

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS

Colaboración al Laboratorio de
QUIMICA - BIOLOGICA

La reacción de Sellek y Frade de enturbiamiento y
floculación al Acetato de Cobre, como investigación
del funcionamiento hepático en comparación con
reacciones similares.

TESIS DOCTORAL

PRESENTADA POR

JOSE ALFREDO MOLINA

Ex-Técnico del Laboratorio del Hospital Rosales,

Ex-Técnico del Laboratorio de Tisiología del Hospital Rosales,

Ex-Preparador de QUÍMICA BIOLÓGICA de la Facultad de
Ciencias Químicas,

Ex-Técnico del Laboratorio del Hospital Psiquiátrico,

Ex-Jefe del Laboratorio del Hospital "San Juan de Dios" de
San Miguel.

SAN SALVADOR. EL SALVADOR, C. A.

JUNIO DE 1960



7
574.1922
M722C
1960
F. C. C. Q. Q.
Ej. 1

049869

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE EL SALVADOR

UES BIBLIOTECA CENTRAL



INVENTARIO: 10122928

Rector

Dr. NAPOLEON RODRIGUEZ RUIZ.

Secretario

Dr. ROBERTO EMILIO CUELLAR.

FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS

Decano

Dr. FRANCISCO GONZALEZ SUVILLAGA.

Secretario

Dr. ROBERTO A. MACHADO.

INTEGRANTES DEL JURADO DE EXAMEN PUBLICO

Dr. Carlos Mata Gavidia,

Dr. Julio César Morán Ramírez,

Dr. Raúl Montoya.

DEDICATORIA:

A la memoria de mi inolvidable madre:

Dña. Jesús Fernández Molina.

Con Cariño y Gritud a mi hermano:

Dr. Miguel A. Molina.

Con todo cariño a mi esposa:

Dña. María de los Angeles de Molina.

A mis hijos:

Margarita de Jesús Molina,

Vilma Elizabeth Molina,

Miguel Alfredo Molina,

Sonia Cecilia Molina.

A mi Profesor:

Dr. Julio César Morán Ramírez.

A mis amigos.

I N T R O D U C C I O N

En el deseo de contribuir a mantener el interés en el uso de reacciones biológicas que sean útiles en la investigación de alteraciones patológicas del funcionamiento de órganos importantes del organismo, me permito presentar a la consideración del Honorable Jurado Examinador de Tesis de la Facultad de Ciencias Químicas, y como una colaboración al Laboratorio de la Escuela de Química - Biológica de esa Facultad, el presente trabajo sobre la aplicación de la Reacción de Sellek y Frade al Acetato de Cobre en la investigación del funcionamiento de la célula hepática; reacción ésta, que por su sensibilidad y especificidad, su técnica libre de pesados procedimientos, la estabilidad de sus reactivos y su bajo costo, debe ser acogida con confianza por quienes interesados en estas disciplinas, desean facilitarse el camino para llegar a la certeza de si la célula hepática se encuentra funcionando dentro de la normalidad o bien ha escapado de este límite y entrado en el campo de la Patología.

No es de dudarse que las funciones múltiples del hígado obliga a usar no una, sino muchas pruebas funcionales o reacciones según la función que se supone alterada y se desea explorar, pero de una manera general puede considerarse que una reacción del tipo de la Reacción de Sellek, permite englobar alteraciones variadas producidas por causas varias que conducen a la alteración y disfuncionamiento de la célula hepática y por tanto de la glándula - hígado en su totalidad; lo que traduce que esta glándula no desempeña o desempeña mal, las funciones que le ha encomendado la naturaleza.

Acaso en la investigación de la función biliar no tenga la reacción de Sellek una aplicación de primer plano, pero sí tendrá que ser útil durante la evolución de una alteración de la función biliar que siempre repercute sobre el funcionamiento de la glándula hepática que se traduce, por su incapacidad de producir o fabricar moléculas de la fracción albúmina de las proteínas - plasmáticas, según explico en el curso de la exposición del presente trabajo, con la consiguiente producción de globulinas especiales que pueden ser puestas en evidencia poniendo en juego me-

canismos de floculación con reactivos sensibles, que varían con la reacción de este grupo que se utiliza, grupo dentro del cual resalta la reacción de Sellek, con más seguridad y facilidad de aplicación.

A continuación expongo el plan distributivo a seguir en la exposición del trabajo que hoy someto a vuestra consideración más distinguida.

- 1.- *Introducción. La reacción de Sellek*
- 2.- *Base científica de la reacción*
- 3.- *Proteínas plasmáticas*
- 4.- *La Gamma Globulina*
- 5.- *Su origen*
- 6.- *Función del cobre en el organismo*
- 7.- *Reacciones basadas sobre globulinas*
- 8.- *Reacción de Sulfato de Zinc*
- 9.- *Reacción de Hanger*
- 10.- *Reacción de turbidez del Timol*
- 11.- *La reacción de Sellek y sus ventajas en comparación con las reacciones de Hanger y Timol*
- 12.- *Material empleado en la reacción de Sellek*
- 13.- *Técnica de esta reacción, método Standard*
- 14.- *Interpretación de los resultados*
- 15.- *Observaciones*
- 16.- *Conclusiones*
- 17.- *Bibliografía*

BASE CIENTIFICA DE LA REACCION

En la prueba del acetato de cobre de Sellek y Frade el agente activo de turbidez y floculación es la gamma globulina que se encuentra aumentada en un 100% de los casos positivos. En las enfermedades hepáticas como es sabido, la gamma globulina además de estar aumentada en cantidad, es muy inestable.

Este hecho está asociado a una reducción en la producción de la Serina (66.6%). A veces un ligero aumento también en la globulina beta (16%).

El cobre sanguíneo está íntimamente ligado a las globulinas. Thompson y Watson han establecido que el cobre de los sueros humanos está combinado con la gamma globulina en un 25%, 55% a la Beta-globulina y un 10% a la Alfa-globulina.

En la enfermedad de Wilson, (degeneración hepatolenticular) hay una aparente falta de incorporación del cobre del acetato Cúprico (Cu^{64}) dentro de la fracción de las globulinas del suero.

Se dispone así de una prueba sensible que utiliza como reactivo una solución de cobre, el metal que en el suero sanguíneo está unido a las globulinas; en cambio el contenido de los lípidos totales no parece estar relacionado con los valores de turbidez de la prueba.

De las investigaciones efectuadas se deduce que el reactivo del Acetato de Cobre reacciona principalmente, sino exclusivamente, con la fracción gamma de las globulinas del suero, las que aumentadas, son causa de la turbidez de la reacción en casos patológicos de daño hepato-celular.

El mecanismo de positividad de la prueba por electroforesis muestra un decrecimiento de la Serina (66.6%) y un aumento de las globulinas, especialmente, de la fracción gamma que está aumentada en un 100% de los pacientes.

La globulina beta fué ligeramente elevada en el 16% de los casos.

PROTEINAS PLASMATICAS

La cifra global de proteínas plasmáticas es de unos 7.5 gramos por 100c.c. Así las proteínas representan la mayor parte de los sólidos del plasma. Pueden dividirse en tres grandes grupos: Fibrinógeno 0.5 gramos por 100 c.c., albúminas 4.5 gramos por 100 c.c., Globulina 2.5 gramos por c.c.

El fibrinógeno es producido por el hígado. Siempre que hay gran destrucción de tejido hepático se observa un descenso acusado del contenido de fibrinógeno de la sangre.

Las proteínas del suero incluyen solamente las fracciones de albúmina y globulina del plasma, puesto que el fibrinógeno queda eliminado por el proceso de coagulación que implica la obtención del suero. Se pueden separar estas dos fracciones por medio de los métodos de salificación. La fracción de globulina es precipitada totalmente con sulfato de magnesio o por hemisaturación con Sulfato de Amonio quedando en solución la fracción albúmina.

Los estudios de plasmoforesis demuestran que el hígado es el órgano principal para la preparación de las proteínas plasmáticas, si bien el intestino puede participar en cierto grado. Ciertas fracciones de las globulinas pueden formarse en otros tejidos aparte del hígado, pero es probable que sea éste el único órgano productor de la albúmina, fibrinógeno y protombina, así como de la mayor parte de las globulinas.

En los recientes estudios físico-químicos de Cohn, se dividen en seis fracciones las proteínas del plasma. La fracción I contiene la mayor parte del fibrinógeno; las fracciones II, III y IV contienen aquellas globulinas que antes se separaban en alfa, beta y gamma globulinas. La fracción V contiene la mayor parte de las albúminas del plasma. La fracción VI contiene una cantidad -- muy pequeña de albúmina y alfa globulina, una cantidad elevada de sales y cierto número de cuerpos no protéicos de pequeño peso molecular.

En la globulina gamma que Cohn designa como fracción II y III se concentran las sustancias inmunizantes o anticuerpos. Se incluyen en éstos los anticuerpos contra las bacterias patógenas y los virus, así como las isohemoaglutininas para los grupos sanguíneos humanos.

En las afecciones del hígado como la cirrosis, existe, en general, tendencia a la hipoproteinemia, que se manifiesta sobre todo en la fracción de albúmina. Las lesiones del parenquima hepático pueden también ocasionar un aumento de las globulinas, sobre todo de la globulina gamma, si bien también la alfa y beta globulina están notablemente alteradas, especialmente en las hepatitis recidivantes entre los 14 y 30 días.

La gravedad de la hipoalbuminemia en las enfermedades crónicas del hígado es de importancia diagnóstico y puede servir de criterio para estimar la intensidad de la lesión. Además, una cifra baja de albúmina del suero que no aumenta bajo los efectos del tratamiento es de mal signo pronóstico.

Los trabajos de Tiselius y otros investigadores en la electroforesis del plasma de animales, antes y después de su inmunización frente a ciertos antígenos, han demostrado que la fracción gamma globulina del plasma contiene la totalidad o la casi totalidad de los anticuerpos circulantes. Además de contener la gamma globulina los anticuerpos de varias enfermedades infecciosas, la concentración elevada de dicha globulina en otras enfermedades no infecciosas como la cirrosis del hígado permite afirmar que esta fracción no solo contiene anticuerpos de inmunidad.

La estimulación y proliferación, por cualquier causa, de las células del retículo endotelio va acompañada de la producción y liberación de gamma globulina.

En los casos de lesión hepática extensa, la fracción globulina, sobre todo la gamma globulina, suele aumentar, a pesar de que la seroalbúmina baja.

En lo que se refiere al órgano u órganos en donde se forman la globulina y la albúmina, el hígado produce probablemente de un modo casi exclusivo, seroalbúmina y los prótidos que intervienen en la coagulación de la sangre (fibrinógeno y la protombina), en cambio, las globulinas se forman en cierto número de órganos distintos del hígado: posiblemente en el retículo endotelio y en los nódulos linfáticos.

Después de una hemorragia, el fibrinógeno, la seroglobulina y la seroalbúmina son regeneradas en este orden al cabo de varios días. Estos resultados han sido confirmados por Tarver y Reimhardt, quienes han inyectado a perros normales y a perros hepatectomizados, metionina marcada con S^{35} radioactivo. La metionina radioactiva no apareció en la molécula del fibrinógeno del plasma de los perros hepatectomizados, lo que permite afirmar que el hígado es el único órgano que lo produce.

Por otra parte, si bien el hígado es sin duda alguna, el órgano más importante en lo que se refiere a la producción de los prótidos del plasma de la sangre, otros órganos, distintos del hígado, pueden formar también una cantidad apreciable de globulinas,

y una mucho menor de albúmina.

Según estos investigadores, el animal normal produce albúmina veinte veces y globulina siete veces más rápidamente que el perro hepatectomizado. Sin embargo, aún en este caso, la producción de albúmina por el perro hepatectomizado es muy dudosa, pues la fracción albúmina del plasma contenía siempre como impureza, una cierta cantidad de globulina.

Observaciones sobre animales en experimentación indican que bajo condiciones simultáneas de daño hepático y restricción en la ingestión de proteínas, el factor que determina concentración de las proteínas del plasma, es la capacidad funcional del hígado y no la deficiencia en la ingestión de proteínas. En la hepatitis viral hay un aumento sobre todo en gamma globulina.

Este aumento de gamma globulina ha sido atribuido a la producción de anticuerpos o a una alteración de la proteína hepática.

En estados avanzados de enfermedades crónicas del hígado, incluso la cirrosis portal, hay una reducción en las proteínas totales, la disminución se hace de la fracción albúmina, debido a alguna desnutrición coexistente o a alguna interferencia a la regeneración de la albúmina resultante de la alteración de la función hepática, sobre todo de la síntesis de las proteínas. El aumento usual de gamma globulina ha sido atribuido a la producción de anticuerpos de una proteína alterada del hígado, además es de observarse que en casos de lesión de la célula hepática, el hígado produce con más facilidad globulina que albúmina, debido al mayor volumen de la molécula de globulina que de la de albúmina que es más fina y por tanto más numerosa y más difícil de producir.

Se pueden hacer algunas generalizaciones respecto a los cambios de las globulinas del plasma en casos de alteraciones hepáticas con aumento de gamma globulina y a veces también de la alfa y beta globulina. El aumento de gamma globulina se cree debido a la producción de anticuerpos para una proteína anormal, resultante de un daño hepato celular inducido por infecciones y tóxicos químicos (Ejemplos: tetracloruro de Carbono, Cloroformo, arsfenamina, etc.). En casos de daño hepático la capacidad del hígado para utilizar los amino ácidos para síntesis de sus proteínas, celulares y albúminas plasmáticas, está obstruccionada o impedida y cantidades de estos ácidos son aprovechados para la síntesis de la gamma globulina por tejidos extrahepáticos (células del retículo endotelio).

El aumento de alfa globulina ocurre en varias condiciones acompañadas de fiebre o procesos inflamatorios y degenerativos. El aumento de globulina beta se relaciona a cierta anormalidad en los lípidos del plasma (lipoproteínas) que ocurren en ciertas formas de enfermedad del hígado. Las diferentes fracciones de estas globulinas se cree que son sintetizados sobre todo en el hígado.

Las globulinas del plasma están con frecuencia aunque no siempre aumentadas en condiciones en las cuales, la concentración de la albúmina es baja, probablemente las condiciones en las cuales la disminución de la albúmina, estimulen simultáneamente la formación de ciertas globulinas por ejemplo, anticuerpos (globulinas gamma), lipoproteínas (alfa y beta globulina).

Como resultado de estos cambios, la relación albúminas: globulina o A/G, o cociente albuminoso que normalmente es de 1. a 1.5 está disminuido o invertido, si bien este factor es sin mayor importancia ya que puede significar una disminución de la albúmina, un aumento en la globulina o una combinación de ambas, en cambio los factores que sí son de importancia son los niveles absolutos de la albúmina y de las globulinas; no en relación de concentración.

GLOBULINA GAMMA

El sector gamma de la fracción globulina es el que más atención ha recibido en el estudio de las proteínas del plasma, quizá, por la importancia de su componente anticuerpo en la inmunidad y en las enfermedades alérgicas y estados de hipersensibilidad. La mayoría de los anticuerpos adquiridos, como los que se producen en repuestas al sarampión, a la poliomielitis, etc. se encuentran en la fracción gamma.

Los naturales, las isoaglutininas anti A y anti B, y algunos de los adquiridos están en la fracción globulina beta. Pero no se debe dar demasiada importancia a esta diferencia porque puede ser solo una distinción electroforética.

Lo que representa la globulina gamma en la inmunidad se ve bien en la historia clínica y los hallazgos de laboratorio de las enfermedades acompañadas de hipogamma-globulinemia, en las cuales no solo falta la globulina gamma, sino también las isoaglutininas. Los individuos afectados sufren ataques repetidos de infección respiratoria, por ejemplo, otitis media o neumonía, y es curioso que no parecen ser más sensibles a enfermedades víricas, como las pa-

peras o el sarampión, que generalmente confieren inmunidad.

ORIGEN DE LA GLOBULINA GAMMA

Parece que la globulina gamma y los anticuerpos proceden de los plasmocitos, pues en los pacientes con hiperagammaglobulinemia, especialmente en el plasmocitoma (mieloma múltiple), hay aumento del número de estas células en los tejidos; en estos enfermos la globulina gamma puede estar aumentado hasta tres o cuatro veces el valor normal.

En la agammaglobulinemia faltan los plasmocitos en los tejidos. La célula del plasma tiene una concentración alta de ácido ribonucleírico, que es necesario para la síntesis de las proteínas, y posee otras características comunes a las células secretoras. - Hay también pruebas de que los linfocitos producen anticuerpos; se ha demostrado que son el tipo de célula predominante en la linfa de los ganglios linfáticos que reciben la que procede de los sitios en que se ha inyectado un antígeno.

Es lógico deducir que ambas clases de células, los plasmocitos y los linfocitos son las productoras de anticuerpo y, por tanto, de globulina gamma.

Así pues, la formación de globulina gamma puede ser el resultado de que dichos dos tipos de células, los plasmocitos y los linfocitos, tengan una célula precursora común, o se conviertan los unos en los otros, o desempeñen papeles distintos en diferentes fases de la respuesta inmune.

FUNCION DEL COBRE EN EL ORGANISMO

El cobre es un elemento indispensable para el organismo aunque las cantidades diarias requeridas son muy pequeñas: entre 1.25 mlgrs. según la edad.

Las funciones de este elemento esencial no son bien conocidas. En unión del hierro es necesario el cobre para la síntesis de la hemoglobina.

En las anemias nutritivas, que se producen por falta de hierro en la dieta, la hemoglobina no se forma por la sola incorporación de este elemento, sino que es necesario adicionar cobre, que se ha comprobado acelera la incorporación del hierro radioactivo a la hemoglobina. El hígado, el bazo y los riñones contienen las mayores proporciones del cobre total (100 a 150 mlgrs) del orga-

nismo. La hemocianina es un complejo cobre-proteína contenido en la sangre de ciertos invertebrados en los que desempeña una función similar a la de la hemoglobina como transportador del oxígeno. Ciertas enzimas como la tirosinasa y la oxidasa del ácido ascórbico son complejos de cobre y proteína.

Se ha aislado del glóbulo rojo de los mamíferos una proteína con cobre (hemocuprina).

La existencia del cobre en los hematíes puede explicar la necesidad de este elemento en la formación de la hemoglobina.

Metabolismo.- Los animales de experimentación sometidos a dieta deficiente en cobre, pierden peso y mueren; aún cuando presenten anemia, esta anemia no es la causa de la muerte, puesto que una anemia de la misma intensidad por falta de hierro no es mortal. Este hecho sugiere que el cobre tiene un papel, además de su función en el metabolismo del hematíe. Este papel adicional del cobre puede relacionarse con la actividad de los enzimas de enzimas de oxidorreducción de los tejidos como los citocromos.

El organismo no elimina el cobre con facilidad por la orina. Al parecer, la mayor parte de él se pierde por vía intestinal.

La cantidad diaria de cobre necesaria para el organismo es obtenida fácilmente de las dietas usuales. Los alimentos que lo contienen en su mayor abundancia son: hígado de ternera 4.4; otras 3.1; chocolate 2.7; hígado de buey 2.2; melazas, setas, 1.9; cacahuete 1; langosta, trigo 0.7; arroz, 0.6; aceitunas 0.5. (Las cifras son en miligramos por 100 gramos). La leche es muy pobre en cobre. Como el hierro, se deposita principalmente en el hígado.

QUE ES EL ACETATO DE COBRE NEUTRO

Llamado verde cristalizado o cristales de Venus. Se presenta en cristales de color verde azul pronunciado, es soluble en 15 partes de agua, es soluble en alcohol y glicerina, efluorescente en el aire seco, tiene olor ligeramente acético. Se le conoce también con el nombre de cardenillo.

Su solución acuosa es descompuesta por la ebullición poniéndose en libertad el ácido acético y haciéndose depositar un acetato tribásico.

REACCIONES BASADAS SOBRE LA GLOBULINA

Ciertas reacciones cualitativas que dan resultados anormales en presencia de anomalías en una o más fracciones de globulina del plasma han sido encontradas de mucha utilidad para

el diagnóstico; las más empleadas corrientemente son: la turbidez del timol, la reacción de Hanger o floculación de la Cefalina Colesterol y la de turbidez con las sales de Zinc.

Reacción de enturbiamiento con Sulfato de Zinc: Este procedimiento está basado sobre el hecho que la solubilidad de las proteínas del plasma está disminuida al ser diluidas con soluciones de baja concentración iónica. Bajo ciertas condiciones las globulinas más insolubles precipitan desarrollando un enturbamiento que puede ser medido.

Con una concentración apropiada de metales pesados como el Zinc o el Cobre es posible de producir una situación en la cual hay una precipitación mínima en el suero normal y una máxima precipitación de sueros con un aumento en la concentración de la -- gamma globulina. Las medidas de la turbidez son hechas por comparación con standards de solución de Sulfato de Bario; siendo el límite normal de 2 a 8 unidades.

Este procedimiento es aplicado de preferencia al estudio de casos con enfermedad hépática.

Su ventaja principal sobre las reacciones de Timol y la de Hanger, descansa en el hecho de que parece reflejar solo cambios cuantitativos de un solo componente del plasma (en este caso de la globulina gamma) en tanto que las otras reacciones son influenciadas por cambios asociados en los grupos albuminosos y de lípidos.

Reacción de Hanger o reacción de floculación Cefalina-Colesterol. - Está basada en el hecho observado de que cuando un suero diluido con un alto contenido (anormal) de globulina se agrega a una mezcla emulsionada de Cefalina colesterol, estas substancias agregadas de la globulina precipitan (floculan) y la solución se aclara, disminuyendo naturalmente la opalescencia. Esta prueba da resultados positivos en una gran proporción de casos de un daño activo de la célula hepática sobre todo en los que hay un aumento de globulina especialmente si la porción albumina está disminuida.

La producción de una reacción positiva ha sido atribuida a la existencia de una o varias de las siguientes condiciones: a) Aumento de la globulina gamma en tal cantidad que los componentes normales de la fracción albuminosa son inhábiles para impedir la reacción, b) disminución en la concentración de la sero albúmina debajo de los límites capaces de inhibir la reacción, c) disminución de las propiedades del suero de inhibir la floculación debida a modificaciones químicas de la fracción suero-albúmina; sin em-

bargo se pueden obtener reacciones positivas aún con sueros normales en las condiciones siguientes: 1o.) Después de permanencia del suero en la nevera durante varios meses. 2o.) Después de su inactivación a 56° durante 30 minutos. 3o.) Si la mezcla suero-emulsión cefalina-Colesterol queda expuesta a la luz durante el período de observación de la reacción (24 a 48 horas).

Reacción de turbidez del Timol: Esta basada sobre la observación que al agregar solución de Timol a ciertos sueros con alto contenido anormal de globulina resulta un enturbiamiento marcado de la solución compleja (timol-globulina-lípidos), en tanto que, escaso o ninguna reacción ocurre con suero normal.

El grado de turbidez, expresado en unidades, puede ser medido por comparación con un standard de turbidez de sulfato de Bario: Normalmente se leen 1 a 4 unidades con lectura a 30 minutos.

Después de períodos más largos (18 a 24 horas) pueden floccular como en la reacción de Hanger haciendo la aclaración de que la turbidez y la floculación no siempre van paralelas, pero los resultados si pueden ser comparables con los de la reacción de Hanger. La reacción de turbidez del timol ha sido acreditada a la presencia de una alta cantidad anormal de la fracción de beta globulina o sea la beta lipoproteína.

Ventajas de la reacción Sellek-Frade en comparación con las reacciones Hanger y Timol.

La solución matriz de Acetate de Cobre es estable, y guardada en el refrigerador se conserva indefinidamente. No sucede lo mismo con la de Timol. Watson ha señalado "que la solución buffer de Timol no es constante como pudiera desearse. Su turbidez varía un poco de un lote al otro y de tiempo en tiempo, encontrándose que, dejada en reposo, se vuelve sensiblemente más turbia en un período de dos semanas. Los resultados también varían con la naturaleza química de los cristales de Timol. Usando dos marcas diferentes señala Ducci, se encuentran discrepancias en un gran número de sus resultados. De la Hueriga y Poper dicen: "El Timol es una solución supersensible, que se vuelve turbia después de unos días de reposo a la temperatura del cuarto. Diferentes lotes producen diferentes lecturas con el mismo suero.

Reinhold y Yonan expresan que la determinación del reactivo de timol se acompaña de una alteración de su espectro de absorción.

En la prueba de Hanger la emulsión de trabajo, debe usarse solo el día que se prepara. Hay por otra parte en la reacción de la cefalina-colesterol los inconvenientes de una falta de uniformidad en la apreciación e interpretación de los resultados positivos. La contaminación bacteriana da falsos resultados positivos. Ella es además fotosensible y el estado de la cefalina afecta la sensibilidad de la prueba.

La reacción Sellek-Frade solo necesita un tubo y no requiere vigilancia alguna sobre el Ph. de la solución reactivo, pues éste se sitúa espontáneamente en la zona óptima Ph. 6.80.

Además podemos mencionar como ventajas de la citada reacción Sellek-Frade las siguientes:

1o.- Por ser entre las reacciones de disfunción hepatocelular actuales la más simple y económica.

2o.- La prueba se realiza con un ayuno simple, lo cual evita las complicaciones e inconvenientes de nuevas extracciones, administración de inyecciones o ingestión de sustancias diversas.

3o.- Alta estabilidad y conservación indefinida de los reactivos.

4o.- Sensibilidad y corto espacio para su realización.

5o.- Procedimiento Standard, Cuantitativo y Ultramicrométodo.

6o.- Bajo costo totalmente insignificante.

En cuanto a economía y sencillez de su procedimiento y su elevado índice de sensibilidad ninguna supera a la prueba Sellek-Frade del Acetato de Cobre.

Reacción de Sellek-Frade del Acetato de Cobre

Material de laboratorio.

El material necesario para verificar la reacción es el siguiente:

a) Matríz volumétrico de 500 cc.

b) Matríz volumétrico de 100 cc.

c) Pipeta de 5 cc. graduada en 0.1 centímetro cúbico.

d) Pipetas de 1 cc. graduadas en 0.1 y 0.01 de centímetro cúbico.

e) Tubos de ensayo de 20 x 120 milímetros.

Reactivos.

1) Solución stock de Acetato de Cobre.- Se prepara disolviendo en el matríz aforado de 500 centímetros cúbicos, 200 miligramos

de Acetato de Cobre químicamente puro y llevando hasta la marca - con agua destilada; mejor bidestilada. Conservada esta solución Stock en el refrigerador es estable por tiempo indefinido; sin embargo es aconsejable cambiarla cada mes.

2) Solución reactivo de Acetato de Cobre.- Esta solución se prepara midiendo 2.5 centímetros cúbicos de solución Stock en un matríz volumétrico de 100 cc. y llevando hasta la marca con agua bidestilada. Esta solución se prepara en el momento de usarla.

Como la solución Stock, esta solución reactivo, guardada en el refrigerador se puede conservar un tiempo indefinido, pero es mejor usar soluciones reactivos frescos.

Técnica de la reacción método Standard

La prueba es muy sencilla; consiste en colocar en dos tubos de ensayo perfectamente limpios seis centímetros cúbicos de solución reactivo. Se agrega a uno de los tubos 0.1 de centímetro cúbico de suero fresco del paciente. Se agita ligeramente observando los resultados después de cinco minutos. El otro tubo nos sirve como testigo después de agregarle 0.1 centímetro cúbico de agua destilada; para controlar el buen estado de la solución Stock.

Si la reacción es negativa, el líquido permanece límpido o muestra una ligera opalescencia libre de flóculos. En los casos positivos aparece un enturbiamiento tanto más intenso según el grado de fuerza de la reacción, dándose el resultado por cruces (+, +, +, +, +, +, + + + +).

Cuando el tubo de la reacción se deja en reposo a la temperatura ambiente más o menos durante 18 horas; en los casos positivos intensos se observa una completa precipitación, siendo el líquido sobrenadante completamente claro. En las reacciones débilmente positivas la precipitación es ligera. El grado de precipitación a las 18 ó 24 horas puede ser reportada según su intensidad por cruces.

En el presente trabajo se efectuaron además de las lecturas de 5 minutos y 18 horas indicados en el trabajo original y en los casos positivos; observaciones a distintos tiempos, habiendo comprobado cómo la reacción se va intensificando hasta llegar a la completa precipitación, variando el tiempo en distintas reacciones desde los 15 minutos hasta las 24 horas, tiempo en que se daba por finalizada la observación.

La lectura visual de la reacción de resultados correctos; pero el enturbamiento puede medirse y expresarse en forma de unidades, dándose así determinaciones cuantitativas.

La curva que sirve para expresar los resultados del enturbamiento en forma de unidades arbitrarias se obtiene por comparación con soluciones turbias de Cloruro de Bario.

Preparación de las soluciones de turbidez de Cloruro de Bario.

Cloruro de Bario 0.0962 N.- Poner 1.175 grms. de cloruro de bario en un frasco volumétrico de 10 cc. Disolver en agua destilada. Diluir a la marca y mezclar.

Acido sulfúrico 0.2 N: Medir alrededor de 800 cc. de agua destilada en un frasco de 1.000 cc. Añadir 5.6 de ácido sulfúrico, diluir a la marca y mezclar. Enfriar antes de ser usado.

Transferir 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, cc. de la solución de Cloruro de Bario en frascos volumétricos de 100 cc. Diluir a la marca con la solución 0.2 N de ácido sulfúrico y mezclar.

Estos standards equivalen a unidades de turbidez de "Acetato de Cobre" de 3.7, 7.4, 14.8, 22.2, 29.6 y 37. Dichas unidades corresponden aproximadamente a las que obtienen MacLagan con la comparación visual en un comparador con los tubos gelatina-albúmina.

La unidad de turbidez del "Acetato de Cobre" es arbitraria como en la prueba de timol.

Las comparaciones que efectué con la escala de turbidez de cloruro de Bario fueron comparaciones visuales macroscópicas; pudiendo efectuarse en fotocolorímetro o espectofotómetro.

En niños y otros pacientes en los que es complicado obtener suficiente sangre para efectuar varias reacciones o para análisis repetidos se usa la prueba del Acetato de Cobre como "Ultramicrométodo".

Técnica del ultramicrométodo.

Colocar 0.60 cc. de la solución reactivo de Acetato de Cobre en un tubo de 13 x 100 mm. Añadir 0.01 cc. de suero fresco del paciente.

La lectura de los resultados se hace en forma idéntica a la reacción standard.

Como se observará por lo anteriormente descrito, la prueba es sencilla y económica.

Usando patrones de Cloruro de Bario y con el espectofotómetro Coleman Jr., los autores del método han encontrado en niños ci-

fras normales de 0 a 3.8. Para los adultos eran de 0 a 4.72.

Las pruebas de la función hepática en el diagnóstico diferencial de las enfermedades del hígado.

Al interpretar las pruebas de la función hepática hay que tener en cuenta que en muchas enfermedades existe hiperglobulinemia y puede estar interesado el hígado o no estarlo. Por consiguiente, un resultado positivo puede indicar enfermedad de este órgano [cirrosis], una enfermedad esencialmente no hepática (mielomatosis) o una con afección del hígado (lupus).

No obstante, para el diagnóstico diferencial de las hepatopatías es útil la regla general de que las lesiones graves de la célula hepática son casi siempre positivas la reacción de la cefalina-colesterina y otras relacionadas con ella. Por consiguiente, serán positivas en la cirrosis portal.

En la hepatitis aguda es positiva generalmente la de floculación por el timol, indicando actividad inflamatoria, es decir, afección del sistema reticulocelular, que elabora las globulinas beta y no degeneración de la célula hepática.

Hay varias enfermedades no hepáticas en las que están aumentadas las lipoproteínas del suero, por ejemplo la nefrosis, que puede dar reacción del timol positiva.

En la ictericia obstructiva, sobre todo si es de larga duración, hay un aumento tal de los lípidos en la sangre, con una función hepatocelular solo ligeramente alterada, que las reacciones del timol son fuertemente positivas y la cefalina-colesterina puede ser negativa.

Para propósitos clínicos la prueba del Acetato de Cobre es indiscutiblemente un método útil de determinar la función hepática. Por lo práctico, simple y elevado índice de sensibilidad la prueba del Acetato de Cobre se puede tomar como una prueba segura de laboratorio.

La prueba del Acetato de Cobre es útil en los casos de Hepatitis agudas virales siendo positiva en un 100% de los adultos y un 83.3% en niños. En los casos de Cirrosis hepática en niños ello se comporta como positiva en el 100% de los casos.

Es una prueba valiosa en el diagnóstico diferencial entre icterico debido a un daño hepatocelular o a una obstrucción hepática.

En los casos de Hepatitis agudas virales las reacciones de Hanger, MacLagan y Sellek-Frade muestran una similitud en los re-

sultados durante el período agudo de la enfermedad. El término medio de positividad es de 3 o 4 +; luego la prueba del Acetato de Cobre es la primera en hacerse negativa, siendo esto una favorable indicación. Resultados positivos prolongados indican degeneración hepática.

En los casos de Cirrosis hepática la prueba de Sellek-Frade es fuertemente positiva. Los varios grados de turbidez obtenidos a través de la enfermedad, sirven de guía para el pronóstico y curso de la misma.

En la prueba del Acetato de Cobre tiene un alto índice de especificidad en los casos de daño hepatocelular.

La presencia de íctero no impide la realización de la prueba de Sellek-Frade.

La prueba del Acetato de Cobre es muy útil para seguir el progreso y restauración de la integridad hepatocelular, siguiendo el daño hepático, donde esto sea posible.

APLICACIONES DE INVESTIGACION

A continuación se presentan reacciones verificadas en 337 personas divididas en tres grupos, así:

Primer Grupo: 187 sueros de personas tuberculosas comprobadas como casos avanzados, asiladas en el Hospital de Soyapango.

Segundo Grupo: 40 observaciones entresacadas de fichas de niños asilados en el Hospital "Benjamín Bloom", cuyos diagnósticos implican alteración funcional de la célula hepática.

Tercer Grupo: 110 sueros de personas asistentes al Laboratorio Central de la Dirección General de Sanidad para control serológico investigando sífilis.

A todos estos grupos se les verificó la reacción de Sellek-Frade y las reacciones de grupo, enturbiamiento del Timol y la de floculación de Hanger, según puede comprobarse en detalle en los cuadros adjuntos.

CUADRO NUMERO UNO

Análisis del cuadro No. 1 correspondiente al primer grupo compuesto de 187 pacientes tuberculosos avanzados.

<u>Reac. Sellek</u>	<u>Reac. del Timol</u>	<u>Reac. Hanger</u>	<u>Total</u>	<u>Porcentajes</u>
Negativos	Negativos	Negativos	14	7.5 %
Negativos	Negativos	Positivos	23	12.3 %
Negativos	Positivos	Negativos	2	1.1 %
Negativos	Positivos	Positivos	2	1.1 %
Positivos	Negativos	Negativos	6	3.2 %
Positivos	Negativos	Positivos	76	40.6 %
Positivos	Positivos	Negativos	3	1.6 %
Positivos	Positivos	Positivos	<u>61</u>	<u>32.6 %</u>
			<u>187</u>	<u>100.0</u>

Se pueden observar los siguientes resultados:

Concordancia total entre las tres reacciones, con resultados positivos o negativos..... 75 - 40.1 %

Concordancia parcial (entre dos reacciones). 104 - 55.6 %

Discordancia del Sellek con las otras dos reacciones..... 8 - 4.3 %

Resumiendo la concordancia total y la parcial se puede conceder a la reacción de Sellek-Frade una concordancia de 95.7% y una discordancia de solo 4.3 % lo que revela su alta sensibilidad.

Detalles:

La concordancia parcial Sellek-Timol alcanzó 101 reacciones con un porcentaje de 54%.

La concordancia parcial Sellek-Hanger fué de 153 reacciones o sea un porcentaje de 81.9.

Se notará en lo anterior que la concordancia se manifiesta con un porcentaje mayor entre las reacciones Sellek-Hanger - - (81.9 %) que entre las reacciones Sellek-Timol (54 %) y este resultado viene en apoyo del criterio de que la reacción de Hanger es más sensible y específica que la reacción de Timol (debido probablemente a las exigencias de pH y la inestabilidad de los reactivos usados en esta última reacción) aún cuando se ha preferido para esta reacción la lectura de 24 horas en vez de la lectura de 30 minutos, ya que la lectura de 24 horas parece más exacta según los siguientes resultados:

Reacción del Timol

<u>Lectura a 30 mnts.</u>	<u>Lectura de 24 horas</u>	<u>Total</u>	<u>Porcentaje</u>
Negativos	Negativos	117	62.6 %
Negativos	Positivos	45	24. %
Positivos	Positivos	25	13.4 %

Lo anterior revela que de no haberse verificado la lectura de 24 horas habrían pasado desapercibidas 45 reacciones positivas, clasificadas como negativas en la lectura de 30 minutos; lo cual instruye que la lectura de 24 horas en la reacción del Timol aumenta la seguridad de los resultados en las investigaciones clínico serológicas.

La lectura de este mismo cuadro (Número uno) sugiere que la tuberculosis en sí como infección, no influye en el resultado de las reacciones, ya que se nota que aún cuando todos los pacientes son tuberculosos comprobados, se han obtenido los resultados siguientes:

Reacciones de Sellek Negativos sobre 187	41
Reacciones de Timol Negativos sobre 187	119
Reacciones de Hanger Negativos sobre 187	25

Infiriéndose así que los casos positivos son debidos, no a la infección tuberculosa en sí misma, sino a su localización sobre el hígado, con el consiguiente disfuncionamiento de la célula hepática y que de los resultados negativos puede deducirse que dicha célula no ha sido dañada.

CUADRO NUMERO DOS

Análisis del cuadro número dos que corresponde al segundo grupo compuesto por 40 niños del Hospital "Benjamín Bloom"; con diagnóstico clínico de daño en la célula hepática 34 casos y sin daño hepático 6.

<u>Reacc. Sellek</u>	<u>Reacc. Timol</u>	<u>Reacc. Hanger</u>	<u>Total</u>
Negativo	Negativo	Negativo	1
Negativo	Negativo	Positivo	2
Negativo	Positivo	Negativo	0
Negativo	Positivo	Positivo	0
Positivo	Negativo	Negativo	1
Positivo	Negativo	Positivo	11
Positivo	Positivo	Negativo	0
Positivo	Positivo	Positivo	13
Positivo	No se hizo	Positivo	6

De la lectura resulta: concordancia total entre las tres - reacciones 14, concordancia parcial, 13 y concordancia, solo entre dos reacciones verificadas 6; o sean un total de 33 reacciones concordantes que representan el 97% de los casos presentados con diagnóstico de daño hepático. Un caso fué discordante que representa solo un 3 % de discordancia.

Detalle:

Concordancia Sellek-Timol alcanza a 16 (47%)

Concordancia Sellek-Hanger 31 (91%)

La mayor concordancia del Sellek-Hanger queda explicada por las mismas razones que las dadas a propósito del cuadro número uno.

En los seis casos restantes en los que el diagnóstico clínico no revela probable daño hepático el resultado fué el siguiente:

<u>Reacc. Sellek</u>	<u>Reac. Timol</u>	<u>Reacc. Hanger</u>	<u>Total</u>
Negativo	Negativo	Negativo	2
Negativo	Negativo	Positivo	1
Negativo	Positivo	Positivo	2
Positivo	Negativo	Positivo	1

En este pequeño cuadro llama la atención que la reacción de Sellek se manifiesta negativo en 5 de los 6 casos presentados, cuyos diagnósticos no prevén daño hepático.

La concordancia total y parcial fué en 4 casos y la discordancia en dos. Por lo pequeño del número de casos no se cree conveniente establecer porcentajes.

CUADRO NUMERO TRES

Análisis del cuadro número tres relativo a 110 pacientes asistentes al Laboratorio Central de la Dirección General de Sanidad para exámen serológico investigando infección sifilítica.

En este grupo no se supone ni se espera lesión hepática alguna, sino de manera eventual.

Los resultados fueron los siguientes:

<u>Infec. Luética</u>	<u>Reac. Sellek</u>	<u>Reac. Timol</u>	<u>Reac. Hanger</u>	<u>Total</u>	<u>Porcent.</u>
Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	34	30.9%
Posit. Débil	Negativo	Negativo	Negativo	27	24.6%
Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	24	21.8%
Posit. Fuerte	Negativo	Negativo	Negativo	13	11.8%
Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	5	4.6%
Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	4	3.6%
Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	1	0.9%
Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	1	0.9%
Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	1	0.9%
				<u>110</u>	<u>100.0%</u>

De la lectura de este cuadro se saca la siguiente observación: Que la infección sifilítica con resultados serológicos positivos en las reacciones de Sellek, Timol y Hanger como se observa en el conjunto de 64 reacciones positivas a sífilis, se encuentran las reacciones de Sellek, Timol y Hanger completamente negativas y en cambio en cinco reacciones negativas a sífilis fueron positivas las tres reacciones en estudio junto con cuatro casos positivos a sífilis; lo cual hace pensar que en estas personas sí habían lesiones de la célula hepática.

En tres reacciones restantes los resultados fueron irregulares y no permiten conclusión alguna.

En resumen, en este grupo, 98 casos fueron totalmente negativos a la lesión hepática como era de esperarse, constituyendo un porcentaje de negatividad de 89.9 % es decir más o menos 90%; constituyendo los 12 casos restantes un 8.2% de positividad y 2.7 % de resultados irregulares, lo cual revela un alto índice de confianza en estas tres reacciones en estudio.

La reacción de Sellek presentó un grado de negatividad de 99 casos sobre 110 casos presentados lo que corresponde a un 90%, casos que como se hace énfasis en las líneas anteriores no había base alguna para esperar lesiones de la célula hepática, lo que revela especificidad y sensibilidad de la reacción de Sellek-Frade.

C O N C L U S I O N E S

- 1.- Se presenta una nueva reacción de floculación para la investigación del disfuncionamiento de la célula hepática como una contribución de la Facultad de Ciencias Químicas, en su sección de la Escuela de Química Biológica.
- 2.- Se compara esta reacción con las usadas corrientemente para este fin; la de floculación de Hanger y la de enturbiamiento del Timol.
- 3.- De esta comparación se concluye que la reacción presentada, llamada de Sellek-Frade es una reacción sensible, de técnica más sencilla, más barata y cuyos reactivos son más estables, pudiendo usarse por un tiempo muchísimo más largo que el de los otros usados en las reacciones de Hanger y Timol.
- 4.- Esta reacción puede usarse con cantidades escasas de suero sanguíneo en su modalidad llamada micrométodo o microreacción.
- 5.- Se presentan los resultados obtenidos en numerosos casos clínicos que se detallan en los cuadros correspondientes; agregando observaciones obtenidas por ensayos llevados en el Hospital de niños "Benjamín Bloom" en casos de alteración de la glándula hepática según técnica suministrada por el sustentante.
- 6.- Según las observaciones detalladas en los cuadros correspondientes, la reacción de Sellek-Frade no es influenciada por enfermedades tales como la tuberculosis, sífilis y otras, quedando como reacción de alta sensibilidad y especificidad en casos de daño de la célula hepática.

CERTIFICACIONES.

El Infrascrito Director del Hospital de Soyapango, CERTIFICA: Que las Reacciones presentadas en el trabajo de Tesis, por el Br. José Alfredo Molina, comprendidas de los números del 1 al 184, han sido verificadas en pacientes de este Hospital.

Y para los usos que convengan al interesado, le extiende la presente en Soyapango, a los diez y ocho días del mes de Diciembre de mil novecientos cincuenta y nueve.

(f) Dr. Armando Rivera Villacorta,
Director

oooooooooooooooo

El Infrascrito Director del Hospital "Benjamín Bloom" CERTIFICA: que las anteriores observaciones, están de acuerdo con los originales llevados en el archivo de este Hospital, correspondientes a las fichas clínicas de cada paciente anotado en los cuadros anteriores.

San Salvador Marzo 9 de 1960.

(f) Dr. Santiago Hernández A.

oooooooooooooooo

El Infrascrito, Director de la División de Laboratorios de la Dirección General de Sanidad, CERTIFICA: que del 26 de junio de 1959 al 26 de agosto del mismo año, le fueron entregados al Br. José Alfredo Molina, 110 muestras de sueros sanguíneos humanos de los que habían sido usados en la sección de Serología.

Y para los usos que convengan al interesado se extiende la presente a los diez y nueve días del mes de marzo de mil novecientos sesenta.

(f) Dr. Roberto Arévalo,
Director División de Laboratorios.

B I B L I O G R A F I A

- 1.- *Revista de la Confederación Médica Panamericana, Noviembre 1958.- Volumen V.- Número 11.*
- 2.- *BIOQUIMICA.- Santiago Pt Suñer.*
- 3.- *Compendio de Química Fisiológica. Harold A. Harper.*
- 4.- *Clinical Biochemistry.- Cantarow and Trumper.*
- 5.- *Curso de Química Biológica.- V. Deulofeu y A. D. Marenzi.*
- 6.- *Chimie Biologique Medicale.- J. Ville et. E. Derrien.*
- 7.- *Métodos de Laboratorio Clínico. Kolmer y Boerner.*
- 8.- *Clinical Laboratory Methods and Diagnosis.- Gradwohl.*
- 9.- *Diagnósticos Clínicos por los análisis de Laboratorio.- Kolmer.*
- 10.- *Clinical Laboratory Methods.- By W. E. Bray.*
- 11.- *Farmacia Práctica de Remington. E. F. Cook y E. W. Martin.*
- 12.- *Progreso de Patología y Clínica. Vol. VI. Año 1959.*
- 13.- *Curso General de Química. Ignacio Puig.*

- 21.- Rodríguez Molina A., *Medicina y conservación ambiental.*
Anales Médicos del I.S.S.S. Vol. 3 Agosto. 1971
- 22.- Kochar A. S. *El Sol, aliado de la India, Pág. 10-17*
Salud Mundial, Agosto-Septiembre. 1971
- 23.+ Izmerou N. F. *Una profesión indispensable. Pág. 18-21.*
Salud Mundial. Agosto-Septiembre. 1971
- 24.- Aaron Sternfield. *El ABC de la contaminación. Pág. 26-32*
Salud Mundial. Agosto-Septiembre. 1971
- 25.- Moerloose de J. *Una Legislación Internacional, arma indispensable, Pág. 32-37*
Salud Mundial. Agosto-Septiembre. 1971