

LA REFRACTOMETRIA SERICA EN LA DETERMINACION DE LA LIPEMIA DE HEMBRAS *GALLUS DOMESTICUS* PREVIA VALORACION QUIMICA DE LA PROTEINEMIA, Y VICEVERSA.

(SERUM REFRACTOMETRY IN THE DETERMINATION OF LIPEMIA IN FEMALE *GALLUS DOMESTICUS* PREVIOUS CHEMICAL VALUATION OF PROTEINEMIA, AND VICEVERSA).

por

R. MAYER VALOR*, J. M. MOLLEDA CARBONELL*, G. GOMEZ CARDENAS*
y D. SANTIAGO LAGUNA**

I. *Introducción.*

Con anterioridad hemos controlado la utilidad de la refractometría sérica en la valoración de la proteinemia de hembras de *Gallus domesticus*, contrastando sus resultados con los obtenidos por el método del biureto (Mayer Valor, *et al.* 1975). Concluimos que en aves sexualmente inmaduras, hasta pocos días antes del comienzo de la puesta, el refractómetro proporciona valores casi uniformemente inferiores en un 8 p. 100 de media a los que suministra el biureto y, por el contrario, en los ocho días que preceden al comienzo de la puesta, y durante ella, los niveles proteinémicos hallados con el refractómetro son variablemente superiores a los que se obtienen mediante la reacción del biureto.

Sugeríamos que este hecho pudiera estar relacionado con el nivel de lípidos sanguíneos, que muestra valores próximos a 500 mg/100 ml en aves sexualmente inmaduras; se eleva hasta casi cuádruplicarse en consonancia con la maduración sexual (Molleda y Mayer, 1975); y fluctúa ampliamente durante la puesta, en concordancia con la suma agilidad que adopta el metabolismo lipídico para atender los requerimientos derivados de la producción huevera (Lorenz y Bachman, 1975). Esta hipótesis ha sido confirmada ulteriormente por nosotros, al poner de manifiesto en suero de gallinas en puesta la existencia de correlación muy significativa ($p < 0,001$) entre los niveles lipémicos y las diferencias que muestran los valores proteinémicos que registra el refractómetro y los que se obtienen mediante el clásico proceder del biureto (Mayer, *et al.*, 1976).

* Cátedra de Patología general y médica. Prof. Dr. G. Gómez Cárdenas. Facultad de veterinaria. Universidad de Córdoba. (España).

** Cátedra de Farmacología y Toxicología. Prof. Dr. F. Infante Miranda. Facultad de veterinaria. Universidad de Córdoba. (España).

En el trabajo presente se mide la influencia de la lipemia sobre el índice de refracción sérico, con objeto de instrumentar un procedimiento matemático que permita valorar refractométricamente la concentración sérica de lípidos totales previo control químico de la proteinemia, y viceversa, en hembras de *Gallus domesticus*.

II. *Material y Metodos.*

Se utilizan 34 hembras Shaver, escogidas al azar: 30 de ellas de veinticinco meses de edad se encuentran en su segundo ciclo productivo, iniciado unos tres meses antes, y las 4 restantes, sexualmente inmaduras, tienen edades comprendidas entre tres y cuatro meses. Todas las aves, alojadas en baterías, están alimentadas *ad libitum* con raciones comerciales de composición adecuada a su edad, disponiendo de agua corriente.

De cada ave se extrae una muestra de sangre mediante flebotomía de la humeral y, tras su coagulación y retracción del coágulo a temperatura ambiente, se separan los sueros respectivos, en los que se valoran lipemia y proteinemia totales.

La lipemia (D) se dosifica por el método de Haury (s. d.) basado en el de Zöllner y Kirsch (1962) y fundamentado en que los componentes típicos de la grasa total del suero, al calentarlos con ácido fosfórico y aldehído vainillínico, producen un color rosado, que se contrasta fotométricamente con el patrón ideal por Hoeflmayr y Fried (1967).

La proteinemia se valora por refractometría (R) en un *Atago Optical Works Co., Ltda.* y mediante la reacción del biureto (B) con el equipo de reactivos del *Biureto-Method* (de Merk), usando como patrón en ambos métodos suero *Versatol* de concentración proteica conocida.

En cada caso, se resta el valor proteinémico obtenido mediante el biureto del que registra el refractómetro, calculándose así (R-B) las diferencias (D) respectivas.

Las aves se clasifican en orden creciente según su nivel lipémico y los pares de valores L y D, expresados en g/100 ml, se representan en un sistema de coordenadas: L en el eje de abscisas y D en el de ordenadas. Se obtiene una serie de puntos, cuya línea media dibuja una parábola, base del estudio estadístico ulterior que consiste en: a) ajustar la ecuación de la parábola de regresión y b) analizar la correlación parabólica entre L y D, de acuerdo con los cálculos que a continuación se indican (Bonnier y Tendin, 1966; Snedecor, 1964).

$$a) \quad Y = a_0 + a_1 X + a_2 X^2$$

$$b) \quad r = \sqrt{1 - \left(\frac{SYX}{SY}\right)^2}$$

$$SYX = \frac{\sqrt{\sum Y^2 - a_0 \sum Y - a_1 \sum XY - a_2 \sum X^2 Y}}{N}$$

$$SY = \sqrt{\frac{\sum Y^2}{N} - \left(\frac{\sum Y}{N}\right)^2}$$

donde Y = D, y X = L, ambas expresadas en g/100 ml de suero, y N = número de individuos, es decir 34.

III. Resultados y discusión.

El cuadro I compendia los valores lipémicos, proteinémicos registrados por refractometría (R) y biureto (B), diferencias (D) entre estos dos últimos, y edad y estado productivo de las aves controladas.

La figura 1 representa la serie de puntos y línea media parabólica que se dibujan al llevar a un sistema de coordenadas los valores L y D hallados en cada ave.

El cuadro II incluye los resultados del análisis matemático: ecuación de la parábola de regresión y coeficiente de correlación parabólica entre las variables L y D.

Puede observarse que en las aves sexualmente inmaduras (NP), con niveles lipémicos comprendidos entre 0,27 y 0,69 g/100 ml, los valores D son siempre negativos y, por el contrario, en las gallinas en puesta (P), de lipemia muy superior (entre 1,21 y 4,88 g/100 ml), dichos valores D son siempre positivo (cuadro I). En todos los casos la magnitud de D depende de la lipemia (L), existiendo entre ambas correlación parabólica directa y muy significativa ($r = 0,9971^{***}$), y la ecuación ajustada de la parábola de regresión viene dada por $Y = -0,448384 + 0,363514X + 0,111271X^2$, donde Y = D y X = L, expresadas en g/100 ml de suero (cuadro II y figura 1).

MAYER, R. y col.: REFRACTOMETRIA SERICA, LIPEMIA DE HEMBRAS G. DOMESTICUS

CUADRO I.—Niveles de lipemia total, de proteinemia registrados por refractometría (R) y biureto (B), diferencias D (R-B) entre estos últimos y valores medios respectivos, obtenidos en las aves controladas, con especificación de su edad y estado productivo: (P) en puesta; (NP) no en puesta. Los datos se clasifican en orden creciente de acuerdo con el nivel lipémico.

EDAD (meses)	LIPEMIA g/100 ml	PROTEINEMIA g/100 ml		D (R-B)
		R	B	
3 (NP)	0,27	3,3	3,6	-0,3
" "	0,60	4,1	4,3	-0,2
4 "	0,63	3,4	3,6	-0,2
" "	0,69	4,9	5,0	-0,1
25 (P)	1,21	5,0	4,8	0,2
" "	1,42	5,2	4,9	0,3
" "	1,71	6,8	6,3	0,5
" "	1,85	6,2	5,6	0,6
" "	1,85	7,2	6,6	0,6
" "	1,99	6,6	6,0	0,6
" "	2,06	6,2	5,0	0,6
" "	2,13	6,0	5,1	0,9
" "	2,13	6,8	5,9	0,9
" "	2,20	7,4	6,6	0,8
" "	2,28	7,0	6,0	1,0
" "	2,35	7,2	6,2	1,0
" "	2,49	7,4	6,3	1,1
" "	2,70	8,2	6,8	1,4
" "	2,92	7,8	6,2	1,6
" "	2,92	8,2	6,6	1,6
" "	2,97	7,8	6,1	1,7
" "	3,13	8,4	6,6	1,8
" "	3,20	8,0	6,3	1,7
" "	3,41	7,6	5,6	2,0
" "	3,41	7,8	5,7	2,1
" "	3,48	8,8	6,5	2,3
" "	3,51	8,8	6,5	2,3
" "	3,55	8,2	6,1	2,1
" "	4,55	10,2	6,5	3,7
" "	4,62	9,2	5,5	3,7
" "	4,69	10,0	6,4	3,6
" "	4,69	10,2	6,5	3,7
" "	4,72	9,8	6,2	3,6
" "	4,88	10,0	6,0	4,0
MEDIAS	2,97	7,34	5,84	1,50

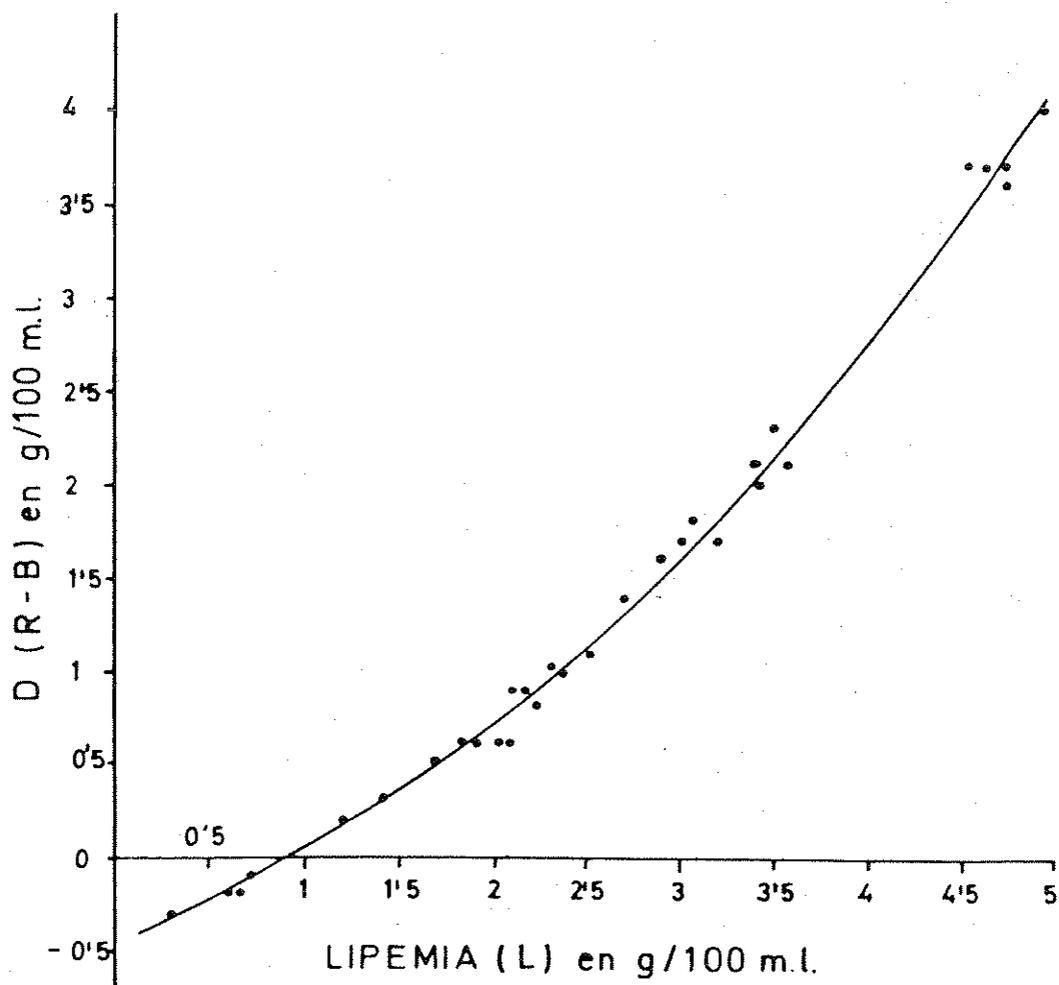


FIGURA 1.—Representación gráfica de los pares de valores L y D hallados en cada ave y línea parabólica media. D es la diferencia encontrada entre los valores proteinémicos obtenidos mediante refractometría (R) y biureto (B).

CUADRO II.—Ecuación de la parábola de regresión ($Y = D$ y $X = L$, en g/100 ml) y coeficiente de correlación parabólica (r), Nivel de significación: (***) muy significativo ($p = 0,001$).

$$Y = -0,448384 - 0,363514X - 0,111271X^2$$

Presumiblemente, esta ecuación permite, previo control químico de la lipemia, corregir el valor proteinémico que registra el refractómetro, restando a éste el valor Y . Asimismo, determinando la proteinemia por refractometría y biureto, y restando del valor obtenido por el primer procedimiento el registrado por el segundo, se calcula Y , que permite, de forma aproximada, conocer la concentración lipídica del suero objeto de estudio, pues, despejando X en la ecuación anterior, resulta:

$$X = \frac{-0,363514 + \sqrt{0,363514^2 - 4 [0,111271 \cdot (Y - 0,448384)]}}{2 \cdot 0,111271}$$

De acuerdo con estas ecuaciones, $Y =$ cero cuando X es alrededor de 0,955 g/100 ml; es decir, en sueros de hembras de *Gallus domesticus* con lipemia alrededor de 955 mg/100 ml la refractometría debe suministrar resultados proteinémicos similares a los que se obtienen mediante la reacción del biureto. Si la concentración serolipídica es menor de 955 mg/100 ml, la proteinemia que registra el refractómetro es inferior a la que proporciona el biureto. Y si la lipemia es mayor que 955 mg/100 ml, ocurre lo contrario.

Ello explicaría las conclusiones de nuestras experiencias anteriores (Mayer, *et al.*, 1974):

a) En aves sexualmente inmaduras, la refractometría sérica registra valores proteinémicos casi uniformemente inferiores en un 8 p. 100 a los que se obtienen con el método del biureto, en consonancia con sus niveles lipémicos que, relativamente constantes, fluctúan alrededor de 500 mg/100 ml en pollitas de cuatro meses de edad, según nosotros mismos hemos podido comprobar (Molleda, 1975; Molleda y Mayer, 1974).

b) En fechas cercanas al comienzo de la puesta y durante el ciclo productivo, por acción de los estrógenos —elaborados abundantemente en la capa granulosa y teca interna de los folículos ováricos en rápido crecimiento (Wyburn y Ballie (s.d.)— se elevan los niveles lipémicos de las hembras de *Gallus domesticus* (Bajpajee, 1972; Baum y Meyer, 1960; Entenmann, Lorenz y Chaikoff, 1940; Homena y Kato, 1962; Landauer *et al.*, 1941; Linsay *et al.* 1946; McDonald y Riddle, 1945; Zondek y Marx, (1939). Sus valores heterogéneamente mayores que 955 mg/100 ml (Molleda, 1975; Molleda y Mayer, 1974), fluctúan grandemente durante la puesta (Bajpajee, y Brown, 1972; Baum y Meyer, 1960) en virtud de cambios hormonales de origen hipofisario concordantes con los procesos de maduración folicular, ovulación y tránsito del huevo por el oviducto (Heald y Badman, 1963). De ahí que la refractometría sérica registre en estas fases de su vida valores proteinémicos variablemente superiores a los que se obtienen mediante el clásico proceder del biureto.

Teniendo en cuenta que en el hombre cada gramo de proteínas séricas por 100 ml incrementa el índice de refracción sérico (I. R. S.) en 0,00175, y que no parecen existir diferencias cualitativas sustanciales entre las proteínas sanguíneas humanas y aviares, puede calcularse, de acuerdo con la ecuación de la parábola de regresión ajustada, la influencia de la lipemia sobre el I. R. S. en hembras de *Gallus domesticus*. Basta para ello multiplicar Y por 0,00175. Así se tiene que, dentro del rango en que se desenvuelve la lipemia en esta especie, cada gramo de lípidos totales por 100 ml de suero hace aumentar el I. R. S. en 0,0012, aproximadamente, como ya estimábamos (Mayer y Molleda, 1975).

De otra parte, puesto que el índice de refracción (I. R.) del agua, a 20° C., es 4/3 (1,3333...), puede decirse que el I. R. S. resulta de sumar al I. R. del agua sérica los incrementos motivados por las concentraciones de proteínas totales, lípidos totales y demás componentes del suero. Es decir, $I. R. S. = 4/3 + PT \cdot 0,00175 + LT \cdot 0,0012 + K$, siendo PT y LT la proteinemia y lipemia, respectivamente, expresadas en gramos p. 100 ml, y K el incremento originado por el resto de componentes disueltos en el agua sérica.

Operando con los valores medios (cuadro I), corresponde a K un valor de 0,01093, siendo presumiblemente la glucosa el componente sérico de mayor importancia en la producción de ese pequeño incremento del I. R. S., puesto que, conjuntamente con proteínas y lípidos, se comporta como una de las principales sustancias ópticamente activas del suero o plasma sanguíneo (Grolmus, Petrovský y Petrovská 1972). Pero, dado que la glucemia no parece aumentar sustancialmente con la maduración sexual y comienzo de la puesta (Carmona y Planas, 1964; Gómez Cárdenas, Mayer y Espejo, 1968; Tapper y Kare, 1956), sino que más bien tiende a decrecer durante esta última (Tapper y Kare, 1956), estimamos que las pequeñas modificaciones del I. R. S. dependientes de ella no condicionan ni limitan la utilidad del método propuesto, que registra resultados no exactamente iguales, pero sí muy análogos a los que se obtienen por métodos químicos.

IV. Conclusión.

En hembras de *Gallus domesticus*, determinada la proteinemia mediante la reacción del biureto y por refractometría sérica, se puede calcular, aproximadamente, el nivel lipémico y, asimismo, conocida previamente la lipemia, puede corregirse el valor proteinémico que registra el refractómetro, resolviendo la siguiente ecuación:

$Y = -0,448384 + 0,363514X + 0,111721X^2$; donde Y es igual al valor proteinémico proporcionado por el refractómetro menos el obtenido por el biureto y X es la lipemia, ambos expresados en g/100 ml de suero.

V. Resumen.

En suero sanguíneo de hembras de *Gallus domesticus*, la ecuación $Y = -0,448384 + 0,363514X + 0,111721 X^2$ permite, previa valoración de la lipemia, corregir el valor proteinémico que se obtiene por refractometría. Asimismo, conociendo en un nuevo dato el nivel proteinémico que registra el refractómetro y el que proporciona el biureto, dicha ecuación permite calcular de forma aproximada su concentración en lípidos totales.

(Y = valor proteinémico obtenido por refractometría - valor proteinémico obtenido mediante el biureto. X = lipemia, Ambos expresados en g/100 ml de suero).

VI. Summary.

In blood serum of female *Gallus domesticus*, the equation $Y = -0,448384 + 0,363514X + 0,111721X^2$ permits, previous evaluation of lipemia, to correct proteinemia value obtained by refractometry. Likewise, known in a blood serum sample the proteinemia levels registered by refractometry and biuret reaction, this equation permits to calculate its total lipid concentration. Proteinemia level registered by serum refractometry - proteinemia level obtained by biuret method, X lipemia, both expressed in g/100 ml.

VI. Bibliografía.

- Bajpajee, D. P. and K. J. Brown, 1972.—Poult. Sci., 51: 1157.
Baum, G. J. and R. K. Meyer, 1960.—Amer. J. Physiol., 198: 1263.
Bonnier, G. y O. Tendin, 1966.—Acribia. Zaragoza.
Carmona, A. M. y J. Planas, 1964.—R. Esp. Fisiol., 20: 129.
Corominas Vilardell, A., 1973 —Toray S. A. Barcelona.
Entemann, C. F., W. Lorenz and I. L. Chaikoff, 1940.—J. Biol. Chem., 134:495.
Gómez Cárdenas, G., R. Mayer Valor y C. Espejo Serrano, 1968.—Arch. zootec., 17: 203.
Grolmus, J., E. Petrovský and E. Petrovská, 1972.—Acta F. R. N. Univ. Comen. Genetica III: 151.
Haury, H. s. d.—Chemiske Fabrik.
Heald, P. J. and H. G. Badman, 1963.—Biochem. Biophys. Acta, 70: 381.
Hoeflmayr, y Fried, 1967.—Cit. por Haury.
Homena, K. and S. Kato, 1962.—Poult. Sci., 41: 608.
Horton-Smith, C. and E. C. Amoroso, 1966.—Ed. Oliver and Boyd. Edinburgh.
Landauer, et al., 1946.—Cit. por Sturkie.
Linsay, et al., 1946.—Cit. por Reynolds et al.
— Lorenz y Bachman, 1947.—Cit. por Sturkie.

- Mayer Valor, R., J. M. Molleda Carbonell, G. Gómez Cárdenas y D. Santiago Laguna, 1975.—Comunicaciones Científicas al I Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas (XV Reunión de la S E C F). Zaragoza.
- Mayer Valor, R., J. M. Molleda Carbonell, G. Gómez Cárdenas y D. Santiago Laguna, 1976.—Arch. de zootec., 100: 379.
- McDonald y Riddle, 1945.—Cit. por Sturkie.
- Molleda Carbonell, J. M. 1975.—Tesis doctoral. Publ. Depto. Reprografía. Fac. Vet. Univ. Córdoba.
- Molleda Carbonell, J. M. y R. Mayer Valor, 1974.—Arch. de zootec., 23: 85.
- Reynolds, A. C., A. V. de Guzman and R. E. Clegg, 1971.—Poult. Sci., 50: 1783.
- Snedecor, G. W., 1964.—Cia. Ed. Cont., S. A. México.
- Sturkie, P. D., 1967.—Acribia. Zaragoza.
- Tapper, D. N. and M. R. Kare, 1956.—Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 92: 120.
- Wyburn, G. M. and A. H. Baillie.—Cit. por Horton-Smith and Amoroso.
- Zöllner y Kirsch, 1962.—Cit. por Corominas Vilardell.
- Zondek y Marx, 1939.—Citado por Sturkie.