

Histidinuria en Embarazos Normales y Patológicos

(Presentación de una técnica Fotocolorimétrica)

Reporte preliminar.

Julio Ospina Archila * —José M. Barreiro.—Beatriz Colmenares

La Histidina es un ácido aminado que se encuentra normalmente en la orina humana. Desde 1908, cuando England logró extraerla de la orina humana, es mucho lo que se ha avanzado a este respecto.

Está demostrado que la Histidinuria normal tiene fluctuaciones cotidianas importantes. Según Camous (1) el régimen alimenticio tiene alguna influencia ya que una alimentación rica en proteínas puede favorecer el aumento de la Histidina. Soupart (2) en 1944, en mujeres no embarazadas encontró valores comprendidos entre 28 y 176 mgrs. en las 24 horas.

El embarazo fisiológico se acompaña de aumento de la excreción de casi todos los aminoácidos esenciales. Entre éstos, la histidina es muy importante, como fué demostrado por Honda Misao en 1927, siendo Vogue (1) en 1929 el primero en usar la Histidinuria como prueba química para el diagnóstico del embarazo.

A partir de 1933 en que Kapeller-Adler mejora el método de bromuración, se ha trabajado bastante a este respecto, siendo los métodos más recientes, el de Carson Seaks (1948) y Cheval y Hans (1949).

* Jefe Laboratorio Caja Nacional de Previsión.

La investigación de Histidinuria como prueba química de embarazo ha sido muy discutida; Cheval y Hans (3) en un detenido estudio observan que si se hace con las debidas condiciones se puede obtener un 95,8% de resultados positivos exactos. Merkel (4) en un estudio comparativo de las pruebas químicas para el diagnóstico del embarazo (1950), concluye que la prueba de histidina tiene errores que la hacen inexacta y que no puede aplicarse clínicamente. Fabiano y Lanza en 1952, hacen notar que en los casos de toxemia, la histidina desaparece de la orina, considerando esto como causa de error de la prueba. Sin embargo, en los últimos días, se ha dado un gran valor a la prueba de histidinuria como método de control de la gestación, habiéndose observado que la disminución de dicha eliminación o su ausencia, es un síntoma precoz de la toxemia, que se presenta antes de cualquier otro síntoma como hipertensión, albuminuria, etc.

Las pruebas usadas para el diagnóstico de histidinuria, son semicuantitativas y en ellas el resultado se expresa por cruces, dependiendo su interpretación del juicio del laboratorista. El objeto de este trabajo es presentar una técnica fotocolorimétrica consistente en la aplicación de un patrón a la prueba de Carson Seaks, usando los reactivos de CPT Laboratories de Dayton Ohio, con la cual se puede presentar una lectura "estandarizada" y apreciar las variantes que puedan presentarse.

Estudiamos un total de 93 casos de mujeres embarazadas, con una evolución de 3 a 9 meses. 49 casos de embarazos normales y 44 pacientes del servicio de Toxemias de la Clínica Primero de Mayo y de la Clínica de la Providencia de esta ciudad.

El hecho de que la Histidina sea un elemento normalmente presente en la orina, en cantidades variables, podría a primera vista, parecer suficiente para rechazar la idea de que la investigación de excreción por la orina pudiera servir para establecer un diagnóstico de embarazo.

Sin embargo, todos los estudios practicados han demostrado que la Histidinuria puede proporcionar datos interesantes para el clínico, si se observan algunas condiciones especiales entre las cuales podríamos anotar:

1) La orina debe tomarse siempre en ayunas habiendo efectuado la paciente una micción evacuadora 3 o 4 horas después de la última comida del día anterior.

2) Para evitar la interferencia de la Histidina normal se debe efectuar una dilución de la orina antes de efectuar la prueba.

3) Una tercera condición fijada por Chevel es la necesidad de usar una reacción que no sea demasiado sensible.

El metabolismo de la Histidina lo podemos resumir en la siguiente forma: (5) La I-Histidina se presenta en la naturaleza como un aminoácido esencial para el crecimiento y desarrollo normal. Aunque es un constituyente importante de las proteínas, se debe señalar que la placenta humana tiene más baja proporción de Histidina en las proteínas de su tejido, que de cualquier otro aminoácido. Estudios recientes muestran que la vía primaria de su catabolismo implica primero una ruptura con separación de un grupo alfa-amino, por la histidaza para formar el ácido Ulocónico, que por medio de la uroconaza, de una molécula de ácido L-Glutámico, ácido Fórmico y Amoniaco. Hay dos vías metabólicas posibles: Una oxidación mediante la oxidasa de l-aminoácidos para formar ácido Imidazol-Pirúvico, o una descarboxilación mediante la descarboxilaza de la Histidina para formar Histamina. La amplitud con que ocurren cada una de estas posibles vías de catabolismo en el cuerpo no se conocen. Una gran proporción de Histidina se utiliza seguramente en la síntesis de Proteínas y una proporción relativamente grande es excretada sin cambio alguno por la orina. Según Page (5) las causas posibles del aumento de Histidinuria en el embarazo teniendo en cuenta todos los mecanismos serían las siguientes:

- 1) Un aumento de la filtración Glomerular.
- 2) Una disminución en la reabsorción Glomerular.
- 3) Un aumento en la absorción intestinal.
- 4) Una disminución en el metabolismo por: a) aprovechamiento disminuído. b) destrucción más lenta o ambos.

Según los autores antes mencionados los factores 1 2 y 4 contribuyen a causar Histidinuria en el embarazo normal.

Existen pues varias hipótesis sobre la causa de la Histidinuria en el embarazo. La primera fue la de Kapeller Addler en 1935 quien supuso que la Histidaza hepática era inhibida por la gonadotropina coriónica. Dicho autor se basa en el hecho de haber encontrado reducida la actividad de la Histidaza en el tejido hepático, obtenido de autopsias de mujeres embarazadas y en la inhibición de las células hepáticas in vitro por la gonadotropina coriónica.

En 1943 Ernest Page y William Dignam (5) se opusieron a esta hipótesis basándose en el hecho de que la curva de aumento de excreción de Histidina seguía más bien la curva de aumento de las hormonas esteroideas y no la de la hormona coriónica. La histidinuria alcanzaba su máximo en el séptimo u octavo mes de embarazo, en lugar del primer trimestre (En el estudio practicado por nosotros observamos la cifra media más alta en el 6º y 7º mes: 0,769 y 0,766 grs. %₁₀₀ respectivamente) y declinaba durante las 2 o 3 semanas anteriores al parto.

En 1946 los mismos autores propusieron la hipótesis de que la Histidinuria era debida a un aumento en el coeficiente de la eliminación renal de la Histidina secundaria o una disminución del índice de reabsorción tubular.

El hecho de la disminución y desaparición de la Histidina en la orina en los estados toxémicos no está bien definido. Puede ser debida, tal vez, a una transformación de la Histidina en Histamina, debido a un proceso de descarboxilación tisular.

Por otra parte se sabe que experimentalmente la Histamina disminuye la presión arterial, aunque Starling piensa que pueda provocar hipertensión por exudación pericapilar, obliterando la luz de los capilares.

Se ha demostrado que la Histidina se encuentra frecuentemente en la orina durante la menstruación así como 2 o 3 días antes de que ésta empiece.

Según Cheval (6) la prueba de Histidinuria se hace positiva desde los 14 días de la gestación y su presencia permite afirmar que si la mujer no tiene su regla en los 3 días siguientes, está embarazada.

METODO USADO

Seguimos el método de Carson Seaks, usando los reactivos suministrados por C. P. T. Laboratories de Dayton Ohio.

Toma de la muestra.

A todas las pacientes se les ordenó no tomar sólidos ni líquidos después de las 6 p. m.; 3 o 4 horas después de la última comida efectuar una micción y desechar esta orina; recoger la primera muestra de la mañana en un recipiente limpio y usar este material para practicar la prueba.

Preparación del espécimen.

Con el objeto de evitar que la prueba revele Histidina en la orina de la mujer no embarazada, (1) se diluye dicha orina a una concentración bastante baja, de manera que la pequeña cantidad de Histidina que pueda encontrarse en estas circunstancias no se revele en la prueba. El grado de dilución se determina por el peso específico y por el pH, habiendo encontrado los autores que una prueba alcalina debe ser diluida con agua hasta que tenga densidad de 1.009 y una ácida hasta 1.005.

(6) Cheval y Hans dan la fórmula a este respecto colocando una gota de indicador de rojo de metilo (ácido-viraje al rojo, alcalina al amarillo) y aplicando una sencilla fórmula consistente en leer en el densímetro la densidad de la muestra, restando 5 de las dos últimas cifras de la densidad, siendo el número obtenido, el de c. c. de agua destilada que se debe añadir a 5 c. c. de orina para obtener densidad de 1.005. En el caso de orina alcalina, se restan 10 de la densidad y se añaden esos c.c. de agua destilada a 10 c.c. de Orina.

Para el caso, en la dilución nosotros usamos lo siguiente: 1) Colocamos 25 c.c. de Orina en un cilindro graduado, añadimos III gotas de reactivo Nº 1, el cual no es otra cosa que sol. de rojo de metilo, al agregar dicho reactivo se puede obtener color amarillo (orina alcalina) o color rojo (orina ácida); y tomamos la densidad con el hidrómetro de dilución suministrado por CPT, con cuyos reactivos y elementos elaboramos este trabajo.

Dicho hidrómetro tiene dos escalas, una con números negros y otra con números rojos. Si el color obtenido fué el amarillo, se lee en la escala negra y si es el rojo se lee en la escala roja.

Siguiendo las instrucciones de la mencionada casa, a 5 c.c. de orina se añade agua destilada hasta completar el volumen total indicado por el hidrómetro.

Tratamiento de la Orina.

El objeto de este tiempo es precipitar los fosfatos, nitritos y sólidos que pueda tener la orina.

Para ello, a 5 c.c. de orina diluída se añaden III gotas de reactivo N^o 2, que no es otra cosa que una sol. de Cloruro de Bario al 10%. Se añaden luego X gotas de reactivo N^o 3 y se mezcla, se añaden IV gotas de reactivo N^o 4. (Sol. de Permanganato de Potasio 0,1 N) de dos en dos hasta que el color rosado persista por medio minuto, se coloca luego la mezcla en Baño de María a 90 grados en ebullición durante varios minutos para obtener que las substancias interferentes se precipiten.

Dejamos enfriar, decantamos el líquido claro en un tubo y deseamos el precipitado.

Investigación de la Histidina.

A la muestra de orina, como lo indicamos antes, añadimos 1 c.c. de reactivo N^o 5, preparado de acuerdo con las instrucciones (sol. de Bromo recién preparada, Bromo N/50 en ácido acético al 33%). Agitamos, y colocamos con un agitador de vidrio, tico al 33%). Agitamos, y colocamos con un agitador de vidrio, una parte de la mezcla sobre un papel indicador (CS Test paper, papel impregnado de almidón y yoduro de Potasio de los CPT Laboratories) si no aparece color rojo púrpura por 10 minutos se añade otro 1/2 c.c. de reactivo y se chequea nuevamente hasta obtener persistencia del color por 10 minutos.

Añadimos III gotas de reactivo N^o 6 (Sol. de hiposulfito de sodio 0.1 N en sol. N de amoniaco) hasta obtener desaparición del exceso de Bromo, lo cual se comprueba por la no aparición del rojo púrpura con el Cs Test paper. En caso de producirse color rojo, se añade I o II gotas más de reactivo N^o 6.

Se añade luego medio c.c. de reactivo Nº 7 (sol. de Carbonato de amonio 3 gms. en 100 c.c. de amoniaco 2 N. El amoniaco utilizado es amoniaco oficial al 17% utilizando como sol. solvente dos partes de amoniaco y una parte de agua destilada).

Se lleva esta mezcla al Baño de María a 97 grados por dos minutos. Si la orina contiene Histidina, una coloración rojo púrpura o rosado intenso aparece. Si no se obtiene color se añaden V gotas más de reactivo Nº 7.

Modificación cuantitativa propuesta.

Una vez hecha la lectura en cruces, efectuamos una lectura inmediata en un Fotocolorímetro Klett usando filtro 54 (verde). Al tiempo con la prueba hacemos un patrón en la siguiente forma: preparamos una sol. de Histidina, usando ampollas de Histidini Hydrochlorici al 4% de los Laboratories Siegfried (1) la cual da un color similar al obtenido en la prueba clásica de Carson Saeks. Dicho patrón lo preparamos de la manera siguiente: hacemos una solución de Histidina diluida de tal manera que 5 c.c. de dicha sol. tuvieran 0,001 gms. de Histidina. A estos 5 c.c. de sol. les agregamos los reactivos para la búsqueda de la Histidina, como si se tratará de la muestra de orina hasta obtener el color rojo púrpura.

Aplicamos luego la fórmula general del colorímetro:

$$\frac{LI}{LP} \times \frac{VI}{VP} \times CP \times 1.000 = \text{gms. } \%$$

$$\frac{LI}{LP} \times \frac{5}{5} \times 0.001 \times 1.000 = \text{gms. } \%$$

$$\frac{LI}{LP} \times 1 = \text{gms. de Histidina } \%$$

(1) Después de varios ensayos con diferentes soluciones, fué esta calidad de producto, el único que nos dió garantía.

LI — Lectura incógnito. - LP — Lectura Patrón. - VI — Volumen incógnito. - VP — Volumen Patrón - CP — Concentración Patrón.

Debe efectuarse luego la corrección de acuerdo con la dilución de la orina problema.

Puede también calibrarse el colorímetro en la forma usual.

Resultados obtenidos.

En 3 cuadros y una gráfica presentamos los resultados obtenidos. Las cifras medias más altas se observaron en el sexto y séptimo mes de embarazo (0,769 y 0,766 respectivamente).

En los casos estudiados se observó que la Histidinuria aumenta hasta obtener su punto máximo en el sexto mes para luego bajar hasta obtener en el noveno mes una cifra sensiblemente igual a la inicial (3 meses).

La cifra más baja de los casos normales se obtuvo en un embarazo de 4 meses y la cifra máxima en un embarazo de 8 meses.

En los 44 casos estudiados con diagnóstico Clínico de Toxemia obtuvimos cifras de 0 en el 75%. En el 25% de los casos se obtuvo Histidinuria, con cifras medias inferiores a las obtenidas en los casos normales.

Los casos estudiados de toxemia en el sexto y séptimo mes de embarazo dieron una Histidinuria de 0.

En los casos de 8 meses el 76% de los casos dio 0 de histidinuria; en 24% de los casos se obtuvieron cifras de Histidinuria con una cifra media de 0,386 grs. ‰ notablemente más baja que la obtenida en embarazos normales de 8 meses de evolución (0,617 gramos ‰).

En los embarazos de 9 meses el 60% de los casos estudiados dio 0 grs. el 40% restante dió una cifra media de 0.406 grs. ‰ más baja que la obtenida en casos normales.

RESUMEN :

Se presenta un estudio en 93 pacientes con embarazos, 49 con embarazos normales y 43 con toxemias del embarazo, a quienes se practicó investigación de Histidinuria.

Se usó el método de Carson Seaks y reactivos suministrados por CPT Laboratories de Dayton Ohio, presentando una modificación a dicha técnica consistente en lectura fotocolorimétrica, usando un patrón de clorhidrato de Histidina v expresando los resultados en grs. ‰.

Se presentan los resultados obtenidos con dicha técnica, obteniendo en embarazos normales una cifra media máxima de 0,769 grs. ‰ en los casos de 6 meses de evolución.

En el 75% de los casos estudiados, en las Toxemias, no se observó Histidinuria. En el 24% restante se obtuvieron cifras inferiores a las obtenidas en casos normales.

SUMMARY :

Relatively simple and consistent colorimetric quantitative modification of the Carson - Seaks' Quantitative method for urine histidine measurement in pregnant women has been described.

The experiments described in this paper lend support to the idea that the method is good as far as the diagnosis of early pregnancy and toxemia of pregnancy is concerned. Variations in the urine histidine excretion in grams. per cent. during normal pregnancy and toxemia of pregnancy are also shown.

**DISTRIBUCION DE FRECUENCIAS
EN EMBARAZOS NORMALES**

CROMOS DE HISTIDINURIA

Meses Embarazo.	0.200	0.300	0.400	0.500	0.600	0.700	0.800	0.900	1.000
3	1		1		1				
4	1	1	1	1	1				
5			2	6	2			1	
6				2	1	4	4	1	1
7			2	1	1	3	2	3	1
8		1	1						
9			1						
	2	2	8	10	6	7	6	5	3

HISTIDINURIA EN EMBARAZOS NORMALES

MESES	Nº CASOS	MEDIA	OSCILACION
3	3	0.429	0.296 - 0.611
4	5	0.447	0.259 - 0.666
5	11	0.584	0.462 - 0.925
6	13	0.769	0.555 - 1.000
7	13	0.766	0.407 - 1.000
8	3	0.617	0.351 - 1.018
9	1	0.425	

HISTIDINURIA EN EMBARAZOS PATOLOGICOS

Meses	Nº Casos	Histidín (+)		Histidín. (-)		Media	Oscilación
		Nº	%	Nº	%		
3	0	0	—	0	—	—	—
4	0	0	—	0	—	—	—
5	1	1	100	0	—	—	—
6	0	0	—	0	—	—	—
7	7	7	100	0	—	—	—
8	25	19	76	6	24	0.384	0.222 - 0.555
9	11	7	60	4	40	0.406	0.351 - 0.462
7	7	7	100	0	—	—	—

BIBLIOGRAFIA:

- CHEVAL M. J. — La détermination de l'histidini dans l'urini et son application comme methode de diagnostic de la grossesse et comme controle de l'évolution de la gestation. Bruxelles Méd. 35 (34). 21, Aug. 1955, pp. 1.685-1708.
- SOUPART P. — Contribution a l'étude de l'histidinurie au cours de la grossesse. Acta Clin. Belg. 9 (4). July-Aug 1954, pp. 297-318.
- CHEVAL M. HANS M. J. — Diagnostic chimique de la grossesse par la mise en évidence de l'histidine dans les urines. Bull. Ass. gyn. fr 2:4, 1954, pp. 400-402.
- MERCKEL R. L. — A comparative Study of chemical tests for the early diagnosis of pregnancy, including a new colorimetric determination. A. J. obst. 60: 4 oct. 1950, pp. 827-833.
- PAGE E. W. GLENDENING m. b. DIGNAM W. HARPER H. A. — The causes of histidinuria in normal pregnancy. Am. J. Obst. 68; 1 July 1954, pp. 110-118.
- CHEVAL M. HANS M. J. MANET L. CAMORS P. — Sur un test Chimique de grossesse, l'histidinurie. Bul. Acad. Nat. Méd. 136: 9 10, 11 Mar. 1952, pp. 135-177.

- 7 HANDOVKY H. THIERY M. PROOST R. — **The Histidinuria pregnancy diagnosis test.** *Gynecología*, Basel 134; 6 Dec. 1952, pp. 401-412.
- 8 FABIANO A. LANZA M. — **Diagnose di gravidanza: prova biologica e chimica:** Gallimainini e Carson Seaks.
- 9 CHEVAL, M. HANS M. J. — **Lé détermination de Lishistidine dans l'urine et son application comme controle de l'évolution de la gestation.** *Bruxelles Méd.* 35 (35). 28 Aug. 1955. pp. 1.740-1750.
- 10 SOUPART. P. — **L'histidinurie dans la grossesse.** *Ach. Internat. Phsiol.* 60: 2 June, 1952, pp. 204-205.
- 11 SAMBUCETI G. RISSETTO. G. — **Sulla reazione di Dumont e Ricarrnelle diagnosi di gravidanza,** *Riv. Balt Clin.* 7: 3 Mar. 1952, pp. 84-89.
- 12 BARTOLETI L. — **La Ricerca dell'histidina nelle urine per la diagnosi chimica rapica di gravidanza.** *Ann. Ostet. Gin. Milano* 74-1 Jan. 1952, pp. 45-52.
- 13 BREITNER J. NEUMANN H. — **Schangersreaction durch Histidinna cheweis in nach Ricketts.** *Geburstsh & Frauenh* 11: 9 Sep. pp. 819-822.
- 14 CHUDOVA V. CHUDOBAVA H. — **Reackce na Histidin y moci jako chemicky test na tehotenstvi shlediska klinické prace.** *Lék. listy* 5: 19, 1 oct. pp. 565-567.
- 15 GAZZANO A. — **Sul valore della ricerca dell'istidina nelle urine pre la diagnosi chimica di gravidanza e di alcune affzioni ginecologiche.** *Minerva Gin.* 2:8 Aug. 1950, pp. 337-339.
- 16 RICHARSON G. G. — **A new biochemical test for pregnancy: a study of 2,560 test on 1,640 patients.** *Am. J. Obst.* 61:6 June 1951, pp. 1.317-1.323.
- 17 CLERC J. P. — WIDHABER M. A. — **Le diagnostic de la grossesse par le recherche de l'histidini dans l'urine.**
- 18 WALCH E. KAPF L. V. — **Sur frage der Schewangerscheftsdiagnose nittels Histidinvestimmung.**