

5000

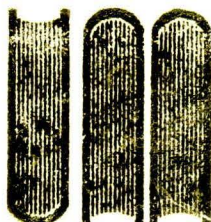
FECHA DE DEVOLUCION

El último sello marca la fecha tope para ser devuelto este libro.

El lector pagará \$5.00 pesos por cada día que pase una semana después del vencimiento.

--	--	--

UNIVERSIDAD DE MONTERREY
DIVISION DE CIENCIAS NATURALES
Y EXACTAS



UNIVERSIDAD
DE MONTERREY

Clarif.
040.54
R457e
1985
c.1

Título
ESTANDARIZACION DE UN METODO DE
DESPROTEINIZACION PARA LA REALIZACION
DE LA QUIMICA SANGUINEA.

REPORTE DEL PROGRAMA DE
EVALUACION FINAL
PRESENTADO POR

Autor

ANA GEORGINA REYES PAEZ

EN OPCION AL TITULO DE
LICENCIADO EN CIENCIAS QUIMICAS
CON ESPECIALIDAD EN ANALISIS CLINICOS

V. B.
S. Jaramilla

Folio
900444

MONTERREY, N. L.

MAYO DE 1985

Con amor y agradecimiento a mis padres:

JUAN F. REYES JACQUES

DIAMANTINA PAEZ DE REYES

Por toda la ayuda y confianza que me han brindado durante toda mi vida.

A mis hermanos:

EDUARDO

JUAN CARLOS

ALBERTO

GABRIELA

CLAUDIA

Y a ti GILBERTO por todo tu cariño y comprensión.

Agradezco sinceramente a todos
mis maestros y amigos que me
ayudaron tan amablemente en la
realización de este trabajo.

Q.F.B. Silvia Teresa Jaramillo

Q.F.B. Ma. de Lourdes Mtz. Maucozet

Q.F.B. Maricela Ramírez

Q.F.B. Laura García Tovar

I.Q.S. Jesús Villa Salinas

Dr. Carlos Pacheco Ravell

INDICE

	página
INTRODUCCION	1
MATERIALES Y METODOS	13
RESULTADOS	26
DISCUSION Y CONCLUSIONES	32
RESUMEN	36
BIBLIOGRAFIA	37

INTRODUCCION

El ser humano como producto de la vida misma, es decir del funcionamiento de todos y cada uno de los tejidos orgánicos produce ciertas sustancias con un nivel constante que se mantendrá así siempre que la persona se encuentre en estado de salud.

En estado de enfermedad la concentración de estas sustancias puede incrementarse o disminuirse y constituir un indicador del grado del padecimiento. Cuando existe este estado, el médico puede establecer el grado de deterioro del paciente enfermo observando los síntomas y signos. Sin embargo se han establecido varios métodos

de medición en el laboratorio que permiten conocer tanto la presencia como la magnitud de la enfermedad, valorando alguna sustancia determinada cuya acumulación va en relación con el padecimiento. Un conjunto de estos métodos se conoce como Química Sanguínea, la cual consta de las determinaciones de: glucosa, urea, ácido úrico y creatinina.

Las alteraciones bioquímicas pueden reflejarse en una variación de los límites normales de la concentración de estas sustancias y esto puede ayudar al médico a establecer un diagnóstico y por lo tanto a administrar un tratamiento adecuado en forma más temprana ya que anteceden a la aparición de los signos y síntomas clásicos del padecimiento.

Además, debido a la facilidad de obtener el espécimen clínico y de medir la concentración de estas sustancias hace que estos exámenes sean cada vez más importantes en la medicina moderna.

La glucosa es un monosacárido compuesto por carbono, hidrógeno y oxígeno, cuya función principal en el organismo es proporcionar energía. Uno de los métodos más comunes para determinar la glucosa es el de la orto-toluidina, en el cual este compuesto se condensa con el gru-

po aldehído de la glucosa en solución fuertemente ácida y caliente, formando una glucosilamina, que después pasa a un producto de color verde denominado base de Schiff, que tiene un máximo de absorción a 610 nm (3, 10).

El aumento de glucosa en sangre o hiperglucemia, generalmente se debe al trastorno denominado diabetes (1).

Existe otro grupo de compuestos en el organismo que tienen como base común el elemento nitrógeno, los cuales se denominan compuestos nitrogenados. Las proteínas y los ácidos nucleicos son las principales macromoléculas de este tipo; además existen otros compuestos que a diferencia de los anteriores tienen bajo peso molecular y son cristaloides, los cuales se denominan sustancias nitrogenadas no proteicas (8, 11).

En la Química Médica el nitrógeno no proteico total es importante para medir el funcionamiento renal, sin embargo actualmente se prefiere la determinación específica de urea, ácido úrico y creatinina (11).

La urea es sintetizada en el hígado a partir del amoníaco producido como resultado de la desaminación de los aminoácidos. Este camino biosintético es el principal

medio de eliminación del exceso de nitrógeno por el cuerpo. La determinación de nitrógeno de urea en sangre, comúnmente es colorimétrica por su reacción con la diacetil monoxima, la cual en presencia de ácido se hidroliza para dar un compuesto diacetilo inestable, este compuesto reacciona con la urea produciendo un derivado de diacina de color amarillo. El color de este producto es intensificado por la adición de tiosemicarbazida, teniendo un máximo de absorción a 520 nm (2, 10).

La reacción anterior tiene la ventaja de que no mide el ion amonio presente, es sensible y específica, además los reactivos son estables, sin embargo tiene algunas desventajas como son: el color producido es inestable, es desarrollado a una temperatura de 95°C, y la diacetil monoxima es volátil y presenta un olor que es desagradable para algunas personas (4).

Los aumentos de urea en sangre se deben generalmente a deficiencias renales, como nefrosclerosis avanzada, nefrosis cortical y tuberculosis renal (1).

El ácido úrico representa el principal producto final del metabolismo de la purinas en el hombre y es usualmente determinado por su acción reductora sobre el ácido fosfotúngstico, ya que se genera un color azul que

es medido colorimétricamente. El ácido úrico es oxidado a alantoína y bióxido de carbono por el ácido fosfotúngstico en solución alcalina. El ácido fosfotúngstico es reducido en esta reacción a azul de wolframio, que tiene su máxima absorción a 640 nm (2).

En esta determinación debe utilizarse un filtrado libre de proteínas para eliminar gran parte de las interferencias. Las limitaciones de este método generalmente están asociadas con la relación no lineal entre color y concentración superior a 10 mg/dl e interferencias por otros agentes reductores como el ácido ascórbico. Además, consume mucho tiempo la preparación del ácido fosfotúngstico (7, 9).

Se encuentran valores altos de ácido úrico en sangre en pacientes que padecen artritis gotosa y también cuando hay un aumento en el metabolismo de las nucleoproteínas, como en leucemia y policitemia (10).

La creatinina es un producto residual derivado de creatina y es eliminada por los riñones. La creatina se une a un fosfato y actúa como un depósito de alta energía, convertible fácilmente en ATP en los músculos y en otros tejidos. La propia creatina es sintetizada en el hígado y en el páncreas; después de la síntesis se di-

funde por el sistema vascular y de esta manera es suministrada a muchas células en donde se fosforila (3, 6, 10).

La creatinina usualmente es determinada por la reacción de Jaffé, en donde reacciona con picrato alcalino para dar un color amarillo. Esta reacción es afectada por más de 50 compuestos endógenos, para eliminar una parte de ellos se utiliza un filtrado Folin-Wu libre de proteínas (1,8).

Las alteraciones de los valores normales de creatinina en sangre sugieren una insuficiencia renal (1).

Para determinar el nitrógeno no proteico, los compuestos específicos y diversas sustancias distintas de las proteínas, se deben retirar éstas de la sangre, del suero o del plasma, ya que interfieren en las determinaciones anteriores. La desproteínización se puede realizar por un proceso de precipitación, seguido por filtración o centrifugación. La precipitación de las proteínas implica la desnaturalización de las mismas, es decir, la alteración de las características químicas, físicas y biológicas de éstas (5, 8).

Los agentes físicos y químicos desnaturalizan las proteínas a través de la eliminación de las estructuras secundarias, terciaria e inclusive cuaternaria, si la hay, trayendo como consecuencia la disminución del grado de solubilidad. Entre los agentes físicos desnaturalizantes se incluyen el calor y la luz ultravioleta, entre los químicos se encuentran ácidos, álcalis, disolventes orgánicos y detergentes (11).

Las proteínas del suero se dividen electroforéticamente en albúmina y globulina, sus características de solubilidad son extensas, pero en general, podemos decir que la albúmina es soluble en el agua, mientras que la globulina requiere sal para disolverse. La precipitación de las globulinas se observa con la adición de agua, ya que da lugar a una disminución de la concentración de sales. Se prefiere una solución salina como diluyente para el suero, para evitar la turbidez que se produce al precipitar las globulinas (10, 11).

Los agentes precipitantes se combinan con las proteínas y las precipitan, dejando los constituyentes deseados en solución (5).

La preparación de filtrados libres de proteínas a partir de la sangre total, plasma o suero, requiere un pre

cipitante aniónico o catiónico que con la proteína forma un producto insoluble, o dos soluciones que por reacción den un precipitado, el cual arrastre la proteína por coprecipitación. Las proteínas contienen aminoácidos activos, por lo cual la forma iónica juega un papel muy importante. Cada aminoácido o proteína despliega propiedades anfóteras según un grupo terminal y cadena lateral. A un pH por debajo de su punto isoeléctrico, un aminoácido tiene una carga positiva, mientras que a un pH por encima de su punto isoeléctrico se presenta con carga negativa. A un pH igual a su punto isoeléctrico se encuentra en forma de molécula de doble carga, positiva y negativa siendo por tanto eléctricamente neutral. En las muestras biológicas tales como plasma o suero, el pH es ligeramente alcalino de manera que las proteínas se presentan cargadas negativamente (aniónicas) (8, 10, 11).

Los agentes precipitantes más comúnmente utilizados son el ácido túngstico, ácido tricloroacético e hidróxido de zinc (1).

Folin y Wu diseñaron un sistema de análisis de sangre usando ácido túngstico para precipitar las proteínas en el año de 1919. En este método primeramente se agrega cierta cantidad de agua a la muestra de sangre para li-

sar los glóbulos rojos, enseguida se agrega el ácido sulfúrico que rompe los enlaces de las proteínas y por último se agrega el tungstato de sodio cuyos iones se unen con el nitrógeno formando moléculas más grandes que precipitan por su peso. Este método sirve para determinar nitrógeno no proteico, urea, ácido úrico y creatinina; pero no se recomienda utilizarlo para la determinación de glucosa, ya que el filtrado contiene aún glutatión y otras sustancias reductoras diferentes a la glucosa (5,10).

En 1928 Van Slyke y Hawkins modificaron el método de Folin y Wu, preparando un solo reactivo que contenía el tungstato de sodio y el ácido sulfúrico; este reactivo es inestable y por lo tanto debe ser preaprado cada dos semanas, o más a menudo si aparecen precipitados en la mezcla. Caraway sugirió la adición de ácido fosfórico al reactivo de ácido túngstico, para demorar la aparición del precipitado por cuatro meses o más. La acidez del filtrado no se incrementa apreciablemente con la adición del ácido fosfórico. Estos filtrados no pueden ser utilizados para la determinación de fósforo (5, 11).

En los laboratorios donde se manejan un gran número de muestras la modificación de Van Slyke y Hawkins es más

satisfactoria y ahorra tiempo. Este procedimiento proporciona un gran volumen de filtrado el cual contiene menos material reductor diferente a la glucosa que por el método de Folin-Wu (5).

El pH de los filtrados debe ser determinado ocasionalmente, la lectura usual es cerca de 6.6 a 6.7, un filtrado demasiado ácido o demasiado básico muestra que las soluciones originales de tungstato de sodio y ácido sulfúrico deben ser verificadas para que tengan una concentración adecuada o reemplazarse si es necesario (5, 11).

Greenwald introdujo el uso de ácido tricloroacético como otro agente precipitante. Este ácido se usa cuando se requiere un filtrado fuertemente ácido para retener ciertos iones en solución, tales como calcio y fosfato; ya que en solución débilmente ácida estos iones se perderían al precipitar las proteínas (5).

En el método de Somogyi-Nelson se precipitan las proteínas por adición de hidróxido de bario y sulfato de zinc. Las proteínas se separan como proteínatos de zinc, los compuestos de sulfhidrilo como sales de zinc y los iones de zinc y bario remanentes como hidróxido de zinc y sulfato de bario. Se precipitan también cier

tos compuestos nitrogenados no proteicos como ácido úrico y algo de creatinina, que son absorbidos sobre el sulfato de bario de modo que el filtrado resultante está prácticamente exento de sustancias reductoras que no son azúcares. Su relativa especificidad permite realizar la determinación de glucosa en este filtrado o el análisis de electrolitos (1, 5).

Este método difícilmente puede ser utilizado para la determinación de urea porque el nivel de nitrógeno no proteico es 10 mg/dl inferior al que se obtiene por la precipitación con ácido túngstico (5).

En esta modificación se emplea hidróxido de bario, y no hidróxido de sodio, con la ventaja de que el ion bario precipita el sulfato y se eliminan así los precipitantes, sin dejar iones agregados en el filtrado (5, 8).

Las concentraciones de las sustancias de interés fisiológico o clínico generalmente se obtienen de suero o plasma, ya que con sangre completa se observan valores diferentes, debido a que estas sustancias no están distribuidas homogéneamente (5, 6).

En todos los filtrados mencionados el suero es diluido en una proporción definida, de tal forma que este fac-

tor debe ser tomado en cuenta en los cálculos de las concentraciones (1).

Para algunas determinaciones de la Química Sanguínea como glucosa y urea, no es necesario utilizar un filtrado libre de proteínas, excepto en ocasiones en que el suero esté hemolizado o lipémico, sin embargo para otras determinaciones como ácido úrico y creatinina es indispensable hacerlo; y lo ideal sería preparar un solo filtrado para todas estas determinaciones, utilizando de esta manera un volumen menor de suero sanguíneo, por lo tanto, el objetivo de este trabajo es la estandarización de un filtrado libre de proteínas para la determinación de ácido úrico y creatinina, pudiéndose incluir glucosa y urea cuando sea necesario.

MATERIALES Y METODOS

Las muestras utilizadas para este trabajo consistieron en sueros sanguíneos a partir de los cuales se prepararon filtrados libres de proteínas por los métodos de Folin-Wu, del ácido tricloroacético, de Somogyi y algunas modificaciones de éstos, para la determinación de glucosa, urea, ácido úrico y creatinina.

Este estudio se realizó en el laboratorio de Análisis Clínicos de la División de Ciencias Naturales y Exactas de la Universidad de Monterrey en el transcurso de los meses de Enero a Abril de 1985.

PREPARACIÓN DE FILTRADOS LIBRES DE PROTEÍNAS POR LOS
MÉTODOS DE:

A) FOLIN-WU

- 1.- A 2 ml de suero añadir 3 ml de agua destilada y 1 ml de la solución de tungstato de sodio, 10% (R-1) y mezclar.
- 2.- Añadir 2 ml de la solución de ácido sulfúrico, 0.67 N (R-2) y agitar por inversión.
- 3.- Centrifugar a 2000 rpm por 5 minutos.

B) FILTRADO DE FOLIN-WU MODIFICADO POR VAN SLYKE Y HAWKINS

- 1.- A 1 ml de suero añadir 9 ml de ácido túngstico (R-3) y agitar por inversión.
- 2.- Centrifugar a 2000 rpm por 5 minutos.

C) FILTRADO DE ACIDO TRICLOROACETICO

- 1.- A 1 ml de suero añadir 9 ml de ácido tricloroacético, 5% (R-4) y agitar por inversión.

2.- Centrifugar a 2000 rpm por 5 minutos.

D) SOMOGYI

1.- A 1 ml de suero añadir 5 ml de agua destilada,
2 ml de hidróxido de bario, 0.3 N (R-5) y mezclar.

2.- Añadir 2 ml de sulfato de zinc, 5% (R-6) y agitar
fuertemente.

3.- Centrifugar a 2000 rpm por 5 minutos.

DETERMINACIÓN DE LA GLUCOSA POR EL MÉTODO DE LA ORTO-
TOLUIDINA

1.- Colocar separadamente 0.1 ml de suero, del estándar de glucosa (R-7) y de agua destilada en tubos de ensayo.

2.- Agregar 5 ml de o-toluidina (*) a cada tubo y mezclar.

3.- Tapar los tubos y calentarlos en un baño de agua hirviendo por 10 minutos.

* o-toluidina - Hycel.

- 4.- Enfriar en un baño de agua helada por 10 minutos.
- 5.- Leer la absorbancia del estándar y de la muestra contra el blanco dentro de los 30 minutos siguientes en un espectrofotómetro (*) a 610 nm.

Si se utiliza un filtrado libre de proteínas, tomar 0.5 ml del sobrenadante de éste y del estándar diluido, agregar 3 ml de o-toluidina y continuar con el procedimiento.

DETERMINACIÓN DEL NITRÓGENO DE UREA POR EL MÉTODO DE LA OXIMA

- 1.- Colocar 3 ml de la solución de oxima (R-8) y 3 ml de la solución ácida (R-9) en tubos de ensayo.
- 2.- Añadir 0.05 ml de la muestra y del estándar (R-10) y reservar un tubo con la mezcla de reactivos como blanco.
- 3.- Calentar los tubos en un baño de agua hirviendo por 15 minutos.

* Espectrofotómetro Coleman.

- 4.- Enfriar en un baño de agua helada por 10 minutos.
- 5.- Leer la absorbancia del estándar y de la muestra contra el blanco a 520 nm.

Si se utiliza un filtrado libre de proteínas, tomar 0.5 ml del sobrenadante de esté y del estándar diluído y continuar con el mismo procedimiento.

DETERMINACIÓN DE ÁCIDO ÚRICO POR EL MÉTODO DE ROWN

- 1.- Colocar 5 ml del sobrenadante del filtrado de Folin-Wu modificado por Van Slyke y Hawkins en un tubo de ensayo y en otros 5 ml del estándar de ácido úrico (R-11) y 5 ml de agua destilada (blanco).
- 2.- Añadir 1 ml de la solución de carbonato de sodio, 10% (R-12) a cada tubo, mezclar y dejar reposar por 10 minutos.
- 3.- Añadir 1 ml de ácido fosfotúngstico (R-13) y dejar reposar por 30 minutos.
- 4.- Leer la absorbancia del estándar y de la muestra contra el blanco a 640 nm.

DETERMINACIÓN DE CREATININA POR EL MÉTODO DE JAFFE

- 1.- Colocar 3 ml del sobrenadante del filtrado de Folin-Wu, del estándar de creatinina (R-14) y de agua destilada en tubos de ensayo.
- 2.- A cada tubo añadir 1 ml de ácido pícrico (*) y 1 ml de la solución de hidróxido de sodio, 0.75 N (R-15), mezclar y dejar reposar 20 minutos.
- 3.- Leer la absorbancia del estándar y de la muestra contra el blanco a 520 nm.

* Acido pícrico - Merck.

INTERPRETACION

Las concentraciones de glucosa, urea, ácido úrico y creatinina se obtienen en base a las lecturas de absorbancia de las muestras y de un estándar conocido, el cual se evalúa con una curva de calibración para cada una de estas sustancias.

En los casos en los que se utilizó filtrados libres de proteínas se toma en cuenta la dilución final de éstos

al realizar los cálculos de las concentraciones.

VALORES NORMALES

	mg/dl
Glucosa.- Mét de la o-toluidina	70 - 110
Urea.- Mét. de la oxima	20 - 40
Acido úrico.- Mét. de Rowen	2 - 8
Creatinina.- Mét. de Jaffé	0.6 - 1.2

REACTIVOS

R-1 Tungstato de sodio al 10%

Tungstato de sodio	100.00 g
Agua destilada c.b.p.	1000.00 ml

Se disuelve el reactivo y se afora.

R-2 Acido sulfúrico 0.66 N

Acido sulfúrico 1 N	1000.00 ml
Agua destilada	500.00 ml

Añadir el ácido al agua destilada y mezclar.

R-3 Acido túngstico

Tungstato de sodio al 10%	50.00 ml
Acido sulfúrico 0.66 N	50.00 ml
Acido fosfórico al 85%	0.05 ml
Agua destilada	900.00 ml

Añadir la solución de tungstato de sodio al agua, enseguida el ácido fosfórico y finalmente el ácido sulfúrico y mezclar.

R-4 Acido tricloroacético al 5%

Acido tricloroacético	50.00 g
Agua destilada c.b.p.	1000.00 ml

Se disuelve el reactivo con precaución y se afora.

R-5 Hidróxido de bario 0.3 N

Hidróxido de bario	47.00 g
Agua destilada c.b.p.	1000.00 ml

Se disuelve el reactivo en agua destilada recientemente calentada a ebullición y enfriada, para que se encuentre libre de dióxido de carbono y se afora.

R-6 Sulfato de zinc al 5%

Sulfato de zinc	50.00 g
Agua destilada c.b.p.	1000.00 ml

Se disuelve el reactivo y se afora.

R-7 Estándar de glucosa de 100 mg/dl

Stock

Glucosa	1.00 g
Acido benzoico al 0.14% c.b.p.	100.00 ml

Se disuelve la glucosa en el ácido benzoico y se afora.

Stock	10.00 ml
Acido benzoico al 0.14% c.b.p.	100.00 ml

Diluir el stock de glucosa en el ácido benzoico y aforar.

R-8 Solución de oxima

Diacetil monoxima	1.00 g
Tiosemicarbazida	0.20 g
Cloruro de sodio	9.00 g
Agua destilada c.b.p.	1000.00 ml

Se disuelven los reactivos y se afora.

R-9 Solución ácida

Cloruro férrico	0.10 g
Acido sulfúrico concentrado	60.00 ml
Acido fosfórico al 85%	10.00 ml
Agua destilada c.b.p.	1000.00 ml

El ácido sulfúrico se agrega lentamente al agua destilada, después el ácido fosfórico y el cloruro férrico ya disuelto y se afora con agua destilada.

R-10 Estándar de nitrógeno de urea de 15 mg/dl

Acido benzoico al 0.2%	
Acido benzoico	2.00 g
Acido sulfúrico concentrado	0.80 ml
Agua destilada c.b.p.	1000.00 ml

Se disuelve el ácido benzoico en el agua destilada, se agrega el ácido sulfúrico y se afora con agua destilada.

Stock

Urea	0.644 g
Acido benzoico al 0.2% c.b.p.	500.00 ml

Se disuelve la urea en el ácido benzoico y se afora.

Se hace una dilución 1:4 del stock con ácido benzoico para obtener el estándar de nitrógeno de urea de 15 mg/dl.

R-11 Estándar de ácido úrico de 6 mg/dl

Stock

Carbonato de sodio	0.50 g
Acido úrico	1.00 g
Formalina al 40%	25.00 ml
Acido acético glacial	3.00 ml
Agua destilada c.b.p.	1000.00 ml

Disolver el carbonato de litio en agua caliente, añadir el ácido úrico, la formalina, el ácido acético y aforar con agua destilada.

Stock	0.60 ml
Agua destilada	100.00 ml

Diluir el stock en el agua destilada y aforar. Esta solución contiene 0.6 mg/dl pero equivale a 6 mg/dl cuando se utiliza un filtrado 1:10 para la muestra.

R-12 Carbonato de sodio al 10%

Carbonato de sodio anhidro	100.00 g
Agua destilada c.b.p.	1000.00 ml

Disolver la sal en el agua y aforar; filtrar si la solución no es transparente y conservar en un frasco de polietileno.

R-13 Acido fosfotúngstico

Tungstato de sodio	50.00 g
Acido fosfórico al 85%	40.00 ml
Agua destilada	400.00 ml

Disolver el tungstato de sodio en el agua y agregar el ácido fosfórico, refluja esta solución por 2 horas, diluir a 500 ml. Esta solución es estable indefinidamente a temperatura ambiente si se guarda en un frasco ámbar. Para utilizarlo se hace una dilución 1:10 con agua destilada, esta solución diluída se debe conservar en el refrigerador.

R-14 Estándar de creatinina de 1.5 mg/dl

Stock

Creatinina	0.15 g
Acido clorhídrico concentrado	0.80 ml
Agua destilada c.b.p.	100.00 ml

Disolver la creatinina en agua destilada, agregar el ácido y aforar la solución.

Stock	1.00 ml
Agua destilada c.b.p.	100.00 ml

Diluir el stock en agua destilada y aforar.

R-15 Hidróxido de sodio 0.75 N

Hidróxido de sodio 30.00 g

Agua destilada c.b.p. 1000.00 ml

Disolver el reactivo en agua destilada y aforar.

MÉTODO ESTADÍSTICO

Para la estandarización del método de desproteínización, se relacionan los valores obtenidos en cada técnica con los obtenidos por el método original por medio de pruebas de hipótesis para diferencia de medias, utilizando una probabilidad de error (α) del 5%.

RESULTADOS

Para determinar glucosa, urea, ácido úrico y creatinina se probaron los siguientes filtrados:

- A) Folin-Wu 1:8
- B) Folin-Wu modificado por Van Slyke y Hawkins 1:10
- C) Folin-Wu modificado por Van Slyke y Hawkins 1:12
- D) Filtrado de ácido tricloroacético
- E) Somogyi

En las tablas 1 y 2 se encuentran los datos obtenidos en las determinaciones de glucosa y urea en relación al método directo. Estos datos indican que el filtrado más

adecuado para glucosa es el de ácido tricloroacético y para urea el de Folin-Wu modificado por Van Slyke y Hawkins 1:10.

TABLA 1

Determinación de glucosa por el método directo y utilizando filtrados libres de proteínas.

METODO	n ¹	\bar{X} ²	S ³	z ⁴
Glucosa directa	39	97.52	31.94	
Con filtrado B	39	93.04	36.50	0.57
Con filtrado D	39	98.01	39.32	-0.06
Con filtrado E	39	105.37	47.74	0.85

1: n = número de muestras

2: \bar{X} = concentración media

3: S = desviación estándar

4: z = estadístico en base al método original

TABLA 2

Determinación de urea por el método directo y utilizando filtrados libres de proteínas.

METODO	n	\bar{X}	S	z
Urea directa	23	20.02	8.21	
Con filtrado B	23	24.24	9.38	-1.62
Con filtrado D	23	24.85	8.64	-1.94
Con filtrado E	23	24.93	8.23	-2.02

Las determinaciones de glucosa, urea, ácido úrico y creatinina por los métodos originales y utilizando el filtrado de Folin-Wu modificado por Van Slyke y Hawkins se presentan en la tabla 3, donde se observa que los valores obtenidos para estas 4 determinaciones se encuentran dentro del rango de aceptación en la curva normal de probabilidad.

TABLA 3

Determinación de glucosa, urea, ácido úrico y creatinina por los métodos originales y utilizando el filtrado de Folin-Wu modificado por Van Slyke y Hawkins 1:12.

METODO	n	\bar{X}	S	z
Glucosa directa	46	88.86	13.96	0.25
Con filtrado C	46	88.05	14.95	
Urea directa	43	30.01	8.82	-1.95
Con filtrado C	43	34.25	11.12	
Acido úrico con filtrado B	72	4.21	1.12	1.01
Con filtrado C	72	4.02	1.12	
Creatinina con filtrado A	71	1.02	0.25	-0.88
Con filtrado C	71	1.06	0.29	

Con los datos obtenidos anteriormente se encontró que la Química Sanguínea puede ser realizada utilizando un filtrado Folin-Wu modificado por Van Slyke y Hawkins con una dilución final 1:12.

Se localizaron los estadísticos de los datos de cada tabla en su gráfica correspondiente (Fig. 1-3).

FIGURA 1

GRAFICA DE LA PRUEBA DE HIPOTESIS PARA DIFERENCIA DE MEDIAS DE LA DETERMINACION DE GLUCOSA

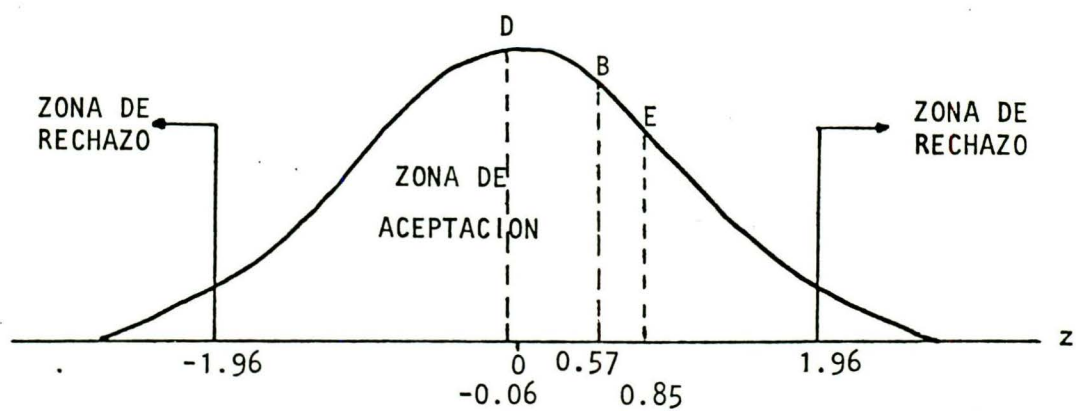


FIGURA 2

GRAFICA DE LA PRUEBA DE HIPOTESIS PARA DIFERENCIA DE MEDIAS DE LA DETERMINACION DE UREA

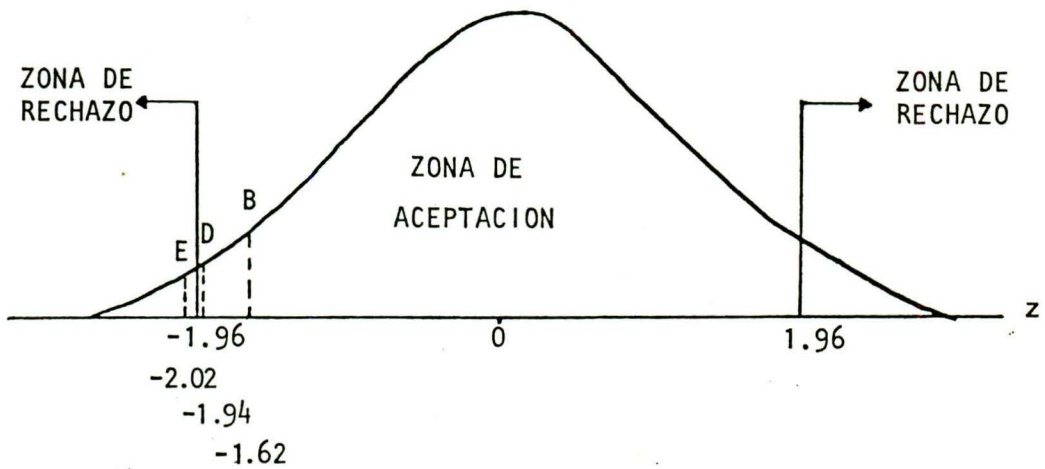
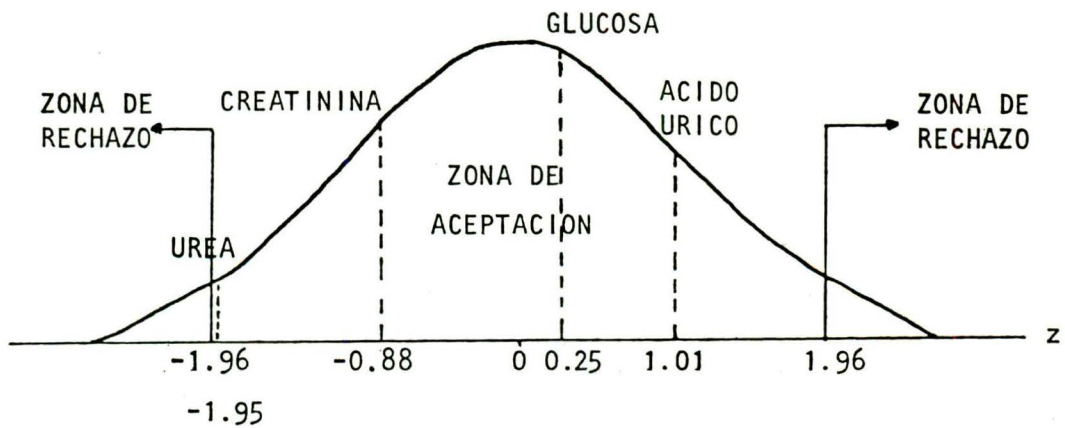


FIGURA 3

GRAFICA DE LA PRUEBA DE HIPOTESIS PARA DIFERENCIA DE MEDIAS DE LA DETERMINACION DE GLUCOSA, UREA, ACIDO URICO Y CREATININA



DISCUSION Y CONCLUSIONES

Se denomina Química Sanguínea al conjunto de métodos por medio de los cuales se puede determinar la concentración de algunos constituyentes químicos de la sangre y de los líquidos corporales. Entre estos constituyentes se encuentran glucosa, urea, ácido úrico y creatinina. El conocimiento de la concentración de estas sustancias proporciona una amplia información acerca del estado del paciente, es decir permite confirmar o descartar un diagnóstico presuntivo, obtener datos de valor pronóstico o predictivo en el transcurso de una enfermedad, datos que guíen el manejo terapéutico, o bien, que permitan la detección de estadios subclínicos de una enfermedad.

En algunos métodos utilizados para la determinación de estas 4 sustancias se requiere la desproteínización del suero, plasma o sangre completa, por esta razón se estandarizó una técnica de filtrado para la cuantificación de estas sustancias.

Las determinaciones fueron realizadas utilizando suero sanguíneo ya que las pruebas preliminares que se hicieron con sangre completa mostraron variación en la concentración en relación a la obtenida en suero. Probablemente esto se debió a los cromógenos no específicos presentes en los eritrocitos y que permanecen en solución aún después de la precipitación.

La elección del filtrado libre de proteínas para la determinación de glucosa, urea, ácido úrico y creatinina se hizo por medio de la prueba de hipótesis para diferencia de medias. El estadístico más cercano al 0 en la curva normal de probabilidad, representa una relación más directa entre los valores obtenidos por las dos técnicas relacionadas.

La determinación de glucosa se puede realizar satisfactoriamente utilizando cualquiera de los filtrados mencionados en la tabla 1, ya que éstos se encuentran libres de sustancias reductoras diferentes a la glucosa o su

concentración es tan baja que no interfieren en la determinación. Sin embargo en base a los resultados obtenidos puede observarse que el filtrado de elección es el de tricloroacético, lo cual concuerda con lo reportado en la literatura (1).

En la determinación de urea se observó que los valores obtenidos con el filtrado de Somogyi rebasan los límites de la zona de aceptación en la curva normal de probabilidad, por lo que no es recomendable. Con los filtrados de Folin-Wu modificado por Van Slyke y Hawkins 1:10 y de ácido tricloroacético se obtienen valores estadísticamente aceptables.

Las determinaciones de ácido úrico y creatinina no pueden ser realizados con los filtrados de ácido tricloroacético y de Somogyi, ya que estas sustancias precipitan junto con las proteínas.

En base a los resultados obtenidos, podemos mencionar que la Química Sanguínea puede ser realizada utilizando un filtrado Folin-Wu modificado por Van Slyke y Hawkins con dilución 1:12, ya que éste proporciona un volumen de sobrenadante suficiente para realizar las 4 determinaciones, con lo cual se tiene la ventaja de utilizar únicamente 1 ml de suero sanguíneo y además la precipi-

tación de las proteínas se efectúa con un sólo reactivo que es estable y fácil de preparar.

Actualmente existen muchos métodos que utilizan suero o en algunos casos plasma directamente sin la preparación de un filtrado, tales métodos se realizan frecuentemente en instrumentos automatizados. Sin embargo, en muchos laboratorios se siguen utilizando los métodos de desproteínización, por que su volumen de trabajo no justifica su adquisición o por que son complejos y costosos y no pueden adaptarse a cualquier laboratorio.

En base a lo anterior podemos concluir que la estandarización de un método de desproteínización para la determinación de glucosa, urea, ácido úrico y creatinina que nos proporcione resultados confiables, puede contribuir al diagnóstico, prevención, control e investigación de las enfermedades con el objeto de colaborar al bienestar del ser humano.

RESUMEN

Se realizó la estandarización de un método de desproteización para las determinaciones de glucosa, urea, ácido úrico y creatinina probándose los siguientes filtrados:

- A) Folin-Wu 1:8
- B) Folin-Wu modificado por Van Slyke y Hawkins 1:10
- C) Folin-Wu modificado por Van Slyke y Hawkins 1:12
- D) Filtrado de ácido tricloroacético
- E) Somogyi

Se encontró que el filtrado más satisfactorio fue el de Folin-Wu modificado por Van Slyke y Hawkins 1:12.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Bauer, J. D., P. G. Ackermann and G. Toro. 1982.
Clinical Laboratory Methods. 9th. ed. The
C. V. Mosby Co., St. Louis, Mo.
- 2.- Bauer, J. D., P. G. Ackermann and G. Toro. 1968
Clinical Laboratory Methods. 7th. ed. The
C. V. Mosby Co., St. Louis, Mo.
- 3.- Guyton, A. C. 1983. Fisiología Humana. 5a. ed.
Interamericana, México.

- 4.- Jung, D. et al. 1975. New Colorimetric Reaction for End-Point, Continuous-Flow, and Kinetic Measurement of Urea. Clin. Chem. 21: 1136-1140.
- 5.- Levinson, S. A. and R. P. Mac Fate. 1969. Clinical Laboratory Diagnosis. 17th. ed. Lea and Febiger, U.S.A.
- 6.- Lynch, M. J. y otros. 1972. Métodos de Laboratorio. 2a. ed. Interamericana, México.
- 7.- Nelson, J. W. and K. K. Baltra. 1975. Simplified Automated Method for Determination of Urinary or Serum Uric Acid, Based on Reduction of Ferric-Phenanthroline Complex. Clin. Chem 21: 125 - 129.
- 8.- Reiner, M. 1964. Métodos Seleccionados de Análisis Clínicos. 2a. ed. Editorial Aguilar, España.
- 9.- Slaunwhite, W. D. et al. 1975. Colorimetric, Enzymatic, and Liquid-Chromatographic Methods for Serum Uric Acid Compared. Clin. Chem. 21: 1427 - 1429

10.- Teitz, N. W. 1972. Química Clínica Moderna.

1a. ed. Interamericana, México.

11.- Tood-Sanford, I., J. Davidson y J. B. Henry.

1972. Diagnóstico Clínico por el Laboratorio.

5a. ed. Salvat Editores, Barcelona.

900444