

1989 - 2

Cód. No. 082323767

Universidad de Guadalajara

Facultad de Ciencias



Quantificación y Caracterización de Glucosaminoglucanos
Urinarios, en Pacientes con Osteocondrodismplasias.

Tesis Profesional

Que Para obtener el Título de:

Licenciado en Biología

Presenta:

Martha Patricia Gallegos Arreola

Guadalajara, Jalisco. 1990.

Este trabajo se realizó, en el Laboratorio de Bioquímica III, División de Genética, de la Unidad de Investigación Biomédica de Occidente; IMSS. Bajo la asesoría del DR. JOSE SANCHEZ CORONA y la dirección del BIOL. GUILLERMO M. ZUÑIGA GONZALEZ, profesor de la Facultad de Ciencias.

Dedicatorias

A mis Padres y Hermanos:

Por el cariño y apoyo
recibidos desde siempre

Biol. Guillermo Zúñiga:

Por su dedicación, paciencia e interés incondicionales ofrecidos durante este tiempo, le doy toda mi gratitud y cariño.

Dr. José Sánchez:

Con eterna gratitud quién, me dedicó su tiempo, sabiduría y valor humano, para la realización de este trabajo.

Ofelia:

Le doy mi más sincero agradecimiento
por haberme ofrecido su paciencia
y sabios consejos.

A todas aquellas personas que
colaboraron directa o indirectamente
en la realización de este proyecto,
les doy mi más sincero agradeci-
miento.

I N D I C E

	Pág.
1.- INTRODUCCION.....	7
2.- ANTECEDENTES.....	22
3.- OBJETIVOS.....	32
4.- HIPOTESIS.....	34
5.- MATERIAL Y METODOS.....	36
6.- RESULTADOS.....	47
7.- DISCUSION.....	56
8.- CONCLUSIONES.....	60
9.- BIBLIOGRAFIA.....	63

Desde el punto de vista embrionario, el Tejido Conectivo se origina del mesodermo, constituido por mesénquima. Este tejido incluye Cartilago, Hueso y Sangre, formado por dos tipos de sustancias fundamentales, la amorfa y la fibrosa. Los materiales amorfos del tejido conectivo están formados principalmente por Glucosaminoglucanos (GAGs), polímeros de azúcar y ácido hexurónico cuyos azúcares son aminados, una de sus funciones es la de facilitar la difusión de metabolitos entre la sangre y los tejidos, al mismo tiempo sirve como barrera física para evitar la diseminación de grandes partículas como bacterias y otros microorganismos, y en menor cantidad por glucoproteínas. La mayor parte de los GAGs que antes se llamaron mucopolisacáridos ácidos (1, 2, 3), están unidos por enlaces covalentes a proteínas denominadas proteoglucanos (4, 5).

El Hueso y Cartilago son tejidos conectivos especializados. Como todos los tejidos conectivos, están formados por tres elementos; células, fibras y sustancias fundamental; las dos últimas constituyen la sustancia o matriz intercelular. El cartilago es una forma de tejido conectivo muy elástico, que proporciona fuerza y sostén en áreas del cuerpo que requieren diferente grado de flexibilidad. Las células del cartilago se denominan condrocitos; estos dan origen a las fibras y a la sustancia fundamental formada principalmente por proteoglucanos, ricos en condroitínsulfato que, junto con el agua se combinan para formar un gel amorfo e hidratado denominado matriz. (1, 2, 3) (Figura 1).

El hueso es una forma rígida de tejido conectivo, que constituye la mayor parte del esqueleto de los vertebrados superiores; se encuentra formado por un componente orgánico que a su vez está constituido por sustancia fundamental amorfa, la cual contiene fibras de osteocolágena, unidas por GAGs, y un componente inorgánico de sales minerales. (1, 2, 3).

Los GAGs son polímeros lineales formados por unidades repetidas de dímeros, compuestos por aminoazúcar y ácido urónico. El aminoazúcar puede ser N-acetil- β -D-glucosamina y N-acetil- β -D-galactosamina. Pueden estar acetilados o sulfatados. El ácido urónico puede ser ácido β -D-glucurónico y α -L-idurónico. (6, 7, 8, 9, 10) (figura 2).

Existen 7 tipos de GAGs dependiendo de la secuencia del aminoazúcar y el ácido urónico, denominados: Heparán (H) Heparán Sulfato (HS), Dermatan Sulfato (DS), Keratán Sulfato (KS), Condroitin-6-Sulfato (Ch-6-S), Condroitin-4-Sulfato (Ch-4-S), y ácido hialurónico (AH). Todos excepto el AH contienen azúcares sulfatados y el KS es el único en el que el ácido urónico es reemplazado por la galactosa. (6, 7, 8, 9, 11, 12) (figura 3) (tabla 1).

Los GAGs son moléculas polianiónicas, dado que contienen grupos sulfato o carboxilo de los ácidos urónicos, presentes a lo largo de su estructura. Muchas de sus funciones surgen de esta característica en particular. (12), se encuentran unidos covalentemente a una proteína central, formando un agregado macromolecular llamado proteoglucano. (13) (figura 4). Los

Proteoglicanos son sustancias de elevado peso molecular, organizadas por una cadena central de ácido hialurónico, a partir de ésta parten moléculas de proteínas, que sirven a su vez de punto de anclaje de numerosas cadenas de polisacáridos que son semejantes en su estructura. Se encuentran agregados en la matriz extracelular del cartilago, formando parte importante para prevenir su calcificación, otra de sus funciones es dar resistencia al cartilago debido a la habilidad de absorber grandes cantidades de agua, permitiendo la estabilidad y soporte de fibras y elementos celulares de los tejidos. También contribuyen al mantenimiento de agua y balance de sal en el cuerpo. (7, 12, 15, 16) (figura 5).

Los GAGs son sintetizados por fibroblastos, células del músculo liso, células cebadas, condrocitos y mastocitos. (12, 14, 17, 18).

En la síntesis de GAGs se elabora en primer lugar el núcleo de proteína de una manera convencional y que luego se añaden las cadenas de carbohidratos, un azúcar cada vez, empezando por xilosa que se fija a la serina. La sulfatación se produce después que el azúcar adecuado se enlaza en la cadena de crecimiento. Los azúcares y el sulfato proceden de precursores activados: nucleótidos, azúcar y fosfoadenosina 5' -fosfosulfato, respectivamente. El alargamiento y la sulfatación se realiza en el retículo endoplásmico rugoso a medida de que la proteína progresa desde los polisomas, donde es sintetizada, hacia el exterior de la célula. La incorporación de azúcar y el sulfato es inhibida por compuestos que inhiben la síntesis protéica, como la

puromicina y la cicloheximida, esto indica que las cadenas laterales no son sintetizadas independientemente del núcleo de la proteína. (19).

La degradación de los GAGs ocurre principalmente en el lisosoma de la célula, que contiene más de 40 hidrolasas ácidas diferentes. Las moléculas enteras de proteoglucanos pueden ser tomadas por adsorción en endocitosis y ser degradadas, las proteasas pueden liberar moléculas de GAGs de la proteína central, y los GAGs poliméricos pueden ser degradados por una serie de enzimas que incluyen endoglucosidasas, sulfatasas y exoglucosidasas. (10, 12, 15, 19) (figura 6).

Los GAGs al no ser degradados se acumulan en diferentes tejidos, dependiendo del bloqueo enzimático, ocasionando lesiones óseas, (alteraciones fenotípicas conocidas como disostosis múltiple). Alteraciones en piel, pelo y limitando la función de las articulaciones. También son excretadas en orina como consecuencia de su acumulación. (7).

En 1979, Cappelletti utilizó un método de separación completa de todos los GAGs conocidos en animales de diferente especie: Teniendo el siguiente orden (mayor a menor) de movilidad electroforética: KS, Ch-6-S, Ch-4-S, HS y DS. (21). Gold en 1979 describe que los niveles de concentración de GAGs urinarios en individuos normales es de 0.105 ± 0.035 mg/ml. (20).

El volumen de producción de GAGs en un individuo normal se puede estimar indirectamente mediante la cantidad de ácido urónico que pasa por el ciclo del ácido glucurónico del hígado al

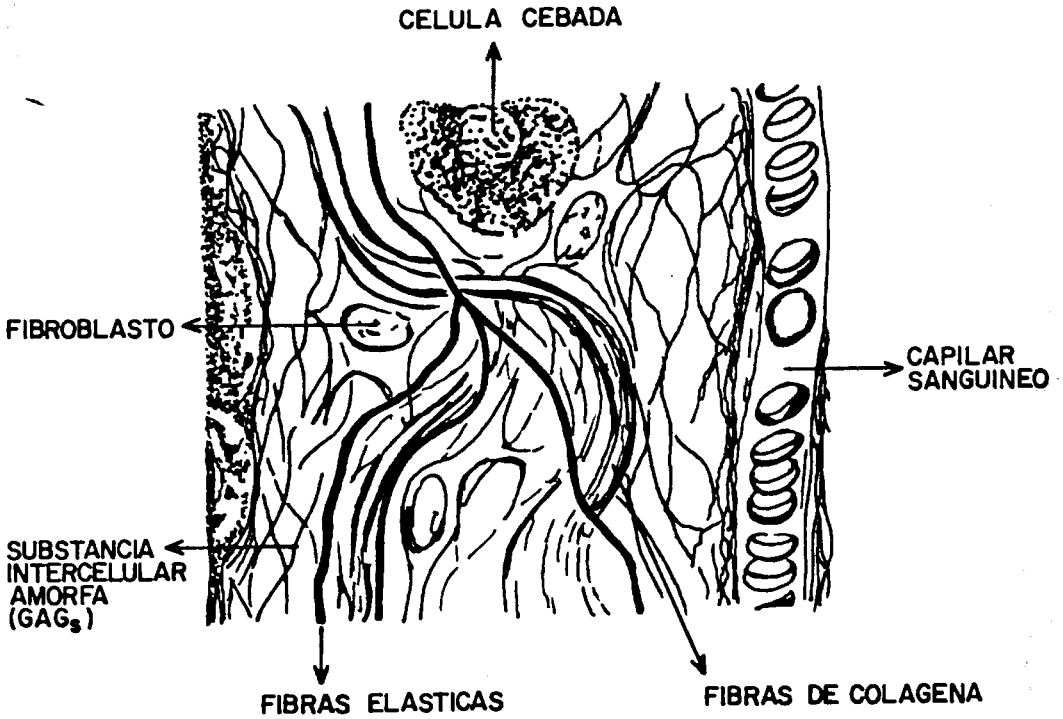
riñón. Esta vía metabólica probablemente tiene como función principal la recuperación de los ácidos glucurónicos e idurónicos procedentes de la degradación de los GAGs y la devolución de sus esqueletos de carbono al depósito metabólico general. (19).

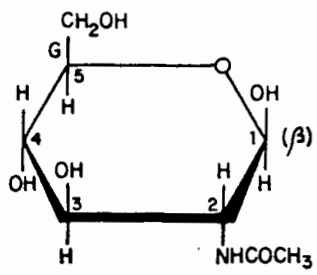
Las principales dificultades para la identificación de los GAGs urinarios, están dadas por la marcada polidispersidad de cada uno de los tipos de GAGs, con respecto a la carga y al tamaño molecular. Los métodos disponibles en el laboratorio para la cuantificación y caracterización de GAGs urinarios son: a) Las pruebas de tamizaje utilizadas para detectar los GAGs urinarios (cloro-cetil-piridinium y albúmina ácida), que en ocasiones dan resultados falsos-positivos o falsos-negativos. Por ello es conveniente aplicar, b) los métodos cuantitativos que demuestren el incremento de GAGs urinarios, c) Los métodos electroforéticos que permiten la identificación de GAGs urinarios, basándose en la movilidad electroforética. No obstante su uso requiere determinadas condiciones especiales, lo cual significa que pocos laboratorios cuentan con esta metodología. (15).

TABLA 1.- COMPOSICION Y DISTRIBUCION DE GLUCOSAMINOGLUCANOS

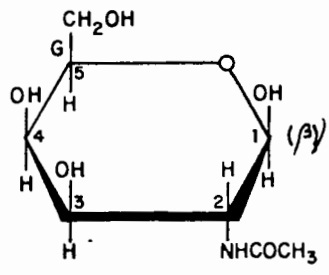
NOMBRE	SINONIMO	AMINOAZUCAR	AC. URONICO	LOCALIZACION
Acido hialurónico		N-acetil glucosamina	D-ácido glucurónico	hueso vítreo líquido sinovial cordón umbilical piel
Condroitín-4-sulfato	condroitín sulfato A	N-acetil galactosamina	D-ácido glucurónico	cartilago hueso aorta
Condroitín-6-sulfato	condroitín sulfato C	N-acetil galactosamina	D-ácido glucurónico	cartilago válvula del corazón sangre
Dermatán sulfato	condroitín sulfato B	N-acetil galactosamina	L-ácido idurónico	piel válvula del corazón pulmón tendón
Keratén sulfato	I kerato sulfato	N-acetil glucosamina	galactosa	córnea
		N-acetil glucosamina N-acetil glucosamina		cartilago
	II	N-acetil galactosamina	galactosa	núcleos pulposos
Heparán sulfato	Heparán monosulfato	N-acetil glucosamina	D-ácido glucorónico L-ácido idurónico	aorta hígado pulmón
Heparán		N-acetil glucosamina	D-ácido glucorónico L-ácido idurónico	hígado mastocitos

FIGURA 1

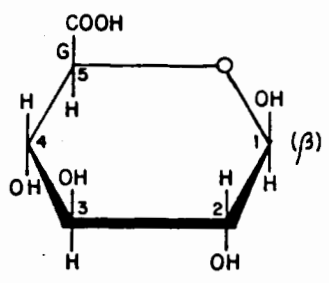




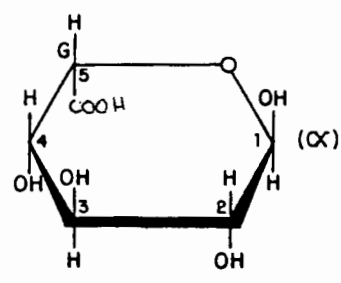
N-ACETIL- β -D-GLUCOSAMINA



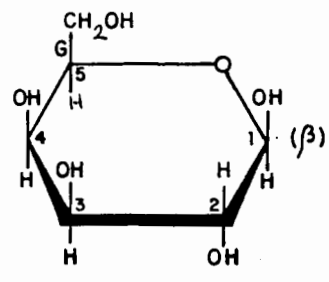
N-ACETIL- β -D-GALACTOSAMINA



β -D-ACIDO GLUCORONICO



α -L-ACIDO IDURONICO



β -D-GALACTOSA

FIGURA 3
GLUCOSAMINOGLUCANOS

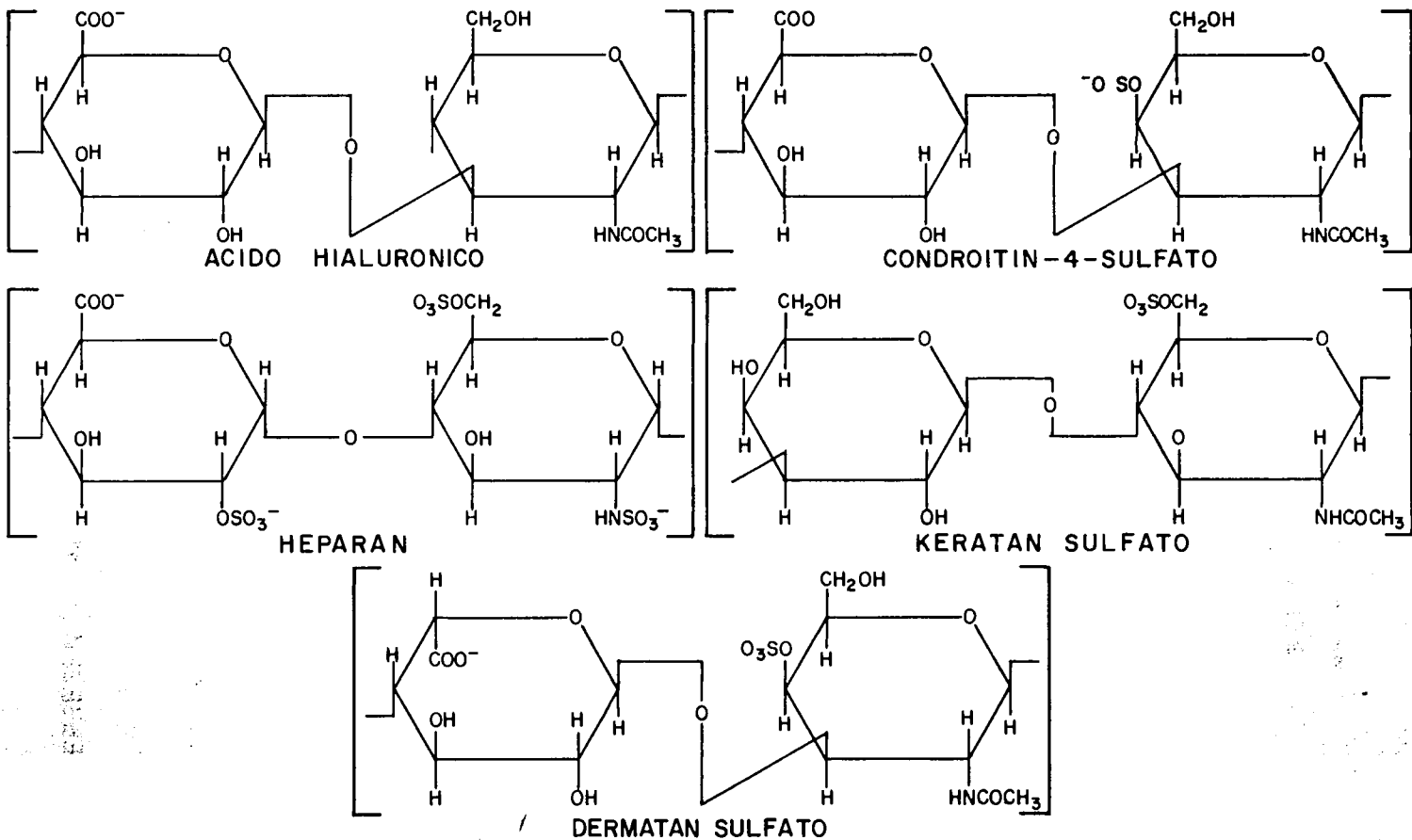


FIGURA 4

REPRESENTACION ESQUEMATICA DE LA RELACION ENTRE LAS PROTEINAS Y POLISACARIDOS

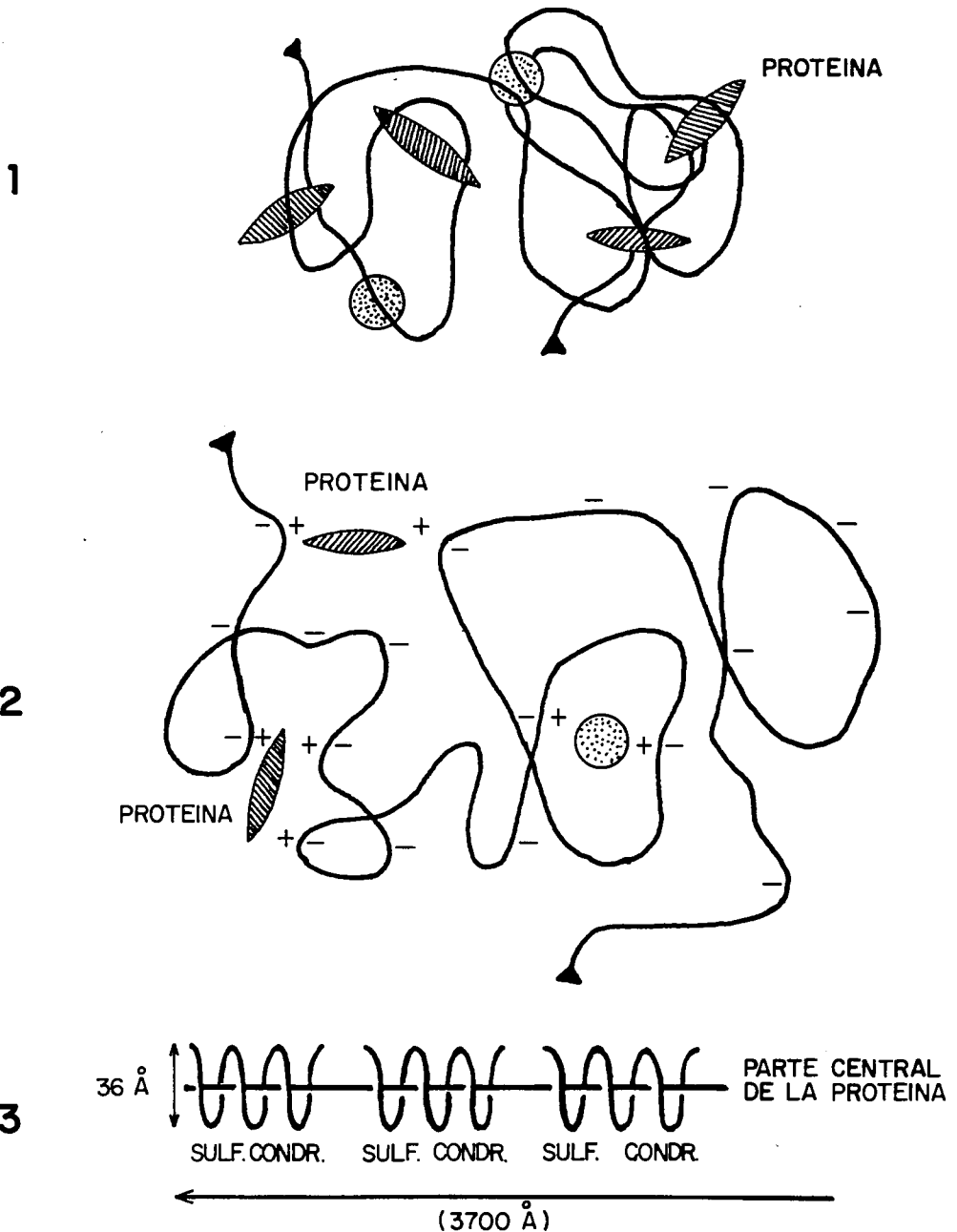
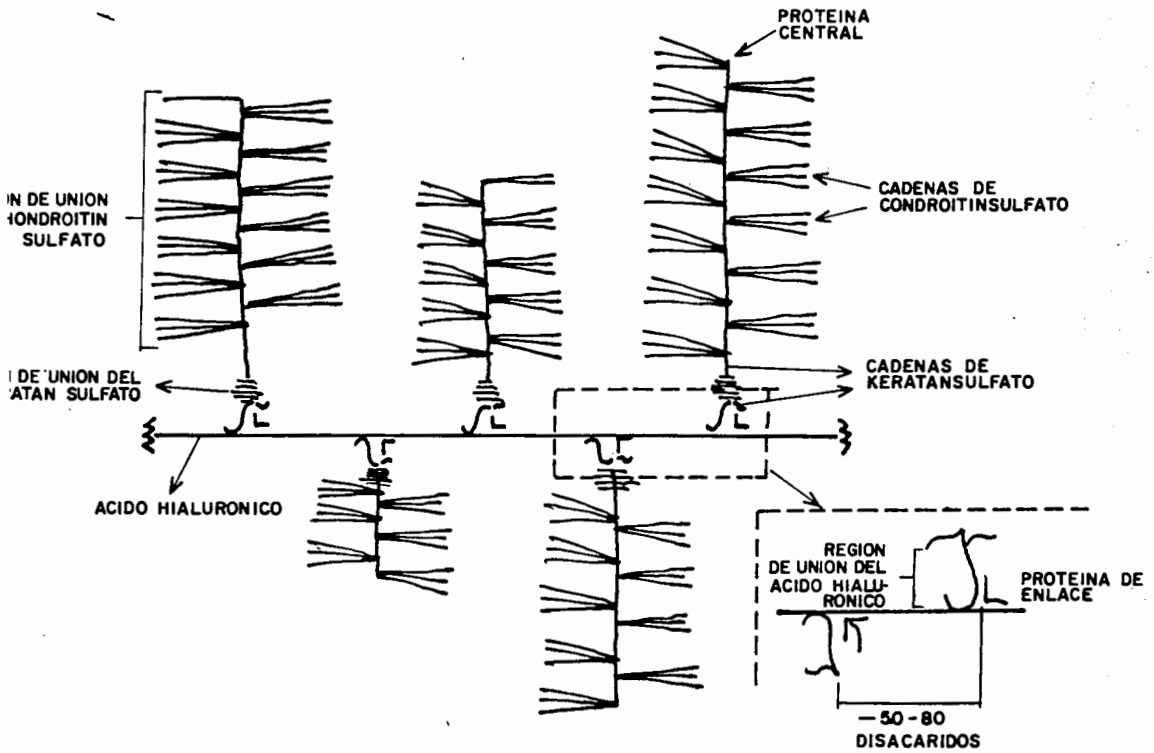
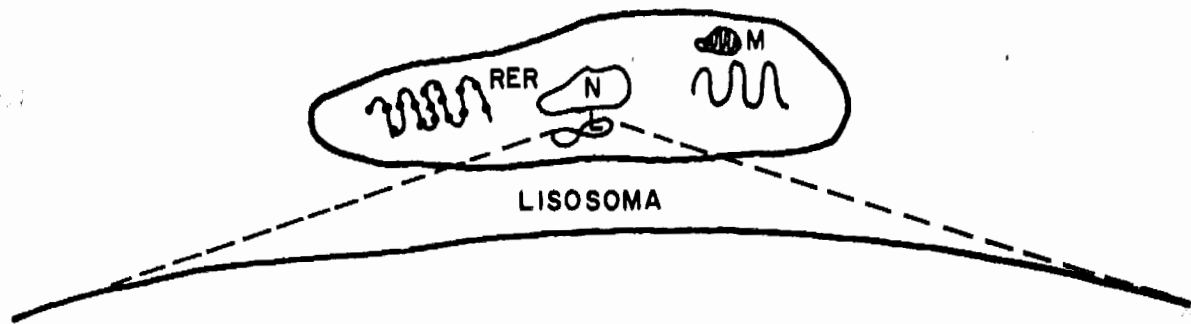


FIGURA 5

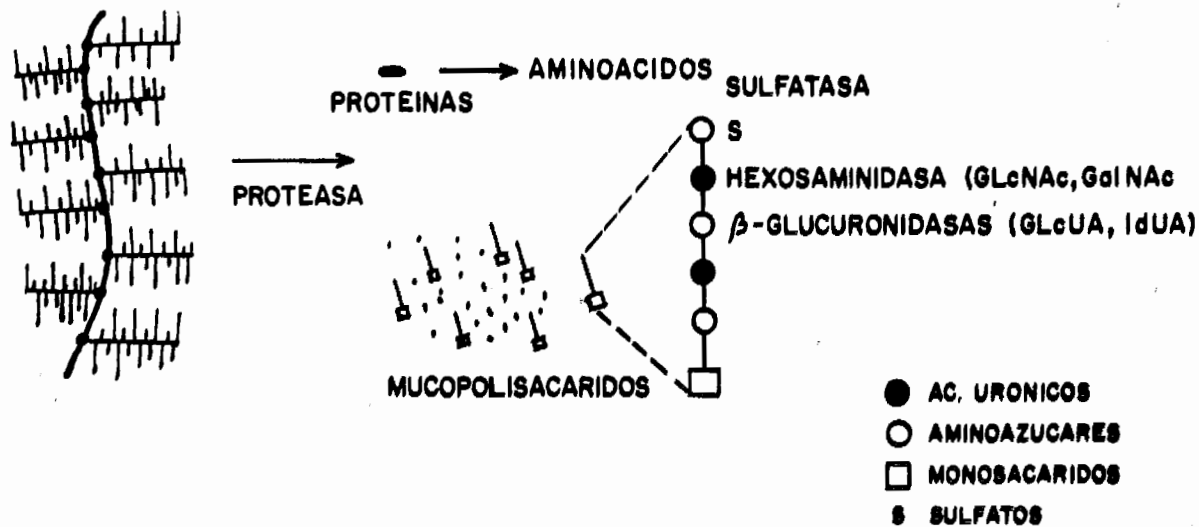
REPRESENTACION ESQUEMATICA DE LA CONFORMACION DEL PROTEOGLUCANO



DEGRADACION DE MUCOPOLISACARIDOS



19



ELECTROFORESIS

Muchas moléculas biológicas, poseen grupos ionizables que en disolución, poseen cargas eléctricas, como cationes (+) o como aniones (-), cuando se someten a un campo eléctrico se produce un desplazamiento de cargas, los cationes emigran hacia el cátodo (-) y los aniones hacia el ánodo (+), las moléculas con cargas similares poseerán distinta relación carga/masa, debido a sus diferencias en el peso molecular. En conjunto estas diferencias constituyen base suficiente para una migración diferencial. (33).

La velocidad de migración depende del equilibrio sobre la fuerza impulsora del campo eléctrico sobre los iones cargados de la muestra y la fuerza de retardo entre las moléculas migrantes y el medio circundante, y que son principalmente de fricción y electrostática (33).

Existen factores que afectan la velocidad de migración de los compuestos, los cuales dependen de:

- a) Tipo de carga, tamaño y forma de la muestra.
- b) La corriente o voltaje aplicado.
- c) El pH del buffer o amortiguador.
- d) La temperatura del sistema.
- e) El medio de soporte. (33).

El material de la muestra debe estar disuelto en solución buffer para que tenga efecto la electroforesis, esta solución no debe reaccionar con las moléculas que se estudian, el medio de soporte también tiene que estar saturado con la solución para conducir la corriente. La corriente entre los electrodos es conducida tanto por la muestra como por los iones de la solución buffer, mientras que la corriente, en el resto del circuito, es

conducida por electrones. La corriente se mantiene por todo el circuito, al tener lugar la electrólisis en los electrodos, los cuales están sumergidos en recipientes con solución buffer. (33).

Se suspende el campo eléctrico antes de que los iones de la mezcla-muestra, alcancen a los electrodos, los componentes de la muestra se separan según su movilidad electroforética.

Por tanto la electroforesis, es una forma incompleta de electrólisis. (33).

Durante la electroforesis se produce el calor y la resistencia decrece cuando la temperatura aumenta. En consecuencia, si el voltaje permanece constante, este calentamiento producirá un aumento de corriente y un incremento de evaporación del disolvente del medio de soporte. La evaporación se reduce a un mínimo encerrado el aparato bajo una tapa hermética. En la electroforesis de alto voltaje (mayores de 200 V), se utiliza un sistema de refrigeración adicional incorporado al aparato.(33).

Existen distintos tipos de medios de soporte tales como: Papel, acetato de celulosa, capa fina de sílice, geles de almidón poliacrilamida y agar, entre otros. (33).

Las sustancias al migrar forman zonas distintivas que se pueden detectar fácilmente mediante técnicas analíticas adecuadas (tinción). (33).

La versatilidad de la electroforesis para la separación de sustancias con carga eléctrica, depende en gran parte de que se lleve a cabo sobre un medio de soporte inerte y relativamente homogéneo. (33).

A N T E C E D E N T E S .

A diferencia de las alteraciones óseas producidas por el trastorno metabólico de GAGs, existe un apartado dentro de la patología genética, concerniente a una anomalía en la estructura o desarrollo óseo, considerado bajo el rubro de osteocondrodisplasias, en la que no ha sido posible en la mayoría de los casos demostrar un trastorno metabólico.

Existen parámetros o características que permiten sospechar de una osteocondrodisplasia, las cuales son:

I.- Exploración Física:

1) Talla baja

a.- Proporcionada

b.- Desproporcionada

2) Alteraciones en columna (hiperlordosis-Xifosis)

3) Alteraciones en articulaciones (aumento de volumen de metáfisis-epífisis).

II.- Características radiológicas.

1) Trastornos en la modelación o arquitectura ósea.

(22, 23, 24).

Gruneberg hizo una revisión de las alteraciones esqueléticas hereditarias, en animales (ratones principalmente), siendo algunas similares a las del hombre. (19).

Rubín clasificó las displasias hereditarias generalizadas del esqueleto, según cual fuera el principal lugar sede de la anomalía (epifisis-diáfisis). (19).

Grebe reconoció la heterogeneidad en el amplio grupo de displasias esqueléticas y dividió los casos. El primer grupo lo forman casos clásicos de acondrodisplasias, y el último caracterizado por cabeza y facies normales. (19).

En 1969 se reunió en París un Consejo de Radiología Pediátrica, para examinar la terminología de los trastornos esqueléticos, formando la nomenclatura de París, en la cual se hizo una mayor división entre osteocondrodisplasias (anomalía del crecimiento y desarrollo del cartilago y hueso) y disostosis (malformación del hueso). (19, 25).

Clasificación.

Nomenclatura Internacional de París para las alteraciones constitucionales del hueso OSTEOCONDRODISPLASIAS

1. Defectos del crecimiento de huesos largos y la espina.
 - A. Manifestaciones en el nacimiento.
 1. Acondrogénesis tipo I (Parenti-Fraccaro)
 2. Acondrogénesis tipo II (Langer-Saldino)
 3. Displasia Tanatofórica.
 4. Displasia Tanatofórica con esqueleto en forma de hoja de trébol.
 5. Síndrome tipo I costilla corta-polidactilia (Saldino Noonan) (quizás formas severas).

6. Síndrome tipo II costilla corta-polidactilia (Majewski)
7. Condrodisplasia Punteada
 - a. Tipo Rizomelica.
 - b. Tipo Dominante.
 - c. Otros tipos.
 - d. Excluye Stippling en otros desordenes.(Síndrome Zellweger, Embriopatía por Warfarina y otros).
8. Displasias camptomelicas.
9. Otras displasias inclinadas a huesos largos.
10. Acondroplasia.
11. Displasia diastrófica.
12. Displasia metatrófica (formas severas)
13. Displasia condroectodérmica (Ellis-van Creveld)
14. Displasia torácica asfixiante (Jeune).
15. Displasia espondiloepifisaria congénita.
(Spranger Wiedemann)
16. Otras displasias espondiloepifisarias reconocidas al nacimiento.
17. Displasia Kniest.
18. Displasia Mesomélica.
 - a. Tipo Nievergelt
 - b. Tipo Langer C
 - c. Tipo Robinow
 - d. Tipo Rheinard
19. Displasia acondromesomelica.
20. Displasia cleidocraneal.
21. Síndrome Larsen.

22. Síndrome oro-palato-digital.

B. Manifestaciones Posteriores.

1. Hipocondroplasia.
2. Discondroteosis.
3. Condrodiasplasia metafisaria (Tipo Jansen).
4. Condrodiasplasia metafisaria (Tipo Schmid)
5. Condrodiasplasia metafisaria (Tipo McKusick)
6. Condrodiasplasia metafisaria con insuficiencia exocrina pancreática y neuropenia cíclica.
7. Displasia espondilometáfisaria.
 - a. Tipo Kozłowski.
 - b. Otros tipos.
8. Displasia epifisaria múltiple.
 - a. Tipo Fairbank.
 - b. Otros tipos.
9. Artrooftalmopatía (Stickler)
10. Pseudocondroplasia
 - a. Dominante
 - b. Recesiva.
11. Displasia espondiloepifisaria tardía
12. Otros tipos
13. Displasia espondiloepifisaria, tipos severos .
14. Displasia Dyggve-Melchior-Clausen.
15. Displasia Miotónica (Catel-Schwartz Jampel)
16. Displasia parastremática.
17. Displasia Tricorínofalángico.
18. Acondroplasia con retinitis pigmentosa y neuropatía (Saldino-Mainzer).

2. Desarrollo desorganizado del cartilago y componentes fibrosos del esqueleto.

1. Displasia epifisaria hemimélica.
2. Exostosis cartilaginosas múltiples.
3. Acendrodisplasia con exostosis (Gedion-Langer)
4. Encondromatosis (Ollier)
5. Encondromatosis con hemangioma (Maffucci)
6. Metacondromatosis.
7. Displasia fibrosa (Jaffe-Lichtenstein)
8. Displasia fibrosa con pigmentación en piel.
y pubertad precoz (McCunc-Albright).
9. Querubismo.
10. Neurofibromatosis.

1. Anormalidades de densidad, de estructura diafisaria cortical y/o modelo metafisario.

1. Osteogénesis imperfecta congénita (Vrollk, Parak-Durante)
2. Osteogénesis imperfecta tardía (Lostein)
3. Osteoporosis juvenil idiopática.
4. Osteoporosis conpseudoglioma.
5. Osteoporosis con manifestaciones precoces.
6. Osteoporosis con manifestaciones tardias.
(formas severas)
7. Picnodisostosis.
8. Osteopoiquilosis.
9. Melorreostosis.
10. Displasia diafisaria (Camurati-Engelmann)
11. Displasia Craneodiafisaria.

12. Hiperostosis endóctica.
 - a. Autosómica Dominante (Worth)
 - b. Autosómica Recesiva (Van Buchem)
13. Stenosis tubular (Kenny-Caffey)
14. Paquidermoperiostosis.
15. Osteodisplastia (Melnick-Needles)
16. Displasia frontometafisaria
17. Displasia craneometafisaria. (formas severas)
18. Displasia Metafisaria.
19. Esclerosteosis.
20. Disosteosclerosis.
21. Osteoectasia con hiperfosfatasa.

DISOSTOSIS

Enfermedades constitucionales óseas de patogenia desconocida.

- I. Disostosis con participación craneal.
 1. Craneosinostosis (formas severas)
 2. Disostosis craneofacial (Crouzon)
 3. Sindactilia acrocefálica (Apert)
 4. Polisindactilia acrocefálica (Carpenter) y otras.
 5. Disostosis mandíbulo-facial.
 - a. Treacher-Collins-Franceschetti-Klein.
 - b. otros.
 6. Síndrome oculomandibulofacial (Hallerman-Streiff-Français)
 7. Síndrome del carcinoma névico de células basales.
- II. Disostosis con participación predominantemente axial.
 1. Defectos vertebrales segmentarios.
 2. Síndrome oculocervicoacústico (Wildervanck)

3. Deformidad de Sprengel.
4. Disostosis espondilocostal.
 - a) Dominante
 - b) Recesiva.
5. Síndrome oculovertebral (Weyers)
6. Osteo-onicodisostosis.
7. Síndrome cerebro costo mandibular.

III. Disostosis con participación predominante de las extremidades.

1. Aquiria.
2. Apodia.
3. Síndrome ectrodactilia.
4. Síndrome aglosia adactilia.
5. Incurvacion congénita de huesos largos (tipos severos)
6. Sinostosis radiocubital.
7. Braquidactilia (tipos severos)
8. Sinfalangismo.
9. Polidactilia (tipos severos)
10. Sindactilia (formas severas)
11. Polisindactilia (formas severas)
12. Camptodactilia.
13. Síndrome Poland.
14. Síndrome Rubinstein-Taybi
15. Síndrome pancitopenia-dismelia (Fanconi)
16. Síndrome aplasia trombocitopenia radial.

17. Síndrome orodigital facial.
 - a. Tipo Papillon-Letebvre.
 - b. Tipo Mohr.
18. Síndrome cardiomelico (Holt-Oram y otros)
19. Síndrome facial-femoral.
20. Sinostosis Múltiple (incluye algunas formas de simfalangismo)
21. Disostosis escapulo-iliaca (Kosenow-Sinios)
22. Síndrome mano-pie-genital.
23. Hipoplasia dérmica focal (Goltz)

OSTEOLISIS IDEOPÁTICA

1. Falangeal (formas severas)
2. Tarso Carpal
 - a. Tipos severos incluyendo Francois.
 - b. Con nefropatía.
3. Multicéntrico
 - a. Tipos severos incluyendo Winchester.
 - b. Hadju-Cheney.

TRASTORNOS DEL METABOLISMO GENERALIZADO CON MANIFESTACIONES OSEAS PREDOMINANTES

1. Metabolismo del calcio y fósforo.
2. Complejo de carbohidratos.
3. Lípidos (Gaucher, Neimann-Pick)
4. Ácidos nucleicos (deficiencia de ADA y otras)
5. Amino ácidos (Homocistinuria y otros)
6. Metales (Menke y otros)

En 1985 Stanescu V. y colaboradores demuestran que el metabolismo de proteoglicanos y GAGs está alterado en los casos de crecimiento del cartilago en condrodisplasias. (26).

Bingel S.A. y colaboradores en 1985 demuestran alteración de los proteoglicanos en las placas de crecimiento de perros (Alaska Malamutes) condrodisplásicos. (27).

Engfeldt y colaboradores en 1982 hacen un estudio en biopsias de cartilago y hueso. Enfocado a polisacáridos (proteoglicanos y GAGs) en pacientes con Osteogenesis Imperfecta, Mucopolisacaridosis Morquio IV y Condrodisplasia metafisial tipo McKusick. En Osteogenesis Imperfecta demuestran alteraciones morfológicas e incremento en el peso molecular del condroitinsulfato. En Morquio IV extensos depósitos intracelulares sólo en la membrana vacuolar en condrocitos y osteocitos (hay indicios de que estos depósitos contienen KS), además la tendencia a la formación de agregados proteoglicanos disminuyó. En McKusick hay cambios insignificantes a nivel ultraestructural. (28).

OBJETIVOS

Investigar cuantitativa y cualitativamente, la posible excreción de glucosaminoglucanos urinarios, en pacientes con sospecha de osteocondrodisplasias.

Caracterización de glucosaminoglucanos urinarios, mediante electroforesis, en pacientes con niveles elevados.

HIPOTESIS

Como se expresó anteriormente, los GAGs forman parte importante del tejido óseo y cartilaginoso. Existen patologías que involucran la degradación de dichos GAGs, las cuales se caracterizan por alteraciones en la modelación del tejido óseo (referido como disostosis). Con este antecedente es posible que: las alteraciones de la estructura y desarrollo del tejido óseo (Osteocondrodisplasias) muestran además una modificación en cantidad o en calidad de los GAGs. Por ello se consideró conveniente cuantificar y caracterizar los GAGs hipotéticamente presentes en pacientes con diagnóstico de osteocondrodisplasias.

MATERIAL Y METODOS

Para realizar este estudio, se colectaron muestras de orina de 37 niños (ambos sexos), con sospecha diagnóstica de osteocondrodisplasia. Fueron captados en la consulta externa de Genética del hospital de pediatría del Centro Médico de Occidente del IMSS.

Las muestras se colectaron en ayunas y fueron filtradas y conservadas a -20°C , hasta su procesamiento.

La cuantificación de GAGs urinarios se realizó por el método de Gold (20): que estima concentraciones hasta en cantidades micrográmicas. Este procedimiento se basa en la diferencia de absorción en espectrofotómetro del colorante azul del alciano y el complejo GAGs-azul de alciano.

El azul del alciano es un colorante catiónico, que forma complejos solubles en cloruro de sodio y metanol, con los GAGs en condiciones óptimas, la cantidad de complejo formado es proporcional a la cantidad de GAGs en solución.

El complejo formado se disocia para entonces recuperar los GAGs. (29, 30).

Los GAGs recuperados se identificaron por electroforesis unidimensional en placas de acetato de celulosa, con amortiguador acetato de bario a diferentes concentraciones de etanol, por el método modificado (21, 31) de Cappelletti y Hopwood.

1.- Cuantificación de GAGs.

(20)

A: Reactivos:

- a. Solución colorante de azul de alciano 8 GX. 1 mg/ml. en acetato de sodio 0.5 M.

- b. Solución Stock: estándar condroitinsulfato (Ch-S) - 1 mg/ml, en agua desmineralizada.

B: Procedimiento:

- a. Para la elaboración de la curva patrón, se colocaron 7 tubos de ensayo marcados del 1-5, con diluciones seriadas de estándar Ch - S, otro tubo marcado como blanco (Bco.), y otros marcados con la muestra problema (Pb); se le adiciona solución Stock, agua desionizada, orina problema y solución colorante, en el siguiente orden:

	T u b o s d e e n s a y o						
	1	2	3	4	5	Bco	Pb
Solución Stock*	10	20	40	80	160	---	---
Agua desionizada*	190	180	160	120	40	200	---
Muestra problema*	---	---	---	---	---	---	200
Solución colorante (ml)	2.4	2.4	2.4	2.4	2.4	2.4	2.4

* μ l

- b. Mezclar.
- c. Reposar 10 minutos a temperatura ambiente.
- d. Leer a una longitud de onda de 480 nm (Espectrofotómetro PMQ-3 ZEISS y Celdilla rectangular de vidrio 1 X 1).
- e. Las lecturas obtenidas de cada muestra se interpolarán en la curva patrón y se multiplicarán por el factor 5 para expresar en m μ .

II.- EXTRACCION DE GAGs URINARIOS PARA ELECTROFORESIS.

(29, 30)

A. Reactivos:

- a. Azul de alciano 8 GX / 0.05 % (p/v), en cloruro de magnesio ($MgCl_2$), 50 mM y acetato de sodio 50 mM a pH 5.8 con ácido acético. (CH_3COOH).
- b. Cloruro de sodio 4 M ($NaCl$).
- c. Carbonato de sodio 0.1M (Na_2CO_3).
- d. Metanol absoluto. (CH_3OH).

B. Procedimiento:

- a. 2 ml. de orina problema se mezclan con 10 volúmenes de azul de alciano 0.05 % (p/v), en cloruro de magnesio 50 mM y acetato de sodio 50 mM a pH 5.8, reposar 120 minutos a temperatura ambiente.
- b. Centrifugar A 2090 g por 15 minutos, recuperar el precipitado, el cual contiene el complejo de GAGs azul de alciano.
- c. Disociar el complejo por agitación vigorosa y la adición de 60 μ l de cloruro de sodio en metanol 2:1 (v/v).
- d. Precipitar el azul de alciano libre, con la adición de 20 μ l de carbonato de sodio, y 60 μ l de agua desionizada.
- e. Repesar 30 minutos a temperatura ambiente y centrifugar a 2090g a 4°C por 15 minutos, para remover el azul de alciano.

- f. Recuperar el sobrenadante en el cual se encuentran los GAGs.
- g. Precipitar los GAGs con la adición de etanol y centrifugar a 2090g por 15 minutos a 4° C.
- h. Recuperar el precipitado en 10 a 20 μl de agua desionizada.

III. ELECTROFORESIS PARA LA IDENTIFICACION DE GAGs URINARIOS.

(21, 31)

A. Reactivos:

- a. Amortiguador acetato de bario 0.1 M pH5, con ácido acético.
- b. Amortiguador acetato de bario 1M pH5, con ácido acético.
- c. Amortiguador acetato de bario 0.1M pH5, con 15% de etanol.
- d. Amortiguador acetato de bario 0.1M pH5, con 50% de etanol.
- e. Estándares de: DS, H, HS, Ch-4 y 6-S, KS, ácido hialurónico a una concentración de mg/ml, en agua desionizada.
- f. Solución acuosa de azul de alciano a 0.25%
- g. Acido acético 0.18 M.
- h. GAGs obtenidos de la orina problema.
- i. Placa o membrana de acetato de celulosa (Sepraphore III de Gelman Instrument Company o Titan III de Helena Laboratories).

- j. Cámara de electroforesis diseñada por el Laboratorio de Bioquímica III de la división de Genética.
- k. Papel Camag NN para electroforesis.
- l. Fuente poder Camag: Power Suply.
- m. Multiaplicador (Helena Laboratories).

B. Procedimiento:

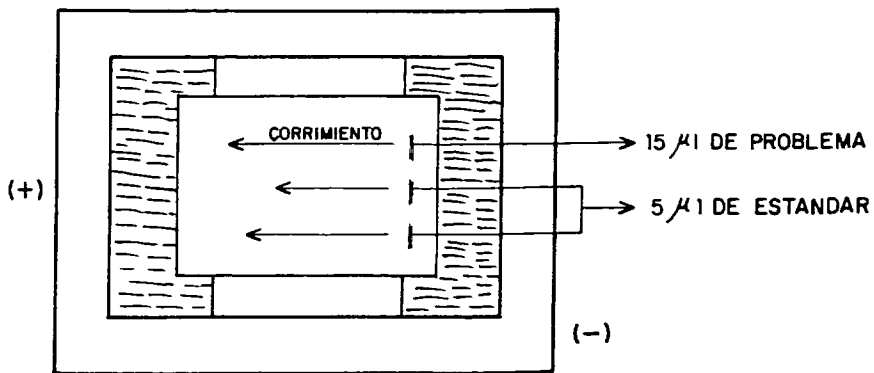
- a. Marcar la membrana de acetato de celulosa (Titan III Helena Laboratories), una línea de aplicación, a una distancia de un cm de los bordes cuidando de no desprender la capa de celulosa.
- b. Humedecer la membrana en amortiguador acetato de bario 0.1 M a pH5.
- c. Aplicar 5 μ l de estándares de GAGs como control y 15 μ l de muestra problema, a lo largo de la línea de aplicación.

Realizar el siguiente montaje (Fig. 7):

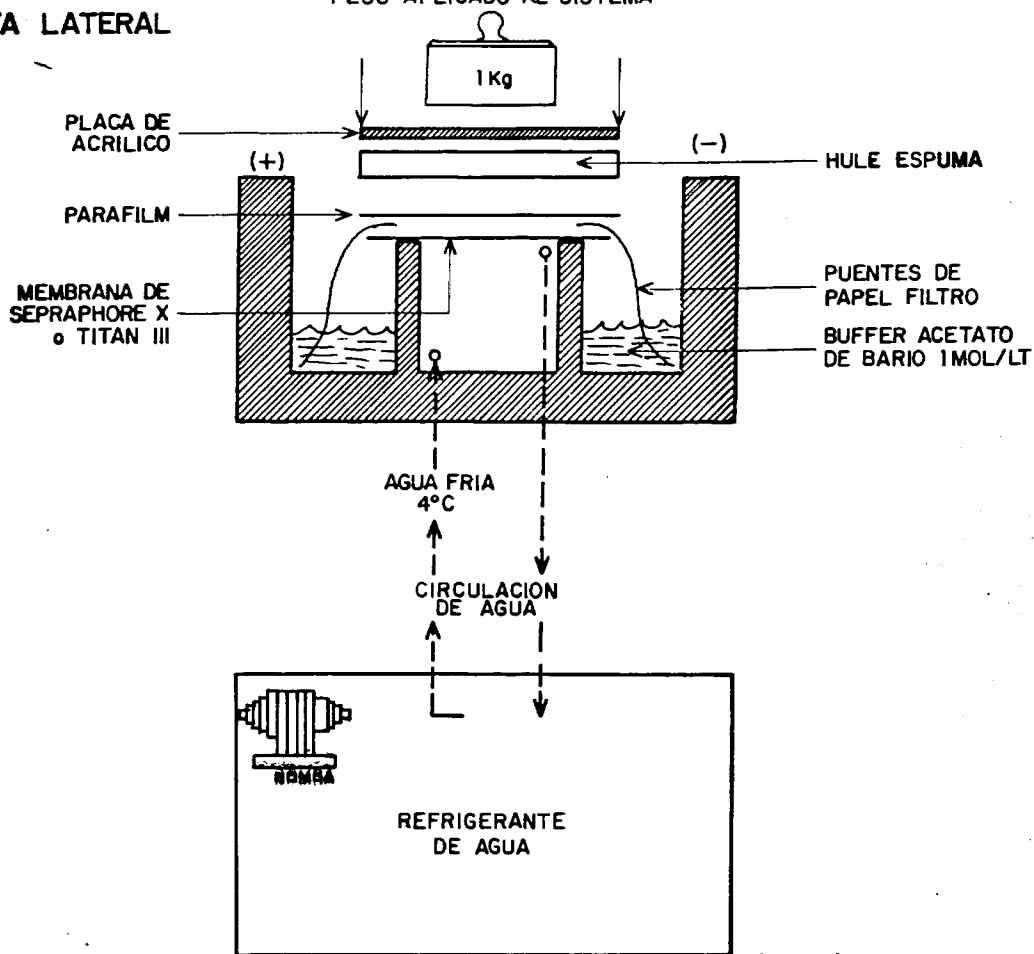
- 1.- Colocar la membrana de acetato de celulosa con la línea de aplicación al lado del polo negativo.
- 2.- Poner los puentes de papel filtro a los extremos de la membrana, cuidando de no tocar la línea de aplicación.
- 3.- Sobre ésta colocar una capa de parafilm, posteriormente un hule espuma de 1.5 ó 2 cm. de grueso.
- 4.- Aplicar la presión correspondiente; en realizar este montaje.

FIGURA 7
MONTAJE PARA LA ELECTROFORESIS

VISTA SUPERIOR



VISTA LATERAL



- d. Iniciar el corrimiento electroforético con amortiguador acetato de bario 1 M a pH5, por 5 minutos a 200 volts (V), manteniendo una temperatura constante de 4° C.
- e. Suspender el corrimiento y sumergir la membrana en acetato de bario 0.1 M a pH5, con 15% de etanol, durante 2 minutos.
- f. Iniciar el corrimiento electroforético por 30 minutos más, en acetato de bario 1M a pH5, a 200 V, manteniendo una temperatura constante de 4° C.
- g. Suspender el corrimiento y sumergir la membrana en acetato de bario 0.1 M a pH5, con 50% de etanol durante 2 minutos.
- h. Continuar el corrimiento electroforético en acetato de bario 1 M a pH5, durante 10 minutos, a 200 V manteniendo una temperatura constante de 4° C.
- i. Suspender el corrimiento y sumergir la membrana en solución acuosa de azul de alciano a 0.25%, durante 15 minutos para su teñido.
- j. Enjuagar la membrana en agua desionizada y sumergir en ácido acético 0.18M por 5 minutos para su desteñido.

Descripción de la cámara electroforética.

Para efectuar la técnica de electroforesis, se diseñó una cámara fabricada con acrílico y sellada con cloroformo; tiene una dimensión de 12 X 14 cm y una altura de 7 cm. (fig.8).

Consta de una cámara central por donde circula agua fría a una temperatura constante de 4° C; con un flujo de 1.8 l/min. Esta cámara de enfriamiento tiene la función de controlar la temperatura y evitar la evaporación, ya que al utilizar altos voltajes (200 V), se produce exceso de calor que al evaporar la solución buffer, seca la membrana de acetato de celulosa, e interrumpe el corrimiento electroforético (32).

A cada lado de la cámara de enfriamiento, hay un compartimiento que contiene los electrodos de platino; en este espacio se coloca la solución buffer, correspondiendo al polo positivo y otro al polo negativo, estos se identifican por el color rojo y negro respectivamente. (32).

Además contiene un aditamento especial para dar la presión necesaria a la membrana donde se aplican las muestras. Este aditamento consta de dos placas de acrílico, la placa de la parte superior es gruesa y más grande; se inserta a unos bornes que se encuentran a los extremos de la cámara de electroforesis y sirve para fijarse a unos tornillos; esta placa en la parte central contiene una flecha roscada que, al girarse da la presión requerida de 1 Kg/cm². La placa de la parte inferior es delgada y coincide con el tamaño de la cámara de enfriamiento y es la parte donde se produce el efecto de presión, la que tiene contacto con el montaje electroforético. (32).

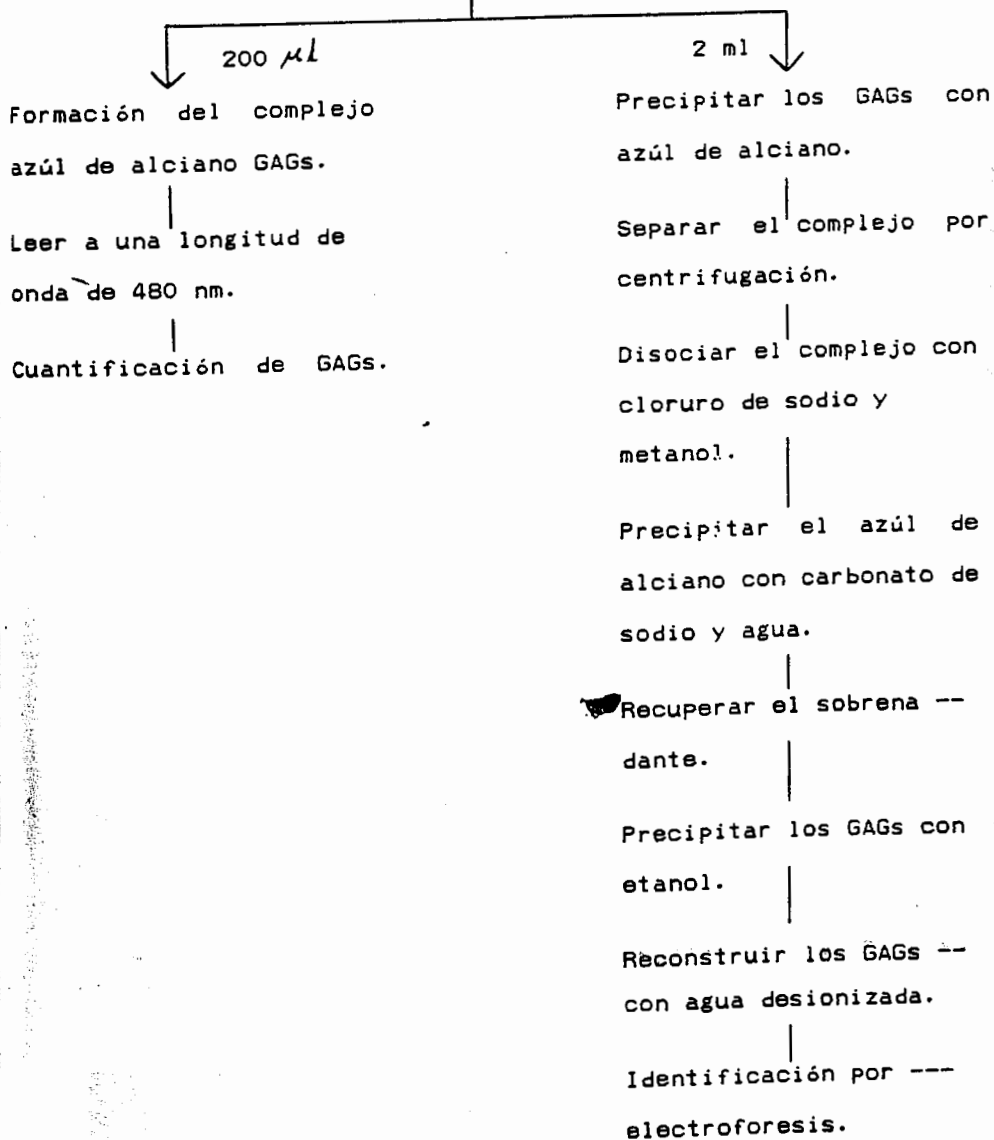
CAMARA ELECTROFORETICA



DIAGRAMA DE FLUJO

Pacientes de la consulta externa con sospecha diagnóstica

ORINA



RESULTADOS

Para la cuantificación de GAGs, se realizaron una serie de determinaciones espectrofotométricas (10,20,40,80 y 160 μ I de condroitínsulfato) para la elaboración de la curva patrón, que se utilizó para determinar la concentración de GAGs urinarios, de pacientes con sospecha diagnóstica de osteocondrodisplasias; lo que muestra una marcada linealidad entre la concentración de Ch-s y su absorbancia a una longitud de onda de 480 nm. (figura 9).

Para convertir las lecturas obtenidas a una concentración de mg/ml, se transpolan los valores a la curva patrón y el resultado se multiplica por 5, ya que se tomaron 200 μ l (1/5) de cada muestra.

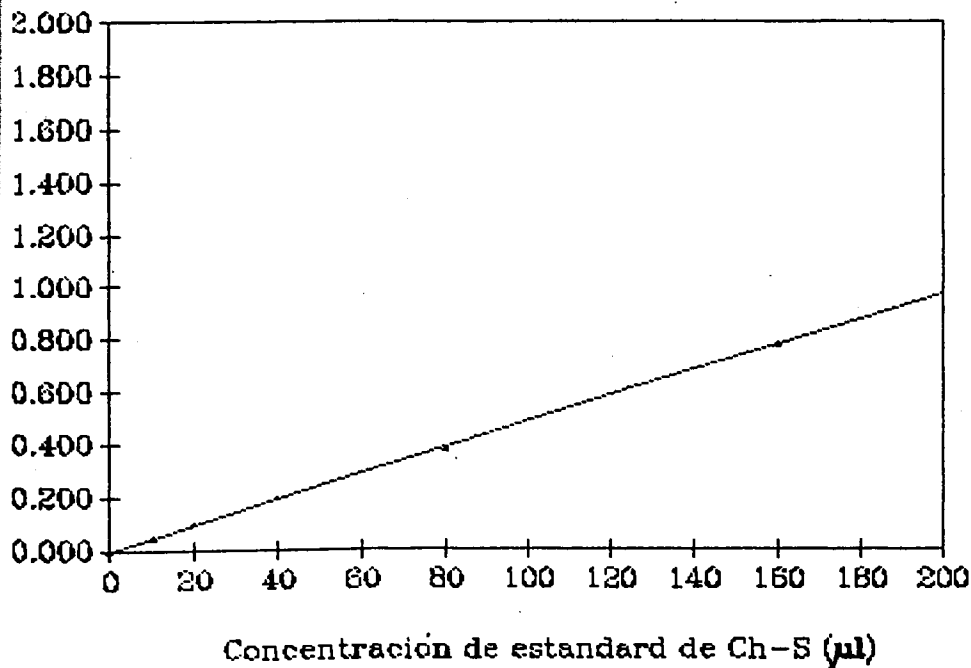
Otra manera de convertir las lecturas espectrofotométricas (dadas como absorbancia) es por medio de la siguiente fórmula:

$$\text{Problema mg/ml} = \frac{\text{Absorbancia del problema}}{\text{Absorbancia del estándar}} \times (\text{estándar}) \times 5$$

Para la caracterización de GAGs urinarios, se desarrolló una cámara para electroforesis, con buenos resultados, ya que dió mayor resolución en la separación de los componentes de la muestra problema y estándares. El sistema de enfriamiento controló adecuadamente la evaporación de los compuestos, los compartimientos de los espacios laterales, son muy reducidos por lo tanto requieren cantidades menores de solución buffer, utilizada para el corrimiento electroforético, por lo tanto es económico.

Otra ventaja importante es que cuenta la cámara electroforética, es el sistema de presión ya que es muy uniforme, con lo cual se logró mantener la membrana saturada con solución

Figura 9. Curva patrón para la cuantificación de GAGs.



buffer y esta solución se condujera uniformemente a través de este medio.

El uso del multiaplicador dió grandes resultados ya que cada aplicación fué uniforme, evitando la dispersión de estándares o problemas, logrando así bandas definidas posibles de identificar.

Se realizó electroforesis de estándares para observar su movilidad electroforética, aplicando 5 μ l sobre la placa de acetato de celulosa de cada uno de los estándares disponibles a una concentración de 1 mg/ml. (fig.10).

Esta figura nos muestra la movilidad electroforética de cada uno de los estándares, observamos la separación del DS en sus dos componentes el DS I y el DS II, el HS, Ch-6-S y el Ch-4-S.

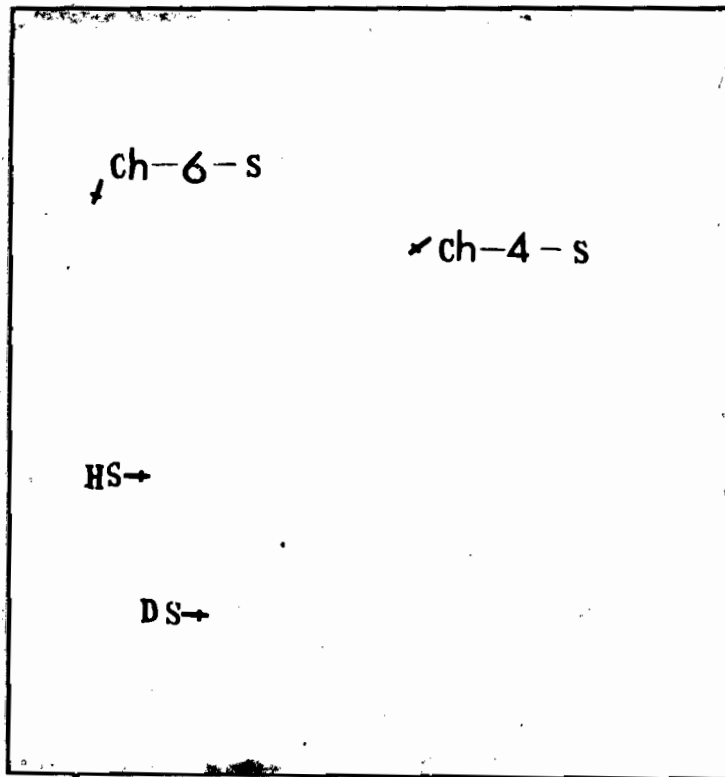
El estudio realizado en el grupo de pacientes con sospecha diagnóstica de osteocondrodisplasias fué un total de 37 pacientes, de los cuales solo 26 mostraron niveles elevados de GAGs (mayores de 0.135 mg/ml), los 11 pacientes restantes los valores de GAGs, estaban dentro de la concentración normal, razón por la cual no se les practicó electroforesis.

Los resultados de la electroforesis en 26 pacientes que presentaron concentraciones elevadas de GAGs urinarios, se muestran en la tabla (2).

La fig. (11) nos muestra la gran sensibilidad, y la resolución de las bandas, que tiene la electroforesis, para identificar el tipo de GAGs excretados en orina del grupo de pacientes estudiados; Las tres primeras aplicaciones corresponden a orina de pacientes con diagnostico de osteocondrodisplasias, en las cuales se distinguen bandas que corresponden al Ch-6-S y al HS, la aplicación 4 y 5 corresponden a individuos con

Figura 10

MIGRACION ELECTROFORETICA DE ESTANDARES DE GAGs



DS = Dermatán Sulfato

HS = Heparán Sulfato

Ch-4-S = Condroitín-4-Sulfato

Ch-6-S = Condroitín-6-Sulfato

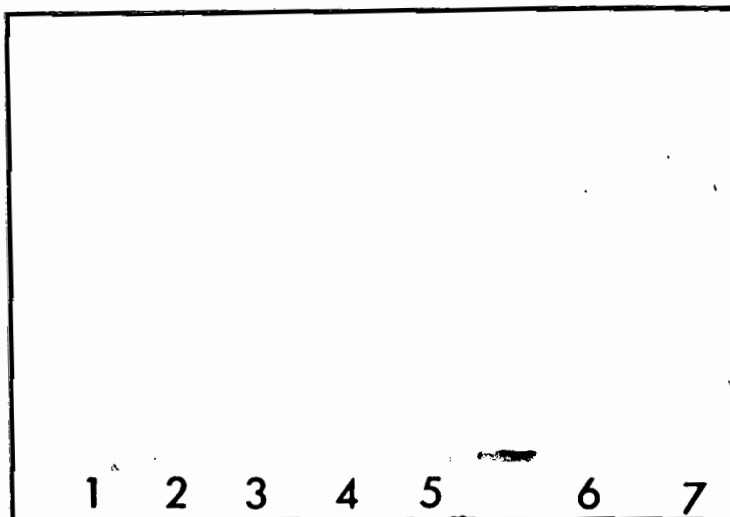
TABLA 2.- CUANTIFICACION DE GAGs URINARIOS EN LOS GRUPOS DE
PACIENTES CON OSTEOCONDRODISPLASIAS

GRUPOS	GAGs	$\bar{X} \pm D.E.$	n	** p
I Osteocondrodisplasia	Ch-4-S, HS, DS	0.235	1	-
II Displasia esquelética	Ch-4-S, Ch-6-S, HS, DS	0.249 \pm 0.139	11	p < 0.001
III Talla baja de etiología determinada	Ch-4-S, Ch-6-S, HS, DS, KS	0.276 \pm 0.187	25	p < 0.001
IV Errores congénitos del metabolismo	Ch-4-S, Ch-6-S, HS	0.277 \pm 0.068	2	N.S.
V Desordenes del tejido conectivo y/o dismorfológico	Ch-4-S, Ch-6-S, HS,	0.270 \pm 0.112	10	p < 0.001
TOTAL		0.252	49	

† Los valores representan la media y la desviación estandar para el número n de determinaciones
 **P - probabilidad obtenida de la prueba t de Student obtenidos al comparar los valores de cada grupo con los valores normales obtenida en el laboratorio (0.130 \pm 0.035 mg /ml)

Figura 11

ELECTROFESIS DE GLUCOSAMINOGLUCANOS URINARIOS DE PACIENTES CON
OSTEOCONDRODISPLASIAS.



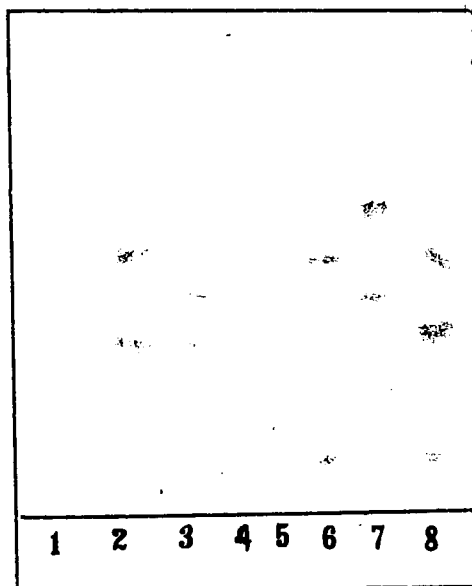
- 1.- Paciente con displasia esquelética
- 2.- Paciente con talla baja
- 3.- Paciente con talla baja
- 4.- Paciente con baja concentración
- 5.- Paciente con baja concentración
- 6.- Condroitín-6-Sulfato (Ch-6-S)
- 7.- Heparán Sulfato (HS)

cuantificación baja de GAGs urinarios, en la que no se observa migración de las bandas, la aplicación 6 corresponde a la mucopolisacaridosis tipo Hurler/Scheie, y por último en la aplicación 7 y 8 se observan los estándares de referencia, Ch-6-S y HS.

La fig. 12 nos muestra la presencia de los diferentes GAGs excretados en orina de pacientes con diagnóstico de osteocondrodiasplasia, en la cual no se observa un patrón característico.

Figura 12.

ELECTROFORESIS DE PACIENTES CON OSTEOCONDRODISPLASIAS



- 1.- Paciente con Síndrome de Fanconi
- 2.- Paciente con Osteocondrodisplasia
- 3.- Paciente con Displasia esquelética
- 4.- Sin muestra
- 5.- Sin muestra
- 6.- Paciente con Talla Baja
- 7.- KS, Ch-4-S
- 8.- DS, HS, Ch-6-S

DISCUSSION

Decidimos aplicar la metodología aquí descrita, debido a que la caracterización y cuantificación de GAGs ha sido difícil de efectuar, donde se han utilizado métodos fotométricos, cuyos resultados son expresados indirectamente como ácido hexurónico (ácido urónico), mientras que en la caracterización se han utilizado cromatografías de intercambio iónico en columnas, no fáciles de montar en la mayoría de los laboratorios.

Los resultados obtenidos permiten concluir la reproductibilidad y su acceso, como método de diagnóstico de fácil elaboración.

La técnica de electroforesis se pudo aplicar para la separación de GAGs, ya que son moléculas portadoras de carga neta.

El uso del acetato de celulosa produce una adsorción menor de la muestra, consiguiendo una gran resolución con pequeñas cantidades de esta última. Tiene la propiedad de ser poco hidrófila por lo que requiere pequeñas cantidades de solución buffer y por lo tanto, una mayor proporción de corriente es conducida por la muestra, lo que proporciona separaciones muy rápidas. Otra ventaja es que consigue mayor visualización de los componentes a causa de la débil coloración de fondo que se origina por tinción.

Para la electroforesis se diseñó una cámara especial, que a cada lado de la cámara consta de una celdilla que tiene un espacio reducido para la solución buffer, lo que permite utilizar un menor volumen.

El peso aplicado al sistema esta contenido en la tapa de la cámara, previamente calibrada, cuya presión ejercida corresponde a 1 Kg/cm. evitando la evaporación y permitiendo tener una uniformidad mayor en el corrimiento de la muestra.

El uso del multiaplicador agiliza el proceso de aplicación ya que se procesan 8 muestras al mismo tiempo, cada aplicación es de un μ l que evita que la muestra se expanda originando una mancha más nítida que facilita su identificación.

La búsqueda de GAGs urinarios en pacientes con sospecha de osteocondrodisplasias surge del antecedente que se tiene de que los GAGs forman parte importante del tejido óseo y cartilaginoso.

Por lo que se hipotetizó que las alteraciones de la estructura y desarrollo del tejido óseo comprometan también a los GAGs ya sea en cantidad o en calidad, ya que en la mayoría de los casos de osteocondrodisplasias, no ha sido posible demostrar un trastorno metabólico.

Del grupo problema (n = 37), sólo 26 pacientes (70.2%) tuvieron niveles elevados de GAGs urinarios, tomando en cuenta la concentración normal de GAGs de 0.130 ± 0.035 mg/ml reportada por el laboratorio de bioquímica III de la División de Genética de la Unidad de Investigación Biomédica de Occidente, los pacientes restantes estuvieron dentro de los límites normales y no se les practicó electroforesis.

De los 26 pacientes con niveles elevados de GAGs urinarios 23, mostraron en electroforesis Dermatán y Heparán Sulfato.

Es muy interesante, que un gran porcentaje que los pacientes estudiados haya dejado valores aumentados de GAGs, así como que hayan presentado Dermatán y Heparán Sulfato, ya que solamente el

condroitin es considerado normal. Así mismo esta observación se ve corroborada con la presencia de GAGs en un paciente con Síndrome Craneo Facio Cardio Esquelético, los cuales nos pudieron ser identificados dado la diferencia migración de los mismos a los estándares utilizados.

Los resultados aquí obtenidos, demuestran el compromiso de los GAGs en la osteocondrodisplasias, no solo en la elevación de los niveles urinarios sino en la modificación en la estructura de las mismas cuando menos de una paciente, sin que por el momento pueda establecerse una relación causa-efecto.

CONCLUSIONS

Se pudo demostrar la presencia de GAGs urinarios, los cuales fué hipotetizada su presencia en orina de pacientes con sospecha diagnóstica de osteocondrodisplasia.

1. Ya que de los 37 pacientes con sospecha diagnóstica de osteocondrodisplasia en 26 (70.2 %) mostraron niveles elevados de GAGs, puede concluirse que el metabolismo de los mismos está afectado en las osteocondrodisplasias.

No obstante no es posible por el momento determinar una relación causa-efecto; por lo que no es posible concluir si un bloqueo metabólico de GAGs dió como consecuencia una osteocondrodisplasia (en cuyo caso debería ser definida como disostosis), o si la mutación es un gen estructural que condiciona el defecto en el desarrollo y estructura del hueso (osteocondrodisplasia) afecte en forma secundaria la síntesis o degradación de GAGs.

2. La metodología aquí utilizada es confiable fundamentalmente por su reproducibilidad lo que aunado a la fácil implementación y el tiempo relativamente corto en el desarrollo de esta metodología permiten su inclusión como método diagnóstico de las mucopolisacaridosis, así como la glucosaminoglucanuras en otros pacientes.

3. El hecho de haber demostrado niveles elevados y glucosaminoglucanos, no identificados por los estándares utilizados, en el Síndrome Craneo Facio Cardio Esquelético permiten concluir que en este síndrome debe ser reestudiado en bases bioquímicas para su mejor delineamiento.

4. Los resultados aquí obtenidos permitieron delinear dos nuevos proyectos de investigación encaminados ambos a investigar la relación entre los glucosaminoglucanos y las osteocondrodisplasias.

BIBLIOGRAFIA.

- 1.- Leeson C.R., Leeson T.S., Paparo A.A.; 1987, Histologia, Editorial Interamericana. Pag. 102-157.
- 2.- Borysenko M., Et. al.; 1985, Histologia funcional, Editorial Limusa. Pag. 57-79.
- 3.- Arthur W.H.; 1975, Tratado de Histología, Editorial Interamericana pag. 110-234.
- 4.- David J.T., John K.S., Ian A.N; 1987, A Study of the Interaction Between Cartilage Proteoglycan and Line Protein, B.J.; 248, 943-951.
- 5.- Catolyn W., Et. al.; 1987, The Identification and Characterization of two populations of Aggregating Proteoglycans of High Buoyant Density Isolated From Postnatal Human Articular, Cartilages of Different Ages.; B.J., 248: 735-740.
- 6.- Bohinski.; 1976, Modern Concepts In Biochemistry. Allyn and Bacon Pag. 234-263.
- 7.- Bondy P., Rosenberg L.; 1980, Metabolic Control and Disease 9th Editorial W.B., Saunders Company. Pag. 545-581.
- 8.- Fariás M.G.; 1988, Química Clínica, Editorial Manual Moderno pag. 115-123.
- 9.- Thomas Mod.; 1986, Biochemistry With Clinical Correlations Editorial A Wiler Medical Publication, Pag. 347-352.
- 10.- H.Ch. Curtis, Marc Roth; 1974, Clinical Biochemistry, Principles and Methods, Editorial de Gruyter, pag. 944-971.
- 11.- Mehhert H., Foster H.; 1977, Enfermedades del metabolismo Editorial Salvat, pag. 7. 458-461
- 12.- Martin D.W., Layes P.A., Rodwell V.W.; 1980, Bioquímica de Harper Editorial el manual moderno. Pag. 448-464.

- 13.- Bland H.J.: 1965, Metabolismo del Agua y los electrolitos en clinica. Interamericana, pag. 364-373.
- 14.- McKusick V. A, Neufeld E. F: 1983 The Mucopolysaccharide Storage Diseases. In: Stanbury J. B., Et. al: The Metabolic Basis of Inherited Disease; McGraw Hill; pag. 751-777.
- 15.- Sly W.S.: 1980, Metabolic Control And Disease, Editorial W.R. Saunders Company, Pag. 545-581.
- 16.- Grynpas M.D.; Hunter G.K.: 1988; Bone Mineral and glycosaminoglycans in newborn and mature rabbits., J. Bone Miner Res. Apr; 3 (2): 159-64.
- 17.- Brett. V. Et. al.; 1988, Quantitation and Characterization of urinary Glycosaminoglycans in Healthy Subjects and Patients With Mastocytosis C.C.A, 171:29-36.
- 18.- Metcalfe D.D., Et. al.; 1979, Isolation and Characterization of Iteparin from Human Lung, J.C. Invest: 64: 1537-1543.
- 19.- Mckusick V.A.: 1976, Trastornos hereditarios del tejido conjuntivo, labor, pag. 39-61 y 805-881.
- 20.- Gold E.A.: 1979: The Simple Espectrophotometric Method for Stimating Glycosaminoglycans Concentrations. Analitical Brochemistry. 99: 183-188.
- 21.- Cappelletti R, Rosso M., and Chiarugi V.P.: 1979, A new electrophoretic method for the complete Separation of all Kown animal glycosaminoglycans in monodimensional run. A.B. 99: 311-315.
- 22.- Peter B.; 1978, Inherited Disorders of Skeleton, Churchill Livingstons, pag. 1-263.

- 23.- Joseph A. B; 1973. Disproporcionate Short Stature. W.B. Saunders Company. pag. 1-561.
- 24.- Jurgen W.S., Leonard C.L, H.R. Wiedmann: 1974. Bone Dysplasias An Atlas Constitutional Disorders of Skeletal Development; W.B. Sauders Company; pag. 1-138.
- 25.- David L.R.; 1979. International Nomenclature of Contitutional Diseases of Bone: A.J. of Medical Genetics: pag. 21-26.
- 26.- Stanescu V; Stanescu R; Maroteoux P. 1985. Cellular aspects of Chondrodysplasia, Ann Biol Clin (Paris): 143 (5): 786-90.
- 27.- Bingel S.A.; Sande R.D.; Wight T.N.; 1985. Chondrodysplasia in the Alaskan Malamute. Characterization of proteoglycans dissociatively extracted from dwarf growth plates. proteoglycans dissociatively extracted from dwarf growth plates. Lab Invest act; 53 (4): 479-85.
- 28.- Engfeldt B.. Et. al.; 1982; Morphological and biochemical analysis of biopsy specimens in disorders of skeletal development. Acta paediatr Scand; May; 71 (3): 353-63.
- 29.- Whiteman P.; 1979. The Quantitative Determination of Glycosaminoglycans in Urine With alcian Blue 8 gx.; Biochemistry Journal. 131; 351-357.
- 30.- Whiteman P.; 1979. The Quantitative Measurement of Alcian Blue Glycosaminoglycans Complexes. Biochemistry Journal 131: 347-350.
- 31.- Hopwood J.J.; Harrison J.R.; 1982. High Resolution on Electrophoretic Urinary Glycosaminoglycans; an Improved Sereening Tests for the Mucopolysaccharidosis. Analitical Biochemistry. 119; 120-127.

- 32.- Ron C.M.; 1989, caracterización electroforética de Glucosaminoglucanos urinarios en pacientes con mucopolisacaridosis, pag. 24-26.
- 33.- Bryan L.W.; Keith W.; 1981, Principios y Técnicas de bioquímica experimental; omega. pag. 105-125.



UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA
FACULTAD DE CIENCIAS

Sección
Expediente
Número 0122/90

SRITA. MARTHA PATRICIA GALLEGOS ARREOLA
P R E S E N T E. -

Manifestamos a usted que con esta fecha ha sido aprobado el tema de Tesis "CUANTIFICACION Y CARACTERIZACION DE GLUCOSAMINOGLUCANOS-URINARIOS, EN PACIENTES CON OSTEONCONDRODISPLASIAS" para obtener la Licenciatura en Biología.

Al mismo tiempo le informamos a usted que ha sido aceptado como Director de dicha Tesis al Biol. Guillermo Moises Zúñiga González.

ATENTAMENTE
"PIENSA Y TRABAJA"
Guadalajara, Jal., Enero 25 de 1990
EL DIRECTOR


ING. ADOLFO ESPINOZA DE LOS MONTEROS CARDENAS


EL SECRETARIO

M. EN C. ROBERTO MIRANDA MEDRANO

c.c.p. El Biol. Guillermo Moises Zúñiga González, Director de Tesis.-Pte.
c.c.p. El expediente de la alumna.

'mjsd

Guadalajara, Jal; Febrero 20 de 1990.

ING. ADOLFO ESPINOZA DE LOS MONTEROS C.
DIRECTOR DE LA FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA.
PRESENTE.

Estimado Ing. Espinoza de los Monteros:

Por este medio comunico a usted que la señorita Martha Patricia Gallegos Arreola, pasante de la Licenciatura en Biología, ha concluido satisfactoriamente el proyecto de tesis titulada: CUANTIFICACION Y CARACTERIZACION DE GLUCOSAMINOGLUCANOS URINARIOS, EN PACIENTES, CON OSTEOCONDRODISPLASIAS, realizado en la Unidad de Investigación Biomédica de Occidente del I.M.S.S.

Asimismo le informo que he revisado el manuscrito de la tesis y considero que cumple con los requisitos establecidos por la facultad y lo presentamos a su consideración

Sin más por el momento, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

A T E N T A M E N T E


Biol. GUILLERMO M. ZUÑIGA G.
Director de Tesis.