
LAS PROTEINAS DEL PLASMA SANGUINEO I. BASES PARA SU CUANTIFICACION EN 0,9 ml. DE SUERO. RESULTADOS OBTENIDOS EN NIÑOS Y EN ALGUNOS ANIMALES DE LABORATORIO.

EDUARDO JURADO GARCIA y JOSE
JOAQUIN IZQUIERDO
Departamento de Fisiología. Facultad
de Medicina de la Universidad
Nacional Autónoma.

INTRODUCCION

Desde que en el siglo pasado Halliburton (32), tras cuidadosos estudios sobre las temperaturas de coagulación de las proteínas del suero y sobre su precipitación con diversas sales, llegó a la conclusión de que tales proteínas eran múltiples, el problema de su cantidad y calidad viene apasionando a los investigadores.

El problema tuvo su más refinada solución con Arne Tiselius (67), quien gracias al empleo de la técnica electroforética en un complicado aparato de su invención (66), concluyó que el plasma de caballo contenía las siguientes fracciones proteicas: albúminas, fibrinógeno, y tres fracciones globulínicas bien diferenciadas, a las que llamó alfa, beta y gamma globulinas, para distinguirlas de las múltiples y confusas fracciones que los métodos de precipitación permitían obtener. Sus continuadores (68 y 47), no solo comprobaron lo afirmado por él, sino que con identificar dichas fracciones en el suero humano (63), dieron lugar prominente a sus conclusiones y relegaron al segundo termino todas las clasificaciones anteriores. En la actualidad son múltiples los trabajos encaminados a establecer nuevos métodos de fraccionamiento de las proteínas del suero o del plasma, por medio de técnicas químicas, inmunológicas o biológicas, con base en la clasificación anterior y que, en manos aptas han determinado un avance considerable en este sector de la bioquímica.

La falta de un aparato de electroforesis, así como la necesidad de contar con un método que nos permitiera realizar cuantificaciones seriadas en animales pequeños de laboratorio, en los cuales resultan inaplicables los métodos conocidos que requieren volúmenes sanguíneos relativamente grandes, fue lo que nos decidió a establecer una técnica que sólo requiriera cantidades mínimas de suero. Cuando ya la teníamos lograda, conocimos los trabajos de W. Q. Wolfson et al. (72, 71) autores de un método para determinar el cuadro proteico sanguíneo en 1 ml de suero o plasma. Sin embargo, como para nuestro método bastan tan sólo 0.9 ml para la cuantificación de todas las fracciones proteicas –menos el fibrinógeno– y sus fundamentos difieren del de aquellos autores, nos servimos de la presente comunicación para presentarlo y dar cuenta del grado de exactitud de los resultados que nos ha permitido obtener en el perro, el conejo y la rata, y también en niños, a los cuales se hizo extensivo.

MATERIAL BIOLÓGICO USADO Y TECNICAS SEGUIDAS

1. *Material biológico.*

A) Niños. Se escogió un grupo de 30 niños de las guarderías infantiles de la ciudad; normales desde el punto de vista clínico, nutricional, radiológico y de laboratorio, y de 2 a 5 años de edad. Previo ayuno de 12 horas, se le extrajo a cada uno entre 3 y 4 ml de sangre, por punción aséptica de las venas del pliegue del codo, con un mínimo de estasis y procurando evitar todo factor de hemólisis. Después de coagulada la muestra y retraído el coágulo, se separaron de ordinario 1-1.2 ml de suero que desde luego fue utilizado para el fraccionamiento de las sueroproteínas, con resultados, en un total de 50 determinaciones, de los que ya se ha dado cuenta en una comunicación anterior (28).

B) Perros. Se utilizaron 12 perros callejeros de 8.200 a 12.000 Kg de peso (promedio 9.450 Kg), de raza indeterminada, escogidos cuidadosamente de modo que quedasen desechados los que tuviesen trastornos patológicos o nutricionales. Para ello, se les colocó y mantuvo en observación durante un mes, en perreras

individuales, alimentándolos durante ese período con desechos de la cocina de la Escuela Médico Militar, ministrados *ad-libitum*. De cada animal se obtuvo una muestra de 5 ml de sangre (venosa o arterial) por punción de los vasos femorales, cuyo suero, después de separado, sirvió para practicar las determinaciones.

C) *Conejos*. Se utilizaron dos grupos de 30 conejos cada uno. A los primeros, de la colonia que posee el Hospital Central Militar de la ciudad de México, se les encerró por grupos de tres en jaulas adecuadas, y se les tuvo en observación durante dos meses, para desechar a los que tuviesen algún trastorno patológico. El segundo lote fue formado en el Departamento de Fisiología de la Facultad Nacional de Medicina, y tratado de modo semejante al anterior. El peso de los animales, al tiempo de las tomas de sangre, osciló entre 2 y 3.5 Kg, con un promedio de 2.950 Kg. Las muestras de sangre (en total 100) fueron de 3 a 4 ml. Obtenidas por punción intracardíaca, sin repetir las nunca antes de transcurrido un mes.

D) *Ratas*. Se apartaron 50 ratas machos de la colonia del Departamento de Fisiología de la Facultad Nacional de Medicina, en jaulas adecuadas, por grupos de tres, y se las estuvo observando durante mes y medio, para desechar a las que presentaran signos evidentes de infección, de infestación por parásitos, o de cualquier otro trastorno patológico, ministrándoseles *ad-libitum* tanto la dicta de Zucker (75) como agua. Al tiempo de la toma de las muestras (3 a 3.5 ml por punción intracardíaca, previa anestesia ligera con éter), el peso de cada rata osciló entre 218.5 y 367 g. (promedio: 280.25 g.). Nunca se repitió la toma antes de 4 semanas. Se obtuvo por lo general, aproximadamente 1.1 ml de suero.

Cuando después de haber sido utilizado algún animal de cualquiera de los grupos, se juzgó conveniente comprobar su estado normal, se le sacrificó y practicó la autopsia. El total de muestras aprovechadas fue de 50.

2. Técnica para el fraccionamiento y cuantificación de las sueroproteínas.

A) Bases de las técnicas que se proponen y grado de precisión de sus resultados.

1, Proteínas totales (P. T.); 2, albúminas verdaderas (A-v); 3, globulinas totales (G. T.) y sus respectivas tres fracciones principales: Alfa-globulinas (A-g); Beta-globulinas (B-g) y Gamma-globulinas* (G-g).

i. *Determinación de las albúminas verdaderas*. Para la determinación de las albúminas verdaderas del suero** o plasma sanguíneo, durante los últimos cuatro años se han desarrollado, aparte del método electroforético y sus modificaciones, varios métodos químicos (11, 50, 56 y 57) e inmunológicos (8, 9 y 25), que han tomado como base de comparación la técnica electroforética de Tiselius A. (66). Por nuestra parte, como los métodos de Milne J. (50) y de C. Cohn y W. Q. Wolfson (11) nos parecieron los más fácilmente realizables, dadas las condiciones de nuestro laboratorio, decidimos tomarlos como base de comparación para los nuestros. Además, Fierro del Río (21) ya había comprobado la exactitud del de Milne, y uno de nosotros ya lo había manejado. Según podrá verse por el cuadro número 1,*** los dos métodos escogidos dieron en nuestras manos valores bastante aproximados, cuyos promedios difirieron 0.04 g/pc con una desviación standard de 0.03 y un error del promedio de 0.01. Por ello modificados el método de Cohn y Wolfson (11) de modo que para cada determinación se necesitasen solamente 0.2 ml

* Siguiendo una sugestión del Dr. Fierro del Río y por las razones que se exponen más adelante, las designamos con las correspondientes mayúsculas del alfabeto griego a fin de distinguirlas de las correspondientes fracciones electroforéticas.

** Practicamos las determinaciones en el suero y no en el plasma porque en ocasiones hubo necesidad de conservar congeladas las muestras antes de proceder al fraccionamiento sueroproteico, y puesto que según los estudios de Stenhagen (63), el plasma congelado se altera y con ello cambia el patrón original. El suero, en cambio se conserva perfectamente bien, aun después de repetidas congelaciones. Reconocemos, sin embargo que el problema fundamental es el relativo al plasma, si se quiere tener una idea completa del complejo equilibrio proteico de la sangre en los vasos.

*** Para los tratamientos estadísticos que contiene este trabajo se han usado las fórmulas siguientes:

$$M = \frac{\sum x}{n}; \sigma = \sqrt{\frac{\sum X^2}{n} - M^2}; \alpha M \frac{\alpha}{\sqrt{n}}$$

en las cuales, M= valor promedio; X= valores de cada determinación en una serie; n = total de muestras

examinadas; s = desviación standard de la serie y, M = error standard del promedio. (Para las series pequeñas se usó en vez de n, el valor n-1.)

La comparación entre los distintos valores promedio se hizo en términos de su significación estadística por medio de las fórmulas:

$$Dif. = M_1 - M_2; \sigma dif. = \sqrt{\sigma M_1^2 + \sigma M_2^2}; \lambda = \frac{Dif.}{\sigma dif.}$$

en las cuales, Dif. = Diferencia de los promedios; s dif.= desviación standard de la diferencia de los promedios y λ = significación estadística. Las demás letras tienen la misma significación que en las fórmulas anteriores.

Se consideró que los valores promedio obtenidos eran estadísticamente diferentes, cuando el valor de *lambda* resultó mayor que 4 ($\lambda > 4$) y, siguiendo el mismo rigorismo estadístico, sólo se consideraron no diferentes, aquellos que dieron para *lambda* un valor menor que 2 ($\lambda < 2$).

Para los cálculos de los valores porcentuales, se usaron las fórmulas:

$$Mpc = \frac{\sum X}{n}; \sigma pc = \sqrt{\frac{pq}{n}}$$

en las cuales. Dif. = valor promedio porcentual; X = valores individuales de una serie; n = universo estudiado p = probabilidad favorable, y q = probabilidad contraria.

En un principio, después de hacer la precipitación total de las globulinas en forma que más adelante se indica, tratamos de separarlas de la solución de albúminas restante, por filtración lenta al través de dos capas de papel filtro Eaton Dickeman N° 248, de 5 cm de diámetro, descartando los primeros 3 ml del filtrado, pero como los resultados así obtenidos divergían de los del método original, corrido simultáneamente, preferimos utilizar la técnica de G. R. Kingsley (41), de hacer la separación de las globulinas por centrifugación, previa disminución de su densidad por adición de éter. En estas condiciones siempre vimos acumularse las globulinas en una capa compacta en la interfase éter-sulfito de sodio y a diferencia de lo comunicado por W. Q. Wolfson, C. Cohn, E. Calvary y F. Ichiba (71), siempre logramos resultados satisfactorios. Sólo cuando el éter es agregado en cantidad insuficiente, no se agita vigorosamente o se centrifuga a otra velocidad que la requerida, la separación es incompleta.

CUADRO 1 –COMPARACION DE LOS VALORES PARA ALBUMINAS VERDADERAS OBTENIDOS POR LOS METODOS DE COHN C.(II) Y DE MILNE J. (50) EN UN MISMO SUERO

METODO DE COHN C	METODO DE MILNE J.	DIFERENCIAS
3.466	3.545	- 0.079
3.830	3.913	- 0.083
3.707	3.666	+ 0.041
4.036	4.077	- 0.041
3.872	3.872	0.
3.954	3.954	0.
3.789	3.707	+ 0.082
3.268	3.227	+ 0.041
3.112	3.074	+ 0.038
2.882	2.882	0.

M= 0.045 E.J.G.
S_M= 0.010

Debemos hacer notar que recientemente B. V. Jäger, T. B. Schwartz, E. L. Smith, M. Nickerson y D. M. Brown (36), como resultado de tratamientos matemáticos adecuados, encontraron que el método de Cohn y Wolfson (11) es el que está más de acuerdo con los resultados del electroforético, correspondiendo el segundo lugar al de G. Popjack y E. F. McCarthy (57). Entre los valores obtenidos por el método original de los autores (11) y los proporcionados con la modificación que se propone hemos hallado una diferencia estadística de 0.08/ g./pc, con desviación standard de 0.065, y error del promedio de 0.015 (véase el cuadro número 2, segunda columna).

ii. *Determinación de albúminas + Alfa globulinas.* Los estudios físico-químicos (4, 5, 18, 31, 48, 55 y 65) han demostrado que los valores que antes sólo se atribuían a las albúminas comprenden los correspondientes a las (a_1 , y a_2 electroforéticas). Por lo tanto, la modificación de G. R. Kingsley (41) al método de P. E. Howe (34) para la estimación de las albúminas del suero, la cual hemos seguido, determina en realidad una fracción proteica mixta, de cuyos valores deben restarse los correspondientes a las albúminas, para tener el de las Alfa-globulinas.

CUADRO 2. COMPARACION DE LOS VALORES OBTENIDOS POR LOS AUTORES, CON LOS METODOS ORIGINALES (11), (41) Y (35) Y CON LOS MISMOS, MODIFICADOS POR ELLOS.

ALBUMINAS + A-GLOBULINAS			ALBUMINAS VERDADERAS			GAMA-GLOBULINAS		DI
METODOS		DIFERENCIAS	METODOS		DIFERENCIAS	METODOS		
ORIGINAL	MODIFICACIÓN		ORIGINAL	MODIFICACIÓN		ORIGINAL	MODIFICACIÓN	
4.593	4.680	-0.087	3.789	3.830	-0.041	1.190	1.157	
4.680	4.680	0.	3.268	3.227	+0.041	1.456	1.522	
4.505	4.859	-0.354	3.466	3.466	+0.198	2.769	2.843	
4.505	4.768	-0.263	3.625	3.748	-0.123	1.658	1.658	
4.815	4.637	+0.178	2.882	2.769	+0.133	1.222	1.222	
4.859	4.724	+0.135	3.586	3.466	+0.120	1.692	1.590	
5.130	4.949	+0.181	3.504	3.625	-0.121	1.189	1.189	
4.680	4.724	-0.044	3.227	3.227	0.	1.829	1.692	
4.903	4.859	+0.044	3.035	3.268	-0.233	2.882	2.997	
3.789	3.830	-0.041	3.074	3.112	-0.038	2.434	2.434	
4.247	4.247	0.	3.112	3.227	-0.115	2.657	2.769	
4.283	4.247	+0.036	2.954	2.959	0.	1.727	1.727	
5.270	4.993	+0.227	2.927	2.959	+0.048	2.289	2.289	
4.505	4.549	+0.044	3.581	3.504	+0.077	2.769	2.769	
4.332	4.332	0.	2.920	2.882	+0.038	2.959	2.843	
S +0.057 M=0.109 s=0.104 sM=0.027			S -0.086 M=0.087 s=0.065 sM=0.015					

En el método original de Kingsley se mezclan 0.5 ml de suero con 7.5 ml de solución de sulfato de sodio al 23 pc, y con ello se logra una solución salina final de 21.5625 pc, que es la requerida para precipitar Beta y Gamma-globulinas, sin que se alteren. Nosotros lo logramos mezclando 9.8 ml de una solución de sulfato de sodio al 22 pc y 0.2 ml de suero. La primera columna del cuadro número 2, compara los valores obtenidos con el método original y con nuestra modificación, y hace ver que entre ellos hubo una diferencia promedio de 0.109 ± 0.104 , con un error del promedio de 0.027.

iii. *Determinación de Gamma-globulinas.* B. V. Jäger y M. Nickerson (35) son autores de una técnica cuyos resultados concuerdan bien con los valores electroforéticos y son comparables a los obtenidos por H F. Deutsch, L.

J. Gosting, R. A. Alberty y J. W. William (17) con un método de precipitación por etanol, a temperaturas por debajo de 0° C. En lo fundamental nos hemos ajustado a esta técnica, pero utilizando 0.4 ml de suero en vez del 1 ml. Con tal método eliminamos, tanto el factor de error que presuponen las concentraciones de albúmina en el método de H. C. Kunkel (42), como las engorrosas manipulaciones del método de Cohn y Wolfson (10). Tropezamos con la dificultad de conservar constante e inalterable la concentración de la solución saturada de sulfato de amonio que, por efecto de los cambios de temperatura ambiente estacionales, cambia y con ello modifica los resultados. Pero como sabíamos que según los trabajos de Edwin J. Cohn, T. L. McMeekin, J. L. Oncley, J. M. Newell y W. L. Hughes (12) y de H. Svensson (64), la concentración del sulfato de amonio al 1.39 molar precipita casi exclusivamente a las Gamma-globulinas (92 a 98 pc), empleamos como solución saturada, una de sulfato de amonio al 4.17 molar, a pH7, y a 37° C. la cual da, en las condiciones que operamos, una dilución final de 1.39 molar. Comparando los resultados de la técnica original, con los de nuestra modificación (tercera columna del cuadro número 2) se obtiene una diferencia promedio de 0.043, con una desviación standard de 0.038 y error del promedio de 0.015, lo cual permite considerar como satisfactoria la modificación. Con el uso de esta técnica en el Hospital Infantil de la ciudad de México, el Dr. Cravioto Muñoz (15) ha obtenido valores reproducibles y estrictamente comparables con los de cualquier otro método conocido, en particular con el de André C. Kibrick y M. Blonstein (40).

B) Calibración espectrofotométrica. Todas nuestras cuantificaciones de proteínas están basadas en mediciones fotocolorimétricas del color desarrollado por la reacción del biureto, según la modificación de Weichselbaum (69), con el reactivo diluido, ya que según Clarence Cohn y colaboradores (10), así como según Allan G. Cornall *et al* (29), la intensidad de dicho color depende, como es sabido, de la cantidad de enlaces peptídicos. Con ello creemos haber eliminado un factor de error importante en las determinaciones electroforéticas [además de los señalados por J. I. Bolívar (3) y por B. Alexander Gutman (30,)] consistente en tomar como proteínas a ciertas sustancias de naturaleza lipóidica o polisacárida (1, 2, 47, 49 y 74) que migran con la fracción proteica a la que están unidas. Utilizamos un espectrofotómetro Coleman Junior, modelo 6-A colocado en longitud de onda de 555 milimicras con cubetas N° 6-302-B, y primero que nada, procedimos a calibrar los valores de sus lecturas, con los del N total y de las proteínas totales y parciales en mezclas de sangres humanas y de conejos. Para ello procedimos como sigue: seis muestras de sangre de otros tantos individuos adultos, normales, tomadas con las precauciones antes apuntadas, después de dejar que se coagulen y de separarles el coágulo, dieron sueros que fueron mezclados entre sí. La concentración total de proteínas en la mezcla, fue calculada determinando el nitrógeno total, por el microKjeldahl de Ancel Kays (39), modificado por Enrique Esperón (20), de cuyo valor se restó luego el correspondiente al nitrógeno no proteico, también por microkjeldahl, siguiendo los lineamientos de la técnica usual (58), adaptada a pequeños volúmenes. De este modo obtuvimos para el nitrógeno proteico 1192.1 mg./pc, que multiplicado por el factor usual de 6.25*, nos da la concentración total de proteínas (7.4509 g./pc.).

* Preferiremos dicho factor, al recomendado por Perlman y Longworth (54) para las proteínas humanas, en razón de que correspondiendo a un promedio, es el más adecuado.

En el mismo día, a fin de evitar alteraciones de las proteínas, se prepararon por triplicado 5 ml de diluciones de la mezcla de sueros en cloruro de sodio al 0.85 pc, a concentraciones entre 0.74509 mg y 7.4509 mg./pc. Con cada mezcla se hizo la determinación de proteínas totales por el procedimiento original de Weichselbaum (69), con reactivo diluido. La correlación de las lecturas obtenidas con los valores proteicos obtenidos según los microkjeldahls nos proporcionó la curva patrón A de la gráfica número 1.

Procediendo en igual forma con seis sueros de conejo se obtuvo, para el nitrógeno total, 948.96 mg./pc; para el nitrógeno no proteico, 30.1437 mg./pc; para el nitrógeno proteico, 918.8163 mg./pc, y como concentración porcentual de las proteínas. 5.7426 g. Se hicieron las lecturas fotocolorimétricas de diluciones análogas a las anteriores, por triplicado, y ya con todos estos datos se construyó la curva B de la gráfica número 1.

Por aplicación de la fórmula de significación estadística a las dos curvas patrón, se obtiene un valor para *lambda* de 0.262, el cual por ser inferior a 2, autoriza a considerar como iguales los promedios, a tomar las pendientes de ambas líneas de correlación como estadísticamente iguales, y a usarlas indistintamente en nuestras determinaciones. Para este trabajo, en realidad nos servimos de una sola curva.

C) Reactivos usados.

I. *Solución de sulfato de sodio* al 22 pc. Pesar con exactitud al de 0.1 mg, 22 g. Na₂SO₄ Q. P. "Baker", disolverlos en agua destilada a 37° C., en matraz aforado y completar hasta la marca de 100 ml con agua destilada. Conservar en la estufa a 37° C.

II. *Solución de sulfito de sodio* al 27.43 pc. Pesar con exactitud de 0.1 mg, 27.43 Na₂SO₃ Q. P. "Mallinckrodt", y

disolverlos en agua destilada a 37° C. (por ser difícilmente soluble, debe agregarse al agua paulatinamente y agitando constantemente). Lograda la solución, llevar a la marca de 100 con agua destilada, a la misma temperatura, y almacenar en la estufa, pues a la temperatura del laboratorio cristaliza, alterándose con ello la concentración y por ende los resultados. Nótese que 9.8 ml de nuestra solución de sulfito, más 0.2 ml de suero, den una concentración salina final de 26.88 pc, que es la recomendada para el arrastre total de las globulinas (6).

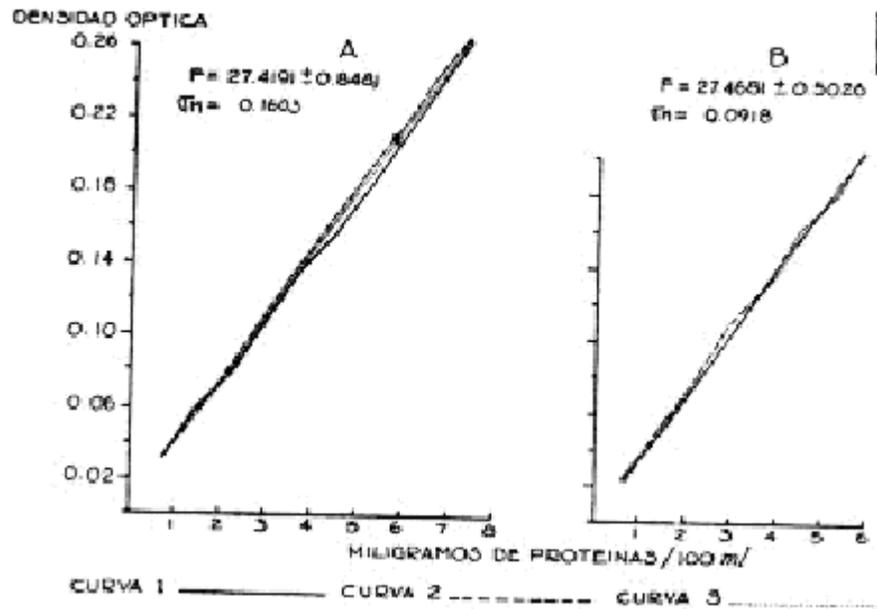


Fig. 1. Curvas patrón para las proteínas del suero humano (A) y del suero de conejo (B) según la técnica de Weichselbaum (69)

F = Recíproca de la pendiente
I, entre A y B = 0.262.

III. *Solución de sulfato de amonio al 4.17 molar.* Pesar, con la exactitud recomendada, 55.102 g. de $(NH_4)_2SO_4$ Q. P. "Baker" y disolverlos en agua destilada a 37° C., con iguales cuidados que para la solución anterior y aforar a la marca de 100 ml ajustando el pH a 7, que convendrá comprobar a intervalos regulares, en el curso del almacenamiento en la estufa a 37° C.

IV. *Solución de sulfato de amonio al 1.39 molar.* Agréguese 50 ml de la solución anterior a 100 ml de agua destilada y ajústese el pH a 7. Consérvese a la temperatura del laboratorio.

V. *Solución salina fisiológica.* Disuélvase 8.5 g de NaCl Q.P. "Mallinckrodt" en agua destilada, aforando la marca de 1000.

VI. *Reactivo sulfúrico de Weichselbaum (69).*

VII. *Eter sulfúrico Q.P. "Mallinckrodt"*

D) *Procedimientos.*

I. *Proteínas totales (Pt).* Según ya quedó dicho, seguimos la técnica original de Weichselbaum.

II. *Albúminas verdaderas (Av.).* Colocar en un tubo de centrifuga de 15 ml de capacidad, 9.8 ml de la solución número II, y si la temperatura del laboratorio es muy baja, colocar previamente en la estufa a 37° C. durante 15 minutos, los tubos y las pipetas que vayan a ser usados, para evitar las cristalizaciones indicadas.

Agregar, cuidadosamente medidos, 0.2 ml del suero (nosotros preferimos usar pipetas de Folin-Ostwald, de dicha capacidad total, y después de vaciar el suero, las lavamos por aspiración repetida de la solución precipitante. Sin embargo, pueden usarse, con buen margen de seguridad, las pipetas de 1 ml graduadas en centésimos).

Mezclar bien por inversión repetida; agregar 2 ml de éter, y tapar herméticamente con un tapón de hule adecuado. Agitar vigorosamente durante 30 segundos, y centrifugar a 2500 r/p/m durante 10 minutos. Destapar, inclinando ligeramente el tubo para que se desprenda de la pared del mismo la capa de globulinas y procurando no tocarla con la pipeta, llevar su punta a través de la fase éter para tomar 5 ml de la solución centrifugada, que deberá ser absolutamente cristalina. Colocarlos en una cubeta Coleman 6-302 B; agregar 5 ml del reactivo de Weichselbaum, y mezclar por inversión. Como control de reactivos, colocar en otra cubeta 5 ml de la solución número II, y 5 ml del reactivo. Llevar las cubetas a baño maría a 30° C, durante 30 minutos; secarlas cuidadosamente y leer en el espectrofotómetro a 555 milimicras.

El desarrollo del color biurético y la lectura en el espectrofotómetro, se hacen en igual forma para todas las determinaciones.

III. *Fracción Albúminas más Alfa-globulinas (A + Ag)*. Con los mismos cuidados antes señalados, colocar en un tubo de centrífuga 9.8 ml de la solución número I; agregarles igualmente, 0.2 ml del suero: mezclar bien por inversión; agregar 2 c.c. de éter; tapar herméticamente con tapón de hule y centrifugar, después de haber agitado fuertemente, a 2100 r/p/m durante 10 minutos.

También con las precauciones señaladas, llévase la punta de una pipeta hasta la fase centrifugada, que debe ser absolutamente cristalina, y tómense 5 ml. Desarróllese el color biurético, y léase según lo indicado, utilizando para comparar, una mezcla de 5 ml de la solución de sulfato de sodio al 22 pc, y 5 ml del reactivo.

IV. *Gamma-globulinas (G-g)*. Medir cuidadosamente 0.4 ml de suero y colocarlos en un tubo de centrífuga de paredes resistentes. Agregar gota a gota y agitando constantemente, 0.2 ml de la solución número III. Golpear delicadamente la punta del tubo, con el dedo índice, para que la mezcla se haga homogénea.

Después de dejar el tubo en el refrigerador, durante 6 horas, o mejor por toda la noche, centrifugar 15 minutos a 3000 r/p/m; desechar el líquido claro sobrenadante por aspiración, y agregar 3 ml de la solución número IV. Emulsifíquese finamente el precipitado, con ayuda de un agitador. Recentrifúguese a 3500 r/p/m durante otros 15 minutos, y deséchese el líquido que sobrenade. Inviértase el tubo sobre una capa de papel filtro; séquese cuidadosamente sus paredes, y disuélvase el precipitado en 8 ml de solución salina fisiológica.

De esta solución tómense 2 ml; colóqueseles en una cubeta 6-302 B: agréguese 3 ml más de la solución salina fisiológica: desarróllese el color y hágase la lectura, usando como tipo de comparación, el utilizado para la determinación de proteínas totales.

V. *Globulinas totales (Gt.)* Réstese simplemente del valor de las proteínas totales, el de las albúminas verdaderas.

VI. *Alfa-globulinas (Ag.)*. Réstese del valor de las albúminas + Alfa-globulinas, el de las albúminas verdaderas.

VII. *Beta-globulinas (Bg.)*. Súmese el valor de las Alfa-globulinas con el obtenido para las Gamma-globulinas, y el valor que resulte réstese del valor de globulinas totales.

VIII. *Relación Albúminas-globulinas (A/G.)*. Divídase simplemente el valor de las albúminas verdaderas entre el de las Globulinas totales.

RESULTADOS

Con relación a cada uno de los cuatro lotes descritos, el cuadro número 3, contiene a) los valores promedio; b) las desviaciones standard de cada uno de ellos, y c) el error standard de cada promedio, y estos mismos datos, para su mejor visualización, han servido para formar la figura número 2. El cuadro número 4 anterior, con los valores que resultan de comparar entre sí estos diversos valores, para su valoración estadística.

CUADRO 3- VALORES (GRAMOS EN 100 c.c.) DE LAS PROTEINAS DE LOS SUEROS DE NIÑOS, DE CONEJO Y DE RATA NORMALES.

GRUPOS	VALORES	PROTEINAS TOTALES	ALBUMINAS VERDADERAS	GLOBULINAS TOTALES	A- GLOBULINAS	B- GLOBULINAS	r- GLOBULINAS	REL
NIÑOS 30	M	6.86	3.62	3.34	0.69	1.58	0.68	
	s	0.90	0.30	0.39	0.18	0.42	0.31	
	sM	0.14	0.05	0.06	0.03	0.07	0.05	
PERROS 12	M	6.87	3.06	3.81	0.95	1.20	1.66	
	s	0.59	0.34	0.45	0.13	0.32	0.16	
	sM	0.17	0.09	0.14	0.04	0.09	0.05	
CONEJOS 100	M	5.82	3.19	2.63	0.84	1.03	0.76	
	s	0.60	0.50	0.64	0.42	0.60	0.34	
	sM	0.06	0.05	0.06	0.04	0.06	0.03	
RATAS 50	M	7.39	1.65	5.75	2.07	2.25	1.43	
	s	0.66	0.34	0.75	0.37	0.64	0.27	
	sM	0.09	0.05	0.11	0.05	0.09	0.04	

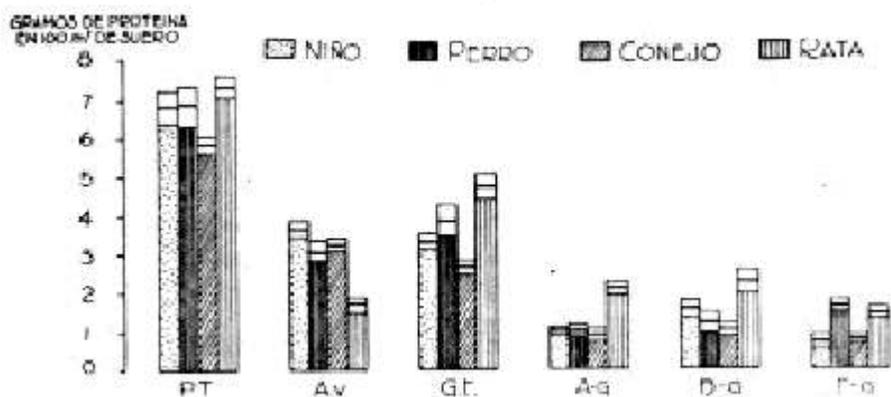


Fig. 2. Gráfica comparativa de los valores normales de las proteínas de los sueros de niño, de conejo y de rata. Las áreas blancas agregadas representan ± 3 errores standard.

CUADRO 4.- COMPARACIÓN ESTADÍSTICA DE LAS CIFRAS DE LAS PROTEINAS EN LOS SUEROS DE NIÑOS, PERROS, CONEJOS Y RATAS NORMALES, EXPRESADA EN TERMINOS DE LOS VALORES DE I ENTRE PARES DE GRUPOS

GRUPOS COMPARADOS	P.T.	A.V.	G.T.	A-G	B-G	G-G	A/G
NIÑO/ PERRO	0.04	5.05	3.30	0.13	3.31	14.19	
NIÑO/ CONEJO	6.84	6.05	7.81	2.37	5.99	1.24	
NIÑO/ RATA	3.15	28.43	20.07	18.45	5.89	11.85	
PERRO/ CONEJO	5.80	1.16	7.76	2.07	1.54	15.20	7.66

PERRO/ RATA	2.66	12.96	11.21	17.39	8.18	3.82	12.27
CONEJO/ RATA	14.18	22.25	25.29	18.33	11.30	12.79	18.64

Nótese que la cifra promedio de proteínas totales, para el conejo (5.82 g/pc) es más baja que la del niño 6.86 g/pc ($l = 6.84$); del perro, 6.87 g/pc, ($l = 5.80$), y de la rata, 7.39 g/pc ($l = 14.18$). En cambio, la cifra para el niño, es estadísticamente igual a la del perro ($l = 0.04$) y aun a la de la rata ($l = 3.15$), que entre sí son estadísticamente iguales ($l = 2.66$).

Por lo que toca a las albúminas, la cifra más baja fue la de la rata (1.65 g/pc) que comparada con las del niño, del perro y del conejo, da lambdas de 28.43, 12.96 y 22.25. La más elevada fue la del niño (3.62 g/pc) que, comparada con la del perro, conejo y rata da lambdas de 5.05, 6.05 y 28.43. Las correspondientes al perro y al conejo, resultan estadísticamente iguales entre sí ($l = 1.16$).

Las cifras de alfa-globulinas (2.07 g/pc) y de beta-globulinas (2.25 g/pc) fueron más elevadas en la rata, y difieren evidentemente de las de las otras series, puesto que comparadas sucesivamente con las del niño, del perro y del conejo, dan lambdas de 18.45, 17.39 y 18.33 para las alfa-globulinas, y de 5.89, 8.18 y 11.30 para las beta-globulinas. En el niño, en el perro y en el conejo, las alfa-globulinas resultan estadísticamente semejantes (lambdas de 0.13, 2.37 y 2.07). Las beta-globulinas sólo lo son entre perro y conejo ($l = 1.54$).

Con respecto a las gamma-globulinas, las cifras más elevadas correspondieron al perro (1.66 g/pc) y resultaron estadísticamente semejantes a las de la rata ($l = 3.82$). Las más bajas fueron las del niño (0.68 g/pc); que estadísticamente son iguales a las de los conejos, 0.76 g/pc. ($l = 1.24$) pero al igual que éstas son estadísticamente diferentes de las del perro y la rata (lambda de 14.19 y 11.05 y de 15.20 y 12.79).

CUADRO 5. VALORES PORCENTUALES DE LAS FRACCIONES PROTEICAS DE LOS SUEROS DE LOS GRUPOS NORMALES (PT=100)

GRUPOS		PROTEINAS TOTALES	ALBUMINAS VERDADERAS	GLOBULINAS TOTALES	ALFA GLOBULINAS	BETA GLOBULINAS	GAM GLOBULI
NIÑOS	M	6.86	52.77	47.23	13.99	23.03	10.2
	S		3.15	3.15	1.40	1.76	2.3
PERROS	M	6.87	44.61	55.39	13.89	17.27	24.2
	S		5.48	5.48	3.81	4.16	4.7
CONEJOS	M	5.82	54.87	45.13	14.40	17.59	13.7
	S		2.06	2.06	1.46	1.58	1.4
RATAS	M	7.39	22.34	77.66	27.97	30.33	19.3
	S		2.17	2.17	2.34	2.40	2.0

Tanto el cuadro número 5, como la figura 3, expresan la proporción de las diversas fracciones proteicas con relación al total, tomado como igual a 100. Por lo que toca a las albúminas, el porcentaje más elevado corresponde al conejo (55 pc), y siguen el niño (53 pc), el perro (45 pc) y la rata (22 pc). La proporción de alfa y beta-globulinas, por el contrario, es más alta en la rata, pero en las demás series sus cifras no difieren grandemente, salvo las B-globulinas del niño, que son un poco más elevadas (23 pc). El porcentaje más elevado de gamma-globulinas correspondió al perro (24 pc), siguiendo, en orden decreciente, la rata (19.4 pc), el conejo (13 pc) y finalmente el niño (10.2 pc).

Puede pues afirmarse que en cada especie animal, cuando menos las examinadas por nosotros, la distribución de las fracciones proteicas es variable, y al parecer característica de cada una de ellas, tal como ya se ha hecho notar en trabajos anteriores (16).

DISCUSION

Según podrá apreciarse, consultando el cuadro número 6, los resultados que acabamos de presentar concuerdan, dentro del margen de error de los métodos empleados, con los de otros autores.

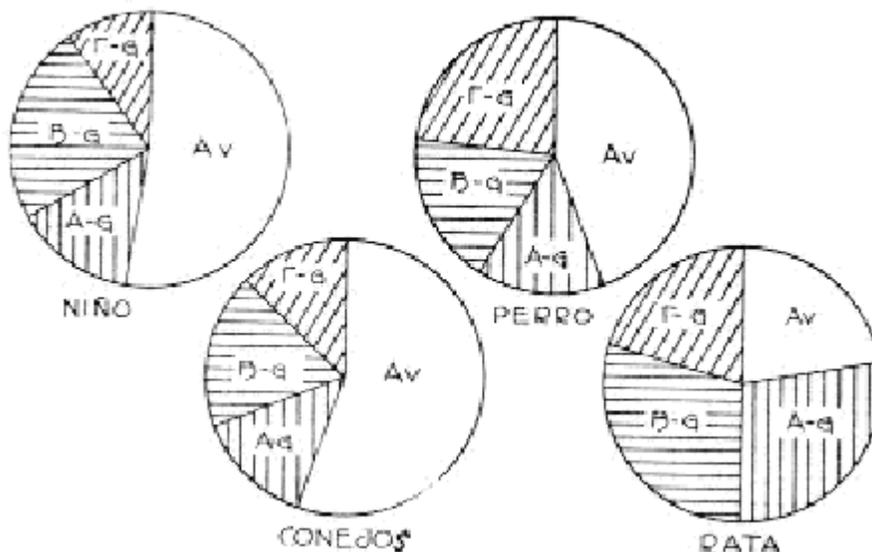


Fig. 3. Gráfica comparativa de la composición proteica porcentual de los sueros de niño de perro, de conejo y rata normales. 3.6° = 1 pc.

Las cifras relativas al niño, con las encontradas para adultos en nuestro medio, por Fierro del Río (22), por el método de precipitación a diferentes concentraciones de sulfato de sodio (40), lo mismo que con los dados en el extranjero por Cohn E. J. et al. (13, 14) Longworth, Curtis y Pembroke (46) y Wolfson, Cohn C., Calvary e Ichiba (71), por medio de la técnica electroforética. Difieren, en cambio, de los obtenidos, también por electroforesis, por Kekwick (38) y por Whitman, Rossmiller y Lewis (70).

Las cifras relativas al perro (véase el cuadro 7) también concuerdan, dentro de las limitaciones señaladas, con las obtenidas por medio de la técnica electroforética, por Deutsch y Goodloe (16), Moore (51) y Zeldis y Alling (73). Difieren sensiblemente de los valores de Goldberg (27), pero esto es explicable ya que el mencionado autor hizo el fraccionamiento de albúminas y globulinas por el método de Howe (34) que, según lo hicimos notar, aumenta la cifra de albúminas, debido a que incluye en la determinación a las alfa-globulinas.

CUADRO 6. VALORES ASIGNADOS A LAS PROTEÍNAS DEL SUERO HUMANO NORMAL, POR DIFERENTES AUTORES, ENTRE ELLOS, LOS DE ESTE TRABAJO.

		Valores en gramos por 100 ml.						
AUTORES		P.T.	A.V.	G. t.	A-G	B-G	G-G	A/G
FIERRO DEL RIO (22)	M	6.79	3.69	3.04	1.04	1.35	0.77	1.22
	S	0.48	0.95	1.20	0.70	0.29	0.26	0.30
	SM	0.08	0.17	0.22	0.02	0.07	0.07	0.06

COHN E.J. (13)	M	6.58	3.42	3.16	1.06	1.26	0.74	1.08
COHN E.J. (14)	M	6.03	3.32	2.71	0.84	0.78	0.66	1.22
LONGSWORTH et. al. (46)	MS	7.17 0.53	3.56 0.31	3.61 0.31	1.26 0.12	1.62 0.26	0.72 0.23	0.90
1.-Maternos	MS	6.18	3.82	2.36	0.78	0.68	0.97	1.61
2.- infantiles		0.38	0.29	0.29	0.04	0.06	0.15	
WOLFSON W (71)	M	7.01	3.77	3.24	1.10	0.94	1.20	1.16
WHITMAN J.E.et al. 70	M	6.55	4.12	2.43	0.47	0.88	0.76	1.69
	S	0.48	0.35		0.08	0.13	0.09	
	SM	0.08	0.06		0.01	0.02	0.02	
DE ESTE TRABAJO	M	6.86	3.62	3.34	0.96	1.58	0.68	1.09
	S	0.90	0.36	0.39	0.18	0.42	0.31	
	SM	0.14	0.05	0.06	0.03	0.07	0.05	

VALORES PORCENTUALES

KEKWICK (38)	M		59.00	41.00	4.00	11.00	25.50	
DE ESTE TRABAJO	M		52.77	47.23	13.991.4	23.03	10.212.	
	S		3.15	3.15		1.76		

CUADRO 7.- COMPARACION DE LOS VALORES QUE SE HAN ASIGNADO A LAS PROTEINAS DEL SUERO DE PERROS NORMALES

Valores en gramos por 100 ml.

AUTORES		P.T.	A.V	G.T.	A-G	B-G	G-G	A/G
ZELDIS L.J. (73)	M	5.66	2.54	3.12	1.54	0.94	0.64	0.82
GOLDBERGI (27)	M	6.03	3.69	2.34				1.61
DE ESTE TRABAJO	M	6.870.5	3.060.3	3.810.4	0.950.1	1.20	1.66	0.18
	S					0.32	0.16	0.13
	SM					0.09	0.05	0.04

VALORES PORCENTUALES

DEUTSCH, H.L. et. al. (16)	MS		39.602.	60.402.1	24.500.	26.303.6	9.60 0.60	0.66
MOORE, D.H. (51)	MS		50.004.	50.004.0	10.004.	26.007.0	14.003.0	1.00
DE ESTE TRABAJO	MS		44.615.	55.395.4	13.893.	17.274.1	24.234.7	0.81 0.13

Por lo que toca al conejo (véase el cuadro 8), encontramos que nuestros datos no son comparables con los existentes en la literatura (métodos de precipitación por sales) en la cual son incompletos y sólo relativos a albúminas y globulinas totales, cuando no incorrectos como los de Dubach et al. (19), Schwartz y Lichtemberg (50) y Fishberg (23, 24) que emplearon el método de separación de Howe.

CUADRO 8.- COMPARACION DE LOS VALORES (g/100ml) QUE SE HAN ASIGNADO A LAS PROTEINAS DEL SUERO DE LOS CONEJOS NORMALES

AUTORES	PH	VALOR	A.V.	G. t.	A-G	B-G	G-G	A/G
DEUTSCH et al (16)	8.6	M S	63.301.	36.701.	11.500.8	13.000.	13.200.	1.70
MOORE D.H (51)	8.6	M	64.00	36.00	12.00	12.00	12.00	1.77
	7.4	M	72.50	27.50	3.00	12.50	12.00	2.64
SHARP D.G.et. al. (62)	7.8	M S SM	64.336. 2.00	35.676. 2.00		14.974. 1.26	20.705. 1.67	1.80
SEIBERT (60,61)	7.7	M	76.00	24.00	1.1	10.8	12.20	3.17
SVENSSON (64)	7.7	M	77.80	22.20	4.7	10.3	7.20	3.50
DE ESTE TRABAJO		M S	54.872.	45.132.	14.401.4	17.591.	13.141.	1.31 0.52

Si se comparan nuestros valores con los encontrados por técnicas de electroforesis, se encuentra: a) que confirman lo afirmado por Hewitt (33), Svensson (64), Majoor (49), Deutsch et al. (16), Sharp (62), Seibert et al. (60, 61) y Moore (51) de que en el conejo el porcentaje de las albúminas es elevado, aunque en menor grado que el señalado por otros autores. b) Que nuestras cifras de albúminas son más bajas y las de alfa-globulinas más altas que las de los autores, cosa atribuible a las diferentes condiciones de pH a que han trabajado (véase 37, 2 y 45) como resultado de las cuales las alfa-globulinas, cuya molécula es sumamente pequeña, migran con la fracción albúmina (2), (45), apareciendo en el esquema electroforético como un ensanchamiento de la base del pico de las albúminas, y c) Que nuestros valores de beta y de gamma- globulinas concuerdan más o menos con los de otros autores.

Con relación a las ratas de nuestra colonia, el cuadro que encontramos es totalmente diferente de los datos que para estos animales dan otros autores (véase el cuadro número 9) tanto los que han utilizado un método químico, como Levin (44), Leatham (43) y Moore (53), como los que han utilizado la técnica electroforética, como Chaoh Hao Li (7); Moore et al. (51, 52); Deutsch et al. (16) y Gjessing et al. (26).

CUADRO 9. - COMPARACIÓN DE VALORES ASIGNADOS A LAS PROTEINAS DEL SUERO DE LA RATA NORMAL.

VALORES EN GRAMOS / 100ml DE SUERO										
AUTORES	CONDICIONES		VALOR	P.T.	A.V.	G. t.	A-G	B-G	F-G	A/G
	PH	CEPA								
LEVIN L. et al. (44)		LONG EVANS	M SM	5.880.0	3.69 0.06	2.200.0				1.73 0.06
LEATHAM J. (43)		LONG EVANS	M SM	6.370.0	3.86 0.09	2.510.1				1.53 0.10
MOORE D.H. et al. (52)		LONG EVANS	M SM	6.040.2	3.86 0.23	2.180.1				1.79 0.22
DE ESTE TRABAJO		FISIOLOG. E.N.M. U.N.A.	M S SM	7.390.6	1.65 0.34 0.05	5.750.7	2.07 0.37 0.05	2.250.6	1.430.2	0.28 0.12 0.02
VALORES PORCENTUALES										
CHOH H (7)	8.5	LONG EVANS	M		73.10	26.90				2.71
MOORE D.H. et al (52)	7.4	LONG EVANS	M		68.20	31.80	2.07	17.10	12.40	2.14
	8.6	LONG EVANS	M		60.20	39.74	19.58	15.48	4.66	1.52
MOORE et al. (53)	7.4	LONG EVANS	M		71.43	28.57		16.00	11.84	2.49

DEUTSCH H.F.	8.6	SPRAGUEDAW	M S		59.101.	40.901.0	15.400.	19.40 0.50	4.80 0.20	1.40
MOORE D.H. (51)	7.4	COTTON RAT	M		52.00	48.00	27.00	12.00	10.00	1.08
	8.6		M		47.00	53.00	36.00	9.00	7.00	0.88
GJESSING (26)	8.6	WISTAR	M		43.60	56.40	30.30	19.60	6.00	0.77
DE ESTE TRABAJO		FISIOLOGÍA	M S		22.342.	77.66 2.17	27.972.	30.33 2.40	19.362.	0.28 0.12

VALORES CALCULADOS A PARTIR DE LOS DATOS DE LOS AUTORES E.J.G.

No hay por qué sorprenderse de la divergencia de nuestras cifras, ya que es lo que corrientemente se observa en cepas diversas de ratas: La cepa Long-Evans (7, 52 y 53) da los valores más elevados de albúminas (71.4 pc); las más bajas de globulinas y nada de alfa-globulinas. La cepa Sprague-Dawley (16), la Cotton-rat [*Sigmodon hispidus hispidus* (51)] y la cepa Wistar (26), tienen otros valores que, sin ser iguales a los nuestros, mucho se les acercan (consúltese el cuadro número 9). Deutsch H. F. y Goodloe M. B. (16) opinan que en condiciones normales hay variaciones de acuerdo no sólo con la cepa, sino con la edad y el sexo del animal.

Por eso consideramos que para ulteriores estudios, era de primera importancia empezar por conocer el cuadro proteico del suero de las ratas de la cepa de este Departamento.

RESUMEN

1. Se describen y exponen los fundamentos y ventajas de varias técnicas desarrolladas para determinar proteínas totales, albúminas verdaderas, globulinas totales, y las tres fracciones principales, alfa-, beta- y gamma-globulinas, así como la relación albúminas/globulinas, en muestras de 0.9 ml de suero sanguíneo.

2. Se comprueba que los valores que proporcionan son consistentes reproducibles, comparables con los obtenidos por otros métodos y con un error probable más pequeño que el propio del aparato utilizado para las lecturas.

3. Se comprueba que las curvas patrón obtenidas con ambos sueros son estadísticamente iguales, y que por lo mismo, puede aceptarse que los sueros humano y de conejo son estadísticamente semejantes en cuanto a los enlaces peptídicos de sus proteínas.

4. Se consignan los valores promedios encontrados con relación a cuatro grupos estudiados, formados: a) por 30 niños normales, b) por 12 perros callejeros; c) por 100 conejos normales, y d) por 50 ratas machos.

5. Se discuten e interpretan las semejanzas y diferencias encontradas con relación a los valores dados por otros autores.

6. Se comprueba que el cuadro proteico normal, es no sólo diferente y característico para cada especie animal, sino que varía entre cepas distintas de la misma especie.

Los autores agradecen las ayudas recibidas de los señores doctores José María Pardo Atristain, de los Laboratorios del Hospital Central Militar; Leonel Fierro del Río, de la Sala de Nutrición de dicho Hospital y de los Laboratorios de la Escuela de Salubridad e Higiene; Rafael Farrera Rojas, del Departamento de Cirugía Experimental del Hospital Central Militar y Joaquín Cravioto Muñoz del Hospital Infantil, así como la del profesor Alvaro Aldama Contreras, técnico en estadística de la Escuela de Salubridad e Higiene.

REFERENCIAS

1. BLIX, GUNNAR, J. Biol. Chem. 137:495. 1941.

2. BLIX, GUNNAR, ARNE TISELIUS, and HARRY SVENSON. J. Biol.Chem 137:485. 1941. 264

3. BOLÍVAR, JOSÉ IGNACIO. Aislamiento de las fracciones globulínicas del plasma de caballos inmunizados contra la Difteria humana. Tesis recepcional. F. N. de C Q., Mexico, 1947.
4. BUTLER, ALLAN M., HESTER BLATT, and HARRIET SOUTHGATE. J. Biol. Chem. 109: 755. 1935.
5. BUTLER, ALLAN M., and HUGH MONTGOMERY. J. Biol. Chem. 99: 173. 1932-33.
6. CAMPBELL, WALTER R. and MARION I. MANNA. J. Biol. Chem. 119: 15. 1937.
7. CHOH, HAO LI. J. Am. Chem. Soc. 66: 1795. 1944.
8. CHOW, BACON F. J. Biol. Chem. 167:757. 1947.
9. CHOW, BACON F., E. HOMBURGER, S. DE BIASE, and M. L. PETERMAN. J. Lab. and Clin. Med. 33:1052. 1948.
10. COHN, CLARENCE, and WILLIAM QUITMAN WOLFSON. J. Lab. and Clin. Med. 32: 1203. 1947.
11. *Ibid.* J. Lab. and Clin. Med. 33: 367-1948.
12. COHN, EDWIN JOSEPH, T. L. MC MEEKIN, J. L. ONCLEY, J. M. NEWELL, and W. L. HUGHES. J. Am. Chem. Soc. 62: 3386. 1940.
13. COHN, E. J., JOHN L. ONCLEY, LAURENCE E. STRONG, WALTER R. HUGHES JR., and S. HOWARD ARMSTRONG. J. Clin. Invest. 23: 417. 1944.
14. COHN, E. J., L. E. STRONG, W. L. HUGHES JR., D. J. MULFORD, J. N. ASHWORTH, M. MELIN, and H. L. TAYLOR. J. Am. Chem. Soc. 68: 459. 1946.
15. CRAVIOTO, MUÑOZ JOAQUÍN. Comunicación personal.
16. DEUTSCH, H. F., and M. B. GOODLOE. J. Biol. Chem. 161: 1. 1945.
17. DEUTSCH, H. F., L. J. GOSTING, R. A. ALBERTY, and J. N. WILLIAM. J. Biol. Chem. 164: 109. 1946.
18. DOLE, VINCENT P., with assistance of ESTHER BRAUN. J. Clin. Invest. 23: 708.1944.
19. DUBACH, REUBENIA, and ROBERT M. HILL. J. Biol. Chem. 165: 521. 1946.
20. ESPERÓN, ENRIQUE. Comunicación personal.
21. FIERRO DEL RÍO, LEONEL. Comunicación personal.
22. — DELFINA ARRIETA AUPART, y FLORENCIA CANO VEGA. Rev. de Invest. Clín. (En prensa).
23. FISHBERG, ELLA H. J Biol. Chem. 81: 205. 1929.
24. — and ARTHUR M. FISHBERG. Proc. Soc. Exp. Biol. and Med. 25: 296. 1927-28.
25. GITLIN, DAVID, CHARLES S. DAVIDSON, and LESLIE H. WETTERLOW. J. Immunol. 63: 415. 1949.
26. GJESSING. ERLAND C., and ALFRED CHANUTIN, with the technical assistance of FLOYD L. CURTIS. J. Biol. Chem. 169: 657. 1947.
27. GOLDBERG, I. Compt. rend. Soc. Biol. 128: 1135. 1928.
28. GÓMEZ SANTOS, FEDERICO, RAFAEL RAMOS GALVÁN, JOAQUÍN CRAVIOTO MUÑOZ, BEATRIZ BIENVENU HERRERA, y MARGARITA ESCOBEDO GUARNEROS. Bol. Med. Hosp. Infant. Mex. (En prensa).
29. GORNALL, ALLAN G., CHARLES J. BARDAWILL, and MAXIM M. DAVID. J. Biol. Chem. 177: 751. 1949.
30. GUTMAN. ALEXANDER B. Advances in Prot. Chem. IV: 155. 1948.

31. — DAN H. MOORE, E. B. GUTMAN, V. McCLELLAN, and E. A. KABAT. *J. Clin. Invest.* 20: 765 1941.
32. HALLIBURTON, W. D. *J. Physiol.* 5: 152. 1884.
33. HEWITT LESLIE, FRANK. *Biochem. J.* 32: 1540. 1938.
34. HOWE, PAUL E. *J. Biol. Chem.* 49: 93.1921.
35. JAGER, B. V., and MARGARET NICKERSON. *J. Biol. Chem.* 173: 683. 1948.
36. JAGER, B. V., T. B. SCHWARTZ, EMIL L. SMITH, MARGARET NICKERSON, and DOUGLAS M. BROWN. *J. Lab. and Clin. Med.* 35: 76. 1950
37. JAMESON, E., and C. ALVAREZ TOSTADO. *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.*40: 476. 1939.
38. KEKWICK, RALPH AMBROSE. *Biochem J.* 33: 1122. 1939.
39. KEYS, ANCEL. *J. Biol. Chem.* 132: 181. 1940.
40. KIBRICK, ANDRE C., and MURIEL BLONSTEIN. *J. Biol. Chem.* 176: 983. 1948.
41. KINGSLEY, GEORGE R. *J. Biol. Chem.* 133: 731. 1940.
42. KUNKEL, HENRY C. *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.* 66: 217. 1947.
43. LEATHEM, JAMES H. *Am. J. Physiol.* 154: 459. 1948.
44. LEVIN, LOUIS, and JAMES H. LEATHEM. *Am. J. Physiol.* 136: 306. 1942.
45. LONGSWORTH, LEWIS G. *Chem Rev.* 30: 323. 1942.
46. — RAYMOND M. CURTIS, and RICHARD H. PEMBROKE. *J. Clin. Invest.* 24: 46. 1945.
47. LONGSWORTH L. G., and D. A. McINNIS. *J. Exp. Med.* 71: 77. 1940.
48. LUETSCHER, J. A. JR. *J. Clin. Invest.* 19: 313. 1940.
49. MAJOOR, C. L. H. *J. Biol. Chem.* 169: 583. 1947.
50. MILNE JOHN. *J. Biol. Chem.* 169: 595. 1947.
51. MOORE, DAN H. *J. Biol. Chem.* 161: 21. 1945.
52. — Louis LEVIN, and JAMES H. LEATHEM. *J. Biol. Chem.* 153: 349. 1944.
53. MOORE, DAN H., LOUIS LEVIN, and GEORGE K. SMELSER. *J. Biol Chem.* 157: 723: 1945
54. PERLMANN, GERTRUDE E., and L. G. LONGSWORTH. *J. Am. Chem. Soc.* 70: 2719. 1948.
55. PETERMAN, MARY L., NELSON E. YOUNG, and KATHERINE R. HOGNESS. *J. Biol. Chem.* 169: 379. 1947.
56. PILLEMER, LOUIS, and M. C. HUTCHINSON. *J. Biol. Chem.* 158: 299. 1945.
57. POPJACK, G., and E. F. McCARTY. *Biochem. J.* 40: 789. 1946.
58. REINER, MIRIAM. *Manual Of Clinical Chemistry.* Interscience Publishers. Inc. New York. 1941. P. 43.
59. SCHWARTZ, HERMAN, and HENRY H. LICHTENBERG. *J. Biol Chem.* 121: 315. 1937.
60. SEIBERT, FLORENCE B., and J. WALTER NELSON. *Proc. Exp. Biol. and Med.* 49: 77. 1942.
61. SEIBERT, FLORENCE B., and J. WALTER NELSON. *J. Biol. Chem.* 143: 29. 1942.

62. SHARP, D. G., A. R. TAYLOR, DOROTHY BEARD, and J. W. BEARD. *J. Immunol.* 44:115. 1942.
63. STENHAGEN, EINAR. *Biochem. J.* 32: 714. 1938.
64. SVENSSON, HARRY. *J. Biol. Chem.* 139: 805. 1941.
65. TAYLOR, HENRY LONGSTREET, and ANCEL KEYS J. *Bioh Chem.* 148:379.1943.
66. TISELIUS, ARNE. *Trans. Faraday Soc.* 33: 524. 1937.
67. TISELIUS, ARNE. *Biochem. J.* 31: 1464. 1937.
68. TISELIUS, ARNE, and ELVIN A. KABAT. *J. Exp. Med.* 69: 119. 1939.
69. WEICHSELBAUM, THEODORE E. *Am. J. Clin. Path.* 16 (tech. sect.): 40. 1946.
70. WHITMAN, JOHN F., H. R. ROSSMILLER, and LENA A. LEWIS. *J. Lab. and Clin. Med.* 35:167. 1950.
71. WOLFSON, W. Q., COHN C., E. CALVARY, and F. ICHIBA. *Am. J. Clin. Path.* 18: 723. 1948.
72. WOLFSON, W. Q., C. COHN, E. CALVARY, and E. M. THOMAS. *J. Lab. and Clin. Med.* 33:1276. 1948.
73. ZELDIS, L. J., and E. L. ALING. *J. Exp. Med.* 81: 515. 1945.
74. ZELDIS, L. J., E. L. ALLING, A. B. McCOORD, and J. P. KULKA. *J. Exp. Med.* 82: 411. 1945.
75. ZUCKER, T. F., L. HALL, M. YOUNG, and L. ZUCKER. *J. Nut.* 22: 123. 1941.