

44 201



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

U. N. A. M.  
"CUAUTITLAN" ESTUDIOS  
SUPERIORES CUAUTITLAN



Desarrollo de  
el Proyecto de  
**ELABORACION DE MANUAL DE LABORATORIO DE  
ANALISIS BIOQUIMICO CLINICO III**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A

LEONARDO ROCHA SALDAÑA

DIRECTOR DE TESIS: Q. B. P. ANTONIO SANCHEZ ORTEGA



V N A M

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEXICO

1990

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



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 está 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.

## INDICE

|   |    |
|---|----|
| <b>INTRODUCCION</b>                       | 1  |
| <b>OBJETIVOS</b>                          | 2  |
| <b>PRUEBAS DE COAGULACION</b>             | 3  |
| Tiempo de sangria                         | 14 |
| Prueba de fragilidad capilar              | 15 |
| Recuento de plaquetas                     | 16 |
| Retracción del coágulo                    | 18 |
| Adhesividad plaquetaria                   | 20 |
| Factor plaquetario 3                      | 21 |
| Agregación plaquetaria                    | 23 |
| Tiempo de coagulación de sangre total     | 26 |
| Prueba del tiempo de recalcificación      | 28 |
| Tiempo de tromboplastina parcial          | 30 |
| Consumo de protrombina                    | 32 |
| Tiempo de protrombina                     | 35 |
| Tiempo de trombina                        | 37 |
| Quantificación de fibrinógeno             | 39 |
| Tiempo de lisis de la euglobulina         | 41 |
| Productos de degradación fibrina-fibrin.  | 44 |
| <b>FUNCIONAMIENTO RENAL</b>               | 46 |
| Pruebas de dilución y concentración       | 49 |
| Pruebas de dilución                       | 52 |
| Pruebas de concentración                  | 53 |
| Depuración de creatinina                  | 54 |
| Determinación de creatinina sérica        | 57 |
| Determinación de urea sérica              | 59 |
| <b>PRUEBAS DE FUNCIONAMIENTO HEPATICO</b> | 62 |
| Bilirrubinas séricas                      | 67 |
| Bilirrubinas urinarias                    | 71 |

|  |     |
|--|-----|
| Excreción de bromosulfaleína                     | 72  |
| Cuantificación de proteínas totales              | 79  |
| Determinación de globulinas séricas              | 82  |
| Prueba de turbiedad del timól                    | 85  |
| Tiempo de protrombina y de vit. "K"              | 87  |
| Tolerancia a la galactosa                        | 90  |
| Determinación de colesterol total                | 96  |
| Determinación de glutamato piruvato transaminasa | 103 |
| Determinación de glutamato oxalacetato transam.  | 107 |
| Determinación de TGO (UV )                       | 111 |
| Determinación de fosfatasa alcalina              | 113 |
| Determinación de acetilcolinesterasa             | 116 |
| Determinación de gamma glutamil transpeptidasa   | 118 |
| Determinación de lactato deshidrogenasa          | 120 |
| Determinación de hierro sérico                   | 124 |
| Prueba de Jirgl                                  | 127 |
| <b>FUNCIONAMIENTO PANCREATICO</b>                | 130 |
| Amilasa sérica y urinaria                        | 134 |
| Determinación de lipasa sérica                   | 138 |
| Determinación de 5 nucleotidasa sérica           | 142 |
| Determinación de LAP                             | 146 |
| <b>FUNCIONAMIENTO CARDIACO</b>                   | 150 |
| Determinación de HBDH                            | 153 |
| Determinación de LDH                             | 155 |
| Determinación de CPK                             | 157 |
| Determinación de CPK fracción MB                 | 159 |
| Grafica cascada de coagulación                   | 161 |
| Grafica biosíntesis de urea                      | 162 |
| Grafica biosíntesis de creatinina                | 163 |
| <b>BIBLIOGRAFIA</b>                              | 164 |

## INTRODUCCION.

Un manual es un documento o serie de documentos que en forma ordenada y sistemática contienen información y/o instrucciones y cuya finalidad es establecer la normatividad y estandarización de los procedimientos que son necesarios para el desarrollo de los programas que se consideran necesarios para la mejor ejecución del trabajo . En este caso el manual trata acerca de los principios y técnicas empleadas en la ejecución de métodos para valorar la función de un órgano determinado .

El presente manual esta dirigido a los alumnos que cursan el laboratorio de análisis bioquímico--clínico III , dicho trabajo contiene las técnicas para evaluar el funcionamiento de los diferentes órganos en estudio de dicho curso , mencionado el fundamento , el método a seguir y una pequeña explicación de los valores anormales obtenidos en las diferentes enfermedades del órgano en cuestion .

**OBJETIVOS :**

- 1.- Que los estudiantes que cursan el laboratorio de análisis bioquímico clínico III, conozcan las principales pruebas para evaluar el funcionamiento de los diferentes órganos en estudio, así como pruebas complementarias como una alternativa o confirmación de los valores arrojados por las pruebas consideradas como básicas .
- 2.- Que el alumno cuente con un manual que contenga los procedimientos de acuerdo a las posibilidades técnicas-económicas de nuestra escuela.
- 3.- Que nuestra facultad disponga de un manual -- de consulta práctico sin necesidad de recurrir a grandes textos.

### PRUEBAS DE COAGULACION

La sangre es un fluido que circula en el cuerpo a través del sistema vascular bajo presión. La prevención del sangrado espontáneo y el control de hemorragias - traumáticas son referidos como hemostasis. Recientemente se han estudiado más a fondo los mecanismos de la hemostasis para determinar las anomalías que resultan en problemas de sangrado.

La hemostasis depende principalmente de los siguientes puntos:

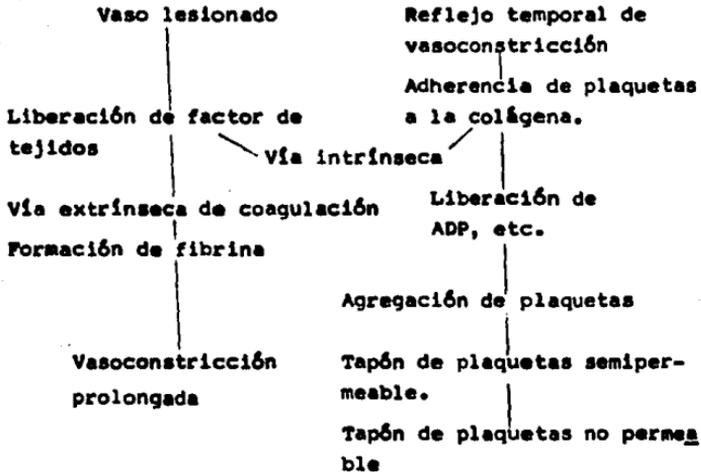
- A) La resistencia y contractibilidad normal de los vasos sanguíneos y un adecuado mantenimiento del sistema vascular.
- B) La actividad plaquetaria normal, la cual incluye -- número y función adecuado de las plaquetas.
- C) Un sistema adecuado de la coagulación ( factores de la coagulación )
- D) La estabilidad del coágulo.

Las plaquetas, vasos y sistema de la coagulación son importantes en la formación del trombo, el cual es importante en el mecanismo del control de la hemorragia.

En una lesión de un vaso, la secuencia exacta de los eventos no siempre siguen el mismo camino, pero -- los siguientes factores pueden tener cierta importancia en su desarrollo : Localización del vaso lesionado, tamaño del vaso y presión sanguínea en el potencial de -- contracción del vaso lesionado, anormalidades intrínsecas del vaso, anormalidades ó derrames de tejidos circunvecinos y aplicación de presión externa ó quirúrgica.

En vasos arteriales grandes, en los cuales la presión sanguínea es alta, no hay formación usualmente de trombos que puedan ocluir la lesión sino, que es necesario la aplicación de un torniquete ó el uso de presión externa ó una intervención quirúrgica.

En los vasos sanguíneos pequeños el control del -- sangrado requiere de una compleja interacción entre los componentes del vaso dañado, plaquetas y las vías intrínseca y extrínseca de la coagulación, para la formación de un trombo. Un esquema simple es ilustrado en la siguiente figura.



Muchos de los factores involucrados en la hemostasis son también importantes en el proceso de la trombosis, sobre todo en los procesos trombóticos en el sistema venoso de las extremidades inferiores. Los procesos de formación del trombo usualmente siguen el mismo camino :

- A) Un cambio en el endotelio del vaso.
- B) Adherencia de plaquetas a la colágena, membrana basal y microfibrillas subendoteliales.
- C) Iniciación de la reacción de liberación de las plaquetas por la colágena y otras sustancias estimulantes-presentes.

- D) Agregación adicional de plaquetas por ADP, tromboxano  $A_2$  y otras sustancias relacionadas con las plaquetas para la formación de un trombo plaquetario reversible.
- E) Generación de trombina iniciada probablemente por la vía extrínseca.
- F) Agregación de plaquetas por la trombina, formación de fibrina por la trombina y activación de la vía intrínseca de la coagulación.
- G) Formación de un tapón estable de fibrina - plaquetas.
- H) Formación continua de fibrina por activación de la vía intrínseca y extrínseca.
- I) Atrapamiento de glóbulos rojos y mas plaquetas en -- las redes de fibrina con la formación del trombo.
- J) Lisis eventual, organización y recanalización del -- trombo formado.

Un punto fundamental en la realización de las -- pruebas de coagulación es la toma de la muestra por lo cual se dan algunas recomendaciones para una buena toma.

Cuando se toma sangre venosa, deberá ser aspirada tan rápido como sea posible y mezclarse con un anticoagulante. Es importante para las pruebas que las muestras no se contaminen con factores tisulares, para evitar esto se recomienda usar jeringas vacutainer, en -- las cuales la toma se realiza con un mango en el cual se insertan los diferentes tubos según la muestra que se necesite y el tipo de anticoagulante mas recomendable para dicha prueba; si no se tiene dicho equipo se puede tomar la muestra en jeringas comunes y hacer el llenado de tubos de la porción media de la toma, para evitar la contaminación con factores histicos, pero el vaciamiento de la sangre deberá ser lo mas rápido posible.

En algunas ocasiones es difícil obtener sangre -- venosa de un paciente, esto particularmente en niños -- en los cuales es relativamente fácil recolectar sangre capilar y la cual puede ser utilizada para realizar -- tiempo de protrombina, utilizando la pipeta de protrombina Miale ( dade ) con oxalato, pero no es recomendable para realizar otras pruebas.

#### Anticoagulantes:

Los anticoagulantes más satisfactorios para las pruebas de coagulación son los oxalatos y citratos, aunque se prefiere el citrato, pues proporciona una mejor preservación de los factores V y VIII.

Las muestras citratadas son también más sensibles a la presencia de heparina y por lo tanto, se prefieren para pruebas usadas en la monitorización del tratamiento con heparina. El citrato forma complejos con el calcio que son insolubles o precipitan y pueden interferir -- con la detección en sistemas de coagulación automática con punto final foto-óptico. Deberá transcurrir por lo menos media hora entre la toma de la muestra y el tiempo de la prueba, cuando se usa el citrato.

En los estudios de coagulación comúnmente se toma una parte de anticoagulante por nueve partes de sangre total. La concentración más utilizada de citrato de sodio es una solución al 3.8 %, en la mayoría de las ocasiones esta concentración es satisfactoria, pero cuando el valor del hematocrito excede del 50%, como en -- una policitemia o en un recién nacido, la cantidad de calcio no es suficiente en el plasma disminuido para unirse completamente al citrato y puede ocurrir una -- prolongación del tiempo de protombina y tiempo parcial de tromboplastina, por lo que deberá ajustarse la concentración del anticoagulante, para evitar dicho fenómeno; deberá reducirse la concentración del citrato de sodio a 3.2 % según el comité internacional para estandarización en hematología.

La heparina no debe utilizarse como anticoagulante para las pruebas de coagulación, puesto que actúa -- en combinación con la antitrombina III inhibiendo muchas de las reacciones de la coagulación.

La heparina sin embargo se puede utilizar para realizar las pruebas de agregación plaquetaria.

El ácido etilendiaminotetracético (EDTA) no es un anticoagulante satisfactorio para la prueba de coagulación, porque inhibe o interfiere la polimerización de los monómeros del fibrinógeno en la formación del coágulo de fibrina y desestabiliza el factor V de la coagulación, sin embargo puede utilizarse para el aislamiento de plaquetas y su examen.

#### Centrifugación :

Para obtener plasma rico en plaquetas (PRP), la sangre anticoagulada se centrifuga a 1000 R.P.M., el plasma debe separarse rápidamente con pipetas de plástico y almacenarse en tubos de plástico o siliconizados, dicho plasma puede utilizarse para estudios de agregación plaquetaria y para el método directo factor III plaquetario aprovechable.

Para obtener plasma pobre en plaquetas (PPP) la sangre anticoagulada se centrifuga a 3000 RPM durante 10 minutos, el plasma se separa rápidamente y se coloca en tubos de plástico, este plasma se utiliza para la mayoría de las pruebas de coagulación.

Para algunas pruebas es necesario que la centrifugación sea realizada a 2 ó 4°C para esto se requiere de centrifugas refrigeradas. Una vez extraída la sangre empiezan a ocurrir cambios como son la activación de los factores de contacto, los cuales no requieren calcio para su activación, los factores lábiles como el factor V y el VIII pueden inactivarse, las plaquetas se alteran.

Suficientemente en 3 horas, por lo que las muestras centrifugadas deberán almacenarse a 4 °C por un tiempo no mayor de 2 horas. Los cambios ocurridos durante este período de almacenamiento son mínimos e insignificantes para la realización correcta de las pruebas de coagulación. La sangre extraída para la prueba de función plaquetaria deberá permanecer a temperatura ambiente, y se procederá inmediatamente después de haberla extraído.

Si el plasma se va a congelar, se deberá hacer rápidamente a 20 °C ó mas, el congelamiento lento desnaturiza las proteínas y dichas muestras deberán descongelarse para su utilización, de una manera rápida a 37 °C, y deberán permanecer en baño de hielo hasta el momento de las pruebas, a excepción de las muestras para el estudio de la función plaquetaria.

La inestabilidad de los reactivos y de las muestras de sangre y plasma tienden a causar una alteración en los resultados que se relacionan con el tiempo involucrado en la realización de determinaciones repetidas, por esta razón, y con frecuencia se deberá obtener una muestra control al mismo tiempo y bajo las mismas condiciones que se obtienen las muestras del paciente. Estas dos muestras pueden ser chequeadas una contra otra durante el período de la prueba.

Las reacciones multienzimáticas de medición del - punto final de la coagulación involucradas en la detección del coágulo final de fibrina, son de tres tipos :

- A) Aquellas basadas en los métodos indirectos de consumo de protombina.
- B) Aquellas basadas en el tiempo de coagulación de la sangre total ó plasma.
- C) Métodos en 2 etapas en los cuales un coagulante se forma en un tubo y su potencial se ensaya sobre un sustrato en otro tubo.

En algunos casos llega a ser muy difícil precisar el momento exacto de la coagulación, ésto trae como -- consecuencia tiempos prolongados de protrombina y tiempos parciales de tromboplastina, acentuandose ésto en diluciones crecientes del plasma. Cuando el plasma se coagula rápidamente, se és incapaz de observar la formación de redes de fibrina ya que los cambios de líquido a sólido ocurren en un segundo. Con buenos métodos manuales, una buena fuente de luz y un fondo negro se hace más fácil ver el punto final.

Los tiempos de coagulación prolongados también -- poseen problemas cuando se utilizan instrumentos automáticos que emplean el sistema foto - óptico, la secuencia de coagulación puede ser tan lenta y el coágulo -- formado de calidad tan pobre, que el instrumento no detecta el coágulo y fracasa para desactivar el cronómetro, cuando ésto pasa, el tiempo de coagulación parece ser más prolongado de lo que en realidad es, por lo tanto, los laboratorios deberán establecer rutinariamente un punto en el cual todos los valores prolongados sean

rechazados con un exámen visual de la formación del coágulo.

La medición directa y cuantitativa de algunas enzimas de la coagulación se pueden alcanzar por la medición de la proteólisis de sustratos preparados sintéticamente, dichos sustratos son satisfactorios para la medición de la actividad proteolítica de la trombina, factor X, plasmina, calicreina, urocinasa y otros, también son usados sustratos cromogénicos y el punto final es el desarrollo de color, el cual es medido por un espectrofotómetro; similarmente cuando se usan sustratos fluorogénicos, el punto final es el desarrollo de fluorescencia detectada por un fluorómetro. La inestabilidad enzimática, formación de redes de fibrina y turbidez pueden contribuir a dificultar la detección de dichos puntos finales. La cuantificación precisa de proteólisis enzimática y por lo tanto la medición de actividad se puede realizar por algunas pruebas más sofisticadas, como son las técnicas de inmunodifusión radial ( RID ), la electroinmunodifusión ( EID ) y la técnica de radioinmunoensayo ( RIA ).

Se deberá seguir una metodología adecuada en las pruebas de coagulación o no se obtendrán resultados --satisfactorios. Las desviaciones de las instrucciones del manejo en las realizaciones de las pruebas deberán evitarse, a menos que el laboratorio haya hecho pruebas frecuentes con una técnica adecuada comparando los resultados con las pruebas ya estandarizadas. El tiempo de incubación de mezclas de activación, tales como el TPTA deben ser llevadas a cabo como lo recomiendan los

fabricantes del reactivo. Existen considerables variaciones en los reactivos que son marcados para uso en pruebas únicas. Esto es particularmente cierto en reactivos de TPTA. Aquellos reactivos que utilizan ácido elálgico como activador, pueden fracasar para detectar una deficiencia de precalicreína.

La variación significativa en la detección del efecto de la heparina sobre tales reactivos, hace ver que es necesario que cada laboratorio construya una curva, agregando cantidades conocidas de heparina a la muestra de plasma con el fin de determinar la sensibilidad del sistema que se está usando. Los reactivos buferados son útiles en la minimización de tales variaciones. Es aconsejable utilizar controles proporcionados por los fabricantes de reactivos seleccionados.

Ninguna prueba aislada de investigación puede determinar la función hemostática adecuada. El uso de pruebas aisladas de coagulación son reprobables.

El siguiente conjunto de pruebas de coagulación es recomendable para la investigación básica del mecanismo hemostático.

- A) Estimación del número de plaquetas.
- B) Tiempo de sangrado como prueba en vivo de las funciones vasculares y plaquetaria en la hemostasia primaria.
- C) Tiempo de protrombina para evaluar la vía extrínseca
- D) Tiempo parcial de tromboplastina activado para evaluar la vía intrínseca.
- E) Retracción del coágulo para evaluar plaquetas y fibrinógeno, y examinar el carácter del coágulo de la sangre total.

**TIEMPO DE SANGRIA****FUNDAMENTO :**

El tiempo de sangría es el necesario para que deje de sangrar una herida estandarizada en la piel, es una medida de la función plaquetaria e independiente del mecanismo de la coagulación, aunque en el caso de alteración grave de la coagulación, el tiempo de sangría puede estar prolongado. ( 39 )

**MATERIAL :**

- Cronómetro
- Lanceta
- Papel filtro
- Alcohol

**METODO :**

- A) Se limpia el lóbulo de la oreja con alcohol sin presionar y se practica una punción con una lanceta.
- B) Se pone en marcha el cronómetro y cada 15 segundos se observa la gota de sangre sobre un papel filtro, teniendo cuidado de no tocar la superficie del lóbulo de la oreja hasta que no sangre más.

**INTERPRETACION CLINICA:**

Esta prueba suele ser prolongada en los problemas trombocitopénicos, en la enfermedad de Von Willebrand, en algunas deficiencias hereditarias de factores plasmáticos como el V y el VIII y en otras trombocitopatías.

El tiempo de sangría es normal en la hemofilia A y B, en hipoprotrombinemias y en general en la hipofibrinogenemia hereditaria.

La ingesta de aspirina prolonga el tiempo de sangría, por lo que debe interrogarse al paciente sobre su uso, y repetir el exámen en caso de prolongación del tiempo de sangrado en una semana sin tomas medicamento.

**VALORES NORMALES :**

De 1-4 Minutos.

**PRUEBA DE FRAGILIDAD CAPILAR****FUNDAMENTO :**

La fragilidad capilar se prueba al someter al paciente a una presión intermedia entre la sistólica y - la diastólica por un determinado tiempo. ( 38 )

**MATERIAL :**

- Cronómetro
- Baunómetro

**METODO :**

- A) Elegir el brazo del paciente que no presente - ningún tipo de manchas que puedan confundirse - con Petequias.

B) Colocar el brazalete del baumanómetro a una presión intermedia entre la sistólica y diastólica, con un máximo de 100 mm de Hg durante 5 minutos, quitar el brazalete y examinar la cara anterior del antebrazo a unos 10 Cm. del codo y en una circunferencia de - 5 Cm de diámetro.

C) Realizar el conteo de petequias.

**INTERPRETACION CLINICA :**

Por lo común la prueba resulta negativa, aunque - un pequeño número de personas normales pueden presentar leve positividad.

En casos de trombocitopenia, fibrinogenopenia y en la púrpura vascular la prueba es francamente positiva, en estados hemofílicos es negativa.

**VALORES NORMALES :**

Hasta 5 petequias.

**RECUESTO DE PLAQUETAS**

**FUNDAMENTO :**

Se destruyen los eritrocitos con una solución -- de oxalato de amonio al 1.0 % y se hace cuenta directa de plaquetas con el microscopio de contraste de fases- en una cámara de Neubauer de fondo plano. ( 29 )

**MATERIAL Y REACTIVOS :**

- Oxalato de amonio al 1.0%
- Menthionate incoloro
- Cámara de Neubauer
- Microscopio de contraste de fases
- Pipeta de dilución de glóbulos rojos
- Cronómetro
- 1.0 de sangre venosa.

**METODO :**

- A) Cargar de sangre una pipeta de glóbulos rojos-hasta la marca 0.5 y llenar con el líquido de dilución, hasta la marca 101.
- B) Agitar, cargar la cámara de Neubauer y dejar reposar 10 minutos en cámara húmeda.
- C) Contar las plaquetas en toda la cuadrícula central con el microscopio de contraste de fases a seco fuerte.
- D) La cifra obtenida se multiplica por 2000 y nos da el número de plaquetas por milímetro cúbico.

**APLICACIONES CLINICAS :**

Las cuentas bajas de plaquetas se observan en la tromboastenia y en trombocitopatías. Las plaquetas actúan como trombos en caso de ruptura de pequeños vasos y su desintegración provoca liberación de serotonina, que a su vez produce vasoconstricción local y tiende a reducir la hemorragia. Su papel es importante en la formación de tromboplastina y libera factores necesarios para la coagulación normal y otros de los que depende la retracción del coágulo.

El número de plaquetas puede aumentar hasta dos - ó tres veces con el ejercicio brusco, con la administración de adrenalina. Durante el transcurso de la menstruación puede apreciarse un descenso del número de plaquetas de hasta un 50 % ó 70 %, que vuelven a la normalidad después del 4<sup>o</sup> día.

**VALORES NORMALES :**

De 150,000 a 450,000 células por milímetro cúbico.

**RETRACCION DEL COAGULO**

**FUNDAMENTO :**

Cuando se deja coagular en forma espontánea la -- sangre total se obtiene una masa solida con todos los componentes sanguíneos, con el tiempo esta masa se contrae y exúda suero, por la función contractil de las - plaquetas sobre la red de fibrina. ( 20 )

**MATERIAL Y REACTIVOS :**

Jeringas  
Tubos de graduados de centrifugas  
Baño María  
Alambre de cobre  
Cronómetro  
2 Ml de sangre.

**METODO :**

A) Extraer sangre venosa 2 ml.

- B) Se coloca en cada tubo de centrifuga graduados 2 ml. de sangre a temperatura de 37°C, introduce inmediatamente un espiral de alambre de cobre.
- C) A la hora se retira el coágulo y se mide el volumen de suero remanente. Referir este volumen a porcentaje y hacer el promedio de los 2 tubos.

#### APLICACIONES CLINICAS :

La cantidad de suero está disminuida en la trombocitopenia y en la trombostenia. También debe considerarse que la retracción del coágulo no solo esta influida por la actividad plaquetaria, sino por la cantidad y reactividad del fibrinogeno y el volumen de los glóbulos rojos.

Cuando el fibrinogeno está disminuido, el coágulo puede estar disminuido ó pequeño y la retracción parece estar muy aumentada; cuando se encuentra aumentado como en algunos casos de estados inflamatorios, la retracción es defectuosa. En presencia de actividad fibrinolítica puede disolver el coágulo. Con un bajo valor del hematocrito, la masa del coágulo sera pequeña en proporción, y dara valores elevados; cuando es alto la retracción resulta defectuosa por ser la masa del coágulo demasiado grande.

#### VALORES NORMALES :

40 % ó mas.

**ADHESIVIDAD PLAQUETARIA****FUNDAMENTO :**

El primer paso en el mecanismo hemostático es la adhesión de las plaquetas al lugar del daño de las venas; éste método compara la cantidad de plaquetas circulantes en sangre venosa, con la cantidad que escapa de una vena lesionada. ( 20 )

**MATERIAL Y REACTIVOS :**

Lanceta  
Cámara de Neubauer  
Microscópio de contraste de fases  
Jeringa  
Líquido de dilución para plaquetas  
1 Ml. de sangre venosa

**METODO :**

- A) Practicar una incisión en el antebrazo de 5 mm aproximadamente, dejando que fluya la sangre libremente por lo menos 1 minuto, efectuar dos recuentos de plaquetas con sangre capilar con intervalos de 2 minutos. Los resultados se promedian.
- B) Al mismo tiempo se efectúa una extracción venosa en la que se realiza también el recuento por duplicado.

- C) La adhesividad plaquetaria IN VIVO estaría expresada por la diferencia entre los 2 resultados.

#### APLICACIONES CLINICAS :

En la telangiectasia hemorrágica hereditaria, y en la enfermedad de Von Willebrand, los valores son muy bajos, alrededor de 38,000 plaquetas por  $\text{mm}^3$ ; por lo regular éstos valores van acompañados de tiempo de sangría prolongados.

#### VALORES NORMALES :

Debe de existir un promedio aproximado de 95,000- plaquetas por  $\text{mm}^3$  de diferencia entre sangre venosa y capilar.

#### FACTOR PLAQUETARIO 3

##### FUNDAMENTO :

Las plaquetas al ser sometidas a diversos estímulos ó alteradas, exponen un fosfolípido ( factor 3 plaquetario ) necesario para la conversión intrínseca del factor 11 activado ( trombina ). La liberación ó exposición puede lograrse por fragmentación mecánica ó por la acción de diversas sustancias que actuarían como activadores. La preincubación del plasma rico en plaquetas con caolín, proporciona este estímulo, y el tiempo de coagulación - con caolín de un plasma rico en plaquetas es una medida de la capacidad del factor 3 plaquetario. ( 56 )

**MATERIAL Y REACTIVOS :**

Caolín ( suspensión de 4 gr. en 100 ml de cloruro de sodio al 0.85 % )

Cloruro Cálcico 0.035 M. ( 3.9 gr. de sal anhidra aforando a 1000 ml. con agua destilada )

Cronómetro

Baño maría

Plasma rico en plaquetas ( poner 9 vol. de sangre con 1-vol. de citrato de sodio al 3.8 % y-centrifugar a 2000 g. durante 15 minutos )

**METODO :**

- A) Se preparan mezclas a partes iguales de las siguientes muestras de plasma : 1- plasma rico en plaquetas del paciente, con plasma pobre en plaquetas del control; 2- plasma rico en plaquetas del control con plasma pobre en plaquetas del paciente, 3- plasma rico y pobre en plaquetas del paciente; 4- plasma rico i pobre en plaquetas del control.
- B) A cada una de éstas muestras se añade 0.2 ml.- de suspensión de caolín bien mezcladas.
- C) Se colocan en baño maría todas las muestras a 37°C durante 20 minutos agitando los tubos cada 5 minutos.
- D) Se añade 0.2 ml de cloruro cálcico, se pone en marcha el cronómetro y se anota el tiempo de coagulación. El punto final se determina cuando aparece el primer grumo de caolín.

**INTERPRETACION CLINICA :**

Las mezclas 1 y 2 difieren solo en la fuente de las plaquetas, si el tiempo de coagulación de las mezclas - que contienen las plaquetas del paciente ( mezcla 1 ) - excede de las que contienen plaquetas normales ( mezcla 2 ) en 5 segundos ó mas, existe un defecto de disponibilidad del factor 3 plaquetario.

Los defectos del factor 3 plaquetario se encuentran en algunos casos de trombopatías, en algunos pacientes - con urémia, trastornos mieloproliferativos, macroglobulinemias etc.

Las mezclas 3 y 4 permiten apreciar la presencia - de algún defecto de la coagulación del paciente.

**VALORES NORMALES :**

Los ya anotados anteriormente.

**AGREGACION PLAQUETARIA****FUNDAMENTO :**

Los primeros estudios realizados para medir la agregación plaquetaria fueron los realizados por Brinkhous en 1958; luego Born y Cross basandose en la diferencia de densidad óptica entre el plasma rico en plaquetas y el carente de las mismas, describieron un método en el cual se basan los actuales, para ello se utiliza un aparato llamado agregómetro, que mide los incrementos de la transmisión óptica al formarse los acúmulos de plaquetas.

La agregación se induce con la adición de diversas sustancias, como por ejemplo ADP, Colágeno, catecolaminas, etc.

El método detallado a continuación es el de Pavlosky y Moreno, tiene la ventaja de poderlo realizar con elementos comunes de laboratorio. Se basa en la diferencia entre el número de plaquetas antes y después de agitar un plasma rico en ellas. ( 50 )

#### MATERIAL Y REACTIVOS :

Citrato de sodio al 3.8 %  
 Centrífuga  
 Cronómetro  
 Tubos de plástico siliconado y de plástico  
 Plasma rico en plaquetas  
 Pipetas de 1,5 ml.  
 Material para conteo de plaquetas.

#### METODO :

- A) Extraer la sangre en forma directa sobre un tubo de plástico con 1 ml. de citrato, llevar a 10 ml, la punsión debe ser limpia y al mezclar con el anticoagulante debe evitarse la hemólisis.
- B) La obtención del plasma rico en plaquetas puede también obtenerse a centrifugando a 200 r.p.m. durante 8 minutos, conservando el plasma en tubos de plástico a 50°C.
- C) La prueba debe realizarse entre 2 y 4 horas de extraída la sangre.
- D) Se toma 1 ml de plasma rico en plaquetas, se coloca en un tubo de vidrio siliconado de 7 por 75 mm. tapar con tapón de plástico.

- E) Agitar 2 minutos a 16 r.p.m. y dejar el tubo - en forma vertical 20 minutos, para que las plaquetas agregadas sedimenten y queden el tercio superior libre de acúmulos plaquetarios.
- F) Se toman 0.1 ml. de plasma de la parte superior y se diluye con 1.9 ml. de citrato al 3.8 %, - al mismo tiempo se realiza una dilución igual - pero tomando 0.1 ml. de plasma rico en plaquetas inicial.
- G) La diferencia entre el número de plaquetas --- antes y después de la agitación dada en porcentaje, da una idea cuantitativa de las plaquetas agregadas.

#### APLICACIONES CLINICAS :

Esta prueba es anormal sobre todo en la enfermedad de Glasmann. Se encuentra también disminuida en hipofibrinogenemia, en leucemias, trombocitopenia y en insuficiencia renal.

En la enfermedad de Von Willebrand existen valores en el límite normal inferior. Se pueden observar un aumento de la agregación en el stress y algunos casos de arteriosclerosis.

#### VALORES NORMALES :

25 a 78 % de agregacion.

**TIEMPO DE COAGULACION DE SANGRE TOTAL****FUNDAMENTO :**

El tiempo que es necesario para que la sangre se coagule en un tubo de cristal es una medida indirecta de la actividad total del sistema intrínseco de la coagulación. La observación periódica de la sangre nos permite la valoración de las propiedades físicas del coágulo que se forma como son el tamaño, aspecto y fuerza mecánica del mismo, así como su estabilidad, velocidad y -- extensión del mismo. ( 37 )

**MATERIAL Y REACTIVOS :**

Jeringa con aguja  
Tubos de ensaye  
Cronómetro  
Baño maría

**METODO :**

- A) Se realiza la punsión rápidamente de sangre venosa para obtener 5 ml de ella, inmediatamente que la sangre entra a la jeringa se pone a andar el cronómetro.
- B) Se vacía la sangre en el tubo de cristal cuidan do de no hacer espuma y se coloca en baño maría a 37°C.

- C) Revisar el tubo cada 30 segundos, inclinando - suavemente dicho tubo, hasta observar el coágulo de sangre y parar el cronómetro.

**APLICACIONES CLINICAS :**

La prolongación del tiempo de coagulación se debe a deficiencias de cualquiera de los factores de la coagulación ó también a la presencia de anticoagulantes -- circulantes en el torrente sanguíneo.

**VALORES NORMALES :**

Entre 4-8 minutos.

**PRUEBA DEL TIEMPO DE RECALCIFICACION DEL PLASMA****FUNDAMENTO :**

El plasma rico en plaquetas contiene todos los factores de coagulación necesarios para la formación de la protrombinasa intrínseca o tromboplastina plasmática -- con excepción de los iones de calcio. Cuando se añade -- calcio al plasma se genera la protrombinasa intrínseca; ésta activa la protrombina y la trombina, así formada -- convierte el fibrinógeno en fibrina. La velocidad de la coagulación es la medida de la actividad coagulante total desarrollada y está disminuida si hay déficit notable de algún componente. ( 9 )

**MATERIAL Y REACTIVOS :**

Citrato de sodio al 3.8 %

Cloruro cálcico 0.025 M.

Centrífuga

Tubos de poliestireno

Reloj

Pipetas pausteur

Cloruro de sodio 0.85 %

Baño maría

Jeringas de 10 ml.

**METODO :**

A) Se practica una punsión venosa, teniendo cuidado

de no hemolizar la sangre, colocando 9 volúmenes de sangre completa en un tubo de poliestireno que contenga 1 volumen de citrato, se mezcla por inversión y se centrifuga a 2000 g. por 15 minutos.

- B) Se extrae el plasma con una pipeta pasteur, colocandolo sobre hielo si se trabajara después.
- C) Se coloca 0.1 ml de plasma en un tubo de ensayo se añade 0.1 ml de cloruro de sodio y la mezcla se incuba a 37°C durante 1 minuto.
- D) La mezcla se recalifica con la adición de 0.1 ml de cloruro cálcico precalentado a 37°C y se pone en marcha el cronómetro.
- E) Se coloca el tubo en baño maría a 37°C y se observa cada 2 seg. hasta observar el coágulo de fibrina parando inmediatamente el cronómetro.

#### APLICACIONES CLINICAS :

Es un método muy general de evaluación que es influenciado por numerosos factores entre ellos están: Temperatura, diámetro y material de los tubos, volumen de la muestra etc.; solo se prolonga cuando hay graves deficiencias de los factores I, II, V, VIII ó IX también en presencia de anticoagulantes circulantes incluyendo altos niveles de heparina.

#### VALORES NORMALES :

135-240 segundos.

**TIEMPO DE TROMBOPLASTINA PARCIAL ACTIVADA****FUNDAMENTO :**

Como el extracto de cefalina no coagula el plasma hemofílico tan rápidamente como el normal, se le llamó tromboplastina parcial para diferenciarlo de la tromboplastina completa, la cuál coagula con ambos plasmas - en el mismo tiempo.

Esta prueba es sensible a la deficiencia de todos los factores plasmáticos de la coagulación excepto el factor VII y el factor plaquetario. ( 49 )

**MATERIAL Y REACTIVOS :**

Equipo de tromboplastina parcial activada  
Solución de cloruro de calcio 0.03 M.  
Solución de citrato de sodio al 3.8 %  
Tubos de ensayo de 13 por 100 mm.  
Centrífuga  
Cronómetro  
Baño maría  
Pipetas 0.1, 1ml.

**METODO :**

A) Colocar 4.5 ml de sangre en un tubo de 13 por-100 mm. conteniendo 0.5 ml de citrato de sodio

al 3.8 %, mezclando suavemente. Centrifugar la muestra a 2000 r.p.m. durante 10 minutos y conservar entre 0 y 5° C, hasta el momento de la prueba que debe ser antes de 2 horas.

- B) Poner 0.1 ml de tromboplastina reconstituida en cada tubo de 13 por 100 mm ( debe de trabajarse por lo menos por duplicado cada muestra ) en baño maría a 37°C tres minutos, y añadir 0.1 ml de plasma problema y mezclar las substancias y encubar 3 minutos.
- C) Añadir 0.1 ml de cloruro de calcio precalentado a 37°C, mezclando rápidamente y empezar a medir el tiempo con cronómetro, hasta ver aparecer un gel de fibrina en la muestra y detener el cronómetro, observando la muestra cada 30 segundos.

#### APLICACIONES CLINICAS :

La prueba está prolongada en la deficiencia de uno ó más de los factores XII, XI, X, IX, VIII, V, protrombina y fibrinógeno. Está prolongado si el fibrinógeno es inferior a 100 mg por ml debido a los productos de degradación del fibrinógeno ó de la fibrina ó a la heparina. En individuos normales que no tienen historia de hemorragias, ni alteraciones de los factores de coagulación ocasionalmente, se encuentra un tiempo prolongado.

Tiempos más cortos de lo normal se pueden observar después de una punsión venosa deficiente, si el plasma contiene plaquetas y la prueba se realiza más tarde de 1 hora ó en coagulación intravascular diseminada.

#### VALORES NORMALES :

30-50 segundos.

### CONSUMO DE PROTROMBINA

#### FUNDAMENTO :

La prueba de consumo de protrombina es una medida de la actividad de la protrombina que queda en el suero después de que la sangre se ha dejado coagular bajo rígidas condiciones de estandarización. Es una determinación cuantitativa de la cantidad de tromboplastina plasmática que la sangre es capaz de producir.

Cuando la sangre se coagula, la protrombina inactiva ó protrombinógeno se convierte al estado activo, si se produce una cantidad normal de tromboplastina plasmática, casi toda esta protrombina libre será consumida, y el tiempo de protrombina en sueros normales será de 15 segundos ó mas. Un tiempo de menos de 15 segundos -- indicará una deficiencia en uno de los factores necesarios para la producción de tromboplastina plasmática.

( 18 )

#### MATERIAL Y REACTIVOS :

Tromboplastina activada : Tromboplastina líquida - activada de cerebro de conejo.

Cloruro cálcico 0.02 M.

Plasma de conejo exento de protrombina : fuente -- de fibrinógeno y factor V.

Tubos de 13 por 100 mm.

Baño maría

Cronómetro

Pipetas de 1.0 ml.

**METODO :**

- A) Extraer 2.0 ml de sangre usando una jeringa siliconada, la punsi3n de la vena debe ser limpia, para evitar la contaminaci3n de la sangre con - tromboplastina tisular.
- B) Medir 1 ml de sangre a cada uno de los tubos de 13 por 100 mm.
- C) Colocar los tubos en ba1o mara a 37°C y dejarla coagular, se van inclinando los tubos cada - 30 segundos, hasta que se forme un co1gulo turgente.
- D) 15 minutos despu3s de que se haya formado el -- co1gulo centrifugar, los tubos a 2,000 r.p.m. - durante 2 minutos. No separar el suero del co1gulo.
- E) Volver a colocar los tubos en ba1o mara a 37°C e incubar durante 45 minutos.
- F) Practicar un tiempo de protrombina en una 3tapa en el suero como sigue:
  - 1.- Medir en un tubo de vidrio de 13 por 100 mm en un ba1o de agua a 37°C, 0.2 ml de mezcla de tromboplastina activada, cloruro de calcio y 0.1 ml de plasma de conejo exento a - protrombina.
  - 2.- Soplar fuertemente 0.1 ml del suero problema en la mezcla anterior y simult1neamente- empezar a cron3metrar.
  - 3.- Observar cuidadosamente hasta que se forme- el co1gulo, siendo 3ste el punto final.

**APLICACIONES CLINICAS :**

Se observó que cuando una sangre hemofílica se coagulaba, no se formaba tromboplastina ó se formaba poca, y consecuentemente poca protrombina podía convertirse en trombina, así mismo en la trombocipenia severa, la mayor parte de la protrombina permanecía en el suero, debido a que el factor plaquetar faltaba y se g vitaba la formación de tromboplastina plasmática.

Más adelante se observó que cuando un plasma hemofílico rico en plaquetas se mezclaba con el plasma --- normal pobre en plaquetas ó plasma trombocitopénico, -- tiene lugar una corrección mutua; al mismo tiempo, con éstas observaciones, se desarrolló la primera prueba - de laboratorio para establecer la existencia de un estado hipotromboplastinémico. A esta prueba conocida como la de consumo de protrombina, puede acreditarsels la - iniciación de una nueva orientación del estudio de la hemofilia y enfermedades afines.

**VALORES NORMALES :**

Un tiempo de protrombina del suero de 15 segundos ó más es normal.

### TIEMPO DE PROTROMBINA

#### FUNDAMENTO :

Al agregar calcio y extracto hístico al plasma, el factor VII reacciona con el factor hístico y se forma - un producto que convierte el factor X en su forma activa que a su vez reacciona con el factor V en presencia de calcio iónico y fosfolípidos para formar la protrombina que convierte la protrombina en trombina, y ésta a su vez convierte el fibrinógeno en fibrina. ( 12 ), ( 48 )

#### MATERIAL Y REACTIVOS :

Baño maría  
 Tubos de ensayo  
 Pipetas de 1 ml.  
 Cronómetro  
 Tromboplastina hística preparada  
 Cloruro cálcico 0.025 M.  
 Plasma pobre en plaquetas.

#### METODO :

- A) Se mezcla un volúmen de 0.1 ml de extracto de cerebro ó pulmón y 0.1 ml. de plasma problema, se incuban en baño maría a 37°C durante 1 minuto.
- B) Se agrega 0.1 ml. de cloruro de calcio 0.025 M. y se pone en marcha inmediatamente el cronómetro.

- C) Después de 8 segundos registrar la formación del coágulo de fibrina con un rápido movimiento del tubo, volviendo el tubo al baño maría hasta observar el coágulo.
- D) Correr un control con el plasma normal, realizando la prueba por duplicado o triplicado. Realizar la prueba inmediatamente ó pasar el plasma a un tubo en refrigeración de la misma.

#### APLICACIONES CLINICAS :

El tiempo de protrombina se encuentra alargado -- cuando existe niveles bajos o ausencia de los siguientes factores : V, VII, X, y 11 cuando el fibrinógeno -- esté por debajo de 100 mg por 100 ml. también cuando -- aparecen productos de degradación del fibrinógeno ó -- de la fibrina ó presencia de heparina. En la policitemia puede estar prolongado debido a una desproporción en la relación de anticoagulante en el plasma.

#### VALORES NORMALES :

12-16 segundos ; Mayor del 70 % de actividad con referencia al control normal.

**TIEMPO DE TROMBINA****FUNDAMENTO :**

El tiempo que es necesario para que el plasma coagule después de la adición de trombina, se le llama tiempo de trombina. La trombina actúa directamente sobre el fibrinógeno para convertirlo en fibrina, la velocidad de la coagulación con la trombina es función de la concentración de fibrinógeno ó de la acción de los inhibidores de la acción de la trombina sobre el fibrinógeno.  
( 11 )

**MATERIAL Y REACTIVOS :**

Baño maría  
Cronómetro  
Pipetas de 1 ml.  
Cloruro de sodio al 0.85 %  
Trombina preparada ( bovina ó humana )  
Plasma citratado pobre en plaquetas.

**METODO :**

- A) Se mezclan 0.1 ml. de plasma problema y 0.1 ml. de cloruro de sodio 0.85 % y se calientan a 37° C, en baño maría 1 minuto.
- B) Se agrega 0.1 ml. de solución de trombina previamente calentada a 37°C, se pone en marcha el cronómetro y se toma el tiempo de coagulación. Si no se realiza la prueba inmediatamente se mantiene en refrigeración el plasma.

C) Correr un control normal paralelamente.

#### APLICACIONES CLINICAS :

Esta prueba es anormal si existe un cambio cualitativo del fibrinógeno, si la concentración del fibrinógeno es inferior de 100 mg. por 100 ml. o si está presente una substancia antitrombínica como la heparina ó los productos de degradación del fibrinógeno ó de la fibrina.

Si la prueba es anormal se debe comprobar el tiempo de trombina de 1 ml. de una mezcla a partes iguales de plasma normal y del paciente. Si el tiempo de trombina de la mezcla es de 4 segundos ó más que el del plasma normal solo, hay que pensar en la presencia de una substancia antitrombínica.

Al cabo de 10 minutos debe examinarse el coágulo-- y compararlo con el del control normal, si es muy frágil indica bajo nivel de fibrinógeno.

#### VALORES NORMALES :

Valores mayores de 3 segundos con relación al tiempo de plasma normal.

## CUANTIFICACION DE FIBRINOGENO

### FUNDAMENTO :

La concentración de fibrinógeno en el plasma es -- tal, que cuando se añade trombina en diluciones seri-- das del plasma con una solución salina tamponada, el -- coágulo es visible a una concentración de 1:64 ó 1:128.

( 10 )

### MATERIAL Y REACTIVOS :

Baño maría

cronómetro

Pipetas de 1 ml.

Tubos de ensaye

Trombina preparada

Solución salina tamponada : 8.5 gr. de cloruro de sodio 1.21 gr. de tris base en 950 ml. de agua des-- tilada a PH 7.2

### METODO:

- A) Se realizan las siguientes diluciones de plasma con la solución salina tamponada: 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128. A cada ml. de la dilución se le a-- grega 1 ml de solución de trombina.
- B) Después de mezclarlos se dejan los tubos en baño maría a 37°C y se observan al cabo de 15 a 30 mi-- nutos. Para valorar la fibrinólisis los coágulos

formados deben observarse después de 2 Hrs.  
de incubación a 37° C.

**APLICACIONES CLINICAS :**

Si se observan coágulos en las diluciones 1:32 del plasma del paciente se puede excluir una anomalía cuantitativa clínicamente significativa del fibrinógeno (concentración del fibrinógeno de mayor de 100 mg/100 mg. ). La lisis de los coágulos a las 2 Hrs. indica fibrinólisis aumentada.

**VALORES NORMALES:**

Títulos de formación del coágulo, menores de 1:32.

**TIEMPO DE LISIS DE LA EUGLOBULINA****FUNDAMENTO :**

La fracción euglobulina del plasma, preparada por dilución y acidificación está relativamente libre del sistema enzimático fibrinolítico y, por ello, la lisis del coágulo formado por el fibrinógeno en el precipitado de euglobulina ocurre con relativa rapidez. El tiempo necesario para la lisis del coágulo es el tiempo de lisis de la euglobulina. ( 5 )

**MATERIAL Y REACTIVOS :**

Cronómetro

Centrífuga

Tubos de ensayo

Barilla de cristal

Pipetas de 1, 5, 10 ml.

Recipiente con hielo

Oxalato sodico 0.1 M.

Cloruro cálcico 0.025 M.

Solución de ácido acético : Diluir 13.5 Ml de ácido acético al 1 % en 1000 ml. de agua destilada con PH final entre 3.65 - 3.70

Solución de borato tamponada : 9 gr de cloruro sódico en un matraz volumétrico y aforar a 1 Lt. con agua destilada.

## METODO :

- A) Se recolectara 4.5 ml. de sangre total en un tubo de centrifuga, enfriado previamente que contenga 0.5 ml. de oxalato sódico 0.1 M. La mezcla se coloca en hielo tan pronto como sea posible y se centrifuga a 2000 g. durante 10 min. se separa el plasma y se deja en hielo.
- B) A 9.5 ml. de la solución de ácido acético se añade 0.5 ml. de plasma y se mezclan cuidadosamente. Los tubos se refrigeran a  $4^{\circ}\text{C}$  durante 30 Min. y entonces se centrifugan a 2000 g. 1 minuto.
- C) El sobrante se desecha y el precipitado se reconstituye en 0.5 ml. del tampón de borato mediante una varilla de cristal.  
Cuando el precipitado se ha disuelto completamente, la solución se pone en baño maría a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 2 minutos; se añade 0.5 ml. de cloruro cálcico 0.025 M. que origina la formación del coágulo y se pone en marcha el cronómetro cuando se forma el coágulo.
- D) Los tubos se mantienen a  $37^{\circ}\text{C}$  y se examinan a intervalos para comprobar la lisis del coágulo y el tiempo de lisis de euglobulina es el intervalo del tiempo entre la coagulación y la lisis completa.

**INTERPRETACION CLINICA :**

Esta prueba no es específica y se cree que refleja ante todo la actividad del activador. El resultado puede ser difícil de interpretar cuando la concentración del fibrinógeno está disminuida puesto que en esta circunstancia la actividad fibrinolítica normal puede disolver un pequeño coágulo más rápidamente de lo normal, con lo cual da una falsa impresión de la actividad fibrinolítica.

Esta prueba es valiosa en el control del tratamiento con urocinasa o estreptocinasa.

**VALORES NORMALES :**

El valor normal de lisis varía entre 90 Min. y 6-Hrs.

## PRODUCTOS DE DEGRADACION DE FIBRINOGENO-FIBRINA

### FUNDAMENTO :

Los complejos de monómeros de fibrina con fibrinógeno, productos de la degradación de la fibrina ó ambos, precipitan cuando se añade al plasma protamina debil.

( 34 )

### MATERIAL Y REACTIVOS :

Baño maría  
 Cronómetro  
 Espejo concavo  
 Tubos de ensaye  
 Sulfuro de pretamina  
 Plasma citratado pobre en plaquetas.

### METODO :

- A) Se coloca en un tubo de ensayo 1 ml. de plasma, se calienta a 37°C durante 3 minutos y se examina para comprobar que el plasma es claro. Se añade al plasma, una parte del sulfuro de protamina al 1 % y se mezcla bien agitando cuidadosamente y la mezcla se incuba a 37°C durante 15 minutos.
- B) El tubo de ensayo se inclina lentamente hacia atrás y hacia delante iluminado por una luz potente frente a un espejo cóncavo en el cual se ve la imagen ampliada del plasma para buscar material insoluble.

**APLICACIONES CLINICAS :**

Un resultado positivo significa la presencia ó -- formación de monómetro de fibrina e indirectamente la presencia de fibrinógeno no alterado y también la concentración adecuada y funcionalidad del sistema de coagulación.

**VALORES NORMALES :**

Una trama de fibrina, trazas de fibrina ó un conglomerado blando y fácilmente visible, constituye un resultado positivo.

## FUNCIONAMIENTO RENAL

## Introducción :

La extracción de líquidos a partir de la sangre fluye por los vasos renales, se efectúa primeramente por los glomérulos de la corteza renal. Cerca de un millón de glomérulos de cada riñón filtran alrededor de 60 ml de líquido por minuto, desde la sangre a las nefronas proximales ; el filtrado glomerular - medio en un adulto con unos riñones normales es, por lo tanto, de unos 120 ml/minuto.

La función excretora de los riñones se efectúa en los diferentes segmentos del nefrón que es la unidad anatomofisiológica del riñón, en donde se lleva a cabo los procesos de filtración glomerular, reabsorción y secreción tubular.

El concepto de filtración glomerular surgió en 1842 en Londres con Willian Bowman quien además, atribuía a los túbulos un papel puramente excretor.

Karl Luidwing en Alemania en 1844, explicaba la función renal a través de filtración y reabsorción tubular, sin secreción a este nivel, y su opinión fué apoyada por otros como Heidenhain y Cushny. Más adelante en este siglo los estudios de investigadores como Verney, Starling y Homer Smith dejaron definidas las bases del funcionamiento renal que posteriormente han

sido completadas por otros autores como Wring y Berliner.

La filtración glomerular, es el primer paso a la formación de la orina y fué demostrada por primera vez mediante técnicas de micropunción, por Richard y colaboradores en 1924. Ellos definieron además la composición del líquido glomerular así como la del ultrafiltrado del plasma.

El filtrado glomerular es consecuencia de fenómenos físicos a partir de un gradiente de presión entre la presión hidrostática de la arteriola aferente que alcanza 75 mm de Hg y que favorece el paso de líquidos y solutos desde la luz del capilar glomerular hacia el espacio capsular. Un factor importante es la permeabilidad para algunos investigadores está dada por la presencia de poros funcionales de 70 a 100 Å de diámetro y para otros depende de la estructura misma de esa membrana por lo cual pasarían fácilmente las moléculas pequeñas como las del agua, sodio, cloro, glucosa, Etc. pero no las moléculas grandes. Cualquiera que sea el mecanismo, el hecho es que la membrana del capilar glomerular es atravesada por moléculas cuyo peso es menor de 15,000 mientras que impide el paso de aquellas con peso mayor que 70,000. El paso de moléculas intermedias es dependiente de su carga eléctrica así como de su propia estereoquímica. El líquido formado por filtración glomerular es un ultrafiltrado del plasma y por lo tanto, libre de proteínas pero con el resto de sus características fisicoquímicas semejantes. A su paso por las otras porciones del nefrón éste líquido es sometido a-

los mecanismos de reabsorción y secreción, que lo convierte finalmente en orina.

La medición de la velocidad con que ocurre la filtración a través del glomérulo se utiliza con frecuencia para obtener un índice de función renal que permite valorar la evolución de un padecimiento y su respuesta al tratamiento : ésta medición puede hacerse con facilidad gracias al concepto de depuración introducido por Van Slyke en 1928. La depuración renal de una substancia puede definirse como : " La cantidad de esa substancia que se libera del plasma en la unidad de tiempo" y puede expresarse como la relación entre la excreción urinaria de la misma por minuto, y su concentración en el plasma. La fórmula con la que se expresa la depuración es la siguiente :

$$D = \frac{U}{P} \times V$$

D = Depuración de la substancia ( ml/ minuto )

V = Volumen de orina ( ml/ minuto )

U = Concentración de la substancia en la orina ( mg/ -  
100 ml )

P = Concentración de la substancia en el plasma ( mg/-  
100 ml )

Para medir la velocidad de filtración glomerular mediante la depuración de una substancia, se requiere que ésta sea completamente filtrable, que no se metabolice, que no se una a las proteínas del plasma y que -

no se modifique su concentración al paso por los túbulos, por los mecanismos de reabsorción y secreción. La insulina, que es un polisacárido de origen vegetal, -- reúne esas condiciones, por lo tanto, una infusión en cantidad conocida y a una velocidad constante a la circulación del sujeto permita obtener una medición exacta de la velocidad de filtración glomerular. Sin embargo, el procedimiento que se requiere para hacerlo es laborioso y de poca aplicación práctica por lo que en la clínica se prefiere medir la depuración de la creatinina endógena, la que aún cuando es secretada por -- los túbulos parcialmente, proporciona un índice útil -- de la velocidad de filtración glomerular.

## PRUEBAS DE DILUCION Y CONCENTRACION

### INTRODUCCION :

Las características físicas : Volúmen, Densidad, - cantidad, color, aspecto de la orina y la composición-- química de la orina normal se mantiene dentro de los -- límites variables pero definidos, que se alteran en las afecciones renales.

El organismo moviliza de manera normal un volumen de agua calculado entre 2,500 y 3,000 ml por día; ésta agua se origina en la ingestión de líquidos, en los alimentos ingeridos y en los procesos metabólicos en los

que el hidrógeno de los alimentos oxidados se convierte en agua. Si el organismo es normal y se mantiene el equilibrio hídrico, por lo tanto esa agua debe ser eliminada por los órganos encargados de esa función, por el riñón en forma de orina, por la piel en forma de transpiración (sudor), por vía pulmonar al saturar de vapor de agua el aire inspirado y por el intestino al acompañar las heces.

En condiciones normales el hombre adulto elimina casi el 50 % del agua diaria movilizada; la que es por el riñón representada por el volumen urinario de 24 Hrs. varía entre 900 y 1800 ml como límites extremos y se modifica por numerosos factores. A los numerosos factores que modifican el volumen urinario como la edad, peso, ingesta de agua, la excreción por otras vías, las condiciones ambientales, la dieta, Etc., deben agregarse los propios del organismo como los estados emocionales, los estados metabólicos en las mas diversas enfermedades que no afectan en forma primaria al riñon, por Ejemplo, el volumen de orina en la Diabetes, en la Epilepsia, en las lesiones en el Sistema Nervioso Central Etc., y disminuyen en el Shock, las Diarreas, los Vómitos, las fiebras con sudoración profusa, las descompensaciones cardiacas Etc.

Cuando pueden eliminarse del cuadro de los factores extrarrenales, la medida del volumen de orina es un índice de la actividad funcional del riñon.

El peso específico de la orina está íntimamente relacionado con el volumen urinario.

El hombre normal elimina por el riñon, a diario - como 35 Grs. de sustancias sólidas que provienen del metabolismo del organismo y para cumplir con ésta función, el riñon debe de disponer de una cierta cantidad de agua, de acuerdo con su capacidad de concentración, porque en el filtrado glomerular aparece dilución notoria.

La capacidad para concentrar que posee el riñon, se refleja en la densidad de la orina, si el volumen de la orina es grande es porque existe gran cantidad de agua disponible, la densidad de la misma será baja, si el volumen de orina es pequeño porque no dispone de agua, la densidad será alta.

Las variaciones del peso específico de la orina no son un índice absoluto de la actividad renal, como tampoco es el volumen de la orina excretada. Las mismas causas capaces de modificar el volumen urinario modifican el peso específico, pero las variaciones son inversas.

Los límites de variación normales del peso específico de la orina aceptados de ordinario son de 1.010 a 1.030 cuando el volumen aumenta mucho, el peso específico puede disminuir hasta 1.002 y cuando disminuye el volumen de orina, puede aumentar el peso específico -- hasta 1.040.

**PRUEBAS DE DILUCION****FUNDAMENTO :**

Son pruebas destinadas a medir la capacidad excretora de agua del riñon y se efectúan después de ingerir un volumen de líquidos conocido. ( 19 )

**METODO :**

- A) Al paciente que es mantenido en ayunas desde la noche anterior, se le hace vaciar la vejiga; se anota la hora y el término de 30 minutos, se le hace ingerir 1200 ml de agua, manteniendolo de preferencia acostado durante la prueba.
- B) A partir del momento de la ingestión del agua se recogen muestras de orina cada 30 y 60 minutos - por 4 horas.
- C) En cada muestra se determina el volumen de orina y su peso específico.

**APLICACIONES CLINICAS :**

En las nefropatías el volumen es menor y la densidad es alrededor de 1.010

**VALORES NORMALES :**

Las personas normales excretan alrededor de 1200 ml

de orina entre las 3 y 4 horas de la ingestión de agua y la densidad disminuye y se aproxima a 1.002

#### PRUEBAS DE CONCENTRACION

##### FUNDAMENTO :

Son pruebas destinadas a medir la capacidad que po see el riñon para concentrar la orina, reflejadas por el aumento de la densidad urinaria al someter al paciente a una privación de agua durante cierto tiempo. ( 3 )

##### METODO :

- A) El paciente después de ingerir su desayuno en el día de la prueba se abstiene de ingerir líquidos durante 24 Hrs. aunque recibe su alimentación ha bitual, de preferencia seca.
- B) Se descartan las orinas emitidas desde las 8 has ta las 20 Horas.
- C) Se recogen las orinas emitidas en el período de 12 horas que va desde las 20 horas hasta las 8- horas del día siguiente.
- D) En ellas se determina la densidad y el volumen- de la orina.

#### APLICACIONES CLINICAS :

En las nefropatías el volumen de orina puede estar dentro de los límites normales pero la densidad se mantiene por debajo de 1.026.

#### VALORES NORMALES :

El 100 % de las personas normales excretan una orina de volumen variable, pero su densidad supera a 1.026

#### DEPURACION DE CREATININA

##### Introducción :

La tasa de excreción de creatinina es fundamentalmente una función del filtrado glomerular. La cantidad de producción de creatinina en un sujeto normal es muy constante. Si la excreción renal es constante, los niveles plasmáticos permanecen bastante estables; incluso - en las nefropatías, el índice de excreción suele descender tan lentamente que los niveles plasmáticos cambian muy ligeramente durante las 24 hrs. por éstas razones - el aclaramiento de creatinina endógena ha sido utilizada ampliamente como prueba clínica de la función renal. La difusión se debe a su sencilla ejecución y también a su mayor precisión que el aclaramiento de la urea endógena para valorar el índice de filtración glomerular, sin embargo, dicha técnica de depuración de creatinina presenta ó está sujeta a errores en el método como en su interpretación.

La depuración de creatinina puede darse como "el volumen de plasma que provee la cantidad de creatinina que aparece en el volumen de orina en un tiempo fijo".

Como consecuencia de las investigaciones realizadas para demostrar la dependencia existente entre la depuración de una sustancia y la superficie corporal, la fórmula de depuración se corrige por el factor de superficie media ideal, Moller y Van Slyke consideraron que la superficie media del hombre normal es de  $1.73 M^2$  y éste - valor se adoptó como término de comparación para corregir el valor de depuración respecto de la superficie y se multiplica el valor de la misma por la relación entre la superficie tipo, y la del sujeto, calculada por cualquiera de los métodos en especial por la fórmula lineal de Dubois.

#### FUNDAMENTO :

La depuración plasmática de cualquier sustancia - se expresa como el volumen del plasma, excenta de ésta - sustancia mediante la actividad renal por unidad de tiempo ( minutos ), dependiendo del tipo de sustancia - la depuración puede realizarse sobre todo mediante el - filtrado glomerular.

#### METODO :

A) Durante el día anterior a la prueba se suprimen las carnes, el te; el café y los medicamentos - en especial aspirina y derivados del ácido acetil salicílico, Los pacientes con acetonúria deben excluirse de la prueba por influencia sobre la reacción de Jaffé de la determinación de creatinina sérica y urinaria.

- B) Se pesa al paciente y se toma su altura para determinar su superficie corporal mediante la tabla de Dubois.
- C) Se hidrata al paciente antes de la prueba, ésta hidratación puede hacerse con tres vasos de agua en tres tomas, en intervalos de 20 minutos, 1 hora antes de la prueba.
- D) Se obtienen las muestras de orina en la primera y segunda hora, y la toma de la muestra de sangre puede efectuarse en cualquier momento durante la prueba.
- E) Se determina los valores de creatinina en sangre y orina.

$$\text{CALCULOS :} \quad D_c = \frac{U}{P} \times V \times \frac{1.73}{S}$$

$D_c$  = Depuración de creatinina

$U$  = Concentración de creatinina urinaria en mg %

$V$  = Volumen por minuto de orina

$P$  = Concentración de creatinina sérica en mg %

$S$  = Superficie corporal.

#### APLICACIONES CLINICAS :

La depuración de la creatinina endógena puede usarse como medida aproximada del filtrado glomerular para fines clínicos y cuyos resultados anormales son índice de nefropatías que pueden ser de variadas etiologías.

**VALORES NORMALES :**

100 a 170 ml/ minuto

**DETERMINACION DE CREATININA SERICA****FUNDAMENTO :**

El picrato en solución alcalina da una coloración-rojiza con la creatinina (reacción de Jaffé), la intensidad de éste color es proporcional a la concentración de ésta substancia. ( 35 )

**MATERIAL Y REACTIVOS :**

Matríz erlenmeyer de 250 ml  
Pipetas 1,5 ml  
Tubos de ensayo  
Papel filtro  
Reloj  
Espectrofotómetro  
Agua destilada  
Acido sulfúrico 2/3 N.  
Tungstato de sodio al 10 %  
Acido Pícrico 0.04 M.  
Hidróxido de sodio 0.75 N.  
Solución de creatinina 0.1 mg / ml  
1 ml de sangre.

**METODO :**

- A) Colocar 7 ml de agua destilada en un matr az erlenmeyer de 250 ml, añadir 1 ml de sangre y mezclar.
- B) Agregar 1 ml de ácido sulfúrico 2/3 N. y agitar. Agregar 1 ml de tungstato al 10 % y agitar.
- C) Filtrar o centrifugar
- D) Tomar 3 ml del filtrado en un tubo de ensayo y - agregar 1 ml de ácido pícrico 0.04 M. y 1 ml de hidróxido de sodio 0.75 N. Agitar y dejar reposar 15 minutos.
- E) Leer a una longitud de onda de 54<sub>0</sub> nm.

**CURVA DE CALIBRACION :**

| Tubo # | Sol.de creatinina 0.1mg % | Agua dest. c.b.p. |
|--------|---------------------------|-------------------|
| 1      | 1 ml                      | 100 ml            |
| 2      | 2 ml                      | 100 ml            |
| 3      | 3 ml                      | 100 ml            |
| 4      | 4 ml                      | 100 ml            |
| 5      | 5 ml                      | 100 ml            |

La concentración de creatinina en cada tubo corresponde de 1,2,3,4,5, mg/100 ml de sangre respectivamente. De cada una de éstas diluciones tomar 3 ml ponerlos en sus respectivos tubos y proseguir como se indica en la técnica a partir del paso 4.

**APLICACIONES CLINICAS :**

La concentración de creatinina en la sangre aumenta en la distrofia muscular, destrucción renal, nefritis, - obstrucción biliar y también en el embarazo, también suele aumentar su nivel por causa iatrogénica : Tratamiento\_

con metiltestosterona.

**VALORES NORMALES :**

De 0.5 a 1.5 mg/ 100 ml de sangre.

**DETERMINACION DE UREA SERICA**

**FUNDAMENTO :**

La urea reacciona con la 2,3 butanodiona 2-oxima en un medio ácido y se produce un complejo de color a amarillo cuya intensidad es proporcional a la cantidad de urea presente. ( 36 )

**MATERIAL Y REACTIVOS :**

Tubos de ensayo

Pipetas 1,5 ml

Baño de agua

Mechero

Reloj

Espectrofotómetro

2,3 butanediona 2-oxima ( diacetil monóxima ) -  
al 3% Mezcla fosfo-sulfúrica-cúprica ( 375 ml de  
Ac. fosfórico al 85%, Ac.sulfúrico concentrado -  
mezclar y agregar sulfato de cobre pentahidratado  
6 gr. en 550 ml de agua dest.)

Solución de urea 0.03 mg/ ml

1 Ml de sangre.

**METODO :**

- A) Colocar 1.0 ml del filtrado libre de proteínas en un tubo de ensayo.
- B) Agregar 2 ml de diacetil monóxima al 3% y 3 ml de la mezcla fosfo-sulfúrica-cúprica.
- C) Colocar en baño de agua hirviendo durante 20-minutos.
- D) Sacar del baño, enfriar y completar a 10 ml - mezclar y leer a 475 nm.

**CURVA DE CALIBRACION :**

| TUBO # | Agua dest. | Solución urea<br>0.03 mg % ml | mg/100<br>ml |
|--------|------------|-------------------------------|--------------|
| 1      | 5.0        | 0.0                           | 0            |
| 2      | 4.5        | 0.5                           | 15           |
| 3      | 4.0        | 1.0                           | 30           |
| 4      | 3.0        | 2.0                           | 60           |
| 5      | 2.0        | 3.0                           | 90           |

Proseguir como se indica en la técnica a partir-del paso 2.

**APLICACIONES CLINICAS :**

Desde el punto de vista clínico, el término uremia utilizado para designar la elevación de la concentración sanguínea de urea no es adecuado. Debe hablarse de hiperazoemia, que indica el incremento de la urea y otras --- sustancias nitrogenadas.

Existe hiperazoemia renal y extrarrenal. La hiperazoemia extrarrenal es la que aparece sin nefropatías demostrables, es reversible y se presenta en distintas situaciones patológicas como en la insuficiencia circulato

ria por déficit de oferta sanguínea al riñón, se trate de insuficiencia cardíaca congestiva o de insuficiencia periférica como en el estado de shock.

En estados de deshidratación por vómito, diarreas, quemaduras extensas, sudoración profusa etc.

En estados infecciosos, hemorragias digestivas, - donde los productos de descomposición de la sangre incrementa los productos nitrogenados, en la insuficiencia suprarrenal aguda donde la hipocloremia provoca la retención de nitrógeno.

En general en las hepatopatías los valores hemáticos son normales e inclusive a veces bajos, por déficit de producción.

En la hiperazoemia renal el proceso evolutivo de una nefropatía puede llegarse a la insuficiencia renal marcada, manifestada por el aumento persistente de la urea en la sangre.

#### VALORES NORMALES :

De 26 a 32 mg/ 100 ml de sange.

## PRUEBAS DE FUNCIONAMIENTO HEPATICO

La constante aparición de estudios bioquímicos, - radiológicos utilizados para evaluar la anatomía y las funciones del hígado, nos constituye un índice de la - complejidad de actividad de este órgano.

Como lo señala su número y diversidad de pruebas, ningún exámen permite obtener por sí solo, toda la información para el diagnóstico de afección hepática. Sin embargo dichas pruebas son de gran utilidad para establecer con certeza el diagnóstico diferencial de las - hepatopatías, escogiendo cuidadosamente un conjunto de pruebas basadas principalmente en un estudio clínico - inicial que constituye la base sobre la cuál debe apoyarse el diagnóstico, y el cuál debe ser corroborado en todos los casos por las pruebas de funcionamiento hepático.

Es importante mencionar que los datos de laboratorio proporcionan una visión instantánea y muchas veces es indispensable para el diagnóstico obtener una visión dinámica que solo puede obtenerse mediante estudios seriados, de aquí la gran utilidad de los datos de laboratorio para juzgar la evolución y el pronóstico de la afección, en especial en los casos difíciles y complicados.

Para abordar el estudio de las pruebas de funcionamiento hepático se ha escogido un grupo de exámenes-

que son importantes en relación con la frecuencia con - la frecuencia con las que se utilizan en la clínica diaria, tomando en cuenta también la facilidad de ejecución de la prueba, bajo costo y disponibilidad de reactivos - y sobre todo para valorar en una forma más completa el funcionamiento hepático.

#### LAS PRUEBAS CON LAS SIGUIENTES :

- 1.- Pruebas basadas en el estudio de las funciones de - excreción.
  - A) Pruebas del metabolismo de los pigmentos biliar-- res : bilirrubinas séricas y urinarias.
  - B) Pruebas de sobrecarga excretora : Bromosulfaleína
- 2.- Pruebas basadas en el metabolismo de las proteínas.
  - A) Proteínas séricas totales y la relación albúmina- globulinas.
  - B) Floculación y enturbamiento del timol.
  - C) Tiempo de protrombina y prueba de vitamina "K"
- 3.- Pruebas basadas en el metabolismo de los hidratos de carbono.
  - A) Tolerancia a la galactosa.
- 4.- Pruebas basadas en el metabolismo de las grasas.
  - A) Colesterol total y fracción esterificado.
- 5.- Pruebas basadas en la función de desintoxicación.
  - A) Acido hipúrico.
- 6.- Pruebas basadas en la cuantificación de enzimas.
  - A) Transaminasa glutámico oxalacética.
  - B) Transaminasa glutámico pirúvico.
  - C) Fosfataa alcalina.
  - D) Deshidrogenasa láctica.
  - E) Pseudocolinesterasa.
  - F) Gamma glutamil transpeptidasa.
- 7.- Otras pruebas.
  - A) Prueba de Jirgl
  - B) Hierro sérico.

**PRUEBAS BASADAS EN EL ESTUDIO DE LAS FUNCIONES DE EXCRECION****Introducción :**

Van der Bergh y Muller en 1916, describieron dos tipos de diazo reacción para los pigmentos biliares en suero, en especial de bilirrubina, que es un rproducto del catabolismo de la hemoglobina.

Los sueros de personas normales y de pacientes con ictericia ( colocación amarillenta de piel y conjuntiva ) por hemólisis, dieron un color rojo con ácido sulfánico diazotado solamente en presencia de etanol. Este tipo fué llamado reacción "indirecta" y fué distingible de la reacción "directa" del suero de pacientes con ictericia obstructiva por no necesitar el etanol para desarrollar el color de la reacción.

En 1937 Malloy y Evelyn describieron un método para la determinación de la bilirrubina sérica con una precipitación de proteínas eliminando también el uso de un Standart artificial con el uso de un colorímetro con un filtro de luz selectiva.

Konzelmann y Neefe ( 1950 ) recomendaron la determinación de bilirrubina en un análisis urinario de rutina para la detección temprana de enfermedades hepáticas con síntomas no claros de la enfermedad como una guía de evolución de una afección hepática como una prueba de rastreo en la selección de donadores de sangre en laboratorios - que carezcan de pruebas más específicas para determinar hepatitis u otra hepatopatía.

Existen un gran número de pruebas para la determinación de la bilirrubina en orina, pero prácticamente todos los métodos empleados se basan en uno de los cuatro principios siguientes :

- A) La observación de una coloración amarilla ó café típica en la orina dada por la presencia de bilirrubina.
- B) La oxidación de la bilirrubina dando derivados coloreados característicos.
- C) La copulación de la bilirrubina a un componente diazo para dar un color específico.
- D) Las diluciones coloridas que provienen de la mezcla de la bilirrubina con azul de metileno ó violeta de metilo.

La medida de la bilirrubina total y determinación de las fracciones directa ó indirecta es importante como prueba preliminar del funcionamiento hepático y para un diagnóstico diferencial de ictericias.

Watson y Nosslin en 1957 observaron que la determinación de bilirrubina directa sérica y bilirrubina total, en algunos pacientes con enfermedades hepáticas ó de vías biliares, los datos de bilirrubina directa fueron elevados, mientras que los de bilirrubina total fueron normales, éstos autores recomendaron una relación de la determinación de la bilirrubina directa y bromosulfaleína, puesto que sigue un mecanismo de excreción similar y puede detectar anomalías hepáticas discretas ó de difícil diagnóstico.

El mecanismo por medio del cuál el hígado excreta la bromosulfaleína es por conjunción, en efecto, estudios bioquímicos y cromatográficos demostraron que la con

junción se efectúa con glutación y la cisteína, condición necesaria para su eliminación, en un número reducido de casos (Chambers, Meister, Earlier, Bojqrneboe, Katz, Scarf ) se ha informado de reacciones indeseables con el empleo de la bromosulfaleína, que van desde una infiltración tisular en el sitio de aplicación del colorante, náuseas, vómito, vértigo, urticaria y en algunos casos hasta la muerte por una reacción a dicho colorante, por lo tanto debe tenerse precauciones en el empleo de esta prueba en pacientes con antecedentes alérgicos en donde debe comprobarse la sensibilidad con la aplicación intradérmica de 0.1 ml en dilución al -- 1:100 de la substancia.

## BILIRRUBINAS SERICAS

### FUNDAMENTO :

La determinación se basa en la diazo reacción de Ehrlich Proscher, que consiste en la copulación, en medio ácido de la bilirrubina con el ácido sulfanílico diazotado.

En la diazo reacción hay la ruptura de la molécula de bilirrubina y el ácido vinilneoxantobilurónico. El primero de estos compuestos reacciona con las sales de diazonio para formar azobilirrubina y en determinadas condiciones también el segundo compuesto puede transformarse perdiendo formaldehído, formando azobilirrubina con una velocidad menor. ( 24 ), ( 51 )

### MATERIAL Y REACTIVOS :

1 ml de suero o plasma  
 Balanza analítica  
 Espectrofotómetro  
 Cronómetro  
 Matracas sforados de 10 y 1000 ml  
 Pipetas de 1, 5, 10 ml  
 Tubos de ensayo.  
 Solución de bilirrubina de 10 mg % en cloroformo  
 Solución de bilirrubina de 2 mg % en cloroformo  
 Acido sulfanílico al 0.1 % ( w/v )  
 Acido clorhídrico concentrado.

Nitrito de sodio al 0.5 % (w/v)

Metanol puro ( 96°)

Agua destilada

Diazo "A" : disolver 1 gr de ácido sulfanilico-  
de 15 ml de ácido clorhídrico concentrado y afo-  
rar a 1000 ml con agua destilada.

Diazo "B" : Disolver 0.5 gr de nítrido de sodio  
en 100 ml de agua destilada, conservando este -  
reactivo en refrigeración hasta 15 días.

Diazo Reactivo : Mezclar 10 ml de diazo "A" con  
0.3 ml de diazo "B". Este reactivo es inestable  
por lo tanto es necesario prepararlo cada vez que  
se use.

**METODO :**

- A) Colocar en un tubo de ensayo "P" 8.6 ml de --  
agua destilada con 1 ml de diazo reactivo y -  
0.4 ml de suero a plasma.
- B) Colocar en tubo de ensayo "B" 8.6 ml de agua-  
destilada con 1 ml de diazo "A" y 0.4 ml de -  
suero ó plasma.
- C) Mezclar cada tubo y dejar 15 minutos en reposo
- D) Leer a 535 Nm (lectura de bilirrubina directa)
- E) En otros dos tubos de ensayo "P" y "B" se colo-  
can 5 ml de cada una de las mezclas anteriores  
y se le agregan 5 ml de metanol a cada uno, se  
mezclan y dejan 5 minutos en reposo.
- F) Leer a 535 Nm (lectura de bilirrubina total)
- G) Bilirrubina indirecta=Bilirrubina total-Bilirru-  
bina directa.

#### Preparación de curva de calibración :

Tubo 1.- Solución de 2 mg % de bilirrubina en cloroformo 0.5 ml agregando 9.5 ml de metanol que corresponde a 1.0 mg/100 ml de bilirrubina en sangre.

Tubo 2.- Solución de 2 mg % de bilirrubina en cloroformo 1.0 ml agregando 9.0 de metanol que corresponde a 2.0 mg/100 ml de bilirrubina en sangre.

Tubo 3.- Solución de 2 mg % de bilirrubina en cloroformo 2.0 ml agregando 8.0 ml de metanol que corresponde a 4.0 mg/100 ml de bilirrubina en sangre.

Tubo 4.- Solución de 10 mg % de bilirrubina en cloroformo 1.0 ml agregando 9.0 ml de metanol que corresponde a 10 mg/100 ml de bilirrubina en sangre.

Tomar 4 ml de cada una de estas soluciones testigo, añadir 5 ml de metanol y 1 ml de diazo reactivo, mezclar, leer a los 5 minutos a 535 Nm contra un blanco con 4 ml de agua, 5 ml de metanol y 1.0 de diazo "A".

#### APLICACIONES CLINICAS :

El valor de un resultado anormal de bilirrubina sérica total estriba especificidad para la disfunción hépatica. El aumento por encima de lo normal, indica superproducción (hemólisis intravascular), algún tipo de enfermedad hepatocelular (hepatitis), ó afección del tracto biliar (coledocolitiasis). Sin embargo, la concentración total de bilirrubina no es un indicador sensible de obstrucción biliar ó lesión hepatocelular, ya que puede encontrarse cirrosis acentuada ó cálculos en el colédoco a pesar de que aparezca normal. La

separación en los componentes "indirecto" (no conjugado) "directo" (conjugado), es esencial para detectar entidades caracterizadas por hiperbilirrubinémias indirecta, por ejemplo, cuando el componente indirecto excede de 1.0 mg % mientras que el directo es menor del 20 %. -- Cuando la bilirrubina directa llega al 30 % ó más, sobre la total, la división no ayuda a determinar si la ictericia es de origen intra o extra hepática. La elevación de la fracción conjugada indica que hay una lesión leve ó primaria de la hepatocitos, aunque la concentración sérica total permanezca normal.

**VALORES NORMALES :**

Bilirrubina "directa" conjugada hasta 0.15 mg --- por 100 ml de sangre.

Bilirrubina total hasta 1.0 mg/100 ml de sangre.

**DETERMINACION DE BILIRRUBINA URINARIA****FUNDAMENTO :**

La determinación se basa en la copulación de una sal de diazonio con bilirrubina, dicha sal contiene P-nitrobenzeno diazonio P-tolueno. Las tabletas contienen además, ácido sulfosalicílico y bicarbonato sódico con el fin de facilitar un medio ácido para la reacción y una mezcla efervescente que asegurará la disolución de la tableta al agregar la muestra.

**MATERIAL Y REACTIVOS :**

Tubos de ensayo.

Tabletas de reactivo ( P-nitrobenzeno diazonio -- P-Tolueno)

Orina fresca ó recién obtenida.

**METODO :**

- A) Emplear orina fresca y sin centrifugar, mezclar bien la muestra de la orina.
- B) Colocar en un tubo de ensayo aproximadamente - 1 ml de orina y agregar una tableta de reactivo
- C) Al cabo de 30 a 60 segundos comparar el color de la reacción con la escala cromática dada por el laboratorio de fabricación del reactivo.

**EXCRECION DE BROMOSULFALEINA****FUNDAMENTO :**

La inyección por vía intravenosa de 5 mg/Kg de peso del colorante es acarreado por la albúmina al hígado, donde es prontamente conjugado con glutación, cisteína y cisteína-glicina, la cuál es excretada en la bilis como tal.

La prueba mide la cantidad de bromosulfaleína en el suero después de un tiempo límite y por lo tanto la capacidad del hígado para conjugarla y retirarla del plasma. ( 17 ), ( 55 )

**MATERIAL Y REACTIVOS :**

Espectrofotómetro

Aguja calibre 12

Jeringa de 20 ml

Cronómetro

Tubos de ensayo

Solución inyectable de B.S.F. 50 mg/ml

Hidróxido de sodio 0.5 N.

Acido clorhídrico 0.5 N.

Agua destilada

Peso y altura del paciente.

**METODO :**

- A) Se canaliza una de las venas del codo con aguja calibre 12.
- B) Se toman 10 ml de sangre que se emplearan como blanco, en un tubo de ensayo sin anticoagulantes.
- C) En el mismo brazo canalizado se inyecta 150 mg/m<sup>2</sup> de superficie corporal con un tiempo para inyectar el colorante entre 30 y 60 segundos.
- D) Poner en marcha el cronómetro
- E) Recoger del brazo contrario al que se le aplicó el colorante, 10 ml de sangre en un tubo sin anticoagulantes.
- F) Se colocan 2 tubos de ensayo y se agregan los reactivos y suero como a continuación se muestra.

|                    | Tubo "B" | Tubo "P" |
|--------------------|----------|----------|
| Agua destilada     | 8 ml     | 8 ml     |
| Suero              | 1 ml     | 1 ml     |
| Acido clorhídrico  | 1 ml     | -        |
| Hidróxido de sodio | -        | 1 ml     |

- G) Se mezclan los tubos por inversión y se leen a 580 Nm. se hace una dilución del colorante con hidróxido de sodio 0.5 N. a 0.005 N que tendrá una concentración de 1 mg/ml y se toma como referencia al problema.

**APLICACIONES CLINICAS :**

Esta es una de las pruebas funcionales hepáticas más sensibles de que se dispone para dar resultados --

anormales en afecciones hepatobiliares de toda clase - ( de origen intra y extrahepáticas ), cuando no hay ictericia demostrable por los estudios clínicos, la prueba tiene 3 aplicaciones principales :

- 1.- Detecta cirrosis "inactiva" ( retención anormal ha sido descubierta en más de 90% de casos histológicamente comprobados).
- 2.- Descartar vórices esofágicas sangrantes ( un valor normal en caso de hemorragia del tracto gastrointestinal superior, constituye evidencia de que el paciente está libre de enfermedad hepática).
- 3.- Detección temprana de infiltración ( amiloidosis, granulosa ) ó enfermedad que ocupa espacio ( quistes ó abscesos ) dentro del parénquima, cuando la retención anormal puede ser el único índice de disfunción hepática.

Las principales limitaciones de la prueba son :

- 1.- Ofrecen poca ayuda diagnóstica en presencia - de ictericia, si se excluyen las hiperbilirrubinemias y hemólisis congénitas.
- 2.- Muchas condiciones pueden dar resultados positivos falsos (por ejemplo, la administración de ácido yopanoico en las 24 horas anteriores a la prueba, la obesidad, fiebre, el ejercicio la diabetes mellitus).

La administración de B.S.F. puede causar efectos tóxicos.

**VALORES NORMALES :**

Menos del 7% en un tiempo de 45 Min.

**PRUEBAS BASADAS EN EL METABOLISMO DE LAS PROTEINAS****Introducción :**

Se ha observado desde hace varios años la elevación de globulinas séricas a partir de pacientes con enfermedades del hígado. El amplio uso de las pruebas de floculación y turbiedad del timol para el diagnóstico de afecciones hepáticas han sido responsables de que el interés por dichas pruebas de elevaciones de globulinas sea grande.

Estas pruebas han podido detectar principalmente - cambios pequeños en las fracciones de globulinas séricas sin embargo en algunos casos, como en la prueba de turbiedad del timol, por ejemplo la concentración de líquidos séricos tienen el efecto de aumentar la intensidad de la reacción.

Los métodos usuales de determinación de proteínas que dependen de la determinación de nitrógeno están sujetos a considerables errores; Puesto que las técnicas además de consumir mucho tiempo, los cambios pequeños en la concentración de globulinas no son aparentes.

Los cambios en los niveles de globulinas pueden detectarse o demostrarse mejor por medios electroforéticos, pero dichas técnicas no son aplicables en laboratorios de rutina.

Las diluciones de suero con soluciones de baja fuerza iónica decrecen la solubilidad de las proteínas y bajo ciertas condiciones la mayoría de globulinas pueden ser precipitadas, éste principio es utilizado en la prueba de turbiedad del timol y su grado de positividad depende; en enfermedades agudas del hígado,-- de la elevación ó incremento de los niveles de la fracción gamma de las globulinas séricas.

La intensidad de éstas reacciones no son siempre proporcionales al incremento en la cantidad de gamma-globulina en el suero.

Las técnicas de determinación de las fracciones-separadas de globulinas, aunque, la purificación de--antígenos y elaboración de los medios de prueba son costosos y difíciles de obtener.

La técnica turbidimétrica provee un índice del grado de elevación de gamma globulina del suero de pacientes con enfermedad hepática.

En estas técnicas la dilución del suero con diluciones de sales de metales pesados precipitan varias-fracciones de globulinas de acuerdo a la concentración del metal usado. El análisis electroforético de dichos precipitados, demuestra que su composición es enteramente de gamma globulina. Estudios con suero de pacientes con hepatitis demostraron que las concentraciones de precipitados de proteínas son proporcionales

al incremento en la cantidad de gamma globulina en el suero.

Las técnicas de determinación de las fracciones se paradas de globulinas, aunque, la purificación de antígenos y elaboración de los medios de prueba son costosos y difíciles de obtener.

La técnica turbidimétrica provee un índice del -- grado de elevación de gamma globulina del suero de pacientes con enfermedad hepática.

En éstas técnicas la dilución del suero con diluciones de sales de metales pesados precipitan varias - fracciones de globulinas de acuerdo a la concentración del metal usado. El análisis electroferético de dichos precipitados demuestra que su composición es enteramente de gamma globulina. Estudios con suero de pacientes con hepatitis demostraron que las concentraciones de - precipitados de proteínas son proporcionales a un incremento de gamma globulina.

Desde hace varios años se sabe que los pacientes con enfermedad hepática grave como también con ictericia obstructiva, presentan problemas de coagulación.

En 1940 se observó que el déficit de vitamina "K" ocasiona hipotrombinemia y que la vitamina "K", que es soluble en grasas requiere para su absorción la presencia de sales biliares. Esto condujo al conocimiento de que la tendencia en la hemorragia en la ictericia - obstructiva podía mejorarse con la administración parenteral de vitamina "K", pero la hipotrombinemia - del paciente con enfermedad hepática no volvía a la -- normalidad tras la administración parenteral de vitamina "K", sobre éstas bases se fundó una prueba de función hepática, la administración de una dosis estable-

cida de vitamina "K" a un paciente con ictericia obstructiva normalmente restablece el tiempo de protrombina prolongada a un tiempo normal, mientras que falla en los pacientes con hipoprotrombinemia que presentan una enfermedad hepática intrínseca.

Esta prueba ha sido considerada por algunos, de cierto valor en el diagnóstico diferencial de ictericia.

## CUANTIFICACION DE PROTEINAS TOTALES

## FUNDAMENTO :

La prueba se basa en la coloración característica adquirida por el contacto con el cobre, formando complejos, en los cuales el cobre en solución como  $\text{Cu}^{-2}$ , se une con varios grupos de péptidos en un medio alcalino, reproduciendo un color azul morado que es medido por un espectrofotómetro. ( 13 ), ( 26 )

## MATERIAL Y REACTIVOS :

Espectrofotómetro

Balanza analítica

Cronómetro

Tubos de ensayo

Solución de hidróxido de sodio al 10%

Sulfato de cobre pentahidratado

Tartrato de sodio y potasio tetrahidratado.

Cloruro de sodio al 0.85%

Agua destilada

Solución testigo de albúmina de 1 mg/ml

Suero 1.0 ml

Preparación del reactivo de Gornall : Colocar en un matraz aforado de 1000 ml sulfato de cobre pentahidratado 1.5 gr, tartrato de sodio y potasio tetrahidratado 6 gr disolver en 500 ml de agua destilada, agregar 300-ml de hidróxido de sodio al 10%

Enfriar y completar a 1000 ml con agua destilada. El reactivo se conserva por tiempo prolongado, debe descartarse si presenta turbiedad ó precipitaciones.

Preparación de solución de hidróxido de sodio al -- 0.85%, se colocan 8.5 gr de cloruro de sodio en 1000 ml de agua destilada.

**METODO :**

- A) Tubo 1 (testigo) 0.1 ml de solución testigo, 1 ml de solución salina, 8.0 ml de reactivo de Gornall.
- B) Tubo 2 (problema) 0.1 ml de suero 1.9 de solución salina, 8.0 ml de reactivo de Gornall.
- C) Tubo 3 (blanco) 2 ml de solución salina, 8-ml de reactivo de Gornall.
- D) Mezclar y dejar 20 minutos a temperatura ambiente, leer a 540 Nm contra blanco de reactivos.

**CALCULO :**  $\frac{\text{Densidad óptima de problema}}{\text{Densidad óptima de testigo}} \times \text{concentración testigo} = \text{gr de proteína} / 100 \text{ ml}$

**APLICACIONES CLINICAS :**

El hígado es el encargado de la síntesis de muchos de los constituyentes protéicos del plasma : Albúmina, Fibrinógeno, Protrombina y otras proteínas esenciales para la coagulación de la sangre.

En sujetos sanos, el hígado conserva relativamente constante la concentración plasmática de sustancias

gracias a que las sintetiza con velocidad aproximada a su destrucción. En estados patológicos, al disminuir la masa de células hepáticas funcionales, el equilibrio se rompe.

Así pues el descenso de la concentración de albúmina por debajo de 3 gramos por 100 ml sugiere insuficiencia hepática y naturalmente, en presencia de ictericia indica origen hepatocelular.

Esta alteración suele presentarse en enfermos con insuficiencia hepática crónica, con más rareza en la aguda.

**VALORES NORMALES :**

De 6.50 a 8 gramos / 100 ml de suero.

**DETERMINACION DE GLOBULINAS SERICAS****FUNDAMENTO :**

Esta determinación se basa en la precipitación de varias fracciones de proteínas en contacto con sales - de metales pesados en determinada concentración y PH - determinado. ( 14 ), ( 27 )

**MATERIAL Y REACTIVOS :**

Espectrofotómetro

Baño María

Tubos de ensayo

Pipetas 1,5 10 ml

Matraz aforado 1000 ml

sulfato de Zinc

Veronal ó barbiturato ácido

Veronal Sódico

Agua destilada

Tiras de PH

0.1 ml de suero

Preparación del reactivo de Kunkel

Poner 24 mg de sulfato de zinc pentahidratado, -  
280 mg de ácido barbitúrico y 210 mg de barbitura-  
to de sodio, calentándolo para disolver en 800 ml-  
de agua destilada y enfriar completando a 1000 ml-  
la solución, debe tener un PH de 7,5

**METODO :**

- A) En un tubo de ensayo se coloca 0.05ml de suero y 3 ml de reactivo (sulfato de zinc) bufferado, se mezcla.
- B) Se deja reposar 30 minutos.
- C) Se lee la turbiedad en un espectrofotómetro a 350 Nm.

**Preparación del Standard :** Tomar 1.15 gr de cloruro de bario dihidratado y llevar a 100 ml, tomar 3 ml de ésta solución y llevar a 100 ml con ácido sulfúrico 0.2 M, ésta solución de sulfato de bario tiene una turbiedad de 20 unidades.

**APLICACIONES CLINICAS :**

La elevación de las globulinas en el plasma se debe a una reacción del sistema retículo endotelial; se encuentra sobre todo en cirrosis y hepatitis crónica y en enfermos con ictericia hemolítica. Es discreta en hepatitis aguda y no se observa en las obstrucciones biliares, a menos que tales alteraciones patológicas sean crónicas ó hayan producido daño hepático secundario.

La separación y cuantificación de las distintas globulinas gamma ó inmuno globulinas en sus fracciones IgG, IgA, IgM han sido de utilidad en el diagnóstico diferencial de las ictericias, en efecto, la IgM que normalmente no sobrepasa la concentración de 190 mg -- por 100 ml de suero, sobrepasa dicho límite en algunos pacientes con cirrosis biliar primaria. En cambio, la concentración de ésta inmunoglobulina no se eleva en -

otros tipos de colestasis ni en los pacientes con obstrucción de las vías biliares extra hepáticas.

**VALORES NORMALES :**

Hásta 12 unidades.

**PRUEBA DE TURBIEDAD DEL TIMOL****FUNDAMENTO :**

Diluciones del suero de pacientes con afecciones - del hígado, con soluciones de baja fuerza iónica, decrecen la solubilidad de las proteínas y bajo ciertas condiciones, las mayorías de las globulinas quedan insolubles y se precipitan, dando una turbiedad a la solución que es medida con el espectrofotómetro dicho incremento de la turbiedad depende del incremento de gamma globulinas del suero. ( 23 ), ( 43 )

**MATERIAL Y REACTIVOS :**

Espectrofotómetro  
Balanza analítica  
Tubos de ensayo  
Pipetas de 0.2, 1,5, y 10 ml  
Matraz aforado de 100 y 1000 ml  
Baño María  
Acido barbitúrico ó veronal  
Barbiturato de sodio  
Solución al 10 % de timol en alcohol de 95°  
Agua destilada  
0.1 ml de suero  
Preparación de reactivos : Buffer de media concentración, colocar 1.380 gr de ácido barbitúrico y -

1.30 gr de barbiturato de sodio. Disolver en 800 ml de agua destilada, calentando a ebullición, enfriar agregar 5 ml de timol al 10% en alcohol de 95<sup>o</sup>, agitar y completar con agua a 1000 ml.

Reactivo de uso : 0.5 ml de solución de timol al -- 10%, 95.5 ml del buffer de concentración media, agitar hasta la disolución completa, sin que deban observarse gotas aceitosas en el cuello del matraz.

#### METODO :

- A) En un tubo de ensayo colocar 0.05 ml de suero y 3 ml de reactivo de uso. Mezclar.
- B) Dejar en reposo durante 30 minutos.
- C) Leer contra blanco de reactivos a 670 mm

Preparar una solución standard como sigue: 1.15 gr de cloruro de bario dihidratado por 100 ml, tomar 3 ml de ésta solución y llevarla a 100 ml con ácido sulfúrico 0.2 M ésta solución de sulfato de bario tiene una turbiedad equivalente a 20 unidades.

#### APLICACIONES CLINICAS :

Es positiva (arriba de los valores normales) en hepatitis infecciosa y en general en toda ictericia hepatocelular, en cirrosis con inflamación mesenquimal como hepatitis cirrótica, cirrosis atrófica con exacerbaciones ictericas, también es positiva en endocarditis, neumonías, tuberculosis pulmonar, mielomas como algunos ejemplos de enfermedades extra hepáticas.

**VALORES NORMALES :**

De 0-4 unidades.

**TIEMPO DE PROTROMBINA Y PRUEBA DE LA VITAMINA "K"****FUNDAMENTO :**

El tiempo de protrombina que se altera, prolongando dose cuando no hay absorción adecuada de su precursor-  
la vitamina "K" ó cuando el hígado no puede utilizarla  
para la síntesis de la protrombina. ( 2 ), ( 31 )

**MATERIAL Y REACTIVOS :**

Balanza analítica  
Jeringa de 1 y 5 ml  
Centrífuga  
Baño María  
Pipetas de 1 y 5 ml  
Fitonadioma ( vitamina "K1" )  
Citrato de sodio 0.1 M  
Tromboplastina activada  
Cloruro de calcio 0.025 M  
Tubos de ensayo  
Cronómetro  
2 ml de suero.

**METODO :**

- A) Determinación del tiempo de protrombina por el método de Quick.
- B) Administrar de 60 a 100 mg de fitonadiona en - inyección intramuscular ó intravenosa.
- C) Extraer sangre a las 6 y 12 hrs. después para la determinación de protrombina.

**APLICACIONES CLINICAS :**

Un tiempo prolongado de protrombina no es específico para la hipovitaminosis K<sub>1</sub>, ya que se puede modificar por la deficiencia congénita de los factores de coagulación y por las drogas (Warfarina).

Esta prueba no es un indicador sensible de lesión celular hepática, pues el tiempo de protrombina puede ser normal ó ligeramente prolongado en cirrosis severa. La respuesta a la aplicación parenteral de vitamina K<sub>1</sub>, no siempre permite distinguir entre la hipovitaminosis debida a la afección del parénquima hepático y la posterior a ictericia obstructiva crónica, ya que la oclusión extrahepática del tracto biliar está con frecuencia asociada a lesión celular hepática secundaria. El tiempo de protrombina tiene valor diagnóstico en afecciones hepatocelulares agudas y crónicas. Un tiempo reducido de protrombina (menos de 40% del control), que no responda a la administración de vitamina K<sub>1</sub>, es casi siempre la única prueba funcional que sugiere el desarrollo inminente de una insuficiencia hepática fulminante.

**VALORES NORMALES :**

Cuando no exceda de 3 segundos en comparación ó - referencia a un testigo normal que pueda dar de 11 a 15 segundos.

**PRUEBAS BASADAS EN EL METABOLISMO DE CARBOHIDRATOS****INTRODUCCION :**

La prueba de tolerancia a la galactosa se ha aplicado durante muchos años al estudio de la enfermedad hepática. El hígado normal es capaz de convertir la galactosa en glucosa, que es almacenada en forma de glucógeno por lo tanto la prueba de tolerancia a la galactosa es una prueba empleada para valorar la capacidad del hígado para metabolizar los carbohidratos. La galactosa es un carbohidrato que no tiene un umbral para su eliminación y por lo mismo es excretada fácilmente por los riñones, excepto en los casos de insuficiencia renal.

La administración de galactosa da lugar a la persistencia de niveles anormales en la sangre durante varias horas y a la excreción urinaria de cantidades anormales de galactosa.

Aunque antiguamente fué recomendada por varios autores para el diagnóstico diferencial de las ictericias, nunca se utilizó mucho y en la actualidad es muy raro su empleo.

## TOLERANCIA A LA GALACTOSA

### FUNDAMENTO :

Los métodos para la determinación de galactosa en sangre ó en orina ordinariamente implican eliminación de glucosa por fermentación con levadura por tratamiento con oxidasa de glucosa.

La concentración de los azúcares reductores remanentes determina entonces y se expresa como galactosa. Se han propuesto varias modificaciones de éstos métodos y todos adolecen de falta de especificidad.

Con el hecho de disponer ahora de oxidasa de galactosa se puede presentar un método más específico. ( 28 )

( 44 )

### MATERIAL Y REACTIVOS :

Espectrofotómetro  
 Balanza analítica  
 Centrífuga  
 Cronómetro  
 Pipetas 1,5, y 10 ml  
 Matraz volumétrico de 50, 100, 1000 ml  
 Tiras de PH  
 Amortiguador de fosfatos PH 7.0  
 Tritón X-100  
 Ortotoluidina

Metanol puro  
 Peroxidasa  
 Oxidasa de galactosa  
 Sulfato de Zinc  
 Hidróxido Bórico  
 Standart de galactosa  
 Agua destilada  
 1 ml sangre u orina.

Preparación de reactivos : Reactivo enzimático : en un matraz de 50 ml. se colocan 2.5 mg de ortotoluidina que se disuelve con 0.5 ml de metanol y se agrega 30 ml de a amortiguador de fosfatos PH 7.0 Se agregan enseguida 2.5 mg de peroxidasa y 4 mg de oxidasa de galactosa se mezclan hasta la disolución y se agregan 5 ml de tritón --- X-100 al 2% se diluyen hasta la marca con el amortiguador de fosfatos.

Preparación del amortiguador de fosfatos PH 7.0 : - poner 5.79 gramos de fosfato ácido de sodio anhidro, 3.53 gramos de fosfato ácido de potasio anhidro en un matraz volumétrico de 1000 ml se diluye con agua hasta la marca ajustar el PH a 7.0 con ácido clorhídrico 0.1 N ó hidróxido de sodio de 0.1 N

Preparación del tritón X-100 al 2% V/V : Se diluye 2 ml de tritón X-100 a 100 ml en un matraz volumétrico de 100 ml con agua destilada.

Preparación de amortiguador de glicina 0.25 M PH - 7.0 : 12.22 gramos de glicina con 9.5 gramos de cloruro de sodio en 1000 ml agregar 300 ml de agua y 87.5 ml de hidróxido de sodio 1 N mezclar y diluir hasta la marca - con agua destilada y checar PH.

Preparación de amortiguador de glicina 0.25 M - PH 7.0: 12.22 gramos de glicina con 9.5 gramos de -- cloruro de sodio en 1000 ml, agregar 300 ml de agua- y 87.5 ml de hidróxido de sodio 1 N mezclar y diluir hasta la marca, con agua destilada y checar PH.

**METODO :**

- A) Poner 0.5 ml de agua destilada en 3 tubos de centrifuga de 12 ml marcado como X1, S2, S1. Agregar 1 ml de agua en otro tubo "B" testigo.
- B) Se agrega 0.5 ml de sangre u orina al tubo X1 y - 0.5 ml de los standart de galactosa a S1 y S2 mezclar.
- C) A cada uno de los tubos poner 2 ml de hidróxido - de bario 0.3 N. mezclar y agregar 2 ml de sulfato de zinc al 5 % y dejar reposar 5 minutos.
- D) Centrifugar 5 minutos los cuatro tubos a 2500 r.p.m. hasta tener un sobrenadante claro.
- E) Colocar 2 ml de sobrenadante en cuatro tubos de - ensayo marcado como X1, S2, S1, y "B".
- F) Agregar 2 ml de reactivo enzimático a todos los - tubos y ponerlos a baño maria a 37° C.
- G) Después de una hora, agregar 6 ml de amortiguador de glicina para interrumpir la reacción y estabilizar el carbohidrato. Mezclar bien y leer a 425nm.

|                                    |       |       |     |   |
|------------------------------------|-------|-------|-----|---|
|                                    | Abs   | X-Abs | "B" |   |
| CALCULO : Mg de galactosa/100 ml = | ----- |       |     | X |
| Conc. St. Galact.                  | Abs   | S-Abs | "B" |   |

#### APLICACIONES CLINICAS :

Aunque la prueba es de un valor clínico pobre en la evolución de la función hepática, su limitación mayor es su insensibilidad. La tolerancia anormal no es manifiesta hasta que no ocurre una destrucción grave de las células hepáticas, sin embargo una disminución progresiva de la tolerancia guarda un paralelismo con necrosis en desarrollo de células hepáticas, y puede ayudar a distinguir entre una ictericia obstructiva y una hepatitis, no obstante su uso ha sido desechado.

#### VALORES NORMALES :

No exceder de 42 mg/100 ml después de 60 minutos.

## PRUEBAS BASADAS EN EL METABOLISMO DE GRASAS

## INTRODUCCION :

Los lípidos de la sangre (colesterol, fosfolípidos, triglicéridos) son, por definición insolubles en soluciones acuosas por lo que no se encuentran libres en el plasma sanguíneo, sino que entran a él, circulan y salen unidos a proteínas, éstos complejos de lípidos y proteínas pueden ser clasificados en función de su densidad, gracias a la ultracentrifugación en: Lipoproteínas de muy baja densidad, kilomicrosomas, lipoproteínas de baja densidad y lipoproteínas de alta densidad.

Los kilomicrosomas se componen principalmente de triglicéridos, que siendo de origen exógeno y proceden del intestino, son transformados en la sangre a la que llegan a través del conducto torácico. Solo una pequeña fracción de los kilomicrosomas es depurada por el hígado.

Las lipoproteínas de muy baja densidad transportan triglicéridos que proceden del hígado, donde son sintetizadas, y se dirigen al tejido muscular y adiposo para servir como fuente energética; al perder gran parte de su contenido de glicéridos y parte de su proteína, las lipoproteínas de muy baja densidad se convierten en lipoproteínas de baja densidad, las que contienen un 50% de colesterol y el resto de fosfolípidos y proteínas. Finalmente las lipoproteínas de alta den-

sidad son las que tienen mayor contenido proteínico y - no participan directamente en el transporte de glicéridos.

El hígado es el principal órgano de síntesis, degradación de lipoproteínas del plasma, por lo que es -- comprensible que éstas experimentan cambios cuando la - función hepática se perturba.

Los métodos usados para la determinación de colesterol y Esteres de colesterol, fueron revisados por --- Bloor, Knudsen, Perry, Kelsy y otros; en todos éstos -- métodos el colesterol libre es separado de los Esteres -- por precipitación con digitonina para una determinación cuantitativa de ambos, colesterol libre y combinado, -- casi todos los métodos utilizan la reacción de color de Lieberman-Burchard.

Varios procedimientos son usados para la extracción del colesterol de la sangre. Bloor, los extracta de --- sangre fresca con una mezcla de alcohol y éter, Myers - y Wardell a partir de sangre seca con cloroformo.

**DETERMINACION DE COLESTEROL TOTAL****FUNDAMENTO :**

El ácido paratoluensulfónico en medio acético reacciona con el colesterol para formar un complejo que con anhídrido acético y ácido sulfúrico concentrado, se vuelve de color verde, cuya intensidad es proporcional a la cantidad de colesterol presente. ( 30 )

**MATERIAL Y REACTIVOS :**

Espectrofotómetro

Tubos de Ensayo

Pipetas de 5, 10 y 20 ml

Acido acético glacial q.p.

Acido paratoluensulfónico q.p.

Anhídrido acético q.p.

Acido sulfúrico q.p.

Colesterol q.p.

Preparación de reactivos : Solución acética de ácido paratoluensulfónico al 12 % : 12 gramos de ácido paratoluensulfónico, aforando con ácido glacial a 100 ml.

Solución colesterol 400 mg/100 ml : 4 gramos de colesterol, aforando a 100 ml con ácido acético glacial.

**METODO :**

- A) Marcar 3 tubos de ensayo con leta P, B y E.
- B) Poner 0.1 ml de suero al tubo P y 0.1ml de agua al - tubo B, al tubo E ponerle 0.1 ml de la solución de - colesterol
- C) A los tubos P y B agregarles 0.1 ml de ácido acético glacial, al tubo P agregar 0.1 ml de agua destilada.
- D) Agregar 0.5 ml de solución acética de ácido parato--luensulfónico al 12% a cada uno de los tubos.
- F) Dejar la mezcla a temperatura ambiente hasta que se enfrie añadir 0.2 ml de ácido sulfúrico concentrado, agitar vigorosamente.
- G) Dejar 20 minutos a temperatura ambiente, y leer a - 550 mm ajustando con el tubo B a cero de densidad - óptica.

**Curva de calibración :**

De la solución de colesterol de 400 mg en 100 ml. to mar 10, 20, 30, 40 y 50 ml y aforar a 50 ml con ácido - acético glacial para obtener las concentraciones siguientes :

80, 160, 2r0, 320 y 400 mg en 100 ml

| Solución de colesterol<br>4 mg en 1 ml | ml de ácido acético<br>glacial c.b.p. | Mg en 100ml |
|--|---------------------------------------|-------------|
| 10                                     | 50                                    | 80          |
| 20                                     | 50                                    | 160         |
| 30                                     | 50                                    | 240         |
| 40                                     | 50                                    | 320         |
| 50                                     | 50                                    | 400         |

De cada uno de éstas diluciones, tomar 0.1 ml y - continuar como se indica en la técnica a partir del paso c) en la indicación del tubo E.

#### APLICACIONES CLINICAS :

Las lipoproteínas plasmáticas, especialmente las de baja densidad ó betalipoproteínas, y por ende el colesterol plasmático descienden cuando hay insuficiencia hepática.

Este descenso no solo tiene un valor diagnóstico sino pronóstico, pues la concentración baja de éstas fracciones indica deterioro progresivo de la función hepatocelular, en cambio, la tendencia a la recuperación de niveles normales es indicativa de recuperación.

El descenso de la proporción del colesterol esterificado es característico de la insuficiencia hepática y, -- por consiguiente, de la enfermedad parenquimatosa del hígado, y ayuda a diferenciar la hipocolesterolemia de origen hepático de las que se deben a otras causas, tales -- como: Absorción intestinal deficiente, hipertiroidismo y estados febriles prolongados.

En las hepatopatías por obstrucción biliar extra --- hepática y en las que se deben a colestasis intra hepática se elevan las lipoproteínas de baja densidad a betalipoproteínas y, en consecuencia el colesterol total del suero, cuya concentración suele sobrepasar los 300 mg/100 ml y llega a alcanzar cifras de 1000 mg/100 ml.

En los enfermos por obstrucción biliar crónica-  
la disminución del colesterol total, previamente eleva  
do, indica daño hepatocelular secundario y tiene, por-  
ello, gran valor diagnóstico.

**VALORES NORMALES :**

Colesterol total : Adultos de 160 a 240 mg/100 ml  
niños: 130 a 180 mg/100 ml.

## PRUEBAS BASADAS EN LA CUANTIFICACION DE ENZIMAS

## INTRODUCCION :

El citoplasma de las células parenquimatosas hepáticas es rico en enzimas que catalizan múltiples funciones metabólicas realizadas por dicho órgano. Cuando las células del parénquima se lesionan o destruyen, algunas enzimas, incluidas las transaminasas del suero y la deshidrogenasa láctica, son liberadas hacia la circulación.

La aparición de actividad enzimática o su incremento, llega a ser demostrable al igual que la disminución de la colinesterasa.

La acción de la fosfatasa alcalina sérica que se origina en el hígado, no procede de las células parenquimatosas, sino más bien de las que recubren el tracto biliar; la actividad se eleva principalmente en las afecciones hepáticas caracterizadas por obstrucción.

Las dos transaminasas séricas que se determinan -- normalmente durante una enfermedad hepática son la transaminasa glutámico pirúvica ( TGP ) y la transaminasa glutámico oxalacética ( TGO ). Las medidas de su actividad constituyen indicadores sensibles de lesiones hepatocelulares difusas, puesto que los niveles elevados -- están entre las primeras anomalías bioquímicas posteriores a la lesión o muerte del hepatocito.

Sin embargo, ésta sensibilidad se ve comprometida por la falta de especificidad del órgano. Las transaminasas se localizan en altas concentraciones en el miocardio, el músculo esquelético y los riñones y su actividad aumenta cuando uno de éstos órganos se lesiona.

Karmen, Wreblewski, Ladue realizaron una medición de la actividad de las transaminasas en un estudio sobre cromatografía en papel, sin embargo dicha técnica escapa por ahora a su aplicación rutinaria en la mayoría de laboratorios.

Retman y Franquell llevaron a cabo la medición con un método más sencillo y accesible a cualquier laboratorio, éstos métodos colorimétricos son suficientemente exactos y sensibles en la determinación de la actividad enzimática como lo son los métodos en determinación de UV.

La fosfatasa alcalina se encuentra en grandes concentraciones en diversos órganos (huesos, hígado, riñones, mucosa intestinal).

Dentro de varios aspectos interesantes de su metabolismo, las rutas de eliminación de las fosfatasas --- alcalinas, son variadas, encontrándose una a través de la vía biliar, por lo que su elevación en la sangre puede ser signo de un trastorno hepático-biliar.

Se han llevado estudios sobre la determinación de la isoenzima de la fosfatasa alcalina, separando fundamentalmente la de origen hepático de la ósea, por métodos electrofóreticos, inmunológicos y térmicos cuya complejidad no ha permitido que tengan utilización en la clínica diaria.

La cuantificación se realiza por medio de varias técnicas siendo las más utilizadas las de Bodanky, Kyng-Armstrong y la de Bessey y Lowry, ésta última con la ventaja de utilizar una pequeña muestra de suero con muy buenos resultados en su cuantificación. La distribución de la deshidrogenasa láctica (LDH) por todos los tejidos del organismo y su falta de especificidad y sen

sibilidad respecto al daño celular hepático, restringen la utilidad de la prueba como indicador en el caso específico, aunque su determinación acompañada de otras enzimas es un buen dato, para apoyar una lesión hepática.

La determinación de la cetilcolinesterasa ó pseudocolinesterasa es muy útil en lesiones hepáticas crónicas, pues se trata de una esterasa sintetizada por el hígado en una concentración alta y cuya determinación colorimétrica llevada a cabo por Ellman es rápida y muy sensible.

Una de las determinaciones más específicas de daño al hígado consiste en la medición de gamma-glutamyl-transferasa, la cual también es útil en algunos tipos de --- obstrucción biliar de etiología principalmente alcohólica.

DETERMINACION DE GLUTAMATO-PIRUVATO-TRANSAMINASA  
(COLORIMETRICA)

( L-alanina : 2-oxoglutarato-aminotransferasa )

FUNDAMENTO :

La transaminasa-glutámico-pirúvica (GOT) cataliza la siguiente reacción :



El piruvato formado reacciona en solución alcalina con 2-4 dinitrofenihidrazina. El producto de la reacción se mide fotometricamente entre 500 y 560 nm. ( 4 )  
( 54 )

MATERIAL Y REACTIVOS :

Espectrofotómetro

Cronómetro

Pipetas 1 y 5 ml

Sustrato amortiguador (amortiguador de fosfatos - 100 Mmol/L, PH 7.4, Dl-alanina 100 Mmol/L,  $\alpha$ -ceto glutarato 2 Mmol/L).

Reactivo de color (2,4-dinitrofenihidrazina 1.5 Mmol/L)

Hidróxido de sodio 0.4 mol/L

Solución patrón (piruvato de sodio 2 Mmol/L)

## METODO :

A) En dos tubos de ensayo marcados "P" (problema "B" (blanco) se coloca 0.5 ml de solución amortiguadora de sustrato y se incuban 5 minutos en baño maría a 37° C.

B) Se agrega al tubo "P" 0.1 ml de suero reciente mezclar e incubar exactamente 30 minutos a 37° C.

C) Se agregan a los dos tubos el reactivo de color 0.5 ml agregando 0.1 ml de suero al tubo "B" mezclar y dejar reposar 20 minutos a temperatura ambiente.

D) Agregar a los dos tubos 5.0 ml de hidróxido de sodio 0.4 M mezclar y leer el problema contra el blanco al cabo de 5 minutos a una longitud de onda de 546 Nm

## CALCULO :

TABLA PARA LA OBTENCION DE LA ACTIVIDAD POR VOLUMEN

| Extinciones | Método UV<br>Convencional | Extinciones | Método UV<br>Convencional |
|-------------|---------------------------|-------------|---------------------------|
|             | mU/ml                     |             | mU/ml                     |
| 0.2         | 3                         | 0.30        | 46                        |
| 0.04        | 5                         | 0.32        | 50                        |
| 0.06        | 8                         | 0.34        | 53                        |
| 0.08        | 10                        | 0.36        | 57                        |
| 0.10        | 13                        | 0.38        | 61                        |
| 0.12        | 16                        | 0.40        | 65                        |
| 0.14        | 19                        | 0.42        | 69                        |
| 0.16        | 22                        | 0.44        | 74                        |
| 0.18        | 26                        | 0.46        | 79                        |
| 0.20        | 29                        | 0.48        | 84                        |
| 0.22        | 32                        | 0.50        | 90                        |
| 0.24        | 36                        | 0.52        | 98                        |
| 0.26        | 39                        |             |                           |
| 0.28        | 43                        |             |                           |

**APLICACIONES CLINICAS :**

Las enfermedades agudas del hígado dan lugar a elevaciones de las transaminasas en el suero, de gran valor para el diagnóstico. Las elevaciones máximas -- se han obtenido en casos de hepatitis aguda infecciosa y tóxica. En éstos casos de lesión hepatocelular-- difusa aguda, ambas enzimas se elevan de manera muy -- importante : 400 a 2000 y aún más unidades, siendo el ascenso de la transaminasa pirúvica ligeramente superior a la oxalacética. Ambas descienden en forma paulatina a la mejoría clínica para volver a ascender si -- ocurre una exacerbación de la enfermedad.

La cirrosis y otras hepatopatías crónicas también se eleva la actividad sérica de las transaminasas si bien de manera moderada: 50 a 250 unidades por ml.

En la ictericia por obstrucción de las vías biliares extra hepáticas, las cifras de transaminasas séricas también se elevan, generalmente entre 40-300 -- unidades, solo por excepción se excede la última cifra, al contrario de lo que ocurre en los casos de -- ictericia hepatocelular aguda, de aquí el valor diagnóstico de ésta prueba.

En enfermos conolestásis intra hepática, las elevaciones en la actividad de las transaminasas séricas son similares a las que se observan en los enfermos con obstrucción biliar extra hepática por lo que, en éstos casos, no tiene valor para el diagnóstico diferencial. Los valores de las transaminasas también se elevan en pacientes con enfermedad del miocardio, musculoesquelético y otros tejidos. En casi todos los casos las -- transaminasas que se elevan son la oxalacética más que la pirúvica.

**VALORES NORMALES :**

**3-17 mU/ml**

**1 unidad internacional (U) de enzima es la cantidad de enzima necesaria para transformar 1 mol de sustrato en 1 minuto.**

**DETERMINACION DE GLUTAMATO-OXALACETATO-TRANSAMINASA  
(COLORIMETRICO) (L-Aspartato-2-Oxoglutarato-Amino--  
transferasa)**

**FUNDAMENTO :**

La glutamato-oxalacetato-transaminasa cataliza la transferencia del grupo amino del glutamato al oxalacetato según la siguiente reacción:



Para la determinación de GOT según Reitman y Frankel se deja actuar el suero problema en solución amortiguada sobre cetoglutarato y aspartato y se mide la cantidad producida de oxalacetato. El producto de reacción puede determinarse fotométricamente en forma de 2,4-dinitrofenihidrazona, en solución alcalina. Puesto que también el  $\alpha$ -cetoglutarato que se produce en la reacción forma una hidrazona, se mide en el intervalo de 500 a 560 nm dentro del cual las extinciones de las hidrazonas se distinguen en máximo grado, se mide a una concentración subóptima de  $\alpha$ -cetoglutarato, para no obtener valores blancos demasiado elevados. ( 4 ), ( 54 )

**MATERIAL Y REACTIVOS :**

Espectrofotómetro

Baño maría

Cronómetro

Pipetas 1, 5 ml

Solución amortiguadora del sustrato (amortiguador de fosfatos 100 Mmol/L

Reactivo de coloración (2,4-dinitrofenihidracina-1.5 Mmol/L) patrón (concentrado, piruvato sódico 2 Mmol/L) Hidróxido de sodio 0.4 N.

**METODO :**

- A) Colocar en 2 tubos marcados "P" (problema) y "B" (blanco) 0.5 ml de solución amortiguadora de sustrato y colocarlos 5 minutos en baño --maría a 37° C.
- B) Agregar 0.2 ml de suero al tubo problema, mezclar e incubar 30 Min. a 37° C ambos tubos.
- C) Agregar 0.5 ml de reactivo de coloración a los 2 tubos y 0.2 ml de suero al tubo "B". Mezclar y dejar en reposo 20 minutos a temperatura --ambiente.
- D) Agregar hidróxido de sodio 0.4 N, 5 ml a cada tubo, mezclar y dejar; después de 5 minutos - medir la extinción (absorvencia) del problema contra el blanco a 546 nm.

**APLICACIONES CLINICAS :**

Las enfermedades agudas del hígado dan lugar a elevaciones de las transaminasas en el suero, de gran valor para el diagnóstico. Las elevaciones máximas se han obtenido en casos de hepatitis aguda infecciosa y tóxica. En éstos casos de lesión hepatocelular difusa aguda, ambas enzimas se elevan de manera muy importante: 400 a 2000 y aún más unidades siendo el ascenso de la -transaminasa pirúvica ligeramente superior a la oxalacética. Ambas descienden en forma paralela a la mejoría clínica para volver a ascender si ocurre una exacerbación de la enfermedad.

La cirrosis y otras hepatopatías crónicas también se eleva la actividad sérica de las transaminasas, si bien de manera moderada: 50 a 250 unidades por ml.

En la ictericias por obstrucción de las vías biliares extrahepáticas, las cifras de transaminasas séricas también se elevan, generalmente entre 40-300 unidades, solo por excepción se excede la última cifra, - al contrario de lo que ocurre en los casos de ictericia hepatocelular aguda, de aquí el valor diagnóstico de ésta prueba.

En enfermos con colestásis intra hepática, las elevaciones en la actividad de las transaminasas séricas son similares a las que se observan en los enfermos con obstrucción biliar extra hepática por lo que, - en éstos casos, no tiene valor para el diagnóstico diferencial. Los valores de las transaminasas también se elevan en pacientes con enfermedad del miocardio, musculo esquelético y otros tejidos. En casi todos los casos - la transaminasa que se elevan son la oxalacética más - que la pirúvica.

## VALORES NORMALES :

2-19 MU/ml

1 unidad internacional (U) de enzima es la cantidad de enzima necesaria para transformar 1 mol -- de sustrato en 1 minuto.

Tabla para la obtención de la actividad por volumen

| Extinciones | Método UV<br>Convencional<br>mU/ml | Extinciones | Método UV<br>Convencional<br>mU/ml |
|-------------|------------------------------------|-------------|------------------------------------|
| 0.02        | 3                                  | 0.16        | 34                                 |
| 0.04        | 6                                  | 0.18        | 41                                 |
| 0.06        | 10                                 | 0.20        | 50                                 |
| 0.08        | 14                                 | 0.22        | 60                                 |
| 0.10        | 18                                 | 0.24        | 72                                 |
| 0.12        | 23                                 | 0.26        | 86                                 |
| 0.14        | 28                                 |             |                                    |

**DETERMINACION DE GLUTAMATO-OXALACETATO-TRANSAMINASA  
( UV )**

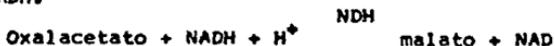
**( L-Aspartato-2-Oxaglutarato-Aminotransferasa )**

**FUNDAMENTO :**

La glutamato-oxalacetato-transaminasa (GOT) --- cataliza el transporte de nitrógeno desde el glutama to al oxalacetato según la siguiente ecuación :

$$\alpha\text{-Cetoglutarato} + \text{aspartato} \xrightarrow{\text{GOT}} \text{glutamato} + \text{oxalace tato}.$$

Para la determinación cuantitativa de GOT se de ja actuar el suero problema en solución amortiguada- sobre cetoglutarato y aspartato. El oxalacetato pro- ducido se transforma enzimáticamente en malato, en - presencia de malato-deshidrogenasa (MDH), por medio- de NADH.



La velocidad de consumo de NADH puede medirse - por la disminución de la extinción en la región del- ultravioleta cercano. Sus valores son directamente - proporcionales a la actividad de la GOT.

**MATERIAL Y REACTIVOS :**

Espectrofotómetro

Cronómetro

Pipetas de 1 y 5 ml

Solución de sustrato (disolvente)

Mezcla de enzima y amortiguador

La concentración en la prueba es la siguiente:

Amortiguador de fosfatos 80 Mmol/L a PH 7.4, -  
L-aspartato 200 Mmol/L;  $\alpha$ -catoglutarato 12 Mmol/L;-  
NADH<sub>2</sub> 0.18 Mmol/L; LDH 1.2U/mL; MDH 0.6 U/ml.

**METODO :**

A) Añadir a un frasco de mezcla de enzima y amortiguador 2 ml de solución de sustrato, esperar dos minutos hasta la solución completa.

B) Agregar 0.5 ml de suero ó plasma, mezclar y pasarlo enseguida a una cubeta fotométrica, medir la extinción al cabo de 1 minuto y, simultáneamente poner en marcha el cronómetro. Repetir las lecturas de minuto en minuto, durante 3, 4 ó 5 minutos una longitud de onda de 365 nm.

**CALCULO :**

Actividad por volumen = E/min x 1471 U/L.

**DETERMINACION DE FOSFATASA ALCALINA SERICA****FUNDAMENTO :**

Las fosfatasas catalizan la hidrólisis de los ésteres del ácido fosfórico. En función de los valores de PH a que logran su actividad óptima se distinguen 2 tipos de fosfatasas : Acida y Alcalina.

Para la determinación de las fosfatasas según - Bessey, Lowry y Brock se utiliza como sustrato el P-nitrofenolfosfato, que por la acción de la enzima se escinde en P-nitrofenol y ácido fosfórico. Añadiendo hidróxido de sodio; se interrumpe la reacción y el P-nitrofenol liberado es transformado en el anión de color amarillo, que puede determinarse fotométricamente. La cantidad de P-nitrofenol liberado - en la unidad de tiempo, es directamente proporcional a la actividad de la fosfatasa. ( 47 ), ( 53 )

**MATERIAL Y REACTIVOS :**

Espectrofotómetro

Baño maría

Cronómetro

Tubos de ensayo

Pipetas de 1,10 ml

Amortiguador de glicina y hidróxido de sodio --

Mmol/L PH 10.5

Sustrato de P-nitrofenilfosfato 5.5 Mmol/L

Hidróxido de sodio 0.02 N.

**METODO :**

- A) pipetear en 2 tubos de ensayo marcados "P" (problema) y "B" (blanco), 1 ml de sustrato amortiguador y dejar 5 minutos en baño maría a 37°C. Agregar 0.1 ml de suero reciente al tubo "P", mezclar, y dejar 30 minutos exactos en baño maría a 37°C.
- B) Agregar hidróxido de sodio 10 ml a los 2 tubos y 0.1 ml de suero al tubo "B" mezclar, y medir la extinción ó absorvencia del problema contra el blanco a 405 nm.

**CALCULO :** Actividad por volumen = Ext. X 200 = U/L

**APLICACIONES CLINICAS :**

La fosfatasa alcalina del suero procede principalmente de los huesos y también en parte del hígado.

Se registran aumentos de fosfatasa alcalina en estados patológicos como en la ictericia obstructiva, por el contrario suele tener valores normales en malformaciones congénita de Vías biliares. Otras enfermedades hepáticas, no ictericas, pueden dar lugar a ligeros valores superiores de los normales como la cirrosis, cáncer hepático, litiasis del colédoco y diabetes con degeneración hepática. Hay que recordar que la enzima se produce principalmente en huesos y por lo tanto se observan elevaciones de fosfatasas en problemas patológicos que involucren dicho sistema.

Por último se encuentran valores altos en cualquiera de los procesos agudos del hígado, como ejemplo la hepatitis viral.

**VALORES NORMALES :**

**De 15 a 69 U/L.**

**DETERMINACION DE ACETILCOLINESTERASA SERICA****FUNDAMENTO :**

El principio de la prueba es la medición de la tasa de producción de tiocolina a partir de la hidrólisis de la acetilcolina, ésta es consumida por la reacción continua del tiol con el ión 5.5 litio-bis-2-nitrobenzónico color amarillo. La cantidad de color es medida en un espectrofotómetro a 412 nm. La reacción es suficientemente rápida con medición de concentraciones bajas de la enzima y sin inhibir dicha concentración a la hidrólisis enzimática. ( 16 )

**MATERIAL Y REACTIVOS :**

Espectrofotómetro

Cronómetro

Pipetas 1, 5 ml

Buffer de fosfatos PH 7.2

Acido ditionitrobenzónico 0.25 mm

Yoduro de acetilcolina 0.156 M.

Reactivo "A" : Buffer de fosfatos 50 mm.

Acido detionitrobenzónico 0.25 mm

Reactivo "B" : Yoduro de acetilcolina 0.15 M.

**METODO :**

- A) Pipetear en una cuba de reacción 3 ml de --- reactivo "A" y agregar 0.02 ml de suero fresco.
- B) Colocar 0.10 ml de reactivo "B", mezclar y - medir la extinción cada 30 segundos por 2 minutos a 412 nm contra blanco de agua.

**CALCULO :** Cambio de extinción / 30 segundos X 23400 = Unid/L.

**APLICACIONES CLINICAS :**

La pseudocolinesterasa suele elevarse en miastemia Grave, con bajas concentraciones en la hipoproteinemia ó hipoalbuminemia dadas en la cirrosis hepática.

Efectivamente, se ha comprobado que el hígado es la fuente principal de colinesterasa plasmática.

En la hepatitis vírica se observa una caída acentuada de los valores de la colinesterasa en casos de favorables, descensos notables en los casos de gravedad media, y modificación insignificante en los favorables. En las colecistopatías ictericas existe una reducción moderada y es normal en la no icterica.

Las ictericias hemolíticas no se afecta la actividad colinesterasa del suero. En las ictericias obstructivas de corta duración los valores son normales, pero se registran valores bajos en los ataques de colangiohepatitis, así como en el cáncer y obstrucción prolongada.

**VALORES NORMALES :**

1900 a 3800 Unid / L.

## DETERMINACION DE GAMMA GLUTAMIL TRANSPEPTIDASA

### FUNDAMENTO :

Se basa en la medición, en forma cinética de la formación de la P- nitroanilina de color amarillo, a-405 nm En la reacción la enzima en presencia de glicilglicina, cataliza la transferencia de  $\gamma$ -glutamina a partir del sustrato para dar el dipéptido  $\gamma$  glutamilglicilglicina y nitroanilina. ( 25 )

### MATERIAL Y REACTIVOS :

Espectrofotómetro  
 Papel PH  
 Matracas aforados 100, 1000 ml  
 Balanza analítica  
 Baño maría  
 Solución Tris 0.2 M. (sol. "A")  
 Buffer Tris 0.1 N. PH 8.6  
 Acido clorhídrico 0.1 N. (sol. "B")

### Preparación de reactivos :

Tris 0.2 M (sol "A") : Hidroximetil-aminometano-24.23 gr. aforar a 1000 ml con agua destilada.  
 Buffer Tris 0.1 N PH 8.6 : 5<sup>o</sup> ml de solución "A" agregar 25 ml de solución "B" llevar a PH 8.6 y aforar con solución "A" a 100 ml  
 Buffer sustrato PH 8.2 : Glicil-P-nitroanilina - 100 ml. Disolver en baño maría no sobrepasando--

los 60°C, agitando.

El buffer sustrato puede fraccionarse en porciones de 3 ml y congelarse.

**METODO:**

- A) Poner en una cubeta de reacción 3 ml de sustrato buffer, agregar 0.2 ml de suero reciente.
- B) Determinar el cambio de extinción por minuto, durante 3 a 6 minutos a 405 nm.

**CALCULO:** Cambio de extinción por minuto X 1616 = Unid/L.

**APLICACIONES CLINICAS :**

La determinación de la actividad de la enzima es muy importante en enfermedades hepáticas, pues el estudio de ésta demostró, elevaciones importantes en hepatitis viral y hepatitis crónica tanto viral como alcohólica.

La gran elevación de la enzima es diagnóstica -- en enfermedades por obstrucción biliar y coledocolitiasis (arriba de 225 Unid.) no son muy aparentes, -- pudiendo dar valores en los límites normales de la -- actividad de la enzima.

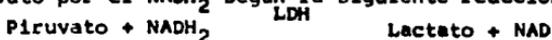
**VALORES NORMALES :**

De 4.5 a 26 Unidades /L.

**DETERMINACION DE LACTATO DESHIDROGENASA**  
**Lactato NAD oxidoreductasa.**

**FUNDAMENTO:**

La lactato deshidrogenasa cataliza la reducción de piruvato por el  $\text{NADH}_2$  según la siguiente reacción:



Para la valoración cuantitativa de la enzima se deja actuar el suero problema sobre piruvato y  $\text{NADH}_2$  y se mide fotométricamente la velocidad de la reacción. ( 7 )

**MATERIAL Y REACTIVOS :**

Espectrofotómetro

Cronómetro

Pipetas de 1,5 ml

Solución de sustrato amortiguador (piruvato sódico 0.6 Mmol amortiguador de fosfatos PH 7.5 - Mmol 50), disolvente  $\text{NADH}_2$  (liofilizado)

**METODO :**

- A) Añadase con pipeta al frasco de  $\text{NADH}_2$  liofilizado, 3 ml de sustrato amortiguador y 0.1ml de suero no hemolizado.
- B) Mezclar y pasarlo enseguida a la cubeta del fotómetro y medir la extinción a temperatura constante al cabo de un minuto, y simultáneamente, poner en marcha el cronómetro repetir-

la lectura de minuto en minuto, durante 3 minutos. a 365 nm.

#### APLICACIONES CLINICAS :

La distribución de la deshidrogenasa láctica por todos los tejidos del organismo y su falta de sensibilidad respecto al daño celular hepático, restringen la utilidad de la prueba como un indicador específico.

Un nivel de actividad de la deshidrogenasa láctica 5-10 veces mayor del valor normal, en presencia de valores normales ó ligeramente elevador de transaminasas, sugiere hemólisis intravascular (anemia perniciosa) ó complicación neoplásica del hígado.

### PRUEBAS COMPLEMENTARIAS

El hierro es un componente esencial de las moléculas de hemoglobina, mioglobinas, catalasa, citocromas y otras enzimas encargadas de la respiración celular.

Se encuentra también como hierro de reserva en órganos como hígado, bazo y huesos de donde se moviliza de acuerdo con las necesidades del organismo, hacia los sitios donde es utilizado circulando en el plasma; Adherido a una beta globulina llamada transferrina o siderofilina, de la cual normalmente solo una parte se satura de hierro. Como se dijo anteriormente el hierro es almacenado en parte, en el hígado el cual es liberado cuando existe un trastorno de las células de dicho órgano, de aquí la importancia de su determinación sérica en algunas hepatopatías.

Jirgl en el año de 1957 informó de magníficos resultados diagnósticos para la ictericia por la obstrucción al observar la floculación del suero al reaccionar con el reactivo de fenoles de folin ciocaltean El mecanismo por el cual se realiza la floculación no se conoce con exactitud.

Varios autores opinan que se debe al incremento de las mucoproteínas y glicoproteínas. Szymansky, encontró una posible correlación con la elevación de las betalipoproteínas. Se ha demostrado que la sustancia responsable de la floculación es originada por las células del epitelio biliar y que su elaboración requiere del funcionamiento normal del hepatocito, hecho que se ha concluido base a observaciones clínicas.

y experimentales; ya que la ligadura del coledoco produce inicialmente Jirgl positivo, pero al cabo de semanas se hace negativo en relación a aparición secundaria del daño hepatocelular.

Por lo tanto en su interpretación correcta debetomarse en cuenta el tiempo de evolución de la ictericia y el estado de la función hepática.

## DETERMINACION DE HIERRO SERICO

### FUNDAMENTO :

Después de liberar el hierro de las proteínas, éstas se les precipita, al filtrado se añade una solución de O-fenantrolina, la cual forma un complejo coloreado con el hierro, la intensidad del color desarrollado por la solución es directamente proporcional a la concentración del hierro. ( 15 ), ( 22 )

### MATERIAL Y REACTIVOS :

Colorímetro  
 Baño maría  
 Tubos de ensayo  
 Pipetas de 1, 5 ml  
 cronómetro  
 Centrífuga  
 Acido clorhídrico 1.2 % con agua  
 Acido clorhídrico 0.3 % con agua  
 Acido tricloroacético al 20% en agua  
 Solución saturada de acetato de sodio  
 Buffer de acetatos 2 M PH 4.5  
 O- fenantrolina mono hidratado al 0.1 % en agua  
 Agua destilada  
 Papel PH  
 Buffer de acetatos 2 M : 90 volúmenes de acetato de sodio 2 M y 110 volúmenes de ácido acético 2 M.

## METODO :

- A) Colocar 2 ml de suero ó plasma en un tubo de ensayo.
- B) Agregar 1 ml de ácido clorhídrico 1.2% mantener a 37°C durante 1 hora.
- C) Llevar a temperatura ambiente y agregar 1 ml de ácido tricloracético al 20 %. Mezclar y mantener 1 hora a temperatura ambiente.
- D) Tapar el tubo y centrifugar a 3000 R.P.M. por 15 minutos.
- E) En una celdilla del colorímetro poner 2 ml de la solución del sobrenadante, 0.5 ml de solución saturada de acetato de sodio, 0.5 ml del buffer del sulfato de hidroxina.
- F) 0.5 ml de la solución de 0-fenantrilina monohidratado.
- G) Preparar un blanco con un volumen de ácido clorhídrico al 1% con un volumen de agua destilada.
- H) Mantener el blanco y el desconocido a temperatura ambiente 1 hora.
- I) Agregar 2.5 ml de agua a cada tubo, mezclar -- y leer a 490 nm.

CALCULO :  $100 \times L / K = \text{mcg de hierro por } 100 \text{ ml}$   
 $K = 114.6$   
 $L = \text{Lectura de trasmittancia.}$

## APLICACIONES CLINICAS :

La concentración de hierro sérico en los enfermos con ictericia hepatocélular crónica con necrosis celular.

intensa e ictericia hepatocelular aguda los niveles -- de hierro están aumentados.

El aumento se debe a la liberación del hierro almacenado en las células hepáticas cuando sufren necrosis.

En enfermos con hemocromatosis se observa concentraciones particularmente elevadas de hierro sérico, - en cambio son normales en enfermos con obstrucción de las vías biliares extrahepáticas y en aquellos con colestasis intrahepática.

Para interpretar bien los datos se preciso tener en cuenta que existen otros padecimientos y estados -- capaces de modificar la concentración de hierro sérico así, se encuentran disminuida en las anemias por deficiencia de hierro y en mujeres embarazadas, en tanto -- suele elevarse su concentración en anemias hemolíticas en personas que han sufrido múltiples transfusiones y en algunos casos de destrucción muscular amplia de origen traumático.

**VALORES NORMALES :**

De 60 a 180 mcg / 100 ml

**PRUEBA DE JIRGL****FUNDAMENTO :**

La presencia de una sustancia de estructura mucoprotéica y/o glicoproteína (betaproteína y betaglobulina), probablemente originada por las células calciformes parietales de la mucosa glandular y del epitelio de revestimiento de las vías biliares, la evaporación de la sustancia parece estar ligada parcialmente a una célula hepática íntegra.

Los sueros con dicha sustancia flocculan con el reactivo de folin ciocaltean. ( 46 )

**MATERIAL Y REACTIVOS :**

Centrífuga  
Pantalla negra  
Tubos de ensayo  
Pipetas de 2,5,10 ml  
Cronómetro  
Papel filtro  
Embudos de vidrio  
Hidróxido de potasio 0.1 N  
Acido sulfosalicílico al 20%  
Acido fosfotungstic al 2%  
Carbonato de calcio al 10%  
Reactivo de fenoles de folin-ciocaltean  
Agua destilada.

**METODO :**

- A) Colocar en un tubo de ensayo 1.6 ml de suero y agregar 4 ml de hidróxido de sodio al 0.1 N -- mezclar, dejar reposar 45 minutos a temperatura ambiente.
- B) Añadir 4 ml de ácido sulfosalicílico al 20%, - agitar y dejar reposar durante 10 minutos.
- C) En un tubo de ensayo para centrifuga, colocar 5 ml del filtrado, 1 ml de ácido fosfotungstico al 2%, agitar y dejar reposar 10 minutos.
- D) Centrifugar a 1500 R.P.M. durante 15 minutos.- Decantar y disolver el precipitado en 6.5 ml de solución de carbonato de sodio al 10%.
- E) Agregar 0.5 ml del reactivo de fenoles diluido al tercio en agua destilada, agitar.
- F) Leer a las 12 horas poniendo el tubo delante - de una pantalla negra fuertemente iluminada.

**APLICACIONES CLINICAS :**

Hay floculación cuando la ictericia se debe a obstrucción biliar, en cambio no hay floculación en las ictericias de cualquier otro origen como en los enfermos con colestasis intrahepática de modo que la prueba no es útil para diferenciar a éstos enfermos de los -- que tienen obstrucción biliar extrahepática.

El mecanismo fisiológico de la prueba de Jirgi parece encontrarse en la elevación que experimentan las mucoproteínas del suero sanguíneo cuando ocurre obstrucción biliar y en su descenso cuando por lo contrario--

hay lesión hepatocélular e insuficiencia hepática.

La prueba es ligeramente superior a otras pruebas de floculación utilizadas con el mismo fin.

VALORES NORMALES :

Floculación : Negativa.

## FUNCIONAMIENTO PANCREATICO

## INTRODUCCION :

El diagnóstico de enfermedad pancreática continúa siendo problema complejo y desafiante. Los signos clínicos y síntomas pueden ser mínimos en presencia de -- inflamación ó enfermedad neoplásica; destrucción extensiva, calcificación y fibrosis de la glándula y pueden acompañarse de una incapacidad significativa del -- órgano.

Además la localización retroperitoneal del páncreas lo hace más inaccesible a los métodos de palpación en el diagnóstico físico, excepto en los casos de una gran-pancreatitis ó carcinoma del páncreas.

Finalmente la detección de anormalidades bioquímicas y metabólicas de ésta glándula es limitada porque dicho órgano tiene una gran reserva funcional y una -- rápida reparación del mismo.

En las células pancreáticas, las enzimas y proenzimas están encerradas en los llamados gránulos de zimogeno, que son estructuras con una pared bien limitada. Además, las células contienen un potente inhibidor que puede anular la actividad tripsica. Una vez que -- los gránulos de zimogeno son liberados de las células- alcanzando la luz de los conductos, la corriente los -

conduce hacia los canales más grandes y por último -- hacia el intestino delgado. Aquí entran en contacto-- con la enteroquinasa, que lisa los gránulos y activa las enzimas. Normalmente el tripsinógeno, experimenta una lenta transformación en tripsina; este proceso es acelerado por el sulfato de magnesio y el amonio.

La etiología de la pancreatitis es aún controvertida, no conociéndose con exactitud la razón de la repentina liberación de la enzima en las células pancreáticas. Se han señalado varios mecanismos probables para la liberación de tripsina, uno sería la repentina disminución de la concentración de los niveles del inhibidor de la tripsina de la glándula.

En 1954 Kalser y Grossman encontraron una disminución en la relación de los niveles del inhibidor -- y la tripsina cuando se inducía la pancreatitis con -- una sustancia llamada etionina.

Otra posibilidad sería la repentina alcalinización intracelular en la glándula, provocada por el reflujo del contenido del intestino delgado. Entre las viejas teorías se ubica la que considera la supersecreción del jugo pancreático por los efectos del alcohol que había recibido algunas evidencias experimentales-- pero que fué discutida por muchos investigadores. Esta teoría está relacionada con la obstrucción y perfusión que sugiere que la presión de los conductos se eleva,-- deprimiéndose la función celular y permitiendo el escape de enzimas hacia los espacios paricelulares.

Otra teoría es la que postula la existencia de -- un canal común temporario entre los conductos biliares

y pancreáticos, por lo que puede deducirse que la bilis actúe como activadora del tripsinógeno. Se han efectuado algunos trabajos en los cuales se anastomosa el conducto biliar común y el conducto pancreático en animales y se encontró que después de largos períodos, una considerable cantidad de bilis en los canales pancreáticos grandes y pequeños, no obstante pese a la presencia de bilis intrapancreática, no hubo evidencias de inflamación

Tal vez la teoría más admitida sea la que indica como factor casual la obstrucción de los conductos por litiasis biliar, cálculos pancreáticos, espasmo del esfínter ó del conducto de proliferación epitelial, edema ó parásitos. La acción conjunta de la obstrucción de la mayor intensidad de los estímulos de la secreción y del aumento de la presión intraductal, llega a producir la ruptura de los acinos y conductos, y la salida de las enzimas digestivas al tejido intestinal, donde provocan, al ser activadas, procesos necróticos.

En el diagnóstico por el laboratorio de anomalías de la función exocrina de ésta glándula, las determinaciones de las concentraciones de enzimas pancreáticas en la sangre y orina son las más comunes usadas en diagnóstico de enfermedades pancreáticas, sobre otros procedimientos menos específicos como son : La determinación PH, bicarbonato y niveles de enzimas del jugo duodenal antes y después de la administración de segretina y pancreocimina, ó varios factores necesarios para la coagulación de la sangre.

El jugo pancreático del hombre es un líquido claro constituido principalmente de agua, electrolitos y una cierta cantidad de enzimas digestivas. Las enzimas pancreáticas fueron clasificados anteriormente como amilasa, lipasa y tripsina, actualmente enzimas proteolíticas. La relación de éstas enzimas con obstrucción y destrucción del páncreas se ve reflejado en la elevación de las mismas en la sangre.

El diagnóstico plantea la diferenciación con el abdomen agudo que exige la intervención quirúrgica. En el diagnóstico diferencial son útiles los valores de amilasa sérica y urinaria, lipasa, leucinaminopeptidasa y la 5'nucleotidasa.

## DETERMINACION DE AMILASA SERICA Y URINARIA

## INTRODUCCION :

El trabajo clásico de Elman en 1929 introdujo la determinación de amilasa sérica en el diagnóstico de pancreatitis aguda. Los resultados de Wohlgeuth, Somogyi y otros pudieron ayudar a simplificar y extender su uso. Ahora la elevación de la misma en la orina es considerada por la mayoría de los investigadores y médicos de extremo valor en el diagnóstico de pancreatitis aguda.

Normalmente una pequeña cantidad de amilasa pasa a las células acinares del páncreas a través del espacio intersticial al torrente sanguíneo, representando el grado de secreción endocrina de una sustancia exocrina. Existen cantidades pequeñas de amilasa en las glándulas salivales, la cuál es elaborada y secretada al tracto gastrointestinal y también una pequeña cantidad de la enzima se encuentra en el hígado.

El camino directo para el paso de la enzima a partir del páncreas al torrente sanguíneo, pudo demostrarse por los trabajos experimentales de Popper y Necheles, quienes demostraron que con un trauma directo al órgano, el contenido de amilasa en las venas pancreáticas se incrementaba pasando dichas concentraciones al torrente sanguíneo general. Dichas elevaciones de las concentra-

ciones de amilasa ocurren durante las primeras 72 hrs. de un ataque de pancreatitis aguda, sin embargo, después de una destrucción celular aguda del páncreas dichos niveles son bajos. Por lo tanto una determinación "normal" de los niveles de amilasa sanguínea no excluyen el diagnóstico de enfermedad pancreática.

Entre las enzimas pancreáticas excretadas en la orina solamente la amilasa puede ser usada extensivamente como una prueba diagnóstica de pancreatitis. La elevación de amilasa en la orina, es un indicador muy útil en enfermedades pancreáticas y en algunos casos más -- útil que la elevación de amilasa sanguínea, pues dicha elevación de amilasa urinaria puede persistir durante 7 ó 10 días después de un ataque pancreático.

#### FUNDAMENTO :

La prueba se basa en la reacción de una solución estable de almidón como sustrato con yodo para formar un compuesto color azul que es medido colorimétricamente. La actividad de la enzima sobre el almidón disminuye la intensidad del color azul. ( 45 ), ( 57 )

#### MATERIAL Y REACTIVOS :

Colorímetro ó espectrofotómetro  
 Balanza analítica  
 Probetas de 500 ml  
 Mechero  
 Vaso de precipitados de 500 ml  
 Matraz volumétrico de 50 ml  
 Pipetas de 5, 10 ml  
 Matraz aforado de 1000 ml

Baño maría  
 Cronómetro  
 0.2 ml de suero  
 0.2 ml de orina  
 Solución de sustrato de almidón  
 Solución de yodo 0.1 N.  
 Agua destilada.

**PREPARACION DE REACTIVOS :**

**Sustrato de almidón :** En 250 ml de agua disolver-  
 13.3 gr de fosfato disódico anhidro y 4.3 gr de ácido-  
 benzoico. Calentar a ebullición y por separado, mezclar  
 0.200 gr de almidón en 5 ml de agua fría y agregar a la  
 solución caliente, enjuagando el vaso de la solución de  
 almidón con agua fría. Hervir nuevamente por un minuto-  
 dejar enfriar y completar a 500 ml con agua destilada.  
 Esta solución es estable a temperatura ambiente y debe  
 permanecer clara como el agua.

**Solución de yodo 0.1 N :** Disolver 3.567 gr de yodato  
 de potasio y 45 gr de yoduro de potasio en 800 ml  
 de agua destilada, agregar lentamente y agitando 9 ml-  
 de ácido clorhídrico concentrado y diluir hasta 1 litro  
 con agua destilada.

**Solución de yodo 0.01 N :** Disolver 25 gr de yodu-  
 ro de potasio en 350 ml de agua destilada en un matraz  
 volumétrico de 500 ml agregar 50 ml de la solución de  
 yodo 0.1 N. y diluir a la marca con agua destilada, --  
 mantener en refrigeración, ésta solución es estable por  
 1 ó 2 meses.

## METODO :

- A) En 2 matraces volumétricos de 50 ml marcados - como "B" y "P" colocar 5 ml de sustrato de almidón y dejarlos en baño maría a 37° C durante 5 minutos.
- B) Pipetear 0.1 ml de suero u orina en el matraz- "P" mezclar y mantener durante 7 minutos 30 segundos exactamente en baño maría.
- C) Inmediatamente agregar 5 ml de solución de yodo 0.01 N a los 2 matraces y aforar con agua destilada, mezclar y leer a 660 nm en infrarojo, contra blanco de agua.

## CALCULO :

$$\frac{\text{Abs de "B"} - \text{Abs. de "P"}}{\text{Abs de "B"}} \times 800 = \text{Unid de amilasa por 100 ml}$$

## APLICACIONES CLINICAS :

Los valores altos por arriba de 400 unidades son característicos de pancreatitis aguda. La determinación más completa de amilasa es su relación de suero y orina altas.

También se observan elevaciones de la amilasa en una variedad de enfermedades intraabdominales y extraabdominales haciendo una interpretación difícil, algunas de estas son : Úlcera péptica perforada, penetración de la porción posterior duodenal ulcerada en el páncreas en coledocolitiasis, isquemia biliar, uremia, oclusión de los conductos salivales, obstrucción intestinal, - neumonía, hepatitis infecciosa y la administración de algunas drogas estimulantes del parasimpático.

## VALORES NORMALES :

60 a 160 unidades por 100 ml

## DETERMINACION DE LIPASA SERICA

## INTRODUCCION :

Las elevaciones de lipasa sérica tienen un paralelismo con las de amilasa sérica en el desarrollo de la pancreatitis aguda y persisten por más tiempo.

La determinación de lipasa se roma casi siempre - como una prueba complementaria a la determinación de - amilasa debido a que a su determinación nunca se le ha dado mucho interés por diferentes razones, que entre - las más importantes son : La complejidad de su determi- nación química, el excesivo tiempo que requiere su de- terminación, su inespecificidad para distinguir entre- actividad lipolítica de una esterasa a la lipasa pan- creática en el desarrollo del método.

Las elevaciones de lipasa sérica son siempre más- tardías aunado a su persistencia en niveles altos por- más tiempo en una pancreatitis, le dan gran utilidad - en el diagnóstico de dicha enfermedad.

En 1943 Goldstein y Roe propusieron un método para la determinación de lipasa en suero y tejidos, en la cual utilizaban como sustrato el tributirín y requería una hora de hidrólisis del sustrato, sin embargo las elevaciones de niveles de lipasa sérica no fueron elevaciones de niveles de lipasa sérica, no fueron elevaciones constantes en pacientes con pancreatitis aguda.

Debido a la importancia de conocer los niveles de lipasa en sangre, en enfermedades del páncreas y otras enfermedades asociadas a ésta. Roe disminuyó el tiempo de hidrólisis del sustrato a una hora solamente.

#### FUNDAMENTO :

Se basa en la hidrólisis del aceite de oliva, empleado como sustrato, que es producida por la lipasa sérica durante un período de incubación de una hora y seguida de la titulación de ácidos grasos liberados -- con una solución de hidróxido de sodio 0.01 N utilizando fenolftalína como indicador. ( 8 ), ( 33 )

#### MATERIAL Y REACTIVOS :

Balanza analítica  
 Agitador magnético  
 Matraces vol 150, 200, 500 ml  
 Mezcla de sustrato-Buffer  
 Solución alcalina standart 0.01 N de hidróxido de sodio  
 Solución de fenolftaleína al 4 %  
 Agua destilada  
 Pipetas de 5 ml  
 Tubos de ensayo  
 Baño maría  
 Alcohol etílico 95 %

Preparación de reactivos : Mezcla sustrato-Buffer disolver 1.21 gr. de hidroxidometilaminometano (tris)-con 1 gr. de benzoato de sodio en 500 ml de agua destilada, poner ésta solución en un agitador magnético y -agregar 10 gr de acasia y 50 ml de aceite de oliva, homogenizar por 10 minutos, reposar 4 horas, ajustando -el PH a 8.5 por la adición de HCl 1 N. Esta solución -se conserva en refrigeración.

Solución standart de alcali : preparas una solución 0.01 N de hidróxido de sodio.

Solución de fenoftaleína al 4 % : Preparas la solución disolviendo 1 gr. de fenolftaleína en 25 ml de alcohol etílico al 95 %.

#### METODO :

- A) En un matraz de 150 ml pipetear 1 ml de suero y guardar en refrigeración.
- B) Pipetear 10 ml de sustrato-Buffer en 2 tubos-de ensayo rotulados "B" y "P" y llevarlos a -baño maría por 5 minutos.
- C) Agregar al tubo "P" 1 ml de suero, mezclar y-mantener a 37° C por 1 hora.
- D) Extraer el tubo del baño, vertir su contenido en un matraz de 150 ml con 30 ml de alcohol -etílico al 95 %.
- E) Agregar al matraz que se guardo en refrigera-ción 30 ml de alcohol etílico al 95 %. Después de haber agregado 10 ml de la mezcla de sustra-to Buffer. Enjuagar los tubos varias veces con la mezcla de sustrato buffer y volver al matraz.

- F) Agregar a cada matraz 3 gotas de fenolftaleina al 4 %, mezclar y titular con hidróxido de sodio empleando agitador mecánico.

#### CALCULOS :

Valor de titulación de "P" - Valor de titulación de "B" por 10 = Unidades de actividad de lipasa = Microgramos de ácidos grasos liberados del sutrato por lipasa en 1 ml de suero durante 1 hora.

#### APLICACIONES CLINICAS :

Los niveles altos de lipasa sérica en pancreatitis aguda persisten por más tiempo que los de amilasa.

Niveles altos de lipasa se han observado también en pacientes con carcinoma de páncreas, en la cual la amilasa sérica puede ser normal. Niveles altos han sido observados en ictericia obstructiva por presencia de cálculos, tumores, cirrosis de hígado, hepatitis viral, obstrucción intestinal y peritonitis. Cambios no significativos fueron reportados después de la administración de drogas estimulantes del parasimpático. La determinación de lipasa junto con la amilasa es útil en pacientes con paperas ó enfermedad del tiroides, puesto que el incremento de amilasa sanguínea puede deberse a una inflamación de las glándulas salivales y el páncreas.

#### VALORES NORMALES :

2-12 unidades por 1 ml de suero.

## DETERMINACION DE 5'NUCLEOTIDASA SERICA

## FUNDAMENTO :

La 5'nucleotidasa sérica es una enzima de actividad fosfatásica, que tiene un PH óptimo de acción a -- 7.8 la actividad fosfatásica alcalina no específica a PH 9 es alta si se utilizan sustratos de fenil fosfato, adenosina fosfato y beta glicerofosfato en orden decreciente. A PH 7.5, sin embargo, la actividad es también baja con los sustratos de fenilfosfato y de beta glicero-- fosfato, mientras que existe mayor actividad con - el sustrato de adenosina de fosfato, por lo que se infiere que se debe a la 5' nucleotidasa específica.

La actividad de ésta enzima se mide, pues, sustrayendo la actividad no específica sobre el beta glicero a PH 7.5 de la actividad total sobre la adenosina - fosfato al mismo valor de PH. 9(21 ), ( 45 )

## MATERIAL Y REACTIVOS :

Espectrofotómetro

Centrífuga

Reloj

Pipetas de 1, 5 ml

Baño maría

Ac. tricloroacético al 30%

Sustrato buffer de beta glicerofosfato PH 9.3

Sustrato Buffer de adenosina 5 fosfato PH 7.5

Reactivo reductor

Reactivo molibdicó

Sol. standart de fosfato.

**Sustrato de buffer de beta glicerofosfato PH 9.3:**  
 Se prepara pesando 0.05 g. de beta glicerofosfato de sodio y 0.424 g de veronal sódico, disolviendolo en agua, ajustando a PH 9.3 y llevando a 100 ml conservar en refrigeración, para ajustar el mismo sustrato a PH-7.5 agregar más ó menos 1.2 ml de ácido clorhídrico 1N sustrato buffer de adenosina 5 fosfato a PH 7.5 : Se disuelve 0.087 g de adenodina 5 fosfato y 0.425g de veronal sódico en agua, se ajusta el PH con el agregado de 1.2 ml de ácido clorhídrico llevar a 100 ml y conservar en refrigeración

**Reactivo reductor :** Se disuelven 0.5 g de ácido 1-2-4-aminonaftol sulfónico en 195 ml de bisulfito de sodio al 15 % y se le agregan 5 ml de sulfito de sodio al -- 20 %. Conservar en refrigeración renovar cada 4 semanas.

**Reactivo molibdico :** Disolver 25 g de molibdato--de amonio en 200 ml de agua destilada. En un frasco de 1 litro se colocan 300 ml de ácido sulfúrico 10 N se agrega la solución de molibdato y se diluye a 1000 ml con agua destilada.

**Solución standart de fosfato :** pesar 0.02195 g. - de fosfato monopotásico y 50 g de ácido tricloroacético y disolver en agua completando a 1 litro. Esta solución contiene 0.02 mg de fósforo en 4 ml.

#### **METODO :**

- A) Se mezclan 4.5 ml de cada sustrato con 0.5 ml de suero y se incuba a 37° C durante 2 horas y media.
- B) Se agrega 1 ml de ácido tricloroacético al 30%. Se deja reposar unos minutos y se centrifuga. - se usan tubos de control sin incubación.

- C) Se toman 4 ml del sobrenadante y se agrega 0.5 ml de reactivo molibdico, 0.2 ml de reactivo - reductor y 0.3 ml de agua destilada.
- D) Se produce en la misma forma con 4 ml de solución standart esperar 15 minutos y leer a 660nm.

**CALCULO :**

Buffer de adenosina fosfato PH 7.5 (A)

Buffer sustrato beta glicerofosfato PH 9.3 (G9.3)

Buffer sustrato beta glicerofosfato PH 7.5 (G7.5)

Actividad fosfatásica alcalina

Lectura de (G9.3) ( Prueba menos control )

---

 X 6 = U.B.

Lectura standart.

Actividad de 5' nucleotidasa sérica

Lectura de A                    ←←                    Lectura (G 7.5)

(Prueba menos control)                    (Prueba menos control)

---

 X 6

Lectura del standart

La actividad se expresa en unidades bodansky.

**APLICACIONES CLINICAS :**

Se han encontrado elevaciones en la actividad de la 5' nucleotidasa en pancreatitis aguda, en pancreatitis edematosa aguda hay elevación moderada de su actividad, manteniendose valores normales en pancreatitis crónica y valores moderadamente altos en carcinoma del páncreas, igualmente cuando hay obstrucción ó metástasis del mismo.

**VALORES NORMALES :**

De 0.54 a 1.06 U.B. por 100 ml de suero.

La unidad de 5' nucleotidasa se define como los mg de fósforo.

Liberadod en 60 minutos por 100 ml de suero.

### DETERMINACION DE LEUCIL-AMINO-PEPTIDASA

#### FUNDAMENTO :

Es una enzima proteolítica que in vitro cataliza la siguiente reacción :



La cantidad de beta-naftilamina, producida es proporcional a la cantidad de LAP presente, se diazota con ácido nitroso y luego reacciona con N-(1-naftil)-etilendiamina para formar un complejo coloreado. ( 1 ), ( 32 )

#### MATERIAL Y REACTIVOS :

Espectrofotómetro  
 Baño maría  
 Centrífuga  
 Pipetas 1,5,10 ml  
 Buffer fosfato 0.2 M PH 7.0  
 L-Leucil-beta-naftilamina 0.0.12 M  
 Sol. buffer de sustrato 0.01 M. PH 7.0  
 Acido tricloroacético al 40%.  
 Sulfato de amonio 0.5%  
 Nitrito de sodio 0.1 %  
 Clorhidrato de N-naftiletildiamina 0.05 %  
 Agua destilada.

## PREPARACION DE REACTIVOS :

Buffer fosfato 0.2 M PH 7.0 : Disolver 28.4 g de fosfato disódico anhidro en agua destilada y completar a 1000 ml.

Disolver 27.2 g de fosfato monopotásico anhidro en agua destilada y completar a 1000 ml. Mezclar 7 partes de la primera solución y 3 partes de la segunda, controlar el PH.

L-Leucil-beta-naftilamina 0.0012 M PH 7.1 : Disolver 400 mg en agua destilada, calentar suavemente y diluir a 1000 ml.

Solución buffer de sustrato 0.1 M. PH 7.0 : Mezclar -- partes iguales de reactivos de fosfatos y L-Leucil-beta-naftilamina, prepararlos cada mes.

Clorhidrato de N-(1-naftil)-etilendiamina 0.05% : disolver 50 mg en alcohol etílico de 95 % y completar a 100 ml con alcohol. Esta solución es estable por 30 días.

## METODO :

- A) Diluir el suero 1:50 ( 2 % ). Marcar 3 tubos como sigue "BR" blanco de reactivo, "P" problema, "B" blanco.
- B) Agregar 1 ml de agua destilada a "BR", 1 ml de suero diluido a "P" y "B", 1 ml de sustrato -- buffer a "BR" y "P", 1 ml de buffer fosfato a "B"
- C) Mezclar e incubar a 37 °C durante 2 horas.
- D) Agregar a los 3 tubos 1 ml de ácido tricloroácido, centrifugar y transferir 1 ml de sobrenadante a otros tubos rotulados como los anteriores.

- E) Agregar 1 ml de nitrito de sodio a los 3 tubos, mezclar y esperar 3 minutos.
- F) Agregar 1 ml de sulfamato de amonio a todos los tubos, mezclar y esperar 2 minutos.
- G) Agregar 2 ml de clorhidrato de N-(1-naftil)-etilendiamina mezclar y esperar 10 minutos, leer a 560 nm contra blanco de agua.

Restar la 0.0 de tubos "BR" y "B" de "P", convertir la D.O. corregida a microgramos de beta-naftilamida de la curva de calibración.

Las unidades se calculan : Microgramos de beta-naftilamina X 3 = Unidades. Donde el factor 3 corrige que 1 ml de alícuota fué diluido a 3 ml.

Las unidades de LAP séricas se definen como los - microgramos de beta-naftilamina liberadas por 1 ml de suero al 2 % luego de 2 horas de incubación.

Curva de calibración : Para preparar la solución-madre standart. Se disuelve 22.6 mg de clorhidrato de beta-naftilamina en agua destilada y diluir a 500 ml,-- ésto equivale a 0.036 mg por ml de base libre. Se procede de acuerdo al siguiente esquema :

| Tubo | Sol madre standart<br>ml | Agua dest.<br>ml | Soltrabajo<br>(mgr/ml) | Beta-naftil<br>amina (microg) |
|------|--------------------------|------------------|------------------------|-------------------------------|
| 1    | 6.0                      | 0.0              | 36                     | 12                            |
| 2    | 5.0                      | 1.0              | 30                     | 10                            |
| 3    | 4.0                      | 2.0              | 24                     | 8                             |
| 4    | 3.0                      | 3.0              | 18                     | 6                             |
| 5    | 2.0                      | 4.0              | 12                     | 4                             |
| 6    | 1.0                      | 5.0              | 6                      | 2                             |
| 7    | 0.5                      | 5.5              | 3                      | 1                             |
| 8    | 0.0                      | 6.0              | 0                      | 0                             |

Mezclar todos los tubos con la solución standar de trabajo y pipetear 1 ml de cada uno a cada serie de tubos. Agregar 1 ml de buffer fosfato y 1 ml de ácido tricloroacético a todos los tubos. Mezclar, transferir una alícuota de 1 ml a tubos de lectura y proceder como para-LAP sérica, leer todos los tubos contra blanco de reactivos (tubo 8)

#### APLICACIONES CLINICAS :

Se han reportado elevaciones de actividad de L-leucilaminopeptidasa en pacientes con cáncer de páncreas - también se ha reportado elevaciones de actividad en pacientes con enfermedades como : Linfomas, Leucemias, - Mielomas. Suele haber gran elevación de actividad ó moderada elevación en pacientes con coledocolitiásis, piritonitis, hepatitis tóxica, cirrosis y hepatomas entre otros.

#### VALORES NORMALES :

Adultos : 5-20 Unidades

Niños : 5-24 Unidades

## FUNCIONAMIENTO CARDIACO

## INTRODUCCION :

Junto con el cuadro clínico y el electrocardiograma, el laboratorio constituye la triología fundamental para el diagnóstico de enfermedad cardíaca.

La mayoría de exámenes de laboratorio investigados hasta ahora para ayudar al diagnóstico de infarto miocárdico, han resultado ser inespecíficos; pero algunos, de todos modos, son de gran utilidad.

- A) Se encuentran leucocitosis desde las dos horas del infarto, en cifras variables de 10,000 a 20,000 con neutrofilos polisegmentados del 75- al 90 % ; descienden en pocos días y desaparecen al cabo de la semana.
- B) La velocidad de sedimentación globular casi -- siempre se acelera, quizá por el aumento de fibrinógeno del plasma, llegando a su máximo entre los cuatro y cinco días, y puede quedar alto - durante semanas, por lo que no puede tomarse - como índice de recuperación.
- C) Aparece proteína "C" reactiva, que es una globulina sérica que se forma como respuesta en-- caso de infecciones, tejido lesionado, neoplasma etc.

- D) Un grupo de enzimas ya numerosas ha sido estudiado, y son de gran utilidad, ya que reflejan pérdida del contenido sarcoplasmático de las células lesionadas y su paso a la sangre.

El diagnóstico y evolución del infarto del miocardio puede lograrse midiendo la actividad de las siguientes enzimas: La transaminasa glutámica oxalacética -- (TGO), creatinincinasa isoenzima y deshidrogenasa alfa hidroxibutírica (HBDH). Pueden ser también útiles la adolasa, la deshidrogenasa málica y otras más.

Dichas enzimas pueden dividirse según su tiempo de aparición en sangre en dos grupos:

- 1) Un grupo de aparición precoz a las seis a ocho horas y de breve duración menor de tres días; están entre éstas la transaminasa glutámico -- oxalacética y la creatinincinasa.

La creatinincinasa es de gran interés y juega un papel muy importante en la clínica, especialmente para confirmar el diagnóstico del infarto al miocardio, pero debido a que no solo aparece en músculos cardíaco, sino también se encuentra en cantidades elevadas en músculo esquelético y cerebro, la interpretación de un aumento es difícil de interpretar, por lo que se debe de determinar la isoenzima Ck-MB que es específica del miocardio. La actividad de la creatinincinasa fracción MB puede medirse entre las ocho y veinticuatro horas siguientes al infarto, determinándose hasta después de sesenta horas. La TGO alcanza su máximo ascenso en 24 hrs. y la CK en ocho hrs.

- 2) Un segundo grupo, de iniciación un poco tardía, después de 24 hrs. con duración prolongada y desaparición lenta, hasta de 10 a 14 días, en-

éstas su grado máximo de concentración en sangre se -- alcanza al tercer ó cuarto día; Pertenecen a este grupo las deshidrogenasas, tanto la láctica como la alfa-hidro genasas, tanto la láctica como la alfa-hidrogenasas.

Bien seleccionadas éstas enzimas, señalan el infar to en la mayoría de los casos, o sea que tienen gran -- especificidad. Utilizadas aisladamente, en un tiempo a- decuado, tienen ascensos entre el 95 y 98 % de los casos.

La transaminasa glutámica oxalacética es realmente muy útil para el diagnóstico, ya que asciende en el 98% de los casos agudos de infarto durante los tres primeros días, sin embargo no es específica.

La deshidrogenasa láctica es una enzima situada -- entre el ciclo celular aeróbico y anaeróbico, ya que -- cataliza la conversión entre el ácido láctico y el áci- do pirúvico. Se encuentra en múltiples tejidos, y desde este punto de vista es la más inespecífica.

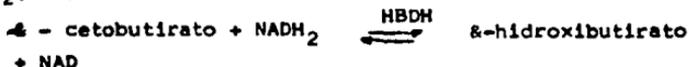
Por electroforesis se ha podido separar en cinco- isoenzimas al igual que la Ck, según su velocidad de - migración. En este nuevo campo de análisis de las enzi mas el cual es muy prometedor, ya que el método las se para o subdivide, en sus distintos componentes mediante cromatografía en papel, y dicha separación hace posi-- ble individualizar más certeramente el sitio dañado -- con exclusión del no dañado.

Por ejemplo, se ha encontrado que las anomalías de la LDH en su porción alfa (se separan en albúmi na y globulinas y éstas en alfa 1 y alfa 2 y gamma, -- beta 1 y beta 2) corresponden a lesiones del corazón, - corteza renal y glóbulos rojos, en cambio, las anomalías de la LDH en la porción beta gamma correspon-- den a daño en piel, músculo e hígado.

DETERMINACION DE  $\alpha$ -HIDROXIBUTIRATO - DESHIDROGENASA  
( HBDH )

FUNDAMENTO :

Las deshidrogenasas características del miocardio catalizan la reducción de ácido  $\alpha$ -cetobutírico por  $\text{NADH}_2$ , según la ecuación siguiente :



Para la valoración cuantitativa de la enzima, se deja actuar el suero problema sobre  $\alpha$ -cetobutirato y  $\text{NADH}_2$ , y se mide fotométricamente la velocidad de la reacción. ( 52 )

MATERIAL Y REACTIVOS :

Espectrofotómetro  
Cronómetro  
Baño maría  
Pipetas de 5, 1 ml  
Solución amortiguadora de sustrato ( $\alpha$ -cetobutirato 3 Mmol/L amortiguador de fosfatos 50 Mmol/L a PH - 7.5)  $\text{NADH}_2$

METODO :

- A) Preincubar los reactivos y cubetas de reacción a  $25^\circ\text{C}$ .
- B) Añadir al frasco con  $\text{NADH}_2$ , 3 ml de solución - amortiguadora de sustrato y 0.10 ml de suero -

reciente no hemolizado.

C) Mezclar y verter inmediatamente en la cubeta - de reacción.

D) Medir la extinción (absorvancia) al cabo de 1- minuto y, simultáneamente poner en marcha el - cronómetro. Repetir la lectura, de minuto en - minuto, durante 3 minutos. Longitud de onda -- 365 nm.

Cálculo de actividad enzimática : AE/min X 9118 U/L a 365 nm.

#### APLICACIONES CLINICAS :

La deshidrogenasa alfa-hidroxi-bútrica es una enzima utilizada casi completamente en el diagnóstico de - infarto del miocardio al igual que la creatinasa, - tiene una alta sensibilidad para el diagnóstico de hepa- topatías, suele tener elevaciones moderadas en trauma- tismo musculares y algunos otros trastornos.

#### VALORES NORMALES :

HBDH : 55-140 U/L

HBDH/LDH : 0.63-0.81

#### VALORES PATOLOGICOS:

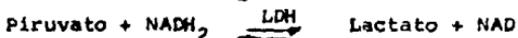
HBDH/LDH mayor de 0.9 en lesiones miocárdicas

HBDH/LDH menor de 0.6 en lesiones hepáticas.

DETERMINACION DE LACTATO-DESHIDROGENASA  
( LDH )

FUNDAMENTO :

La lactato-deshidrogenasa cataliza la reducción de piruvato por el  $\text{NADH}_2$ , según la siguiente ecuación :



Para valoración de la enzima, se deja actuar el suero problema sobre piruvato y  $\text{NADH}_2$ , y se mide fotométricamente la velocidad de la reacción. ( 6 )

MATERIAL Y REACTIVOS :

Espectrofotómetro

Cronómetro

Baño maría

Pipetas de 3, 1 ml

Solución amortiguadora de sustrato ( Piruvato sódico 0.6 Mmol/L amortiguador de fosfatos 50 Mmol/L a PH 7.5)

$\text{NADH}_2$  (liofilizado)

METODO :

A) Se añade al frasco de  $\text{NADH}_2$ , 3 ml de sustrato-amortiguador y 0.1 ml de suero (reciente no -- hemolizado).

- B) Mezclar y vertir inmediatamente en la cubeta, -  
medir la extinción al cabo de 1 minuto y simultáneamente poner en marcha el cronómetro.
- C) Repetir la lectura, de minuto en minuto, durante 3 min. a una longitud de onda de 365 nm.

#### APLICACIONES CLINICAS :

Esta valoración junto con una determinación de -- las isoenzimas de LDH características del miocardio, o sea, la llamada  $\alpha$ -hidroxibutirato deshidrogenasa, es de gran valor para el diagnóstico diferencial, pues, por comparación de ambos resultados, pueden distinguirse - las alteraciones cardíacas de las hepáticas.

Cálculo : Actividad enzimática = E/min. X 9118 U/L

#### VALORES NORMALES :

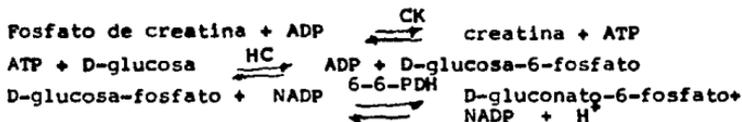
80 - 240 U/L : HBDH/LDH 0.63 - 0.81

En lesiones miocárdicas HBDH/LDH mayor de 0.9

En lesiones hepáticas HBDH/LDH menor de 0.6

DETERMINACION DE CREATINININCINASA  
(ATP creatina-N-fosfotranferasa)

FUNDAMENTO :



La velocidad del aumento de NADPH se mide fotométricamente.

Sus valores directamente proporcionales a la actividad de CK en el suero ó plasma. ( 41 )

MATERIAL Y REACTIVOS :

Espectrofotómetro

Pipetas de 1,5 ml

Cronómetro

Solución amortiguadora : Imidazol-acetato PH 6.7

Enzima/Coenzima/Sustrato : fosfato de creatina - 30 Mmol/L

Glucosa 20 Mmol/L, N-aceticisteina 20 Mmol/L, -- acetato de mg 10 Mmol, EDTA 2 Mmol/L, ADP 2 Mmol/L, NADP 2 Mmol/L, AMP 5 Mmol/L, adenisin-5-pentofosfato 5'-adenosina, 10 Mmol/L, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa menor de 1.5 KU/L, Hexicinaasa menor de 2.5 KU/L.

**METODO :**

- A) Agregar 2.5 ml de la solución del amortigua--  
dor al frasco que contiene la mezcla enzima/-  
coenzima/sustrato y disolver.
- B) Agregar a la disolución 0.10 ml de suero ó --  
plasma, mezclar e incubar durante 3 minutos a  
25° C.
- C) Medir el aumento de absorvencia cada minuto duran  
te 3,4,5 minutos.

CALCULO : Actividad enzimática a 365 nm = AE/min X7429 U/L

**APLICACIONES CLINICAS :**

La concentración de CPK en el músculo esquelético y en el miocardio es muy elevada, y se encuentra en el cerebro cantidades apreciables, mientras que en otros-  
órganos solo hay pequeñas cantidades y en el hígado --  
nada. Aunque la CPK se encuentra casi exclusivamente -  
en el miocardio, músculo esquelético, los trabajos más  
recientes indican que pueden darse valores elevador --  
séricos de CPK en el infarto pulmonar y además pulmonar.  
En el momento actual, debe ser considerado como útil,-  
pero no específico, en el diagnóstico de las enfermeda  
des del miocardio y musculares.

**VALORES NORMALES:**

Mujeres de 10-70 U/L    Hombres de 10-80 U/L a 25°C.

**DETERMINACION DE CREATININCINASA FRACCION "MB"****FUNDAMENTO :**

Los reactivos para la determinación de creatinincinasa contienen además anticuerpos inhibidores de CK-M éstos inhiben totalmente la actividad de la subunidad-CK-M sin actuar sobre la actividad de la subunidad CK-B por ello en la muestra se determina únicamente la actividad de la subunidad CK-B. ( 40 )

**MATERIAL Y REACTIVOS :**

Espectrofotómetro

Pipetas de 5 ml

Baño maría

Solución amortiguadores : 100 Mmol/L de amortiguador de imidazol acetato, PH 7.6

Solución Enzima/Coenzima/Anticuerpo : 1.5 KU/L de glucosa.

6-fosfato-deshidrogenasa.

2.5 KU/L hexocinasa ; 1000 U/L de anticuerpos (cabra)

**Cronómetro:**

0.2 ml de suero

**METODO :**

- A) Mezclar el contenido de frasco de solución amortiguadora con 2.5 ml de la solución Enzima/Coenzima/Anticuerpo se mantiene estable, ésta mezcla durante 7 días a una temperatura entre 2-8 grados centígrados y durante 12 horas a temperatura ambiente.
- B) Preincubar la solución a 25°C y agregar 0.10 ml de suero.
- C) Mezclar e incubar durante 10 minutos a 25°C - y medir cada minuto el aumento de extinción - durante 10 minutos a una longitud de onda de 365 nm.

**Cálculo :** Actividad enzimática de la subunidad CK-Bs- cambio de extinción por minuto por 7429. Se calcula la actividad de CK-MB en la muestra multiplicando por 2 el valor de la actividad de la subunidad CK-B.

**INTERPRETACION CLINICA :**

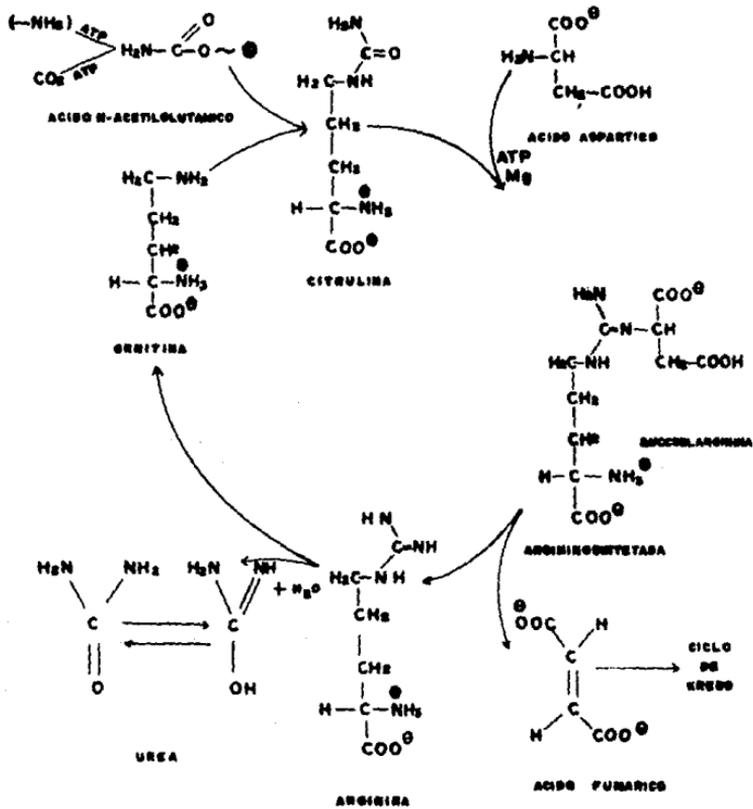
Valores más altos de los niveles normales dan una alta probabilidad de lesión del miocardio.

En el infarto del miocardio después de 48 a 60 -- horas de evolución, puede observarse un porcentaje de CK-MB inferior al 6 %.

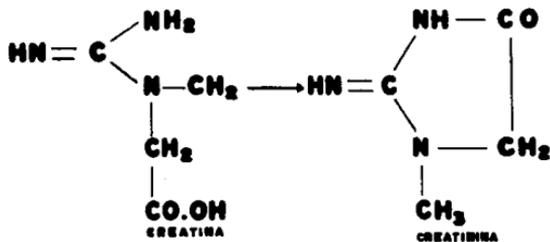
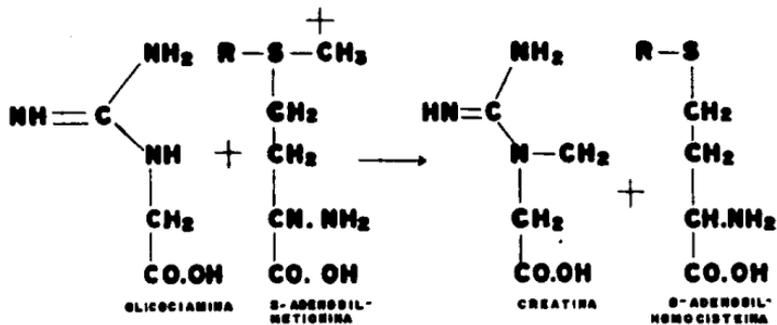
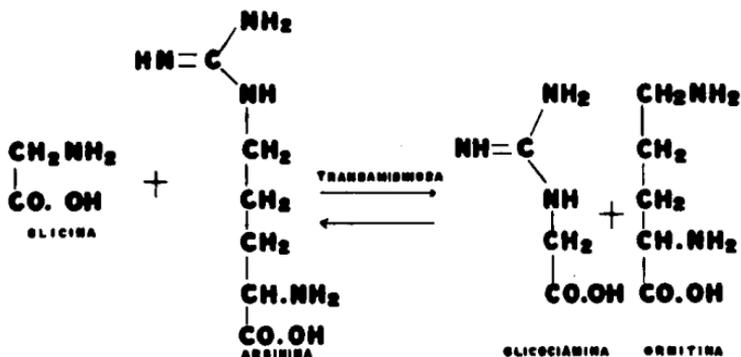
**VALORES NORMALES :**

Valores inferiores de actividad CK-MB de 10 U/L.





### BIOSINTESIS DE UREA



### BIOSINTESIS DE CREATININA

## BIBLIOGRAFIA

- 1.- Alexander Rutenberg, Julius A. Golber, E. Pineda ; 1958 ; Leucina Amino Peptidase Activity ; The New England Journal of Medicine ; Vol. 259 ; Pag. 469-472.
- 2.- Alfonso Barcell Gorina ; 1978 ; Pruebas Funcionales Hepáticas ; La clínica y el laboratorio ; Undecima Edicc. Edit. Marin S.A. ; Pag. 294-302.
- 3.- Alfonso Barcell Gorina ; 1978 ; La clínica y el laboratorio Edit. Marin S.A. ; Undecima Edicc. ; Pag. 286-287.
- 4.- Arthur Berman , Felix Wroblewski, John Ladue ; 1955 ; Transaminase activity in human blood ; J.Clin. Invest. Vol. 34 ; Pag. 126-127.
- 5.- Buckell, M. ; 1958 ; The effect of citrate on euglobulin methods of estimating fibrinolytic activity ; J. Clin. Pathol. ; Vol. 11 ; Pag. 403-405.
- 6.- B.A. Elliot, J.M. Wilkinson ; 1963 ; Determination of lactato-deshidrogenase ; Clin. Scin. ; Vol. 24 ; Pag. 343-346.
- 7.- Gabaud, P.G., Wroblewski P. ; 1969 ; Colorimetric measurement of lactic deshidrogenase activity of body fluids ; Am. J. Clin. Pathol. ; Vol. 30 ; Pag. 234-238.
- 8.- Constantin Arvanitakis, Alan C. ; 1978 ; Diagnostic test of exocrine pancreatic function and disease ; Progress in gastroenterology ; Vol. 74 ; Pag. 932-933.
- 9.- Cecil Hougie ; 1983 ; Prueba del tiempo de recalcificación Tatrado de hematoglogia ; Edit. Salvat , Segunda Edicc. ; Pag. 1766-1767.
- 10.- Cecil Hougie ; 1983 ; Hematologia tomo 11 , Seg. Edicc. Pag. 1778-1779.
- 11.- Cecil Hougie ; 1983 ; Tiempo de Trombina ; Hematologia tomo 11, Segunda Edicc. ; Edit. Salvat ; Pag. 1777-1778.

- 12.- Cecil Hougie ; 1983 ; Tiempo de Protrombina ; Hematologia tomo 11 ; Edit. Salvat., Segunda Edicc. ; Pag. 1771-1772.
- 13.- Gornall ,A.G., Bardawill, C.J. ; David M.M. ; 1949 ; Determination of protein total ; Vol. 177 ; Pag. 751-754.
- 14.- Geral Bevan, William P. Balduz ; 1969 ; Serum immunoglobulin levels in cholestasis ; Gastroenterology ; Vol. 56 Pag. 1040-1041.
- 15.- Georg Borkan, Burnham Walker ; 1940 ; Determination of serum iron and pseudohemoglobin iron with O-phenantroline ; J.Biol.Chem. ; Vol. 135 ; Pag. 37-39.
- 16.- George L. Ellman K., Diane Cortney ; 1961 ; A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity ; Biochemical Pharmacology. ; Vol. 88 ; Pag. 7-10.
- 17.- E. Lovine, A. Atilo Selva ; 1980 ; Bromosulfaleína ; El laboratorio y la clínica ; Segunda Edicc. , Edit. Panamericana ; Pag. 961- 962.
- 18.- E.Lovine-Selva ; 1981 ; El laboratorio en la clínica ; Segunda Edicc., Edit. Panamericana ; Pag. 137-138.
- 19.- E. Lovine- Selva ; 1981 ; El laboratorio en la clínica Edit. Panamericana, Segunda Edicc. ; Pag. 390-392.
- 20.- Enrique Lovine , Alejandro Selva ; 1982 ; Bioquímica de la hemostasia ; El laboratorio en la clínica ; Segunda Edicc. , Edit. Panamericana ; Pag. 126-127.
- 21.- E. Lovine, A. Selva ; 1982 ; Enzimología Clínica ; El laboratorio en la clínica ; Segunda Edicc., Edit. Panamericana ; Pag. 303-306.
- 22.- Franklin M. Hanger ; 1960 ; Liver Function test ; Med. Clin. N. Amer. ; Vol. 44 ; Pag. 681-682.
- 23.- Horacio Jinich Brook ; 1949 ; Valoración clínica del empleo simultaneo de la prueba del timol y la dosificación de la fosfatasa alcalina en el suero sanguíneo ; Vol. XVI ; Pag. 147-150.

- 24.- Helga T. Malloy and Kenneth A. Evelyn ; 1937 ;  
The determination of bilirubin with the photo-  
electric colorimeter. ; J.Biol. Chem. ; Vol. 119 ;  
Pag. 481-487.
- 25.- Edward Ssoseklik, Marian Orłowski ; 1961 ; A new  
and rapid colorimetric, Serum alfa glutamyltranspep-  
tidase activity in liver disease. ; Gastroenterology ;  
Vol. 41 ; Pag. 353-357.
- 26.- Horacio Jinich Brook ; 1978 ; El enfermo icterico ,  
Etapas de laboratorio ; 4 Edic. , Edit. Interamericana  
Pag. 81-85.
- 27.- Henry C. Kunkel ; 1957 ; Estimation of alterations of  
serum gamma globulina by a turbidimetric technique ;  
Proc. Sec. Exp. Biol. and Med. ; Vol. 66 ; Pag. 217-219.
- 28.- I. Davidsohn J.G. Henry ; 1980 ; Diagnostico clínico por el  
laboratorio; octava edic, Edit. Salvat ; Pag. 833-835.
- 29.- Manual de Laboratorio clínico ; 1974 ; Instituto Mexicano  
del seguro Social ; Pag. 416-418.
- 30.- Jorge Ocaraza Melero ; 1982 ; Pruebas de Funcionamiento  
Hepatico ; Gastroenterologia ; Vol. 11 ; Segunda Edic.  
Edit. Pco. Mendez Otes ; Pag. 260-267.
- 31.- John A. Kolmer ; 1963 ; Diagnóstico clínico por los  
análisis de laboratorio ; Pruebas de Funcionamiento  
Hepatico ; Tercera Edic. , Edit. Interamericana ;  
Pag. 153-170.
- 32.- Julios A. Goldberg, Alexander M. Rutenburg ; 1958 ;  
The colorimetric determination of leucina aminopeptidase  
subjects and patients with cancer and other diseases. ;  
Vol. 11 ; Pag. 283-285.
- 33.- Joseph H. Roe And Robert E. Byler ; 1963 ; Serum  
Lipase determination using a One-Hour period of  
hidrolisis ; Analytical Biochemistry ; Vol. 6 ;  
Pag. 451-454.

- 34.- Kidder, W.R. Logan, Rapaport ; 1972 ; The Plasma Protromine Paracoagulation Test. ; J. Lab. Clin. Med. ; Vol. 58 ; Pag. 675-678.
- 35.- Manual de procedimientos de laboratorio clínico ; 1980 ; Instituto mexicano del seguro social ; Pag. 215-217.
- 36.- Manual de procedimientos de laboratorio clínico ; 1980 Pag. 205-207.
- 37.- Macfarlane R.G. ; 1939 ; A simple method measuring clot retraction ; Lancet ; Vol. 1 ; Pag. 1199-1201.
- 38.- Miller S.E. ; 1966 ; Tratado de Patología clínica ; Séptima Edic. ; Edit. Baltimore ; Pag. 323-330.
- 39.- Mielke, C.R., Kaneshiro, M.M. Weiner J.M. And Rapaport ; 1969 ; The standardized normal duke Bleeding time and its prolongation by aspirin ; Blood ; Vol. 32 ; Pag. 204-207.
- 40.- Manual de Química clínica ; 1982 ; Diagnostica Merk ; Pag. 8-9.
- 41.- Manual de Química clínica ; 1982 ; Diagnostica Merk ; Pag. 6-7.
- 42.- Manual de Procedimientos de laboratorio clínico ; 1974. Instituto mexicano del seguro social ; Pag. 320-325.
- 43.- N.F. MacLagan ; 1944 ; The Thymol turbidity test as an indicador of liver dysfuncotic ; Brit. J. Exper. Pathol. ; Vol. 25 ; Pag. 234-236.
- 44.- Norbert W. Tietz ; 1972 ; Química clínica moderna ; Primera Edic. ; Edit. Interamericana ; Pag. 795-799.
- 45.- O. Dhodanaud Kowlessar ; 1960 ; The Diagnostic Value Of serum Enzyme Determination in pancreatic disease ; Gastroenterology ; Vol. 22 ; Pag. 817-818.
- 46.- Ocaraza M.J. J.J. Villalobos , Ricardo Santoyo ; 1969 ; Valoración de la prueba de Jirgl en el diagnóstico diferencial de las ictericias ; Revista de Gastroenterología en México. ; Vol. 34 ; Pag. 285-287.

- 47.- Otto A. Bessey, Oliver A. Lowry ; 1946 ; A method for rapid determination of alkaline phosphatase ; J. Biol. Chem. ; Vol. 164 ; Pag. 321-326 .
- 48.- Poller L. And Thomson ; 1969 ; The interpretation of Prothrombin results. ; Bris. J. Hemat. ; Vol. 16 ; Pag. 31-34.
- 49.- Proctor R.R., Rapaport S.L. ; 1961 ; The partial thromboplastin time with kaolin, a simple screening test for first stage plasma clotting factor deficiencies Am. J. Clin. Path. ; Vol. 36 : Pag. 212-214.
- 50.- Pavlosky M., Moreno S. ; 1967 ; XII reunión anual de la sociedad clinica Argentina Salta ; Pag. 24-26.
- 51.- P.G. Cole, G.H. Lathe, Barbara H. Billing ; 1954 ; Separation of the bile pigments of serum, bili and urine ; Biochem. J. ; Vol. 57 ; Pag. 514-515.
- 52.- S.B. Rosalky ; 1962 ; A simple colorimetric method for the determination of serum alpha-hydroxybutyric dehydrogenase activity. ; J.Clin. Pathol. ; Vol 15 ; Pag. 566-570.
- 53.- Solomon Posen ; 1967 ; The mechanism of serum alkaline phosphatase elevation in hepatic disorders ; Ann.Intern. Med. ; Vol. 67 ; Pag. 191-192.
- 54.- Stanley Reitman, Frankel S. ; 1957 ; A colorimetric method for determination of serum Glutamic Oxalacetic and Glutamic Pyruvic Transaminases. ; Am. J. Clin. Pathol. ; Vol. 28 ; Pag. 56-61.
- 55.- Warren A. Katz, Maxwell Scarf ; 1964 ; Bromosulphhein reactions ; Am. J. Med. Scien. ; Vol. 26 ; Pag. 545-546.
- 56.- William, J. William ; 1983 ; Hematologia Tomo 11, segunda Edic. Edit. Salvat ; Pag. 1792-
- 57.- Wendell T. Caraway ; 1959 ; A stable starch substrate for the determination of amylase in serum and other body fluids. ; Am. J. Clin. Pathol. ; Vol 32 ; Pag. 97-101.