

Fraccionamiento de proteínas en el suero humano por salazón progresiva con sulfato de sodio *

B. A. MENDIOROZ, J. SOMMARUGA, M. E. CAMIOU,
M. G. CHIESA y E. CASTRO

Las proteínas séricas difieren entre sí por su composición química, arquitectura, forma, tamaño carga eléctrica y peso molecular. La electroforesis separa fracciones integradas por partículas de igual velocidad de migración en un campo eléctrico, independientemente de su composición química. La ultracentrifugación separa fracciones de acuerdo a su peso molecular. Los métodos de salazón ("salting-out" o "relargage")^{1 a 7} y de alcoholificación^{9 a 11} realizados en condiciones rigurosas son más específicos porque separan distintas fracciones de acuerdo a su solubilidad, o sea a una constante física definida por ecuaciones complejas en las que intervienen las leyes de los gases, la carga eléctrica, la valencia y el radio medio de los iones, la fuerza iónica de la solución, la constante dieléctrica del solvente, la naturaleza y concentración de los componentes, la temperatura absoluta.^{1a, 11 a 16}

Sörensen, Roche, Derrien y Mandel, Kekwick, Mac Meekin, Kendall y otros autores^{5, 16 a 27} han separado con las sales neutras y en estado de pureza distintas proteínas a partir de una fracción considerada única. Derrien²⁴ y Roche, Derrien y Mandel⁶ han aplicado las ecuaciones de solubilidad a la separación e individualización de las proteínas séricas mediante una curva de precipitación progresiva.

Estos autores han podido delimitar así una serie de concentraciones críticas de sulfato de sodio y de fosfatos de sodio que separan un mayor número de componentes que el método de Howe. Obtienen en el suero de caballo siete fracciones globulínicas. Howe da sólo tres. Con fosfatos obtienen además cinco albúminas distintas. Roche, Derrien y Mandel utilizan concentraciones finales de 10.6, 13, 14.25, 15, 17.25, 21 y 22 gr. % de sulfato de sodio como límites de sus siete fracciones.

En el presente trabajo presentamos los resultados obtenidos aplicando estas concentraciones en diversos sueros humanos normales y patológicos.

* Centro de Hepatología del Ministerio de Salud Pública. Instituto de Patología de la Facultad de Medicina. Presentado en la sesión del 4 de diciembre de 1952.

Aumentando la concentración en sal, comienzan a precipitar las albúminas. Sin embargo, algunos autores señalan que un alto porcentaje de alfa globulinas es dejado en solución si no se aumenta mucho la concentración en sulfato.^{32, 35} Para ver si captamos variaciones en las alfa globulinas hemos añadido dos concentraciones adicionales: 22.5 gr. %, que corresponde al comienzo de la precipitación de las albúminas según Roche y Derrien ⁶ y 24.15 gr. %. Concentraciones mayores precipitan ya mucha albúmina.

MÉTODO.— Seguimos un procedimiento análogo al de Howe, pero con las concentraciones de Roche y Derrien. Dosificamos la proteína total en cada filtrado después de 24 horas de permanencia a 37-38° en la estufa.

Hacemos la reacción del biuret según Robinson y Hogden ³³ con precipitación túngstica para eliminar la sal. Leemos en el fotocolorímetro Evelyn con filtro de 540 m μ . El mayor inconveniente está en conseguir un buen papel de filtro endurecido, de poro, fino que dé filtrados lípidos en la primera filtración. Se desechan los primeros centímetros. Se procede siempre a la temperatura adecuada para evitar la cristalización del sulfato.

Hemos adaptado un micrométodo haciendo tomas equivalentes a 0.1 c.c. de suero a partir de una dilución hecha con pipeta de Kahn con 0.25 c.c. de suero en un volumen final de 7.5 c.c. La proteína total se hace con igual toma de ensayo diluída con cloruro de sodio al 9 %. La fracción alícuota de dilución o de filtrado se coloca en un tubo de centrífuga aforado en 10 c.c. Se precipita la proteína con 0.5 c.c. de ácido sulfúrico $\frac{2}{3}$ N y 0.5 c.c. de tungstato de sodio al 10 %. El sedimento se redisuelve en 1 c.c. de soda 7.5 N. Se agita, se diluye a enrase con agua y 0.15 c.c. de sulfato de cobre al 20 %. Se agita intensamente y se centrifuga. Se lee después de 5' contra agua como 100 %.

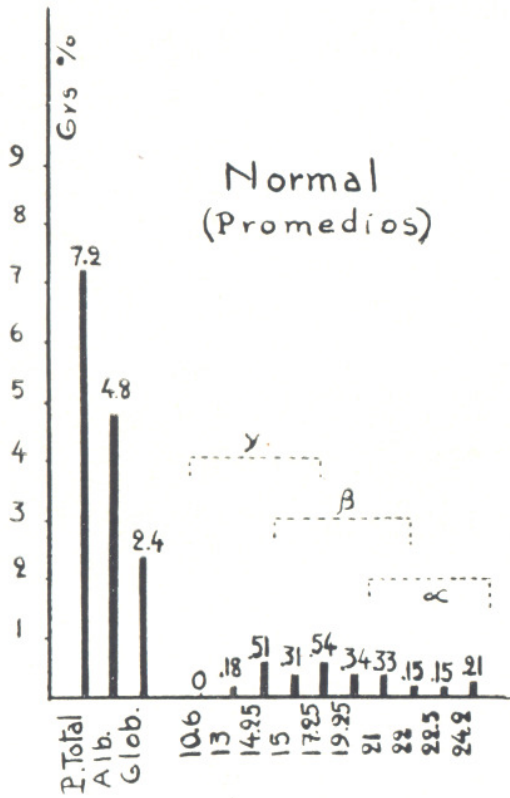
RESULTADOS.— En el cuadro I se muestran los resultados obtenidos en 14 sujetos normales estudiantes y personal de laboratorio.

En el cuadro II se ven los de diversos sueros patológicos que presentaban alteraciones de la fórmula proteica. Las gráficas I, II, III y IV, muestran algunos proteinogramas distintos que permiten comparar mejor que con números las modificaciones de las diversas fracciones y las correlaciones con las fracciones electroforéticas.

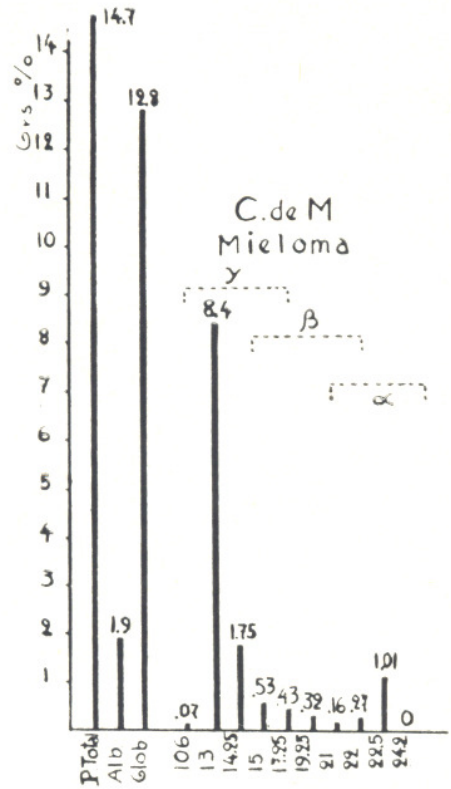
Cuadro I

SUEROS HUMANOS NORMALES

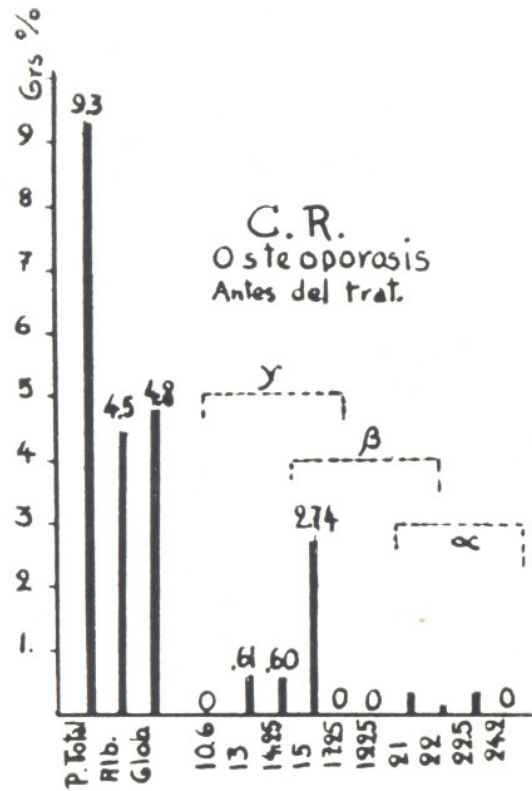
	Gramos % de Sulfato de Sodio											Albú- minas	Globu- linas	Prot. total
	10.6	13	14.25	15	17.25	19.25	21	22	22.5	24.2				
Caso 142-I	0	.05	.04	0	1.13	.44	.15	0	.46	.33	4.7	2.6	7.3	
Caso 141-I	0	.09	.6	.35	.11	.66	.56	.23	.3	.18	4.2	3.1	7.3	
Caso 140-I	0	.44	0	.18	.43	.35	.27	.10	.32	1.0	5.	2.6	7.6	
Caso 139-I	0	.11	1.05	.43	0	.29	.31	0	.28	0	4.6	2.5	7.1	
Caso 138-I	0	0	.4	.52	.12	.38	.24	.53	.02	.02	4.8	2.3	7.1	
Caso 137-I	0	0	.73	.12	.41	.7	.06	.07	0	.14	4.8	2.1	6.9	
Caso 136-I	0	.29	.81	.13	.83	.09	.50	.42	.64	.67	5.1	3.2	8.3	
Caso 135-I	0	.47	.38	.13	.74	.31	.68	.22	.35	.63	4.9	2.7	7.6	
Caso 134-I	0	.06	.18	.15	.36	.43	.66	.04	.01	0	5.4	1.9	7.3	
Caso 133-I	0	.11	.79	.16	.72	.07	.11	.03	.06	.03	5.1	2.1	7.2	
Caso 58-I	0	.41	.56	.36	.35	.2	.26	.39	0	.43	4.2	3.0	7.2	
Caso 30-I	0	.12	.67	.24	.15	.12	.18	.02	.51	.27	4.6	2.3	6.9	
Caso 31-I	0	.15	.43	0	.45	.47	.53	.03	.09	.15	4.3	2.1	6.4	
Caso 72-I	0	0	0	.1	1.08	.02	.80	0	0	0	5.1	2.0	7.1	
Promedio	0	.18	.51	.31	.54	.34	.33	.15	.15	.21	4.8	2.4	7.2	



Gráfica I.



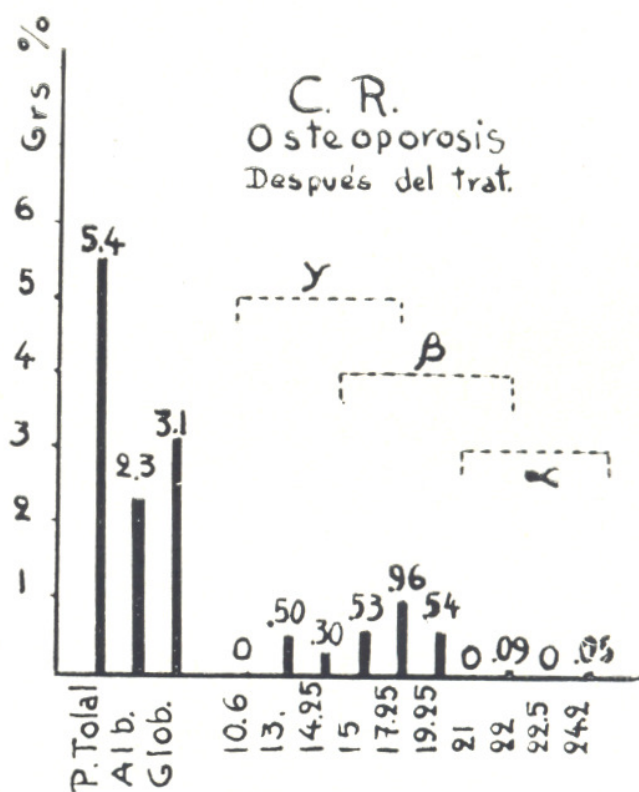
Gráfica II.



Gráfica III.

La cantidad de proteína que precipita en una concentración crítica se obtiene restando el valor del filtrado correspondiente del inmediato precedente.

Se ve que todas las hiperproteinemias se producen a expensas de hiperglobulinemia y que en muy raros casos, algunas cirrosis, artritis reumatoidea o mieloma, tiene una cantidad apreciable de un componente lábil que precipita a 10.6 gr. %.



Gráfica IV.

El promedio de las fracciones obtenidas con cada concentración crítica en los 14 sueros normales muestra dos picos mayores que corresponden a 14.25 y 17.25 gr. %, zona correspondiente a gamma y beta globulina respectivamente.

Las cifras individuales muestran alejamientos importantes de los promedios indicando que no hay igualdad en la distribución de las globulinas aun en sueros aparentemente normales. En algunos se ponen en evidencia fracciones de alfa globulinas y en otros éstas no se perciben.

Algunos sueros presentan un componente que inicia su precipitación entre 22 y 22.5 gr. %, zona que corresponde aproximadamente a las alfa y beta globulinas.

Cuadro II

SUEROS HUMANOS PATOLÓGICOS

Caso	Gramos % de Sulfato de Sodio										Albú- minas	Globu- linas	Prot. totales	Diagnóstico
	10,6	13	14,25	15	17,25	19,25	21	22	22,5	24,2				
39-I	2	3.6	2.3	1.5	.08	.4	.2	.12	.02	.06	1.5	8.6	10.1	Cirrosis de Hanot.
75-I	0	.44	.6	.2	.3	.3	.4	.04	.25	0	1.6	2.5	4.1	Nefrosis amiloide.
76-I	0	.8	.08	.74	0	.33	0	0	0	0	4.9	1.9	6.8	Hemofilia.
77-I	0	.4	0	.3	.8	.2	.3	.3	0	.3	4.4	2.3	6.7	Hemofilia.
79-I	0	0	.14	.11	1.6	0	.2	.2	0	0	3.8	2.2	6.	Amiloidosis.
81-I	0	.08	.07	.05	1.4	.3	.12	.34	0	.04	4.8	2.4	7.2	Hemofilia.
103-I	0	1.1	3.3	.5	1.2	.07	.03	.1	.7	.12	2.6	7.0	9.6	Artritis reumatoidea 4º p.
105-I	1.8	.17	1.6	1.0	.23	.2	.3	.3	.1	.2	3.5	5.6	9.1	Artritis reumatoidea.
107-I	0	.4	.4	.7	1.1	.5	.5	.07	.13	.42	3.6	4.1	7.7	Angiocoledocitis. Estenosis ci- catrizal de colédoco.
109-I	.6	.34	.6	.02	.16	.9	.13	.7	.2	.3	2.9	3.3	6.2	Prostatitis crónica.
84-I	0	.3	.3	.28	1.9	0	0	0	.15	.29	3.3	3.3	6.6	Amiloidosis.
86-I	0	.4	.2	.3	.8	.5	.1	.3	0	0	3.3	2.5	5.8	Neoplasia canalicular y pioco- lecistocitos.
95-I	0	.26	.94	.2	.96	.2	.2	.2	.1	.06	3.3	3.2	6.5	Ictericia catarral.
28-I	0	.9	1.4	.13	.7	.4	.15	.06	.4	.14	2.8	4.3	7.1	Cirrosis de Laennec.
59	0	.92	.8	.14	.86	0	.16	0	0	.37	2.4	3.4	5.8	Neoplasia de pulmón.
33	0	.39	.1	.31	1.18	.26	.14	0	.14	.2	4.8	2.7	7.5	Ictericia hemolítica 2ª.
51	0	.1	.4	.2	1.4	.2	.06	0	.24	0	3.6	2.5	6.1	Insuficiencia cardíaca global.
65	0	.97	0	0	.87	.51	.63	0	0	.33	3.7	2.7	6.4	Ictericia virósica.

Gramos % de Sulfato de Sodio

Caso	10.6	13	14.25	15	17.25	19.25	21	22	22.5	24.2	Albú- minas	Globu- linas	Prot. totales	Diagnóstico
27	0	.51	.6	.12	0	0	.23	0	.16	.12	2.7	1.7	4.4	Neoplasia. Infección 2ª.
29	0	.61	.1	.55	.85	.75	0	.07	.1	.05	2.7	3.1	5.8	Ictericia tífica.
55	0	.61	.6	2.74	0	0	.35	.09	.38	0	4.5	4.8	9.3	Osteoporosis.*
57	0	.5	.3	.53	.96	.54	0	0	0	.05	2.3	3.1	5.4	Caso 55 después del trata- miento.**
61	0	0	5.9	.61	.54	.2	.25	.35	.38	.17	4.5	2.6	7.1	Reumatismo crónico.
63	0	1.22	.76	1.25	.72	.04	.36	.1	0	.05	3.1	4.8	7.9	Actinomicosis pulmonar. Ami- loidosis.
69	0	1.08	1.4	.61	1.01	.15	.15	0	0	.3	3.5	4.8	8.3	Amiloidosis.
79	0	.24	.18	.50	1.3	.57	0	.05	0	0	5.4	2.8	8.2	Artritis reumatoidea.
85	3.59	2.52	.91	.74	.34	.43	.14	.18	.13	0	2.4	8.8	11.2	Cirrosis hepática.
89	0	.57	1.22	0	.63	.77	.31	0	.07	.15	4.5	3.9	8.4	Ictericia virósica.
95	0	.04	1.25	0	.38	.14	.46	.27	.33	.02	.94	3.2	4.1	Glomerulonefritis subcrónica.
97	.07	8.34	1.75	.53	.43	.32	.16	0	1.01	.59	1.9	13.4	14.8	Mieloma.
101	0	.50	.52	1.16	.78	.40	0	0	.50	—	3.8	3.9	7.7	Litiasis renal.
133	0	.4	0	.29	5.6	1.8	.32	0	.22	.33	2.4	8.8	11.2	Metástasis óseas múltiples. Reacción mieloide.
29-I	.08	.6	.41	4.26	.33	1.16	.05	.26	.1	.12	2.3	7.4	9.7	Mieloma.
34-I	0	.1	1.69	.03	1.18	.2	.55	.35	.02	.22	3.0	4.3	7.3	Cirrosis biliar.

* Ca total: 11 mg.%; Ca iónico: 4.1 mg.%; Mg: 27.2 mg.%

** " " 8.75 " " " 4.4 " " = 50 " " : 26, " "

Se comprueba que la hiperproteinemia de un mieloma está integrada casi exclusivamente con gamma globulinas que precipitan al 13 % presentando también valores altos de alfa globulina (22.5 gr. %), mientras que en otros mielomas hay un alto nivel en la zona de gamma globulina de 15 gr. % con un nuevo incremento en la zona de beta (19.25 %), revelando un nivel normal o bajo de alfa globulina.

En las cirrosis se observa un aumento en las fracciones lábiles en la zona de las gamma globulinas entre 13 y 17.25 gr. %, pero de distinta solubilidad en los distintos enfermos.

En un caso de osteoporosis se observa un alto contenido en la fracción de 15-17.25 gr. %, que decrece notablemente con el tratamiento.

En general se aprecia que no hay un esquema específico para ninguna enfermedad y que por el momento el estudio fraccionado no tiene valor diagnóstico sino valor de estudio para conocer el significado de esas fracciones de solubilidad variable.

COMENTARIO.— Muchos autores han estudiado electroforéticamente las fracciones precipitadas por el método de Howe,^{28 al 33} por lo cual se ha visto que a pesar de no ser equivalentes en su fundamento la electroforesis y la salazón, existe sin embargo una correlación entre el grado de solubilidad de una partícula proteica, la velocidad de migración en el campo eléctrico y su peso molecular.

Se ha visto que las fracciones que precipitan por debajo de 13.6 gr. % son casi exclusivamente gamma globulinas; que en 17.5 gr. % precipitan la mitad de las gamma globulinas y 1/4 de la beta y nada de la alfa y que en 21.5 gr. % se precipita toda la gamma, 3/4 de la beta y 1/4 de la alfa. A 18.5 ya se precipita toda la gamma.³³

Patológicamente las fracciones no se reparten igual.^{28a} No existen límites precisos entre albúminas y globulinas²⁸ ni entre fracciones globulínicas entre sí, debido a la superposición de las zonas de solubilidad, la adsorción de proteínas en los precipitados y la asociación de unas moléculas con otras.

Los valores absolutos están afectados del error colorimétrico. Las dosificaciones de nitrógeno son menos adecuadas porque a pesar de ser más exactas se traducen en errores mayores al transformar el N en proteína, con un factor común de 6.25, pues se ha visto que éste oscila para las diversas fracciones entre 6.1 y 8.4.³⁴ No obstante dichos errores, los datos obtenidos señalan diferencias interesantes en el comportamiento de los distintos sueros y permiten apreciar alteraciones cualitativas y cuantitativas en las subfracciones globulínicas.

Al igual que los diagramas electroforéticos ^{2sb} no se muestran específicos ni característicos de ninguna enfermedad. Estos últimos tampoco representan fracciones puras, tienen bases arbitrarias y adolecen de grandes errores de apreciación, por lo cual consideramos que los proteinogramas obtenidos con las sales neutras son suficientemente correctos y fundamentados como para usarlos en el estudio de las alteraciones proteicas.

RESUMEN.— Se mencionan los fundamentos de la separación de fracciones globulínicas por las sales neutras.

Se dan los resultados obtenidos con sueros normales y patológicos, usando las concentraciones críticas de Roche y Derrien y dos concentraciones adicionales dentro de la zona de las alfa globulinas.

Se usa la reacción del biuret según Robinson y Hogden, adaptada a un micrométodo con lectura en el fotocolorímetro Evelyn.

SUMMARY.— The basis of salting out fractionation are considered. Results are given based on the Roche and Derrien critical concentrations of sodium sulphate and two additional concentrations in alpha globulin range. Nine globulinic subfractions, normal and pathological, are studied. Biuret reaction according to Robinson and Hogden is employed.

BIBLIOGRAFÍA

1. EDSALL, J. T.— **The Plasma Proteins and their fractionation.** *Advances in Protein Chemistry*, III, 408, 429; 1947.
- 1 a Idem.— Págs. 432, 437 y 424.
2. PEDERSEN, K. O.— **Ultracentrifugal Studies on serum and Serum Fractions Almqvits y Wikssells.** Uppsala, 52, 57; 1945.
3. HOWE, P. E.— *J. Biol. Chem.*, 49, 93, 109; 1921.
4. HOWE, P. E.— *J. Biol. Chem.*, 49, 93, 109; 1921.
5. COHN, E. J.— *Physiol. Rev.*, 28, 395; 1941.
6. ROCHE, J. y DERRIEN, Y.— Les protéines du plasma et du serum, recents acquisitions et position actuelle de leur étude. *Exp. Ann. Bioch. Med.*, 5^a S., 33; 1945.
7. EDSALL, J. T.— **Advances in Protein Chemistry**, III, 429, 432; 1947.
- 7 a Idem.— Pág. 437:463.
8. COHN, E. J.; LUETSCHER, J. A.; ONCLEY, J. L.; ARMSTRONG (Jr.), S. H. y DAVIS, D. B.— *Journ. of Amer. Chem. Soc.*, 62, 3396; 1940.
9. EDSALL, J. T.— **Advances in Protein Chemistry**, III, 437; 463.

10. COHN, E. J.; STRONG, L. E.; HUGHES, W. L. (Jr.); MULFORD, D. J.; ASHWORTH, J.; MELIN, M.; TAYLOR, H. L.—**J. Am. Chem. Soc.**, 68, 459; 1946.
11. COHN, E. J. y EDSALL, J. T.—*Protein, Amino Acids and Peptides*. Reinhold Pub. Corp. N. Y., 1943.
12. DEBYE, P.—**Z. physic. Chem.**, 130, 56; 1927.
13. DEBYE, P. y Mc. AULAY, J.—**Physic Z.**, 26, 22.
14. SCATCHARD, G.—**Chem. Revs.**, 3, 383; 1927.
15. SCATCHARD, G.—**Trans Faraday Soc.**, 23, 454; 1927.
16. SÖRENSEN, S. P. L.—*Protein*, 1 vol. Fleischmann Lab. ed. U. S. A., 40; 1925.
17. COHN, E. J.—**J. Am. Chem. Soc.**, 49, 173; 1927.
18. GREEN, A. A.—**J. Am. Chem. Soc.**, 55, 2331; 1933.
19. ROCHE, J.; DERRIEN, Y. y MOUTTE, M.—**C. R. Soc. Biol.**, 130, 1299; 1939.
20. SÖRENSEN, S. P. L.—**Comp. Rend. trav. lab. Carlsberg**, 18, 5, 124; 1930.
21. FERRY, J. D. y ONCLEY, J. L.—**Journ. of Amer. Chem. Soc.**, 60, 1123; 1938.
22. KEKWICK, R. A.—**Biochem. Journ.**, 32, 553; 1938.
23. KENDALL, F. E.—**Journ. of Clin. Invest.**, 16, 921; 1937.
24. DERRIEN, Y.—**Bull. Soc. Chim. Biol. (Trav.)**, 26, 1091; 1944.
25. MAC MEEKIN, T. L.—**Journ. of Amer. Chem. Soc.**, 62, 3393; 1940.
26. COHN, E. J.; MAC MEEKIN, T. L.; ONCLEY, J. L.; NEWELL, J. M. y HUGHES, W. L. (Jr.)—**J. Am. Chem. Soc.**, 62, 3386; 1940.
27. GREEN, A. A.—**J. Am. Chem. Soc.**, 63, 1108; 1938.
28. GUTMAN, A. B.—*The Plasma Proteins in Disease*. Advances in Protein Chemistry. Ac. Press, IV, 160; 1948.
- 28 a Idem.—Pág. 163.
- 28 b Idem.—Págs. 170 y 172 a 176.
- 28 c Idem.—Pág. 162.
29. GUTMAN, A. B.; MOORE, D. H.; GUTMAN, E. B.; Mc CLELLAN, V. y KABAT, E. A.—**J. Clin. Investigation**, 20, 765; 1941.
30. PETERMANN, M. L.; YOUNG, N. F. y HOGNESS, K. P.—**J. Biol. Chem.**, 169, 379; 1947.
31. GUTMAN, A. B.—*Ad. in Protein Chem.*, IV, 162; 1948.
32. MAJOOR, C. L. H.—**Yale J. Biol. Med.**, 18, 419; 1946.
33. MAJOOR, C. L. H.—**J. Biol. Chem.**, 169, 583; 1947.
34. ARMSTRONG, S. H. (Jr.); BUDKA, M. J. E.; MORRISON, K. C. y HASSON, M.—**J. Amer. Chem. Soc.**, 69, 1747; 1947.
35. MILNE, J.—**J. Biol. Chem.**, 169, 595; 1947.