

## TEMA 3.

### DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS.

*David Olivares Gordillo.*

#### 1. DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS EN SUERO.

El suero sanguíneo tiene el mismo contenido proteico que el plasma (en 100 ml. de suero hay de 6 a 8.2 g. de proteínas totales). Excepto el fibrinógeno que convertido en fibrina ha quedado en el coágulo retenido. El fibrinógeno representa del 3 al 6 % del contenido proteico plasmático.

Se utilizan fundamentalmente los métodos basados en la refractometría, en Kjeldahl y en la reacción de Biuret.

##### 1.1. Estimación de la concentración proteica a partir de la medida del índice de refracción.

Es el método más rápido y directo. Los resultados obtenidos con este método son lo suficientemente buenos para las necesidades de la clínica siempre que se utilicen sueros transparentes y no pigmentados. Tiene la ventaja de necesitar muy poco suero, tan sólo una gota. Estos refractómetros proporcionan directamente en sus escalas el contenido proteico.

En la aplicación de este método se parte del supuesto de que las concentraciones de los electrolitos inorgánicos y de los metabolitos orgánicos simples no varían apreciablemente de un suero a otro y de que las diferencias en el índice de refracción son un reflejo de las diferencias en la concentración de proteínas. En condiciones normales esto es cierto, pero pueden existir otros componentes distintos de las proteínas capaces de afectar el índice de refracción, por ejemplo altas concentraciones de lípidos o de bilirrubina, y entonces el método presenta grandes errores.

## 1.2. Método de Kjeldahl.

La validez de la determinación de proteínas fundada en el análisis del nitrógeno se basa en:

- Constancia del contenido en nitrógeno de las diversas clases de proteínas existentes en la muestra.
- Recuperación completa, o cuando menos constante, del nitrógeno proteico en el análisis.

Generalmente los cálculos se hacen basándose en la presunción de que la molécula proteica tiene como promedio, en peso, un 16% de nitrógeno; así pues, basta multiplicar el contenido en nitrógeno por el factor 6.25 para obtener la concentración de proteínas.

En este método, el nitrógeno de las proteínas es transformado en  $\text{NH}_4^+$  el cual se destila en forma de  $\text{NH}_3$ . El  $\text{NH}_4^+$  existente en el destilado se titula con  $\text{ClH}$  o  $\text{SO}_4\text{H}_2$  0.1 N usando un indicador adecuado.

Para determinar los mg de proteínas de la muestra se realizan los siguientes cálculos:

***Mg de nitrógeno de la muestra = ml. ácido x normalidad del ácido x 14 mg. de proteínas de la muestra = mg. de nitrógeno de la muestra x 6.25.***

Habrá que hacer una corrección para el nitrógeno no proteico presente en la muestra; para ello suponemos que la cantidad del mismo presente es normal y restamos del valor hallado un 0.2%.

## 1.3. Método del Biuret.

El biuret en presencia de iones cúpricos, en solución alcalina, produce un color violeta, por formación de un complejo de composición desconocida, entre el ión  $\text{Cu}^{++}$  y los grupos ( $=\text{C}=\text{O}$ ) y ( $=\text{N}-\text{H}$ ) de los enlaces de péptidos; se necesitan por lo menos dos de cada uno de estos grupos, por lo que la reacción no la darán aminoácidos y dipéptidos, pero sí tripéptidos, polipéptidos y proteínas.

Cuanto mayor es la cantidad de proteína presente, más enlaces de péptidos hay disponibles para la reacción. La intensidad del color producido es proporcional al número de enlaces de péptidos que reaccionan. El método es simple y rápido. La precisión es suficiente, por lo que se ha convertido en el método más utilizado.

## 1.4. Significación clínica.

Los valores normales de proteínas totales en suero oscilan de 6 a 8.2 g./100 ml. En plasma el fibrinógeno aumenta este valor en 200-400 mg./100 ml.

Las anormalidades que se presentan en clínica en el contenido de proteínas totales del plasma la mayoría de las veces, son en el sentido de una disminución

(hipoproteïnemia), debida a un descenso en la albúmina. Aunque la fracción globulínica, puede, ocasionalmente ser también baja, lo habitual es que experimenta un incremento simultáneamente. El grado de hipoalbuminemia por lo general excede a la coexistente hiperglobulinemia, siendo, por tanto subnormal, la concentración de proteínas totales. La hipoproteïnemia se presenta en el síndrome nefrótico, en las hemorragias extensas o quemaduras graves en los estados de hambre o de carencia por deficiente absorción intestinal en los que el hígado no dispone de los materiales suficientes para su síntesis.

En otros casos, sobre todo en el mieloma múltiple y enfermedades víricas, puede ocurrir que la hiperglobulinemia, presente un incremento en la concentración total de proteínas.

A veces la hipoalbuminemia puede ser contrarrestada por la hiperglobulinemia, por lo que la concentración de proteínas totales permanece normal. Es por ello por lo que muchas veces la determinación de proteínas totales debe ir acompañada por la determinación de las distintas fracciones proteicas (proteïnograma).

## **2. DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS EN ORINA.**

En la orina normal el contenido de proteínas es tan escaso que no es detectable por los procedimientos cualitativos ordinariamente empleados en el laboratorio, por lo que consideramos siempre la positividad de estas de carácter patológico.

La permeabilidad de la membrana glomerular para las proteínas es escasa; pero el filtrado glomerular contiene normalmente de 2.8 mg. de proteínas por 100 ml., en su mayor parte albúmina, que por ser la de menor peso molecular atraviesa más fácilmente la membrana glomerular. Estas proteínas son absorbidas en su mayor parte por las células del túbulo renal, considerándose el límite superior de normalidad del contenido proteico diaria en la orina de unos 100-150 mg. Se dice que existe proteinuria si la cantidad eliminada es superior a estos valores. Del 70% de las proteínas presentes en la orina son mucinas que tienen su origen en el revestimiento mucoso del tracto urinario y carecen de significación clínica.

### **2.1. Métodos cualitativos.**

Es deseable que el método no sea muy sensible para que sea negativo a las concentraciones proteicas normales, pero que dé resultados positivos siempre que la concentración sea mayor de 20-25 mg./100 ml. No debe de ser sensible a mucinas y otras proteínas de origen no renal y el método elegido habrá de permitir una estimación cuantitativa aproximada.

El método más sencillo es mediante el empleo de tiras reactivas. La mayoría de ellas emplean azul de tetrabromofenol, que en presencia de proteínas da lugar al desarrollo de un color verde. Esta prueba de resultados negativos con orinas normales,

de forma que un resultado positivo indica proteinuria significativa. En orinas de elevada densidad con proteinuria no significativa puede darnos valores positivos erróneos. Al meter la tira reactiva en la orina leemos inmediatamente, ya que el tiempo no es crítico.

### *2.1.1. Método de coagulación por calor.*

Es un método recomendable por su sencillez. La orina en tubo de ensayo se calienta en su porción superior a la llama de un mechero Bunsen hasta ebullición. Si hay proteinuria aparecerá en la parte calentada un enturbiamiento o precipitación muy visible por contraste con la parte no calentada. Esto se debe a que la albúmina y la globulina se coagulan mediante calor a un pH ácido. El enturbiamiento producido puede ser debido en las orinas alcalinas a precipitación de fosfatos; para descartar esta posibilidad, causa de error, se añaden unas gotas de ácido tricloroacético al 20%, lo que provocará la redisolución del precipitado si era debido a fosfatos; mientras que si es una proteinuria, el precipitado se intensificará aun más en medio ácido. De este método existen modificaciones que lo hacen más exacto, pero también, más laboriosos.

### *2.1.2. Prueba del anillo de Séller.*

También llamada prueba del anillo con ácido nítrico consiste en poner en contacto, con cuidado, ácido nítrico concentrado con la orina, haciéndola resbalar por las paredes del tubo de ensayo o bien colocando el ácido nítrico en el fondo de un tubo de ensayo, que contenga orina, con una pipeta fina. En caso de positividad aparece un anillo, la sensibilidad del método es aproximadamente de 10 mg. de proteína por 100 ml. de orina, pero da anillos con mucina, urea, ácido úrico y proteína de Bence-Jones.

## **2.2. Métodos cuantitativos.**

A) *Método de Esbach* : En 1874 desarrolló un método de precipitación de la proteína urinaria, empleando ácido pícrico, mediante el cual la cantidad de proteína precipitada podía ser estimada por su volumen. El método de Esbach y sus modificaciones es mucho menos preciso y exacto que los métodos turbidométricos, por lo que debe emplearse solo de manera semicuantitativa para dar una estimación de la proteínas presente, e incluso en este caso los resultados serán a menudo erróneos a no ser que la orina se acidifique antes de la precipitación.

B) *Método de centrifugación de Dhommée*: Es recomendable emplear este método cuando sea necesario conocer el resultado con anterioridad a las 24 horas (en cuyo caso no podemos emplear el Esbach). Los resultados obtenidos, si bien no tienen la exactitud de los métodos turbidométricos, son clínicamente tolerables. Se basa en la coagulación de la albúmina con un reactivo que contiene ácido tricloroacético, ácido cítrico y ácido pícrico. La albúmina coagulada se recoge por centrifugación en el

fondo de un tubo de centrifuga graduado, por lo que podemos deducir la cantidad de albúmina que contenía muestra de orinas.

C) *Proteínas de Bence-Jones*: Se trata de una proteína de peso molecular aproximado 22.000 que contiene de 210 a 230 aminoácidos. Corresponde a cadenas ligeras de las gammaglobulinas. En la mielomatosis, y en general en los casos de extensa afectación de la médula ósea, se producen estas gammaglobulinas de forma excesiva y desordenadas; dado su pequeño tamaño atraviesan con facilidad la membrana glomerular, por lo que aparecen en la orina.

A continuación vamos a ver como se realizan cada una de estas pruebas citadas anteriormente.

### 3. DETERMINACIÓN CUANTITATIVA DE PROTEÍNAS POR EL MÉTODO DE DOMES.

– Fundamento.

Se basa en la coagulación de la albúmina con un reactivo que contiene ácido tricloroacético, ácido cítrico y ácido pícrico.

– Reactivo.

Ácido tricloroacético .....	1 g.
Ácido cítrico .....	2.5 g.
Ácido pícrico .....	0.5 g.
Agua destilada c.s.p .....	100 ml.

– Procedimiento.

En tubo de centrífuga de 15 ml., graduado en décimas, se colocan 10 ml. de orina y 5 ml. de reactivo. Mezclar. Dejar en reposo durante 10 minutos como mínimo (tiempo normal para la coagulación irreversible de la albúmina) y centrifugar de 1.500 a 2.000 r.p.m. durante 3 minutos.

Leer la altura que alcanzó el precipitado y deducir la cantidad de albúmina en gramos por litro según el cuadro de la página siguiente.

### 4. DETERMINACIÓN CUALITATIVA DE PROTEÍNAS EN ORINA POR EL MÉTODO DE COAGULACIÓN POR CALOR.

Se basa en la propiedad que tienen las proteínas (principalmente la albúmina y la globulina) de coagularse mediante calor en un medio ácido.

– **Procedimiento 1.**

- Colocar orina acidulada con unas gotas de ácido tricloroacético al 29% en un tubo de ensayo resistente al calor.

M I L I L I T R O	DECIMAS DE MILILITRO									
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
	0	0.1	0.3	0.4	0.5	0.7	0.85	1.0	1.15	1.30
	1.4	1.5	1.6	1.85	2	2.1	2.25	2.35	2.50	2.60
	2.75	2.85	3.0	3.15	3.25	3.40	3.50	3.60	3.75	3.90
	4.0	4.1	4.2	4.4	4.5	4.6	4.75	4.90	5	5.20

- Calentar la parte superior de la orina del tubo de ensayo a la llama de un mechero Bunsen hasta ebullición.
- Comparar la parte calentada con la no calentada observando si se ha producido enturbiamiento o precipitación.

Interpretación: Si se ha producido enturbiamiento o precipitación la orina contiene proteína; en caso contrario la orina no contiene proteínas.

### – Procedimiento 2.

#### Reactivo:

Ácido acético glacial.....	23.7 ml.
Acetato sódico anhidro .....	7.4 ml.
Agua destilada c.s.p .....	100 ml.

- Centrifugar 10 ml. de orina para aclarar
- Colocar 7.5 ml. de orina clara en un tubo de ensayo y añadir 3 gotas del reactivo. Mézclase invirtiéndolo. Si se precipita moco quitarlo por filtración o centrifugación.
- Calentar la mitad superior de la orina a la llama hasta ebullición y comparar entonces la mitad superior con la inferior.

#### Interpretación:

Sin diferencia	Negativo	
Turbidez escasamente visible	Indicios	Alrededor de 5 mg./100 ml.
“ evidente	+	de 10 a 30 mg./100 ml.
“ moderada	++	de 40 a 100 mg./100 ml.
“ notable	+++	de 100 a 500 mg./100 ml.
Floculación intensa	++++	500 mg./100 ml. o más.

## 5. DETERMINACIÓN CUALITATIVA DE PROTEÍNAS EN ORINA POR EL MÉTODO DE SÉLLER.

### – Procedimiento.

- Poner un tubo de ensayo 5 ml. de orina.
- Con una pipeta fina dejar caer, apoyando la pipeta en el fondo, dos o tres ml de ácido nítrico concentrado (el ácido nítrico, al ser más denso que la orina, queda en el fondo separado de ésta). Sacar la pipeta tapada para no mezclar el nítrico con la orina.

### – Interpretación.

En caso de albuminuria aparecerá, en el límite de separación de ambos líquidos, un disco blanquecino más o menos aparente, según la cantidad de albúmina presente en la muestra.

### – Causas de error.

Es conveniente acidular la orina previamente con unas gotas de ácido acético, ya que las orinas que contienen fosfatos dan un disco similar al que produce la albúmina.

Las orinas ricas en uratos también producen un anillo blanco por encima del límite de separación. En las orinas ricas en urea aparece un anillo cristalino de nitrato de urea.

## 6. DETERMINACIÓN CUANTITATIVA DE PROTEÍNAS EN ORINA POR EL MÉTODO DE ESBACH.

### – Fundamento.

Se basa en la precipitación de la proteína urinaria con el reactivo de Esbach.

### – Reactivos.

Ácido acético

Reactivo de Esbach:

- Ácido pícrico..... 1 g.
- Ácido cítrico..... 2 g.
- Agua destilada c. s.p..... 100 ml.

### – Procedimiento.

- Poner orina acidulada con unas gotas de ácido acético, en un tubo de Esbach hasta la señal “U”.
- Poner reactivo de Esbach hasta la señal “R”.
- Mezclar por inversión y dejar en reposo durante 24 horas en un sitio fresco.
- Leer la cantidad de proteínas precipitadas en la escala del albuminómetro, que nos expresa la concentración de proteínas en g/1.000 ml.

## 7. TEST COLORIMÉTRICO “BIURET”.

### — Fundamento del método.

Los grupos – CO-NH unidos entre sí dan una reacción con formación de color violeta con las sales cúpricas en medio alcalino, siendo la más representativa y simple la que da con el Biuret –NH<sub>2</sub>-CO-NH-CO-NH<sub>2</sub>. Es en la actualidad el método colorimétrico más exacto y simple para la determinación de proteínas totales.

### – Reactivos

Reactivo 1:	Tartrato KNa	15 mmol/l.	
	Yoduro Na		100 mmol/l.
	Yoduro K	15 mmol/l.	
	Sulfato de cobre	5 mmol/l.	

### – Estabilidad.

A temperatura ambiente la estabilidad es hasta la fecha de caducidad indicada en el envase

### – Muestra.

Suero, plasma

### – Técnica.

	Blanco	Estándar	Muestra
Estándar	-	100 ul.	-
Muestra	-	-	100 ul.
R. 1 Biuret	5.00 ml.	5.00 ml.	5.00 ml.

Mezclar e incubar 20 min a 37 ° C.  
 Dejar enfriar 5 minutos a temperatura ambiente.  
 Leer, frente al blanco de reactivo, a 540 nm.

### – Cálculo.

D. opt. muestra

\_\_\_\_\_ x Conc. standard = Conc. muestra

D. opt. standard

G./dl. = 10g./l.

Como estándar deberá usarse un suero previamente valorado o un “pool” de sueros valorados por refractometría o Kjeldhal.

### – Linealidad.

El método es lineal hasta valores de 15 mg./dl. (150g./l.).

– Valores normales.

Recién nacido..... 5.2-9.1 g./dl.

Niños (hasta 3 años)..... 5.4-8.7 g./dl.

Adultos ..... 6.7-8.7 g./dl.

– **Notas.**

Pueden variarse los volúmenes de reactivo y muestra proporcionalmente sin alterar el resultado.

### **BIBLIOGRAFÍA.**

B. Genetet Hematología: A. Madrid Vicente, ediciones, págs. 133-147; 216-225.

Farreras Rozman, Medicina interna. Volumen II, 11º edición, pág. 1470-1471.

M. Aguilo, J. A. Tatay. Hematología editorial. ECIR. págs. 42-48.

S. de Castro del Pozo. Manual de patología general. 5ª edición, editorial Masson S.A. págs. 335-337.