
Universidad de Guadalajara

FACULTAD DE CIENCIAS



CARACTERIZACION ELECTROFORETICA DE
GLUCOSAMINOGLUCANOS URINARIOS EN PACIENTES
CON MUCOPOLISACARIDOSIS.

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
LICENCIADO EN BIOLOGIA
P R E S E N T A
MARIA DEL ROSARIO RON CORTES

GUADALAJARA, JAL., 1989

I N D I C E

	Pág.
INTRODUCCION	1
ANTECEDENTES	
- Características bioquímicas de los glucosaminoglucanos	2
- Electroforésis	12
OBJETIVOS	15
MATERIAL Y METODOS	16
- Cuantificación de glucosaminoglucanos	17
- Obtención de glucosaminoglucanos de orina	19
- Electroforésis de glucosaminoglucanos	20
- Descripción de la cámara de electroforésis	24
RESULTADOS	27
DISCUSION	39
CONCLUSIONES	44
BIBLIOGRAFIA	46

A cada una de las
que de las M. S. S. S.
colaboraron con

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Bioquímica
III, Unidad de Investigación Biomédica de Occidente, -
I.M.S.S. bajo la asesoría del doctor JOSE SANCHEZ CORO-
NA y dirección del doctor GUILLERMO PEREZ GARCIA.

A G R A D E C I M I E N T O S

A todas aquellas personas
que de una u otra forma
colaboraron con la realiza-
ción de este trabajo,
les doy mi más sincero
agradecimiento.

A mis Padres y Hermanos,
por su esfuerzo y cariño
que me impulsaron a seguir
adelante.

INTRODUCCION

INTRODUCCION

Las mucopolisacaridosis (MPSs), son un grupo heterogéneo de enfermedades metabólicas caracterizadas por el almacenamiento de moléculas complejas denominadas glucosaminoglucanos (GAGs), secundarias a la deficiencia heredada de alguna de las enzimas lisosomales involucradas en la degradación de los GAGs. Estas moléculas al no ser degradadas se acumulan en diferentes tejidos, principalmente el conectivo; por lo que su excreción en orina se incrementa. Las alteraciones fenotípicas están dadas por lesiones óseas conocidas en general como disostosis múltiple, limitaciones en la función de las articulaciones, facies grotesca y retardo psicomotor (excepto morquio).

Actualmente no hay tratamiento para estas enfermedades, sin embargo, el diagnóstico es particularmente importante para el pronóstico y el asesoramiento genético adecuado.

Una forma alterna de establecer el diagnóstico de las MPSs, es cuantificar los niveles de GAGs y su identificación; de esta forma el desarrollo de la metodología que permite la cuantificación de GAGs y en forma esencial su identificación, resulta importante.

ANTECEDENTES

ANTECEDENTES

CARACTERISTICAS BIOQUIMICAS DE LOS GLUCOSAMINOGLUCANOS.

Los GAGs son polímeros de un aminoazúcar y un ácido urónico; el aminoazúcar es la D-glucosamina (GlcN), ó la D-galactosamina (GalN); y pueden estar sulfatadas o acetiladas. El ácido urónico es el D-glucurónico (GlcUA), o el L-idurónico (IdUA) (1).

Dependiendo de la secuencia del aminoazúcar y el ácido urónico, existen siete tipos de GAGs: Heparán (Hep), heparánsulfato (HS), dermatánsulfato (DS), ácido hialurónico (Ac. Hial), Chondroitin-4-sulfato (Ch-4-S), chondroitin-6-sulfato (Ch-6-2) y keratánsulfato (KS). Todos, excepto el ácido hialurónico, contienen azúcares sulfatados; y el KS es el único que no contiene ácido urónico (2). Tabla 1.

Los GAGs, son moléculas polianiónicas, dado que contienen grupos sulfato y carboxilo de los ácidos urónicos y muchas de sus funciones surgen de esta característica particular. Ya que la unión de GAGs con otras macromoléculas es generalmente de carácter electrostático, contribuyen de modo significativo a la organización estructural de la matriz del tejido conectivo, del cual son la sustancia base. Cuando se asocian con proteínas por uniones covalentes, forman un agregado macromolecular llamado proteoglucano, el cual confiere elasticidad a algunos tejidos (3-5).

Tabla 1

TIPOS ESTRUCTURA Y LOCALIZACION DE LOS GLUCOSAMINOGLUCANOS

Nombre	D I M E R O			Localización
	Acido urónico	Aminoazúcar	Otro	
Condroitin Ch-4-S Ch-6-S	GlcUA	GalNac-4-sulfato GalNac-6-sulfato		Cartilago y piel
Heparán HS	GlcUA GlcUA IdUA sulfato (30-55%)	GalNac GlcN-S/GlcNac GlcN-S/GlcNac		Gránulos células cebadas y super- ficie extracelu- lar.
DS	IdUA	GalNac-4-sulfato GalNac-6-sulfato (pocas veces)		Piel y pulmón
KS		GlcNac-6-sulfato	Gal	Cornea, núcleo - pulposo y cartí- lago.
Ac. hial	GlcUA	GlcNac		Tejido vítreo, lí- quido articular, cordón umbilical y piel.

Ch-4-S = Condroitín-4-sulfato
 Ch-6-S = Condroitín-6-sulfato
 Ac. hial = Acido hialurónico
 HS = Heparán-sulfato
 DS = Dermatán-sulfato
 KS = Keratán-sulfato

GlcNac = N-acetil glusosamina
 GalNac = N-acetil galactosamina
 GlcUA = Acido glucurónico
 IdUA = Acido idurónico
 GlcN = Glucosamina
 Gal = Galactosa

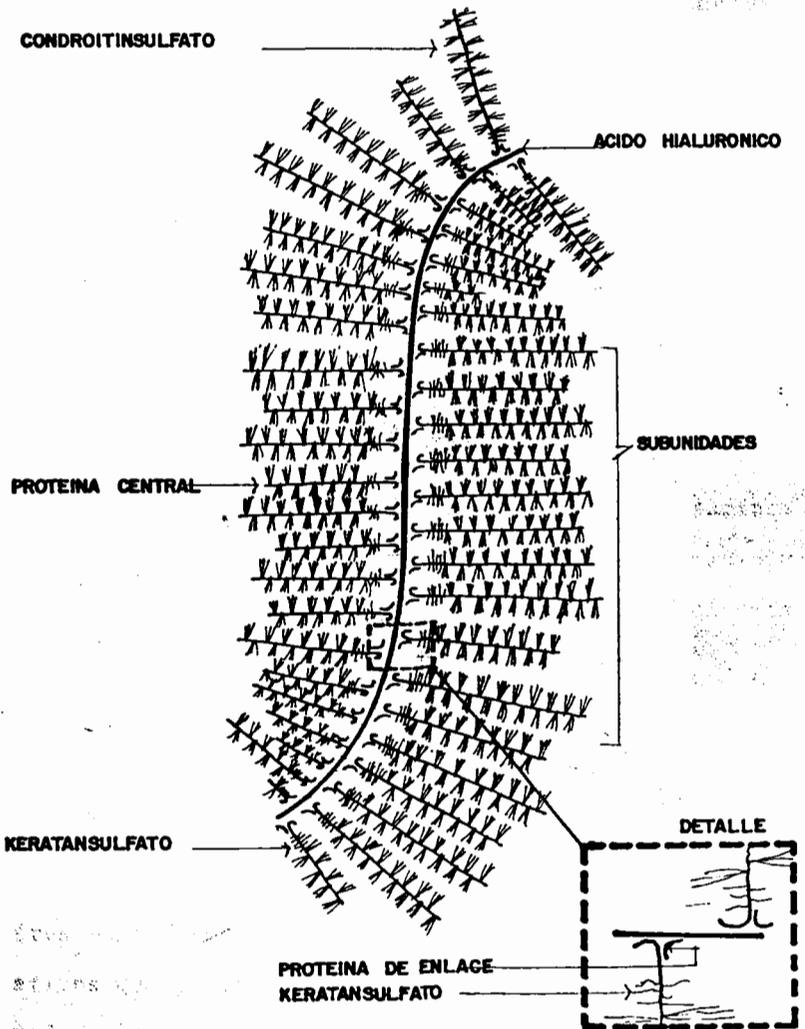
El proteoglucano es un conjunto altamente ordenado en donde la electronegatividad juega un papel importante, dado que su molécula organizadora es el ácido hialurónico. A partir de esta cadena central, se extienden proteínas que sirven a su vez de punto de anclaje de numerosas cadenas de polisacáridos, que son semejantes en su estructura. Otra región es rica en cadenas de KS y pequeñas cadenas de oligosacáridos; la última es rica en cadenas de condroitínsulfato (3). Figura 1.

Los GAGs son sintetizados por condrocitos, células del músculo liso, células cebadas y fibroblastos (2-4).

En 1957, Dorfman y Lorincz, describieron una excesiva excreción de GAGs en orina de pacientes con síndrome de Hurler, lo que erróneamente fue interpretado como exagerada síntesis de GAGs. Kaplan describió en 1969 un análisis cuantitativo de GAGs, presentes en cantidades excesivas en orina de pacientes con MPSs y distinguió algunos de estos síndromes (5). En 1979, Cappelletti utilizó un método de separación completa de todos los GAGs conocidos en animales de diferente especie; teniendo el siguiente orden de movilidad electroforética: KS, Ch-6-S, Ch-4-S, HS y DS (6). Gold describió en 1979 que los niveles de concentración de GAGs urinarios en individuos normales es de 0.105 ± 0.035 mg/ml (7).

Un aspecto importante del metabolismo de los GAGs, es su degradación, ya que un defecto catabólico a diferentes -

REPRESENTACION ESQUEMATICA DEL AGREGADO DE PROTEOGLUCANO.



niveles conduce al almacenamiento de estas moléculas que son la causa de las enfermedades referidas como Mucopolisacaridosis (1,2).

Las MPSs (tabla 2), son enfermedades de almacenamiento lisosomal, producidos por una deficiencia heredada de alguna de las enzimas lisosomales (hidrolasas ácidas), involucradas en la degradación de los GAGs (Figura 2). La enfermedad es progresiva y afecta a varios tejidos, tales como: conectivo, sistema nervioso central, corazón y esqueleto; en este último produce una serie de anormalidades conocidas en general como diostosis múltiple (1,2).

Todas las MPSs excretan cantidades excesivas de GAGs en orina, a este fenómeno comunmente se le denomina como glucosaminogluconuria (mucopolisacariduria) (8,9).

En la práctica, existen cuatro modelos de glucosaminogluconuria: DS, KS, HS y una combinación de DS y Hs; involucradas con la deficiencia de enzimas lisosomales en el catabolismo de los GAGs (8,9). Tabla 3.

Las pruebas de tamizaje utilizadas para detectar las MPSs (cloro-cetil-piridinium y albúmina ácida), en ocasiones dan resultados falso-positivo o falso-negativo. Por esta razón, es importante aplicar pruebas cuantitativas que demuestren el incremento de GAGs urinarios y los métodos cualitativos que permiten identificar el GAGs excretado. De los métodos cualitativos, la electroforésis parece ser la

Tabla 2.

TIPOS DE MUCOPOLISACARIDOSIS

Nombre	Designación alterna	Manifestaciones clínicas.	Tipo de herencia	Deficiencia enzimática.
Hurler	MPS I H	Antes de los 10 años graves manifestaciones óseas, sordera, opacidad corneal. Retardo mental y físico progresivo. Conduce a la muerte.	Autosómico recesivo	α -L-iduronidasa
Scheie	MPS I S	Mayor opacidad corneal Invasión de la válvula aórtica. Coeficiente intelectual normal.	Autosómico recesivo	α -L-iduronidasa
Hurler/Scheie	MPS I H/S	Opacidad corneal, ceguera a los 15 años. Fenotipo intermedio entre MPS IH y MPS I S.	Autosómico recesivo	α -L-iduronidasa.
Hunter A	MPS II A	No hay opacidad corneal Alteración mental lenta. Sordera progresiva Muerte antes de los 15 años.	Ligada al X recesivo	Sulfoirudonidato-sulfatasa.
Hunter B	MPS II B	Retardo mental leve Sobreviven más allá de los 50 años.	Ligada al X recesiva.	Sulfuronidato-sulfatasa
Sanfilippo A	MPS III A	Los subtipos de la MPS No hay opacidades corneales Oligofrenia grave Rigidez en todas las articulaciones	Autosómica recesiva	Heparan-N-sulfatasa (Sulfaminidasa).
Sanfilippo B	MPS III B	"	"	N-acetil- α -D-glucosaminidasa-N-acetil-transferasa

Tabla 2.

Continuación.

Nombre	Designación alterna	Manifestaciones clínicas	Tipo de herencia	Deficiencia enzimática.
Sanfilippo C	MPS III C	No se han descrito anomalías cardíacas. Subtipos clínicamente indistinguibles.	Autosómica recesiva	Acetil CoA: α -glucosaminido-N-acetiltransferasa.
Sanfilippo D	MPS III D		"	N-acetil- α -D-glucosaminido-6-sulfato-sulfatasa.
Morquio A	MPS IV A	Severa opacidad corneal Inteligencia normal Estatura muy baja Sordera progresiva. Deformidad torácica	Autosómica recesiva	Galactosa-6-sulfato-sulfatasa.
Morquio B	MPS IV B	Opacidad corneal Inteligencia normal, Leve disostosis múltiple.	Autosómica recesiva	β -galactosidasa
Matoteux - Lamy	MPS VI A	Severos cambios óseos y corneales Inteligencia normal Sobreviven hasta los 20 años.	Autosómica recesiva	N-acetil-galactosamina-4-sulfatasa (arilsulfatasa)
Maroteux - Lamy	MPS VI	Cambios moderadamente severos.	"	" "
Maroteux - Lamy	MPS VI B	Leves cambios óseos y corneales. Inteligencia normal.	Autosómica recesiva	N-acetil-galactosamina-4-sulfatasa (arilsulfatasa).
Deficiencia de B-glucuronidasa.	MPS VII	Facies extraña. No se observa oligofrenia, ni opacidades corneales. Leve retraso mental y físico.	Autosómica recesiva	β -glucuronidasa

Tabla 2

Continuación

Nombre	Designación alterna	Manifestaciones clínicas	Tipo de herencia	Deficiencia enzimática.
Differrante	MPS VIII	Retardo mental. Estatura corta. Leve disostosis múltiple. Engrosamiento del pelo.	Autosómica recesiva	N-acetil-glucosamina- 6-sulfatasa.

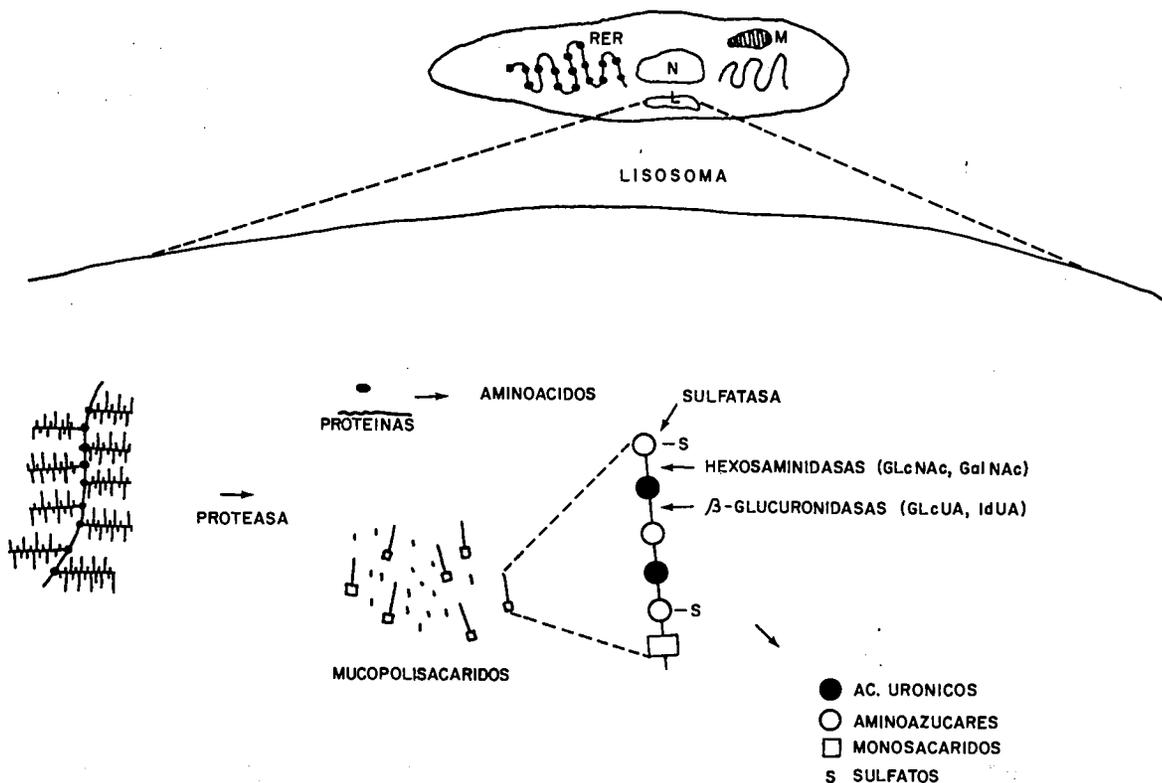


TABLA 3
MODELOS DE EXCRECION DE GAGs URINARIOS EN PACIENTES
CON MPSs.

MUCOPOLISACARIDOSIS	GAGs EXCRETADOS EN ORINA
MPS I-H y MPS I-S	DS-HS (Proporción 2-4:1)
MPS II	DS-HS (Proporción 1:1)
MPS III A	HS 80-90 % de GAG
MPS III B	HS 80-90 % de GAG
MPS IV	KS-Ch-S (Proporción 1:1)
MPS VI	DS 70-90 % de GAG
MPS VII	HS-DS y Ch-4/6-S
MPS VIII	KS y HS

Abreviaturas:

Ch-4-S = Condroitín-4-sulfato.

Ch-6-S = Condroitín-6-sulfato.

MPSs = Mucopolisacaridosis.

Ch-S = Condroitinsulfato.

GAGs = Glucosaminoglucanos.

GAG = Glucosaminoglucano.

DS = Dermatánsulfato.

HS = Heparansulfato.

KS = Keratansulfato.

más adecuada para la identificación de GAGs, no obstante - que su uso requiere de determinadas condiciones considera- das como especiales, lo que ha significado que pocos labo- ratorios cuenten con esta metodología.

Electroforesis:

Muchas moléculas biológicas poseen grupos ionizables, que en disolución presentan una carga eléctrica, como ca- tiones (+), o como aniones (-). Cuando estos iones se so- meten a un campo eléctrico, se produce un desplazamiento - que los hace migrar a los polos de polaridad opuesta, es - decir, los cationes se van a trasladar al cátodo (-), y - los aniones al ánodo (+). Además aquellas moléculas que - poseen cargas similares, poseen distintas relaciones car- ga/masa; produciendo diferencias en el peso molecular, es- tas diferencias constituyen la base de la migración dife- rencial (10).

La velocidad a la que migran las moléculas depende - del equilibrio de la fuerza impulsora del campo eléctrico, sobre los iones de la muestra y las fuerzas de retardo de estas moléculas migrantes, y el medio circundante (princi- palmente fricción y electrostática). Se puede modificar- la velocidad de desplazamiento de un ión, cambiando tanto la distancia entre los electrodos, como el potencial eléc- trico. Si no existiera una fuerza de resistencia, los io- nes se acelerarían en el campo eléctrico; pero en virtud -

de la resistencia, alcanzan una velocidad constante (10,11).

La movilidad electroforética es directamente proporcional a la carga, e inversamente proporcional al tamaño de la partícula y a la viscosidad de la solución (11).

La distancia recorrida es directamente proporcional al tiempo de exposición del campo eléctrico en condiciones - - bien estandarizadas. Sin embargo, cuando varía la temperatura, la movilidad también varía; la temperatura produce un segundo efecto debido a la evaporación del buffer en el medio de soporte. El enfriamiento por convección puede variar en casos de voltajes bajos, pero en voltajes altos se requiere un medio de enfriamiento eficaz (11).

El material (a separar), debe estar disuelto en una solución buffer o amortiguadora para que tenga efecto la electroforésis y esta solución no debe de reaccionar con las moléculas que se estudian; el medio de soporte también debe estar saturado con la solución, para que pueda conducir la energía eléctrica. La corriente entre los electrodos es conducida por la muestra, por los iones del buffer en disolución y el resto de la corriente en el circuito es conducida por los electrones. La corriente se mantiene en todo el circuito, al tener lugar la electrólisis en los electrodos; éstos se encuentran separados pero se conectan mediante los puentes de papel filtro (10,11).

El campo eléctrico se suspende antes que los iones de la mezcla-muestra alcancen los electrodos, los componentes de la mezcla se separan según sus movibilidades electroforéticas, por lo tanto la electroforé*si*s es una forma incompleta de electrólisis (10).

La versatilidad de la electroforé*si*s para separar moléculas con carga eléctrica, depende de que se lleve a cabo en un medio de soporte inerte y homogéneo; se necesita una fuente de poder, que origine una corriente constante (10).

La electroforé*si*s de alto voltaje (voltajes mayores de 200 volts), origina bandas bien definidas y la separación se realiza en un corto tiempo, pero produce un incremento de calor que debe ser controlado mediante un sistema de enfriamiento (10).

Existen distintos tipos de medios de soporte, pero el acetato de celulosa presenta adsorción mínima, permitiendo una clara separación de bandas (10).

Las sustancias al migrar forman zonas distintivas que se pueden detectar fácilmente mediante técnicas analíticas adecuadas (ejemplo, tinciones) (10,11).

OBJETIVOS

OBJETIVOS

1. Determinar los valores de GAGs de la población normal.
2. Cuantificación de GAGs urinarios en pacientes con sospecha diagnóstica de Mucopolisacaridosis.
3. Caracterización de GAGs urinarios mediante electroforesis, en pacientes con niveles elevados.
4. Determinar la importancia y utilidad de la caracterización de GAGs en el diagnóstico diferencial.

MATERIAL Y METODOS

[Faint, mostly illegible text, likely bleed-through from the reverse side of the page. The text is arranged in several columns and appears to be a detailed description of materials and methods used in a study.]

MATERIAL Y METODOS

Para llevar a cabo este estudio, se colectaron 53 muestras de individuos normales y 24 con sospecha diagnóstica de MPSs. El grupo de normales se dividió en subgrupos:

1. Subgrupo A, de 1-16 años; (n=19).
2. Subgrupo B, de 17-66 años; (n=12).
3. Subgrupo C, recién nacidos (RN); (n=22).

Las muestras de RN fueron tomadas al azar del hospital de Gineco-Obstetrica del Centro Médico de Occidente del IMSS y los otros subgrupos fueron personas voluntarias de la población general. El grupo problema fué captado en la consulta externa de Genética de los Hospitales de Pediatría y Especialidades del CMO, IMSS. Las muestras fueron filtradas y se conservaron a -20°C hasta su procesamiento.

Se cuantificarán los GAGs de orina por medio del método de Gold (7); estimando las concentraciones en cantidades micrográmicas, que fueron expresadas como mg/ml. Este procedimiento se basa en las diferentes absorciones espectrales del colorante azul de alciano y el complejo GAGs-azul de alciano.

Siendo el azul de alciano un colorante catiónico, forma complejos insolubles con los GAGs en condiciones óptimas; la cantidad de complejo formado es proporcional a la cantidad de GAGs en la solución. El complejo formado es disocia

do para recuperar los GAGs (12-14).

Los GAGs recuperados se identifican por electroforésis unidimensional en acetato de celulosa con buffer acetado de bario, a diferentes concentraciones de etanol (adaptación de la técnica de Cappelletti y Hopwood, con modificaciones (6,8). (Figura 3).

Se realizará electroforésis de los estándares de GAGs, para identificar la movilidad electroforética y conocer las mejores condiciones para el corrimiento electroforético, tanto en estándares como en muestras.

I. Cuantificación de GAGs.

A. Reactivos:

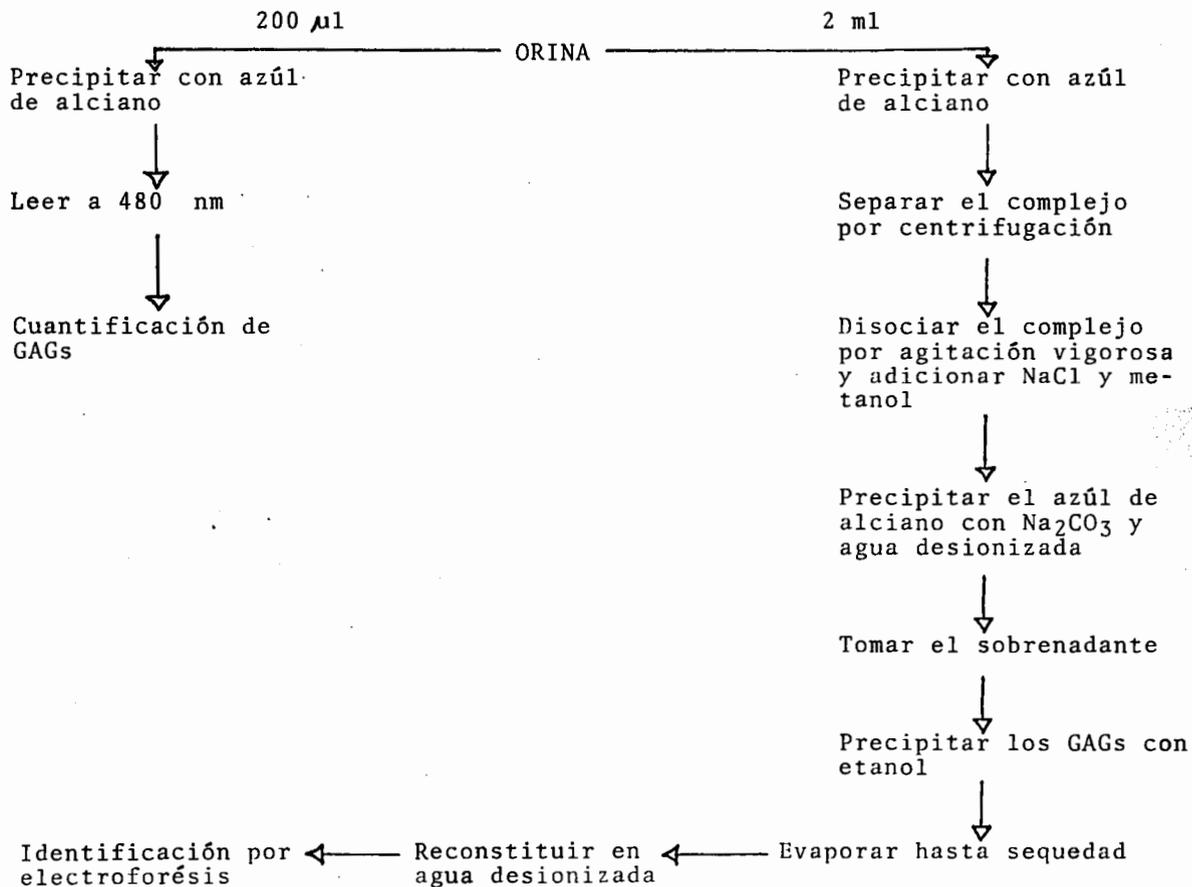
- a. Solución colorante: azul de alciano 8 Gx a - -
1 mg/ml en acetato de sodio 0.5 M.
- b. Solución stock: estándar condroitinsulfato - -
(Ch-S) a una concentración de 1 mg/ml, en agua desionizada.

B. Procedimiento:

- a. Para la elaboración de la curva patrón, se colocan 7 tubos marcados del 1-5 con disoluciones del estándar Ch-S, otro tubo marcado con blanco (Bco.) y el otro u otros con la solución problema (pb); se les adiciona solución stock, agua desionizada, orina y solución colorante, como -

Figura 3.

PROCEDIMIENTO PARA LA CARACTERIZACION Y CUANTIFICACION DE GLUCOSAMINOGLUCANOS (GAGs).



se muestra a continuación:

Tubos	1	2	3	4	5	bco.	pb
Solución stock (μl)	10	20	40	80	160	---	---
Agua des-ionizada (μl)	190	180	160	120	140	200	---
Orina (μl)	--	---	---	---	---	---	200
Solución Colorante	←-----				2.4 ml	-----→	

- b. Mezclar enérgicamente.
- c. Reposar 10 min. a temperatura ambiente.
- d. Leer a 480 nm (espectofotómetro PMQ-3 Zeiss y - celdilla rectangular de vidrio 1x1).
- e. Las lecturas obtenidas de cada muestra se interpolan con la curva patrón y se multiplican por - el factor 5 para convertir las concentraciones a mg/ml, ya que se toman 200 μl de orina.

II. Obtención de GAGs de orina para electroforésis:

A. Reactivos:

- a. Azú1 de alciano 8 Gx a 0.05% (P/V) en cloruro de magnesio 50 mM. Ajustado a un pH de 5.8 con ácido acético.
- b. Cloruro de sodio (NaCl) 4 M.
- c. Carbonato de sodio (Na_2CO_3) 0.1 M.

B. Procedimiento:

- a. 2ml de orina se mezclan con 10 volúmenes de azú1

- de alciano. Reposar 2 hr. a temperatura ambiente.
- b. Centrifugar a 2000 g por 15 minutos, el precipitado es el complejo GAGs-azul de alciano.
 - c. Disociar el complejo por agitación vigorosa y la adición de 60 μ l de NaCl-metanol (2:1 V/V).
 - d. Precipitar el azul de alciano libre, adicionando 20 μ l de Na_2CO_3 y 60 μ l de agua desionizada.
 - e. Reposar por 30 minutos a temperatura ambiente y centrifugar a 3500 g por 15 min. para remover el azul de alciano.
 - f. Recuperar el sobrenadante (aproximadamente 0.1-ml), en el cual se encuentran los GAGs.
 - g. Precipitar los GAGs adicionando 0.4 ml de etanol.
 - h. Centrifugar a 3500 g por 15 minutos y desecar el sobrenadante.
 - i. Recuperar el precipitado en 20-40 μ l de agua desionizada.

III. Electroforésis para la identificación de GAGs:

A. Reactivos y material:

- a. Buffer acetato de bario 0.1 mol/L. Ajustado a un pH de 5 con ácido acético.
- b. Buffer acetato de bario 1 mol/L. Ajustado a un pH de 5 con ácido acético.

- c. Buffer acetato de bario 0.1 mol/L, con un pH de 5. Con 15% de etanol.
- d. Buffer acetato de bario 0.1 mol/L, con pH de 5. Con 50% de etanol.
- e. Estándares de DS, HS, Ch-6-S, Ch-4-S, KS, Hep.- y ácido hial., a una concentración de 1 mg/ml - en agua desionizada.
- f. Solución acuosa de azul de alciano a 0.25% (en agua desionizada).
- g. Acido acético a 0.18 mol/L.
- h. GAGs obtenidos de orina de pacientes.
- i. Placa o membrana de acetato de celulosa (sepraphore X ó titán III)
- j. Cámara de electroforesis fabricada en el Depto. de Diseño (el diseño fué propuesto por el laboratorio de Bioquímica III de la División de Genética), la cual se describirá más adelante.
- k. Papel camag NN para electroforesis.
- l. Fuente de poder camag: Power suply.
- m. Multiaplicador (Helena laboratories).

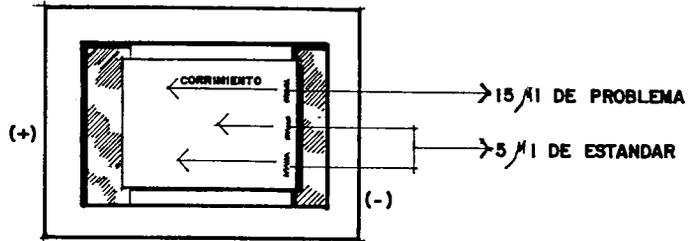
B. Método:

- a. Marcar en la membrana de acetato de celulosa una línea de aplicación, a una distancia de un centímetro de uno de los bordes; cuidando de no desprender la capa de celulosa.
- b. Humedecer la membrana en buffer acetato de bario 0.1 mol/L, con pH de 5.

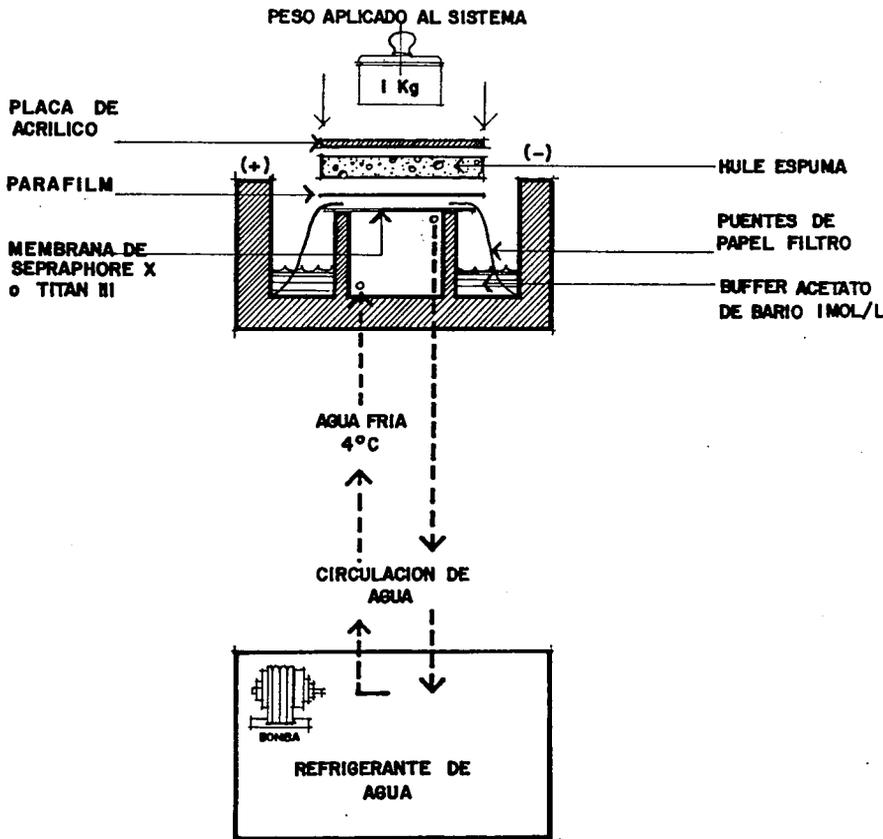
- c. Aplicar 5 μ l de estándares de GAGs, como control y 15 μ l de la muestra problema, a lo largo de la línea de aplicación.
- d. Realizar el siguiente montaje (Figura 4):
 1. Colocar la membrana de acetato de celulosa con la línea de aplicaciones al lado del polo negativo.
 2. Poner los puentes de papel filtro a los extremos de la membrana, aproximadamente a 0.5 cm de su borde, cuidando de no tocar la línea de aplicación.
 3. Colocar sobre esto una lámina de parafilm, posteriormente un hule espuma de 1.5 ó 2 cm de grueso y un poco más grande al tamaño de la membrana.
 4. Posteriormente aplicar la presión correspondiente; en cada corrimiento realizar este montaje electroforético.
- e. Correr electroforé debate en buffer acetato de bario a pH de 5, por 15 minutos a 200 volts (V) y manteniendo una temperatura constante de 4°C.
- f. Suspender el corrimiento y sumergir la membrana en acetato de bario 0.1 mol/L, a pH de 5 con 15% de etanol, durante dos minutos y quitar el exceso de buffer con papel filtro.
- g. Correr electroforé debate por 30 minutos en buffer acetato de bario 1 mol/L a pH=5, a 200 V y man-

MONTAJE PARA LA ELECTROFORESIS

VISTA SUPERIOR



VISTA LATERAL



- teniendo una temperatura constante de 4°C.
- h. Suspender el corrimiento y sumergir la membrana en acetato de bario 0.1 mol/L a pH=5 con 50% de etanol durante dos minutos y quitar el exceso de buffer con papel filtro.
 - i. Correr electroforésis en acetato de bario 1 - - mol/L a pH=5, por 10 minutos a 200 V y mante--- niendo una temperatura constante de 4°C.
 - j. Suspender el corrimiento y teñir la membrana en solución acuosa de azul de alciano a 0.25%, durante 15 minutos.
 - k. Enjuagar la membrana con agua desionizada y desteñir en ácido acético 0.18 mol/L.

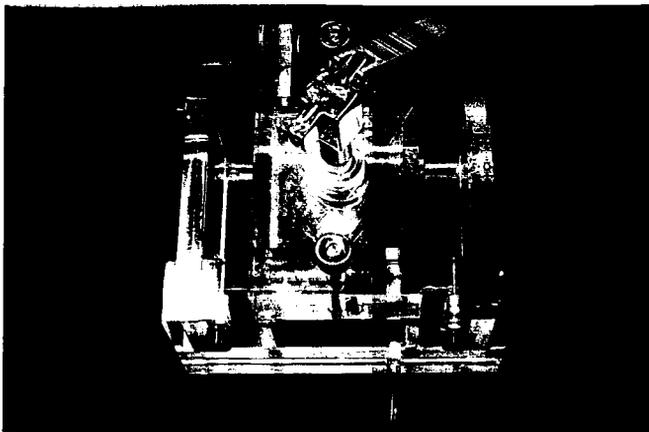
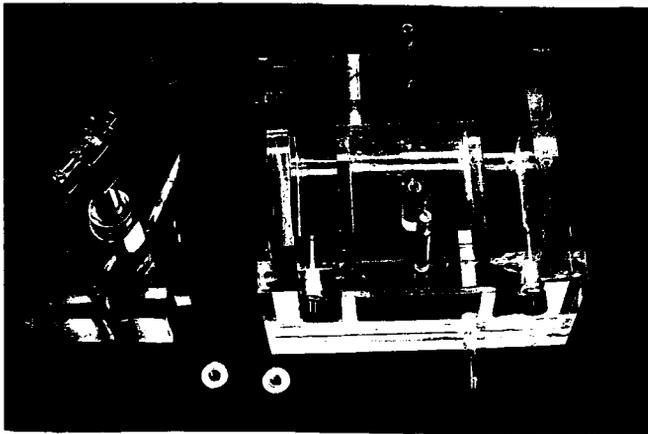
Descripción de la cámara de electroforésis:

Para llevar a cabo la técnica de electroforésis, se di señó una cámara que fué fabricada con acrílico y sellada - con cloroformo; tiene una dimensión de 12x14 cm y una altura de 7 cm (Figura 5).

Consta de una cámara central por donde está circulando 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 utilizarse altos voltajes (200 V), se produce un exceso de calor que al evaporar la solución buffer, seca la membrana de acetato de celulosa, e interrumpe la electroforésis.

Figura 5.

CAMARA DE ELECTROFORESIS



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 un lado al polo positivo y otro al lado negativo, éstos se identifican por el color rojo y negro.

Además, contiene un aditamento especial para dar la presión necesaria a la membrana donde se aplicaron 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 electroforésis y sirve para fijarse con unos tornillos; esta placa en la parte central contiene una flecha roscada que al girarse da la presión requerida de 1 Kg/cm^2 . 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.

RESULTADOS

RESULTADOS.

Estandarización de la metodología para la cuantificación de GAGs:

Se realizaron una serie de determinaciones espectrofotométricas (10, 20, 40, 80, 160 μ l), para la elaboración de la curva patrón.

En la figura 6 se muestra la curva patrón (los puntos representan el promedio de tres determinaciones), que se utilizó para determinar la concentración de GAGs en orina de individuos normales y pacientes; cabe mencionar que cada vez que se cuantifican los GAGs, se realiza la curva patrón. Es evidente que existe una relación lineal entre la concentración del estándar Ch-S y su absorbancia a una longitud de onda de 480 nm.

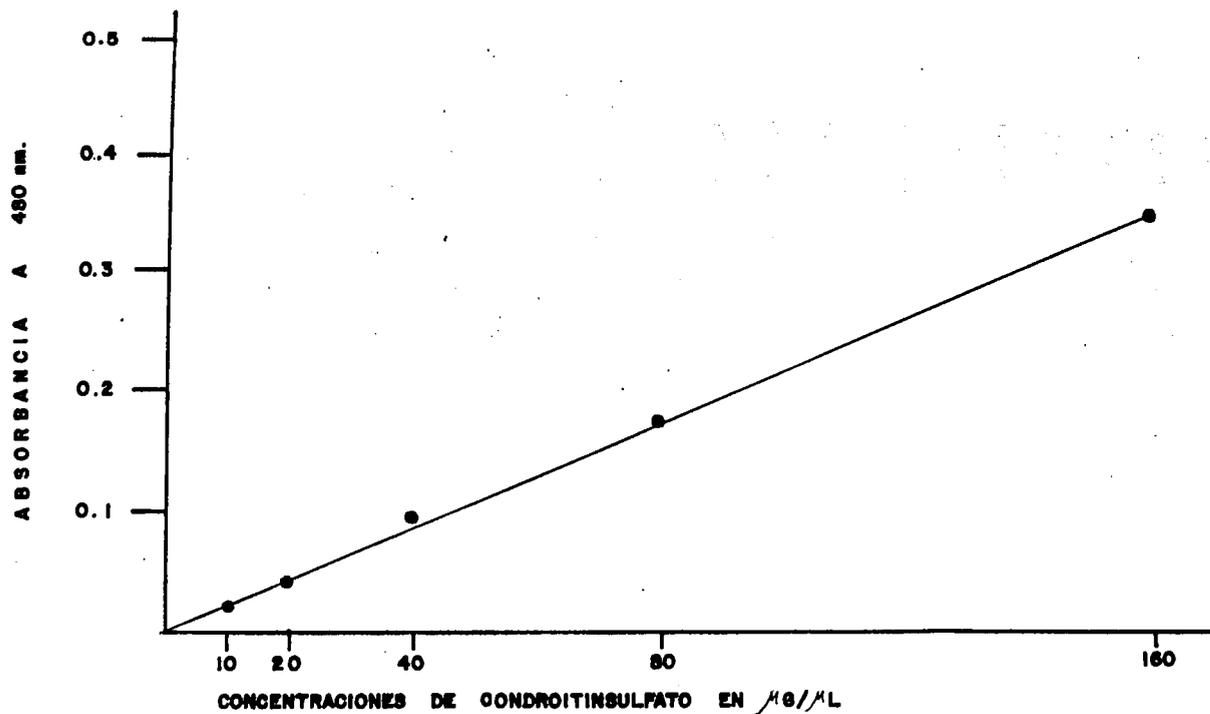
Para convertir las lecturas del espectrofotómetro (dadas como absorbancia) a mg/ml, se transpolan los valores de la curva patrón y se multiplican por el factor 5, ya que se toman 200 μ l de cada muestra, o bien, los valores se pueden convertir por medio de la siguiente fórmula:

$$\text{Problema mg/ml} = \frac{\text{Absorbancia problema}}{\text{Absorbancia estándar}} \times [\text{estándar}] \times 5$$

Estandarización de la metodología para electroforesis:

El diseño de la cámara de electroforesis tuvo grandes-

CURVA PATRON PARA LA DETERMINACION DE GLUCOSAMINOGLUCANOS



ventajas para el corrimiento electroforético, ya que el sistema de enfriamiento controló perfectamente la evaporación. En algunas ocasiones que no se mantuvo constante la temperatura, los estándares se diseminaron en la membrana de acetato y no fué posible identificarlos. Otra ventaja es el compartimiento de los espacios laterales de la cámara que son tan reducidos y el volumen de solución buffer utilizado para el corrimiento electroforético es muy pequeño (aproximadamente de 25 ml) y por tanto más económico.

La presión aplicada al sistema es uniforme, logrando que la membrana se mantenga saturada con la solución buffer y que esta solución se conduzca uniformemente a través de este medio.

El uso del multiaplicador dió mejores resultados que la micropipeta, ya que en el primero, la aplicación es de un μ l, evitando que el estándar o problema se disperse y dando en consecuencia bandas bien definidas que facilitan su identificación.

Se realizó electroforesis de los estándares de GAGs, se aplicaron 3 μ l en la membrana de acetado de celulosa (Sepraphore X) de cada uno de los estándares que estaban a una concentración de 1 mg/ml; la movilidad electroforética o relación de frente fué la siguiente:

Estándares	Relación de frente
Hep	0.026
Hs	0.346
DS ₁	0.044
DS ₂	0.120
Ac hial	0.386
Ch-4-S	0.533
Ch-6-S	0.600
KS	0.660

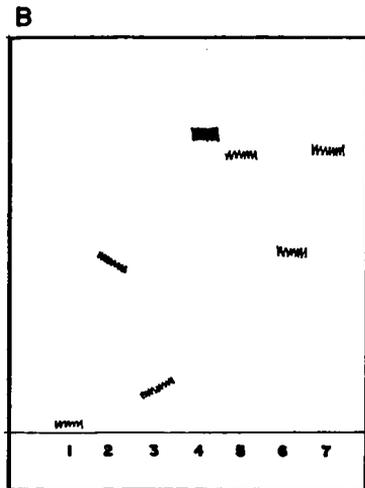
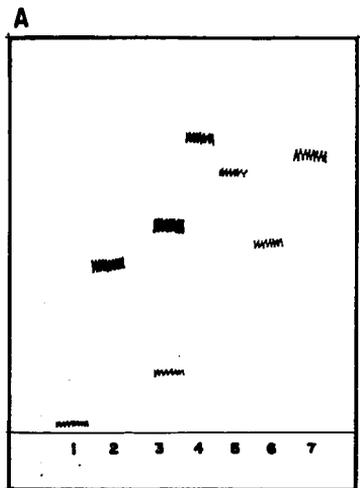
En la primer electroforésis, el DS se separó en sus dos componentes DS₁ y DS₂; aunque el DS₂ y el ác.hialuróni- presentan una migración similar, este último migra de 1 a 3 mm menos que el DS₂ (8). La migración de los estándares - fué confirmada con un segundo experimento, resultando la - misma relación de frente para cada uno de ellos, dándose - condiciones similares en ambas electroforésis (figura 7).

La figura 8 muestra los niveles de concentración de - GAGs urinarios del grupo control y problema; el subgrupo A- y B presentaron valores semejantes; en cambio el C mostró - una gran dispersión con un valor máximo de 0.805 mg/ml y un valor mínimo de 0.030 mg/ml.

Del grupo problema (n=24) sólo 15 pacientes presenta-- ron niveles elevados de GAGs (mayores de 0.204 mg/ml), ver- figura 8. Estos valores se confirmaron por lo menos dos ve- ces y aunque no fueron constantes, se mantuvieron por enci-

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS
 ACERCA DEL COMPORTAMIENTO DE LAS
 AGUIJAS DE LOS ANILAS

REPRESENTACION ESQUEMATICA DE LA MOVILIDAD ELECTROFORETICA DE LOS ST DE GAGs.



1a ELECTROFORESIS

2a ELECTROFORESIS

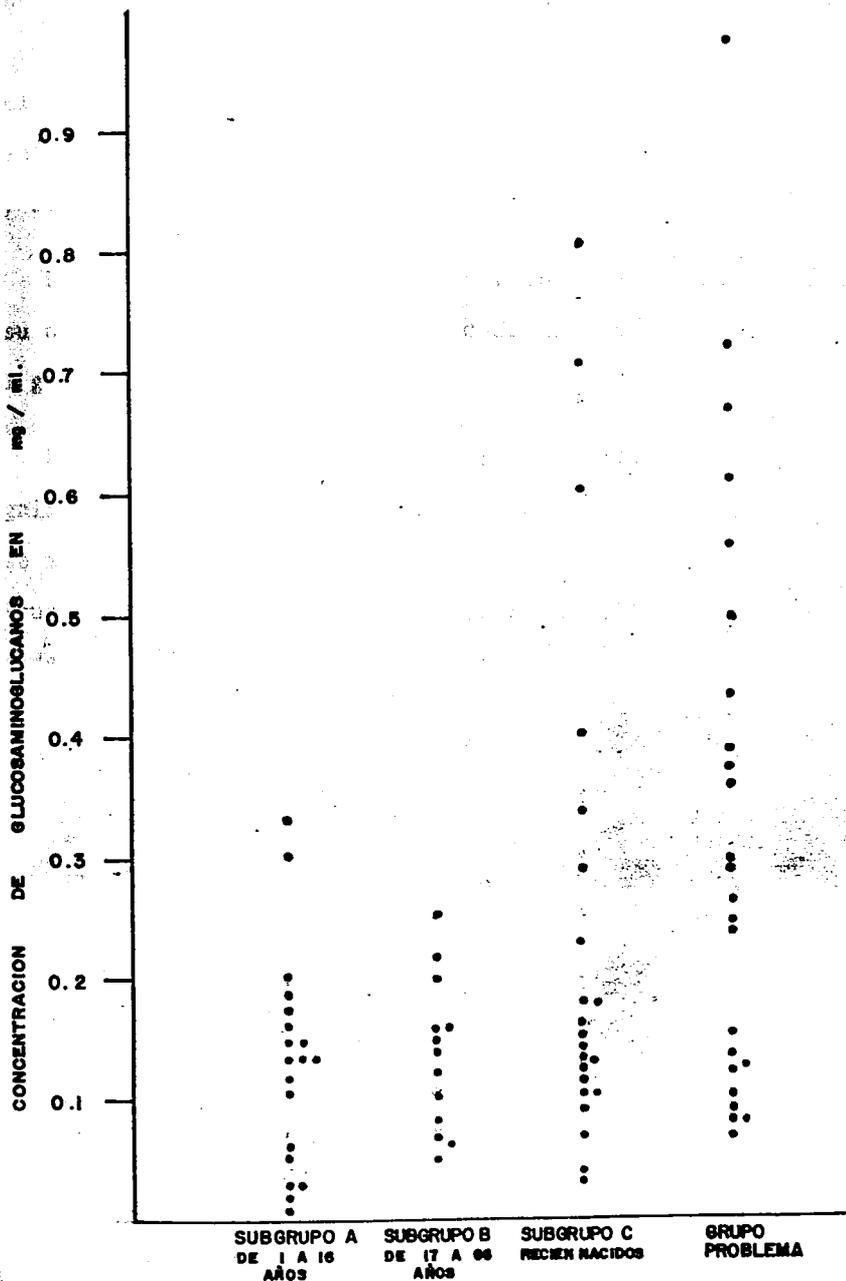
ST DE GAGs.

- 1 HEPARAN
- 2 HEPARANSULFATO (HS)
- 3 DERMATANSULFATO (DS)
- 4 KERATANSULFATO (KS)
- 5 CONDROITIN-4-SULFATO (Ch-4-S)
- 6 ACIDO HIALURONICO (AC. HIAL.)
- 7 CONDROITIN-6-SULFATO (Ch-6-S)

ST — ESTANDARES

GAGs — GLUCOSAMINOGLUCANOS

NIVELES DE CONCENTRACION DE GLUCOSAMINOGLUCANOS EN ORINA DE PACIENTES E INDIVIDUOS NORMALES.



ma de los límites normales, lo cual fué tomado como criterio para su estudio posterior (para fines de discusión, es este subgrupo es catalogado como problema 1). De los nueve-pacientes restantes del grupo problema, los resultados de-cuantificación fueron similares a los valores del subgrupo A y B, razón por la cual no se les practicó electroforé-sis.

En la tabla 4 se muestran los valores de la media (\bar{x}) y su desviación estándar (s), de cada uno de los subgrupos del grupo control y problema.

Para saber si existen diferencias estadísticamente - significativas entre los diferentes subgrupos, en la tabla 5 se muestran los valores de las pruebas de Students (t) y ji-cuadrada (χ^2), con su respectiva probabilidad para cada uno de los subgrupos correspondientes.

Electroforé-sis de GAGs urinarios del grupo problema:

Sólo se practicó electroforé-sis a los 15 pacientes - del grupo problema que presentaron concentraciones eleva-das de GAGs urinarios y los resultados fueron los siguien-tes (tabla 6): en un paciente la fracción mayor fué DS y - las menores Ch-6-S, Ch-4-S y HS, sugiriendo un patrón de - excreción de la MPS tipo I; seis pacientes excretaron can-tidades elevadas de HS, modelo característico de la MPS ti-po III; en dos pacientes se detectaron cantidades simila--res de KS y Ch-S, correspondiendo al modelo de excreción - de la MPS tipo IV, tres pacientes presentaron incremento -

Tabla 4

VALORES PROMEDIO DE GAGs URINARIOS DEL GRUPO CONTROL Y PROBLEMA

Subgrupo	Edad (años)	n	\bar{X} (mg/ml)	1 s
Control A	1-16	19	0.128	0.088
Control B	17-66	12	0.124	0.062
Control C	RN	22	0.236	0.213
Control A+B	1-66	31	0.126	0.078
Control A+B+C	RN-66	53	0.172	0.157
Problema 1	1-14	15	0.460	0.211
Problema 2	1-14	24	0.324	0.243

GAGs = Glucosaminoglucanos

RN = Recién nacidos

n = Número de muestra

\bar{X} = Media

s = Desviación estándar

GRADOS DE SIGNIFICANCIA ESTADISTICA DE LOS DIFERENTES SUBGRUPOS
DEL GRUPO CONTROL Y PROBLEMA

Subgrupo	t ó χ^2	Probabilidad
A vs B	0.1371	N.S.
A vs C	-2.0607	p 0.05
B vs C	-1.7699	N.S.
A vs Problema 1	-6.2206	p 0.001
B vs Problema 1	-5.3132	p 0.001
C vs Problema 1	-3.1483	p 0.001
A+B vs Problema 1	-7.8445	p 0.001
A+B+C vs Problema 1	-5.7914	p 0.001
A vs Problema 2	3.3397	p 0.01
B vs Problema 2	2.7873	p 0.01
C vs Problema 2	1.3009	N.S.
A+B vs Problema 2	4.2726	p 0.001
A+B+C vs Problema 2	3.2951	p 0.01

Controles:

A = de 1-16 años (n=19).

B = de 17-66 años (n=16).

C = Recién nacidos (n=22).

Problema 1 = Pacientes que presentaron niveles elevados de glucosaminoglucanos (n=15).

Problema 2 = Total de pacientes del grupo problema, sin considerar los niveles de glucosaminoglucanos (n=24).

PACIENTES CON MUCOPOLISACARIDOSIS DEL GRUPO PROBLEMA

Paciente	Diagnóstico clínico	Patrón electroforético	Cuantificación de GAGs urinarios mg/ml
1	MPS I	DS***, HS; Ch-4-S* y Ch-6-S*.	0.670
2	MPS III	HS** y Ch-4-S*	0.725
3	MPS III	HS***	0.968
4	MPS III	HS* y Ch-4-S*	0.247
5	MPS III	HS** y Ch-4-S*	0.370
6	MPS III	HS*** y Ch-6-S*	0.500
7	MPS III	HS* y Ch-6-S*	0.385
8	MPS IV	KS*, Ch-6-S** y HS (h)	0.430
9	MPS IV	KS*, Ch-4-S* y HS (h)	0.296
10	MPS VI	DS ₁ *, DS ₂ * y HS (h)	0.260
11	MPS VI	DS** y Ch-6-S*	0.365
12	MPS VI	DS**	0.557
13	MPS VIII	KS**, HS*** y Ch-4-S (h)	0.610
14	MPS VIII	KS*, HS** y Ch-4-S (h)	0.295
15	MPS VIII	KS**, HS* y Ch-4-S**	0.244

h = Huellas

* = Ligeramente elevados, cualitativamente en la membrana de electroforésis.

** = Moderadamente elevados, cualitativamente en la membrana de electroforésis.

*** = Marcadamente elevados, cualitativamente en la membrana de electroforésis.

de DS, patrón que corresponde a la MPS tipo VI; por último, tres pacientes que excretaron KS, HS y Ch-4-S, sugiriendo el modelo de expresión de la MPS tipo VIII. Todos los casos examinados por el laboratorio, fueron correlacionados con el diagnóstico clínico realizado por un médico genetista de la U.I.B.O., División de Genética IMSS.

Los resultados de electroforésis del grupo de pacientes estudiados permiten sugerir que la MPS tipo III, fué la más frecuente.

La figura 9 muestra la sensibilidad que tiene la electroforésis para identificar los tipos de GAGs excretados en orina de individuos normales y pacientes; las dos primeras aplicaciones corresponden a la orina de individuos normales, donde se distingue una banda muy leve que corresponde al Ch-S; la tercera aplicación corresponde a otro tipo de enfermedades de tejido conectivo (Síndrome de Marfán), donde muestra una mancha muy cargada que corresponde a Ch-6-S; la cuarta aplicación es de la orina procesada de un paciente que excretó grandes concentraciones de DS, menor concentración de Ch-6-S y Ch-4-S, y leves concentraciones de HS, correspondiendo a la MPS tipo I que fué confirmada clínicamente.

Figura 9.

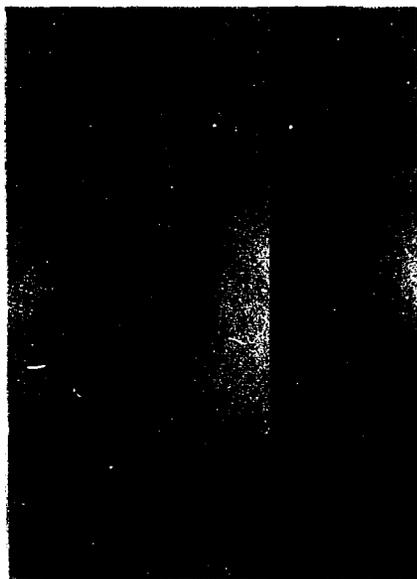
SEPARACION ELECTROFORETICA DE GLUCOSAMINOGLUCANOS
EN ORINA DE PACIENTES CON MUCOPOLISACARIDOSIS E
INDIVIDUOS NORMALES

Ch-6-S →

Ch-4-S →

HS →

DS →



1. Orina normal
2. Orina normal
3. Síndrome de Marfán
4. MPS tipo I Hurler/Scheie

Estándares:

5. Heparánsulfato (HS) y dermatánsulfato (DS)
6. Condroitínsulfato (Ch-S)
7. Condroitín-4-sulfato (Ch-4-S)

DISCUSION

La cuantificación y caracterización de GAGs ha sido por mucho tiempo difícil de efectuar, donde se han utilizado métodos fotométricos, cuyos resultados son expresados in directamente como ácido hexurónico (ác. urónico), mientras que en la caracterización se utiliza cromatografía de inter cambio iónico con columnas no fáciles de montar en laborato rios convencionales. Por esta razón, decidimos implementar la metodología aquí descrita, cuyos resultados permiten establecer su reproducibilidad y su aceptación, como método de diagnóstico de fácil implementación.

Para realizar la curva patrón, se utilizó condroitín-sulfato como estándar, ya que éste se encuentra presente en la orina de individuos normales en mínimas cantidades. También se utilizó orina en lugar de cualquier otro fluido biológico, porque la mayoría de los pacientes estudiados son niños y es difícil la obtención de cualquier otro tipo de muestra.

Consideramos que los resultados de cuantificación fueron confiables, ya que la determinación repetida de un mismo paciente nos dieron concentraciones muy similares y además, éstas fueron semejantes a las que reportó Gold en 1979 (7); cuyos niveles de cuantificación de GAGs urinarios, fueron de 0.105 ± 0.035 mg/ml y nuestros resultados fueron de 0.126 ± 0.078 mg/ml, en pacientes con edades de 1-66 años -

(n=31). Debido a que Gold no describe las edades promedio, ni el número de sus pacientes, no podemos establecer una correlación estadística.

Para la electroforésis se diseñó una cámara especial - que entre muchas ventajas tiene un reducido espacio para el buffer de corrimiento, lo que permite utilizar un menor volumen y en consecuencia, economizar. En las cámaras electroforéticas convencionales, el espacio de los compartimientos de los electrodos es muy grande, utilizando mayores volúmenes para la solución buffer.

El peso aplicado al sistema está contenido en la tapa de la cámara previamente calibrada, cuya presión ejercida - corresponde a un Kg/cm^2 . Esto permite tener una mayor uniformidad en el corrimiento de la muestra.

El multiaplicador es muy práctico, ya que en una ocasión se aplican ocho muestras, ésto agiliza el proceso de aplicación, el cual es de un μl , cantidad que evita que la muestra se disemine originando una mancha más nítida que fácilmente puede ser identificada. De esta forma se estandarizó la electroforésis y se reconoció la movilidad electroforética de cada uno de los estándares.

La concentración de GAGs urinarios fué similar en el subgrupo A y B, como se demostró estadísticamente. En el subgrupo C (reción nacidos), los valores de concentración de GAGs urinarios presentaron una gran dispersión (figura 8)

por nuestra parte, desconocemos el motivo de la dispersión tan grande de valores. Sin embargo, se sabe que a mayor edad del individuo, los valores de GAGs urinarios decrecen (16); por tal motivo los valores obtenidos en este subgrupo no se consideraron para obtener el valor normal de GAGs urinarios.

Comparando los valores promedio de A entre B, como ya se mencionó anteriormente, no muestran diferencias estadísticamente significativas; sugiriendo que los resultados son similares. El subgrupo B con respecto al C, no muestran diferencias estadísticamente significativas, aún cuando sus medias son muy distintas y se esperaría diferencias estadísticas, sin embargo, creemos que esto se debió al número de individuos (n=12) del subgrupo B, que es pequeño con relación al C (n=22); posiblemente si se aumentara la muestra del subgrupo B, creemos que la diferencia sería significativa. El subgrupo A con relación al C, sí mostró diferencias significativas, esto era lo esperado, ya que los valores del subgrupo C son muy elevados.

Del grupo problema (n=24), sólo 15 pacientes tuvieron niveles elevados de GAGs urinarios (tomando en cuenta como valores normales, la media de los subgrupos A+B que fue de 0.126 ± 0.078 mg/ml) y esto se tomó como criterio para su estudio posterior. Los nueve pacientes restantes estuvieron dentro de los límites normales y no se les practicó electroforesis, además, la evaluación clínica posterior en-

4 de ellos, descartó la posibilidad de una MPSs (un paciente presentó síndrome de Wiedemann-Beckwith, otro síndrome -cardiocraneofacioesquelético, otro una displasia esquelética espondiloepifisiaria tipo pseudomorquio I y otro donde -aún no se conoce la causa de retraso psicomotor); en cinco-pacientes restantes de los nueve, no se pudo concluir el -diagnóstico, ya que uno falleció y los otros cuatro dejaron de asistir a la consulta externa de Genética y no se tuvo -seguimiento de ellos. De lo anterior, para fines de discu-sión, el grupo problema fué dividido en dos: problema 1 (pa-cientes que presentaron niveles elevados de glucosaminoglu-canos en orina), n=15 y problema 2 (total de pacientes del-grupo problema, sin considerar los niveles de glucosamino--glucanos), n=24.

Los resultados obtenidos de la cuantificación en los -diferentes subgrupos (A, B, C, A+B, A+B+C), mostraron dife-rencias estadísticamente significativas con relación al pro-blema 1; con respecto al problema 2, todos los subgrupos se ñalados anteriormente, excepto el C, mostraron diferencias-estadísticamente significativas (ver tabla 5).

El método electroforético que utilizamos, identificó -con precisión el producto o los productos excretados; de es-ta forma el diagnóstico clínico se confirmó clínica y labo-ratorialmente, ya que en ocasiones es difícil diferenciar -una MPSs de otra, porque presentan rasgos muy similares. -Sin embargo el diagnóstico preciso debe ser establecido me-

diante la cuantificación de la enzima involucrada, metodología no disponible en estos momentos en nuestra ciudad.

CONCLUSIONES

Los valores de concentración de GAGs urinarios en el subgrupo A (1-16 años), fueron de 0.128 ± 0.088 y en el subgrupo B (17-66 años), de 0.124 ± 0.062 mg/ml; considerando al subgrupo A y B como grupo control podemos decir que los valores normales de concentración de GAGs urinarios son de 0.126 ± 0.078 mg/ml en individuos de 1 a 66 años. En el grupo de recién nacidos, los valores de GAGs urinarios no pueden ser considerados dentro del grupo control, ya que presentan una gran dispersión, con un promedio de 0.236 ± 0.213 mg/ml.

La cuantificación de GAGs urinarios permitió hacer una selección adecuada de los pacientes con mucopolisacaridosis y nos dió una estimación global de la excreción de GAGs en orina, ya que no podemos reconocer cuáles se excretan. De 24 pacientes que fueron enviados con sospecha de MPSs, sólo 15 presentaron glucosaminogluconuria (excreción excesiva de GAGs en orina); característica no exclusiva de las MPSs, ya que existen otras enfermedades de tejido conectivo que excretan cantidades excesivas de GAGs, pero en este caso todos los pacientes que estudiamos fueron enviados con sospecha diagnóstica de MPSs.

Se practicó electroforésis a los 15 pacientes que presentaron niveles elevados de GAGs; los resultados obtenidos de esta prueba permiten concluir que la MPS tipo III es la-

más frecuente en nuestro estudio.

La electroforé^sis es un método sensible que permite - identificar el tipo de GAGs excretados; apoyando así el diagnóstico diferencial, ya que se correlacionan los datos clínicos con los bioquímicos. Además, estos estudios son una - - guía para posteriores estudios enzimáticos (metodología no - disponible en estos momentos en nuestra ciudad).

Aunque actualmente no existe tratamiento para las MPSS, el diagnóstico clínico es particularmente importante, ya que el pronóstico del paciente dependerá del diagnóstico y el - asesoramiento genético será más adecuado.

BIBLIOGRAFIA

1. Sly WS: The mucopolysaccharidoses. In: Bondy P., Rosenberg L. Metabolic control and disease. 9th Ed. W.B. Saunders Company. pp 545-581, 1980.
2. Martin DW: Glucoproteínas, proteoglicanos y glucosaminoglicanos. En: Martin DW, Laves PA, Rodwell VW. Bioquímica de Harper. 6a. Ed. El Manual Moderno. Pág. 448-464,
3. Caplan AI: El cartílago. Investigación y Ciencia. Dic. 99: 48-57, 1984.
4. Bornstein P.: Disorders of connective tissues. In: Bondy P., Roserberg L. Diseases and Metabolims. Genetic and Metabolism. 7th Ed. W.B. Saunders Company. pp 881-935, 1974.
5. Mckusick VA, Neufeld EF: The mucopolysaccharide storage diseases. In: Stanbury JB, Wyngaarden JB, Fredrickson DS, Goldstein JL, Brow MS. The Metabolic Basis of Inherited Disease. 5th Ed. McGraw Hill Book Company. pp. 751-777, 1983.
6. Cappelletti R, Rosso M. and Chiarugi VP: A new electrophoretic method for the complete separation of all kown animal glycosaminoglycans in monodimensional run. Analitical Biochemistry 99:311-315, 1979.
7. Gold EA: A simple espectrophotometric method for stimating glycosaminoglycans concentrations. Analitical Biochemistry 99: 183-188, 1979.

8. Hopwood JJ, Harrison JR: High-resolution on electrophoretic urinary glycosaminoglycans: an improved screening tests for the mucopolysaccharidosis. *Analytical Biochemistry* 119: 120-127, 1982.
9. Mckusick VA: *Trastornos Hereditarios del Tejido Conjuntivo*. Edit. Labor. 1976.
10. Williams B., Wilson K: *Principios y Técnicas de Bioquímica Experimental*. 1a. Ed. Omega. Pág. 98-135, 1981.
11. Rendina G. *Técnicas de Bioquímica Aplicada*. 2a. Ed. Interamericana. Pág. 37-45, 1974.
12. Whiteman P.: The quantitative determination of glycosaminoglycans in urine with alcian blue 8 Gx. *Biochemistry Journal*. 131: 351-357, 1979.
13. Whiteman P.: The quantitative measurement of alcian blue-glycosaminoglycans complexes. *Biochemistry Journal*. 131: 347-350, 1979.
14. Whiteman P., Young E.: The laboratory diagnosis of sanfilippo disease. *Clinica Chimica Acta*. 76: 139-147, 1977.
15. Henry RJ, Mason WB: *Photometry and spectrophotometry*. In Henry R., Cannon D., Winkelman J.: *Clinical Chemistry: Principles and Technics*. Bio-science labor laboratories. pp. 1-47, 1980.
16. Huang KC: Glycosaminoglycans excretion in random samples of urine. *Clinica Chimica Acta*. 151 (2): 141-146, 1985.



UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA
FACULTAD DE CIENCIAS

Expediente
825/88
Número

SRITA, MARIA DEL ROSARIO RON CORTES
P R E S E N T E , -

Manifiesto a usted que con esta fecha ha sido -
aprobado el tema de Tesis "CARACTERIZACION ELECTROFORETICA-
DE GLUCOSAMINOGLUCANOS URINARIOS, EN PACIENTES CON MUCOPOLI
SACARIDOSIS" para obtener la Licenciatura en Biología.

Al mismo tiempo informo a usted que ha sido ---
aceptado como Director de dicha Tesis el Dr. Guillermo Pérez
García.

A T E N T A M E N T E
"AÑO ENRIQUE DIAZ DE LEON"
"PIENSA Y TRABAJA"
Guadalajara, Jal., Julio 8 de 1988



El Director

Dr. Carlos Astengo Osuna

FACULTAD DE CIENCIAS

El Secretario

Ing. Adolfo Espinoza de los Monteros Cárdenas.

c.c.p. El Dr. Guillermo Pérez García, Director de Tesis.-Pte.
c.c.p. El expediente de la alumna.

Al contestar este oficio citese fecha y número

Guadalajara, Jal., Junio 22 de 1989

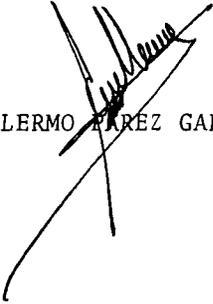
ING. ADOLFO ESPINOZA DE LOS MONTEROS
Director de la Facultad de Ciencias
de la Universidad de Guadalajara
P r e s e n t e.

Señor Director:

Por la presente informo a usted que he revisado la tesis titulada CARACTERIZACION ELECTROFORETICA DE GLUCOSAMINO-GLUCANOS URINARIOS EN PACIENTES CON MUCOPOLISACARIDOSIS, presentada por la pasante de la carrera de Licenciado en Biología, MARIA DEL ROSARIO RON CORTES, la cual apruebo para que se imprima y se someta a examen, puesto que la considero adecuada para ello.

Sin otro asunto que tratar, me despido de usted

A t e n t a m e n t e:


DR. GUILLERMO PÉREZ GARCÍA