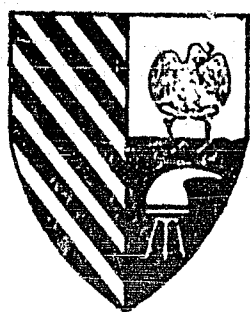


9

507(04)

FACULTAD DE QUIMICA BERZELIUS.
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO.



DETERMINACION DE CUERPOS
CETONICOS EN SANGRE
DE PRE - ESCOLARES DESNUTRIDOS

ELENA LELO DE LARREA ROBLES.

MEXICO, D. F.

— 1956 —



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.

77(04)

FACULTAD DE QUIMICA BERZELIUS.
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO.

DETERMINACION DE CUERPOS
CETONICOS DE SANGRE
DE PRE - ESCOLARES DESNUTRIDOS

T E S I S

que para su Examen Profesional de
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

presenta

ELENA LELO DE LARREA ROBLES.

MEXICO, D. F.

— 1956 —

A mis padres:

Sr. ALFREDO LELO DE LARREA

y

Sra. MAGDALENA R. DE L. DE LARREA

con mi inmenso cariño y gratitud.

A MIS HERMANOS

A la
FACULTAD DE QUIMICA BERZELIUS

y a su Director,
QUIM. LUIS M. VERA.

A MIS MAESTROS Y COMPAÑEROS

A los Sres. Dres.

SILVESTRE FRENK

y

JOAQUIN CRAVIOTO

por su valiosa dirección.

AI HOSPITAL INFANTIL

de esta ciudad, a los Sres Dres.

FEDERICO GOMEZ

y

LAZARO BENAVIDES,

director y subdirector de esta institución,
por facilitarme los medios para la realización
de esta tesis.

S U M A R I O

- CAPITULO I.—INTRODUCCION.**
- CAPITULO II.—MATERIAL Y METODOS.**
- CAPITULO III.—RESULTADOS.**
- CAPITULO IV.—DISCUSION.**
- CAPITULO V.—RESUMEN.**
- CAPITULO VI.—BIBLIOGRAFIA.**

INTRODUCCION

La mortalidad en la desnutrición crónica de origen dietético en el niño, continúa siendo extraordinariamente elevada. En 733 casos estudiados en el Servicio de Nutrición del Hospital Infantil de México, la mortalidad global fué de 35%, ocurriendo el mayor número de muertes durante las 48 horas después de la admisión (1). La causa más frecuente de estas defunciones lo fueron trastornos electrolíticos relacionados con un proceso diarreico o en muchos casos, simplemente con ayuno prolongado.

Es sabido desde hace mucho que el niño es sumamente propenso a entrar en cetosis bajo la influencia de una serie de condiciones, entre las cuales una de las más importantes es el ayuno. Se ha observado, por otra parte que el niño con desnutrición grave crónica, entra en acidosis con gran facilidad.

Teóricamente esta acidosis metabólica puede estar determinada tanto por pérdida de base fija, como por incremento de la producción de ceto-ácidos. Debe tenerse en cuenta que durante la desnutrición, existe disminución (2) de tolerancia a los carbohidratos, conocida como diabetes de Hofmeister, este mismo hecho podría estar en relación con una producción aumentada de cuerpos cetónicos.

En virtud de las extensas anomalías encontradas en la composición hidroeléctrica en los líquidos del niño desnutrido (3, 4) y de las peculiaridades de la tolerancia a la glucosa en los mismos (2),

se emprendió el estudio del metabolismo de los cuerpos cetónicos y ácidos orgánicos. en este mismo material clínico.

El presente trabajo se refiere a la determinación seriada de ceto-ácidos, en la sangre de niños con desnutrición grave.

MATERIAL Y METODOS

El presente trabajo, se realizó en 30 niños con desnutrición de Tercer Grado.

En el cuadro siguiente se presenta la distribución por edades y sexos.

CUADRO No. 1

Edades	Hombres	Mujeres
1 a 2 años	12	8
2 a 3 años	4	0
3 a 4 años	2	1
4 a 5 años	0	2
7 a 8 años	0	1

Las determinaciones se hicieron en sangre venosa, tomada generalmente de la yugular, previa asepsia de la piel, procurando hacer la extracción con un minimum de estasis y empleando jeringa seca y fría, con el objeto de no alterar las cifras de los resultados; las dosificaciones se hicieron al ingreso del niño a la Sala, repitiéndose aproximadamente a los 15, 30, 45 y 60 días de internado.

FUNDAMENTO DEL METODO.—

De muchos métodos usados para la determinación de ceto-ácidos el más sensible es el que está basado en la reacción de estos ácidos con las nitrofenilhidrazinas. Estos métodos no son propiamente específicos para el ácido pirúvico, sino más bien para el grupo de

ceto-ácidos en general. Sin embargo, dichos procedimientos pueden ser modificados para la identificación y determinación de ceto-ácidos individuales.

Los principios fundamentales de estos métodos fueron descritos por primera vez en 1913 por Dakin y Dudley (5). Estos autores notaron que el ácido 4-nitrofenilhidrazinopropiónico y los piruvatos de 4-nitrofenilhidrazonas, el ácido glioxílico y el fenilglioxílico podían ser separados de otras hidrazonas, mediante el tratamiento de solución de carbonato de sodio al 10%, o aprovechando sus diferentes solubilidades en alcohol. Si las sales de hidrazonas, existen en suficiente cantidad, pueden ser reprecipitadas por acidificación de la solución alcalina.

Dakin y Dudley posteriormente notaron que "simples trazas" de las hidrazonas de glioxal, metilglioxal, y fenilglioxal en solución de hidróxido de sodio, dan coloración azul o púrpura, la cual después de algún tiempo puede pasar a rojo o café; por otra parte todas las hidrazonas ácidas, incluyendo el ácido fenilglioxílico, dan una intensa coloración roja con solución de hidróxido de sodio. Estos principios fueron aplicados por Neuberg (6), Barrenscheen y Dregus (7), Case (8), Peters y Thompson (9), Pi-Suñer y Farrán (10), Lu (11), Larsson y Liljedahl (12), y Bueding y Wortis (13).

Lu (11) aplicó el procedimiento para la determinación de ácido pirúvico en muestras de sangre; y en colaboración con Bueding y Wortis (13) y otros (14, 15), modificó los métodos anteriores. La modificación consiste en poner el filtrado de ácido tricloroacético (7) a reaccionar 10 minutos con un mg. de 2-4 dinitrofenilhidrazina, después de lo cual se hacen varias extracciones y re-extracciones con acetato de etilo y carbonato de sodio. Aunque el método de Lu representa un gran avance en la técnica, las 7 extracciones requieren mucho tiempo y cuidado del analista para evitar pérdidas de las soluciones. Se ha encontrado que una extracción de las hidrazonas (16) con acetato de etilo, y una re-extracción con carbonato de sodio son suficientes para que la mezcla reaccione. Al agregar esta simplificación al procedimiento se favorecen las extracciones de las diferentes hidrazonas. Por ejemplo 8 ml. de acetato de etilo que son mezclados con 4 ml. de la mezcla reaccionante extraen: 81% de hidrazonas de ácido pirú-

vico, 79% de hidrazona de ácido cetoglutárico, y 89% de hidrazona de ácido oxalacético. Si la extracción se hace nada más con carbonato de sodio al 10%, las hidrazonas de los glioxales y aldehídos se obtienen solo en pequeñas cantidades, en tanto que las hidrazonas de los ceto-ácidos se extraen casi cuantitativamente.

La 2-4 dinitrofenilhidrazina se prefiere a las otras fenilhidrazinas porque reaccionan más rápidamente con los ceto-ácidos, en solución es estable, y es muy usada para la determinación de hidrazonas totales, como también para ceto-ácidos totales.

La coloración roja de las 2-4 dinitrofenilhidrazinas en álcali fuerte, se debe probablemente a la sustitución de uno de los nitrogrupos en posición para del anillo del benceno.

TECNICA.—

Desproteinización.—A 1 ml. de la muestra de sangre agregar 5 ml. de ácido tricloroacético al 10%, agitar y filtrar a través de papel filtro Whatman No. 30.

De este filtrado tomar 3 ml. y pasarios a tubos de ensayos de 17 cm. x 2 cm.; agregar 1 ml. de 2-4 dinitrofenilhidrazina y dejar reaccionar las sustancias, 5 minutos a 25° C.; después de lo cual, se le añaden 8 ml. de acetato de etilo, y mezclar por medio de una corriente de aire, que se hace pasar por el líquido con el aparato que se describe después, durante dos minutos. Dejar separar las capas, extraer la capa acuosa inferior con una pipeta capilar, desecharla. Sobre la capa amarilla de acetato de etilo que queda, agregar 6 ml. de carbonato de sodio al 10%, y mezclar haciendo pasar de nuevo la corriente de aire durante dos minutos. Dejar separar las capas y esta vez extraer la capa superior de acetato de etilo, y desecharla; tomar 5 ml. de la capa acuosa extraída con el carbonato y pasar a celdillas de fotocolorímetro; agregar a esta porción 5 ml. de hidróxido de sodio aproximadamente 1.5 N, dejar reaccionar las sustancias 10 minutos para completo desarrollo de color.

Leer en espectrofotómetro de Coleman Jr., a 520 m μ .

La misma técnica se siguió con los standards de ácido pirúvico que se montaron para cada serie de muestras.

CURVA DE CALIBRACION.—

Los autores del método (16) recomiendan algún piruvato o ácido pirúvico recientemente destilado para las curvas de calibración.

En este caso se montaron varias curvas de calibración con diluciones de ácido pirúvico destilado, las diluciones se hicieron de la siguiente manera: se pesaron 600 mg. de ácido pirúvico destilado, se disolvieron en 100 ml. de agua destilada, de esa solución patrón se tomaron cantidades crecientes como lo muestra la Tabla No. 1; usando la misma solución patrón y concentraciones similares a las de la tabla, se hicieron las diferentes curvas.

TABLA No. 1.

Concentraciones de Acido Pirúvico.

Tubos	ml. de sol patrón pirúvico	ml. de agua	pirúvico en mg.	conc. real* de pirúvico	D. O.* promedio
1	0.000	1.00	0.00	0.000	0.000
2	0.062	0.93	0.375	0.187	0.0868
3	0.125	0.87	0.75	0.375	0.1691
4	0.250	0.75	1.50	0.75	0.3505
5	0.330	0.67	2.00	1.00	0.447
6	0.50	0.50	3.00	1.50	0.748
7	0.58	0.41	3.50	1.75	0.882
8	0.66	0.34	4.00	2.00	0.974
9	0.75	0.25	4.50	2.25	1.034
10	0.83	0.17	5.00	2.50	1.290
11	1.00	0.00	6.00	3.00	1.412

*Conc. real de pirúvico, significa que en el método se tomó esa concentración, puesto que se toma la mitad del volumen de las diluciones.

*D. O., es igual al promedio de las Densidades Ópticas.

Se observó que había variaciones considerables entre las diferentes curvas. (Gráfica No. 1), por lo que se optó por montar standards para cada determinación. Las diluciones que se usaron para estos standards fueron las de los tubos 1, que se empleó como testigo, el 2 con una concentración de 0.1875 mg. de ácido pirúvico, y el 5, con 1 mg.

Sin embargo, se tuvieron muchas dificultades, pues los piruvatos y el ácido pirúvico son muy difíciles de conseguir, y solo se obtuvo un ácido al 10% de concentración, que se tomó como standard.

REACTIVOS.—

I.—Anticoagulante.

Pesar 168 mg. de ácido cítrico monohidratado, disolver en 0.5 ml. de agua destilada y agregar hidróxido de sodio al 40% gota a gota hasta alcanzar un pH de 4; la mitad del volumen de este buffer se agrega a cada frasco, evaporándolo a sequedad, poniendo los frascos sobre la estufa a 80° C. Agregar al residuo 21 mg. de fluoruro de sodio y 20 mg. de bromuro de etil trimetil amonio.

Este anticoagulante fué ideado por Long (18), evita pérdidas de ácido láctico y pirúvico, ya que con la combinación de las sustancias antes mencionadas, se obtiene un cambio de pH en la sangre por inhibición enzimática y la hemólisis de la misma, lo que permite su estabilidad por mucho tiempo.

II.—Solución para desproteinizar.

a).—Solución al 10% de ácido tricloroacético.

III.—Soluciones de extracción o solventes.

a).—Acetato de etilo anhidro.

b).—Solución al 10% de carbonato de sodio.

c).—Solución de hidróxido de sodio aproximadamente 1.5 N.

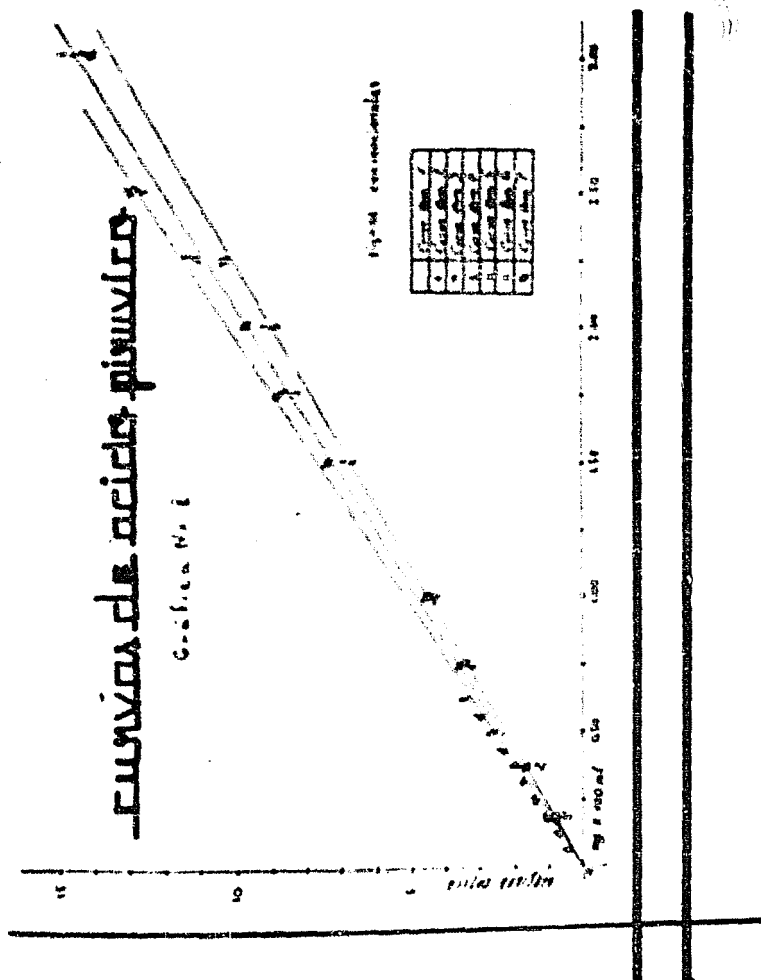
d).—Solución al 0.1% de 2-4 dinitrofenilhidrazina.

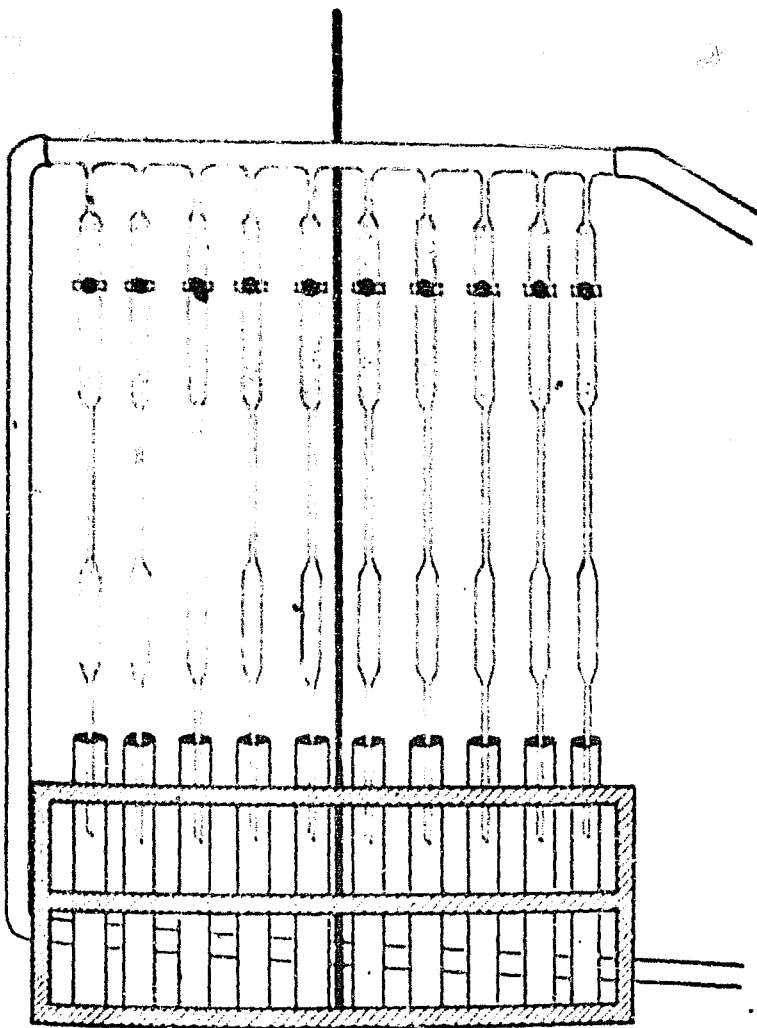
IV.—Solución Standard de ceto-ácidos.

El ácido pirúvico recientemente preparado se usa como standard, se prepara según Wendell (19) destilándolo en aparato de vi-

Curvas de acidez-pH

Gráfico No. 1





Aparato de aireación usado en el método

drio, a presión de 10 mm. de Hg. y a temperatura de 57.9° C., utilizándose la porción que destila entre 55 y 60° C.

APARATOS.—

El aparato empleado (20), consiste en un tubo de vidrio con un diámetro interno de 1 cm., al que por un extremo se le conecta una bomba de vacío. El tubo en posición horizontal tiene 10 ramas verticales a las que se les conecta por medio de tubos de hule, 10 pipetas volumétricas de 5 ml.; en esta forma el aparato permite la aereación simultánea a 10 tubos de ensaye; éste aparato presenta la ventaja de que la operación puede ser hecha por una sola persona en corto tiempo, evitando así variaciones en los resultados.

RESULTADOS.—

Las lecturas obtenidas en el espectrofotómetro, se convierten a Densidad Óptica (D. O.); como los problemas fueron hechos por duplicado se sacó promedio de las Densidades Ópticas individuales:

D. O. del problema x concentración del Standard.

Resultados

D. O. del Standard.

En vista de la concentración de los standards, y en virtud de que los resultados de los problemas son referidos a éstos, para no cometer un error se prefirió plantear los resultados en términos de valores porcentuales en lugar de en miligramos por ciento de pirúvico. Máxime que el propósito de este trabajo consiste en conocer el fenómeno en sí, es decir, las variaciones de las concentraciones de ceto-ácidos durante las diversas etapas por las que atraviesa el niño desnutrido encamado en el Hospital.

RESULTADOS

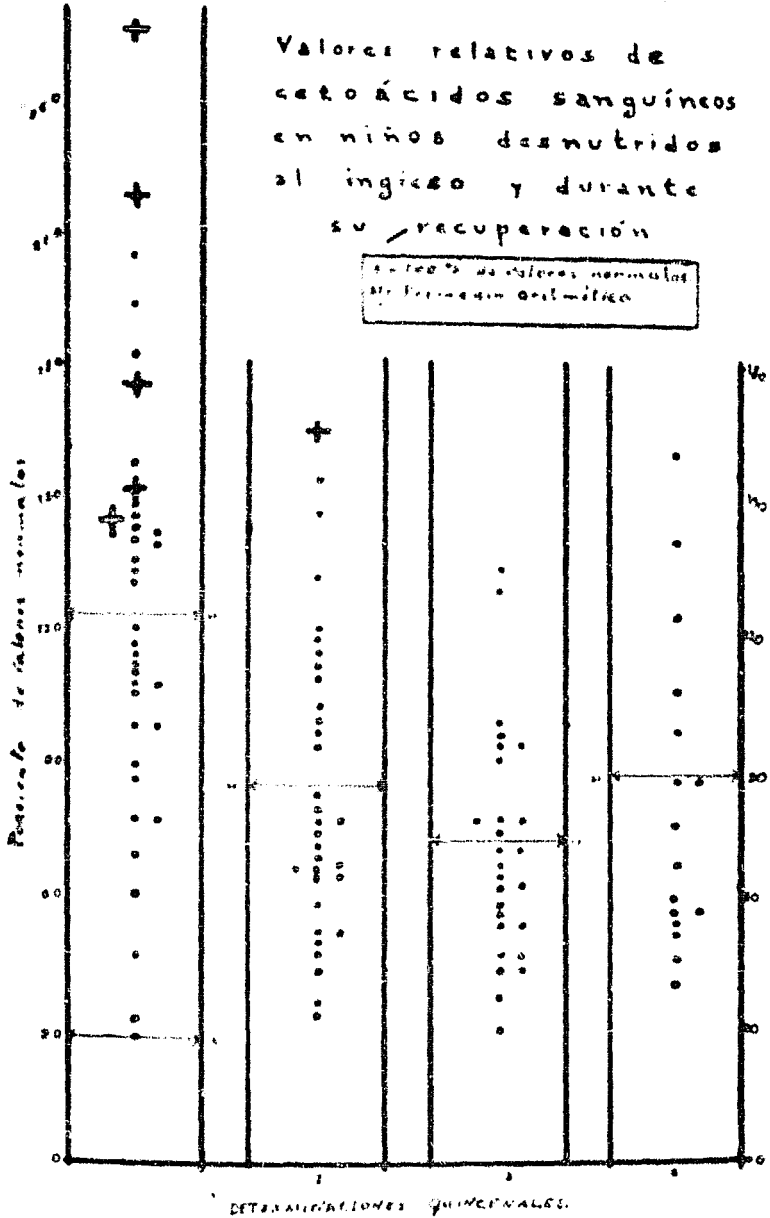
Es así como para los fines del presente trabajo, se han expresado los resultados obtenidos en niños desnutridos como proporción de los datos recogidos en un grupo de niños normales. Al promedio obtenido en este número de niños normales, se le asignó arbitrariamente el valor de cien, a los resultados obtenidos en cada una de las determinaciones de niños desnutridos, la proporción correspondiente. Este tipo de cálculos se realizó en cada uno de los casos individuales. Los valores promedios así como los valores extremos obtenidos en los distintos grupos, se señalan en la Tabla No. 1; en la Gráfica No. 1, se representa la distribución de los valores individuales.

TABLA No. 1.

Grupo	Promedio	Valores extremos
Normal	100%	— — — — —
Del ingreso a los 15 días	126.5	30.9% — 254.3%
De los 15 a los 30 días	84.8	33.4% — 165.6%
De los 30 a los 45 días	73.2	28.9% — 133.9%
De los 45 a los 60 días	87.2	39.7% — 161.4%

Es perfectamente obvio que con la gran dispersión encontrada, los promedios obtenidos no son representativos. No obstante se presentan porque proporcionan una idea general acerca de la evolución de los niveles de ceto-ácidos en las diferentes etapas de la recuperación de niños desnutridos.

Gráfico No. 1



Dentro de estos resultados han podido identificarse varios tipos de curvas, que están señaladas en las gráficas No. 2, 3, 4, 5, y 6. Estos tipos de curvas se describen tomando en cuenta el hecho de que el número de determinaciones fué progresivamente menor a medida que se ausentaron del Hospital. Existe por lo tanto la posibilidad de que la evolución ulterior de algunos niños hubiera obligado a incluirlos en un grupo distinto, de aquél en que aquí se presentan. Con esta salvedad, la gráfica No. 2, incluye 12 niños que presentan valores altos en la primera quincena, que fueron descendiendo progresivamente en las siguientes determinaciones. La gráfica No. 3, presenta 6 niños, de los cuales 3 tuvieron un ligero ascenso en la segunda, para tener luego un franco descenso en la tercera y cuarta quincenas; los otros 3, presentan un ligero descenso en la segunda determinación, y en la tercera un franco descenso al igual que los anteriores. En la gráfica No. 4, observamos 2 casos que tuvieron un rápido descenso en la segunda quincena, pronunciado ascenso en la tercera y finalmente franco descenso en la cuarta determinación. La gráfica No. 5, incluye un grupo de 5 niños, con tendencia a descender en la segunda determinación, siguiendo un descenso más ligero en la tercera y luego un suave ascenso en la cuarta. La gráfica No. 6 se subdivide en grupo A y grupo B; en el grupo A se presentan 4 casos que exceptuando uno, muestran un pequeño descenso en la segunda quincena, en la tercera todos, sufren un pronunciado descenso y en la cuarta rápido ascenso. En el grupo B se incluyen 4 casos, 3 de ellos presentan un ligero descenso en la segunda determinación, y franco ascenso en la tercera y cuarta determinaciones. El cuarto caso tiene un valor pequeño en la primera determinación, pero en la segunda y tercera determinaciones, va en ascenso progresivo.

Un grupo especial debe ser hecho con cinco niños que fallecieron, tres de ellos, después de la primera y dos después de la segunda determinaciones de ceto-ácidos, y que manifestaron los siguientes valores:

Gráfica No. 2

Valores de catodécidos en niños desnutrido.

100% promedio de valores
en niños normales

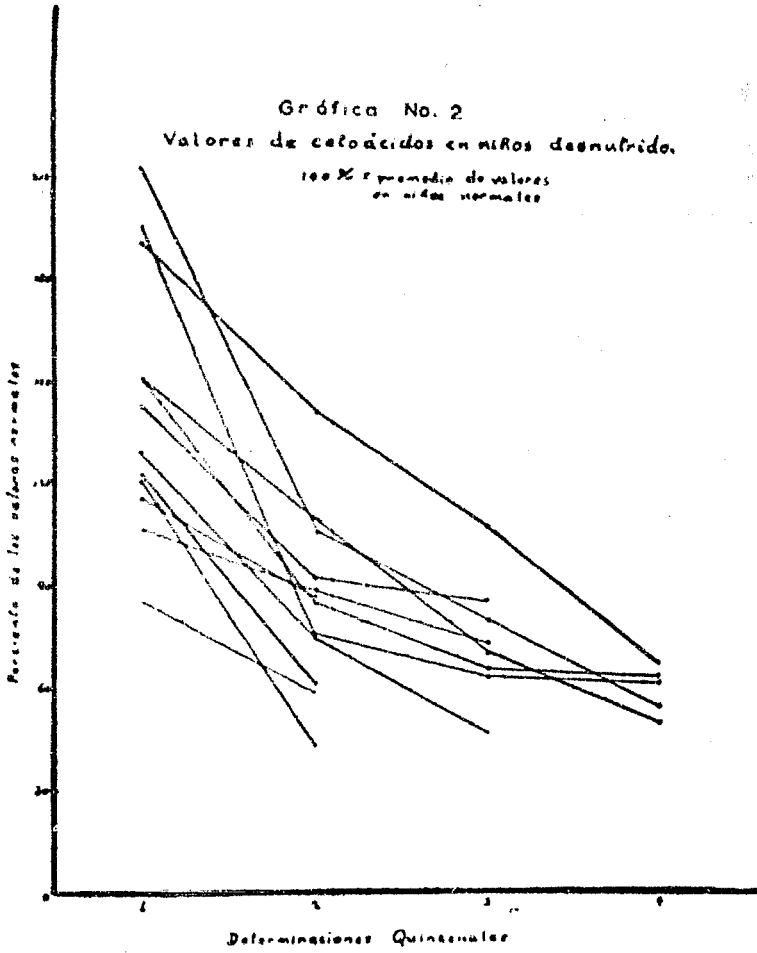


Gráfico No 3

Valores de calcio en niños desnutridos.
100% = promedio de valores en niños normales.

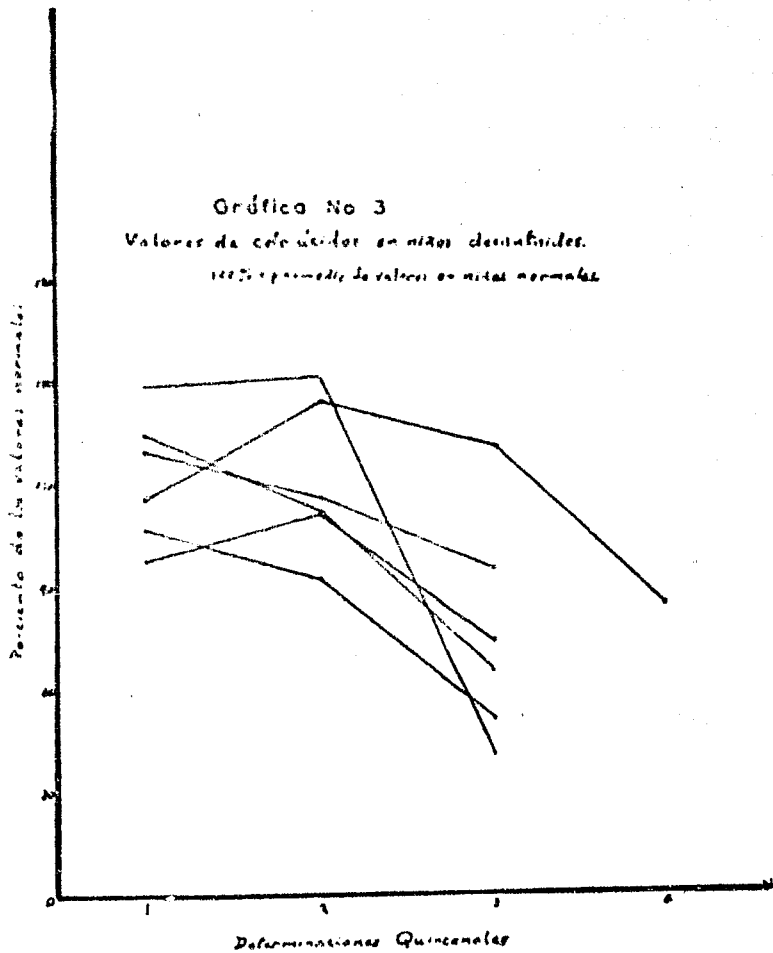


Grafico No. 4

Valores de catálisis en rinas desahmadas
y en presencia de valores en rinas normales.

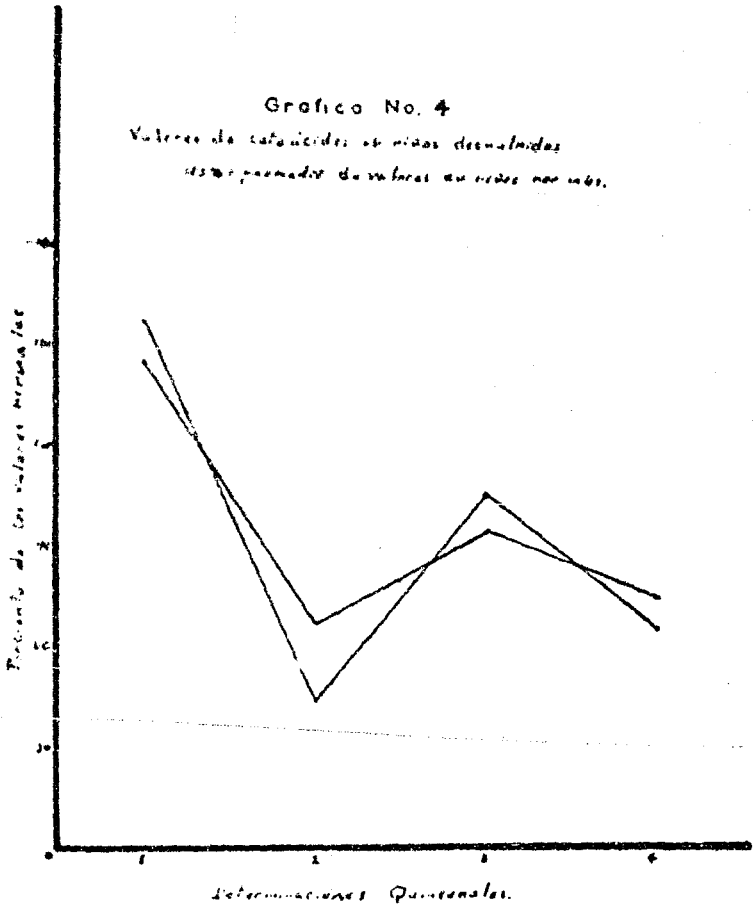
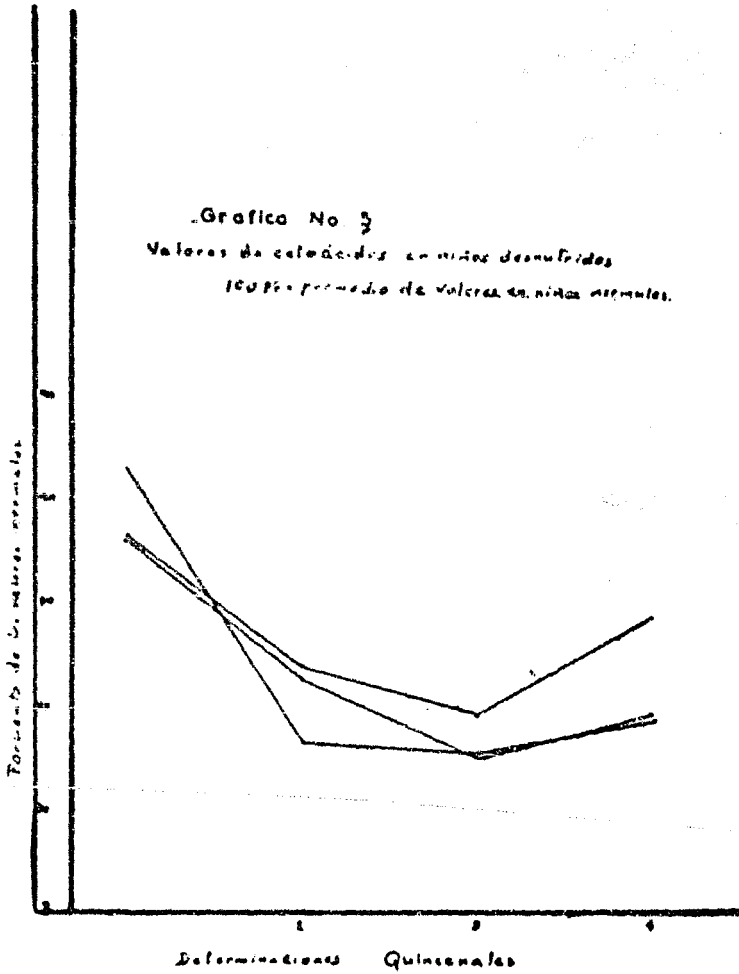


Grafico No 3

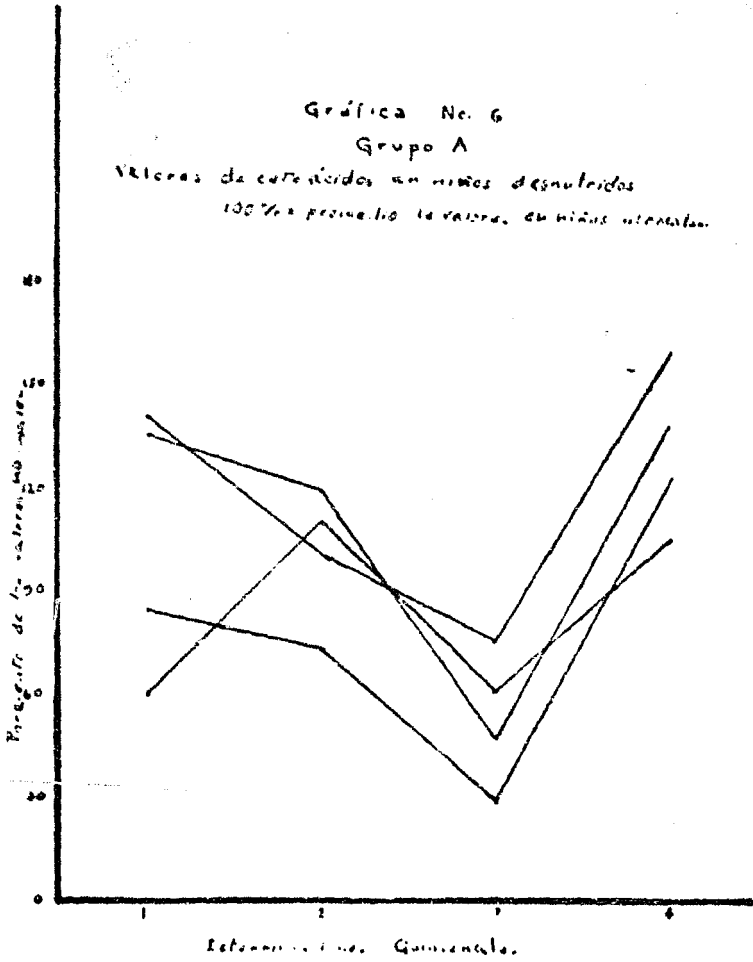
Valores de calidades en niños desnutridos
100 por promedio de valores en niños normales.



Gráfica No. 6

Grupo A

Valores de coeficientes en niños desnutridos
100% promedio la altura de niños normales



Gráfica No. 6
Grupo H

Valores de cada día, en miles de unidades
1949, por cada la semana en cinco días.

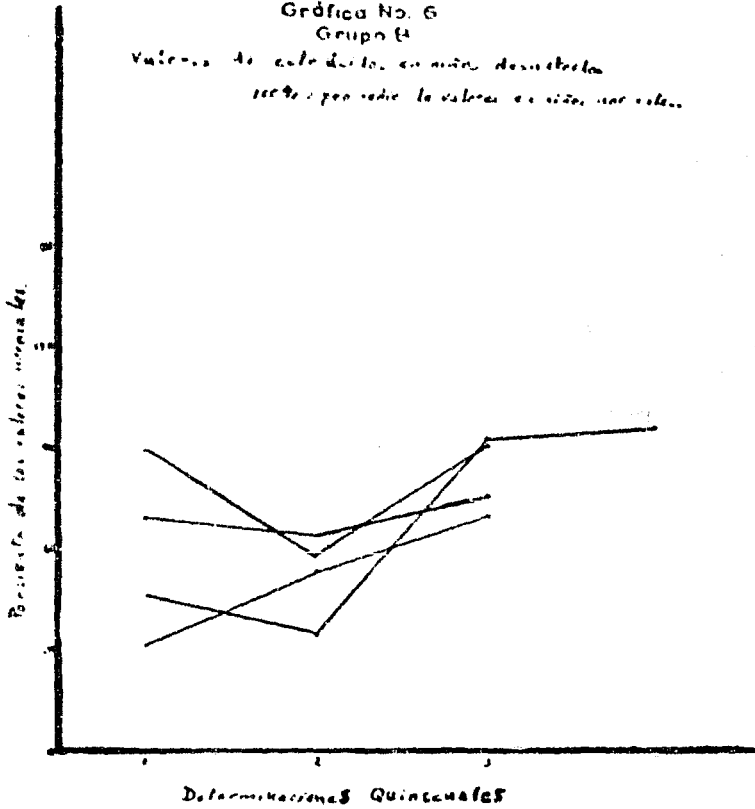


TABLA No. 2

CASOS	1a. DETERMINACION	2a. DETERMINACION
1	254.3	— — —
2	217.7	165.6.
3	175.1	— — —
4	148.6	— — —
5	140.2	65.1.

Además, se determinaron dos casos de coma diabético, y un caso probable de beri-beri; en la Tabla No. 3 se dan los valores de este grupo

TABLA No. 3.

CASOS	1a. DETERMINACION	2a. DETERMINACION
C. D. *	196.3	— — —
Pre C. D. *	80.6	165.3.
B-b *	234.7	309.3.

- C. D. - COMA DIABETICO.
- * Pre C. D. - PRE COMA DIABETICO.
- B-b - BERI-BERI.

DISCUSSION

Los resultados presentados muestran que el niño crónica y gravemente desnutrido a su ingreso al Hospital, presenta concentraciones de ceto-ácidos, considerablemente mayores que los obtenidos en niños aparentemente normales. Esta tendencia se acentúa considerablemente en niños próximos a morir.

Aunque en vista de la forma de presentación de los datos, no es posible calcular su equivalencia iónica, parece obvio que un acúmulo de ácidos orgánicos, como se observó en muchos de los niños, debe de haber jugado un papel de cierta importancia en la génesis de acidosis metabólica, mediante desplazamiento de bicarbonato, por una parte y, por requerir bases fijas para su excreción renal, por otra.

No se está en condiciones, en este momento de comprender la significación fisiológica de esta cetoacidemia inicial del niño desnutrido, y tampoco la de los diferentes tipos de curvas obtenidos en el material de estudio. Desde luego hubiera podido tenerse una idea más clara de las interrelaciones metabólicas involucradas, si se hubiera hecho determinación simultánea de niveles de ácido láctico y el cálculo de una relación lactato-piruvato, y si se hubiera examinado el mismo fenómeno después de la ingestión de glucosa.

Sin embargo, los datos obtenidos en este trabajo, sugieren que en ciertas fases de la historia natural de la desnutrición crónica infantil, existen dificultades en la oxidación normal de ácido pirúvico por vía del ciclo tricarbóxico de Krebs. Es de recomendarse

que se haga la determinación de ceto-ácidos siempre que quiera tenerse una idea precisa de todas las modalidades del equilibrio ácido básico en un caso dado, especialmente en individuos desnutridos.

RESUMEN

En el estudio seriado de los niveles de ceto-ácidos en la sangre de 30 niños con desnutrición grave, se observó que el 93% de los casos presentaron valores altos en la primera determinación; descendiendo los niveles posteriormente, en el 66% de los casos definitivamente. En los restantes, se presentó ascenso en determinaciones subsecuentes sin explicarse de momento esta anomalía.

Así mismo se observó, que los niños que fallecieron después de la primera o segunda determinaciones, fueron los que presentaron valores más altos, de 150 a 253%, en algunos casos sobrepasaron los niveles obtenidos en pre-coma diabético, 160 a 200%. Un caso de probable Beri-beri, presentó los valores máximos, 235 a 310%.

BIBLIOGRAFIA

- 1.—Gómez, F., Ramos, Gaiván, R., Cravioto, J., Frenk, S., *J. Trop. Peds.* (En prensa).
- 2.—Del Pino, R. M., Tesis, U. N. A. M., 1955.
- 3.—Frenk, S., Metcalf, J., Gómez, F., Cravioto, J., Antonowicz, I., *Pediatrics.* (Por ser publicado).
- 4.—Sagahón, J., Tesis de Internado, Hospital Infantil, 1953.
- 5.—Dakin, H. D., and Dudley, H. W., *J. Biol. Chem.*, 15 127 (1913).
- 6.—Neuberg, C., and Gorr, G., *Biochem. Z.*, 166, 442 (1925).
- 7.—Neuberg, C., and Kobel, M., *Biochem. Z.*, 216, 493 (1929).
- 8.—Barrenscheen, H. K., and Dregus, M., *Biochem. Z.*, 233, 305 (1931).
- 9.—Case, E. M., *Biochem., J.*, 26, 753 (1932).
- 10.—Peters, R. A., and Thompson, R. H. S., *Biochem. J.* 28, 916 (1934).
- 11.—Pi-Suñer, A., y Farrán, M., *Biochem. J.* 287, 113 (1936).
- 12.—Lu, G. D., *Biochem. J.*, 33, 249 (1939).
- 13.—Larsson, A., and Liljedahl, I., *Svensk. Kem. Tidskr.*, 52, 67 (1940).
- 14.—Bueding, E., and Wortis, H., *J. Biol. Chem.*, 133, 585 (1940).
- 15.—Fornaroli, P., and Pardi, A., *Boll. Soc. ital. biol. sper.*, 15, 511 (1940).

- 16.—Kato, K., and Li, P. K., *Am. J. Dis. Child.*, 61, 1222 (1941).
- 17.—Friedemann, T. E., and Haugen, G. E., *J. Biol. Chem.*, 144, 67 (1942).
- 18.—Long, C., *Biochem. J.*, 40, 27 (1946).
- 19.—Wendel, W. B., *J. Biol. Chem.*, 94, 717 (1931-32).
- 20.—Friedemann, T. E., Cotonio, M., and Shaffer, P. A., *J. Biol. Chem.*, 73, 335 (1927).