

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

VALORACION DEL METODO DE BIURET
MODIFICADO PARA LA CUANTIFICACION
DE PROTEINAS EN LA ORINA.

T E S I S

Que para obtener el Título de

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P r e s e n t a

LUIS IGNACIO PADILLA MEZA



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

TESIS 1979
U.T. ~~270~~ 270
BCHA _____
RCC _____
0 _____



JURADO ASIGNADO SEGUN EL TEMA.

PRESIDENTE. PROF. JOEL E. TEJEDA V.
V O C A L . PROF. DEA CORONADO PERDOMO
SECRETARIO. PROF. MA. DOLORES LASTRA A.
1er.SUPLENTE PROF. GPE. LETICIA CARRASCO RIVERA.
2o. SUPLENTE. PROF. ESTHER GUTIERREZ HIDALGO.

Sitio donde se desarrollo el tema:

LABORATORIO GUADALUPE S.A.

PUEBLA, PUE.

SUSTENTANTE : LUIS IGNACIO PADILLA MEZA

ASESOR : Q.F.B. DEA CORONADO PERDOMO.

A CRISTO:

A QUIEN DEBO TODO.

A MI PADRE:

SR. IGNACIO PADILLA VILLAVICENCIO.

QUE CON TU EJEMPLAR CONDUCTA, ME ENSEÑASTE
EL CAMINO PARA LLEGAR A SER HOMBRE EN EL
SENTIDO SOLEMNE DE LA EXPRESION.

TODA MI ADMIRACION.

(q.e.p.d.)

A MI MADRE:

SRA. TITO MEZA VDA. DE PADILLA.

TU QUE ERES LUZ DIVINA QUE ILUMINAS EL
CAMINO DE MI EXISTENCIA, QUE POR TU TERNURA
CONOCI SIEMPRE EL AMOR.

QUE DIOS TE BENDIGA POR SER COMO ERES
Y POR AYUDARME A SER LO QUE SOY.

A MI ESPOSA:

MADLINE.

CON DEVOCION PROFUNDA Y CON TODO EL AMOR
QUE NOS HEMOS PROFESADO.

QUE SIEMPRE ESTEMOS UNIDOS Y QUE DIOS
REINE EN NUESTROS CORAZONES.

A TI BEBE:

QUE COMO UNA SEMILLA EN UNA PRADERA
TRANQUILA Y BELLA.
GERMINAS DIA A DIA.

A TI ABUELITA:

QUE SOY PARTE DE TU SANGRE Y DE
TU ESPIRITU.

CON CARINO.

SRA. MARIA VERDUGO VDA. DE MEZA.

A MIS HERMANOS.

AMERICA.

MARIA ISABEL.

FERNANDO.

A MI HERMANO POLITICO:

ALEJANDRO.

A MIS SOBRINOS.

ELISA .

PILY .

GORY.

ALBERTO.

CON RESPETO Y CARINO :

SR. MAXIMINO MELENDEZ GARCIA
SRA. DOMITILA CARRERA DE MELENDEZ

CON PROFUNDO AGRADECIMIENTO POR SU AYUDA DESINTERESADA

A LA Q.F.B. DEA CORONADO PERDOMO.

BAJO CUYA DIRECCION FUE POSIBLE LA REALIZACION
DE ESTA TESIS.

AL HONORABLE JURADO.

C A P I T U L O I .

INTRODUCCION.

DESPUES DE UN SIGLO DE ESTUDIOS Y OBSERVACIONES PARA LA CUANTIFICACION DE LAS PROTEINAS URINARIA, NO SE HA ENCONTRADO TODAVIA UN METODO DE ACEPTACION GENERAL Y EXACTO, PARA SER USADO EN LA RUTINA , QUE PERMITA UNA DETERMINACION RAPIDA Y CONFIABLE, Y ESTA ES LA PRINCIPAL INQUIETUD QUE ME MOTIVO A REALIZAR EL ESTUDIO DEL METODO QUE ESTOY PROPONIENDO, BASANDOME EN DOS HECHOS FUNDAMENTALES QUE SON: LA PRECIPITACION DE LAS PROTEINAS, Y SEGUNDO EL USO DE UN REACTIVO DE COLOR PARA EFECTUAR LA DETERMINACION CUANTITATIVA.

DADA LA IMPORTANCIA DE LA CUANTIFICACION DE LAS PROTEINAS EN LA ORINA PARA PONER DE MANIFIESTO SU FISIOPATOLOGIA, Y NO SOLO ESTA , SINO PARA EL DIAGNOSTICO TEMPRANO EN LAS ALTERACIONES QUE SE PRESENTAN EN LA FILTRACION GLOMERULAR Y LA REABSORCION TUBULAR; EL MEDICO PARA EL BUEN MANEJO DE DICHS PACIENTES, SE BASA EN LOS RESULTADOS EMITIDOS POR EL LABORATORIO, QUE SU VEZ DEBE DE CONTAR CON METODOS CONFIABLES PARA EFECTUAR DICHA DETERMINACION.

EL ESTUDIO QUE ME OCUPA QUISO SER FIEL A LOS CRITERIOS DE EVALUACION DE UN METODO, QUE EL PANEL DE EXPERTOS EN CONTROL DE CALIDAD, I.F.C.C., LOS CONSIDERA IMPORTANTE EN LA CONFIABILIDAD DE UNA METODOLOGIA; COMO SON LA PRECISION, EXACTITUD, ESPECIFICIDAD, LINEARIDAD Y SENSIBILIDAD; POR LO TANTO PARA CONSIDERAR

LA UTILIDAD DEL METODO PROPUESTO, ESTO PARAMETROS SE PRESENTAN EN FORMA DE DATOS NUMERICOS, DE TAL MODO QUE EL JUICIO SOBRE LA METODOLOGIA SEA EN UNA FORMA OBJETIVA.

UN METODO ANALITICO SE DEFINE COMO, UN CONJUNTO DE INSTRUCCIONES IMPRESAS , EN LAS CUALES SE DESCRIBE: PROCEDIMIENTO, MATERIAL Y EQUIPO NECESARIO PARA QUE EL ANALISTA PUEDA OBTENER UN RESULTADO.

EL OBJETIVO DEL PRESENTE TRABAJO ES EL DE PRESENTAR UNA EVALUACION DE LA CONFIABILIDAD DEL METODO DE TSUCHIYS/ YATZIDIS (Biuret modificado), PARA LA CUANTIFICACION DE LAS PROTEINAS ELIMINADAS POR LA ORINAS, EL CUAL SE FUNDAMENTA EN LA PRECIPITACION INICIAL DE LAS MISMAS CON EL REACTIVO DE TSUCHIYS A 56°C, Y DETERMINACION CUANTITATIVA DE LAS PROTEINAS PRECIPITADAS CON EL REACTIVO DE BIURET MODIFICADO POR HIPPOCRATES YATZIDIS.

C A P I T U L O II.

GENERALIDADES.

EL ESTUDIO DE LAS PROTEINURIAS CON MIRAS AL DIAGNOSTICO DE UNA NEFROPATIA ES DE NOTABLE IMPORTANCIA PRACTICA, DEBIDO A QUE LA PRESENCIA DE ESTAS EN LA ORINA EN CONCENTRACIONES SUPERIORES A LOS LIMITES FISIOLÓGICOS ADEMÁS DE REPRESENTAR UN SIGNO DE EXTREMA ESPECIFICIDAD Y DE FACIL OBSERVACION, ES LA EXPRESION DE UNA LESION RENAL.

SE DEBE A BRIGH (1), EL INICIO DE LOS ESTUDIOS QUE RELACIONARON EL CUADRO CLINICO CON LAS ALTERACIONES ANATOMOPATOLÓGICAS DEL RIÑON Y LA PROTEINURIA . UNA DE LAS PRIMERAS INTERPRETACIONES PATOLÓGICAS CONSIDERABA QUE LA PROTEINURIA ERA CONSECUENCIA DE UNA ALTERACION EN LAS PROTEINAS PLASMATICAS, Y QUE DEBIDO A DICHA MODIFICACION SE ELIMINABAN EN LA ORINA (2); ESTA INTERPRETACION AUNQUE ERRONEA CUANDO SE REFIRE A LOS PROBLEMAS RENALES , SE ACEPTO MAS TARDE PARA ALGUNAS ENFERMEDADES EXTRARENALES, COMO POR EJEMPLO PARA EL MIELOMA CUYA EXCRECION DE PROTEINAS DE BENCE JONES NO SE DEBE A UNA ALTERACION RENAL, SINO A UNA MODIFICACION PATOLÓGICA EN EL PROCESO DE SINTESIS PROTEICA.

¿ LA ALTERACION DE QUE FACTORES CONDICIONAN LA PRESENCIA DE PROTEINAS EN LA ORINA EN CONCENTRACIONES SUPERIORES A LO NORMAL?... PRINCIPALMENTE ALTERACIONES EN LA FILTRACION GLOMERULAR Y LA REABSORCION TUBULAR? A CONTINUACION SE ANALIZAN.

1.- FILTRACION GLOMERULAR. ANTES DE TRATAR LOS DIFERENTES ASPECTOS DE LA COMPOSICION PROTEICA URINARIA, EN CONDICIONES NORMALES Y PATOLOGICAS, ES NECESARIO EXAMINAR DE QUE MANERA LLEGAN LAS PROTEINAS A LA ORINA. POR DERIVAR DEL PLASMA LA MAYORIA DE LAS PROTEINAS URINARIAS, ES NECESARIO EN PRIMER LUGAR QUE ELLAS PASEN LA BARRERA GLOMERULAR, ESTO ES QUE SEAN FILTRADAS POR EL GLOMERULO, ESTABLECIDO EL PASO DE MOLECULAS PROTEICAS SE DEBE DE ADMITIR QUE EN LA ESTRUCTURA GLOMERULAR EXISTEN POROS DE MORFOLOGIA NO DEFINIDA, QUE AL VARIAR SU DIMENSIONES FRENTE A CONDICIONES FISIOLOGICAS O PATOLOGICAS INFLUYEN EN LA COMPOSICION DEL FILTRADO GLOMERULAR. (3)

EL MODELO PROPUESTO POR PAPPENHEIMER Y COL. (4,5), ESTOS POROS LOS CONSIDERAN COMO CANALES CILINDRICOS DE UN DIAMETRO QUE POR LAS DIMENSIONES DE LAS MOLECULAS DE DEXTRANO ESTUDIADAS SE CALCULAN EN 80 A° DE ANCHO Y 500 A° DE LARGO QUE OCUPAN NORMALMENTE EL 5 % AL 10 % DE LA SUPERFICIE CAPILAR GLOMERULAR. LA ESCASA EXTENSION DE LOS POROS FILTRANTES Y LA DISPOSICION DE LOS MISMOS, EXPLICAN LA MODESTA ELIMINACION AUN DE AQUELLAS PROTEINAS CUYO TAMAÑO MOLECULAR ES INFERIOR A LAS DIMENSIONES DE LOS MISMOS. RECIENTEMENTE ARTURSON Y COL. (2), ESTUDIANDO EN EL HOMBRE LA DEPURACION DE DEXTRANOS DE DIVERSOS PESOS MOLECULARES, ENCONTRARON QUE EN LA MEMBRANA BASAL EXISTEN DOS GRUPOS DE POROS, EL PRIMERO QUE PREVALECE ES DE 26 A° Y EL SEGUNDO DE 46 A°, PERO ADEMAS EXISTEN POROS DE HASTA 80 A° EN CANTIDADES MUCHO MENORES QUE LOS ANTERIORES. .

EN LA FILTRACION GLOMERULAR NO SOLO LAS DIMENSIONES DEL PORO CONDICIONA EL PASO DE PROTEINAS POR ELLOS, SINO QUE EXISTEN FACTORES FISICO LIMITANTES , QUE HACEN QUE MOLECULAS CON PESO MOLECULAR SEMEJANTE TENGAN FILTRACION GLOMERULAR DIFERENTE. SEGUN PAPPENHEIMER Y COL. (5), LOS FACTORES FISICO SON LOS SIGUIENTES:

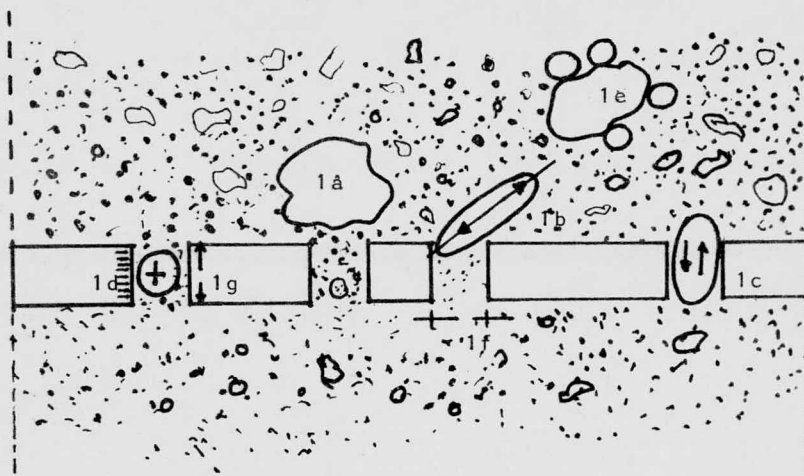
A.- TAMAÑO DEL EJE DE LA MOLECULA PROTEICA (Fig 1a)

B.- IMPEDIMENTO ESTERICO. LA MOLECULA DE PROTEINA DEBE DE TENER UNA ORIENTACION PROPIA HACIA EL PORO, PORQUE DE OTRA MANERA NO PASARA AL FILTRADO GLOMERULAR. ESTE FENOMENO ES MAS NOTABLE PARA PROTEINAS FIBRILARES QUE PARA LAS GLOBULARES (Fig 1b).

C.- ARRASTRE VISCOSO. SE DEBE AL MOVIMIENTO ADHERENTE DE LAS MOLECULAS Y LA CAPA ESTACIONARIA DEL LIQUIDO A LO LARGO DE LA PARED DEL PORO (Fig 1c).

D.- CARGA ELECTRICA. ES LA INTERACCION DE LAS CARGAS ELECTRICAS DE LA MOLECULA PROTEICA Y LA PARED DEL PORO. ESTO DETERMINA LA PERMEABILIDAD DIFERENCIAL ENTRE PROTEINAS CATIONICAS Y ANIONICAS.(Fig 1d).

E.- LA UNION DE MOLECULAS PROTEICAS DE BAJO PESO MOLECULAR A MOLECULAS DE MAYOR PESO, JUEGA UN PAPEL MUY IMPORTANTE EN LA PERMEABILIDAD GLOMERULAR DE ALGUNAS PROTEINAS, POR EJEMPLO LA HEMOGLOBINA QUE SE UNE A LAS HAPTOGLOBINAS.(fig 1e)



7

FIGURA No 1. REPRESENTACION ESQUEMATICA DE LOS FACTORES QUE LIMITAN LA FILTRACION DE LAS MOLECULAS DE PROTEINAS.

1a.- DIMENSIONES MOLECULARES. 1b.- CONFIGURACION ESTERICA. 1c.- VISCOSIDAD. 1d.- CARGA ELECTRICA. 1e.- UNION A OTRAS PROTEINAS. 1f.- AREA TOTAL DEL PORO. 1g.- LARGO DEL PORO. (PAPPENHEMER Y COL.)

2.- REABSORCION TUBULAR. ACERCA DE LA REABSORCION TUBULAR, NUMEROSAS PRUEBAS BASADAS EN ABUNDANTES OBSERVACIONES MORFOLOGICAS, ULTRAMICROSCOPICAS Y DE INMUNOFLORESCENCIA, NO SOLO HAN DEMOSTRADO SINO QUE HAN ESTABLECIDO LAS MODIFICACIONES QUE SUFREN LAS PROTEINAS REABSORBIDAS EN EL CITOPLASMA DE LAS CELULAS DEL TUBULO PROXIMAL (6,7,8). SE ADMITE QUE LA REABSORCION TUBULAR PROTEICA DEL ULTRAFILTRADO GLOMERULAR SE REALIZA POR UN PROCESO DE FAGOCITOSIS, EN LA QUE INTERVIENEN LAS CELULAS TUBULARES (PINOCITOSIS), LAS PROTEINAS ASI CAPTADAS SON TRANSPORTADAS DENTRO DE VACUOLAS HACIA EL CITOPLASMA CELULAR RICO EN ENZIMAS.

MAS PROTEOLITICAS , ENCARGADAS DE LA DIGESTION DE LAS PROTE _
INAS REABSORBIDAS.

ACEPTANDO QUE EL TUBULO INTERVIENE REABSORBIENDO PROTE _
INAS FILTRADAS, DEBEMOS PREGUNTARNOS COMO OCURRE LA REABSORCION
TUBULAR . DURANTE MUCHO TIEMPO Y PARTIENDO DE LAS LAS OBSERVACIO _
NES DE HARDWICK Y SQUIRE (9), SE SOSTUVO QUE LA REABSORCION TU _
BULAR PROTEICA INESPECIFICA, NO SELECTIVA, INCLUIA A TODAS LAS
PROTEINAS, SI ESTA HIPOTESIS FUESE CIERTA , EN EL MIELOMA CON _
PROTEINURIA DE BENGE JONES DEBERIAMOS OBSERVAR SIEMPRE UN AUMEN _
TO EN LA ELIMINACION URINARIA DE OTRAS FRACCIONES PROTEICAS , -
FENOMENO QUE ES RARAMENTE DEMOSTRADO.

EN LOS ESTUDIOS DE CORTNEY Y COL. (8), LA REABSORCION DE _
ALBUMINA MARCADA CORRESPONDE A UN 10 % DE LA DOSIS ADMINISTRA _
DA , MIENTRAS QUE POR EL CONTRARIO LA REABSORCION TUBULAR DE _
INSULINA Y DE RIBONUCLEASA, MOLECULAS ESTAS DE MENOR PESO MO _
LECULAR , ES MAYOR DEL 60 % . ESTOS DATOS SE INCLINAN A PENSAR
EN LA EXISTENCIA DE MECANISMOS SEPARADOS QUE REGIN LA REABSOR _
CION TUBULAR DE LAS PROTEINAS . SEGUN ALGUNOS INVESTIGADORES
PODEMOS INDIVIDUALIZAR AL MENOS DOS: UNA PARA MOLECULAS DE PE _
SO MOLECULAR INTERMEDIO Y OTRO PREFERENCIAL O MAS EFICIENTE _
PARA MOLECULAS DE MENOR PESO.

TIPOS DE PROTEINURIAS.

1.- PROTEINURIA GLOMERULAR. SE DEBE A UN AUMENTO ANORMAL EN LA PERMEABILIDAD GLOMERULAR. EN ESTE TIPO PASAN AL FILTRADO MOLECULAS DE ALTO PESO MOLECULAR Y APARECEN EN LA ORINA.

2.- PROTEINURIA TUBULAR. EN ESTE CASO LA CANTIDAD DE PROTEINAS FILTRADAS POR EL GLOMERULO NO SE ENCUENTRAN AUMENTADAS, LO QUE SUCEDE ES QUE LAS PROTEINAS DE BAJO PESO MOLECULAR QUE NORMALMENTE SON REABSORBIDAS POR LOS TUBULOS SON ELIMINADAS EN LA ORINA DEBIDO A LA INCAPACIDAD DE LOS MISMOS PARA REABSORBERLAS.

PROTEINURIA GLOMERULAR, SE DESIGNA CON ESTE TERMINO A UNA PROTEINURIA MUY VARIABLE (0.200 a 0.300 g/l) EN LA GLOMERULO NEFRITIS CRÓNICA Y (5 a 10 g/l) EN EL SINDROME NEFROTICO, COMO CONSECUENCIA DE UN AUMENTO EN LA PERMEABILIDAD GLOMERULAR PARA LAS PROTEINAS PLASMATICAS. EN LA ELECTROFORESIS SOBRE ACETATO DE CELULOSA DE ORINAS CONCENTRADAS, SE CARACTERIZA EL PATRON POR LA PRESENCIA DE UN BANDA DE ALBUMINA DE MAYOR IMPORTANCIA CUANTITATIVA Y DE BETA-GLOBULINA, (2). LA PRESENCIA Y SOBRE TODO LA CANTIDAD DE GAMM-GLOBULINA, SIRVE PARA DIFERENCIAR LA FORMA DE LA PERMEABILIDAD SELECTIVA CUYA CANTIDAD DE GAMM-GLOBULINA ES EXTREMADAMENTE ESCAS, DE AQUELLA DE PERMEABILIDAD NO SELECTIVA, EN LA CUAL EXISTE UNA MAYOR CONCENTRACION DE ESTA.

EN EL AMBITO DE LA PROTEINURIA GLOMERULA SE ENCUENTRA
TRES TIPOS:

a.- PROTEINURIA SELECTIVA. EXISTE UN PREDOMINIO DE LAS _
FRACCIONES DE PESO MOLECULAR INFERIORES A 100,000, PRINCIPAL_
MENTE ALBUMINA Y TRANSFERRINA. EN LA ELECTROFORESIS EN ACETA_
TO DE CELULOSA, SE OBERVA UNA GRUESA BANDA DE ALBUMINA , QUE _
ES LA FRACCION EN MAYOR CONCENTRACION (75-85%), LA FRACCION _
ALFA UNO ES MAYOR QUE LA ALFA DOS, QUE ES MUY ESCASA O NO EXIS_
TE. EN LA REGION BETA SE ENCUENTRA LA TRANSFERRINA Y NO APARECE
GAMMA-GLOBULINA.(2)

b.- PROTEINURIA NO SELECTIVA. SE CARACTERIZA POR TENER UN
ASPECTO ELECTROFORETICO SIMILAR AL DEL SUERO, LA ALBUMINA ES LA
FRACCION PRINCIPAL PERO NO SUPERA EL 60%, LA FRACCION ALFA DOS
ES MAYOR QUE SU CORRESPONDIENTE ALFA UNO LA FRACCION DE LAS _
GAMMA-GLOBULINAS ES DE MAYOR IMPORTANCIA CUANTITATIVA.(2)

c.- PROTEINURIA DE SELECTIVIDAD INTERMEDIA. LA ALBUMINA ES
LA FRACCION DE MAYOR IMPORTANCIA, LA GLOBULINA DOS ESTA AUMEN_
TADA PERI NO ALCANZA LOS VALORES DE LA FRACCION UNO. EN LA ZONA
DE LAS BETA SE ENCUENTRA LA TRANSFERRINA, Y APARECEN LAS GAMMA-
BLOBULINAS. (2)

EL MECANISMO DE LA PROTEINURIA GLOMERULAS DEDUCIDO EN GRAN

PARTE POR LAS OBSERVACIONES EXPERIMENTALES DE HAWKINS Y COHRANE Y GANG (10), EN LA NEFRITIS INDUCIDA POR SUERO DE CONEJO ANTI MEMBRANA BASAL, Y LA CUAL SE CARACTERIZA EN PRIMER TIEMPO POR UN AUMENTO EN LA PERMEABILIDAD GLOMERULAR COMO CONSECUENCIA DE ALTERACIONES EN LA ESTRUCTURA MOLECULAR DE LA MEMBRANA BASAL, A CAUSA DE ALTERACIONES POR DEPOSITOS DE ANTICUERPOS, EN ESTE MOMENTO LA PROTEINURIA SE CARACTERIZA SOLO POR ALBUMINA. EN UN SEGUNDO TIEMPO POR ACCION DEL COMPLEMENTO, APARECEN EN LA MEMBRANA BASAL UN INFILTRADO DE LEUCOCITOS POLIMORFONUCLEARES QUE LIBERAN ENZIMAS PROTEOLITICAS Y PROVOCAN ALTERACIONES MAS EXTENSAS Y MARCADAS EN LA MEMBRANA BASAL. A JUZGAR POR ESTAS OBSERVACIONES LA PROTEINURIA DE LAS LESIONES GLOMERULARES SE MANIFIESTA EN DOS FASES: LA PRIMERA LIGADA AL DEPOSITO DEL COMPLEJO INMUNE ANTIGENO- ANTICUERPO, O ANTICUERPO ANTI-MEMBRANA BASAL CON PREDOMINIO NETO DE ALBUMINA: SEGUNDO, LA ACCION DE LOS NEUTROFILOS SOBRE LA MEMBRANA BASAL, EN LA CUAL SE PRESENTARA ALBUMINURIA CON GAMMA-GLOBULINURIA. (12)

PROTEINURIA TUBULAR. SON PROTEINURIAS DE BAJO PESO MOLECULAR, ESTAS PROTEINAS PRESENTES EN EL SUERO EN BAJAS CONCENTRACIONES, SON FILTRADAS POR EL GLOMERULO Y REABSORBIDAS NORMALMENTE POR EL TUBULO PROXIMAL, PARA ENCONTRARSE EN MUY BAJAS CONCENTRACIONES EN LA ORINA DE PACIENTES SIN TUBULOPATIAS. DENTRO DE LAS PROTEINAS LLAMADAS TUBULARES TENEMOS LA LISOZIMA, LA BETA GLOBULINA DE BERGGARD, LA POST-GAMMA-GLOBULINA, LAS CA

DENAS LIGERAS DE LAS INMUNOGLOBULINAS, LAS INSULINA, LA PARATHORMONA Y LA HORMONA DEL CRECIMIENTO. (13,14)

EL PATRON ELECTROFORETICO DE ORINAS CONCENTRADAS DE PACIENTES CON TUBULOPATIAS SE CARACTERIZA, POR BANDAS HOMOGENEAS BIEN DEFINIDAS, UNA REGION DE PRE-ALBUMINA SEGUIDA DE UNA BANDA DE ALBUMINA MUY DEBIL, DIVERSAS BANDAS EN LA REGION POST-ALBUMINA UNA O DOS DE ELLAS EN LA REGION ALFA UNO Y DE TRANSFERRINA, MIENTRAS QUE EN LA ZONA DE TRANSICION ENTRE LA BETA Y LA GAMMA SE OBSERVA PERFECTAMENTE DOS BANDAS, UNA DE ELLAS SE DESTACA NITIDAMENTE, TANTO, QUE EN ALGUNAS OCACIONES ES LA FRACCION PRINCIPAL EN ESTA ZONA, Y ES LA LLAMADA BETA LENTA O BETA-GLOBULINA DE BERGGARD. CON FRECUENCIA TAMBIEN PODEMOS ENCONTRAR BANDAS COM MOVILIDAD POST-GAMMA. (15,16,17)

2.- METODOLOGIA ANALITICA.

LAS PROTEINAS SON MACROMOLECULAS DE PESO MOLECULAR BIEN _
DEFINIDO, QUE PARA SU CUANTIFICACION SE HAN IDEADO DIVERSAS ME _
TODOLOGIAS, FUNDAMENTANDOSE EN SUS PROPIEDADES FISICOQUIMICAS
E INMUNOLOGICAS.

a.- METODOS SEMICUANTITATIVOS. SE RECURRE EN GENERAL A _
PRUEBAS DE FACIL REALIZACION . EN ESTE TIPO DE PROCEDIMIENTOS
SE ENCUENTRAN LAS TIRAS REACTIVAS, QUE SON LAS MAS USADAS EN LA
RUTINA DE LA MAYORIA DE LOS LABORATORIOS, Y SE FUNDAMENTAN EN
EL ERROR PROTEICO DE LOS INDICADORES , EN LAS CUALES EL AZUL DE
BROMOFENOL AMORTIGUADO EN CITRATO A pH DE 3.5 , CUYO COLOR EN _
PRESENCIA DE LOS AMINOGRUPOS DE LAS PROTEINAS QUE SE UNEN AL _
AZUL DE BROMOFENOL, CAMBIA DEL AMARRILLO AL VERDE AZULADO POR _
DISMINUCION DE LA ACIDEZ. ES UNA VALORACION DE ORIENTACION _
UNICAMENTE, YA QUE ES IMPOSIBLE PONER DE MANIFIESTO LA PRESEN_
CIA DE PROTEINAS DE BAJO PESO MOLECULAR , COMO POR EJEMPLO LA
PROTEINA DE BENCE JONES Y MICROGLOBULINAS. BENDERHOM, E. EN --
1975 PUBLICO UN METODO EN EL CUAL UTILIZO EL VERDE DE BROMOCRE _
SOL, QUE ES UN COLORANTE QUE SOLO REACCIONA CON LA ALBUMINA PE _
RO NO ASI CON LAS GLOBULINAS , Y SE PRESENTA EL MISMO PROBLEMA
QUE LAS TIRAS REACTIVAS. (18)

EN CUANTO A LOS METODOS CUANTITATIVOS, HAY UNA GRAN VARI_ _
RIEDAD DE PUBLICACIONES DE LOS MISMOS, CADA UNO DE ELLOS CON _
SUS VENTAJAS Y DESVENTAJAS.

b.- METODOS TURBIDIMETRICOS. SE FUNDAMENTAN EN LA PRECIPIT_ _
ACION CATIONICA DE LAS PROTEINAS , POR EJEMPLO ACIDO TRICLO_ _
ROACETICO, ACIDO SULFOSALICILICO. ESTOS METODOS SE REPORTAN _
COMO INEXACTOS Y DE MARCADA VARIABILIDAD, DEBIDO A LA INTERFE_ _
RENCIA DE DROGAS Y FACTORES FISICOS QUE AFECTAN LA PRECIPITA_ _
CION, COMO PUEDE SER LA TEMPERATURA. (18)

c.- METODOS COLORIMETRICOS. LA MAYORIA DE ESTOS METODOS _
SI NO ES QUE TODOS, USAN UNA SEPARACION INICIAL DE LAS PROTE_ _
INAS DE LA ORINA PARA POSTERIORMENTE APLICAR UNA REACCION DE _
COLOR SOBRE EL PRECIPITADO. JAMES, D. PEELE EN 1977 (19), UTI_ _
LIZO LA CROMATOGRAFIA DE EXCLUSION MOLECULAR , CONOCIDA TAM_ _
BIEN COMO FILTRACION EN GEL, PARA SEPARAR LAS PROTEINAS DE _
ACUERDO A SU PESO MOLECULAR, Y EN EL LIQUIDO DE EXCLUSION REA_ _
LIZO LA REACCION DE BIURET PARA DETERMINAR CADA FRACCION SEPA_ _
RADA. JHON, M. MOELA EN 1977, (20), EFECTUO LA SEPARACION POR
MEDIO DE ADSORCION SELECTIVA SOBRE ACETATO DE CELULOSA, Y LA _
REACCION COLORIMETRICA LA REALIZO CON PONCEAU Y ELUCION DEL CO_ _
LOR CON HIDRÓXIDO DE SODIO.

d.- METODOS INMUNOLOGICOS. SE FUNDAMENTAN EN LA PRECIPITA_

CION FORMADA POR LA REACCION ANTIGENO-ANTICUERPO, LA CUAL SE MIDE NEFELOMETRICAMENTE , DEMETRIUS EN 1975 (21), Y KILLINGSWOT EN 1977 (21), USARON ESTA METODOLOGIA , Y ENCONTRARON EN ESTUDIOS COMPARATIVOS ENTRE METODOS COLOROMETRICOS E INMUNOLOGICOS RESULTADOS MAYORES PARA LOS PRIMEROS, COMO ES DE ESPERARSE, YA QUE SE ENCUENTRAN EN LA ORINA PROTEINAS QUE NO SOLO TIENEN SU ORIGEN EN EL PLASMA, SINO EN EL TRACTO URINARIO Y RIÑON, UN EJEMPLO DE ESTE TIPO ES LA MUCROPROTEINA DE TAMM-HORSFALD, LA CUAL EN LAS ULTIMAS FECHAS SE LE HA ASIGNADO SER LA RESPONSABLE DE LA FORMACION DE CILINDROS EN LOS TUBULOS. (2)

e.- METODOS QUIMICOS. DENTRO DE ESTE TIPO TENEMOS EL DE FENOL , EN LA CUAL TODOS LOS AMINOACIDOS QUE EN SU CADENA POSEAN GRUPOS FENOLICOS, REACCIONAN CON CIERTOS OXIDOS SUPERIORES DE MOLIBDENO, PARA PRODUCIR UN COLOR AZUL PROPORCIONAL AL NUMERO DE GRUPOS FENOLICOS PRESENTES EN LA MOLECULA DE PROTEINA. (23)

UNO DE LOS METODOS MAS GENERALIZADOS PARA LA CUANTIFICACION DE PROTEINAS EN LOS LIQUIDOS BIOLOGICOS ES EL DE BIURET, LLAMADA ASI A LA SUSTANCIA GENERICA DE ESTE GRUPO QUE SE OBTIENE POR CALENTAMIENTO DE LA UREA A 180 °C , QUE SE DESCOMPONE Y DA ORIGEN AL BIURET. TODAS LAS SUSTANCIAS QUE POSEAN UNIONES PEPTIDICAS COMO OCURRE CON EL BIURET , DAN UNA COLORACION VARIABLE ENTRE EL ROJO Y EL AZUL VIOLACEO EN PRESENCIA

DE CATIONES CUPRICOS EN UN MEDIO ALCALINO. KUNTSEE Y DROCHER (23), SEÑALAN QUE LA COLORACION AZUL VIOLACEA POSEE DOS COMPONENTES , UNO DE COLOR ROJO QUE RESULTA DE LA UNION DE UNA O MAS UNIONES PEPTIDICAS , Y OTRA DE COLOR AZUL QUE ES DEBIDA A LA FORMACION DE UN COMPLEJO ENTRE EL COBRE Y LOS GRUPOS AMINOS LIBRES DE LAS PROTEINAS . EN LA REACCION DE BIURET UN ION CUPRICO SE UNE A CUATRO O SEIS ENLACES PEPTIDICOS, LA INTENSIDAD DEL COLOR ES PROPORCIONAL AL NUMERO DE ESTOS QUE EXPERIMENTAN LA REACCION.

f.- METODOS ELECTROFORETICOS. ESTAN BASADOS EN EL MOVIMIENTO O MIGRACION DE UNA PARTICULA CARGADA BAJO LA INFLUENCIA DE UN CAMPO ELECTRICO, EN EL CUAL ES NECESARIO: 1.- UN CAMPO ELECTRICO, 2.- UNA PARTICULA CARGADA, 3.- UN SOPORTE DONDE ESTE MOVIMIENTO PUEDA OCURRIR. LA ELECTROFORESIS DE PROTEINAS URINARIAS NO TIENE APLICACION COMO METODO CUANTITATIVO, SIN EMBARGO DESDE EL PUNTO DE VISTA DE CONOCER CADA UNA DE LAS FRACCIONES ELIMINADAS EN LOS DIFERENTES PADECIMIENTOS Y COMO UN METODO PARA SEGUIR LA EVOLUCION DE UN PACIENTE ES DE GRAN VALOR.

C A P I T U L O I I I .

MATERIAL Y METODOS.

1.- EL PRODUCTO BIOLÓGICO UTILIZADO FUE LA PRIMERA ORINA DE LA MAÑANA DE 630 PACIENTES QUE ASISTIERON AL SERVICIO DE LABORATORIO EN EL HOSPITAL GUADALUPE DE PUEBLA, 263 DEL SEXO FEMENINO Y 267 DEL MASCULINO, CON EDADES COMPRENDIDAS ENTRE LOS 11 Y 80 AÑOS.

2.- METODO DE SELECCION DE LAS ORINAS CON PROTEINAS.

EN LAS 630 MUESTRAS DE ORINA SE REALIZO PRUEBA CUALITATIVA PARA PROTEINAS POR MEDIO DE COMBUR 8 TEST(Boehringer Mannheim, 82274 Alemania). SE OBTUVIERON 100 MUESTRAS POSITIVAS.

EN LAS MUESTRAS POSITIVAS SE DETERMINARON PROTEINAS POR MEDIO DEL METODO DE TSUCHIYA - YATZIDIS(biuret modificado), KINGSBURY - CLARCK Y ELECTROFORESIS DE PROTEINAS EN ACETATO DE CELULOSA.

METODO DE KINGSBURY - CLARCK.

a.- FUNDAMENTO. AL AÑADIR EL ACIDO SULFOSALICILICO A UNA SOLUCION DE PROTEINAS , ESTAS CAMBIAN A LA FORMA CATIONICA, Y FACILMENTE SE COMBINAN CON UN ANION PARA FORMAR UN PRECIPITADO QUE TEORICAMENTE DEBE DE RESULTAR PROPORCIONAL A LA CANTIDAD DE PROTEINAS PRESENTES.

b.- REACTIVOS.

1.- ACIDO SULFOSALICILICO AL 3.0 %

SE PESAN 30 G DE ACIDO SULFOSALICILICO Y SE PASAN A UN MATRAZ AFORADO DE 1000 ML. SE COMPLETA A LA MARCA CON AGUA DESTILADA.

2.- PATRON DE PROTEINAS CON UNA CONCENTRACION DE 0.600 G/L:

3.- SOLUCION SALINA AL 0.85 %.

c.- MATERIAL.

1.- TUBOS DE 13X100 ML.

2.- PIPETAS DE 1.0 Y 5.0 ML

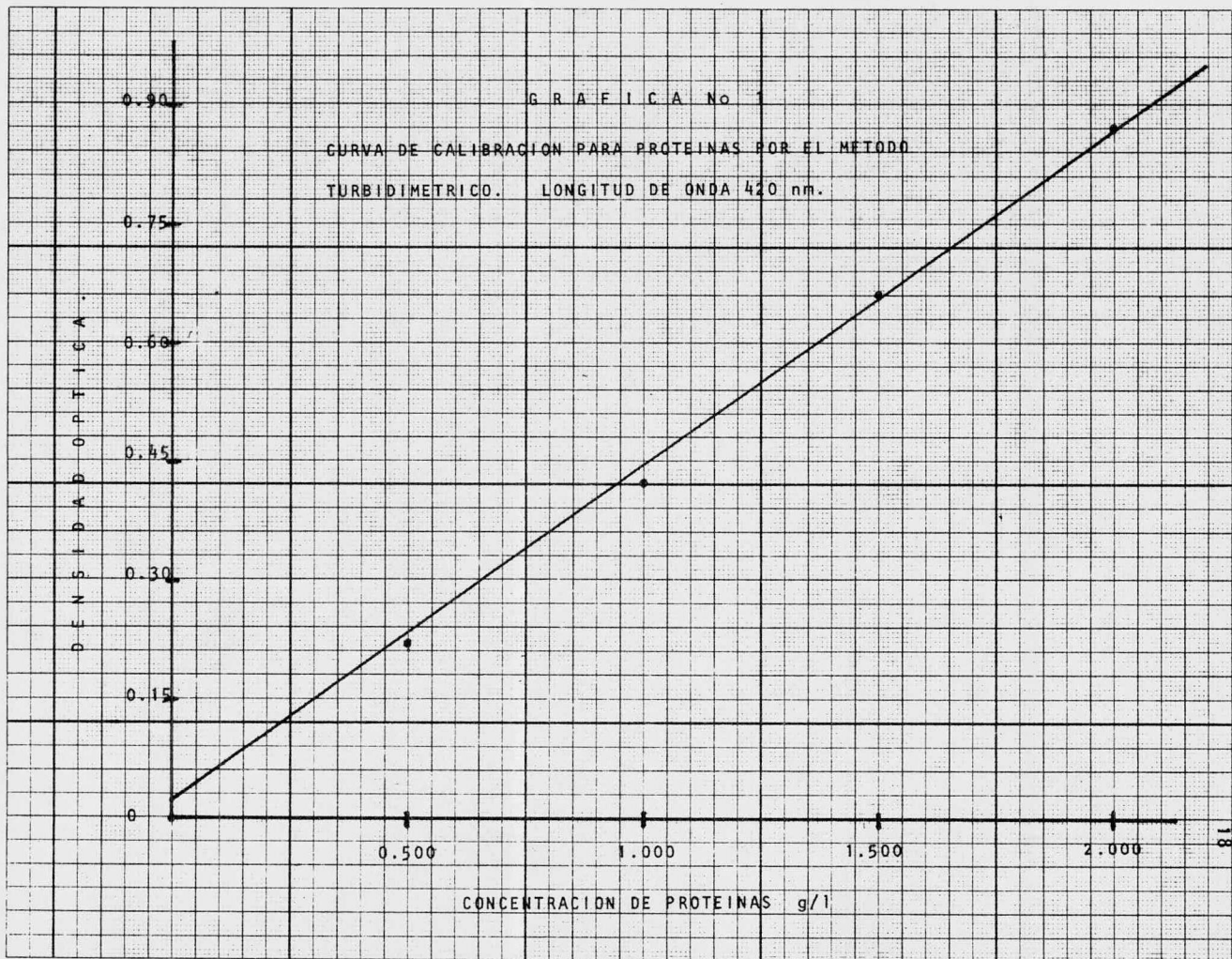
3.- RELOJ DE INTERVALOS

4.- ESPECTROFOTOMETRO COLEMAN JUNIOR III.

d.- PROCEDIMIENTO.

1.- CENTRIFUGAR LAS ORINAS CON PROTEINAS A 3000 RPM, DURANTE 10 MINUTOS , Y PROSEGUIR DE ACUERDO AL SIGUIENTE ESQUEMA

	BLANCO PROBLEMA	PROBLEMA	BLANCO ESTANDAR	ESTANDAR
ORINA	1.0 ML	1.0 ML	-	-
PATRON DE PROTEINAS	-	-	1.0 ML	1.0 ML
SOLUCION SALINA	5.0 ML	-	5.0 ML	-
ACIDO SULFOSALICILICO	-	5.0 ML	-	5.0 ML
DEJAR ESTAR A TEMPERATURA AMBIENTE DURANTE 5 MINUTOS.				



2.- LEER A UNA LONGITUD DE ONDA DE 420 nm, AJUSTANDO A CERO CON SU CORRESPONDIENTE BLANCO.

e.- CALCULOS.

EL RESULTADO SE PUEDE OBTENER EXTRAPOLANDO EL RESULTADO DE DENSIDAD OPTICA EN LA CURVA DE CALIBRACION, O POR MEDIO DE LA SIGUIENTE ECUACION.

$$\text{CONCENTRACION} = \frac{D.O. \text{ PROBLEMA}}{D.O. \text{ PATRON}} \times \text{CONCENTRACION DEL PATRON.} = \text{g/l DE PROTEINAS.}$$

METODO DE TSUCHIYA- YATZIDIS.

a.- FUNDAMENTO. AL ADISIONAR EL REACTIVO DE TSUCHIYA A LAS MUESTRAS DE ORINA CON PROTEINAS, EL EFECTO COMBINADO DEL ACIDO CLORHIDRICO, ACIDO FOSFOTUNGSTICO Y EL ETANOL PRECIPITAN ESTAS, DEBIDO A QUE EL ETANOL POSEE UNA CONSTANTE DIELECTRICA MENOR QUE LA DEL AGUA, ESTO INCREMENTA LA ATRACCION ENTRE CARGAS OPUESTAS, Y DA COMO RESULTADO QUE LAS MOLECULAS SE AGREGAN Y PRECIPITAN. EL ACIDO CLORHIDRICO TRANSFORMA A LAS PROETINAS DE LA FORMA CATIONICA, Y AL ESTAR PRESENTE UN ANION COMO EL TUNGSTATO SE COMBINAN Y PRECIPITAN. LAS UNIONES PEPTIDICAS DE LAS PROTEINAS, SE UNEN AL ION CUPRICO PARA FORMAR UN COMPLEJO DE COLOR AZUL, PROPORCIONAL AL NUMERO DE ESTAS Y A SU VEZ A LA CANTIDAD DE PROTEINAS PRESENTE.

b.- REACTIVOS.

1.- REACTIVO DE TSUCHIYA.

EN UN MATRAZ AFORADO DE 100 ML AGREGAR 5.0 ML DE ACIDO CLORHIDRICO CONCENTRADO, 6.0 ML DE AGUA DESTILADA Y 77 ML DE ETANOL:AGUA(95:5 v/v) Y 15 G DE ACIDO FOSFOTUNGSTICO.

2.- REACTIVO DE HIPPOCRATES YATZIDIS. (biuret modificado)

EN UN MATRAZ AFORADO DE 1000 ML AÑADIR, 3.8 G DE $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$, 6.7 G DE EDTA, 17.5 G DE GLICINA, 14 G DE NaCl EN 750 ML DE AGUA DESTILADA. ESTABLE A TEMPERATURA AMBIENTE DURANTE SEIS MESES.

3.- SOLUCION PATRON DE PROTEINAS DE 0.600 G/L

4.- SUEROS CONTROLES COMERCIALES. 0.600 G/L, 0.250 G/L Y 1.500 G/L DE PROTEINAS.

c.- MATERIAL.

EL MISMO QUE EL PARA EL METODO ANTERIOR

d.- PROCEDIMIENTO.

1.- CENTRIFUGAR LAS ORINAS DURANTE 5 MINUTOS A 3000 RPM

2.- PROSEGUIR COMO EN EL SIGUIENTE ESQUEMA.

	PROBLEMA	PATRON
SOBRENADANTE DE LA ORINA	2.0 ml	-
PATRON DE PROTEINAS	-	2.0 ml
REACTIVO DE TSUCHIYA	2.0 ml	2.0 ml
MEZCLAR Y COLOCAR TODOS LOS TUBOS EN UN BAÑO MARIA A 56 °C, DURANTE 15 MINUTOS.		
CENTRIFUGAR LOS TUBOS DURANTE 5 MINUTOS A 3000 RPM, Y DECANTAR EL SOBRENADANTE.		
ETANOL	1.0 ml	1.0 ml
DISPERSAR EL PRECIPITADO FORMADO EN EL FONDO DEL TUBO, CENTRIFUGAR Y DECANTAR EL SOBRENADANTE.		
EN EL PRECIPITADO AÑADIR:		
REACTIVO DE YATZIDIS.	2.5 ml	2.5 ml
ESPERAR 10 MINUTOS PARA EL DESARROLLO DE COLOR.		
3.- LEER LOS TUBOS MARCADOS COMO PROBLEMA Y PATRON A 545 nm CONTRA UN BLANCO DE REACTIVO DE YATZIDIS.		

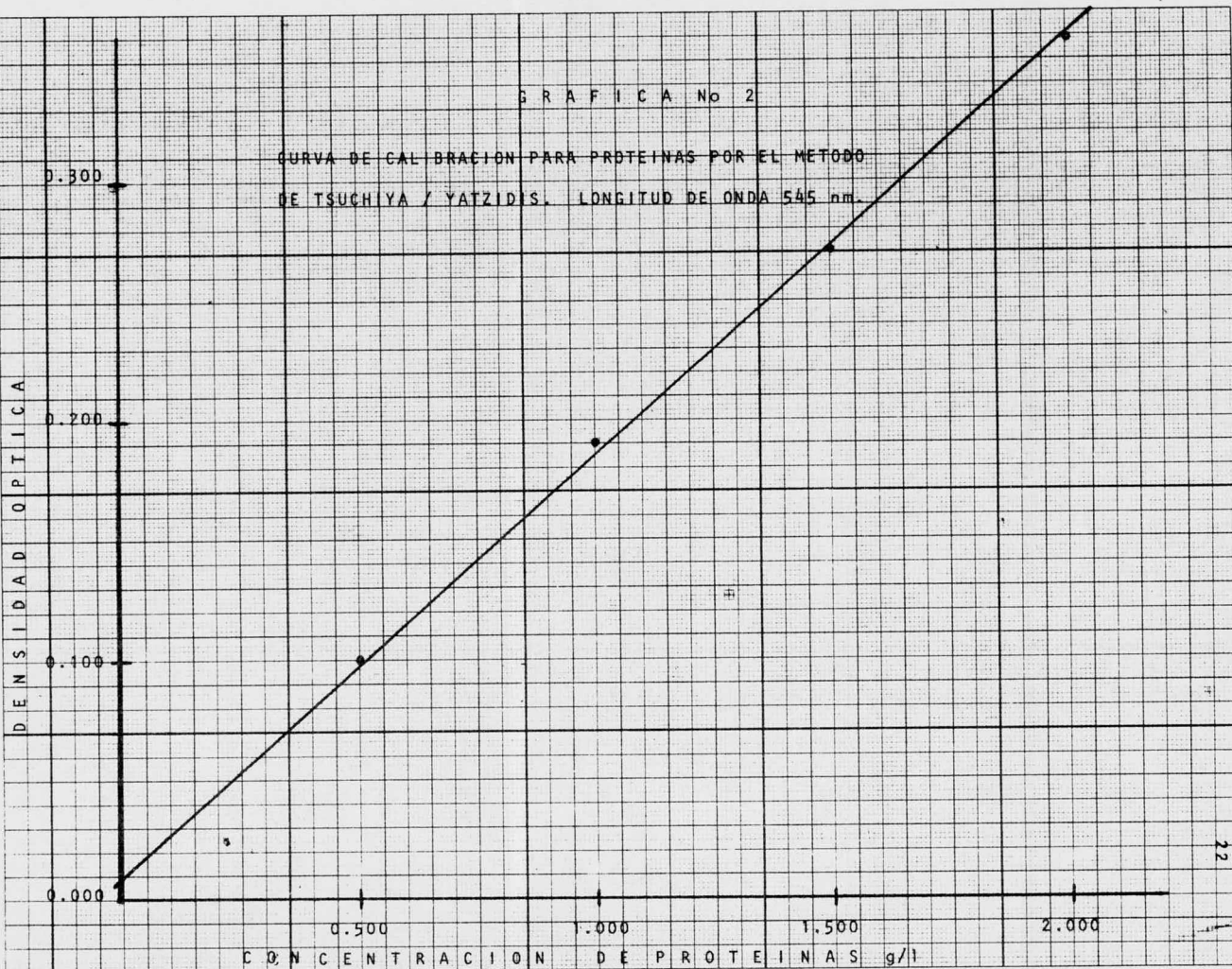
e.- CALCULOS.

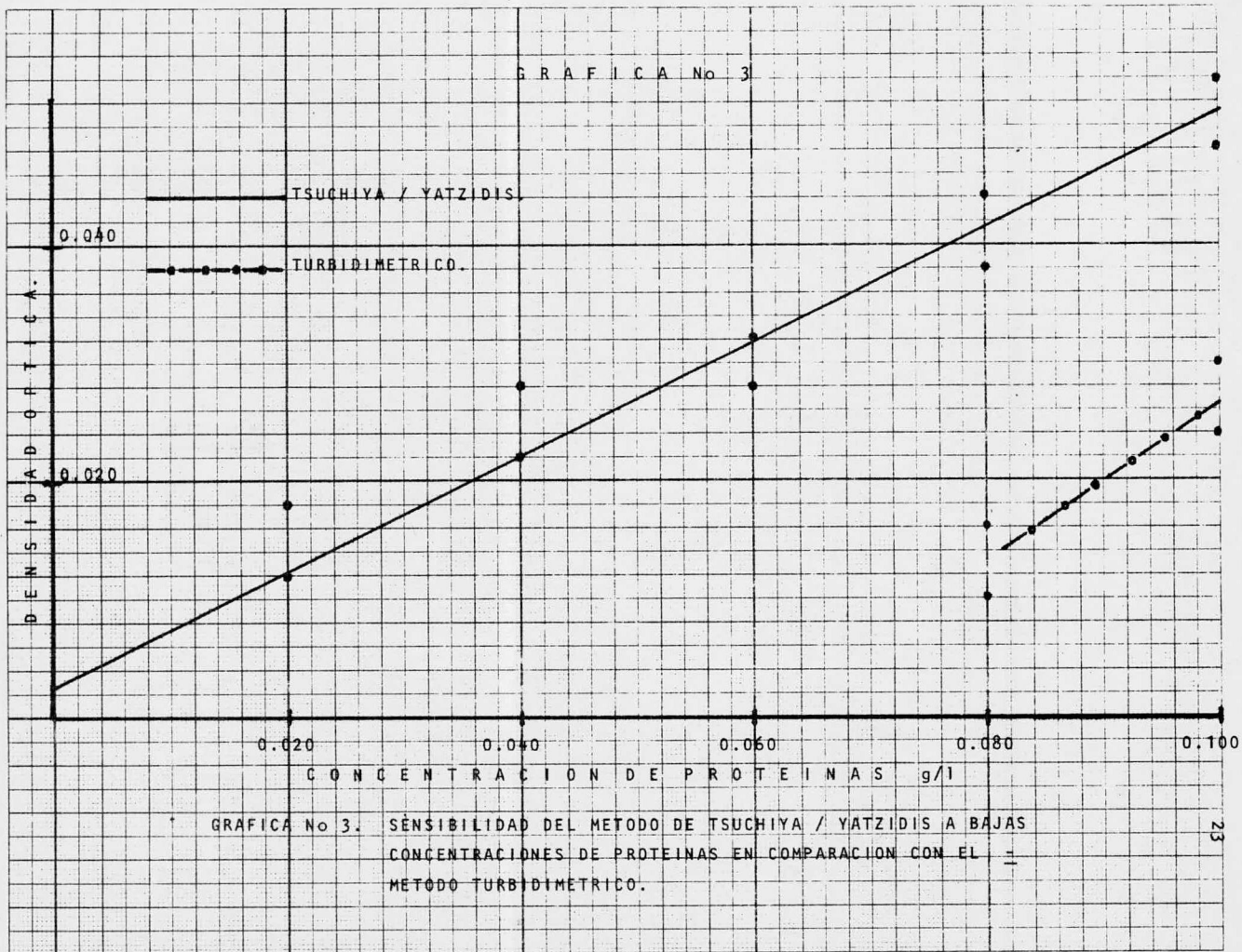
LA CONCENTRACION DE PROTEINAS SE OBTIENE POR MEDIO DE LA SIGUIENTE ECUACION, O DE OTRA MANERA EXTRAPOLANDO LAS LECTURAS DE DENSIDAD OPTICA SOBRE LA CURVA DE CALIBRACION.

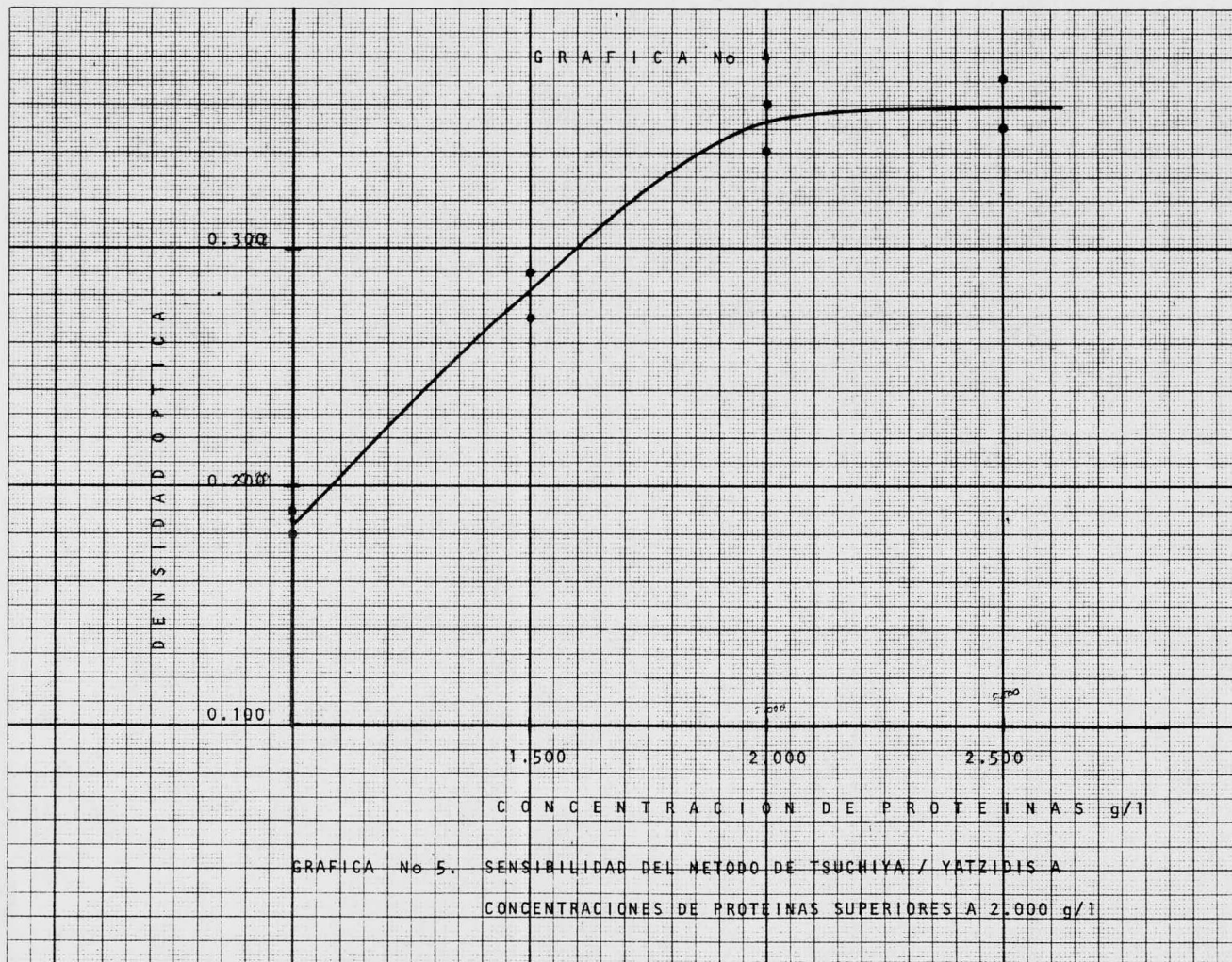
$$\text{CONCENTRACION} = \frac{\text{D.O. PROBLEMA}}{\text{D.O. PATRON}} \times \text{CONCENTRACION PATRON} = \text{g/l}$$

GRAFICA No 2

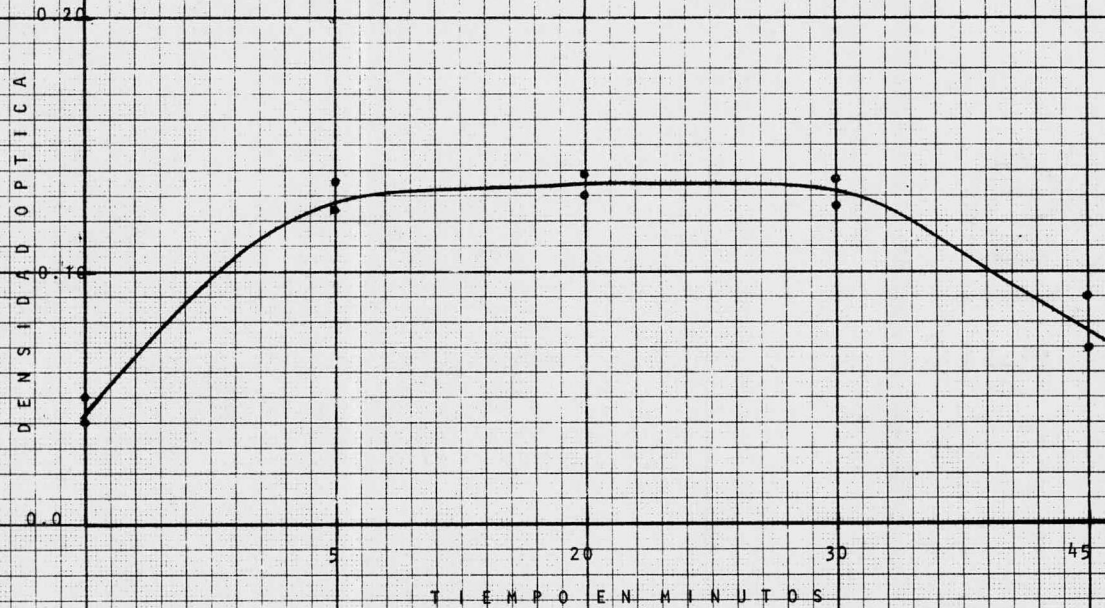
CURVA DE CALIBRACION PARA PROTEINAS POR EL METODO
DE TSUCHIYA / YATZIDIS. LONGITUD DE ONDA 545 nm.







GRAFICA No 5



GRAFICA No 5. MAXIMO DESARROLLO DE COLOR CON EL REACTIVO DE HIPPOCRATES YATZIDIS Y ESTABILIDAD DEL MISMO CON RESPECTO AL TIEMPO.

ELECTROFORESIS DE PROTEINAS.

a.- FUNDAMENTO. CUANDO UAN PROTEINA EN SOLUCION SE SOMETE A LA ACCION DE UN CAMPO ELECTRICO, ESTAS SE SEPARAN EN SUS DI_ FERENTES FRACCIONES DE ACUERDO A SU PESO MOLECULAR , CARGA _ ELECTRICA, PUNTO ISOELECTIRCO, FUERZA IONICA Y pH DEL AMORTI_ GUADOR UTILIZADO.

b.- MATERIAL Y EQUIPO. (Helena Laboratories)

1.-AMORTIGUADOR DE BARBITURATOS A UN pH DE 8.6 Y FUERZA IONICA DE 0.05.

2.- CAMARA PARA ELECTROFORESIS.

3.- FUENTE DE PODER

4.- APLICADOR DE MUESTRAS.

5.- PLACAS DE ACETATO DE CELULOSA.

6.- COLORANTE PONCEAU S.

7.- DENSITOMETRO.

8.- MINICON B15 (American Corporation, Lexiton Mass.)

c.- METODO.

LAS ORINAS FUERON CONCENTRADAS EN MINICON B15, DE ACUERDO A LA CANTIDAD DE PROTEINAS PRESENTES EN LA MUESTRA ENTRE 4.0 A 5.0 G/L. LA ELECTROFORESIS SE EFECTUO DE LA SIGUIENTE MANERA

1.- PONER 50 ML DEL AMORTIGUADOR EN CADA UNO DE LOS COM_ PARTIMENTOS DE LA CAMARA DE ELECTROFORESIS.

2.- HIDRATAR LA MEMBRANA DE ACETATO DE CELULOSA EN EL AMORTIGUADOR DURANTE 15 MINUTOS ANTES DE SU USO.

3.- SECAR LAS MEMBRANAS CON PAPEL ABSORBENTE Y APLICAR 5 μ L DE MUESTRA DE LA ORINA CONCENTRADA.

4.- PONER LA MEMBRANA EN LA CAMARA, Y APLICAR UN VOLTAJE DE 180 VOLTS DURANTE 15 MINUTOS.

5.- PASAR LA MEMBRANA AL COLORANTE DE PONCEAU S, DURANTE 15 MINUTOS, PARA LA TINCION DE CADA UNA DE LAS FRACCIONES.

6.- LAVAR EL EXESO DE COLORANTE CON ACIDO ACETICO AL 5 % DURANTE 5 MINUTOS.

7.- DESHIDRATAR LA MEMBRANA EN METANOL DURANTE 2 MINUTOS

8.- PASAR LA MEMBRANA A UNA SOLUCION TRANSPARENTADORA, QUE CONTIENE 20 % DE ACIDO ACETICO, 80% METANOL DURANTE 5 MINUTOS.

9.- SECAR LA MEMBRANA SOBRE UNA PLACA A 56-60 °C, HASTA QUE ESTE TOTALMENTE TRANSPARENTE.

10.- ENMICAR Y GRAFICAR EN EL DENSITOMETRO, CON UN FILTRO DE 525 nm.

C A P I T U L O I V

R E S U L T A D O S

T A B L A No 1.

RESULTADOS ENCONTRADOS POR EL METODO DE TSUCHIYA- YATZIDIS Y EL METODO TURBIDIMETRICO EN 100 MUESTRAS DE ORINA CON PROTEINAS.

METODO DE TSUCHIYA YATZIDIS. g/l	METODO TURBI DIMETRICO g/l	METODO DE TSUCHIYA YATZIDIS g/l	METODO TURBI DIMETRICO g/l
1.- 0.250	0.230	27.- 0.240	0.180
2.- 2.130	2.210	28.- 0.890	0.750
3.- 2.060	2.170	29.- 1.120	1.060
4.- 0.390	0.250	30.- 0.440	0.280
5.- 0.450	0.410	31.- 1.580	1.550
6.- 0.590	0.570	32.- 1.700	1.840
7.- 0.600	0.510	33.- 1.220	1.140
8.- 0.400	0.380	34.- 0.500	0.450
9.- 0.300	0.280	35.- 0.540	0.530
10.- 0.230	0.210	36.- 0.970	0.970
11.- 2.000	2.100	37.- 0.510	0.480
12.- 0.220	0.200	38.- 1.220	1.170
13.- 0.100	-----	39.- 0.630	0.580
14.- 0.220	0.200	40.- 1.200	1.140
15.- 0.030	-----	41.- 0.890	0.770
16.- 0.470	0.430	42.- 1.020	1.010
17.- 0.680	0.530	43.- 0.360	0.360
18.- 0.180	0.120	44.- 1.740	1.860
19.- 0.610	0.520	45.- 0.690	0.660
20.- 0.120	0.120	46.- 0.120	0.090
21.- 0.340	0.330	47.- 1.100	1.100
22.- 0.590	0.370	48.- 0.630	0.570
23.- 0.450	0.420	49.- 1.860	1.990
24.- 0.600	0.580	50.- 0.300	0.480
25.- 0.045	-----	51.- 1.520	1.450
26.- 1.870	1.880	52.- 0.120	0.060

continuación de la tabla No 1.

METODO DE TSUCHIYA YATZIDIS g/l		METODO TURBIDI METRICO g/L	METODO DE TSUCHIYA YATZIDIS g/l		METODO TURBI DIMETRICO g/l
53.-	1.080	0.800	77.-	0.230	0.225
54.-	1.310	1.300	78.-	1.880	1.860
55.-	0.800	0.770	79.-	1.180	1.170
56.-	1.630	1.830	80.-	0.250	0.230
57.-	1.620	1.600	81.-	1.060	1.040
58.-	2.000	2.170	82.-	0.500	0.500
59.-	1.800	1.910	83.-	2.000	2.070
60.-	1.450	1.140	84.-	1.150	1.150
61.-	1.350	1.140	85.-	0.780	0.780
62.-	1.710	1.630	86.-	2.030	2.080
63.-	1.470	1.450	87.-	2.020	2.100
64.-	0.150	0.080	88.-	1.170	1.170
65.-	1.660	1.940	89.-	0.940	0.935
66.-	1.870	1.770	90.-	0.460	0.500
67.-	0.240	0.200	91.-	1.640	1.625
68.-	1.970	1.570	92.-	0.910	0.900
70.-	0.330	0.310	93.-	1.730	1.720
71.-	2.000	2.180	94.-	0.090	-----
72.-	0.400	0.390	95.-	2.000	2.200
73.-	1.330	1.300	96.-	1.660	1.610
74.-	0.680	0.640	97.-	1.190	1.180
75.-	1.640	1.590	98.-	1.720	1.720
76.-	1.280	1.200	99.-	0.600	0.570
			100.-	1.460	1.400

T A B L A 2-A

N	VALOR MEDIO g/l	DESVIACION ESTANDAR g/l	ERROR TIPO	COEFICIENTE DE VARIACION %
100	0.940	0.060	0.040	8.85

ESTUDIO ESTADISTICO DEL METODO DE TSUCHIYA- YATZIDIS EN LA CUANTI-
FICACION DE 100 MUESTRAS DE ORINA CON PROTEINAS.

T A B L A 2-B

N	VALOR MEDIO g/l	DESVIACION ESTANDAR g/l	ERROR TIPO	COEFICIENTE DE VARIACION %
100	0.940	0.060	0.040	8.85

RESULTADOS ENCONTRADOS POR EL METODO TURBIDIMETRICO EN LA
CUANTIFICACION DE 100 MUESTRAS DE ORINA CON PROTEINAS.

GRAFICA No. 6

RECTA DE REGRESION ENTRE EL METODO DE TSUCHIYA / YATZIDIS
Y EL METODO TURBIDIMETRICO DE KINGSBURY CLARCK.

$$Y = 0.010 + 1.0 X$$

$$r^2 = 0.97$$

METODO DE TSUCHIYA / YATZIDIS g/l

1.500

1.000

0.500

0.000

0.500

1.000

1.500

2.000

METODO DE KINGSBURY CLARCK g/l

T A B L A 3-A

N	CONCENTRACION DETERMINADA g/l	CONCENTRACION AÑADIDA g/l	CONCENTRACION ESPERADA g/l	CONCENTRACION ENCONTRADA g/l	% DE RECUPERACION
1	0.050	0.100	0.150	0.145	96.6
2	0.100	0.100	0.200	0.190	95.0
3	0.500	1.000	1.500	1.490	99.3
4	0.800	0.300	1.100	1.080	98.1
5	2.000	1.500	3.500	3.300	94.2
6	0.900	1.000	1.900	1.820	95.7
7	0.850	0.100	0.950	1.000	105.20
8	0.300	0.400	0.700	0.705	100.70
9	0.000	0.100	0.100	0.100	100.0
10	0.000	0.200	0.200	0.200	100.0

RESULTADOS ENCONTRADOS EN EL ESTUDIO DE LA RECUPERACION A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE PROTEINAS PARA EL METODO DE TSUCHIYA-YATZIDIS.

T A B L A 3-B

N	CONCENTRACION DETERMINADA g/l	CONCENTRACION AÑADIDA g/l	CONCENTRACION ESPERADA g/l	CONCENTRACION ENCONTRADA g/l	% DE RECUPERACION
1	0.050	0.100	0.150	0.100	66.6
2	0.100	0.100	0.200	0.185	92.5
3	0.500	1.000	1.500	1.455	97.0
4	0.800	0.300	1.100	1.100	90.7
5	2.000	1.500	3.500	3.555	101.4
6	0.900	1.000	1.900	1.870	98.4
7	0.850	0.100	0.950	0.850	89.4
8	0.300	0.400	0.700	0.710	101.4
9	0.000	0.100	0.100	0.090	90.8
10	0.000	0.200	0.200	0.180	90.4

RESULTADOS ENCONTRADOS EN EL ESTUDIO DE LA RECUPERACION A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE PROTEINAS PARA EL METODO TURBIDIMETRICO(KINGSBURY CLARCK) .

ESTUDIO DE LA PRECISION Y EXACTITUD DEL METODO DE TSUCHIYA-YATZIDIS.

N	CONCENTRACION g/l
1	0.240
2	0.245
3	0.255
4	0.240
5	0.258
6	0.257
7	0.240
8	0.255
9	0.240
10	0.245
11	0.254
12	0.251
13	0.249
14	0.240
15	0.255
16	0.250
17	0.254
18	0.245
19	0.240
20	0.245
VALOR TEORICO 0.250 g/l	
$\bar{x} = 0.247$ g/l	
DE= 0.006 g/l	
CV= 2.42 %	

N	CONCENTRACION g/l
1	1.395
2	1.400
3	1.450
4	1.420
5	1.410
6	1.495
7	1.390
8	1.500
9	1.425
10	1.400
11	1.450
12	1.480
13	1.450
14	1.410
15	1.400
16	1.480
17	1.450
18	1.455
19	1.450
20	1.470
VALOR TEORICO 1.500 g/l	
$\bar{x} = 1.439$ g/l	
DE= 0.034 g/l	
CV= 2.36 %	

CORRIDA	X_1	X_2	\bar{X}	R	R_s
1	0.610	0.600	0.605	0.010	
2	0.600	0.605	0.602	0.005	0.013
3	0.590	0.580	0.585	0.010	0.017
4	0.580	0.600	0.590	0.020	0.005
5	0.620	0.610	0.615	0.010	0.005
6	0.590	0.595	0.592	0.005	0.023
7	0.570	0.590	0.580	0.020	0.012
8	0.590	0.590	0.590	----	0.010
9	0.610	0.600	0.605	0.010	0.015
10	0.605	0.590	0.597	0.015	0.008
11	0.600	0.590	0.595	0.010	0.002
12	0.590	0.605	0.597	0.015	0.002
13	0.595	0.590	0.592	0.005	0.005
14	0.600	0.610	0.605	0.010	0.013
15	0.610	0.600	0.605	0.010	-----
16	0.605	0.585	0.600	0.010	0.005
17	0.610	0.620	0.615	0.010	0.015
18	0.605	0.610	0.607	0.005	0.008
19	0.595	0.590	0.592	0.005	0.015
20	0.585	0.600	0.592	0.015	-----
21	0.595	0.595	0.595	----	0.003
22	0.590	0.595	0.592	0.005	0.003
23	0.605	0.600	0.602	0.005	0.010
24	0.610	0.605	0.607	0.005	0.005
25	0.605	0.585	0.595	0.010	0.012
26	0.600	0.595	0.597	0.005	0.002
27	0.595	0.600	0.597	0.005	-----
28	0.585	0.580	0.585	0.010	0.002
29	0.590	0.580	0.585	0.010	0.002
30	0.600	0.595	0.597	0.005	0.012
31	0.605	0.590	0.597	0.010	-----

CONTROL DE CALIDAD PARA EL METODO DE TSUCHIYA- YATZIDIS
 SEGUN EL MODELO DE LEVEY Y JENNINGS (MODIFICADO POR
 HARLTINE YOBBS)

MODELO DE LEVEY Y JENNINGS, MODIFICADO POR
HARLTINE YOBBS.

Explicación de los cálculos para realizar la tabla de control de calidad, y encontrar los límites de confiabilidad.

$$X_1 = \text{CONTROL}$$

$$X_2 = \text{CONTROL}$$

$$\bar{X} = \text{PROMEDIO DE DUPLICADOS} = \frac{X_1 - X_2}{2}$$

$$\bar{\bar{X}} = \text{PROMEDIO DE PROMEDIOS} = \frac{\bar{X}_1 + \bar{X}_2 + \dots + \bar{X}_n}{n}$$

$$R = \text{DIFERENCIA DE DUPLICADOS POR CORRIDA} = X_1 - X_2$$

$$R_s = \text{DIFERENCIA ENTRE DIAS} = \bar{X} - \bar{X}_1 - \bar{X}_2$$

$$\bar{R} = \text{PROMEDIO DE DIFERENCIAS DE DUPLICADOS DIARIOS} = \frac{R_s}{n}$$

$$\bar{R}_s = \text{PROMEDIO DE DIFERENCIAS ENTRE PROMEDIOS DE DUPLICADOS DE DIA A DIA} = \frac{R_s n}{n}$$

R E S U L T A D O S .

$$\bar{\bar{X}} = 0.597 \text{ g/l}$$

$$\bar{R} = 0.008$$

$$\bar{R}_s = 0.007$$

CARTA DE LAS X.

CARTA DE LAS R.

LIMITE DEL 95%

LIMITE DEL 95%

$$LCS = \bar{\bar{X}} + 1.77\bar{R}_s = 0.609 \text{ g/l}$$

$$LCS = 2.51 \bar{R} = 0.020 \text{ g/l}$$

$$LCI = \bar{\bar{X}} - 1.77\bar{R}_s = 0.585 \text{ g/l}$$

$$LCI = 0$$

LIMITE DEL 99 %

LIMITE DEL 99%

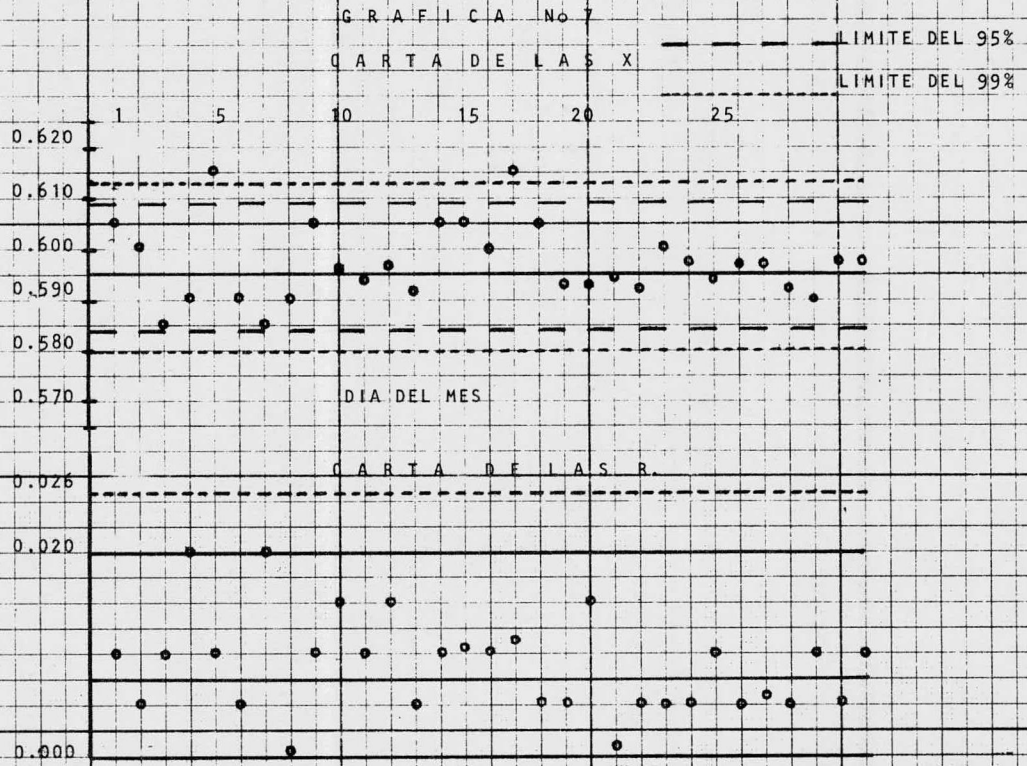
$$LCS = \bar{\bar{X}} + 2.30\bar{R}_s = 0.609 \text{ g/l}$$

$$LCS = 3.27 \bar{R} = 0.026 \text{ g/l}$$

$$LCI = \bar{\bar{X}} - 2.30\bar{R}_s = 0.580 \text{ g/l}$$

$$LCI = 0$$

CONCENTRACION DE PROTEINAS g/l



GRAFICA No 8. -GRAFICA DE CONTROL DE CALIDAD PARA EL METODO DE TSUCHIYA-YATZIDIS EN 31 DIAS DE TRABAJO. (MODELO DE LEVEY Y JENNINGS MODIFICADO POR HARLTINE YOBBS).

T A B L A 5

CONCENTRACION g/l	ALBUMINA %	ALFA 1 %	ALFA 2 %	BETA %	GAMMA %	TIPO DE PROTEINURIA
0.100-0.500	71.2	9.9	---	20.8	---	SELECTIVA
0.600-1.000	63.2	12.9	4.3	8.3	11.8	SELECTIVA INTERMEDIA
1.100-2.000	57.7	6.4	7.8	12.2	18.8	NO SELECTIVA
MAYOR DE 2.000	40.2	5.6	8.8	14.8	30.8	NO SELECTIVA

RELACION ENCONTRADA ENTRE LA CONCENTRACION DE PROTEINAS EN LA ORINA, EL PORCIENTO DE ELIMINACION DE CADA UNA DE LAS FRACCIONES Y EL TIPO DE PROTEINURIA.

T A B L A 6

FECHA	PROTEINAS g/l	ALBUMINA %	ALFA 1 %	ALFA 2 %	BETA %	GAMMA %
4-VI-78	0.900	51.0	6.0	6.0	19.0	18.0
10-VIII-78	1.480	37.0	4.0	9.0	16.5	33.5
25-XI-78	2.590	40.0	2.0	9.0	12.0	39.0

ESTUDIO SERIADO ELECTROFORETICO DE UN PACIENTE CON PROTEINURIA
DURANTE SEIS MESES HASTA SU FALLECIMIENTO. 46 AÑOS MASCULINO

T A B L A 7

N	PROTEINAS \bar{X} g/l	ALBUMINA %	ALFA 1 %	ALFA 2 %	BETA %	GAMMA %	TIPO DE PROTEINURIA
31	2.640	45.5	3.9	11.0	15.0	22.5	GLOMERULAR NO SELCETIVA

RESUKTADOS ENCONTRADOS EN EL ESTUDIO ELECTROFORETICO DE 30 ORINAS DE
PACIENTES DIABETICOS CON PROTEINURIA.

C A P I T U L O V .

DISCUSION DE LOS RESULTADOS .

EL METODO DE BIURET MODIFICADO QUE SE PROPONE EN EL PRESENTE TRABAJO PARA LA DETERMINACION CUANTITATIVA DE LAS PROTEINAS URINARIAS, SE BASA EN LA COMBINACION DE DOS PRINCIPIOS FISICOQUIMICOS QUE SON: 1.- EL USO DE UN REACTIVO PRECIPITANTE DE PROTEINAS . 2.- LA UTILIZACION DE UN REACTIVO DE COLOR PARA EFECTUAR LA DETERMINACION CUANTITATIVA DE DICHAS PROTEINAS.

EL BIURET MODIFICADO POR HIPPOCRATES YATZIDIS SE UTILIZO COMO REACTIVO DE COLOR, Y CONSISTE EN UNA SOLUCION DE SULFATO CUPRICO DIHIDRATADO, EDTA, EN UN AMORTIGUADOR DE HIDROXIDO DE SODIO/GLICINA/ CLORURO DE SODIO A UN pH DE 13, EL EDTA IMPIDE LA PRECIPITACION DEL COBRE, QUE OCURRE EN OTRAS FORMULACIONES DEL BIURET, YA QUE ACTUA COMO UN AGENTE " COMPLEJANTE " IMPIDIENDO DICHO FENOMENO. POR OTRO LADO EL REACTIVO DE TSUCHIYA EMPLEADO EN LA PRECIPITACION PROTEICA SE OBTUVIERON BUENOS RESULTADOS, COMO LO DEMUESTRA LOS ESTUDIOS DE RECUPERACION DEL METODO (TABLA 3-A), LO CUAL NOS INDICA , QUE DEPENDIENDO DE LA CONCENTRACION DE PROTEINAS PRESENTES, LA RECUPERACION FLUCTUA ENTRE 95.7 % A 105.2 %. EN EL CASO PARTICULAR DEL No 5 DE LA MISMA TABLA SE OBERVA UNA RECUPERACION BAJA 94.2 %, PERO DEBE TOMARSE EN CUENTA QUE SE HIZO DILUCION DE LA MUESTRA PARA EFECTUAR LA DETERMINACION, DEBIDO A LA LINEARIDAD DEL METODO PROPUESTO SE PIERDE SOBRE 2.000 G/L, COMO PODEMOS OBSERVAR EN LA GRAFICA No 5), ESTO TAMBIEN SE AFIRMA POR LOS ESTUDIOS DE RECUPERACION

DEL METODO TURBIDIMETRICO DE KINGSBURY - CLARCK (TABLA 3B), EN LA CUAL ,A LAS MISMAS CONCENTRACIONES LA RECUPERACION FUE DE 66.6 % A 101.4 %, ESTO RESULTA COMPRESIBLE DEBIDO A LA SENSIBILIDAD DE AMBOS METODOS 0.080 g/l PARA EL TURBIDIMETRICO Y DE 0.030 G/L PARA EL METODO PROPUESTO. (GRAFICA No 5).

OTRA VALORACION QUE NOS INDICA LA CONFIABILIDAD DEL METODO PROPUESTO, SON LOS RESULTADOS ENCONTRADOS EN EL ESTUDIO DE LA PRECISION Y EXACTITUD EFECTUADOS EN DOS ORINAS QUE CONTENIAN 0.250 G/L Y 0.500 G/L DE PROTEINAS ENCONTRANDOSE UNA DESVIACION ESTANDAR DE 0.006 G/L Y 0.034 G/L RESPECTIVAMENTE. (TABLA No 3C)

UNA VEZ VALORADOS EN FORMA CONJUNTA EL REACTIVO DE TSUCHIYA Y EL BIURET MODIFICADO POR HIPPOCRATES YATZIDIS, COMO NOS INDICAN TODOS LOS ESTUDIOS ANTERIORMENTE MENCIONADOS, SE APRECIO QUE EL METODO PROPUESTO NOS GARANTIZA CONFIABILIDAD EN LOS RESULTADOS Y PODEMOS SACRIFICAR TIEMPO POR EXACTITUD, YA QUE EL METODO TURBIDIMETRICO ES RAPIDO, PERO NO GARANTIZA LA PRECIPITACION COMPLETA DE TODAS LAS PROTEINAS(23), COMO TAMBIEN SE DEMUESTRA EN LOS ESTUDIOS DE RECUPERACION (TABLA No 3B). SIN EMBARGO SE HACE HINCAPIE EN EL REACTIVO DE BIURET MODIFICADO CON EL CUAL EL MAXIMO DESARROLLO DE COLOR SE OBTIENE A LOS 5 MINUTOS Y ES ESTABLE HASTA LOS 30 MINUTOS. (GRAFICA No 6).

EL ESTUDIO ESTADISTICO DE LA COMPORACION DE LOS METODOS

REALIZADOS EN 100 MUESTRAS DE ORINAS CON PROTEINAS (TABLA No 1), EL VALOR MEDIO ENCONTRADO EN EL METODO PROPUESTO FUE DE 0.980G/L CONTRA 0.940 G/L DEL METODO CONVENCIONAL, DE ACUERDO A LAS TABLAS (2A, 2B), EL METODO PROPUESTO ES MAS CONFIABLE QUE EL CONVENCIONAL, SIN EMBARGO AL REALIZAR LA RECTA DE REGRESION ENTRE LOS DOS METODOS Y EL INDICE DE CORRELACION, NO SE ENCONTRO DIFERENCIA ESTADISTICAMENTE SIGNIFICATIVA ENTRE AMBOS METODOS (GRAFICA No 3), $r^2 = 0.97$ Y UNA ORDENADA AL ORIGEN DE 0.010 G/L, PERO ES IMPORTANTE ANOTAR QUE LOS RESULTADOS ENCONTRADOS FUERON SIEMPRE MAS ELEVADOS PARA EL METODO PROPUESTO.

SE REALIZO UN CONTROL DE CALIDAD, DEL METODO EN ESTUDIO PARA DETECTAR LAS VARIACIONES TANTO ENTRE CORRIDAS, COMO ENTRE DIAS, CON ESTE PROPOSITO SE UTILIZO UN SUERO COMERCIAL DE PROTEINAS, CON EL QUE SE OBTUVO EN LA CARTA DE LAS X UNA MEDIA DE 0.597 G/L Y UNOS LIMITES DE 0.008 G/L Y 0.016 G/L, PARA INTERVALOS DE CONFIANZA DEL 95 % Y 99 % RESPECTIVAMENTE, Y PARA LA CARTA DE LAS R, LOS LIMITES DE CONFIABILIDAD FUERON DE 0.020 G/L Y 0.026 G/L. (GRAFICA No 7). DE ACUERDO A LA CARTA DE LAS X EN LA MISMA GRAFICA, EL METODO ESTUVO FUERA DE CONTROL LOS DIAS 5 Y 17, ESTO SE DEBIO A DETERIORO DEL CONTROL, EL PROBLEMA SE CORRIGIO ENSAYANDO NUEVOS CONTROLES. SI OBSERVAMOS LA CARTA DE LAS R, ENCONTRAMOS QUE EL METODO ESTUVO SIEMPRE DENTRO DE CONTROL A PESAR DE LAS VARIACIONES ENCONTRADAS EN LA CARTA DE LAS X, ESTO ES FACIL DE INTERPRETAR, PUESTO QUE EN LA CARTA

DE LAS R NOS REPRESENTA LA DIFERENCIA EXISTENTE DE DUPLICADOS DIARIOS, O SE LA PRECISION.

POR INTERES PERSONAL SE EFECTUO ELECTROFORESIS DE PROTEINAS URINARIAS CON EL OBJETO DE VALORAR EL PORCIENTO DE ELIMINACION DE CADA UNA DE LAS FRACCIONES , Y SE ENCONTRO QUE A MEDIDA QUE AUMENTA LA CANTIDAD DE PROTEINAS EN LA ORINA EL PORCIENTO DE _ ELIMINACION DE ALBUMINA ES MENOR, LO QUE NOS INDICA QUE EL AU_ MENTO EN LA PROTEINURIA ES A EXPENSAS DE LAS DEMAS FRACCIONES PROTEICAS (TABLA No 5). COMO DATO ADISIONAL SE PRESENTA EL _ ESTUDIO SERIADO DE UN PAÇIENTE CON PROTEINURIA , CON EL OBJETO DE SEGUIR LA EVOLUCION DEL PADECIMIENTO Y EL VALOR DIAGNOSTICO Y PRONOSTICO QUE REPRESENTA LA ELECTROFORESIS DE PROTEINAS (TA_ BLA No 6). A MAS DE PRESENTAR EN LA (TABLA No 7) EL ESTUDIO SE_ RIADO DE 30 PACIENTES DIABETICOS CON PROTEINURIA GLOMERULAR NO SELECTIVA. (21).

C A P I T U L O VI.

CONCLUSIONES.

DESPUES DE HABER HECHO UNA EVALUACION DE LOS PRINCIPALES FACTORES QUE, EL PANEL DE EXPERTOS EN CONTROL DE CALIDAD DE LA IFCC, LOS CONSIDERA IMPORTANTES EN LA EVALUACION DE UN METODO, SE CONCLUYE:

1.- AUNQUE EL METODO QUE SE PROPONE UNA DE LAS PRINCIPALES DESVENTAJAS QUE SE LE PUEDE ATRIBUIR ES EL TIEMPO EMPLEADO PARA LA DETERMINACION, ESTO SE JUSTIFICA POR UN AUMENTO EN LA CONFIABILIDAD EN LOS RESULTADOS, PRINCIPALMENTE LA SENSIBILIDAD DEL MISMO, QUE EN UN MOMENTO DADO PUEDE SER DE GRAN IMPORTANCIA PARA EL DIAGNOSTICO TEMPRANO DE UNA NEFROPATIA.

2.- EL REACTIVO DE TSUCHIYA UTILIZADO PARA LA PRECIPITACION RESULTA EFECTIVO, YA QUE ES LA COMBINACION DE FACTORES FISICO Y QUIMICOS QUE LAS PRECIPITAN.

3.- EL REACTIVO DE BIURET MODIFICADO POR HIPPOCRATES YATZIDIS, ES ESTABLE POR EL USO DE EDTA QUE IMPIDE LA PRECIPITACION. EL AMORTIGUADOR EMPLEADO PROPORCIONA EL pH INDICADO PARA EL MEJOR DESARROLLO DE COLOR, QUE EN ESTE CASO ES DE 5 MINUTOS, Y ESTABLE DURANTE 30.

4.- EL ESTUDIO DEL PATRON ELECTROFORETICO DE ORINAS CON PROTEINAS TIENE SU IMPORTANCIA, PRINCIPALMENTE PARA CLASIFICAR EL TIPO DE PROTEINURIA, Y RELACIONARLA CON EL PADECIMIENTO, O GRADO DE LESION. (VALOR DIAGNOSTICO Y PRONOSTICO).

C A P I T U L O V I I .

RESUMEN.

SE DESCRIBE UN NUEVO METODO PARA LA CUANTIFICACION DE LAS PROTEINAS URINARIAS, EN EL QUE SE REALIZA UNA PRECIPITACION DE LAS MISMAS CON EL REACTIVO DE TSUCHIYA (ETANOL, ACIDO CLORHIDRICO, ACIDO FOSFOTUNGSTICO), Y DETERMINACION DE LAS PROTEINAS PRECIPITADAS CON EL REACTIVO DE BIURET MODIFICADO POR HIPPOCRATES YATZIDIS (SULFATO CUPRICO DIHIDRATADO EN EDTA EN UN AMORTIGUADOR DE HIDROXIDO DE SODIO / GLICINA / CLORURO DE SODIO A UN pH DE 13.0.LA LECTURA DEL COLOR SE EFECTUA A 545 nm.

SE REPORTA EL ESTUDIO ESTADISTICO DE 100 MUESTRAS DE ORINAS CON PROTEINAS VALORADAS CON EL METODO DE KINGSBURY -CLARCK. EL COEFICIENTE DE VARIACION PARA EL METODO PROPUESTO FUE DE 3.54 %, LA DESVIACION ESTANDAR DE 0.030 G/L, LA SENSIBILIDAD DEL METODO ES DE 0.030 G/L Y RESULTA LINEAL HASTA 2.000 G/L .EL PROMEDIO DE RECUPERACION FUE DE 99.7 %.

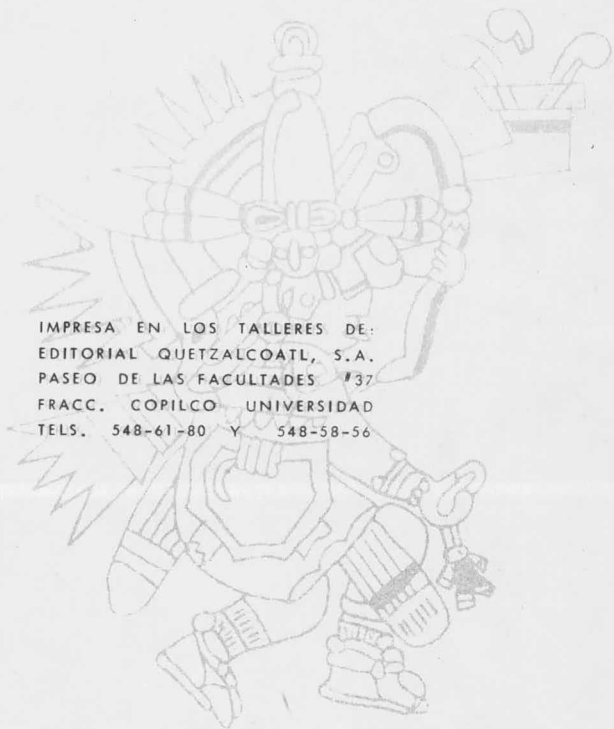
C A P I T U L O V I I I

BIBLIOGRAFIA.

- 1.- BRIGH, R: CASE AND OBERVATION ILLUSTRATIVE OF RENAL DISEASE ACCOMPANIED BY THE SECRETION OF ALBUMINOUS. GUY HOSP REP (1) 1966.
- 2.- ESCARPIONE LINO, HEER, E. ENRIQUE. FISILOGIA PROTEICA DE LAS NEFROPATIAS. EDITORIAL MEDICA PANAMERICANA, S.A, BUENOS AIRES ARGENTINA 1977.
- 3.- karnovsky, M. J., AND AINSWORTH, J.K. : LES BASES STRUC_TURALES DE LA FILTRATION GLOMERULAIRE. ACTUALITES NEPHROLOGI_QUE DE L'HOSPITAL NECKER.1972. FLAMIRTON, PARIS 1972.
- 4.- LANDIS, E.M. AND PAPPENHEIMER, J.R. EXCHANGE OF SUSTAN_CES THROUGH THE CAPILARE WALL. HANBOOK OF PHISILOGY. SEC 2 CIRCULATION VOL II, HAMILTON W., FED. WASHINGTON, D.C 1973
- 5.- HEINEMAN, H.O. ET AL. PROTEINURIA. AM. J. MED. 56-71 1974.
- 6.- STRAUS, W.: ACURRENCE OF PHAGOSOME AND PHAGO- LYSOSOME IN DIFFERENT SEGMENT OF THE NEPRHON IN RELATION TO REABSORPTION TRANSPORT DIGESTION AND EXTRUSION OF INTRAVENOUSLY INJECTION HORSERADISH PEROXIDASE. J. CELL. BIOL.(21) 1974
- 7.- MAACK, T. , MACKENSIE, D. INTRACELULAR PATHWAY OF RENAL REABSORPTION IN THE RAT. J. CLIN. INVEST. (49), 1, 1970.
- 8.- CORNEY, M.A. ; SAWIN, L.L.; RENAL PROTEIN TUBULAR AB_SORTION IN THE RAT. J. CLIN. INVEST.(49), 1970.

- 9.- HARWICKE, J. , AND SQUIRE, J.R. ; THE RELATION BETWEEN PLASMA ALBUMINOOS CONCENTRATION AND PROTEIN EXCRETION IN PATIENTS WITH PROTEINURIA. CLIN.SCI.(14) 1975
- 10.- HAWKINS, D. AND COCHRANE, C. G. GLOMERULAR BASEMENT MEMBRANE DAMAGE IN IMMUNOLOGIC GLOMERULONEPHRITIS. IMMUNOLOGY, (14), 1977
- 11.- GANG, N.F., AND MAUTNER,W. NEPHROTOXIC SERUM NEPHRITIS LAB. INVEST.,(23), 1976
- 12.- MORITA, T.; WENZEL, J.E. : THE RELATION OF NEUTROPHILIC AND EOSINOPHILIC LEUKOCYTES TO THE GLOMERULAR CAPILLARY BASEMENT MEMBRANE IN ACUTE PROLIFERATIVE GLOMERULONEPHRITIS. LAB. INVEST. (25), 445, 1971
- 13.-CHAMBERLAIN, M.J., AND STIMMLER,L.: THE RENAL HANDLING OF INSULIN. J. CLI. INVEST. (46), 1977
- 14.- JOHANSSON, B. G. , ROVNSKOV, U. : THE SERUM LEVEL AND URINARY EXCRETION OF ALFA 2- MICROGLOBULIN AND BETA 2_ MICROGLOBULIN AND LYSOSYME IN RENAL DISEASE. SCAN. J. UROL. NEPHROL.(6), 242 1972.
- 15.- MAACK, T. : RENAL HANDLING OF LOW MOLECULAR WEIGHT PROTEINS. AMER. J. MED. (58), 1975.
- 16.- DILLARD, M.G., PESCE, A. ; PROTEINURIA AND RENAL PROTEIN IN CLEARANCE IN PATIENTS WITH RENAL TUBULAR DISODERS. J. CLIN. MED. (78), 203 1971.
- 17.- BUTLER, E.A., FLYNN, F.V.; THE ACURRENCE OF POST_ GAMMA PROTEIN IN URINA. J. CLIN. PATH.(14), 172 1971.

- 18.- BENGERSHOM, E.; SCREENING FOR ALBUMINURIA: ACUSE FOR ESTIMATION OF ALBUMIN IN URINA. 21 (12), 1975.
- 19.- PEELE, JAMES., FICHARD, J.H.; COMBINED GEL FILTRATION BIURET COPPER METHOD COMPARED WITH AND IMMUNOCHEMICAL METHOD FOR URINARY PROTEIN MEASUREMENT. CLIN. CHEM.(23), 1997.
- 20.- MOELA, M. JOHN., VARGAS, A. SIMPLE PROCEDURE FOR _ MEASURING TOTAL PROTEINS IN URINE. CLIN. CHEM. 23(6) 1976
- 21.- DEMETRIUS, ELLIS., BUFFONE, G.J. : NEW APPROACH TO _ EVALUATION OF PROTEINURIC STATES. CLIN. CHEM.23(4), 1970.
- 22.- KILLINGSWORTH, L.M., BRITAIN, C.E.: AUTOMATED IMMUNO_ CHEMICAL METHOD FOR DETERMINATION OF URINARY PROTEIN OF PLASMA ORIGIN. CLIN. CHEM.(21), 1975
- 23.- DAVIDSOHN. D.H., HENRY, B.J.; DIAGNOSTICO CLINICO POR EL LABORATORIO. SALVAT EDITORES. MEXICO, 1976.
- 24.- YATZIDIS, H.. AN IMPROVED BIURET REAGENT. CLIN. CHEM. (23) 1978.



IMPRESA EN LOS TALLERES DE:
EDITORIAL QUETZALCOATL, S.A.
PASEO DE LAS FACULTADES #37
FRACC. COPILCO UNIVERSIDAD
TELS. 548-61-80 Y 548-58-56

QUETZALCOATL