

300627

1
20



Universidad LA SALLE

**ESCUELA DE QUIMICA
INCORPORADA A LA U. N. A. M.**

**Diseño y Desarrollo de Métodos Enzimáticos para la
Cuantificación de Glucosa, Acido Urico y Colesterol
en Sangre, que podrán ser utilizados en los
Laboratorios de las Unidades Asistenciales de la
Secretaría de Salud en la República Mexicana**

T E S I S P R O F E S I O N A L

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE :

Químico Farmacéutico Biólogo

P R E S E N T A N :

MATILDE CABRERA MONTOYA

MIRCEL MEDINA MEJIA

DIRECTOR DE TESIS INTERNO

Q. F. B. LETICIA LINARES ESTUDILLO

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

MEXICO, D. F.

1994



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.

A Dios

por habernos dado una vida llena de oportunidades.

A nuestros padres

Jesús y Yolanda
a quienes debo
todo lo que soy

Samuel y Meche
por ser un ejemplo
a seguir

A nuestros hermanos

Alejandro y José Luis

Meche

A la Universidad "La Salle"

por la formación que nos dió, no solo como profesionistas
sino por todo lo que implica la esencia de nuestro ser.

Al Doctor Francisco Javier Resano Pérez

con admiración y respeto por su dedicación y apoyo.
Gracias por haber confiado en nosotras.

A la Q.F.B. Leticia Linares Estudillo

por sus consejos, por ayudarnos a superarnos
y por ser más que una maestra, una amiga.

Con especial cariño para
Ricardo José Luis
por un sinfín de razones.

A todas las personas que trabajan en
el Laboratorio Central de Reactivos
por su ayuda, y en especial a la
Q.F.B. Corita Martínez Ojeda G.
por su interés y cariño.

A tí Kena por darnos algo más que una amistad.

y a todos aquellos que nos han enseñado . . .

Maty

Mirce1

I N D I C E

	Pág.
OBJETIVOS	1
PROLOGO	2
INTRODUCCION	3
1. GENERALIDADES DE LAS SUBSTANCIAS A DETERMINAR: GLUCOSA, ACIDO URICO Y COLESTEROL	
1.1 Glucosa	
1.1.1 Características	16
1.1.2 Metabolismo	16
1.1.3 Importancia de su determinación en sangre	20
1.1.4 Métodos de determinación	28
1.2 Acido Urico	
1.2.1 Características	35
1.2.2 Metabolismo	36
1.2.3 Importancia de su determinación en sangre	41
1.2.4 Métodos de determinación	49
1.3 Colesterol	
1.3.1 Características	59
1.3.2 Metabolismo	60
1.3.3 Importancia de su determinación en sangre	66
1.3.4 Métodos de determinación	74
2. METODOS UTILIZADOS ACTUALMENTE EN LA SECRETARIA DE SALUD	
2.1 Método de la orto-toluidina para la determinación de glucosa	

2.1.1	Fundamento del método	85
2.1.2	Componentes del reactivo para la determinación de glucosa	86
2.1.3	Procedimiento	87
2.1.4	Linealidad del método	89
2.2	Método del ácido fosfotúngstico para la determinación de ácido úrico	
2.2.1	Fundamento del método	91
2.2.2	Componentes del reactivo para la determinación de ácido úrico	92
2.2.3	Procedimiento	92
2.2.4	Linealidad del método	94
2.3	Método de Liebermann-Burchard para la determinación de colesterol	
2.3.1	Fundamento del método	96
2.3.2	Componentes del reactivo para la determinación de colesterol	97
2.3.3	Procedimiento	98
2.3.4	Linealidad del método	99
2.4	Toxicidad de los componentes de los reactivos utilizados	
2.4.1	Ácidos	101
2.4.2	Compuestos nitrogenados	103
2.4.3	Salas	105
3. METODOS PROPUESTOS		
3.1	Método de la glucosa oxidasa/ 4-aminofenazona (GOD-PAP)	
3.1.1	Fundamento del método	106
3.1.2	Componentes del reactivo para la determinación de glucosa	107
3.1.3	Costo del estuche de diagnóstico para la determinación de glucosa	112
3.1.4	Procedimiento	114
3.1.5	Linealidad del método	116

3.2	Método de la uricasa/ 4-aminofenazona	
3.2.1	Fundamento del método	131
3.2.2	Componentes del reactivo para la determinación de ácido urico	132
3.2.3	Costo del estuche de diagnóstico para la determinación de ácido urico	136
3.2.4	Procedimiento	137
3.2.5	Linealidad del método	140
3.3	Método de la colesterol oxidasa/ 4-aminofenazona (CHOD-PAP)	
3.3.1	Fundamento del método	154
3.3.2	Componentes del reactivo para la determinación de colesterol	155
3.3.3	Costo del estuche de diagnóstico para la determinación de colesterol	158
3.3.4	Procedimiento	159
3.3.5	Linealidad del método	161
3.4	Toxicidad de los reactivos utilizados	
3.4.1	Compuestos aromáticos	176
3.4.2	Compuestos nitrogenados	177
3.4.3	Ácidos	178
3.4.4	Enzimas	179
4.	VENTAJAS DE LOS METODOS PROPUESTOS SOBRE LOS UTILIZADOS ACTUALMENTE EN LA SECRETARIA DE SALUD	180
5.	VALIDACION DE LOS METODOS PROPUESTOS	184
	CONCLUSIONES	209
	BIBLIOGRAFIA	212

OBJETIVO GENERAL

Diseñar y desarrollar métodos enzimático-colorimétricos para la cuantificación de glucosa, ácido úrico y colesterol en sangre, mismos que podrán ser utilizados en los laboratorios de análisis clínicos de las unidades asistenciales que pertenecen a la Secretaría de Salud, en la República Mexicana.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

Se pretende que los métodos de análisis a desarrollar cumplan con las siguientes características:

- Que sean específicos.
- Que sean confiables.
- Que sean sensibles.
- Que sean factibles de realizarse en los laboratorios de la Secretaría de Salud.
- Que los componentes de los reactivos utilizados no sean tóxicos.
- Que la determinación se lleve a cabo de una manera sencilla y rápida.
- Que tengan un bajo costo de producción.
- Que sean validados para así asegurar que cumplen con los requisitos para las aplicaciones analíticas deseadas.

PROLOGO

Al ingresar al Laboratorio Central de Reactivos para llevar a cabo nuestro servicio social, pudimos darnos cuenta de la necesidad de actualizar algunos de los métodos de análisis clínicos que se utilizan en la Secretaría de Salud, ya que éstos no garantizan la obtención de resultados confiables, además de que representan un peligro para la salud tanto de los químicos analistas, como de las personas encargadas de la producción de los reactivos, ya que los componentes de los mismos son tóxicos.

Por los motivos anteriores nos interesamos en realizar una investigación para proponer otros métodos de análisis que se adaptaran a las necesidades y a la tecnología disponible en los laboratorios de la Secretaría de Salud.

Consideramos que de esta manera podemos aplicar los conocimientos adquiridos durante nuestros estudios profesionales, contribuyendo al desarrollo científico de México en materia de salud, aportando nuevas y mejores metodologías que nos hagan autosuficientes en reactivos clínicos y teniendo una mayor eficiencia en los resultados de los análisis realizados en nuestra población.

INTRODUCCION

La Química Clínica estudia el desarrollo y la ejecución de los análisis químicos de los líquidos corporales y de otros materiales biológicos para el diagnóstico, terapéutica y profilaxis de las enfermedades. Intenta aclarar los fenómenos que se verifican en la enfermedad, sirviéndole de base las anomalías en el proceso metabólico del organismo, y es indispensable para obtener un resultado eficaz en el diagnóstico médico.

Las exigencias que se le hacen varían de año en año y de laboratorio en laboratorio; la experiencia práctica demuestra que la "vida" de un método de determinación es de aproximadamente 5 años, después de este lapso necesita ser revisado o renovado.

En los últimos años ha habido un notable incremento en el número de análisis requeridos por la población, por lo que cabe suponer que se necesitan desarrollar métodos más sencillos y que den una mayor exactitud en los resultados.

Uno de los principales líquidos corporales que se utilizan en los análisis clínicos es la sangre. Esta es el vehículo líquido por medio del cual los principales nutrientes orgánicos son transportados desde el intestino, donde se absorben, hasta el hígado, donde se elaboran, y de ahí a otros órganos; también es el vehículo por el cual los productos orgánicos de desecho y el exceso de iones minerales se transportan a los riñones para su

excreción. La sangre también transporta el oxígeno desde los pulmones a los tejidos, así como el bióxido de carbono producido durante el metabolismo respiratorio para su eliminación. Además, la sangre sirve asimismo para transportar hormonas y otros mensajeros químicos, desde diversas glándulas endócrinas hasta sus órganos blanco específicos.

Una vez absorbidos del tracto intestinal, la mayor parte de los nutrientes llegan directamente al hígado, que es el principal centro de distribución de nutrientes en el metabolismo de los mamíferos. Tal vez el hígado sea el órgano que muestra una mayor flexibilidad metabólica, puesto que es el primero en recibir los nutrientes del intestino, y por tanto, tiene que ajustar sus actividades metabólicas (2).

El sistema vascular del humano adulto contiene de 5 a 6 litros de sangre aproximadamente. Casi la mitad de su volumen son células: glóbulos rojos (eritrocitos), que transportan oxígeno y algo de bióxido de carbono, y en mucho menor número, glóbulos blancos (leucocitos) y plaquetas. La porción no celular es el plasma sanguíneo, cuyo 10 por ciento aproximadamente, consiste en varios solutos orgánicos e inorgánicos. Las proteínas plasmáticas representan las tres cuartas partes del total de solutos. El resto de los solutos consiste en nutrientes orgánicos y en metabolitos, productos de desecho y sales inorgánicas (6). En la tabla 1 se muestran los componentes

principales del plasma sanguíneo normal y su función general; aunque sin duda, aún quedan muchos componentes minoritarios de éste por identificar.

Los componentes del plasma sanguíneo se mantienen en concentraciones con pequeñas variaciones gracias a varios mecanismos de regulación que suavizan las fluctuaciones de la composición, lo que constituye una necesidad dada la intermitencia de los períodos de alimentación de los humanos.

La velocidad a la cual la sangre transporta nutrientes a través de varios órganos es relativamente elevada en comparación con el ritmo de su metabolismo; contrariamente, la fracción extraída de la sangre, de un determinado nutriente, durante un solo "paso" por la mayoría de los órganos, es relativamente pequeña (2).

La medición de las concentraciones de componentes específicos del plasma sanguíneo y de la orina es extraordinariamente importante en medicina, puesto que permite vislumbrar la naturaleza de las alteraciones metabólicas y la efectividad de las medidas terapéuticas.

En los exámenes quimicoclínicos habituales se trabaja exclusivamente con sangre venosa o capilar y sólo en casos especiales es preciso obtener sangre arterial para las

correspondientes determinaciones. Kaplan y colaboradores compararon las concentraciones de colesterol, cloro, glucosa, sodio, potasio, urea, calcio, fósforo; proteínas totales y albúmina en sangre venosa y capilar, encontrando que sólo los valores de glucosa eran inferiores en la primera; en todas las demás sustancias no existen diferencias demostrables (12), por lo cual el tipo de sangre utilizada carece de significado para las siguientes sustancias: colesterol, sodio, potasio, cloro, urea, proteínas totales, calcio, albúmina y fósforo. En el caso de la glucosa hay que esperar valores más bajos en la sangre venosa que en la capilar (hasta 22 mg/100 ml) (1).

Con frecuencia se plantea el interrogante de si para el examen de determinadas sustancias es necesaria la extracción de sangre en ayunas o, dicho de otro modo, si la ingestión alimenticia ejerce alguna influencia significativa sobre sus concentraciones sanguíneas. Annino y Reiman (13) investigaron las concentraciones de urea, glucosa, bicarbonato, cloro, sodio, potasio, creatinina, proteínas totales, colesterol, calcio, fósforo y ácido úrico en 32 personas sanas, en ayunas y 45 y 120 minutos después del desayuno. En el caso del fósforo se observó una pequeña caída 45 minutos después de la ingesta alimenticia, la concentración de glucosa presentó grandes dispersiones hacia arriba en los valores registrados de un individuo a otro cuando la determinación se realizó después de ingerir alimentos. Otros metabolitos que presentan variación en las concentraciones san-

guíneas son el colesterol y los triglicéridos; por lo cual, para realizar la determinación de cualquiera de los metabolitos mencionados, la muestra de sangre deberá tomarse en ayunas (10-12 horas de ayuno total) (1).

Se puede aceptar que no es necesaria la extracción de sangre en ayunas cuando se desea determinar urea, bicarbonato, cloro, sodio, potasio, creatinina, proteínas totales, calcio y ácido úrico, ya que en estos casos no se presentó diferencia alguna en los valores registrados en ayunas, 45 y 120 minutos después de la ingesta alimenticia.

La utilización de plasma en lugar de suero tiene la ventaja de que la hemólisis producida durante la extracción, coagulación y transporte de la sangre es mucho menor. La disminución del peligro de hemólisis así como la posibilidad de centrifugación sanguínea son ventajas sustanciales en favor de la utilización del plasma. La utilización de sangre entera en lugar de plasma o suero sólo es admisible en el análisis de los eritrocitos y cuando en el plasma existen concentraciones aproximadamente iguales de la substancia que hay que determinar. Sin embargo, el suero tiene la ventaja de no presentar interferencia con los anticuagulantes para llevar a cabo la determinación.

Para realizar la determinación con los métodos enzimáticos que proponemos, lo ideal es utilizar suero en lugar de plasma

por lo que no es necesario adicionar a la muestra substancias anticoagulantes, a excepción de que no se cuente con el tiempo necesario para que el coágulo se retraiga, en este caso se podrá agregar heparinato de amonio como anticoagulante de elección, o ácido etilendiamintetraacético.

La acción inhibidora de la heparina sobre el proceso de coagulación es compleja y transcurre escalonadamente; inhibe la activación de la protrombina a trombina, la transformación del fibrinógeno en fibrina por acción de la trombina y finalmente es un factor estabilizador plaquetario. Como anticoagulante lo más conveniente es el empleo de 75 U de heparina por ml de sangre (aproximadamente 0.75 mg/ml) (1)(5).

El ácido etilendiamintetraacético (EDTA) forma un complejo con el calcio, que es la base de su efecto anticoagulante. Lo más frecuente es la utilización de 1 mg de su sal disódica (dihidratada) por ml de sangre.

En la conservación de la sangre siempre existe el peligro de que se produzca el catabolismo glucolítico del azúcar por los eritrocitos y leucocitos presentes en la sangre entera, pudiendo prevenirse este proceso mediante la separación inmediata del plasma o la del suero inmediatamente después de que se retraiga el coágulo. La separación inmediata se realiza centrifugando la sangre después de los 60 minutos siguientes a su extracción.

Después de centrifugar, el suero se pasará a un nuevo tubo; con este procedimiento la concentración de glucosa permanece estable como mínimo 24 horas si se conserva a 4°C (1). De ciertas investigaciones se desprende que la concentración de glucosa en plasma o suero conservados en condiciones de perfecta esterilidad permanece constante durante largo tiempo (23).

En el caso de la determinación de glucosa, en algunas ocasiones es necesario agregar al suero una substancia que funcione como conservador, como los fluoruros, para evitar la glucólisis de los eritrocitos, pero solo cuando se espera que la muestra tenga una concentración de leucocitos por arriba de lo normal, ya que los fluoruros inhiben muchas enzimas.

Si se conserva el suero que fué centrifugado inmediatamente después de ser extraída la sangre, a temperatura ambiente no se presenta modificación alguna de los metabolitos y enzimas. A 4°C y en recipiente cerrado, el suero o plasma pueden ser conservados hasta 24 horas sin que se presenten modificaciones. Si es necesario conservarlos por más tiempo es necesario congelarlos o liofilizarlos (1) (5).

Se encontró que en el plasma estacionado a 25°C se producen en las primeras 24 horas modificaciones en la concentración de sus componentes, que pueden caracterizarse como relativamente pequeñas: permanecen sin alteraciones el sodio, potasio, cloro

fosfato, colesterol y urea; aumentan el hierro, calcio y creatinina; descienden las concentraciones de bilirrubina directa y ácido úrico (14).

El plasma o suero contiene aproximadamente 93% de agua y la sangre completa alrededor de 81%.

Frecuentemente, para la ejecución de determinados análisis químico clínicos, la muestra de plasma o suero debe ser previamente desproteinizada.

El método de desproteinización más usado es el de la precipitación de las proteínas como sales insolubles. El pH tiene un importante papel en todos los métodos de precipitación. Las proteínas poseen cargas eléctricas positivas y negativas, y el número de esas cargas depende del pH. En caso de pH fuertemente alcalino las proteínas se comportan como aniones con un exceso de cargas negativas, mientras que, por el contrario, en un medio fuertemente ácido se encuentran como cationes protéicos con un exceso de cargas eléctricas positivas. Entre los dos extremos mencionados se encuentra un pH que es típico para cada proteína, el cual constituye un punto isoeléctrico en el cual se iguala el número de cargas positivas y negativas; en este punto las proteínas poseen la mayor tendencia a precipitar.

Si el pH de una solución es inferior al punto isoeléctrico

de la proteína que se ha de precipitar, ésta se encuentra como cation y en consecuencia reaccionará con determinados aniones constituyendo compuestos salinos insolubles. Los aniones desproteinizantes más utilizados son el picrato, molibdato, tungstato, sulfosalicilato, metafosfato, perclorato y tricloroacetato; comunmente se usa tricloroacetato o tungstato.

Si el pH de la solución se encuentra por encima del punto isoeléctrico de las proteínas, éstas se encuentran como aniones, es decir, que pueden constituir sales insolubles con determinados cationes. Como cationes se utilizan los metales pesados como el zinc, mercurio, cadmio, uranio, hierro, cobre y plomo.

Se han desarrollado muchos métodos clínicos para determinar metabolitos en sangre, pudiendo encontrarse métodos sencillos en cuanto a equipo, técnicas y/o reactivos, así como los que requieren de una tecnología muy avanzada. Los métodos tradicionales utilizados para la determinación de glucosa, ácido úrico y colesterol se encuentran explicados en el capítulo dos dentro de las características de cada una de las sustancias; se observa que en general dichos métodos presentan la desventaja de ser poco específicos, pudiendo producirse resultados falsos por la presencia de ciertos productos metabólicos endógenos.

La necesidad de renovar los métodos de análisis químico-clínicos ha llevado al desarrollo de nuevos métodos, dentro de

los cuales los enzimáticos han probado ser de una gran exactitud y sencillez. Por lo anterior, las determinaciones enzimáticas se han transformado en un recurso diagnóstico absolutamente imprescindible en la medicina actual. Son múltiples las enfermedades en las que las determinaciones enzimáticas no pueden ser reemplazadas por otros procedimientos diagnósticos, y además constituyen uno de los ramos más modernos de la química clínica.

Todas las enzimas sin excepción son proteínas. Como toda proteína, son lábiles y propensas a su inactivación y desnaturalización. Mientras que la inactivación puede ser reversible, la desnaturalización es, en cambio, siempre irreversible. De ahí que las determinaciones enzimáticas deben llevarse a cabo, en principio, con la mayor rapidez posible. Las enzimas son extremadamente sensibles a la acción de los metales pesados, jabones, detergentes y ácidos. La limpieza insuficiente de la cristalería del laboratorio, especialmente de los recipientes de envío de las muestras, constituye una de las fuentes de error más frecuente en la determinación enzimática.

Las reacciones enzimáticas son sensibles a las modificaciones de la temperatura. Al ascender la temperatura hasta cierto límite, crece la actividad enzimática. Esta se duplica aproximadamente con un ascenso de 10°C o, expresado de otro modo, se comprueba un incremento del 10% en la actividad enzimática cuando la temperatura asciende 1°C . Las mediciones de la

temperatura deben ser controladas estrechamente y no deben apartarse más de 0.05°C del valor nominal (14). Se ha propuesto medir las enzimas de uso clínico a temperaturas estándares como 25, 30 y 37°C, contra cada una de las cuales se pueden esgrimir argumentos. La ventaja de las determinaciones a 37°C está en la gran diferencia de extinción por unidad de tiempo y en la mayor sensibilidad que de ello se deriva. Por esa razón se incrementa la frecuencia de los análisis realizados y se utilizan menores cantidades de muestra que a 25°C. Como desventaja de las mediciones a 37°C puede mencionarse la posibilidad de que ciertas enzimas, así como algunas coenzimas, se inactiven y desnaturalicen durante el tiempo que dura la reacción. Todas estas cuestiones fueron motivos de dudas y discusiones. En el año de 1973 la Asociación Escandinava de Química y Fisiología Clínica recomendó la realización de los exámenes a 37°C (15).

Los expertos en enzimas de la Comisión de Estandarización de la IFCC (International Federation on Clinical Chemistry) han recomendado provisionalmente los 30°C como temperatura de medición. Los documentos respecto a la temperatura definitiva, internacionalmente reconocidos, aún no se han concluido.

En el caso de los métodos de determinación que se proponen, se realizaron varias pruebas de temperatura con los reactivos, y se determinó cual era la más óptima para cada caso.

No existe ninguna regla fija para establecer el pH de una

reacción enzimática. En cada caso es necesario indagar experimentalmente cuál es la concentración de hidrogeniones óptima para la prueba. Para ello debe considerarse, ante todo, que la temperatura, la fuerza iónica, la presencia de activadores e inhibidores pueden tener una influencia substancial sobre el pH óptimo (16).

Es posible medir la concentración de un sustrato mediante su transformación enzimática; en éste caso, la enzima debe ser añadida en exceso de tal modo que bastante sustrato se transforme por unidad de tiempo. La medición enzimática del sustrato tiene la ventaja de que el metabolismo que hay que mensurar es el especialmente registrado. El desarrollo de la reacción debe plantearse de tal modo que la reacción se desenvuelva en un período de tiempo admisible; a éste método se le conoce como "método del punto final" (1).

TABLA 1. COMPONENTES PRINCIPALES DEL PLASMA SANGUINEO HUMANO NORMAL (2).

	Concentración aproximada mg/100 ml	
Proteínas (totales)	5800-8000	Regulación osmótica; transporte de ácidos grasos, bilirrubina, etc.
α_1, β, γ -globulinas	2800-3800	Transporte de lípidos, cobre y hierro; coagulación sanguínea; anticuerpos.
Lípidos (totales)	400-700	
Triglicéridos	100-250	Componentes de la ruta dirigida a los centros de almacenamiento o de oxidación.
Fosfolípidos	150-250	
Colesterol y sus ésteres	100-250	Metabolismo graso.
Ácidos grasos libres	8-20	Fuentes combustibles inmediatas para los músculos y el corazón.
Glucosa	50-100	Forma de transporte de glúcidos.
Aminoácidos	35-65	Precusores de la síntesis proteicas.
Urea	20-30	Producto de excreción del nitrógeno amoniacal.
Ácido Úrico	2-6	Producto final del catabolismo de las purinas.
Creatinina	1-2	Forma excretoria de la creatinina.
Láctato	8-17	Producto de la glucólisis en músculos y eritrocitos.
Piruvato	0.4-2.0	Producto de la glucólisis en músculos y eritrocitos.
β - hidroxibutirato	3-6	
Acetoacetato	0.8-2.0	Cuerpos cetónicos; formas de transporte de los grupos acetilo.
Bilirrubina	0.2-1.4	Producto de la degradación de la protoporfirina.
Componentes Inorgánicos	mequiv ⁻¹	
Na ⁺	140	
K ⁺	5	
Cl ⁻	100	
HCO ₃ ⁻	20	
Fosfato ⁻	4	

CAPITULO 1

**GENERALIDADES DE LAS SUBSTANCIAS A
DETERMINAR: GLUCOSA, ACIDO URICO Y
COLESTEROL**

1.1 GLUCOSA.

1.1.1 Características.

Químicamente, la glucosa es una aldohexosa en la que la forma aldehídica está en equilibrio con la forma enodíolica; sin embargo, a pH fisiológico el equilibrio se desplaza hacia la forma enodíolica caracterizada por sus propiedades reductoras. La forma aldehídica de la glucosa es muy inestable y en solución acuosa solo existe en muy pequeñas cantidades (Fig. 1).

1.1.2 Metabolismo de la glucosa.

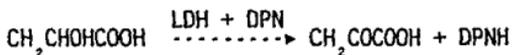
Las principales sustancias energéticas son los hidratos de carbono, y en forma secundaria también intervienen las grasas y proteínas. El grupo fisiológicamente más importante es el de las hexosas, de las cuales la más importante en el organismo humano es la glucosa; posteriormente se encuentran la galactosa y fructosa. Otros hidratos de carbono importantes son las pentosas, como la ribosa (presente en el RNA) y la desoxirribosa (presente en el DNA).

Al tubo digestivo llega una mezcla de monosacáridos libres resultantes de la digestión de oligosacáridos y polisacáridos.

los cuales son absorbidos por la mucosa del duodeno y la primera parte del intestino delgado. Después de su absorción, la glucosa circulante es captada y almacenada principalmente por el hígado, los músculos, y las células corporales; las células cerebrales solo captan la glucosa (sin almacenarla) para poder llevar a cabo su metabolismo. La glucosa entra al hepatocito libremente, por difusión a favor de un gradiente de concentración; para entrar a casi todas las demás células necesita de un portador activado por sodio, en especial a nivel de músculo, adiposo y tejido fibroso.

Dentro de la célula la glucosa puede seguir dos vías metabólicas principales, aerobia o anaerobia, según la cantidad de oxígeno disponible. El metabolismo anaerobio es el que se utiliza principalmente en el músculo, en el cual las exigencias del aumento de actividad con frecuencia sobrepasan el suministro inmediato de oxígeno. El ácido pirúvico se reduce a ácido láctico por acción de la deshidrogenasa del ácido láctico y del dinucleótido de difosfopiridina reducido.

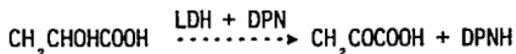
Cuando existe bastante oxígeno en la célula, el nucleótido de difosfopiridina conserva su forma oxidada, por lo que no puede reducir el ácido pirúvico a ácido láctico. En estas condiciones, la deshidrogenasa láctica cataliza la reacción opuesta:



los cuales son absorbidos por la mucosa del duodeno y la primera parte del intestino delgado. Después de su absorción, la glucosa circulante es captada y almacenada principalmente por el hígado, los músculos, y las células corporales; las células cerebrales solo captan la glucosa (sin almacenarla) para poder llevar a cabo su metabolismo. La glucosa entra al hepatocito libremente, por difusión a favor de un gradiente de concentración; para entrar a casi todas las demás células necesita de un portador activado por sodio, en especial a nivel de músculo, adiposo y tejido fibroso.

Dentro de la célula la glucosa puede seguir dos vías metabólicas principales, aerobia o anaerobia, según la cantidad de oxígeno disponible. El metabolismo anaerobio es el que se utiliza principalmente en el músculo, en el cual las exigencias del aumento de actividad con frecuencia sobrepasan el suministro inmediato de oxígeno. El ácido pirúvico se reduce a ácido láctico por acción de la deshidrogenasa del ácido láctico y del dinucleótido de difosfopiridina reducido.

Cuando existe bastante oxígeno en la célula, el nucleótido de difosfopiridina conserva su forma oxidada, por lo que no puede reducir el ácido pirúvico a ácido láctico. En estas condiciones, la deshidrogenasa láctica cataliza la reacción opuesta:



El ácido pirúvico es luego descarboxilado por condensación con el ácido lipoico, produciendo bióxido de carbono y ácido lipoico acetilado. Este último se combina con la coenzima A para dar acetil-CoA que finalmente se integra al ciclo de Krebs (Fig. 3).

Aproximadamente dos tercios de la glucosa libre que entra en el hígado penetra en sus células y resulta fosforilada a glucosa-6-fosfato por la hexoquinasa; el resto de la glucosa se vierte en la sangre sistémica. Los otros monosacáridos, tales como la D-galactosa y la D-manosa, son fosforilados en el hígado y después transformados en glucosa-6-fosfato (3).

La mayor parte de la glucosa-6-fosfato se transforma intracelularmente y sigue el camino de la glucogénesis acumulándose como glucógeno hístico, ocurriendo ésto cuando el suministro de glucosa es superior a las necesidades inmediatas del organismo, o bien se utiliza para la liberación de energía a través de su catabolismo, primero a través del proceso de glucólisis y luego por medio del ciclo del ácido cítrico (Fig. 3) (2).

El hígado puede almacenar de 5 a 6 % de su propio peso de glucógeno (el músculo casi 1%) (70).

La sangre circulante no contiene más azúcares sencillos que la D-glucosa y pequeñas cantidades de D-fructosa; dichos azúcares

son transportados desde la sangre a través de la membrana plasmática de las células musculares y adiposas por acción de la insulina, produciéndose una reducción en los niveles sanguíneos de glucosa (1).

Son múltiples las hormonas que contribuyen a regular los niveles del azúcar en sangre, y en el mecanismo de esa regulación entran en acción, además de la insulina (hormona esencial), el glucagón, la somatotropina hipofisiaria, los glucocorticoides y la adrenalina (4).

La adrenalina produce un aumento rápido de la glucosa sanguínea por activación de la fosforilasa que desdobla el glucógeno. Esta activación tiene lugar a través de la unión del fosfato con la fosforilasa y se acompaña de una disminución del fosfato en sangre. El glucagón tiene un efecto similar, sin embargo, la adrenalina eleva también el lactato sanguíneo al desdoblar el glucógeno muscular. La hormona tiroidea facilita la glucogenólisis hepática, aumentando así el azúcar sanguíneo, pero eleva también la utilización de glucosa por las células tisulares. La utilización de la glucosa aumenta considerablemente por efecto de la insulina, probablemente porque ésta facilita la penetración de la glucosa a las células. Cuando no existe bastante insulina penetra menos glucosa a la célula, aumenta la glucogenólisis hepática, disminuye la oxidación de carbohidratos y se eleva la producción de cuerpos cetónicos.

Bajo una dieta normal, la mayor parte de la glucosa se convierte en glucógeno o glucosa sanguínea. Una porción relativamente pequeña se oxida por completo, puesto que es la oxidación de los ácidos grasos y de los aminoácidos la que proporciona la mayor parte del ATP que el hígado requiere. La mitad aproximadamente de la glucosa que experimenta degradación en el hígado, penetra en la ruta del fosfogluconato, que es el responsable de la generación del NADPH que hace falta como agente reductor en la biosíntesis de los ácidos grasos (2).

Normalmente el organismo no excreta glucosa ; ésta pasa libremente al filtrado glomerular, en donde alcanza la misma concentración que en la sangre, pero en condiciones fisiológicas se reabsorbe por completo por el epitelio tubular, a razón de 125 mg por minuto en promedio. Si no fuera así, se perderían cada día por la orina casi 200 g de glucosa. Por lo tanto, si la tasa de filtración o el riego sanguíneo del riñón disminuyen, puede no presentarse glucosuria a pesar de que existan en sangre cantidades muy altas de glucosa.

1.1.3 Importancia de su determinación en sangre.

El diagnóstico de los trastornos del metabolismo de los hidratos de carbono se apoya en parte en la medición de la

glucosa plasmática, ya sea en ayunas o tras estimulación o pruebas de supresión. La sangre venosa es la muestra de elección para el análisis de glucosa, pero en niños y otros pacientes en los que la punción venosa resulte difícil puede utilizarse sangre capilar (8).

Los valores normales de la concentración de glucosa en sangre son de 50 a 100 mg/100 ml, 2.78 a 5.55 mmol/l (5).

La región límite está considerada dentro de 100 a 130 mg/100 ml, 5.55 a 7.22 mmol/l (5).

La región patológica es menor de 50 mg/100 ml en una hipoglucemia, y mayor de 130 mg/100 ml en una hiperglucemia. Los resultados en las determinaciones de niveles de glucosa sanguíneos dependen de los siguientes factores: 1) Utilización de sangre entera, plasma o suero, 2) utilización de sangre capilar o venosa, 3) de la eventual ejecución de una desproteínización y, 4) por el método utilizado; por las razones anteriores no se pueden indicar normas absolutamente válidas para la determinación de glucosa en sangre, en ayunas. Por lo anterior las cifras dadas deben interpretarse como "valores de referencia" que han sido obtenidos de los tres tipos de métodos de determinación: de las sustancias reductoras, de los hidratos de carbono totales y enzimática de la glucemia (1).

Durante el ayuno los niveles de glucosa se mantienen dentro

de los límites normales gracias a la desintegración del glucógeno de reserva, y en ayunos prolongados a la síntesis de nueva glucosa a partir de la gluconeogénesis (2).

En la tabla 2 se indican los valores de referencia representativos, procedentes de una investigación realizada con el método de la glucosaoxidasa en plasma venoso y capilar sin desproteinización previa (1).

Los resultados de la glucosa plasmática pueden clasificarse como hiperglucémicos o hipoglucémicos, aunque dichas definiciones son arbitrarias.

La sospecha clínica de diabetes se confirma al encontrar glucosa en la orina y al descubrir un contenido muy elevado de glucosa en la sangre. La prueba más sencilla consiste en obtener una prueba de orina uno o dos horas después de una comida rica en hidratos de carbono. Sin embargo, en personas de edad avanzada con un elevado umbral renal, puede haber elevación de la glucosa sanguínea sin glucosuria; además, el encontrar azúcar en la orina no es por sí solo un signo diagnóstico de diabetes, sino que indica glucosuria renal. Por lo tanto, la determinación de la glucosa sanguínea no sólo es preferible como procedimiento de elección, sino que resulta indispensable para establecer el diagnóstico de diabetes (4)(6)(7).

A) Hiperglucemia:

Existe una larga lista de enfermedades y síndromes que se asocian con un nivel elevado de glucosa plasmática en ayunas.

El tipo más importante de hiperglucemia es la Diabetes. El conocimiento de la Diabetes es importante por su gran frecuencia; se calcula que hay unos 200 millones de diabéticos en el mundo. La Diabetes es, después de la obesidad, el segundo transtorno metabólico más común (69).

La Diabetes es más frecuente en personas mayores.

El tratamiento de la Diabetes ha aumentando notablemente, por lo que la esperanza de vida para los diabéticos es mayor, aumentando con ésto el número de diabéticos en el mundo y el número de personas que heredarán el gen diabético. La obesidad es un fenómeno creciente en todo el mundo debido a la industrialización de los alimentos, la cual contribuye a que haya más diabéticos en potencia. Otro factor muy importante que influye en el desarrollo de la enfermedad es el ritmo de vida moderno que ocasiona un estrés permanente.

La Diabetes mellitus es una enfermedad crónica caracterizada por concentraciones plasmáticas de glucosa anormalmente elevadas, glucosuria (presencia de glucosa en la orina) y engrosamiento de las membranas basales de los capilares. Los sujetos tienen un elevado riesgo de ceguera, nefropatía, vasculopatía periférica y

cardiopatía (8).

La Diabetes tiene componentes metabólicos y vasculares, ambos interrelacionados. El síndrome metabólico está caracterizado por una elevación excesiva e inapropiada de la glucosa sanguínea, acompañado de alteraciones en el metabolismo de los lípidos y las proteínas, de todo lo cual la causa es una falta relativa o absoluta de insulina (4).

La Diabetes Mellitus se divide clínicamente en dos grupos: la insulino dependiente y la insulino independiente. Los pacientes con Diabetes Mellitus insulino dependientes presentan la enfermedad en su juventud (generalmente antes de los 30 años), y rápidamente aparecen los trastornos, con remisiones ocasionales y episodios de cetosis. Por el contrario, los sujetos con Diabetes Mellitus insulino independientes suelen ser obesos; en estos casos, la enfermedad aparece después de los 40 años, el comienzo es insidioso y la cetosis rara (8).

La insulina es secretada en respuesta de la hiperglucemia y estimula la síntesis del glucagón (hormona secretada por el páncreas en respuesta a la hipoglucemia) e inhibe su degradación, tanto en el hígado como en el músculo; sin embargo, su mecanismo de acción no ha sido todavía bien dilucidado, se cree que un paso determinante de la regulación puede ser la activación de la fosfoproteína fosfatasa, lo que conduce a la estimulación de la glucogénesis (3).

Respecto a los tipos de Diabetes, se aplica la siguiente clasificación etiológica:

- 1) Diabetes genética, que se subdivide según la edad de aparición en Diabetes juvenil y del adulto.
- 2) Diabetes pancreática, en la que hay intolerancia a los hidratos de carbono y no hay producción de insulina.
- 3) Diabetes endócrina, cuando se acompaña de endocrinopatías.
- 4) Diabetes iatrogénica, cuando es precipitada por la administración de corticosteroides, ciertos diuréticos o por la combinación de estrógenos-progesterona (7).

El mantenimiento de una concentración sanguínea constante de glucosa es uno de los elementos fundamentales de la homeostasia. La concentración de glucosa en sangre en cualquier momento refleja el equilibrio de dos grupos de procesos fisiológicos: 1) los que tienden a aumentar la concentración de glucosa en sangre por a) absorción de los carbohidratos ingeridos, b) formación de carbohidratos a partir de fuentes no hidrocarbonadas (gluconeogénesis) y, c) movilización de la glucosa de los depósitos o reservas de glucógeno, y 2) los que tienden a disminuir la concentración de glucosa en sangre mediante la utilización de glucosa por los tejidos muscular, adiposo, cerebral, hepático, etc.

B) Hipoglucemia:

La hipoglucemia se define como un síndrome caracterizado por bajos niveles plasmáticos de glucosa en asociación con un grupo de síntomas que se alivian con la ingesta de alimentos o hidratos de carbono. Los niveles plasmáticos de glucosa tras el ayuno nocturno inferiores a 45 mg/dl (2.5 mmol/l S.I.) resultan claramente patológicos, mientras que los superiores a 55 mg/dl (3 mmol/l S.I.) suelen considerarse "normales". Durante la primera semana de vida, la hipoglucemia viene definida por concentraciones plasmáticas de glucosa inferiores a 25 mg/dl (1.4 mmol/l S.I.) en el caso del recién nacido prematuro o de bajo peso al nacer. En el recién nacido a término, los valores de glucosa son inferiores a 35 mg/dl (1.9 mmol/l S.I.) desde el momento del nacimiento hasta las 72 horas de vida, a partir de entonces los valores inferiores a 45 mg/dl (2.5 mmol/l S.I.) se consideran representativos de hipoglucemia (4).

En adultos se presentan dos grupos diferentes de síntomas, dependiendo de que la hipoglucemia sea aguda o crónica. Cuando la hipoglucemia se presenta rápidamente, los mecanismos homeostáticos ponen en marcha la liberación de adrenalina y aparecen sudoración, inestabilidad, temblores, debilidad y ansiedad. Si la reducción de la glucosa en plasma se produce lentamente, predominan el dolor de cabeza, irritabilidad, letargia y otros síntomas propios del sistema nervioso central (4)(7).

Las informaciones divulgadas en los medios de comunicación han llevado al público en general a creer que la hipoglucemia está extremadamente difundida, pero que con frecuencia no es detectada. Una declaración sobre la hipoglucemia realizada por la American Diabetes Association y otras sociedades médicas llega a la conclusión de que tales afirmaciones carecen de fundamento. Sin embargo, muchos pacientes continúan presentándose con un autodiagnóstico de hipoglucemia. En estos casos es importante que, si tras el oportuno estudio diagnóstico no se confirma la hipoglucemia, el paciente quede convencido de que su idea inicial era errónea. Sin embargo, si se confirma la presencia de hipoglucemia, es esencial realizar una investigación determinante de su origen.

El etanol y otros fármacos representan otras causas de hipoglucemia. La hipoglucemia inducida por etanol sólo ocurre después de una ingestión de alcohol prolongada y cuando se reduce simultáneamente el suministro hepático de glucógeno. Las causas más corrientes de hipoglucemia inducida por fármacos son los agentes hipoglucémicos (sulfonilureas, insulina, etc.), que representan más de la mitad de las causas inducidas por fármacos: salicilatos, sulfamidas, propanolol o una combinación de éstos. La hipoglucemia ficticia es otro fenómeno que puede no producirse en relación con las comidas.

Los insulinomas u otros tumores, tales como mesoteliomas,

carcinomas hepáticos, tumores adrenocorticales y carcinomas gastrointestinales pueden provocar hipoglucemia. La hipoglucemia provocada por tumores suele ser profunda y persistente. Aproximadamente, entre el 30% y 50% de los tumores, como por ejemplo, grandes tumores del mesénquima, hepatomas y carcinomas cortico-suprarrenales, producen sustancias insulinoideas que provocan hipoglucemia (8).

La causa más importante de la hipoglucemia espontánea es la secreción excesiva e inapropiada de insulina por los tumores, denominados insulinomas, ocurren a cualquier edad, aunque resultan más corrientes entre la cuarta y sexta décadas. Las diversas características clínicas asociadas con estos tumores son debidas a la hipoglucemia que inciden. El diagnóstico de hipoglucemia debe establecerse utilizando los criterios conocidos como triada de Whipple: 1) ataques hipoglucémicos precipitados por el ayuno, 2) nivel de glucosa en el plasma inferior a 40 mg/dl (2.2 mmol/l S.I.) durante el ataque y 3) alivio rápido de los síntomas por administración de glucosa. Aproximadamente el 80% de los insulinomas son benignos, un 10% múltiples y otro 10% malignos. Se ha descrito que los insulinomas malignos producen ciertas hormonas, que incluyen ACTH y glucagón (7) (8).

1.1.4 Métodos de determinación.

El fundamento de los primeros métodos químicos para la

determinación cuantitativa de la glucosa se basa en la fácil oxidación que caracteriza a la forma enólica de la glucosa. Sin embargo, éstos métodos de reducción no registran solo la glucosa, sino también todos los demás azúcares reductores existentes y otras sustancias como la creatina, creatinina, ácido úrico, glutatión y ácido ascórbico. Por esta inespecificidad los métodos de reducción no deberían utilizarse para las determinaciones cuantitativas de glucosa en sangre, sin embargo, pruebas cualitativas en las que la reducción se lleva a cabo con solución de Fehling o de Benedict son aún importantes para demostrar la presencia de niveles altos de glucosa; lo mismo puede decirse de la tabletas y tirillas clínicas de prueba (1).

Nuevamente, la principal desventaja de todas las pruebas cualitativas de reducción reside (al igual que en los métodos cuantitativos de determinación) en su poca especificidad. Pueden producirse resultados positivos falsos por la presencia de ciertos productos metabolitos endógenos, pero muy especialmente por la acción de ciertos medicamentos como el ácido ascórbico, tiamina, penicilina, ácido para-aminobenzoico, estreptomycin, isoniacida, y tetraciclina (1)(5)(11). Las pruebas de reducción deberían utilizarse sólo en aquellos casos en los que se sospecha la existencia de niveles altos en la sangre de cualquier clase de azúcar, exceptuando la glucosa.

Los métodos utilizados para la determinación de los hidratos

de carbono totales se basan en la formación de derivados típicos de los monosacáridos, cuya coloración posibilita una posterior evaluación fotométrica.

Si se calienta la glucosa en presencia de ácidos fuertes se origina un derivado de furano con desprendimiento de agua (Fig. 2). El hidroximetilfurfural así constituido puede condensarse por calentamiento con ciertos fenoles orgánicos, y originar así sustancias intensamente coloreadas determinables fotométricamente. Tampoco este método es específico para la glucosa, dado que otras hexosas, como la fructosa y galactosa pueden constituir furfurales al ser calentadas con ácidos fuertes y fenoles orgánicos. Por otra parte, teniendo en cuenta que el calentamiento ácido de los polisacáridos (inulina, glucógeno, almidón) los hidroliza a monosacáridos, el procedimiento termina siendo apropiado para la determinación de los carbohidratos totales.

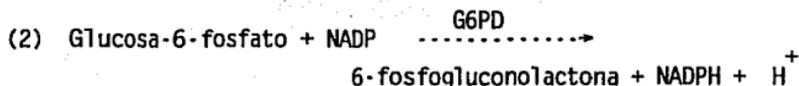
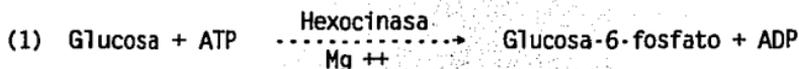
La determinación de azúcares sanguíneos con aminas aromáticas es un método cromogénico que se usa actualmente para la evaluación de las aldosas, dado que es un procedimiento de ejecución relativamente sencillo. En esta técnica la glucosa es calentada en presencia de ácido acético glacial y se condensa con anilina o con orto-toluidina, dando lugar a la formación de glucosilamina. Probablemente el producto de la reacción es una mezcla de glucosilamina y la correspondiente base de Schiff en interequilibrio; el método tiene la desventaja de que además de

La glucosa también otros azúcares, como la fructosa, manosa y galactosa, originan diversas cantidades de cromógeno (1). La galactosa y la manosa reaccionan por igual, mientras que la lactosa, la maltosa, la sacarosa y la fructosa lo hacen con mucho menor intensidad (8).

Las determinaciones enzimáticas de la glucosa sanguínea registran exclusivamente los niveles de glucosa, y son preferibles cuando se requiere de una determinación exacta (1).

Una aproximación muy útil a la metodología de la determinación de la glucosa ha sido el método del electrodo glucosa-oxidasa-oxígeno. En este método, la reacción de la glucosa con el oxígeno es monitorizada mediante un electrodo sensible a éste, mientras que el peróxido de hidrógeno generado se elimina por reacción con el etanol y yodo. Evaluando la tasa de consumo de oxígeno puede determinarse con precisión la glucosa. Este método resulta preciso, lineal y carece de interferencias notables.

Se ha postulado un método con hexocinasa, que proporciona un elevado grado de especificidad para la determinación de glucosa; tal procedimiento ha sido propuesto como método de referencia para la determinación de glucosa, y en él, ésta se mide cuantificando la formación de NADPH a partir de las siguientes reacciones:



El principal inconveniente de la hexocinasa lo constituye su costo, pero sin duda es el método con mayor precisión (8).

El método enzimático que utiliza glucosa oxidasa y peroxidasa es uno de los más accesibles; en este método la glucosa oxidasa cataliza la oxidación de la glucosa en ácido glucónico y peróxido de hidrógeno, el cual, en presencia de peroxidasa, produce la copulación oxidativa de la 4-aminofenazona y el 2,4-diclorofenol para formar un cromógeno color rojo cereza. Este método se explicará más adelante.

Fig. 1

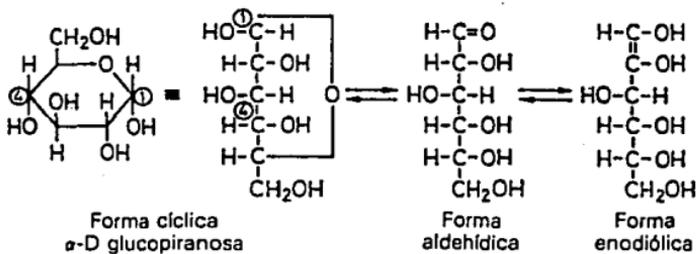


Fig. 2

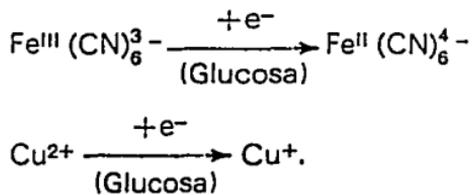


Tabla 2

**Concentración de glucosa en ayunas en plasma capilar y venoso;
determinación con la glucosa oxidasa/peroxidasa sin desproteinización; en mg/100 ml (36)**

	Edad	Plasma capilar				Plasma venoso				
		n = 20		Región de referencia		n = 20		Región de referencia		
		\bar{x}	s	$\bar{x} \pm$	2 s	\bar{x}	s	$\bar{x} \pm$	2 s	
Recién nacidos.	6 horas	32,2	13,13	5,94	58,46					
	5 días	44,1	15,63	12,84	75,36					
Niños	1-2 años	72,0	19,75	32,5	111,5	63,3	13,02	37,3	89,4	
	3-4 años	75,1	11,53	52,0	98,2	65,4	7,60	50,2	80,6	
	5-6 años	78,9	4,96	69,0	88,8	67,9	3,30	61,3	74,5	
	7-9 años	81,8	7,48	66,8	96,8	69,7	4,92	60,0	79,7	
	10-12 años	80,2	9,22	61,8	98,6	68,7	6,22	56,0	80,9	
	13-15 años	78,2	7,68	62,8	93,6	72,4	5,10	57,2	77,6	
	16-20 años	82,4	4,97	72,5	92,4	70,1	3,30	63,6	76,7	
Adultos	Hombres	21-30 años	79,5	5,06	69,4	89,6	68,3	3,32	61,6	74,9
	Mujeres	21-30 años	83,4	5,20	73,0	93,8	70,7	3,40	64,0	77,6
	Hombres	31-50 años	83,6	7,55	68,5	98,7	71,0	4,97	61,0	80,9
	Mujeres	31-50 años	83,8	7,68	68,4	99,2	71,1	5,07	60,9	81,2
	Hombres	51-80 años	84,3	8,58	67,1	101,5	71,5	5,62	60,2	82,7
	Mujeres	51-80 años	83,5	8,19	67,1	99,9	70,9	5,40	60,1	81,7
Adultos	20-80 años	83,0	7,04	68,9	97,1	69,8	4,58	60,6	78,9	
		n = 120				n = 120				

1.2 ACIDO URICO.

1.2.1 Características.

El ácido úrico es el principal producto del catabolismo de las purinas en el hombre. Se forma por la acción de la enzima xantina-oxidasa sobre las purinas (adenina y guanina), que son compuestos heterocíclicos con carácter aromático; éstas están constituidas por un anillo de pirimidina y otro de imidazol condensados (Fig. 5). Las bases nitrogenadas purínicas y pirimidicas forman parte de los nucleótidos, unidades estructurales del DNA y RNA (desoxirribonucleótidos y ribonucleótidos respectivamente). Un nucleótido está formado por una base nitrogenada heterocíclica, una pentosa y una molécula de ácido fosfórico (3) (8).

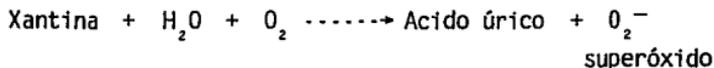
La purina se puede considerar como un derivado de la pirimidina; está constituida por un anillo de pirimidina y otro de imidazol. Las bases nitrogenadas principales que se encuentran en los nucleótidos son tres derivados de la pirimidina, el uracilo, la timina y la citosina; y dos derivados de la purina, la adenina y la guanina (Fig. 5). En forma libre o no combinada estas bases se encuentran solamente en cantidades mínimas o trazas en las células, generalmente como productos de la hidrólisis enzimática de los ácidos nucleicos y de los nucleótidos (2).

El ácido úrico es un ácido débil con pKa1 de 5.75 y pKa2 de 10.3; en consecuencia, este ácido existe al pH de los líquidos corporales casi totalmente en forma de anión urato; parece ser que la unión del urato a las proteínas del plasma es mínima (8).

1.2.2 Metabolismo del ácido úrico.

La mayor parte del ácido úrico en el hombre proviene del catabolismo de la guanina. El desdoblamiento de la adenina es poco intenso, y gran parte de esta base parece excretarse sin alteraciones en la orina (70).

El producto final de la degradación de las purinas en el hombre es el ácido úrico. Las purinas principales, adenina y guanina, se convierten primero en xantina, la cual es entonces oxidada a ácido úrico por la flavoproteína xantin-oxidasa. La mayor parte de la formación del ácido úrico tiene lugar en el hígado, el cual presenta gran actividad de la enzima xantin-oxidasa, al igual que la mucosa intestinal de acuerdo con la siguiente reacción (2):



En muchos mamíferos, incluyendo al humano, el producto final

de la degradación de las bases púricas de los ácidos nucleicos (purinas), es el ácido úrico.

La mayoría de los nucleótidos producidos por la hidrólisis de los ácidos nucleicos, se cataboliza para formar la pentosa, el fosfato y la base correspondiente (Fig. 6), como se explica a continuación:

1. La adenilato desaminasa cataboliza la desaminación del C-6 del residuo de adenina, dando origen a la formación de inosina 5' monofosfato.

2. La siguiente reacción consiste en la pérdida del fosfato por medio de hidrólisis. La reacción es catalizada por la enzima fosfo-monoesterasa correspondiente; los productos de esta reacción son los nucleósidos guanosina o inosina.

3. El siguiente paso consiste en el rompimiento de la unión entre la pentosa y la base nitrogenada, por medio de una fosforólisis. La reacción es catalizada por la enzima purina-nucleósido-fosforilasa correspondiente, dando como productos a la hipoxantina o a la guanina y ribosa-1-fosfato.

4. La guanina pierde su grupo amino por medio de la enzima guanasa, dando origen a la xantina.

5. La hipoxantina es oxidada por la xantina oxidasa, dando xantina. La misma enzima también oxida a la xantina, para dar el ácido úrico, producto final de esta vía.

Esta enzima es una metaflavoproteína, que contiene flavin adenin dinucleótido en su forma oxidada (FAD) como coenzima, y

que requiere iones molibdeno y hierro no proveniente de la sangre. Los electrones del sustrato retienen al molibdeno, FAD y hierro. El aceptor final de electrones es el oxígeno; los productos de ésta reacción son el peróxido y el ácido úrico (3) (2).

Los ácidos nucleicos ingeridos por el hombre experimentan hidrólisis enzimática en el intestino por acción de las nucleasas secretadas por el páncreas. Los nucleótidos resultantes de dicha degradación sufren a su vez una hidrólisis enzimática para rendir finalmente las bases purínicas y pirimídicas libres. Si no son recuperadas y reutilizadas, las bases libres son degradadas y sus productos finales excretados. Un adulto medio en un período de 24 horas, sometido a una dieta reducida en purinas, excretará aproximadamente entre 275 y 600 mg de ácido úrico, lo cual representa una cantidad algo menor que la formada por el metabolismo endógeno. Es probable que la mayor parte de la totalidad de la excreción restante de ácido úrico tenga lugar a través de las secreciones biliares, pancreáticas y gastrointestinales con posterior degradación por la flora intestinal. Los tejidos humanos tienen una capacidad uricolítica muy limitada (8).

La solubilidad máxima del ácido úrico en plasma es de 8.5 a 8.8 mg/100 ml, y a un pH de 7.4 aproximadamente el 98% del ácido úrico total se encuentra bajo su forma de sal monoalcalina. Sin embargo, se observan con frecuencia concentraciones estables

superiores a las indicadas, cuestión atribuible al hecho de que la solubilidad del ácido úrico en plasma depende, entre otros factores, de la interacción entre el catabolito y ciertas macromoléculas séricas. Experimentos realizados in vitro han señalado que entre estas últimas se encontrarían la seroalbúmina y una glucoproteína (9).

Normalmente, aproximadamente el 25% del ácido úrico plasmático se encuentra en correlación con las mencionadas macromoléculas, y en ciertas formas de gota primaria parecen subyacer alteraciones de las globulinas ultrafijadoras (8).

El ácido úrico se encuentra también presente en los glóbulos rojos y en condiciones de equilibrio su concentración eritrocitaria es aproximadamente la mitad de la plasmática. Debido a su mala solubilidad en los líquidos orgánicos, el ácido úrico es un catabolito potencialmente peligroso capaz de conducir a la constitución de formaciones cristalinas (1).

Los valores normales del ácido úrico en plasma son, para hombres: 3.4 a 7.0 mg/dl (0.20 a 0.42 mmol/l S.I.) y para mujeres: 2.4 a 5.7 mg/dl (0.14 a 0.34 mmol/l S.I.) (70).

Los valores de la concentración de ácido úrico sérico pueden estar sujetos en los distintos individuos a variaciones genéticas y a las determinadas por el medio. Muchos estudios

realizados en distintas zonas han demostrado que también existen apreciables variaciones en diferentes regiones étnicas y sociales. Junto a los factores genéticos también se encuentra la edad y el sexo de los individuos investigados. Los recién nacidos muestran valores algo superiores a los del adulto, pero dentro del primer año de vida sus cifras se igualan. Con toda seguridad el hombre posee (en promedio) concentraciones de ácido úrico superiores a las de la mujer, pero esta diferencia entre los sexos depende también de la edad, ya que se observa que al aumentar la edad del hombre, su uricemia decrece, mientras que sucede exactamente lo contrario en la mujer, en la que pasada la menopausia los valores de ácido úrico en sangre son prácticamente idénticos en ambos sexos (10) (1) (5).

En un mismo individuo son observables diferencias de un día para otro de aproximadamente 0.5 mg/100 ml; se ha demostrado también la existencia de un ritmo diario siendo los valores nocturnos más bajos que los diurnos (10) (5).

Las cifras de la uricemia están significativamente influenciadas por el tipo de alimentación. Así, por ejemplo, una dieta libre de purinas puede conducir a un descenso del ácido úrico en sangre de hasta 0.8 mg/100 ml y, por el contrario, con una dieta rica en la mencionada base se observan excreciones urinarias de ácido úrico superiores a 800 mg diarios. Por su parte la actividad física también influye en los niveles de ácido

úrico en la sangre; bajo condiciones de trabajo muscular intenso, la uricemia puede ascender alrededor de 2.5 mg/100 ml y simultáneamente aumentar la excreción urinaria del catabolito. También se comprueba algo similar en casos de esfuerzos exagerados mentales y psíquicos (1) (7).

La excreción urinaria del ácido úrico depende del contenido purínico de la dieta ingerida. El ácido úrico filtrado por el glomérulo renal experimenta una parcial reabsorción tubular; por otra parte, el catabolito es también excretado por el túbulo y en parte reabsorbido nuevamente. Como regla general puede considerarse que un adulto sano sometido a una dieta normal excreta no más de 250 a 700 mg cada 24 horas (6).

Los tres principales reguladores de la concentración plasmática del ácido úrico son: (Fig. 7)

- 1) La síntesis y el catabolismo endógenos de los derivados de las purinas.
- 2) La ingesta exógena de purinas.
- 3) La eliminación renal de los uratos.

1.2.3 Importancia de su determinación en sangre.

Numerosas enfermedades, alteraciones fisiológicas, cambios bioquímicos e incluso factores sociales y de comportamiento se

asocian a modificaciones de la concentración del ácido úrico en el plasma. El aumento de la concentración sérica del ácido úrico es mucho más frecuente y clínicamente más significativo que su disminución (8).

La capacidad del organismo para eliminar el ácido úrico está relacionada con la concentración de éste tanto en el torrente sanguíneo como en la orina. Puede haber 2 tipos de alteraciones en los niveles sanguíneos de ácido úrico:

A) Hiperuricemia:

Cuando las concentraciones de ácido úrico en sangre son mayores de 6 a 7 mg/dl (solubilidad del ácido úrico a 37°C en suero) se favorece la acumulación de cristales de urato de sodio.

El aumento en las concentraciones de ácido úrico en sangre puede deberse a los siguientes factores: síntesis y destrucción aumentada de purinas, disminución de la eliminación del ácido úrico o deficiencia de la actividad de enzimas de la vía de ahorro (Fig. 7).

La ingesta dietética de alimentos ricos en purinas, como por ejemplo, carnes, vísceras, vegetales leguminosos y fermentos, provoca una leve hiperuricemia, así como una excreción urinaria de ácido úrico significativamente incrementada.

La gota es un transtorno del metabolismo de las purinas o de la excreción renal del ácido úrico caracterizado por: 1) hiperuricemia; 2) precipitación de urato monosódico en forma de depósitos (tofós) por todo el cuerpo, excepto por el sistema nervioso central, aunque muestra una especial predilección por las articulaciones y el cartilago periarticular, el hueso, las bolsas sinoviales y el tejido subcutáneo; 3) ataques clínicos recurrentes de artritis y 4) nefropatía y a menudo nefrolitiasis.

Aunque en el origen genético menos de una tercera parte de todos los pacientes presentan una historia familiar de gota clínica. Frecuentemente, en parientes próximos se detecta hiperuricemia asintomática. La gota podría tener muy bien un origen poligénico. Los varones constituyen más del 90% de todos los casos, mientras que la gota no es corriente en las mujeres antes de la menopausia. La edad más probable de aparición se centra en la quinta década y la enfermedad es muy infrecuente antes de los veinte años.

La gota se clasifica a menudo en primaria y secundaria según si se supone que la enfermedad es un error congénito del metabolismo que afecta directamente la síntesis o excreción del ácido úrico o si se asocia con hiperuricemia derivada de cualquiera de las otras etiologías. Si se considera la frecuencia de la hiperuricemia, la gota secundaria es una complicación muy poco común. La reserva miscible del ácido úrico aumenta notablemente en la gota y puede superar 30 g. La

concentración de ácido úrico en el plasma se relaciona más o menos con la gravedad clínica, pero no se sabe por que un individuo presenta gota clínica, mientras que otro de la misma familia con una concentración igualmente elevada de ácido úrico en el plasma puede mantenerse asintomático.

El aumento de carga que representa para el cuerpo el ácido úrico resultado de un incremento notable de la síntesis de dicho ácido a partir de purinas endógenas de una disminución de la excreción renal del ácido úrico o de una combinación de ambos defectos (6) (7) (8).

La gota primaria es una enfermedad que ataca sobre todo a hombres jóvenes, después de la pubertad. En la mujer se presenta después de la menopausia, siendo sin embargo más rara que en el hombre. Casi no se observa en mujeres en edad reproductiva.

El riesgo de aparición de gota se manifiesta con uno o más accesos gotosos agudos y aumenta a medida que asciende la concentración plasmática del ácido úrico (1) (7).

La deficiencia de la enzima hipoxantín-guanín-fosforribosil-transferasa, que conduce a la sobreproducción de purinas con acumulación intensa de ácido úrico, representa una etiología rara. La enzima antes mencionada normalmente está presente en todos los tejidos y transforma la hipoxantina y la guanina en sus

respectivos nucleótidos, ácidos inosínicos y guanílico (Fig. 8). Esta enfermedad, normalmente denominada síndrome de Lesch-Nyhan, se caracteriza por retraso mental, coreoatetosis, parálisis cerebral espástica, comportamiento agresivo e impulsos hacia la automutilación, además manifestación patológica de hiperuricemia, artritis gotosa, nefrolitiasis y nefropatía.

La ausencia de la hipoxantina-guanina-fosforribosil-transferasa (Fig. 9) da origen al síndrome de Lesch Nyhan. Debido a la falta de ésta enzima, las bases purínicas no pueden ser reaprovechadas, lo que causa aumento en la formación de ácido úrico. Se ignora a que se debe el comportamiento agresivo y el retraso mental de estos paciente.

La ausencia de actividad de la glucosa-6-fosfatasa, en la enfermedad de Von Gierke impide la salida de glucosa de la célula, dando origen, entre otras alteraciones, a la formación excesiva de ribosa-5-fosfato, la cual ejerce una modulación positiva sobre la síntesis de novo de purinas, ocasionando la formación exagerada de ácido úrico (Fig. 10).

El aumento en la actividad de la enzima glutatión reductasa puede ocasionar también una aceleración de la síntesis de ribosa 5-fosfato, produciéndose un aumento en la formación de ácido úrico por el mecanismo descrito en la figura 11.

En algunos pacientes gotosos se ha observado que hay un

exceso de ácido glutámico en sangre, por lo que se sospecha que la ausencia o deficiencia en la actividad de la deshidrogenasa glutámica, aumenta las concentraciones de glutamina, sustrato de la primera reacción de la síntesis de purinas, lo que produce un incremento en la producción de ácido úrico (3).

La mayor producción y catabolismo de nucleoproteínas tiene importancia en la hiperuricemia que se produce conjuntamente con la leucemia, linfoma, macroglobulinemia, policitemia, mieloma múltiple, neuroblastoma y neoplasias diseminadas. Asimismo, los agentes quimioterápicos y la terapéutica a base de radiación ionizante para las neoplasias malignas pueden incrementar notablemente la formación de ácido úrico. La psoriasis también se asocia a una hiperuricemia, como resultado de la mayor proliferación de células epidérmicas. La hiperuricemia es frecuente en la anemia de células falciformes.

La ingestión de etanol incrementa a menudo la concentración plasmática del ácido úrico y puede provocar ataques de gota en pacientes susceptibles. La patogénesis en este caso está relacionada con el exceso del lactato producido por la oxidación del etanol a acetaldehído, catalizada por la alcohol-deshidrogenasa y que inhibe competitivamente la excreción renal del ácido úrico. El exceso de lactato también se asocia con la hiperuricemia en los casos de ejercicio fuerte, toxemia del embarazo e intoxicación por etilenglicol. De igual manera el

incremento del acetoacetato y beta-hidroxibutirato contribuye a la hiperuricemia en la cetoacidosis diabética y en la inanición. La enfermedad por almacenamiento de glucógeno de tipo I va acompañada de modo regular de hiperuricemia como consecuencia de la acidemia láctica y la mayor formación de purinas (5) (8).

La hiperuricemia se produce en muchas otras alteraciones en las que no está bien definida la relación patogénica, entre las que se incluye el síndrome de Down, sobredosis de barbitúricos, envenenamiento por cloroformo, monóxido de carbono, amoníaco y berilio, hipoparatiroidismo, acromegalia, diabetes insípida nefrogénica, sarcoidosis y enfermedad hepática (8).

B) Hipouricemia:

Las causas de la hipouricemia son relativamente pocas. Los valores de urato plasmático menores de 2 mg/100 ml que no están relacionados con la acción de fármacos son raros, ya que variados medicamentos como la aspirina y el alopurinol, así como los medios de contraste radiológicos pueden producir una disminución de la concentración sérica del ácido úrico (8). La hipouricemia puede encontrarse también en diferentes neoplasias; por lesiones tubulares que suelen ser congénitas (defecto idiopático de resorción); en dos alteraciones congénitas del metabolismo: defecto o carencia de la enzima xantina oxidasa, la xantínuria, alteración infrecuente, es provocada por una deficiencia congénita de la

xantin oxidasa de forma que en lugar del ácido úrico se excretan xantina e hipoxantina. Por otra parte, la enfermedad hepática grave puede dificultar seriamente la transformación de la xantina a ácido úrico; se trata de un trastorno genético raro causado por deficiencia importante o falta de actividad de la xantina oxidasa en el hígado y la mucosa del intestino delgado. En la mujer lactante la actividad de la enzima es deficiente en la leche mamaria o en el calostro.

Cuando están restringidas las purinas de la dieta, los valores séricos de urato son menores de 1 mg por 100 ml, y el urato urinario suele ser menor de 30 mg por día.

La xantinuria debe ser distinguida de otras causas de hipouricemia, en casi todas en las que los valores séricos de uratos están por encima de 1 mg por 100 ml y la orina contiene considerablemente más ácido úrico que en los pacientes con xantinuria.

La otra alteración del metabolismo son los defectos o carencias de la purino-nucleósido-fosforilasa; o adquiridas (enfermedades de Wilson, síndrome de Fanconi, hepatopatía con ictericia, enfermedad de Hodgkin, o carcinoma broncogénico) (5) (6) (7) (8).

1.2.4 Métodos de determinación.

Se han descrito numerosos métodos para la determinación del ácido úrico en los líquidos biológicos. Las primeras técnicas se aplicaron en sangre total y exigían la separación del ácido úrico como su sal de plata. Para la determinación colorimétrica, el urato de plata era disuelto en solución de cianuro y medido por su acción reductora sobre el fosfotungstato en solución ligeramente alcalina. Debido a que el cianuro incrementa la intensidad del color producido, éste se conservó en algunos métodos después de que la técnica de precipitación con plata fué abandonada (11). Los métodos con cianuro presentan varias dificultades inherentes, que incluyen la coprecipitación del ácido úrico con las proteínas del plasma, la formación de turbidez durante el desarrollo de color y la presencia de sustancias endógenas potencialmente interferentes, tales como ácido ascórbico, tioles libres, purinas metiladas, ácido homogentísico y glucosa en concentraciones muy altas. El uso de un filtrado libre de proteínas para la formación de color elimina la mayoría de las interferencias. El carbonato sódico que se usa como reactivo para conservar un medio alcalino ha sido de algunos otros métodos sustituido por cianuro sódico para incrementar la sensibilidad del ensayo (8) (11).

A pesar de las numerosas modificaciones del método colorimétrico realizadas para mejorar la especificidad, el método más específico continúa siendo la oxidación del ácido úrico con

la enzima uricasa. La introducción del uso de uricasa permitió el desarrollo de métodos altamente específicos para medir el ácido úrico y proporcionó un criterio para evaluar los antiguos métodos colorimétricos (5) (8) (11).

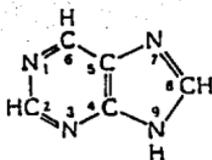
Los métodos espectrofotométricos en ultra violeta con uricasa se basan en la medición directa del descenso de la absorbancia a 292 nm después del tratamiento con uricasa. Las ventajas de este método consisten en que evita la precipitación de proteínas y presenta una sensibilidad y especificidad superiores (40).

Los diversos métodos que se sirven del peróxido de hidrógeno formado durante la reacción enzimática con uricasa incluyen la formación de cromógenos por vía de acoplamiento con la enzima catalasa y la formación de compuestos fluorescentes ya sea por autoacoplamiento de ácido p-hidroxifenilacético o por oxidación del ácido homovanílico; otros de la determinación de la captación de oxígeno durante la formación de peróxido de hidrógeno, por la valoración coulombimétrica y por determinaciones cromatográficas; el ácido úrico también puede separarse por cromatografía de intercambio iónico y medirse su absorbancia directamente a 292 nanómetros (5) (8) (11).

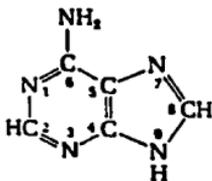
En el método enzimático el ácido úrico se transforma, en presencia de oxígeno y uricasa, en alantoína y peróxido de hidrógeno; éste último reacciona simultáneamente con el ácido

3,5-dicloro-2-hidroxibencensulfónico y 4-aminofenazona formando una quinonimina de color rojo. Este método se describirá en detalle en el capítulo siguiente.

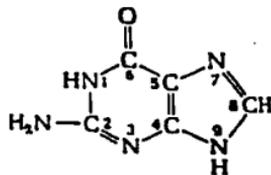
Fig.4 . Estructuras de las bases púricas.



Purina. el compuesto originario

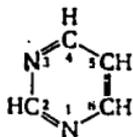


Adenina
(6-aminopurina)

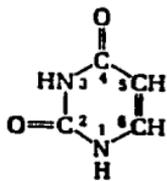


Guanina
(2-amino-6-oxopurina)

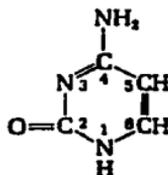
Fig. 5. Estructuras de las bases pirimidicas.



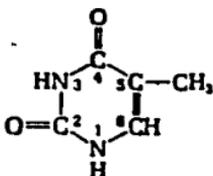
Pirimidina, el compuesto originario



Uracilo
(2,4-dioxopirimidina)



Citosina
(4-amino-2-oxopirimidina)



Timina
(5-metil-2,4-dioxopirimidina)

Fig. 6

Catabolismo de Nucleótidos Purínicos

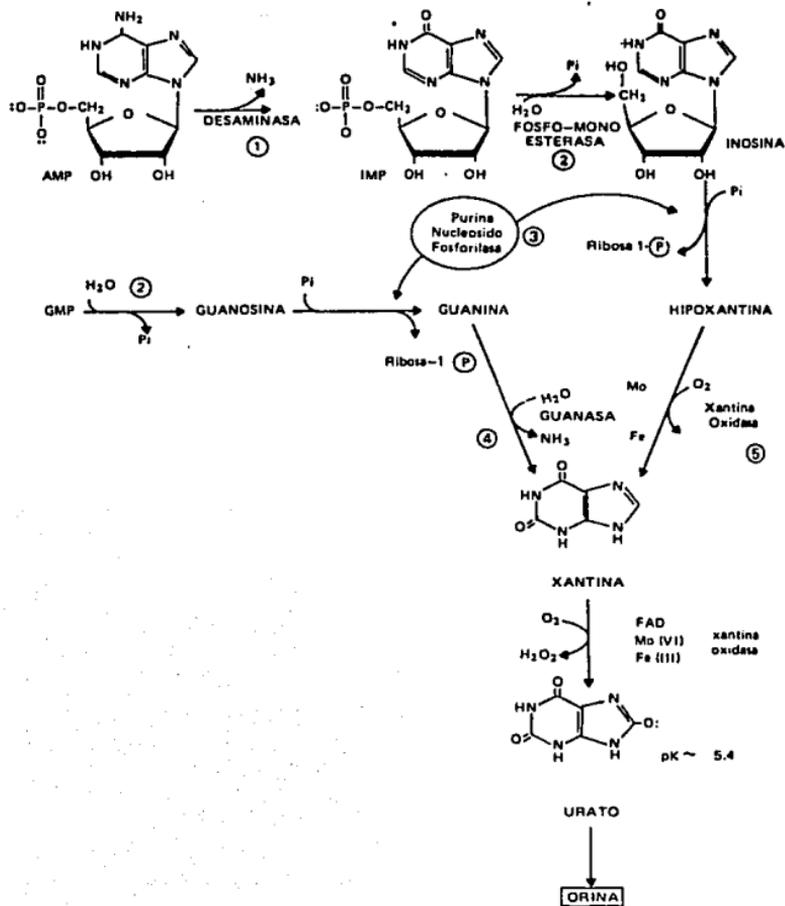


Fig. 7 Factores que regulan la concentración plasmática de ácido úrico.

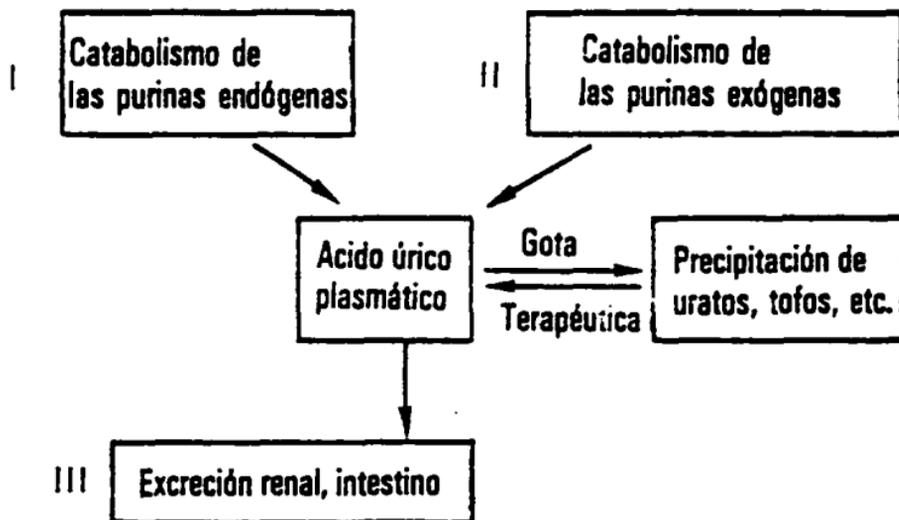


Fig. 8

Causas del aumento en la uricemia

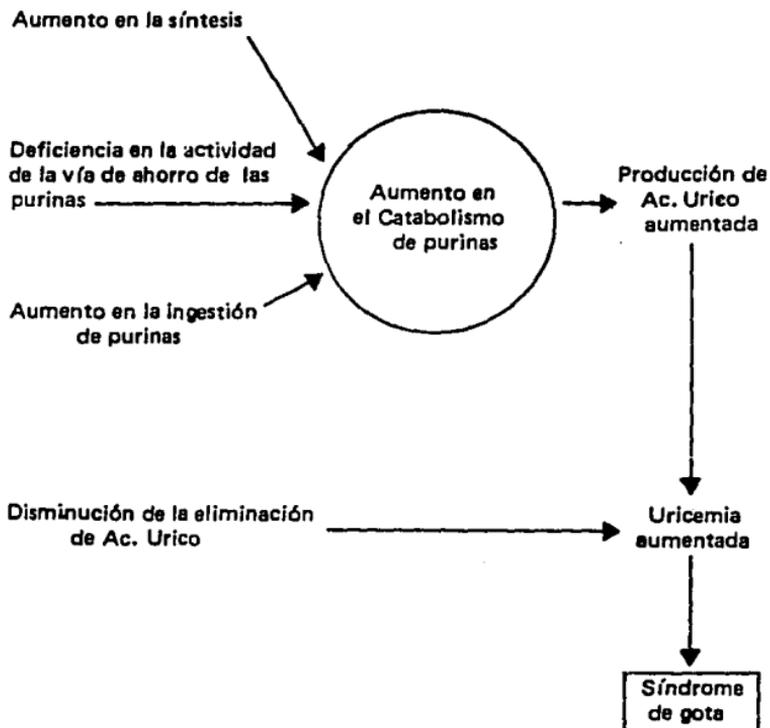


Fig. 9

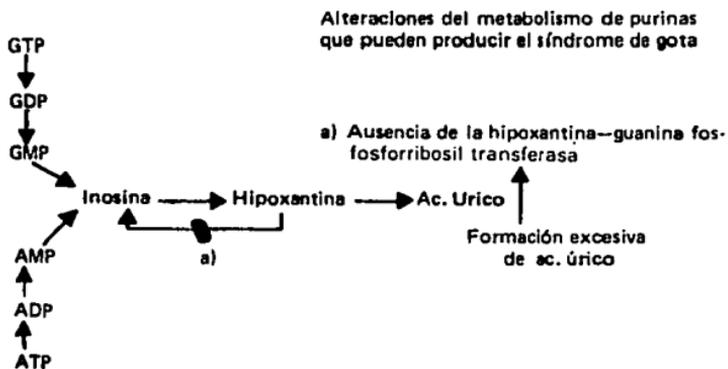


Fig. 10

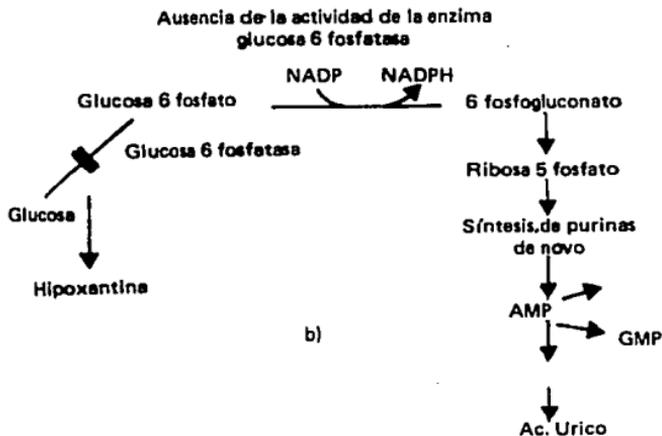
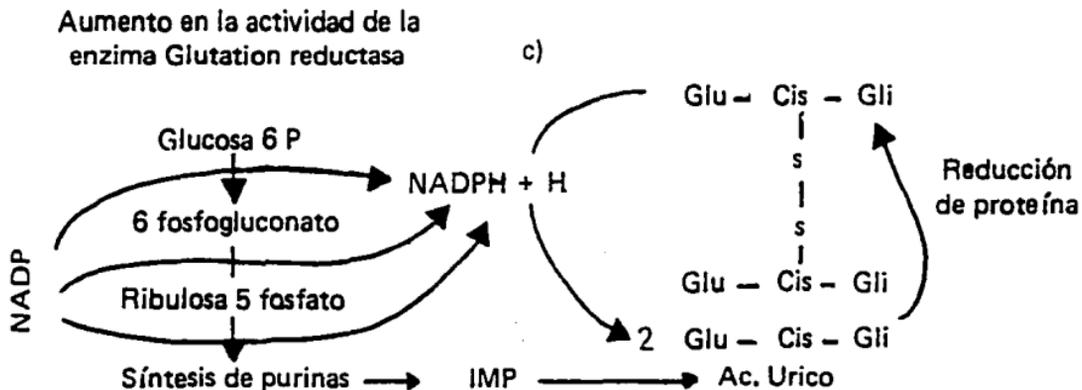


Fig. 11 Un incremento en la actividad de la enzima glutatión reductasa ocasiona una mayor síntesis de ribosa 5 fosfato y como resultado aumento de purinas y de su producto catabólico, el ácido úrico.



1.3 COLESTEROL

1.3.1 Características.

Los esteroides son derivados del perhidrociclopentanofenantreno, hidrocarburo tetracíclico saturado que se origina a partir del escualeno, triterpeno lineal que se cicla con facilidad. El primer producto esteroide importante en este proceso es el lanosterol, que es el precursor del colesterol en los tejidos animales (Fig. 12).

Es un miembro del grupo de los esteroides llamados esteroides, que son alcoholes esteroides que contienen un grupo hidroxilo en el carbono 3 del anillo A y una cadena ramificada de ocho o más átomos de carbono en el carbono 7 (Fig. 13).

El colesterol es una molécula lipídica en casi todos los organismos eucariotes, los vegetales contienen otros esteroides diferentes (2) (3).

Los lípidos sencillos no contienen ácidos grasos. Aparecen en las células y en los tejidos en cantidades menores que los lípidos complejos, pero se hallan entre ellos muchas sustancias con intensa actividad biológica, como las vitaminas, hormonas y otras biomoléculas solubles en las grasas, muy especializadas.

Existen dos clases principales de lípidos insaponificables, los terpenos y los esteroides (3).

El colesterol funde a 150°C y es insoluble en agua, pero se extrae fácilmente de los tejidos con cloroformo, éter, benceno o alcohol caliente. El colesterol se encuentra en las membranas plasmáticas de muchas células animales y en las lipoproteínas del plasma sanguíneo. El lanosterol fue encontrado por primera vez en la cubierta cérica de la lana, en forma esterificada, antes de ser definido como un intermediario importante en la biosíntesis del colesterol en los tejidos animales. En los tejidos animales el colesterol es el precursor de otros muchos esteroides; se incluyen entre ellos los ácidos biliares, compuestos con carácter detergente que ayudan a la emulsión de los lípidos y a su absorción intestinal; los andrógenos u hormonas sexuales masculinas; los estrógenos, que son las hormonas sexuales femeninas; la progesterona y las hormonas adrenocorticales (2).

1.3.2 Metabolismo del colesterol.

El colesterol es el principal esteroide en el organismo humano, se ha calculado que un individuo con peso ideal de 70 kg que corresponde aproximadamente al 0.2% de su peso corporal, puede contener en su organismo 140 g de colesterol distribuidos

principalmente en el sistema nervioso central, tejido adiposo, músculo y piel. Cualquier célula de nuestro organismo, además de utilizar las fuentes extracelulares de colesterol, es también capaz de sintetizarlo; este proceso se lleva a cabo principalmente en el hígado y en el intestino. El colesterol se puede encontrar en los tejidos en sus formas esterificada (CE) y no esterificada (CNE); la principal función de esta última parece ser como componente estructural de membranas en las que actúa como regulador de la fluidez membranar. En las regiones de la membrana en donde predominan los ácidos grasos insaturados disminuirá dicha fluidez, en cambio, en las regiones donde abundan los ácidos grasos saturados, se incrementará. El colesterol esterificado casi no existe en las membranas, se encuentra en el citoplasma, de preferencia asociado a otros lípidos, y su función parece ser la de reserva, depositándose fundamentalmente en el tejido adiposo, hepático, gónadas y corteza suprarrenal. El colesterol es tanto el producto de una vía biosintética, como el precursor de otras vías metabólicas, como es el caso de la síntesis de ácidos biliares, de hormonas esteroides y síntesis de vitamina D.

El hombre puede absorber fácilmente el colesterol contenido en los alimentos. Una persona cuya dieta incluye leche, carne y huevos, ingiere en promedio entre 500 y 1000 mg de colesterol por día (1.3-2.6 mmol), ya que su contenido en la yema de un huevo es aproximadamente de 240 mg y la ingesta promedio de carne

proporciona entre 300 y 400 mg de colesterol. Sin embargo, del colesterol total ingerido, solamente se absorbe el 40%.

Cuando la ingestión es relativamente baja, su absorción es eficiente; en cambio, cuando el colesterol de la dieta excede los 800 mg (2.1 mmol/día), su absorción es menos eficiente.

Cuando una persona evita ingerir alimentos ricos en colesterol, resulta relativamente fácil reducir la ingesta a 400 ó 500 mg/día; sin embargo, aun en estas condiciones, se absorberán en promedio entre 200 ó 300 mg (0.5-0.8 mmol/día).

El colesterol de la dieta es incorporado a micelas formadas por constituyentes anfifílicos presentes en la bilis. Estas micelas contienen fosfolípidos y ácidos biliares conjugados, además del propio colesterol; este proceso, conocido como emulsificación, es indispensable para solubilizar el colesterol en el quimo, el medio acuoso presente en el lumen intestinal. El colesterol esterificado, una vez integrado en la fase micelar, es hidrolizado en el lumen intestinal por la enzima colesterol esterasa, presente en el jugo pancreático; esta hidrólisis es posible gracias al proceso de emulsificación, lo que permite que la enzima actúe sobre o dentro de la micela. El colesterol se absorbe por la difusión de las micelas hacia las células de la mucosa, en donde gran parte de él es nuevamente esterificado.

Los ésteres de colesterol que se sintetizan en las células

de la mucosa intestinal, conjuntamente con el colesterol no esterificado, son incorporados a partículas lipoproteicas de gran tamaño, constituidas principalmente por triglicéridos; estas partículas, conocidas como quilomicrosomas, transportan el colesterol y los triacilglicéridos de la linfa hacia el plasma, a través del conducto torácico (Fig. 15) (2) (3).

Todos los átomos de colesterol endógeno se derivan de la acetil-coenzima A (acetil-CoA). Esta sustancia, considerada como la piedra angular del metabolismo, puede formarse a partir de carbohidratos, lípidos y proteínas. La glándula hepática y el intestino son los principales sitios de síntesis de colesterol en el hombre; sin embargo, también se sintetiza en las glándulas que producen hormonas esteroideas, por ejemplo: corteza adrenal, testículos y ovarios. Las enzimas que participan en las reacciones de síntesis se encuentran localizadas en el citoplasma y en el retículo endoplásmico de la célula.

La biosíntesis del colesterol se conoce como colesterogénesis, en la que en la etapa inicial se condensan dos moléculas de acetil-CoA para formar acetoacetil-CoA, continuando el proceso hasta que el lanosterol es transformado a colesterol. Las enzimas clave en el metabolismo del colesterol son las siguientes:

a) En la síntesis de colesterol, la 3 hidroxil 3 metil glutaril coA reductasa (HMGR).

b) En la formación intracelular de ésteres de colesterol, la acil-Co A, colesterol acil transferasa (ACAT).

c) En la hidrólisis intracelular de ésteres de colesterol, la colesterol éster hidrolasa (CEH).

d) En la síntesis de ácidos biliares, la colesterol 7 alfa hidrolasa.

En la figura 16 se muestra la síntesis endógena del colesterol (colesterogénesis) indicando todos los intermediarios.

La síntesis de colesterol es un proceso que requiere un elevado gasto energético, por lo que es de esperarse que su metabolismo sea cuidadosamente regulado. El colesterol puede ser esterificado y los ésteres resultantes pueden, a su vez, ser hidrolizados. En cuanto a su conversión en ácidos biliares, esta vía constituye uno de los principales mecanismos para la utilización de colesterol. El colesterol también es el precursor de las hormonas esteroideas; si bien la cantidad de este compuesto convertido en este tipo de hormonas es pequeña, en términos de la utilización total de colesterol, estas reacciones son de enorme importancia desde el punto de vista fisiológico (2) (4) (6).

La enzima 3 hidroxí 3 metil glutaril CoA reductasa es la única sujeta a regulación en la biosíntesis del colesterol. El

colesterol de la dieta, presente en los restos de quilomicrones, constituye el inhibidor más importante de la HMGCoA reductasa hepática; sin embargo, esta inhibición no se lleva a cabo en la síntesis intestinal de colesterol. Puesto que el colesterol es el producto final de la vía biosintética originalmente se consideró que la inhibición correspondía a la de un efector alostérico negativo y se definió como inhibición por retroalimentación. Sin embargo, estudios posteriores en cultivos celulares, demostraron que la regulación ocurría a través de cambios en el contenido de HMGCoA reductasa, y no por regulación alostérica de la enzima ya existente (25).

Los principales sitios para la síntesis de ésteres de colesterol por la enzima colesterol acil transferasa son hígado, intestino y corteza adrenal (2). Esta reacción también tiene lugar en las células musculares lisas de la pared arterial, proceso de gran importancia en la génesis de la aterosclerosis (7).

Importancia de las lipoproteínas en la regulación del metabolismo del colesterol:

La membrana plasmática de ciertas células contiene receptores para lipoproteínas. Dos receptores han sido

identificados, el primero reconoce la apoproteína B-100, presente en las lipoproteínas de baja densidad (LDL) conocido como receptor para LDL; el segundo reconoce la apoproteína E presente en los restos de quilomicrones. El receptor para LDL se encuentra en muchos tejidos, incluyendo fibroblastos y hepatocitos; por el contrario el receptor para los restos de quilomicrones se encuentra solamente en el hígado (3).

Las LDL inhiben la síntesis de colesterol, al ser endocitadas por la célula; el primer paso en este proceso es el reconocimiento de la LDL por su receptor específico. El sitio de reconocimiento de LDL se encuentra asociado con la apolipoproteína (apo B-100). El colesterol de las proteínas de baja densidad (LDL) inhibe la síntesis endógena de colesterol al ser endocitadas las LDL y liberado el colesterol que inhibe a la HMG-CoA reductasa (Fig. 17) (3).

1.3.3 Importancia de su determinación en sangre

El colesterol y los triglicéridos son lípidos plasmáticos del máximo interés a la hora del diagnóstico y tratamiento de las alteraciones de las lipoproteínas. El colesterol es el esteroide más frecuentemente determinado en fluidos del cuerpo humano para

el diagnóstico de las perturbaciones del metabolismo graso, ya que altera los vasos sanguíneos. El colesterol es un alcohol capaz de ser esterificado por ácidos grasos, pero que, debido a su deficiente solubilidad en los medios acuosos, es transportado, ligado principalmente a las lipoproteínas beta. El diagnóstico fundamental es la determinación de la concentración sérica del denominado colesterol total (colesterol libre y esterificado).

Se encuentra como una mezcla de formas esterificada (60% a 70%) y no esterificada (30% a 40%), siendo bastante constante la proporción de ambas en individuos normales. Las concentraciones de colesterol total y lipoproteína-colesterol suelen expresarse en términos del núcleo de esterol sin distinguir la fracción esterificada y la no esterificada. Por lo general no es necesario diferenciar ambas formas, excepto en casos en que debe calcularse la masa total de lipoproteínas; o cuando la relación colesterol/éster de colesterol es indudablemente anormal, lo que puede afectar la estimación del total de núcleos de esterol.

Lipidosis es el término general que se aplica a todas las enfermedades caracterizadas por acumulación anormal de lípidos en los tejidos o en el líquido extracelular. Algunas veces se restringe exclusivamente a las anomalías del metabolismo de los lípidos que son hereditarios. Xantomatosis es un término morfológico que se refiere a la acumulación de lípidos en los tejidos acompañada de grandes "células espumosas".

Las más comunes de las lipodosis son las causadas por alteraciones secundarias en la concentración de los lípidos plasmáticos. Estos suelen descubrirse y diagnosticarse mediante mediciones de las concentraciones de colesterol. Es más fácil comprender estos trastornos cuando se consideran en términos de lipoproteínas, las formas en que casi todos los lípidos, excepto los ácidos grasos libres, se encuentran en el plasma. Pueden ocurrir tanto aumento selectivo como deficiencia grave o falta de algunos de los grupos o clases de lipoproteínas.

Las anomalías de las lipoproteínas, por sí mismas, se caracterizan por muy pocos trastornos. Por lo general, las lipoproteínas son simplemente indicadores de anomalías intracelulares del metabolismo de lípidos o carbohidratos que se reflejan en concentraciones plasmáticas anormales de lípidos; sin embargo es de gran importancia determinar cualquier alteración en los niveles plasmáticos normales para así poder evitar una cardiopatía temprana.

A: Hipercolesterolemia:

El aumento en la concentración de los lípidos plasmáticos y de las proteínas cuya etiología no se debe a una enfermedad primaria representan problemas del metabolismo que son difíciles de clasificar y de tratar. Para su diagnóstico se miden las

concentraciones plasmáticas de colesterol y triglicéridos (70).

Las principales hipercolesterolemias, con aumentos superiores a 300 mg/dl son: a) formas sintomáticas, en las que además del aumento de colesterol, se observa la subida de todas las fracciones lipídicas, esto es, de los triglicéridos y los fosfolípidos; y b) Xantomatosis hipercolesterolémica idiopática, familiar o esencial, que lo obedece a excesos dietéticos, sino que se trata de un trastorno idiopático del metabolismo endógeno del colesterol (4) (24).

La hipercolesterolemia familiar es la forma más antigua conocida de hiperlipoproteíemia (HLP) familiar. La existencia de un gen anormal produce HLP beta que se descubre con facilidad al año de edad, y a menudo al nacer. La HLP de tipo II puede ser la única anomalía durante toda la vida, pero empiezan a aparecer hacia los 20 años de edad xantomas subcutáneos (afección cutánea caracterizada por la formación de placas o nódulos amarillos, ligeramente elevados y de tamaño diverso) sobre todo en los tendones de Aquiles y codos. Hacia los 50 años de edad el peligro de cardiopatía coronaria es de 3 a 10 veces lo normal. No parecen ser muy frecuentes la diabetes, la hiperuricemia u otras anomalías que se observan en otras formas de hiperlipoproteíemia. Los descendientes de dos padres afectados presentan HLP del tipo beta; pueden tener xantomas cutáneos al nacer, la aterosclerosis en ellos es particularmente grave, y la muerte se presenta entre el año y los treinta años de edad por cardiopatía.

La hipercolesterolemia familiar afecta a ambos sexos y ocurre con mayor frecuencia en personas caucasoides, pero no es exclusiva de dicha raza.

Aún sigue discutiéndose la importancia del colesterol en relación a la aterosclerosis. En los animales se ha demostrado con los acetatos colesterógenos marcados con isótopos radiactivos que a las pocas horas ya aparecen precipitados de colesterol "marcados" en los vasos.

El exceso de colesterol puede deberse a una dieta excesivamente rica en lípidos y sobre todo en colesterol y grasas de origen animal con abundantes ácidos grasos no saturados. Pero en la aterosclerosis no sólo aumenta el nivel de colesterol en forma de β -lipoproteínas, sino los triglicéridos, disminuyendo en cambio los fosfolípidos, lo que facilitaría la precipitación del colesterol, por lo cual se recomienda llevar una dieta pobre en lípidos después de los 40 años de edad, así como determinar con cierta regularidad los niveles de colesterol plasmático a fin de prevenir una cardiopatía coronaria temprana. Algunos alimentos ricos en colesterol son: vísceras sólidas en general (sesos, hígado, riñón), mariscos (camarón, langosta, ostiones), yema de huevo, carne y leche (4)(7)(24).

B) Hipocolesterolemia:

El colesterol normal oscila entre 150 y 250 mg por ciento. En el hipertiroidismo desciende pronto a menos de 120 mg por ciento junto con las grasas, al ser metabolizado en exceso. En el hipotiroidismo aumenta su nivel plasmático.

Los niveles plasmáticos de colesterol son más bajos entre los vegetarianos y los pueblos de alimentación pobre en grasas y carne (orientales), que entre los que consumen mucho de estos alimentos (anglosajones, centro-europeos, sudamericanos, etc.) (24)

1.3.4 Métodos de determinación.

En los laboratorios clínicos se utilizan muchos tipos de métodos para la determinación del colesterol, siendo los métodos enzimáticos y colorimétricos los más ampliamente utilizados.

Se dispone de múltiples métodos para la determinación colorimétrica del colesterol, utilizando uno de los tres grupos de reactivos siguientes: anhídrido acético/ácido sulfúrico (reactivo de Liebermann-Burchard), sal de hierro/ácido sulfúrico

o ácido p-toluenosulfónico.

La absorbancia de los cromóforos producidos a partir del colesterol y sus ésteres difiere con uno y otro reactivo. Los ésteres del colesterol producen más color que el colesterol con el reactivo de Liebermann - Burchard, y generan un sesgo positivo del 10 al 15% cuando los análisis se basan en los estándares del colesterol no esterificado (17) (19). Estos ésteres dan una coloración menos intensa que el colesterol con el reactivo de ácido sulfúrico/sales de hierro, siendo los valores de prueba ligeramente más bajos que los de referencia (18). Hay más de 200 métodos para la determinación de colesterol en suero (11), por lo que solo mencionaremos los más utilizados.

Método de Liebermann - Burchard: El colesterol reacciona con el acético y ácido sulfúrico concentrado, y en un medio absolutamente deshidratado se constituyen polímeros de hidrocarburos no saturados. En el transcurso de la reacción se produce una pérdida de agua y el colesterol se protona, con lo que se origina un ion de enilcarbonio, el cual sufre nuevas deshidrogenaciones, constituyendo así más sistemas conjugados insaturados. El máximo de absorción se ubica en los 412, 478,563 y 620 nm, siendo éstas longitudes de onda características del dienil, trienil, tetraenil y pentaenilcatión, respectivamente (Fig. 14) (1). Para la investigación de lípidos en forma

semiautomatizada se ha utilizado una modificación de éste método.

Cuando se trabaja según el método de Liebermann y Burchard, generalmente se establecen diferencias entre procedimientos de un solo paso y de pasos múltiples. Estos últimos presuponen la extracción y aislamiento del colesterol y la correspondiente reacción colorimétrica, mientras que los procedimientos de un solo paso utilizan directamente el suero para la reacción pigmentaria. Los métodos de un solo paso no poseen la especificidad característica de los de extracción, pero su ventaja es que combinan procedimientos de ejecución sencilla con una elevada precisión (Tabla 2).

En el método de Liebermann - Burchard previa extracción con 2-propanolol, el colesterol es extraído de las muestras de suero con 2-propanolol, el cual elimina las sustancias interferentes; la reacción de color es acelerada por el color de la reacción exotérmica del 2-propanolol con el ácido sulfúrico; después de incubación controlada, la absorbancia es medida a 630 nm. Es lineal para concentraciones de colesterol hasta 10 g/l (11).

Método de Schoenheimer - Sperry: Hidroliza los ésteres de colesterol, extrayéndolos con solventes orgánicos y precipitándolos con digitonina; analizando posteriormente con el reactivo de Liebermann - Burchard (11).

Los métodos que se basan en el procedimiento de Liebermann-Burchard tienen el inconveniente de que las reacciones que se llevan a cabo son exotérmicas; la temperatura no puede ser controlada, por lo que los resultados y confiabilidad son bajos.

Método de Parekh - Jung: Se basa en la precipitación de proteínas y sustancias asociadas con acetato de uranilo, seguida de colorimetría de la reacción que se produce entre el colesterol y una mezcla de sulfato de hierro y ácido sulfúrico concentrado. El método puede ser utilizado para determinar colesterol total en suero y otros fluidos corporales, homogenizados tisulares o sus extractos. Dentro de los inconvenientes del método está la alta toxicidad de los reactivos utilizados y el uso de radioisótopos que se requiere para obtener el acetato de uranilo. Este método no ha dado resultados satisfactorios con muestras pediátricas (20) (21).

Determinación por cromatografía de gases: El colesterol se extrae, se saponifica, se seca con éter y se determina la concentración utilizando un cromatógrafo de gases (1).

Métodos enzimáticos: Se determina el colesterol total directamente en el plasma o el suero en una serie de reacciones en las que los ésteres son hidrolizados, se oxida el radical OH de la posición 3 del colesterol y se determina enzimáticamente el

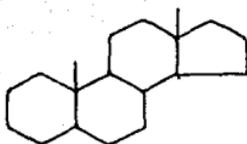
peróxido de hidrógeno, uno de los productos de la reacción. Esta reacción se verá en detalle más adelante.

Los métodos enzimáticos se ven menos sujetos a posibles interferencias por sustancias no esterólicas que los métodos químicos; sólo se consumen cantidades de muestra expresadas en microlitros, no siendo necesario el paso previo de la extracción. Son métodos bastante rápidos y si se suprime la hidrolasa del éster de colesterol, proporcionan también datos acerca del colesterol no esterificado. Finalmente, los métodos enzimáticos parecen ser bastante precisos, con coeficientes de variación que oscilan entre el 1% y el 2%. En la mayoría de los casos se emplean métodos de calibración sérica estándar o pueden medirse las concentraciones de colesterol en sueros de calibración. Los valores enzimáticos coinciden con los de referencia en aproximadamente un 1% cuando los métodos enzimáticos son calibrados con sueros a los que se ha asignado valores de referencia de colesterol (20)(59).

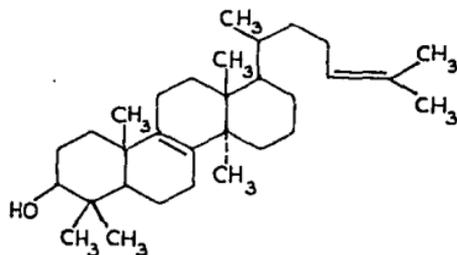
Fig. 12



Escualeno



Núcleo del perhidro-ciclopentanofenarileno



Lanosterol

Fig. 13

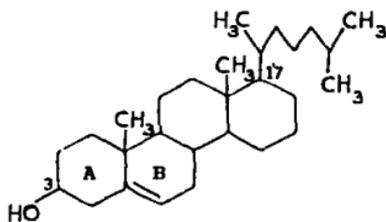


Fig. 14 Mecanismos de las reacciones en la determinación de colesterol según Liebermann, Burchard y Zak.

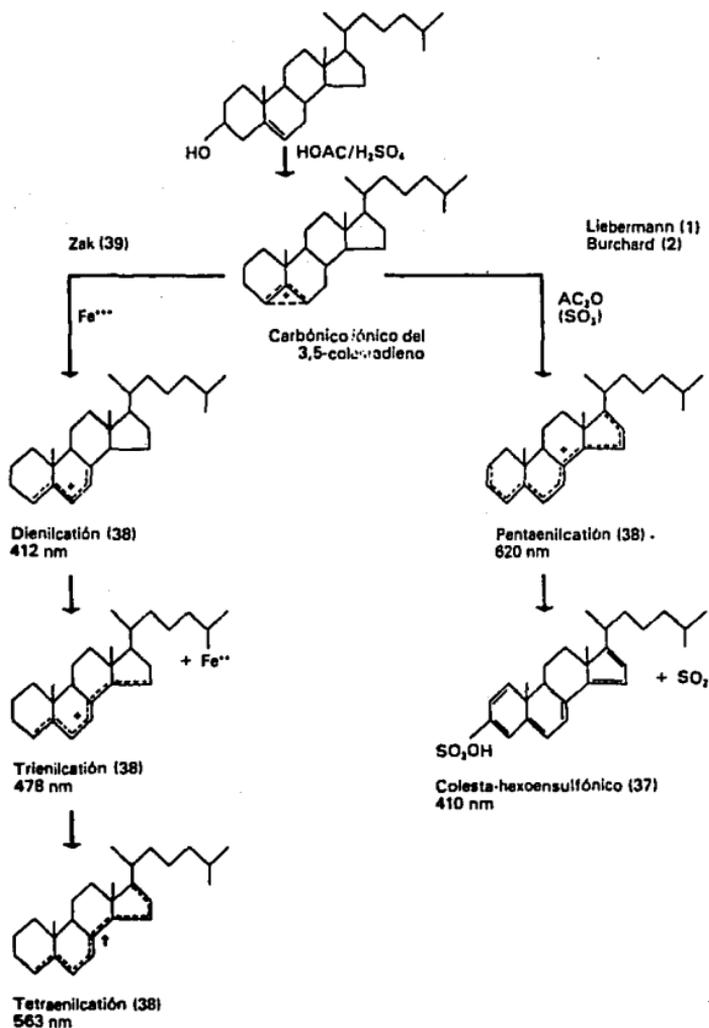
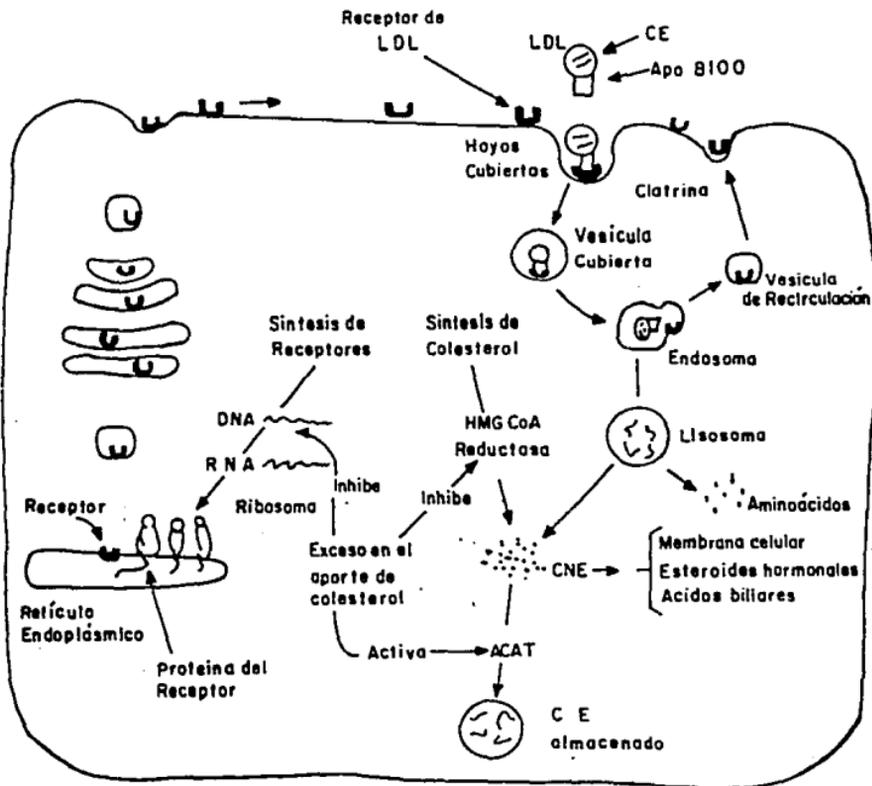
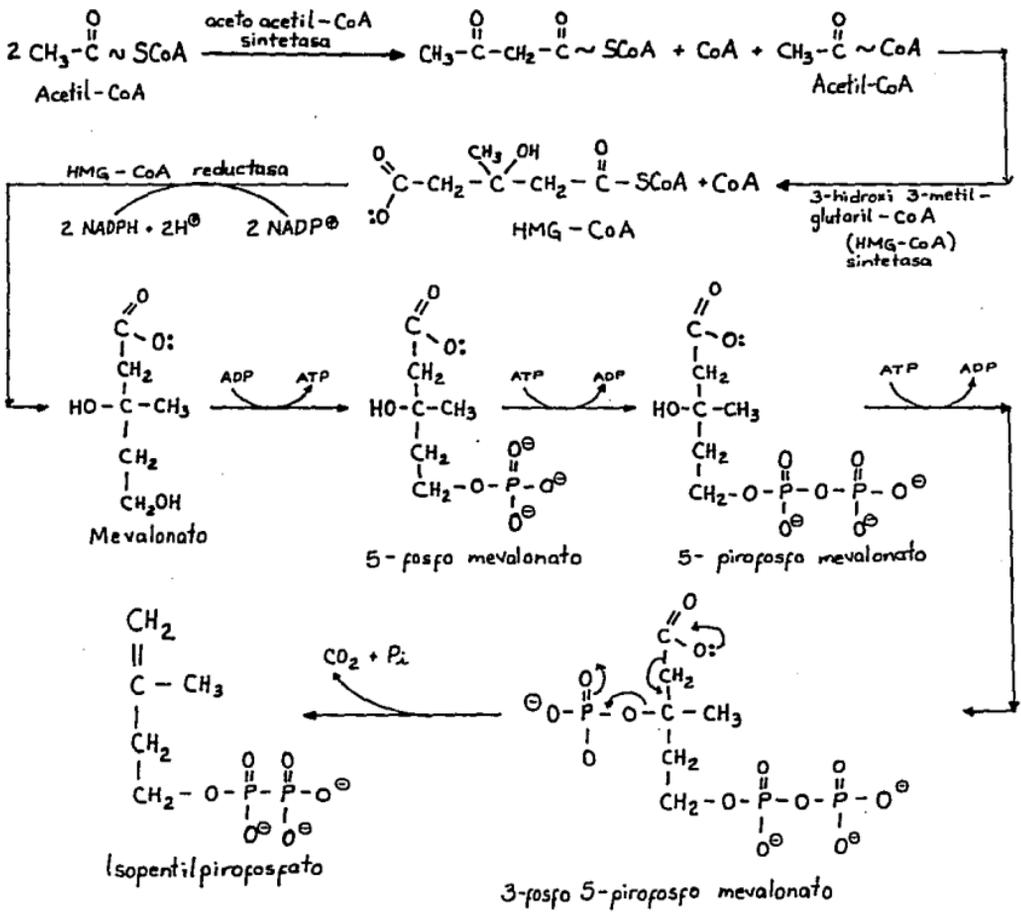


Fig. 15

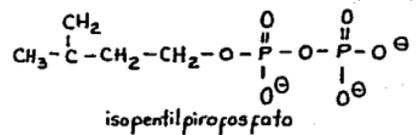
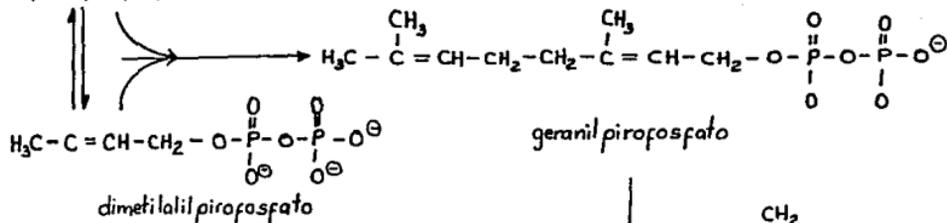
El colesterol de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) inhibe la síntesis endógena de colesterol, al ser endocitadas las LDL y liberado el colesterol que inhibe a la HMG-CoA reductasa.



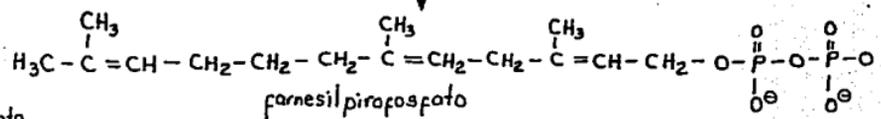


ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

Isopentil pirofosfato

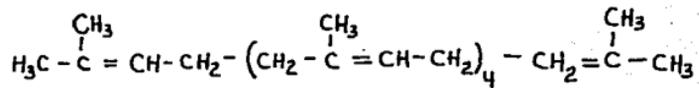


PP_i (radical pirofosfato)

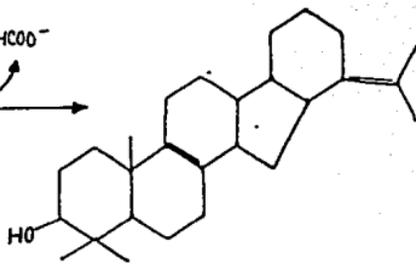
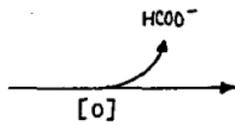
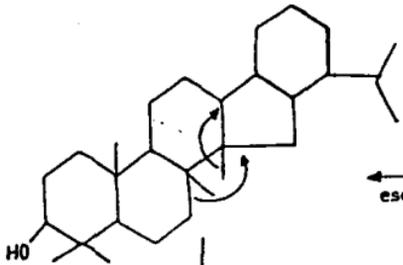
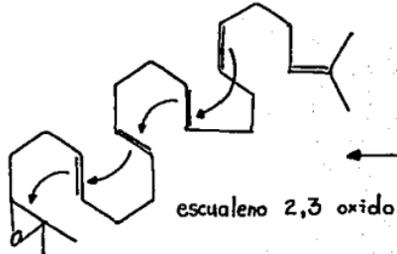
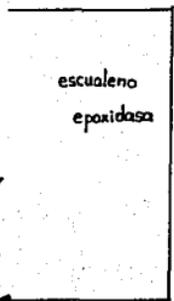
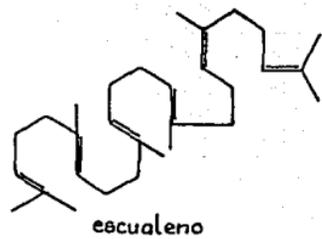
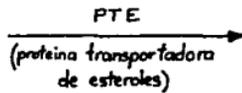


farnesil pirofosfato + NADPH + H

NADP⁺ + 2 ppi + H⁺



escualeno forma lineal



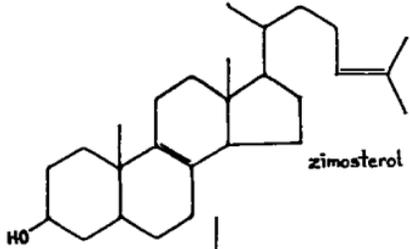
lanosterol

14 desmetil lanosterol

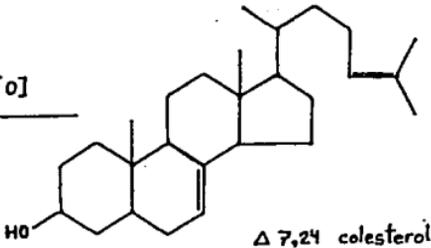
14 desmetil lanosterol

[O] [NADPH]

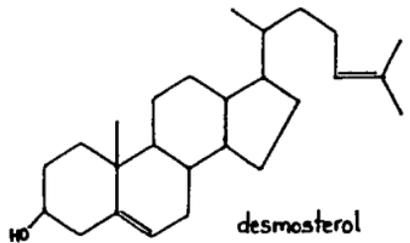
2 CO₂



[NADPH] [O]



desmosterol
(24 deshidro colesterol)



(NADPH)

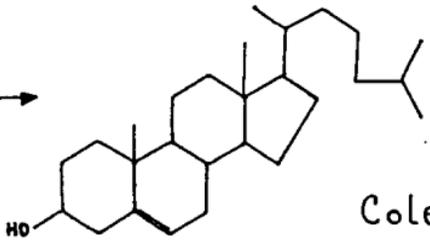
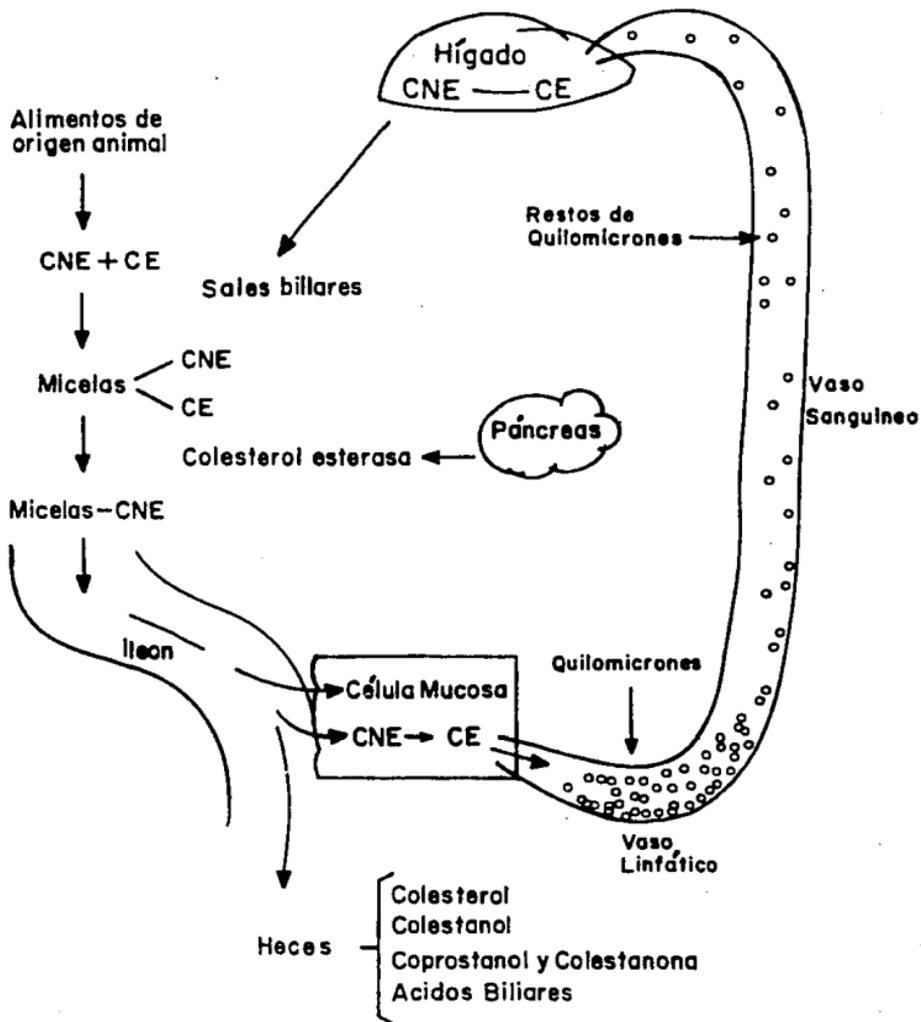


Fig. 17

El colesterol de la dieta es incorporado a micelas. Los ésteres de colesterol son hidrolizados en el lumen intestinal. Luego de absorbido vuelve a ser esterificado y es transportado al hígado en quilomicrones. CNE=Colesterol no esterificado; CE=Colesterol esterificado



CAPITULO 2

METODOS UTILIZADOS ACTUALMENTE EN LA SECRETARIA DE SALUD

2.1 METODO DE LA ORTO-TOLUIDINA PARA LA DETERMINACION DE GLUCOSA.

2.1.1 Fundamento del método.

La orto-toluidina se condensa con una aldosa o cetosa para formar glucosilamina, la cual se equilibra con su base de Schiff y posiblemente forma otros complejos cromógenos (Fig. 18).

Estas reacciones ocurren en medio ácido y con calentamiento a ebullición. La intensidad del color verde obtenido se mide espectrofotométricamente. La densidad óptica de la solución está relacionada linealmente con la concentración de glucosa presente (11).

Los principales inconvenientes de este método son: su inespecificidad, ya que cualquier aldohexosa presente en la sangre reacciona con la orto-toluidina; la toxicidad de los componentes del reactivo, de los cuales la orto-toluidina se ha reportado como cancerígeno (72); y que la reacción requiere de ebullición.

Este método fué utilizado ampliamente en todo el mundo desde fines de la década de los 60's, por la Secretaría de Salud desde 1971 (26) (27).

2.1.2 Componentes del reactivo para la determinación de glucosa.

El reactivo de orto-toluidina está constituido por las siguientes sustancias:

- Orto-toluidina para síntesis	33.906 ml/l
- Acido acético para análisis (inerte al ácido crómico)	882.000 ml/l
- Tiourea ACS	0.730 g/l
- Agua destilada	73.510 ml/l

Nota: La cantidad de orto-toluidina varía de acuerdo con su pureza.

Las siglas ACS se refieren a la American Chemical Society.

El estuche de diagnóstico para la determinación de glucosa consta de:

- Reactivo de orto-toluidina, 3 frascos con 240 ml cada uno.
- Patrón de glucosa de 1 mg/ml, 1 frasco con 20 ml.

El patrón de glucosa con concentración de 3 mg/ml para

realizar la curva estándar se entrega a solicitud específica.

2.1.3 Procedimiento.

Para realizar la determinación puede utilizarse suero, plasma, líquido cefalorraquídeo u orina.

Pipetear en tubos de ensayo:

	Blanco	Testigo	Problema
Agua	0.1 ml	----	----
Patrón de glucosa 1 mg/ml	----	0.1 ml	----
Suero problema	----	----	0.1 ml
Reactivo de orto-toluidina	5.0 ml	5.0 ml	5.0 ml

Mezclar los tubos y colocarlos durante 8 minutos en baño de agua a ebullición. El nivel de agua en el baño debe ser superior al nivel de los reactivos en los tubos. Sacar los tubos del baño y enfriarlos inmediatamente con agua fría corriente. Leer en un espectrofotómetro la densidad óptica del cromógeno formado a una

longitud de onda de 630 nm o con el filtro correspondiente (rojo), ajustando a 100% de transmitancia o cero de absorbancia con el blanco de reactivos. El color es estable durante 20 minutos.

Convertir la lectura a la concentración por cálculos o con la curva estándar.

$$\text{mg de glucosa/100 ml} = \frac{\text{D.O. problema}}{\text{D.O. testigo}}$$

Curva estándar (debe hacerse con cada lote de reactivos):

Usar patrón de glucosa con 3 mg/ml ; medir exactamente las diluciones para la curva.

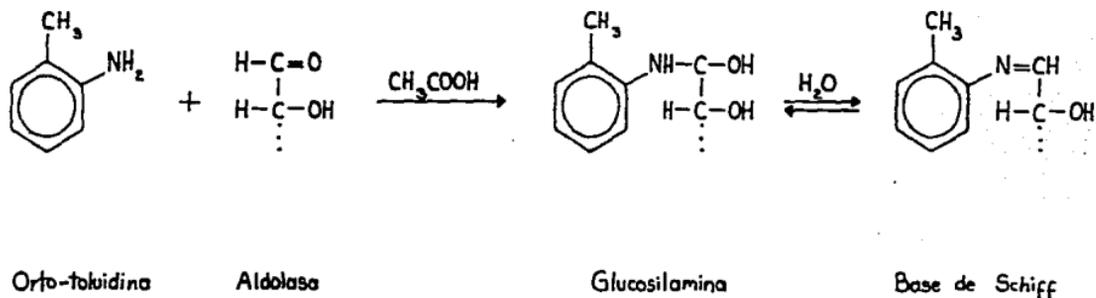
Tubos	Patrón de glucosa con 3 mg/ml	Agua destilada	Equivalente a mg de glucosa/100 ml
1	0.0 ml	3.0 ml	0
2	0.5 ml	2.5 ml	50
3	1.0 ml	2.0 ml	100
4	2.0 ml	1.0 ml	200
5	3.0 ml	0.0 ml	300

La determinación se realiza en 30 minutos aproximadamente.

2.1.4 Linearidad del método.

La curva estándar es lineal hasta una concentración de glucosa de 700 mg/100 ml (70).

Fig. 18 Reacción que se verifica en la determinación de glucosa por el método de la orto-toluidina.



2.2 METODO DEL ACIDO FOSFOTUNGSTICO PARA LA DETERMINACION DE ACIDO URICO.

2.2.1 Fundamento del método.

El ácido úrico en solución alcalina reduce el reactivo de ácido fosfotúngstico y forma un complejo de color azul (Fig. 19). El color final se mide espectrofotométricamente en la región roja del espectro. La densidad óptica del cromógeno formado está en relación lineal con la concentración de ácido úrico presente en la reacción.

Los principales inconvenientes de este método son su inespecificidad, ya que en la sangre hay sustancias que también reducen el reactivo de ácido fosfotúngstico, así como la toxicidad de los componentes del reactivo, y el método requiere de desproteinización.

Este método ha sido utilizado desde fines de la década de los 60's en todo el mundo: por la Secretaría de Salud desde 1971 (28) (29).

Pipetear en tubos de ensayo:

	Blanco	Testigo	Problema
Agua	3.0 ml	----	----
Patrón de ác. úrico 0.01 mg/ml	----	3.0 ml	----
Filtrado	----	----	3.0 ml
Reactivo de ác. fosfotúngstico	1.0 ml	1.0 ml	1.0 ml
Carbonato de sodio al 14%	1.0 ml	1.0 ml	1.0 ml

Mezclar y dejar en reposo 15 minutos a temperatura ambiente. Leer la densidad óptica del cromógeno formado a una longitud de onda de 710 nm o con el filtro correspondiente (rojo), ajustando a 100% de transmitancia o cero de absorbancia con el blanco de reactivos. El color es estable durante 15 minutos.

Convertir la lectura a la concentración por cálculos o con la curva estándar.

$$\text{mg de ácido úrico /100 ml} = \frac{\text{D.O. problema}}{\text{D.O. testigo}} \times 10$$

Curva estándar (debe hacerse con cada lote de reactivos):

Diluir el patrón de ácido úrico 1:100 con agua destilada para obtener una solución estándar que contenga 0.01 mg de ácido úrico/ml. Esta solución es estable una semana si se mantiene en refrigeración.

Medir exactamente para las diluciones de la curva:

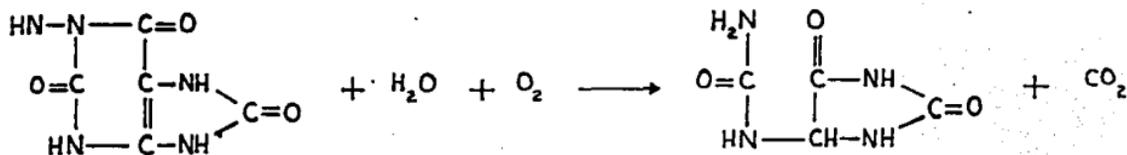
Tubos	Estándar de ácido úrico 0.01 mg/ml	Agua destilada	Equivalente a mg de ác. úrico/100 ml
1	0.0 ml	10.0 ml	0.0
2	2.5 ml	7.5 ml	2.5
3	5.0 ml	5.0 ml	5.0
4	7.5 ml	2.5 ml	7.5
5	10.0 ml	0.0 ml	10.0

La determinación se realiza en 30 minutos aproximadamente.

2.2.4 Linearidad del método.

La curva estándar es lineal hasta una concentración de ácido úrico de 15 mg/100 ml.

Fig. 19 Reacción que se verifica en la determinación de ácido úrico por el método del ácido fosfotúngstico.



Acido úrico

Alantoína

2.3 METODO DE LIEBERMANN-BURCHARD PARA LA DETERMINACION DE COLESTEROL.

2.3.1. Fundamento del método.

El colesterol reacciona con anhídrido acético y ácido sulfúrico concentrado, constituyéndose en polímeros de hidrocarburos no saturados. En el transcurso de la reacción se produce una pérdida de agua y una protonización del colesterol, con lo que se origina un ion de enilcarbonio. A continuación, este compuesto sufre nuevas deshidrogenaciones, proceso por el cual se constituyen más sistemas conjugados insaturados (Fig. 20). El color verde producido se mide espectrofotométricamente.

Los principales inconvenientes de este método son: con este método se pueden encontrar valores 20% más elevados que con los obtenidos en los métodos de extracción por ser un método directo, sueros hemolizados, ictericos o lipémicos dan resultados elevados; y la toxicidad de los componentes del reactivo.

La reacción que se lleva a cabo data del siglo pasado, pero el método como tal fué implantado a fines de la década de los 50's y utilizado en muchos laboratorios de análisis clínicos en todo el mundo. La Secretaría de Salud lo trabaja desde 1971 (30) (31).

2.3.2 Componentes del reactivo para la determinación de colesterol.

El reactivo de color para colesterol (Reactivo de Liebermann-Burchard) está constituido por las siguientes sustancias:

- Acido acético glacial (inerte al ácido crómico)	451 ml/l
- Anhidrido acético ACS	458 ml/l
- Acido sulfúrico ACS	91 ml/l
- Mark-off (* MR)	19 g/l
- Hielo seco CO	780 g/l

El hielo seco debe usarse lo más reciente posible, ya que absorbe la humedad con el paso del tiempo.

Las siglas ACS se refieren a la American Chemical Society.

El estuche de diagnóstico para la determinación de colesterol consta de :

- Reactivo de colesterol, 3 frascos con 175 ml cada uno.
- Acido acético glacial QP, 1 frasco con 10 ml.

- Patrón de colesterol 2 mg/ml, 1 frasco con 10 ml.

2.3.3 Procedimiento.

Para realizar la determinación se utiliza suero o plasma.

Pipetear en tubos de ensayo:

	Blanco	Testigo	Problema
Acido acético glacial QP	0.1 ml	----	----
Patrón de colesterol 2 mg/ml	----	0.1 ml	----
Suero problema	----	----	0.1 ml
Reactivo de color para colesterol (frio)	5.0 ml	5.0 ml	5.0 ml

Mezclar e incubar en baño de agua a 37°C durante 6 minutos. El nivel de agua en el baño debe ser superior al nivel de los reactivos en tubos. Sacar los tubos y secarlos por fuera. Leer la densidad óptica del cromógeno formado en un espectrofotómetro, a una longitud de onda de 625 nm o con el filtro correspondiente (rojo) ajustando a 100% de transmitancia o cero de absorbancia

con el blanco de reactivos. El color es estable 20 minutos (19).

La lectura se convierte a la concentración por cálculos:

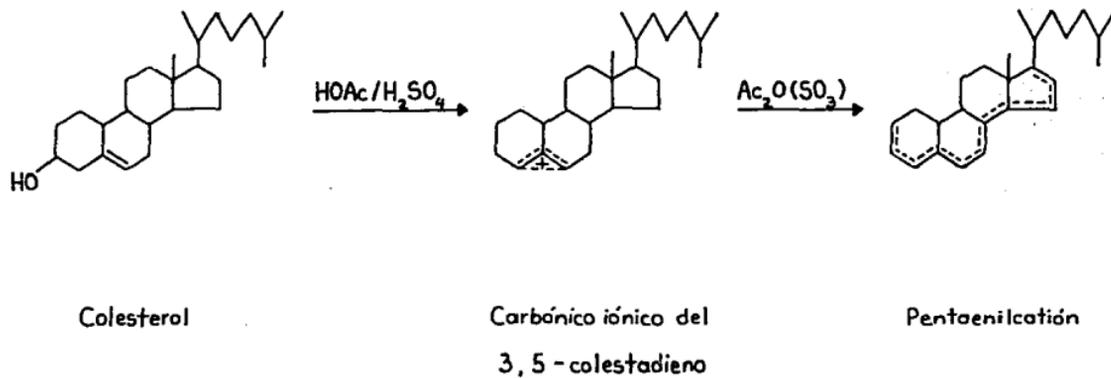
$$\text{mg colesterol/100 ml} = \frac{\text{D.O. problema}}{\text{D.O. testigo}} \times 200$$

La determinación se realiza en 30 minutos aproximadamente.

2.3.4 Linearidad del método.

El método es lineal hasta concentraciones de colesterol de 300 mg/100 ml (73).

Fig. 20 Reacción que se verifica en la determinación de colesterol por el método de Liebenmann-Burchard.



2.4 TOXICIDAD DE LOS COMPONENTES DE LOS REACTIVOS UTILIZADOS (32) (33) (69).

2.4.1 Acidos.

- Acido acético glacial (Contenido en los reactivos para determinación de glucosa y colesterol).

Límite de exposición 10 ppm

Dosis letal calculada 5 ml/kg de peso

- Anhídrido acético (Contenido en el reactivo para determinación de colesterol).

Límite de exposición 5 ppm

Dosis letal calculada 5 ml/kg de peso

- Acido orto-fosfórico (Contenido en el reactivo para determinación de ácido úrico).

Límite de exposición 1 mg/m cúbico

Dosis letal calculada 1 g/kg de peso

- Acido sulfúrico (Contenido en el reactivo para determinación de colesterol).

Límite de exposición 1 mg/m cúbico
Dosis letal calculada 1 ml/kg de peso

Los ácidos corrosivos destruyen los tejidos por acción química directa. La proteína tisular es convertida en proteinato ácido, el cual se disuelve en el ácido concentrado. La hemoglobina es convertida en hematina ácida oscura y es precipitada. La intensa estimulación por el ácido causa pérdida del reflejo del tono vascular. Los hallazgos patológicos son corrosión e irritación. Después de la ingestión frecuentemente se encuentra la perforación por corrosión e irritación. El epitelio del esófago puede descamarse en partes o totalmente. El ojo muestra denudación del epitelio corneal y en casos graves, edema y necrosis de los tejidos mas profundos.

A. Envenenamiento agudo.

1. Ingestión: Dolor intenso con sensación de quemadura en la boca, faringe y abdomen, seguido por vómito y diarrea de sangre precipitada, de color oscuro. La presión arterial cae bruscamente. Se pueden encontrar manchas parduzcas o amarillentas alrededor de, o en la boca.

2. Inhalación: La inhalación de vapores de ácidos o gases irritantes causa tos, sensación de ahogo y síntomas variables de

cefalea, vértigo y debilidad, seguidos después de un período de latencia de 6 a 8 horas por edema pulmonar con sensación de opresión torácica, falta de aire, vértigo, esputo espumoso y cianosis. Los hallazgos físicos concomitantes son hipotensión arterial y alta frecuencia del pulso.

3. Contacto cutáneo: Los síntomas son dolor intenso y manchas parduzcas o amarillentas. Las quemaduras usualmente penetran en su totalidad el grosor de la piel, tienen bordes definidos y sanan lentamente con formación de cicatriz.

4. Contacto ocular: El edema conjuntival y la destrucción de la córnea aparecen por el contacto con ácidos aún diluidos. Los síntomas son dolor, lagrimeo y fotofobia.

B. Envenenamiento crónico (por inhalación). La inhalación prolongada de vapores de ácidos pueden causar erosión de los dientes seguido de necrosis maxilar. La irritación bronquial con tos crónica y los ataques frecuentes de bronconeumonía son comunes. También se observan trastornos gastrointestinales.

2.4.2 Compuestos nitrogenados.

- Orto-toluidina

Límite de exposición 5 ppm

DL 50 5 mg/kg de peso

La o-toluidina transforma la hemoglobina en metahemoglobina. La intensa metahemoglobinemia producida por esta sustancia puede producir hipoxemia lo suficientemente grave como para lesionar las células del Sistema Nervioso Central. En los hallazgos patológicos efectuados en muertes producidas en una intoxicación aguda se encuentran sangre color chocolate, lesiones en el riñón, hígado y bazo, así como hemólisis; pueden también ocurrir ulceraciones en la pared de la vejiga y necrosis.

Las principales manifestaciones en el envenenamiento con este compuesto son cianosis e ictericia.

A. Envenenamiento agudo (por inhalación, absorción cutánea o ingestión). Los síntomas y signos incluyen cianosis con cifras de metahemoglobina mayores del 15% ; cefalea, respiración superficial y desvanecimiento con cifras de metahemoglobina de 40-50% ; confusión, descenso de la presión arterial, letargo y estupor a 60% ; convulsiones, coma y posiblemente muerte con cifras de metahemoglobina del 70% o más.

B. Envenenamiento crónico (por inhalación o absorción cutánea). Ocurren pérdida de peso, anemia, debilidad e irritabilidad.

Pueden ser afectados el sistema nervioso, hígado, riñones y médula ósea.

2.4.3 Sales.

- Tungstato de sodio (Contenido en el reactivo para determinación de ácido úrico).

Límite de exposición 1 mg/m cúbico

Las sales solubles de tungsteno pueden producir fibrosis pulmonar.

- Sulfato de litio (Contenido en el reactivo para determinación de ácido úrico).

Las cifras séricas no deben exceder de 1.5 meq/lit

Puede ocasionar diarrea, vómito, somnolencia, erupciones cutáneas, debilidad muscular, falta de coordinación, movimientos atetósicos, coma y descenso de la presión arterial (32)(33).

CAPITULO 3

METODOS PROPUESTOS

3.1 GLUCOSA.

La formulación que se propone se desarrolló analizando la bibliografía sobre la determinación enzimática-colorimétrica de punto final de la glucosa, a partir de 1980 a la fecha, lo mismo que la información de los reactivos enzimáticos de las casas comerciales.

Se hicieron pruebas con los diferentes componentes que aparecen en la bibliografía, haciendo combinaciones de concentraciones de enzimas, de procedencia de las mismas, de soluciones amortiguadoras tanto de sus componentes como de sus pH's, propiedades fotoquímicas de los compuestos formados, y finalmente de las temperaturas de reacción y de las condiciones de estabilidad de los reactivos (34) (35) (36) (37) (38) (39) (40) (41).

3.1.1 Fundamento del método.

En el método de la glucosa oxidasa/ 4-aminofenazona (que se conoce por sus siglas como GOD-PAP) la glucosa oxidasa convierte enzimáticamente a la glucosa en ácido glucónico y peróxido de hidrógeno, el cual, en presencia de peroxidasa, produce la

copulación oxidativa de la 4-aminofenazona con el 2,4-diclorofenol, dando lugar a la formación de una iminoquinona de color rojo-cereza (Fig. 21), de intensidad proporcional a la cantidad de glucosa presente en la reacción (34).

La longitud de onda óptima para efectuar la lectura del complejo colorido es 520 nm, de acuerdo al espectro de absorción realizado de 400 a 600 nm con patrón de glucosa a una concentración de 3 mg/ml, en el cual la máxima absorción se observa en un rango de 510 a 520 nm (Tabla 4) (Gráfica 1). Sin embargo, ya que pocos laboratorios de la Secretaría de Salud cuentan con espectrofotómetros lo suficientemente sensibles para registrar lecturas de densidad óptica por arriba de 1.0 (las cuales se presentan cuando se analizan muestras con valores de glucosa mayores de 300 mg/dl) se prefiere realizar la lectura a una longitud de onda de 550 nm, ya que de esta manera se obtienen valores más bajos y se aumenta el rango clínico del análisis.

3.1.2 Componentes del reactivo para la determinación de glucosa.

Para llegar a la formulación propuesta, se experimentaron 36 diferentes formulaciones del reactivo enzimático de glucosa, haciendo con cada una determinaciones con patrón de la Secretaría de Salud de 1 y 3 mg de glucosa por ml.

Se probaron soluciones amortiguadoras de fosfatos, acetatos y tris hidroximetil aminometano, con 50 pH's diferentes variando su concentración, alcanzando el pH deseado tanto con reactivos líquidos como sólidos, y se mantuvieron a temperatura ambiente y en refrigeración registrando tanto la temperatura del refrigerador como la del medio ambiente dos veces al día. También se llevó un control del pH y de las características físicas de cada solución. Posteriormente se les agregó cloruro de sodio en distintas concentraciones llevando el mismo control anterior.

Como aceptores se utilizaron 4-aminofenazona, 4-cloro 3-metil fenol y 2,3-diclorofenol. Se combinaron y se usaron diferentes concentraciones de cada uno, intentando también alcanzar su total solubilidad utilizando Brj 96 en distintos porcentajes.

Se probaron dos tipos de glucosa oxidasa, cruda y de tipo X-S, ambas procedentes de Aspergillus niger de 50,000 unidades cada una, marca Sigma Chemical. La glucosa oxidasa cruda tiene una actividad de 7,250 unidades por miligramo de sólido y la tipo X-S 119,000 unidades por miligramo de sólido.

A los reactivos que funcionaron mejor se les agregó azida de sodio como conservador al 0.1%, teniendo como control reactivo sin azida de sodio para verificar que ésta no inhibiera la acción

de la peroxidasa. Se hizo su curva estándar y se corrió su espectro de absorción.

Cuando se determinó la formulación que producía mejores resultados, se le realizaron pruebas de estabilidad durante un mes y medio, analizando diariamente el pH y la densidad óptica del reactivo (que se mantuvo de 0 a 5°C), y realizando determinaciones con patrones estándar de glucosa de 1 y 3 mg/ml (elaborados en el Laboratorio Central de Reactivos) (Tabla 5) (Gráficas 2,3 y 4).

Con el reactivo anterior también se realizaron determinaciones con sueros control para Química Clínica, Moni-trol-ES Level I y Level II (marca Baxter Healthcare y American Date), Kontrollogen LP y Kontrollogen L (marca Behring), Qualitrol N y H (marca Merck), Precipath U y Precinorm U (marca Boehringer Mannheim), cada uno en diferentes lotes (Tabla 6).

Con la formulación más eficiente se desarrollaron, en distintos días, varios lotes piloto de la misma y se les realizaron las siguientes pruebas con el fin de perfeccionar el resultado de las determinaciones:

- Pruebas de reacción a diferentes temperaturas (5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, y 50 °C) con patrones NIST con concentraciones de 1 y 3 mg/dl y con patrones del Laboratorio Central de Reactivos de la Secretaría de Salud en las mismas concentra

ciones, incubando 15 minutos (Tabla 7) (Gráfica 5).

- Estabilidad del color con patrones que equivalen a 100, 200, 300, 400 y 500 miligramos de glucosa por decilitro, midiendo densidad optica de cada uno, a los 15, 60, 120, y 180 minutos. (Tabla 8) (Gráfica 6).

- Se efectuaron determinaciones con 120 sueros de origen humano.

Todas las determinaciones anteriores se efectuaron por triplicado y en diferentes fechas.

El reactivo enzimático para la determinación de glucosa quedó finalmente constituido por las siguientes sustancias:

- Glucosa oxidasa (GOD). Enzima que oxida a la glucosa en ácido glucónico y peróxido de hidrógeno.

Procedente de Aspergillus niger, Tipo X-S ; 50,000 U. E.C.
1.1.3.4. Cat. G-7141 . Sigma Chemical Co.

- Peroxidasa (POD). Enzima que produce la copulación oxidativa de la 4-aminofenazona con el 2,4-diclorofenol.

Procedente de rábano picante, Tipo I ; 100,000 U . E.C.
1.11.1.7 Cat. P-8125. Sigma Chemical Co.

- 4-Aminofenazona. Aceptor de hidrógeno.
(Cat. A-4382 . Sigma Chemical Co.).

- 2,4-Diclorofenol. Aceptor de hidrógeno.
(Cat. D-6023 . Sigma Chemical Co.).

- Tris(hidroximetil)aminometano. Componente de la solución amortiguadora.
(Cat. T-1503 . Sigma Chemical Co.).

- Fosfato monobásico de potasio. Componente de la solución amortiguadora.
(Cat. 3246 . J.T. Baker).

- Cloruro de sodio. Favorece la ionización de los componentes de la solución amortiguadora.
(Merck)

- Azida de sodio. Conservador.
(Cat. S-2002 . Sigma Chemical Co.).

Nota: El número que aparece a continuación de las siglas E.C. hace referencia al número de la Comisión de Enzimas.

REACTIVO UTILIZADO

- Glucosa oxidasa	8000	U/L
- Peroxidasa	1500	U/L
- 4-aminofenazona	0.25	mmol/L
- 2,4-diclorofenol	0.30	mmol/L
- Tris(hidroximetil)aminometano	0.05	mol/L
- Fosfato monobásico de potasio	0.05	mol/L
- Cloruro de sodio	0.07	mol/L
- Azida de sodio	0.0154	mol/L

El contenido del vial se disuelve en 500 ml de agua destilada. El reactivo ya preparado debe conservarse de 2 a 8°C y protegido de la luz. Se observó que en estas condiciones el reactivo es estable 1 mes como mínimo (o hasta que la D.O del blanco sea mayor de 0.2 a 520 nm).

3.1.3 Costo del estuche de diagnóstico para la determinación de glucosa.

El estuche para la determinación enzimática de glucosa está calculado para 250 pruebas. Su costo es de N\$ 14.65 (El precio no

incluye el costo del patrón de glucosa de 6 mg/ml para realizar la curva estándar).

Substancia	Cantidad (gr) para 500 ml de reactivo	Precio (N\$)
- Glucosa oxidasa	0.0214	8.15
- Peroxidasa	0.008	3.81
- 4-aminofenazona	0.025	0.03
- 2,4-diclorofenol	0.02444	0.01
- Tris(hidroximetil) aminometano	3.029	1.97
- Fosfato monobásico de potasio	3.4022	0.34
- Cloruro de sodio	2.0704	0.07
- Azida de sodio	0.5	0.26
TOTAL	9.08044	14.65

3.1.4 Procedimiento.

Para realizar la determinación se utiliza suero o plasma.

Pipetear en tubos de ensayo:

	Blanco	Testigo	Problema
Agua destilada	0.01 ml	---	---
Patrón de glucosa 1 mg/ml	---	0.01 ml	---
Problema	---	---	0.01 ml
Reactivo enzimático para glucosa	2.0 ml	2.0 ml	2.0 ml

Mezclar e incubar en baño María a 37°C durante 15 minutos. Leer la densidad óptica del cromógeno formado en un espectrofotómetro, a una longitud de onda de 550 nm. El color es estable durante 2 horas.

Convertir la lectura a su concentración por cálculos o con la curva estándar.

$$\frac{\text{D.O. problema}}{\text{D.O. testigo}} \times 100 = \text{mg glucosa/100 ml}$$

Curva estándar:

Para realizar la curva estándar se utiliza patrón de glucosa de 6 mg/ml ; medir exactamente las diluciones para la curva:

Tubos	Patrón de glucosa 6 mg/ml	Agua destilada	Equivalente a mg de glucosa/100 ml
1	0.5 ml	2.5 ml	100
2	1.0 ml	2.0 ml	200
3	1.5 ml	1.5 ml	300
4	2.0 ml	1.0 ml	400
5	2.5 ml	0.5 ml	500
6	3.0 ml	0.0 ml	600

Medir 0.01 ml de cada dilución y continuar como se indica en el procedimiento.

La tabla 9 presenta los valores de D.O. que se obtuvieron al realizar la curva estándar (Gráfica 7). Las lecturas se realizaron en un espectrofotómetro Hitachi-Perkin Elmer.

3.1.5 Linearidad del método.

El método es lineal hasta concentraciones de glucosa de 500 mg/100 ml.

NOTA: Las conversiones de % de transmitancia a densidad óptica se hicieron de acuerdo a la tabla de conversiones que se encuentra al final de la tesis.

Fig. 21 Reacción que se verifica en la determinación enzimática de glucosa por el método de la glucosa oxidasa - 4-aminofenazona.

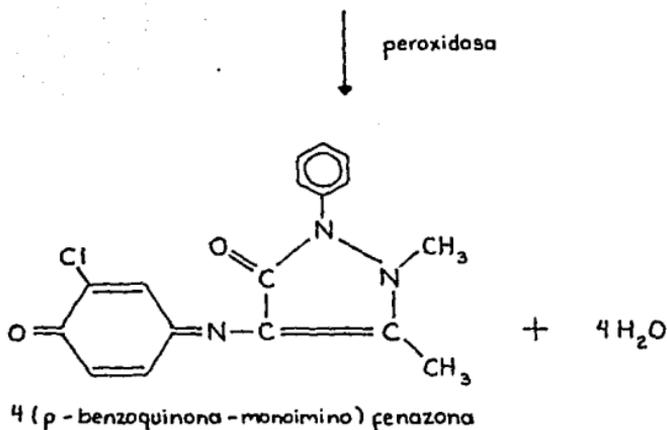
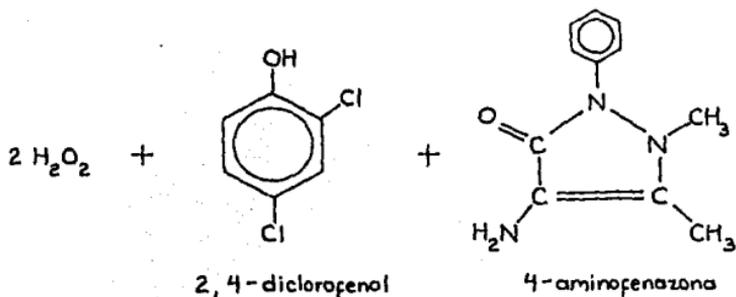
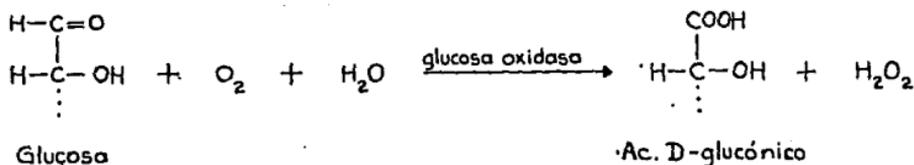


TABLA 4 Espectro de absorción del cromógeno formado en la reacción enzimática de la determinación de glucosa.

Longitud de onda	Patrón de glucosa 300 mg/dl	
	% T	D.O.
400	65.75	0.182
410	66.75	0.176
420	64.50	0.191
430	58.25	0.235
440	48.75	0.312
450	39.00	0.409
460	30.25	0.520
470	23.00	0.638
480	18.00	0.745
490	14.75	0.831
500	13.00	0.886
510	12.25	0.912
520	12.75	0.894
530	14.00	0.854
540	17.25	0.789
550	20.52	0.694
560	24.75	0.606
570	31.75	0.498
580	39.00	0.409
590	48.25	0.317
600	58.25	0.235

Junior. Las lecturas se realizaron en un espectrofotómetro Coleman-

TABLA 5 Pruebas de estabilidad del reactivo enzimático de glucosa.

FECHA	D.O. REACTIVO	pH REACTIVO	D.O. 1 mg/ml	D.O. 3 mg/ml
23/02/93	0.009	7.42	0.342	0.969
24/02/93	0.009	7.42	0.342	0.969
25/02/93	0.010	7.43	0.337	0.959
26/02/93	0.012	7.44	0.340	0.930
01/03/93	0.012	7.42	0.327	0.939
02/03/93	0.011	7.44	0.354	0.907
03/03/93	0.014	7.42	0.329	0.890
04/03/93	0.020	7.43	0.331	0.912
05/03/93	0.019	7.40	0.338	0.903
08/03/93	0.016	7.43	0.333	0.900
09/03/93	0.018	7.45	0.334	0.882
10/03/93	0.020	7.43	0.325	0.900
11/03/93	0.021	7.43	0.322	0.939
12/03/93	0.022	7.46	0.333	0.964
15/03/93	0.021	7.43	0.332	0.934
16/03/93	0.018	7.43	0.334	0.949
17/03/93	0.022	7.46	0.333	0.936
18/03/93	0.024	7.44	0.334	0.903
19/03/93	0.025	7.44	0.326	0.930
22/03/93	0.030	7.46	0.341	0.912
23/03/93	0.030	7.46	0.341	0.903
24/03/93	0.036	7.47	0.317	0.900
25/03/93	0.039	7.48	0.305	0.903
26/03/93	0.039	7.52	0.301	0.884
29/03/93	0.041	7.55	0.286	0.878
30/03/93	0.043	7.58	0.286	0.870
01/04/93	0.042	7.58	0.289	0.854
02/04/93	0.047	7.68	0.272	0.838
03/04/93	0.048	7.70	0.266	0.824
06/04/93	0.048	7.72	0.264	0.803
07/04/93	0.051	7.79	0.260	0.782

Las lecturas se realizaron en un espectrofotómetro Coleman Junior.

TABLA 6 Resumen se los resultados de las determinaciones de glucosa con el reactivo enzimático, utilizando sueros control para Química Clínica.

SUERO	RANGO ACEPTADO EN SUERO CONTROL mg/dl	mg/dl DE GLUCOSA REACTIVO ENZIMATICO
Moni-trol-ES level I	74-82	79
Moni-trol-ES level II	249-282	270
Kontrollogen LP	239-259	248
Kontrollogen L	79-103	90
Qualitrol N	74-100	81
Qualitrol H	167-225	213
Precipath U	221-269	257
Precinorm U	106-130	115

Las lecturas se realizaron en un espectrofotómetro Coleman Junior.

TABLA 7 Efecto de la variación de la temperatura de incubación en las reacciones de determinación enzimática de glucosa.

Temperatura (°C)	D.O. 1 mg/ml	D.O. 3 mg/ml
5	0.185	0.517
10	0.247	0.835
15	0.256	0.813
20	0.270	0.776
25	0.280	0.824
30	0.293	0.878
35	0.313	0.899
40	0.322	0.878
45	0.306	0.870
50	0.319	0.886

Las lecturas se realizaron en un espectrofotómetro Coleman Junior.

Los resultados de las determinaciones realizadas con patrones NIST y con patrones LCR fueron muy similares.

TABLA 8 Estabilidad del color del cromógeno formado en la determinación de glucosa con reactivo enzimático.

GLUCOSA mg/dl	D.O. 15 min.	D.O. 60 min.	D.O. 120 min.	D.O. 180 min.
100	0.388	0.386	0.370	0.373
200	0.801	0.806	0.801	0.801
300	1.170	1.173	1.171	1.168
400	1.606	1.613	1.599	1.579
500	2.060	2.070	2.030	2.020

Las lecturas se realizaron en un espectrofotómetro Hitachi Perkin-Elmer.

TABLA 9 Curva estándar realizada con el reactivo enzimático para la determinación de glucosa.

Equivalente a mg de glucosa/dl	% T	D.O.
100	51.1	0.282
200	26.5	0.570
300	14.3	0.842
400	7.7	1.111
500	3.8	1.426
600	2.3	1.652

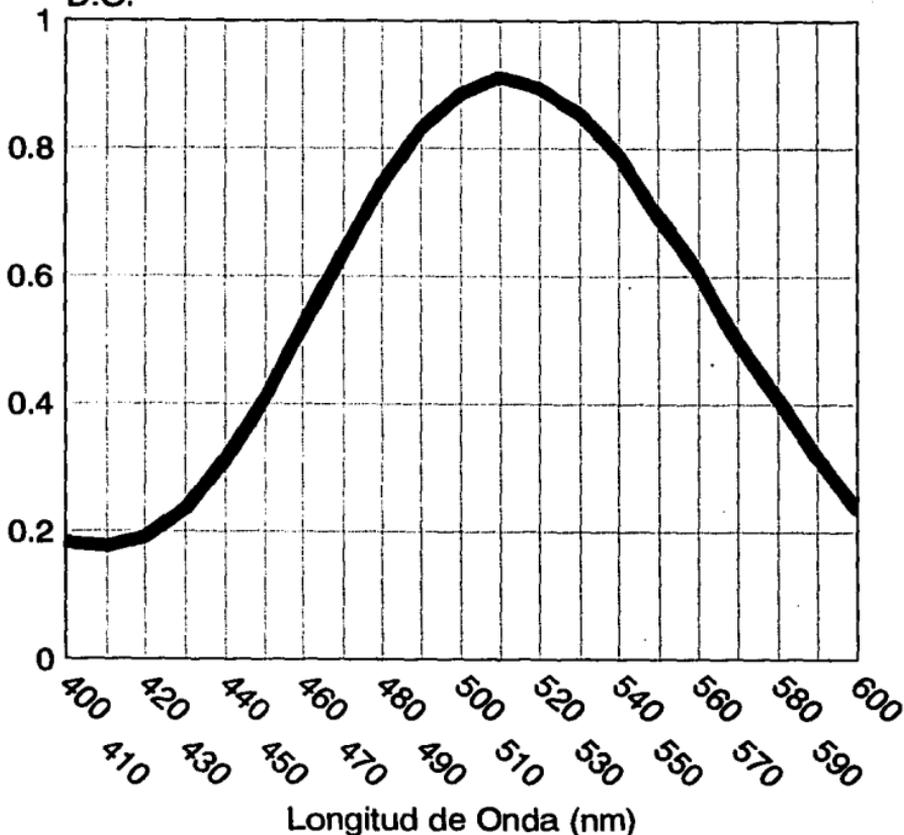
Las lecturas se realizaron en un espectrofotómetro Hitachi-Perkin Elmer.

GRAFICA 1 ESPECTRO DE ABSORCION DEL CROMOGENO FORMADO EN LA REACCION ENZIMATICA DE DETERMINACION DE GLUCOSA

PATRON DE GLUCOSA

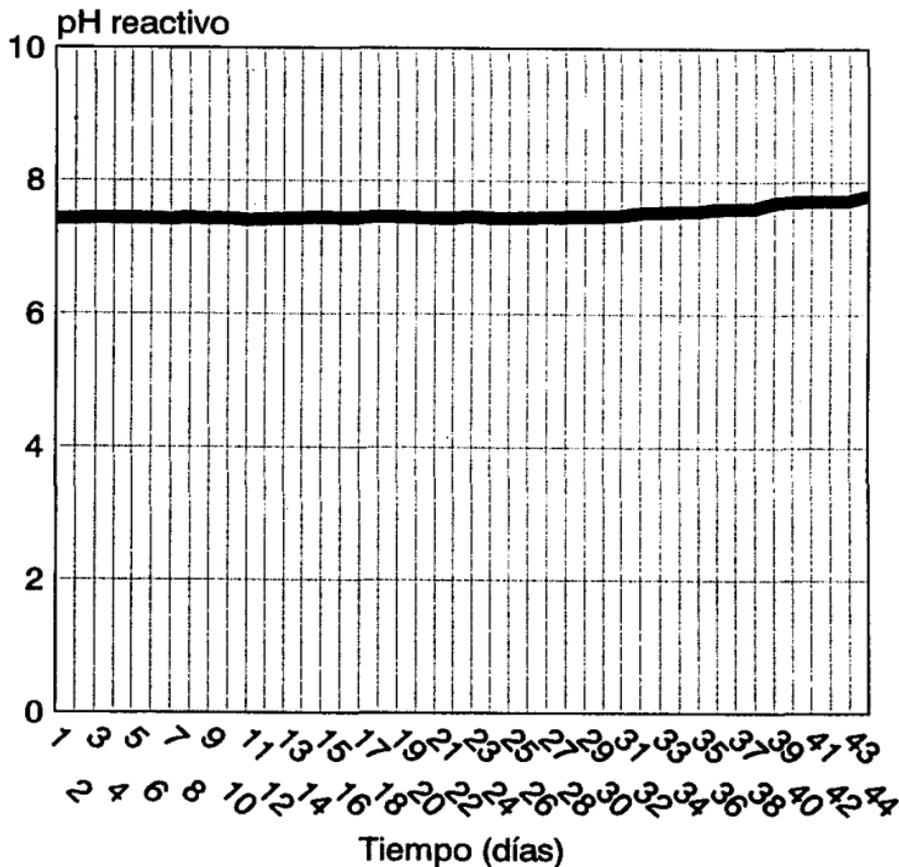
300 mg/dl

D.O.



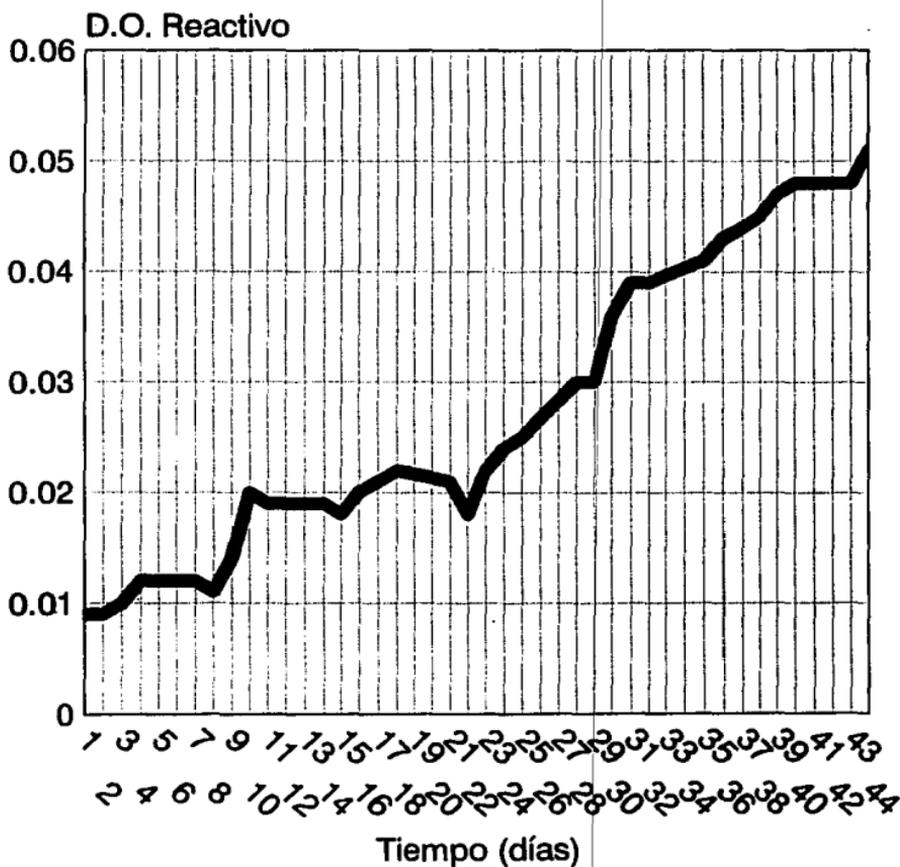
GRAFICA 2

PRUEBAS DE ESTABILIDAD DEL REACTIVO ENZIMATICO DE GLUCOSA



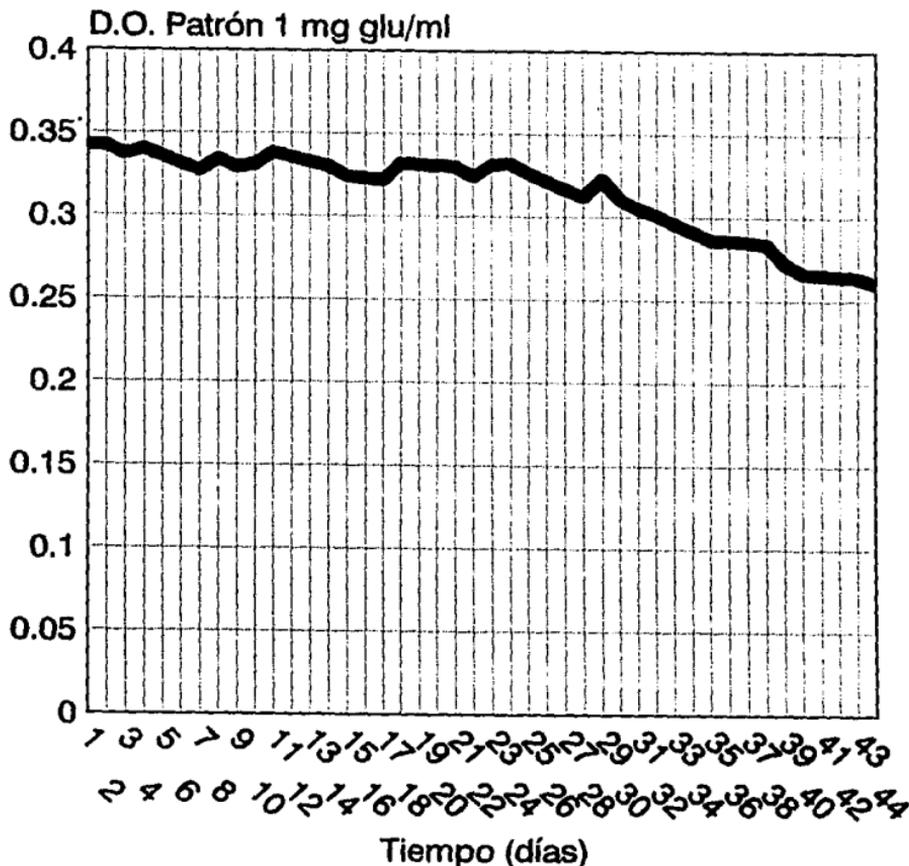
GRAFICA 3

PRUEBAS DE ESTABILIDAD
DEL REACTIVO ENZIMATICO
DE GLUCOSA



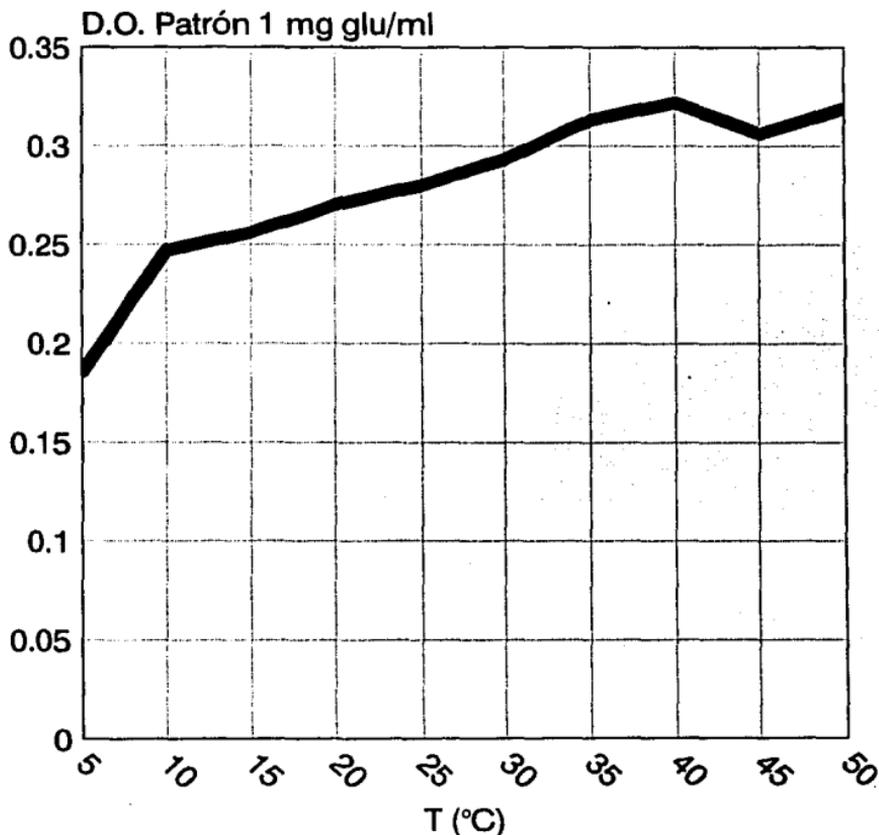
GRAFICA 4

PRUEBAS DE ESTABILIDAD DEL
REACTIVO ENZIMATICO DE
GLUCOSA



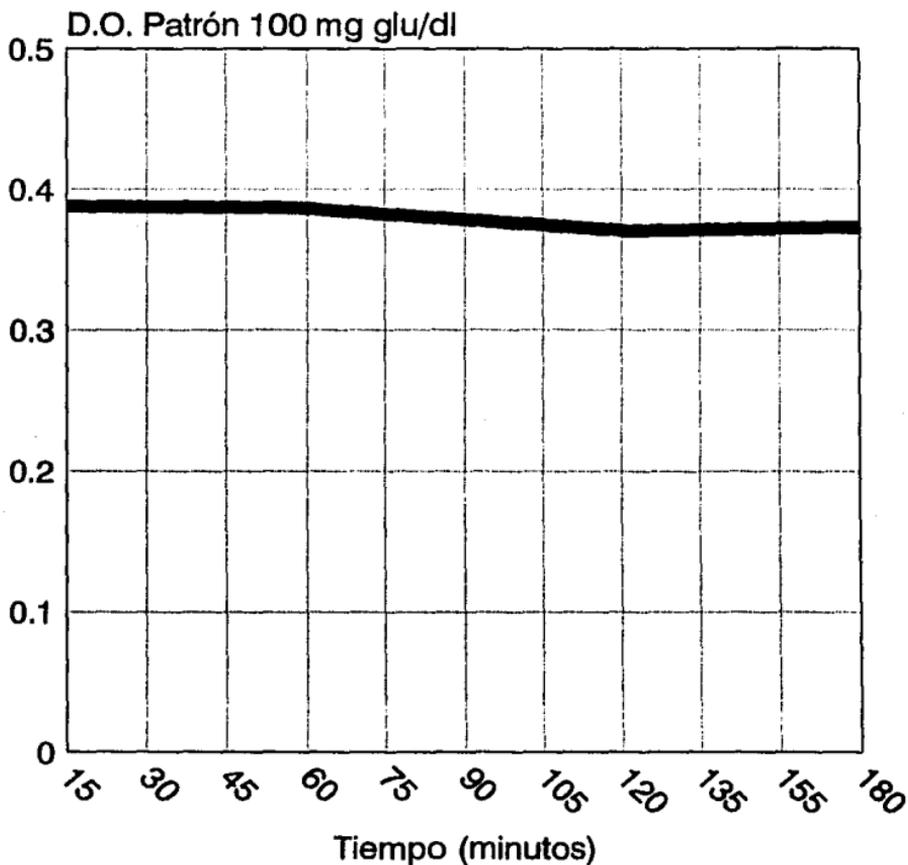
GRAFICA 5

EFFECTO DE LA VARIACION DE LA TEMPERATURA DE INCUBACION EN LAS REACCIONES DE DETERMINACION ENZIMATICA DE GLUCOSA



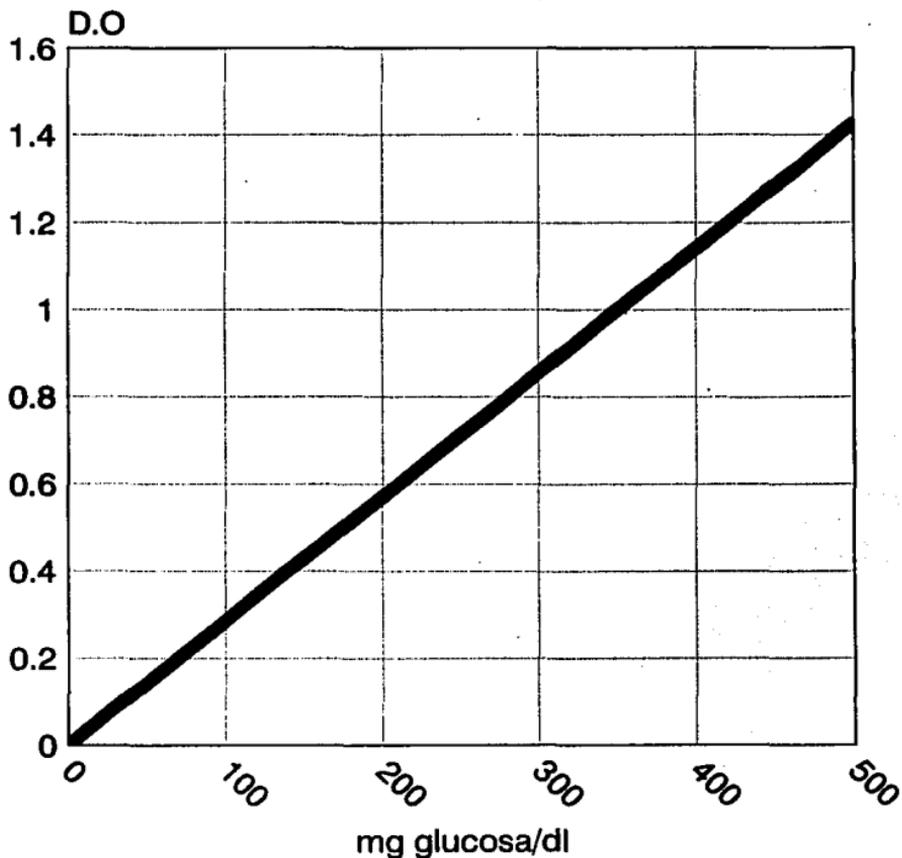
GRAFICA 6

ESTABILIDAD DEL COLOR DEL CROMOGENO FORMADO EN LA DETERMINACION DE GLUCOSA CON REACTIVO ENZIMATICO



GRAFICA 7

CURVA ESTANDAR REALIZADA
CON EL REACTIVO ENZIMATICO
PARA DETERMINACION DE
GLUCOSA



3.2 ACIDO URICO.

Para desarrollar la formulación propuesta se analizó la bibliografía sobre la determinación enzimática-colorimétrica de punto final del ácido úrico, a partir de 1980 a la fecha, así como la información de los reactivos enzimáticos de las casas comerciales. Se realizaron pruebas con los diferentes componentes que aparecen en la bibliografía, haciendo combinaciones de concentraciones, de enzimas, de procedencia de las mismas, de soluciones amortiguadoras tanto de sus componentes como de sus pH's, propiedades fotoquímicas de los compuestos formados y finalmente de las temperaturas de reacción y de las condiciones de estabilidad de los reactivos (44) (45) (46) (47) (48) (49) (50) (51) (52).

3.2.1 Fundamento del método.

La uricasa oxida enzimáticamente al ácido úrico produciendo alantoína, peróxido de hidrógeno y bióxido de carbono. El peróxido de hidrógeno generado produce la copulación oxidativa de la 4-aminofenazona con el ácido 3,5-dicloro-2-hidroxibencensulfónico, mediante una reacción catalizada por la peroxidasa, dando lugar a la formación de una quinonimina roja (Fig. 22) , de

intensidad proporcional a la concentración de ácido úrico presente en la reacción (34) (42).

La longitud de onda óptima para efectuar la lectura del complejo colorido es 520 nm, de acuerdo al espectro de absorción realizado de 400 a 600 nm con patrón de ácido úrico con una concentración de 0.05 mg/ml, en el cual la máxima absorción se observa en un rango de 500 a 520 nm (Tabla 10) (Gráfica 8).

3.2.2 Componentes del reactivo para la determinación de ácido úrico.

Antes de elegir la formulación propuesta se analizaron 41 diferentes formulaciones del reactivo enzimático de Acido Urico.

Las soluciones amortiguadoras estudiadas fueron de fosfatos, realizándolas con fosfato dibásico de sodio, fosfato monobásico de potasio y Tris(hidroximetil)aminometano, probando 36 pH's diferentes variando la concentración de cada uno y combinándolos. Se realizaron pruebas de estabilidad de soluciones mantenidas a temperatura ambiente y en refrigeración, llevando un control de la temperatura, el pH y las características físicas de cada solución.

Como aceptores se utilizaron 4-aminofenazona, ácido 3,5

diclorofenol 2-hidroxibencensulfónico (DHBS) y 2,4 dicloro fenol, combinandolos y variando la concentración de cada uno.

Se probaron tres tipos de uricasa, procedentes de hígado porcino de 100 unidades, de Aspergillus flavus de 100 unidades y Candida utilis de 50 unidades, variando las concentraciones de cada una.

Se les agregó azida de sodio al 0.1% como conservador.

Se trabajó con patrón de ácido úrico del Laboratorio Central de Reactivos con una concentración de 5 mg/dl, pero como éste contiene formaldehído inhibe la acción de la uricasa, por lo que se preparó un patrón disolviendo 60 mg de carbonato de litio en 75 ml de agua destilada a 60°C, posteriormente agregando 100 mg de ácido úrico y aforando a 100 ml. De esta solución se tomó una alícuota de 5 ml y se llevó a un volumen final de 100 ml para obtener un patrón equivalente a 5 mg de ácido úrico por decilitro.

Con este patrón se realizaron todas las pruebas siguientes, por triplicado y en diferentes fechas:

Cuando se determinó la formulación que producía mejores resultados se le realizaron pruebas de estabilidad durante un mes y medio, analizando diariamente el pH y la densidad óptica del reactivo (que se mantuvo de 0 a 5°C), y realizando determina-

ciones con el patrón arriba mencionado (Tabla 11) (Gráficas 9,10 y 11).

Con la formulación más eficiente se desarrollaron, en distintos días, varios lotes piloto de la misma y se les realizaron las siguientes pruebas con el fin de perfeccionar el resultado de las determinaciones:

- Pruebas de reacción a diferentes temperaturas (5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, y 50 °C) incubando 30 minutos (Tabla 12) (Gráfica 12).
- Pruebas para determinar la estabilidad del color del cromógeno formado (30, 60, 120 y 180 minutos) (Tabla 13) (Gráfica 13).
- Se efectuaron determinaciones con 120 sueros de origen humano.

El reactivo enzimático para la determinación de ácido úrico quedó finalmente constituido por las siguientes sustancias:

- Uricasa. Enzima que oxida al ácido úrico produciendo alantoína, peróxido de hidrógeno y bióxido de carbono. de hígado porcino, Tipo V ; 100 U . E.C. 1.7.3.3 Cat. U-9375 Sigma Chemical Co.).

- Peroxidasa. Cataliza la copulación oxidativa de la 4-aminofenazona con el ácido 3,5-dicloro-2-hidroxibencensulfónico.
de rábano picante, Tipo I ; 100,000 U . E.C. 1.11.1.7 Cat. P-8125 . Sigma Chemical Co.
- 4-Aminofenazona. Aceptores de hidrógeno.
Cat. D-6023 . Sigma Chemical Co.
- Acido 3,5-dicloro-2 hidroxibencensulfónico (DHBS). Aceptor de hidrógeno.
Cat. D-4645 . Sigma Chemical Co.
- Fosfato dibásico de sodio. Aceptor de hidrógeno.
Cat. 6586 Merck.

Nota: El número que aparece a continuación de las siglas E.C. hace referencia al número de la Comisión de Enzimas.

REACTIVO UTILIZADO

- | | | |
|--------------|-------|-----|
| - Uricasa | 50.0 | U/L |
| - Peroxidasa | 250.0 | U/L |

- 4-aminofenazona	0.3	mmol/L
- DHBS	3.0	mmol/L
- Fosfato dibásico de sodio	39.7	mol/L
- Fosfato monobásico de potasio	10.3	mol/L
- Azida de sodio	0.0154	mol/L

El contenido del vial se disuelve en 100 ml de agua destilada; el pH del reactivo ya preparado es de 7.35 a 7.40. El reactivo debe conservarse de 2 a 8°C y protegido de la luz. Se observó que en estas condiciones el reactivo es estable 1 mes como mínimo (o hasta que la D.O. del blanco sea mayor de 0.2 a 520 nm).

3.2.3 Costo del estuche de diagnóstico para la determinación de ácido úrico.

El equipo para la determinación enzimática de ácido úrico está calculado para 50 pruebas. Su costo es de N\$ 38.40

Substancia	Cantidad (gr) para 100 ml de reactivo	Precio (N\$)
- Uricasa	0.14750	37.10
- Peroxidasa	0.00026	0.12
- 4-aminofenazona	0.00609	0.01
- Ac. 3,5-dicloro- 2-hidroxi-bencen- sulfónico	0.07950	1.05
- Fosfato dibásico de sodio	0.56354	0.06
- Fosfato monobásico de potasio	0.14014	0.01
- Azida de sodio	0.1	0.05
TOTAL	1.03703	38.40

3.3.3 Procedimiento.

Para realizar la determinación se utiliza plasma o suero.

Pipetear en tubos de ensayo:

	Blanco	Testigo	Problema
Agua destilada	0.05 ml	---	---
Patrón de ácido úrico 5 mg/ml	---	0.05 ml	---
Problema	---	---	0.05 ml
Reactivo enzimático para ácido úrico	2.0 ml	2.0 ml	2.0 ml

Mezclar e incubar en baño María a 37°C durante 30 minutos. Leer la densidad óptica del cromógeno formado en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 520 nm. El color es estable.

Convertir la lectura a su concentración por cálculos o con la curva estándar.

$$\frac{\text{D.O. problema}}{\text{D.O. testigo}} \times 500 = \text{mg ácido úrico/100 ml}$$

Curva estándar:

Para realizar la curva estándar se utiliza patrón de ácido úrico de 20 mg/dl ; medir exactamente las diluciones para la curva.

Tubos	Patrón de ácido úrico 20 mg/dl	Agua destilada	Equivalente a mg de ác. úrico/100 ml
1	0.3 ml	2.7 ml	2
2	0.6 ml	2.4 ml	4
3	0.9 ml	2.1 ml	6
4	1.2 ml	1.8 ml	8
5	1.5 ml	1.5 ml	10
6	1.8 ml	1.2 ml	12
7	2.1 ml	0.9 ml	14
8	2.4 ml	0.6 ml	16
9	2.7 ml	0.3 ml	18
10	3.0 ml	0.0 ml	20

Medir 0.05 ml de cada dilución y continuar como se indica en el procedimiento.

La tabla 14 presenta los valores de D.O. que se obtuvieron al realizar la curva estándar (Gráfica 14). Las lecturas se

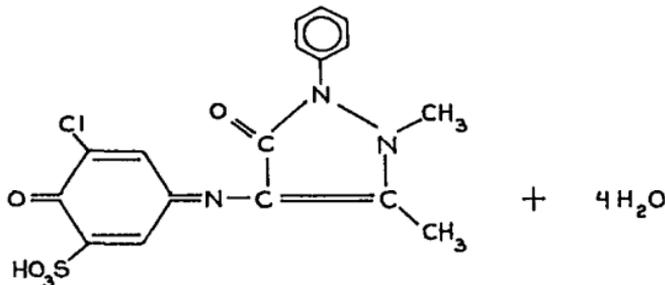
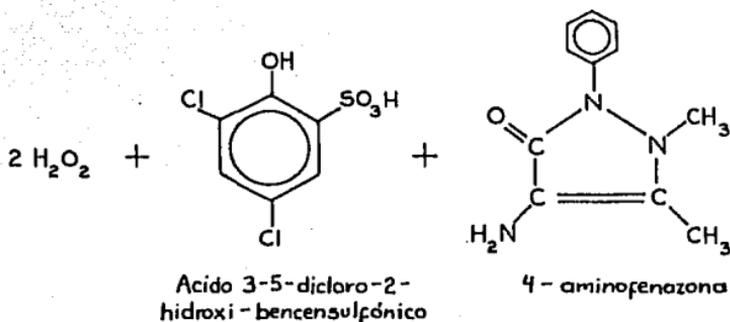
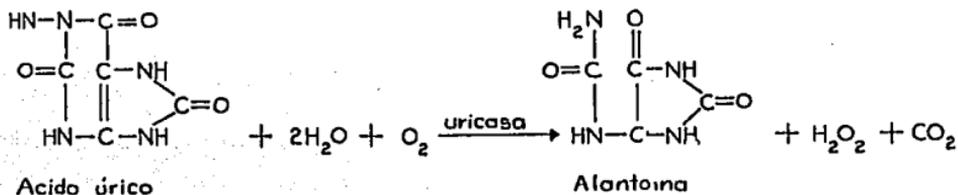
realizaron en un espectrofotómetro Hitachi-Perkin Elmer.

3.2.5 Linearidad del método.

El método es lineal hasta una concentración de ácido úrico de 20 mg/100 ml.

NOTA: Las conversiones de % de transmitancia a densidad óptica se hicieron de acuerdo a la tabla de conversiones que se encuentra al final de la tesis.

Fig. 22 Reacción que se verifica en la determinación enzimática de ácido úrico por el método de la uricasa - 4-aminofenazona.



N-(4-antipiril)-3-cloro-5-sulfonado-p-benzoquinona-monaimina

TABLA 10 Espectro de absorción del cromógeno formado en la reacción enzimática para la determinación de ácido úrico.

Longitud de onda	Patrón de ácido úrico de 5 mg/dl	
	% T	D.O.
400	96.50	0.016
410	97.00	0.013
420	97.00	0.013
430	96.00	0.018
440	95.00	0.020
450	93.50	0.028
460	92.25	0.035
470	90.25	0.045
480	88.25	0.054
490	86.25	0.064
500	84.25	0.069
510	82.00	0.071
520	80.25	0.069
530	78.25	0.064
540	76.00	0.056
550	75.00	0.048
560	75.00	0.040
570	75.00	0.033
580	75.00	0.027
590	75.00	0.024
600	74.00	0.027

TABLA 11 Prueba de estabilidad del reactivo enzimático de ácido úrico.

FECHA	D.O. REACTIVO	pH REACTIVO	D.O. 5 mg/dl
05/04/93	0.043	7.38	0.057
06/04/93	0.046	7.37	0.066
07/04/93	0.047	7.40	0.059
08/04/93	0.046	7.39	0.061
09/04/93	0.046	7.39	0.063
12/04/93	0.046	7.38	0.072
13/04/93	0.046	7.38	0.072
14/04/93	0.046	7.38	0.066
15/04/93	0.046	7.38	0.066
16/04/93	0.046	7.38	0.064
19/04/93	0.048	7.38	0.067
20/04/93	0.052	7.37	0.068
21/04/93	0.052	7.35	0.069
22/04/93	0.052	7.35	0.069
23/04/93	0.053	7.35	0.069
24/04/93	0.053	7.35	0.066
25/04/93	0.056	7.37	0.059
27/04/93	0.054	7.37	0.066
28/04/93	0.056	7.37	0.067
29/04/93	0.056	7.37	0.067
30/04/93	0.059	7.37	0.068
03/05/93	0.057	7.37	0.072
04/05/93	0.057	7.37	0.059
06/05/93	0.057	7.37	0.061
07/05/93	0.059	7.36	0.054
10/05/93	0.061	7.36	0.056
11/05/93	0.061	7.36	0.056
12/05/93	0.061	7.36	0.056
14/05/93	0.061	7.36	0.056
17/05/93	0.063	7.34	0.046
18/05/93	0.063	7.34	0.049
19/05/93	0.064	7.33	0.048
20/05/93	0.067	7.30	0.046

Las lecturas se realizaron en un espectrofotómetro Coleman Junior.

TABLA 12 Efecto de la variación de la temperatura de incubación en las reacciones de determinación enzimática de ácido úrico.

Temperatura °C	D.O. 5 mg/dl
5	0.048
10	0.050
15	0.059
20	0.060
25	0.060
30	0.064
35	0.062
40	0.052
45	0.047
50	0.037

Las lecturas se realizaron en un espectrofotómetro Coleman Junior.

TABLA 13 Estabilidad del color del cromógeno formado en la determinación de ácido úrico con reactivo enzimático.

ACIDO URICO mg/dl	D.O. 30 min.	D.O. 60 min.	D.O. 120 min.	D.O. 180 min.
3	0.030	0.037	0.037	0.035
5	0.059	0.066	0.065	0.064
9	0.144	0.150	0.152	0.140

Estas lecturas se realizaron en espectrofotómetro Coleman Junior.

TABLA 14 Curva estándar realizada con el reactivo enzimático para determinación de ácido úrico.

Equivalente a mg de ácido úrico/dl	% T	D.O.
2	92.75	0.033
4	86.00	0.066
6	79.75	0.098
8	73.75	0.132
10	68.25	0.166
12	63.75	0.196
14	59.00	0.229
16	54.50	0.264
18	50.25	0.299
20	46.50	0.332

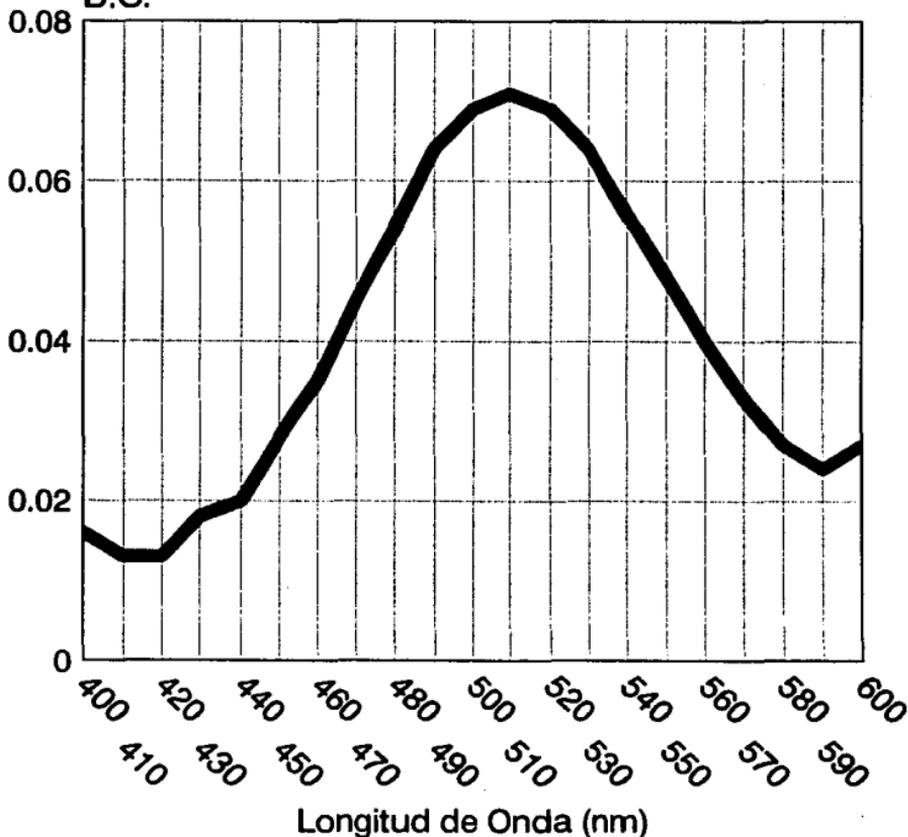
Las lecturas se realizaron en un espectrofotómetro Hitachi Perkin-Elmer.

GRAFICA 8 ESPECTRO DE ABSORCION DEL CROMOGENO FORMADO EN LA REACCION ENZIMATICA DE DETERMINACION DE ACIDO URICO

PATRON DE ACIDO URICO

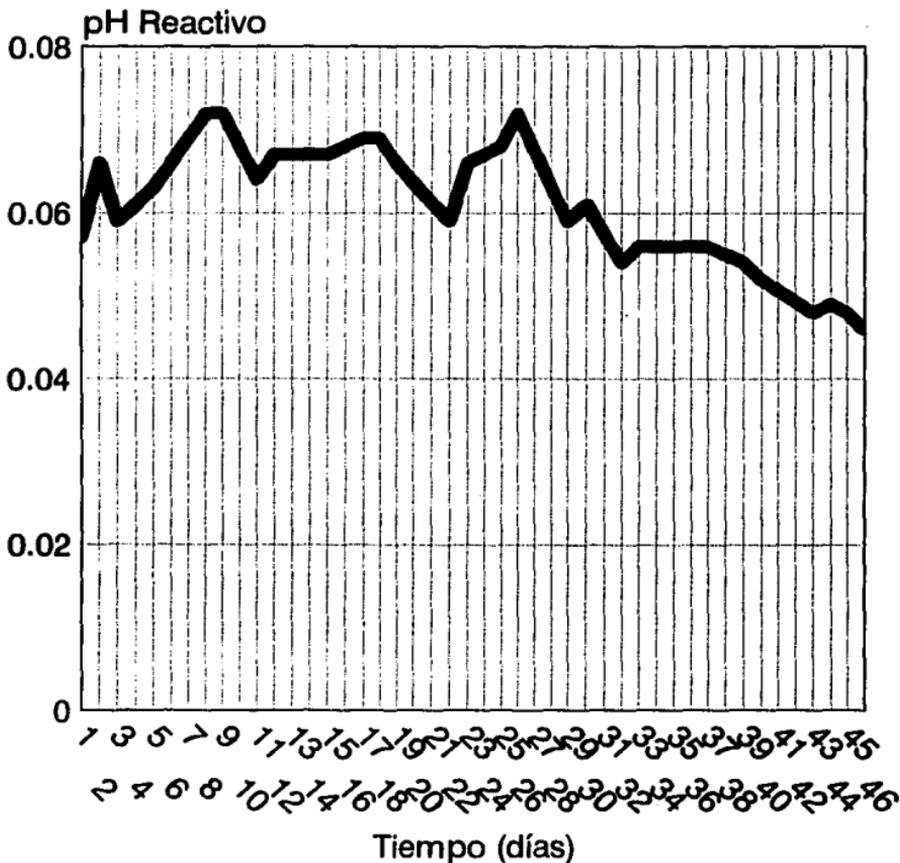
5 mg/dl

D.O.



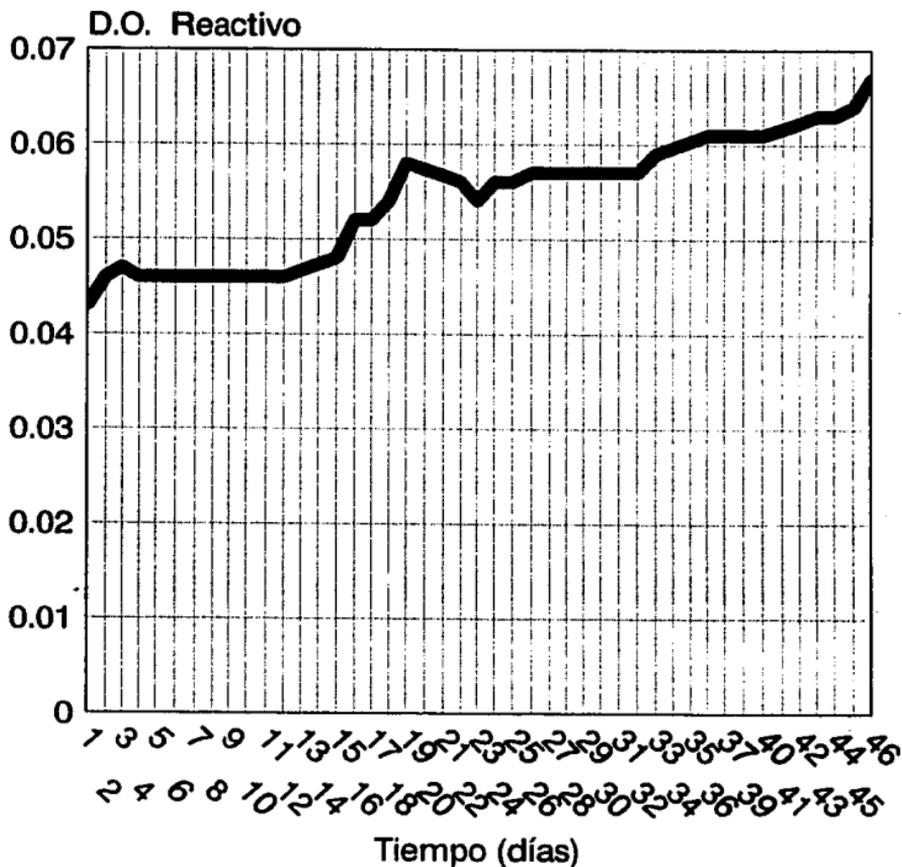
GRAFICA 9

PRUEBAS DE ESTABILIDAD
DEL REACTIVO ENZIMATICO
DE ACIDO URICO



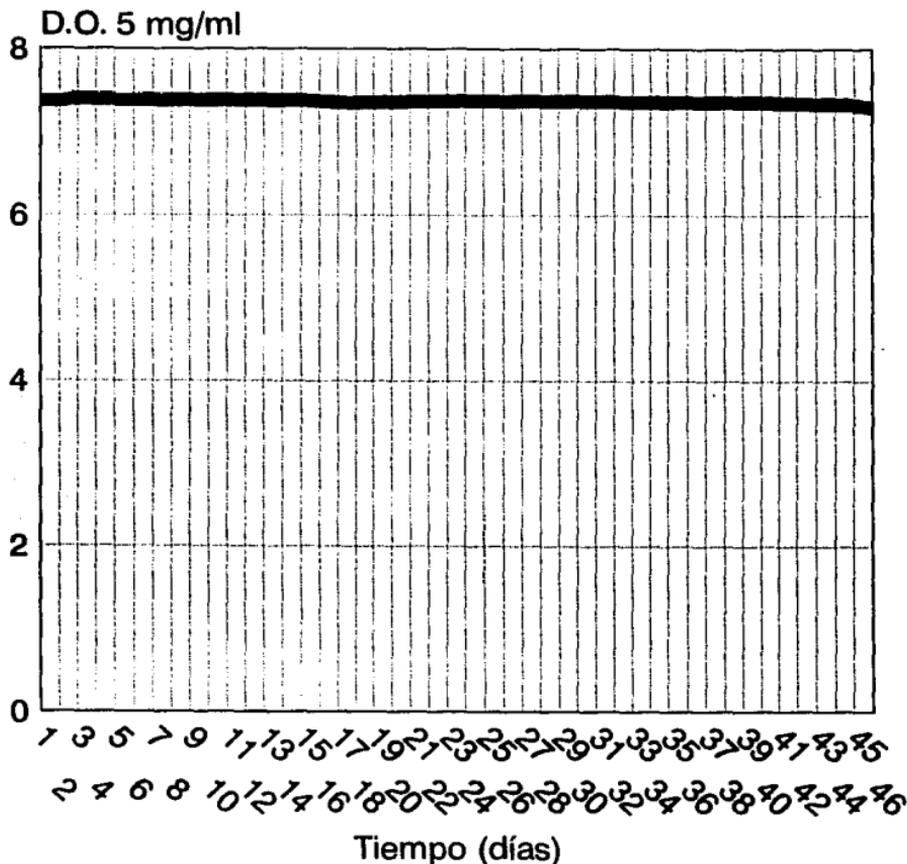
GRAFICA 10

PRUEBAS DE ESTABILIDAD
DEL REACTIVO ENZIMATICO
DE ACIDO URICO



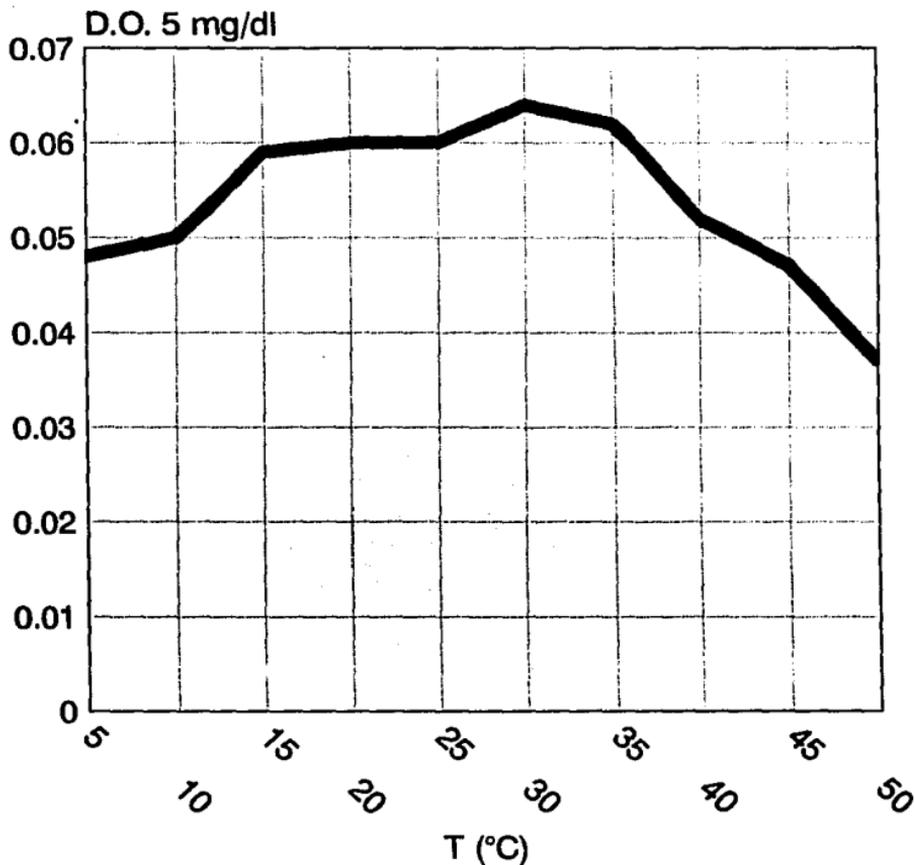
GRAFICA 11

PRUEBAS DE ESTABILIDAD DEL
REACTIVO ENZIMATICO DE
ACIDO URICO



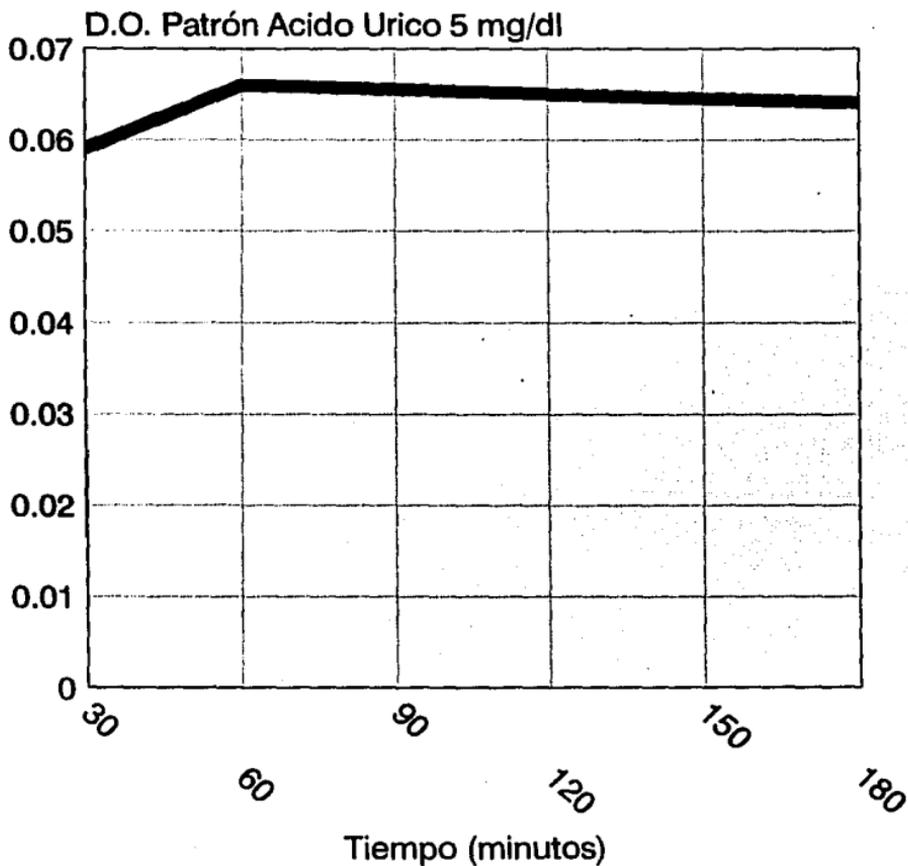
GRAFICA 12

EFFECTO DE LA VARIACION DE LA TEMPERATURA DE INCUBACION EN LAS REACCIONES DE DETERMINACION ENZIMATICA DE ACIDO URICO



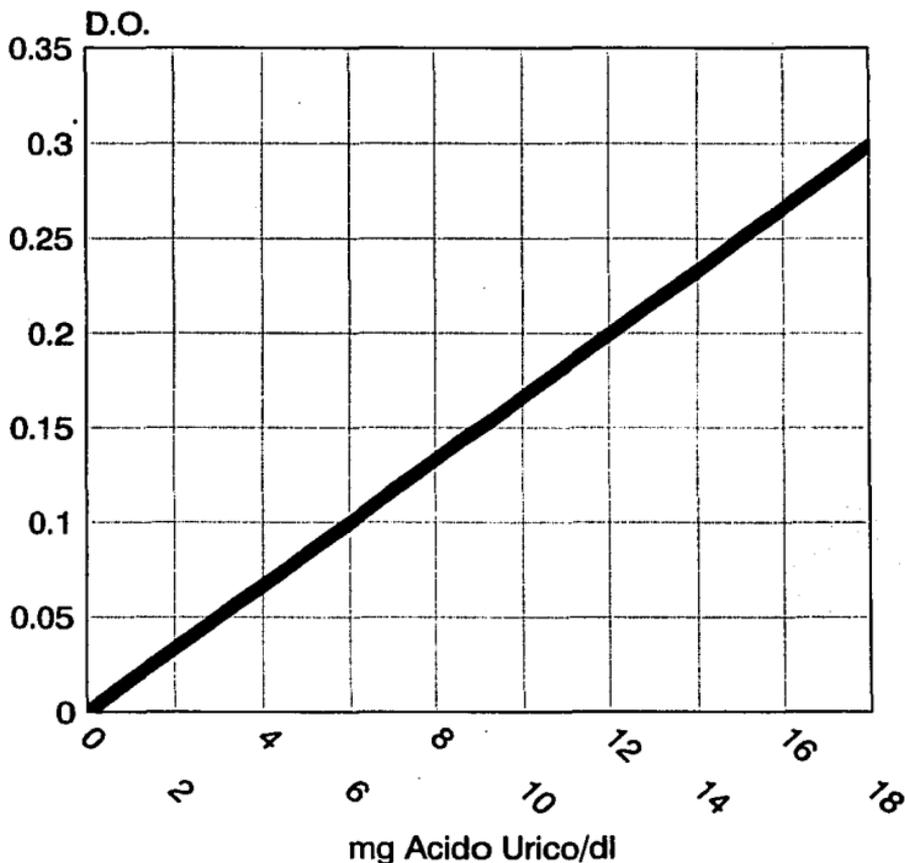
GRAFICA 13

ESTABILIDAD DEL COLOR DEL CROMOGENO FORMADO EN LA DETERMINACION DE ACIDO URICO CON REACTIVO ENZIMATICO



GRAFICA 14

CURVA ESTANDAR REALIZADA
CON EL REACTIVO ENZIMATICO
PARA DETERMINACION DE
ACIDO URICO



3.3 COLESTEROL

La formulación propuesta se desarrolló analizando la bibliografía sobre la determinación enzimático-colorimétrica de punto final del colesterol, a partir de 1980 a la fecha, lo mismo que la información de los reactivos enzimáticos de las casas comerciales. Se hicieron pruebas con los diferentes componentes que aparecen en la bibliografía, haciendo combinaciones de concentraciones, reactivos y pH's óptimos de reacción (53) (54) (55) (56) (57) (58) (59) (60) (61) (62) (63) (64) (65) (66) (67) (68).

3.3.1 Fundamento del método.

La colesterol esterasa cataliza la hidrólisis enzimática de los ésteres del colesterol en ácidos grasos y colesterol libre, el cual es entonces oxidado por la colesterol oxidasa en colest-4-en-3-ona y peróxido de hidrógeno; este último, en presencia de peroxidasa, produce la copulación oxidativa de la 4-aminofenazona y el 2,4-diclorofenol, dando lugar a la formación de una iminoquinona de color rojo-cereza, de intensidad proporcional a la cantidad de colesterol presente en la reacción (34) (54).

La longitud de onda óptima para efectuar la lectura del

complejo colorido es 520 nm, de acuerdo al espectro de absorción realizado de 400 a 600 nm con patrón de colesterol con una concentración de 200 mg/dl, en el cual la máxima absorción se observa en un rango de 500 a 520 nm (Tabla 15)(Gráfica 15).

3.3.2 Componentes del reactivo para la determinación de colesterol.

Para determinar la formulación propuesta se analizaron 12 diferentes formulaciones del reactivo enzimático de colesterol.

Se probaron diferentes sustancias que ayudaran a aumentar la actividad de la enzima colesterol esterasa y la solubilidad de los componentes de la formulación, como: Carbowax 8000, Triton X-100 y Taurocolato de sodio, variando las concentraciones de cada uno y haciendo combinaciones con todos ellos.

Se analizaron tres tipos de colesterol esterasa provenientes de: Pseudomonas fluorescens con 500 unidades, Pseudomonas species con 500 unidades y de páncreas bovino con 1000 unidades; y dos tipos de colesterol oxidasa, de Nocardia erythropolis con 100 unidades, y de Pseudomonas fluorescens con 500 unidades. Se variaron las concentraciones de cada enzima, así como la temperatura y tiempo de formulación.

A las formulaciones se les agregó azida de sodio al 0.1% como conservador.

Para realizar las determinaciones se utilizó patrón de colesterol de 200 mg/dl. Con este patrón se realizaron todas las pruebas siguientes, por triplicado y en diferentes fechas:

Cuando se determinó la formulación que producía mejores resultados se le realizaron pruebas de estabilidad durante un mes y medio, analizando diariamente el pH y la densidad óptica del reactivo (que se mantuvo de 0 a 5°C), y realizando determinaciones con el patrón arriba mencionado (Tabla 16) (Gráficas 16,17 y 18).

Con la formulación más eficiente se desarrollaron, en diferentes días, varios lotes piloto de la misma a los que se les realizaron las siguientes pruebas con el fin de perfeccionar el resultado de las determinaciones:

- Pruebas de reacción a diferentes temperaturas (5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 y 50°C) incubando 30 minutos. (Tabla 17) (Gráfica 19).
- Pruebas para determinar la estabilidad del color del cromógeno formado (30, 60, 120 y 180 minutos). (Tabla 18) (Gráfica 20).
- Se efectuaron determinaciones con 120 sueros de origen humano.

El reactivo enzimático para la determinación de colesterol está constituido por las siguientes sustancias:

- Colesterol esterasa
(de Pseudomonas species ; 500 U . E.C. 3.1.1.13 Cat. C-1403 Sigma Chemical Co.).

- Colesterol oxidasa
(de Pseudomonas fluorescens ; 500 U . E.C. 1.1.3.6 Cat. C-7149 Sigma Chemical Co.).

- 4-Aminofenazona
(Cat. A-4382 Sigma Chemical Co.).

- 2,4-Diclorofenol
(Cat. D-6023 Sigma Chemical Co.).

- Acido taurocólico
(Cat. T-4009 Sigma Chemical Co.).

- Azida de sodio
(Cat. S-2002 Sigma Chemical Co.).

Nota: El número que aparece a continuación de las siglas E.C. hace referencia al número de la Comisión de Enzimas.

REACTIVO UTILIZADO

- Colesterol esterasa	100	U/L
- Colesterol oxidasa	100	U/L
- Peroxidasa	1500	U/L
- 4-aminofenazona	0.5	mmol/L
- 2,4-diclorofenol	0.6	mmol/L
- Fosfato dibásico de sodio	29.2	mmol/L
- Fosfato monobásico de potasio	20.8	mmol/L
- Acido taurocólico	5.2	mmol/L
- Azida de sodio	0.0154	mol/L

El contenido del vial se disuelve en 500 ml de agua destilada; el pH del reactivo ya preparado es de 6.95 a 7.0 . El reactivo debe conservarse de 2 a 8°C y protegido de la luz. Se observó que el reactivo es estable 1 mes como mínimo (o hasta que la D.O. del blanco sea mayor de 0.2 a 520 nm).

3.3.3 Costo del estuche de diagnóstico para la determinación de colesterol.

El estuche para la determinación enzimática de colesterol está calculado para 250 pruebas. Su costo es de N\$ 393.20

Substancia	Cantidad (gr) para 500 ml de reactivo	Precio (N\$)
- Colesterol esterasa	0.00025	211.11
- Colesterol oxidasa	0.00970	100.00
- Peroxidasa	0.00800	3.81
- 4-aminofenazona	0.05080	0.05
- 2,4-diclorofenol	0.04890	0.02
- Fosfato dibásico de sodio	2.07260	0.12
- Fosfato monobásico de potasio	1.41530	0.14
- Taurocolato de sodio	1.39800	77.62
- Azida de sodio	0.5	0.26
TOTAL	5.50355	393.20

3.3.4 Procedimiento.

Para llevar a cabo la determinación se utiliza suero o plasma.

Pipetear en tubos en ensayo:

	Blanco	Testigo	Problema
Agua destilada	0.02 ml	---	---
Patrón de colesterol 2 mg/ml	---	0.02 ml	---
Problema	---	---	0.02 ml
Reactivo enzimático para colesterol	2.0 ml	2.0 ml	2.0 ml

Mezclar e incubar en baño María a 37°C durante 30 minutos. Leer la densidad óptica del cromógeno formado en un espectrofotómetro, a una longitud de onda de 520 nm. El color es estable durante 2 horas.

Convertir la lectura a su concentración por cálculos o con la curva estándar.

$$\frac{\text{D.O. problema}}{\text{D.O. testigo}} \times 200 = \text{mg colesterol/100 ml}$$

Curva estándar:

Para realizar la curva estándar se utiliza patrón de colesterol de 200 mg/dl. (Tabla 19) (Gráfica 21).

Tubo	Patrón de colesterol 200 mg/100 ml	Reactivo enzimático para determinación de colesterol	Equivalente a mg de colesterol/100 ml
1	0.01 ml	2.01 ml	1
2	0.02 ml	2.00 ml	200
3	0.03 ml	1.99 ml	600
4	0.04 ml	1.98 ml	800

3.3.5 Linearidad del método.

El método es lineal hasta una concentración de colesterol de 800 mg/100 ml.

NOTA: Las conversiones de % de transmitancia a densidad óptica se hicieron de acuerdo a la tabla de conversiones que se encuentra al final de la tesis.

Fig. 23 Reacción que se verifica en la determinación enzimática de colesterol por el método de la colesterol oxidasa - 4-aminofenazona.

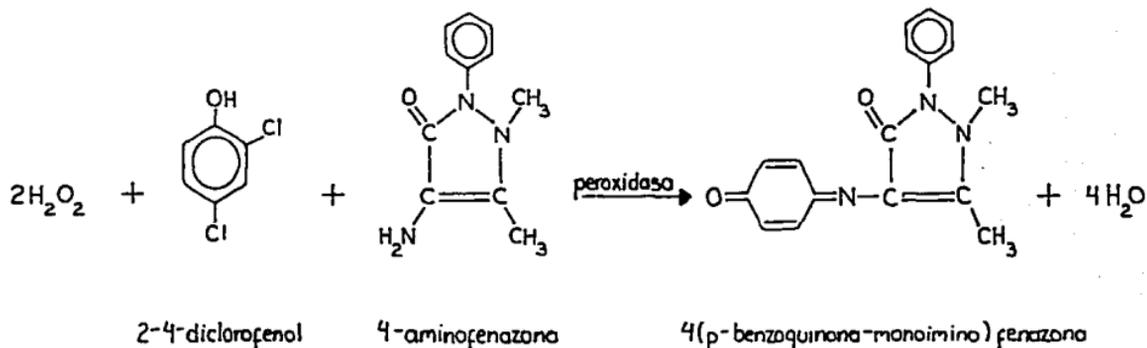
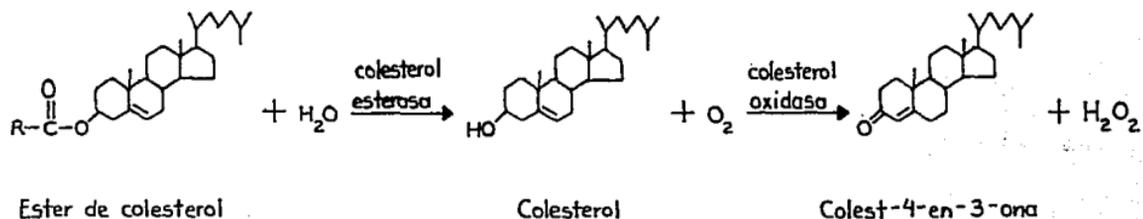


TABLA 15 Espectro de absorción del cromógeno formado en la reacción enzimática de la determinación de colesterol.

Longitud de onda	Patrón de colesterol 200 mg/dl	
	% T	D.O.
400	70.75	0.150
410	71.25	0.147
420	69.25	0.160
430	64.25	0.182
440	64.50	0.226
450	56.50	0.248
460	48.00	0.319
470	40.25	0.395
480	33.50	0.475
490	28.25	0.549
500	24.75	0.606
510	23.25	0.634
520	23.00	0.638
530	24.50	0.611
540	25.50	0.594
550	31.75	0.488
560	37.00	0.432
570	43.00	0.367
580	50.00	0.301
590	56.75	0.246
600	63.25	0.199
	69.75	0.157

Las lecturas se realizaron en un espectrofotómetro Coleman Junior.

TABLA 16

Prueba de estabilidad del reactivo enzimático de colesterol.

FECHA	D.O. 200 mg/dl.	pH REACTIVO	D.O. REACTIVO
05/04/93	0.581	6.97	0.006
06/04/93	0.577	6.97	0.006
07/04/93	0.594	6.96	0.007
08/04/93	0.602	6.96	0.008
09/04/93	0.594	6.95	0.011
12/04/93	0.598	6.94	0.011
13/04/97	0.596	6.96	0.010
14/04/93	0.596	6.96	0.010
15/04/93	0.596	6.96	0.010
16/04/93	0.611	6.96	0.010
19/04/93	0.585	6.96	0.011
20/04/93	0.596	6.96	0.012
21/04/93	0.596	6.96	0.013
22/04/93	0.594	6.96	0.013
23/04/93	0.581	6.94	0.014
26/04/93	0.598	6.96	0.019
27/04/93	0.578	6.96	0.018
28/04/93	0.595	6.96	0.018
29/04/93	0.594	6.96	0.018
30/04/93	0.602	6.96	0.019
03/05/93	0.600	6.96	0.019
04/05/93	0.594	6.93	0.019
06/05/93	0.600	6.90	0.019
07/05/93	0.599	6.90	0.020
10/05/93	0.585	6.88	0.020
11/05/93	0.589	6.88	0.020
12/05/93	0.584	6.88	0.021
13/05/93	0.581	6.87	0.021
14/05/93	0.577	6.87	0.022
17/05/93	0.581	6.87	0.022
18/05/93	0.500	6.86	0.023
19/05/93	0.573	6.86	0.023
20/05/93	0.569	6.86	0.023

Las lecturas se realizaron en un espectrofotómetro Coleman Junior.

TABLA 17

Efecto de la variación de la temperatura de incubación en las reacciones de determinación enzimática de colesterol.

TEMPERATURA °C	D.O. 200 mg/dl
5	0.546
10	0.626
15	0.602
20	0.604
25	0.616
30	0.608
35	0.611
40	0.589
45	0.587
50	0.537

Las lecturas se realizaron con un espectrofotómetro Coleman Junior.

TABLA 18 Estabilidad del color del cromógeno formado en la determinación de colesterol con reactivo enzimático.

COLESTEROL mg/dl	D.O. 30 min.	D.O. 60 min.	D.O. 120 min.	D.O. 180 min.
200	0.602	0.602	0.598	0.594

Las lecturas se realizaron en un espectrofotómetro Coleman Junior.

TABLA 19 Curva estándar realizada con el reactivo enzimático para la determinación de colesterol.

Equivalente a mg de colesterol/dl	% T	D.O.
100		0.305
200		0.611
600		1.833
800		2.444

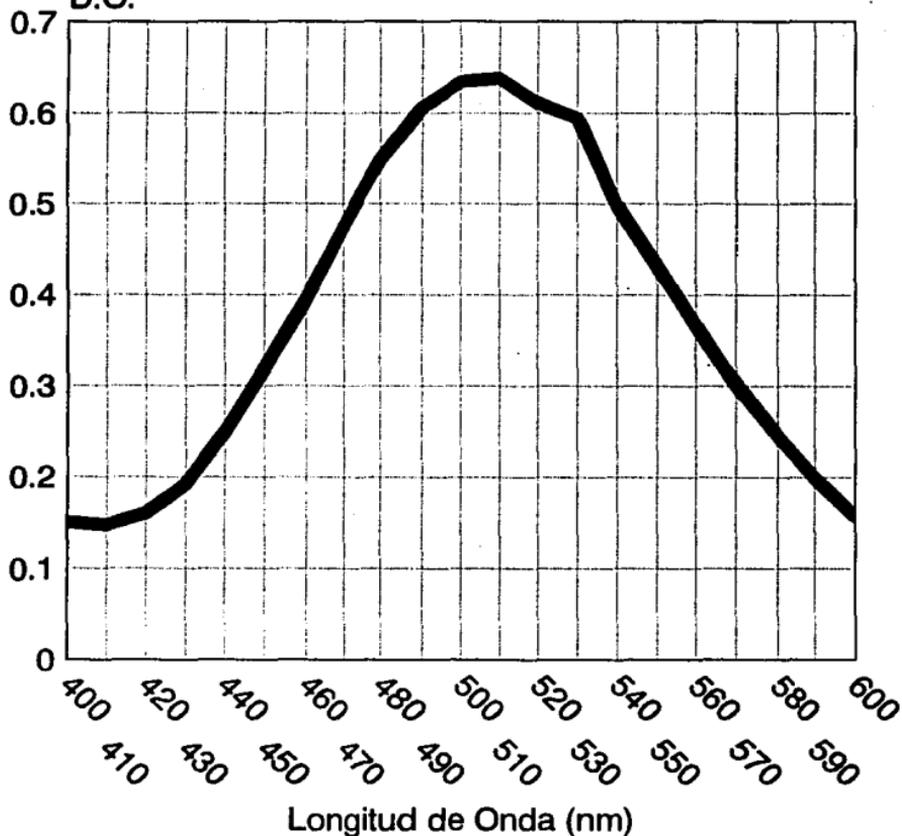
Las lecturas se realizaron en un espectrofotómetro Hitachi Perkin-Elmer.

GRAFICA 15 ESPECTRO DE ABSORCION DEL CROMOGENO FORMADO EN LA REACCION ENZIMATICA DE DETERMINACION DE COLESTEROL

PATRON DE COLESTEROL

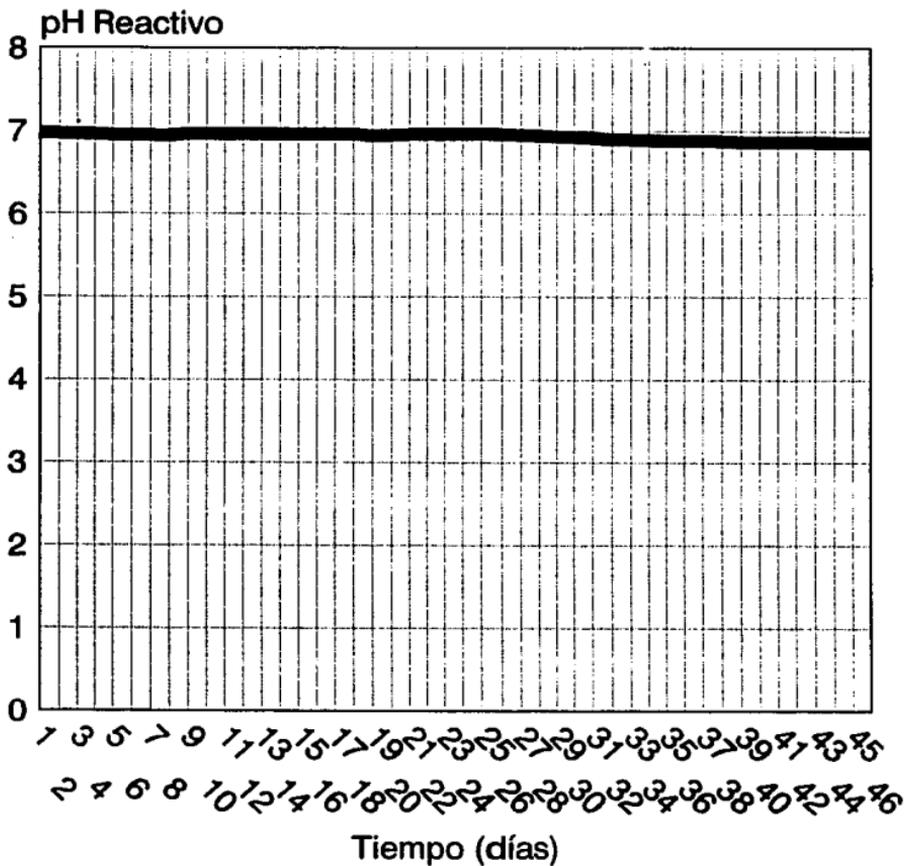
200 mg/dl

D.O.



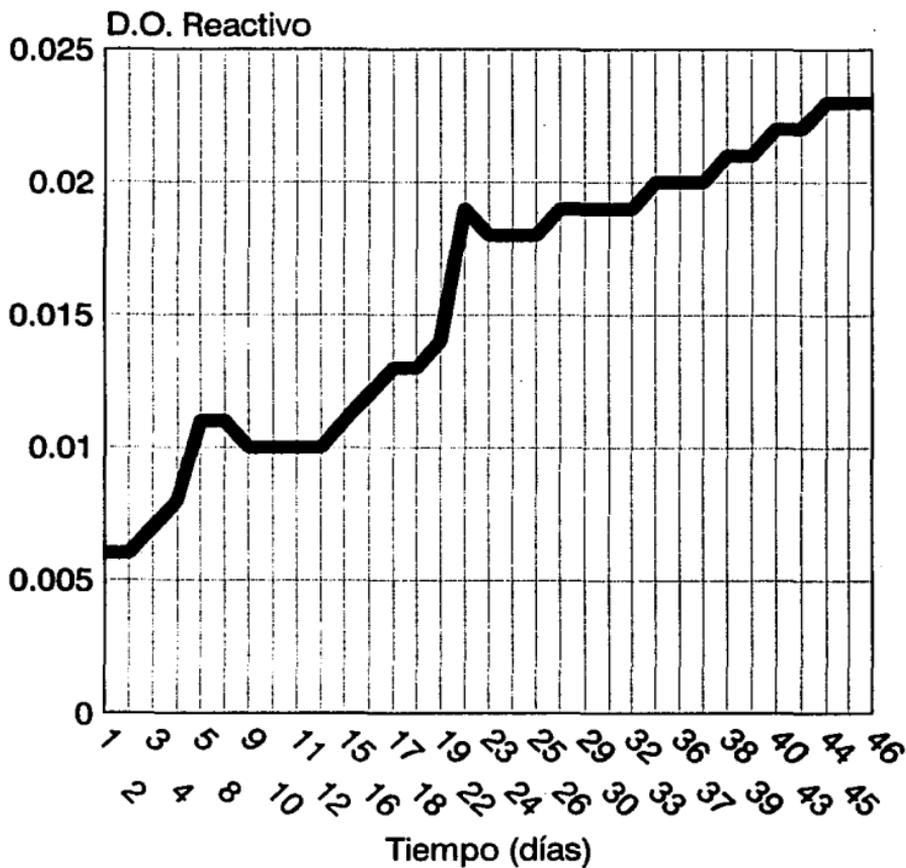
GRAFICA 16

PRUEBAS DE ESTABILIDAD
DEL REACTIVO ENZIMATICO
DE COLESTEROL



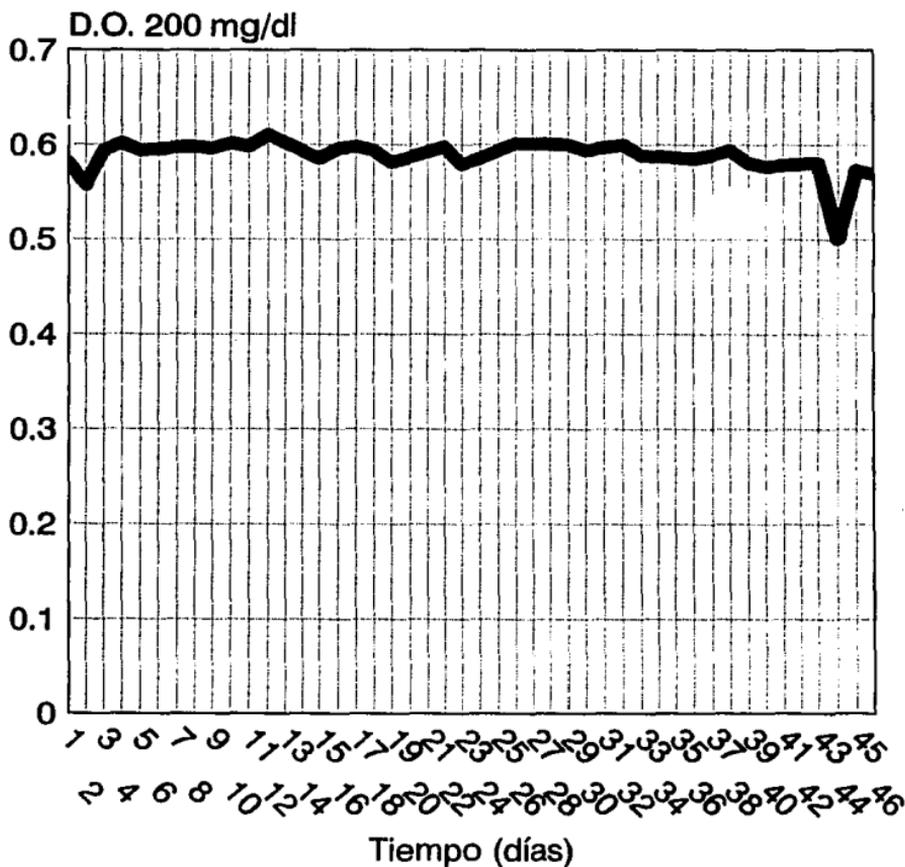
GRAFICA 17

PRUEBAS DE ESTABILIDAD DEL
REACTIVO ENZIMATICO DE
COLESTEROL



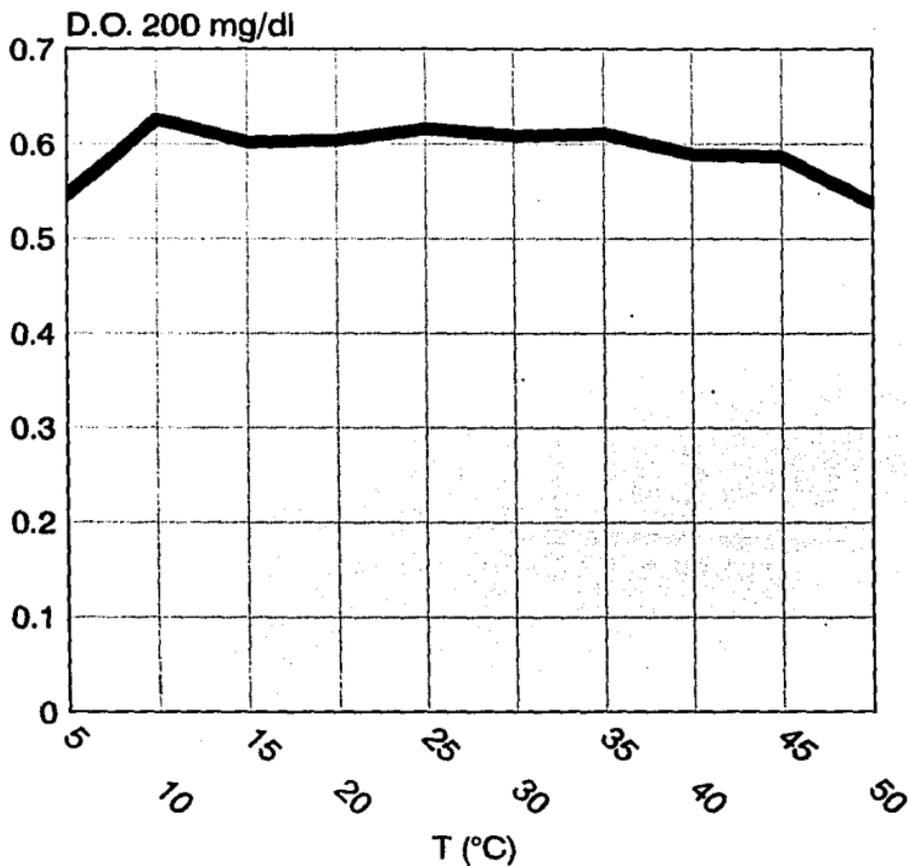
GRAFICA 18

PRUEBAS DE ESTABILIDAD
DEL REACTIVO ENZIMATICO
DE COLESTEROL



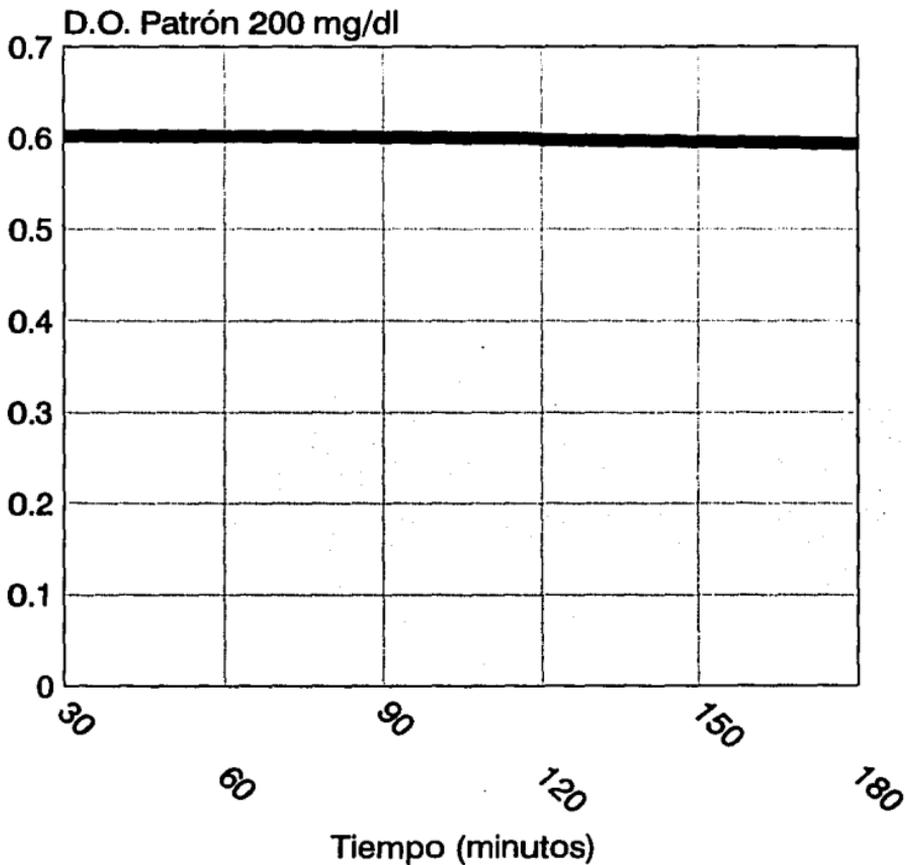
GRAFICA 19

EFFECTO DE LA VARIACION DE LA TEMPERATURA DE INCUBACION EN LAS REACCIONES DE DETERMINACION ENZIMATICA DE COLESTEROL



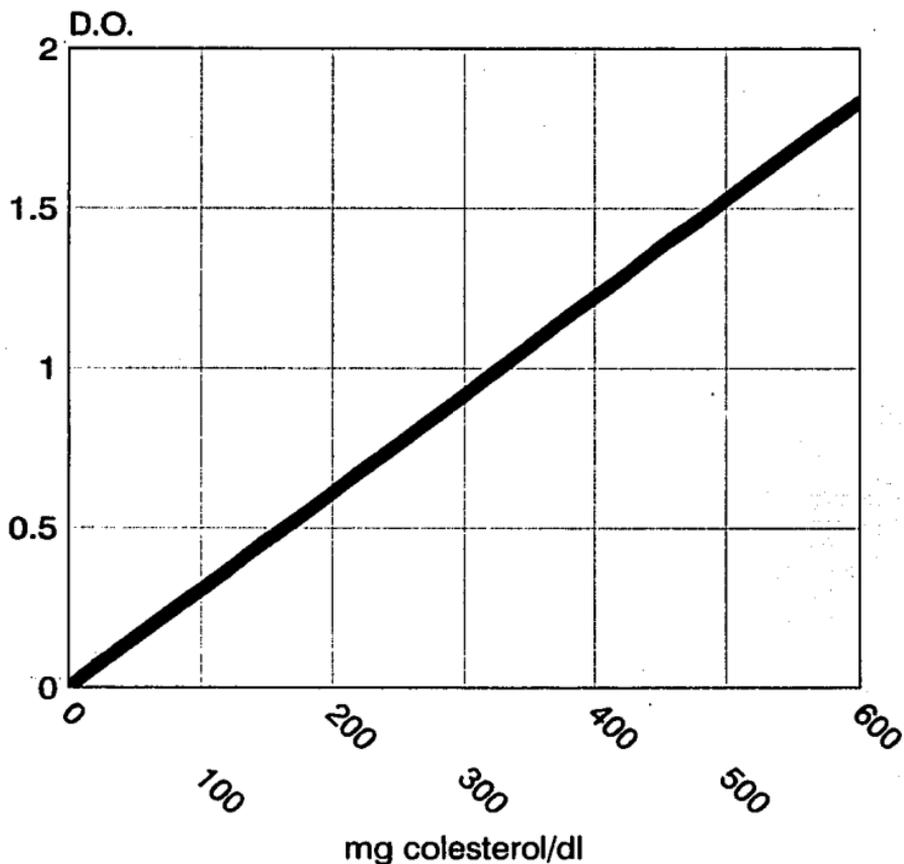
GRAFICA 20

ESTABILIDAD DEL COLOR DEL CROMOGENO FORMADO EN LA DETERMINACION DE COLESTEROL CON REACTIVO ENZIMATICO



GRAFICA 21

CURVA ESTANDAR REALIZADA
CON EL REACTIVO ENZIMATICO
PARA DETERMINACION DE
COLESTEROL



3.4 TOXICIDAD DE LOS REACTIVOS UTILIZADOS. (32)(33)(69)

La prevención del envenenamiento requiere del conocimiento adecuado de las propiedades nocivas de las sustancias. El químico laboratorista debe ser educado en los peligros que representan los diferentes productos químicos con los que va a trabajar.

El equipo y ropa protectora consta del uso de máscaras para filtración de partículas, ventilación por extractores de aire durante el pesado y mezclado en seco, lentes de protección, y guantes de tela con recubrimiento de hule natural para proteger contra ácidos, sales y cetonas, siempre que sea necesario.

A continuación se da un resumen del procedimiento de urgencia en caso de envenenamiento:

a) Venenos ingeridos: Mantenga la respiración y la circulación. Induzca el vómito (excepto cuando se han ingerido ácidos o alcalis, ya que aumenta la posibilidad de perforación gástrica) dando 15 ml de jarabe de hipecacuana por vía bucal y posteriormente administre carbón activado.

b) Contaminación cutánea: Enjuague abundantemente con agua toda el área contaminada para diluir y remover el veneno.

c) Venenos inhalados: Retirar al enfermo del sitio de exposición, establecer un adecuado conducto para aire y administrar oxígeno y respiración artificial.

d) Lesiones oculares: Enjuagar el ojo con abundante agua.

3.4.1 Compuestos aromáticos.

- 4-aminofenazona (Contenida en los reactivos enzimáticos para determinación de glucosa, colesterol y ácido úrico).

Este compuesto es dañino por ingestión. Irrita los ojos, el sistema respiratorio y la piel. En caso de contacto con los ojos enjuáguelos inmediatamente con abundante agua y consulte al médico. Para trabajar con esta sustancia debe usarse ropa protectora adecuada.

- 2,4-diclorofenol (Contenido en los reactivos enzimáticos para determinación de glucosa y colesterol).

Dosis letal 5 gr

Los derivados del fenol alteran y precipitan las proteínas celulares, envenenando así directamente todas las células. Los

hallazgos patológicos en muertes producidas por derivados del fenol son necrosis de las mucosas, edema cerebral y cambios degenerativos hepáticos y renales.

Este compuesto puede ser carcinógeno. Es dañino por inhalación, contacto por la piel e ingestión. Irrita los ojos, el sistema respiratorio y la piel.

En caso de contacto con los ojos enjuáguelos inmediatamente con abundante agua y consulte al médico. Para trabajar con esta sustancia debe usarse ropa protectora adecuada y protectores para ojos y cara. El polvo no debe respirarse.

3.4.2 Compuestos nitrogenados.

- Tris(hidroximetil)aminometano (Contenido en el reactivo enzimático para determinación de glucosa).

Dosis letal 50 calculada 50 gr

Puede irritar ligeramente los ojos, sistema respiratorio y piel. En caso de contacto con los ojos enjuáguelos inmediatamente con abundante agua y consulte al médico. Para trabajar con esta

sustancia debe usarse ropa protectora adecuada.

- Azida de sodio (Contenida en los reactivos enzimáticos para determinación de glucosa, ácido úrico y colesterol).

Dosis letal 50 37 mg/kg

Puede causar daños genéticos. Es muy tóxica por inhalación, contacto por la piel e ingestión. Al ponerse en contacto con ácidos libera gases muy tóxicos. Su calentamiento puede causar una explosión. Evite su contacto con metales.

Puede afectar los nervios del corazón. Si siente algún malestar consulte a su médico. Para trabajar con esta sustancia debe usarse ropa protectora adecuada, guantes y protectores para ojos y cara. No respire el polvo.

3.4.3 Acidos.

- Acido 3,5-dicloro-2-hidroxibencensulfónico (Contenido en el reactivo enzimático para determinación de ácido úrico).

Es irritante para los ojos, sistema respiratorio y piel. En caso de contacto con los ojos enjuáguelos inmediatamente con abundante agua. Para trabajar con esta sustancia debe usarse ropa

protectora adecuada.

- Acido taurocólico (Contenido en el reactivo enzimático para determinación de colesterol).

Las propiedades toxicológicas de este compuesto no han sido totalmente determinadas, por lo que se recomienda manejarlo con precaución.

3.4.4 Enzimas.

Evite su contacto e inhalación.

CAPITULO 4

**VENTAJAS DE LOS METODOS PROPUESTOS
SOBRE LOS UTILIZADOS ACTUALMENTE EN
LA SECRETARIA DE SALUD**

Para el perfeccionamiento del diagnóstico, el médico se apoya cada vez más en los resultados de los análisis de laboratorio, por lo que es conveniente que los métodos analíticos utilizados proporcionen resultados confiables.

Una de las principales características que debe tener un método analítico es su especificidad; un método específico permite registrar cualitativa o cuantitativamente una única sustancia. Una de las metas que se plantea la Química Clínica es la substitución de las reacciones inespecíficas con métodos de especificidad absoluta.

Los métodos enzimáticos que se proponen tienen una mayor especificidad que los métodos de determinación actuales.

La determinación enzimática de glucosa registra exclusivamente la glucosa presente en la muestra; el método de determinación con aminas aromáticas tiene la desventaja de que además de la glucosa también otros azúcares reductores como la fructosa, manosa y galactosa presentes en la sangre originan diversas cantidades de cromógeno.

La determinación del ácido úrico basada en la reducción del ácido fosfotúngstico posee serias desventajas: las proteínas interfieren en la reacción, además de que son múltiples los compuestos existentes en el organismo que reducen el ácido fosfotúngstico y provocan la aparición de una sustancia de color

azul; entre éstos pueden mencionarse las concentraciones elevadas de glutatión, cisteína y glucosa. A lo anterior debe sumarse el hecho de que son múltiples los fármacos capaces de dar una reacción positiva, por ejemplo, los salicilatos, cafeína, teofilina y teobromina. En el método enzimático la uricasa es capaz de oxidar específicamente el ácido úrico y sus sales a alantoina, por lo que es una determinación completamente específica.

El método de Liebermann-Burchard para la determinación de colesterol presenta la desventaja de que el desmosterol, sustancia precursora en el proceso de síntesis endógena del colesterol (ver Fig. 14), puede alterar el resultado del análisis al ser registrado, interfiriendo además la hemoglobina y la bilirrubina, pudiendo elevar hasta en un 20% el valor real. En cambio, el método enzimático no presenta ninguna interferencia por hemoglobina y/o bilirrubina, ya que determina únicamente el colesterol libre.

Los componentes utilizados en la preparación de los reactivos enzimáticos no representan un riesgo para la salud del químico analista ni de la persona encargada de su producción ya que en general son poco tóxicos y además se utilizan en muy pequeña cantidad.

Los métodos propuestos han sido validados, demostrando así que son lineales, específicos y precisos.

A continuación se muestra una tabla comparativa de los costos por prueba con los estuches de diagnóstico de la Secretaría de Salud y los enzimáticos.

Métodos Secretaría de Salud	Número de pruebas	Precio del estuche N\$	Precio por prueba N\$
Glucosa	130	136.00	1.05
Acido úrico	225	51.00	0.20
Colesterol	90	123.00	1.36

Métodos Enzimáticos

Glucosa	250	14.65	0.05
Acido úrico	50	38.40	0.75
Colesterol	250	393.20	1.55

A pesar de que los costos de los estuches de diagnóstico para la determinación enzimática de ácido úrico y colesterol son un poco más altos que los de la Secretaría de Salud, el precio se justifica por la mayor especificidad y menor toxicidad que tienen los métodos enzimáticos propuestos.

La estabilidad del cromógeno formado en las reacciones

enzimáticas es de aproximadamente dos horas, lo cual es conveniente ya que da un tiempo bastante amplio para poder leer en el espectrofotómetro la densidad óptica.

Otra ventaja del reactivo propuesto es su presentación, ya que permite reconstituirse cuando ya se va a utilizar. Los laboratorios a los que está destinado tienen gran demanda de análisis, por lo que se calcula que una vez reconstituido el reactivo se consumirá en un período menor al establecido para su estabilidad.

No es necesario adicionar sustancias anticoagulantes, ni desproteínizar la muestra de suero o plasma para llevar a cabo las determinaciones enzimáticas propuestas.

Por otra parte el estuche de diagnóstico de los reactivos enzimáticos es pequeño, ya que solo consta de un frasco que no contiene más de nueve gramos, lo que facilita su transportación y almacenamiento.

Las concentraciones de metabolitos que alcanzan a detectar los reactivos enzimáticos son, por mucho, mayores que las de las regiones patológicas, de tal manera que se pueden determinar concentraciones séricas muy elevadas sin necesidad de hacer diluciones.

CAPITULO 5

VALIDACION DE LOS METODOS PROPUESTOS

La validación de un método analítico es parte fundamental del desarrollo de una nueva formulación, ya que nos permite conocer si ésta cumple con los propósitos para los cuales fue diseñada. La validación proporciona una medida del comportamiento del método, y se define como el proceso por el cual queda establecido, por estudios de laboratorio, que la capacidad del método satisface los requisitos para las aplicaciones analíticas deseadas. La capacidad se expresa, en este caso, en términos de parámetros analíticos.

Debe considerarse que en la aplicación de los criterios de evaluación de un método analítico prevalecerá ante todo la experiencia y el criterio de la persona que lleve a cabo la validación.

DEFINICIONES: (74)

Linealidad. La linealidad de un sistema o método analítico es su habilidad para asegurar que los resultados analíticos, los cuales pueden ser obtenidos directamente o por medio de una transformación matemática bien definida, son proporcionales a la concentración de la sustancia dentro de un intervalo determinado.

Exactitud. La exactitud de un método analítico es la concordancia entre un valor obtenido experimentalmente y el valor de referencia. Se expresa como el porcentaje de recobro obtenido del análisis de muestras a las que se les ha adicionado cantidades conocidas de la sustancia.

Precisión. La precisión de un método analítico es el grado de concordancia entre resultados analíticos individuales cuando el procedimiento se aplica repetidamente a diferentes muestreos de una mezcla homogénea del producto. Usualmente se expresa en términos de Desviación Estándar o del Coeficiente de Variación.

La precisión es una medida del grado de reproducibilidad y/o repetibilidad del método analítico bajo las condiciones normales de operación.

Repetitibilidad. Es la precisión de un método analítico expresada como la concordancia obtenida entre determinaciones independientes realizadas bajo las mismas condiciones (analista, tiempo, aparato, laboratorio, etc.)

Reproductibilidad. Es la precisión de un método analítico expresada como la concordancia entre determinaciones

independientes realizadas bajo diferentes condiciones (diferentes analistas, en diferentes días, en el mismo y/o en diferentes laboratorios, utilizando el mismo y/o diferentes equipos, etc.)

Especificidad. Es la habilidad de un método analítico para obtener una respuesta debida únicamente a la sustancia de interés y no a otros componentes de la muestra.

Estabilidad de la muestra. Es la propiedad de una muestra preparada para su cuantificación, de conservar su integridad fisicoquímica y la concentración de la sustancia de interés, de almacenarse durante un tiempo determinado bajo condiciones específicas.

DETERMINACIONES:

Linealidad del sistema. Se determina construyendo una curva de calibración (concentración contra respuesta medida) utilizando cuando menos cinco diluciones preparadas a partir de una misma solución patrón y haciendo análisis cuando menos por

duplicado para cada dilución.

El intervalo entre las concentraciones a analizar dependerá del propósito del método.

Los criterios para la validación de la linealidad del sistema son los siguientes:

$$CV \leq 1.5\%$$

$$r \approx 0.99$$

$$r^2 \approx 0.98$$

Precisión del sistema. Se determina por el análisis sextuplicado de una misma solución estándar correspondiente al 100% establecido en la linealidad del sistema.

El criterio para validar la precisión del sistema es el siguiente:

$$CV \leq 1.5\%$$

METODOLOGIA:

Linealidad del sistema:

- Calculos preliminares para coeficiente de correlación y coeficiente de determinación:

$$\Sigma x = n (x_1 + x_2 + \dots + x_t)$$

$$\Sigma y = y_{11} + y_{12} + \dots + y_{1n} + y_{21} + y_{22} + \dots + y_{2n} + \dots + y_{t1} + \dots + y_{t2} + \dots + y_{tn}$$

$$\Sigma x^2 = n (x_1^2 + x_2^2 + \dots + x_t^2)$$

$$\Sigma y^2 = y_{11}^2 + y_{12}^2 + \dots + y_{1n}^2 + y_{21}^2 + y_{22}^2 + \dots + y_{2n}^2 + \dots + y_{t1}^2 + y_{t2}^2 + \dots + y_{tn}^2$$

$$\Sigma xy = x_1 (y_{11} + y_{12} + y_{1n}) + x_2 (y_{21} + y_{22} + \dots + y_{2n}) + \dots + x_t (y_{t1} + y_{t2} + \dots + y_{tn})$$

- Calculos finales para el coeficiente de correlación y coeficiente de determinación:

$$r = \left[\frac{[nt (\Sigma xy) - (\Sigma x)(\Sigma y)]^2}{[nt (\Sigma x^2) - (\Sigma x)^2] [nt (\Sigma y^2) - (\Sigma y)^2]} \right]^{1/2}$$

$$r^2 = \frac{[nt (\Sigma xy) - (\Sigma x)(\Sigma y)]^2}{[nt (\Sigma x^2) - (\Sigma x)^2] [nt (\Sigma y^2) - (\Sigma y)^2]}$$

- Calculos preliminares para el coeficiente de variación:

(a) Calcular para cada punto de la linealidad del sistema el siguiente factor:

$$F = \frac{\text{propiedad medida (y)}}{\text{concentración de la dilución de la solución patrón (x)}}$$

$$F_{11} = \frac{y_{11}}{x_1}$$

$$F_{12} = \frac{y_{12}}{x_1}$$

$$F_{1n} = \frac{y_{1n}}{x_1}$$

⋮

$$F_{t1} = \frac{y_{t1}}{x_t}$$

$$F_{t2} = \frac{y_{t2}}{x_t}$$

$$F_{tn} = \frac{y_{tn}}{x_t}$$

- Calcular la suma de factores, la suma de cuadrados de los factores y la media del factor:

$$\Sigma F = F_{11} + F_{12} + F_{1n} + \dots + F_{t1} + F_{t2} + F_{tn}$$

$$\Sigma F^2 = (F_{11})^2 + (F_{12})^2 + (F_{1n})^2 + \dots + (F_{t1})^2 + (F_{t2})^2 + (F_{tn})^2$$

$$F = \frac{\Sigma F}{N}$$

donde:

N = número de puntos de la linealidad del sistema.

- Cálculos finales para el coeficiente de variación:

$$DE = \left[\frac{N (\Sigma F^2) - (\Sigma F)^2}{N (N - 1)} \right]^{1/2}$$

$$CV = \frac{DE}{F} \times 100$$

GLUCOSA.

1. Linearidad del Sistema.

Curva estándar del reactivo enzimático para la determinación de glucosa:

mg glucosa/dl (X)	Y1	D.O.	Y2
100	0.282		2.280
200	0.570		0.565
300	0.842		0.839
400	1.111		1.108
500	1.426		1.425

$$t = 5$$

$$n = 2$$

$$\Sigma x = 3000$$

$$(\Sigma x)^2 = 9'000,000$$

$$\Sigma x^2 = 1'100,000$$

$$\Sigma xy = 3100.6$$

$$\Sigma y = 8.448$$

$$(\Sigma y)^2 = 71.3687$$

$$\Sigma y^2 = 8.7410$$

Coefficiente de correlación (r)

$$r = \left[\frac{[nt (\Sigma xy) - (\Sigma x)(\Sigma y)]^2}{[nt (\Sigma x^2) - (\Sigma x)^2] [nt (\Sigma y^2) - (\Sigma y)^2]} \right]^{1/2}$$

$$r = \left[\frac{[10 (3100.6) - (3000)(8.448)]^2}{[10 (1'100,000) - 9'000,000] [10 (8.741) - 71.3687]} \right]^{\frac{1}{2}}$$

$$r = 0.9996$$

Coefficiente de variación (CV)

$$F1 = \frac{0.282}{100} = 0.002820$$

$$F1' = \frac{0.280}{100} = 0.002800$$

$$F2 = \frac{0.565}{200} = 0.002825$$

$$F2' = \frac{0.570}{200} = 0.002850$$

$$F3 = \frac{0.842}{300} = 0.002806$$

$$F3' = \frac{0.839}{300} = 0.002796$$

$$F4 = \frac{1.111}{400} = 0.002777$$

$$F4' = \frac{1.108}{400} = 0.002770$$

$$F5 = \frac{1.426}{500} = 0.002852$$

$$F5' = \frac{1.425}{500} = 0.002850$$

$$\Sigma F = 0.02814$$

$$\Sigma F^2 = 0.0000792$$

$$\bar{F} = 0.002814$$

$$DE = \left[\frac{N (\Sigma F^2) - (\Sigma F)^2}{N (N - 1)} \right]^{1/2}$$

$$DE = \left[\frac{10 (0.0000792) - (0.02814)^2}{10 (10 - 1)} \right]^{1/2}$$

$$DE = 0.0000394$$

$$CV = \frac{DE}{\bar{F}} \times 100$$

$$CV = \frac{0.0000394}{0.002814} \times 100$$

$$CV = 1.40 \%$$

CRITERIOS	VALORES OBTENIDOS
$r \geq 0.99$	0.9996
$r^2 \geq 0.98$	0.9992
$CV \leq 1.50 \%$	1.40 %

Por lo tanto, la curva estándar del reactivo enzimático para determinación de glucosa cumple con los criterios para la linealidad del sistema.

2. Precisión del sistema:

Los datos corresponden a la densidad óptica del patrón de glucosa con una concentración de 1 mg/ml.

DIA	ANALISTA	
	A	B
1	0.340	0.333
1	0.344	0.340
1	0.340	0.337
2	0.340	0.342
2	0.337	0.340
2	0.340	0.337

$$N = 12$$

$$\Sigma y = 4.072$$

$$(\Sigma y)^2 = 16.58118$$

$$\Sigma y^2 = 1.38183$$

$$\bar{y} = 0.33933$$

$$DE = \left[\frac{N (\Sigma y^2) - (\Sigma y)^2}{N (N - 1)} \right]^{1/2}$$

$$DE = \left[\frac{12 (1.38183) - 16.58118}{12 (12 - 1)} \right]^{1/2}$$

$$DE = 0.0024308$$

$$CV = \frac{DE}{\bar{y}} \times 100$$

$$CV = \frac{0.0024308}{0.33933} \times 100$$

$$CV = 0.71 \%$$

Como $CV \leq 1.5\%$ se cumple con el criterio para la precisión del sistema.

ACIDO URICO.

1. Linearidad del Sistema.

Curva estándar del reactivo enzimático para la determinación de ácido úrico:

mg ácido úrico/dl (X)	Y1	D.O.	Y2
2	0.033		0.033
4	0.066		0.066
6	0.098		0.099
8	0.132		0.132
10	0.166		0.163
12	0.196		0.198
14	0.229		0.231
16	0.263		0.264
18	0.299		0.299
20	0.332		0.331

$$t = 2$$

$$n = 20$$

$$\Sigma x = 220$$

$$(\Sigma x)^2 = 48,400$$

$$\Sigma x^2 = 3,080$$

$$\Sigma xy = 50.868$$

$$\Sigma y = 3.63$$

$$(\Sigma y)^2 = 13.1769$$

$$\Sigma y^2 = 0.840142$$

Coefficiente de correlación (r)

$$r = \left[\frac{[nt (\Sigma xy) - (\Sigma x)(\Sigma y)]^2}{[nt (\Sigma x^2) - (\Sigma x)^2] [nt (\Sigma y^2) - (\Sigma y)^2]} \right]^{\frac{1}{2}}$$

$$r = \left[\frac{[20 (50.868) - (220)(3.63)]^2}{[20 (3.080) - 48,400] [20 (0.840142) - 13.1769]} \right]^{\frac{1}{2}}$$

$$r = 0.9999$$

Coefficiente de variación (CV)

$$F1 = \frac{0.033}{2} = 0.0165$$

$$F1' = \frac{0.033}{2} = 0.0165$$

$$F2 = \frac{0.066}{4} = 0.0165$$

$$F2' = \frac{0.066}{4} = 0.0165$$

$$F3 = \frac{0.098}{6} = 0.0163$$

$$F3' = \frac{0.099}{6} = 0.0165$$

$$F4 = \frac{0.132}{8} = 0.0165$$

$$F4' = \frac{0.133}{8} = 0.0166$$

$$F5 = \frac{0.166}{10} = 0.0166$$

$$F5' = \frac{0.163}{10} = 0.0163$$

$$F6 = \frac{0.196}{12} = 0.0163$$

$$F6' = \frac{0.198}{12} = 0.0165$$

$$F7 = \frac{0.229}{14} = 0.0163$$

$$F7' = \frac{0.231}{14} = 0.0165$$

$$F8 = \frac{0.263}{16} = 0.0164$$

$$F8' = \frac{0.264}{16} = 0.0165$$

$$F9 = \frac{0.299}{18} = 0.0166$$

$$F9' = \frac{0.299}{18} = 0.0166$$

$$F10 = \frac{0.332}{20} = 0.0166$$

$$F10' = \frac{0.331}{20} = 0.0165$$

$$\Sigma F = 0.3296$$

$$\Sigma F^2 = 0.00543202$$

$$\dot{F} = 0.01648$$

$$DE = \left[\frac{N (\Sigma F^2) - (\Sigma F)^2}{N (N - 1)} \right]^{\frac{1}{2}}$$

$$DE = \left[\frac{20 (0.00543202) - (0.3296)^2}{20 (20 - 1)} \right]^{\frac{1}{2}}$$

$$DE = 0.000105631$$

$$CV = \frac{DE}{\dot{F}} \times 100$$

$$CV = \frac{0.000105631}{0.01648} \times 100$$

$$CV = 0.64 \%$$

CRITERIOS	VALORES OBTENIDOS
$r \geq 0.99$	0.9999
$r^2 \geq 0.98$	0.9998
$CV \leq 1.50 \%$	0.64 %

Por lo tanto, la curva estándar del reactivo enzimático para determinación de ácido úrico cumple con los criterios para la linealidad del sistema.

2. Precisión del sistema:

Los datos corresponden a la densidad óptica del patrón de ácido úrico con una concentración de 5 mg/dl.

DIA	ANALISTA	
	A	B
1	0.067	0.066
1	0.066	0.069
1	0.066	0.067
2	0.067	0.067
2	0.067	0.066
2	0.066	0.067

$$N = 12$$

$$\Sigma y = 0.801$$

$$(\Sigma y)^2 = 0.641601$$

$$\Sigma y^2 = 0.053475$$

$$\bar{y} = 0.06675$$

$$DE = \left[\frac{N (\Sigma y^2) - (\Sigma y)^2}{N (N - 1)} \right]^{\frac{1}{2}}$$

$$DE = \left[\frac{12 (0.053475 - 0.801)}{12 (12 - 1)} \right]^{\frac{1}{2}}$$

$$DE = 0.000866$$

$$CV = \frac{DE}{\bar{y}} \times 100$$

$$CV = \frac{0.000866}{0.06675} \times 100$$

$$CV = 1.29 \%$$

Como $CV \leq 1.5\%$ se cumple con el criterio para la precisión del sistema.

COLESTEROL.

1. Linealidad del Sistema.

Curva estándar del reactivo enzimático para la determinación de colesterol:

mg colesterol/dl (X)	D.O.	
	Y1	Y2
100	0.305	0.300
200	0.611	0.608
600	1.833	1.834
800	2.444	2.439

$$t = 4$$

$$n = 2$$

$$\Sigma x = 3400$$

$$\Sigma y = 10.374$$

$$(\Sigma x)^2 = 11'560,000$$

$$(\Sigma y)^2 = 107.6198$$

$$\Sigma x^2 = 2'100,000$$

$$\Sigma y^2 = 19.5713$$

$$\Sigma xy = 6410.9$$

Coefficiente de correlación (r)

$$r = \left[\frac{[nt (\Sigma xy) - (\Sigma x)(\Sigma y)]^2}{[nt (\Sigma x^2) - (\Sigma x)^2] [nt (\Sigma y^2) - (\Sigma y)^2]} \right]^{\frac{1}{2}}$$

$$r = \left[\frac{[8 (6410.9) - (3400)(10.374)]^2}{[8 (2'100,000) - 11'560,000] [8 (19.5713) - 107.6198]} \right]^{\frac{1}{2}}$$

$$r = 0.9999$$

Coefficiente de variación (CV)

$$F1 = \frac{0.305}{100} = 0.00305$$

$$F1' = \frac{0.300}{100} = 0.00300$$

$$F2 = \frac{0.611}{200} = 0.00305$$

$$F2' = \frac{0.608}{200} = 0.00304$$

$$F3 = \frac{1.833}{600} = 0.00305$$

$$F3' = \frac{1.834}{600} = 0.00305$$

$$F4 = \frac{2.444}{800} = 0.00305$$

$$F4' = \frac{2.439}{800} = 0.00304$$

$$\Sigma F = 0.02433$$

$$\Sigma F^2 = 0.000074$$

$$\bar{F} = 0.00303$$

$$DE = \left[\frac{N (\Sigma F^2) - (\Sigma F)^2}{N (N - 1)} \right]^{\frac{1}{2}}$$

$$DE = \left[\frac{8 (0.000074) - (0.02433)^2}{8 (8 - 1)} \right]^{\frac{1}{2}}$$

$$DE = 0.0000302$$

$$CV = \frac{DE}{\bar{F}} \times 100$$

$$CV = \frac{0.0000302}{0.00303} \times 100$$

$$CV = 0.99 \%$$

CRITERIOS	VALORES OBTENIDOS
$r \geq 0.99$	0.9999
$r^2 \geq 0.98$	0.9998
$CV \leq 1.50 \%$	0.99 %

Por lo tanto, la curva estándar del reactivo enzimático para determinación de colesterol cumple con los criterios para la linealidad del sistema.

2. Precisión del sistema:

Los datos corresponden a la densidad óptica del patrón de colesterol con una concentración de 200 mg/dl.

DIA	ANALISTA	
	A	B
1	0.589	0.582
1	0.594	0.585
1	0.585	0.602
2	0.598	0.606
2	0.594	0.598
2	0.589	0.606

$$N = 12$$

$$\Sigma y = 7.131$$

$$(\Sigma y)^2 = 50.85116$$

$$\Sigma y^2 = 4.238273$$

$$y = 0.59425$$

$$DE = \left[\frac{N (\Sigma y^2) - (\Sigma y)^2}{N (N - 1)} \right]^{\frac{1}{2}}$$

$$DE = \left[\frac{12 (4.238273 - 50.85116)}{12 (12 - 1)} \right]^{\frac{1}{2}}$$

$$DE = 0.0078412$$

$$CV = \frac{DE}{y} \times 100$$

$$CV = \frac{0.0078412}{0.59425} \times 100$$

CV = 1.31 %

Como $CV \leq 1.5\%$ se cumple con el criterio para la precisión del sistema.

NOTA: La bibliografía utilizada en este capítulo fué la (72).

CONCLUSIONES

En la última década se ha presentado en México un incremento en el número de personas que padecen enfermedades metabólicas, siendo más comunes las alteraciones en el metabolismo de la glucosa, ácido úrico y colesterol. Como consecuencia, el número de análisis químico-clínicos también ha aumentado.

El médico requiere de resultados de análisis de laboratorio confiables, y el químico clínico requiere de metodologías que le permitan realizar su trabajo fácil y rápidamente, que den resultados exactos y que no representen un riesgo para su salud.

Los métodos que aquí se proponen cumplen con los objetivos que se establecieron, ya que se adaptan a las necesidades de los Laboratorios de las Unidades Asistenciales de la Secretaría del Salud, siendo esto importante pues los reactivos están destinados a ser utilizados en dichos laboratorios, que tienen una alta demanda de pacientes y no cuentan con instrumentos sofisticados ni con suficiente personal que realice las determinaciones.

Para el Químico Laboratorista y para la persona encargada de la producción de los reactivos enzimáticos la toxicidad de los componentes es menor que si se trabaja con los reactivos usados actualmente en la Secretaría de Salud.

Al mantenerse estable por un tiempo razonable el cromógeno formado en las determinaciones enzimáticas, el Químico Analista tiene la facilidad de poder trabajar con varias muestras a la

vez, ya que la lectura no tiene que realizarse inmediatamente; en cambio, con los reactivos que se utilizan actualmente en la Secretaría de Salud, la lectura tiene que realizarse en un período de quince a veinte minutos, lo cual limita el número de muestras.

Al realizar la validación de los métodos que se proponen se comprobó su linealidad y precisión.

La especificidad y la sensibilidad de los métodos propuestos se debe a que se utilizan enzimas que solamente reaccionan con el metabolito que se desea determinar. La sensibilidad de los métodos se menciona en el capítulo 3.

Las enfermedades del metabolismo humano son muy complejas, y para su diagnóstico requieren de la determinación de diversos metabolitos, por lo que es conveniente desarrollar nuevos métodos de análisis que sean específicos para cada uno.

Esperamos que este trabajo impulse nuevas investigaciones en el desarrollo de métodos analíticos enzimáticos para la determinación de metabolitos en sangre, ya que éstos han demostrado tener muchas ventajas.

Si el Químico Analista puede brindar la confianza de que los resultados de los análisis clínicos son correctos, podremos lograr que el Médico se apoye más en el trabajo del Laboratorio

Clinico, y así juntos, Médico y Químico dar un mejor diagnóstico y una esperanza de vida mayor al paciente.

BIBLIOGRAFIA.

- (1) Richterich, R., Colombo, J.P.: Química Clínica, teoría, práctica e interpretación. Ed. Salvat, México (1993).
- (2) Lehninger L.A.: Bioquímica las bases moleculares de la estructura y función celular. Ed. Omega, segunda edición, Barcelona España (1980).
- (3) Díaz, Z.J., Hicks, J.J.: Bioquímica e inmunología I y II. Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México, México (1988).
- (4) Thorn, W.G., Adams, D.R., et al.: Medicina Interna Harrison Tomo I y II. Ediciones Científicas La Prensa Médica Mexicana. Colombia (1982).
- (5) Krupp, A.M., Tierney, M.L., et al.: Manual de Diagnóstico Clínico y de Laboratorio. Ed. Manual Moderno. México (1986).
- (6) Quiroz, G.F.: Tratado de Anatomía Humana Tomos I, II y III Ed. Porrúa. México (1983).
- (7) Robbins, L.S.: Tratado de Patología con Aplicación Clínica. Ed. Interamericana, segunda edición. México (1963).
- (8) Tood, Sanford, et al.: Diagnóstico y Tratamientos Clínicos por el Laboratorio Tomo I. Ed. Salvat, octava edición. México (1991).
- (9) Alysaker, J.O.: Urate-plasma protein interactions. Scand.J. clin. Lab. Invest. 30: 345 (1972).
- (10) Bengtsson, C. and Tibblin, E.: Serum uric acid levels in women. Acta med. Scand. 196: 93 (1974).
- (11) Zavala, E.: Métodos Selectos para el pequeño laboratorio de Química Clínica. Asociación Mexicana de Bioquímica Clínica. México (1984).
- (12) Kaplan, S.A., Yuçeoğlu, A.M. and Strauss, J.: Chemical Microanalysis: Analysis of Capillary and Venous Blood. Pediatrics 24: 270 (1959).
- (13) Annio, J.S., and Reiman, A.S.: The Effect of Eating on some of the Clinically Important Chemical Constituents of the Blood. An J. clin. Path. 31: 155 (1959).

- (14) King, J.: On a Standard Temperature for Clinical Enzymology. *Ann. clin. Biochem.* 9: 197 (1972).
- (15) Recommended Methods for the Determination of four Enzymes in Blood. *Scand. J. clin. Lab. Invest.* 33: 291 (1974).
- (16) Liliana Gianfreda and Maria Rosaria Scarfi.: Enzyme stabilization: State of the Art. *Molecular and Cellular Biochem.* 100: 97-128 (1991).
- (17) Burke, W.; Diamondstone, B.I.; Velopoldi, R.A. and Menis O. Mechanism of the Liebermann-Burchard and Zak color reactions for Cholesterol. *Clin. Chem.* 20: 749 (1974).
- (18) Wood, P.D., Bachorik, P.S., Albers, J.J., Stewarck, C.C., et al: Effects of Sample Again on Total Cholesterol Values Determined by the Automated Ferric Chloride-Sulfuric Acid and Liebermann-Burchard procedures. *Clin. Chem.* 26, 592-597 (1980).
- (19) Huang, T.C., Chen, C.P., Wefler, V., and Rafferty, A.: A Stable Reagent for the Liebermann-Burchard Reaction.- Application to Rapid Serum Cholesterol Determination. *Analyt. Chem.* 33: 1405 (1961).
- (20) Jung, D.H., and Parek, A.C.: A New Color Reaction for Cholesterol Assay. *Clin. Chim. Acta.* 35, 73-78 (1971).
- (21) Jung, D.H., Biggs, H.G., and Moorehead, W.R.: Colorimetry of Serum Cholesterol with use of ferric Acetate/Uranyl Acetate and Ferrous Sulfate/Sulfuric Acid Reagents. *Sel. Methods Clin. Chem.* 8, 51-62 (1977).
- (22) Ruiter, J., Weinberg, F. and Morrison, A.: The Stability of glucose in serum. *Clin. Chem.* 9: 356 (1963).
- (23) Farreras, P.V.: *Medicina Interna.* Ed. Marín S.A. Barcelona España (1976).
- (24) Juárez-Oropeza, M.A., y Díaz Zagoya, J.C.: Enzimas Clave en el Metabolismo del Colesterol y su Regulación. *Bol. Educ. Bioquímica* 4: 8, (1985).
- (25) Hultman E.: Rapid Specific Method for Determination of Aldosaccharides in Body Fluids. *Nature* 183, 108-109 (1959).
- (26) Dubowsky, K.M.: An Orto-Toluidine Method for Body-Fluid Glucose Determination. *Clin. Chem.* 8, 215-235 (1962).

- (27) Caraway, W.T. Am. J. Clin. Path. 25: 840-845, (1955).
- (28) Henry, R.J., Sabel, C., and Kim, J.; Am. J. Clin. Path 28: 152-645, (1957).
- (29) Liebermann, C.: Über das Oxychinoterpen. Ber. dt. chem. Ges. 18: 1803 (1855).
- (30) Burchard, H.: Beiträge zur Kenntnis des Cholesterins. Chem. Zentbl. 61: 25 (1890).
- (31) Dreisbach, H.R.: Manual de Envenenamientos. Ed. El Manual Moderno, 4a. edición, México (1981).
- (32) González, J.E.: Manual de Seguridad Industrial. Instituto Tecnológico de Tijuana, México (1987).
- (33) Dreisbach H.R., and Robertson, O.W.: Manual de Toxicología Clínica, Prevención, Diagnóstico y Tratamiento. Ed. Manual Moderno, México (1988).
- (34) Trinder, P.: Determination of Glucose in Blood using Glucose Oxidase with an alternative Oxygen Acceptor. Ann. Clin. Biochem. 6, 24-27 (1969).
- (35) Zahradnicek, L., Vidová, M., Chromy, V.: Determination of Serum Glucose by a Continuous-Flow technique using Glucose and 4-Chlor-3-methylphenol as a Color Reagent. Clin. Chim. Acta 127, 127-130 (1983).
- (36) Tietz, N. W.: Fundamentals of Clinical Chemistry, W.B. Saunders Co., Philadelphia, 243-244 (1976).
- (37) Young, D.S., Pestaner, L.C., Gibberman, V.; Clin. Chem. 21, 304 D - 308 D, (1975).
- (38) Teuscher, A. and Richterich, R., Schweiz. med. Wschr. 101, 345 y 390 (1971).
- (39) Bergmeyer, H.U.: Methoden der Enzymatischen Analyse, Vol.1 3a. Ed., Verlag Chemie, Weinheim 175, (1974).
- (40) Wolf, P.L., et al: Methods and Techniques in Clinical Chemistry, Wiley-Interscience, New York, 202, (1972).
- (41) Bergmeyer, H.V.: Methods of Enzymatic Analysis, Verlag Chemie Associated Press, New York, 1196, (1974).
- (42) Fossati, P., Prencipe, L., Berti, G.: Use of 3,5-Dichloro-2-hydroxybenzenesulfonic Acid / 4-Aminophenazone Chromogenic System in Direct Enzymic Assay of Uric Acid in Serum and Urine. Clin. Chem. 26/2, 227 - 231 (1980).

- (43) Sanders, G.T.B., Pasma A.J., Hoek F.J.: Determination of Uric Acid with Uricase and Peroxidase. Clin. Chim. Acta 101, 299-303 (1980).
- (44) Thefeld, L., et al, Dtsch. med. Wschr., 98, 390, (1973).
- (45) Henry, B.J., Clin. Chem., Harper & Row, New York, 2 Aufl. 541, (1974).
- (46) Chu, S.Y., Can. J. Med. Technol. 40/5: 154 (1978).
- (47) Day, J.H., La Prensa Medica Argentina, Vol. 58, No. 15: 786 (1971).
- (48) Donadon V., Barbieri, E., Menin, A., Canterin, A., Lab. Vol. III, No.4: 473 (1976).
- (49) International Federation of Clinical Chemistry. Clin. Chim. Acta, 87/3: 459 F (1978).
- (50) Young, D.S., Pestaner, L.S. Clin. Chem., 21/5: 374 D (1975).
- (51) Witte, D.J., Brown, L.F., and Feld, R.D., Clin. Chem. 24, 1778, (1978).
- (52) Tietz, N.W.: Textbook of Clinical Chemistry, W.B. Saunders Co., Philadelphia (1986).
- (53) Abel, L.L., Levy, B.B., Bradie, B.B., Kendall, F.E. Journal Biol. Chem. 195: 357 (1952).
- (54) Allain, C.C., Poon, L.S., Chan, C.S.G., Richmond, W., Fu, P.C. Clin. Chem. 20: 270 (1974).
- (55) Flegg, A.S. Ann. Clin. Biochem. 10: 79 (1973).
- (56) Koster, G.M., Avogaro, P., Bottolo Bon, G., Cazzolato, G., Quinci, G.B. Clin. Chem. 25/6: 939 (1979).
- (57) Perlstein, M.T., Thibert, R.V., Zak, B. Microchem. J. 22: 403 (1977).
- (58) Young, D.S., Pestaner, L.C., Gibberman, V. Clin. Chem. 21, 278 D - 281 D (1975).
- (59) Tood-Sanford. Clinical Diagnostics by Laboratory Methods, Fifteenth edition, Edited by I. Davidson and J.B. Henry, W.B. Saunders Co., Philadelphia, (1974).
- (60) Uwajima, T., Yagii, H., Nakamura, S., and Tereda, O.: Agr. Biol. Chem. 37: 2345 (1973).

- (61) Uwajima, T., Yagii, H., and Tereda, O.: Agr. Biol. Chem. 38: 1149, (1974).
- (62) Richmond, W.: Scand. J. Clin. Lab. Invest. 29: Suppl. 26, abstr. 3.25, (1972).
- (63) Richmond, W.: Clin. Chem. 19: 1350, (1973).
- (64) Hernández, H.H. and Chaikoff I.L.: J. Biol. Chem. 228: 447, (1957).
- (65) Hyun, J., Kothari, H., Herm, E., Mortenson, J., Treadwell, C.R., and Wahouny, G.V.: Biol. Chem. 244: 1973 (1969).
- (66) Tarbutton, P.N., and Gunter, C.R.: Clin. Chem. 20: 724 (1974).
- (67) Search, R.L.: Diagnostic Biochemistry, Mc. Graw-Hill, New York, N.Y. (1969).
- (68) Bucolo, G., David, H.: Clin. Chem, 19, 476 (1973).
- (69) Conferencia telefónica con la Asociación Mexicana de diabetes de la Ciudad de México A.C.
- (70) Lynch, M.J., Raphael, S.S., Mellor, L.D., et al: Métodos de Laboratorio Tomo I. Ed. Interamericana, México (1977).
- (71) Chemical Test for Intoxication Manual. Chicago, American Medical Association, Cap.8 1970. Referido en Davidsohn and Henry; Todd-Sanford Clinical Diagnosis by Laboratory Methods, 14ed: W.B. Saunders Company. Philadelphia (1979).
- (72) Métodos Analíticos de Validación. Comité de Elaboración de Guías Oficiales de Validación de la Dirección General de Control de Insumos para la Salud, Secretaría de Salud.
- (73) Liese, L. and Levy, D.: Cholesterol in Serum in Standard Methods of Clinical Chemistry Vol. II. Ed. Academic Press Inc. New York 1958 p.26 a 33.

CONVERSION TABLE
PERCENT TRANSMITTANCE—OPTICAL DENSITY

T	Optical Density				T	Optical Density				T	Optical Density				T	Optical Density			
	.00	.25	.50	.75		.00	.25	.50	.75		.00	.25	.50	.75		.00	.25	.50	.75
1	2.000	1.003	1.024	1.757	20	.585	.581	.577	.573	51	.292	.290	.288	.286	76	.119	.118	.116	.115
2	1.699	1.648	1.602	1.561	27	.569	.565	.561	.557	52	.284	.282	.280	.278	77	.114	.112	.111	.109
3	1.523	1.484	1.450	1.426	28	.553	.549	.545	.542	53	.276	.274	.272	.270	78	.108	.107	.105	.104
4	1.398	1.372	1.347	1.323	29	.538	.534	.530	.527	54	.268	.266	.264	.262	79	.102	.101	.100	.098
5	1.301	1.280	1.260	1.240	30	.523	.520	.516	.512	55	.260	.258	.256	.254	80	.097	.096	.094	.093
6	1.222	1.204	1.187	1.171	31	.509	.505	.502	.498	56	.252	.250	.248	.246	81	.092	.090	.089	.088
7	1.155	1.140	1.126	1.112	32	.495	.491	.488	.485	57	.244	.242	.240	.238	82	.086	.085	.084	.082
8	1.097	1.083	1.071	1.059	33	.482	.478	.475	.472	58	.237	.235	.233	.231	83	.081	.080	.078	.077
9	1.046	1.034	1.022	1.011	34	.469	.465	.462	.459	59	.229	.227	.226	.224	84	.076	.074	.073	.072
10	1.000	.989	.979	.969	35	.456	.453	.450	.447	60	.222	.220	.218	.216	85	.071	.069	.068	.067
11	.959	.940	.930	.920	36	.444	.441	.438	.435	61	.215	.213	.211	.209	86	.066	.064	.063	.062
12	.921	.912	.903	.894	37	.432	.429	.426	.423	62	.208	.206	.204	.202	87	.061	.059	.058	.057
13	.886	.878	.870	.862	38	.420	.417	.414	.412	63	.201	.199	.197	.196	88	.056	.054	.053	.052
14	.854	.840	.838	.831	39	.409	.406	.403	.401	64	.194	.192	.191	.189	89	.051	.049	.048	.047
15	.824	.817	.810	.803	40	.398	.395	.392	.390	65	.187	.186	.184	.182	90	.046	.045	.043	.042
16	.796	.789	.782	.776	41	.387	.385	.382	.380	66	.181	.179	.177	.176	91	.041	.040	.039	.037
17	.770	.763	.757	.751	42	.377	.374	.372	.369	67	.174	.172	.171	.169	92	.036	.035	.034	.033
18	.745	.739	.733	.727	43	.367	.364	.362	.359	68	.168	.166	.164	.163	93	.032	.030	.029	.028
19	.721	.716	.710	.704	44	.357	.354	.352	.349	69	.161	.160	.158	.157	94	.027	.026	.025	.024
20	.699	.694	.688	.683	45	.347	.344	.342	.340	70	.155	.153	.152	.150	95	.022	.021	.020	.019
21	.678	.673	.668	.663	46	.337	.335	.332	.330	71	.149	.147	.146	.144	96	.018	.017	.016	.014
22	.658	.653	.648	.643	47	.328	.325	.323	.321	72	.143	.141	.140	.138	97	.013	.012	.011	.010
23	.638	.634	.629	.624	48	.319	.317	.314	.312	73	.137	.135	.134	.132	98	.009	.008	.007	.006
24	.620	.615	.611	.606	49	.310	.308	.305	.303	74	.131	.129	.128	.126	99	.004	.003	.002	.001
25	.602	.598	.594	.589	50	.301	.299	.297	.295	75	.125	.124	.122	.121	100	.0000	.0000	.0000	.0000

