

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS MEDICAS

**Electroforesis en Papel de las
Proteínas Séricas en Individuos
Normales y en Casos Patológicos**

T E S I S

PRESENTADA A LA JUNTA DIRECTIVA DE LA FACULTAD DE
CIENCIAS MEDICAS DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE
GUATEMALA, POR

Mario Roberto Mencos Martínez

EN EL ACTO DE SU INVESTIDURA DE

MEDICO Y CIRUJANO

SEPTIEMBRE DE 1959

INTRODUCCION

A pesar de la gran importancia de la ELECTROFORESIS en la práctica Médica actual, los diversos sistemas de aplicación de la misma son aún bastante desconocidos en la mayor parte de América Latina, siendo necesario a Internistas y Biólogos el remitirse a publicaciones llegadas del exterior, para conocer las experiencias que constantemente se llevan a cabo en dicho campo.

En nuestro país este tipo de trabajo data a lo sumo de diez años atrás. Sobre Electrólisis Libre hay interesantes estudios realizados por Escobar y Méndez de la Vega, los cuales han sido varias veces editados, (5, 13,). Sobre Electrólisis en Papel no existen datos anteriores a no ser los obtenidos por Herrarte (Comunicación Personal), primero en experimentar este método en Guatemala y de quien nosotros lo conociéramos en forma objetiva. Todos estos datos se complementan con las investigaciones sobre el fraccionamiento de las proteínas séricas, obtenido por el método de Biuret, que han llevado a cabo Castellanos, Méndez y Arroyave (10, 19, 20).

Queda por explorar en nuestro medio un extenso campo de la Electrofóresis: Líquido Cefalorraquídeo, Saliva, Jugo Gástrico, Hormonas, Vitaminas, Pigmentos, Lípidos e Hidratos de Carbono y muchas investigaciones más que sería engorroso enumerar, pero que incluyen hasta las más recientes experiencias con Isotopos Radioactivos.

Dado el tipo monográfico de nuestro estudio, su elevado costo y prolongado tiempo de realización no nos era posible extendernos en una revisión general de otros líquidos orgánicos y debimos por lo tanto circunscribirnos al estudio de las variaciones normales y Patológicas de las Proteínas Séricas.

El valor que esta Tesis pueda tener, es el de haber sido realizado en forma experimental, así como el de ser un estudio original en nuestro país. No es pues, un simple recabamiento de datos obtenidos por otros o de experiencias realizadas por terceros, sino una investigación personal, por medio de la cual se establecen comparaciones con datos de investigadores guatemaltecos y extranjeros y se dan promedios por primera vez en nuestro medio para el método de Electrofóresis en Papel.

Los objetivos primordiales de la presente Tesis serán por lo tanto:

1o.—Divulgar la Técnica de la Electrofóresis en Papel.

2o.—Establecer Valores Normales para Guatemala.

3o.—Estudiar su aplicación Clínica en diversos procesos morbosos.

HISTORIA

Las investigaciones Electroforéticas se inician a finales del pasado siglo y principios del presente, con las observaciones de: Reuss sobre el movimiento direccional del agua a través de la arcilla, sometiénola a una corriente eléctrica. Hardy, quien estudió las variaciones de las proteínas de la albúmina del huevo. Theorell, quien observó que la albúmina y la globulina demostraban tener diferente movilidad eléctrica. Field y Teague que lograron separar la toxina de la antitoxina diftérica en un gel de Agar. Sin embargo su utilización sólo se intensificó después de las investigaciones de Tiselius en el año de 1937. Luego vinieron las importantísimas aplicaciones de dicho sistema a problemas de medicina interna, llevadas a cabo por Longsworth y colaboradores. (1, 3, 4, 5).

El método de Tiselius, (21) que es el clásico, requiere un tubo en forma de U en el cual se coloca la solución tampón (Buffer de pH 8.5) con el plasma previamente dializado. Se aplica la corriente eléctrica, siendo las proteínas atraídas hacia el polo positivo y colocadas a distintos niveles, según su diferente velocidad de migración. La lectura se realiza por medio de un sistema óptico refractométrico.

Como el método de Tiselius resultaba demasiado caro y de manejo complicado se idearon nuevos aparatos, aunque siempre debieron seguir usando de la refractometría en la medición.

Koenig y Klobusitzky (1) emplearon tiras de papel para aislar el pigmento de un veneno de oficio, lo cual probablemente sugirió a otros investigadores el uso de dicho material como medio soporte. En los siguientes años, es decir de 1940 en adelante, creció el número de investi-

gadores, los cuales dieron un heterogéneo pero importantísimo aporte a la evolución y perfeccionamiento del método: Wieland, Fisher, Durrum, Krauss, Wunderly y muchos más. Día por día ha sido mayor la importancia dada al estudio de los líquidos orgánicos por medio de la electrofóresis y en especial al de las proteínas séricas.

TEORIA

Existen ciertas sustancias que, en solución, tienen la propiedad de reaccionar con ácidos y bases para formar sales. Se les ha dado el nombre de electrólitos anfóteros o anfólitos. Como ejemplo tenemos el hidróxido de Zinc, el hidróxido de aluminio, el ácido paraaminobenzoico y de especial interés para el médico y el Químico Biólogo, los aminoácidos y las proteínas.

En solución ácida un anfólito actúa como base y en solución alcalina actúa como ácido.

La naturaleza ácida se manifiesta en toda su extensión en solución fuertemente alcalina y la naturaleza alcalina en solución fuertemente ácida. En solución acuosa el aminoácido se comporta como un electrólito débil.

Un anfólito, como es de suponerse, tiene dos constantes de disociación: Una ácida y otra básica.

El valor de las dos constantes nunca es igual, de manera que en solución acuosa el anfólito será más ácido que alcalino y viceversa. Cuando (como ocurre en la mayor parte de los aminoácidos y proteínas) el anfólito se disocia más como ácido que como base, es posible disminuir el pH hasta que la disociación ácido sea igual a la básica, en cuyo caso la concentración de los iones ácidos

y básicos del anfólito serán iguales. En estas condiciones se dice que el anfólito está en su "punto isoelectrico" y presenta propiedades especiales, tales como un mínimo de solubilidad y conductibilidad eléctrica.

Prácticamente se puede determinar el punto isoelectrico utilizando estas propiedades. Así tenemos que ciertas proteínas y aminoácidos como la caseína, la cistina y la tirosina son prácticamente insolubles en su punto isoelectrico. Esta propiedad también se utiliza para separarlos de otras sustancias. Colocados en un campo eléctrico (corriente directa) las proteínas o aminoácidos a un pH más alcalino que su punto isoelectrico migran hacia el polo positivo y a uno más ácido hacia el polo negativo.

Las proteínas son pues, como ya se dijo, electrólitos anfóteros es decir sustancias que pueden actuar como ácidos o como bases débiles. Debido a esta propiedad tendrán dos constantes de disociación: Una ácida y otra básica. Los valores de estas constantes son muy pequeñas y conociéndolos se puede calcular su punto isoelectrico, es decir el valor de pH al cual presentan, entre otras propiedades, un mínimo de conductibilidad eléctrica.

En las proteínas del plasma el valor de la constante ácida es siempre mayor que el de la básica, lo que nos da puntos isoelectricos que corresponden a un pH menor de 7.0.

Los puntos isoelectricos de las albúminas y globulinas son:

Albúmina: 4.86

Globulina: 5.0

Si se coloca una solución de proteínas del plasma en un campo eléctrico y en un Buffer mayor de pH 7,0 (ejemplo 8.5) todas estarán al estado de sales de ácidos débiles y migrarán hacia el polo positivo. La velocidad de migración o movilidad de los iones electronegativos de proteína depende, entre otras causas, del punto isoelectrico de las fracciones y del tamaño de la molécula. Las albúminas cuyo peso molecular (aprox. 67,000) y punto isoelectrico son menores, se moverán a mayor velocidad que las globulinas cuyo punto isoelectrico y peso molecular son mayores (p.m. aprox. 150,000). (Lo anterior es tomado de Herrarte (11) con autorización del autor). El fenómeno que hemos descrito lleva el nombre de Electrofóresis. Se llama "libre" cuando las partículas coloidales se encuentran directamente en la solución y fue el sistema originalmente usado por Tiselius, pero ofrece entre otras, la desventaja de la convención y efecto, la de ser más difícil su lectura y mayor el tiempo de realización, defectos que sumados al elevado precio del equipo han hecho que se prefiera la utilización de un "medio soporte" lo que facilita enormemente la técnica y hace más sencillos los aparatos de electrofóresis. El medio soporte es un material poroso sobre el que migran las partículas, entre los medios soportes conocidos, el que mayores ventajas ofrece es el papel filtro, de donde toma su nombre el método: ELECTROFORESIS EN PAPEL.

METODO

MATERIALES

a) Aparato de Electrofóresis de Grassman:

Consiste en una caja de plexiglass que tiene en ambos lados un depósito para la colocación del Buffer y en el fondo de los mismos sendos electrodos de platino. La

parte central del aparato sirve para colocar el sostén del papel filtro, la altura a que queda dicho sostén está calculado, de modo que los extremos de ambos lados de cada tira queden ligeramente sumergidos en el líquido. El sostén tiene capacidad para cuatro tiras de papel filtro de 12" de largo por 1½" de ancho. Toda la caja va cubierta por una tapa del mismo material, con suficiente espacio para permitir el libre juego del vapor y la consecuente saturación húmeda de la tira; tiene además en cada extremo de desajuste especial para permitir el escape de los vapores. La caja tiene un pequeño orificio en uno de sus bordes, sobre el que ajusta un saliente de la tapa el que a más de asegurarla en su posición, conecta automáticamente la corriente.

b) Transformador de Voltaje para suministro de corriente continua al aparato de Grassman. Regulable de 0 a 300 voltios.

c) Densitómetro Photovolt:

Sus elementos básicos son: Una placa de vidrio sobre la que se mueve la tira de papel traccionada por un pequeño rotor. Bajo la placa de vidrio hay una lámpara de filamento recto, cuya luz pasa por una hendidura. Encima de la tira queda la celda fotoeléctrica que es excitada por la luz de lámpara descrita que ha logrado pasar a través de la tira.

d) Un inscriptor de gráficas de respuesta variable VARICORD, que se ajusta el densitómetro para inscribir la curva.

e) Espectrofotómetro de Beckman. (Cuando se sigue el método de elución).

f) Horno.

- g) Papel filtro corriente en pliegos, para secado.
- h) Papel filtro No. 1 de la casa Whatman, de 12" de largo por 1½" de ancho.
- i) Colorante. Negro de Anilina o Amidoschwarz.
- j) Mezcla de lavado.
 - Acido acético glacial 50 cc.
 - Agua destilada 100 cc.
 - Alcohol etílico a 86° 300 cc.
- k) Buffer de Veronal 8.6, casa Harleco. Fuerza Iónica: 0.075.
- l) Eluyente: Alcohol metílico —
 - aa

Buffer de Veronal (Cuando se sigue el método de elución).
- m) Bateas, tubos de ensayo, pipetas y demás objetos de uso común en laboratorio.
- n) Aceite mineral, éter y demás materiales de uso común en laboratorio.

TECNICA

1.—En una batea con Buffer (el mismo tipo de Buffer se usa en todo el trabajo), se mojan durante unos minutos 4 tiras de papel filtro, que es el máximo que puede ponerse en el aparato usado por nosotros, luego se secan con papel filtro corriente, por presión simple para no lastimarlas.

2.—Se colocan las tiras en el sostén del aparato de Grassman, cuidando que todas queden en posición simétrica y debidamente tensas para lo cual se fijan cuidadosamente sus extremos, doblándolos sobre la base del soporte.

3.—El suero, extraído con jeringa y aguja secas, se coloca sobre uno de los extremos de la tira, a todo lo ancho, cuidando que la cantidad quede lo mejor repartida posible a lo largo de la aplicación y que la cantidad total de la misma sea la adecuada, pues tanto el exceso como el defecto de cantidad da malos resultados. La aplicación puede hacerse con una pipeta de 10 lambdas o con un pincel delgado; en nuestra técnica hemos empleado estos dos sistemas. El grosor de la aplicación debe ser aproximadamente de unos 3 mm. a todo lo ancho de la tira.

4.—Se coloca el sostén dentro del aparato, se tapa éste y se gradúa el transformador a 125 voltios y 6 miliamperios. Se deja trabajar durante 12 horas; al final de este tiempo se invierte la polarización del aparato por medio de un botón especial que tiene para el efecto y se deja durante 5 minutos a 250 voltios, con esto se logra una mejor compactación de las fracciones. El sistema de seis horas a 250 voltios no ha dado buenos resultados, teniendo además la incomodidad de necesitar refrigeración para evitar el excesivo calentamiento y la consecuente desnaturalización de las proteínas. (Herrarte. C.P.)

5.—Se saca el sostén y se coloca con las tiras en el horno a 100° C. durante media hora para secar los papeles. Se deja enfriar el horno y se sacan las tiras.

6.—Se colocan en una batea y se lleva a cabo la tinción con el Negro de Anilina, dejándolas cubiertas durante 25 minutos.

7.—Se recoje el colorante e inmediatamente sin dejar que se sequen las tiras se cubren con la mezcla de lavado durante unas cuatro horas, cuando ya no suelte más colorante se cambia nuevamente la mezcla y así hasta que la porción de la tira donde no hay proteínas, se acerque al blanco.

8.—Se ponen a secar las tiras dejando que escurra la mezcla de lavado.

9.—Se procede a realizar cualquiera de los dos sistemas de medición: Densitografía o Elución. Nosotros seguiremos en la descripción el orden seguido en la mayor parte de nuestros casos, en los que utilizamos la misma tira para los dos cálculos, con el objeto de reducir lo más posible el margen de error o diferencias entre los dos sistemas al usar tiras distintas.

9.—Desintografía. Se dejan las tiras cubiertas por aceite mineral durante media a una hora y luego se seca el exceso con papel filtro. Se coloca en el densitómetro y se deja que el Inscriptor acoplado marque la curva. Una vez obtenida ésta se separan las distintas fracciones por medio de líneas verticales y se lleva a cabo la integración de áreas, la cual se puede hacer por conteo de cuadros (de fatigosa realización), por planimetría, sistema más recomendable, o pesando las fracciones una vez cortadas.

10.—Elución. Se quita el aceite de las tiras por medio de éter y luego separando las fracciones y cortándolas se colocan en tubos de ensayo que contienen 10 cc. de eluyente.

Se colocan los tubos a 37° C. y luego se determina la densidad óptica de cada muestra en el espectrotómetro, usando como "blanco" una solución de 10 cc. de eluyente

a la cual se ha agregado pedazos de papel de la porción de la tira libre de proteínas, de la misma superficie de cada fracción. Este "blanco" ha sido incubado juntamente con las muestras.

ESTUDIO EN INDIVIDUOS NORMALES

Para realizar este estudio se escogieron cincuenta personas de población estudiantil universitaria y de individuos de clase económica media. En ambos sectores se tomaron muestras indiferentemente de hombres y de mujeres. Las edades generalmente comprendidas entre los 18 y los 30 años.

Los primeros estudios sirvieron para ir depurando la técnica y escogiendo el método más práctico que nos habría de servir en adelante. Entre este tipo de estudios están: La forma de aplicación de la muestra, la cantidad de suero a usar en cada una de las mismas; los tiempos de tinción y de lavado; el tiempo de aplicación de la corriente eléctrica y sus variaciones de voltaje; la forma de aceitar la tira; de cortar las fracciones para la elución; de corregir las inscripciones en el aparato Varicord y muchas más que sería cansado repetir aquí. Sirva esta aclaración, únicamente, para explicar el hecho de que una gran cantidad de casos se consumió en este tipo de pruebas e investigaciones experimentales previas, haciendo imposible en muchos casos su utilización en los estudios estadísticos posteriores.

Los estudios estadísticos se llevaron a cabo de la siguiente manera: Un grupo de 32 casos se estudió únicamente por el método de elución, mientras que otro grupo de 19 casos se estudió por el método de desintometría-planimetría comparándolos al mismo tiempo con el método de elución y estableciendo un coeficiente de correlación

entre ambos. Se hicieron tres correcciones distintas en el método desitometría-planimetría y cada una de las mismas se comparó matemáticamente con los resultados de la elución. La misma tira se utilizó en los dos métodos, siguiendo el orden descrito en la página (18) (Técnica de este trabajo.

TABLA I

Valores promedios y Desviación Standard de las diversas fracciones proteínicas del suero, empleando el método de la Elución.

	Albúmina	Alfa 1 G1	Alfa 2 G1	Beta G1	Gamma G1
Promedio	59.4	3.4	7.7	9.8	19.7
D. St.	9.0	1.6	2.7	2.9	4.6

No. de Casos: 32 (Normales)

TABLA II

Valores promedios y Desviación Standard en cada una de las fracciones proteínicas del suero por el método de Densitometría-Planimetría y por el método de la Elución. Test de diferencias de las distintas correcciones y Coeficiente de correlación entre cada una de las correcciones y el método de la Elución.

Número de muestras: 19.

ALBUMINA

	Corrección 3	Corrección 6	Corrección 9	Elución
Promedio	56.7	60.7	62.0	57.0
Desv. St.	3.2	5.0	5.6	10.7
Test de Dif.	0.15	1.35	1.84	
Coef. de Corr.	0.389	0.0057	0.0606	

Fracción ALFA 1 GLOBULINA

Promedio	4.6	4.0	3.9	3.2
D.S.	1.2	1.1	1.0	1.6
Valor de t.	3.73++	1.96	1.85	
Coef. de Corr.	0.335+	0.156	0.234	

Fracción ALFA 2 GLOBULINA

Promedio	9.4	8.4	8.0	8.3
D.S.	2.1	1.8	1.7	3.2
Valor de t.	1.47	0.16	0.44	
Coef. de Corr.	0.381+	0.338+	0.447+	

Fracción BETA GLOBULINA

Promedio	11.3	10.0	9.8	11.0
D.S.	2.2	1.7	2.1	3.1
Valor de t.	0.54	1.47	1.49	
Coef. de Corr.	0.500++	0.389+	0.170	

Fracción GAMMA GLOBULINA

Promedio	18.0	16.8	16.2	20.4
D.S.	3.2	3.8	4.2	5.1
Valor de t.	1.79	2.49+	2.95++	
Coef. de Corr.	0.0661	0.018	0.102	

Proteínas Totales en las 19 muestras. Método: Biuret.

Promedio	7.47	(grm.x 100)
D. Standard	0.84	
Coeficiente de Correlación para niveles de significación estadística.	d.f. 36	5% = 0.321
		1% = 0.413
Valor de "t" para niveles de significación estadística	d.f. 36	5% = 2.028
		1% = 2.719

d.f. = grados de libertad.

DISCUSION

Los resultados no son todos parejos a pesar del gran cuidado puesto al realizar todos y cada uno de los detalles de la técnica, esto es debido a una serie de causas imposibles de eliminar, entre ellas: La desnaturalización de las proteínas ocasionada a veces por la temperatura elevada del horno, las horas de estar extraída la muestra de suero, la cantidad variable de suero que lleva cada tira, el tiempo de estar hechas las mezclas de lavado y tinte, etc. Todos estos problemas son confrontados por todos los investigadores (3, 6, 25).

A pesar de lo anteriormente expuesto y de las naturales diferencias de medio y técnicas empleadas, nuestros resultados concuerdan con los obtenidos por investigadores de otros países; a continuación damos una tabla

de valores promedios de 36 estudios publicados, sobre Electroforesis en Papel y 18 sobre Electroforesis Libre. (6)

TABLA III

Electroforesis Libre	Electroforesis en Papel		Resultados obtenidos por nosotros (Tabla II Corr. 6)
	Promedio	Promedio	Promedio
Albúmina	58.9	59.2	60.7
Alfa 1 G1.	5.4	4.1	4.0
Alfa 2 G1.	9.3	8.4	8.4
Beta G1.	13.4	11.4	10.0
Gamma G1.	13.2	16.6	16.8

Como puede verse por la Tabla III, nuestros valores tienen una enorme similitud con los obtenidos por otros autores en distinto medio.

A continuación damos una tabla comparativa de los valores obtenidos en nuestro medio por diferentes métodos en investigadores.

NOTA: Las tablas dadas arriba a excepción de la última columna han sido tomadas de Harry C. Ehermantraut (6).

TABLA IV

Método Químico Castellanos (20) % relativo	Electrofóresis Libre Escobar (5, 13) % relativo	Electrofóresis En Papel Datos nuestros % relativo
Albúmina	57.9	60.7
Alfa 1 Glob.	5.8	4.0
Alfa 2 Glob.	14.3	8.4
Beta Glob.	12.1	10.0
Gamma Glob.	15.7	16.8

Como puede observarse por las tablas anteriores, tanto en nuestro medio como fuera de él los resultados tienen bastante similitud aunque los métodos empleados sean absolutamente distintos.

De nuestra propia técnica diremos, que ambos métodos utilizados, Densitografía-Planimetría y Elución son recomendables, sin embargo hay que hacer la siguiente diferenciación: El eluado tiene la ventaja de la rapidez, por lo cual es bastante más cómodo, además es más trabajoso llevar a cabo la planimetría que la lectura rápida en el espectrofotómetro. La Densitografía en cambio tiene como ventajas: El poder guardar la tira una vez densitografiada para realizar nuevos controles o probar distintas correcciones en el aparato Varicord.. El análisis de los promedios obtenidos con las distintas correcciones en Densitografía-Planimetría y en Elución determina que: La corrección 6 es la más similar a los datos promedios obtenidos en más de 36 estudios de Electrofóresis en Papel publicados por diferentes autores (6). Comparati-

vamente con la elución la corrección más ajustada es en cambio la 3 que tiene el más alto coeficiente de correlación. (Tabla II).

Para dejar más claro este capítulo, reproducimos al final algunas de las tiras obtenidas con nuestra técnica y sus correspondientes curvas densitográficas. (Láminas 1 y 2).

Como es ya sabido las proteínas fraccionan según su diferente velocidad de migración (pág.), siendo las que más avanzan en la tira, las albúminas, dado su menor tamaño molecular y su punto isoeléctrico menor; las fracciones globulínicas son las que menos avanzan dados su tamaño mayor y su punto isoeléctrico más elevado. En los casos normales, como en los que se reproducen en la lámina 1, las distintas fracciones tienen una apariencia aproximada a como se describen a continuación: La albúmina da la marca más neta y generalmente la más intensa en la coloración, tiene un grosor aproximado de 12 mm. Le sigue la fracción Alfa 1 Globulina difícil de diferenciar claramente pues se halla siguiendo inmediatamente a la Albúmina de tal manera que en la mayor parte de los casos se confunden sus bordes. A continuación está la fracción Alfa 2 globulina, aproximadamente de unos 8 mm. claramente diferenciable así como la Beta globulina que le sigue y con la cual tiene mucha similitud, ésta última dió en varios casos resultados idénticos a la Alfa 2 en las densitografías. La última fracción es la Gamma globulina, la más ancha de todas (aprox. 20 mm.) y de una intensidad de coloración muy bien definida.

Hemos hecho la aclaración anterior para que pueda servir de guía a quien experimente por vez primera estas técnicas y tenga dudas acerca de sus resultados. Desde luego la descripción dada tiene un margen amplio de

variación, pero sí conserva sus características sobresalientes. Este patrón sí está completamente alterado en los casos patológicos como podrá verse más adelante (Lámina 3).

ESTUDIO EN CASOS PATOLOGICOS

El presente estudio fue llevado a cabo en 37 pacientes de clientela particular y de los Servicios de Medicina de Hombres del Hospital General. Los resultados se dan por el método de Elución. Seguidamente de cada cuadro se da una corta descripción de las variaciones encontradas así como una suscita discusión clínica.

TABLA V

Estudio de 7 casos de CIRROSIS por el método de ELUCION.

Casos	Albúmina	Alfa 1 Gl.	Alfa 2 Gl.	Beta Gl.	Gamma Gl.	Prot. Tot.
	% rel.	% rel.	% rel.	% rel.	% rel.	gm x 100
2	59.8	0.6	1.8	3.4	34.4	6.6
3	44.4	4.5	12.6	8.6	29.9	7.1
3	44.5	4.5	12.6	8.6	29.9	7.1
4	54.3	2.7	9.7	2.6	30.7	6.8
5	19.7	4.0	9.2	11.6	55.5	5.5
6	28.6	4.8	8.8	10.5	47.3	7.3
7	32.7	1.8	1.8	8.9	54.8	4.5

Como se puede apreciar hay bastantes variaciones en todas las fracciones. pero sí pueden determinarse claramente dos alteraciones básicas: Un aumento moderado o marcado de las Gamma globulinas y una disminución igualmente moderada o intensa de la Albúmina. Según Fasoli (6) tanto en la Hepatitis como en la Cirrosis se encuentra la fracción Alfa 2 globulina severamente disminuida, lo que concuerda con nuestros casos 1, 2 y 7 de la Tabla V, especialmente estos dos últimos. Las diferencias de intensidad en el aumento de las Gamma globulinas y la consiguiente disminución de la Albúmina, así como la baja marcada en las proteínas totales, coincide con las condiciones patológicas de la enfermedad o sea con lo avanzado que se encuentre ésta o con la gravedad especial de cada caso. La disminución progresiva marcada de la Albúmina determina según Post y Patteck (22) un agravamiento del pronóstico.

TABLA VI

Estudio de dos casos de Hepatitis. Método: Elución

Casos	Albúmina	Alfa 1 Gl.	Alfa 2 Gl.	Beta Gl.	Gamma Gl.	Prot. Tot.
	% rel.	% rel.	% rel.	% rel.	% rel.	gm x 100
1	34.7	5.7	10.3	16.7	32.6	8.0
2	23.4	3.7	5.2	67.7		8.0

En los casos de la Tabla VI encontramos una elevación marcada de las Gamma globulina que arrastra en parte a las Beta Gl siendo imposible en uno de los casos encontrar la línea de separación entre ambas fracciones. El aumento marcado de las Gamma Gl parece ser el fenómeno más constante de esta afección, sin embargo la

elevación que nosotros encontramos en las Beta está confirmado por otros autores, entre ellos McNeil (23) quien afirma que en los estadios iniciales de la enfermedad hay un aumento de las lipoproteínas de la fracción Beta, así mismo si después se encuentra una disminución marcada de la fracción Alfa G1., como en la Cirrosis, esto indica un serio trastorno de la función Hepática. Nosotros podemos agregar como dato de interés, que es notorio el aumento de las proteínas totales en estos pacientes, lo que unido a los datos anteriores ayudará a resolver los problemas diagnósticos y pronósticos.

F. W. Sunderman e hijo afirman (24) que lo que diferencia el patrón de la Cirrosis del de la Hepatitis es: Que si bien en ambas hay un aumento de la fracción Gamma G1, en la primera las Albúminas se hayan muy disminuidas mientras que en la segunda las Albúminas se encuentran en los límites normales y la fracción Alfa 1 G1. se haya deprimida. Ninguno de los últimos dos datos concuerdan con nuestros casos.

TABLA VII

Estudio de 6 casos de NEFROSIS. Método: Elución.

Casos	Albúmina	Alfa 1 G1.	Alfa 2 G1.	Beta G1.	Gamma G1.	Prot. Tot.
	% rel.	% rel.	% rel.	% rel.	% rel.	gm. x 100
1	61.4	2.4	6.2	7.2	22.8	8.4
2	48.0	6.0	13.8	12.2	20.0	6.0
3	35.3	2.7	16.0	6.2	39.8	4.3
4	49.7	7.9		30.0	12.4	5.2
5	27.3	4.4		56.1	12.2	3.9
6	65.0	3.0	8.4	9.5	14.1	6.5

Como puede verse en la tabla VII hay casos de Nefrosis con porcentajes normales de Albúmina y casos con exagerada disminución de ella. El dato más significativo de esta afección parece ser el marcado aumento de la fracción Alfa 2 G1. (Casos 2, 3, 4 y 5); dicho aumento es en algunos casos tan marcado no sólo en intensidad de saturación (cantidad aumentada) sino también en el espacio que ocupa normalmente en la tira (pág. y láminas 1 y 2), que incluso irrumpe en la fracción siguiente haciendo imposible la separación de ambas (Alfa 2 y Beta G1s.), ver láminas 3 y 4.

Esta alteración de la fracción Alfa 2 concuerda con la hallada por Longsworth y colaboradores (4). Concordando con las bajas notables de Albúmina, las proteínas Totales se encuentran igualmente bajas, casos 3 y 5. Este doble signo parece hallarse en relación con lo avanzado del proceso morboso.

TABLA VIII

Estudio de un caso de NEFRITIS AGUDA. Método: Elución.

Casos	Albúmina	Alfa 1 G1.	Alfa 2 G1.	Beta G1.	Gamma G1.	Prot. Tot.
	% rel.	% rel.	% rel.	% rel.	% rel.	gm. x 100
1	44.3	5.4	12.2	8.0	30.1	7.9

Se observa en este único caso el aumento de la fracción Alfa 2 G1., marcado aumento de la Gamma G1. y disminución de la Albúmina. (Ver Láminas 3 y 4).

TABLA IX

Estudio de 3 casos de NEFRITIS CRONICA. Método Elución.

Casos	Albúmina	Alfa 1 Gl.	Alfa 2 Gl.	Beta Gl.	Gamma Gl.	Prot. Tot.
	% rel.	% rel.	% rel.	% rel.	% rel.	gm. x 100
1	64.8	6.2	10.9	8.2	9.9	5.3
2	36.8	5.8	13.8	19.5	24.1	5.8
3	41.7	4.5	16.0	9.2	28.6	5.0

Se encuentra en la Nefritis Crónica una elevación de la fracción Alfa 2 Gl., con disminución, en dos casos, de la Albúmina concordando con una elevación marcada de las Gamma Gl.

Según ha podido observarse es común a las enfermedades renales estudiadas en este trabajo una elevación de la fracción Alfa 2 Gl., ya sean enfermedades agudas o crónicas, concuerdan nuestros datos con los de otros observadores (6, 24). A pesar de las alteraciones descritas, algunos autores han encontrado en fases finales de Nefritis, una distribución, en las fracciones, igual o muy parecida a la normal (4). Luescher (6) pudo demostrar por medios químicos y por la ultracentrífuga que una gran porción de la fracción Alfa 2 Gl., anormal no era sino una lipoproteína. Es importante hacer constar que varios autores coinciden en afirmar que el patrón de estas enfermedades es quizás el más constante y marcado de todos los logrados por electrofóresis en casos patológicos, esto es su albúmina plana y la Alfa 2 Gl., elevándose enormemente (6, 4) ver láminas 3 y 4, del presente trabajo.

TABLA X

Estudio de un caso de LINFOMA LINFOBLASTICO. Método: Elución.

Casos	Albúmina	Alfa 1 Gl.	Alfa 2 Gl.	Beta Gl.	Gamma Gl.	Prot. Tot.
	% rel.	% rel.	% rel.	% rel.	% rel.	gm. x 100
1	54.0	4.2	9.4	14.5	17.9	5.8

El único caso que reportamos de Linfoma no presenta alteraciones típicas, si acaso una leve disminución de la Albúmina. Hay disminución de las proteínas totales. Nosotros no encontramos la disminución de las fracciones Alfa 2 Gl. y Gamma Gl., descrita por Teitelbaum y Colaboradores (47).

TABLA XI

Estudio de 2 casos de MIELOMA. Método Elución.

Casos	Albúmina	Alfa 1 Gl.	Alfa 2 Gl.	Beta Gl.	Gamma Gl.	Prot. Tot.
	% rel.	% rel.	% rel.	% rel.	% rel.	gm. x 100
1	51.6	1.4	7.1	5.5	34.4	10.0
2	37.3	3.0	8.4	6.5	44.8	8.6

El aumento de las Gamma Gl., es perfectamente manifiesto en los dos casos expuestos de Mieloma múltiple, así como el exagerado aumento de las proteínas totales. Esta alteración puede observarse claramente en las láminas 3 y 4. Los cambios electroforéticos de esta enfermedad son tan constantes que aparte de un solo caso reportado por Sunderman e hijo (24) los hallazgos de dicho autor y de varios otros, (Adams, Osserman y Lawler (6))

que suman más de un centenar de casos clínicos arrojan una cifra de 100% de alteraciones electroforéticas, lo que no sucedió con otros métodos diagnósticos como el hallazgo de Anemia, Hiperglobulinemia, proteínas Bence-Jones, etc. A la proteína anormal del Mieloma en electrofóresis se le llama proteína "m". Además de las alteraciones en las proteínas del suero se han encontrado anomalías en las glico y lipoproteínas por Sachs y colaboradores y Magalini y colaboradores (6) ya sea por ultracentrífuga, por métodos químicos o por electrofóresis en papel.

Aparte de las alteraciones descritas, encontramos una disminución de la fracción Alfa 1., concordando con los datos de Magalini y Col. (6) así mismo están de acuerdo nuestros datos con los de Teitelbaum y Col. (47) en lo referente a la elevación de la fracción Gamma G1., no así en lo referente a la fracción Alfa 1 G1., la cual encuentran ellos elevada y nosotros, como ya dijimos, disminuida.

Parece ser que la alteración más común en el Mieloma es el aumento de las Gamma G1., sin embargo esto no es constante, encontrándose en ocasiones la proteína "m" ocupando la porción de las Beta G1. Según sea la localización de esta proteína "m" se le denominará "Beta Mieloma" o "Gamma Mieloma".

TABLA XII

Estudio de 3 casos de AGAMAGLOBULINEMIA. Método: Elución.

Casos	Albúmina	Alfa 1 G1.	Alfa 2 G1.	Beta G1.	Gamma G1.	Prot. Tot.
	% rel.	% rel.	% rel.	% rel.	% rel.	gm. x 100
1	71.4	4.3	7.1	9.1	8.1	6.2
2	72.3	2.9	8.6	5.6	10.6	7.3
3	75.0	2.2	5.2	7.3	10.3	7.2

Como su nombre lo indica la Agamaglobulinemia determina una alteración de la última fracción globulínica, indicativa teóricamente, de su absoluta carencia. El nombre le fue dado por Bruton en 1952, después de estudiar algunos casos de niños que se infectaban fácilmente; encontró carencia completa de la fracción Gamma G1. lo que le valió el nombre con que se la conoce actualmente. Sin embargo posteriormente se encontraron otros tipos de la enfermedad que difieren en algunos aspectos de la descripción original hecha por Bruton. Las diferencias parecen estar ligadas a la etiología de la enfermedad. Actualmente se aceptan: La Agamaglobulinemia genética, que corresponde a la descripción clásica de Bruton; Agamaglobulinemia por retardo de desarrollo; Agamaglobulinemia asociada con hipoproteinemia generalizada; Agamaglobulinemia en los adultos; Hipogamaglobulinemia por pérdida de proteínas. (14)

Como no siempre se encuentra carencia completa de la fracción Gamma, sino solamente una marcada disminución de la misma es más conveniente llamarla en estos casos Hipogammaglobulinemia.

La facilidad con que se infectan las personas que padecen esta enfermedad parece deberse a que una elevada porción de anticuerpos se encuentra ligada a dicha globulina; su carencia o disminución marcada producirá lógicamente un "estado de menor resistencia", el cual será más grave mientras menor sea la cantidad existente de Gamma G1., es por esto que la más seria de todas las Agamaglobulinemias descritas es la clásica o sea la Agamaglobulinemia Genética en que no se encuentra ninguna cantidad de dicha fracción en el examen electroforético, esto es indicativo de que la cantidad circulante de la misma es menor de 75-100 mg. por cc. (14). Las investigaciones Histológicas demuestran que hay una hipogenia del te-

jido reticuloendotelial (14) razón entre otras que ha hecho admitir que sea en dicho lugar en donde se forma la Gamma G1.

Los tres casos presentados por nosotros no corresponden pues, al tipo clásico y deberán colocarse más bien dentro de las Hipogammaglobulinemias.

La fracción correspondiente a la Albúmina alcanza según puede verse en la tabla XII, una marcada elevación en todos los casos. Las restantes fracciones globulínicas están dentro de los límites normales.

TABLA XIII

Estudio de un caso de ARTRITIS. Método: Elución.

Casos	Albúmina	Alfa 1 Gl.	Alfa 2 Gl.	Beta Gl.	Gamma Gl.	Prot. Tot.
	% rel.	% rel.	% rel.	% rel.	% rel.	gm. x 100
1	49.0	5.2	10.3	10.8	24.7	6.8

El resultado obtenido concuerda con los de Sunderman, Jencks, Salt y otros (6): La Albúmina se encuentra disminuida y la Globulina Gamma aumentada. Cuando estos casos se encuentran siendo tratados por Cortisona puede haber un aumento de las fracciones Alfa 1 y Alfa 2 Gls., que vale la pena tomar en cuenta. (35, 41, 50).

TABLA XIV

Estudio de un caso de enfermedad de STILL. Método: Elución.

Casos	Albúmina	Alfa 1 Gl.	Alfa 2 Gl.	Beta Gl.	Gamma Gl.	Prot. Tot.
	% rel.	% rel.	% rel.	% rel.	% rel.	gm. x 100
1	40.9	4.2	7.6	7.9	39.4	8.2

Probablemente la similitud de la enfermedad de la tabla XIV con la de la anterior, haga que los resultados sean iguales, es decir: Disminución de la Albúmina y aumento de la fracción Gamma. (35, 41, 50)

TABLA XV

Estudio de tres casos de CANCER. Método: Elución.

Casos	Albúmina	Alfa 1 Gl.	Alfa 2 Gl.	Beta Gl.	Gamma Gl.	Prot. Tot.
	% rel.	% rel.	% rel.	% rel.	% rel.	gm. x 100
1	39.1	6.0	5.4	10.9	38.6	5.1
2	39.5	6.3	10.8	17.3	26.1	7.7
3	39.0	6.3	10.4	10.0	34.3	4.9

Esta última enfermedad es la que presenta indudablemente las más variadas formas electroforéticas; una diferencia de significación estadística fue encontrada por Bodansky entre cada una de las fracciones de sueros cancerosos y de adultos normales, exceptuando solamente la fracción Gamma G1. (6). A pesar de que todos los autores coinciden en afirmar que no es posible determinar un patrón definitivo para los casos de cáncer, (6, 24), se acepta que en general es posible hallar una baja más o menos constante de la Albumina y una elevación de la Globulina Gamma, algunos han encontrado también con cierta regularidad una elevación de la fracción Alfa 2 Gl. en ciertos tipos de Cáncer. La variación tan grande existentes en entre unos casos y otros parece depender principalmente de la misma complejidad de dicha enfermedad y de la diversidad de formas con que se presenta, incluyendo localizaciones, sistemas comprometidos, etc. Nosotros encontramos las dos alteraciones más comunes ya se-

ñaladas, a saber: baja de la Albúmina y aumento de la Globulina Gamma. En lugar de la alteración en la fracción Alfa 2 referida por algunos autores (6), encontramos una elevación de la fracción Alfa 1, no sólo ligeramente marcada, sino en un nivel casi idéntico en todos los casos (Tabla XV, casos 1, 2 y 3), la misma similitud puede hallarse en los niveles de Albumina de dichos casos.

Es importante mencionar que generalmente el examen electroforético se lleva a cabo cuando el paciente ya ha sido sometido a tratamientos médico-quirúrgicos, lo cual hace más difícil la valorización de la prueba; muchas veces se duda pues de la influencia directa de la enfermedad en los cambios de los niveles de cada fracción, ya que

éstos pueden deberse más a la terapéutica empleada. Ese imposible no considerar la influencia de la radioterapia, del gas mostaza o de la cirugía radical del cáncer. Aparte de las variaciones que la terapéutica pueda producir en el patrón electroforético, queda aún la duda planteada por varios autores (6), de que los cambios a que nos hemos referido puedan efectivamente deberse al cáncer y ser característicos de dicha enfermedad o simplemente el resultado de un estado general grave de los enfermos que lo padecen.

DESDOBLAMIENTO DE LA FRACCION BETA

Bajo el título arriba apuntado queremos señalar la aparición de una fracción que aún no se halla bien conocida y que parece estar ligada a ciertos procesos morbosos. Queremos dejar sentado claramente que el nombre que le hemos asignado es hasta hoy hipotético y no es más que la conclusión de un estudio comparativo de lo encontrado por otros autores y de los hallazgos nuestros y

de un razonamiento científico. Esta fracción es probablemente la misma encontrada por Stern (54) y a la que dicho autor designa con el nombre de proteína "U". Varios otros investigadores han hecho referencia a esta fracción anormal, entre ellos: Franklin (55) quien le da el nombre de globulina Gamma 1. Algunos científicos Japoneses (54) encontraron en ciertos casos de Tuberculosis una fracción similar a la que llamaron Alfa 3. Otros investigadores la han llamado componente "T" y componente "X" (54). Block (36) le ha denominado fracción Alfa 2.

El lugar en que aparece la fracción anormal es según unos autores (36, 54) entre la fracción Alfa 2 y la fracción Beta gl. y según otros (35) entre la fracción Beta G1. y la Gamma G1. A nosotros nos parece, según el sitio aparente que ocupa en la tira, así como por la distancia relativa a que se halla su pico del pico de la Albumina, que su situación es precisamente sobre la fracción Beta y si acaso ligeramente más cerca de la fracción Gamma G1. Ver lámina 4 y su correspondiente gráfica en lámina 5. Las apreciaciones de diversos autores son como puede verse muy disímiles en cuanto a su exacta posición, su denominación y así mismo en lo referente al porqué de su aparición en ciertos casos y su ausencia en otros: iguales o muy similares. En lo que parece haber alguna certeza es en la esencia de esta fracción, creyendo algunos que pueda ser una mucoproteína o una lipoproteína (35, 54).

Los datos anteriores y el haber nosotros encontrado que esta fracción está sobre la fracción Beta ya conocida o siguiéndola inmediatamente, así como el no ser claro el punto divisorio entre ambas y el de ser su apariencia tan similar que las hace aparecer como gemelas, nos ha hecho suponer que es la propia fracción Beta la que se ha "di-

vidido", este argumento también está apoyado por el hecho de que la suma de los porcentajes relativos de cada fracción (Beta 1 y Beta 2) es similar en varios casos al porcentaje de la fracción Beta, cuando la fracción patológica no existe.

Varios de los autores mencionados han encontrado esta fracción anormal en diversas enfermedades, Matsui y Tamura (54) en Tuberculosis, Block (36) en Amiloidosis Sistémica Familiar, Franklin (55) en enfermedades crónicas del Hígado y Stern (54) en niños con enfermedades hepáticas y con enfermedades renales (glomerulonefritis crónica y Síndrome Nefrótico), este último autor encontró también algunos casos ocasionalmente, en sueros de infantes y niños normales.

Nosotros encontramos la fracción aludida en varios casos de diversa índole, los que reproducimos en la tabla No. XVI.

TABLA XVI

Estudio de 7 casos en que apareció un desdoblamiento teórico de la fracción Beta. Método Elución.

Casos	Albúmina	Alfa 1 Gl.	Alfa 2 Gl.	Beta 1 Gl.	Beta 2 Gl.	Gamma Gl.
Mieloma	51.6	1.4	7.1	2.9	2.6	34.4
Nefrosis	48.0	6.0	13.8	6.0	6.2	20.0
Nefrosis	35.3	2.7	16.0	1.8	4.4	39.8
Cirrosis	59.8	0.6	1.8	2.0	1.4	34.4
Cirrosis	48.0	6.0	13.8	6.0	6.2	20.0
Cirrosis	44.4	4.5	12.6	6.0	2.6	29.9
Cirrosis	54.3	2.7	9.7	1.5	1.1	30.7

SUMARIO

El presente estudio se llevó a cabo en 19 casos normales por los métodos de ELUCION y DENSITOGRAFIA-PLANIMETRIA y en 32 casos normales por el método de ELUCION solamente.

Los resultados obtenidos concuerdan con los de otros investigadores, cualesquiera que hayan sido los métodos usados, sin embargo los resultados que damos a continuación son los que nos parecen más exactos y los cuales proponemos para valores promedios de nuestro país para el método de Electroforesis en Papel.

TABLA XVII

Valores promedios para Guatemala para el Método Electroforesis en Papel.

	DENSITOGRAFIA-PLANIMETRIA	ELUCION
Albúmina	60.7	57.0
Alfa 1 Gl.	4.0	3.2
Alfa 2 Gl.	8.4	8.3
Beta Gl.	10.0	11.0
Gamma Gl.	16.8	20.4

Los casos patológicos estudiados fueron 37, de clientela particular y del Hospital General. A excepción de 2 casos, el resto tenía record completo y diagnóstico clínico. Los dos casos sin ficha completa fueron dos sospechas de Agamaglobulinemia, una de las cuales fue con-

firmada por el análisis verificado por nosotros y la otra rechazada, ya que el análisis fue absolutamente negativo; el caso que fuera confirmado, lo fue como Hipogammaglobulinemia y fue reportado más adelante como tratado satisfactoriamente con la administración de Gammaglobulina.

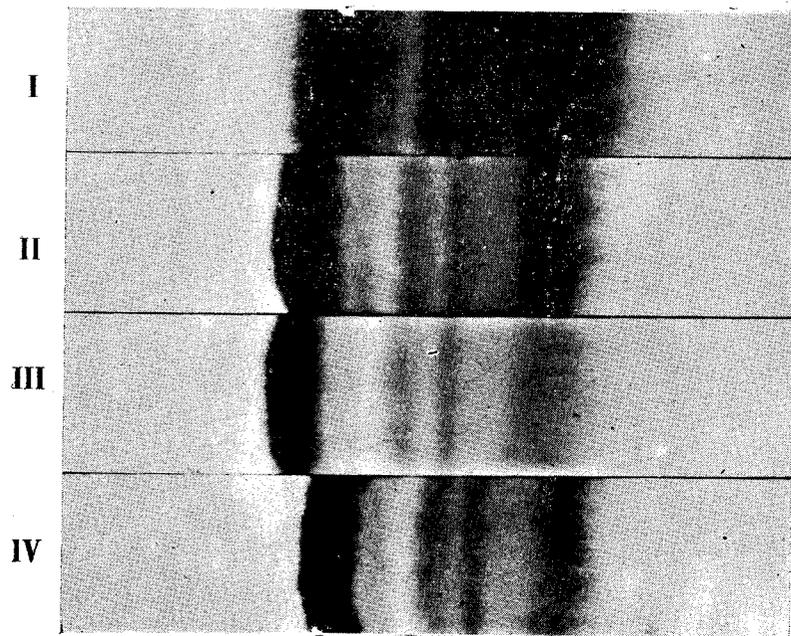
En todos los casos patológicos se confirmaron los datos de otros autores, habiendo únicamente algunas alteraciones de ciertas fracciones no claramente establecidas como características de la enfermedad.

Se puede afirmar que el método es decisivo en el diagnóstico de Mieloma, siendo además la prueba más exacta (100%). Es francamente determinante la alteración descrita de la fracción Alfa 2 en los trastornos Renales especialmente el síndrome Nefrótico. Así mismo son determinantes las alteraciones encontradas en la Hipogammaglobulinemia y en la Agammaglobulinemia. Los padecimientos crónicos y agudos Hepáticos tienen, aunque en menor escala un patrón bastante característico y lo mismo sucede con la Artritis aunque con variaciones menos marcadas aún, que en las enfermedades Hepáticas. La enfermedad que mayores dificultades presenta en definir su patrón característico es el Cáncer.

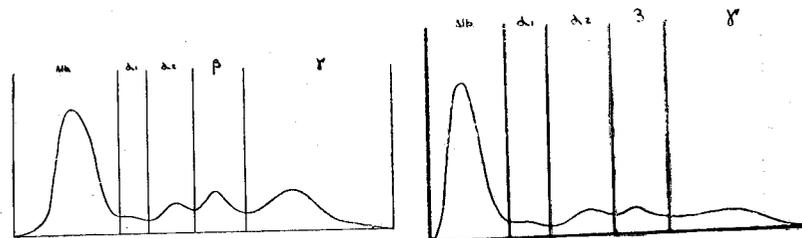
La fracción Beta 2 descrita por nosotros como un desdoblamiento de la fracción Beta original debida probablemente a la aparición en ese lugar de una proteína anormal, aunque descrita por varios autores, no presente aun un carácter definido y se presta a varias conjeturas, sabiéndose únicamente que su naturaleza es casi con seguridad la de una lipoproteína. Nosotros la denominamos Beta 2 y creemos que nos asiste el mismo derecho que a otros autores en darle un nombre aunque sea meramente hipotético.

CONCLUSION

La ELECTROFORESIS EN PAPEL ha dado, en nuestro medio, óptimos resultados tanto en la obtención de valores promedios para individuos normales, como en el estudio de casos patológicos, lo que lo hace altamente recomendable como análisis de rutina en ciertos casos y en otros como factor decisivo para el Diagnóstico diferencial. Creemos por lo tanto que será un análisis de sumo interés para el Biólogo y para el Internista.

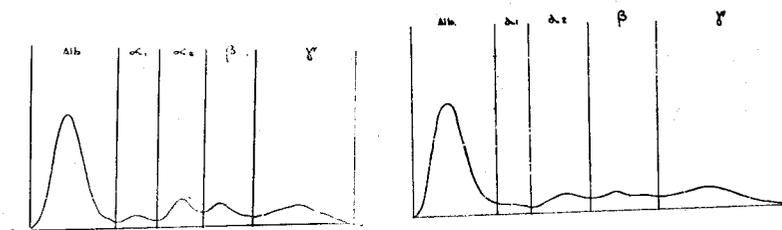


LAMINA 1. Tiras de fraccionamiento protéinico Normal.



I) Enfermedad de Still.

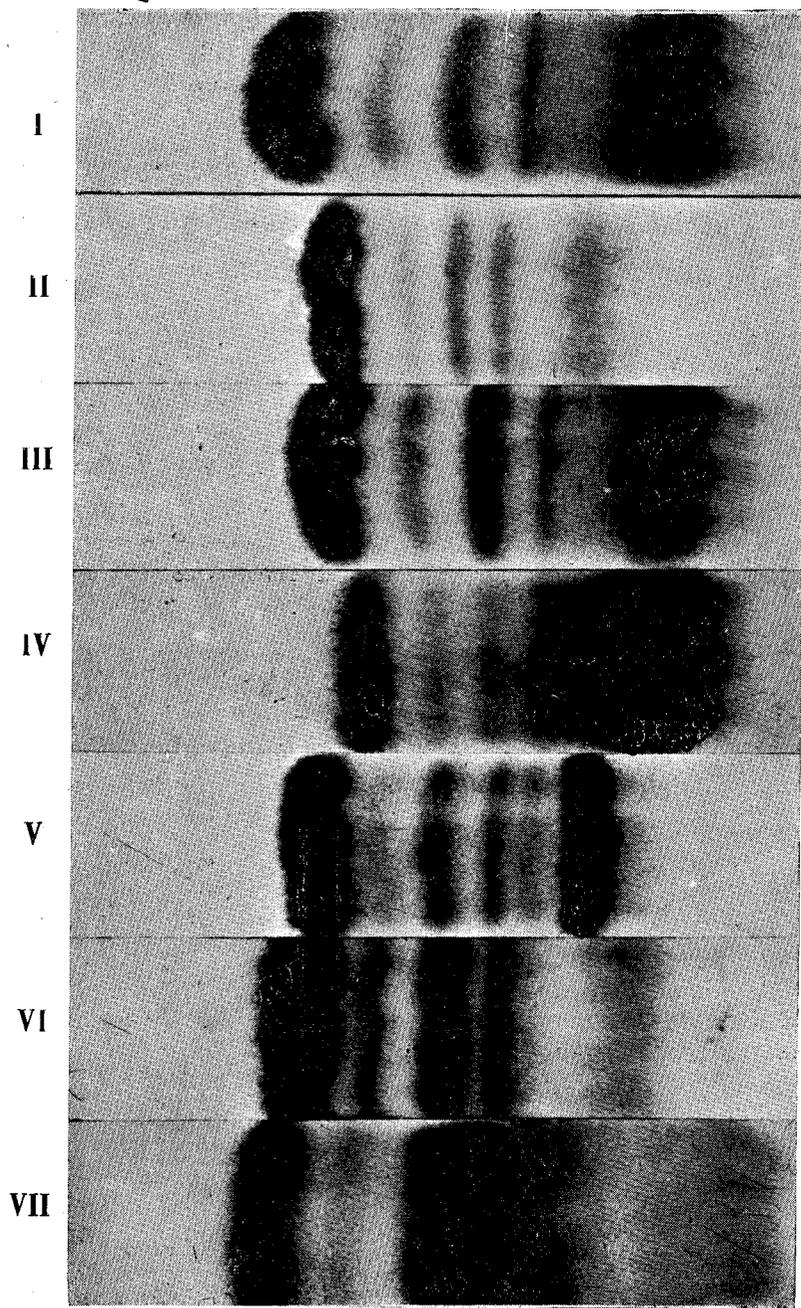
II) Linfoma Linfoblástico.



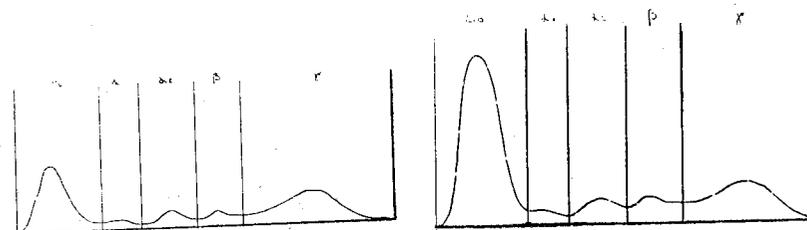
III) Nefritis Aguda.

IV) Cirrosis.

LAMINA 2. Gráficas de fraccionamiento protéinico Normal.

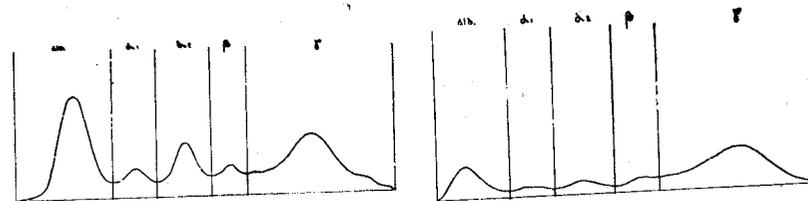


LAMINA 3. Tiras de fraccionamiento Proteínico Anormal.



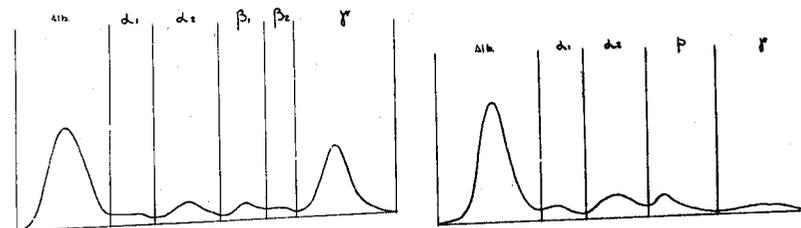
I) Enfermedad de S&SII.

II) Linfoma Linfoblástico.



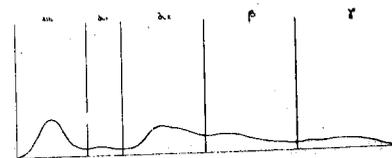
III) Nefritis Aguda.

IV) Cirrosis.



V) Gamma Mieloma.

VI) Agamaglobulinemia.



VII) Síndrome Nefrótico.

LAMINA 4. Gráficas de fraccionamiento Proteínico Anormal.

Bibliografía:

1.—Ch. Wunderly. La Electrofóresis en Papel. Editorial Científico-médica. Barcelona-Madrid-Lisboa-Rio de Janeiro. 1956.

2.—Paper Chromatography. Richard Block, Raymond Le Strange and Gunter Zweig. Academic Press Inc. Publishers. New York 1952.

3.—Electrophoresis of Proteins. Abramson, Margot Gorin. Reinhold Publishing Corporation. 1942.

4.—A Manual of Paper Chromatography and Paper Electrophoresis. Block, Durrum, Zweig. Academic Press Publishers. New York 1955.

5.—Estudio de Proteínas Séricas en grupos normales y en diversos casos Patológicos por Microelectroforesis. Carlota Escobar. Imprenta Universitaria. 1952, Guatemala.

6.—The Clinical significance of Paper Electrophoresis. Herman C. Ehrmantraut. Distribuido por Aloe Scientific.

7.—Niveles de itaminas y Proteínas. Valores Hematológicos y hallazgos parasitológicos en diversos grupos de población. Méndez de la Vega, Guzmán, Aguirre. Revista del Colegio Médico, Vol. III, 1951. Reproducido publicaciones periódicas INCAP.

8.—The interpretation of Human Serum Proteins Values in Central America and Panama. Scrimshaw, Guzman, Mendez de la Vega. Am. J. of Trop. Med. 31, 1951.

9.—Presumptive false Positive Serologic Reaction for Syphillis in Central America. Stout, Mendez de la Vega, Guzman. Am. J. of Syph G. and V.D. Vol. 36, 1952.

10.—Uso del método del Biuret en la determinación de Proteínas Séricas y sus fracciones. Revista del Colegio Médico. VIII, 1957.

11.—Fundamentos de Química Biológica. Enrique Herrarte. Tip Nac. Guatemala, C. A. 1948.

12.—Estudios Nutricionales en un grupo de niños guatemaltecos de un mes a un año de edad. Revista del Colegio Médico. I y GII, 1955.

13.—Estudios Microfotoeléctricos de las proteínas séricas en grupos normales de la ciudad de Guatemala y en Diversos casos Patológicos. Escobar, Méndez de la Vega. Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana. Julio 1953.

14.—Agamaglobulinemia. N. H. Martin. Londres. Revista "Triangulo", II, 297, 1957.

15.—Rapid Microelectrophoresis of Serum Total Proteins and Lipoproteins. B. Zak y Col. American Jour. of Clinical Pathology 31, 559.

16.—Tris (hiproxymethyl) aminomethane as an Electrophoresis Buffer. Robert D. Rapp and M. M. Memminger. Amer. Jor. of Gl. Path. 31, 400.

17.—Paper Electrophoresis of Serums from apparently Normal Adults by a Standardized Method. Vernon N. Dodson y Col. American Journal of Clinical Pathology. 31, 404.

18.—The occurrence of Pas Positive Protein Fraction in Paper Electrophoresis of Serum Myelomatosis.

19.—Uso del método del Biuret en la determinación de Proteínas Séricas y sus fracciones. Castellanos, Méndez de la Vega.

20.—Estudio de las proteínas del suero y sus fracciones en grupos normales de la ciudad de Guatemala. Castellanos.

21.—A. Tiselius Trans. Faraday Soc. 33, 524 (1937).

22.—J. Post and A. J. Patteck. Serum Proteins in Cirrhosis of the Liver Relation to Prognosis and to formation of Ascitis. Arch. Inter. Med. 69, 67-82 (1942).

23.—C. McNeil. Notations on Clinical Interpretations of Paper Electrophoresis. Holy Cross. Research Foundation. Salt Lake City, Utah.

24.—F. W. Sunderman and F. W. Sunderman Jr. Clinical Application of the Fractionation of Serum Proteins by Paper Electrophoresis. Am. J. Clin. Path., 27, 125-158. (1957).

- 25.—Dale M. Shulz. Effects of Heat on the Electrophoretic Pattern of Human Serum Proteins. 31, 9. (1959).
- 26.—F. W. Sunderman y Col. Studies of the Serum Proteins. II. The Nitrogen Content of Purified Serum Proteins Separated by Continuous Flow Electrophoresis. American Jour. of Cl. Pathology. 30, 112 (1958).
- 28.—A. Paul Keibel and J. L. Arbogast. Electrophoresis Technics. An Inexpensive Stabilized Power Supply. Amer. Jour. of Cl. Pathology. 30, 126. (1958).
- 29.—Studies in Serum Proteins. I The Chemical Estimation of Albumin and of the Globulin Fractions in Serum. Charence Cohn and W. Quitman Wolfson. The Journal of Lab. and Cl. Medicine. 32, 1203. (1947).
- 30.—Studies in Serum Proteins. VI. The Extension of the Standard Biuret Method to the Estimation of Total Proteins in Urine. P. Foster y Col. The Jour. of Lab. and Cl. Medicine. 39, 618. (1952).
- 31.—The Electrophoresis of Serum and other Body Fluids in Filter Paper. Louis Griffiths y Col. The Jour. of Lab. and Cl. and Medicine. 41, 188. (1953).
- 32.—Turbidimetric Gamma Globulin determinations in Hepatobiliary Diseases Hans Popper y Col. The Jour. of Lab. and Cl. Medicine. 35, 391. (1950).
- 33.—Studies in Serum Proteins. II. A Rapid Clinical Method for the Accurate Determination of Albumin and Globulin in Serum or Plasma. Cl. Cohn ad W. Quitman Wolfson. 33, 367. (1948). The J. of L. & C.M.

- 34.—A comparative study of the Serum Albumin-Globulin Ratio, the Cephalin Colesterol Flocculation, and the Thymol Turbidity Tests for Liver function. A. C. Kibric and A. B. Clements. The Journal of Lab. and Clinical Medicine. 33, 662. (1948).
- 35.—Electrophoretic Studies on the Serum of Rheumatoid Arthritis Treated with Cortisone. E. L. Hess y Col. The Journal of Lab. and Cl. Medicine. 38, 526. (1951).
- 36.—Serum Electrophoretic Studies on Patients With Familial Primary Systemic Amyloidosis. W. D. Block y Col. The Journal of Lab. and Cl. Medicine. 47, 357. (1956).
- 37.—The effect of Plasma Transfusion and Treatment with Corticotropin on the Electrophoretic Patterns in Serum and Urine of Children With Nephrotic Syndrome. G. B. Stickler y Col. The Journal of Lab. and Cl. Medicine. 47, 392. (1956).
- 38.—Paper Electrophoretic Survey of Hemoglobins of American Indians. D. L. Rucknagel. 49, 896. (1957). The Journal of Lab. and Cl. Medicine.
- 39.—Hipergammaglobulinemia, Circulating Anticoagulant, and Biologic False Positive Wasserman Reaction. A. B. Laurell and I. M. Nilsson The Journal of Lab. and Cl. Medicine. 49, 694. (1957).
- 40.—Correlative Studies of Serum Proteins, Lipoproteins and Glycoproteins in Inborn disorders of Lipid Metabolism E. Sohar y Col. The Journal of Lab. and Cl. Medicine. 49, 716. (1957).

41.—Changes in the Electrophoretic Behavior of Arthritic Synovial Fluid Components Following Intra-articular Steroid Therapy. D. Platt y Col. The Journal of Lab. Cl. Medicine. 49, 762. (1957).

42.—Electrophoretic Analysis of Sera from a patient With Hemochromatosis and Diabetes Resistant to Insulin. V. L. Koenig y Col. The Journal of Lab. and Cl. Medicine. 47, 862. (1956).

53.—A study of Gamma Globulins in Dystrophia Myotonica. H.H. Zinneman and J. Rotstein. The Journal of Lab. and Cl. Medicine. 47, 907. (1956).

44.—Electrophoretic Distribution of Serum Glycoproteins in some Hemorrhagic States. Magalini y Col. The Journal of Lab. and C. Medicine. 47, 923. (1956).

45.—On the Zone Electrophoresis of Human Parotid Saliva in Starch Gels. K. Hoerman and B. Berzinskas. The Journal of Lab. and Cl. Med. 53, 64. (1959).

46.—Continuous Electrophoresis D. R. Davis y Col. The Journal of Lab. and Cl. Medicine. 53, 958. (1959).

47.—A serologic and Electrophoretic Study of the malignant and Proliferative Disorders of the Hematopoietic and Reticuloendothelial Systems. J. Teitelbaum y Col. The Journal of Lab. and Cl. Med. 53, 535. (1959).

48.—Rapid Electrophoretic Separation of Hemoglobins. B. Zack y Col. The Journal of Lab. Cl. Medicine. 54, 288. (1959).

49.—Some of the Variables Involved in the Fractionation of Serum Proteins by Paper Electrophoresis. R. J. Henry y Col. Clinical Chemistry 3, 49. (1957).

50.—Serum Globulin Fractions in Chronic Rheumatic Diseases. H. Salt. Clinical Chemistry 2, 35. (1956).

51.—Observations on Electrophoretic Analysis of Normal Human Serum R. S. Gordon, Clinical Chemistry. 2, 31. (1956).

53.—Buffer Composition in Paper Electrophoresis. C. B. Laurell y Col. Clinical Chemistry. 2, 99. (1956).

53.—Paper Electrophoresis of Serum Proteins. L. D. Mellor. Clinical Chemistry. 3, 195. (1957).

54.—“U” Protein and Migration Ratios in Paper Electrophoresis. J. R. Stern y Col. Clinical Chemistry. 3, 599. (1957).

55.—Franklin, M. y Col. J. Clin. Invest. 30, 729. (1951).

Vo. Bo.

Dr. Enrique Herrarte.

Imprimase:
Dr. Ernesto Alarcón.