " " patrón.

Bu y Bs= Las densidades ópticas de los tubos en blanco para el problema y el patrón respectivamente.

Albúmina = Proteína que queda en la solución sulfato-sulfito.

Globulina = Proteínas totales - Albúminas.

COMENTARIOS SOBRE ESTE METODO.

No se presentarán dificultades debidas a la cristalización del sulfato sódico si las soluciones se preparan con sulfato sódico anhidro y se mantengan a temperaturas superiores a 25°C en todas las fases. Es conveniente también observar una temperatura de 37°C para las soluciones de sulfato-sulfito mientras no se esten usando. La precipitación por salado puede hacerse sin interrupción ya que las demoras favorecen la cristalización y e conveniente no analizar más muestras que las que se puedan manejar fácilmente en una sola tanda.

La operación más crítica en el método es la agitación de la mezcla de suero y mezcla salina con éter,que se debe realizar exactamente en la forma especificada. Hay que evitar la agitación violenta ya que la experiencia ha demostrado que puede causar la desnaturalización de la albúmina. Un error de 2 ó 3 seg. en el tiempo total de la agitación no afecta los resultados,pero la agitación durante menos de 15 seg. ó más de 25 seg. puede ser causa de que el método proporcione cifras de albúmina demasiado elevadas o bajas respectivamente.

Los tubos se deben tapar ó cubir perfectamente durante la centrifugación para evitar la acumulación de vapores de éter en la proximidad de la centrífuga. Hay que centrifugar a una velocidad suficiente para que se origine una capa firme de globulina que no se desintegre cuando el tubo se incline para eliminar la solución de albúmina.

La introducción de la pipeta para sacar la solución de albúmina debe hacerse procurando tomar lo menos posible la capa de globulina. La globulina precipitada se adhiere con facilidad a la pipeta; si se produce este contacto hay que desprenderla cuidadosamente.

El desarrollo de color es casi completo tras un calentamiento de 10 min. a 30°C. y los resultados son idénticos a los obtenidos cuando el

color se deja desarrollar durante 30 min. como sugiere Weichselbaum. Aparte del ahorro de tiempo que así se consigue la turbidez se incrementa en algunas muestras durante el período de calentamiento y por ello es preferible - un tiempo más corto.

El color formado por el reactivo de biuret por gramos de albúmina es tan semejante al formado por la globulina que se puede usar el mismo patrón para ambas. La densidad de color ligeramente mayor producida por la albúmin es contrarrestada por el incremento en el volumen de la solución causada — por la saturación por éter.

METODO DE GREMBER.

REACTIVOS.-

1.- Solución de NaCl al 0.85%.

Poner en un matras aforado 8.5 gr. de NaCl. Disolver con agua destilada y aforar a un litro.

2.- Hidróxido de sodio 2.5 N.

Prepárese diluyendo ligeramente más que la cantidad requerida para la solución concentrada de sosa. Titular con solución standard de ácido. Ajustar a 2.5 N.

3.- Reactivo de Fenol (Folin & Ciocalteu).

Para prepararse en un matraz Florence de 1,500 poner 100 gr. de tungstato de sodio y 25 gr, de molibdato de sodio. Añadir 700 cc. de agua destilada, 50 cc. de ácido fosfórico de 85%. Mezclar. Añadir lentamente 100 cc.- de HCl. Poner a reflujo durante 10 horas. Añadir 150 gr. de sulfato de litio. Añadir de 5 a 10 gotas de Bromo. Enfriar a la temperatura ambiente. Diluir a 1000 cc. Filtar y al envasar poner en frasco obscuro. Guardar perfectamente bien tapado. Este reactivo no debe de tener coloración verdosa. — Cuando ésta aparece volver a poner otras gotas de Bromo y volver a hervir.

PROCEDIMIENTO.-

En un tubo de ensaye poner 5 ml. de NaCl 0.85% y 0.5 ml. de suero ó - plasma. Mezclar. Diluir a 10 ml. con solución de NaCl 0.85% y mezclar agitando vigorosamente. En un matraz Erlemeyer de 50 ml. poner de la mezcla - diluída de suero ó plasma, 5 ml. de agua destilada y mezclar. Añadir lenta-

mente y agitando el matraz 4 ml. de NaOH 2.5 N. Mezclar por agitación. Poner el matraz en agua hirviendo por 10 min. Enfriar a la temperatura del cuarto bajo chorro de agua. Filtrar el contenido del matraz a través de un buen papel filtro y sobre un matraz volumétrico de 100 ml. Lavar el matraz Erlemeyer varias veces con pequeñas proporciones de agua destilada. Añadir estos lavados al matraz volumétrico de 100 ml. por filtración.

En otro matraz volumétrico de 100 ml. etiquetado "Blank" poner 4 ml. de NaOH 2.5 N. Llevar el volumen de cada matraz volumétrico a cerca de 50 ml. y añadir 3 ml. de reactivo de fenol. Anotar el tiempo. Diluir cada matraz a 100 ml. y mezclar por inversión.

En exactamente 10 min. después de anotar el tiempo con el blank y a una longitud de onda de 700 mu. llevar a 100% de transmisión. Inmediatamente reemplazar el blank con el problema y leer.

Ver en la tabla la concentración determinada y darla en % de proteína total.

METODO DE AULL Y COLABORADORES.

FUNDAMENTO.-

Se hace la precipitación de las seroproteínas por soluciones de fosfato y por simples métodos ó medidas turbidimétricas se determinan las concentraciones de estas sero proteínas.

REACTIVOS.-

1.- Solución Stock de fosfatos.

3.33 M.; pH 6.5. Adicionar 2.268 gr. de fosfato de potasio monobásico a unos 4,000 ml. de solución que contenga 335 gr. de NaOH. Agitar hasta que esté completamente disuelto. Ponerlo a la temperatura ambiente, entonces diluír a 5,000 ml. ó añadir agua hasta el peso final de la solución que es 6,675 gr.

2.- Soluciones diluídas de fosfato.

No. 1.- Pesar 1,235 gr. de solución stock de fosfato y ponerlo en un matraz aforado de 1000 ml. Aforar con agua destilada.

No. 2.- Pesar 1,000 gr. de solución stock de fosfatos y ponerlo en un matraz aforado de 1000 ml. Aforar con agua destilada.

No. 3.- Pesar 785 gr. de solución stock de fosfato y ponerlo en un matraz aforado de 1000 ml. Aforar con agua destilada.

No. 4.- Pesar 625 gr. de solución stock de fosfato y ponerlo en un matraz aforado de 1000 ml. Aforar con agua destilada.

PROCEDIMIENTO.

Colocar 5 tubos de colorímetro marcados con B (blank),1,2,3 y 4. En el tubo B medir 10 ml. de agua destilada y en los otros tubos medir 10 ml. delas soluciones numeradas correspondientes de fosfato. Medir 1 ml. de suero y 1.5 ml. de agua en un pequeño tubo de ensaye. Añadir 7.5 ml. de solución-stock de fosfato permitiendo ponerlo directamente en el suero diluído.

Invertir el tubo 5 ó 6 veces mezclando,entonces transferir 1 ml. de la mezcla a cada uno de los tubos del colorímetro previamente preparados permitiendo otra vez que la mezcla del suero fosfato se ponga directamente. Mezclar el contenido de cada tubo completamente ya sea por rotación o inversión del tubo pero evitando una agitación vigorosa. Dejar en reposo cerca de 15 min. y entonces se mide la densidad óptica de los tubos 1,2,3 y 4 a 650 mu. usando el tubo B para poner el espectrofotómetro a la densidad óptica de cero. (100 por ciento T).

CALCULOS.- D.O.(densidad óptica).

D.O. Tubo No. 1	F = Proteína Total.
D.O. Tubo No. 1 - D.O. Tubo No. 2	F = Albúmina.
D.O. Tubo No. 2 - D.O. Tubo No. 3	F = Alfa Globulina.
D.O. Tubo No. 3 - D.O. Tubo No. 4	F = Beta Globulina.
D.O. Tubo No. 4	F = Gama Globulina.

CALIBRACION.-

El factor F usado en los cálculos debe ser determinado para tipo particular de espectómetro usado.

Obtener una muestra clara de suero humano normal. Determinar la proteína total contenida en ese suero por cualquier método exacto y conveniente.- Trabajar el suero según el método previamente descrito usando el blank y el tubo No.1 solamente (en triplicado). Dividir la proteína total del suero por el cálculo D.O. del tubo No.1 dado por el factor F. Para conveniencia -

mostrar una tabla de calibración de proteínas correspondientes a varios colorímetros listos para ser preparados. Todas las medidas turbidimétricas reportadas en ese papel estarán hechas con un espectrofotómetro Coleman Mod.-11 provisto de celdillas especiales para ser adaptadas a 22 mm.

Para el trabajo de esta tesis se usó el espectrofotómetro Bausch &-Lomb. 20 Colorímetro usando celdillas de prueba de media pulgada que indica que la mitad de las cantidades de suero y reactivos pueden ser usados por - este procedimiento con resultados igualmente satisfactorios.

III.- R E S U L T A D O S.

Se practicó el método turbidimétrico comparándolo con el método - de Kingsley y Greember y se vió que hay una buena correlación entre los métodos con un porcentaje pequeño de error.

Los resultados obtenidos se expresan en las siguientes tablas:

Exp.	NOMBRE.	ENFERM.	(Kingsley) METODO DE BIURET.			(Greember) METODO DE FENOL.			(Aull y Colab.) METODO TURBIDIMETRICO.				
			Prot. Tot.	Alb.	Glob.	Prot. Tot.	Alb.	Glob.	Prot. Tot.	Alb.	Alfa Glob.	Beta Glob.	Gama Glob.
12262	M.P.E.	HEPATITIS.	7.45	5.80	1.65	7.50	5.80	1.70	7.48	5.70	.60	.49	.69
28886	E.C.C.		7.80	4.85	2.95	7.80	4.86	2.94	7.73	4.86	.64	1.02	1.21
61820	V.S.E.		8.30	5.22	3.08	8.20	5.22	2.98	8.30	5.22	.95	.74	1.36
75564	M.R.		7.20	4.20	3.00	7.21	4.20	3.01	7.19	4.15	.84	.91	1.26
19151	R.F.G.		8.30	2.60	5.70	8.28	2.60	5.68	8.30	2.54	.92	1.73	3.11
32732	J.A.J.S.		8.00	4.50	3.50	8.00	4.45	3.55	8.00	4.52	.60	.87	1.91
87174	M.F.S.		7.80	4.50	3.30	7.90	4.53	3.37	7.90	4.58	.63	1.42	1.26
21776	M.P.M.		8.80	5.02	3.78	8.80	5.10	3.70	8.79	5.02	1.17	1.02	1.57
19318	B.A.G.		8.32	4.10	4.22	8.30	4.00	4.30	8.20	4.09	1.05	1.47	1.59
7917	R.M.L.A.		8.60	4.90	3.70	8.60	4.80	3.80	8.58	4.92	.79	1.19	1.66
11598	J.A.M.	ARTERIOSCLEROSIS E HIPERTENSION ARTERIAL.	7.10	4.00	2.90	7.10	3.95	3.15	6.87	3.80	.71	.82	.55
43260	M.R.		8.00	4.90	3.10	7.90	5.00	2.90	7.98	4.90	1.33	1.05	.70
33981	D.B.M.		7.50	4.62	2.98	7.40	4.62	2.78	7.40	4.83	1.05	.70	.84
75804	E.G.A.		7.10	4.20	2.80	7.15	4.20	2.95	7.09	4.37	.91	.79	1.01
78160	D.G.R.		7.16	4.25	2.91	7.40	4.20	3.20	7.36	4.39	.84	.95	1.16
86723	B.S.R.		8.30	4.70	3.60	8.40	4.70	3.70	8.40	4.96	.96	.95	1.81
86163	C.R.C.		9.10	5.80	3.30	9.10	5.80	3.30	9.40	5.89	.95	1.23	1.33
5311	F.V.R.		8.87	5.50	3.37	8.90	5.60	3.30	9.00	5.78	.59	.93	1.70
22955	L.F.		7.50	5.10	2.40	7.52	5.02	2.52	7.60	5.11	.93	1.00	.57
30870	A.O.J.		8.40	5.20	3.20	8.50	5.20	3.30	8.49	5.13	.88	1.15	1.32
39578	J.E.J.		7.45	5.00	2.45	7.60	5.06	2.54	7.59	5,06	.46	1.03	1.03
41229	M.C.G.		7.45	4.50	2.95	7.50	4.80	2.70	7.49	4.59	.91	1.14	.84
50867	C.S.R.		8.40	6.00	2.40	8.60	6.09	2.51	8.60	6.12	.86	1.16	.48
38728	B.B.		6.80	4.00	2.80	7.20	4.10	3.10	7.20	4.00	1.30	1.00	.90
2562	C.R.		8.20	4.30	3.90	8.20	4.28	3.92	8.40	4.30	.93	1.30	1.87
76890	F.S.D.	COLECISTITIS AGUDA.	6.90	4.00	2.90	6.90	3.90	3.00	6.89	3.80	1.20	1.30	.50
73564	C.S.C.		7.16	4.90	2.26	7.16	4.95	2.21	7.20	5.00	.70	1.00	.50
83753	V.G.S.		7.80	4.60	3.20	8.10	4.60	3.41	8.09	4.69	.92	1.19	1.28
85673	M.L.A.C.		7.16	4.00	3.16	7.20	4.09	3.11	7.10	4.00	.43	1.10	1.50
76089	M.L.R.P.		8.28	4.68	3.60	8.30	4.70	3.60	8.30	4.73	.83	1.21	1.53
2061	G.A.P.		7.45	4.30	3.15	7.60	4.30	3.30	7.56	4.36	.78	1.50	.88

EXP.	NOMBRE.	ENFERM.	(Kingsley) METODO DE BIURET.			(Greember) METODO DE FENOL.			(Aull y Colab.) METODO TURBIDIMETRICO.				
			Prot. Tot.	Alb.	Glob.	Prot. Tot.	Alb.	Glob.	Prot. Tot.	Alb.	Alfa Glob.	Beta Glob.	Gama Glob.
85207	P.G.R.	ULCERA DUODENAL.	6.68	3.90	2.78	6.59	4.00	2.59	6.50	3.90	.99	1.00	.61
69660	J.C.G.		7.65	4.05	3.60	7.70	4.00	3.70	7.90	4.05	.69	1.21	2.08
84576	A.C.M.		7.74	3.35	4.39	7.62	3.35	4.27	7.61	3.32	1.22	1.07	2.00
2059	R.O.D.		6.87	3.60	3.27	7.00	3.60	3.40	6.99	3.58	1.18	1.18	1.03
44801	J.M.		7.54	5.10	2.44	7.40	5.10	2.30	7.41	5.13	.91	.78	.58
85921	C.V.R.	DIABETES.	6.58	2.30	4.28	6.58	2.38	4.20	6.59	2.11	.76	1.01	2.70
4536	M.L.T.		8.00	4.58	3.42	8.00	4.60	3.40	7.98	4.59	.96	1.08	1.33
2059	R.O.D.		6.87	3.60	3.27	7.00	3.60	3.40	6.99	3.58	1.18	1.18	1.03
84197	P.P.M.	PANCREATITIS.	8.20	6.90	1.30	8.10	6.87	1.23	8.10	6.90	.53	.36	.32
87445	M.A.A.		7.56	4.50	3.06	7.60	4.52	3.08	7.61	4.59	.84	.84	1.12
57739	Y.D.E.S.		7.95	4.60	3.33	8.00	4.60	3.40	8.00	4.93	.85	1.21	1.00
28233	F.D.L.M.	OSTEOARTRITIS.	8.65	5.28	3.37	8.65	5.25	3.40	8.80	5.27	.95	1.12	1.47
77906	S.S.R.		8.40	5.52	2.88	8.60	5.52	3.08	8.60	5.60	.94	1.14	.94
87224	I.M.A.		7.70	4.00	3.70	7.70	4.00	3.70	7.70	3.89	1.49	1.22	1.08
86680	P.C.R.	LEUCEMIA LINFOIDE.	9.77	5.25	4.52	9.79	5.25	4.54	9.90	5.31	.88	.35	3.39
1314	L.G.P.	CARCINOMA LARINGE.	8.03	5.00	3.03	7.90	5.00	2.90	7.88	4.94	.85	1.14	.95
18102	P.V.V.	FIBROMATOSIS UTERINA.	7.45	4.39	3.06	7.45	4.40	3.05	7.49	4.40	1.25	.78	1.04
65793	M.G.L.	ICTERICIA HEMOLITICA.	7.45	4.80	2.65	7.60	4.77	2.83	7.59	4.72	.44	1.07	1.34
83753	V.G.S.	ICTERICIA HEPATOMEGALIA.	7.94	4.69	3.25	8.10	4.52	3.58	8.09	4.69	.92	1.19	1.28

EXP.	NOMBRE	ENFERM.	(Kingsley) METODO DE BIURET.			(Greember) METODO DE FENOL.			(Aull y Colab.) METODO TURBIDIMETRICO.				
			Prot. Tot.	Alb.	Glob.	Prot. Tot.	Alb.	Glob.	Prot. Tot.	Alb.	Alfa Glob.	Beta Glob.	Gama Glob.
86711	A.S.P.	ICTERICIA OBSTRUCTIVA.	7.79	4.48	3.31	7.90	4.50	3.40	7.88	4.35	1.15	.74	1.63
49398	E.S.C.	HEPATOESCLEROSIS.	7.16	2.23	4.93	6.90	2.20	4.70	6.88	2.23	.68	1.54	2.40
79581	D.R.D.	DIARREA CRONICA.	7.74	4.80	2.94	7.80	4.79	3.01	7.80	4.72	.89	1.09	1.09
72414	A.J.A.	MONONUCLEOSIS INFECCIOSA	9.10	4.50	4.60	8.90	4.42	4.48	8.90	4.40	1.02	1.31	2.19
75305	R.P.F.	EMBOLIA CEREBRAL.	6.80	4.02	2.78	6.80	4.00	2.80	6.78	3.92	.73	1.46	.67
23263	F.A.C.	ADENOMA PROSTATICO.	7.89	5.00	2.89	7.90	5.00	2.90	7.86	5.03	.83	1.03	.96
86470	E.R.F.	HIPERTROFIA DE LA PROSTATA.	8.30	5.32	2.98	8.70	5.40	3.30	8.68	5.32	.90	1.00	1.57

EXP.	NOMBRE	(Kingsley) METODO DE BIURET.			(Greember) METODO DE FENOL.			(Aull y Colab.) METODO TURBIDIMETRICO.				
		Prot. Tot.	Alb.	Glob.	Prot. Tot.	Alb.	Glob.	Prot. Tot.	Alb.	Alfa Glob.	Beta Glob.	Gama Glob.
				SUEROS	NORMALES.							
79372	D.N.C.	7.60	4.78	2.82	7.58	4.76	2.82	7.60	4.76	.81	.88	1.15
47450	S.G.F.	7.60	4.90	2.70	7.59	4.92	2.66	7.60	4.93	.70	1.12	.84
61847	R.P.V.	7.10	4.48	2.62	7.08	4.51	2.57	7.10	4.50	.63	1.07	.88
85686	B.M.Ll.	7.30	4.50	2.80	7.29	4.50	2.79	7.29	4.48	.91	1.14	.76
85106	M.A.A.S.R.	8.60	5.26	3.34	8.54	5.21	3.33	8.60	5.22	1.08	1.23	1.01
9146	R.M.A.	7.60	3.87	3.73	7.59	3.87	3.72	7.60	3.89	1.23	1.14	1.33
75630	F.B.K.	7.30	4.50	2.80	7.29	4.53	2.76	7.31	4.55	.89	.89	.96
85426	V.O.	7.80	4.60	3.20	7.75	4.60	3.15	7.77	4.61	.88	.97	1.29
16466	A.O.V.	7.10	4.10	3.00	7.08	4.20	2.88	7.09	4.12	.99	.90	1.07
10605	J.L.G.	7.30	4.37	2.93	7.30	4.40	2.90	7.30	4.40	.63	.76	1.51
2947	S.G.U.	7.80	4.50	3.30	7.79	4.50	3.29	7.80	4.52	1.05	.86	1.36
37150	C.R.G.	7.38	4.72	2.66	7.40	4.76	2.64	7.39	4.75	.79	.85	.99
64599	M.B.M.	6.78	4.00	2.78	6.80	4.18	2.62	6.80	4.20	.87	.94	.79
75825	T.F.L.	8.32	5.09	3.23	8.10	5.00	3.10	8.10	4.97	.85	1.24	1.04
37495	M.P.G.	7.45	4.75	2.70	7.60	4.72	2.88	7.60	4.75	.86	1.00	1.00
17193	C.A.P.	7.21	4.40	2.81	7.20	4.40	2.80	7.20	4.38	.90	.90	1.03
5258	M.G.M.	7.74	4.50	3.24	7.60	4.38	3.22	7.60	4.40	.92	..62	1.15
55344	E.A.	7.45	5.40	2.05	7.61	5.40	2.21	7.60	5.40	.80	.80	.60
20122	L.D.R.	7.45	4.29	3.16	7.60	4.30	3.30	7.58	4.29	.85	.85	.57
4052	L.C.	7.16	5.50	1.66	7.10	5.50	1.60	7.04	5.55	.28	.76	.43
18568	D.C.P.	8.48	5.48	3.00	8.50	5.50	3.00	8.49	5.48	.89	.95	1.16

IV.- C O N C L U S I O N E S.

Una de las ventajas del método propuesto es que es el más aproximado al método electroforético sobre todo tratándose de la determinación de alfa,beta y gama globulina.

En los métodos químicos siempren resultan errores por incompleta precipitación de una fracción que aparentemente esta nulificada por la precipitación parcial de la siguiente y por eso se cree que esta clase de errores están disminuidos en el método propuesto por la alta dilución del suero usado.

Otra ventaja es la rapidez y simplicidad del método requiriendo poco material y reactivos en comparación con el método de electroforésis que resulta caro por la inversión inicial en el costo del aparato.

Otra gran ventaja de este método sobre los propuestos anteriormente es la determinación de las fracciones alfa,beta y gama globulinas que en los otros métodos compárativos no se ha logrado separar.

Además este método es mucho más rápido comparándolo con los métodos químicos también citados y con el electroforético que dura 24 horas en proceso.

V.- B I B L I O G R A F I A.

1.- Kingsley, G.R.
J. Biol. Chem. 133:731 (1940).
J. Lab. Clin. Med. 27:840 (1942).

2.- Howe, P.C.
J. Biol. Chem. 49:109 (1921).

3.- Wolfson, W.Q. ; Cohn, C. ; Calvery, E. ; Zehiba, F.
Am. J. Clin. Pathol. 18:723 (1948).

4.- Gornall, A.G. ; Bardawill, C.J. ; David, M.M.
J. Biol. Chem. 177:751 (1949).

5.- Pillemer, L. ; Hutchinson, M.C.
J. Biol. Chem. 158:299 (1945).

6.- Rosenfeld, M. ; Surgenor, D.M.
J. Biol. Chem. 199:911 (1952).

7.- Reiner Miriam.
Métodos seleccionados de Análisis Clínicos.
Vol. I

8.- Folin and Ciocalteu.
J. Biol. Chem. 73:627 (1927).

9.- Greenberg.
J. Biol. Chem. 82:545 (1929).

10.- William, M. y M°Cor., M.D.
J. Lab. Clin. Med. 46:476 (1955).