

UNIVERSIDAD IBERO AMERICANA

Incorporada a la Universidad Nacional Autónoma de México

FACULTAD DE QUIMICA BERZELIUS

**DOSIFICACION DE MUCOPROTEINAS EN NIÑOS SANOS
Y CON FIEBRE REUMATICA**

Director de Tesis: Q. F. B. Aurelia Rivas

T E S I S

que para optar al título de
Químico Farmacéutico Biólogo

P R E S E N T A

MARIA LUISA SOLER PONCE DE LEON
MEXICO, D. F. 1959



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

A mis Padres.

A mis hermanos.

*A Don Luis M. Perea, Director de
la Facultad de Química Berzelius. A
mis maestros. Al Instituto Nacional de
Cardiología.*

CONTENIDO

CAPITULO I:	INTRODUCCION
CAPITULO II:	MATERIAL Y METODO
CAPITULO III:	RESULTADOS.
CAPITULO IV:	CONCLUSIONES.
	BIBLIOGRAFIA.

CAPITULO I

INTRODUCCION

Amplias investigaciones llevadas a cabo por Kelley, Forrest, Adams (8) etc., han logrado establecer con bastante seguridad, que la determinación de la concentración de mucoproteínas en el suero humano es de utilidad para el diagnóstico y evolución de las diferentes fases de la actividad reumática. Numerosos investigadores hicieron determinaciones de las concentraciones de mucoproteínas en sueros de pacientes con F. R. activa y en el estado de latencia y encontraron elevación de los niveles de mucoproteínas en el primer caso, y descenso de los mismos en el segundo; sugiriendo que dichas cifras podrían utilizarse como un índice no específico de actividad reumática, así como para controlar la eficacia del tratamiento con ACTH y cortisona. Enseguida doy a conocer otros factores que modi-

fican la concentración de las mucoproteínas del suero a saber: la histamina inyectada produce elevación inmediata de las concentraciones, en cambio las bacterias pirógenas, los salicilatos y ACTH, la detienen en un 50% (1). También se ha dado el caso de niños que sin ser reumáticos, pero teniendo una faringitis estreptocócica sin complicaciones presentan el nivel de mucoproteínas elevado (10).

La mucoproteína fué obtenida por Winzler, quien la identificó como una glucoproteína alfa-1 rica en glúcidos y hexosamina de poco peso molecular soluble en ácido perclórico (3) y en ácido tricloro-acético (11) e insoluble en ácido fosfotungstico. Las mucoproteínas séricas han sido estudiadas desde 1931 por Lusig y Langer (9) en muy diversas condiciones clínicas, predominando en los procesos neoplásicos y los inflamatorios (2). En relación con esto, los estudios posteriores han demostrado que los niños con enfermedades infecciosas activas y procesos inflamatorios como reumatismo, tuberculosis, endocarditis bacteriana, etc., presentan aumento de mucoproteínas séricas, que guardan algunas veces estrecha relación con la velocidad de sedimentación de los hematíes y dosificación del fibrinógeno (6).

Se han propuesto varios métodos para su dosificación.

El de Niazi y State (12), en 1948 que lo llevaron a cabo de la siguiente manera: a 0.2 cc de suero colocado en un

tubo pyrex de 25 x 150 mm. añadir 4 cc de ácido tricloro-acético al 20%; agitar fuertemente y centrifugar por espacio de 15' a 2000 R.P.M. El sobrenadante resulta negativo a la reacción de la difenilamina, por lo tanto se desecha. Al precipitado agregar 5 cc de ácido tricloro-acético al 5% moviendo con un agitador de vidrio y procurando que no queden partículas adheridas. Adaptar a dicho tubo un tapón de vidrio y calentar por 15' en B. de agua hirviente; pasado este tiempo invertir el tubo en B. de agua helada. Centrifugar el tubo por 15' a 2000 R.P.M. nuevamente y decantar el sobrenadante que resulta incoloro, pero que se vuelve a centrifugar por 15' más para asegurarse de que no contenga partículas. En un tubo de 22 x 174 mm. colocar 3 cc del líquido hidrolizado y a la vez preparar el blanco con 3 cc de ac. tricloro-acético al 5%; añadir a dichos tubos 6 cc de reactivo (100 cc de CH_3COOH , 2.75 cc H_2SO_4 conc. y 1 g de difenilamina); se tapan nuevamente y se ponen a B. de agua hirviendo por 10' más, enfriándolos rápidamente. El color púrpura desarrollado en este periodo se lee en el Fotocolímetro Evely usando filtro de 660 milimicrones y se dan los resultados en D.O.

Otro método fué dado a conocer en 1951 por Winzler, (3) que consiste en lo siguiente: A 1 cc de suero agregar 4 cc de ácido perclórico al 6%. Después de 10' agregar 5 cc de agua destilada y filtrar; poner 5 cc de este filtrado en tubo de

centrifuga y agregar 1 cc de ácido fosfotúngstico al 5% en solución de HCl 2N. Después de 10' de reposo centrifugar por otros 10' a 2000 R.P.M. Tirar el sobrenadante y agregar al precipitado 0.5 cc de solución de carbonato de sodio a 5° de saturación. Agitar con varilla de vidrio para disolver el precipitado y dejar la varilla dentro del tubo. Agregar 4.5 cc de agua. Añadir 2 cc de Biuret y leer a los 5' en el Espectrofotómetro a 540 mm la colocación púrpura que desarrolla. Hacer simultáneamente un testigo con 2 cc de Na₂CO₃ y 2 cc del reactivo de Biuret; tomando para los cálculos la diferencia entre el testigo y el problema.

En ese mismo año, o sea en 1951, Ayala Moore y Hess (11) encuentran una modificación al método de Niazi y State consistente en un Macroproceso y un Microproceso.

El macroproceso lo describiré a grandes rasgos ya que solo difiere del semimicro en la cantidad de suero problema y en la sensibilidad de los reactivos ("reactivos standard" en el primero y "reactivos sensitivos" en el segundo), encontrando obvio extenderme ya que en el segundo capítulo de esta tesis lo describiré detalladamente por ser el método que yo usé, aplicándolo a los niños que se inscribieron en la Campaña de F. R. organizada por el I.N.C. El método es como sigue:

A 0.2 cc de suero agregar 10 cc. de ac. tricloro-acético

al 5%, hidrolizar por 20' en B. de agua hirviendo, enfriar rápidamente; filtrar y a 3 cc de este filtrado añadir 6 cc del reactivo standard. (100 cc de CH_3COOH 2.75 cc de H_2SO_4 conc. y 1 g. de difenilamina) a la vez preparar 2 blancos; el primero para llevar a cero el aparato que consiste en 3 cc de ácido tricloro-acético y 6 cc del reactivo; el segundo, que se le resta al problema para dar la lectura final, está formado por 3 cc del hidrolizado y 6 cc de una mezcla standard (100 cc de CH_3COOH y 2.75 cc. de H_2SO_4 conc.) Ponerlos de nuevo en B de agua hirviendo por espacio de 30' desarrollándose en este período la coloración rojo púrpura; enfriar rápidamente y esperar a que la temperatura suba a la del medio ambiente. Leer en el Espectro-fotómetro a 530 mm. y dar los resultados en D.O.

El valor de la reacción mencionada en el índice de F.R., fué afirmada además de por Ayala Moore y Hess en 1951, por Coburn Moore y Haninger en 1953, Coburn y Haninger en 1954 y más recientemente en 1956, por Coburn, Bates, Hahn y Murphy. Sin embargo las opiniones no han sido unánimes difiriendo de ella, pero principalmente del valor que pueda tener en enfermedades articulares crónicas, autores tan distinguidos como Cecchi y Ferraris en 1955; Fearnley, Purkis, de Coek, Lakner y Meanock en 1955 y en ese mismo año, Förster y Schmid; Rother y Gamp (4).

A continuación describiré el Semimicro proceso descrito

por Ayala método que seguí por adaptarse mejor al plan de trabajo de la Campaña ya que la cantidad de suero entre uno y otro métodos en considerable, máxime si se tiene en cuenta que se necesitaba suero de estos niños para otras muchas determinaciones; y por el uso de reactivos sensitivos que me dieron mejores resultados que los reactivos standard del macroproceso.

CAPITULO II

MATERIAL Y METODO

MATERIAL:

Tubos Pyrex de 25 x 250 mm.

Tubos Pyrex de 13 x 100 mm.

Embudos de cristal.

Papel filtro Watman No. 40.

Pipetas de 1 cc y 5 cc

Tapones de hule perforados a los cuales se les han adaptado tubos de vidrio de 20 cm. de largo por 0.5 cm. de luz.

REACTIVOS:

1. Reactivo Sensitivo: 90 cc de CH_3COOH ; 10 cc de H_2SO_4 y 1 g de difenilamina.

- 2- Mezcla sensitiva: 90 cc de CH_3COOH ; 10 cc de H_2SO_4 .
- 3- Acido tricloro acético al 5%.

METODO:

A 0.2 cc de suero humano problema colocado en tubo de 25 x 250 mm se le añaden 5 cc de ácido tricloro-acético dejándolo caer lentamente resbalado por las paredes y agitando con objeto de obtener finos flóculos de precipitado. Sigue a esto un periodo de hidrólisis por 20' en B. de agua hirviendo adaptándose al tubo el tapón de hule, cuya varilla actúa como condensador. Pasado este tiempo se enfría por inmersión en B. de agua helada. Se filtra el hidrolizado del cual se toman 1.5 cc colocándolo en tubo de 13 x 100 mm. se le agregan 3 cc del reactivo sensitivo y se pone de nuevo en B. de agua hirviendo por espacio de 30', desarrollándose durante este lapso de tiempo la coloración rojo o púrpura, fin principal de la reacción. Se enfría en B. de agua helada nuevamente y se deja que la temperatura suba a la del medio ambiente. Se lee en Espectrofotómetro (6A Coleman a 570 nm en cuba pequeña y se anotan los resultados obtenidos. Para esta prueba son necesarios dos testigos: el primero consistente en 1.5 cc del ácido tricloro-acético y reactivo sensitivo en la misma proporción que en el suero problema, sirve para establecer el cero del aparato. El segundo blanco preparado a partir de 1.5 cc del suero hi-

drolizado y 3 cc de la mezcla sensitiva, este blanco deberá prepararse por separado para cada suero problema (véase nota). Se anota su lectura y se le resta a la del problema, dando así el resultado final.

Los valores normales de este método de Ayala practicados en adultos norteamericanos, fué dado de .288 a .376 en D.O.

Los valores que yo presento, obtenidos de un grupo de niños aparentemente sanos y leídos los resultados en un Espectrofotómetro modelo 6B Coleman Junior, son más bajos, oscilando entre .040 y .110.

NOTA: El ácido sulfúrico de la mezcla sensitiva causa el desenvolvimiento del color variando la intensidad de éste con cada suero problema.

CAPITULO III

RESULTADOS

Tomando como base los valores normales de .04 a .110 apliqué este método a 100 de los niños de las escuelas primarias que se inscribieron en la campaña de F.R. del Instituto y cuyas edades fluctuaron entre 5 y 15 años, obteniéndose los siguientes resultados:

Sesenta y cuatro de los 100 niños resultaron con el nivel de mucoproteínas elevado y el resto normales; de los 64, 12 han sido diagnosticado con F.R. activa, 4 clasificados como sospechosos y de los restantes se han presentado casos congénitos, nefríticos un caso de angiología y uno de esplenomegalia.

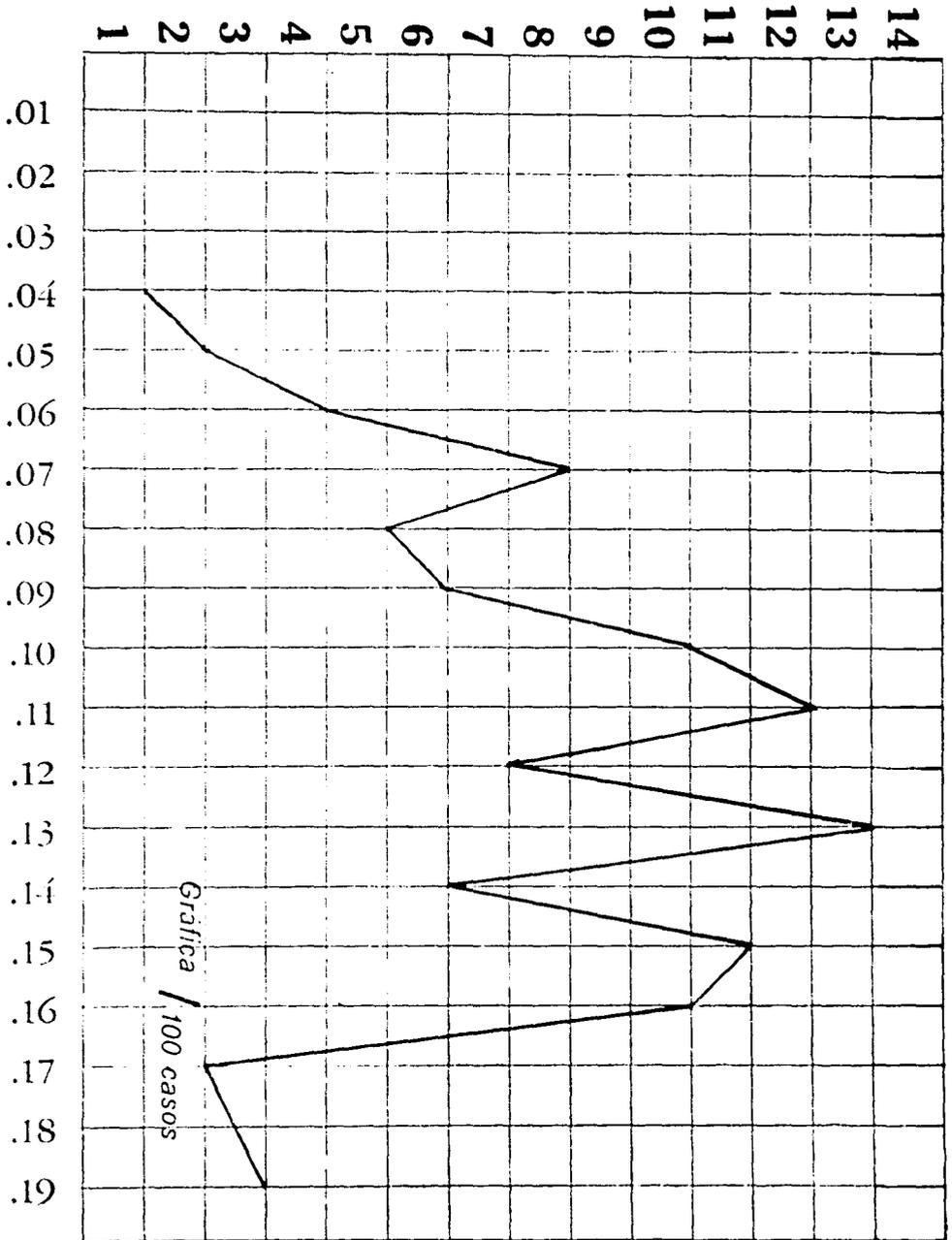
A continuación doy a conocer solamente las lecturas ob-

tenidas de los 12 casos con diagnóstico seguro de F.R. y los 4 sospechosos, ya que los restantes no interesan para el desarrollo de este trabajo:

<i>LECTURAS</i>	<i>NUMERO DE CASOS</i>	
.120	1R.	1S.
.130	1R.	1S.
.140	1R.	—
.150	2R.	—
.160	2R.	2S.
.170	3R.	—
.180	—	—
.190	2R.	—

NUMERO DE CASOS

LECTURA DADA EN D. O.



CAPITULO IV

CONCLUSIONES

Los métodos descritos en esta tesis fueron probados, aportando mejores resultados los del Semimicro proceso. Esta prueba se practicó en 100 sueros resultando 64 positivos.

Comparando los datos positivos obtenidos con el diagnóstico de la F.R., encontramos que 12 resultaron con el diagnóstico positivo; ésto acaba de comprobar que las mucoproteínas en el organismo son aumentadas en numerosos padecimientos infecciosos activos y procesos inflamatorios, tuberculosis, endocarditis bacteriana y desde luego en el reumatismo. La gráfica que presentó está hecha con el fin de resumir en ella el trabajo realizado en los 100 niños dando sus lecturas y el número de casos que de ellas se obtuvieron; siendo de notarse en

los resultados que el mayor número de reumáticos se encuentran en las concentraciones más altas de mucoproteínas, por lo que podemos concluir que a pesar de que la reacción de la difenilamina no es específica de la F.R., sí aporta gran ayuda para el diagnóstico de ella.

BIBLIOGRAFIA.

- 1.—Kushner Daniel M. D., Klaas Honig M. D., Alvin Dubin M. S., H.A. Dynlewicz. Studies of serum mucoprotein (seromucoid). *The J. of Lab. and C. Med.* 409-17, 1956
- 2.—Greenspan Ezra M.D. Survey of clinical significance of Serum mucoprotein level. *Arch. of Int. Med.* 93: 863-74, 1954.
- 3.—Langrue G., Rahman y P. Mozziconacci. Dosificación de las mucoproteínas en el curso del reumatismo articular agudo. *La Sem. del Hopitaux* 54: 2171, 1957
- 4.—Milan Adam, Jiri Malecek, y Marta Kutova. Diphenylamine reaction in cronic joint diseases. *Ann. of Rheum. Dis.* 16: 68-72, 1957
- 5.—Coburn, M.D., Moore M.D., Serum diphenylamine reaction in rheumatic fever. *Arch. of Int. Med.* 92: 185-88, 1953
- 6.—Fearnley, Jeanette Pirkis, Nanette de Cock, Rita Lackner and R. I. Meanock. Reacción de la difenilamina en artritis reumatoide. *Ann. of Rheum. Dis.* 14: 226-30, 1955
- 7.—Cecchi Elvío y Ferraris F. La reacción sérica de la Difenilamina en artritis reumatoide. *Ann. of Rheum. Dis.* 14: 267-70, 1955
- 8.—Kelley Vincent C. M.D., Ph. D. Forrest H. Adams. Mucoproteínas séricas en pacientes con fiebre reumática. *Pediatrics.* 12: 607-21, 1953
- 9.—Kumate J. Vivar G. Benavides L. Reacción de la difenilamina. *Boletín médico del Hospital Infantil.* 12: 377-85, 1955
- 10.—Kelley Vincent C. M.D., Robert A. Good M.D., and Irvine MC. Quarrie M.D. Serum mucoproteins in children in health and diseases with special reference to rheumatic fever. *Pediatrics* 5: 824-35, 1950
- 11.—Ayala Lucile, Moore and Eugene L. Hess. The purple color reaction given by diphenylamine. *The J. of C. L.* 30: 781-85, 1951
- 12.—Niazi M.B. and State M.D. ph. D. The diphenylamine reaction of serum human. *Cancer Res.* 8: 653-56, 1948