

Tesis de Posgrado

Comparación de métodos para la valoración de fibrinógeno : Aplicación del mét. del biuret a casos normales y patológicos

Gabarain, Roberto Victorio Angel

1957

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Químicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Gabarain, Roberto Victorio Angel. (1957). Comparación de métodos para la valoración de fibrinógeno : Aplicación del mét. del biuret a casos normales y patológicos. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_0928_Gabarain.pdf

Cita tipo Chicago:

Gabarain, Roberto Victorio Angel. "Comparación de métodos para la valoración de fibrinógeno : Aplicación del mét. del biuret a casos normales y patológicos". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1957.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_0928_Gabarain.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

RESUMEN DE TESIS

Título:

" COMPARACION DE METODOS PARA LA VALORACION DE FIBRINOGENO "
(Aplicación del m^ot. del biuret a casos normales y patológicos)

Presentado por:

ROBERTO V. A. GABARAIN

Para optar al título de:

DOCTOR EN QUIMICA.

Res de Tesis: 928

Este trabajo se refiere a la determinación cuantitativa del fibrinógeno y está dividido en dos partes, general y experimental.

a) Parte general

Se tratan modernos conocimientos sobre la coagulación sanguínea, exponiéndose conceptos y esquemas recientes de Quick, Owren y Pavlouky.

Luego los conocimientos modernos con respecto a constitución, propiedades lugar de formación y variaciones en la concentración, de fibrinógeno.

Se exponen también diversos métodos para su valuación como el de Campbell y Hanna, Cullen y Van Slyke, Foster y Whipple y otros.

A continuación se considera un trabajo publicado por Robinson y Hogden sobre la reacción del biuret aplicada a la determinación de proteínas y en especial sueroproteínas.

b) Parte experimental

Los autores recién mencionados demostraron que el método que aplica la reacción del biuret para la determinación de proteínas sanguíneas ofrece suficientes seguridades. En este trabajo se lo aplica para la evaluación de fibrinógeno, siguiendo las indicaciones de un trabajo de los doctores Marín y Gómez.

El fibrinógeno se precipita con sulfato amónico al 25 % en plasma diluido con solución fisiológica. Luego de quince minutos de reposo se centrifuga por igual lapso y a 3000 r.p.m.

Se lava el precipitado con sulfato amónico, centrifugando por dos veces. Luego de efectuar un drenaje del tubo sobre papel de filtro, se disuelve el precipitado en H₂O al 3 %, calentando ligeramente al baño maría.

Se lleva a 9,75 ml con la misma solución alcalina y se agrega 0,25 ml de SO₄Cu al 20 %, agitando enérgicamente durante 20 a 30 segundos. Se deja en reposo cinco minutos para luego centrifugar durante veinte minutos a 3000 r.p.m.

La lectura se efectúa en fotocolorímetro con filtro de máxima transmisión en 530 mμ. Como blanco de compensación un tubo conteniendo 9,75 ml de H₂O al 3 % al que se agrega 0,25 ml de SO₄Cu 20 %, para después centrifugar en idénticas condiciones.

Se estudian en la parte experimental la influencia de las diversas fases del trabajo, como ser tiempo de precipitación y número de lavados.

Se realizan también determinaciones por duplicado y triplicado, reacciones de recuperación y un estudio sobre la influencia de la concentración del sulfato amónico.

Final ente se compara valores obtenidos por este método y el de Cullen y Van Slyke.

Siguen luego las tablas de resultados, dispuestas en cuadros:

- Cuadro 1- Determinaciones por duplicado y triplicado.
- " 2- Influencia del tiempo de precipitación.
 - " 3- Influencia del número de lavados.
 - " 4- Reacciones de recuperación.
 - " 5- Precipitación con distintas concentraciones de $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$.
 - " 6- Resultados comparativos con respecto al método de Cullen y Van Slyke.
 - " 7- Fibrinógeno en personas normales.
 - " 8- Estudio sobre mujeres embarazadas, distribuidas en cinco grupos:
 - 1º- 20 embarazadas normales.
 - 2º- 30 embarazadas preeclámpticas.
 - 3º- 30 embarazadas con procesos hemorrágicos diversos.
 - 4º- 4 embarazadas con feto muerto y retenido.
 - 5º- 10 púerperas.
 - 2 9- Estudio sobre personas con diversas afecciones.

CONTENIDO

PRIMERA PARTE

Estudio del método:

- I- La determinación del fibrinógeno mediante la reacción del biuret, se efectúa sin inconvenientes y presenta ciertas ventajas con respecto a otros métodos a saber:
 - a) Requiere menos tiempo.
 - b) Permite efectuar simultáneamente un número elevado de determinaciones.
 - c) La preparación y conservación de los testigos colorimétricos no ofrece dificultades.
- II- El método controlado mediante determinaciones efectuadas por duplicado y triplicado, así como por medio de ensayos de recuperación, dió siempre resultados satisfactorios (CUADROS 1 y 4). Las desviaciones observadas están dentro de límites normales.
- III- Hemos confirmado que un lapso de quince minutos, una vez agregado sulfato amónico, es suficiente para obtener una completa precipitación de fibrinógeno (CUADRO 2).

Hemos confirmado que es necesario efectuar un lavado para eliminar restos de otras proteínas. De lo contrario se obtienen valores superiores a los reales. Un mayor número de lavados no influye en las cifras determinadas (CUADRO 3).

IV- Hemos estudiado la influencia de las diversas concentraciones de sulfato amónico, llegando a las siguientes conclusiones (CUADRO 5)

- a) El grado óptimo de saturación es de 25 %.
- b) Por debajo de estas concentraciones, se obtienen siempre valores inferiores a los reales.
- c) Por encima de 30 %, se obtienen siempre valores superiores a los reales.
- d) Entre 25 y 30 %, los resultados son variables, a veces por encima y a veces por debajo de los valores reales.

V- Se obtienen valores concordantes al efectuar determinaciones simultáneas por el método propuesto de la reacción del biuret y por el método de Cullen y Van Slyke.

SEGUNDA PARTE

El método aplicado a sangres normales y a sangres de personas con diversas afecciones.

I - En 20 personas de ambos sexos consideradas normales, el promedio de las determinaciones alcanza a 348 mg %, con un valor máximo de 500 mg % y un mínimo de 220, lo cual coincide con los límites indicados por diversos autores que comprenden entre 200 y 500 mg % (CUADRO 7).

II- Se estudió el nivel de fibrinógeno en mujeres embarazadas dividiéndola en cuatro grupos (CUADRO 8).

Primer grupo: en 20 embarazadas normales. Se observa que el fibrinógeno ofrece cifras moderadamente elevadas, que se acrecientan con la edad del embarazo. Nuestras cifras son más elevadas que las clásicas. También otros autores, entre ellos, O. Agüero (de Caracas), obtuvieron valores superiores a los clásicos e inclusive, superiores a los nuestros.

Segundo grupo: en 30 embarazadas preeclámpticas. Presentan valores moderadamente elevados, similares a los del grupo anterior. No se notaron alteraciones en los demás factores de la coagulación sanguínea.

Tercer grupo: embarazadas con procesos acompañados de hemorragias (placenta previa, desprendimiento normalplacentario, mola hidatiforme, amenaza de aborto). Los valores obtenidos son similares a los tres grupos anteriores no variando las cifras de fibrinógeno ni aún después de hemorragias importantes.

Cuarto grupo: embarazadas con feto muerto y retenido. Se observan las cifras de fibrinógeno en relación al desarrollo del embarazo, no variando estas cifras, ni los factores de la coagulación sanguínea en el lapso de dos meses.

Quinto grupo: comprende a 10 puérperas. Las pacientes ofrecieron cifras más elevadas que las embarazadas, y siempre por encima del límite normal de 500 mg %.

III- En pacientes con diversas afecciones observamos (CUADRO 9)

- a) Cifras normales en diabéticos (salvo uno de ellos)
- b) Cifras elevadas en los enfermos con diversas infecciones acompañadas por eritrosedimentación acelerada.
- c) Cifras limítrofes inferiores en pacientes con afecciones hepáticas.
- d) Un caso de púrpura con trombocitopenia sumamente acentuada (28000 trombocitos por mm³), pétéquias en diversas partes del cuerpo, retracción retardada del coágulo y tiempo de coagulación ligeramente aumentado, acusó cifras normales.

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

" COMPARACION DE METODOS PARA LA VALORACION DE FIBRINOGENO "
(Aplicación del mét. del biuret a casos normales y patológicos)

por

ROBERTO V. A. GABARAIN

TESIS: 533

Tesis presentada para optar al título de Doctor en Química.

- 1957 -

A MI MADRE, Y EN ELLA A
LA MEMORIA DE MI PADRE.

Sean las primeras palabras de este trabajo para expresar mi verdadero reconocimiento a todos aquellos que lo hicieron posible por su colaboración.

Agradezco así el apoyo que me prestaron los Doctores Ventura Morera y Ariel H. Guerrero, bajo cuya dirección se llevó a cabo esta tesis, la Doctora Celia Simonetti de Arbona por su asesoramiento en lo concerniente a la coagulación sanguínea, y el Doctor Jacomo Rosenwasser por su colaboración en lo concerniente a embarazo y fibrinógeno.

-- oOoOo --

I N T R O D U C C I O N

ooOoo

En el presente trabajo estudiaremos principalmente la determinación del fibrinógeno por el método del biuret. Por lo tanto la primera parte se dedica a las modernas teorías de la coagulación sanguínea en razón de la primordial importancia de esta proteína plasmática en el citado fenómeno.

A continuación los conocimientos respecto a la constitución del fibrinógeno y su relación con fibrina, para seguir con un comentario acerca los métodos más comunes para su evaluación.

Pasamos a estudiar la reacción del biuret aplicada a la determinación de las proteínas y en especial las proteínas sanguíneas.

Finalmente dicho método aplicado en particular a la determinación del fibrinógeno según una técnica de Marenzi y Gómez, con un estudio de los diversos factores en juego.

En la última parte las tablas de resultados y las conclusiones pertinentes.

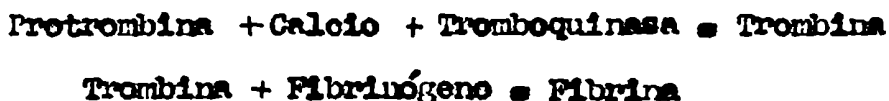
- - - - -

1) MODELOS CONOCIMIENTOS SOBRE LA COAGULACION DE LA SANGRE

Según Quick, la evolución de los conocimientos respecto al fenómeno de la coagulación pueden dividirse en tres grandes períodos: a) era de la teoría preclásica (hasta 1904); b) era de la teoría clásica (1904-34) y c) era de la protrombina (1934 en adelante). La observación de Malpighi en 1666, que después del lavado del coágulo, se obtiene una masa de fibras, puede considerarse la primer tentativa para conocer el fenómeno mencionado. Nuevas bases fueron proporcionadas por Hewson, cien años después, al introducir los primeros métodos para mantener fluida la sangre, fuera del organismo. Se obtuvo entonces la certidumbre de que los factores de la coagulación se ubican en la fracción no celular de la sangre.

El primero en postular que sólo era necesario la trombina para coagular el fibrinógeno, fue Hammarsten (1877), quien a su vez aportó importantes datos para el conocimiento de esa proteína. Posteriormente Schmidt, formalizó la idea de que la trombina se forma a partir de un precursor (denominado protrombina por Pechelharing), interviniendo un agente zimoplástico en este proceso de activación. En 1890, se obtiene por labor de Pages y Arthur, la certeza de la indispensabilidad del calcio, para el proceso de coagulación.

La unificación de conocimientos en un esquema completo, se llevó a cabo por mediación de Morawitz y Fuld y Spiro, en la conocida expresión



Con esta ecuación que expresa la generalmente llamada teoría clásica, comienza una nueva era.

b) Era de la teoría clásica: A través de la ecuación de Morawitz, se emitieron nuevas y contradictorias teorías. Por ejemplo Howel afirma que la sangre contiene protrombina combinada con un agente anticoagulante, la heparina. Esta antitrombina se neutraliza por acción de la tromboplastina, aportada por plaquetas y tejidos. En estas condiciones la protrombina se combina con el calcio para formar la trombina.

Otras variaciones se construyen alrededor de la teoría clásica, siendo tales contribuciones más obstáculo, que factor de progreso en los estudios sobre la coagulación.

La teoría clásica constituyó una guía segura y condujo a notables adquisiciones, que comienzan en 1934. En este período se lograron numerosos adelantos clínicos.

La introducción del citrato de sodio como anticoagulante, alcanzado independientemente en 1915 por Austin, Agote y Lewisohn, ^{en} razón del número de vidas salvadas por la transfusión de sangre y plasma, puede considerarse entre las más importantes contribuciones de todos los tiempos.

e) Era de la protrombina: En el año 1934 comienza lo que Quick denomina el renacimiento en el estudio de la coagulación de la sangre.

Si bien el aislamiento de la vitamina K permitió combatir eficazmente a dos enfermedades hasta entonces misteriosas: las hemorragias de las colestopatías y del recién nacido, a más de veinte años de tal descubrimiento, no se ha aclarado su acción en las síntesis de la protrombina, contribuyendo, por lo tanto, relativamente poco al esclarecimiento del problema fundamental. De más importancia fue la introducción del método simple de Quick, y del método en dos etapas de Warner, Dinkhaus y Smith, para determinar la actividad protrombínica de la sangre. El método en una etapa es simple y sus resultados ^{son} satisfactorios para los fines diagnósticos. Los resultados inciertos tuvieron su posterior explicación al conocerse la complejidad de la protrombina. Ambos métodos, así como la acción de la vitamina K, se apoyaban en la teoría clásica, que alcanzó su apogeo alrededor de 1940.

Pero el descubrimiento en 1943 de un nuevo factor esencial para la actividad protrombínica, marcó el comienzo del ocaso de esta teoría.

La teoría clásica fue la mejor guía en el pasado, pero adolecía de algunas deficiencias, teniendo puntos débiles que impusieron la necesidad de su remplazo por una nueva hipótesis más amplia.

Las principales fallas de la antigua teoría son:

- I) No logró precisar la función de las plaquetas.
- II) No indicaba explícitamente el origen de la tromboplastina.
- III) Consideraba que la acción de la tromboplastina y del calcio era de naturaleza catalítica.
- IV) Suponía que la protrombina estaba formada por un componente único.
- V) No analizaba el carácter autocatalítico del proceso de coagulación.
- VI) No explicaba satisfactoriamente la incoagulabilidad de la sangre circulante.

Aplicando los notables adelantos obtenidos en el estudio de la coagulación, se ha formado una nueva concepción del proceso, que remplaza a la teoría clásica, superando las limitaciones de ésta. Se procuró, como resultado de la integración y correlación de hechos que derivan de observaciones precisas y experimentos perfectamente comprobados, formular una teoría simple y provechosa de la coagulación sanguínea.

Función de las plaquetas:

Patton y sus colaboradores, centrifugando a gran velocidad sangre extraída cuidadosamente, lograron preparar un plasma libre de plaquetas. Dicho plasma permanece flúido a temperatura ambiente durante más de tres días. De tales trabajos surge la afirmación en el sentido de que no puede presentarse prueba alguna en apoyo de la hipótesis de que el plasma pueda contener un factor soluble capaz de iniciar la coagulación, sin que intervengan las plaquetas.

Al agregar una pequeña cantidad de tromboplastina a un plasma libre de plaquetas, se inicia rápidamente la coagulación. Es decir, que la tromboplastina estaría contenida en las plaquetas. Pero Quick encontró que estos elementos - prácticamente no contienen dicha sustancia, hallazgo corroborado por Ware, Fakey y Seegers.

Quick admite entonces que la tromboplastina se encuentra en el plasma al estado de un precursor inactivo, el tromboplastinógeno, y que las plaquetas al desintegrarse ponen en libertad la sustancia (activador) que transforma al tromboplastinógeno en tromboplastina. Esta hipótesis es apoyada por algunos hechos observados al estudiar la sangre hemofílica. El defecto de la coagulación se corrige por agregado de tromboplastina. La deficiencia no se vincula a la desintegración de las plaquetas, porque la adición de saponina, que realiza tal efecto, no consigue normalizar la coagulación de una sangre hemofílica.

Por otra parte Quick demostró recientemente, que la coagulación de un plasma que presente plaquetopenia, se normaliza por adición de plaquetas hemofílicas. El conjunto de comprobaciones afirma la hipótesis que concluye, por parte de la sangre hemofílica, una deficiencia del precursor, tromboplastinógeno, siendo en cambio normal el factor activador contenido en las plaquetas.

Quick demostró que la velocidad de activación de la protrombina es una función del número de plaquetas. Y la curva que se obtiene al representar gráficamente, las velocidades en función del número de plaquetas, es típica de una función enzimática. Sin embargo en una posterior comunicación de dicho autor, se duda de la naturaleza enzimática del factor plaquetario, considerando que reacciona según proporciones estequiométricas.

Existen de todos modos entonces, pruebas experimentales que demuestran que las plaquetas determinan la utilización de la tromboplastina.

Labilización de las plaquetas:

La observación de Burke por la cual, las condiciones e factores que impiden la coagulación de la sangre, también inhiben la desintegración de las plaquetas, constituye un mejón muy importante en el estudio de la coagulación.

Las plaquetas permanecen intactas en cuatro tipos de plasma: descalcificados, heparinizados, hemofílicos, o con acentuada hipoprotrombinemia, y que a su vez poseen en común, la característica de no formar trombina. Este hecho induce a pensar que la última sustancia mencionada interviene en forma directa e indirecta en la labilización y lisis de las plaquetas.. En razón de que la fijación de las plaquetas sobre las superficies rugosas, seguida de la aglutinación respecto a esas células, solo se produce en condiciones tales que aseguran la formación de trombina, parece probable que los hechos acaezcan en la siguiente forma: la trombina se adsorbe y extiende sobre la superficie hmede cible: las plaquetas que se ponen en contacto con esta superficie, se vuelven inmediatamente pegajosas e inestables. Las superficies recubiertas con silicón que no adsorben trombinas, tampoco fijan las plaquetas.

Aceptando que la trombina provoca la labilización de las plaquetas, se puede explicar en forma lógica, el carácter autocatalítico de la coagulación. En cuanto se ha formado una pequeña cantidad de trombina, comienza esa labilización y desintegración de las plaquetas; talmente se conduce de inmediato a la activación del tromboplastinógeno, que a su vez, determina la conversión de protrombina en trombina. La nueva trombina formada, labiliza otra serie de plaquetas, y en esa forma se conduce a una reacción acelerada. Esta reacción en cadena puede denominarse ciclo trombinogénico.

La sangre normal no contiene tromboplastina libre e activa; ésta solo aparece cuando el factor de las plaquetas actúa sobre el precursor de la tromboplastina, contenido en el plasma.

La protrombina como sistema complejo:

Está constituida por dos componentes, uno de los cuales se destruye durante la conservación, disminuyendo el otro en el tratamiento con dicumarol. También se apreció que el primer componente no es adsorbido por el hidróxido de aluminio. Este nuevo factor, denominado por Quick compuesto lábil primeramente y luego factor lábil, existe en mucho mayor concentración en los plasmas de conejo y perro, que en el plasma humano. El tal factor (Ac-globulina) afecta la actividad protrombínica cuando se determina por el método en una etapa.

Actualmente se admite la coexistencia en el plasma, de la protrombina activa con su precursor inactivo. La transformación de una en otra se lleva a cabo en presencia de una superficie rugosa, pero no ha sido totalmente esclarecida la influencia de otros factores.

La nueva concepción aclara en forma lógica, las diferencias observadas en las concentraciones de protrombina alcanzadas por los métodos en una y dos etapas. La protrombina libre e activa se dosa en el método de una etapa, mien-

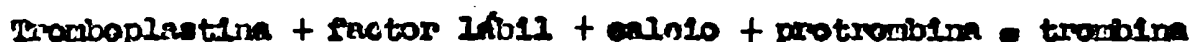
tras que el otro pondere posiblemente la protrombina total.

Naturaleza de la reacción entre la protrombina y tromboplastina:

A la tromboplastina y al calcio de la teoría clásica, se agrega entonces el factor lábil, como componente necesario para la formación de trombina.

Estudios posteriores de Quick y Stefanini indican que solo toma parte en la reacción el calcio combinado, teniéndose la impresión de que existe un compuesto definido del calcio que interviene en la coagulación. La acción de dicho elemento es poco conocida, pero se ha determinado las concentraciones necesarias para una coagulación óptima. Estas son 0,0012 M, en el hombre, y 0,0004 en conejo y perro.

Sobre la base del conocimiento actual del problema, se puede describir la reacción que conduce a la formación de trombina de la siguiente manera:



En la actualidad se admite, que en lugar de una acción catalítica de alguno de los diversos componentes, ocurren las sucesivas transformaciones siguiendo una relación estequiométrica entre dichos componentes.

Ciclo trombinogénico. Mecanismo regulador:

Al poner en presencia, cantidades adecuadas de tromboplastina y los factores del sistema complejo protrombina, se produce la formación de trombina.

Para que se inicie el ciclo, la trombina ha de labilizar las plaquetas, las cuales a su vez dejan en libertad al agente que activa al tromboplastinógeno. Con cada ciclo que se completa aumenta la cantidad de trombina formada, con la consiguiente aceleración del fenómeno coagulatorio, puesto que hay una interdependencia casi absoluta entre dicha velocidad y la concentración de trombina.

La trombina es una enzima; a partir de 1 ml. de sangre se puede obtener una cantidad de trombina suficiente para coagular todo el fibrinógeno contenido en la sangre circulante. Se desprende que es indudable la existencia de algún mecanismo regulador actuante sobre la formación así como, ^{sobre} la actividad de la trombina, ya que normalmente no se produce la coagulación intravascular de la sangre circulante. Desde los primeros estudios sobre la trombina se reconoció la existencia de una antitrombina, que luego se halló asociada a un componente de la fracción albúmina. Tal antitrombina no impide la coagulación del fibrinógeno, sino que neutraliza a la trombina, una vez que todo el fibrinógeno se ha transformado en fibrina.

En razón de la acción regulante de la antitrombina natural, también llamada albúmina X, sobre la actividad coagulante de la trombina, puede suponerse la existencia de algún otro mecanismo fisiológico que actúe regulando la forma-

ción y localizando la actividad de la trombina.

Quick y Fayre-Gilly observaron que en la coagulación normal se efectúa la conversión de pequeñas proporciones de protrombina en trombina. En cambio después de separado el coágulo del suero, se produce una rápida transformación de la protrombina desapareciendo ésta del suero.

Esta observación indica casi con seguridad, que la red de fibrina que consta de una enorme superficie, adsorbe tan completamente la trombina, que solo deja en libertad una ínfima cantidad para actuar sobre las plaquetas. Así, se retarda y regula la reacción en cadena.

La función del coágulo de fibrina no es la de un simple e inerte tapón mecánico. Actúa en primer término adsorbiendo la trombina, fijando de tal modo el exceso. Por lo tanto se frena aunque no interrumpe, la reacción en cadena, quedando trombina libre en cantidad suficiente para proseguir la labilización de las plaquetas. En tales momentos, se libera junto con el activador del tromboplastinógeno, un agente vasoconstrictor, que ejerce su acción localmente en la zona lesionada. En condiciones normales la trombina y el fibrinógeno se combinan en virtud de la afinidad existente entre enzima y sustrato. El complejo enzima-sustrato tiene duración limitada, y persiste hasta que al formarse la fibrina, queda la trombina libre.

Tanto la fibrina como el fibrinógeno tienen afinidad con la trombina, pero siendo mayor la afinidad del fibrinógeno, la conversión a fibrina prosigue hasta que se ha coagulado todo el fibrinógeno disponible.

La afinidad de la antitrombina del suero (albúmina X) con la trombina, es tan débil que no puede competir con el fibrinógeno o fibrina; solo cuando estos faltan, tiene la capacidad de neutralizar grandes cantidades de trombina. Por lo tanto, es evidente que la antitrombina natural no puede impedir que la trombina coagule al fibrinógeno. Puede neutralizar en cambio la trombina excedente, pero con velocidad relativamente pequeña.

Coagulación y hemostasis:

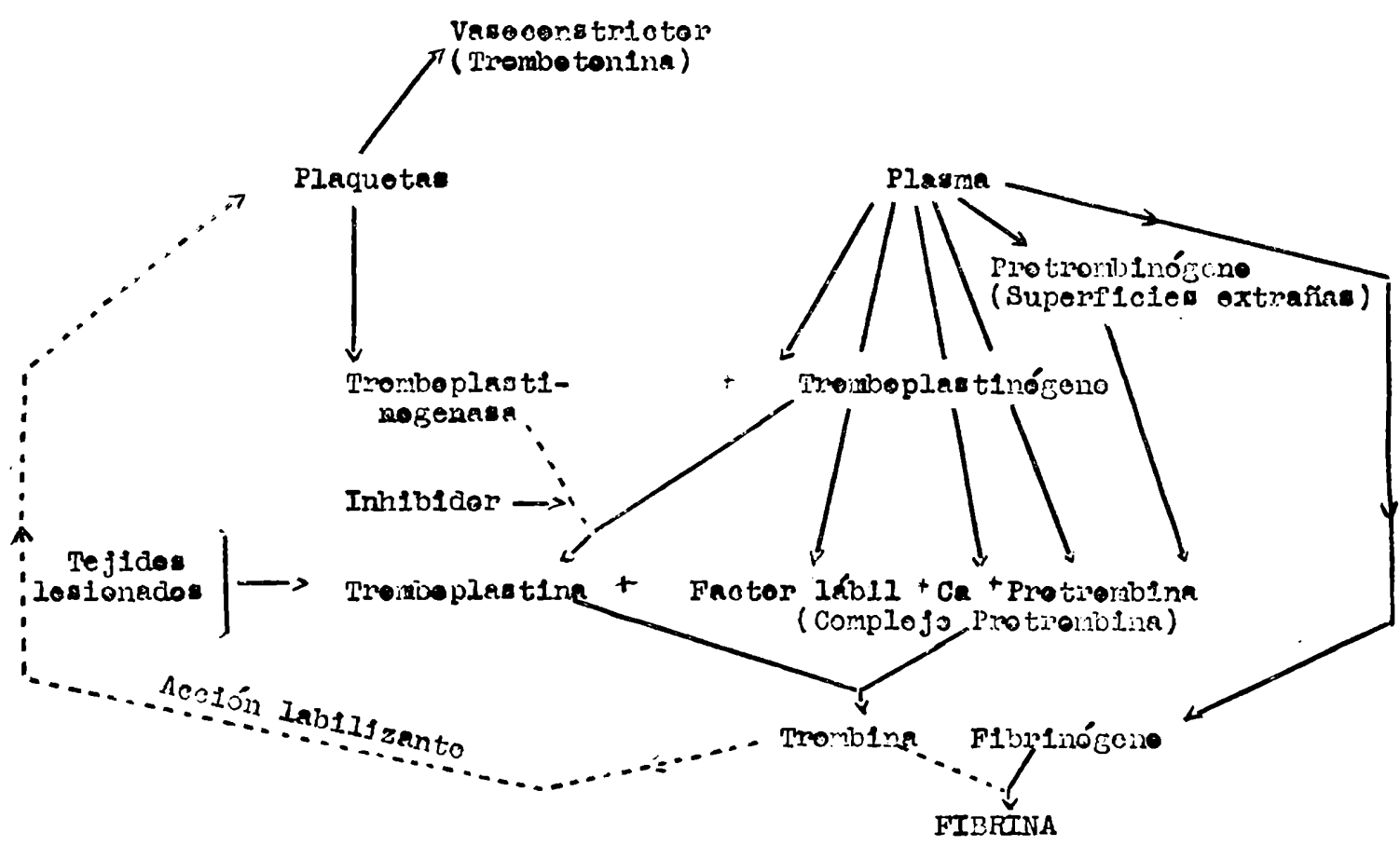
La coagulación de la sangre, y en particular el grupo de reacciones que conduce a la formación de trombina, desempeña un papel vital en el conjunto del mecanismo de la hemostasis.

Además de coagular el fibrinógeno, la trombina labiliza las plaquetas, iniciando así una reacción en cadena, ya que el agente puesto en libertad por las plaquetas activa al tromboplastinógeno. Simultáneamente cuando las plaquetas se disgregan, producen un factor de acción vaso-constrictora; mediante esta última sustancia, la coagulación de la sangre aparece relacionada con los factores vasculares de la hemostasis. A la acción vaso-constrictora de las plaquetas se suman otros factores para asegurar la hemostasis: la contracción

vascular primaria, probablemente de naturaleza refleja, y la adhesividad que aparece en el endotelio vascular, cuando se comprime e injuria el vaso.

La principal función del coágulo de fibrina, se reitera, no es la de actuar como un simple tapón mecánico, sino que actúa como un depósito de reserva de plaquetas, al mismo tiempo que un poderoso adsorbente de la trombina. Como resultado de la acción combinada de estas dos funciones, se mantiene en acción la hemostasis, por una liberación continua del agente constrictor.

A través de todas estas consideraciones llega ~~ya se basa~~ Quick a formular su esquema de la coagulación, que seguidamente transcribimos.



En los últimos años se han producido grandes progresos en los estudios sobre este fenómeno. Los progresos principales se han desarrollado en varias orientaciones, ante todo con miras a obtener la purificación de los componentes principales del proceso de coagulación, algunos de los cuales, por obra de investigadores como Seegers y de los laboratorios de la gran industria farmacéutica, fueron aislados en un grado de pureza realmente importante.

En segundo lugar, la introducción del microscopio electrónico y de otros nuevos métodos físico-químicos, han permitido aclarar mejor las relaciones del fibrinógeno y la fibrina, orientando hacia el concepto de la fibrinogénesis como un fenómeno de polimerización.

En tercer lugar se ha debido rever el concepto de la llamada primera fase de la coagulación, teniendo en cuenta algunos factores plasmáticos identificados en los últimos años e considerados de nuevo desde otro punto de vista.

Se tiende también modernamente a considerar la génesis de la trombina como dividida en dos fases, y por lo tanto el proceso de la coagulación debe considerarse en tres estadios en lugar de dos, a saber.

- 1) de tipo probablemente autocatalítico (o mejor coautocatalítico)
- 2) por algunos interpretado estequiométricamente, correspondiente al viejo primer estadio y que lleva a la formación de la trombina.
- 3) probablemente de polimerización que lleva a la transformación del fibrinógeno en fibrina por acción de la trombina.

A estos estadios se puede agregar un cuarto, que también tiene mucha importancia clínica, a saber; el de la formación, y la adhesión del trombo y de la retracción del coágulo.

Sin embargo surgen los inconvenientes, de la incompleta aclaración del primer estadio autocatalítico y la anarquía de la nomenclatura. En cambio los factores del segundo estadio han sido mejor estudiados.

No existe en la actualidad una teoría sobre la coagulación sanguínea que satisfaga a todo el mundo. La mayoría de los especialistas están de acuerdo sobre las reacciones fundamentales y las principales sustancias que intervienen en la formación del coágulo sanguíneo; sin embargo discrepan mucho en los que se refiere a las etapas sucesivas del proceso y a la aparición de sustancias específicas de la cadena de reacciones que conducen, en definitiva, a la fibrina.

Expondremos a continuación los principales conceptos de una de las modernas teorías sobre este proceso tan debatido, de la coagulación sanguínea. Es la que pertenece al Prof. P.A.Owren (Oslo). Los conceptos personales de este autor se encuentran reunidos en el esquema, que mas adelante se transcribe, y en

el cual se aprecia la terminología que considerara más adecuada. Este nuevo concepto es, según el autor, resultado del desarrollo en tres direcciones de la teoría clásica:

- 1º- El contacto con una superficie extraña provoca la coagulación, no solo por destrucción de los trombocitos, sino también por activación de factores coagulantes del plasma.
- 2º- La tromboplastina de la sangre no es liberada por los trombocitos bajo su forma final, sino que se produce por reacción entre un factor trombocitario y dos factores plasmáticos.
- 3º- Otros dos factores coagulantes, la proacelerina y la preconvertina, son también necesarios, además de la tromboplastina, para obtener una transformación rápida de la protrombina en trombina.

Consigna el autor las observaciones clínicas que le condujeron al descubrimiento de los nuevos factores de la coagulación. Una mujer de 29 años que padecía de diátesis hemorrágica desde su infancia, fué admitida en 1943 en la Clínica Universitaria de Oslo: el tiempo de coagulación y el tiempo de protrombina, según Quick, estaban anormalmente aumentados, sin que fuese posible corregir su deficiente coagulación mediante adición de protrombina. Por el contrario, el tiempo de coagulación se normalizó añadiendo a la sangre una pequeña cantidad de plasma normal que había sido desprovisto de protrombina por adsorción. Posteriormente se obtuvo del plasma exento de protrombina, un factor coagulante desconocido hasta la fecha, y que no existía en la sangre de la enferma. Esta sustancia llamada al principio factor V, es conocida hoy con el nombre de proacelerina; el sistema patológico producido por ausencia de proacelerina ha sido denominado parahemofilia. Las investigaciones de Quick (1943) sobre el plasma conservado, habían ya hecho sospechar la existencia de este factor.

En el curso de investigaciones efectuadas después del descubrimiento de la proacelerina, se observó que era posible distinguir diferentes preparaciones de protrombina por su tiempo de conversión; por no ser debidas estas diferencias a la proacelerina, se sospechó en esas preparaciones de protrombina la existencia de cantidades variables de un factor de conversión, todavía no identificado, al que se dió provisoriamente el nombre de co-factor V (Owren, 1947); es el equivalente de la preconvertina que fué aislada de la protrombina en 1949. La probable existencia de este factor había sido prevista después de investigaciones sobre el plasma de enfermos tratados con dicumarol. Sin embargo la prueba definitiva de la existencia de la preconvertina fué obtenida gracias al descubrimiento de enfermos con una diátesis hemorrágica de tipo es

pecial por ausencia congénita de este factor (Alexander y col.1951; Aas, 1952
Owren, 1952)

Pavlovsky observó en 1947 que la sangre procedente de sujetos hemofílicos de una misma familia permitía corregir los trastornos de la coagulación de hemofílicos de otras familias y viceversa, esto significaba la existencia de dos tipos diferentes de hemofilia, lo que condujo a la identificación y caracterización de un segundo factor antihemofílico (Aggeler y col. 1952; Koller y col. 1952; Biggs y col. 1953) Se llamó a este factor: "Factor antihemofílico B", y al factor ausente en la hemofilia clásica, "Factor antihemofílico A".

La terminología utilizada para los nuevos factores coagulantes varía de uno a otro autor. Los sinónimos mas corrientes se transcriben en cuadro aparte.

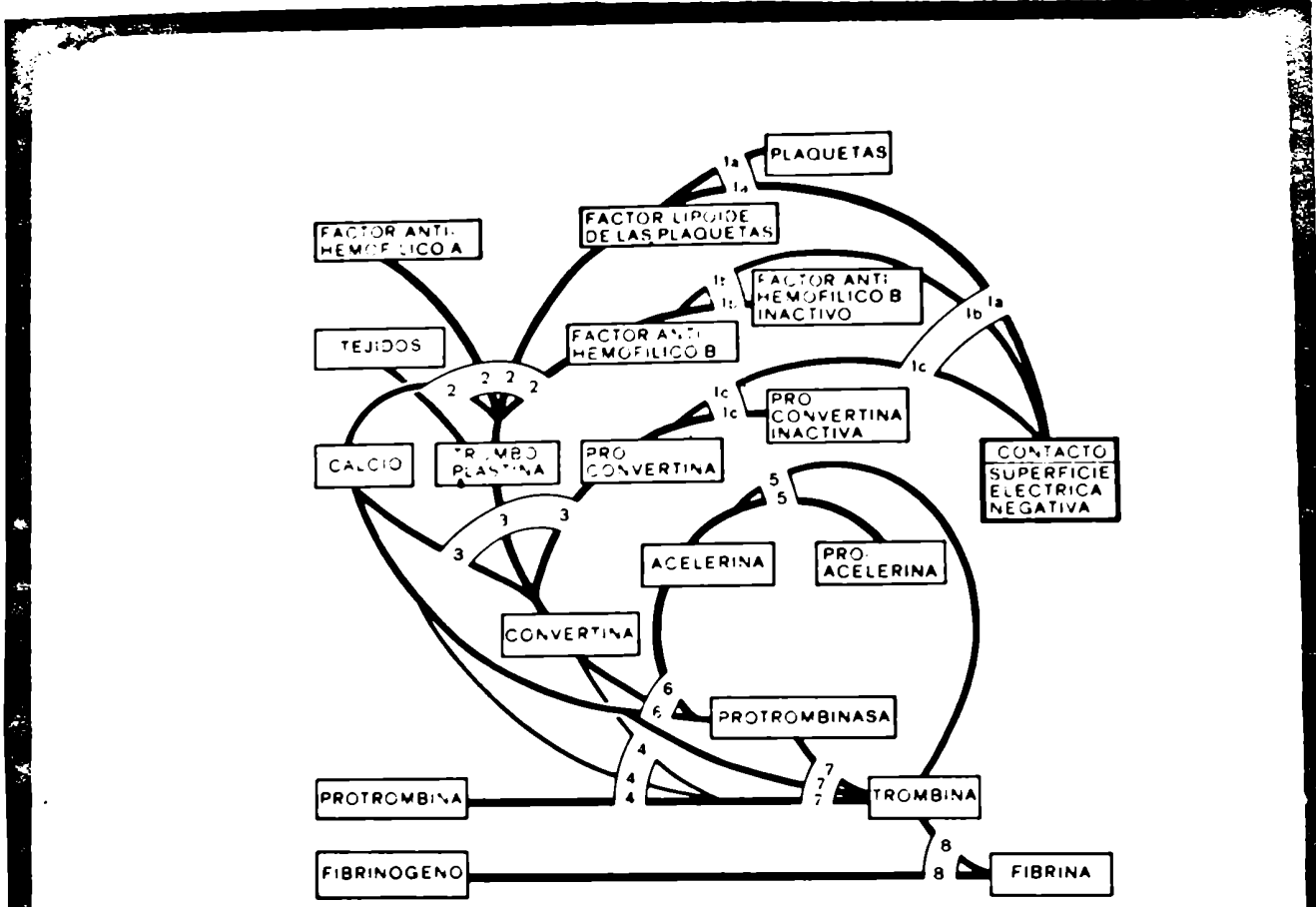


Fig. 1
La coagulación según la teoría de P. A. Owren.

1. El contacto provoca la coagulación: a) Por destrucción de trombocitos y liberación del factor tromboplastina lipídica trombocitaria; b) por activación del factor antihemofílico B (principio de la tromboplastina plasmática o PTC, "christmas factor"); c) por activación de la proconvertina (co-tromboplastina, SPCA, factor VII, "stable factor").
2. La lesión de los tejidos provoca la liberación espontánea de tromboplastina. Reacción entre el factor lipídico trombocitario, el factor antihemofílico A y el factor antihemofílico B activado para formar tromboplastina en la sangre, en presencia de iones calcio.
3. Formación de convertina con la participación de iones calcio por reacción de la tromboplastina con proconvertina.
4. La convertina provoca, en presencia de iones cálcicos, una débil transformación de protrombina en trombina.
5. La trombina así formada actúa sobre el sistema de factores aceleradores y origina la transformación de proacelerina en acelerina.
6. Reacción entre convertina y acelerina en presencia de iones calcio para formar protrombina.
7. La protrombina acelera, con intervención de los iones calcio, la transformación de protrombina en trombina.
8. La concentración de trombina es ahora suficiente para transformar el fibrinógeno en fibrina.

El sistema de los factores inhibidores no figura en el esquema. El factor antihemofílico B y la proconvertina son inactivos en el estado inicial, muy probablemente por estar combinados con un principio inhibidor. El plasma contiene también sustancias capaces de inactivar la tromboplastina, la convertina, la acelerina, la protrombina y la trombina.

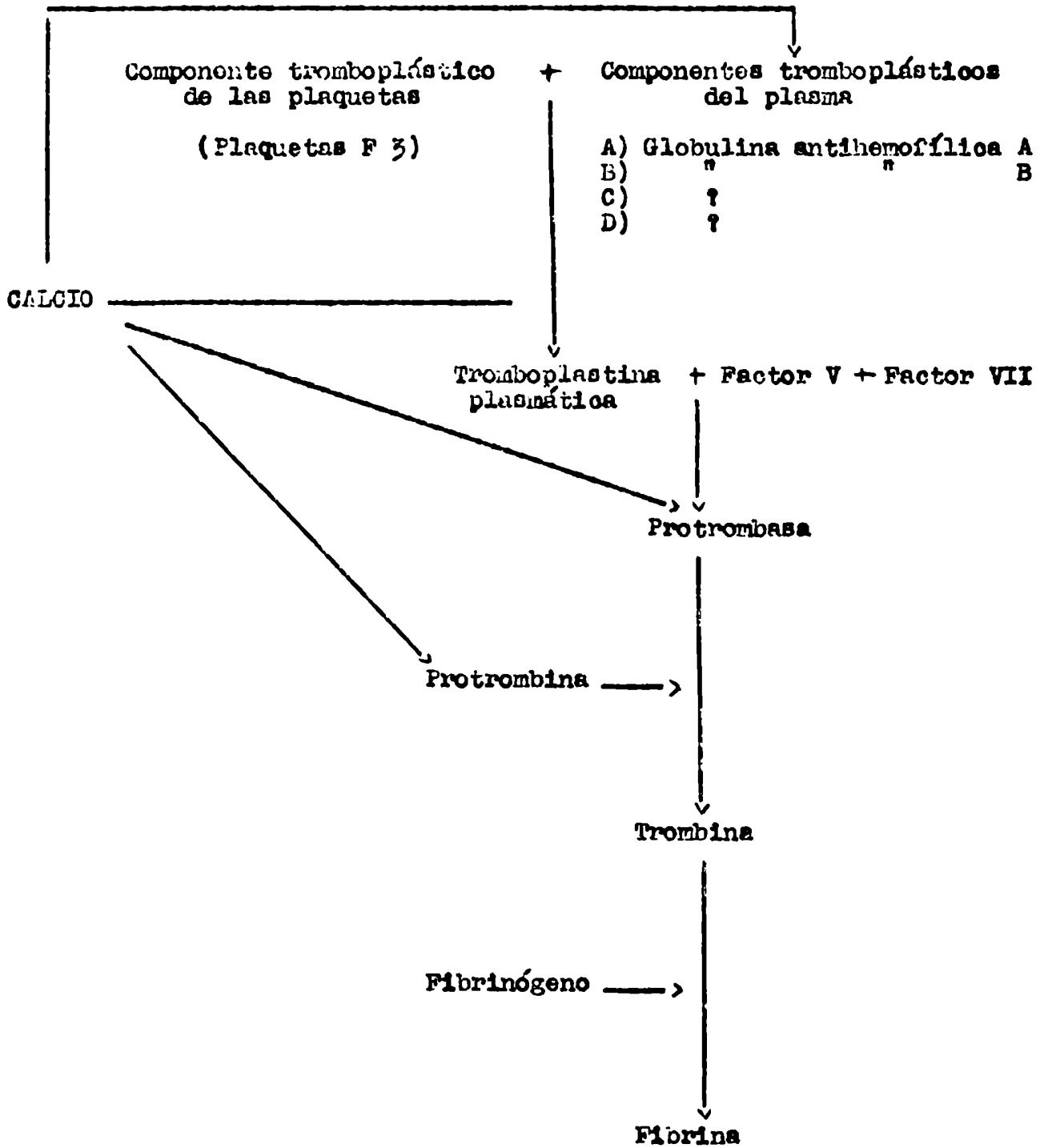
SINONIMOS UTILIZADOS PARA LOS FACTORES DE LA COAGULACION

Factor antihemofílico B	{ (Componente tromboplástico del plasma, (Aggeler y col., 1952) (Factor Clustmas (Biggs y col., 1953
Proconvertina	{ (Co-factor V (Owren, 1947) (Factor de conversión de la protrombina (Owen y Bellman, 1948) (Acelerador sérico de la conversión de la pro- trombina. (SPCA) (Golstein, 1948) (Co-tromboplastina (Mann, 1949)
Proacelerina	{ (Factor V (Owren, 1947) (Protrombina A (Quick, 1943) (Acelerador de la protrombina (Fantl y Nance, 1946) (Co-factor plasmático de la tromboplastina (Nonorato, 1947) (Factor Lábil (Quick, 1947) (Globulina aceleradora del plasma (Ware, Guest y (Seegers, 1947)

- - - - -

ESQUEMA DE LA COAGULACION SANGUINEA

A sugerencia del Dr.A.Pavlosky.



BIBLIOGRAPHIA

- 1) HALLANSETH, O.: Zur Lehre von der Faserstoffgerinnung, Pflüger's Arch. f. d. ges. Physiol., 14, 211, 1877.
- 2) ARTHES, M. and PAGHS, C.: Nouvelle théorie chimique de la coagulation du sang, Arch. de Physiol. Norm. et Path., 2, 739, 1890.
- 3) HORAWITZ, P.: Beiträge zur Kenntnis der Blutgerinnung. Deut. Arch. klin. med., 76, 215, 1903-04.
- 4) FULD, E. and SPIRO, K.: Der Einfluss einiger gerinnungshemmender Agentien auf das Vogelplasma, Beitr. chem. Physiol. u. Path., 5, 171, 1904.
- 5) HOWELL, W.H.: The purification of heparin and its chemical and physiological reactions, Bull. Johns Hopkins Hosp., 42, 199, 1923.
- 6) BODENT, J.: The theories of blood coagulation, Bull. Johns Hopkins Hosp., 32, 213, 1921.
- 7) JUSTIN, A.: Note sur une nouvelle méthode de transfusion, Bull. Soc. Roy. de Sc. med. et nat. de Bruxelles, avril 1914.
- 8) AGOTE, L.: Nuevo procedimiento para la transfusión de la sangre, An. Inst. Modelo de Clin. Med., enero 1915.
- 9) LEWISOHN, R.: A new and greatly simplified method of blood transfusion, Med Rec., 37, 141, 1915.
- 10) QUICK, A. J.: The coagulation defect in sweet clover disease and in the hemorrhagic chick disease in dietary origin. A consideration of the source of prothrombin, Am. J. Physiol., 113, 260, 1937.
- 11) The prothrombin in hemophilia and in obstructive jaundice, J. Biol. Chem. 109, lxxiii, 1935.
- 12) PATTON, T.B., WARE, G. and SHERGINS, W.H.: Clotting of plasma and silicone surfaces, Blood, 3, 656, 1943.
- 13) Studies on the enigma of the hemostatic dysfunction of hemophilia, Am. J. Physiol., 214, 272, 1947.
- 14) BÜNKER, K.: Blutplättchen und Blutgerinnung, Pflüger's Arch. f. d. ges. Physiol., 102, 36, 1904.
- 15) FOHIO, A.: Neue Untersuchungen über Blutgerinnung, Schweiz. Med. Wchnschr., 4, 36, 1923.
- 16) On the constitution of prothrombin, Am. J. Physiol., 146, 212, 1943.
- 17) QUICK, A. J.: Is the action of calcium in the coagulation of blood stoichiometric or catalytic?, Science, 106, 591, 1947.

- 18) AAS, K.: *Prekonvertin og konvertin*. Akademisk Trykningscentral, Oslo 1952.
- 19) AGGELER P.H., WHITE, S.G., GLENDENING M.B., PAGE, E.W., LEAKE, T.B., BATES, G.:
Proc. Soc. Exp. Biol. Med., N.Y. 79, 692, (1952).
- 20) ALEXANDER, B., DE VRIES, A., GOLDSSTEIN, R.: *J. Clin. Invest.* 27, 523, (1948).
- 21) ALEXANDER, B., GOLDSSTEIN, R., LANDWEHR, G., COOK, C.D.: *J. Clin. Invest.* 30, 596,
(1951).
- 22) BIGGS, R., DOUGLAS, A.S., MACFARLANE, R.G.: *J. Physiol.* 122, 554, (1953).
- 23) BORDET J., GENGOU, O.: *Ann. Inst. Pasteur, Paris* 18, 98, (1904).
- 24) DE VRIES, A., ALEXANDER, B., GOLDSSTEIN, R.: *Blood* 4, 247, 739, (1949).
- 25) PANTL, P., HANGS M.: *Nature* 158, 708, (1946).
- 26) FIALA, S.: *Nature* 167, 279, (1951).
- 27) FLYNN, J.E., COOH, R.W.: *Amer. J. Physiol.* 175, 289, (1953).
- 28) HONORATO, R.: *Amer. J. Physiol.* 150, 381, (1947).
- 29) KOLLER, F.: *Blood* 9, 286, (1954).
- 30) KOLLER, F., LOELIGER, A., DUCKERT, F.: *Acta haemat.* 6, 1, (1951).
- 31) KOLLER, F., LOELIGER, A., DUCKERT, F.: *Rev. hémat., Paris* 8, 156, (1952)
- 32) MANN, F.D.: *Amer. J. Clin. Path.* 19, 361, (1949).
- 33) MANN, F.D., HURN, M., BARKER, N.W.: *Amer. J. Clin. Path.* 17, 712, (1947).
- 34) OWEN, C.A., BOLLMAN J.L.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, N.Y. 67, 231, (1948).
- 35) OWREN, P.A.: *Norsk Videnskapsakademi, Aarbok*, p. 21, Dytrud, Oslo (1944).
- 36) OWREN, P.A.: *The Coagulation of Blood*. *Acta med. Scand. Suppl.* 194, (1947a).
- 37) OWREN, P.A.: *Lancet* 252, 446, (1947b).
- 38) OWREN, P.A.: *Bull. Acad. suisse sc. méd.* 5, 163, (1947c).
- 39) OWREN, P.A.: *Proc. 3rd Int. Congr. Haemat.* Cambridge, Inglaterra, 1950. Grune &
Stratten, New York 1951.
- 40) OWREN, P.A.: *Trans. Fifth Conference on Blood Clotting and Allied Problems*.
Josiah Macy Jr. Foundation, New York 1952.
- 41) OWREN, P.A., AAS, K.: *Scand. J. Clin. Laborat. Invest.* 3, 201, (1951).
- 42) PAVLOSKY, A.: *Blood* 2, 165, (1947).
- 43) QUICK, A.J.: *Amer. J. Physiol.* 110, 212, (1943).
- 44) QUICK, A.J.: *Amer. J. Physiol.* 151, 63, (1947).
- 45) QUICK, A.J., EPSTEIN, J.: *J. Appl. Physiol.*, Wash. 4, 840, (1951/52).
- 46) QUICK, A.J., STEFANINI, M.: *J. Laborat. Clin. Med. S. Louis* 34, 1203 (1949).
- 47) RAPAPORT, S.I., AAS, K., OWREN, P.A.: *Scand. J. Clin. Laborat. Invest.* 6, 81 (1954a)
- 48) RAPAPORT, S.I., AAS, K., OWREN, P.A.: *Scand. J. Clin. Laborat. Invest.* 6, 82, (1954b)
- 49) RAPAPORT, S.I., AAS, K., OWREN, P.A.: en prensa (1954c).
- 50) ROSENTHAL, R.L., DRESKIN, O.H., ROSENTHAL, N.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med. N.Y.* 82,
171 (1953).

51) TOCANTINS, L. N.: *Ann. J. Physiol.*, 113, 67, (1945).

52) WARE, A. C., GUEST, H. N., SHERGESS, W. H.: *J. Biol. Chem.*, 169, 231, (1947).



2) FIBRINOGENO - SU NATURALEZA.

El fibrinógeno parece ser una proteína específica, en el sentido de que es la única proteína plasmática que se transforma en fibrina en el proceso de coagulación. Por sus propiedades generales se clasifica dentro de las globulinas.

Debe recordarse que las globulinas representan un grupo de proteínas naturales muy importantes, constituyendo una gran proporción en casi todos los órdenes, tanto en los humores como en los contenidos celulares, vegetales y animales.

Se diferencian principalmente de las albúminas, a las que siempre acompañan por su insolubilidad en agua destilada y su solubilidad cuando la solución acuosa tiene pequeñas cantidades de sales. Este carácter hace que las globulinas precipiten cuando se dializan sus soluciones, y el tenor de sales baja de un cierto límite.

La molécula globulínica media es mucho mayor que la correspondiente de las albúminas, ya que su peso molecular es aproximadamente 210.000 (siete veces el peso molecular medio albuminóideo). Coagulan por el calor como las albúminas y tienen también una constante ^{de} disociación ácida (ka) mayor que la disociación básica (kb) y el punto isoeléctrico está en la zona ácida. En suma, son más ácidas que las albúminas.

El mayor peso molecular de las globulinas indica ya a priori la posibilidad de que precipiten antes de sus soluciones por acción de sales neutras. Así, todas las globulinas precipitan antes de media saturación con sulfato amónico, y antes del 20 % de sulfato de sodio, concentraciones salinas que no precipitan a las albúminas de sus soluciones. La mayor precipitabilidad de las globulinas, puede provenir también de un distinto estado de agregación coloidal.

Las globulinas constituyen un grupo menos homogéneo que las albúminas, puesto que es posible reconocer varios tipos de globulinas. Con las soluciones mencionadas hay distintas zonas de precipitación. Además las globulinas tienen glicocola y mucho menos cistina como diferencia con respecto a las albúminas.

Para aplicar las propiedades citadas al fibrinógeno, deben considerarse sus caracteres y propiedades peculiares. Se trata de la proteína sanguínea más pesada, de más gruesa molécula. El peso molecular es alrededor de 300.000 - 500.000 (Ferry y Morrison, Cohn, Onoley, Strong, Hughes, Armstrong). Pero algunos autores llegan hasta 700.000 (Holmberg).

El punto isoeléctrico del fibrinógeno se halla alrededor de un pH 5,4

Métodos de preparación del fibrinógeno:

La preparación tiene esencialmente dos finalidades: en primer lugar la eliminación de las otras proteínas del plasma especialmente la protrombina; en segundo lugar la obtención de un preparado con las características propias del fibrinógeno fisiológico. La dificultad del procedimiento consiste en la probable insolubilización del fibrinógeno durante las distintas manipulaciones.

Los métodos clásicos propuestos por Hammarsten y Høye, que se basan en la precipitación por el cloruro de sodio y sulfato amónico al quinto de saturación, respectivamente, y el de Mellanby, que se basa en la precipitación ácida del plasma diluido, fueron sustituidos por otros más o menos complicados: el de Quick, de Ferguson y Smith, Warner y Brinkhaus, que se fundan en la eliminación de protrombina adsorbiéndola por hidróxido de aluminio coloidal, y sus precipitaciones alternadas por nuevas diluciones.

Sin embargo ninguno de estos métodos, no obstante modificaciones y perfeccionamientos permiten obtener un preparado seco de fibrinógeno, que se conserve inalterado un tiempo prudencial.

Cohn sugirió en 1941 un método de precipitación por alcohol, que fué usado por el grupo de Seegers en sus investigaciones. Se procede mezclando 4,5 galones (casi 17 litros) de sangre bovina con un litro de anticoagulante (1,85 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,5 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$). Por centrifugación se obtiene el plasma. Al día siguiente se diluyen 8 litros con igual volumen de solución fisiológica, enfriando a 0°C . A esta temperatura se adiciona una solución de alcohol al 21 % en forma de rocío (Spray) finísimo, hasta que la concentración de alcohol llegue a 7 %. El precipitado se recoge a 0° , centrifugando a baja velocidad, para luego lavar tres veces con 1,5 litros de alcohol al 7 % en solución fisiológica fría. El precipitado se disuelve en 1,5 l de solución fisiológica y se conserva a -40° . El porcentaje de proteína coagulada varía del 70 al 98 % según las preparaciones. Seegers y sus colaboradores han usado preparados que contenían el 96 %.

Otros métodos fueron empleados en el campo industrial para obtener preparado de fibrinógeno y de fibrina al estado seco.

Propiedades:

Considerando la molécula del fibrinógeno como un elipsoide de rotación sus dimensiones deberían ser 900 \AA (largo) por 35 \AA (espesor) con una relación axial de 1:30.

Ciertos autores han obtenido valores un poco diferentes; así Holmberg habla

de una relación de 1:50, mientras en base a las medidas de doble refracción viscosidad y presión osmótica Ferry y Morrison dan valores de 35 A° para el espesor y 700 A° para la longitud.

Según Astbury el fibrinógeno pertenece a las proteínas fibrilares constituidas por cadenas de polipéptidos fuertemente asimétricos. Las soluciones de fibrinógeno tienen una doble refracción positiva y una viscosidad muy alta: en solución al 2 % el fibrinógeno tiene la misma viscosidad de la sangre.

La composición química del fibrinógeno según los datos más recientes es la que se transcribe a continuación (Bergren y Nicmann, Brand, Kassel y Saidel) y es casi todo superponible a la de la fibrina.

En el espectrofotómetro el fibrinógeno da una curva diferente de la trombina. El contenido en triptofano, en base a estos datos, es mayor que en la trombina (Loeffler, Wunderly, Hurman, 1949).

Seegers y colaboradores han preparado soluciones de fibrinógeno constituidas por dos componentes: uno llamado alfa fibrinógeno, tiene propiedades análogas al fibrinógeno común. El otro, beta fibrinógeno existe en menor cantidad, siendo su punto isoelectrico pH 4,2 no es termo-coagulable, es soluble en sulfato amónico, y puede ser obtenido solo purificado en forma parcial.

Si una muestra de fibrinógeno es coagulada con trombina purificada se produce la descomposición de la fibrina en forma análoga a la del fibrinógeno: el coágulo de fibrina pierde su estructura y se solubiliza descomponiéndose en dos constituyentes siendo estos últimos iguales, tanto para la fibrina como para el fibrinógeno.

Métodos ópticos de estudio:

El fibrinógeno y su transformación en fibrina se manifiesta esencialmente por el pasaje del fibrinógeno del estado de sol al estado de gel, y además por la importancia de las manifestaciones de orden morfológico. El aspecto más grosero de estos fenómenos se presenta con la formación y la retracción del coágulo, pero los detalles más sutiles se aprecian solamente con técnicas especializadas y perfeccionadas necesarias para obtener más de los que puede la microscopía común. La ultra microscopía, la reongenespectrografía, la microscopía electrónica y la luz polarizada son capaces de proporcionar documentaciones morfológicas sobre la estructura fina y el comportamiento de la fibrina, en particulares condiciones experimentales.

Se han observado distintas imágenes de esta sustancia de acuerdo al método empleado, individualizándose las fibras con los métodos ópticos comunes, especialmente en campos oscuros, las micelas en el microscopio electrónico, los -

COMPOSICION QUIMICA DEL FIBRINOGENO

(Bergmann y Niemann, Brand Kassell y Saidel)

	Fibrinógeno	Fibrina
Azufre protóico total	1,26 %	1,23 %
Arginina	7,9 "	7,9 "
Histilina	2,8 "	2,8 "
Triptofano	3,29 "	3,22 "
Tirosina	5,75 "	5,75 "
Treonina	6,6 "	6,5 "
Leucina	7,1 "	7,1 "

Composicion del fibrinógeno según Block y Bolling (1944)

Arginina	6,8 ± 0,6	%
Histilina	2,3 ± 0,2	"
Lisina	7,5	"
Tirosina	5,1 ± 0,7	"
Triptofano	3,4 ± 0,4	"
Fenil alanina	7	"
Cistina	1,9 ± 0,4	"
Metionina	2,2	"
Treonina	7,8	"
Leucina	14,3 ± 3,9	"
Isoleucina	5,0 ± 0,5	"
Valina	3,9 ± 1,8	"
Ac. glutámico	13,8 ± 0,1	"
Ac. aspártico	11,9 ± 0,1	"
Glicina	5,4 ± 0,1	"

constituyentes moleculares con otros procedimientos indirectos.

Ultramicroscopio:

Algunas tentativas hechas por varios autores con el microscopio común - (Richardson 1858, Schirmelbusch 1885 y posteriormente Stübel) hicieron considerar ya a la coagulación como una verdadera cristalización. Según Stübel, los cristales tendrían extremidades despuntadas y estarían dotados de movimientos browniano. Dieselhorst y Freundlich, habiendo observado depósitos granulares amorfos anisótopos, se opusieron a este concepto, y así también Mayer y Cosana, quienes por medio de la iluminación de un campo oscuro, describieron elementos que juntándose, daban lugar a filamentos y luego a una estructura densa reticular. Los investigadores posteriores (Benke, Barrat, Nekina, Meyer, Kitamura, Margold, etc.) se sirvieron al respecto del ultramicroscopio.

Con esta técnica trabajaron luego Ewke y Krüchel, llegando a poner de manifiesto figuraciones cristalinas en forma de estrella, y depósitos granulares durante el desarrollo de la coagulación, aún en ausencia de trombocitos. Ambos aspectos distintos corresponderían a pruebas de coagulación llevadas a cabo por inhibición, en un caso débil y en el otro fuerte, del proceso con diferentes anticoagulantes.

Los investigadores admitieron que se trataba de una cristalización por polimerización, y que las formas granulares también podrían posteriormente cristalizarse en agujas.

El principal descubrimiento microscópico y ultramicroscópico, es de acuerdo con Aritz, la fibra elemental que se aprecia formada siempre por un fino filamento de fibrina, distendido y formando parte de una red de mallas angostas. En ciertas y determinadas condiciones esta puede presentarse en trabéculas gruesas, como en la sangre de cadáveres, o en forma de trabéculas más cortas similares, en el examen in vitro, y bajo el cubreobjeto, a cristales, o más raramente en los cortes microtómicos de órganos alterados.

Microscopio electrónico:

Con su empleo se lograron notables progresos en el estudio morfológico de la fibrina. Prácticamente se distinguen solo micelas o agregados micelares, que están entre la fibra elemental y la molécula.

Volpera y Huska de acuerdo a su trabajo admiten que la fibra elemental posee una estructura a base de elementos dispuestos en forma paralela y longitudinalmente.

Las formaciones homogéneas sutiles, visibles con aumento mediano y fuerte,

son consideradas como micelas de fibrina, cuyo ancho de 20 a 100 μ , es extraordinariamente uniforme. No se observarían en ningún caso, ramificaciones o divisiones en estas micelas. La fibrina resultaría por lo tanto, constituida por una red de micelas filiformes, un "Micellengerüst", en el sentido de Frey Wyssling; solamente una parte de las micelas muy largas se dispondría en haces o fibras paralelas, de modo que pueden ser reconocidas también con los métodos ópticos comunes. De tal forma los elementos constitutivos de las fibras no serían esencialmente las micelas, sino que las fibras representarían porciones aisladas de micelas dispuestas paralelamente en la red micelar o campo del Micellengerüst.

Debe hacerse constar que los estudios con microscopio electrónico soportan el prejuicio de orden técnico que significa exponer el coágulo de fibrina a la deshidratación en el vacío, con las posibilidades consiguientes de modificaciones estructurales.

Otros estudios fueron realizados por Hamn y Porter. Estos investigadores utilizaron trombina y fibrinógeno purificado, mientras que los autores antes mencionados emplearon plasma. Sin embargo el coágulo observado electrónicamente, no es en forma sustancial diferente, pero han confirmado la hipótesis de Ferry y Morrison de que el coágulo fino está constituido por una red de cadenas formadas por moléculas de fibrinógeno unidas de extremo a extremo, cruzadas en parte con ligaduras químicas primarias, y de que el coágulo grueso resultaría de una red de haces de estas cadenas, cruzadas ampliamente con ligaduras secundarias y con asociaciones laterales.

La sinéresis, del coágulo se puede explicar en parte por la tendencia a formar fibras complejas, fenómeno observable sobre todo en zona de pH ácido.

De acuerdo con Hall al estudiar muestras de fibrinógeno, tanto humano como bovino con el microscopio electrónico, se aprecia que dichas muestras se hallan constituidas en gran parte por elementos filamentosos con una longitud media de 600 Å y su ancho medio de alrededor de 30 a 40 Å . Con el máximo poder de resolución obtenible los filamentos de fibrinógenos aparecen como cintas, asemejándose en su aspecto a las sartas de un rosario.

Según el mismo autor, el macro período en las fibrillas de fibrina obtenidas de la fracción bovina 1, consiste en una estrecha banda colorable, ubicada entre dos mas densas y anchas, con distancias de 10 a 100 Å de largo; el eje de la fibrilla es de casi 200 Å y en la fibrina humana esta distancia es de aproximadamente 215 Å .

Hall concluye que la fibrina está producida por una asociación predominante-

mente lateral de filamentos de fibrinógeno. A su vez interpreta la estructura axial característica como consecuencia de variaciones periódicas de concentraciones proteicas, efectos de mutaciones localmente ocurridas, de materiales colocados en posiciones preferidas, en un estado adelantado de las fibras. A pesar de todo no se logró encontrar una relación razonable entre el largo de los filamentos de fibrinógeno y las dimensiones del macro periodo de la fibrina.

Las fases de transformación del fibrinógeno en fibrina bajo la acción de la trombina fueron mejor conocidas gracias al trabajo de Porter y Maxam 1949. Empleando siempre sustancias purificadas, observaron por medio del microscopio electrónico, que en un principio de las moléculas de fibrinógeno polimerizadas, se forman protofibrillas en agujas, parecidas a cristales, que luego se unen para originar así haces de fibrina.

Identidad química entre fibrinógeno y fibrina:

Numerosas investigaciones tuvieron por finalidad resolver este problema. Los estudios de Wöhlisch, Vonk, Klinke y Ballowitz habían llegado ya a la conclusión de que el fibrinógeno y la fibrina son dos sustancias químicas diferentes.

Luego otras investigaciones han podido establecer que existe un parecido mucho más marcado entre la fibrina que se obtiene por acción de trombina sobre el fibrinógeno y por desnaturalización al calor de este último; sin embargo - debe excluirse según Wöhlisch una completa identidad de ambas fibrinas especialmente en base a la solubilidad muy diferente de ambas sustancias (Klinker y Ballowitz). Estudios más recientes parecen establecer que en lo fundamental no hay diferencias químicas muy notables entre fibrinógeno y fibrina y que la formación de la estructura sólida no implica cambios profundos en la constitución del fibrinógeno (Bailey, Astbury y Rudali, 1943)

Además los productos de la digestión parcial, tanto de la fibrina como del fibrinógeno por parte de enzimas proteolíticas parecen ser idénticos en sus características de solubilidad, movilidad electroforética de sedimentación.

No se trata por consiguiente de alteraciones químicas como las que se producen en la desnaturalización de las proteínas globulares.

El fibrinógeno y la eritrosedimentación:

La velocidad de sedimentación de los glóbulos rojos se modifica con la presencia del fibrinógeno. Esta proteína plasmática tiene una acción acentuadamente acelerante. Así, la sedimentación de los hematíes es deficiente en el suero, pero se efectúa muy bien en el plasma. Tan importante parece ser la presencia del fibrinógeno, que en el caso del suero, aún la centrifuga separa

con dificultad los hematíes.

Hober, Fahraus, Katz y Leffkowitz, y numerosos otros autores establecen como causa de la inestabilidad globular, el aumento proporcional en el plasma de sus proteínas. Especialmente dan importancia a las variaciones que sufren sus valores en la sangre, y a la modificación del contenido en fibrinógeno, globulina y albúmina. Tal número de trabajos se realizaron y tanta importancia se dió a los estudios orientados en este sentido para tratar de establecer las causas de la eritrosedimentación, que autores como Westergaard, Widstrom y Theorell llegaron a establecer una fórmula automática para determinar las cifras de la eritrosedimentación, después de una hora, usando los valores porcentuales de las fracciones protéicas del plasma.

$$\text{E.S. en la 1}^{\text{a}} \text{ hora} = \underline{110.4} \times \text{fibrina \%} + \underline{6.22} \times \text{globulina \%} - \underline{6.09} \times \text{albúmina \%} - \underline{21.5}$$

Los valores subrayados son constantes. En esta fórmula, una de las expresiones más sencillas que fueron aplicadas al estudio de la eritrosedimentación, se aprecia la influencia fundamental del fibrinógeno.

Otros investigadores efectuaron experimentaciones en plasmas artificiales, empleando eritrocitos de una misma muestra de sangre, suspendidos en soluciones de fibrinógeno, globulina y albúmina. Con los dos primeros tubos se observó una mayor velocidad de caída de los eritrocitos.

Si experimentalmente se defibrina la sangre, se observa que hay un retardo en la velocidad de la eritrosedimentación. Por lo general aunque menos interesante se observa al eliminar las globulinas del plasma, o haciendo la experiencia contraria, o sea que, por añadido artificial de fibrinógeno o globulinas al plasma, se observa que la eritrosedimentación, se acelera.

Los glóbulos rojos por tener cargas de igual signo, mantienen entre ellos una fuerza de repulsión. Mientras que siendo esta carga de signo contrario con respecto a los elementos plasmáticos, se produce con estos una fuerza de atracción. Esta fuerza se establece entre los eritrocitos por un lado, y fibrinógeno, globulinas y albúmina por el otro, y con intensidad decreciente en el orden indicado. El equilibrio de estas cargas actuantes crea una fuerza de estabilidad, si así se permite llamar a la que determina la suspensión de los eritrocitos en el plasma. Fahraus observó que son inversamente proporcionales, el valor de la carga eléctrica de los eritrocitos y la velocidad de la eritrosedimentación.

En los estudios realizados en casos patológicos se observa la coincidencia de los aumentos en fibrinógeno o globulinas de la sangre, o ambos a la vez, con respecto a los incrementos en la eritrosedimentación.

Formación y variaciones del contenido en fibrinógeno:

Se han hallado variaciones de la fibrinogenemia, no solo en aquellos casos patológicos en los cuales está en juego una diatesis hemorrágica, sino también en muchos otros estados fisiopatológicos espontáneos y experimentales.

Sobre la génesis del fibrinógeno aún no se ha llegado a un acuerdo definitivo. Después de demolida la teoría de Mathews del año 1,899, sobre la génesis intestinal se observaron dos corrientes distintas de opinión, o sea, una seguida por Holf, Corin y Ansiaux y colaboradores, retomada por Whipple, Fawcitt, Mann y Magath, etc., que sostenía la génesis hepática, y otras que atribuya mayor importancia a la médula ósea (Muller, Morawitz, etc.)

La investigación experimental ha dado razón en parte a unos y otros; las graves lesiones hepáticas halladas en la intoxicación por P_2CHCl_3 , C_6H_6 , se acompañan de la desaparición casi completa del fibrinógeno hemático, y por otra parte, ciertas hepatopatías graves presentan esta misma característica. Pero se ha observado (Jurgens), que en estas últimas condiciones, la fibrinólisis hepática puede ser tan intensa como para enmascarar los resultados analíticos; esto sería válido hasta cierto punto para ciertos experimentos de intoxicación.

La extirpación del hígado no conduciría por otra parte, (Jurgens y Gebhardt) a una hipofibrinogenemia definitiva, dado que en ciertas circunstancias (inyección de sustancias pirogénicas), se puede volver a obtener valores normales e hipernormales.

Lo mismo se puede decir de los perros operados con fistula de Bok.

Se ha observado por lo demás, por muchos autores, entre los cuales está Bolli, que la tasa de fibrinógeno es superior en la sangre medular que en la periférica.

También la irradiación de la médula ósea en dosis estimulantes, puede conducir a una hiperfibrinogenemia y a una hiperglobulinemia (Veronesi). Por otra parte la inhibición de la médula ósea observable desde el punto de vista morfológico, que se obtiene con inyecciones endovenosas de lípidos espiénicos (Guarnaschelli, Raggio y Gastano) no origina variaciones correspondientes de las fracciones protéicas del plasma. Se ha sostenido además una génesis retículo-endotelial, por parte de varios autores (Campellione, Hed y Dehr, Lenzler, Pauliczky, etc.) en base a los resultados obtenidos con inyecciones de colorantes vitales y otras sustancias estimulantes del sistema reticuloendotelial (Thorotrast, Cu coloidal, tinta china, etc.)

Sobre las variaciones del fibrinógeno hemático en la clínica, se poseen desde hace tiempo muchos datos. A veces el fibrinógeno puede estar aumentado; se

ha visto así que en enfermedades infecciosas como neumonía, poliartritis reumática, escarlatina, se observa paralelamente a la leucocitosis, una marcada hiperinosis. En los estados post-hemorrágicos se tiene también un aumento de fibrinógeno, concomitante con la regeneración de los elementos figurados. Se ha hallado hiperinosis por Benhold, Magnus-Levi en el mieloma múltiple; por Lian Sasser, Facquet y Frumusan en la xerosis lipóidea, de manera constante.

Numerosas hemopatías estarían acompañadas por variaciones de fibrinógeno, en el sentido de que las que estimulan la hematopoyesis conducen a una hiperinosis, y viceversa. En numerosas condiciones fisiológicas se observan también desplazamiento de la tasa normal de fibrinógeno; y así es como en la fuerte sudoración y en la retención calórica prolongada se observa un leve aumento del fibrinógeno (Jurgens) y de la misma manera en la gravidez y en la alimentación eminentemente proteica.

Con respecto a las condiciones en que el fibrinógeno se halla disminuido, de acuerdo con las premisas teóricas de la génesis hepática, se ha hallado una hipoinosis por muchos autores en numerosas hepatopatías; tal en casos de cirrosis, atrofia amarilla aguda, tuberculosis hepática, etc. (Mc Lester, Opitz, Gram, Ham y Curtis, Lowenstein, etc.)

Inclusive algunos autores han propuesto considerar el dosaje de fibrinógeno como una prueba funcional hepática; Veronesi llegó a las mismas conclusiones, acentuando el significado diagnóstico de la hipoinosis en la cirrosis hepática y en la ictericia catarral, mientras que en la ictericia por estasis, en el hígado de estasis cardíaco, en los neoplasmas de hígado, el fibrinógeno está generalmente normal o aumentado.

Influencia de ciertos reactivos:

La coagulación del fibrinógeno por trombina es notablemente demorada por la presencia de ciertos reactivos. Uno de ellos, hexametileno glicol, ha sido motivo de numerosas investigaciones. Estadísticas de viscosidad y sedimentación por ultracentrifugación, han revelado el hecho de que mezclas de fibrinógeno y trombina en presencia de hexametileno glicol, si bien se mantienen fluidas, han sufrido una polimerización, dando lugar a la formación de un discreto polímero intermediario. Después de varios días, una vez completada la conversión queda una mezcla de polímeros y monómeros, siendo cada uno de estos últimos, del mismo tamaño y condición que el fibrinógeno.

Observaciones con luz birrefringente, indican que el polímero citado, es un tanto polidisperso, siendo su longitud media de 4,000 A°.

Resultados similares han sido obtenidos por Scheraga y Backus. Más recientemente estudios con luz dispersa, señalan para el polímero una sección cuadrada

con un área doble respecto de la similar del fibrinógeno, siendo a su vez su longitud 7 u 8 veces la de una unidad de fibrinógeno.

También ha sido demostrado, que ocurre una completa disociación de estos polímeros si la mezcla es diluida hasta una pequeña concentración de proteínas, y una composición constante de solvente. La disociación comienza en el momento de la dilución y progresa hasta dos horas después, tiempo en el cual, el polímero es totalmente convertido en formas monoméricas con peso molecular y dimensiones correspondientes al fibrinógeno.

Estas conclusiones han sido ahora confirmadas por medio de observaciones directas en microscopio electrónico.

BIBLIOGRAFIA

- 1) FERRY, J. D., MORRISON, P. R.: J. Clin. Investigation 23, 5666, (1944)
J. Am. Chem. Soc. 69, 409, (1947)
- 2) COHN, E. J., ONCLEY, J. L., STRONG, L. E., HUGHES, H. L., ARSTFONG, S. H.: J. Clin. Investigation 23, 417 (1944).
- 3) HAMMARSTEN, O.: Pflügers arch. J. d. ges. Physiol. 19, 563 (1879).
Ztschr. J. physiol. chem. 22, 331 (1896).
" " " 28, 98 (1899)
- 4) REYE: Inaug. dissert., Strassburg (1898)
- 5) COHN, E. J.: Chem. rev. 28, 394 (1941)
- 6) HOWELL, W. H.: Am. J. Physiol. 26, 153 (1910)
" " 35, 143 (1914)
" " 40, 526 (1916)
- 7) WURHMAN, F., y WUNDERLY, Ch.: Die Eiweiskörper des blutplasmas, Schwabe (1947)
- 8) HOLMBERG, C. J.: Ztschr. f. physiol. chem. 280, 11 (1944)
Ark. kem. Mineral. geol., 17, (1944)
- 9) BOHM, G., SIEBER, R.: Klin. Wochenschr 11, 599 (1932)
- 10) BERGMANN, M., NIEMANN, G.: Science 86, 157 (1937)
J. Biol. Chem. 115, 77 (1936)
" " " 118, 301 (1937)
- 11) BRAND, E., KASSELL, B., SAIDEL, K. J.: J. biol. chem. 125, 115, 145 (1938)
" " " 145, 365 (1942)
- 12) LOEFFLER, W., WUNDERLY, Ch., WURHMAN, F.: Schweizer. med. wochenschr 79, 595 (1949)
- 13) WERNEBERGER, E., SHAPIRO, B., FODOR, SALOMOWICZ, I.: Brit. J. Exper. Path. 25, 121
(1944)
- 14) STEIN, L., WERNEBERGER, E.: Nature (London) 149, 528 (1942)
- 15) ELSBCKE, U., KNÜCHELL, H.: Pflügers Arch., J. d. ges. Physiol 243, 54, 65 (1939)
- 16) APTZ, K.: Ztschr. f. d. ges. expert. Med. 101, 552 (1937)
" " " " 102, 202 (1937)
" " " " 105, 89 (1939)
- 17) WOLBERS, C., NUSKA, H.: Klin. Wochenschr 18, 1077 (1939)
- 18) HATH, C. V. Z., PORNER, K. R. J.: J. Expert. Med. 86, 285 (1947)
- 19) HALL, C. E.: J. Biol. Chem. 179, 85 (1949)
- 20) PORNER, K. P., HATH, C. V. Z.: Proc. soc. expert. biol. & Med., 65, 39 (1947)
J. Expert. Med. 90, 225 (1949)
- 21) KATZ, I. R., DE ROOY, A.: Naturwissenschaften 21, 559 (1933)

22) KLINKE, K., BALLOWITZ, K.: Ztschr J. d. ges. Expt. Med. 77, 717 (1931)

23) BAILEY, K., ASTBURY, W. T., RIDALL, K. M.: Nature (London) 1951, 716 (1943)

3) FIBRINOGENIO - METODOS DE DETERMINACION

El aislamiento del fibrinógeno se efectúa pocas veces en la determinación de proteínas plasmáticas. Aquello que se dosa generalmente es la forma polimerizada de esta proteína, o sea su transformación en fibrina por acción de las sales de calcio. Para evaluar directamente el fibrinógeno, es necesario proceder a un fraccionamiento del plasma con diversas sales; por ejemplo con sulfito sódico al 12,5 %, tal como lo indican Campbell y Hanna (1927), teniendo en cuenta que, según ya se mencionó, esta globulina es la que precipita menor concentración salina.

Los métodos que valoran el fibrinógeno al estado de fibrina, están basados en la propiedad que presentan las sales de calcio de producir en vitro, dicha transformación. Cullen y Van Slyke (1920) utilizan para este fin, la acción del cloruro de calcio sobre plasma oxalatado y diluido con solución fisiológica. Posteriormente Green (1921) desarrolló un método aplicable a la valoración de fibrina en sangre citratada.

La mayor parte de los métodos posteriores están basados en la primitiva técnica de Cullen y Van Slyke, variando únicamente en el proceso de valoración de la misma, que en el método original se efectúa por microkjeldahl.

El método de Campbell y Hanna, después de precipitar el fibrinógeno por medio de una solución de sulfito de sodio al 12,5 %, procede a la destrucción del coágulo con ácido sulfúrico, para valorar finalmente el amoníaco por nesslerización.

También puede valorarse el fibrinógeno precipitándole al estado de fibrina, para determinarlo luego por gravimetría. Tales son las técnicas de Foster y Whipple, y la modificación de Chledín y Hug (1938). Estos últimos provocan la coagulación del fibrinógeno en el plasma citratado mediante una solución salina, que contiene 0,8 g. de $CaCl_2$ y 0,125 g. de $CaCl_2$ por ciento. En un vaso de precipitación, se mezclan 5 ml. de plasma con 100 ml. de solución salina. Tras un reposo de dos o tres horas sepárase el coágulo, y luego del correspondiente lavado y secado, se procede a pesarlo en balanza de precisión.

Fu y Ling han propuesto determinar por colorimetría, el contenido de tirosina en el coágulo de fibrina.

Hylone, Wintewit y Suto-Nagy precipitan el fibrinógeno por protamina, en el plasma oxalatado, para determinar luego el nitrógeno del precipitado por microkjeldahl. Este método no es afectado por el tipo de anticoagulante usado, y los valores obtenidos con el mismo son algo más altos que los resultantes de

métodos más antiguos.

En el presente trabajo hemos aplicado la reacción del biuret para su evaluación. Por lo tanto hemos de considerar la aplicabilidad de dicha reacción para determinaciones de proteínas sanguíneas.

BIBLIOGRAFIA

- 1) CULLEN, G. E. I. Van SLYKE, D. D.: J. Biol. Chem. 41, 587, 1920.
- 2) GRAM, H. G.: J. Biol. Chem. 49, 279, 1921.
- 3) CAMPBELL, W. M. y HANNA, M. I.: J. Biol. Chem. 119, 9, 1937.
- 4) FOSTER, S. y WHIPPLE, G. H.: Am. J. Physiol. 58, 365, 1922.
- 5) CHIODINI, L. A. y HUG, E.: Rev. Sec. Arg. Biol. 14, 357, 1938.
- 6) WU, H. y LING, S. M.: Chinese J. Physiol. 1, 161, 1929.
- 7) MOGLIA, J., VILALLONGAZP. y MARENZI, A. D.: Pub. Cent. Invest. Tisiol. 9,
133, 1945.

4) LA REACCION DEL BIURET APLICADA A DETERMINACION DE PROTEINAS
CONDICIONES GENERALES Y FACTORES INFLUYENTES

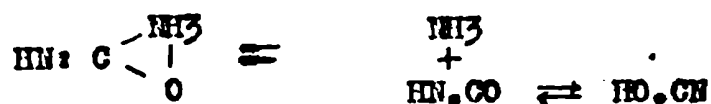
En 1948 Wiedeman aisló biuret $C_2H_5N_3O_2$ como producto de calentar urea a 150-170°. Propuso este nombre porque creyó que la nueva sustancia provenía de la unión de dos moléculas de urea con pérdida de una de amoníaco.

Años después, con el advenimiento de la carbamida, la fórmula del biuret resultó fácilmente explicable así:



También se sugirió que la reacción entre biuret y urea con pérdida de dos moléculas de amoníaco, fuera el origen del ácido cianúrico que se forma por acción del calor sobre la urea.

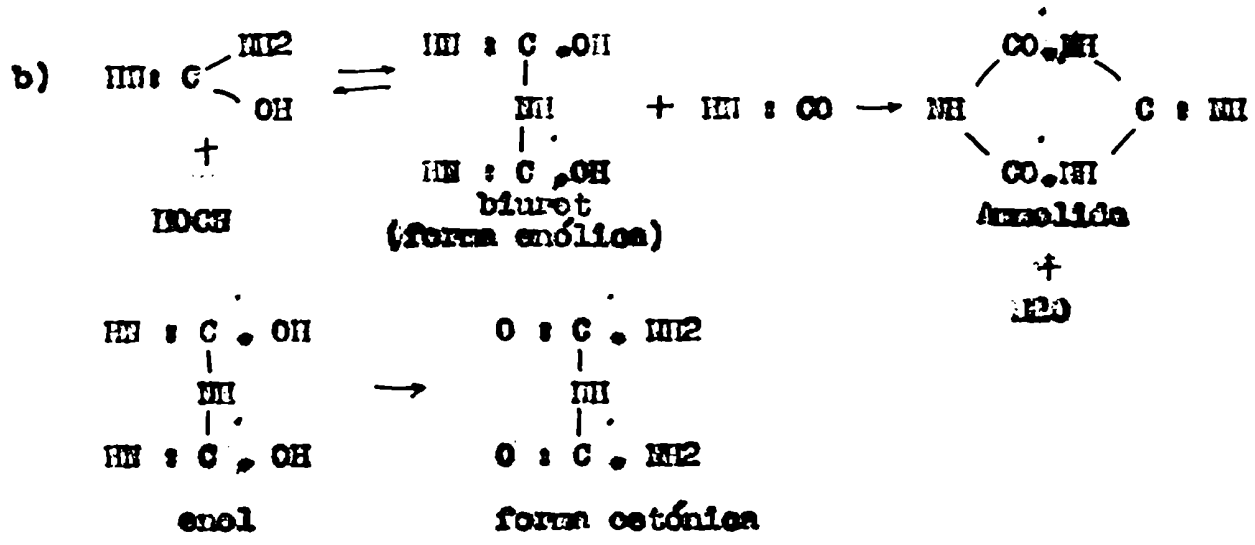
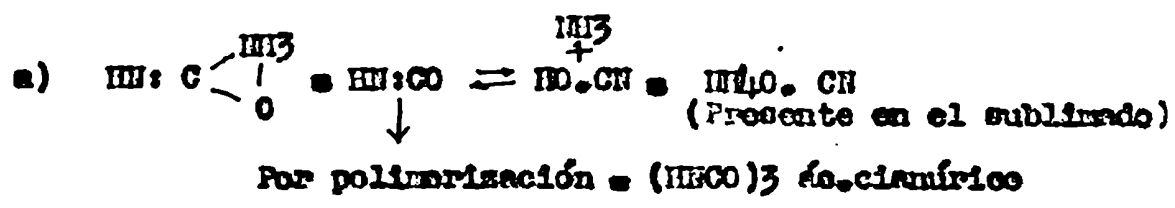
Pero en realidad, la primera acción del calor sobre la urea es producir su disociación en los dos componentes a partir de los cuales se forma, o sea amoníaco y ácido cianúrico. Esta descomposición se apreció más claramente a partir de la fórmula cíclica de la urea propuesta por Werner



La inestabilidad y reactividad del ácido cianúrico son responsables de los productos que forman posteriormente.

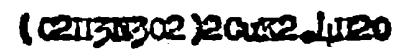
El biuret proviene de la interacción entre ácido cianúrico y urea, siendo la reacción reversible según lo ha demostrado Werner, por encima de 192° punto de fusión del biuret.

En suma, el mecanismo de la serie de cambios que ocurren por la progresiva acción del calor sobre la urea, puede ser ilustrado por el siguiente esquema, en el cual se observa que el fenómeno de la disociación así como la inestabilidad y facilidad de reacción del ácido cianúrico son los agentes activos en este proceso.



El biuret se caracteriza porque da en solución alcalina con las sales de cobre una coloración violeta intensa que se atribuye a la formación de una sal compleja de cobre. Schiff (1896) afirma que el compuesto coloreado responsable de la prueba tiene la siguiente composición $\text{Cu}(\text{OH})_2 \cdot 2\text{KOH} \cdot 2\text{C}_2\text{H}_5\text{N}_3\text{O}_2$, observándose que la molécula del biuret permanece intacta.

Werner considera más correcta la siguiente expresión:



Puesto que el agua de cristalización es expulsada a 110° sin mayor cambio en el color y sin descomposición del compuesto, la sal anhidra disuelta en agua produce un color característico.

Este fenómeno conocido con el nombre de reacción del biuret es propio también de aquellas sustancias que poseen más de dos grupos amido- CONH_2 , o grupos de constitución parecida en su molécula. Las proteínas también dan esta reacción pero en ella y debido a la complejidad de la molécula proteica intervienen otros factores.

Influye fundamentalmente la existencia en dichas moléculas proteicas de la unión peptídica. También depende de la presencia de uno o más de los grupos siguientes: $-\text{CO}\text{NH}_2$ con otro $-\text{CO}\text{NH}_2$, o en lugar del anterior, uno de los grupos CSNH_2 , $-\text{C}(\text{NH})\text{NH}_2$, CH_2NH_2 , $-\text{C}(\text{NH})\text{NH}_2$, $-\text{CHOHCH}_2\text{NH}_2$, $-\text{C}(\text{NH}_2)\text{CH}_2\text{OH}$, $-\text{C}(\text{NH}_2)\text{CHOH}$.

Kuntzel y Dioscher (1940) indican que la coloración obtenida tiene dos componentes: uno rojo, por la presencia de una o más uniones peptídicas, mientras que junto a éste existe un componente azul, que resulta de la formación de complejos entre los iones Cu y los grupos amino libres de la proteína. Riegler aplicó ya en 1914 esta reacción para valorar proteínas en orinas, utilizando como testigo suero humano desecado.

Autenrieth y Hink (1915) y luego Autenrieth lo aplicaron a proteínas del suero, orina, líquido cefalorraquídeo y líquidos ascíticos. El testigo de comparación se preparaba con suero humano diluido con orina. El inconveniente del método radicaba en la precaria duración de las soluciones testigo.

Hiller (1927) y en el mismo año Hiller, McIntosh y Van Slyke, observando las dificultades que presentaba el uso de testigos corrientes hasta aquel entonces, indicaron el uso de soluciones de biuret puro, no logrando empero resultado satisfactorio. La dificultad en la conservación de sueros testigos se fué solucionando poco a poco. En 1935 Fine publicó un procedimiento por el cual prepara una solución standard protéica, por dilución de suero con CINA al 9 e/oo, hasta una concentración protéica aproximadamente de 0,24 %. Esta concentración se determina por Kjeldahl. Este testigo puede ser guardado por varios meses en presencia de cloroformo.

Finalmente los estudios de Siger (1937) y de Robinson y Hodgson (1940) permitieron establecer, mediante el empleo del espectroscopio, las características exactas de la coloración desarrollada. Estos últimos autores comunicaron haber utilizado satisfactoriamente testigos protéicos preparados por dilución, en sus determinaciones de proteínas séricas por el método del biuret.

Las diluciones con suero de conejo son mejores que las de perro u hombre, porque las soluciones pueden guardarse por más tiempo. Soluciones de suero de conejo conservadas con un cristal de timol dan después de seis meses, los mismos resultados que en el momento de su preparación.

La reacción del biuret para determinaciones de las proteínas sanguíneas, tiene ciertas ventajas sobre otros procedimientos colorimétricos. La intensidad de color desarrollado por el reactivo fenólico de Folin es distinto para albúminas y globulinas (Greenberg y Miró Lugoba, Minet y Keller, 1926) Autenrieth (1917) notó que la albúmina y globulinas dan en la reacción del biuret iguales intensidades de color para iguales concentraciones protéicas.

Los resultados de Fine (1935) sugieren sin embargo que no se cumple exactamente tal reacción. Cuando se usa un patrón de globulina para determinar albúmina, el resultado tiende a ser bajo y si a la inversa se determinan globulinas comparando con testigos de albúminas los datos tienden a ser altos. Se deduce que la intensidad del color generado por globulinas en la reacción del biuret es algo mayor que la correspondiente a albúmina. Las diferencias están prácticamente dentro de los errores admisibles, de modo que se recomienda el uso de suero diluido como standard para determinar albúmina.

Lieben y Jesserer obtuvieron conclusiones importantes respecto a esta reacción. De tales trabajos se deduce que en condiciones adecuadas la intensidad

del color con la reacción del biuret, es igual, en mezclas de una variedad de proteínas y derivados protéicos para igual concentración en las soluciones, independientemente del peso molecular y los aminoácidos contenidos.

Por otra parte el trabajo de Sieger (1937), que han determinado el espectro de transmisión de las soluciones luego de haberse efectuado la reacción del biuret indica que el porcentaje de transmisión para una longitud de onda determinada varía con la naturaleza y la concentración de las respectivas proteínas. Trabajos posteriores de laboratorio demostraron que a una longitud de onda de 560 m μ , la densidad óptica de soluciones protéicas coloreadas por la antedicha reacción, es esencialmente la misma (por unidad de peso protéico), para proteínas totales, albúmina en suero y proteínas existentes en orinas patológicas y líquidos ascíticos. También se comprobó la correspondencia entre densidades ópticas de soluciones protéicas coloreadas, obtenidas a partir de sangre humana, de perro y de conejo. En el método que emplea el reactivo de fenoles de Folin, es distinto el factor aplicable a sangre de perro y humana. Greenberg (1929) afirma que el color desarrollado por el reactivo fenólico depende de la edad del suero, y el color obtenido decrece con el tiempo de estacionamiento de dicho suero. Robinson y Hogden no han observado ningún decrecimiento similar en la reacción del biuret. Estos autores han efectuado un estudio sobre esta reacción para determinar las condiciones óptimas. Por lo tanto realizaron investigaciones sobre la estabilidad del color en la reacción del biuret, la reproducibilidad de ese color para una concentración protéica dada, la mejor concentración de álcali y la más exacta cantidad y concentración de sulfato cúprico que deben agregarse.

En un sistema en el cual, las proteínas se precipitan para luego ser solubilizadas existe siempre el riesgo de que una parte de ese precipitado no pase a integrar la solución. Cuando el color del biuret se desarrolla en una solución desconocida y un standard de aproximada concentración protéica, en iguales intervalos de tiempo, la cantidad que resta soluble en ambos casos, es probablemente la misma, no introduciendo error.

Con la aplicación del fotocolorímetro y espectrofotómetro para medir las intensidades de color, puede eliminarse la preparación de la solución testigo en cada determinación. Para tales casos es importante siempre que las condiciones bajo las cuales el color se desarrolla para cada muestra individual sean las mismas que las usadas para determinar la curva standard del aparato. Sobre todo teniendo en cuenta, que dicha curva puede haber sido preparada con mucho tiempo de antelación.

Para determinar si se habían producido algunas pérdidas de proteínas se determinó el nitrógeno protéico directamente sobre las soluciones coloreadas por el biuret, y se compararon los valores con aquellos obtenidos por dilución -

de soluciones proteicas a las cuales no se les agregó cobre. A continuación⁵⁵ las principales conclusiones a que arribaron Robinson y Hogden en su estudio sobre la reacción del biuret aplicada a determinación de proteína.

Medida de la intensidad de color:

Un estudio del espectro de absorción de las soluciones coloreadas de biuret a partir de seroproteína revela una banda de absorción máxima entre las longitudes de onda correspondientes a 550-560 m μ . Prepararon una curva con soluciones coloreadas obtenidas a partir de suero de conejo. La curva no es similar en su forma con la obtenida por Siger, pero coinciden los máximos, así como en los trabajos de Lieben y Jessorer que usaron soluciones coloreadas de biuret a partir de ovoalbúmina y edestina.

La región de máxima absorción es la mejor para estudios cuantitativos, respecto a las proporciones entre la intensidad de color originado en la reacción del biuret y la concentración y relaciones de las seroproteínas. Es esencial para una buena medida fotoeléctrica, obtener soluciones de suficiente limpieza o claridad óptica. Por lo tanto deben buscarse las condiciones necesarias para la obtención de soluciones que presenten dichos requisitos.

Pronto se comprobó que se obtienen soluciones límpidas por disolución con álcali de proteínas previamente precipitadas por tricloroacético. En cambio a partir de suero directamente, la solución coloreada presentó una opalescencia definida, y la medida de densidades ópticas muestra que las intensidades de color cambian durante períodos que van de media hora a tres horas después de producido el color.

Para un valor seguro de la intensidad de color se determinó la densidad óptica, en el trabajo de Robinson y Hogden, a una longitud de onda de 560 m μ , empleando un espectrofotómetro universal Bausch y Lomb.

Preparación de soluciones coloreadas límpidas, mediante la reacción del biuret

Los autores ya mencionados en su estudio sobre la reacción del biuret, efectuaron una dilución del suero al 1/25 con ClNa al 0,9 %. Luego colocaron 25 ml de este suero diluido en un tubo de centrífuga de 50 ml, para adicionar luego 25 ml de tricloroacético al 10 %, agitando y homogeneizando con varilla de vidrio. La mezcla se centrifuga hasta que el precipitado esté bien sedimentado y el líquido sobrenadante sea límpido (15 minutos a 3.600 r.p.m.) Se invierte sobre papel de filtro. El precipitado protéico sin lavar, se disuelve en pocos centímetros de H₂O al 3 %. La disolución se facilita por una previa adición de varias gotas de álcali, hasta formar una pasta fluida. Luego se agrega el resto de H₂O para completar la disolución.

Es importante antes de seguir asegurarse que no existan pequeñas partículas

gelatinosas. Cuando se hallen presentes debe agitarse hasta completa solución, para evitar obtener una intensidad de color por debajo del valor correcto.

Las proteínas disueltas se pasan a un vaso de precipitado e de Erlenmeyer, lavando varias veces el tubo de centrifuga con HONa al 3 %. Luego se completa a 95 ml con dicho álcali, agregando 2,5 ml de $\text{SO}_4\text{Cu} \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ al 20 % para completar a 100 ml nuevamente con el álcali. Se deja en reposo y se centrifuga para separar el precipitado de $(\text{HO})_2\text{Cu}$. El líquido sobrenadante que se retira con pipeta, es generalmente límpido. Para una mayor uniformidad los autores filtraron a través de papel de 9 cms. de diámetro Munktel Nº 00, descartando siempre la primera porción que pasaba.

Estabilidad de los colores obtenidos por la reacción del biuret:

Luego de obtenido el color se filtraron distintas porciones después de transcurridos los siguientes intervalos de tiempo: 1/2, 1, 2, 4, 24, 48 horas. Se se tomaron precauciones especiales para conservar las soluciones durante el día pero se guardaba de noche en nevera.

Se observó previamente que el color rojo púrpura de las soluciones de biuret apareció cambiado a un tono rojo luego de estacionado durante 24 horas. Sin embargo las densidades medidas a 560 m μ a intervalos mayores de 48 horas, no mostraron cambios apreciables. Estas observaciones están de acuerdo con Jesserer (1936) que afirma que la medida realizada con filtro azul es constante para grandes períodos de tiempo pero efectuadas con filtro rojo presenta un decrecimiento de valores. Opinan los autores que para esos dos sistemas componentes la densidad óptica a 560 m μ que demuestra ser tan estable, es una medida del complejo Cu-proteína, y el decrecimiento del valor a 700 m μ indica que el $(\text{HO})_2\text{Cu}$ ha sido separado e precipitado del sistema.

Nitrógeno protéico en soluciones colcreadas con la reacción del biuret:

Existe la posibilidad de que estas soluciones contengan una cantidad de proteínas no comparable con el suero original concerniente a su estudio. El nitrógeno protéico ha sido determinado por Kjeldahl a partir de soluciones salinas, y las soluciones de biuret, a partir del mismo suero. Se utiliza el factor 6,25 para la conversión, restando el nitrógeno^{no} protéico para obtener el total. Se efectuaron 8 determinaciones de albúmina a partir del filtrado, obtenido luego de precipitar globulinas con SO_4Na_2 1,5 M. Se compararon valores en determinaciones por Kjeldahl y por biuret, filtrando e centrifugando para los casos del último método. Al trabajar con suero humano, de perro y de conejo, se observa concordancia de valores.

En el método del biuret, tal como se describe, existe un pequeño error, pues se lleva a un volumen determinado de líquido, sin considerar el volumen del

del precipitado de $(HO)_2Cu$. Pero este error influye muy poco en los valores finales. Se aprecia sin embargo, que al estar en contacto el precipitado y el líquido sobrenadante, se produce una apreciable disminución de nitrógeno proteico, debido quizá a la adsorción que efectúa esa capa sólida y pesada.

Efecto de la filtración sobre la intensidad de color:

Aunque la reacción del biuret no muestre pérdida de nitrógeno proteico por filtración, tal proceso permite apreciar una disminución de la densidad óptica entre 560 y 700 m μ .

Luego de que la solución, aparentemente límpida, atraviese un filtro de papel seco, queda en éste una coloración azul.

En principio este decrecimiento puede deberse al $(HO)_2Cu$ eliminado de la solución. Se consideró la posibilidad de que filtrando un número determinado de veces pueda ser eliminado todo el factor conocido como el componente azul, y el color remanente sea posiblemente complejo Cu-proteína. Trabajando con soluciones filtradas una, dos y cuatro veces, se observó, que excepto el decrecimiento en la densidad óptica no hay alteración en la curva de absorción, en la zona comprendida entre 485-680 m μ .

Desifinando el nitrógeno contenido en los filtrados se observó que ocurren pérdidas proteínicas, pero aún después de cuatro filtraciones, se obtuvieron disminuciones de las densidades ópticas.

La única explicación que puede darse a este fenómeno, es la inestabilidad del complejo proteína-Cu. En tales condiciones este precario equilibrio es perturbado por las cargas eléctricas existentes sobre el papel.

Estos experimentos demostraron que el color filtrado, quizá no represente un valor absoluto, en intensidad de color, para el compuesto Cu-Proteína. - Cuando la solución se filtra una vez, utilizando papel Munktell ya mencionado, la pérdida de color es muy pequeña.

Para una variación amplia de concentraciones proteicas, la intensidad de color de la muestra filtrada x veces, da una proporcionalidad directa con el nitrógeno proteico.

Cantidad de SO_4Cu al 20 % agregada:

Lieben y Jesserer (1936) expresaron que la cantidad de sal cúprica agregada puede variarse, sin que ocurran cambios en la intensidad de color obtenidos por la reacción del biuret, para una misma concentración proteica disuelta en el $HONa$ al 3 %.

Robinson y Hogden trataron de confirmar esta observación sobre soluciones en las cuales ya se había determinado previamente el nitrógeno proteico, los valores de las tablas correspondientes muestran que, a través de todo el es-

pectre las concentraciones proteicas y las lecturas estan acordes dentro de los errores experimentales. Se aprecia que las variaciones en el SO_4Cu agregado no producen cambio significativo. Por lo tanto no es necesaria gran exactitud en el agregado de la sal cúprica.

Efectos observados con soluciones diluidas SO_4Cu :

La mayor parte del cobre agregado a la solución alcalina es inmediatamente precipitado como $(\text{HO})_2\text{Cu}$ y es necesario, después de la introducción de pequeñas cantidades de SO_4Cu al 20 %, agitar vigorosamente la mezcla para permitir el desarrollo del color del biuret. Se pensó en disolver la proteína en soluciones alcalinas más fuertes y agregar la misma cantidad de Cu , pero en solución más diluida. Por lo tanto 25 ml de SO_4Cu al 2 % se emplearon en lugar de 2,5 ml de SO_4Cu al 20 %. La concentración final del HOHa se mantuvo en 3 %.

Con la sal cúprica diluida el color se desarrolla inmediatamente, con muy poca agitación. La densidad óptica se mantienen en los valores observados para SO_4Cu 20 % a una longitud de onda de 560 m μ , pero dando valores superiores para 700 m μ .

Algunas soluciones que se colorearon a partir de patrones proteicos conocidos dieron valores bajos, pero después de dejar la mezcla en contacto con el precipitado de Cu por varios días los valores medidos correspondieron a los correctos.

La cantidad de $(\text{HO})_2\text{Cu}$ que permanece disuelto es siempre grande cuando se ha usado la solución diluida de SO_4Cu ; de manera que la relación de la densidad óptica a nitrógeno proteico es más alta que usando SO_4Cu 20 %. Además la variabilidad de resultado con la sal cúprica diluida introduce un factor de incertidumbre nunca presente con la solución concentrada. Se admite que la precipitación del Cu en un estado de dispersión muy fina arrastra algunas proteínas, y que luego de un tiempo parte de esas proteínas se redisuelve.

Efectos de la concentración del HOHa :

El color de la reacción del biuret se desarrolla en presencia de álcali, y se destruye por acción de ácidos. La estabilidad del complejo Cu -proteína depende de la concentración de álcali. Si esta concentración se incrementa, el componente azul del color, que no es debido al $(\text{HO})_2\text{Cu}$, forma una significativa parte del color total. Cuando la sal cúprica (SO_4Cu 20 %) se introduce en HOHa 3 %, filtrando la solución a través de papel Munkstetl N^o00 la densidad óptica es solo 0,02, un valor que se aproxima al error experimental obtenido para las soluciones proteicas.

En el agregado de sal cúprica a HOHa 10 % y siguiendo el mismo procedimiento, la densidad valuada es 0,45. Si este incremento de color está también pre

sente cuando el color del biuret se desarrolla en una solución proteica, podría ser apreciable proporción del color total de la solución. Se determina que de acuerdo a la relación entre densidad óptica y nitrógeno proteico hay una mayor absorción con la solución alcalina fuerte que con las diluidas. Si la concentración alcalina se reduce debajo del 3 %, hay una tendencia a disminuir en los valores del nitrógeno proteico.

Las proteínas de suero de conejo precipitadas con tricloroacético son disueltas en HONa al 3%. Sobre la dilución 1:1 de esta solución stock (muestra A) se realiza una determinación de nitrógeno. Las demás muestras se preparan con la misma dilución. Para cada mezcla las respectivas cantidades de sal cúprica alcali y agua se agregaron de manera tal de obtener la concentración final expresada en la tabla. Las soluciones D y F que fueron preparadas con SO_4Cu 20% dan un valor de nitrógeno en acuerdo con la solución control A. Por lo tanto la alcalinidad de la solución puede ser incrementada sin que varíe el nitrógeno proteico obtenido. En la solución B, al reducir la alcalinidad, se obtiene un valor más bajo, indicando que en tales condiciones parte de las proteínas han sido desviadas por el exceso de Cu .

Cuando se ha usado el SO_4Cu diluido, para las soluciones C, E y G, en los tres casos el nitrógeno proteico resultante es bajo, y la magnitud de las variaciones, está en razón inversa con la concentración alcalina.

Los autores comprobaron finalmente que las intensidades de color más constantes y correctas se obtienen por agregado de SO_4Cu al 20 %, a una solución de proteína en HONa al 3 %. Para conocer las aplicaciones cualitativas de estas soluciones coloreadas, respecto al nitrógeno proteico contenido, se llevaron a cabo una serie de determinaciones sobre proteínas totales y albúmina de suero de conejo. Se determinó dicho nitrógeno proteico en los sueros diluidos y en las soluciones coloreadas.

En este grupo se realizaron 58 determinaciones sobre sueros de 11 conejos, obtenidos en varias veces. Los resultados indicaron una relación lineal entre la densidad óptica a 560 $\text{m}\mu$ y el nitrógeno proteico de la solución. La línea de ~~estos~~ puntos se calcula por el método de cuadrados mínimos.

Para una concentración nula de nitrógeno, la línea cruza ordinariamente a una densidad de 0,02, que es prácticamente la obtenida al tratar una solución alcalina en la misma forma que para la reacción del biuret. Este bajo valor indica que el $(\text{HO})_2\text{Cu}$ disuelto contribuye muy poco al color de la solución, y por lo tanto, la densidad determinada es una medida directa del complejo Cu -proteína.

De acuerdo con estas líneas experimentales, las proteínas totales y albúmi-

INFLUENCIA DE LA CONCENTRACION ALCALINA

Muestra	Conc. final de NO ₃ -Na	Cant. de Sol. Cu. 5N20,2% agreg. para 100ml	Cant. de Sol. Cu. 5N20,20% agreg. para 100ml	N de Noma. (Kjeldahl) en sol. colorada.	Variación de N	Conc. pract. Calc. del suero orig.
		ml	ml	mgx100ml	mgx100ml	mgx100 ml
A	3,0	-	-	23,10	-	7,22
B	1,5	-	2,5	21,70	1,40	6,78
C	1,5	25,0	-	21,26	1,84	6,65
D	3,0	-	2,5	23,10	0,00	7,22
E	3,0	25,0	-	21,86	1,24	6,83
F	6,0	-	2,5	23,20	0,10	7,25
G	6,0	25,0	-	22,51	0,59	7,04

nas de conejo podrán ser determinadas en relación a su densidad óptica con su ficiente grado de seguridad, y en menor tiempo que con un Kjeldahl.

Después pasaron a estudiar el método empleando sueros humanos. Se efectuaron series de determinaciones con el mismo procedimiento, empleando suero de perro y suero humano. Se obtiene perfecta concordancia entre los valores de nitrógeno proteico, y por ende de proteínas, determinados paralelamente por Kjeldahl y empleando la reacción del biuret.

Se demuestra pues que en condiciones adecuadas, la reacción del biuret puede ser utilizada como un método cuantitativo seguro para la estimación de las proteínas sanguíneas. Obteniendo soluciones límpidas de biuret, puede afirmarse que este método puede reemplazar el Kjeldahl.

En muchos casos puede evitarse la filtración, y por lo tanto emplear directamente el líquido sobrenadante luego de centrifugar. Realizadas las experiencias de tal manera se obtiene una relación lineal similar a la anterior. Se observa un ligero incremento de color, debido a la presencia de una mayor cantidad de HO(2Cu) en la solución.

Omitiendo la filtración se realizaron 41 determinaciones de densidades ópticas y nitrógeno proteico con soluciones preparadas de proteínas de hombre, perro y conejo. La concordancia respecto a los datos anteriores satisface los requerimientos de las determinaciones clínicas.

Más tarde, en 1945, Robinson y Hogden, simultáneamente con Harenzi, Moglia y Vilallonga establecieron, que las proteínas de los sueros de distintas especies animales (perro, conejo) no solamente poseían la misma banda de absorción, sino que también los coeficientes de extinción específicos eran idénticos entre sí. Esta observación es válida, tanto para las proteínas totales, como para cada una de las fracciones.

Waken y Still (1942) llegaron a la conclusión de que con este método se obtienen resultados bajos, cuando se los compara con el Kjeldahl, y que solo se obtiene buenos resultados luego de almacenar los sueros, una o dos semanas en heladera.

Esta afirmación que invalidaría el método no se vio confirmada por trabajos posteriores de Robinson y Hogden, ni de Harenzi, Moglia y Vilallonga. Estos últimos observaron una completa constancia en la cifra de la concentración proteica obtenida por el método de biuret, durante un período de dos meses de permanencia de los sueros en heladera.

De acuerdo a las conclusiones a que llegaron los diversos estudios sobre el método del biuret, puede expresarse que este método presenta en general bastantes ventajas sobre los otros métodos colorimétricos. En primer lugar la es-

pecificidad de la reacción es muy grande, y si bien los polipéptidos existentes en la sangre pueden causar un error por exceso, la concentración de estos es tan pequeña, que apenas influye. Esta observación se ve confirmada por la identidad de valores, que se obtienen por dos métodos distintos: uno, el de Robinsen y Hogden que utilizan una separación previa de las proteínas por tricloracético, y otro el método de Marenzi, Moglia y Vilallonga, efectuando la reacción directamente del suero.

Por otra parte resulta un método de elección para la aplicación de los foto colorímetros corrientes, a pesar de que es perfectamente aplicable al colorímetro, teniendo en cuenta que los sueros testigos presentan una gran estabilidad cuando se conservan en condiciones adecuadas.

BIB. TOGATAPIA

- 1) KAUFER, P.: *Trat. Química Orgánica*,
- 2) WIENER: *Chemistry of urea*.
- 3) DEULOFEU, V. y MARENZI, A.D.: *Cursos de Química Biológica*.
- 4) RIEGLER, E.: *Z. Anal. Chem.*, 53, 242, 1914.
- 5) AUTENRIETH, W.: *Munch. Med. Woch.*, 61, 241, 1917.
- 6) HILLER, A.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 24, 385, 1927.
- 7) SIZER, I.W.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 37, 107, 1937.
- 8) ROBINSON, H.H. y HODGEN, C.G.: *J. Biol. Chem.*, 135, 707, 1940.
- 9) GREENBERG, D.H.: *J. Biol. Chem.*, 82, 545, 1929.
- 10) LIEBEN, F. y JESSEFER, H.: *Biochem. Z.* 285, 36, 1936.
- 11) PEYRYRA, R.F.: *Rev. Fac. Med. Vet., Univ. Sao Paulo*, 2, 257, 1944.
- 12) NEILL, J.W.: *J. Biol. Chem.*, 157, 173, 1945.
- 13) WEIGSELBAUM, T.E.: *An. Jour. Clin. Path. Tec. Supp.*, 16, 41, 1946.
- 14) CORTELL, A.G., BARDWILL, C.G., DAVID, M.H.: *J. Biol. Chem.*, 177, 751, 1949.
- 15) ZECCA, A.H.: *Scz. Med.*, 51, 709, 1947.
- 16) SOL, A.: *Nature*, 160, 89, 1947.
- 17) BOGLIA, J., MARENZI, A.D. y VILALLONGA, F.: *Pub. Cent. Invest. Tisiol.* 10, 7, 1946.
- 18) HOWE, P.E.: *J. Biol. Chem.*, 57, 241, 1923.
- 19) ALBANESE, A.A., IRBY, V., SAUR, B.: *J. Biol. Chem.*, 166, 231, 1946.
- 20) FERGUSON, J.H.: *J. Lab. Clin. Med.*, 27, 273, 1938.
- 21) QUICK, A.J.: *J. Immunol.*, 29, 87, 1935.
- 22) AVERY, A., MUNRO, F.L.: *Arch. Biochem.*, 16, 33, 1948.

5) DETERMINACION DEL FIBRINOGENO POR EL METODO DEL BIURET

TECNICAS EMPLEADAS

De acuerdo a las ventajas y seguridades que ofrece la determinación de proteínas sanguíneas por el método que aplica la reacción del biuret, en nuestro trabajo lo emplearemos para la determinación de fibrinógeno. Para ello seguiremos las indicaciones del trabajo que al respecto efectuaron los doctores Maronzi y Gómez.

El fibrinógeno se precipita del plasma con $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ al 25 % de saturación. Tal concentración ha sido determinada por diversos investigadores, puesto que solo precipita entonces la mencionada proteína. Por otra parte Svenson ha demostrado que de las proteínas restantes del plasma, la que precipita a continuación, es la gama globulina, en concentraciones superiores al 30 % de saturación de la mencionada sal, asegurándose así un margen bastante amplio, entre la concentración dispuesta por la técnica a utilizarse, y la que produce la precipitación de otra de las proteínas plasmáticas.

Técnica:

La extracción de sangre debe ser efectuada sin estasis venoso, recibiendo sobre oxalato de sodio o potasio, en la proporción de 1 mg por ml de sangre. Se procede a separar rápidamente el plasma por centrifugación. Una pequeña hemólisis no produce interferencia en las determinaciones.

Se diluye 1 ml de plasma con 5 ml de solución fisiológica (ClNa 9 o/oo). Se mezcla bien y se agregan gota a gota y agitando continuamente, 2 ml de solución saturada de $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$. De esta manera se tiene una concentración, en el volumen total, de 25 % de saturación de la mencionada sal.

Se deja en reposo durante 15 minutos, y luego se centrifuga durante igual lapso a 3.000 r.p.m. Se vuelca el líquido sobrenadante cuidando de evitar pérdidas de precipitado. A continuación se lava tal precipitado, suspendiéndolo en 5 ml de $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ al 25 % y volviendo a centrifugar 5 minutos.

Se repite la decantación, dejando drenar el tubo sobre papel de filtro durante otros 5 minutos. El precipitado se disuelve con 5 ml de la solución de HONa al 3 %, calentando ligeramente al baño maría. Se enfrían los tubos y se completa a 9,75 ml con la misma solución de HONa.

A esta solución de fibrinógeno se le agregan 0,25 ml de la solución de SO_4Cu al 20 %, se agita energicamente durante 20 a 30 segundos, dejando en reposo 5 minutos, y centrifugando luego por 20 minutos a 3.000 r.p.m.

La absorción de color del líquido sobrenadante se lee en fotocolorímetro,

preferiblemente con filtro de máxima transmisión en 530 m μ , utilizando como líquido de compensación un blanco efectuado con 9,75 ml de solución de HONa al 3 % y 0,25 ml de solución de SO_4Cu 20 %, y centrifugando de igual manera que el ensayo.

La determinación también puede efectuarse con un colorímetro común, siendo entonces reemplazable el blanco por la solución testigo.

Ya se dijo que el principal inconveniente que presentaba la aplicación de la reacción del biuret a la evaluación de las proteínas séricas, residía en la obtención de un patrón que fuera estable y cuya concentración proteica fuera perfectamente conocida. Se mencionaron los testigos preparados por Riegler, Autenrieth y Hiller, y por último el uso del suero de conejo normal, diluido con solución fisiológica, según técnica de Robinson y Hegden, el que con el agregado de un cristal de timol se conserva por más de seis meses. También indican que los sueros humanos y de perro, no tienen la característica de conservarse tan bien como el de conejo, hecho que ha sido confirmado por Moglia, Maronzi y Vilallonga. Pero según Weinschelbaum, cualquier suero diluido en solución de urea al 30 %, y con el agregado de un cristal de timol, se conserva por lo menos doce meses.

Cualquiera sea el método de conservación utilizado, será necesario efectuar la determinación del contenido en proteínas del mismo. Esto se ha hecho comúnmente determinando el nitrógeno proteico por el método de Kjeldahl, e algunas de las modificaciones conocidas; en todos los casos que se encuentran en la literatura se ha utilizado el factor 6,25 para convertir el dato de nitrógeno en proteína, de acuerdo a la suposición de que las proteínas séricas contienen un 16 % de nitrógeno. Cook ha demostrado que tal valor no es real, habiendo efectuado determinaciones sobre sueroproteínas precipitadas con acetona coaguladas por calor, utilizando los métodos de Dumas y Kjeldahl; sobre ocho determinaciones efectuadas por el primer método se obtiene un valor de 15,20 con una desviación de $\pm 0,84$, y sobre seis determinaciones efectuadas por el segundo método encuentra un contenido de nitrógeno de 15,23 con una desviación de $\pm 0,50$. Según Cook el factor 6,50 sería más real del que se utiliza corriente.

Si bien es cierto que el uso de los fotocolorímetros excluye la necesidad de utilizar patrones, y con ello desaparece el problema de la conservación de los mismos, siempre resultará necesario preparar una solución testigo para efectuar la curva de calibración. Maronzi y Gómez sostienen que resulta más conveniente la obtención de una proteína pura para efectuar la curva de calibración, ya que en este caso no se tiene el inconveniente apuntado respecto a

la inseguridad del factor de conversión. Los citados autores usaron un patrón de fibrinógeno e de fibrina, sumamente asequible, y de muy buena conservación al estado de polvo seco. La fibrina la obtuvieron con la técnica corriente de coagular el fibrinógeno del plasma (diluido con 5 volúmenes de ClNa 9 o/oo) por acción de Cl_2Ca al 2,5 %.

A su vez, el fibrinógeno al estado de tal se le precipita con sulfato amónico al 25 %, disolución en cloruro de sodio, reprecipitación y dialisis.

En ambos casos se procede a lavar con alcohol, alcohol y éter por partes iguales, y finalmente con éter; se dejan secar al aire y posteriormente el desecador al vacío sobre SO_4H_2 . El material obtenido se convirtió en polvo fino. También puede utilizarse la gamma globulina, puesto que Marenzi y Gómez demostraron que las tres proteínas tienen el mismo coeficiente de extinción específico.

Parte experimental:

Hemos seguido en nuestro trabajo los detalles de la técnica ya mencionada, en publicación de Marenzi y Gómez. A tal efecto empleamos un fotocolorímetro Lumetron, llevando a cabo las observaciones con filtro de máxima transmisión en 530 m μ . A fin de conseguir la curva de calibración para dicho aparato, se preparó una solución de fibrina Difco en HONa al 3 %. Se adoptó tal droga debido a la garantía que ofrece la marca mencionada. Dicha solución contenía un mg de fibrina por ml.

Para construir la curva se tomaron varios tubos conteniendo 0,5; 1; 2; 2,5; 3; 4; 5 ml de la solución citada, cantidades que corresponden respectivamente a 50, 100, 200, 250, 300, 400, y 500 mg por ciento. Se llevó a 9,75 ml con HONa al 3 %, para adicionar la sal cúprica correspondiente.

Efectuadas las lecturas, se construye en papel logarítmico la recta que nos permite obtener la tabla que relaciona, porcentaje de transmisión con el contenido de fibrinógeno por ciento. Se utilizó para comparación en cada caso, el testigo de HONa y SO_4Cu ya mencionados.

En razón de que al precipitar el fibrinógeno, siempre se arrastra algo de las restantes proteínas, se efectúa el lavado con solución de $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ al 25 % de saturación. Marenzi y Gómez comprobaron que un solo lavado es necesario y suficiente; más lavados del precipitado no hacen variar el dato obtenido.

También comprobaron que son suficientes 15 minutos para que la precipitación del fibrinógeno sea total. La cantidad precipitada en dicho lapso es sensiblemente la misma que precipita en 24 horas.

Nuestras experiencias confirman tales aseveraciones.

Se ha descartado que la presencia de sales de amonio interfiera en la reacción del biuret.

Por nuestra parte hemos realizado trabajos por duplicado y triplicado según consta en la tabla de resultados.

Reacciones de recuperación:

Para efectuarlas, se empleó la solución de fibrina ya citada. Se llevó a cabo la técnica usual, y una vez disuelto el precipitado de fibrinógeno, se agregaron a dicha solución: 0,5, 1, 2, ml de la solución de fibrina. Finalmente en cada caso se adicionó el HONa al 3 % necesario para completar a 9,75 ml y luego el SO_4Cu al 20 % necesario.

Influencia de la concentración de $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$:

En esta faz de nuestro trabajo, manteniendo constante el volumen total para la precipitación, de 8 ml, se modificaron las cantidades de ClNa al 9 e/ce y de $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ solución saturada.

La siguiente tabla indica tales variaciones y la concentración respectiva del sulfato amónico en porcentaje de saturación que se obtuvo.

La mayor parte de las determinaciones se efectuaron sobre mujeres gestantes; también sobre personas normales, otras presentando ciertas afecciones, y puerperas, según consta en los resultados expuestos mas adelante en la tabla de experiencias.

Comparación de resultados:

Para comparar los valores obtenidos con el método que emplea la reacción del biuret, se procedió a valorizar la concentración de fibrinógeno en un mismo plasma, por dicho método y por el de Cullen y Van Slyke, simultáneamente.

Estos últimos autores, como ya se expresó, precipitan el fibrinógeno al estado de fibrina por medio de Cl_2Ca . Luego se realiza un Kjeldahl, evaluando el nitrógeno protéico por nesslerización.

BIBLIOGRAFIA

- 1) MARENZI, A.D. y GOMEZ, C.G.: 15, 245, 1951.
- 2) MARENZI, A.D. y GOMEZ, C.G.: 35, 253, 1951
- 3) ROBINSON, H.W. y HODGEN, C.G.: J. Biol. Chem., 135, 727, 1940.
- 4) SVENSON, H.: J. Biol. Chem., 139, 805, 1941.
- 5) HOYTINGA, E.: Arch. Neerland Physiol., 28, 241, 1946.
- 6) RAPAPORT, M., RUBIN, M.J. y CHAFEE, D.: J. Clin. Invest., 22, 487, 1923.
- 7) TREVARDY, V., KASER, M., PATENSON, J.P., HILL, R.H.: J. Lab. Clin. Med., 27, 471, 1942

新 華 書 局

中

重 慶 分 局 中 正 路 四 號

CUADRO 1

Determinaciones por duplicado y triplicado

		Original		Duplicado		Triplicado	
1)	Alvear (hospital)	455	mg %	460	mg %	-	mg %
2)	" "	345	" "	360	" "	-	" "
3)	" "	325	" "	310	" "	-	" "
4)	" "	450	" "	440	" "	-	" "
5)	" "	420	" "	420	" "	-	" "
6)	" "	500	" "	520	" "	-	" "
7)	" "	360	" "	370	" "	-	" "
8)	" "	325	" "	320	" "	-	" "
9)	" "	450	" "	445	" "	-	" "
10)	" "	520	" "	500	" "	-	" "
11)	" "	450	" "	460	" "	-	" "
12)	" "	465	" "	470	" "	-	" "
13)	" "	500	" "	475	" "	-	" "
14)	" "	395	" "	400	" "	-	" "
15)	Argerich	430	" "	410	" "	430	" "
16)	" "	660	" "	620	" "	640	" "
17)	" "	520	" "	500	" "	525	" "
18)	" "	395	" "	580	" "	410	" "
19)	" "	580	" "	520	" "	570	" "
20)	" "	415	" "	420	" "	410	" "
21)	" "	395	" "	380	" "	400	" "
22)	" "	580	" "	590	" "	590	" "
23)	" "	520	" "	540	" "	535	" "
24)	" "	590	" "	600	" "	580	" "
25)	" "	600	" "	610	" "	630	" "
26)	" "	540	" "	540	" "	520	" "
27)	" "	500	" "	500	" "	500	" "
28)	Normal	395	" "	395	" "	-	" "
29)	Embarazo	450	" "	440	" "	-	" "
30)	Normal	270	" "	270	" "	260	" "
31)	Puérpera	825	" "	825	" "	-	" "

CUADRO 2Influencia del tiempo de precipitación

	15 minutos		30 minutos		60 minutos		24 horas	
1) Particular	485	mg%	490	mg%	-	mg%	490	mg%
2) "	575	" "	-		580	" "	590	" "
3) "	600	" "	580	" "	-		590	" "
4) "	320	" "	320	" "	310	" "	330	" "
5) "	400	" "	405	" "	410	" "	400	" "

CUADRO 3Influencia del número de lavados

	Sin lavado		un lavado		2 lavados		3 lavados	
1) Particular	470	mg%	430	mg%	425	mg%	430	mg%
2) "	630	" "	580	" "	570	" "	570	" "
3) "	550	" "	520	" "	500	" "	510	" "
4) "	385	" "	370	" "	370	" "	360	" "
5) "	340	" "	300	" "	290	" "	310	" "

CUADRO 4

Reacciones de recuperación

	Sin agregado	0,5 ml	1 ml	2 ml	3 ml
	mg%	mg%	mg%	mg%	mg%
1) Original (Particular)	270	-	-	-	-
2) Orig. 1 ml solución de fibrina	-	-	365	-	-
3) " 2 ml " " "	-	-	-	465	-
4) " 3 ml " " "	-	-	-	-	570
5) " (embarazo)	560	-	-	-	-
6) " 1 ml " " "	-	-	650	-	-
7) " (normal)	395	-	-	-	-
8) " 1 ml " " "	-	-	500	-	-
9) " (infecioso)	640	-	-	-	-
10) " 0,5 ml " " "	-	690	-	-	-
11) " (embarazo)	450	-	-	-	-
12) " 1 ml " " "	-	-	540	-	-
13) " 2 ml " " "	-	-	-	630	-
14) " (varicoso)	540	-	-	-	-
15) " 1 ml " " "	-	-	630	-	-
16) " 2 ml " " "	-	-	-	720	-
17) " (diabético)	360	-	-	-	-
18) " 0,5 ml " " "	-	420	-	-	-
19) " 1 ml " " "	-	-	450	-	-
20) " (diabética)	325	-	-	-	-
21) " 1 ml " " "	-	-	420	-	-
22) " (normal)	360	-	-	-	-
23) " 0,5 ml " " "	-	410	-	-	-
24) " (normal)	500	-	-	-	-
25) " 0,5 ml " " "	-	560	-	-	-
26) " 1 ml " " "	-	-	610	-	-
27) " (eritrosedimentación acel.)	500	-	-	-	-
28) " 1 ml solución de fibrina	-	-	620	-	-
29) " 2 ml " " "	-	-	-	700	-
30) " 3 ml " " "	-	-	-	-	810

CUADRO 5

Precipitación con distintas concentraciones de sulfato amónico
siendo la original del método 25 % de saturación

	18,75%	20 %	22,5 %	25 %	27,5%	30 %	35 %
	mg%	mg%	mg%	mg%	mg%	mg%	mg%
1) infeccioso	110	325	-	590	-	-	-
2) diabético	-	-	480	600	-	820	-
3) normal	-	-	-	285	-	500	-
4) diabético	-	-	-	300	-	560	-
5) puérpera	-	-	440	600	660	775	-
6) diabético	180	310	-	580	725	-	-
7) normal	-	230	285	310	205	-	-
8) "	-	-	-	540	415	-	-
9) "	180	230	270	360	415	450	-
10) "	-	300	-	415	450	580	-
11) "	-	-	350	395	370	580	1100
12) embarazo	-	-	310	465	850 x	825 x	-

x Estos dos últimos tubos no se clarificaron por centrifugado. Al cabo de 24 horas lo hizo por completo el de 27,5 %, pero dando un precipitado de tamaño mayor que el normal. El de 30 % no estaba perfectamente limpio.

CUADRO 6

Resultados comparativos con respecto al método de Gullen y Van Slyke

	Biuret	Gullen y Van Slyke
1) normal	325 mg%	330 mg%
2) "	450	425
3) "	275	285
4) "	370	365
5) embarazo	530	550
6) "	480	480
7) "	450	445
8) normal	255	250
9) "	430	420
10) "	300	315
11) "	290	290

CUADRO 2

Fibrinógeno en personas normales

		mg
1)	465	...
2)	420	...
3)	270	...
4)	285	...
5)	360	...
6)	285	...
7)	360	...
8)	500	...
9)	500	...
10)	360	...
11)	250	...
12)	285	...
13)	220	...
14)	320	...
15)	430	...
16)	430	...
17)	260	...
18)	360	...
19)	350	...
20)	270	...

CUADRO 8Estudio sobre mujeres embarazadas.

Hemos determinado el fibrinógeno en cinco grupos de pacientes seleccionadas de las maternidades "U. FERNANDEZ" del Hospital T. de Alvear; "PEDRO A PARDO" "COSME ARGENTI" y de la clientela privada.

- 1°) 20 embarazadas normales
- 2°) 30 embarazadas preeclápticas
- 3°) 30 embarazadas con procesos hemorrágicos diversos
- 4°) 4 embarazadas con feto muerto y retenido
- 5°) 10 púerperas

1er. GRUPO (20 embarazadas normales)

1)	normal, de término	490	mg%
2)	" " "	570	" "
3)	" de 5 meses	380	" "
4)	" de término	580	" "
5)	" " "	520	" "
6)	" " "	580	" "
7)	" " "	560	" "
8)	" de 6 1/2 meses	380	" "
9)	" de término	570	" "
10)	" " "	610	" "
11)	" de 8 meses	450	" "
12)	" de término	650	" "
13)	" de 8 meses	415	" "
14)	" " " "	500	" "
15)	" de 5 meses	390	" "
16)	" de 9 meses	600	" "
17)	" de 7 meses	520	" "
18)	" de 4 meses	320	" "
19)	" de 9 meses	610	" "
20)	" de término	490	" "

2º GRUPO (30 embarazadas preeclápticas)

1)	embarazo de 7 meses y 15 días	492	mg
2)	" " 8 "	580	" "
3)	" " 8 "	440	" "
4)	" " 8 " " 15 "	570	" "
5)	" de término	580	" "
6)	" " "	490	" "
7)	" 8 meses	520	" "
8)	" de término	460	" "
9)	" de 9 meses	485	" "
10)	" " 9 "	405	" "
11)	" " término	580	" "
12)	" " 9 meses	570	" "
13)	" " 8 "	590	" "
14)	" " 9 "	490	" "
15)	" " 8 "	420	" "
16)	" " 7 " y 15 días	460	" "
17)	" " 8 "	450	" "
18)	" " término	495	" "
19)	" " 7 meses	400	" "
20)	" " 6 "	390	" "
21)	" " 7 "	430	" "
22)	" " 9 "	490	" "
23)	" " 7 "	575	" "
24)	" " término	580	" "
25)	" " 9 meses	540	" "
26)	" " 7 meses	390	" "
27)	" " 6 "	370	" "
28)	" " 7 "	500	" "
29)	" " 9 "	495	" "
30)	" " 8 "	490	" "

3er GRUPO

(30 embarazadas con procesos hemorrágicos diversos)

1) mola hidatiforme (embarazo de 4 m.)	320 mg%
2) desprendimiento normoplacentario (emb. de 7 m)	380 "
3) amenaza de aborto (emb. de 2 m y 15 días)	225 "
4) placenta previa (emb. de 7 m.)	365 "
5) amenaza de aborto (emb. de 3 m)	250 "
6) mola hidatiforme (emb. de 3 m.)	340 "
7) amenaza de aborto (emb. de 3 m)	300 "
8) " " " (" " ")	290 "
9) desprendimiento normoplacentaria (emb. de término)	410 "
10) placenta previa (emb. de 7 m)	390 "
11) amenaza de aborto (emb. de 4 m)	300 "
12) placenta previa (emb. de 7 m y 15 días)	395 "
13) " " (emb. de 8 m)	570 "
14) " " (emb. de 9 m)	395 "
15) mola hidatiforme (emb. de 4 m y 15 días)	370 "
16) amenaza de aborto (emb. de 4 m y 15 días)	300 "
17) " " " (emb. de 4 m)	460 "
18) " " " (emb. de 4 m)	275 "
19) mola hidatiforme (emb. de 3 m)	300 "
20) amenaza de aborto (emb. de 2 m)	290 "
21) placenta previa (emb. de 7 m)	390 "
22) desprendimiento normoplacentaria (emb. 8 m 15 días)	380 "
23) placenta previa (emb. de término)	570 "
24) amenaza de aborto (emb. de 3 m)	300 "
25) " " " (emb. de 3 m 15 días)	290 "
26) placenta previa (emb. de término)	650 "
27) amenaza de aborto (emb. de 3m y 15 días)	305 "
28) desprendimiento normoplacentario (emb. de 9 m)	495 "
29) amenaza de aborto (emb. de 3 m)	250 "
30) " " " (emb. de 3 m)	300 "

4° GRUPO (4 embarazadas con feto muerto y retenido)

- 1) Embarazo gemelar. A los 7 meses se comprueba la muerte de uno de los fetos. El embarazo llega a término, el parto y alumbramiento se producen espontáneamente. Las determinaciones se efectuaron con intervalos periódicos desde los siete meses hasta el momento del parto.

Determinación I	460
" II	450
" III	470
" IV	490

- 2) Embarazo de 8 meses. Se constata la muerte fetal. El embarazo llega a término. El parto y alumbramiento se efectúan espontáneamente.

Determinación I	480
" II	490

- 3) Embarazo de 7 meses. Muerte del feto que data de pocos días. Parto premature espontáneo. Alumbramiento natural.

Determinación I	495
-----------------	-----

- 4) Embarazo de 8 meses y medio. Se comprueba la muerte fetal. El embarazo llega a término. Parto y alumbramiento espontáneos.

Determinación I	580
-----------------	-----

5° GRUPO

1) puérpera	620	mg%
2) "	595	"
3) "	625	"
4) "	600	"
5) "	610	"
6) "	590	"
7) "	635	"
8) "	580	"
9) "	640	"
10) "	650	"

DETERMINACION DE FIBRINOGENO EN EMBARAZADASCOMENTARIOS

De acuerdo a las investigaciones efectuadas y con respecto a los casos estudiados se puede establecer:

1° que el fibrinógeno aumenta durante el embarazo y en los estados infecciosos. Además que se regenera rápidamente, para mantenerse en límites normales, aún después de hemorragias graves, tal ocurre en estados patológicos como la eclampsia, en los cuales la deposición de fibrina puede ser importante en ciertos órganos.

2° que el carácter agudo y dramático del síndrome de afibrinogenemia en obstetricia, hace pensar que la acción de una sustancia de gran actividad trombo-plástica unida a menudo a potentes enzimas fibrinolíticas, agotan el poder regenerador de los sistemas fibrinopepticos, para reponer el fibrinógeno a niveles normales, y así detener las hemorragias desencadenadas. Este concepto ya es casi universalmente admitido aunque quedan todavía ciertas lagunas.

3° que las formas consideradas lentas o subagudas, tales como se observan en los casos de fetos muertos y retenidos in-útero, no lo son en toda la acepción de la palabra, pues los accidentes no se manifiestan hasta pasados tres o cuatro meses después de la muerte fetal, periodo en el cual de acuerdo a los conceptos admitidos, la autólisis de las capas endometriales prepara una vía para el pasaje de tromboplastina o fibrinolisinias al torrente circulatorio materno, y en el cual, los dosajes de fibrinógeno no demuestran déficit de esta sustancia. Es recién después de este periodo que el proceso se desencadena en una forma más o menos aguda; en nuestras investigaciones tal como se puede observar en el cuadro 3, 4° grupo, hasta dos meses después de la muerte fetal, el fibrinógeno se mantuvo en niveles normales.

CUADRO 9

(Estudios sobre personas con diversas afecciones)

1) diabético leve	360	mg%
2) " "	600	"
3) " "	300	"
4) " "	380	"
5) " discreto	325	"
6) infeccioso	610	"
7) "	590	"
8) paciente con eritrosed. acelerada	500	"
9) " varicoso	510	"
10) " con hepatitis	300	"
11) " con ictericia	205	"
12) " con púrpura (28000 plaquetas)	250	"

CONCLUSIONESP R I M E R A P A R T EEstudio del método:

- I- La determinación del fibrinógeno mediante la reacción del biuret, se efectúa sin inconvenientes y presenta ciertas ventajas con respecto a otros métodos a saber:
- a) Requiere menos tiempo.
 - b) Permite efectuar simultáneamente un número elevado de determinaciones.
 - c) La preparación y conservación de los testigos colorimétricos no ofrece dificultades.
- II- El método controlado mediante determinaciones efectuadas por duplicado y triplicado, así como por medio de ensayos de recuperación, dió siempre resultados satisfactorios (CUADROS 1 y 4). Las desviaciones observadas están dentro de límites normales.
- III- Hemos confirmado que un lapso de quince minutos, una vez agregado sulfato amónico, es suficiente para obtener una completa precipitación del fibrinógeno (CUADRO 2).
- Hemos confirmado que es necesario efectuar un lavado para eliminar restos de otras proteínas. De lo contrario se obtienen valores superiores a los reales. Un mayor número de lavados no influye en las cifras determinadas (CUADRO 3).
- IV- Hemos estudiado la influencia de las diversas concentraciones de sulfato amónico, llegando a las siguientes conclusiones CUADRO 5)
- a) El grado óptimo de saturación es de 25 %.
 - b) Por debajo de esta concentración, se obtienen siempre valores inferiores a los reales.
 - c) Por encima de 30 %, se obtienen siempre valores superiores a los reales.
 - d) Entre 25 y 30 % los resultados son variables, a veces por encima y a veces por debajo de los valores reales.
- V- Se obtienen valores concordantes al efectuar determinaciones simultáneas por el método propuesto de la reacción del biuret y por el método de Cullen y Van Slyke.

S E G U N D A : P A R T E

El método aplicado a sangres normales y a sangres
de personas con diversas afecciones.

I- En 20 personas de ambos sexos consideradas normales, el promedio de las determinaciones alcanza a 348 mg %, con un valor máximo de 500 mg % y un mínimo de 220, lo cual coincide con los límites indicados por diversos autores que comprenden entre 200 y 500 mg % (CUADRO 7).

II- Se estudió el nivel de fibrinógeno en mujeres embarazadas dividiéndolas en cuatro grupos (CUADRO 8):

Primer grupo: en 20 embarazadas normales. Se observa que el fibrinógeno ofrece cifras moderadamente elevadas, que se acrecientan con la edad del embarazo. Nuestras cifras son más elevadas que las clásicas. También otros autores, entre ellos O. Agüero (de Caracas), obtuvieron valores superiores a los clásicos e inclusive, superiores a los nuestros.

Segundo grupo: en 30 embarazadas preeclámpticas. Presentan valores moderadamente elevados, similares a los del grupo anterior. No se notaron alteraciones en los demás factores de la coagulación sanguínea.

Tercer grupo: embarazadas con procesos acompañados de hemorragias (placenta previa, desprendimiento normoplacentario, mola hidatiforme, amenaza de aborto). Los valores obtenidos son similares a los tres grupos anteriores, no variando las cifras de fibrinógeno ni aún después de hemorragias importantes.

Cuarto grupo: embarazadas con feto muerto y retenido. Se observan las cifras de fibrinógeno en relación al desarrollo del embarazo, no variando estas cifras, ni los factores de la coagulación sanguínea en el lapso de dos meses.

Quinto grupo: comprende a 10 puérperas. Las pacientes ofrecieron cifras más elevadas que las embarazadas, y siempre por encima del límite normal de 500 mg %.

III- En pacientes con diversas afecciones observamos, (CUADRO 9):

- a) Cifras normales en diabéticos (salvo uno de ellos)
- b) Cifras elevadas en los enfermos con diversas infecciones acompañadas por eritrosedimentación acelerada.
- c) Cifras limítrofes inferiores en pacientes con afecciones hepáticas.
- d) Un caso de púrpura con trombocitopenia sumamente acentuada (28000 trombocitos por mm³), petequias en diversas partes del cuerpo, retracción retardada del coágulo y tiempo de coagulación ligeramente aumentado, acusó cifras normales.

[Handwritten signature]

[Handwritten signature]