

ESTUDIO COMPARATIVO DE LAS CURVAS DE PESO, DE PROTEINAS Y DE LA RELACION GLOBULO- PLASMA, EN EL RECIEN NACIDO

POR EL

Prof. Dr. Felipe González Alvarez

Profesor Adjunto de Clínica Pediátrica

El estudio de la composición de los humores del organismo va adquiriendo día a día mayor importancia en la fisiopatología de las afecciones que interesan al clínico.

Con el objeto de abonar esta premisa, múltiples ejemplos podríamos aducir. Para no citar muchos, recordaremos la importancia que tiene el estudio humoral en todos los procesos que dan lugar a deshidratación (diarreas, transpiraciones excesivas, etc.); las enfermedades infecciosas en general que trastornan los balances, lo que provoca alteraciones en el equilibrio físico-químico; las afecciones que modifican cualquier tiempo de la nutrición (ingestión, absorción, metabolismo o excreción).

Ahora bien; conociendo que el recién nacido tiene un descenso en su curva de peso llamada fisiológica, y deseando averiguar cuáles son las alteraciones humorales experimentadas en ese momento por el niño, decidimos realizar una investigación sobre las proteínas en la sangre, así como también acerca de los valores de la relación globular plasmática durante este período. El dosaje de las proteínas en la sangre, sirve de pauta para conocer indirectamente las variaciones de la hidremia sanguínea. (Esto en los casos en que no existe alteración de la permeabilidad de los vasos, que permita la evasión de las proteínas del lecho vascular).

Consideraciones sobre el método empleado

Con este objeto hemos estudiado los diferentes métodos empleados para la determinación de las proteínas en la sangre, decidiéndonos por aquel que, además de darnos seguridad en las determinaciones, nos resulta de fácil manejo, poco dispendioso, rápido y práctico (sobre todo para investigaciones en grandes grupos), y susceptibles de ser practicados casi al lado de la cama del enfermo.

El procedimiento empleado por nosotros, se funda en las relaciones que existen entre el peso específico del plasma y su contenido en proteínas, y en que, conociendo uno de estos factores (peso específico) podemos deducir el otro.

En el año 1924, Barbour y Hamilton, observan la relación estrecha que hay entre el peso específico y el contenido de proteínas del plasma. Sin duda es éste el trabajo inicial del cual parten todas las investigaciones tendientes a verificar tan íntima conexión. Los estudios para determinar el peso específico del plasma, fueron hechos por medio del picnómetro, aparato de suma sensibilidad y, por consiguiente, de absoluta fidelidad. A pesar de esto, no puede ser generalizado su uso por el tiempo prolongado que exige la determinación y por las cantidades apreciables de sangre que son necesarias, las que no siempre es posible obtener, especialmente trabajando en sujetos a quienes se les debe practicar muchas determinaciones.

La parte de la experimentación referida a determinar la cantidad de proteínas, se la realiza con la técnica de Howe Kjeldhal, la que no obstante ser aceptada por su gran exactitud, puede oponérsele algunos reparos en cuanto a sus resultados, como así el serio inconveniente de requerir una instalación especial, costosa, amén del largo tiempo que insume su ejecución.

Sintéticamente diremos que este procedimiento se funda en la determinación gasométrica, acidimétrica o colorimétrica del nitrógeno en los materiales examinados, para de ello deducir las proteínas. Los hallazgos experimentales de Voit permitieron deducir de la porción del nitrógeno excretado, la cantidad de los

prótidos ingeridos en la alimentación. Su fórmula: 100 grs. de proteína igual a 16 grs. de nitrógeno, fué aceptada por los investigadores posteriores, resultando, en consecuencia, que un gramo

de nitrógeno es igual a $\frac{100}{16} = 6.25$ grs. de proteína.

Del estudio de la composición química de las proteínas integradas por amino ácidos, se conocen algunas con diferente contenido de nitrógeno. Así, éstas pueden contener una, dos y hasta cuatro moléculas de nitrógeno, como son las hoy llamadas bases exónicas (arginina, histidina y glicina).

De esto se deduce, por consiguiente, que por el coeficiente de Voit (fundamento del método Kjeldhal), no podemos conocer con exactitud absoluta el valor proteico de una muestra. Esta sería la única objeción que podríamos hacer al método de Kjeldhal en cuanto a su fidelidad; sin embargo, es el más preciso en la determinación de las proteínas, exceptuando el gravimétrico, y constituye para la clínica un método de gran valor.

Desgraciadamente este último procedimiento exige, para su efectividad, laboratorios costosamente montados, amén de técnicos eximios y una tarea realmente agotadora. Si bien es cierto que mediante su aplicación se obtienen resultados exactísimos, éstos no son rigurosamente necesarios para la clínica.

Convencidos Barbour y Hamilton de la relación lineal existente entre el peso específico del plasma y su concentración en proteínas, es decir, que las variaciones de la una corresponden exactamente a variaciones de la otra, en el año 1926 propusieron un procedimiento para la determinación de las proteínas, deducidas del peso específico.

El procedimiento propuesto por estos autores es simple, rápido y seguro. Con el aparato de su invención determinan el tiempo de caída de una gota de una solución cuyo grado de concentración se conoce. Luego, Barbour y Hamilton prepararon tablas cuyo equivalente en proteínas corresponde a los tiempos transcurridos en el recorrido de la gota.

Descripción del método de Barbour y Hamilton

El fundamento está dado por el tiempo de caída de una gota de tamaño conocido del líquido a examinar, a través de una distancia predeterminada, en una mezcla no miscible con la gota, de menor peso específico y menor viscosidad que aquél: estas condiciones se satisfacen con una mezcla de xileno-bromobenceno, la cual es de baja volatilidad y de poca viscosidad.

La gota de la sustancia a ser probada (que debe ser de 0.01 cm.³) siendo más pesada que la mezcla, cae tanto más rápido cuanto mayor sea la diferencia de densidad. La velocidad de caída está influenciada por la temperatura y por la pureza del líquido orgánico. No es necesaria la determinación exacta de la densidad de la mezcla xileno-bromobenceno sino de la solución "standard". El líquido desconocido es probado en igual forma y contralorado el tiempo de caída. La solución "standard", elegida por los autores, es sulfato de K., la cual es muy estable y no es higroscópica. Para soltar la gota se usa una pipeta bien calibrada, en forma tal que en cuatro centímetros de longitud contenga una gota de 0.01 cm.³ de mercurio limpio. Las condiciones que deben tomarse en cuenta para despedir la gota son las siguientes: la muestra debe ser fresca, para evitar la evaporación, la coagulación o la sedimentación y no debe ir mezclada con aire. Se introduce la punta de la pipeta dentro del líquido (xileno-bromo-benceno); por medio de un dispositivo especial, se larga la gota, del tamaño ya especificado, y por el hecho de estar dentro del líquido ya mencionado, no se desprende hasta el momento de retirar la pipeta. Esto se hace en forma suave hasta separarla de la mezcla contenida en el tubo; el recorrido de la gota deberá ser contralorado con un cronómetro, con la precisión al décimo de segundo. El tubo que contiene la mezcla, es de 50 centímetros de largo, con un calibre de 7.45-55 milímetros.

Las variaciones que se registran, siempre que sean pequeñas en el tamaño de la gota, no modifican en forma sensible, en este procedimiento, los valores que se obtienen. El aumento del tamaño de la gota (que aceleraría, por tal motivo, la velocidad de su

caída) está contrarrestado por el aumento del volumen de la misma. Hemos tenido oportunidad de verificar esto en nuestras determinaciones de contralor.

Método usado en nuestras determinaciones

Nosotros hemos usado el método de Kagan, el cual describiremos a continuación, por ser más simple que el de Barbour Hamilton.

Fundado en principios similares, Kagan, preconiza un método en el cual, en lugar de la mezcla xileno-bromo-bencene, usa una de parafina y salicilato de metilo. Según el autor, ésta es una mezcla absolutamente no miscible, no higroscópica y con menos volatilidad aún, que la mezcla xileno-bromo-bencene. Este método difiere también del anterior, en que no emplea la solución "standard" de sulfato de K. Acompaña a su aparato con nomogramas, en los cuales viene calculado el dosaje de las proteínas directamente desde el peso específico. De esto se deduce que el método de cálculo es más rápido. Por otra parte, como la mezcla usada por Kagan es algo más pesada que el xileno-bromo-bencene, el tamaño del tubo lleno con la mezcla, por el cual cae la gota, es más pequeño y, por lo tanto, el aparato es más manuable.

Nosotros hemos hecho algunos contralores con ambos procedimientos y sus resultados son muy aproximados.

Con el fin de obtener el mínimo de error en las determinaciones con los métodos descriptos, haremos algunas indicaciones de orden práctico. En cuanto a la extracción de la sangre, que puede hacerse de capilares o de venas, debemos tener en cuenta: que la primera fuente (capilares) puede darnos errores cuando se ejerce presión sobre el pulpejo del dedo, por mezclarse la sangre con linfa o con líquidos del intersticio; en cuanto a la extracción de vena, se aconseja hacer la punción antes de transcurrir un minuto de la aplicación de la venda, para evitar hemoconcentración local. Y, finalmente, tomar precauciones generales para evitar la hemólisis, ya que ello altera fundamentalmente los resultados. La do-

sificación debe hacerse inmediatamente después de la extracción de sangre. En general, salvo que se disponga de elementos y condiciones muy especiales para conservar la sangre, como sería la de mantener los tubos cerrados con cera y en la nevera, toda permanencia de más de 24 horas altera fundamentalmente las determinaciones.

Aunque parezca supérfluo, queremos destacar la gran importancia que reviste una escrupulosa limpieza de la pipeta antes y después de cada determinación, como también el que esté perfectamente seca. La no observancia de estas indicaciones, podría traer como consecuencia, en el primer caso, una sensible alteración en el tamaño de la gota; y en el segundo, diluciones del plasma, cosa lógica si recordamos el calibre pequeñísimo de la pipeta y la exigüidad del tamaño de la gota; es decir, se expondría el experimentador a errores apreciables en las determinaciones.

Las modificaciones que con respecto a la temperatura hubiere que hacer, se ejecutan con tablas especiales que acompañan al aparato de Kagan.

El momento de la extracción de la sangre, con este método, no altera mayormente los resultados. Cuando se realiza en seguida de las comidas principales, las variaciones no pasan de 0.20 gramos por ciento y solamente las copiosas ingestiones de agua (de más de un litro de golpe) pueden ocasionar modificaciones apreciables en los primeros minutos, debido al aumento del volumen circulante.

Cuando iniciamos nuestro trabajo, fuimos sorprendidos con la publicación de Looney, quien hace objeciones al método elegido por nosotros que él considera fundamentales; pero, por las razones que expondremos a continuación, se verá que las mismas carecen de fuerza suficiente para invalidar los fundamentos del método y su importancia práctica.

En su trabajo, Looney hace objeciones a las fórmulas de Moore y Van Slyke para el cálculo de las proteínas totales, fórmulas éstas aceptadas y confirmadas por Weech y sus colaboradores, como también por Kagan y Bridge. Apoya su punto de vista, en trabajos de Zozaya, quien encuentra correlación entre las proteínas

totales del suero y su peso específico, que se aparta notablemente de las encontradas por los autores antes mencionados. Looney, al usar el Barbour Hamilton, utiliza el cloruro de K. como "standard" en vez del sulfato que empleó Barbour. El contralor del doaje de las proteínas lo hizo con el turbidimétrico. El autor ya citado atribuye al procedimiento mayor precisión que el ya acreditado método de Kjeldhal, universalmente aceptado. Finalmente, apoya sus conclusiones en un trabajo de Moon sobre shok, con el que Moon demuestra que en sangre de shocados, el peso específico se halla aumentado y que las proteínas están disminuídas.

En contra de sus aseveraciones, podemos decir que Looney usó métodos completamente diferentes y que, por consiguiente, no pueden tomarse en cuenta sus resultados a los fines de establecer comparaciones. (Usó Looney el CIK en vez del SO_4K , y el turbidimétrico en lugar del Kjeldhal. En cuanto al trabajo de Moon, que hemos leído detalladamente, cabe destacar que este autor, como es lógico, encuentra un peso específico de la sangre elevado y las proteínas del plasma, bajas; pero Looney no señala que el peso específico debe tomarse del plasma y no de la sangre total, cuando se desea sacar conclusiones en cuanto a las proteínas que debe tener el plasma.

Por estas razones, nos reafirmamos en la decisión de haber elegido este método para nuestra empresa, máxime después de la lectura de los trabajos de Moore y Van Slyke y los de Weech. Los primeros, trabajando con plasma humano de sujetos nefríticos y normales, concluyen afirmando que la relación entre el peso específico y el contenido de proteínas del plasma en ambos tipos de sujetos, es más estrecha que la existente entre el índice de refracción y el contenido proteico; los contralores los hicieron con el método gasométrico del micro Kjeldhal. El coeficiente de relación encontrado por estos autores, es de 0.99107, lo que traduce una seguridad casi absoluta. Queda el error probable reducido a cifras despreciables para la clínica.

Weech, revisando y contraloreando estos trabajos y los de Zozaya, quien encuentra un índice muy bajo, retoma el método y llega a conclusiones aun más alentadoras que las de Moore y Van

Slyke. Para el citado autor, las proteínas totales deducidas del peso específico tienen un coeficiente de relación aun más alto: 0.998538. Este autor trabajó con plasma, suero y trasudado de perros. Sus resultados fueron concordantes en las investigaciones con estos tres elementos. Los contralores de este trabajo fueron realizados con el picnómetro para el peso específico y el micro Kjeldhal para las proteínas. En sus resultados aplicó el método estadístico "standard" basado sobre la teoría de los cuadrados mínimos. La seguridad de estos coeficientes fué mantenida en el sexto lugar decimal. Las muestras que él utilizó fueron: 164 de plasma de perro, 145 de suero y 56 de trasudado.

Material y Método

El estudio se realizó en 18 niños recién nacidos, hijos de madres internadas en el Hospital San Roque. Estas eran sanas, con reacción de Wassermann y Kahn negativas. Los niños eran sanos a término y todos con peso dentro de los límites considerados como normales. La primera muestra se extraía antes de las 8 horas siguientes al nacimiento. Estaban sometidos al régimen corriente del Servicio y alimentados a pecho de la madre cada tres horas. Se hicieron extracciones de sangre mañana y tarde: la extracción de la mañana verificóse entre las 9 y 15 a 9 y 30 y las determinaciones estaban realizadas antes de las 12; por la tarde, la extracción efectuóse a las 19, estando concluída la operación antes de las 21. Procediendo en la forma indicada, eliminamos la posibilidad de alteraciones en las muestras por demoras entre la hora de extracción y la de dosificación. En la totalidad de los casos hemos trabajado con suero, realizando también determinaciones de plasma y glóbulos con hematocritos, a los cuales los llevábamos a la centrífuga durante quince minutos a 3.000 revoluciones por minuto. En todos los casos se trató de extraer sangre todos los días que estuvieron en el Hospital.

Inconvenientes

Como es lógico suponer, la tarea de la extracción de sangre, ha sido agotadora. Las tomas de sangre de la yugular o del seno longitudinal dos veces al día, durante los primeros seis a ocho días, en niños recién nacidos, es empresa seria.

Por otra parte, había resistencia de parte de las madres, y eso nos obligó, en algunas oportunidades, a trabajar con ciertos niños, durante un menor número de días que el que hubiésemos deseado. Queremos también hacer constar que algunas muestras nos han fallado porque a pesar de haber tratado de llenar todos los requisitos para evitar la hemólisis, ésta se produjo en varias oportunidades.

En cuanto a la determinación de la relación glóbulo-plasma, por medio del hematocrito, se hace con oxalato de potasio al 0.10 %.

La determinación de las proteínas se verificó, como hemos dicho, en suero. Para cada determinación, hacíamos tres pruebas con la gota. Cuando había alguna diferencia, sacábamos el promedio del tiempo de recorrido de la gota en las tres pruebas, y con ese promedio leíamos en la tabla el peso específico y proteínas correspondientes.

El aparato usado por nosotros en este trabajo fué el de Kagan, con todo el equipo completo de frascos, pipetas y de la mezcla de parafina y salicilato de metilo. El tiempo de caída de la gota lo tomamos con un cronómetro sensible al décimo de segundo.

Discusión

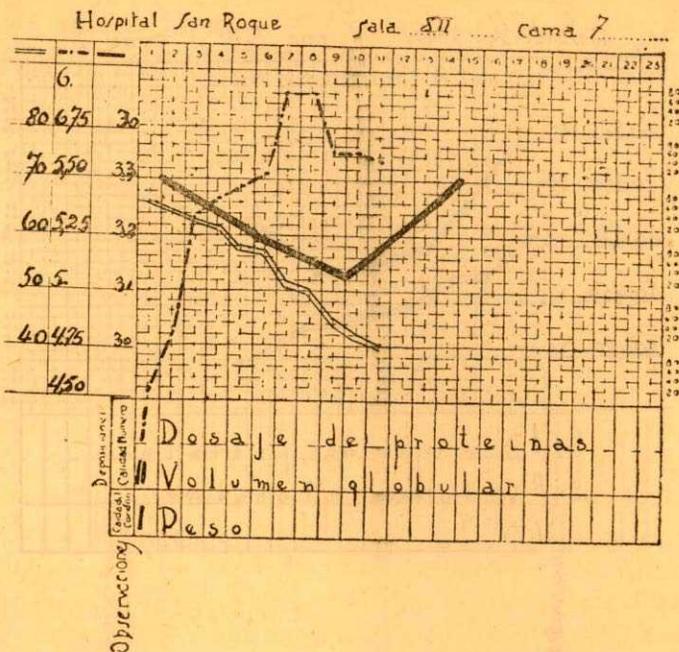
Del estudio de nuestros resultados, podemos concluir que el término medio de las cifras de proteínas totales en suero es algo más bajo en el recién nacido que en el adulto. Estos resultados están acordes con los obtenidos por autores que han estudiado este problema en nuestro país (Piantoni y Sosa Gallardo) y en el extranjero.

En cuanto a las lecturas de los hematocritos, ellos nos han re-

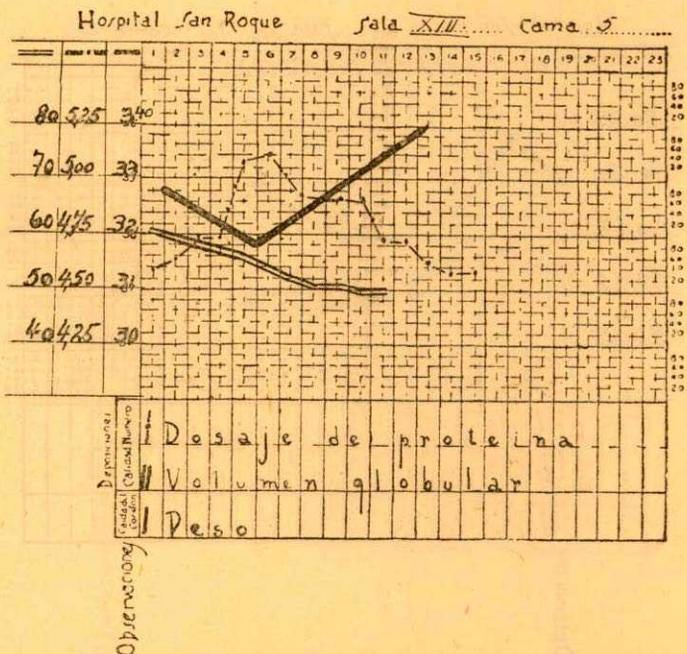
velado notables diferencias entre las primeras horas del nacimiento y los días posteriores. Como esperábamos, bajaba la cifra indicada por el hematocrito en cada una de las diferentes tomas de sangre, aún en aquellas del mismo día, donde se apreciaba diferencia en la lectura a favor de la mañana sobre la tarde.

Un hecho que se destaca nítidamente en nuestras determinaciones de las proteínas, relacionándolas con la curva de peso es el siguiente: a medida que la caída de la curva de peso se produce, va aumentando, en forma evidente, la concentración de proteínas. Tan pronto la curva se detiene e inicia el ascenso, se produce una disminución de las proteínas. Esta comprobación la verificamos hasta el día que dejamos de tomar muestras. Esto ocurría alrededor del sexto al octavo día de la vida, época en la que la madre era dada de alta. Otra particularidad, en lo que a las proteínas se refiere, es su mayor concentración encontrada en las muestras tomadas a la tarde comparándolas con las de la mañana. Podría explicarse esta singularidad por la coincidencia con la época en que realizamos nuestro trabajo: meses de febrero y marzo, con temperaturas muy elevadas durante el día y algo menores de noche. Esto es aun más sensible en dicha Maternidad, dada la forma de su construcción, orientación y altura.

Fecha: 24-III-43-Hor: 14.30 - Elba Alfaro

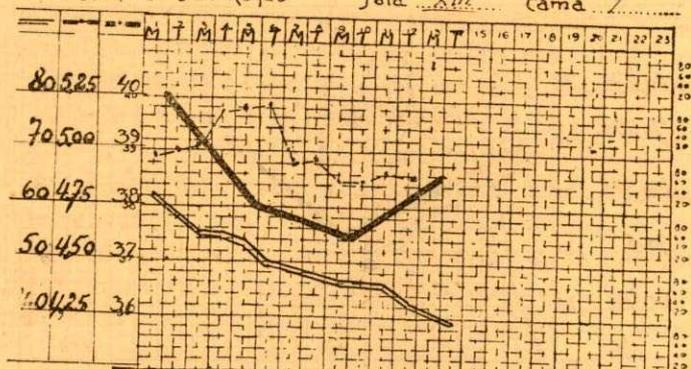


Fecha: 7-IV-43-Horas 830. Miguel A. San Lillan



Fecha 7-II-43. Horas 9:30. Juana Rosa Pajón

Hospital San Roque sala XIII Cama 9



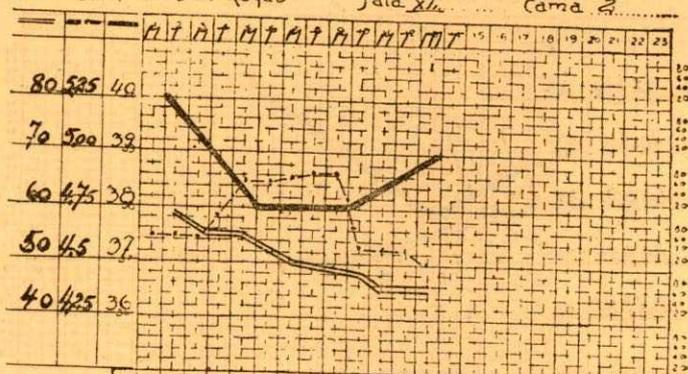
Deposición
Cantidad
Caudal
Caudal
Caudal

Opinión

I Dosaje de proteína
II Volumen globular
I Peso

Fecha 4-II-43. Horas 19:15. Jose Antonio Mamaná

Hospital San Roque sala XII Cama 2

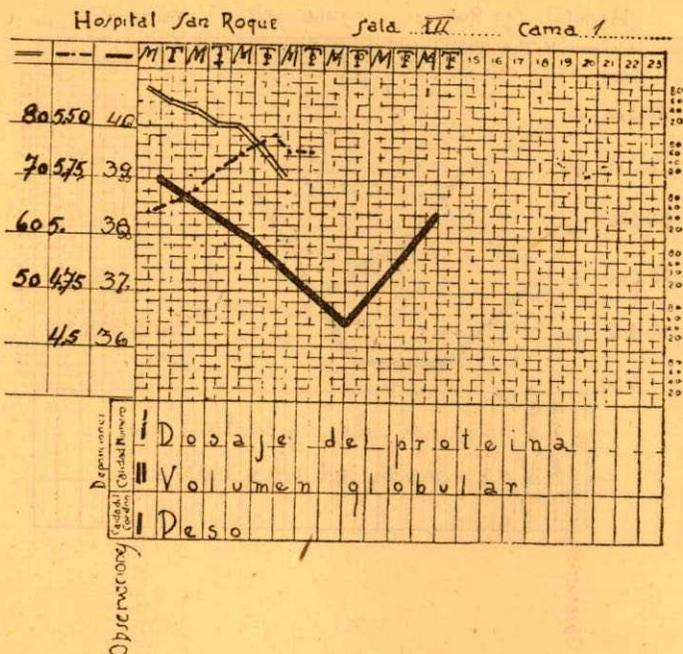


Deposición
Cantidad
Caudal
Caudal
Caudal

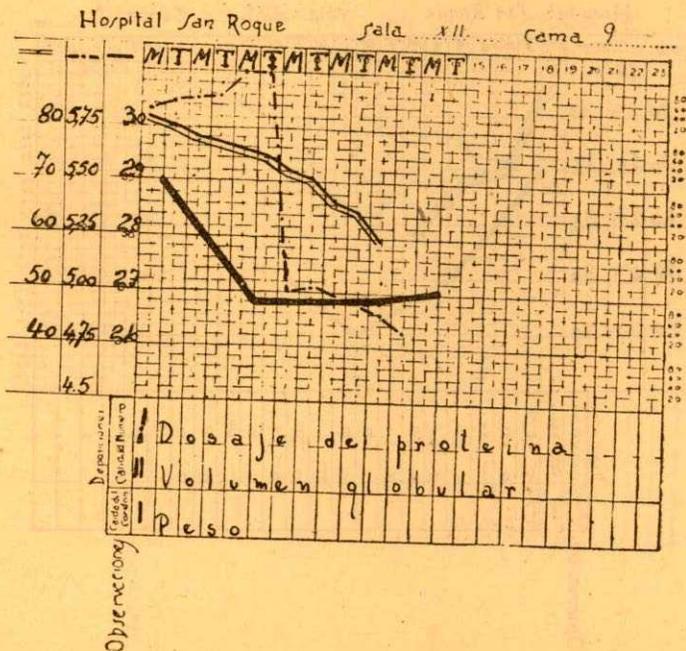
Opinión

I Dosaje de proteína
II Volumen globular
I Peso

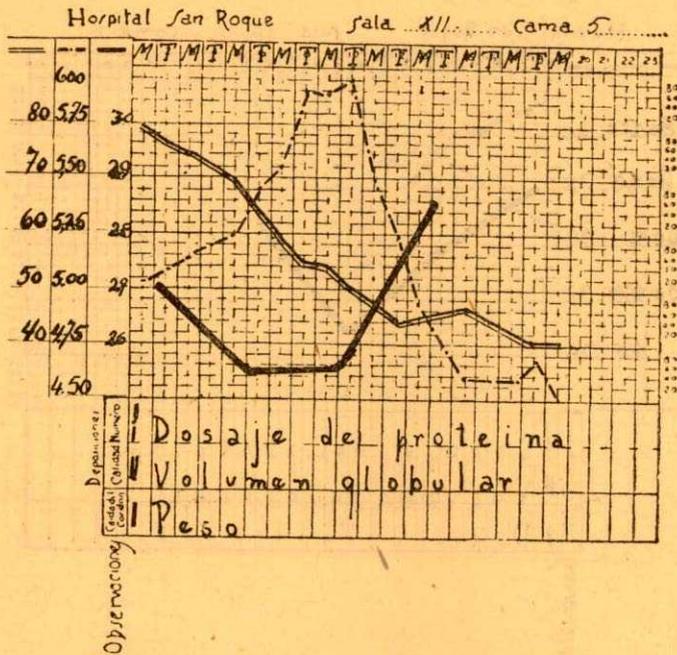
Fecha: 26-III-43- Hora: 7.45- Candida P. Lopez



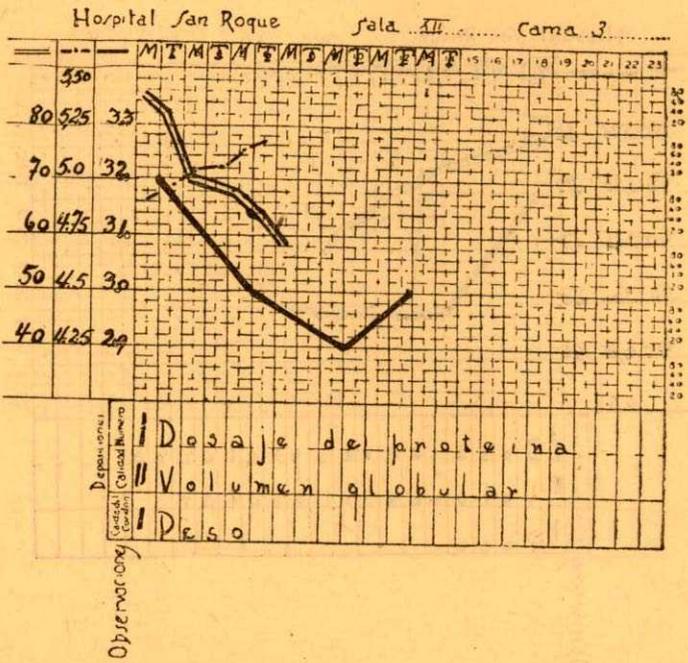
Fecha: 28-II-43- Hora: 9.- Victoria M. Luna



Fecha: 1-III-43 - Hora: 16 - Emilio H. Villalón

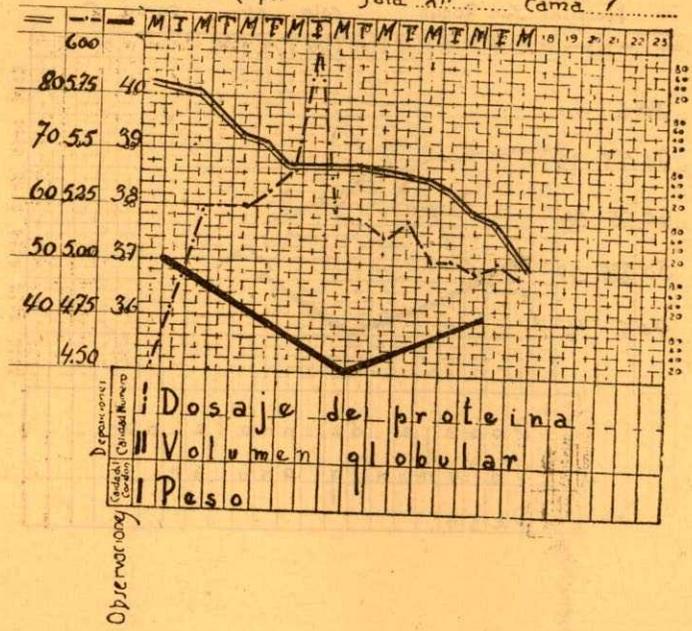


Fecha: 30-III-43 - Hora 7 - María Luisa Aguirre



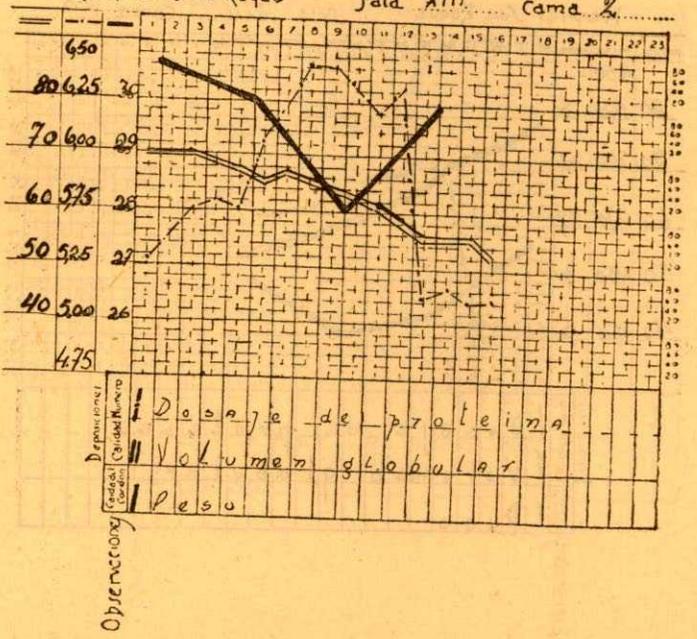
Fecha: 8-III-43-Hora: 3- María F. Landa

Hospital San Roque sala XII Cama 1

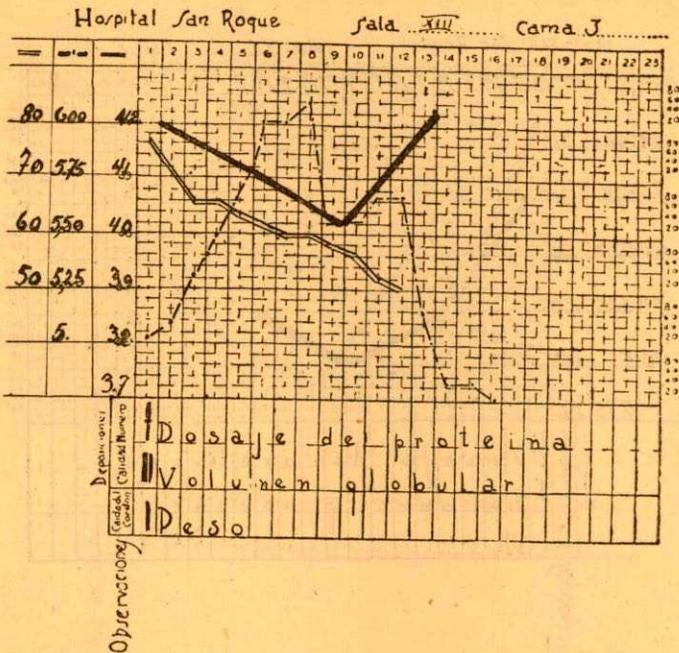


Fecha: 3-III-43-Hora: 15.45. Nelida B. Pereyra

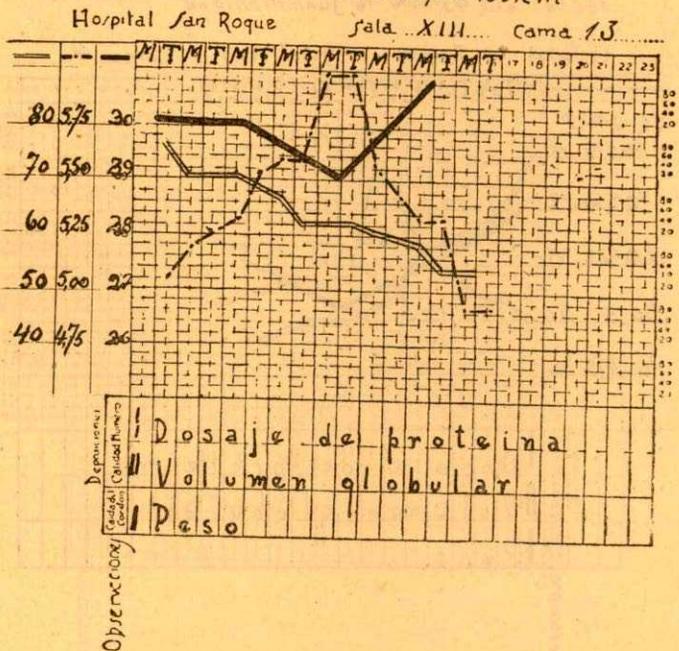
Hospital San Roque sala XIII Cama 2



Fecha: 24-III-43 - Hora: 5 - Raul Bustos

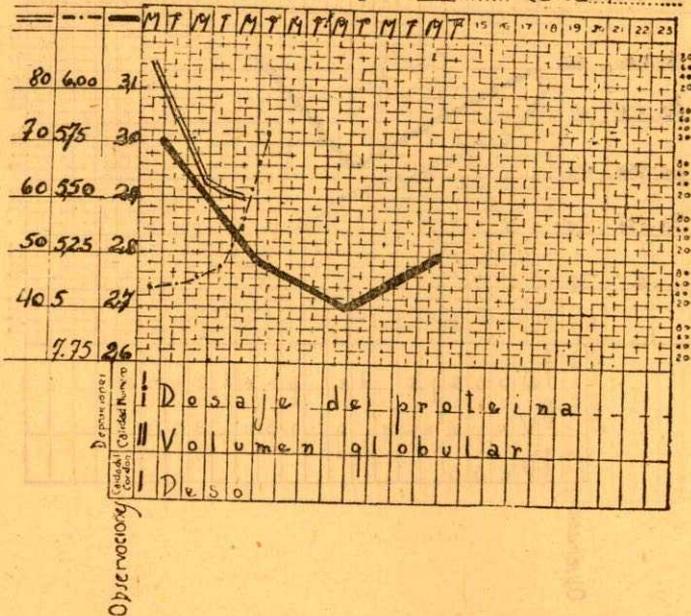


Fecha: 11-III-43 - Hora: 7 - Maria Angela Boletti



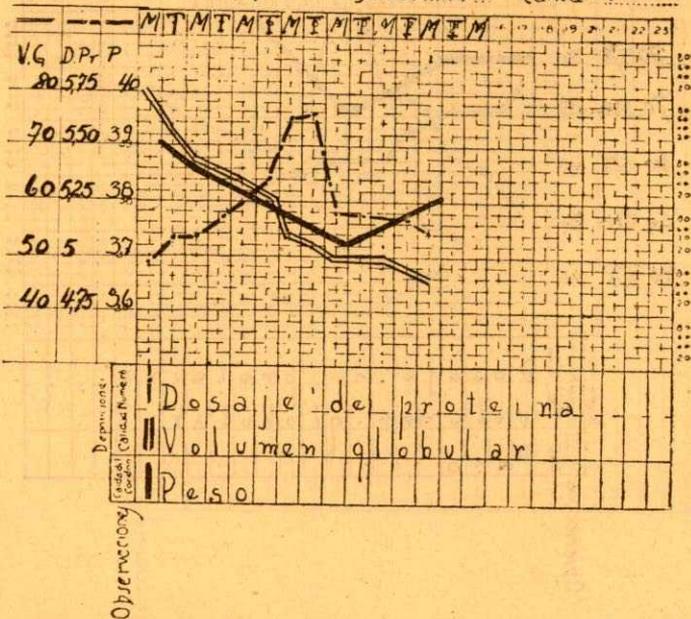
Fecha 12.III-43-Hora 8.45. Alejandro R. Paredi

Hospital San Roque sala XII. Cama 4



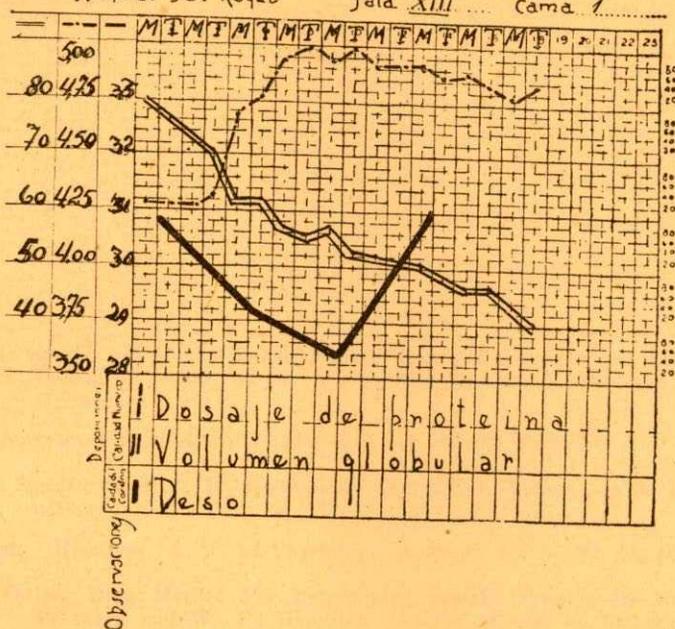
Fecha: 16.III-43-Hora 16 Juan Montoya

Hospital San Roque sala XIII. Cama 4



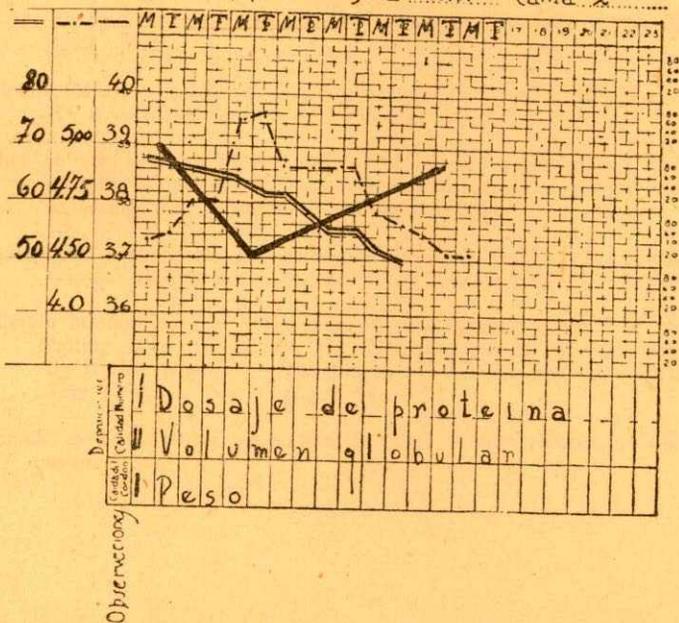
Fecha: 2-III-43 - Hora: Yrma Rosa Ramallo

Hospital San Roque sala XIII Cama 1



Fecha: 13-II-43 - Hora: 6.55 - Hugo Godoy

Hospital San Roque sala XIII Cama 2



Bibliografía

- A note on the use of the Kakan Falling drop proteinometer. — Lieutenant Donald H. Allas, M. C. A. v. S.; Leonard Cordon and Joseph Burrata.
- An. Journal of Clinical Pathologic. Vol. 13. March 1943, N°. 3.
- Blood Specific Gravity: Its significance and a New Method for its Determination.
- Barbour - Hamilton. A. J. of Physiology. Volumen LXIX, N°. 13, pág. 654.
- The Falling Drop Method For Determining specific Gravity By Hemy G. Barbourg and W. F. Hamilton. — The Journal of Biological Chemistry — Año 1926. Vol. 69, pág. 625.
- Serum protein concentration as a guide to the treatment of deshidration in diarrheal Diseases.
- Ed. M. Bridge. M. D.; Mainard I. Cohen, M. D. and T. F. Mc. Nair Scott. M.D.
- Baltimore, M.D. — Original Communications — Junio 1941. —, Vol. 18, N°. 6. — The Journal of Pediatrics.
- Studies on the Clinical Significance of the Serun Proteins. — The protein content of normal human venous and capillary Serum and factors affecting the Accuracy of its determination.
- Benjamin M. Kagan, M. D., Richmond. — The Journal of Laboratory and Clinical Medicine. — V. 27, N°. 11, pág. 1457. — August. 1942.
- A Simple Method for the estimation of total protein content of plasma. A falling drop method for the determination of specific Gravity. — By B. M. Kagan. — The Journal of Clinical Investg. — Vol. XVII, July 1938. — N°. 4, pág. 369.
- A Simple method for the estimation of total protein content of plasma and serum.

- The estimation of total protein content of human plasma and serum by the use of the falling drop method. by B. M. Kagan. — *The Journal of Clin. Investig.* — Vol. XVII. July 1938. — N^o. 4, pág. 373.
- Archives of Internal Medicine.* — V. 71, N^o. 2. February 1943. — Studies on the Clinical significance of the serum proteins. By B. M. Kagan.
- The relation between specific Gravity of blood serum and its protein concentration. — Joseph M. Looney, M. D. Worcester, Mass *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine.* — Vol. 27, N^o. 11. August. 1942, pág. 1463.
- Similarities and Distinctions between shock and the effects of hemorrhage.
- Virgil H. Moon, M.D. — David R. Morgan, M.D. — Marshall M. Lieber, M.D. and Donald Mc. Crew, M.D.
- The Journal of the A. M. Ass.* — Pág. 2024, Año 1941. T. 117.
- The relationships between plasma, specific gravity, plasma protein content and edem in Nephritis.
- By Norman S. Moore and Donald D. van Slyke. — *The Journal of. Clinical Investigation.* — V. VIII, N^o. 3. Abril 20-30. Pág. 337.
- Quantitative Clinical Chemistry* — Peter and van Slyke — 1931 — Pág. 652. — *Proteins of the Urine, Blood Plasma and Other Body Fluids Nature. Functions and Physiological variations of the Plasma Proteins. Clasification of the plasma proteins by solubility.*
- The Relationship between specific Gravity and protein in plasma, serum and transudate from dogs.* A. A. Weech, E. B. Reeves and E. Joettsch. — *The Journal of Biological Chemistry* — T. 113, Año 1936, pág. 167.
- The relation between plasma protein content, plasma specific gravity and edem in dogs maintaind on a protein inadequate dietand in dogs rendered edematous by plasma pheresis. By A| A| Weech, C. E. Smelling and E. Goettsch.
- The Journal of Cl. Investigation.* — V. XII, N^o. 1, pág. 193.
- More N. S. and V. Slyke D. D. Relationships between plasma and specific Gravity, plasma protein content and Edem y nefritis. — *Journal Clin. Investig.* — V. VIII, pág. 337, Año 1930.
- Dres. Carlos Piantoni y J. B. Sosa Gallardo. — *Proteidemia plasmática y relación g'obulino-plasma durante el primer año de vida.* — *Arch. Arg. de Pediatría.* Año XIII, tomo XVIII, núm. 5, pág. 438.