

LABORATORIO DE ANALISIS CLINICOS "SANZ-EXTREMERA"
SECCION DE BIOQUIMICA

ACIDOS SIALICOS EN SUERO (Comunicación)

por
F ARREBOLA

Ars Pharm. IX, 461 (1968)

Estando integrados los Acidos Siálicos, como componentes fundamentales, en el seromucoide o mucoproteína, al igual que en los lipopolisacáridos (mucolípidos), nos encontramos en el estudio sobre la importancia de estas dosificaciones.

El profesor PALLARDO, en la primera edición de su obra "Diabetes", pág. 198 y bajo el título de "Concepto y extensión del síndrome metadiabético", nos dice "En coincidencia, e incluso precediendo aparentemente a uno u otro ingrediente del síndrome metadiabético, se aprecian desviaciones cuantitativas y cualitativas, en la sangre, en la orina y en el L.C.R., de las proteínas, de los lípidos y de las mucoproteínas y de las sustancias relacionadas con estas últimas (Hexosaminas y Ac. Glucorónico), todo lo cual hace pensar fundamentalmente que la deposición del material mucoprotéico en la pared de los vasos de angiopatía diabética sea la consecuencia de un trastorno en el recambio íntimo de los glucoprotéidos"

PIGMAN, ha estudiado las influencias en Artritis y Reumatismo. Nosotros, hemos encontrado cifras elevadas en estos casos, comprobadas con la determinación de Proteína C reactiva y Mucoproteínas. Seguimos su posible interés en el diagnóstico del síndrome metadiabético.

Habiendo obtenido resultados muy concordantes en ambas determinaciones, cabe preguntarse ¿Sería más útil acudir a esta determinación, que a la de la glucoproteína alfa o Mucoproteína de Winzler?

Evidentemente, el que obtengamos resultados concordantes en estas determinaciones, podemos concluir la mayor sensibilidad de esta fracción a desviaciones patológicas.

Hemos realizado dos técnicas simultáneamente, la de Difenilamina y la de mezcla ácida Acético/Sulfúrico. Ambas técnicas han sido modificadas para superar los inconvenientes que veremos.

En la primera, la de Difenilamina o técnica de Ayala, hemos suprimido el tubo blanco, con 2 ml de ácido tricloroacético al 5 % y 4 ml de reactivo de Ayala que no interfiere en el resultado, porque hemos operado exactamente igual con la solución patrón al 5 mgrs. % en la curva de calibración. No existirá interferencia del reactivo.

Mediremos cada tubo problema frente al correspondiente de la batería B y miraremos la correspondencia de D.O. en la curva calibrada.

La modificación introducida en la técnica Acético/Sulfúrico, consiste en variar el factor de la fórmula, para obtener unos resultados idénticos a los obtenidos con la técnica de Ayala.

La fórmula de los autores para Espectrofotómetro Coleman, verificando la medida en tubo Coleman 6A, de 18 × 100 mm, es:

$$\frac{\text{D.O. Problema (alfa } \times 10)}{2'65} \times 38 = \text{mgrs. \%}$$

Como los autores cifran los valores normales en suero en (38 ± 2) %, esta es la razón de ese factor 38 de la fórmula.

Nosotros consideramos las cifras normales de (60 ± 4) % que son las dadas para la técnica de Ayala, por lo que modificamos el factor y ponemos 60, de forma que obtenemos los mismos valores que si usáramos de la primera técnica. De esta forma, nos han coincidido los resultados de ambas técnicas. En un ejemplo práctico, obtuvimos una D.O. (alfa × 10) de 2'676 y una equivalencia de 75 mgrs % en suero, midiendo con un Spectronic 20 y usando una longitud de onda de 530 mμ.

Hemos repetido la experiencia, sobre el mismo problema, pero usando la técnica acético-sulfúrico, obteniendo una D.O. (alfa × 10) de 3'370. Aplicamos la fórmula de los autores para Espectrofotómetro Coleman 6A, de 18 × 100 mm, y la fórmula es:

$$\frac{3'370}{2'65} \times 60 = 76 \text{ mgrs \%}$$

Si damos 76 mgrs % en lugar de 75, no cometemos error de consideración si tenemos en cuenta que, una unidad de transmisión en este sector de la escala, se corresponde con 2'26 mgrs. Efectuamos la medida en transmisiones, pero usando una tabla de transformación en D.O. con cuatro decimales.

Todo esto, viene a confirmarnos la posibilidad de usar el Spectronic, fotocolorímetro modesto, para realizar la Microtécnica.

MICROTECNICA Y VENTAJAS SOBRE LA REACCION DE DIFENILAMINA

Microtécnica: Añadir rápidamente y soplando con la pipeta, sobre 1 ml de suero, un volumen igual de ácido tricloroacético al 10 %. Mezclar bien. Poner en agua corriente y poner en coagulador durante 15 minutos. Centrifugar a 2.500 r.p.m. durante 10 minutos. A una parte alícuota de 0'4 ml de sobrenadante, añadir 5 ml de reactivo ácido (ácido Acético/Sulfúrico 95:5). Calentar 30 minutos exactos en baño de maría hirviente y nos aparecerá un color rosa. Enfriar a temperatura ambiente y leer antes de los 40 minutos, a 530 mμ, ajustando a cero de D.O. con el reactivo Acético/Sulfúrico y aplicar la fórmula antes expuesta.

Ventajas de la Microtécnica

a) Labilidad de la Difenilamina.—Las soluciones se altean con facilidad. El producto químico puro ha de conservarse en refrigerador y envuelto en papel negro.

b) Costo del patrón.—El patrón de A.N.A.N. (ácido N-acetil-Neuramínico) es muy difícil de adquirir y muy costoso. Se acude a una mezcla de sueros "supuestos normales"

c) La técnica del Acético/Sulfúrico no hace necesaria curva de calibración alguna. Lo hemos comprobado, y todo se reduce a calcular según la fórmula expuesta por los autores, o la modificada.

d) Los productos empleados en la microtécnica, son todos estables y químicamente puros (Ac. acético glacial y Ac. sulfúrico) y la mezcla reactiva no encierra dificultad alguna de preparación.

Al valernos de esta dosificación en el diagnóstico de Metadiabetes, pensamos en la mayor sensibilidad de esta fracción dentro de las Mucoproteínas y su manifestación más rápida en casos intermedios.

Acido Acético, Sulfúrico, Tricloroacético y Difenilamina, son todos de la casa MERCK y químicamente puros.

El Acido Siálico, es de la casa americana (U.S.A) "SIGMA" de Chemical Company, St. Louis, 18. Missouri.

El lote usado. 116 B - 2470.

A continuación exponemos la bibliografía usada y otras, de posible utilidad, pero de métodos más complicados.

BIBLIOGRAFIA

Reacción de la DIFENILAMINA:

AYALA, W., MOORE, L. V y HESS, E. L. Jour. Clin. Invest., 30: 781, 1951.

DISCHE, Z., *Microchemie*, 8: 4, 1930.

PIGMAN, P., HAWKINS, W L., BLAIR, M. G. y HOLLEY, *Arthritis and Rheumatism* 1: 151, 1958.

SAIFER, A. y GERSTENFELD, S., *J. Lab. Clin. Med.*, 50 17, 1957.

Reacción del ACETICO/SULFURICO:

HESS, E. L., COBURN, A. F., BATES, R. C. y MURPHY, P., *J. Clin. Invest.*, 36 449, 1957

Reacción del ORCINOL:

KLENK, E. y LANGERBEINS, H. *Zeit Physiol. Chem.*, 270 185, 1941.

SVENNERHOLM, L., *Arkiv. Kemi*, 10 577, 1957.

WERNER, I. y ODIN, L., *Acta. Soc. Med. Upsalensis*, 57 230, 1952.

Racción del RESORCINOL

SVENNERHOLM, L., *Acta. Chem. Scand.*, 12: 547, 1948.

SVENNERHOLM, L., *Biochim. et Biophys Acta*, 24: 604, 1957.

Reacción del TRIPTOFANO-Ac. PERCLORICO

SIEBERT, F. B., PFAFF, M. L. y SIEBERT, M. V., *Arch. Biochem. Biophys.*, 18 279, 1948.

Reacción del Ac. TIOBARBITURICO · después de oxidar con PERYODATO

WARREN, L., *J. Biol. Chem.*, 234 1971, 1959.

Nota.—La "Microtécnica" ha sido extractada de "Microtécnicas de Química Clínica" Samuel Natelson, Sc. M., Ph. D., pág. 433, 1964. Ediciones Toray, S. A. Barcelona.