

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS



**DETERMINACION DE LOS NIVELES DE SODIO Y
POTASIO EN PLASMA DE SANGRE CONSERVADA**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A**

JESUS CORPUS SANTILLAN

México, D. F.

1979



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

TESIS 1979
AÑO M. C. 82
FECHA _____
PROC _____
S _____



JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE

Dea Coronado Perdomo.

VOCAL

Gpe. Leticia Carrasco Rivera

SECRETARIO

Victor Manuel Sánchez Hidalgo

1er. SUPLENTE

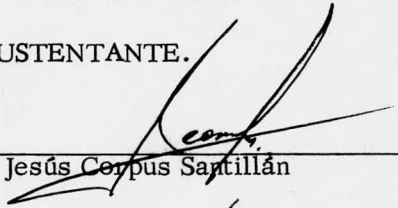
Esther Gutierrez Hidalgo

2do. SUPLENTE

Patricia Alvarez Romero


Sitio donde se desarrolló el tema. Banco de sangre del Hospital
del Niño IMAN.

Nombre completo y firma del SUSTENTANTE.



Jesús Corpus Santillán

Nombre completo y firma del ASESOR.



QBP Víctor Manuel Sánchez Hidalgo

Con gran Cariño y agradecimiento
para mis padres:

FRANCISCO CORPUS R Y
RICARDA SANTILLAN DE CORPUS.

Con amor y ternura para mi esposa
Gloria Magaña y mis hijos Verence
y Daniel Arodi como un ejemplo.

Con afecto para todos mis Hermanos
y especial gratitud a Sarita quien -
hizo posible que realizara mis estu-
dios y contribuy6 grandemente en mi
formaci6n personal.

En agradecimiento al Hospital
IMAN por su valiosa ayuda pa
ra realizar esta Tesis.

En agradecimiento al QBP Victor -
Manuel Sanchez Hidalgo por su va -
liosa asesoria.

En memoria a un gran amigo:
SERGIO VELEZ LOMBEL

En memoria al Maestro QFB RAMON
GUEVARA.

Agradecimiento infinito a la Srita.
QFB Dea Coronado Perdomo por sus
consejos para realizar esta tesis.

Agradecimiento a todos los Maestros
que hicieron posible realizar mi ca -
rrera.

I N D I C E

	Pág.
INTRODUCCION.....	2
I. - GENERALIDADES.....	3-16
II. - MATERIALES Y METODOS.....	18-20
III. - RESULTADOS.....	22-39
IV. - DISCUSION Y CONCLUSIONES.....	41-43
RESUMEN.....	45
BIBLIOGRAFIA.....	47-49

CAPITULO I
INTRODUCCION Y GENERALIDADES

INTRODUCCION.

Se ha demostrado que en las sangres que se destinan a transfusión, - preservadas mediante las condiciones habituales de refrigeración, existen concentraciones elevadas de sustancias nefrotóxicas que tienden a incre- - mentarse conforme se prolonga el tiempo de conservación (6, 9, 14, 21, 28,) aparecen productos de degradación provenientes del metabolismo de los - componentes bioquímicos de los eritrócitos (14, 15, 16) por lo que la admi- nistración de sangre total conservada por este proceso debe controlarse, - para evitar riesgos mayores a los pacientes en quienes deba ser trasfun- - dida.

El objetivo de este trabajo es contribuir a que el manejo de sangre total y/o sus componentes, tenga una aplicación adecuada y evitar de esta manera los accidentes transfusionales.

GENERALIDADES.

El hombre se ha interesado por el conocimiento de la sangre, asignándole poderes curativos, propiedades naturales y sobrenaturales, los antiguos egipcios daban a beber sangre de animales sanos a sus enfermos. También el legendario Genghis Khan alimentaba a sus hombres con sangre de sus caballos, e inventó un ingenioso aparato para la sangría de estos, haciéndolo periódicamente.

En 1616 Denys y cols. Aplicaron sangre de cordero a humanos, muriendo todos los pacientes después de la transfusión. Las cantidades transfundidas fueron de 300 a 400 ml, el método consistió en conectar la arteria carótida del cordero a la vena de sus pacientes, quienes presentaron todos los síntomas conocidos ahora en la incompatibilidad sanguínea como dolor de brazos, irregularidad del pulso, vómitos, diarrea, fatiga etc.

Más tarde el Journal book of the royal Society Birch's estableció la posibilidad de transfundir experimentalmente sangre de un animal, a otro de la misma especie.

La primera transfusión en humanos la realizó Blundell el 22 de diciembre de 1818, utilizando jeringas e inyectando de 360 a 400 ml de sangre de varios donadores para un mismo receptor, éste murió a las pocas horas de haber sido transfundido (ya que hubo incompatibilidad sanguínea). En 1824 se publicaron tres transfusiones con mucho éxito a un paciente con hemorragia se le transfundieron 500 ml de sangre en un período de tres horas, el paciente se recuperó. En este mismo siglo se explicó la in

compatibilidad sanguínea mediante reacciones " in vitro " realizadas por Landois, quien demostró que el suero de ciertos individuos normales, era capaz de aglutinar o hemolizar eritrocitos de otros individuos sanos y de otras especies.

Roussel, en 1865 practicó una transfusión directa del brazo del donador al brazo del receptor, quien tenía una fuerte hemorragia, y enfatizó la necesidad de trasfudir sangre de humanos para humanos. Siendo el principal problema de la transfusión la tendencia de la sangre a coagular, posteriormente se realizaron estudios y las investigaciones se encaminaron en la búsqueda de anticoagulantes no tóxicos. Así en 1869 Braxton H. recomendó el uso de fosfato de sodio como anticoagulante, el que resultó de elevada toxicidad.

A. Hustin en Bélgica, L. Agate en Buenos Aires y R. Lewishon en Nueva York, publicaron sus trabajos independientemente el uno del otro, e introdujeron el citrato de sodio como anticoagulante efectivo y no tóxico en concentraciones de 0.2 %, advirtiendo que la cantidad no excediera de 5 mg, posteriormente se incluyó glucosa como citrato ácido de glucosa (ACD). El perfeccionamiento de las sustancias preservativas para conservarlas para su uso inmediato o futuro dieron origen a los primeros bancos de sangre, primero en Rusia y posteriormente en los Estados Unidos de Norteamérica, en Chicago en 1937.

En 1901 Landsteiner descubrió el sistema A, B, O, en su libro " las especificidades de las reacciones séricas ", contribuyó grandemente a la medicina estableciendo las bases inmunológicas que forman, las estructu

ras para los conocimientos actuales. Otro descubrimiento fué el factor Rh. y así hasta 1940 fué posible trasfundir sangre con menor riesgo de incompatibilidad (10, 13, 16 y 27).

Anticoagulantes.

Los mas empleados en la trasfusión de sangre son: Citrato-ácido - Dextrosa (ACD). Que existe en varias fórmulas, la solución ACD, utilizada por el Instituto Nacional de Norteamérica (N.I.H.) se presenta en dos formulaciones, la solución " A " y la solución " B " las cuales se describen a continuación:

	Solución " A "	Solución " B "
Citrato trisódico	22.0 g	13.2 g
Acido cítrico	8.0 g	4.8 g
Glucosa	25.0 g	14.7 g
Agua destilada	1000.0 ml	1000.0 ml

Es conveniente recolectar sobre el anticoagulante empleado, una cantidad adecuada de sangre, ya que si ésta, es menor a la indicada la sobrevivencia globular disminuye debido a los cambios de pH; si se recolecta de masiada sangre puede presentarse coagulación.

Después de varios estudios se demostró que la sangre recolectada en Citrato-ácido-Dextrosa y Citrato-fosfato-Dextrosa (CPD) almacenada a 4° C muestra una sobrevivencia a 70 % aproximadamente, valor que ha sido aceptado como un estándar, para el período que comprende desde el mo - -

mento de la recolección hasta los 21 días. Por otro lado, en estudios hechos sobre el metabolismo y regulación de aditivos de sangre conservada en las condiciones ya descritas (9, 13 y 16) se ha observado que el factor 2, 3- Difosfoglicerato decrece (2, 3- DPG; esta sustancia facilita o aumenta la afinidad de la hemoglobina hacia el oxígeno para liberarlo posteriormente a los tejidos) en el eritrocito durante el almacenamiento, por lo que el oxígeno se une mas fuertemente a la molécula de hemoglobina haciendo menos disponible a éste para los tejidos en su intercambio gaseoso (4, 6, 9, 16 y 27) , los eritrocitos trasfundidos en estas condiciones requieren de varias horas, hasta días para recuperar sus funciones normales de transporte (4, 6, 9, 18 y 24) .

Son varios los trabajos encaminados a encontrar las vías que permiten por un lado, que los eritrocitos mantengan las concentraciones normales de 2, 3 DPG, para un mejor funcionamiento de la hemoglobina, y por otro de la molécula de Adenosintrifosfato (ATP), para una mayor viabilidad eritrocítica; se observó que durante el almacenamiento se disminuye el pH, lo que favorece los niveles de 2, 3 DPG, e inhibe los efectos del ATP (sustancia que proporciona gran cantidad de energía), encontrando que esta molécula actúa como buen preservador ayudando a la viabilidad del glóbulo rojo durante el almacenamiento, en estas condiciones los glóbulos rojos en la circulación del receptor (paciente), son capaces de regenerar sus funciones, perdiendo esta propiedad después de almacenarlos por un período mayor de 21 días a 4° C. atribuyendo que la huella de almacenamiento es irreparable ya que existe una alteración en alto grado de to

das las sustancias bioquímicas (1, 3, 5, 9, 13, 14, 16, 17 y 23).

Recomendaciones del uso de diferentes anticoagulantes.

Heparina

Es conveniente para recolectar 500ml. de sangre, el empleo de - - 2250 unidades de heparina sódica en 30 ml. de solución salina amortiguada. La sangre heparinizada debe utilizarse en un tiempo máximo de 24 a 48 hs. de su recolección, después de este tiempo se empieza a coagular por career de sustancias que proporcionen energía, y está indicada principalmente para circulación extracorpórea y exanguíneotrasfusión.

Etilendiaminotetraacético (EDTA) Na_2EDTA .

Se puede recolectar 500 ml. de sangre sobre 50 ml. de Na_2EDTA - al 1.5 % en solución salina fisiológica (al 0.85 %) , la sangre debe utilizarar se antes de las 24 hs; se ha recomendado para la preparación de concentrados plaquetarios, porque evita el agregado inoportuno de éstas.

Resina de intercambio iónico.

En caso de transfusión masiva, cuando está contraindicado el em - pleo de anticoagulantes, es recomendable el uso de resina de intercambio iónico, selectivamente suprimen los iones calcio y magnesio de la sangre a medida que entra en el recipiente, la sangre debe emplearse antes de 24 hs.

Dextrosa -fosfato -citrato (CPD).

Este anticoagulante se emplea más cada día, debido a que con él, - los glóbulos rojos así conservados al ser trasfundidos tienen una vida me dia mayor y generan sus funciones con mayor rapidez está compuesto de la siguiente manera:

Citrato trisódico dihidratado	25.80	g
Acido cítrico monohidratado	3.20	g
Fosfato monosódico diácido monohidratado	2.18	g
Glucosa	25.00	g
Agua destilada	1000.00	ml

El pH es de 5.63 para esta solución y se emplean 70 ml. para la re colección de 500 ml. de sangre y se hacen las mismas recomendaciones de que la recolección sea exacta. (13 y 23).

Metodos de conservación de sangre y/o sus componentes.

La preservación ordinaria de la sangre, recolectada en condiciones asépticas en bolsas de plástico (cloruro de polivinilo), con su respectivo - anticoagulante ACD o CPD, se mantienen en refrigeración a bajas tempe raturas de 2 a 10° C (preferentemente entre 4 y 6° C), durante 21 días, lo - que permite mantener un nivel terapéutico útil durante este período (1, 2, 3, 9, 13 y 16).

Preservación de los glóbulos rojos por congelación.

Hace 25 años el glicerol fué usado principalmente como agente crio protector de glóbulos rojos, la aplicación de este descubrimiento fué un - - gran paso para los laboratorios de investigación.

Tullis y cols. realizaron un trabajo en el hospital naval de Massa - chusetts desarrollando un proceso de glicerización de los glóbulos rojos para su congelación posterior.

Huggins desarrolló un método, suspendiendo los glóbulos rojos en - una solución no electrolítica (sin electrólitos), en glicerol dejándolos sedimentar y desechando el glicerol sobrenadante por decantación, congelando los posteriormente.

Rowe, utilizando una congelación rápida de los eritrocitos en nitrógeno líquido, disminuyó considerablemente el empleo de glicerol en grandes cantidades (1, 9, 13 y 16). En la actualidad el glicerol se utiliza en diferentes concentraciones que pueden ser elevadas (en un 40 % peso/volumen), empleando la técnica de congelación lenta y se almacena el paquete glóbulu - lar en congeladores mecánicos a - 80° C, el otro método es aquel que emplea una concentración de glicerol baja (aproximadamente 20 % pero/volumen), en la que se desarrolla una técnica rápida de congelación a temperaturas que oscilan entre - 80 a - 150° C. en nítrogeno líquido, los glóbulos - rojos preservados de esta manera tienen una viabilidad aproximadamente - de 5 años.

Los glóbulos rojos congelados por tiempo indefinido para su poste -

rior trasfusión, se ha convertido en un método bastante aceptado en los - - bancos de sangre modernos: resolviendo muchos de los problemas de las - - deficiencias de la sangre total y sus derivados, como son concentrados - - plaquetarios, plasma fresco congelado, y crioprecipitados, proporcionan - - do un mejor uso de las fracciones de la sangre total, que resulta de gran - - importancia en la autotrasfusión de paquete glóbular de tipo sanguíneo ra - - ros.

Las ventajas que presentan los métodos de conservación por conge - - lación eliminan o minimizan los problemas clínicos asociados con la hepa - - titis trasfusional, anticuerpos antieritrocíticos, antígenos tisulares pre - - sentes en los glóbulos bancos y plaquetas siendo de gran importancia en - - histocompatibilidad en el transplante de órganos, antígenos de proteínas - - plasmáticas, anticuerpos, hipercalemia y toxicidad al anticoagulante.

Los glóbulos rojos almacenados durante 21 días a 4° C. en lugar de eliminarse pueden ser tratados con soluciones amortiguadoras y nutrien - - tes, acondicionando los niveles normales de metabolitos y así procesarlos, para su posterior congelación y preservarlos por tiempo indefinido, los nu - - trientes empleados son eliminados en el proceso de lavado. Estos glóbulos rojos rejuvenecidos tienen la misma supervivencia postrasfusional como - - los glóbulos rojos recién donados. El paquete globular conservado por los métodos de congelación a -80° C y -150° C. no pierden las sustancias ATP y 2,3 DPG. cuyo papel importante en la viabilidad y buen funcionamiento - - eritrocitario, ha sido ya mencionado (1, 8, 9, 13, 16 y 27).

Metabolismo del eritrocito.

Al eritrocito se le considera un verdadero dinamo de actividad, su metabolismo incesante requiere de sustancias para su consumo energético, por lo que la pérdida de viabilidad de esta célula durante su almacenamiento se debe al agotamiento de su energía celular, ya que requiere de ésta, para mantener en condiciones óptimas sus propiedades osmóticas frente a un gradiente iónico, conserva así su forma discoide frente a fuerzas que tienden a hacerlo esférico efectuando el transporte iónico y de glucosa a través de su membrana y realiza con eficiencia su función de transporte gaseoso.

El eritrocito posee sustancias no hemoglobínicas que se encuentran en pequeñas cantidades y son fundamentales para su funcionamiento y su pervivencia, estos componentes son los que guardan una relación con la estructura superficial de éste (en la membrana); intervienen en el mantenimiento de la hemoglobina, rigen la difusión hacia adentro y hacia afuera del glóbulo rojo, y abastecen la energía necesaria para las diversas actividades que desarrollan los glóbulos rojos; se desconocen muchos de los mecanismos de como actúan otras sustancias en el complicado funcionamiento de los eritrocitos.

Membrana eritrocitaria.

Su composición química se ha obtenido de estudios realizados del estroma y constituye del 2 al 5 % del peso neto del eritrocito, y está com-

puesto de un 40 a 60 % de proteínas, del 10 al 12 % de lípidos (estas porciones fueron separadas del estroma por electróforesis). De los complejos que constituyen al estroma la mejor caracterizada es la elinina, se cree que las fibrillas de esta molécula están unidas entre sí por lípidos extraíbles en éter lo cual forma el armazón (Estromina) de la membrana.

Del glóbulo rojo normal intacto un 95 % son lípidos neutros (colesterol libre con pequeñas cantidades de colesterol esterificado y triglicéridos) los lípidos hidrocarbonados representan de 5 al 8 %, quedando como la fracción principal los fosfolípidos con 65 %, éstos comprenden esfingomielinas (compuestos por esfingosinas que es un ácido graso de cadena larga y fosforil colina), fosfogliceridos, fosfatidilcolina (lecitina), fosfatidiletanolamina (cefalina) y fosfatidil serina, todos estos lípidos se encuentran en un estado altamente dinámico.

Es probable que el intercambio de lípidos revista gran importancia en el mantenimiento de la viabilidad (capacidad de las células de seguir viviendo) del eritrocito, puesto que la pérdida del lípidos superficiales guarda una estrecha relación con el envejecimiento y viabilidad del glóbulo rojo (16, 17 y 27). La membrana de éste tiene la propiedad de ser semipermeable, de manera que permita el paso de aniones y cationes venciendo un gradiente de concentración iónico.

El potasio atraviesa la membrana del glóbulo rojo por un proceso dinámico que depende de la energía proveniente de la glicólisis anaeróbica, en el cuál interviene la molécula de ATP; el sodio atraviesa la membrana del eritrocito por un mecanismo metabólico similar a la del ion potasio. En

la membrana del glóbulo rojo existen poros que contienen numerosas cargas eléctricas positivas, por consiguiente se deduce que el grado de permeabilidad, es específico para cada ión.

Metabolismo energético.

El glóbulo rojo no contiene glucógeno, en consecuencia su continuo metabolismo le exige tener acceso a la glucosa, el índice de glucólisis del glóbulo rojo humano es de 0.3 a 0.5 mg por 100 ml de glóbulos rojos durante una hora, desconociéndose el mecanismo por el cuál la glucosa penetra a través de la membrana de éste, concluyéndose, por varios investigadores que es un transporte activo y no difusión simple; en la estructura lipídica externa pueden localizarse sitios de transporte activo de sustrato a través de los cuales pasa la glucosa.

En los eritrocitos maduros quedan pequeños remanentes del ciclo de Krebs y del sistema citocrómico. El desdoblamiento metabólico de la glucosa depende de las reacciones de la vía glucolítica de EMBDEN-MEYERHOF, en la cuál la glucosa se fracciona en forma anaeróbica en lactato a través de una serie de intermediarios fosforilados.

Otra vía del metabolismo de la glucosa reside en la ruta oxidativa del monofosfato de hexosa (MPH), donde la glucosa-6-fosfato se oxida y da lugar a la formación de fosfato de pentosa, estos últimos pueden transformarse después en derivados fosforilados de triosa, tetrosa, hexosa etc. por acción de la transcetolasa y transaldolasa, (27), la actividad del MPH, es regulada de modo principal por el glutati6n.

Envejecimiento del glóbulo rojo.

Cuando las mitocondrias, el ARN y los ribosomas desaparecen de los reticulocitos, el eritrócito pierde capacidad para sintetizar sus constituyentes esenciales a partir de moléculas mas pequeñas como el Hem de la hemoglobina, las proteínas, los lípidos y los nucleótidos púricos y pirimidicos, provocando una seria interrupción de su metabolismo energético. La glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa (G6PD) que cataliza el paso inicial de la vía de fosfato de pentosa, la 6-fosfogluconico-deshidrogenasa y la fosfohexosa-isomerasa etc. se encuentran en cantidades relativamente grandes en los eritrocitos jovenes, cantidad que disminuye conforme el glóbulo rojo envejece " in vivo ", afirmándose que la cantidad de gliceraldehido-3-fosfo-deshidrogenasa, que cataliza un paso fundamental de la glucólisis anaerobia disminuye considerablemente, así como también otras enzimas importantes.

Sin embargo parece que la fosforilación inicial de la glucosa catalizada por la hexocinasa, es el paso que limita la velocidad de glucólisis global en el eritrócito normal, y que la disminución de la actividad de esta enzima constituye la base de algunas otras alteraciones metabólicas que sobrevienen durante el envejecimiento del glóbulo rojo.

Las alteraciones del metabolismo de la glucosa que ocurren en última estancia, ocasionan una disminución marcada de la concentración del ATP disponible, porque éste se genera durante la serie de reacciones del ciclo de Embden-Meyerhof.

Por ser el ATP una importante fuente de energía en varios pasos - - esenciales para el mantenimiento de la integridad estructural del eritrocito se sabe que la lesión de los glóbulos rojos almacenados en condiciones ordinarias se debe al decremento del ATP (8, 9 15 y 27).

Sangre almacenada y exceso de potasio.

Durante el almacenamiento de la sangre hay destrucción continua - de glóbulos rojos al cabo de tres semanas, sólo quedan un 70 a un 80 % de los glóbulos rojos iniciales (3, 9, 13 y 18), en el preservado ocurre en de - cremento de 2, 3-DPG y ATP, propiciando una serie de alteraciones en la - permeabilidad del glóbulo rojo que favorece la salida del potasio, ión intra celular y la entrada de sodio que es un ión extracelular, por consiguiente a mayor tiempo de almacenamiento en condiciones ordinarias de banco de - - sangre, aumenta el nivel plasmático de potasio, (14 y 23).

La sangre total almacenada por mas de 10 días no debe administrarse a pacientes con oliguria o anuria, ya que existe el riesgo de elevar en - exceso los niveles de potasio plasmático (13, 15, 16 y 26), los aumentos de - este ión producen los siguientes síntomas;

- a). - Hiperactividad gastrointestinal (náuseas, cólicos etc.)
- b). - Sensación vaga de debilidad muscular.
- c). - Parálisis flácida afectando los músculos respiratorios.

d). - Paro cardíaco y muerte, por notable flacidez del corazón cuando los niveles de potasio plasmático llegan de 10 a 15 meq/lit.

Según Leveen (15) la frecuencia de paros cardíacos, durante las in-

tervenciones quirúrgicas tienen relación con la administración de gran can tidad de sangre total almacenada por varios días, por lo que no es reco - - mendable el abuso de trasfusión de sangre total almacenada de manera or - dinaria por más de 10 días.

En el presente trabajo se pretende determinar la concentración de sodio y potasio en plasma, de sangre total conservada a 4° C a distintos in tervalos de tiempo hasta 31 días, con el propósito de demostrar si existe - alguna difusibilidad anormal de estos iones debido a una posible alteración de la bomba de sodio a nivel de membrana del eritrocito, causada por el - efecto del almacenamiento (huella de almacenado; 9, 19, 21, 23 y 28).

El incremento del ión potasio puede ser indicativo, aunque en forma indirecta, del incremento de posibles sustancias nefrotóxicas; lo que per - mitirá decidir si una muestra de sangre conservada en las condiciones des critas, sea aceptada o rechazada, evitando así que pueda resultar nociva y riesgosa al ser trasfundida al paciente.

CAPITULO II
MATERIAL Y METODOS.

MATERIAL Y METODOS.

Material biológico:

Sangre total en bolsas de plástico (policloruro de vinilo PVC), con capacidad de 500 ml con solución ACD como anticoagulante formula "A" unidas a bolsas piloto, éstas con capacidad de 100 ml conectadas mediante circuito cerrado, conservadas a 4°C.

Recolección de muestras:

La sangre ^{Total} total fue recolectada en el banco de sangre del Hospital del Niño (IMAN), de hombres y mujeres (donadores voluntarios) de varias edades, clasificados hematologicamente "normales", por exámenes previos como lo especifica el código sanitario en el artículo 3, inciso VIII, en su fragmento trasfusión y bancos de sangre (12). El trabajo se realizó en el lapso comprendido entre el mes de agosto de 1975 hasta enero de 1976, reuniéndose un total de 300 muestras.

La sangría se realizó limpiando el brazo en la zona de punción con alcohol yodado, recolectando 500 ml de sangre hacia la bolsa de donación colocada en el aparato mezclador hemolator para aumentar el flujo de sangre, creando en la unidad una presión negativa al mismo tiempo que se mezcló el anticoagulante, posteriormente se trasvasó en condiciones estériles 100 ml a la bolsa anexa (bolsa piloto) donde se realizaron las mediciones en el plasma de sangre total desde el primer día de recolección hasta los 31 días, las muestras se almacenaron en condiciones similares que la sangre total de uso ordinario para trasfusión, a 4°C.

Reactivos:

Cloruro de sodio NaCl QP (Merck)

Cloruro de potasio KCl QP (Merck)

Nitrato de litio LiNO_3 QP (Merck)

Sueros Comerciales de Concentración Conocida.

Equipo:

Fotómetro de flama marca IL-343

Centrifuga Clay Adams

Microcentrifuga

Fotocolorímetro

Aparato mezclador Hemolator

Refrigerador para banco de sangre, con alarma de temperatura y -
registro gráfico para control de temperatura.

Método:

Determinación de sodio y potasio en plasma de sangre conservada -
por flamometría.

Preparación de soluciones estándares de sodio y potasio.

La solución utilizada como estandar contiene 100 meq/l de sodio y -
1.5 meq/l de potasio en agua desionizada.

Se emplearon 2 sueros comerciales de concentración conocida uno -
de ellos bajo en sodio 119 meq/l y alta en potasio 6.2 meq/l, el otro de - -

concentración normal para ambos cationes, 140 meq/l para el ión sodio y 5.0 meq/l para el ión potasio.

Manejo de Muestras biológicas:

Se homogenizó la bolsa de sangre total con movimientos manuales, suaves y lentos para evitar hemólisis lo cual podía alterar las concentraciones reales en el plasma de dichos electrólitos, las muestras se tomaron directamente de las bolsas y se pasaron a tubos de vidrio de 13x100 de fondo plano con aforo a 3 ml perfectamente limpios ésto se llevó a cabo encampana de flujo laminar para evitar contaminación y tener en condiciones estériles las muestras originales. Lo cual se demostró mediante un control bacteriológico, realizado en el servicio de bacteriología del mismo hospital.

Los tubos con la sangre total se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 minutos, separándose el paquete glóbular del plasma este fué directamente succionado hacia el flamómetro. El volumen del plasma aspirado fué por lo general de 0.05 a 0.075 ml cantidad que permitió llegar a la estabilización de lecturas de concentración del analito medido.

Cada una de las muestras destinadas al análisis de sodio y potasio fué conservada a 4°C, (llevándose un control estricto diario de la temperatura de refrigeración) desde el momento de su recolección hasta los 31 días, tomándose alícuotas de 3 ml cada tercer día, lo cual da un total de 16 análisis por muestra durante dicho período.

CAPITULO III

RESULTADOS.

Resultados:

Los valores de sodio y de potasio obtenidos en cada una de las 16 - alicuotas provenientes de cada una de las 300 muestras de plasma fueron - registradas en tablas. Se analizaron los 16 datos de cada una de las mues - tras y se observó que en todas ellas hubo un incremento en la concentra - ción de potasio y una disminución en la de sodio. En base a este análisis y para los propósitos del trabajo debido al gran número de datos obtenidos de los niveles de concentración de estos cationes se consideró adecuado hacer grupos por cada 20 muestras correspondientes a cada uno de los días del - período de análisis; a cada grupo de 20 muestras se le determinó su pro - medio de concentración de cada ión para cada día. Estos resultados se - - muestran en la tabla # 1 para el ión sodio y en la tabla # 2 para el ión pota - sio.

Por análisis de los datos de las tablas # 1 y # 2 y con la finalidad de mostrar en forma gráfica los posibles cambios en la concentración de so - dio y potasio se tomaron los valores promedio máximo del potasio y míni - mos del sodio y se determinó la frecuencia con que aparecen los 15 grupos en cada intervalo, los resultados se muestran en la tabla # 3.

TABLA No. 1

Valores promedio de la concentración de Na^+ en meq/l *

Muestra	Días															
No.	1 ^o	3 ^o	5 ^o	7 ^o	9 ^o	11 ^o	13 ^o	15 ^o	17 ^o	19 ^o	21 ^o	23 ^o	25 ^o	27 ^o	29 ^o	31 ^o
1	171	168	166	166	167	164	161	161	162	161	162	160	160	161	161	159
2	163	160	155	159	159	157	158	158	162	159	157	155	155	155	153	153
3	159	159	157	157	155	162	159	153	156	153	150	148	150	149	149	147
4	161	161	153	164	152	152	151	149	146	145	147	150	148	147	145	144
5	160	162	163	163	161	159	157	154	152	152	153	151	149	148	147	145
6	161	160	159	157	156	153	153	151	150	149	148	146	144	144	142	141
7	161	159	156	155	153	154	153	151	150	150	149	148	147	145	143	142
8	165	162	160	158	156	155	151	148	149	148	147	144	142	142	141	141
9	161	159	157	153	151	151	150	148	146	144	146	145	145	143	142	140
10	162	160	158	156	154	152	150	148	146	145	145	144	142	141	140	140
11	158	157	156	155	153	152	150	148	146	145	144	142	142	141	141	140
12	161	159	157	156	155	153	151	150	148	147	146	144	143	142	141	140
13	161	159	157	157	155	153	152	153	150	149	148	146	144	142	141	140
14	163	161	159	158	156	154	152	149	147	146	145	143	141	141	140	138
15	164	162	160	158	158	156	154	152	150	149	148	148	147	146	145	144

* La cifra promedio de la concentración de sodio resultante para cada grupo es la media de las determinaciones en 20 alícuotas de plasma.

TABLA No. 2

Valores promedio de la concentración de K^+ en meq/l *

Muestra	Días															
No.	1 ^o	3 ^o	5 ^o	7 ^o	9 ^o	11 ^o	13 ^o	15 ^o	17 ^o	19 ^o	21 ^o	23 ^o	25 ^o	27 ^o	29 ^o	31 ^o
1	4	6	8	10	12	13	15	16	18	18	19	20	21	23	25	26
2	4	5	7	8	9	11	13	14	16	17	17	19	21	23	25	26
3	4	4	6	7	8	10	12	13	15	16	16	17	20	22	23	25
4	4	5	7	8	10	12	14	15	18	19	20	22	24	26	27	29
5	4	5	7	8	12	14	15	19	21	22	23	26	28	30	32	34
6	3	5	8	10	12	15	17	20	22	24	25	27	30	31	32	34
7	3	6	8	10	13	15	18	20	23	24	25	26	29	32	35	37
8	3	5	8	10	13	15	18	20	23	25	26	28	31	33	36	39
9	4	6	8	10	14	16	18	21	24	25	26	28	30	33	36	38
10	4	6	9	12	14	17	20	22	24	25	27	29	32	34	36	39
11	4	7	9	12	14	17	20	22	25	26	27	29	32	34	37	39
12	4	7	10	12	15	17	20	23	25	27	28	30	33	35	38	41
13	4	6	8	11	13	17	19	21	24	25	26	29	32	34	36	38
14	4	6	9	11	13	16	19	22	24	26	27	29	32	34	36	39
15	4	6	9	12	14	17	20	22	25	26	27	29	32	34	36	38

* La cifra promedio de la concentración de potasio resultante para cada grupo es la media de las determinaciones en 20 - alícuotas de plasma.

TABLA No. 3

Intervalos de la concentración de K^+ (meq/l)	Frecuencia de grupos analizados.	Intervalos de la concentración de Na^+ (meq/l)	Frecuencia de grupos analizados.
25 - 27	3	135 - 140	6
28 - 30	1	141 - 145	6
31 - 33	0	146 - 150	1
34 - 36	2	151 - 155	1
37 - 39	8	156 - 160	1
40 - 42	1	- -	0

Analizando los intervalos de concentración de potasio y de sodio en meq/l, se formaron diferentes grupos de frecuencia variada como se muestra en la tabla # 3.

Con la finalidad de hacerlo mas objetivo se procedió a representar los graficamente. Cada gráfica se construyó con los grupos de la misma frecuencia; los datos de la concentración media de potasio en el eje de las ordenadas (Y) y los días de conservación a 4°C en el eje de las abcisas (X) enumerandolas de manera secuencial, de la misma forma se graficaron los datos de concentración media de sodio en meq/l.

Con el propósito de ver si existe una posible correlación estadística entre los cambios mostrados por sodio y potasio se promediaron los 300 datos de cada día.

Las cifras promedio resultantes se muestran en la siguiente tabla.

TABLA No. 4

Días.	Valor promedio de la concentración de	
	Na ⁺ meq/l (Y)	de K ⁺ meq/l (X)
1	163	4.0
3	160	5.6
5	158	8.3
7	158	10.5
9	158	12.7
11	156	15.1
13	152	17.5
15	151	19.6
17	150	22.0
19	149	23.0
21	148	25.0
23	148	27.0
25	147	29.0
27	146	31.0
29	145	33.0
31	144	35.0

Con los valores promedio de la tabla # 4 se elaboró la gráfica de - correlación, la cual se muestra en la figura # 1.

A continuación se muestran los cálculos utilizados para la determinación del coeficiente de relación (r).

$$Y = a_0 + a_1 x \quad X = b_0 + b_1 Y$$

$$EY = a_0 N + a_1 EX \quad EX = b_0 N + b_1 EY$$

$$EXY = a_0 EX + a_1 EX^2 \quad EXY = b_0 EY + b_1 EY^2$$

$$a_0 = \frac{(EY) (EX^2) - (EX) (EXY)}{N EX^2 - (EX)^2}$$

$$a_1 = \frac{N EXY - (EX) (EXY)}{N EX^2 - (EX)^2}$$

$$b_0 = \frac{(EX) (EY^2) - (EY) (EXY)}{N EY^2 - (EY)^2}$$

$$b_1 = \frac{N EXY - (EX) (EY)}{N EY^2 - (EY)^2}$$

$$r = \sqrt{\frac{EXY}{(EX^2)(EY^2)}}$$

Para nuestros datos obtenemos los siguientes resultados.

$$r = - 0.995$$

$$m = - 0.590$$

$$b = 163.88$$

m es la pendiente de la curva

b es la intercepción de la curva

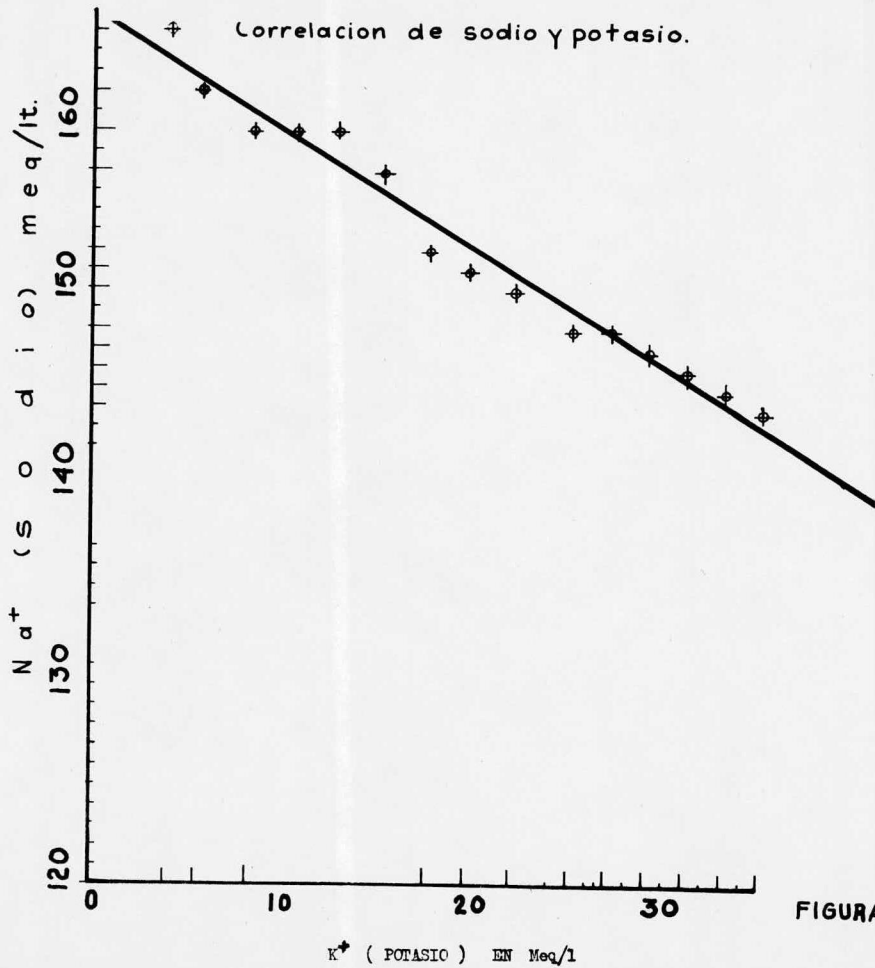
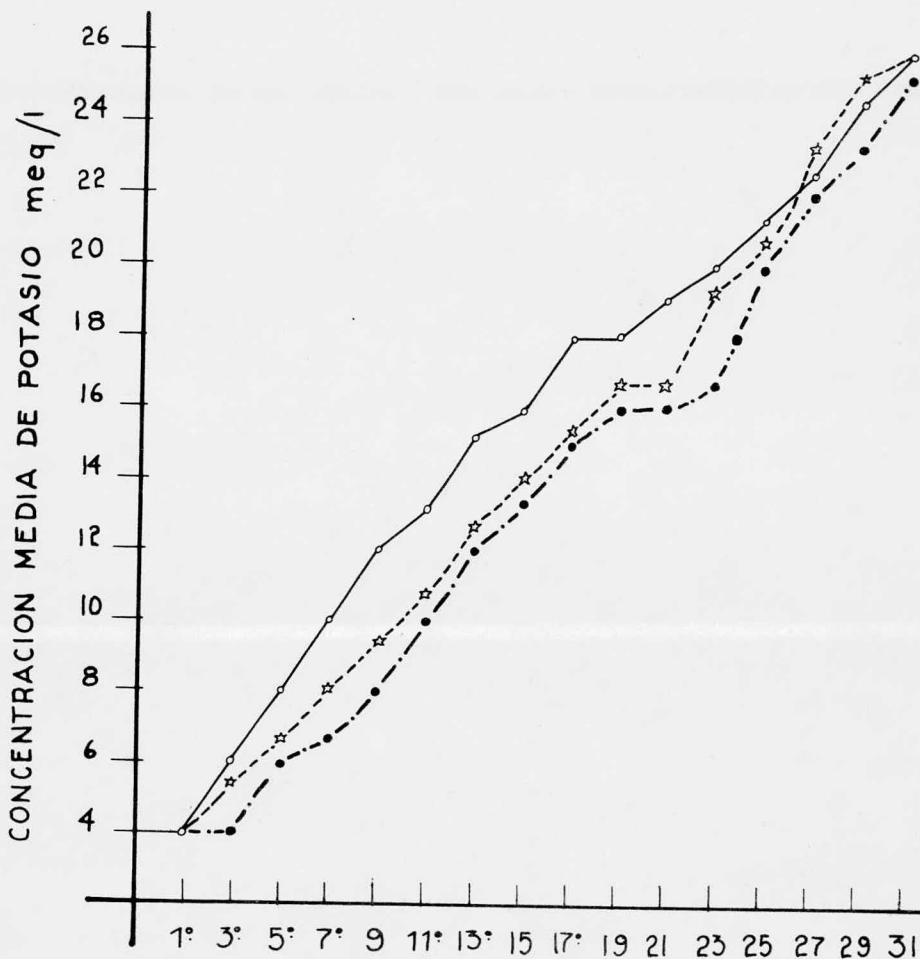


FIGURA N° 1

POTASIO



DIAS DE CONSERVACION A 4°C

FIGURA 2.- Determinación de la concentración de potasio en plasma de sangre total conservada a 4°C. cada curva es resultante del análisis de 20 muestras, en el intervalo de concentración de 25 a 27 meq/l de K⁺

POTASIO

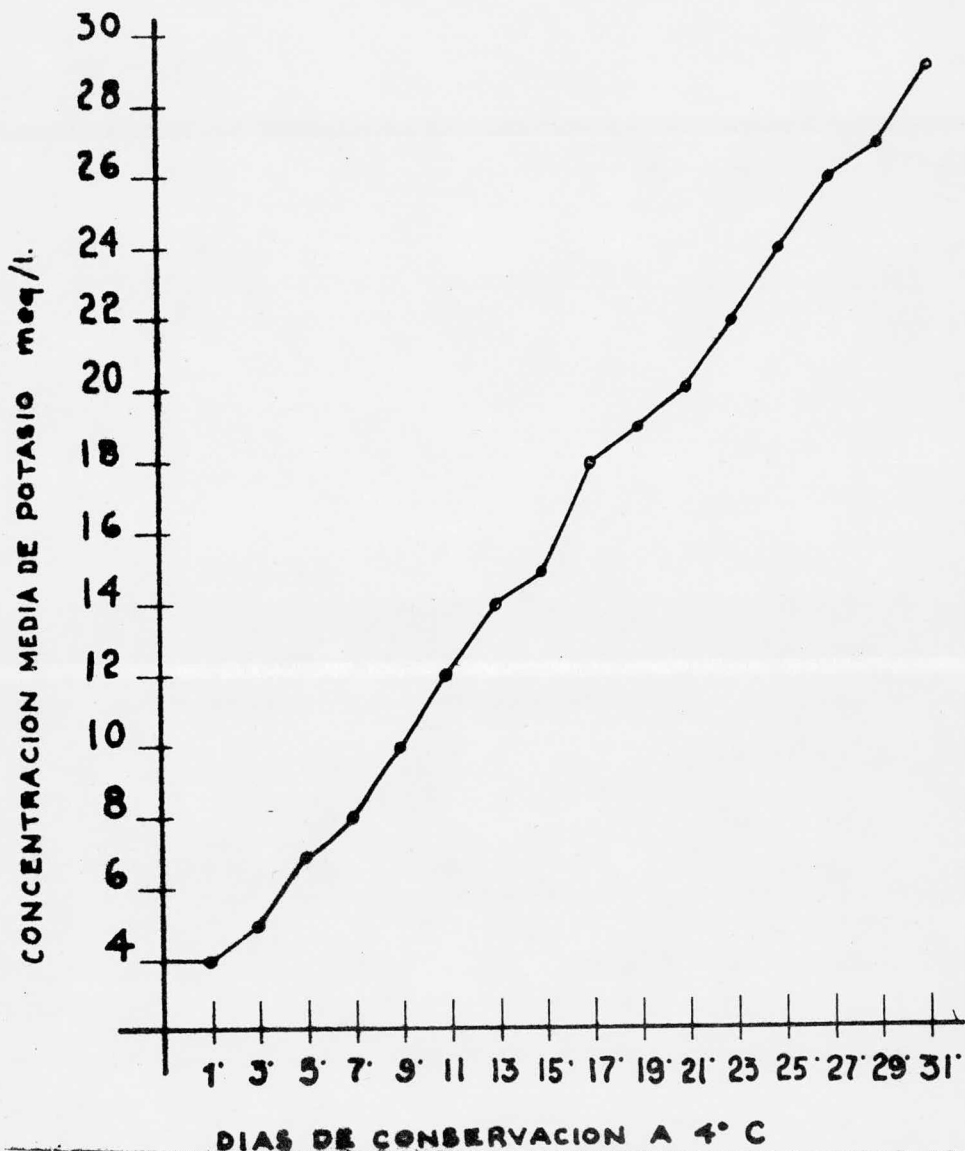


Figura 3 Determinación de potasio en plasma de sangre total conservada a 4°C. cada curva es el resultante del análisis de 20 muestras, en el intervalo de concentración de 28 a 30 meq/l de K⁺

POTASIO

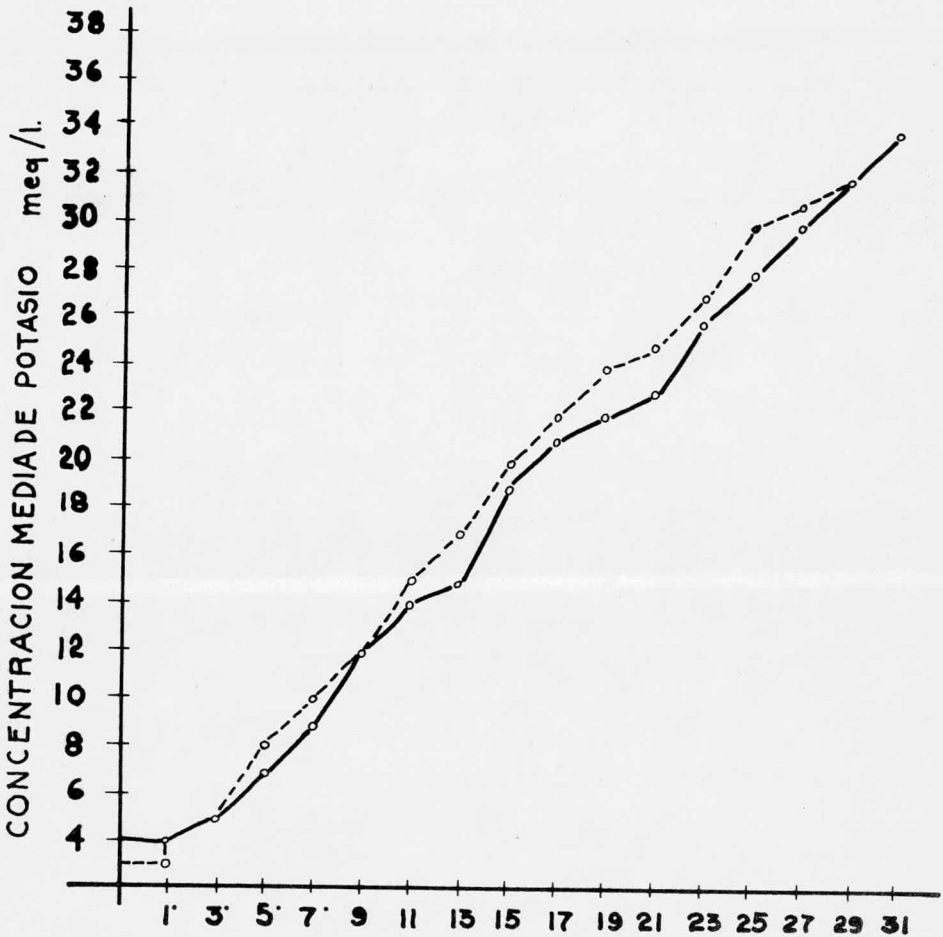


FIGURA 4 DIAS DE CONSERVACION A 4°C

Figura 4.- Determinación de la concentración de potasio en plasma de sangre total conservada a 4°C. Cada curva es resultante de análisis de 20 muestras, en el intervalo de concentración de 31 a 33 meq/l de K⁺

POTASIO

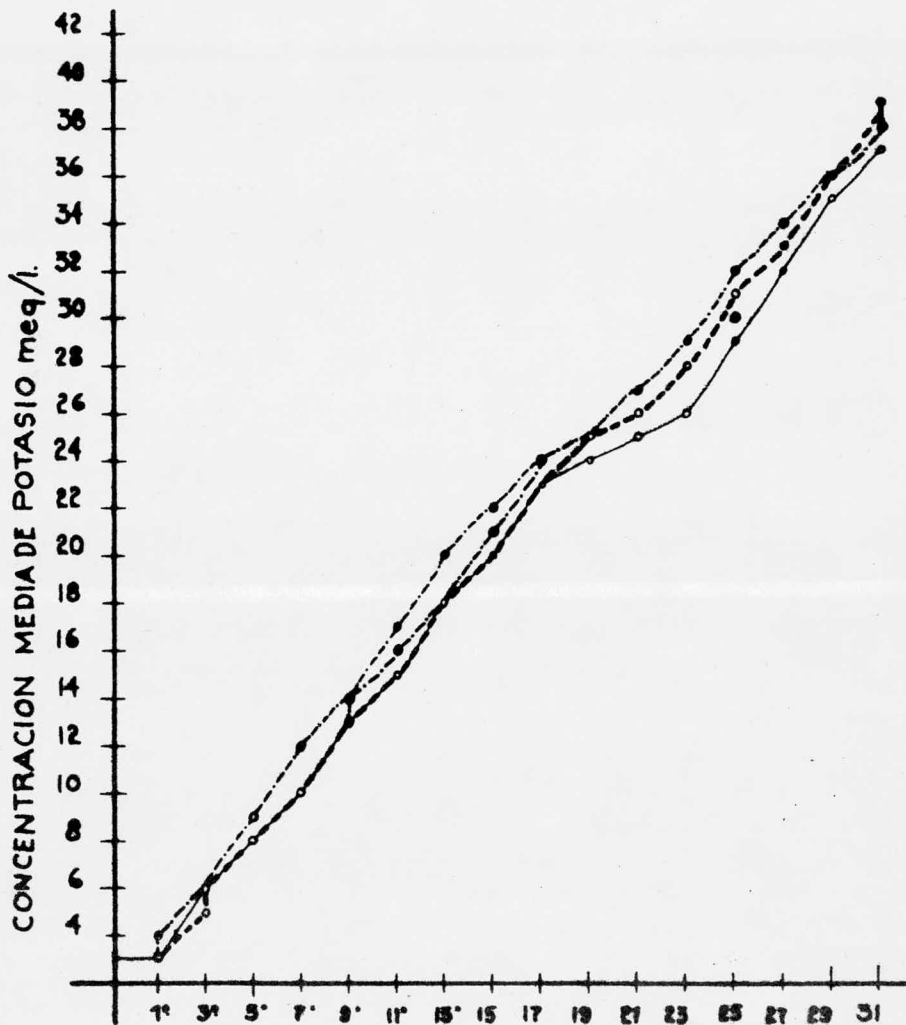


FIGURA 5 DIAS DE CONSERVACION A 4°C

Figura 5 Determinación de la concentración de potasio en plasma de sangre total conservada a 4°C. Cada curva es resultante del análisis de 20 muestras, en el intervalo de concentración de 34 a 36 meq/l de K^+

POTASIO

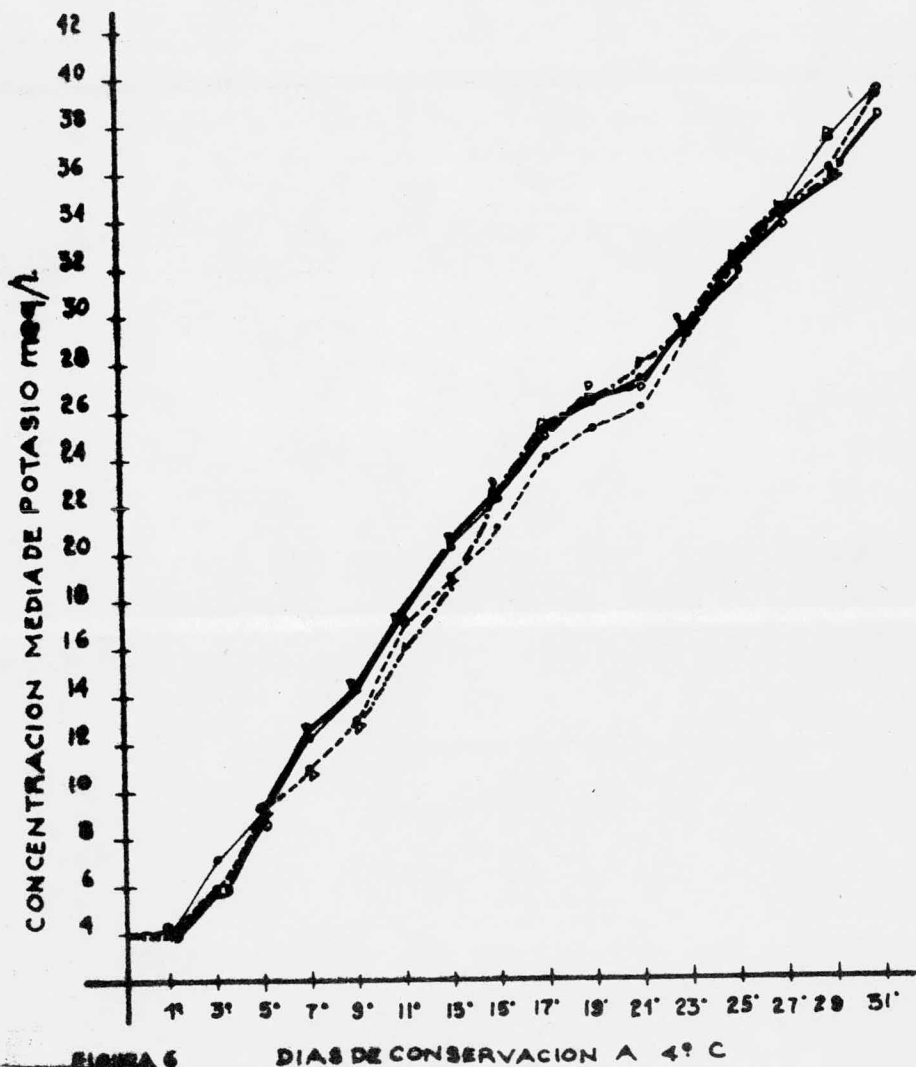


FIGURA 6

DIAS DE CONSERVACION A 4° C

Figura 6 Determinación de la concentración de potasio en plasma de sangre total conservada a 4°C. Cada curva es resultante del análisis de 20 muestras, en el intervalo de concentración de 37 a 39 meq/l de K⁺

f₂

POTASIO

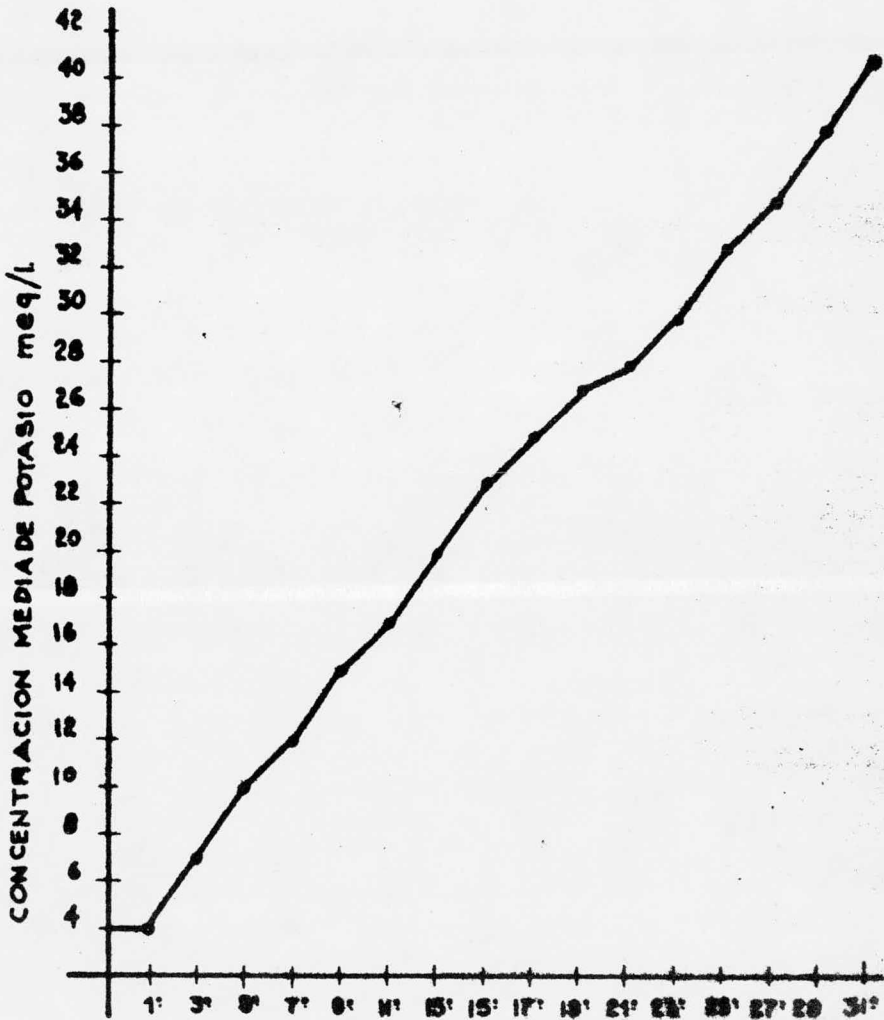


FIGURA 7 DIAS DE CONSERVACION A 4° C

Determinación de la concentración de potasio en plasma de sangre total conservada a 4°C. Cada curva es resultante del análisis de 20 muestras en el intervalo de concentración de 40 a 42 meq/l de K⁺

SODIO

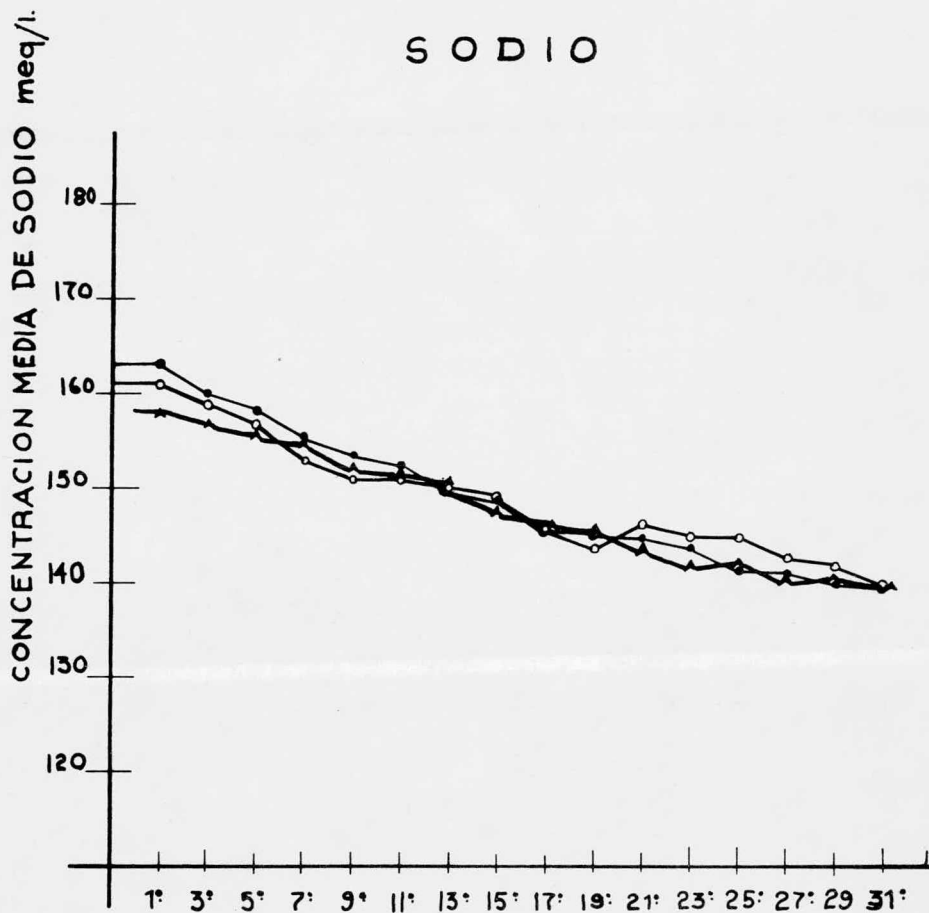


FIGURA 8 DIAS DE CONSERVACION A 4°C

Figura 8.- Determinación de la concentración de sodio en plasma de sangre total conservada a 4°C. Cada curva es resultante del análisis de 20 muestras, en el intervalo de concentración de 135 a 140 meq/l de Na⁺.

SODIO

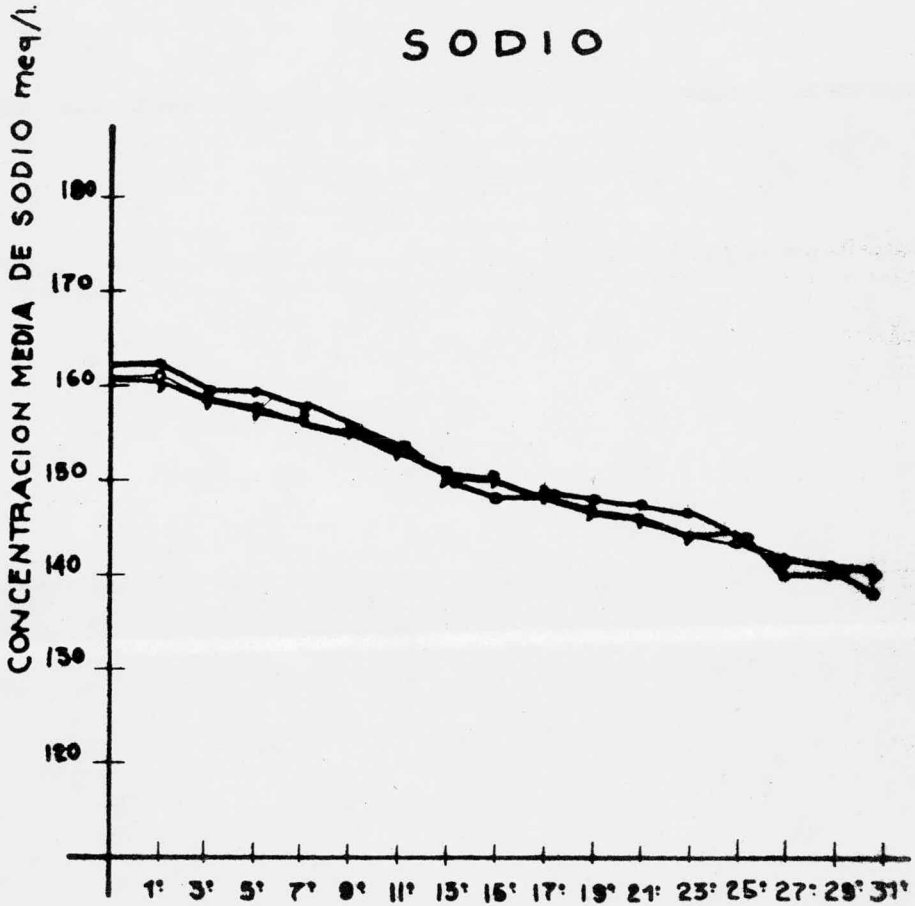


FIGURA 9a. DIAS DE CONSERVACION A 4°C

Figura 9a. Determinación de la concentración de sodio en plasma de sangre total conservada a 4°C. Cada curva es resultante del análisis de 20 muestras, en el intervalo de concentración de 141 a 145 meq/l de Na⁺.

Nota: Dado a la gran frecuencia de curvas en este intervalo de concentración para la mejor apreciación de estas se graficó en dos figuras denominadas 9a y 9b.

SODIO

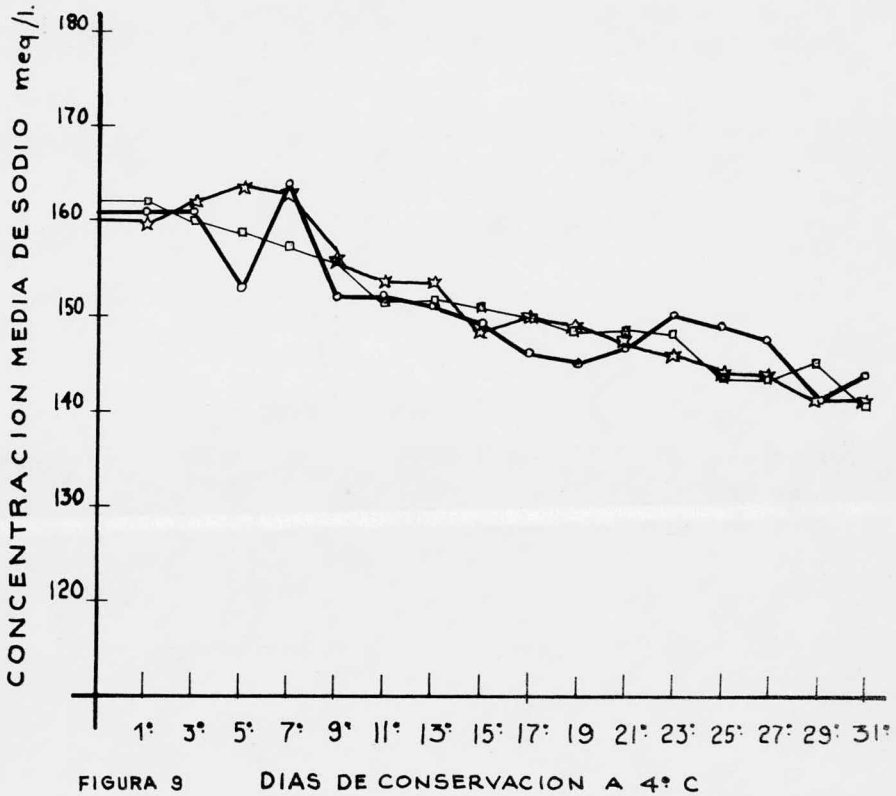


FIGURA 9 DIAS DE CONSERVACION A 4° C

Figura 9.- Determinación de la concentración de sodio en plasma de sangre total conservada a 4°C. Cada curva es resultante del análisis de 20 muestras, en el intervalo de concentración de 141 a 145 meq/l de Na⁺.

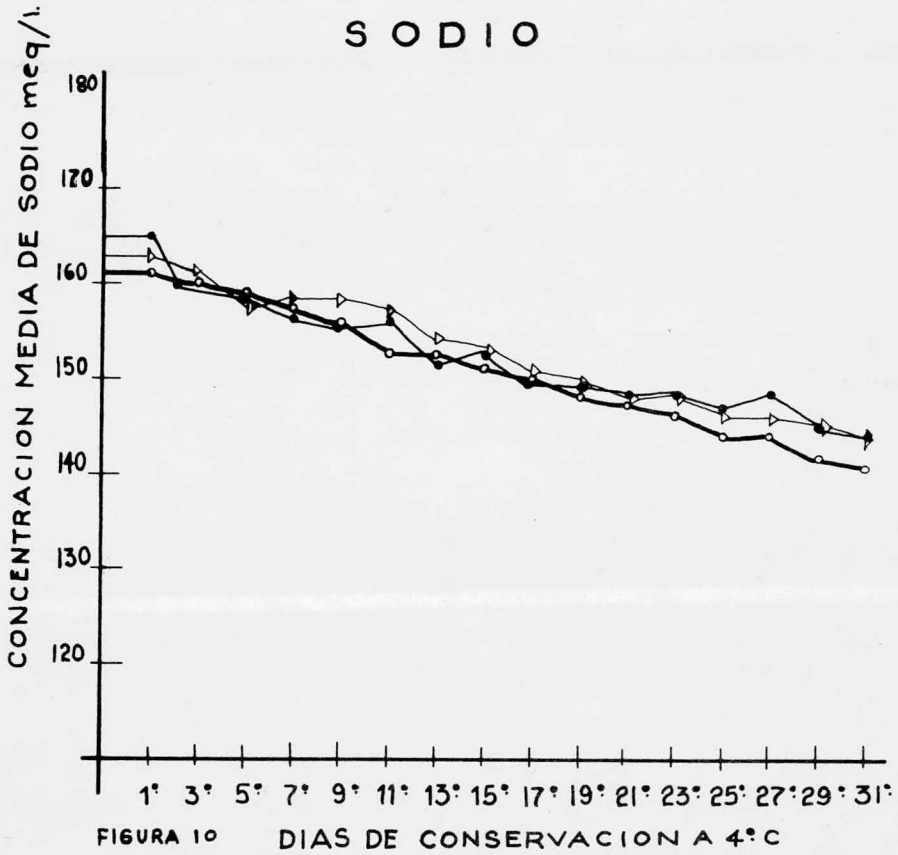


Figura 10.- Determinación de la concentración de sodio en plasma de sangre total conservada a 4°C. Cada curva es resultante del análisis de 20 muestras, en el intervalo de concentración de 146 a 150 meq/l de Na⁺.

S O D I O

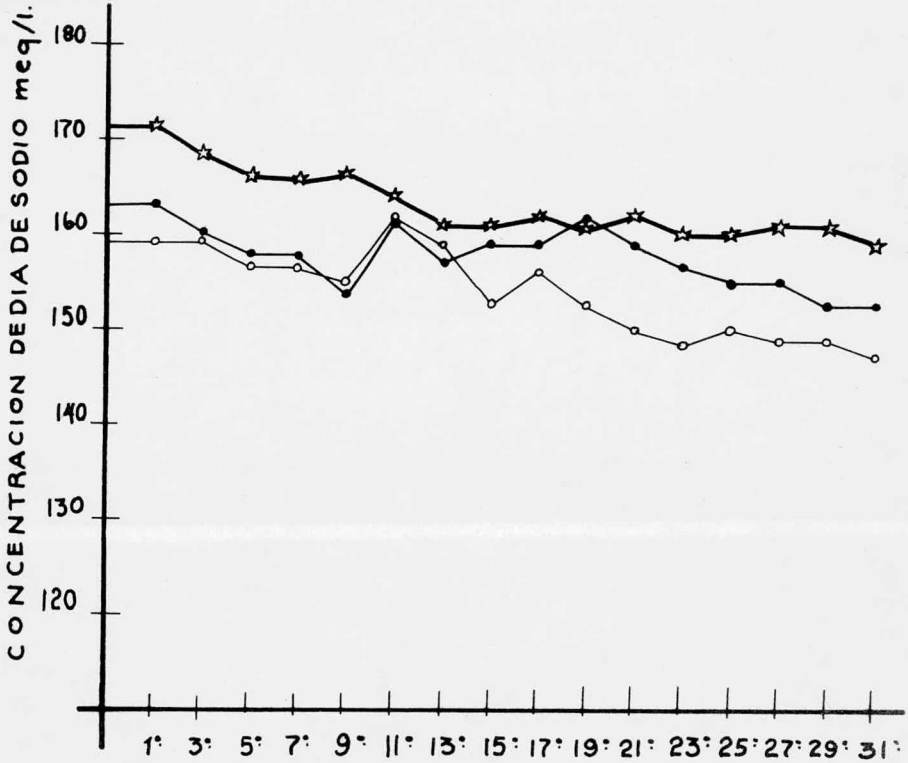


FIGURA II

DIAS DE CONSERVACION A 4° C

Figura 11.- Determinación de la concentración de sodio en plasma de sangre **total** conservada a 4°C. Cada curva es resultante del análisis de 20 muestras, en el intervalo de concentración de 15^6 a 14^0 meq/l de Na^+ .

CAPITULO IV
DISCUSION Y CONCLUSIONES

DISCUSION.

El nivel de concentración de sodio y potasio obtenidos de las 300 -- muestras almacenadas a 4°C y analizadas cada tercer día muestran un incremento en cuanto a potasio y una disminución en cuanto a sodio; dada la gran cantidad de datos por el tipo de análisis efectuado en cada muestra se consideró necesario la formación de grupos por lotes de 20 muestras y calcular un valor promedio para aquellos valores correspondientes al mismo día de análisis.

De acuerdo con los datos mostrados en las tablas 1 y 2 se observa un incremento marcado del ión potasio con una concentración inicial de --- 4 meq/l en las muestras recién obtenidas (día cero) hasta 41 meq/l en las muestras almacenadas a 4°C por 31 días.

Un notable aumento de 10 meq/l o más de potasio se encontró entre el 7º y 9º día en las muestras conservadas en las condiciones ya indicadas. Estos datos muestran que las medidas de seguridad de transfundir sangre total hasta con un período de 10 días de conservación en refrigeración es completamente riesgosa ya que ello puede inducir al paciente a un estado -- hiperpotasémico con los posibles efectos ya mencionados.

El incremento de potasio bajo estos procedimientos de conservación fué demostrado también por los estudios realizados Michul J M y Runk, A. H. (14 y 20).

Por otro lado Mollison demostró que a incrementos de potasio por -- períodos largos de conservación hay un incremento paralelo de sustancias -- como lactato, amonio, lo cual aumenta mas las posibilidades de riesgo en --

las trasfusiones de estas muestras si no se toman medidas como la cuantificación de potasio como un índice para detectar el estado actual de la sangre (9, 14, y 28).

En cuanto a la cuantificación de sodio se observa un decremento de 171 a 138 meq/l conforme transcurre el tiempo hasta los 31 días que comprendió este estudio, estos datos estan en concordancia por lo reportado -- por otros autores (9, 11 y 16), este efecto de la disminución de sodio probablemente se deba a una alteración a nivel de la membrana en la bomba de sodio y potasio (14, 17, 21 y 23).

En los estudios de correlación entre potasio y sodio se encontró que el coeficiente de correlación (r), muestra un valor de -0.995 muy próximo a la unidad, indicativo de que existe una probable salida de potasio a partir de los eritrocitos y una entrada de sodio tendientes a mantener una neutralidad eléctrica, ya que la gráfica resultante de este estudio, muestra una -- relación lineal entre los incrementos de potasio y los decrementos de sodio.

Con el propósito de reducir la gran cantidad de gráficas que pueden obtenerse de los datos resultantes y nada mas tener aquellas que sean representativas, se utilizan el promedio de la concentración de los grupos a diferentes intervalos de concentración de potasio y sodio en meq/l de la tabla # 3, pudiendose apreciar en forma objetiva un marcado incremento en la -- concentración de potasio y un decremento en la de sodio, conforme aumenta el tiempo de conservación a 4°C , como se demuestra a partir de la figura - # 2 hasta la # 7 para potasio y de la # 8 hasta la # 11 para sodio.

CONCLUSIONES.

Por el análisis de la concentración de potasio en plasma obtenido en este estudio se demuestra que el método de conservación a 4°C de sangre total con anticoagulante ácido-citrato- dextrosa fórmula "A", para trasfusión sólo es adecuado dentro de los primeros 6 días después de obtenida la muestra.

En el uso de sangre total, los bancos de sangre determinan como -- una medida de seguridad transfundir desde muestras frescas hasta aque- -- llas que tengan como máximo 10 días de conservación a 4°C, sin embargo - por los resultados obtenidos en esta tesis se demuestra que dicha medida - es inadecuada, ya que la sangre total alcanza una concentración de 10 meq/ l o más de potasio después de 7 días de conservada en refrigeración. Por - lo cual, las transfusiones en pacientes con disfunciones renales, hepáticas y cardiovasculares etc., pueden resultar altamente riesgosa y fatal por lo- tanto no deberán administrarse en casos de anuria, exanguineotrasfusiones etc., ya que será nocivo para el paciente trasfundido.

Se sugiere como medida de seguridad para la aceptación o rechazo- de sangre total para transfusión, la valoración de los niveles de concentra-- ción de potasio en el plasma de sangre total de la bolsa piloto, una medida- que será independiente del tiempo de conservación de la muestra.

RESUMEN

RESUMEN.

En el banco de sangre dependiente del Hospital del Niño (IMAN) se realizó este estudio en 300 unidades de sangre total de donadores voluntarios, conservada a 4°C por un período de 31 días; en el plasma de éstas muestras se determinaron los niveles de concentración de sodio y potasio por flamometría cada tercer día desde el momento de su recolección hasta los 31 días.

Las determinaciones de estos cationes demuestran que el método de conservación por refrigeración no es adecuado, ya que existe un incremento en potasio de 10 meq/l después del 7^º día, elevándose en forma notable hasta 41 meq/l a los 31 días.

Se muestra que existe una correlación entre potasio y sodio por un aumento gradual del primero con una disminución del segundo.

BIBLIOGRAFIA.

BIBLIOGRAFIA .

- 1). - Allen, L. N. y Palmer, J. W. (1963). Manual de inmunohematología - la Ed. Eds. Hyland laboratories, los angeles Calif. 233 pags.
- 2). - Balcells, A. G. (1972). Clínica y el laboratorio interpretación de - - pruebas funcionales 8va. Ed. Eds. Barcelona 428 pags.
- 3). - Bensinger, T. A. Metro, J. y Beutler, E. (1975). Invitro metabolism of packed erithrocytes stored in CPD-Adenine. Transf. 15: (2), 135-39.
- 4). - Beutler, Panifer, N.V., y West, C. (1971). The effect of 2, 3-DPG - on the sickling phenomenon, Blood. 37: (2), 184-86.
- 5). - Bunn, H.F. y Briehl, R.W. (1970). The Interaction of 2, 3-DPG with - various human hemoglobins J. Clin. invest. 49. 1088 - - 95.
- 6). - Dawson, R. B. Jr. Loken, M. R. Carter D. H. (1972). Hemoglobin - function in stored blood, preservative with pH to main - tain red blood, cell 2, 3-DPG (function) and ATP (viabili - ty). Transf. 12 (1), 46-52.
- 7). - Dern, R. J. Rodney, P. G. y Wiorkowski, J. J. (1966). Studies on the preservation of human blood. I. Variability in erythro - cyte storage characteristics among healthy donors. J. - lab. clin. med. 13. (1), 955-65.
- 8). - Dern, R. J. Brewer, G. J. y Wiorkowski, J. J. (1968). Storage and - trasfusión, the relationship of erithrocyte adenine tri - phosphate levels and other in vitro measures to red - - cells storageability. Transf. 8: (1), 53-54.
- 9). - Doublas, W. Huestis, M. D. Joseph R. y Bove M. R. (1975). Practi - cal blood trasfusion. 3a. Ed. Eds. Sitirley busch mph - (ASCP). 381 pags.
- 10). - Erskine, A. G. (1971). History of blood trasfusion and basic princi - ples of the blood groups. lab. digest. 33 (2): 3-11.
- 11). - Gordillo, P. G. (1975). Electrólitos en pediatria fisiología clínica 2a. Ed. Eds. Asociación de Médicos Hospital Infantil de Mé - xico 431 pags.

- 12). - Lopez, M. A. (1960). Reglamentos de banco de sangre, servicio de trasfusión y derivados de la sangre, Secretaría de Salud y Asistencia código sanitario mexicano. 150 - pags.
- 13). - Lynch, M. J. (1972). Métodos de laboratorio. 2da. Ed. Eds. Interamericana 1398 pags.
- 14). - Michael, J. M. Dorner. I. Bruns, D. Ladenson J. H. y Sherman, L. (1975). Potassium load in CPD- preserved whole blood - and types of packed red blood cells. *Transf.* 15 (2) 144-49.
- 15). - Milligan, N. M. (1967). *Terapeutic. de liquidos y electrólitos.* 1a. - Ed. Eds. Ateneo 245 pags.
- 16). - Mollison, P. L. (1976). *Blood trasfusion in clinical medicine.* 15a. - Ed. Eds. Blackwell scientific publications oxford London Edinburgh melbourne 856 pags.
- 17). - Moore, G. L. Cooper, D. A. Antonoff, R. S. y Robinson, S.L. - - (1971). Changes in human erythrocytes membrana proteins during storage *Vox sang.* 20, 239-251.
- 18). - Oski, F. A. Travis, S. F. Miller, L. D. Delivoria, P. M. y Canon E. (1971). The in vitro restoration of red cell 2, 3-diphosphoglycerate levels in banked blood. *Blood* 37 (1) - 52-58.
- 19). - Perutz, M. F. (1970). Stereochemistry of cooperative effects in haemoglobin. *Nature.* 228 (21) 726-39.
- 20). - Runch, A. H., Valeri C. R. y Sampson W. T. (1968). Comparison - of the effects of ionic and non-ionic solutions on the volumen and in tracellular potassium of frozen and no frozen human red cells. *Trans.* 8 (1) 9-18.
- 21). - Sass, M. D. Caruso C. J. y Axelrod R. D. (1971) Deterioration of - young and old red cells stored at 4°C. *Vox sang,* 21 (1) 327-37.
- 22). - Smith, C. H. (1975). *Hematología pediátrica* 2a. Ed. Eds. Salvat 875 pags.
- 23). - Stoltz, J. F. Vigneron C. y Streiff F. (1971). Alterations of red blood cell osmotic fragility storage of blood drawn on ACD. -

solution. Vox. sang. 21, 86-89.

- 24). - Strumia, M. M. y Strumia, P. V. (1972). Conditions affecting the -- maintenance of adenosinetriphosphate, 2, 3-DPG and - oxygen dissociation by addition of adenine and inosine to blood stored at 1° C. Transf. 12 (2), 68-74.
- 25). - Szymanski I. O. y Valeri C. R. (1971). Lifespan of preserved red - cells. Vox sang. 21 (97) 97-108.
- 26). - Valeri C. R., Weisel R. D., Dennis R. C. Mannick J. A. Berger R. L. y Hechtman H. B. (1978). Oxygen transport function of preserved red blood cells and myocardial performance. Red cells, progressin clinical biological research. Eds. Alan R. Liss inc. New York. Vol. 597 pags.
- 27). - Wintrobe M. M. (1975). Hematologia clinica 3ra. Ed. Eds. Intermedica 1239 pags.
- 28). - Zachara B. L., Poland. (1975). The effect of inosine, pyruvate, and inorganic phosphate on 2, 3-diphosphoglycerate, adenine, and hypoxanthine nucleotide synthesis in outdated - human erythrocytes. J. lab. clin. 85 (3) 436-43.

**Tesis por computadora
único sistema en el país**

TESIS

RAPIDAS

Paseo de las Facultades Núm. 34 Locales C-D

Tels. 550-86-32 y 550-87-43

M.t. 82