



11217
100
RE

UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO

División de Estudios de Postgrado
Hospital General "Dr. Miguel Silva"
Secretaría de Salud

Lipoperoxidación en pacientes
normales y con hipertensión
inducida por el embarazo

TESIS DE POSTGRADO
Que para obtener el Título de Especialista en
GINECOLOGIA Y OBSTETRICIA

p r e s e n t a

DRA. TERESA NAVARRETE HORTA

Asesor de Tesis: Dr. Rogelio Vallejo Castro



Morelia, Mich.

1995



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

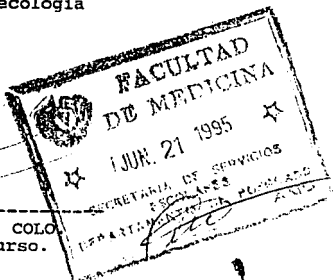
DR. JUAN IGNACIO CARDENAS
Jefe de enseñanza e investigación.

Rogelio Vallejo C.

DR. ROGELIO VALLEJO CASTRO.
Jefe del servicio de ginecología
y obstetricia.
ASESOR DE TESIS.

Sereno

DR. JOSE ANTONIO SERENO COLO.
Profesor titular de curso.



SERVICIOS COORDINADOS
- DE SALUD PUBLICA -
MICHUACAN
JEFATURA DE ENSEÑANZA
Hospital Gral "Dr. Miguel Silva"
ACAPULCO, MICHA.

- A quien debo cuanto soy , mi lealtad , mi honestidad, y el motivo constante de superación, a cada uno de mis pacientes con amor.

A quien dedicaré cada obra buena de mi vida, por su estímulo, cariño y devoción: a mis padres con todo mi amor.

- Al Dr. Rogelio Vallejo Castro, por sus atinados consejos respaldados siempre del afecto, base elemental de desiciones de mi vida y de éste trabajo con todo mi cariño y gratitud.

- Al Dr. José Antonio Sereno Coló. Maestro y amigo siempre, con respeto y gratitud imperecedera.

- A mis hermanos; fuente siempre de alegría y estímulo vital que me han ayudado siempre a entender y amar éste mi quehacer diario.

- A mis Compañeros y Maestros por todas esas vivencias compartidas, positivas siempre, porque invariablemente aprendimos algo de ellas. En el propósito de ser mejores cada vez y a quienes llevaré en mi mente y corazón.

Gracias.

INDICE

<u>TEMAS</u>	<u>PAGINAS</u>
I.- ANTECEDENTES.	2
II.- HIPOTESIS DE BASE	8
III.- LIPOPEROXIDACION.MECANISMO.	8
IV.- JUSTIFICACION.	14
V.- OBJETIVOS.	15
VII.- MATERIAL Y METODOS.	15
VIII.-RESULTADOS, GRAFICAS Y CUADROS.	19
IX.- ANALISIS.	21
X.- COMENTARIO.	21
XI.- BIBLIOGRAFIA.	23
XII.- APENDICE I	26

ANTECEDENTES.

La hipertensión arterial es una de las complicaciones más comunes del embarazo, se presenta en más del 5-10 % de todos los embarazos y cuando se asocia con proteinuria el riesgo fetal y materno se incrementa según D.A. Davey en forma importante. (16-17).

El síndrome de hipertensión, proteinuria y edema producida por el embarazo es sin duda una de las principales causas de mortalidad materna y perinatal en todo el mundo lo cual tiene que ver con falta de cuidado prenatal principalmente y secundariamente porque el tratamiento instituido una vez presente la enfermedad es empírico por falta del conocimiento preciso de la causa básica de producción de la enfermedad. Proviene de aquí la necesidad urgente de identificar su etiología ya que la detección temprana de la misma aunado a un buen cuidado prenatal reducirían el número de muertes infantiles y maternas atribuibles a esta enfermedad.

La hipertensión durante el embarazo puede definirse como una elevación de la presión arterial sistólica y diastólica igual o superior a 140/90 mm Hg o una tensión arterial media (TAM) (definida como la mitad de la suma de la presión sistólica más la diastólica) igual o mayor de 105 mm Hg, o bien es el aumento de 30 mm Hg o más en la presión sistólica y de 15 mm Hg o más en la diastólica sobre cifras previamente conocidas. (15)

La proteinuria se define como = o > a 1+ en tiras reactivas de orina o > 300 mg en 24 horas. La proteinuria es un factor discriminativo para considerarla precláptica o no.

Se han hecho múltiples clasificaciones a los estados hipertensivos del embarazo (15).

En Estados Unidos se les clasifica de la siguiente manera:

A.- HIPERTENSION GESTACIONAL: - Hipertensión arterial después de la semana 20a. del embarazo sin proteinuria acompañante. Desaparece después del parto.

B.- HIPERTENSION CRONICA :- Hipertensión detectada antes de la semana 20 del embarazo. Suele no cursar con proteinuria.

C.- HIPERTENSION CRONICA CON PREECLAMPSIA SOBREAÑADIDA:- Hipertensión antes de la semana 20a. con desarrollo de proteinuria y edema en la segunda mitad del embarazo. Ocurre en 13 % de las hipertensas crónicas tratadas (20).

D.- PREECLAMPSIA:- Hipertensión, proteinuria, y o sin edema (éste puede ocurrir en el 80% de los embarazos normales (17), y aparece después de la semana 20a. de la gestación. Se le subdivide en leve, moderada y grave.

a) Leve.- Aquellas pacientes con una tensión arterial media de 106 mm Hg ,(de 140/90mmHg) , con elevación de presión diastólica mayor de 15 mm Hg más proteinuria , con o sin edema.

b) Moderada.- TAM mayor de 106 mm Hg (de 140/90) y menor de 126 mm Hg (160/110 mm Hg) o bien incremento mayor de 15 mm Hg y 30 mm Hg en presión diastólica y sistólica respectivamente. más proteinuria y edema.

c) Grave.- TAM mayor de 126 mm Hg (de 160/ 110 mm Hg) en dos determinaciones con intervalo de 6 horas, mientras está en reposo en cama o proteinuria mayor de 5 grs, en 24 hrs.

E.- ECLAMPSIA.- Crisis convulsivas generalizadas mas hipertensión y proteinuria en la mujer embarazada excluyendo otras etiologías de convulsiones.

F.- GESTOSIS EPH ATIPICA.- (preeclampsia recidivante). - Forma grave de preeclampsia que puede ocurrir en todos los embarazos de una mujer múltipara. (7).

CAMBIOS HEMODINAMICOS DEL EMBARAZO.

En el embarazo normal ocurren cambios hemodinámicos que podríamos resumir básicamente en los siguientes:

- Aumento del volumen plasmático y gasto cardíaco como mecanismo compensador del corto circuito de volumen efectivo de plasma a través de la placenta.
- Descenso secundario de la presión arterial por disminución de las resistencias vasculares periféricas.
- Pérdida de sodio por aumento de la filtración glomerular, acción natriurética de la progesterona y disminución de la presión oncótica del plasma (23).
- Disminución del retorno venoso secundario a la presión ocasionada por el útero crecido.

CAMBIOS EN LA FUNCION RENAL:

- Aumento del flujo renal y filtración glomerular, lo que explica urea, creatinina y ácido úrico bajos.
- Cambios en el sistema renina-angiotensina-aldosterona:
- Aumento en la actividad de renina plasmática, de su concentración y sustrato por estimulación estrogénica, manteniendo así los niveles de tensión arterial. Sus valores se incrementan en posición supina.
- Aumento de angiotensina II como respuesta a incremento de renina y por tanto también aumenta la aldosterona con incremento en la retención de agua y sodio.(17).

La refractariedad a la angiotensina puede ser causada por la acción vasodilatadora de prostaglandinas en valores elevados. Cuando las mujeres embarazadas normales reciben inhibidores de la síntesis de las prostaglandinas tipo indometacina o aspirina, pierden su refractariedad.

HIPOTESIS SOBRE LA CAUSA DE LA HIPERTENSION INDUCIDA POR EL EMBARAZO.

Existen algunos datos para pensar que la enfermedad se comporta como un estado hiperdinámico y se apoya en el hecho que el aclaramiento del sulfato de dehydroisoandrosterona por la placenta tuvo un aumento paulatino en paciente normotensas hasta el término, pero en pacientes que desarrollaron hipertensión primero tuvieron aclaramiento mayor y posteriormente bajo bruscamente cerca del término indicando disfunción placentaria.

En un estudio similar realizado por Gant y cols., en mujeres núlparas, demostraron que las mujeres que van a ser hipertensas tiene respuesta anormal a la infusión de angiotensina aun en la semana 14 de gestación cuando aun no se manifiesta el signo clínico de hipertensión.

Estos dos estudios documentan la característica básica de esta enfermedad del embarazo: Los cambios fisiopatológicos están presentes meses antes del inicio de la enfermedad hipertensiva.

Mucho se ha escrito sobre el papel de los prostanoides y del balance de prostaciclina/troboxano, sin embargo Ylikokala y col. demostraron que los cambios en prostanoides no están presentes en semanas tempranas y cuando se presentó este cambio casi siempre coincidió con la alteración de la presión arterial.

De este y otras estudios se deduce, que los cambios en la fisiología comienzan meses antes del inicio de los síntomas y puede estar presente tan temprano como a finales del primer trimestre (Depuración de dehydroisoandrosterona alterada en el primer trimestre) y apoyados en la detección de trastornos en el

balance de prostanoïdes en forma tardía, sugiere que todos los cambios no pueden ser explicados por vasoconstricción o hipoxia únicamente, ya que al inicio existe hiperfunción placentaria y de flujo alto demostrado por aclaramiento del sulfato de dehidroisoandosterona elevado y por último cuando la enfermedad se presenta, existe caída del aclaramiento de sulfato por la placenta, baja la excreción de prostaciclina, inicia la proteinuria y la hemodinámica alterada se presenta de forma heterogénea.

Easterling y Benendetti (23) que presentaron los hallazgos previos sugieren el siguiente mecanismo de producción de enfermedad:

- Gasto cardíaco elevado
- Vasodilatación compensatoria de este gasto elevado.
- Agotamiento de las reservas de vasodilatadores.

La teoría de ellos es apoyada además por la presencia más frecuente de hipertensión en casos de embarazos gemelares, donde el volumen sanguíneo es mayor que en la embarazada normal y por lo tanto mantienen un gasto cardíaco alto mayor al del embarazo único.

En la HIPERTENSION INDUCIDA POR EL EMBARAZO (HIPE) la anomalía básica parece ser un vasoespasmo generalizado con hipoxia secundaria que altera la función hística, el problema hasta la fecha es saber cuál es el evento inicial y si existe o no alguna manera de identificarlo.

Ya cuando existe desbalance de prostanoïdes con aumento del tromboxano y manifestación clínica de hipertensión, la secuencia de hechos va mediada por los efectos de estas sustancias en exceso, así el tromboxano aumenta el vasoespasmo, induce agregación plaquetaria, con depósitos de fibrina, más liberación de sustancias presoras y más daño endotelial. El daño endotelial puede ser de diversos grados y puede llegar a ser tan intenso que condicione muerte celular irreversible. En estadios finales las alteraciones hemodinámicas pueden ser variables y dependen muchas veces del estado de función renal.

En la función renal como consecuencia del vasoespasmismo hay disminución del flujo sanguíneo, disminución de la filtración glomerular, aumento del ácido úrico, y para compensar estas deficiencias se pone a funcionar el mecanismo de renina-angiotensina-aldosterona con la consiguiente retención de agua y sodio.

Estos cambios pueden originar hipoperfusión placentaria, con zonas de isquemia importante manifestadas por los típicos infartos placentarios observados en estas pacientes hipertensas y que son favorecidos por el efecto de vasoconstricción, con agregación plaquetaria, daño endotelial y perpetuación de este círculo vicioso difícil de vencer.

Siempre que hay hipoxia útero-placentaria hay degeneración trofoblástica y aumento en la liberación de la renina uterina (16). La degeneración trofoblástica libera tromboplastina con depósito de fibrina y fibrinógeno en glomérulos renales con proteinuria secundaria y disminución de la filtración glomerular, aumenta así la retención renal de sodio y expande el volumen apareciendo edema e hipertensión arterial. El aumento de la reabsorción renal de sodio aumenta la reabsorción de ácido úrico con su incremento secundario en plasma.

TEORIAS ETIOLOGICAS PREVIAS.

La preeclampsia históricamente es un modelo clásico de hipótesis confusas y antagónicas para la etiología, fisiopatología y sus efectos en la madre y el feto.

Todos los efectores que se han involucrado tienen bases y apoyos al momento de estar en estudio, sin embargo hemos visto como, una vez instalada la enfermedad la cascada de eventos presentes puede dar oportunidad a pensar en uno de ellos como evento inicial, cosa que no puede ser, pues ya vimos como midiendo el aclaramiento de sulfato de dehidroisoandrosterona depurada por la placenta en el primer trimestre, ya desde entonces podemos identificar aquellas que serán pacientes hipertensas, porque su tasa

de aclaramiento difiere de otras pacientes. La cuestión sigue en pie: "¿Cual es el evento inicial que origina esta secuencia de fenómenos?:

HIPOTESIS DE BASE.

Generalmente en el cuerpo humano existen fenómenos de oxidación reducción a todos niveles, uno de estos lugares son las membranas celulares las cuales tiene en su estructura cidos grasos los cuales son susceptibles de sufrir alteración al estar en contacto con radicales de oxígeno y algunos metales como hierro. Al ocurrir oxidación se transforman en lipoperóxidos los cuales por si mismos pueden causar daño a membranas y liberación de precursores de prostaglandinas. Según estudios, de la capacidad del cuerpo para liberar estos radicales de oxígeno estriba su capacidad para detener o no una secuencia de daño a nivel de membrana celular

UNA EXPLICACION SENCILLA DEL MECANISMO.

LIPOPEROXIDACION.

Las sustancias químicas que contienen un electrón no apareado pero que son electrónicamente neutras se conocen como RADICALES LIBRES. Los radicales libres son altamente reactivos a causa de un electrón no apareado. El mecanismo de acción por radicales libres incluye una serie de reacciones que son :

REACCION DE INICIACION , DE PROPAGACION Y DE TERMINACION DE RADICALES LIBRES (3).

a.- DE INICIACION: Formación de radicales libres por ruptura homolítica de un enlace simple (A:B -- A B) Formando dos radicales libres, cada uno con su electrón enlazante. La energía es dada por luz ultravioleta, calentamiento de la mezcla o por acción enzimática.

b.- DE PROPAGACION: A través de una reacción se perpetúa así misma y se le llama reacción en cadena, origina así un nuevo radical a partir de un radical sencillo, el número de ciclos de las etapas de propagación se llama longitud de la cadena. La energía de reacción depende de la energía de los radicales que intervienen.

c.- DE TERMINACION: Cualquier reacción que lleve a la destrucción de radicales libres o formación de radicales libres estables no reactivos (combinando radicales libres con otros, por captación o acoplamiento enzimático).

OXIGENO MOLECULAR (3).

Puede ser metabolizado in vivo para formar derivados oxidantes altamente reactivos. El oxígeno actúa como oxidante terminal durante la respiración, fuente principal de energía en los organismos aeróbicos. Ciertas radiaciones llamadas ionizantes dañan las células vivas por destrucción directa de los componentes celulares ó formación de radicales o iones que sufren reacciones anormales con otros componentes celulares. El oxígeno molecular en estado basal tiene dos electrones no apareados constituyendo un BIRRADICAL ESTABLE. Los compuestos con dobles enlaces hidrógenos alifáticos, bencénicos o terciarios son susceptibles de oxidación al aire (autooxidación), y ésta produce inicialmente hidroperóxidos que son compuestos que contienen el grupo -OOH, y que fácilmente se convierten en mezclas de alcoholes, cetonas y otros productos.

El OXIGENO y el HIERRO poseen propiedades que los hacen potencialmente dañinos a los tejidos biológicos. Durante la reducción del oxígeno las especies reactivas tales como el radical superóxido (O_2^-) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2) son rápidamente formados. El hierro puede reaccionar con estas especies o con el propio oxígeno molecular para generar RADICALES LIBRES, los cuales atacarán a los ácidos grasos poli-insaturados o a los lípidos de membranas.

EL DETERIORO OXIDATIVO DE LOS LIPIDOS DE LAS MEMBRANAS ES LO QUE SE CONOCE COMO LIPOPEROXIDACION.

Para protegerse así mismo contra la lipoperoxidación, el organismo posee muchos mecanismos de defensa (antioxidantes), que en condiciones normales proveen adecuada protección para las membranas celulares sin embargo bajo ciertas circunstancias su efectividad puede disminuir o incluso abatirse. Los factores que pueden estimularla son en general un desbalance entre factores pro-oxidantes y antioxidantes; el primero puede estar mediado por procesos enzimáticos como la lipoxigenasa, ciclooxigenasa, NADPH-citocromo C reductasa y no enzimáticos probablemente mediados por hemoproteínas endógenas y metales de transición.

LA LIPOPEROXIDACION MICROSMAL (1,3); es un proceso complejo que ocurre en plantas y animales, involucra, formación y propagación de radicales libres, liporadicales, el consumo de oxígeno, reacomodo de los dobles enlaces en los lípidos insaturados y una eventual destrucción de las membranas lipídicas, produciendo una variedad de productos de rompimiento incluyendo alcoholes, cetonas, aldehídos y éteres.

Las membranas biológicas son ricas en ácidos grasos insaturados y se encuentran en un fluido rico en metales y oxígeno. Generalmente el radical libre que inicia la reacción es un oxígeno enriquecido como un radical hidroxilo (OH) y/o complejos oxígeno-hierro.

La lipoperoxidación comúnmente empieza con el secuestro de un átomo de hidrógeno de un ácido graso insaturado, resultando la formación del radical lípido, el reacomodo del doble enlace es el resultado de la formación de dienos conjugados. El ataque por oxígeno molecular produce un radical lipoperoxil que a su vez puede extraer un hidrógeno del lípido adyacente para formar un lipohidroperóxido ó un lipoendoperóxido, éstos últimos pueden formar MALONDIALDEHIDO como producto final de rompimiento. El mecanismo predominante de continuación incluye fraccionamiento de peróxidos lípidos catalizados primariamente por formas de hierro reducido. Las membranas microsomaes son

particularmente susceptibles a la lipoperoxidación debido a las altas concentraciones de ácidos grasos poli-insaturados y de hierro que facilita la lipoperoxidación dependiente de NADPH.

El sitio primario de daño celular por proceso de lipoperoxidación es la asociación de membrana, ácido graso poli-insaturado y proteína en asociación con colesterol altera la permeabilidad de la membrana, con el consiguiente aumento de peróxidos lípidos sanguíneos con gran susceptibilidad de fijación en las lipoproteínas de baja densidad donde se transportan a la circulación causando degeneración tisular proximal y distal. La destrucción de la integridad de la membrana hace que disminuya la actividad de la glucosa 6 fosfato deshidrogenasa en la lipoperoxidación dependiente de NADPH e igualmente inactiva al citocromo B 5 y P 450 con destrucción del grupo hemo y paralelamente pérdida de la actividad del metabolismo de las drogas.

LIPOPEROXIDACION EN EL EMBARAZO.

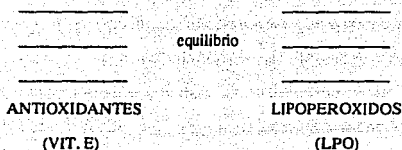
Datos recientes sugieren que el tejido placentario puede ser el origen principal en productos de lipoperoxidación con disminución de NADPH y cloro férrico conforme avanza la edad gestacional. En tejidos específicos de producción de prostaglandinas la actividad lipoperoxidativa es proporcional a la generación de prostaglandinas endoperoxidas inhibiendo a la ciclooxigenasa y consecuentemente la reacción lipoperoxidativa. Influyen además la gran cantidad de triglicéridos placentarios y la gran actividad intrínseca de la lipooxigenasa, por lo tanto, la actividad aberrante de estas aumentan la producción de ácido araquidónico y por consiguiente la lipoperoxidación (4,3).

El incremento de la lipoperoxidación se asocia con aumento en los lípidos séricos totales por fracción de lipoproteínas de baja densidad (en el 40% de los embarazos fundamentalmente a partir del 2o. trimestre) y este aumento está en relación al grado de severidad de la enfermedad y disminuye 24 horas posterior al parto (4). El efecto citotóxico de los lipoperoxidos ocasiona falla funcional del endotelio favoreciendo vasoespasmo arterial por aumento en la sensibilidad para agonistas vasopresores, a nivel arterial causa

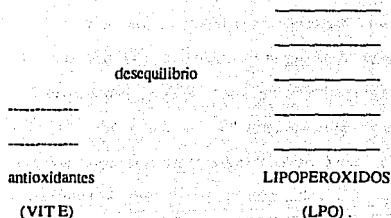
además aumento en la presión de oxígeno modificando la tensión arterial. La citotoxicidad ocurre con niveles de lipoperoxidación de 0.5 a 1 micromolas/litro.

LA HIPERTENSION INDUCIDA POR EL EMBARAZO (HIPE) parece relacionarse con un desbalance entre acciones pro-oxidantes y antioxidantes, y que se podría esquematizar de la siguiente manera:

EMBARAZO NORMAL:



PREECLAMPSIA.



condiciona:

Disminución de PGI₂

Daño a las células endoteliales.

Desintegración ó ruptura de la membrana plaquetaria

Aumento del tromboxano.

Este nomograma esquematiza comparativamente el balance entre las acciones biológicas de antioxidantes y peróxidos lípidos en embarazo normal y el desbalance con incremento en los peróxidos lípidos y disminución de vitamina E en embarazo complicado con preeclampsia.

Durante el embarazo ocurre un estado antioxidante normal que aumenta progresivamente con la edad gestacional. Los antioxidantes son derivados de la síntesis endógena de vitamina E o su aporte dietético, protegen a enzimas, células y proteínas de destrucción por efecto citotóxico de la lipoperoxidación. En el embarazo normal la concentración proporcional de prostaciclina-tromboxano favorece progresivamente la acción de la primera; La prostaciclina es un potente vasodilatador, inhibidor de la agregación plaquetaria y de la actividad uterina favoreciendo un incremento en el flujo sanguíneo útero-placentario. El tromboxano tiene acciones opuestas.

En la preeclampsia existe desbalance prostaciclina-tromboxano, dado por aumento de peróxidos lípidos que inhiben enzimas como la ciclooxigenasa y prostaciclín-sintetasa con disminución de la síntesis de prostaciclina, aumento de tromboxano, consiguiente aumento en la lipoperoxidación con consumo de vitamina E (está también puede disminuir por disminución en la absorción intestinal por vasoconstricción), y cuando ésta es severa se asocia con destrucción de la membrana plaquetaria. Otros componentes de la actividad antioxidante importantes son el ácido úrico y las células plasmáticas. Las células rojas por su fácil acceso son estudiadas, éstas sufren cambios antioxidantes y son ricas en funciones tioles potencialmente involucrados en la protección contra radicales libres. En la paciente con preeclampsia hay alteración del metabolismo de ácidos grasos, en el almacenaje o bien movilización alterada de depósito de lípidos. Algunos de los ácidos grasos son los precursores de prostanoides (tromboxano y prostaciclina) como el

N3 y N6 del ácido eicosapentanoico y ácido araquidónico respectivamente los que a su vez disminuyen la trigliceridemia, colesterolemia, y agregación plaquetaria además de disminuir la viscosidad sanguínea, deformidad eritrocitaria y niveles de antitrombina. Los niveles de ácidos grasos sin embargo también pueden disminuir por deficiencia en la dieta o alteración en la absorción intestinal. Los ácidos grasos poli-insaturados se han encontrado significativamente elevados en la mujer con preeclampsia.

Por lo ya descrito el incremento en la actividad de radicales libres se ha implicado en la patogénesis de hipertensión inducida por el embarazo.

Los cambios en los sistemas antioxidantes contribuyen a ésta condición, los radicales libres por su inestable y transitoria naturaleza hacen difícil su medición directa por lo que su tendencia a causar lipoperoxidación ha sido evaluada en forma indirecta a través de malondialdehído para determinar su estado en éste padecimiento.

JUSTIFICACION:

La hipertensión inducida por el embarazo es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad materna y perinatal, en México ocupa el 2o. lugar de causa de muerte materna, es una entidad común de la cual se han propuesto numerosas teorías para explicar la o las causas desencadenantes sin que hasta la fecha exista una que explique totalmente el cuadro de inicio. Por lo anterior todos los tratamientos son sintomáticos y no curativos como debería de ser, por lo que la búsqueda de una etiología cierta es fundamental.

OBJETIVOS:

El objetivo principal fué investigar el papel que juega la lipoperoxidación en la génesis de la hipertensión inducida por el embarazo y hacer una caracterización de la lipoperoxidación en mujeres gestantes no hipertensas e hipertensas.

HIPOTESIS:

En la hipertensión inducida por el embarazo existe daño en las membranas celulares en toda la economía donde se incluyen células endoteliales vasculares. Este daño en su inicio puede estar mediado por trastornos de lipoperoxidación, y este estado puede ser medido por empleo de una técnica colorimétrica para determinación de dienos conjugados, especies finales formadas durante el proceso de lipoperoxidación. Con los anteriores datos nosotros podemos establecer una correlación entre la lipoperoxidación y el estado del embarazo como ayuda para tratar de investigar la fase inicial de la hipertensión inducida por el embarazo y por otra parte saber si la medición del ácido tiobarbitúrico empleada para medir lipoperoxidación puede ser de utilidad como ensayo predictivo de la presencia de ésta patología.

MATERIAL Y METODOS:

Estudio longitudinal, y prospectivo en 47 pacientes del Servicio de Gineco-obstetricia (Urgencias, Embarazo de alto riesgo y Hospitalización) del Hospital General "Dr. Miguel Silva" de Morelia, Michoacán con embarazos del segundo y tercer trimestre. Se captaron pacientes de 16 a 35 años de edad, primíparas ó multíparas y se les dividió en dos grupos de acuerdo a las cifras tensionales y antecedentes:

Grupo 1.- Pacientes con cifras tensionales menores a 140/90 mm Hg ó presión arterial media menor de 106 y sin antecedentes de HIPE I (grupo control).

Grupo 2.- Pacientes con presiones por arriba de 140/90 mm hg en dos tomas o presión arterial media mayor de 106 o pacientes eclámpicas, con proteinuria según criterio establecido o bien aquellas con antecedentes de HIPE (grupo problema).

De acuerdo a las cifras tensionales arriba de 140/90 mm Hg, proteinúria, cuadro clínico y antecedentes la paciente se consideró como con hipertensión crónica, preeclámpsia o eclámpsia.

Para confirmar que la técnica del ácido tiobarbitúrico es una técnica confiable para la identificación cuantitativa de radicales libres en plasma y orina, en el Departamento de Investigación Clínica y Biomédica (DICB) del Hospital General "Dr. Miguel Silva" se realizó un estudio doble ciego en el que se buscó determinar la concentración de malondialdehído circulante en plasma en un grupo de ratas machos de la cepa wistar tratadas con tetracloruro de carbono contra un grupo control de ratas sin tratamiento. En el mismo DICB se desarrollaron todas las pruebas, tanto de bioquímica clínica, enzimáticas, de orina y lipoperoxidación.

En el Servicio de Ginecología y Obstetricia, a las pacientes captadas se les informó sobre las características del estudio y objetivo del mismo, al cual accedieron voluntariamente. Posteriormente se les realizó interrogatorio y evaluación clínica, la presión arterial se determinó en posición supina y en decúbito lateral izquierdo posterior a 15 minutos de reposo utilizando baumanómetros aneroides. Las pacientes ambulatorias fueron enviadas al DICB donde después de una nueva corroboración de cifras tensionales fueron clasificadas en el grupo correspondiente.

Se realizaron los procedimientos siguientes:

DETERMINACION DE LIPOPEROXIDACION SERICA.

Se obtuvieron 15 ml. de sangre, los cuales se colectaron por punción en la vena cubital. Inmediatamente después la sangre obtenida se dividió en dos porciones: una de 5 ml que se colocó en un tubo de ensayo el cual contenía 0,25 ml. de anticoagulante EDTA y la otra de 10 ml. se colocó en un tubo sin anticoagulante; se mezcla cuidadosamente la sangre con el EDTA mediante inversión para evitar su coagulación por un espacio aproximado de 30 segundos. A cada paciente se le proporcionó un frasco esterilizado para la colección de la muestra de orina, de preferencia la primera orina de la mañana después de un periodo de 8 horas de ayuno.

El tubo de la muestra de sangre más el EDTA, después de ser mezclado se lleva a centrifugación a 3000 r.p.m. durante 5 minutos. Durante el tiempo de centrifugación se prepara una batería de tubos para las muestras así como un tubo para el blanco. A todos los tubos marcados como muestra se les colocan 2.5 ml. de reactivo para lipoperoxidación (LPO) y al tubo marcado como blanco se le colocan 3 ml. del mismo reactivo. Una vez concluida la centrifugación se procede a separar el plasma del paquete globular de cada muestra con pipetas Pasteur; se toman 0.5 ml de plasma con una pipeta semiautomática de 500 micrlit y se depositan en los tubos con reactivo para LPO, cada muestra se realiza por duplicado.

Posteriormente cada tubo (incluyendo el blanco) se coloca en ebullición durante 15 minutos, se sacan, se colocan en un baño de agua fría durante tres minutos y se llevan a centrifugación a 1500 r.p.m. durante 3 minutos. Se separa el sobrenadante de cada tubo muestra y se lee a una longitud de onda de 540 nm. Finalmente se entregan los resultados para análisis estadístico. Es importante en la técnica la prontitud con la cual se manejan las muestras, ya que los radicales libres son entidades sumamente reactivas y conforme pasa el tiempo éstos van disminuyendo. Una forma eficaz para el frenado de este proceso es el enfriamiento de las muestras a 4 grados.

De las muestras tomadas para química sanguínea y enzimática; una vez obtenidos los 10 ml. de sangre de las pacientes, se depositó en un tubo de ensayo sin anticoagulante y la muestra se dejó en reposo a

temperatura ambiente durante aproximadamente 30 minutos, esto con el fin de que se forme el coágulo, posteriormente se mete la muestra a centrifugar a 2500 r.p.m. durante 5 minutos, finalmente se sacan los tubos de la centrifuga y se separa el suero del paquete globular quedando la muestra preparada para iniciar pruebas de química sanguínea básica y enzimática.

PRUEBAS DE QUIMICA SANGUINEA:

Se realizaron las siguientes pruebas:

1.-Determinación de colesterol: Prueba realizada por el método de Liebermann-Burchard.

2.- Determinación de proteínas totales: Fue determinada por el método de Biuret.

PRUEBAS DE QUIMICA ENZIMATICA:

Se determinan aquellas que sirven para determinar daño hepático.

1.- Determinación de fosfatasa alcalina: La prueba se realizó por el método de Bessey, Lowry y Brock (21).

2.- Cuantificación de la Aspartato Amino Transpeptidasa: Para la cuantificación de esta enzima se utilizó la prueba ultravioleta optimada según las recomendaciones de la Sociedad Alemana para la química clínica.

3.- Cuantificación de la alanin-amino-transpeptidasa: Esta se realizó mediante la prueba de ultravioleta optimada según las recomendaciones de la Sociedad Alemana para la química clínica.

MANEJO DE LAS MUESTRAS DE ORINA:

DETERMINACION DE LIPOPEROXIDACION URINARIA.

De la misma forma que se procesó la muestra de sangre para la cuantificación de los niveles de malondialdehído, la muestra de orina, recién colectada se lleva a procesar. Se toman 500 mcrits de orina y se depositan en un tubo de ensaye, el cual contiene 2.5 ml de reactivo para la LPO, en otro tubo rotulado como blanco se colocan 3.0 ml. del mismo reactivo, se tapan los tubos con tapones de goma y se colocan en un baño de agua fría durante 3 minutos se centrifuga a 1500 r.p.m. y finalmente se separa el sobrenadante de las muestras y se leen en el espectrofotómetro a 540 nm contra el blanco de reactivo.

DETERMINACIONES HECHAS EN ORINA:

Se midió la densidad y se utilizó un refractómetro de mano.

El resto de las pruebas, entre las cuales se incluyen pH, glucosa, proteínas, y nitritos fueron realizadas con tiras reactivas Combur 10 Test de la casa comercial Boehringer-Mannheim.

RESULTADOS.

Tabla 1.- Valores de LPO en plasma de ratas.

En esta tabla se observan las concentraciones de lipoperoxidos de dos grupos de ratas machos adultos de la cepa wistar, el grupo II estuvo formado por ratas tratadas con tetracloruro de carbono en aceite de mafz, administrándoseles 0.1 ml de la solución al 50% por vía intraperitoneal, el grupo I fue un grupo control, al cual solo se le administro 0.1 ml de aceite de mafz. Las administraciones se hicieron por vía intraperitoneal y el proceso de daño hepático duró 18 días. Como se puede observar en ambos casos el tamaño de la muestra tiene una N=7, las muestras se hicieron por duplicado y a doble ciego y se muestran los resultados,

tanto de las absorbancias leídas a una longitud de onda de 540 nm, como de las concentraciones expresadas en nanomoles de malondialdehído por mililitro de plasma.

Tabla 2.- Resultados del estudio biológicos en mujeres embarazadas.

En esta tabla se hace el reporte total de las pruebas de laboratorio hechas en la población de estudio, se incluyen las pruebas de química sanguínea, química enzimática, general de orina, así como datos individuales de las pacientes como son edad, paridad, semanas de gestación, presión arterial diastólica y sistólica.

Tabla 3.- Valores de lipoperoxidación en mujeres embarazadas separadas por edades.

A la población total se le dividió de acuerdo a rangos de edades de 5 años, los cuales fueron: a) Grupo de edades menores o iguales a 20 años, b) grupo de edades entre 21 y 25 años, c) grupo de edades entre 26 y 30 años, d) grupo de edades iguales o mayores de 31 años. A su vez cada grupo se subdividió internamente en base a hipertensión o no por cada grupo para diferenciación.

Tabla 4.- Relación de los niveles de lipoperoxidación y gravidéz.

En esta tabla se encuentran acomodadas todas las pacientes de acuerdo a su paridad en el momento del estudio. A su vez se observan en cada sección dos grupos que representan al grupo de mujeres con igual paridad pero divididas en normotensas e hipertensas.

Tabla 5.- Relación entre semanas de gestación y niveles de lipoperoxidación

En esta tabla se acomodaron los resultados de la población de estudio formando grupos de acuerdo a las semanas de gestación de cada paciente y posteriormente se hace otro nuevo acomodo dentro de estos grupos en base a las presiones arteriales intragrupal y diferenciar las hipertensas de las normotensas

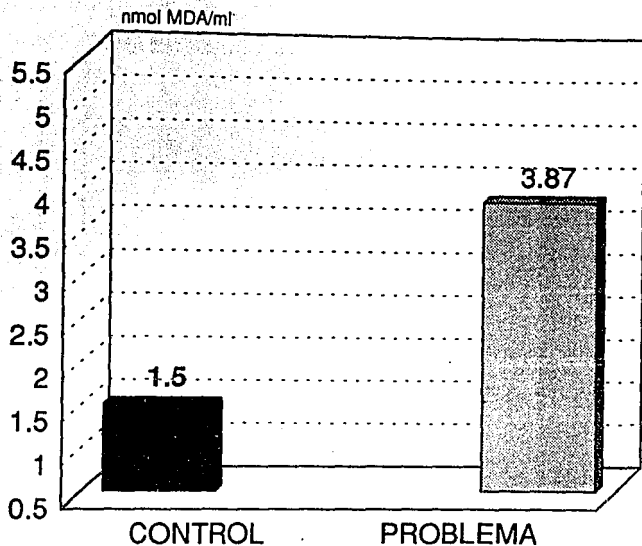
TABLA 1. VALORES DE LIPOPEROXIDACION EN PLASMA DE RATA

		ABSORBANCIA			CONCENTRACION nmol MDA-ml plasma			
	GRUPO I							
1		0.04		0.04	1.54		1.54	1.61
2		0.05	0.05	0.05	1.77	1.73	1.75	1.61
3		0.04	0.04	0.04	1.62	1.65	1.64	1.61
4		0.04	0.04	0.04	1.65	1.62	1.64	1.61
5		0.04	0.04	0.04	1.50	1.46	1.48	1.61
6		0.05	0.05	0.05	1.77	1.77	1.77	1.61
7		0.04	0.04	0.04	1.46	1.42	1.44	1.61
	L INF			0.04		1.44		
	L SUP			0.05		1.77		
	V MEDIO			0.04		1.61		
	D ST			0.00		0.12		
	C VAR			7.50		7.33		
	E ST			0.00		0.05		

21

		ABSORBANCIA			CONCENTRACION nmol MDA/ml plasma			
	GRUPO II							
1		0.10	0.09	0.10	3.85	3.61	3.73	3.87
2		0.10	0.10	0.10	3.65	3.69	3.67	3.87
3		0.11	0.11	0.11	4.34	4.15	4.25	3.87
4		0.10	0.10	0.10	3.92	3.79	3.86	3.87
5		0.09	0.09	0.09	3.38	3.46	3.42	3.87
6		0.10		0.10	4.00		4.00	3.87
7		0.11		0.11	4.15		4.15	
	L INF			0.09			3.42	
	L SUP			0.11			4.25	
	V MEDIO			0.10			3.87	
	D ST			0.01			0.27	
	C VAR			6.97			6.90	
	E ST			0.00			0.11	

LPO EN PLASMA DE RATAS CONCENTRACION

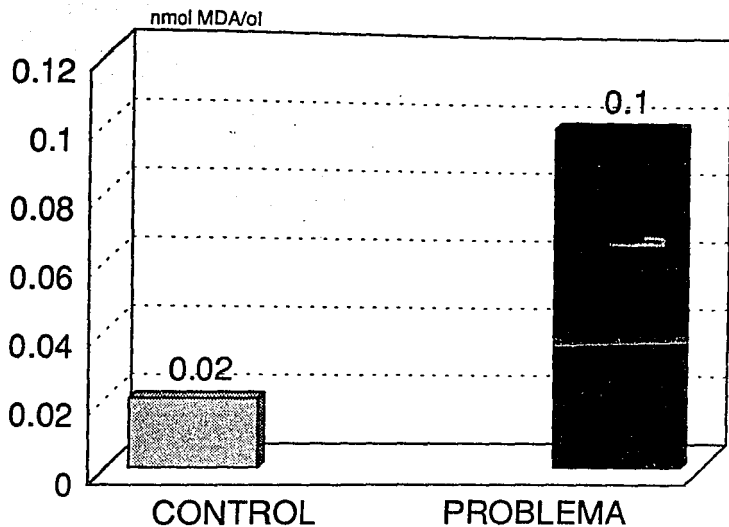


Grafica 1 LPO en plasma de ratas (concentración)

En esta grafica se comparan los valores medios de la concentración de lipoperoxidos entre los grupos control y problema al cabo de 18 días de tratamiento, correspondientes a la tabla I. La concentración de lipoperoxidos está expresada en nanomoles de malondialdehido por mililitro de plasma.

Valores de LPO en plasma de ratas

Absorbancia



Gráfica 2 LPO en plasma de ratas (absorbancias)

Aquí se observa la variación de la concentración expresada en nanomoles de malondialdehído por mililitro de orina de los lipoperoxidos en los grupos de ratas control y problema de la tabla I.

TABLA 2. RESULTADOS DEL ESTUDIO DEL LIPOPEROXIDACION EN MUJERES EMBARAZADAS

No. SUJETO	EDAD	PARIDA	SDG	PAS	PAD	LPO s	PROT	COL	FAL	TGO	TGP	LPO o	DENS o	PH o	GLU o	PROT o	NIT o
1	25	1	46	102	54	10.07	7.5	215.3	32.6	12.4	14.0	9.3	1.013	5.0	0.0	0	pos
2	17	1	34	110	70	8.60	6.9	220.6	44.0	10.6	16.1	8.4	1.013	7.0	0.0	30	0
3	26	2	33	107	75	9.10	7.0	201.1	33.0	10.9	10.1	24.6	1.021	6.0	0.0	10	0
4	22	2	18	120	80	13.70	7.8	167.4	35.0	11.9	8.9	7.7	1.019	5.0	0.0	30	0
5	27	4	28	140	100	16.40	6.5	250.0	33.6	10.5	12.1	14.9	1.032	5.0	0.0	100	0
5	28	4	37	200	140	29.70	6.9	279.0	55.3	17.7	21.0	19.4	1.022	5.5	0.0	500	0
6	30	6	35	140	90	25.90	6.4	146.0	63.4	11.3	10.3	14.7	1.028	5.0	0.0	0	0
7	20	2	39			20.40	7.3	147.0	64.2	9.5	18.3	7.3	1.008	5.0	0.0	0	0
8	28	1	30	120	70	20.00	8.8	235.0	29.0	15.0	16.0	22.0	1.030	6.0	0.0	0	0
8	28	1	20	108	60	19.50	7.0	183.01	19.8	12.9	17.2	19.3	1.026	5.0	0.0	0	0
9	39	12	6	90	60	15.50	8.3	162.0	34.0	19.5	15.9	16.1	1.023	6.0	0.0	10	0
10	27	6	40	160	100	19.20	7.7	155.0	52.6	12.4	12.2	17.6	1.018	7.5	0.0	100	0
11	26	1	23	100	60	7.30	7.9	184.0	33.6	17.2	22.7	15.7	1.024	6.0	0.0	0	0
12	23	1	40	110	70	16.40	7.2	265.0	46.2	13.1	8.5	7.8	1.007	6.0	0.0	0	0
13	39	8	30	130	80	21.00	6.6	279.0	54.2	18.5	21.3	17.4	1.021	6.0	0.0	30	0
14	31	3	36	120	80	13.40	6.8	263.0	66.7	15.9	17.5	10.6	1.013	6.0	0.0	0	0
15	36	8	39	110	70	13.10	6.3	169.5	45.8	14.5	11.1	4.5	1.002	6.0	0.0	0	0
16	38	6	36	110	70	12.10	6.5	258.5	45.6	16.9	17.9	8.7	1.010	7.0	0.0	0	0
17	23	1	40	110	70	11.10	7.5	201.3	47.4	17.7	13.2	9.3	1.019	6.0	0.0	0	0
18	23	1	35	100	60	13.40	7.4	225.0	47.5	15.2	16.8	16.1	1.015	6.0	0.0	0	0
19	24	2	29	110	70	12.0	7.3	210.8	32.6	11.3	10.1	10.5	1.014	7.0	0.0	0	0
20	24	1	28	110	75	12.10	7.1	210.6	37.6	16.5	16.1	13.5	1.018	6.0	0.0	0	0
21	23	2	25	100	70	11.40	6.9	200.9	35.2	17.3	18.0	13.0	1.015	6.0	0.0	0	0
22	25	2	30	115	70	13.50	7.2	205.0	35.5	17.0	16.9	15.0	1.010	6.0	0.0	0	0
23	30	1	32	145	100	16.0	7.9	240.0	46.2	12.4	16.1	18.0	1.020	6.0	0.0	10	0
24	25	2	32	114	70	12.80	7.2	211.3	38.0	18.3	16.0	12.5	1.010	5.0	0.0	0	0
25	26	3	38	120	80	13.80	7.1	246.2	41.0	19.2	20.7	16.7	1.020	6.0	0.0	30	0
26	23	1	33	120	80	14.10	7.4	205.8	47.5	22.8	26.6	13.2	1.013	5.0	0.0	330	0
26	29	1	35	150	95	16.60	6.9	250.0	40.0	20.3	22.8	18.6	1.021	6.0	0.0	30	0
27	20	1	29	160	100	18.70	6.9	261.0	63.2	24.6	23.1	19.5	1.022	5.0	0.0	100	pos
28	20	1	31	180	120	20.40	6.8	279.3	72.4	28.8	25.8	23.4	1.022	5.0	0.0	500	pos
29	16	1	31	150	100	17.60	6.8	243.1	64.4	25.0	27.5	16.0	1.016	5.0	0.0	100	0
30	19	4	32	120	85	16.10	7.0	220.2	43.5	20.5	23.4	15.0	1.010	6.5	0.0	30	0
31	18	2	35	160	110	18.40	7.0	239.7	55.2	20.5	18.0	20.0	1.023	6.0	0.0	100	0
32	24	1	33	110	70	13.00	7.3	215.7	32.3	17.7	29.7	13.6	1.009	6.0	0.0	0	0
33	26	1	32	110	70	12.40	7.5	209.0	47.5	23.0	20.8	15.8	1.010	5.5	0.0	0	0
34	22	1	33	150	109	16.7	8.0	239.5	45.8	10.6	15.2	19.7	1.025	6.5	0.0	100	0
35	23	3	28	110	60	13.00	6.9	200.0	32.6	16.9	20.7	12.4	1.012	5.0	0.0	0	0
36	27	2	29	130	85	13.70	6.9	218.4	35.3	17.2	22.7	15.0	1.013	5.0	0.0	0	0
37	24	1	32	135	90	14.00	7.0	215.3	29.8	17.8	21.3	15.1	1.016	6.0	0.0	30	0
38	25	1	32	140	100	15.80	7.0	227.8	54.2	20.4	17.5	16.4	1.016	6.0	0.0	30	0
39	26	2	33	150	110	14.90	6.9	215.6	63.3	25.6	17.9	14.6	1.015	6.0	0.0	30	0
40	23	2	35	150	115	15.30	7.0	245.6	65.8	24.3	16.8	17.6	1.016	6.5	0.0	30	0
41	24	3	29	120	80	13.50	6.8	240.0	41.0	18.2	20.0	16.9	1.018	6.0	0.0	30	0
42	28	3	31	130	80	14.00	7.2	231.4	44.9	18.5	11.1	16.7	1.019	6.0	0.0	30	0
43	29	1	38	140	100	15.40	7.0	233.9	63.0	21.6	18.3	17.9	1.013	5.5	0.0	100	0

TABLA 3 EDAD Y NIVELES DE LIPOPEROXIDACION

	NOMBRE	EDAD	PAD	PAS	LPO s	LPO o
	GRUPO MENOR O IGUAL A 20 AÑOS					
2	CONCEPCION VALDIVIESA	17	110	70	8.60	8.4
30	DOLORES RUIZ TAPIA	19	120	85	16.10	15.0
	NORMOTENSA					
	V MEDIO	18.0	115.0	75.5	12.4	11.7
	DESV STANDARD	1.0	50	7.5	3.7	3.3
29	PETRA GOMEZT	16	150	100	17.60	16.0
31	CARMEN TELLO ROJAS	18	160	110	18.40	20.0
27	ALEJANDRA RUIZ TAPIA	20	160	100	18.70	19.5
28	MA ISaura RANGEL	20	180	120	20.40	23.4
7	EVA GARCIA ANDRADE	20			20.40	7.3
	HIPERTENSA					
	V MEDIO	18.8	162.5	107.5	19.1	17.2
	DESV STANDARD	1.6	10.9	8.3	1.1	5.5
	GRUPO 21 A 25 AÑOS DE EDAD					
21	PETRA ROBLES RUIZ	23	100	70	11.40	13.0
18	MARTHA RUTH MEZA	23	100	60	13.40	16.1
1	MA CARMEN TOLEDO	25	102	54	10.07	9.3
12	GRISELDA ZAMUDIO E	23	110	70	16.40	7.8
35	ELVIRA ROJAS Z	23	110	60	13.00	12.4
17	GRISELDA SEGOVIA E	23	110	70	11.10	9.3
19	CARMEN LOPEZ A	24	110	70	12.00	10.5
20	CLAUDIA GOMEZ P	24	110	75	12.10	13.5
32	GABRIELA ROJAS FLORES	24	110	70	13.00	13.5
24	ROSA FLORES BAEZALEJANDRA	25	114	70	12.80	12.5
22	GOMEZ ALCALA	25	115	70	13.50	15.0
4	MA SALUD SALAZAR B	22	120	80	13.70	7.7
26	ROSAURA TAPIA	23	120	80	14.10	13.2
41	ALEJANDRA SAUCEDO G	24	120	80	13.50	16.9
37	FERNANDA URIBE M	24	135	90	14.00	15.1
	NORMOTENSA					
	V MEDIO	23.7	112.4	71.3	12.9	12.4
	DESV STANDARD	0	8.7	8.8	1.4	2.8

TABLA 3 EDAD Y NIVELES DE LIPOPEROXIDACION

	NOMBRE	EDAD	PAD	PAS	LPO s	LPO o
38	ANA MA LOPEZ	25	140	100	15.80	16.4
34	LAURA ESPARZA G	22	150	109	16.70	19.7
40	GUADALUPE PEREZ P	23	150	115	15.30	17.6
	HIPERTENSAS					
	V MEDIO	23.3	146.7	108.0	15.9	17.9
	DESV STANDARD	1.2	4.7	6.2	6.9	1.4
	GRUPO DE 26 A 30 AÑOS					
11	MA EUFRASIA EGUIA	26	100	60	7.30	15.7
3	MARGARITA MENDEZ	26	107	75	9.10	24.6
8	MA ANGELES MARTINEZ	28	108	60	19.50	19.3
33	ALEJANDRA TAPIA F	26	110	70	12.40	15.8
25	VICTORIA GALVEZ FLORES	26	120	80	13.80	16.7
8	MA ANGELES MARTINES	28	120	70	20.00	22.0
36	CLAUDIA PEREZ G	27	130	85	13.70	15.0
42	ROSIO FLORES T	28	130	80	14.00	16.7
	NORMOTENSA					
	V MEDIO	26.9	115.6	72.5	13.7	18.2
	DESV STANDARD	0.9	10.4	8.7	4.1	3.2
5	ELBA ELIZARRAS ALONSO	27	140	100	16.40	14.9
43	LOURDES CHAVEZ B	29	140	100	15.40	17.9
6	ALEJANDRA CARDONA	30	140	90	25.90	14.7
23	ROSAURA ESPINOZA E	30	145	100	16.00	18.0
39	REINALDA SANCHEZ R	26	150	110	14.90	14.6
26	ROSAURA TAPIA	29	150	95	16.60	18.6
10	MA CARMEN RODRIGUEZ	27	160	100	19.20	17.6
5	ELVA ELIZARAGA	28	200	140	29.70	19.4
	HIPERTENSAS					
	V MEDIO	28.3	153.1	104.4	19.3	17.0
	DESV STANDARD	1.4	18.9	14.5	5.2	1.8

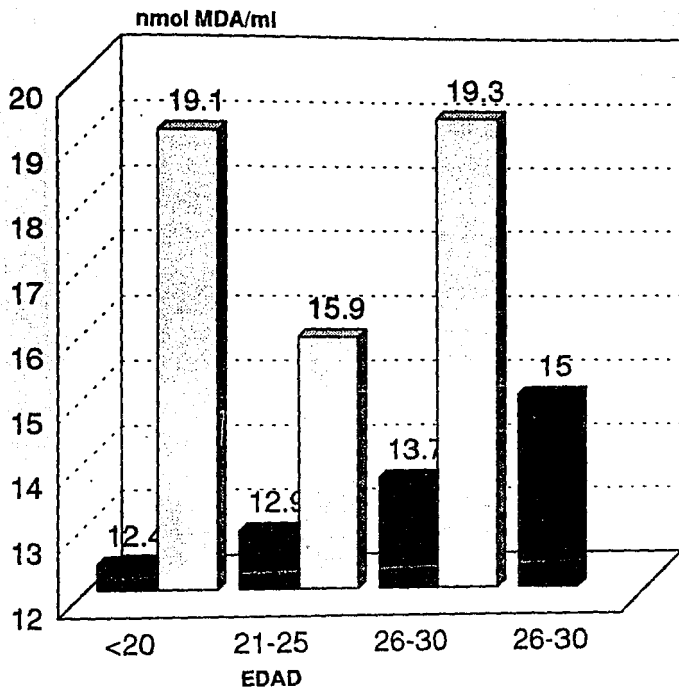
TABLA 3 EDAD Y NIVELES DE LIPOPEROXIDACION

	NOMBRE	EDAD	PAD	PAS	LPO s	LPO o
	GRUPO DE 31 A 40 AÑOS					
9	CONCEPCION MELGAREJO	39	90	60	15.50	16.1
15	MA GLAFIRACHAVEZ	36	110	70	13.10	4.5
16	MA CARMEN ARREOLA	38	110	70	1.10	8.7
14	ALICIA CAMIÑO PEREZ	31	120	80	13.40	10.6
13	GUADALUPE GARCIA S	39	130	80	21.00	17.4
	NORMOTENSAS					
	V MEDIO	112.0	112.0	72.0	15.0	11.5
	DESV STANDARD	13.3	13.3	7.5	3.2	4.8

LPO vs. EDAD

Lipoperoxidación en plasma

■ NORMAL □ HIPER

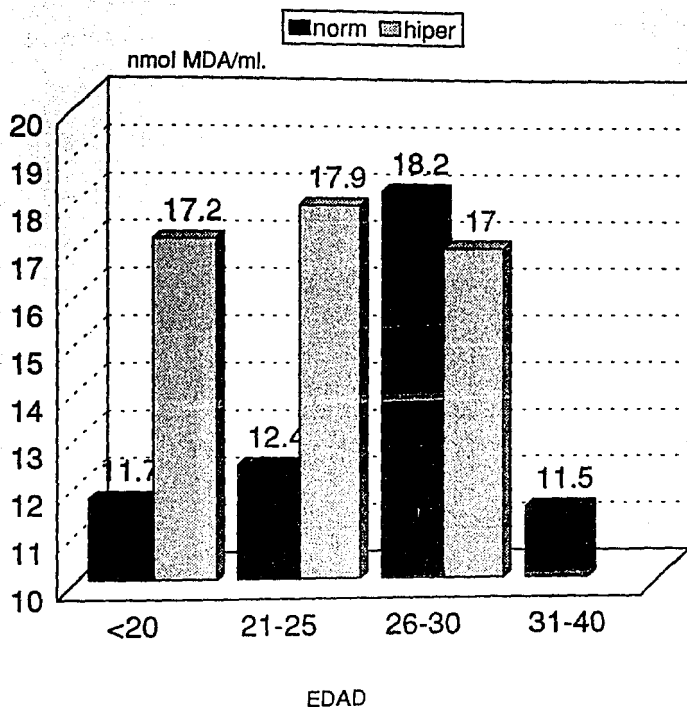


Gráfica 3 LPO vs. (plasma).

Esta gráfica muestra la relación de los niveles séricos de lipoperoxidación en relación a la de las pacientes normotensas e hipertensas respectivamente. Las unidades en que se muestran las concentraciones de lipoperoxido son nanomoles de malondialdehído por mililitro de plasma. Las edades de las pacientes están separadas en intervalos de 5 años cada uno.

LPO vs EDAD

Laperoxidación en orina.



Gráfica 4 LPO vs. edad (orina).

Niveles de liperoxidación en las pacientes estudiadas con presión arterial normal e hipertensas en relación a su edad.

Las unidades en las cuales se expresan los niveles de liperoxidos son nanomoles de malondialdehído por mililitro de orina.

TABLA 4 RELACION ENTRE GRAVIDEZ Y NIVELES DE LPO

NOMBRE	GRAV	SDG	PAS	PAD	LPO s	LPO o
MARTHA RUTH MEZA	1	35	100	60	13.40	16.1
MA EUFRASIA EGUIA	1	23	100	60	7.30	15.7
MA CARMEN TOLEDO	1	46	102	54	10.07	9.3
MA ANGELES MARTINEZ	1	20	108	60	19.50	19.3
CONCEPCION VALDIVIESA	1	34	110	70	8.60	8.4
GRISELDA ZAMUDIO E	1	40	110	70	16.40	7.8
GRISELDA SEGOVIA E	1	40	110	70	11.10	9.3
CLAUDIA GOMEZ P	1	28	110	75	12.10	13.5
GABRIELA ROJAS FLORES	1	33	110	70	13.00	13.6
ALEJANDRA TAPIA F	1	32	110	70	12.40	15.8
ROSAURA TAPIA	1	33	120	80	14.10	13.2
MA ANGELES MARTINEZ	1	30	120	70	20.00	22.0
FERNANDA URIBE M	1	32	135	90	14.00	15.1
V MEDIO					13.2	13.8
D ESTANDARD					3.6	4.1
ANA MA LOPEZ	1	32	140	100	15.80	16.4
LOURDES CHAVEZ B	1	38	140	100	15.40	17.9
ROSAURA ESPINOZA E	1	32	145	100	16.0	18.0
PETRA GOMEZ T	1	31	150	100	17.60	16.0
LAURA ESPARZA G	1	33	150	109	16.7	19.7
ROSAURA TAPIA	1	35	150	95	16.60	18.6
ALEJANDRA RUIZ TAPIA	1	29	160	100	18.70	19.5
MA ISAURA RANGEL	1	31	180	120	20.40	23.4
V MEDIO					17.2	18.7
D ESTANDARD					1.6	2.2
PETRA ROBLES RUIZ	2	25	100	70	11.40	13.0
MARGARITA MENDEZ	2	33	107	75	9.10	24.6
CARMEN LOPEZ A	2	29	110	70	12.0	10.5
ROSA FLORES BAEZ	2	32	114	70	12.80	12.5
ALEJANDRA GOMEZ ALCA	2	30	115	70	13.50	15.0

TABLA 4 RELACION ENTRE GRAVIDEZ Y NIVELES SE LPO

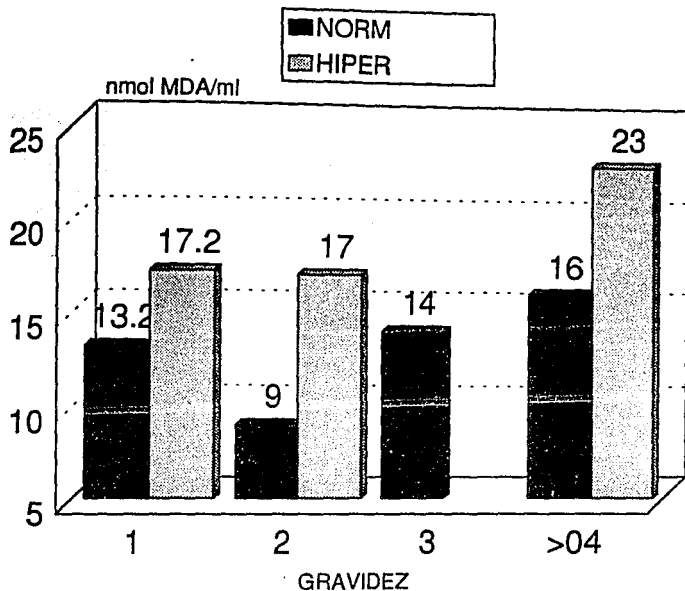
NOMBRE	GRAV	SDG	PAS	PAD	LPO s	LPO o
MA SALUD SALAZAR B	2	18	120	80	13.70	7.7
CLAUDIA PEREZ G	2	29	130	85	13.70	15.0
V MEDIO	NORMAL				9	12
D ESTANDARD					5.8	6.5
GUADALUPE PEREZ P	2	35	150	115	15.3	17.6
REINALDA SANCHEZ R	2	33	150	110	14.90	14.6
CARMEN TELLO ROJAS	2	35	160	110	18.40	20.0
EVA GARCIA ANDRADE	2	39			20.40	7.3
V MEDIO	HIPER				17	15
D ESTANDARD					2.3	4.8
ELVIRA ROJAS Z	3	28	110	60	13.00	12.4
ALEJANDRA SAUCEDO G	3	29	120	80	13.50	16.9
VICTORIA GALVEZ FLORES	3	36	120	80	13.80	16.7
ALICIA CAMIÑO PEREZ	3	36	120	80	13.40	10.6
ROCIO FLORES T	3	31	130	80	14.00	16.7
V MEDIO	NORMAL				14	15
D ESTANDARD					0.3	2.6
CONCEPCION MELGAREJO	12	6	90	60	15.50	16.1
MA GLAFIRA CHAVEZ	8	39	110	70	13.10	4.5
MA CARMEN ERREOLA	6	36	110	70	12.10	8.7
DOLORES RUIZ TAPIA	4	32	120	85	16.10	15.0
GUADALUPE GARCIA S	8	30	130	80	21.00	17.4
V MEDIO	NORMAL				16	12
D ESTANDARD					3.1	4.9

TABLA 4 RELACION ENTRE GRAVIDEZ Y NIVELES DE LPO

NPOMBRE	GRAV	SDG	PAS	PAD	LPO s	LPO o
ELBA ELIZARRAS ALONSO	4	28	140	100	16.40	14.9
ALEJANDRA CARDONA	6	35	140	90	25.90	14.7
MA CARMEN RODRIGEZ	6	40	160	100	19.20	17.6
ELVA ELIZARRAZA	4	37	200	140	29.70	19.4
V MEDIO	HIPER				23	17
D ESTANDARD					2.0	2.0

GRAVIDEZ vs NIVELES DE LPO.

Lipoperoxidación en plasma.



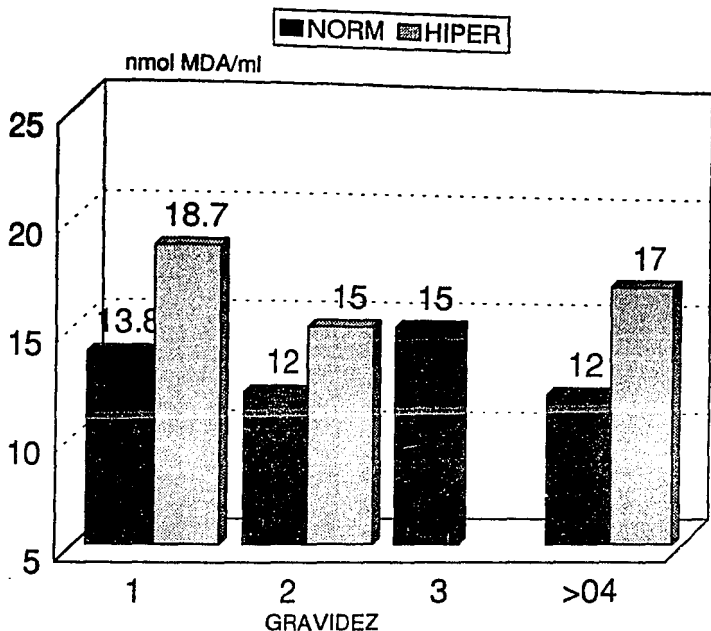
Gràfica 5 Gravidez vs. niveles de LPO (plasma).

Esta es una gràfica complementaria a la tabla 7,3 se muestra en forma gràfica los valores medios de los niveles de LPO en las mujeres embarazadas normotensas e hipertensas de acuerdo a su gravidez.

Los valores de gravidez que se asignaron fueron 1,2,3 y mayores o igual a 4. las unidades en que se midiò la LPO nanomoles de malondialdehido por mililitro de plasma. En el estudio no hubo mujeres embarazadas hipertensas cuyo valor de gravidez fuera 3.

GRAVIDEZ vs NIVELES DE LPO

Lipoperoxidación en orina



Gràfica 6 Gravidez vs. niveles de LPO (orina)

En esta gràfica se observan los valores de LPO en orina de mujeres hipertensas contra el de mujeres normotensas, aqui tambien estàn separados en grupos de acuerdo a la gravidez de las pacientes en el tercer trimestre de su embarazo, para lo cual se emplearon los valores, al igual que en la gràfica anterior de 1,2,3 y mayor o igual que 4. Las unidades en que se determinò la LPO son nanomoles de malondialdehido por mililitro de orina.

**TABLA 5 RELACION ENTRE SEMANAS DE GESTACION Y NIVELES DE LPO
VALORES MENORES O IGUALES A 20 SEMANAS DE GESTACION**

	NOMBRE	SDG	PAS	PAD	LPO s	LPO o
9	CONCEPCION MELGAREJO	6	90	60	15.50	16.1
4	MA SALUD SALAZAR	18	120	80	13.70	7.7
8	MA ANGELES MARTINEZ	20	108	60	19.50	19.3
	Normotensas					
	V MEDIO	14.7	106.0	66.7	16.2	14.4
	DESV STANDAR	6.2	12.3	9.4	2.4	4.9

VALORES ENTRE 21 Y 25 SEMANAS DE GESTACION

11	MA EUFRASIA EGUIA	23	100	60	7.30	15.7
21	PETRA ROBLES RUIZ	25	100	70	11.40	13.0
	Normotensas					
	V MEDIO	24.1	100.0	65.0	9.4	14.0
	DESV STANDARD	1.0	0.0	5.0	2.1	1.4

VALORES ENTRE 26 Y 30 SEMANAS DE GESTACION

20	CLAUDIA GOMEZ	28	110	75	12.10	13.5
35	ELVIRA ROJAS Z	28	110	60	13.00	12.4
19	CARMEN LOPEZ A	29	110	70	12.0	10.5
22	ALEJANDRA GOMEZ ALCALA	30	115	70	13.50	15.0
41	ALEJANDRA SAUCEDO G	29	120	80	13.50	16.9
8	MA ANGELES MARTINEZ	30	120	70	20.00	22.0
36	CLAUDIA PEREZ G	29	130	85	13.70	15.0
13	GUADALUPE GARCIA S	30	130	80	21.00	17.4
	Normotensas					
	V MEDIO	29.1	118.0	73.8	14.9	15.3
	DESV STANDARD	0.8	7.9	7.4	3.3	3.3
5	ELVA ELIZARRAS ALONSO	28	140	100	16.40	14.9
27	ALEJANDRA RUIZ TAPIA	29	160	100	18.70	19.5
	Hipertensas					
	V MEDIO	28.5	150.0	100.0	17.6	17.2
	DESV STANDARD	0.5	10.0	0.0	1.2	2.3

TABLA 5 RELACION ENTRE SEMANAS DE GESTACION Y NIVELES DE LPO

	NOMBRE	VALORES ENTRE 31 Y 35 SEMANAS DE GESTACION			LPO s	LPO o
		SDG	PAS	PAD		
18	MARTHA RUTH MEZA	35	100	60	13.40	16.1
3	MARGARITA MENDEZ	33	107	75	9.10	24.6
33	ALEJANDRA TAPIA F	32	110	70	12.40	12.40
32	GABRIELA ROJAS FLORES	33	110	70	13.00	13.00
2	CONCEPCION VALDIVIESA	34	110	70	8.60	8.60
24	ROSA FLORES VAEZ	32	114	70	12.80	12.80
30	DOLORES RUIZ TAPIA	32	120	85	16.10	16.10
26	ROSAURA TAPIA	33	120	80	14.10	14.10
42	ROSIO FLORES T	31	130	80	14.00	14.00
37	FERNANDA URIBREM	32	135	90	14.00	14.00
	Normotensas					
	VMEDIO	32.7	115.6	75.0	14.8	15.1
	DESV STANDARD	1.1	10.2	8.4	2.2	3.9
38	ANA MA LOPEZ	32	140	100	15.80	16.4
6	ALEJANDRA CARDONA	35	140	90	25.90	14.7
23	ROSAURA ESPINOZA E	32	145	100	16.0	18.0
29	PETRA GOMEZ T	31	150	100	17.60	16.0
34	LAURA ESPARZA G	33	150	109	16.7	19.7
39	REINALDA SANCHEZ R	33	150	110	14.90	14.6
26	ROSAURA TAPIA	35	150	95	16.60	18.6
40	GUADALUPE PEREZ P	35	150	115	15.3	17.6
31	CARMEN TELLO ROJAS	35	160	110	18.40	20.0
28	MA ISAURA RANGEL	31	180	120	20.40	23.4
	Hipertensas					
	V MEDIO	33.2	104.9	17.8	17.8	17.9
	DESV STANDARD	1.6	8.9	3.1	3.1	2.6

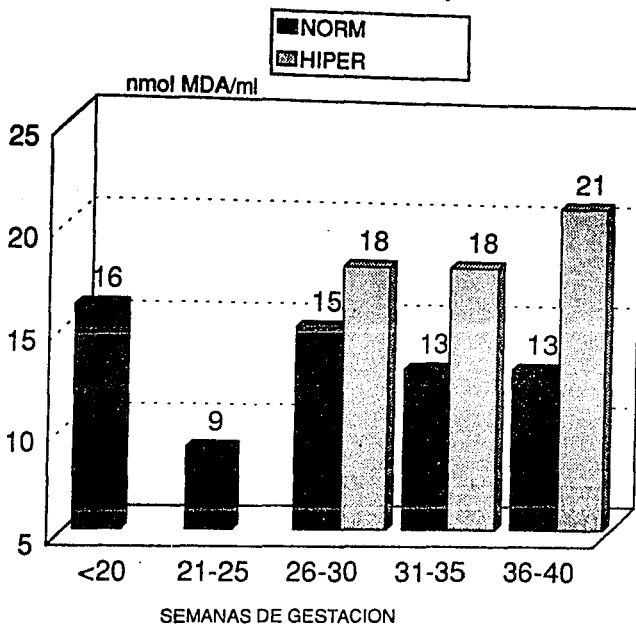
TABLA 5 RELACION ENTRE SEMANAS DE GESTACION Y NIVELES DE LPO

VALORES MAYORES O IGUALES A 36 SEMANAS DE GESTACION

	NOMBRE	SDG	PAS	PAD	LPO s	LPO o
1	MA CARMEN TOLEDO	46	102	54	10.07	9.3
16	MA CARMEN ARREOLA	36	110	70	12.10	8.7
15	MA GLAFIRA CHAVEZ	39	110	70	13.10	4.5
12	GRISELDA ZAMUDIO E	40	110	70	16.40	7.8
17	GRISELDA SEGOVIA E	40	110	70	11.10	9.3
25	VICTORIA GALVEZ FLORES	36	120	80	13.80	16.7
14	ALICIA CAMIÑO PEREZ	36	120	80	13.40	10.6
	Normotensas					
	V MEDIO	39.1	111.7	70.6	12.9	9.6
	DESV STANDARD	3.3	5.9	8.1	1.9	3.4
	LOURDES CHAVEZ B	38	140	100	15.40	17.9
	MA CARMEN RODRIGES	40	160	100	19.20	17.6
	ELVA ELIZARRAZA	37	200	140	29.70	19.4
	EVA GARCIA ANDRADE	39			20.40	7.3
	Hipertensas					
	V MEDIO	38.5	166.7	113.3	21.2	15.6
	DESV STANDARD	1.1	24.9	18.9	5.3	4.8

LPO EN DIFERENTES SEMANAS DE GESTACION

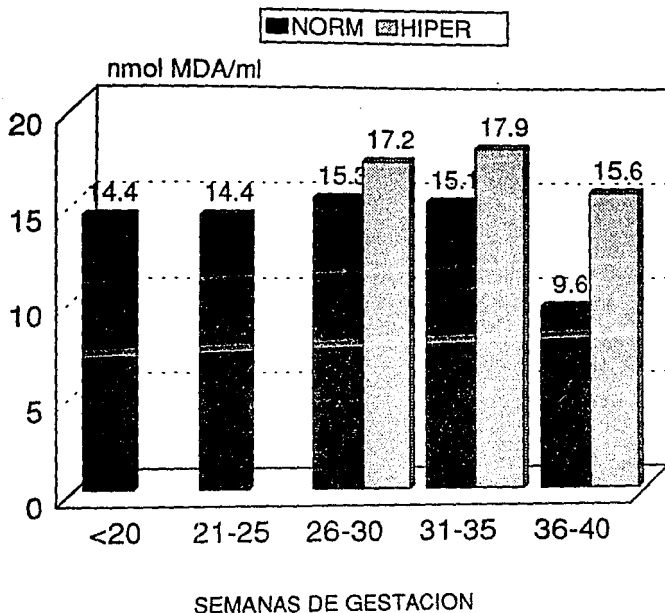
Lipoperoxidación en plasma



Gràfica 7 LPO en diferentes semanas de gestación (plasma). En esta gràfica se muestran los niveles de LPO en mujeres embarazadas en diferentes semanas de gestación, los intervalos empleados en la división fueron de 5 semanas y a su vez se dan los niveles de mujeres normotensas e hipertensas para cada intervalo. Las concentraciones de lipoperóxidos están dadas en nanomoles de malondialdehído por mililitro de plasma.

LPO EN DIFERENTES SEMANAS DE GESTACION

Lipoperoxidaciòn en orina.



Gràfica 8 LPO en diferentes semanas de gestaciòn (orina).

En esta gràfica se muestran los niveles de lipoperoxidaciòn expresados como nanomoles de malondialdehido por mililitro de orina en embarazadas, tanto normotensas como hipertensas de la poblaciòn de estudio pero esta separada en base a las semanas de gestaciòn.

ANALISIS.

De las 43 pacientes incluidas en el estudio, 16 tuvieron hipertensión inducida por el embarazo de acuerdo a los criterios establecidos (tabla 2), la presión arterial promedio global fue de 154 mm hg sistólica y 106 mm hg la diastólica entre ellas hubo niveles elevados de lipoperoxidación tanto sérica como urinaria (18.1 Vs 13.5 LPOs y 17.36 vs 13.45 LPOo):

La edad varió de 17 a 39 años, con mayores niveles en mujeres menores de 20 años, que puede unicamente ser reflejo de hipertensión inducida por el embarazo "pura" en estas mujeres ya que en mujeres de mayor edad pudiera ser por Hipertensión crónica con HIPE sobreagregada que pueden cambiar los resultados y que nosotros no podemos evaluar en este trabajo.

En cuanto a la edad de las pacientes hubo poca influencia porque consideramos que mas que en relación a la edad, se esta en relación directa al primer contacto con gestación y esto si es proporcional a la edad gestacional ya que conocemos como las manifestaciones de HIPE se presentan el sicamente en el último trimestre pero que tal vez desde inicios de la gestación ya se encuentren indicadores de alteración en la lipoperoxidación.

COMENTARIO FINAL.

En la hipertensión inducida por el embarazo existe daño endotelial que desencadena los eventos finales que conducen al signos clínico de hipertensión con toda su secuencia de eventos que la acompañan, la cuestión de siempre es saber que es lo que causa este daño endotelial. El suero de pacientes con HIPE tiene factores citotóxicos que son responsables directos de daño endotelial ahora en este estudio medidos por medio de la lipoperoxidación sérica y urinaria que muestran claramente que existen diferencias importantes entre las gestantes hipertensas y las normotensas. Este daño endotelial podría bien ser el paso previo al desequilibrio entre prostaglandinas y entonces estaríamos un paso antes de lo que se ha considerado hasta ahora como la

causa inicial del desequilibrio, sin embargo podemos retroceder aún mas y pensar si esto es el evento inicial o bien el evento inicial es la disparidad entre lipoperóxidos y antioxidantes que sería la gran cuestión a resolver, por el momento, estos hallazgos sugieren que observaciones clínicas previas de que el uso de ácido acetil salicílico mejora estos estados apoya aun mas la teoría de exceso de radicales libres en la circulación y en teoría apoyarían el uso de agentes antioxidantes como sería la vitamina E y C, cuestiones que tendrían necesariamente que modificar la presentación de HIPE en embarazos subsecuentes de estas pacientes si al proporcionar esta vitaminas se pudiera mejorar el efecto antioxidante de esta pacientes.

Por último consideramos necesario continuar este estudio en pacientes primigestas desde el inicio de la gestación a evolución normal para determinar si este método puede ser de utilidad para detectar pacientes que desarrollarán hipec.

Las conclusiones a las que llegamos en nuestro estudio son:

- 1.- Existe un incremento de los niveles séricos y urinarios de lipoperóxidos en HIPE.
- 2.- Este incremento en la lipoperoxidación refleja un desbalance entre radicales libres y agentes antioxidantes como evento inicial previo al del aumento de lipoperóxidos.
- 3.- No sabemos cual de estos dos, radicales libres o antioxidantes es el que se altera durante la gestación.

BIBLIOGRAFIA:

- 1.- Buege J.A.,D.A. Steven: Microsomal Lipid peroxidation. *Biochem Biophys* 30:302-309,1984.
- 2.- Casarett L.J.,D.KJOHN. Lipoperoxidation; mechanisms of liver injury. *Toxicology* 1:181-85,1975.
- 3.- Horton A.A.,F. Steven: Department of Biochemistry; University of Birmingham. Lipid peroxidation and mechanisms of toxicity. *Critical Reviews in Toxicology*, 18:27-79,1987.
- 4.- Hubel C.A., M.R. James, MD,N.T. Robert. Lipid peroxidation in pregnancy: New perspectives on preeclampsia. *Obstet & Gynec* 161:1025-34,1989.
- 5.- Williams A.P,Jack, C.M. Paul, Transtornos hipertensivos del embarazo. 1:539-1983.
- 7.- Niswander K.R.,C.H.Hans. Enfermedades hipertensivas del embarazo. *Manual de obstetricia* 1:277,1990.
- 8.- Stephen J. Wisdom MB,Rhoda Wilson. Antioxidants Systems in normal pregnancy and in pregnancy-induced hypertension. *Am J Obstet Gynecol* 165:1701-4,1991.
- 9.- Yupin Wang MD.,Helen H, Kay. Decreased levels of polyunsaturated fatty acids in preeclampsia. *Am J Obstet & ginecol*; 164:812-8,1991.
- 10.- Yuping Wang ,Scott W. Walsh. The imbalance between thromboxane and prostacilin in preeclampsia is associated with an imbalance between lipid peroxides and vitamin E in maternal blood. *Am J Obstet & Ginecol* ,16:7:946-9,1992.

- 11.- Yiping Wang . Placental lipid peroxides and tromboxane are increased and prostacyclin is decreased in women with preeclampsia . Am J Obstet & Ginecol. 167:946-9,1992.
- 12.- Jagadeesan V,Prema K. Plasma tocopherol and lipid levels in pregnancy and oral contraceptives users. Am J Obstet & Ginecol ;87:903-7,1980.
- 13.- Makila U-M,Viinikka L, Ylökorkala O. Increased thromboxane A2 production but normal prostacyclin by the placenta hypertensive pregnancies. Prostaglandins; 27:87-95,1984.
- 14.- Baha M.,Sabai,MD., The HELLp syndrome (hemolysis, elevated liver enzymes and low platelets): Much do about nothing?, Am J Obstet Gynecol;162:311-6,1990.
- 15.- Danforth D:N,Eduard J. Denis , Kay F McFarland, Lawrence L, Síndrome preeclampsia-eclampsia. Tratado de Ginecología y Obstetricia 4a. edición, Editorial Interamericana , capítulo 25 ,447-51,1986.
- 16.- Hipertensión en el embarazo y con anticonceptivos.
- 17.- Davey D.A. Hipertensive Disorders of Pregnancy.C.R. Whitfield Dwhts textbook of Obstetrics, 4a edition, editorial Interamericana. Capítulo 25 ,447-51,1986.
- 18.- Govind T,Vatassery. In vitro oxidation of alfa tocopherol (Vitamina E) in human platelets upon incubation with unsaturated fatty acids diamine and superoxide. Biochimica et Biophysica acta 926:160-69,1987.
- 19.- Goodlin P.C. Cotton D.B., and Haeslein H.C. Severe EPH Gestosis. Am J Obstet & Ginecol; 132:595,1978.

- 20.- W.A. Poyer and I.P. Lipoperoxidation. J Org Chem; 40:3615,1975.
- 21.- O.A. Bessey O. H. Locory M.N. Brock. Report of the Comision on enzymes mof the international union of Biochesmistry. Biol Chem;164 :231,1946.
- 22.- Chesley Le .Plasma and red cels volumes during pregnancy. Am J Obstet & Ginecol;1:112-3,440-50,1972.
- 23.- Easterling T. Preeclampsia: A Hyperdinamic Disease model; Am J Obstet Gynecol 19889;160:1447-

53

-APENDICE-

1.-Determinación de colesterol:

Prueba realizada por el método de Liebermann-Burchard:

Se coloca una batería de tubos de ensayo de 15* 100 mm marcados como problema, blanco y estándar. En los tubos de ensayo marcados como problema se depositan 100 mcrlts. de ácido acético glacial y al tubo marcado como estándar se le depositan 100 mcrlt del patrón para colesterol. Después a cada tubo se le agregan 5 ml de reactivo para colesterol (ácido sulfúrico anhídrido acético - ácido acético), se agitan y se colocan en incubación en baño de agua a 37 grados durante 10 minutos. El nivel del baño debe ser superior al de los reactivos en los tubos. Se sacan los tubos, se secan por fuera y posteriormente se leen a una longitud de onda de 625 nm. Finalmente se convierte la lectura a su concentración por cálculos: $(D.O. Problema / D.O. Estándar) * 200 = \text{mg de colesterol} / 100 \text{ ml}$.

2.- Determinación de proteínas totales: Fue determinada por el método de Biuret

Se prepara una batería de tubos de 15*100 mm los cuales se marcaron como blanco, patrón y problema. Al tubo marcado como problema se les adicionan 100 mcrlt de suero, al tubo marcado como blanco se le adicionan 100 mcrlt de agua destilada y al tubo marcado como patrón se le adicionan 100 mcrlt de reactivo de referencia para proteínas totales. A cada tubo se le agregan 5.0 ml. de reactivo de Biuret (tartrato de sodio y potasio 18 mmol/L; iodato de potasio 10 mmol/L; sulfato de cobre 12 mmol/L; hidróxido de sodio 200 mmol/L), mezclar y dejar en baño maría a 37 grados por 15 minutos, medir las extinciones del patrón y del problema contra el blanco a 545 nm. Por último convertir la lectura a su concentración por medio de cálculos: $(\text{Extinción del problema} / \text{Extinción del patrón}) * 4 = \text{proteínas totales en g \%}$.

b).- PRUEBAS DE QUIMICA ENZIMATICA:

Se determinan aquellas que sirven para determinar daño hepático.

1.- Determinación de fosfatasa alcalina:

La prueba se realizó por el método de Bessey, Lowry y Brock (21).

Se prepara una batería de tubos de ensayo de 16*150 mm, de tal manera en la que cada muestra sea marcada como problema y a su vez para cada problema habrá su blanco respectivo.

A los dos tubos, blanco y problema se le agrega 1.0 ml. de un sustrato amortiguador, formado por un amortiguador de glicina e hidróxido de sodio 50 mmol/L, a un pH de 10.5, cloruro de magnesio 0.5 mmol/L, y el sustrato de P-nitrofenilfosfato 5.5 mmol/L y se dejan 5 minutos en baño de agua a 37 grados centígrados. Después el tubo problema se le agregan 100 microlitros de suero, se mezcla perfectamente con el sustrato amortiguador y se deja exactamente 30 minutos en baño de agua a 37 grados centígrados. Al finalizar este tiempo, a los tubos problema y blanco se les agregan 10.0 ml. de hidróxido de sodio 0.2 N y después a los tubos marcados como blanco se les agregan 100 microlitros de suero respectivo. Se mezclan y se mide la extinción del problema contra la del blanco a una longitud de onda de 405 nm, la actividad por volumen a partir de la extinción se calcula de acuerdo a la siguiente fórmula: Extinción * 200 (mU/ml) U/L = Actividad por volumen.

2.- Cuantificación de la Aspartato Amino Transpeptidasa:

Para la cuantificación de esta enzima se utilizó la prueba ultravioleta optimada según las recomendaciones de la Sociedad Alemana para la química clínica.

El equipo contiene frascos con una mezcla de enzima y amortiguador (fosfatos 80 mmol/L a pH de 7.4, L-aspartato 200 nmol/L, alfa-cetoglutarato 12 mmol/L, NADH2 0.18 mmol/L), a cada frasco se le agregan 2.0 ml. de la solución de sustratos y a éste se le agregan 500 microlitros de suero. Se mezcla perfectamente y se pasa enseguida a la cubeta fotométrica, se mide la extinción a 25 grados centígrados al cabo de un minuto aproximadamente, y simultáneamente poner en marcha un reloj cronómetro. Se repiten las lecturas, de minuto en minuto, durante 3, 4, ó 5 minutos. Las lecturas se hacen a una longitud de onda de 340 nm, y

el espesor de la cubeta que sea de 1 cm. Para calcular la actividad por volumen de la enzima, primero se calcula el valor medio de las diferencias de extinción por minuto y se aplica la siguiente fórmula:

$$\text{actividad por volumen} = \text{Diferencia de extinción por minuto} \times 794 \text{ U/L.}$$

3.- Cuantificación de la alanin-amino-transferasa.

Esta se realizó mediante la prueba de ultravioleta optimada según las recomendaciones de la sociedad Alemana para la Química Clínica.

La forma en que se desarrolla la técnica es igual a la anterior; aquí, también la presentación del equipo trae tres frascos con la mezcla enzima-amortiguador (amortiguador de fosfatos 80 mmol/L a pH de 7.4; L-alanina 800 mmol/L; alfa-cetoglutarato 18 mmol/L; NADH2 0.18 mmol/L) a los cuales se les agregan 2.0 ml. de la solución de sustrato así como 500 microlitros de suero o plasma. Se agitan, se pasan inmediatamente a la cubeta de lectura y se hacen lecturas secuenciales cada minuto hasta los 3, 4, ó 5 minutos. Las lecturas se hacen a una longitud de onda de 340 nm en una cubeta de 1 cm. de espesor. Para calcular la actividad por volumen de enzima, primero se calcula el valor medio de las diferencias de extinción por minuto y se aplica la siguiente fórmula: Actividad por volumen = diferencia de extinción por minuto * 794 U/L

DENSIDAD, para esta prueba se utilizó un refractómetro de mano., la forma de hacer la lectura se realizó colocando una gota de orina sobre el plato lector y se le, la densidad de esta por observación directa a través del lente graduado del aparato.