

UNIVERSIDAD MOTOLINIA

Universidad Nacional Autónoma de México

**Valoración de la Excreción Urinaria de Acido
5 Hidroxi-Indol-Acético en Niños Normales y en Pacientes
con Fiebre Reumática Activa e Inactiva**

T E S I S

que para obtener el Título de
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

presenta

Adela Ramírez del Angel

México, D. F.

1 9 6 1



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.

Este trabajo se elaboró en el Laboratorio de
Hormonas de *Medicina* Experimental del
Instituto Nacional de Cardiología bajo la
dirección del Dr. Pedro A. Serrano Mass
a quien expreso mi más profundo agradecimiento

A mis padres
que con su cariño y consejos
me enseñaron a perseverar.

A mis hermanos
con cariño.

Al Dr. Perdo de Tejada
por su eficaz ayuda.

Agradezco la colaboración del
Departamento de Fiebre Reumática.

Al H. Jurado

A mis compañeros y amigos.

C A P I T U L O S

- I Introducción
- II Aspectos Bioquímicos.
- III Principales Acciones Fisiológicas.
- IV Diferentes Tipos de Técnicas para medir Serotonina y sus Metabolitos.
- V Objetivo y Fundamento.
- VI Material y Métodos.
- VII Resultados.
- VIII Discusión.
- IX Conclusiones.
- X Bibliografía.

INTRODUCCION

I.—ALGUNOS DATOS HISTORICOS DE LA SEROTONINA

En 1948 el grupo de Page logró aislar de la sangre una substancia de color amarillo pálido, a la que se le encontraron propiedades vasoconstrictoras; como la extrajeron del suero y produce vasoconstricción, decidieron darle el nombre de serotonina (1). Más tarde Hamlin y Fisher (2), determinan la estructura química de la serotonina, como la 5-hidroxitriptamina (5-HT). Poco después, en 1951, Erspamer y Asero comprobaron que aquel compuesto vasoconstrictor estudiado por ellos en 1933, al que habían llamado enteramina por haber sido aislado de las células cromafines del intestino, era idéntico a la serotonina (3).

Una vez conocido que la secreción de las células argentafines del intestino era la serotonina, no tardó en comprobarse la elevada concentración de esta substancia en el tumor producido por dichas células el llamado carcinoide (4). Pronto se atribuyeron ya los síntomas observados en el carcinoide al aumento de la serotonina circulante (5), lo que rápidamente fue aceptado (6). Esta observación dió lugar al desarrollo de técnicas para medir serotonina en sangre y su metabolismo en orina: el ácido 5-hidroxi-indol acético. Con dichos procedimientos se llegó a corroborar su aumento importante en sangre y en orina, en casos clínicos de carcinoide (7, 8).

Más recientemente se le ha dado extraordinario interés al posible papel que pueda jugar la serotonina en el proceso de la inflamación, llegando a considerarse su secreción como representante de una hormona celular, producida por las llamadas células cebadas del tejido conjuntivo (9).

II.—ASPECTOS BIOQUIMICOS

A.—Biosíntesis.

La serotonina se forma a partir del amino-ácido triptófano. Este tiene dos vías metabólicas principales (10), una de ellas, la de mayor cuantía, termina con la formación de niacina y la otra con la de serotonina (Fig. 1). Se ha calculado que el 99 por ciento del triptófano ingerido se convierte en niacina y proteínas y solo el 1 por ciento en 5-HT (11). El triptófano se convierte en 5-hidroxitriptófano por la acción de la oxidasa del triptófano, que según parece, se encuentra fundamentalmente en el hígado (Fig. 2). Sólo la forma levógira del 5-hidroxi-triptofano (5-HTF) se convierte en serotonina (12) por la acción de la descarboxilasa del 5-HTF, que se encuentra principalmente en la pared intestinal, sistema nervioso, hígado y riñón (Fig. 3). Parece que la capacidad para sintetizar 5-HT por los tejidos depende de la presencia de células cebadas.

Los factores enzimáticos que intervienen en esta fase biosintética son fundamentalmente una hidroxilasa llamada triptofano-oxidasa presente en hígado y riñón de mamíferos (13). Esta enzima es la responsable de hidroxilar el triptofano en posición "5" para convertirlo en 5-Hidroxi-triptofano, proceso sumamente lento y que quizás sea lo que limite la cantidad de serotonina sintetizada en el organismo.

El paso de 5-HTF a serotonina requiere la descarboxiliación del precursor. Esta descarboxilasa necesita de la presencia de vitaminas B₆ o piridoxal fosfato para su acción (13), pero este paso es sumamente rápido y se piensa que por esa razón no ha sido posible encontrar 5-HTF en tejidos de mamíferos (14). Se considera que esta última etapa en la biosíntesis de la serotonina es específica de algunas estirpes celulares, principalmente las células argentafines del intestino, las células cebadas y las células del sistema nervioso. En apoyo a esta afirmación está el hecho de que la serotonina administrada por vía intravenosa no pasa al cerebro, en

tanto el 5-HTF sí pasa y origina un aumento en la cantidad de serotonina cerebral (15). Es interesante señalar que el 5-HTF sólo se ha identificado en la orina en casos de carcinoma, en la que las células tumorales carecían de los gránulos citoplasmáticos argentafines, característicos de estas neoplasias (16).

El presente esquema biosintético se ve parcialmente confirmado por los estudios en que se ha empleado triptofano marcado con C-14 (17).

B.—*Catabolismo.*

La degradación metabólica de la 5-HT para formar ácido 5-hidroxiindol acético (ácido 5-HIA) se lleva a cabo por medio de una desaminación oxidativa que está catalizada por la monoamino-oxidasa (MAO); se verifica en dos pasos, en el primero se forma 5-Hidroxiindol acetaldehído y en el segundo, ácido 5-hidroxiindol acético (18), que es la forma habitual en que se elimina por la orina (Fig. 4). El ácido 5-hidroxiindol acético presente en la orina sólo representa una pequeña porción de la 5-hidroxitriptamina administrada; en el hombre varía del 20 al 30 por ciento (10, 19). Aunque el catabolismo de la serotonina a través de la monoamino-oxidasa parece ser la vía más importante de la excreción del ácido 5-hidroxiindol acético. También se ha comprobado que la serotonina se excreta en cantidades del 5 al 25 por ciento en forma de N-acetil-5-hidroxi triptamina, hallazgo obtenido en animales mediante la administración de 5-HT marcada con C-14 (20). Igualmente se acepta que una pequeña porción de la serotonina es excretada en forma libre y en menor cantidad conjugada en forma de sales sea como glucoronidato o como sulfato.

Metabolismo del Triptofano

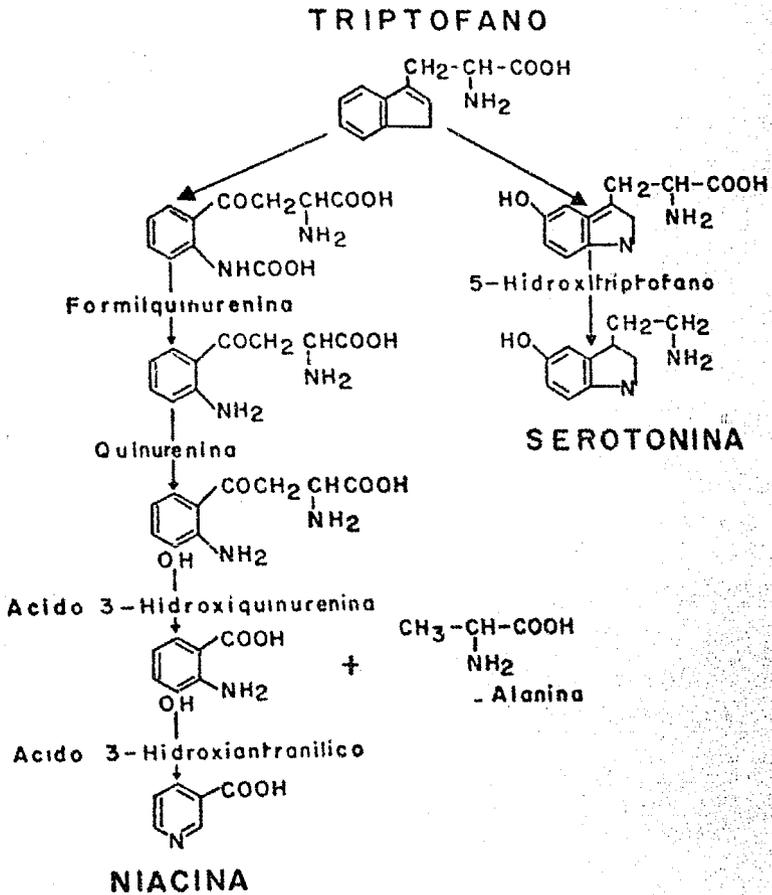


Fig. 1

Las dos principales vías metabólicas del Triptofano.

Metabolismo de la Serotonina

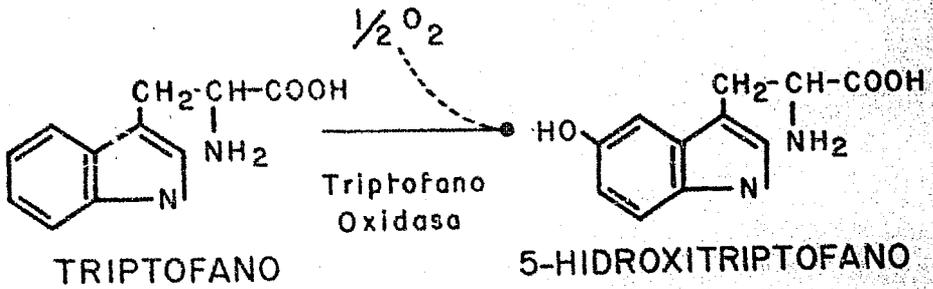


Fig. 2

Biosíntesis.—Primer paso: Hidroxilación en posición. "5" del triptofano.

Metabolismo de la Serotonina

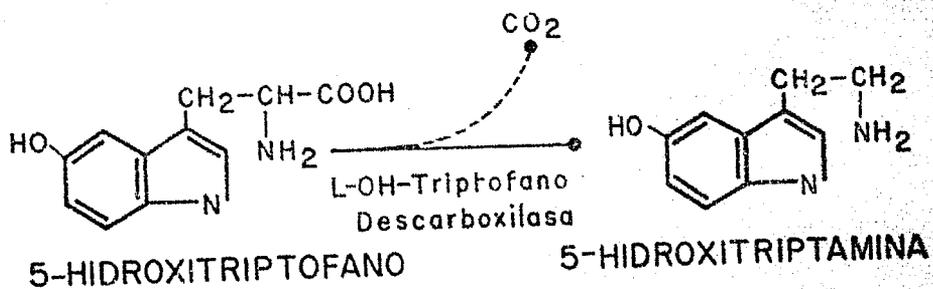


Fig. 3

Biosíntesis.—Segundo paso: Descarboxilación oxidativa del 5-HTF a 5-HT.

Catabolismo de la Serotonina

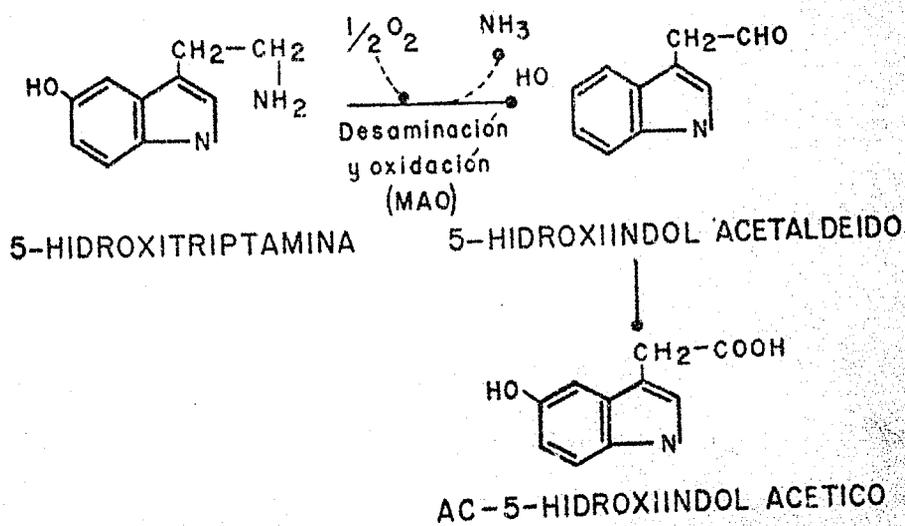


Fig. 4

Catabolismo. — Degradación metabólica de la 5-HT para formar ácido 5-HIA.

III.—PRINCIPALES ACCIONES FISIOLÓGICAS

La serotonina es un compuesto que, como la adrenalina, noradrenalina e histamina, es una amina normalmente producida en el organismo vivo. Guarda con ellos relaciones importantes desde el punto de vista fisiológico con potencialización y antagonismo diverso aún no completamente conocido.

El estudio de las acciones fisiológicas de la serotonina se ha visto extraordinariamente complicado por las distintas respuestas que provoca en el hombre, en el animal íntegro o en la preparación aislada de un órgano; sin embargo, puede decirse que el conocimiento de sus acciones sobre el sistema circulatorio, pulmón y riñón, están en términos generales correctamente aceptadas. De éstas, las dos primeras son las que tienen mayor interés para nosotros por las posibles relaciones que pueda guardar el metabolismo de la serotonina con algunos padecimientos cardiovasculares.

Se ha señalado que la serotonina produce vasoconstricción en el tejido arterial aislado (21). Sin embargo, los efectos clínicos del carcinoide demuestran lo contrario: si efectivamente la serotonina produjera vasoconstricción arterial, era de esperarse en estos casos, palidez intensa de los enfermos, y sin embargo, es signo característico de la enfermedad la rubicundez y vasodilatación de la cara en forma de bochorno (22). Igualmente, si la acción de la serotonina fuera principalmente vasoconstrictora arterial, se esperaría como consecuencia aumento de la presión arterial sistémica, y en contra de ésto, lo que en realidad se observa son efectos impredecibles en el humano (23), con reacción hipertensiva en algunos casos, hipotensora en otros y sin efecto sobre la presión en otros más. Se ha tratado de explicar dicha respuesta variable en relación a los distintos fenómenos que suceden al administrarse serotonina sobre las respuestas reflejas que simultáneamente produce sobre el nervio vago y cuerpo carotídeo (24, 13).

Esta dualidad de posibilidad de acción constrictora y dilatadora se puede explicar basándose en la observación de que la serotonina es un constrictor arterial y en cambio, un dilatador de los vasos capilares (25, 26).

En cambio, parece uniforme la opinión de que esta amina es la responsable de cierta vasodilatación coronaria (23, 27, 28), así como de la taquicardia que se observa con su administración (28, 29).

Sobre pulmón y sistema circulatorio pulmonar los efectos de esta sustancia parecen ser mejor conocidos; producen una hipertensión pulmonar evidente (20, 31, 32). Igualmente es característica la acción espasmódica sobre músculos bronquiales (23), lo que explica los ataques asmáticos tan frecuentes en el carcinóide (33, 34). Igualmente explica que en el humano se observe hiperpnea por la administración de serotonina la que ha sido explicada en razón de una respuesta refleja inducida por distintos receptores (35). Es interesante señalar que en el pulmón parece destruirse la serotonina en forma específica, pues se encuentran cantidades mucho más bajas en la sangre que sale del pulmón que en la que le llega (36).

En otros territorios la serotonina aumenta la permeabilidad capilar (27); reduce el tiempo de sangrado (27); es interesante el efecto que tiene sobre el riñón, pues en él causa disminución de la cantidad de orina formada y aumenta el flujo plasmático renal (23); igualmente favorece la retención de sodio y potasio (39), es decir, tiene acción antidiurética.

En relación a aparato digestivo, sus acciones tienen interés, sobre todo por el hecho de que la serotonina se produce en forma importante a nivel de las células enterocromafines localizadas en intestino. Parece que el peristaltismo por sí mismo aumenta la cantidad de serotonina formada en la pared intestinal (39). A su vez, el aumento de serotonina altera el peristaltismo intestinal (27), y tiene importante acción la secreción de la pared gástrica (34). A estas acciones se atribuye el hecho de que es frecuente encontrar úlcera gástrica en el carcinóide (23, 40), así como se han logrado producir lesiones necrosantes del tejido gástrico mediante la inyección de serotonina (41).

Se ha invocado que la 5-HT tiene importante acción sobre el sistema nervioso; un efecto estimulante ha sido atribuido a ella (42) y se cree

que a través de esta substancia es como actúan los inhibidores de la mono-amino-oxidasa (43). También se le ha atribuido un importante papel en la trasmisión neuro-hormonal reguladora de la secreción de la hipófisis (44).

Es conocida la específica avidez que tienen las plaquetas por la serotonina (45). En ella se ha supuesto que estriba gran parte de la explicación de los fenómenos fisiológicos que se observan en el humano y el animal; se ha demostrado que su concentración en plaquetas están en razón inversa a la histamina (46), observación que varía una vez más la relación que parece guardar con otras aminas biológicas, como la noradrenalina.

Muchos otros efectos se le atribuyen a la serotonina, entre los principales pudieramos aún mencionar la acción favorecedora sobre el crecimiento (47), la acción oxitóxica (48); y el hecho de que disminuya la concentración de serotonina con la administración de cortisona (49). Esta última observación, junto con la posible influencia que pueda tener en los procesos de inflamación (9), hacen particularmente interesante el papel de la serotonina en algunos procesos inflamatorios del sistema cardiovascular. El interés en Fiebre Reumática, se ve reforzado si se tiene en cuenta que algunos autores piensan que las lesiones valvulares observadas en los enfermos con carcinoide, indistinguibles de las que aparecen en Fiebre Reumática (50, 51, 52, 53), mientras que otros afirman que las anomalías valvulares son completamente distintas en ambos padecimientos (53, 54). Para explicar esta diferencia de opiniones, tenemos que suponer que un número importante de autores experimentados se equivocaron o lo que parece más probable, que por lo menos en algunas etapas de su evolución, las lesiones valvulares del carcinoide son similares a las de la Fiebre Reumática.

IV.—DIFERENTES TIPOS DE TECNICAS PARA MEDIR
SEROTONINA Y SUS METABOLITOS

Los primeros métodos de determinación de serotonina fueron los que aplicaron el conocimiento de las distintas acciones biológicas de este compuesto sobre órganos aislado en animales. Estas técnicas han medido, sobre muy diversos órganos, la acción producida por un extracto biológico comparándola contra los efectos producidos por concentraciones conocidas de serotonina.

De las muchas variantes que existen, quizá sea útil mencionar la que emplea el útero de ratas, previamente sensibilizado con atropina y tratado con estrógenos (13), lo que hace la técnica altamente sensible y específica. Sin embargo, como toda técnica biológica, influyen sobre ellas, variantes de difícil regulación: para lograr el máximo de especificidad en este tipo de determinaciones, es necesario que los procedimientos de extracción y purificación sean llevados a un punto tal, que permitan la determinación de serotonina por métodos directamente químicos de especificidad conocida y mucha mayor sencillez en su realización, que las técnicas biológicas.

Con métodos físico-químicos, la serotonina puede ser medida en sangre, orina y tejidos. Los métodos cromatográficos generalmente utilizan cromatografía bidimensional para separar la serotonina de los demás indoles, coloreando la misma al hacerla reaccionar con solución clorhídrica de dimetil-aminobenzaldehído (55). Estas técnicas son altamente específicas y se reconoce que su sensibilidad es suficiente para medir niveles cercanos a un microgramo de serotonina. Se ha aplicado a determinación de indoles urinarios en forma semicuantitativa (55, 56), o bien haciendo cuantificación en un densitómetro (57). Como las cantidades de esta sustancia encontrada en sangre y tejidos son extraordinariamente bajas, Weissbach, Waalkes y Udenfriend (58) emplean la fluorescencia del compuesto previamente purificado en columna de acetato ácido de algodón para su determinación. Estas técnicas pueden considerarse altamente sensibles y específicas.

Tratando de llevar estos métodos de determinación a nivel clínico, Sjoerdsma (59) propuso una reacción colorimétrica semicuantitativa para

la determinación del principal metabolito urinario de la serotonina: el ácido 5-hidroxi-3-indol acético; el método de Sjoerdsma solo da reacción positiva para niveles de ácido 5-hidroxiindol acético superiores a 40 mg. por litro y por lo tanto, únicamente útil para el diagnóstico de carcinoma. Udenfriend y colaboradores (60) modifican esta reacción logrando una variante que permite al aplicar la fórmula de Allen a las lecturas espectrofotométricas de los cromógenos, especificidad y sensibilidad suficientes para aplicación clínica. Mediante este procedimiento, la excreción de ácido 5-HIA, en normales, va de 2 a 9 mg. en 24 horas. Esta es la técnica más ampliamente usada en la actualidad, concretamente, éste fue el procedimiento que se seleccionó para iniciar estudios de serotonina, y su implantación forma la parte experimental de la presente tesis.

V.—OBJETIVO Y FUNDAMENTO

En la actualidad se conoce que la serotonina y el ácido 5-HIA sólo aumentan notable y persistentemente en el carcinoide (7, 59). Es por ello, que esta es la única entidad patológica donde pueden observarse alteraciones funcionales importantes y lesiones cardíacas atribuidas sin género de duda a la serotonina.

Excepción hecha del carcinoide, los niveles sanguíneos de 5-HT y la eliminación urinarias de ácido 5-HIA son muy estables: solo aumentan discretamente y generalmente por poco tiempo en algunas enfermedades como el Sprue no tropical (61, 62), en algunas enfermedades de tipo alérgico (63), en el choque anafiláctico (64), en las quemaduras extensas y en la intoxicación por endotoxina de E. Coli (65).

Se suelen presentar valores persistentes, aunque no muy elevados, en un síndrome determinado por anomalías genéticas, al que se le ha llamado "Enfermedad H", que se caracteriza por retardo en el desarrollo mental, ataxia cerebelosa, piel pelagroide y aminoaciduria (66). Todavía se discute si el ácido 5-HIA se encuentra aumentado en algunos padecimientos mentales (67).

En niños no se ha dosificado la excreción de ácido 5-HIA y por lo tanto se desconoce si ésta es igual o distinta a la de los adultos. El establecer una técnica de dosificación de serotonina o metabolitos en niños, está justificado, sobre todo, para diagnóstico clínico de carcinoide, padecimiento que puede acontecer en la infancia (68). Nuestro interés, sin embargo, está encaminado a estudiar los niveles de excreción de estos metabolitos en padecimientos pulmonares ya que como se mencionó en el capítulo, en donde se describen las acciones fisiológicas de la serotonina, es característica de esta substancia, la acción broncoconstrictiva a la que se le ha atribuido la frecuencia con que se ven crisis asmátiforme, en casos de carcinoide. Igualmente se tiene interés en determinar estos compuestos en casos de Fiebre Reumática activa, también por las ya mencionadas posibles acciones de la serotonina en el proceso de la inflamación y por-

que algunos autores han considerado las lesiones cardíacas de la Fiebre Reumática similares a las del carcinoide, atribuibles en este último caso a la serotonina.

Aunque es deseable la medición directa de la serotonina en sangre o en orina, en este primer paso se seleccionó aquel método que llenara los requisitos de máximo de sensibilidad y especificidad, pero a la vez fuera suficientemente sencillo para iniciar el estudio del tema. Dicho procedimiento fue el descrito por el grupo de Udenfriend y colaboradores (58), técnica colorimétrica para la cuantificación de ácido 5-Hidroxi-3-Indolacético en orina.

VI.—MATERIAL Y METODOS

A.—*Técnica implantada en el presente trabajo.*

Se efectuaron 90 determinaciones de ácido 5-HIA en la orina de 86 niños, de los cuales 32 eran del sexo masculino y 54 del femenino.

Los niños sanos que sirvieron como testigos fueron 65, los que tenían fiebre reumática inactiva 19 y los reumáticos activos 2. Sus edades variaron entre 2 y 15 años, con un promedio de 9 años 8 meses. La distribución de los casos normales, según la edad se muestra en la Figura 5.

Se emplearon muestras de orina de 2 horas; pues es difícil controlar eficientemente la eliminación urinaria en niños pequeños y aún con vigilancia continua pueden perderse cantidades de orina lo suficientemente importantes como para falsear los resultados.

Para estimular la diuresis se les administraron 250 mililitros de agua fría al principio de las 2 horas de recolección.

La determinación del ácido 5-HIA se llevó a cabo por el procedimiento de Udenfriend, Titus y Weissbach (60) que se describe a continuación.

Reactivos Empleados:

- 1.—2,4 dinitro fenil hidrazina Q. P. (Carlo Erba) al 0.5 por ciento en ácido clorhídrico 2N.
- 2.—Cloroformo, reactivo analítico (Reasol).
- 3.—Eter sulfúrico purificado, (Baker, Chem. Co.).
- 4.—Solución amortiguadora de fosfatos (Gen. Chem. Div.) al 0.5 M a un pH 7.
- 5.—Cloruro de sodio Q. P. (Gen. Chem. Div.).
- 6.—Solución de 1 nitroso 2 naftol Q. P. (Carlo Erba) al 0.1 por ciento en Etanol.

- 7.—Ácido nitroso: preparado, con nitrato de sodio (Carlo Erba) al 2.5 por ciento (0.2 ml.) y ácido sulfúrico, 2N (5 ml.).
- 8.—Acetato de etilo, reactivo analítico (Reasol).

T E C N I C A :

- 1.—Se ponen 6 ml. de orina en un frasco de tapón esmerilado de 50 ml. y se agregan 6 ml. del reactivo 2-4 dinitro fenil hidrazina.
- 2.—Después de 30 minutos, se agregan 25 ml. de cloroformo. Se agita y se centrifuga.
Se descarta el cloroformo y se repite el lavado.
- 3.—Se toman alícuotas de 10 ml. de la fase acuosa y se ponen en un frasco que contenga 4 gramos de cloruro de sodio y 25 ml. de éter. Se agita 5 minutos y se centrifuga.
- 4.—Se toman alícuotas de 20 ml. de éter y se pasan a otro tubo que contenga 1.5 ml. de solución amortiguadora a pH 7. Se agita 5 minutos, se centrifuga y se aspira el éter.
- 5.—Se toma 1 ml. de la fase acuosa y se pasa a un tubo de centrifuga de 15 ml. que contenga 0.5 ml. del reactivo 1-nitroso 2-naftol.
- 6.—Se agrega 0.5 ml. de ácido nitroso, mezclar e incubar 5 minutos a 37 grados centígrados.
- 7.—Se agregan 5 ml. de acetato de etilo, se agita, se aspira el acetato de etilo. Se repite este paso.
- 8.—La fase acuosa se lee a 500, 540 y 580 m μ en el fotocolorímetro Beckman. Las lecturas se comparan con los obtenidos con una solución patrón de ácido 5-HIA.

B.—Fundamento químico de la técnica implantada.

El procedimiento incluye un tratamiento preliminar de la orina con 2-4 dinitro fenil hidrazina para hacer reaccionar cualquier cetoácido presente, ya que estas sustancias cuando son extraídas a través del procedi-

Normales

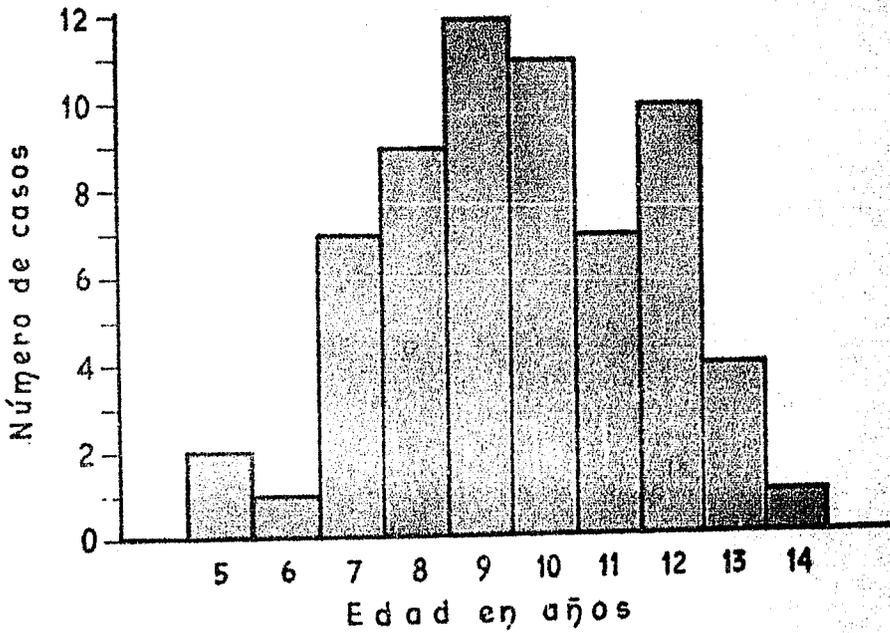


Fig. 5

Distribución de los casos normales analizados con relación a la edad.

miento interfieren con el color final. Normalmente la interferencia es ligera, pero en ciertos desórdenes metabólicos, cuando se excretan gran cantidad de cetoácidos, su separación es esencial.

La extracción con cloroformo separa el ácido indolacético, el cual da ligera coloración con el ácido nitroso. El bajo coeficiente de distribución del ácido 5-hidroxi-indolacético entre el éter y agua hacen necesario saturar la fase acuosa de cloruro de sodio para extraerlo en éter. El ácido 5-hidroxi-indolacético se regresa a una solución amortiguadora de un pH 7 para su ensayo colorimétrico. A valores de pH arriba de éste, el compuesto se vuelve progresivamente más inestable.

Una porción del extracto etéreo, conteniendo aproximadamente 40 microgramos de ácido 5 hidroxiindolacético, se extrae con 1.5 ml. de solución amortiguadora; una alícuota de 1 ml. de la solución anterior se trata con 1-nitroso-2-naftol y ácido nitroso como se ha descrito antes en el procedimiento analítico; una muestra auténtica de ácido 5-hidroxi-indolacético se trata en la misma forma siendo los espectros de absorción de las dos soluciones (Fig. 6) esencialmente los mismos.

La formación de un cromóforo violeta es característico de los compuestos 5-hidroxi-indólicos como se ha demostrado previamente; por ejemplo, la triptamina y varios 7-hidroxi-indoles no responden. De más de 20 compuestos probados solamente la parahidroxi-acetanilida reacciona dando este color.

La técnica anterior solo se modificó en el tiempo de recolección de la orina que fue de 2 horas en vez de 24, por las razones expuestas con anterioridad. Para que los resultados fueran comparables con los obtenidos por otros autores se multiplicó el resultado por 12 para tener un equivalente aproximado a 24 horas.

Para obtener mayor seguridad en la identificación del ácido 5-hidroxi-indolacético se compararon las densidades ópticas de un extracto de orina preparado en forma idéntica a las anteriores, con las de una solución patrón de ácido 5-hidroxi-indolacético.

Para el cálculo de todas las determinaciones se usó la fórmula de corrección de Allen (69).

Curvas de absorción

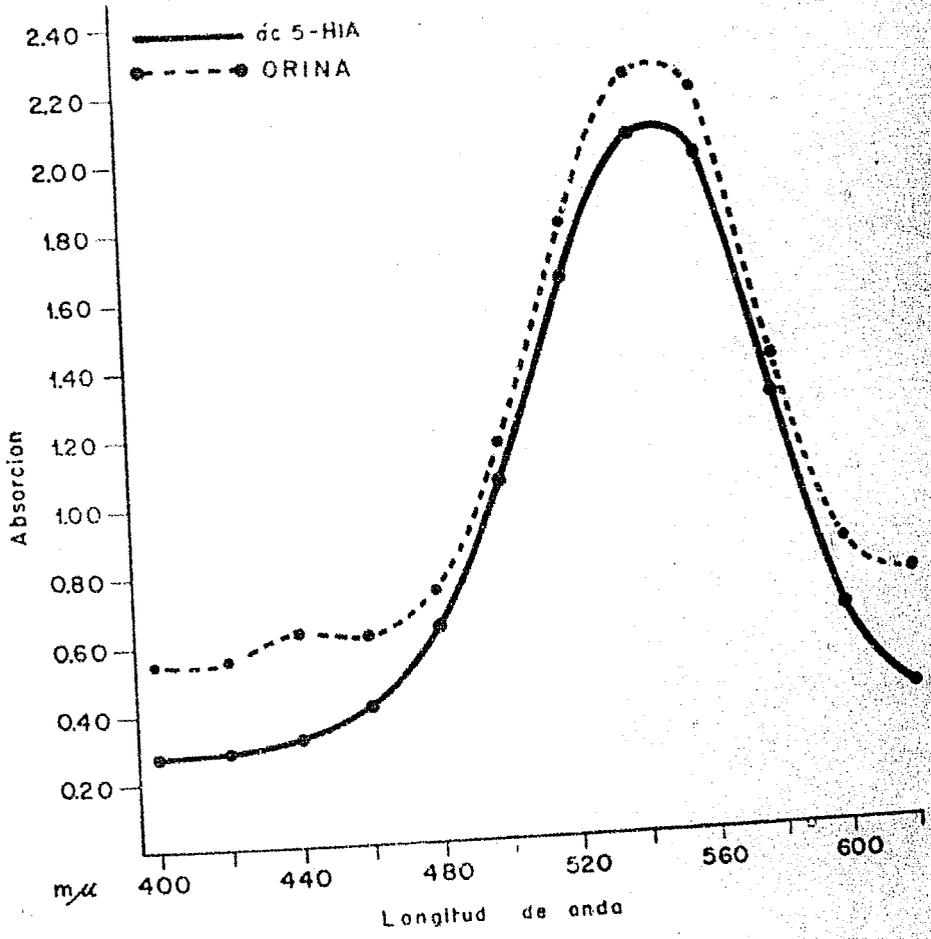


Fig. 6

Espectros de absorción de los cromógenos producidos por solución patrón de ácido 5-HIA y por los obtenidos de un extracto de orina.

VII.—RESULTADOS

La curva de densidad óptica del extracto de orina muestra una absorción máxima a 540 m μ ., lo mismo que la de la solución patrón de ácido 5-hidroxi-indolacético. Además la morfología de las dos curvas es muy parecida (Fig. 6), siendo idénticas en su porción apical y en gran parte de su función.

La eliminación urinaria de ácido 5-hidroxi-indolacético en las 69 determinaciones efectuadas en niños sanos varió entre límites moderados, pues osciló entre 1.10 y 7.92 mg/24 horas. El promedio encontrado fue de 3.49 mg/24 horas y la variación estándar de \pm 1.42 (Fig. 7).

Esta misma similitud entre las cifras encontradas en este trabajo en alicuotas de dos horas de orina y en la reportada en orina de 24 horas, hace válida la observación de que la determinación fue correctamente realizada, pues dicha cifra normal fue la misma en el lote de niños y adultos, que en forma colateral, se trabajaron. La modalidad de hacer la determinación de dos horas, permite por un lado, tener mejor control, sobre la excreción de orina, puesto que es conocido lo difícil que es lograr una buena colección de 24 horas y sobre todo simplifica más este problema en los niños. Igualmente se hace innecesario el uso de preservativos indispensables para la colección urinaria de 24 horas; ya que se trabaja inmediatamente después de obtenida la micción de dos horas.

El hecho de haber encontrado elevación en solo los dos niños con Fiebre Reumática activa, podría presuponer que hubiera un factor de error en ello por posible ingesta de alimentos ricos en serotonina. Si bien no es posible excluir esta posibilidad, parece difícil que haya sido precisamente en estos dos niños los que hubieran tomado cantidades elevadas de plátano, piña, jitomate o ahuate, que hubieran hecho la determinación erróneamente elevada en el grupo completo de 86 sujetos estudiados; sin embargo, hoy día se tiene la precaución de prohibir expresamente estos alimentos e inclusive darles alimentos sintéticos 24 horas previos a la prueba.

Por otro lado, estos niños del grupo de reumáticos, no estaban recibiendo medicamentos durante la prueba, por lo que no parece factible que el aumento encontrado en ellos fuera por interferencia de sustancias medicamentosas.

Puede considerarse que la determinación de ácido 5-HIA en la orina, ofrece ventajas prácticas sobre la de 5-HT en sangre, sobre todo, en los niños, no solo porque representa un examen menos molesto, sino porque permite juzgar de las condiciones del paciente en estudio durante un período de tiempo mucho más amplio que con una sola determinación hecha en sangre.

En los niños normales la cifra media de 3.49 mg. con variación estándar de ± 1.42 parece satisfactoria si se tiene en cuenta el número de factores conocidos que pueden alterar la eliminación de ácido 5-HIA. Las cifras límites encontradas en el presente trabajo son muy similares a las obtenidas, en sujetos adultos por los creadores de la técnica usada por nosotros para determinar el ácido 5-HIA (60), pues ellos encuentran límites de 2 a 9 mg. en 24 horas y nosotros de 1.10 a 7.92 mg. en 24 horas.

Esta similitud en las cifras hace pensar que la serotonina se metaboliza en igual proporción en los adultos y en los niños. La observación anterior, parece confirmarse por el hecho de no haber encontrado proporcionalidad entre la excreción de ácido 5-HIA y la edad de los sujetos estudiados, como puede verse en la Fig. 7.

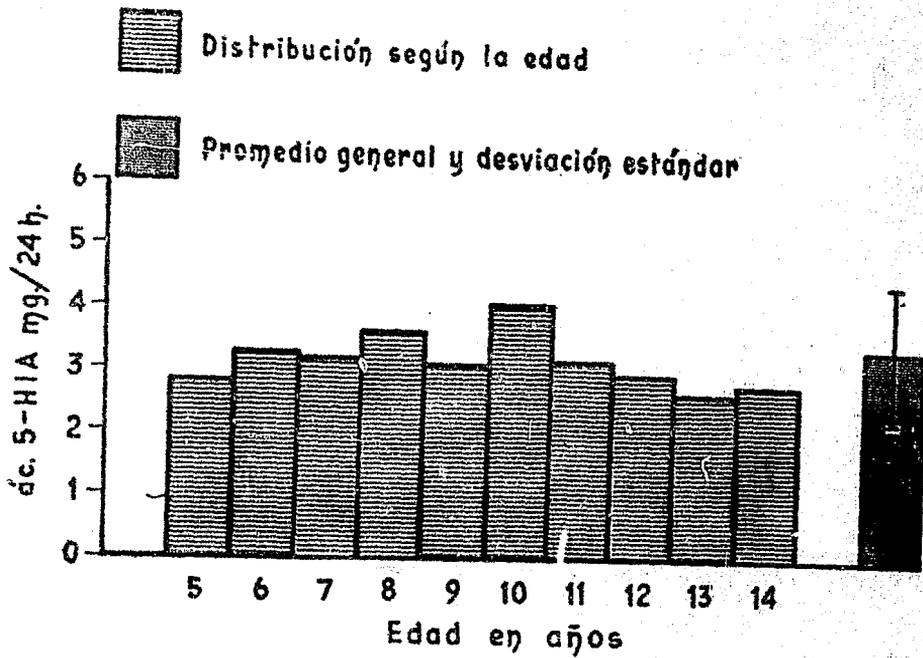


Fig. 7

Histograma que muestra la excreción de ácido 5-HIA en relación con la edad.

VIII.—DISCUSSION

El análisis de la curva espectrofotométrica de los cromógenos obtenidos de la orina contra los cromógenos obtenidos de ácido 5-HIA puro, revelan por la identidad de las curvas (Fig. 6) la especificidad del procedimiento, lo que permite confiar en el mismo para la determinación de ácido 5-HIA en clínica. Esto asegura que las lecturas de los extractos de orina que se hacen en el fotocolorímetro a 500, 540 y 580 m μ . descubre la presencia de ácido 5-HIA y disminuye notablemente la posibilidad de interferencia con otras sustancias.

La excreción de ácido 5-HIA en los niños sanos se graficó en forma de histograma separando el lote de niños por edades en periodos de 5 a 14 años. Los resultados mostraron que la excreción de este metabolito de la serotonina es prácticamente uniforme en las distintas etapas de la infancia, dentro de las edades estudiadas en este grupo; la cifra promedio para cada edad cae dentro de la variación estándar encontrada para el grupo global y es similar a la cifra de 5-hidroxi-indolacético en adultos, tanto la reportada en la literatura como la que se ha obtenido en este laboratorio en los sujetos adultos estudiados, (Fig. 7).

Los pacientes con Fiebre Reumática inactiva, presentaron una eliminación de ácido 5-hidroxi-indolacético muy similar a la de los sujetos sanos, pues las cifras límite encontradas en los reumáticos no activos, fueron de 1.07 y 6.90 mg/24 horas y el promedio de 2.92 con desviación estándar de \pm 1.52. Como puede verse en el Cuadro 1 no existen diferencias apreciables entre el grupo de sujetos sanos y el de reumáticos no activos.

En cambio, los enfermos con Fiebre Reumática, presentaron los valores más elevados de estos grupos de sujetos. Las dos determinaciones practicadas en sujetos reumáticos activos mostraron valores de 12.56 y 10.51 mg/24 horas. Estas cifras caen fuera, no solo de la variación estándar de la media aritmética, sino que se encuentran lejos del límite superior de lo normal, como se ve en el Cuadro 1.

	<i>Límites</i>	<i>Promedio</i>
Sujetos sanos	1.10 — 7.92	3.43 ± 1.42
Pacientes con Fiebre Reumática Inactiva	1.07 — 6.90	2.92 ± 1.52
Pacientes con Fiebre Reumática Activa	10.51 — 12.56	

Cuadro 1

Eliminación de ácido 5-HIA en sujetos normales y en pacientes con Fiebre Reumática inactiva y activa.

IX.—CONCLUSIONES

La implantación de la técnica de ácido 5-HIA, en orina, siguiendo el procedimiento de Udenfriend, Titus y Weissbach (60) mostró ser un método sencillo y fácil de adaptación, reproducible y de especificidad eficiente.

La colección de orina de dos horas da ventajas sobre la colección de 24 horas de orina; por la sencillez y exactitud de la misma.

Las cifras encontradas en niños fue de 1.10 y 7.92 mg/24 horas con variación estándar de 3.43 ± 1.42 , siendo similar a la cifra excretada por adultos normales, tanto por la encontrada por nosotros, como la que ha sido mencionada en la literatura.

Los niños con Fiebre Reumática inactiva dieron cifras de 1.07 y 6.90 mg/24 horas con variación estándar de 2.97 ± 1.52 , similares a la de los niños normales. Los dos casos de Fiebre Reumática activa, sin tratamiento, dieron cifras moderadamente elevadas de ácido 5-HIA en orina (10.51 y 12.56), elevación aparentemente real puesto que no tomaban medicamento y se considera que estos niños tampoco tuvieron ingesta de alimentos ricos en serotonina, por ser los únicos dos casos de todo el lote, que tuvieron alta la cifra de excreción de ácido 5-HIA.

X.—BIBLIOGRAFIA

1.—Rapport, MM., Green, A. y A., y Page, I. H.: Crystalline serotonin. *Science*, 108: 329-330, 1948.

2.—Hamlin, K., y Fisher, F. E.: The synthesis of 5-hidroxytryptamine. *J. Amer. Soc.*, 73: 5007-5008, 1951.

3.—Erspamer, V., y Asero, B.: Identification of enteramine, the specific hormone of the enterochromaffia cell system, as 5-hidroxytryptamine. *Nature (Lond)* 169: 800-801, 1952.

4.—Lembek, F.: Hydroxytryptamine in a carcinoid tumor. *Nature.*, 172: 910-911, 1953.

5.—Pernow, B., y Waldenström, J.: Paroxysmal flushing and other symptoms caused by 5-hidroxytryptamine and histamine in patients with malignant tumors. *Lancet.*, 2: 951, 1954.

6.—Page, I. H., Corcoran, A. C., Udenfriend, S., Sjoerdsma, A., y Weissbach, H.: Argentoffinoma as endocrine tumor. *Lancet.*, 1: 198-199, 1955.

7.—Mohler, D. N.: Evaluation of the urine test for serotonin metabolites. *J.A.M.A.*, 163: 1138, 1957.

8.—Snow, P. J. D., Lennard-Jones, J. E., Curzon G., y Stacey, R. S.: Humoral effects of metastasing carcinoid tumors. *Lancet*, 2: 1004-1009, 1955.

9.—Gossy, B., y Kató, L.: Studies on phagocytic stimulation. Ed. Thiérier, freres. (Montreal, Canadá). 1957.

10.—Calva, E.: Serotonina. Fisiología y patología. *Gac. Méd. Méx.*, 87: 498-504, 1957.

11.—Smith, F. H., y Murphy, R.: Tumores carcinoides. *Clin. Méd. N. Amer.*, 465-476, 1960.

12.—Fréter, K., Weissbach, H., Udenfriend, S., y Witkop, B.: Biochemical and pharmacological studies with D- and L-5-hidroxytryptophan. *Proc. Soc. Biol. Med.*, 94: 725-728, 1957.

- 13.—Pennini, de de Vega, E.: Serotonina o 5-hidroxitriptamina. *La Sem. Méd.*, 117: 1966-1928, 1960.
- 14.—Resnick, R. H., y Gray, S. J.: Metabolismo de la serotonina y síndrome carcinoide. *Clin. Méd. N. Amer.*, 1323-1339, 1960.
- 15.—Davidson, J., Sjoerdsma, A., Loomis, J. N., y Udenfriend, S.: Studies with the serotonina precursor 5-hidroxytryptophan, in experimental animals and man., *J. Clin. Inv.*, 36: 1594, 1957.
- 16.—Sandler, M., y Snon, P. J.: An atypical carcinoid tumour secreting 5-Hydroxytryptophan. *Lancet. (London)* 1, 137-139, 18, Jan. 1958.
- 17.—Weissbach, H., Redfield, B. G., y Udenfriend, S.: Serotonin-o-glucuronide: An alternate routs of serotonin metabolism., *Fed. Proc.* 17: 418, 1958.
- 18.—Udenfriend, S., Titus, E., Weissbach, H., y Peterson, R. E.: Biogenesis and metabolism of 5-hidryindole compounds. *J. Biol. Chem.* 219: 335-344, 1956.
- 19.—Erspamer, V.: Observation on the fate of indolal kylamines in the organism. *J. Physiol. (Lond)*, 127: 118-133, 1955.
- 20.—Melsaac, W. M., y Page, I. H.: The metabolism of serotonin (5-hidroxytryptamine). *J. Biol. Chem.*, 234: 858-864, 1959.
- 21.—Spector, W. G., y Willoughby, D. A.: 5-hidroxytryptamine in acute inflammation. *Nature (Lond)*, 179: 318, 1957.
- 22.—Bleehen, N. M.: Precipitation by fatty food of systemic disturbance from argentaffinoma. *Lancet.* 2: 1362-1363, 1955.
- 23.—Page, I. H.: Serotonin (5-hidroxytryptamine); The last four years. *Physiol. Rev.*, 38: 277-335, 1958.
- 24.—Dawes, G. S., y Comroe, J. H., Jr.: Chemoreflexes from the heart and lungs. *Physiol. Rev.*, 34: 167-201, 1954.
- 25.—Poumailloux, M.: La serotonina en cardiología. *Arch. Mal. Co-sur.*, 52: 721-730, 1959.
- 26.—Haddy, F. J.: The mechanism of edema production by acetylcholine, serotonin, histamine and norepinephrine. *Fed. Proc.*, 19: 93, 1960.

27.—Erspamer, V.: Pharmacology of indolealkylamines. *Pharmacol. Rv.*, 6: 425-487, 1954.

28.—Crompton, C. W., Castillo, C. A., Bowe, G. G., y Maxwell, G. M.: Serotonin and the dynamics of the heart. *Ann. Acad. Sci.*: 960-968, 1959.

29.—Lemessurier, D. H., Schwarts, C. J., y Whelam, R. F.: Cardiovascular effects of intravenous infusions of 5-hydroxytryptamine in man. *Brit. J. Pharmacol.*, 14: 246-250, 1959.

30.—Nahas, G. G., y MacDonald, I.: Effects of norepinephrine and 5-hydroxytryptamine on the pulmonary circulation of the spinal dog. *Amer. J. Physiol.*, 196: 1045-1048, 1959.

31.—Noble, J. C., y Manson, E. M.: An investigation of the effects of 5-hydroxytryptamine (serotonin) on the cardiovascular system of the dog. *Ann. Surg.*, 150: 846-853, 1959.

32.—McGaff, C. J., y Milnor, W. R.: Effects of serotonin on pulmonary blood volume and flow in the dog. *Fed. Proc.*, 19: 96, 1960.

33.—Peskin, G. W., y Orloff, J. M.: Carcinoids, th malignant carcinoid syndrome and 5-hydroxytryptamine (serotonin), *Amer. J. Med. Sci.*, 237: 224, 1959.

34.—Pichel, Warner, R. R.: Serotonin and gastrointestinal function., *J. Mount, Sinai Hosp. N. Y.*: 26: 450-463, 1959.

35.—Parks, V. J., Sandison, A. G., Skinner, S. L. y Wholan R. F.: The stimulation of respiration by 5-HT in man., *J. Physiol. (Lond)*, 151: 342-335, 1960.

36.—Goble, A. J., Hay, D. R., y Sandler, M.: 5-hydroxytryptamine metabolism in acquired heart-disease associated with argentaffin carcinoma. *Lancet*, 2: 1016-1017, 1955.

37.—Van Cauwedberge, H., Lapiere, C., Lecomte, J., y Renson, J.: Modifications pharmacodinamiques et hormoneles de l'augmentation de la perméabilité y vasculaire provoquee par la 5-hydroxytryptamine., *Soc. Biol. (Par.)*, 152: 1848-1851, 1958.

38.—Little, J. M., Angell, E. A., Hoffman, W., y Brooks, W.: Effect of 5-hydroxytryptamine (5-HT) on renal hemodynamics, water and electrolyte excretion. *Fed. Proc.* 19: 367, 1960.

- 39.—Bulbring, E., y Crema, A.: The release of 5-hydroxytryptamine in relation to pressure exerted on the intestinal mucosa. *J. Physiol. (Lond)*, 146: 18-28, 1959.
- 40.—Sjoerdsma, A.: Serotonin. *New Engl. J. Med.* 261: 181-188, 1959.
- 41.—Owens, F. J., y Masson, G. M. C.: Effects of amine liberators on gastric secretions in the rat. *J. Lab. Clin. Méd.*, 52: 932, 1958.
- 42.—Sjoerdsma, A.: Serotonin. *New Engl. J. Méd.*, 261: 231-237, 1959.
- 43.—Page, I. H., McCubbin, J. W., Kaneko, Y.: Ability of serotonin and norepinephrine to mimic the central effects of reserpine on vasomotor activity. *Circulat Res.*, 8: 849-858, 1960.
- 44.—García Reyes, J. A., Domenge, L., Maisterrena, J., Alarcón, D., Puzzuto, J., González, C., y de León, A.: Endocrine and metabolic studies during nialamide Therapy. *J. Soc. Cient. Med. Lisboa*, 123: 111-125, 1959.
- 45.—Born, G. V., y Gillson, R. E.: Studies on the uptake of 5-hydroxytryptamine by blood platelets. *J. Physiol. (Lond)*, 146, 472-491, 1959.
- 46.—Mitchell, R. G., y Cass, R.: Histamine and 5-hydroxytryptamine in the blood of infants and children. *J. Clin. Invest.*, 38: 595-604, 1959.
- 47.—Laborit, H., Niauxsat, P., Broussolle, B., y Jouany, J. M.: Sur la signification biologique de la serotonine. *Presse. Méd.*, 67: 927-928, 1959.
- 48.—Valseghi, A.: *Minerva. Ginecol.*, 10: 398, 1958.
- 49.—Matos, R.: Serotonina y Catecolaminas. *Bol. Méd., Univ. Autom., Guadalajara*, 1: 54-60, 1960.
- 50.—Sjoerdsma, A.: Clinical and laboratory features of malignant carcinoid. *A.M.A. Arch. Internm. Méd.*, 102: 936-938, 1958.
- 51.—Spain, D. M.: Association of gastrointestinal carcinoid tumor with cardiovascular abnormalities. *Amer. J. Méd.*, 19: 366-369, 1955.
- 52.—Hudson, R. E.: Malignant carcinoid tumors. *Proc. Soc. Roy. Méd.*, 50: 37-39, 1957.

- 53.—Thorson, A. H.: Studies on carcinoid disease. *Acta Méd. Scand.*, 161: 1-132, 1958.
- 54.—Mac Donald, R. A., y Robbins, S. L.: Pathology of the heart in the carcinoid syndrome. *A.M.A. Arch. Path.*, 63: 103-112, 1957.
- 55.—Curzon, G.: Rapid chromatographic test for high urinary excretion of 5-hydroxyindoleacetic acid and 5-hydroxytryptamine., *Lancet*. 269: 1361-1362, 1955.
- 56.—Jepson, J. B.: Paper chromatography of urinary indoles. *Lancet*. 2: 1009-1011, 1955.
- 57.—Rodmigh, R.: Caracterización on urinary indoles resembling 5-hydroxytryptamine and tryptamine. *Biochem. J.* 64: 621-626, 1956.
- 58.—Weissbach, H., Waalkes, T. P., u Udenfriend, S.: A simplified method for measuring serotonin in tissues, simultaneous assay of both serotonin and histamine. *J. Biol. Chem.*, 230: 865-871, 1958.
- 59.—Sjoerdsma, A., Weissbach, H., y Udenfriend, S.: Simple test for diagnosis of metastatic carcinoid (argentaffinoma). *J.A.M.A.*, 1959: 397, 1955.
- 60.—Udenfriend, S., Titus, W., y Weissbach, H.: The identification of 5-hidroxy-3-indol-acetic acid in normal urine and a method for its assay. *J. Biol. Chem.*, 216: 499-505, 1955.
- 61.—Haverback, B. J., y Davidson, J. D.: Serotonin and Gastrointestinal tract. *Gastroenterology.*, 35: 570-577, 1958.
- 62.—Haverback, B. M., Dice, B., y Thomas, H. V.: Indole metabolism in the malabsorption syndrome. *New Engl. J. Méx.* 262: 754-757, 1960.
- 63.—Machaffie, R. A., Menebroker, L. R., Mahler, D. J., y Baraj, A. J.: Studies in allergy. II Serum serotonin levels in monallergic, pre-treatment, and posttreatment allergic human beings and in normal and sensitized quinea pigs.: *J. Allergy.* 31: 106-110, 1960.
- 64.—Waalkes, T. P., y Coburn, H.: Histamine and serotonin in anaphylaxis in the mouse. *J. Allergy.* 31: 151-161, 1960.

65.—Gilbert, P. P.: Effect of antihistaminic and antiserotonin drugs on vascular responses to *E. Coli* endotoxin in the cat. *Proc. Soc. Exp. Biol. Méd.* 100: 346-349, 1956.

66.—Baron, D. N., Dent, C. E., Harris, H., Hart, E. W., y Jepson, J. B. Hereditary pellagra-like skin rash with temporary cerebellar ataxia. Constant renal amino aciduria. And other bizarre biochemical features *Lancet.* 2: 421-428, 1956.

67.—Cole, N. J., Allison, R. B. J., Cortatowsky, M. J., y Branch, C. H. H.: Studies of behavior and the metabolism of indole derivatives in schizophrenia. *Amer. J. Psychiat.* 117: 393-400, 1960.

68.—Cathala, J., Galey, Auzepy, P., Saada, B., y Bertrand N.: Tumeur carcinoïde de borché avec métastase ganglionnaire chez fille de 10 ans. *Arch. Franc. Pédiat.*, 17: 816-821, 1960.

69.—Allen, W. M.: A simple method for analyzing complicated absorption curves of use in the colorimetric determination of urinary steroids. *J. Clin. Endocr.*, 10: 71-83, 1950.