



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
CUAUTITLAN

## "EFECTO DE LA BACTERIURIA SOBRE LA CONCENTRACION URINARIA DE AMP CICLICO"

### T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
QUIMICO FARMACEUTICO BILOGO  
P R E S E N T A :  
HECTOR ORLANDO URIBE EGUILUZ

ASESORES: DR. JUAN ALFREDO TAMAYO Y OROZCO  
Q.F.B. ROSA ISABEL SIERRA AMOR  
DR. ANDRES ROMERO ROJAS

TESIS CON FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN**  
**UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR**  
**DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES**

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

FACULTAD DE ESTUDIOS  
SUPERIORES CUAUTITLÁN



Departamento de  
Exámenes Profesionales

**DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO**  
**DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN**  
**PRESENTE**

ATN: Q. Ma. del Carmen García Mijares  
Jefe del Departamento de Exámenes  
Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS:

Efecto de la bacteriuria sobre la concentración urinaria de  
AMP cíclico.

que presenta el pasante: Héctor Orlando Uribe Eguiluz

con número de cuenta: 785566R-9 para obtener el título de:

Químico Farmacéutico Biólogo

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

**ATENTAMENTE**  
**"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"**

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 09 de Julio de 2002

PRESIDENTE	<u>M.V.Z. Gerardo Cruz Jiménez</u>	
VOCAL	<u>Q.F.I. Andrea Becerril Osnaya</u>	
SECRETARIO	<u>Dr. Andrés Romero Rojas</u>	
PRIMER SUPLENTE	<u>Q.F.B. Rene Damian Santos</u>	
SEGUNDO SUPLENTE	<u>Dra. Susana F. Mendoza Elvira</u>	

## Dedicatoria

A mis padres: Maria del Rosario y Esteban.

Por su enorme cariño, amor, paciencia y confianza. En reconocimiento a sus esfuerzos.

A mis tíos: Ana Maria, Socorro, Julia, Elsa, Raymundo y Víctor.

Siempre me ayudaron cuando más los necesité. Porque me brindaron su casa, amistad y cariño. Nunca me dejaron solo y me dieron la fuerza para seguir adelante.

A mis hermanos: Francisco, Emilio, Gerardo, Ma. del Rosario, Ma. Elizabeth, Fabiola †, Teresa †, Carlos Esteban y Mayra.

Para quienes les deseo lo mejor.

A mi esposa Irene.

Por mis momentos de ausencia. Por tú amor, tú enorme paciencia y tolerancia. Gracias por darme el apoyo en los momentos difíciles y compartir los momentos de alegría.

A mis hijos: Rogelio y Enrique.

Esperando que esto pueda motivarlos para que siempre luchen, se preparen y alcancen sus metas. Han sido y serán mi motivo de superación.

## Agradecimientos

A los profesores de la F.E.S. Cuautitlán.

Por darme la formación profesional.

A mi gran amigo y compadre Dr. Vladimir Vázquez Ambriz.

Por su enorme sentido de responsabilidad, respeto, animo, optimismo y apoyo incondicional.

A mis amigos y compañeros de trabajo: Jesús, Celestino y Ma. Luisa.

Gracias por su compañía, apoyo y comprensión.

Mi mas sinceros agradecimientos a todas aquellas personas que de alguna forma colaboraron en esta tesis y muy especialmente a:

Dr. Andrés Romero Rojas, Dr. Juan A. Tamayo y Orozco, Q.F.B. Rosa Isabel Sierra Amor, Dr. José Carlos Peña.

En reconocimiento a su elevado sentido de responsabilidad. Por el tiempo que le dedicaron a la revisión, orientación y realización del trabajo.

A mis sinodales. Por su tiempo y valiosas aportaciones.

## INDICE

	pagina
Lista de abreviaturas -----	I
Lista de figuras -----	III
Lista de tablas -----	IV
Resumen -----	1
Introducción -----	2

### CAPITULO I

#### Generalidades

1.1.- AMP cíclico ( AMPc ) -----	3
1.2.- AMPc como segundo mensajero hormonal -----	5
1.3.- Metabolismo y mecanismo de acción del AMPc -----	9
1.3.1.- Mecanismo de acción -----	14
1.4.- Fisiología del AMPc -----	17
1.5.- AMPc urinario como parámetro de la función paratiroidea -----	18
1.6.- PTH y la importancia clínica de la determinación del AMPcU --	23
1.6.1.- Glandulas paratiroides -----	23
1.6.2.- Síntesis y metabolismo de la PTH -----	24
1.6.3.- Trastornos de las Glándulas Paratiroides -----	27
1.6.3.1.- Hiperparatiroidismo primario -----	27
1.6.3.2.- Hiperparatiroidismo secundario -----	29
1.6.3.3.- Hipoparatiroidismo -----	31
1.6.3.4.- Pseudohipoparatiroidismo -----	33
1.7.- Radioinmunoanálisis del AMPc Urinario -----	34
1.8.- Justificación -----	39

## CAPITULO II

### Objetivos

2.1.- Objetivo general -----	41
2.2.- Objetivos específicos -----	41

## CAPITULO III

### Material y Métodos

3.1.- Diseño experimental -----	42
3.2.- Procedimientos para la obtención de las muestras -----	43
3.2.1.- Recolección de las muestras de orina de 24 horas -----	43
3.2.2.- Recolección de la orina para el urocultivo -----	44
3.2.3.- Recolección de la orina de dos horas y, a su vez, la muestra para el urocultivo del grupo Control -----	44
3.2.4.- Preparación de las muestras de orina -----	45
3.2.5.- Obtención de la muestra de suero -----	47
3.3.- Métodos para la cuantificación de Calcio, Fósforo, Creatinina y AMPc -----	49
3.3.1.- Método para la cuantificación de Calcio -----	49
3.3.1.1.- Técnica para la cuantificación de Calcio urinario ----	50
3.3.1.2.- Técnica para la Cuantificación de Calcio Sérico -----	52
3.3.2.- Método para la cuantificación de Fósforo -----	54
3.3.2.1.- Preparación de la mezcla de reactivos -----	54
3.3.2.2.- Preparación de las muestras de suero, orina y curva estándar -----	55
3.3.2.3.- Desarrollo de la técnica para la determinación de Fósforo -----	56
3.3.3.- Método para la cuantificación de creatinina -----	57
3.3.3.1.- Técnica para la cuantificación de creatinina en orina --	58
3.3.3.2.- Técnica para la cuantificación de creatinina en suero --	58



3.3.4.- Método para la cuantificación de AMPc urinario -----	59
3.3.4.1.- Técnica para el RIA de AMPc urinario -----	60
3.3.5.- Método para el urocultivo -----	65
3.4.- Análisis Estadístico -----	67

## CAPITULO IV

### Resultados

4.1.- Grupo Control -----	68
4.2.- Pacientes con sospechas de infección de las vías urinarias -----	71

## CAPITULO V

### Discusión

5.1.- Resultados de los urocultivos -----	77
5.2.- Resultados del grupo control -----	78
5.3.- Resultados del grupo de pacientes con sospecha de infección urinaria -----	79

## CAPITULO VI

### Conclusiones

6.1.- Conclusiones -----	84
--------------------------	----

## CAPITULO VII

### Apéndice

7.1.- Equipos y materiales de laboratorio -----	85
7.1.1.- Equipos de laboratorio -----	85

7.1.2.- Materiales de laboratorio -----	86
7.1.3.- Reactivos -----	87
7.1.4.- Medios de cultivo -----	88
7.2.- Tabla 6 -----	89

## Bibliografía

Bibliografía -----	90
--------------------	----

## Lista de abreviaturas

A.A.	Absorción Atómica
a.á.	Aminoácido
AC	Enzima Adenil Ciclasa
Ac	Anticuerpo
Ag	Antígeno
AMPc	3'5'-Adenosín Monofosfato cíclico
5'AMPc	5' Adenosín Monofosfato cíclico
AMPcP	AMPc Plasmático
AMPcN	AMPc Nefrogenico
ATP	Adenosín trifosfato
Co	Unión inespecífica del derivado radiactivo
cpm	Cuentas por minuto
Cr	Creatinina
DS	Desviación Estándar
EDTA	Ácido etiléndiamino tetraacético
GTP	Guanosin trifosfato
GTPasa	Enzima GTPasa
HCL	Ácido Clorhídrico
HPT 1°	Hipoparatiroidismo primario
HPT 2°	Hipoparatiroidismo secundario
IRA	Insuficiencia Renal Aguda
KD	Kilo Daltons
La	Lantano
NEM	Neoplasia Endocrina Múltiple
nmol	Nanomoles

25(OH)D <sub>3</sub>	25-Hidroxi calcitriol
1,25(OH)D <sub>3</sub>	1,25-Dihidroxi calciferol,
PDE	Enzima Fosfodiesterasa
pmol	Picomoles
PK	Enzima Proteína Cinasa
PTH	Hormona Paratiroidea
RIA	Radioinmunoanálisis
TME-sAMPc	Tirosin metil ester del 2'O monosuccinil AMPc
Tc	Cuentas totales del derivado radiactivo
To	Porcentaje de unión máxima
UFC	Unidades Formadoras de Colonias

## Lista de figuras

		pagina
Figura 1	Estructura del AMPc	4
Figura 2	Mecanismo de transducción	11
Figura 3	Degradación del AMPc	13
Figura 4	Mecanismo de acción del AMPc	16
Figura 5	Fisiología del AMPc	19
Figura 6	Diagrama de flujo para la recolección de orina	46
Figura 7	Diagrama de flujo para la preparación de las muestras de orina	48
Figura 8	Resultados de AMPcU del subgrupo A	74
Figura 9	Resultados de AMPcU del subgrupo B	75
Figura 10	Resultados de AMPcU del subgrupo C	75
Figura 11	Comparación de AMPcU del grupo control, subgrupo C y muestras con <i>E. coli</i>	76

## Lista de Tablas

	pagina	
Tabla 1	Resultados del laboratorio en los estados patológicos de las glándulas paratiroides	35
Tabla 2	Protocolo para el RIA del AMPc	63
Tabla 3	Resultados de Calcio, Fósforo, Creatinina, AMPcU del grupo control	69
Tabla 4	Resultados de Calcio, Fósforo y Creatinina de los subgrupos A, B, C.	73
Tabla 5	Resultados de AMPcU de los subgrupos A, B y C	74
Tabla 6	Valores de referencia para Calcio, Fósforo y Creatinina	89

## Resumen

La cuantificación del AMPc urinario (AMPcU), por medio del radioinmunoanálisis (RIA), se utiliza con éxito en el diagnóstico y tratamiento de las enfermedades paratiroideas. Las bacterias presentes en las muestras de orina producen AMPc así como también enzimas que lo degradan (12,13,38).

Para poder determinar si las bacterias modifican significativamente el AMPcU, se estudiaron dos grupos de pacientes:

- A.- Un grupo control de 22 pacientes, formado por 10 mujeres y 12 hombres
- B.- Un grupo de 24 pacientes con sospechas de infección las vías urinarias, 15 fueron mujeres y 9 hombres.

En ambos grupos se recolectó orina de 24 horas y se les practicó un urocultivo en orina recién emitida. De la orina de 24 horas del grupo "B" se tomaron dos alícuotas. a una se le agregó 0.10 ml de ácido clorhídrico y la otra se dejó como tal. A todas las muestras se les determinó AMPcU, Calcio, Fósforo y Creatinina.

En el grupo A se obtuvo un AMPcU promedio de  $2.95 \pm 0.88$  nmol/mg Cr..

En el grupo B se obtuvo un AMPcU promedio  $3.69 \pm 1.26$  nmol/mgCr.

En las muestras de orina no tratadas con HCl y con una cuenta bacteriana igual o mayor a 100,000 UFC, se observa una alteración significativa en la concentración de AMPcU. Por lo tanto, para obtener resultados fidedignos de AMPcU, el paciente deberá presentar un urocultivo negativo previo a la cuantificación del nucleótido, y la muestra de orina se recolectará en un recipiente que contenga HCl 6N.

## INTRODUCCIÓN

La cuantificación de la hormona paratiroidea (PTH) por medio del radioinmunoanálisis (RIA) representa un gran avance metodológico aplicado en el laboratorio de análisis clínicos para el diagnóstico y tratamiento de los desordenes paratiroideos. Este método está limitado principalmente por las dificultades biológicas que enfrenta la PTH.

Una solución a estas dificultades, fue el desarrollo de la cuantificación del AMPc urinario (AMPcU). Este metabolito refleja fielmente la acción de la PTH, biológicamente activa, sobre el riñón, proporcionando un excelente índice de la función paratiroidea (18, 31). La capacidad de los microorganismos para producir AMPc y la enzima (fosfodiesterasa) que lo degrada (12,13) ponen en duda la exactitud de la determinación de AMPcU.

En la literatura no se ha reportado, en forma precisa, la influencia presentada por las bacterias sobre la concentración del AMPcU. Por tal motivo, el interés del trabajo es investigar si las bacterias en las vías urinarias modifican en forma significativa los niveles de AMPcU.

Para comprender mejor el trabajo, se mencionará en el siguiente capítulo: qué es el AMPc, su función en el mecanismo de acción hormonal, la relación que guarda con la PTH y glándulas paratiroideas, los criterios que fundamentan el uso del AMPcU como una prueba diagnóstica y una breve explicación del RIA para AMPc.



# CAPITULO I

## GENERALIDADES

### 1.1. - AMP-cíclico

El 3'-5' monofosfato cíclico de adenosina, mejor conocido como AMP-cíclico (AMPc), es una molécula relativamente pequeña que desempeña un papel muy importante al regular la velocidad de las reacciones enzimáticas de los organismos vivos.

Aunque escaso en cantidad, el AMPc está presente en todas las células de la especie animal que se han estudiado, comprendiendo desde los organismos unicelulares como las bacterias hasta los organismos pluricelulares como los mamíferos (1,2,3).

Este nucleótido tiene un peso molecular de 239 g/mol y está compuesto por una molécula de adenina unida a una molécula de ribosa, la cual a su vez, está unida a un grupo fosfato. Se le llama AMP cíclico (AMPc) porque el grupo fosfato forma un anillo con los átomos de carbono C3 y C5 de la ribosa (1,2). La estructura del AMPc se muestra en la Figura 1.

El AMPc es una molécula hidrofílica, resistente a la temperatura de ebullición y las soluciones ácidas, por lo cual es muy estable en soluciones inorgánicas, pero es

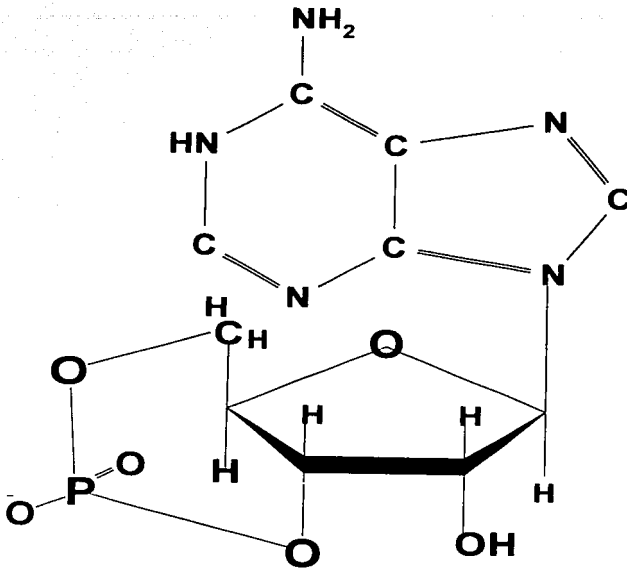


Figura 1: Estructura del AMPc. La molécula del AMPc consta de cristales en forma de platillos, termoestables, resistentes a la acción de los ácidos y álcali.

Tiene un peso molecular de 239.22 g/mol., un punto de fusión de 219–222 °C y presenta la siguiente fórmula condensada: C<sub>10</sub>H<sub>12</sub>N<sub>5</sub>O<sub>6</sub>P.

muy lábil en soluciones o fluidos biológicos debido a la presencia de las enzimas del grupo de las fosfodiesterasas (PDE) que degradan a este nucleótido (1,2,3).

Las primeras investigaciones para identificar al AMPc en los sistemas celulares, fueron efectuadas en 1958 en la Universidad de Washington por el Dr. Earl W. Sutherland y sus colaboradores al estudiar el mecanismo de acción hormonal por medio del cual la epinefrina estimula la glucogenólisis en las células hepáticas (1,2).

Este descubrimiento y las investigaciones posteriores sobre este nucleótido, hicieron merecedor al Dr. Earl W. Sutherland al premio Nobel de Medicina y Fisiología del año de 1971.

El AMPc desempeña múltiples funciones en el metabolismo celular, pero para el trabajo solo nos interesa la función que desempeña como segundo mensajero en los mecanismos de acción hormonal, la relación que guarda con la hormona paratiroidea (PTH) y el uso de la cuantificación de este nucleótido como prueba diagnóstica de los desórdenes paratiroideos.

## 1.2.- AMPc Como Segundo Mensajero Hormonal

Los trabajos del Dr. Sutherland no tan solo llevaron al descubrimiento del AMPc, también marcaron el camino para descubrir los mecanismos de acción hormonal que hoy en día se conocen, los cuales forman parte del sistema de comunicación celular.

La primera teoría postulada por el Dr. Sutherland para explicar el mecanismo de acción hormonal, en donde el AMPc participa como segundo mensajero, dice:

“La hormona es el primer mensajero que viaja desde su célula de origen hacia su célula blanco para modificar la concentración intracelular del segundo mensajero”.

Aquí termina el papel del primer mensajero, el segundo mensajero procederá a estimular los cambios metabólicos intracelulares característicos en la respuesta al estímulo hormonal :

En la actualidad se sabe que la mayoría de las hormonas no penetra a la célula, el factor crucial para desencadenar el efecto hormonal es la interacción de la hormona con el receptor de su célula blanco.

Después de ser activado el receptor, los siguientes pasos ocurren dentro de la célula. Para fines prácticos, este proceso se ha dividido en dos etapas que son:

1. - La producción y generación de un segundo mensajero (transducción).
2. - La propagación intracelular de la señal hormonal.

Se le llama transducción al proceso que se lleva a cabo desde el momento de la activación del receptor hasta la formación del segundo mensajero. También se puede definir como la transformación de señal externa a interna, o lo que es lo mismo, de primer a segundo mensajero.

El proceso de transducción se va a efectuar en la membrana celular, lugar en donde se alojan los mecanismos para traducir las señales externas en internas, en conjunto con los segundos mensajeros se difunda la información y la señal se propague rápidamente por toda la célula.

Hoy en día se sabe, el número de segundos mensajeros es muy pequeño y solo se conocen principalmente dos rutas de transmisión interna, siendo la más conocida la que emplea al AMPc (4,5).

Se ha llegado a determinar, bajo la acción hormonal, se incrementan los niveles intracelulares del AMPc, pero también se ha observado la existencia de hormonas que producen una disminución del nucleótido. Sobre la base de estos conocimientos se han tomado los siguientes criterios para considerar que una hormona emplea el AMPc como segundo mensajero :

- En condiciones *in-vivo*, la estimulación hormonal produce cambios medibles en la concentración de AMPc.
- Los cambios en la concentración de este nucleótido preceden a un aumento en la función característica del órgano blanco en respuesta al estímulo hormonal determinado.
- La estimulación hormonal puede potencializarse al administrar al mismo tiempo la hormona y el inhibidor de la fosfodiesterasa (enzima que degrada al AMPc).

- En condiciones *in-vitro*, la adición de AMPc a un cultivo celular origina una respuesta semejante a la que se produce por la estimulación hormonal.

Es importante hacer notar la existencia de una cierta formación basal intracelular de AMPc independiente de la estimulación hormonal, que ocurre en todos los sistemas celulares, por lo que la concentración intracelular del AMPc no depende en su totalidad de la estimulación hormonal.

La versatilidad del AMPc de actuar como segundo mensajero en muchos sistemas celulares, sin traslapar la acción de un sistema celular con otro, se logra gracias a que cada tipo celular tiene en su interior un juego distinto de enzimas sensibles para ser activadas por el aumento en la concentración intracelular del AMPc.

Los sistemas celulares que emplean AMPc se caracterizan por su catabolismo basal, esto causa una pérdida neta de energía en la célula blanco. También se caracterizan porque la célula blanco se activa muy rápidamente, por lo que estos sistemas hormonales determinan segundo a segundo la regulación del metabolismo celular (3,5).

### 1.3.- Metabolismo y Mecanismo de Acción del AMPc

La producción del AMPc en la célula blanco se va a iniciar cuando la hormona apropiada interactúa con su receptor específico para poder activar a la enzima adenilato ciclasa (AC), esta enzima estimula la conversión del ATP a AMPc dejando en libertad fósforo inorgánico en una reacción dependiente de magnesio ( $Mg^{2+}$ ). Tanto el receptor celular como la enzima AC se encuentran presentes en la membrana plasmática, el receptor se localiza en la cara externa de la membrana y la AC se encuentra en la cara interna. Normalmente la transformación de ATP a AMPc es muy baja, pero debido a la estimulación hormonal esta transformación se ve incrementada (4,6).

M. Rodbell en el año de 1971 demostró que no solo se requiere del receptor y de la hormona para activar a la AC, sino que participa un tercer elemento que acopla al receptor con la AC, este elemento es de naturaleza proteica y se encuentra localizado en la membrana celular. A esta proteína acopladora se la llamó proteína "G" o proteína "N", por requerir para su funcionamiento un nucleótido de guanina, el GTP.

Se ha demostrado la existencia de dos tipos de proteínas G, una que actúa en forma activadora, llamada "Gs", y otra que lo hace en forma inhibitoria, llamada "Gi". Cada tipo de proteína G se acoplará a un receptor específico, al  $R_s$  y al  $R_i$ , de aquí la existencia de hormonas las cuales activan y otras inhiben a la AC. Se ha

descubierto que los receptores hormonales  $R_s$  son del tipo  $\beta$  adrenérgicos y los receptores  $R_i$  son del tipo  $\alpha$  adrenérgicos (8,9,10).

La secuencia del mecanismo de acción de las proteínas G lo ha descrito con detalle Alfred G. Gilman, y dice:

El receptor  $R_s$ , una vez activado por la acción de una señal externa, cambia conformacionalmente, este cambio se trasmite hasta Gs ocasionando que el GTP se una a la proteína Gs. Esta nueva conformación de Gs permite activar a la AC, e iniciar la síntesis de AMPc.

La unión de GTP con Gs constituye la reacción de apertura del proceso de la transducción. La actividad del complejo Gs-GTP termina con la hidrólisis del GTP, por medio de la enzima GTPasa, esto constituye la reacción de cierre.

Una explicación esquemática del mecanismo de transducción lo podemos ver en la Figura 2.

En el caso de la hormona paratiroidea (PTH), activa a los receptores  $R_s$  y en consecuencia causa un cambio conformacional en la proteína Gs para activar a la enzima AC y se obtenga la producción de AMPc.

Debido a que el AMPc es un potente regulador intracelular de la actividad enzimática, la célula cuenta principalmente con dos sistemas que controlan la concentración intracelular del AMPc. Uno de ellos regula la velocidad de síntesis por medio de la acción de las enzimas del grupo de las fosfodiesterasas (PDE),



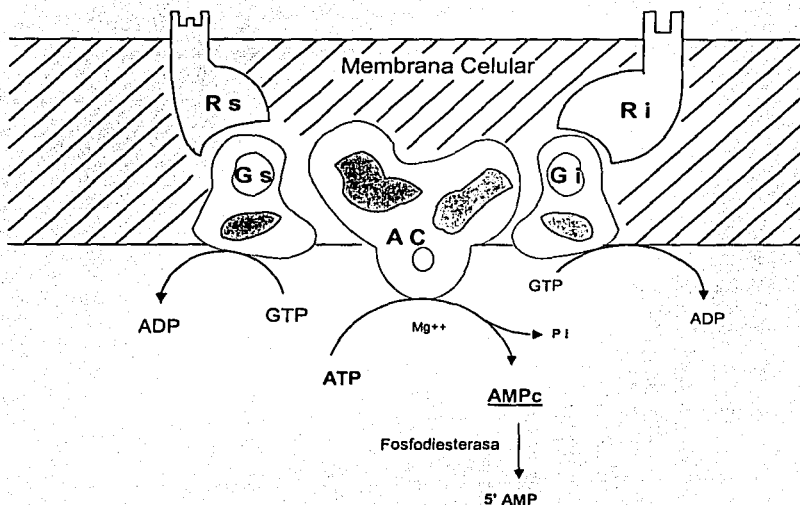


Figura 2.- Proceso de transducción para el AMPc.

En el esquema se puede observar el proceso de transducción, el cual se inicia cuando el receptor Rs es activado por la acción hormonal, este a su vez activa a la proteína Gs, esta proteína es la responsable de activar a la AC e iniciar la síntesis de AMPc. El proceso termina cuando el complejo GTP-Gs es hidrolizado.

degradando al AMPc en un intermediario inactivo, el 5'AMP. Hay dos tipos PDE en el interior de la célula, la PDE I y la PDE II, la primera se encuentra distribuida en todo el citoplasma y la segunda se encuentra unida a la membrana celular. La cantidad de la PDE no es constante, aparentemente la cantidad de la enzima se ve incrementada cada vez que la concentración intracelular del AMPc aumenta (1,5).

El otro mecanismo que opera en adición a la degradación enzimática es la difusión a través de la membrana celular, permitiendo un mejor control de la concentración intracelular del AMPc. Por el tamaño molecular del AMPc y por sus propiedades físicas, no se puede aceptar que este nucleótido se difunda libremente por la membrana celular, la teoría más aceptada para explicar que el AMPc pasa a través de la membrana es por medio de la utilización de un transporte activo (1,11).

La degradación enzimática del AMPc por la acción de la PDE resulta de la ruptura del enlace fosfodiéster que une al fosfato con el carbono 3' de la ribosa en una reacción dependiente de iones magnesio ( $Mg^{2+}$ ), esta acción enzimática puede ser inhibida por agentes quelantes, como el EDTA, secuestradores de magnesio. En la Figura 3 se presenta la degradación enzimática del AMPc.

Las fosfodiesterasas (PDE's) se pueden encontrar en la mayoría de los tejidos, líquidos corporales y en las bacterias. Para poder cuantificar el AMPc en estos productos biológicos, es esencial inhibir la acción de estas enzimas. Afortunadamente, las PDE no son muy resistentes y se pueden destruir con facilidad, se desnaturalizan en soluciones con pH bajos (soluciones ácidas), no

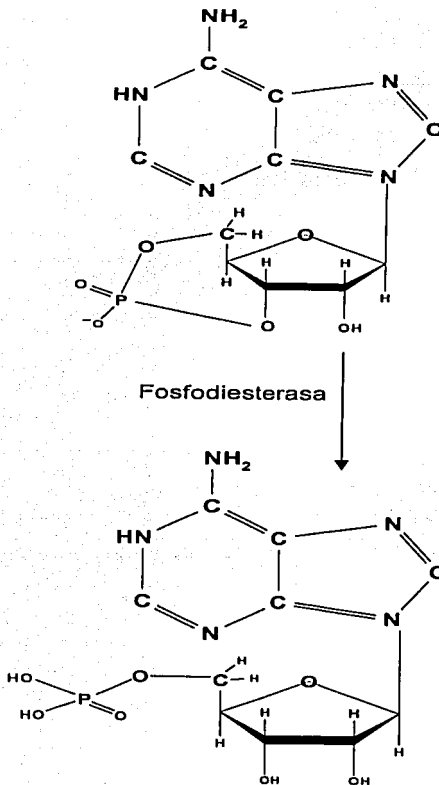


Figura 3: - Degradación enzimática del AMPc

En el esquema se puede observar la ruptura del enlace fosfodiéster entre el oxígeno del fósforo y el carbono 3' de la ribosa.

resisten los cambios bruscos de temperatura, ni temperaturas extremas como la temperatura de congelación y de ebullición (12,13).

Hay muchas sustancias que inhiben y estimulan a las PDE's, de las sustancias inhibidoras más potentes se encuentran los derivados de las metilxantinas, en este grupo de sustancias se puede mencionar a la teofilina, cafeína y la isobutil-metilxantina. De las sustancias que estimulan la actividad de las PDE's se tienen a las catecolaminas y a los derivados del imidazol.

El estudio del grupo de las enzimas de las PDE's ha llamado mucho la atención, se han descubierto 9 grandes familias de isoenzimas de la PDE y se ha mostrado mucho interés en las distintas áreas de la medicina por el descubrimiento de inhibidores sintéticos específicos para cada una de las isoenzimas, esta especificidad ha dado las herramientas necesarias para su aplicación en la farmacoterapia (15,17).

### 1.3.1.- Mecanismo de Acción

El AMPc generado intracelularmente por la estimulación hormonal, es reconocido en el citoplasma con una extraordinaria afinidad y especificidad por la enzima Proteína Cinasa (PK). La interacción de la PK con el AMPc ocasiona la propagación de la señal en forma de cascada de amplificación (5).

La PK presenta dos subunidades, una subunidad reguladora llamada "R" que presenta una alta afinidad por el AMPc, y una subunidad catalítica llamada "C". La

subunidad R mantiene inhibida a la enzima y la subunidad C presenta la actividad de proteína cinasa propiamente dicha.

Cuando la concentración intracelular del AMPc aumenta, este se une a la subunidad R e induce la separación de las dos subunidades, quedando libre la subunidad C con la propiedad de poder fosforilar a algunas proteínas. Las proteínas al ser fosforiladas modifican su actividad, la aumentan o la disminuyen, algunas de estas proteínas son a su vez PK que al ser fosforiladas van a activar a otras PK y así sucesivamente se sigue desencadenando esta cascada de fosforilaciones, llevando a la amplificación de la señal en el interior de la célula, y en consecuencia, la respuesta celular.

El descubrimiento de como actúa el AMPc, dio lugar a postular la teoría del mecanismo de acción del AMPc que dice:

El AMPc es un activador de la enzima proteína cinasa, confiriéndole a esta enzima un aumento en la eficiencia para transferir un grupo fosfato del ATP a otras proteínas. La proteína resultante puede alterar sus funciones biológicas cuando existe en forma fosforilada. Una representación grafica del mecanismo de acción del AMPc se presente en la Figura 4.

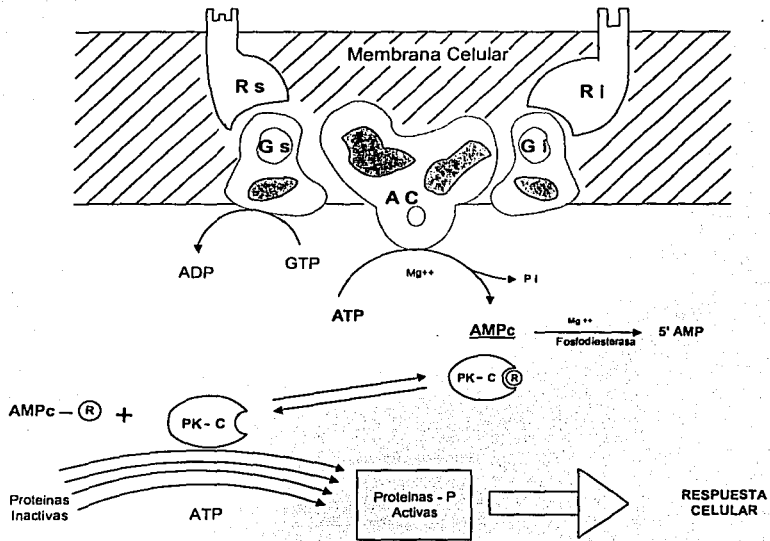


Figura 4.- Mecanismo de acción del AMPc

El AMPc es un activador de la proteína cinasa (PK). La PK activada puede fosforilar a otras proteínas, estas proteínas fosforiladas son a su vez PK, lo que desencadena la amplificación de la señal y en consecuencia la respuesta celular.

## 1.4.- Fisiología del AMPc

El AMPc producido por estimulación hormonal sigue dos caminos: uno de ellos es ser degradado a 5'-AMP por la enzima fosfodiesterasa (FDE). Y el otro es la expulsión del nucleótido al líquido extracelular para posteriormente pase a la circulación sanguínea.

La cantidad de AMPc presente en el plasma se debe a una pequeña pero constante liberación del nucleótido de virtualmente todos los sistemas celulares del organismo, y no hay un solo tejido en particular que predomine en la producción plasmática del AMPc. Como ya se había mencionado, además de la producción hormonal, siempre hay una cierta formación basal de AMPc, por lo que la síntesis del AMPc no está mediada en su totalidad por la estimulación hormonal.

En el año de 1977, Arthur E. Broadus determinó que la concentración plasmática del AMPc, en sujetos sanos y bajo condiciones basales, se mantiene constante gracias al proceso degradativo efectuado por la enzima FDE y a la velocidad con la que el riñón depura a este nucleótido del plasma .

Este mismo investigador demostró que el AMPc es depurado del organismo por un simple proceso de filtración glomerular y el riñón también da una aportación del nucleótido, el cual es añadido directamente a la orina sin pasar a la circulación sanguínea. A este AMPc producido en el riñón se le llama AMPc-Nefrógeno (AMPcN).

En la actualidad se sabe que la concentración total urinaria del AMPc es la suma del AMPc depurado del plasma y el AMPc producido por el riñón. En promedio, cada componente cuenta con aproximadamente el 50% de la cantidad total excretada del nucleótido en un individuo sano. En la Figura 5 se representa esquemáticamente la fisiología del AMPc.

La aportación renal del AMPcN es ocasionada por la acción ejercida por la hormona paratiroidea (PTH) sobre los túbulos renales. El principal efecto de la PTH en el riñon, es aumentar la reabsorción de calcio y provocar la salida de fósforo a la orina (fosfaturia). Se ha estudiado la existencia de otras hormonas que actuan en el riñon, como la hormona antidiuretica y la calcitonina, pero su contribución de AMPcN es insignificante frente a la producción que ejerce la PTH (19,21,23).

### 1.5.- AMPc Urinario como parámetro de la función paratiroidea

El desarrollo del radioinmunoanálisis para la PTH en los años 60's dio una metodología de avance en el estudio de la fisiología y patofisiología de la función paratiroidea. No obstante, un número de dificultades técnicas y biológicas, en las que se incluyen la naturaleza del ensayo y la heterogeneidad de las formas circulantes de la PTH, restringen su disponibilidad y aplicabilidad como una prueba rutinaria de laboratorio para el estudio y diagnóstico de la función paratiroidea.



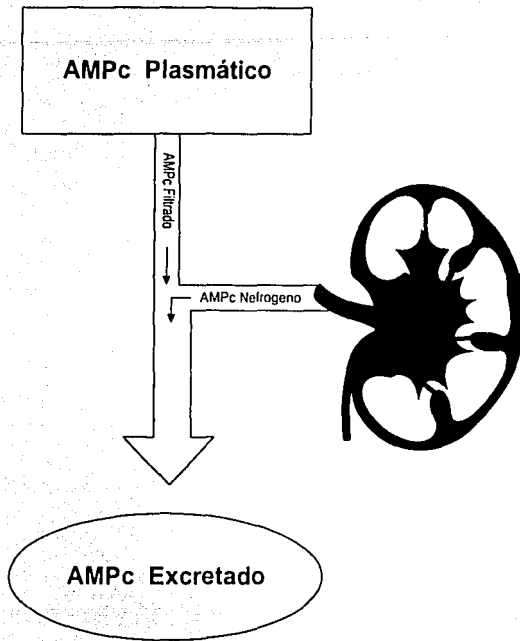


Figura 5.- Fisiología del AMPc. El AMPc presente en la orina proviene de dos fuentes:

- a. El depurado del plasma, por un simple proceso de filtración glomerular.
- b. El producido por el riñón, el cual no pasa a la circulación sanguínea, a este AMPc se le llama AMPc nefrogeno (AMPcN).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Por este mismo periodo de tiempo, Chase y Aurbach (22,23), entre otros investigadores, demostraron que la acción de la PTH es mediada por AMPc y el efecto de esta hormona en la corteza renal se asocia con un aumento en la excreción urinaria de este nucleótido. Estos y otros descubrimientos motivaron para investigar si la cuantificación del AMPc urinario (AMPcU) pueda usarse como prueba diagnóstica de la función paratiroidea.

De los experimentos que respaldan la cuantificación del AMPcU como prueba de funcionamiento paratiroideo, se puede mencionar lo siguiente:

Como se menciono anteriormente, el AMPc presente en la orina proviene de dos fuentes; el depurado del plasma (AMPcP) y el producido por el riñón, también llamado AMPc nefrógeno (AMPcN), este ultimo refleja exclusivamente el efecto de la PTH sobre el riñón.

La PTH es una hormona que tiene como principal órgano blanco al riñón, también se sabe la existencia de hormonas, como la calcitonina y la hormona antidiurética, que actúan en este mismo órgano, su contribución en la producción de AMPcN son muy pequeñas o casi insignificantes frente a la acción ejercida por la PTH.

Para demostrar el aumento en la concentración del AMPcU se debía a una mayor producción del nucleótido por el riñón y no a un aumento en el AMPc proveniente del plasma, Kaminsky, Broadus y colaboradores (19,24) determinaron

la filtración glomerular de la inulina y del AMPc simultáneamente durante la infusión de PTH en sujetos sanos. Los resultados obtenidos al calcular la filtración glomerular de ambas sustancias, establecen cerca del 94% del AMPc excretado era de origen renal. Dadas las dosis tan altas de PTH empleadas en este experimento, los resultados muestran un ligero incremento en la concentración del AMPc del plasma (AMPcP).

Para comprobar la producción del AMPc presente en la orina y en el plasma se debía a la acción de la PTH sobre el riñón, infundieron esta misma hormona pero ahora en pacientes anéfricos, el resultado fue una ausencia de AMPc en el plasma. Estos experimentos demuestran que la mejor contribución del AMPc por efecto de la PTH es el riñón, siendo los túbulos proximales de la corteza renal en donde actúa esta hormona (22,23).

Para establecer que tan fielmente el AMPcU refleja el funcionamiento de las glándulas paratiroides, Kaminsky y colaboradores (24), estudiaron la variación en la concentración del nucleótido durante la estimulación e inhibición de las glándulas paratiroides.

Para llevar a cabo este procedimiento, se parte del conocimiento de que la concentración del ión calcio en la sangre es el principal factor determinante en la síntesis y secreción de la PTH. Cuando la concentración sanguínea de calcio disminuye, se estimula la secreción de PTH, y por el contrario, cuando el calcio sanguíneo aumenta, la secreción de la PTH disminuye.

Para estimular la hipocalcemia y en consecuencia la síntesis y secreción de la PTH, Kaminsky administró una infusión de EDTA (agente quelante del calcio) en sujetos sanos y encontró que efectivamente la concentración del AMPcU se incrementó hasta en un 240 %, resultados comparables a los resultados obtenidos cuando se administra 40 mU/Kg por minuto de PTH en sujetos sanos.

Cuando se infundió calcio en sujetos sanos, para suprimir la secreción de la PTH, la concentración de AMPcU disminuyó hasta en un 20 a 45 %.

Finalmente, Broadus, Khoury, Alston, Nistrup, entre otros investigadores, (19,25-28) determinaron y compararon los resultados de AMPcU de pacientes sanos con un grupo de pacientes con hiperparatiroidismo y con un grupo con hipotiroidismo. Encontraron en el 91 % de los pacientes con hiperparatiroidismo se obtuvieron resultados elevados de AMPcU y en el grupo de pacientes con hipoparatiroidismo presentaron resultados bajos de AMPcU.

De esta manera se establece que la PTH en cantidades fisiológicas causa un incremento en la excreción urinaria de AMPc por medio de su acción directa en el riñón. La velocidad de secreción de la PTH es el mejor factor fisiológico que determina la concentración del AMPcN. Por lo tanto, la cuantificación del AMPcU puede ser utilizada como una prueba de laboratorio para el estudio y diagnóstico de la función paratiroidea.

## 1.6. - PTH y la Importancia Clínica de la Determinación del AMPcU.

Para comprender la necesidad de contar con una prueba de laboratorio para el diagnóstico y tratamiento de los desórdenes paratiroides, a continuación se mencionan los aspectos más importantes de la PTH, las glándulas que la producen y los trastornos del organismo relacionados con esta hormona.

### 1.6.1. - Glándulas Paratiroides

Los seres humanos suelen tener cuatro glándulas paratiroides, dos superiores y dos inferiores, localizándose simétricamente y adheridas a los polos de la tiroides. Están rodeadas por una cápsula fina que se extiende al interior del parénquima dividiéndolas en lóbulos. Su forma es elipsoide, plana y presentan un color marrón.

Su tamaño es de 2 a 7 mm de longitud, de 2 a 4 mm de anchura y de 0.5 a 2.0 mm de grosor. El peso de todo el tejido oscila entre 100 y 150 mg..

Las glándulas paratiroides contienen tres tipos de células: las principales, las oxífilas y las claras. Las primeras son las más abundantes y responsables de la secreción de la hormona paratiroidea (PTH). Las células oxífilas y las células claras tienen una función aún desconocida.

La principal función de las glándulas paratiroides es la secreción de la PTH, hormona que junto con el calcitriol ( $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ) y la calcitonina integran un complejo sistema endocrino para controlar la homeostasia del calcio, fósforo y magnesio en todos los vertebrados (30,31).

La secreción de la PTH está principalmente determinada por la concentración sanguínea del calcio ionizado, esta secreción es inversamente proporcional a la concentración sanguínea de este ión. La hipocalcemia estimulará la secreción de la PTH, pero la hipercalcemia la inhibe. Una vez que la concentración sanguínea del calcio regresa a la normalidad, cesa la estimulación de las glándulas paratiroides aunque no se suprime completamente, ya que siempre existe un pequeño componente secretor de PTH responsable de niveles detectables en circulación (31).

### 1.6.2. – Síntesis y Metabolismo de la PTH.

Esta hormona está formada por una molécula lineal, de cadena única, compuesta de 84 a.á., con un peso molecular de 9.5 KD.

Existe un gen para su codificación, en el brazo corto del cromosoma 11, el producto original de este gen es un precursor polipeptídico de 115 a.á. sintetizado en los ribosomas y recibe el nombre de pre-pro PTH. La conversión de pre-pro PTH a pro PTH ocurre en unos segundos, durante el transporte del polipéptido a través de la membrana del retículo endoplásmico rugoso. La pro PTH formada contienen 90 a.á., la escisión de otro exapéptido la convierte en la PTH 1-84. Todo este proceso de síntesis ocurre en 15 minutos.

En este punto, la hormona se encuentra bien empaquetada en gránulos secretores para su depósito y conveniente liberación. La PTH empaquetada sufre al menos otra escisión para generar fragmentos inactivos que pueden ser liberados junto con la hormona intacta a la circulación.

En cuanto la PTH es secretada a la circulación, rápidamente es metabolizada y fragmentada por las enzimas proteolíticas en el hígado y en el riñón, dando lugar a fragmentos activos amino terminales (secuencia 1-34) y a fragmentos inactivos carboxiterminales (secuencia 53 – 84) y molécula intermedia (secuencia 48-64).

Mientras en el afluente venoso de las glándulas paratiroides, la PTH intacta 1-84 puede constituir el 80 % de la secreción, a nivel periférico la contribución de los fragmentos la reducen al 10%, representando los fragmentos carboxiterminales la mayor proporción (80%) y los amino terminales otra mínima fracción. Los fragmentos amino terminales y la molécula intacta tienen la actividad biológica pero su vida media es muy corta, alrededor de 10 minutos, mientras los carboxiterminales son inactivos y tienen una vida media más larga que se estima de 40 minutos. De tal forma, se encuentran circulando múltiples fragmentos, en su gran mayoría inactivos, además de la propia molécula intacta.

Todas las formas circulantes de la PTH son filtradas por los glomérulos y reabsorbidas en los túbulos renales, donde son catabolizadas.

La heterogeneidad de formas circulantes es uno de los principales factores que limita la disponibilidad de la cuantificación de la PTH como una prueba de laboratorio para el estudio y diagnóstico de los desordenes paratiroides, esto ha originado emplear otras determinaciones alternativas, como la cuantificación de AMPcN, AMPcU, calcio y fósforo, entre otros (30,31).

La principal función de la PTH es regular la homeostasis del calcio, fósforo y magnesio por medio de su acción en el riñón, hueso y en forma indirecta en el

intestino. La hormona actúa, en sus órganos blanco, uniéndose a sus receptores específicos y activando el sistema de la adenilciclasa para producir el AMPc.

La unión de enlace entre el receptor de la célula blanco y la cadena polipeptídica de la PTH depende de dos regiones, las secuencias 10 – 27 y 15 – 34, correspondientes a la porción de los fragmentos amino terminales. Además, los aminoácidos 1 y 2 son necesarios para que la molécula sea bioquímicamente activa, es por ello, el péptido sintético (con secuencia 1 – 34) tiene la misma actividad biológica que la molécula intacta 1 – 84 (32,33).

En el riñón, la PTH modula la excreción urinaria de fósforo y la absorción de calcio y magnesio a través de sus acciones en distintos segmentos de la nefrona.

Los efectos de la PTH sobre el hueso estimulan la reabsorción ósea, también estimula la formación de hueso nuevo, pero su efecto neto es aumentar la liberación de calcio y fósforo a la sangre. Estos efectos tienen lugar en dos fases: una inicial, a las 2-3 horas, caracterizada por una liberación de calcio a partir de áreas de fácil movilización, seguida de una fase más tardía que necesita síntesis proteica y se acompaña de un aumento de la resorción ósea.

La PTH aumenta la absorción intestinal de calcio indirectamente al activar la 1-alfa hidroxilasa renal, convirtiendo la 25-hidroxicalciferol ( $25(\text{OH})\text{D}_3$ ) en su forma activa, la 1-25 dihidroxi vitamina  $\text{D}_3$  ( $1-25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ), también llamada calcitriol, metabolito regulador de la absorción intestinal de calcio (32,33).



### 1.6.3. - Trastornos de las Glándulas Paratiroides

Los trastornos de las paratiroides se caracterizan por una hipo e hipersecreción de la PTH. El conocimiento de estos padecimientos es importante para el trabajo, porque dependiendo del grado de afectación de la secreción de la hormona serán los resultados obtenidos en la cuantificación del AMPc Urinario.

#### 1.6.3.1.- Hiperparatiroidismo primario (HPT 1°)

Es una enfermedad caracterizada por una hipersecreción autónoma de PTH, esto provoca una hipercalcemia por las acciones que ejerce el exceso de hormona sobre el riñón, hueso e intestino.

En este padecimiento, la hipercalcemia es incapaz de suprimir la secreción aumentada de PTH, mecanismo que se lograría en circunstancias normales.

La enfermedad se debe en el 80% de los casos a un adenoma benigno que suele localizarse principalmente en las paratiroides inferiores. Cada gramo de tejido anormal incrementa el calcio sérico en 1mg, a mayor tamaño del adenoma más manifestaciones clínicas. El otro 20 % de los casos se debe a una hiperplasia ó cáncer de las glándulas paratiroides, este puede aparecer espontáneamente, aunque en muchos de los casos se trata de un hiperparatiroidismo familiar o formando parte de algunos de los síndromes de neoplasia endocrina múltiple (NEM).

La mayoría de los pacientes son asintomáticos, su prevalencia oscila entre el 1 y 3 % de la población adulta. Su incidencia es de 200 a 500 casos nuevos por

millón de habitantes al año, es más frecuente a partir de la quinta década de vida y afecta tres veces más a las mujeres que a los hombres.

La hipersecreción de PTH acelera la remodelación ósea, lo que produce un balance de calcio negativo para el hueso. En el riñón, aumenta la reabsorción tubular de calcio, disminuye la reabsorción de fosfato, activa la producción de calcitriol y este ocasiona el aumento de la absorción intestinal de calcio, trayendo en conjunto un hiperflujo exógeno de calcio al organismo que se traduce en una hipercalcemia.

Aunque la reabsorción de calcio está aumentada, se observa hipercalciuria ya que el exceso de calcio filtrado supera la capacidad de reabsorción tubular.

Las manifestaciones clínicas de esta enfermedad son muy variables y dependen de la magnitud de la hipercalcemia, de la afectación de los órganos blanco y del grado de la hipersecreción de la PTH. Se puede manifestar desde una hipercalcemia ligera, que cursa asintomática, hasta las tormentas paratiroides caracterizadas por una hipercalcemia extrema de evolución aguda.

La hipercalcemia altera la capacidad del túbulo renal para concentrar la orina, ocasionando poliuria la cual puede repercutir en una deshidratación. También produce trastornos digestivos (náuseas y vómito), neuromusculares (pérdida de la memoria), cardiovasculares (hipertensión arterial) y depósito de sales de calcio en distintos tejidos. Aumenta el riesgo de que aparezca litiasis renal calcíca recidivante, también puede aparecer la nefrocalcinosis, lo que puede llevar hasta la insuficiencia renal.

El diagnóstico de un hiperparatiroidismo primario se haría por medio de la detección de las manifestaciones clínicas o renales de la hipercalcemia. En la actualidad, hay muchos pacientes que presentan una hipercalcemia ligera o totalmente asintomática, detectándose de modo casual al realizar un perfil bioquímico general.

El diagnóstico definitivo se establece por los resultados del laboratorio clínico. Para el caso de un HPT primario, se espera un calcio sérico elevado, un fósforo sérico bajo ó en el límite inferior de la normalidad, una calciuria elevada, un AMPcN y AMPcU elevados.

El diagnóstico confirmatorio y definitivo de un HPT primario lo daría la demostración de una hipercalcemia asociada a valores elevados de PTH en sangre.

El tratamiento de esta enfermedad es quirúrgico, la cirugía debe de ser realizada por un cirujano de amplia experiencia, lo que garantizaría la curación definitiva en más del 90% de los casos.

### 1.6.3.2.- Hiperparatiroidismo secundario ( HPT 2° )

Es una enfermedad que resulta cuando las glándulas paratiroides secretan más PTH de lo normal, todo ello como consecuencia de una actividad compensadora frente a cualquier situación que tienda a provocar un descenso mantenido de la calcemia. Cuando se corrige el proceso que desencadenó la hipocalcemia, la función paratiroidea se corrige.

El padecimiento más frecuente e importante para producir una hipocalcemia crónica con estimulación prolongada de secreción de PTH, es la insuficiencia renal crónica (IRC).

La patogenia más aceptada supone que la estimulación inapropiada de la secreción de PTH se pone en marcha a partir de la fase en que el aclaramiento renal disminuye por debajo de 40 ml/min, originado una incapacidad renal para excretar el fosfato dando como resultado una hiperfosfatemia. A su vez, la hiperfosfatemia disminuye la calcemia e inhibe la actividad de la 1-alfa hidroxilasa renal, produciéndose menos calcitriol y en consecuencia se obtiene una menor absorción intestinal de calcio, todo esto lleva al organismo a un cuadro mayor de hipocalcemia.

La hipocalcemia mantenida es un potente estimulador de la secreción de la PTH. Si este aumento de la secreción de la hormona se mantiene por largos periodos de tiempo, se puede llegar a producir la hiperplasia paratiroidea (32,33).

El tratamiento consiste en normalizar el calcio, fósforo y el calcitriol sérico mediante sales de calcio, quelantes de fósforo y empleo de calcitriol oral o intravenoso.

El trasplante renal corrige el metabolismo fosfocálcico de la uremia con lo que las paratiroides hiperplásicas tienden a volver a la situación normal de manera progresiva.

Los resultados de laboratorio esperados en esta enfermedad serían: Un fósforo sérico elevado, calcio sérico bajo o en el límite inferior de la normalidad, el AMPcU y AMPcN estarían elevados.

### 1.6.3.3.- Hipoparatiroidismo

Es una enfermedad poco frecuente debida a una disminución de la secreción de PTH. Abarca un amplio espectro de casos, desde la deficiencia ligera de PTH, hasta la deficiencia absoluta de PTH con hipocalcemia mantenida muy grave.

El hipoparatiroidismo produce hipocalcemia, hipofosfaturia y disminución de la excreción de AMPc.

La causa más frecuente del hipoparatiroidismo es la lesión de las paratiroides como consecuencia de la cirugía de cuello o por la remoción quirúrgica de las glándulas paratiroides, a esta enfermedad también se le ha llamado hipoparatiroidismo adquirido. Estas glándulas también pueden destruirse como consecuencia de un ataque autoinmune o por otros mecanismos poco comprendidos que pueden ser genéticos o incluso infecciosos (32,33). En todos estos casos no hay secreción de PTH ni de AMPcN, la concentración urinaria del nucleótido es baja, y el AMPc detectado en la orina corresponde exclusivamente al AMPc depurado de la circulación.

La deficiencia de PTH altera la regulación del metabolismo fosfocálcico del hueso, disminuye el recambio óseo y la salida del calcio al líquido extracelular. En el riñón, disminuye la reabsorción tubular de calcio y la síntesis de calcitriol, pero

aumenta la reabsorción tubular de fósforo. En el intestino, disminuye la absorción de calcio al disminuir los valores de calcitriol. Todo ello lleva a la aparición de hipocalcemia e hiperfosfatemia .

En ausencia absoluta de PTH, la calcemia no suele descender a cifras inferiores de 5mg/dl, cuando se alcanzan estas concentraciones, sale el calcio del hueso independientemente de la acción de la PTH.

La hipocalcemia produce irritabilidad muscular, oscilando desde una tetania franca hasta una tetania latente. La tetania rara vez es mortal pero alarma mucho al enfermo.

La hipocalcemia también altera el funcionamiento del sistema nervioso central traduciéndose en convulsiones, anomalías variadas de las funciones intelectuales superiores (trastornos de la memoria, rendimiento escolar bajo). También puede provocar insuficiencia cardiaca congestiva, la piel suele ser seca descamativa, el pelo escaso y quebradizo y las uñas frágiles y deformes. Todas estas manifestaciones mejoran de manera espectacular cuando se corrige la hipocalcemia.

La asociación de hipocalcemia, hiperfosfatemia y concentraciones inapropiadamente bajas de PTH en ausencia de insuficiencia renal, establecen el diagnóstico de un hipoparatiroidismo.

El tratamiento de este trastorno pretende mantener las cifras de calcio sérico en el límite inferior de la normalidad (entre 8.5 y 9.0 mg/dl), calcemias más altas pueden provocar hipercalciuria debida a la baja reabsorción tubular de calcio. Para

alcanzar este objetivo se administran de 1 a 2 g/día de calcio elemento por vía oral, dividida en 2 a 3 dosis. Conviene evitar la leche y el queso por su alto contenido en fosfatos.

#### 1.6.3.4.- Pseudohipoparatiroidismo o Síndrome de Resistencia a la PTH

El pseudohipoparatiroidismo comprende un grupo heterogéneo de enfermedades caracterizadas por una resistencia tisular a la acción de la PTH, provocan un cuadro bioquímico indistinguible del hipoparatiroidismo auténtico (hipocalcemia e hiperfosfatemia), pero con un aumento en la concentración sérica de PTH.

En este tipo de enfermedades, el problema no radica en la falta de secreción de la PTH, sino en la alteración de los mecanismo de comunicación entre la hormona y su célula blanco. Por eso, aunque existen cantidades normales e incluso elevadas de PTH en plasma, los enfermos tienen manifestaciones de hipofunción glandular. El pseudohipoparatiroidismo puede ser de dos tipos:

**Pseudohipoparatiroidismo Tipo I.-** Se identifica porque al infundir PTH no se aumenta la fosfatúria ni la excreción urinaria de AMPc, debido a una falla en el mecanismo transducción de la señal, desde el receptor hasta la adenilciclase.

Se han identificado tres subtipos de pseudohipoparatiroidismo tipo I;

En el tipo IA, el defecto lo tiene en la actividad de las proteínas Gs, en este caso, la PTH no tiene la capacidad de generar cantidades adecuadas de AMPc y no habrá una respuesta correcta a esta hormona en su órgano blanco.

En el tipo IB, el trastorno no se debe a las alteraciones de las proteínas G, parece deberse a defectos del receptor de la PTH.

En el tipo IC, se trata de pacientes sin anomalías en las proteínas G, el problema puede estar originado por otros trastornos del sistema receptor adenilciclasa.

**Pseudohipoparatiroidismo Tipo II.-** Se debe a la resistencia de los efectos de la PTH en un eslabón posterior al AMPc, como la proteína cinasa dependiente de AMPc. Al infundir PTH, se presenta la excreción urinaria de AMPc, pero no se presenta la respuesta que caracteriza la acción de la hormona en el riñón.

Se presenta en la Tabla 1 los resultados de laboratorio para el AMPcU, Calcio sérico, Fósforo sérico y Calcio urinario esperados en los distintos estados patológicos de las glándulas paratiroides.



Tabla 1.- En esta tabla se pueden observar los resultados de Calcio, Fósforo y AMPcU en los distintos estados patológicos de las paratiroides.

	AMPcU	Calcio Sérico	Fósforo Sérico	Calcio Urinario
Hiperparatiroidismo Primario	↑	↑	Normal a ↓	↑
Hiperparatiroidismo Secundario	↑	↓ a Normal	Normal a ↑	↓
Hipoparatiroidismo Primario	↓	↓	↑	↓
Pseudohipoparatiroidismo Tipo I	↓	↓	↑	-
Pseudohipoparatiroidismo Tipo II	-	↓	↑	-

↑ = resultado aumentado, ↓ = resultado disminuido .

## 1.7. - Radioinmunoanálisis del AMPc Urinario

Los primeros ensayos de laboratorio para la cuantificación del AMPc fueron principalmente colorimétricos y enzimáticos, requiriendo la purificación de las muestras debido a que muchas sustancias interfieren con el análisis y a las pequeñas concentraciones del nucleótido, esto ocasionó un método complicado y de difícil aplicación en el laboratorio de análisis clínicos.

Con el interés de desarrollar un método que permitiera cuantificar al AMPc de una manera práctica y fácil de llevar a cabo, eliminando la complejidad de la purificación de las muestras, surgió el método descubierto por Gilman y Walton (1,34) basado en la afinidad existente entre el AMPc y una proteína cinasa dependiente del mismo. El ensayo se lleva a cabo en condiciones establecidas por una competencia entre dos especies de AMPc, un AMPc marcado radiactivamente con tritio ( $H^3$ ) y otro no marcado (presente en la muestra), para unirse con la proteína cinasa. Los complejos proteína cinasa-AMPc radiactivo se separan de la mezcla de reacción absorbiéndolos en un filtro Millipore de celulosa y se procede a contar la radiactividad. La concentración de la muestra se obtiene por la extrapolación de los resultados obtenidos en una curva estándar, preparada simultáneamente con cantidades conocidas de AMPc.

Este método aumenta la sensibilidad, se pueden cuantificar cantidades de AMPc de  $0.05$  a  $0.1 \times 10^{-12}$  mol (picomoles), no se requiere de una previa purificación de la muestra, por medio de la cromatografía, pero sí requiere de la

desproteínización de la muestra, representando grandes ventajas sobre el método enzimático.

Paralelamente a este método, se hicieron investigaciones para aplicar el radioinmunoanálisis (RIA) en la cuantificación del AMPc. El RIA es un método altamente específico y de gran sensibilidad. En este método es necesario contar con un anticuerpo (Ac) contra el metabolito por determinar (Ag no marcado) y un derivado radiactivo de este mismo metabolito (Ag marcado).

El ensayo se lleva a cabo en condiciones para establecer una competencia, entre el metabolito marcado radiactivamente y el no marcado, por la unión al anticuerpo (Ac), el porcentaje de unión depende de la concentración de cada uno de los metabolitos, siendo la relación unido / libre inversamente proporcional a la cantidad existente de cada uno de ellos (34,35).

Debido al bajo peso molecular del AMPc y por consecuencia a su poca actividad antigénica. En la elaboración del anticuerpo contra el mismo, fue necesario preparar un derivado de alto peso molecular que conservara intactos el anillo de adenina y la unión diéster para poder conservar la especificidad. Esto se logró succinilando el AMPc en la posición 2'O y conjugando al grupo carboxilo libre una proteína, la hemocianina. Este compuesto se empleó como antígeno para inmunizar conejos blancos de Nueva Zelanda.

La obtención de este anticuerpo, en contra del AMPc, hizo posible la aplicación del RIA para la cuantificación de este nucleótido en los diferentes tejidos y fluidos del organismo.

Una vez obtenido el Ac específico para el AMPc, el siguiente paso para lograr llevar a cabo el RIA, era contar con un derivado radiactivo del AMPc. En la elaboración de este derivado radiactivo, se requería de un isótopo marcador con una vida media larga y emitiera la mayor cantidad de radiactividad posible, eligiéndose al  $I^{125}$  como isótopo marcador.

Debido a la propiedad del  $I^{125}$  de poder sustituir a uno o varios hidrógenos de la molécula de la tiroxina, fue necesario preparar un derivado del AMPc que contara con una molécula de tiroxina en su estructura química. Se sintetizaron varios derivados con diferentes sustituyentes, tanto en la posición N 6 como en la 2'O, se hicieron reaccionar con el Ac contra el AMPc. El derivado que presentó mayor actividad específica para unirse con el Ac, fue el tirosilmetiléster del 2'O monosuccinil 3'-5'adenosín monofosfato cíclico (TME-sAMPc) (34,36).

La obtención del Ac específico y el derivado radiactivo hizo posible la aplicación del radioinmunoanálisis (RIA) para el AMPc. Este método es muy sensitivo, específico y de fácil aplicación, permitiendo la cuantificación del AMPc, en el rango de nanomoles ( $10^{-12}$  mol), en los distintos tipos de muestras biológicas.

El RIA para AMPc elimina la necesidad de purificar las muestras, pero no elimina la necesidad de inactivar a las enzimas del grupo de las fosofodiesterasas (PDE), enzimas presentes en las muestras biológicas las cuales degradan al AMPc. Para evitar esta degradación, se recomienda el uso de inhibidores enzimáticos.

En el trabajo, para la cuantificación del AMPcU, se emplea el ácido clorhídrico (HCl) como inhibidor enzimático y como conservador de la muestra de orina. La acción del ácido es inactivar a la PDE e inhibir el crecimiento bacteriano.

La presencia de las bacterias en las muestras de orina ha preocupado mucho a los investigadores y recomiendan el uso de conservadores para eliminar la variación en los resultados de AMPcU. Arthur E. Broadus (19) argumenta que la presencia de las bacterias en las muestras de orina, causan una disminución en la concentración del AMPcU como resultado de la acción de las PDE bacterianas. También se sabe que las bacterias pueden sintetizar este nucleótido y expulsarlo al exterior (38).

### 1.8.- Justificación

Con base en los argumentos anteriormente expuestos, se ha demostrado que la cuantificación del AMPcU es una prueba de fácil ejecución en el laboratorio clínico. Empleada para estimar, en forma indirecta, la concentración de la hormona paratiroidea (PTH), biológicamente activa, en circulación.

La aplicación del radioinmunoanálisis (RIA) en la cuantificación del AMPcU es un método que ha revolucionado la determinación de este nucleótido por su alta especificidad y sensibilidad. Lamentablemente, este método no elimina la variabilidad en los resultados de AMPcU ocasionados por la presencia de las bacterias en las vías urinarias.

Para la obtención de resultados confiables y reproducibles de AMPcU es necesario inhibir el crecimiento bacteriano en las muestras de orina. La falta de información, la cual reporte con certeza, si la alteración en los resultados de AMPcU se deban a una acción degradativa por parte de la PDE bacteriana o por el aporte de un AMPc bacteriano, deja la oportunidad de investigar este suceso.

Por tal motivo, el trabajo tiene como finalidad determinar si la presencia de las bacterias en las vías urinarias puede alterar de alguna forma la concentración urinaria del AMPc.

## CAPITULO II

### OBJETIVOS

#### 2.1.- OBJETIVO GENERAL

- Aplicar la determinación del AMPcU, por medio del radioinmunoanálisis, como una prueba del laboratorio clínico en el diagnóstico de las enfermedades paratiroides.

#### 2.2.- OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Conocer si la presencia de las bacterias en las vías urinarias aumentan, disminuye, o no alteran la concentración de AMPc presente en la orina (AMPcU).
- Si el género y/o la cantidad de las bacterias alteran la concentración del AMPcU.
- Comprobar si el empleo del HCl como conservador e inhibidor bacteriano es necesario para la cuantificación del AMPcU.

## CAPITULO III

### Material y Métodos

#### 3.1-Diseño Experimental.

Se trata de un trabajo de investigación clínica llevado a cabo en el departamento de Nefrología y Metabolismo Mineral del INSTITUTO NACIONAL DE LA NUTRICIÓN "SALVADOR SUBIRÁN".

Se estudiaron 46 pacientes cuyas edades fluctuaban entre los 19 y 52 años, de los cuales se formaron 2 grupos:

Un grupo control de 22 pacientes sanos formado por 10 mujeres y 12 hombres.

Un grupo de 24 pacientes con sospecha de infección de vías urinarias de los cuales fueron 15 mujeres y 9 hombres.

Los pacientes con sospechas de infección de las vías urinarias fueron seleccionados de los pacientes que acuden a la consulta externa y de los internados.

Este grupo de pacientes cumplió con los siguientes requisitos:

- a.- Tener manifestaciones clínicas sugestivas de una probable infección de las vías urinarias, como molestias o ardor para orinar.
- b.- Los pacientes no sufran de alguna nefropatía.



Los pacientes del grupo control, fueron voluntarios sanos, se les comprobó que no padecían alguna nefropatía ni infección alguna de las vías urinarias.

A los dos grupos de pacientes se les pidió recolectarán la orina de 24 horas, se mantuvieran en ayuno para tomarles una muestra de sangre venosa y también recolectaran la orina del chorro medio para el urocultivo (42). Para el grupo control, además de la recolección de la orina de 24 horas, se recolectó la orina de dos horas. Estas muestras fueron el material biológico para el desarrollo de este trabajo.

### 3.2.- Procedimientos para la obtención de las muestras

#### 3.2.1.- Recolección de las muestras de orina de 24 Horas

Para recolectar de la orina de 24 horas, el paciente siguió los siguientes pasos:

- a.- Este proceso se inicia un día antes de presentarse a entregar la orina. En las primeras horas de la mañana (al levantarse) el paciente orinó en la taza del baño.
- b.- A partir de la siguiente micción, el paciente recolectó toda la orina excretada durante lo que resta del día y la noche, sin perder una sola gota de orina. El recipiente usado para este objetivo, fue un frasco limpio y seco proporcionado por el laboratorio.

c.- Al día siguiente, al levantarse, el paciente recolectó solamente la primera orina de la mañana. Con esta última muestra, termina la recolección de 24 horas.

### 3.2.2.- Recolección de la orina para el urocultivo

Para la obtención de la muestra, el paciente siguió las siguientes indicaciones:

- a.- El paciente se presentó por la mañana, en la toma de muestra, sin haber orinado durante al menos en las 3 últimas horas previas al estudio.
- b.- Se desinfectó sus genitales con el material proporcionado. El material empleado para el aseo genital fueron unas torundas de algodón impregnadas de benzal al 5% o espuma de isodine.
- c.- Al principio de la micción, el paciente vació un poco de orina en la taza del baño, se aguantó un poco y recolectó los siguientes 20 ml de orina (aproximadamente) en un frasco estéril. A este tipo de muestra recolectada se le llama muestra de orina del chorro medio.
- d.- Una vez recolectada la orina para el urocultivo, el paciente terminó de orinar en la taza del baño.

### 3.2.3.- Recolección de la orina de dos horas y, a su vez, la muestra para el urocultivo del grupo control

Los voluntarios del grupo control siguieron los siguientes pasos:

- a.- El paciente se presentó por la mañana, a la toma de muestra, con un ayuno de 12 horas.
- b.- Debió orinar al levantarse, inmediatamente después, tomó dos vasos de agua pura y anotó la hora exacta en la que bebió el agua.
- c.- En el transcurso de las dos horas siguientes no debió orinar.
- d.- Al concluir las dos horas, desinfectó sus órganos genitales con el material entregado para este fin ( benzal al 5% ).
- e.- Se le dió un frasco "A" en donde recolectó la primera orina de la micción.
- f.- Enseguida, se le dió un frasco "B" estéril, en donde recolectó la orina del chorro medio. Esta muestra fué útil para el urocultivo.
- g.- Finalmente se le dió al paciente el frasco "A" para terminar de recolectar la orina.

Una vez efectuado el urocultivo, se mezclaron las muestras contenidas en los dos frascos A y B. De esta forma se obtuvo la muestra de orina de dos horas.

En la figura 6 se muestra un diagrama de flujo para la recolección de las muestras de orina de 2 horas y la muestra para el urocultivo del grupo control.

### 3.2.4.- Preparación de las muestras de orina

De las muestras de orina recolectadas, de 24 y 2 horas, se midió el volumen y se tomaron dos alícuotas de 5 ml de cada una de ellas. A una de las alícuotas se le dejó como tal, y a la otra se le agregó 0.10 ml de ácido clorhídrico (HCl)

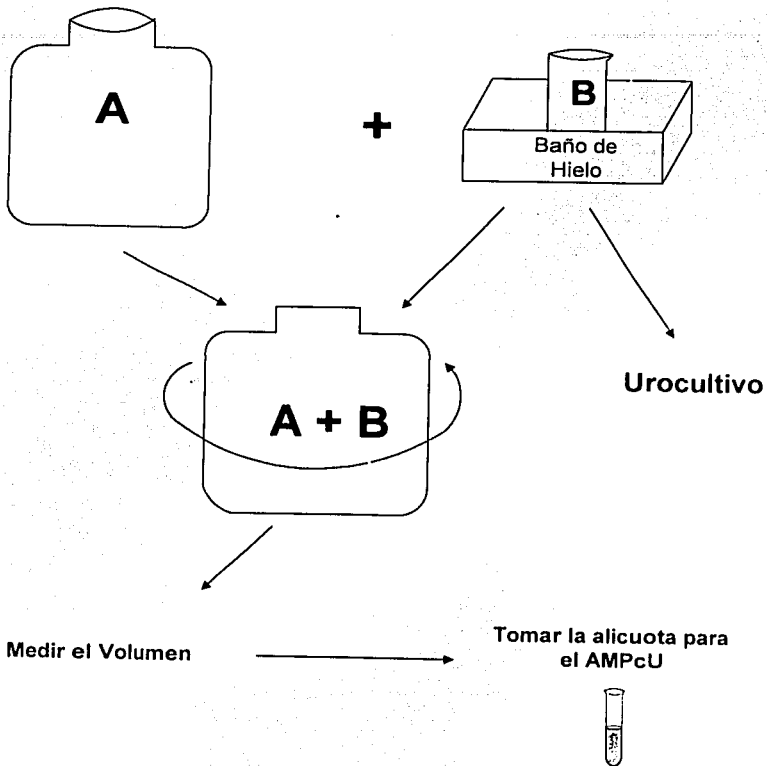


Figura 6 .- Diagrama de flujo para la recolección de las muestras de orina de dos horas y del urocultivo para el grupo control.

concentrado como conservador y antibacteriano. Las alícuotas se guardaron en congelación (a  $-20^{\circ}\text{C}$ ) para conservarlas hasta el momento de ser procesadas.

A cada una de las muestras de orina se les determinó; calcio, fósforo, creatinina y AMPc.

En la Figura 7 se muestra un diagrama de flujo para la preparación de las muestras de orina.

Con la finalidad de demostrar que la dilución empleada al 2% del HCl haya sido letal para las bacterias, se inocularon 10 muestras de orina con *E. coli*, se agregó HCl como conservador y se les practicó un urocultivo control

La *E. coli* empleada para inocular las muestras de orina, fue identificada y aislada de los urocultivos positivos.

Las muestras de orina recolectadas para el urocultivo, fueron llevadas a la brevedad posible al laboratorio para sembrarlas de inmediato en los medios de cultivo correspondientes. Estas muestras se conservaron siempre en un baño de hielo, desde el momento de su obtención hasta ser sembradas.

### 3.2.5.- Obtención de la muestra de suero.

Se les tomó una muestra de sangre venosa a los pacientes de los dos grupos de estudio. La obtención de la sangre fué por punción venosa de la cara anterior del antebrazo, se recolectó en un tubo limpio, seco y sin ningún aditivo. Fue requisito

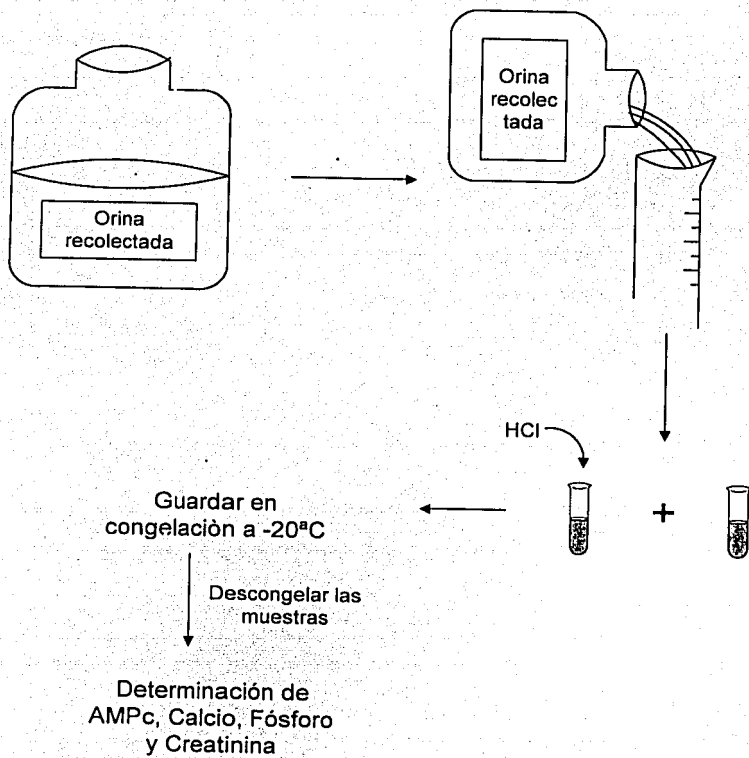


Figura 7.- Diagrama de flujo para la preparación de las muestras de orina recolectadas.

indispensable que los pacientes se presentarán por la mañana, a la toma de productos biológicos, en total ayuno.

Para la obtención del suero, se centrifugaron las muestras de sangre a 2500 rpm durante 10 minutos, se separó el suero con una pipeta Pasteur y estos se guardaron de inmediato en congelación, o si era posible, se determinó en ese momento los metabolitos correspondientes.

En los sueros obtenidos se determinó: calcio, fósforo y creatinina.

### 3.3.- Métodos para la cuantificación de Calcio, Fósforo, Creatinina y AMPc.

#### 3.3.1. -Método para la cuantificación de Calcio

Para la cuantificación de este metabolito, se empleó el método de absorción atómica (A.A.), utilizando el espectrofotómetro de A.A. marca PYE UNICAM, modelo SP 90 en una longitud de onda de 422 nm.

En el método de A.A. se aplica una energía luminosa a una determinada longitud de onda que se hace incidir en una nube de átomos libres en estado fundamental, la cantidad de luz absorbida es directamente proporcional al número de átomos libres presentes en la muestra. La cuantificación de la luz absorbida permite hacer una determinación cuantitativa del analito.

En la A.A. se requiere de una fuente de luz la cual emita las líneas atómicas características del elemento por analizar, por ello, se utilizan lámparas de cátodo hueco específicas para el elemento a determinar (43,44).

La nube de átomos requerida para la medición en A.A., es producida por la aplicación de suficiente energía térmica a la muestra para disociar los compuestos químicos en átomos libres. La aspiración de una solución de la muestra dentro de una llama alineada con el rayo de luz se emplea para este propósito.

### 3.3.1.1.-Técnica para la cuantificación de Calcio urinario

Para la aplicación de este método se diluyó la orina con la finalidad de tener una concentración de calcio en el rango de 5 a 20 mg/dl, esto implica un factor de dilución que va entre 5 y 50.

También, se prepararon las soluciones de la curva estándar y la solución de cloruro de lantano de la manera siguiente:

a.- Solución de Cloruro de Lantano ( 5% de  $La^{3+}$ ): - Pesar 58.6 g de óxido de lantano y ponerlo en un matraz de 2 litros, añadir 800 ml de agua destilada y 100 ml de HCl concentrado. Calentar y agitar la muestra hasta la completa dilución de la sal. Ya disuelta la sal, aforar con agua destilada.

Preparación de las soluciones de la curva estándar:

Para preparar las distintas soluciones de la curva estándar, primero se preparó la solución de 100 mg/dl de calcio de la manera siguiente:



a.- Solución de Calcio 100 mg/dl: - Disolver 249.7 mg de carbonato de calcio ( $\text{Ca CO}_3$ ) en una mínima cantidad de HCl concentrado, aforar a un litro con agua destilada.

Para preparar las soluciones de la curva estándar se procedió de la manera siguiente:

b.- Soluciones de la curva estándar de Calcio: - En 5 matraces aforados de 100 ml, pipetear 0, 5, 10, 15, 20 ml de solución de calcio (100 mg/dl) respectivamente. Agregar a cada uno de los matraces 20 ml de la solución de cloruro de lantano y aforar con agua destilada. Estas soluciones contienen 0.0, 5, 10, 15 y 20 mg/dl de calcio y están listas para usarse.

Preparación de las muestras de orina:

Como se mencionó anteriormente, las muestras de orina se diluyen para poder determinar la concentración de calcio. La manera en que se hizo fue la siguiente:

- a.- Se pipeteó en un tubo 20 x 150 mm un mililitro de orina.
- b.- Se agregó en el mismo tubo, 2 ml de  $\text{LaCl}_3$ .
- c.- Se agitó el tubo para mezclar su contenido
- d.- Finalmente, se agregó 7 ml de agua destilada para obtener un volumen final de 10 ml y se mezcló.
- e.- El siguiente paso fue leer la muestra en el equipo de absorción atómica (A.A.).

Para leer las concentraciones de calcio en el equipo de A.A. se corrió primero el blanco de reactivos para ajustar a cero de absorbancia; seguido de las soluciones estándar y a continuación las soluciones problema.

Para calcular las concentraciones de las muestras se trazó una gráfica, poniendo en el eje de las abscisas las concentraciones de calcio de las soluciones estándar, y en el eje de las ordenadas, a las lecturas correspondientes a cada uno de los estándares. Las lecturas de las muestras se extrapolan en la grafica, el resultado obtenido (en mg/dl) se multiplica por el factor de dilución y por el volumen correspondiente a cada muestra, y así obtener la concentración de calcio urinario en mg/vol excretado.

### 3.3.1.2.- Técnica para la cuantificación de Calcio sérico

Las muestras de suero para ser procesadas se diluyeron con una solución de EDTA. También se tuvo que preparar su propia curva estándar.

Previo a la preparación de las soluciones de la curva estándar, se preparó la solución de EDTA Na<sub>2</sub> al 0.78% de la manera siguiente:

a.- Solución de EDTA Na<sub>2</sub> (3.75%): - Disolver 37.5 g de EDTA Na<sub>2</sub> en casi 800 ml de agua destilada y aforar a un litro.

b.- Solución de EDTA Na<sub>2</sub> (0.78%): - Con una probeta de 100 ml, transferir 208 ml de la solución de EDTA Na<sub>2</sub> 3.75% a un matraz de un litro y aforar con agua destilada.

### Preparación de las soluciones de la curva estándar:

a.- Solución de Calcio (100 mg/dl): - Disolver 249.7 mg de carbonato de calcio ( $\text{Ca CO}_3$ ) en la mínima cantidad de HCl concentrado (aproximadamente 50 ml) y aforar a un litro con agua destilada.

b.- Soluciones de la Curva Estándar: - En 7 matraces aforados de 100 ml, pipetear, respectivamente en cada uno de ellos, 0, 1, 2, 3, 4, 5 y 6 ml de la solución de calcio. Agregar a cada uno de los matraces, 20 ml de la solución de EDTA al 0.78 % y aforarlos con agua destilada. Estas soluciones contienen 0, 2.5, 5.0, 7.5, 10.0, 12.5 y 15 mg/dl de calcio respectivamente. La solución "0" (que no contiene calcio) se empleó como blanco de reactivos.

### Preparación de las Muestras de Suero:

En un tubo de 20 x 150 mm pipetear 0.4 ml de suero y 9.6 ml de solución de EDTA  $\text{Na}_2$  al 0.78%, mezclar bien. Esta solución tiene una dilución 1:25 y ya esta lista para leerse.

Para leer las soluciones de plasma en el equipo de A.A., se leyó primero la solución blanco y se ajustó a cero de absorbancia, después se leyeron las soluciones estándar y finalmente las soluciones de plasma.

Para conocer la concentración de calcio en las muestras problema, se trazó una gráfica poniendo en el eje de las abscisas la concentración de calcio de las

soluciones estándar (en mg/dl), y en el eje de las ordenadas la lectura (en absorbancia) correspondiente a cada una de las soluciones estándar.

Las lecturas de las soluciones problema se extrapolan en la gráfica para así poder calcular su concentración de calcio en mg/dl.

El cloruro de lantano ( $\text{LaCl}_3$ ) y el EDTA  $\text{Na}_2$  se agregaron a las muestras y a los estándares para evitar que los iones de calcio sean secuestrados por los grupos fosfatos y las proteínas (43).

### 3.3.2. - Método para la cuantificación de Fósforo

Para conocer la concentración de fósforo inorgánico seguimos un método colorimétrico de la técnica modificada de Chen y Toribara (45), en donde el fósforo inorgánico de la muestra reacciona en un medio ácido con el molibdato para dar un complejo de fosfomolibdato que al ser reducido por el ácido ascórbico da una solución de color azul. La intensidad del color es proporcional a la cantidad de fósforo presente en la muestra.

#### 3.3.2.1.- Preparación de la mezcla de reactivos

Reactivo A: Ácido Ascórbico al 10 %. En un matraz de 100 ml pesar 10 gramos de ácido ascórbico, disolver y aforar con agua destilada. Conservar la solución en refrigeración (entre  $2^\circ\text{C}$  y  $10^\circ\text{C}$ ) hasta el momento de ser empleado.

Reactivo B: Heptamolibdato de Amonio al 42% en H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 0.1N. En un matraz aforado de 1000 ml agregar 500 ml de agua destilada, mantenerlo en un baño de hielo. Medir 27.7 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado y agregarlo en forma lenta y por las paredes, al terminar de agregar el ácido, sacar el matraz del baño de hielo. Finalmente, pesar 4.2 g de Heptamolibdato de amonio, agregarlo, agitar para disolverlo y aforar con agua destilada.

Se mezclaron los reactivos A y B en una proporción 1: 6 respectivamente. Solo la cantidad necesaria reactivos se preparó momentos antes de realizar el ensayo.

### 3.3.2.2.- Preparación de las muestras de suero, orina y curva estándar

#### Preparación de la curva estándar:

Para preparar las distintas concentraciones de la curva estándar, se prepararon primero la solución stock y la solución estándar de fósforo de la manera siguiente:

a.- Solución stock de Fósforo: En un matraz aforado de 100 ml pesar 439.2 mg de fosfato diácido de potasio (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) anhidro, disolver la sal y aforar con agua destilada.

b.- Solución estándar de Fósforo : Pipetear un mililitro de la solución stock en un matraz aforado de 100 ml y aforar con agua destilada.

Para preparar las concentraciones de 0, 1, 2, 3 y 4 mg/dl de fósforo de la curva estándar, se siguieron los siguientes pasos:

- a.- Rotular 5 tubos de 10 x 75 mm y agregar respectivamente a cada uno de ellos 0.0, 0.5, 1.0, 1.5 y 2.0 ml de la solución estándar.
- b.- Completar, con agua destilada, un volumen final de 5 ml  
El tubo "0" fué nuestro blanco de reactivos.

#### Preparación de las muestras de suero y de orina:

Para este ensayo fué necesario desproteinizar las muestras de suero, la manera de hacerlo es de la forma siguiente:

- a.- En un tubo de 10 x 75 mm, pipetear 200 microlitros de suero
- b.- Añadir 1.8 ml ácido tricloro acético al 10%, agitar fuertemente
- c.- Centrifugar las muestras 10 min. a 2000 rpm.
- d.- En un tubo de 10 x 100 mm separar 0.5 ml del sobrenadante.

Las muestras de orina se prepararan de la manera siguiente:

- a.- Diluir las muestras de orina 1:100, colocando en un tubo de 15 x 150 mm 0.1 ml de orina más 9.9 ml de agua destilada.

#### 3.3.2.3 .- Desarrollo de la técnica para la determinación de Fósforo

- a.- Numerar una serie de tubos de 10 x 100 mm en el orden siguiente; empezando con el blanco de reactivos, seguida de los estándares, las muestras de suero y de orina.

- b.- En el tubo correspondiente. Agregar 0.5 ml de estándar, sobrenadante de la muestra de suero o dilución de la orina, según sea el caso.
- c.- Añadir a cada uno de los tubos un mililitro de agua destilada y 2.5 ml de la mezcla de reactivos.
- d.- Agitar e incubar una hora a 37°C, en baño maría y con agitación.
- e.- Al término de la incubación, leer en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 830 nm, ajustando a cero de absorbancia con el blanco de reactivos.
- f.- Para calcular la concentración de fósforo de las muestras, se graficó las lecturas de los estándares, poniendo en el eje de las abscisas la concentración en mg/dl y en el eje de las ordenadas la lectura en absorbancia. Las absorbancias de las muestras de suero se extrapolan en la gráfica y obtenemos la concentración de fósforo en mg/dl. Para las muestras de orina, extrapolamos en la gráfica las lecturas en absorbancia, y el resultado lo multiplicamos por el factor de dilución y por el volumen de la muestra correspondiente para obtener el resultado en mg/vol.

### 3.3.3. - Método para la cuantificación de Creatinina

Para la determinación de creatinina se utilizó el auto analizador Beckman, modelo 2. En este método la creatinina reacciona en un medio alcalino con el ácido pícrico (reacción de Jaffe) para producir un complejo de color rojizo, la intensidad del color es proporcional a la concentración de creatinina.

Por este método se lee el suero en forma directa y la orina solo hay que diluirla. La proporción recomendada para la orina de 24 horas es de 1:20 y para la orina de 2 horas es de 1:5.

### 3.3.3.1.- Técnica para la cuantificación de Creatinina en orina

- a.- Pipetear en un tubo de 20 x 150 mm, 0.5 ml de orina
- b.- Agregar 9.5 ml de agua destilada para lograr una dilución 1:20
- c.- Mezclar
- d.- De la dilución 1:20, tomar 25 microlitros para determinar la concentración en el equipo automatizado Beckman
- e.- El resultado que se obtiene esta expresado en mg/dl, por lo tanto, para conocer la cantidad de creatinina presente en la muestra , se multiplica el resultado obtenido por el factor de dilución y por el volumen de orina excretado.

### 3.3.3.2.-Técnica para la cuantificación de Creatinina en suero

Tomar 25 microlitros de suero y determinar directamente la concentración de creatinina en el equipo Beckman. El resultado que mostró el equipo es en mg/dl.



### 3.3.4. - Método para la cuantificación de AMPc urinario

Para la cuantificación del AMPc Urinario (AMPcU) se empleó el método de radioinmunoanálisis (RIA). Usando el anticuerpo (Ac) BR-1 producido en conejo, obsequiado por la "Washington University School of Medicine St. Louis Mo.", y el derivado radiactivo MET-sAMPc-I<sup>125</sup>, preparado en el departamento de Nefrología y Metabolismo Mineral del Instituto Nacional de la Nutrición "Salvador Zubirán".

Para el desarrollo del método fue necesario la elaboración de los siguientes reactivos:

a.- Buffer de acetato de sodio 50 mM a pH de 6.2: - Pesar 6.8 g de acetato de sodio, se diluye en aproximadamente 800 ml de agua destilada y se aforan a un litro. Se ajustar el pH a 6.2 con ácido acético glacial.

b.- Preparación del Ac BR-1: - Diluir el antisero BR-1 1: 25,000, tomando 60 microlitros del antisero y añadiendo 15 ml del buffer de acetato. Recordar que el antisero se encontraba en congelación en tubos con 60 microlitros del mismo, se recomienda medir primero el volumen de buffer y de este tomar un mililitro para hacer una premezcla con el antisero, enseguida sacarlo totalmente del tubo con una pipeta, No decantar, lavar el tubo otras tres veces para así lograr menos pérdida de Ac. Finalmente, mezclar en la cantidad total del buffer.

c.- Preparación del TME-sAMPc-I<sup>125</sup>: - De acuerdo con la eficiencia del marcado, se calculó la cantidad para diluirlo y usarlo en el ensayo, de tal forma, se tengan aproximadamente 11,000 cpm en un volumen de 200 microlitros.

d.- Preparación del Buffer MES: - Pesar 976 mg de MES, diluirlo en aproximadamente 150 ml de agua destilada, aforar a 250 ml, ajustar el pH a 6.2 con NaOH 1N. Al final se obtuvo el buffer MES 20 mM con pH de 6.2.

e.- Estándar de AMPc: - Se prepararon concentraciones de la sal sódica del AMPc que van desde 0.25 picomolar (pmol) a 10 pmol por tubo. La solución estándar la encontramos ya preparada, en congelación, y en tubos conteniendo un mililitro de la solución.

f.- Agente Precipitante: - Es una IgG humana extraída del suero humano con sulfato de amonio. Es una mezcla de varias IgG's sin purificación. El propósito de este anticuerpo o mezcla de anticuerpos es para precipitar los complejos Ag-Ac.

g.- Solución de Sulfato de Amonio  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ : - Partiendo de una solución saturada de sulfato de amonio, se preparó una solución al 60 % poco antes del ensayo y en la cantidad exacta que se necesite. Para tal finalidad, se toman 6 partes de la solución saturada y se añaden 4 partes de agua destilada.

### 3.3.4.1.-Técnica para el RIA de AMPc Urinario

Para llevar a cabo este ensayo fue necesario tener las muestras de orina totalmente descongeladas. Para que la concentración de las muestras esté dentro del rango lineal de la curva estándar, estas se diluyeron 1:25 con la solución buffer de acetato. La manera de hacer la dilución es la siguiente:

En un tubo de 10 x 75 mm, se pipetea 40 microlitros de la muestra de orina y se añaden 960 microlitros de la solución buffer de acetato de sodio.

Para poder determinar la concentración de AMPc presente en la orina, se procesaron simultáneamente las muestras y las 5 soluciones estándar.

Para una mayor precisión en los resultados, las muestras y las soluciones estándar se trabajaron por triplicado.

También se incluyeron los siguientes tubos para poder efectuar los cálculos de los resultados:

- a.- Un tubo con únicamente 200 microlitros de la solución radiactiva (MET-sAMPc-I<sup>125</sup>) para obtener las cuentas totales. A este tubo le llamamos "Tc".
- b.- Un tubo con únicamente la solución amortiguadora y el derivado radiactivo (TME-sAMPc-I<sup>125</sup>). Este tubo es para determinar la unión inespecífica del derivado radiactivo y lo llamamos "Co".
- c.- Un tubo con la solución amortiguadora, el anticuerpo (Ac) y el derivado radiactivo (TME-sAMPc-I<sup>125</sup>). Esto es, para establecer el porcentaje de unión máxima entre el Ac y el TME-sAMPc-I<sup>125</sup>. A este tubo lo llamamos "To".

En el ensayo de las muestras y de los estándares se llevó a un volumen final de 500 microlitros. Para cada uno de los tubos de las muestras problema se agregaron los siguientes reactivos:

- a.- 150 microlitros de la solución amortiguadora de acetato de sodio pH 6.2.
- b.- 50 microlitros de la dilución 1:25 de la muestra de orina.
- c.- 100 microlitros del anticuerpo (Ac) en una dilución 1:25,000.

d.- 200 microlitros de TME-sAMPc-I<sup>125</sup> conteniendo de 11,000 a 15,000 cpm.

Para el ensayo de la curva estándar, se sustituyó únicamente el volumen de la muestra diluida por el volumen correspondiente a cada una de las soluciones estándar y se agregaron los demás reactivos como se agregaron en las muestras problema.

En la Tabla 2 se muestra esquemáticamente el protocolo del ensayo para el radioinmunoanálisis (RIA) del AMPcU.

Después de añadidos todos los reactivos, se agitó perfectamente cada uno de los tubos y se dejaron incubar a 4°C, con agitación permanente, durante 24 horas.

Terminada la incubación:

- a.- Se agregó a cada uno de los tubos, a excepción del tubo "Tc", 100 microlitros del agente precipitante (IgG humana) y 2.5 ml de sulfato de amonio al 60 %. Esto tuvo como objeto separar los complejos Ag-Ac del derivado radiactivo que se encontraba libre.
- b.- Centrifugar a 2500 rpm durante 20 minutos y a 4°C
- c.- Se decantó el sobrenadante
- d.- Se leyó la radiación presente en el precipitado usando para tal efecto un contador para radiaciones gamma.

Tabla 2. - Protocolo esquemático para el RIA del AMPcU.

Tubo	Solución Amortiguadora	Estándar (pmol/tubo) Muestra	Anticuerpo	TME-sAMPc-I <sup>125</sup>	cpm
Tc	-----	-----	-----	200 µl	
Co	300 µl	-----	-----	200 µl	
To	200 µl	-----	100 µl	200 µl	
St. 0.25	195 µl	5 µl	100 µl	200 µl	
St. 0.50	190 µl	10 µl	100 µl	200 µl	
St. 1.00	180 µl	20 µl	100 µl	200 µl	
St. 2.00	160 µl	40 µl	100 µl	200 µl	
St. 4.00	120 µl	80 µl	100 µl	200 µl	
St. 6.00	80 µl	120 µl	100 µl	200 µl	
St. 10.00	-----	200 µl	100 µl	200 µl	
Muestra	150 µl	50 µl	100 µl	200 µl	

- a) Incubar a 4°C durante 24 hrs. con agitación constante
- b) - Al término de la incubación, agregar 100 µl de IgG humana a cada uno de los tubos, a excepción de del tubo Tc, agitar
- c) - Agregar a partir de Co 2.5 ml de sulfato de amonio al 60 %, agitar
- d) - Centrifugar a 2,500 rpm durante 20 minutos a 4°C
- e) - Decantar el sobrenadante de inmediato
- f) - Contar la radiación de cada uno de los tubos

Para calcular la concentración de las muestras, fué necesario transformar las lecturas obtenidas en cpm a % de unión (34), lo cual se logró empleando los siguientes cálculos y fórmulas:

$$Tc - Co = Tc'$$

Tc' = Cantidad de radiactividad neta aplicada a cada tubo

$$To - Co = To'$$

To' = Unión Máxima ( Unión Neta de Ac - TME-sAMPc-I<sup>125</sup>)

To' / Tc' x 100 = % de Unión Máxima ( Lo ideal es de 25 a 35 %)

Para calcular el % de unión de las muestras aplicamos la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{cpm Problema} - \text{cpm Co}}{\text{cpm To} - \text{cpm Co}} = \frac{\text{cpm Problema} - \text{cpm Co}}{\text{cpm del To}'} = \% \text{ de Unión}$$

Para el cálculo del % de unión de los estándares, sustituimos en la formula las cpm del problema por las cpm del estándar.

Los datos obtenidos de la curva estándar se grafican en un papel semilogarítmico, colocando en el eje de las abscisas la concentración del AMPc (en picomoles/tubo) y en el eje de las ordenadas el porcentaje de unión correspondiente.

La concentración de AMPc (en pmol/tubo) presente en las muestras problema se obtuvo extrapolando los resultados de % de unión en la curva estándar y multiplicado por la dilución y el volumen total de la muestra.

Para expresar los resultados como nanomoles de AMPc/mg de creatinina (nmol AMPc/mg Cr), empleamos la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{pmol}}{\text{tubo}} \times \frac{\text{nmol/ml} \times \text{dil.} \times \text{vol.}}{1000 \text{ pmol} \times \text{mg de Cr} \times \text{vol.}} = \frac{\text{nmol AMPc}}{\text{mg Cr.}}$$

### 3.3.5. - Método para el Urocultivo

Para llevar a cabo el urocultivo se utilizaron los medios de cultivo, agar Sangre y agar MacConkey.

Las pruebas bioquímicas empleadas para la identificación de las enterobacterias fueron: TSI, LIA, SIM, Citrato de Simmons, Urea / Sacarosa, Ornitina y Voges – Proskauer. Para la identificación de los cocos Gram positivos se usaron las pruebas de; Catalasa, Coagulasa, Manitol, Bilis Esculina, Optoquina (49,50).

### Técnica para el Urocultivo

Con la muestra de orina adecuada para el urocultivo, se siguió el siguiente proceso:

- a.- Se tomó, con una asa calibrada y estéril, 0.01 ml de la muestra de orina y se colocó en el centro de la caja de pétri de agar sangre, se extendió en forma radial en todo el medio.
- b.- Se tomó, con una asa estéril, otra porción de orina de la misma muestra para sembrarla ahora en forma de primo-aislamiento en el agar Mac Conkey.
- c.- Se incubaron a 37°C por 24 hrs.
- d.- Al término de la incubación, se observó si había o no crecimiento bacteriano. Si fuera lo último, se siguió incubando otras 24 hrs. a 37°C.
- e.- En las cajas de agar sangre con crecimiento, se contaron las colonias y se les practicó una tinción de Gram. Se revisó si en la caja correspondiente de agar Mac Conkey había crecimiento bacteriano.
- f.- Para la identificación de los bacilos Gram negativos, se emplearon la siguiente batería de pruebas biquímicas: TSI, LIA, Citrato de Simmons, SIM, Ornitina, Urea / Sacarosa y Voges-Proskauer.
- g.- Para la identificación de los cocos gram positivos se emplearon las siguientes pruebas: Catalasa, Coagulasa, Manitol, Bilis Esculina, Optoquina.



### 3.4.- Análisis Estadístico

Para el cálculo de los rangos de referencia se empleó un intervalo de confianza en donde se incluye al 95 % de la población ( $\alpha = 0.05$ ).

El análisis estadístico empleado para el trabajo fue por la comparación de medias muestrales, usando para ello la distribución t-Student (48).

## CAPITULO IV

### RESULTADOS

#### 4.1. - Grupo Control

Los urocultivos practicados a cada uno de los voluntarios del grupo control resultaron sin desarrollo bacteriano después de 48 horas de incubación.

De las 10 muestras de orina inoculadas con *E. coli*, a las cuales se les agregó HCl como antibacteriano, los resultados de los urocultivos fueron sin desarrollo bacteriano después de 48 horas de incubación. Para no dejar duda de lo letal que resultó la cantidad de ácido empleada, se inocularon otras 5 muestras de orina con *E. coli*, pero en esta ocasión agregando 0.050 ml de HCl, la mitad de la cantidad de ácido agregado a las muestras de trabajo. Los resultados de los urocultivos fueron: sin desarrollo des pues de 48 horas de incubación.

Los resultados promedio de calcio, fósforo, creatinina, AMPc obtenidos en las muestras de suero, orina de 2 horas y orina de 24 horas se presentan en la Tabla 3. Aquí también se observan los rangos de referencia, calculados para cada uno de los metabolitos, empleando para ello un intervalo de confianza del 95 % de la población ( $\alpha = 0.05$ ).

Tabla 3. - Se muestran los resultados obtenidos para calcio, fósforo, creatinina y AMPcU en las muestras de suero y orina del grupo control.

Metabolito	Media ( $\bar{x}$ )	DS	Rango ( $\alpha=0.05$ )
Calcio Sérico	9.2 mg/dl	0.56	8.1 – 10.33 mg/dl
Calcio Urinario de 24 hrs.	148.8 mg/vol	51.6	45.0 – 252.0 mg/vol
Calcio Urinario de 2 hrs.	10.4 mg/vol	4.3	1.8 – 19.0 mg/vol
Fósforo Sérico	3.83 mg/dl	0.34	3.10 – 4.52 mg/dl
Fósforo Urinario de 24 hrs.	621 mg/vol	218	185 – 1057 mg/vol
Fósforo Urinario de 2 hrs.	56.4 mg/vol	18.0	20.4 – 92.4 mg/vol
Creatinina Sérica	0.8 mg/dl	0.15	0.49 – 1.10 mg/dl
Creatinina Urinaria de 24 hrs.	1286 mg/vol	371	543 – 2029 mg/vol
Creatinina Urinaria de 2 hrs.	133 mg/vol	51	31 – 236 mg/vol
AMPc Urinario de 24 hrs.	2.95 nmol/mgCr	0.88	1.18 – 4.72 nmol/mgCr
AMPc Urinario de 2 hrs.	2.75 nmol/mgCr	1.22	0.31- 5.19 nmol/mgCr

Todos los urocultivos del grupo control resultaron negativos.

Al comparar los valores de referencia obtenidos en las muestras de suero con los reportados en la literatura, se observa que los valores de nuestro grupo control son casi idénticos a los reportados por: S. Khourg, J. W. Shaw, Nistrup, Broadus y colaboradores. Cabe mencionar que estos investigadores usaron los mismos métodos empleados en el trabajo. En la Tabla 6, del apéndice, se muestran los valores de referencia reportados en la literatura para estos metabolitos.

Al comparar los valores de referencia obtenidos para el calcio y fósforo urinario con los reportados en la literatura (25,28,41,47), se observa que los primeros corresponden a un grupo de pacientes sanos con una dieta abundante en estos minerales. Para una adecuada obtención de valores de referencia para calcio y fósforo urinario, Jorgen Thode (39) recomienda, a los voluntarios sanos del grupo control, deben llevar una dieta no abundante en alimentos que contengan calcio y fósforo. Nuestro grupo control llevó una dieta libre, por lo tanto, esta pueda ser la causa que justifique los resultados.

Los valores de referencia obtenidos para la creatinina urinaria fueron casi idéntico a los valores de referencia que reporta Nistrup, Broadus, Todd Sanford y colaboradores (18,19,28,47).

#### 4.2. - Pacientes con Sospecha de Infección de las Vías Urinarias

Los resultados de los urocultivos dieron lugar a que este grupo se subdividiera en tres subgrupos, esta nueva clasificación estuvo en función del número de colonias desarrolladas en cada uno de los urocultivos.

La forma de reagrupar a los pacientes fue la siguiente:

- A.- Pacientes con sospecha de infección con un urocultivo negativo.
- B.- Pacientes con sospecha de infección con un urocultivo positivo, pero con una cuenta bacteriana inferior a 100,000 UFC (Unidades Formadoras de Colonia).
- C.- Pacientes con sospecha infección con un urocultivo positivo, pero con una cuenta bacteriana superior o igual a 100,000 UFC.

De los urocultivos positivos, las bacterias aisladas fueron: *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoneae*, *Enterobacter aerogenes*, *Staphylococcus coagulasa* positivo y levaduras.

La bacteria aislada en el 60 % de los casos fue la *Escherichia coli*, y se observó el crecimiento de las levaduras asociadas siempre alguna enterobacteria (cultivos mixtos).

Los resultados promedio para calcio, fósforo y creatinina obtenido en los tres subgrupos se presentan en la Tabla 4.

En lo que respecta al AMPcU, los resultados promedio obtenidos, para las muestras tratadas y no tratadas con HCl, en cada uno de los tres subgrupos, se presentan en la Tabla 5. Y en las figuras 8, 9 y 10 se comparan gráficamente los resultados de los subgrupos frente al AMPcU promedio del grupo control.

Al comparar estadísticamente el AMPcU promedio del grupo control con el AMPc promedio obtenido en las muestras de orina tratadas y no tratadas con HCl de los subgrupos A y B, se observó una diferencia no significativa (ver figuras 8,9).

En el subgrupo C, el resultado promedio de AMPcU ( $3.04 \pm 0.71$  nmol/mgCr), obtenidos en las muestras de orina tratadas con HCl, no presenta una diferencia significativa con el valor promedio de AMPcU del grupo control. Sin embargo, para el resultado promedio de AMPcU ( $3.69 \pm 1.26$  nmol/mgCr) obtenido en las muestras de orina no tratadas con HCl, si presenta una diferencia significativa al compararlo con el valor promedio de AMPcU ( $2.95 \pm 0.88$  nmol/mgCr) del grupo control (ver figura 10).

Como se mencionó anteriormente, la bacteria responsable del 60 % de los urocultivos positivos (urocultivo  $\geq 100,000$  UFC) fue la *E.coli*. Si se agrupan los resultados correspondientes de AMPcU de las muestras de orina en los que se identificó a este microorganismo se obtuvo lo siguiente:

Un AMPcU promedio de  $3.20 \pm 0.81$  nmol/mgCr para las muestras de orina tratadas con HCl. Y un AMPcU promedio de  $3.88 \pm 1.02$  nmol/mgCr para las muestras de orina no tratadas con HCl.

Estos resultado de AMPcU fueron mayores a los resultados correspondientes obtenidos en el subgrupo C, y se observa que en las muestras de orina no tratadas con HCl presentaron el AMPcU promedio más alto ( $3.88 \pm 1.02$  nmol/mgCr) determinado en el trabajo. Una representación gráfica de la comparación de los resultados promedio de AMPcU entre el grupo control, subgrupo C y los obtenidos en las muestras con *E. coli*, lo podemos observar en la Figura 11.

Tabla 4. - Resultados de calcio, fósforo y creatinina obtenidos en los subgrupos A, B y C.

Metabolito	Subgrupo A (Urocultivo Negativo)	Subgrupo B (Urocultivo < a 100,000 UFC)	Subgrupo C ( Urocultivo $\geq$ a 100,000 UFC )
Calcio Sérico	$8.98 \pm 0.73$ mg/dl	$9.3 \pm 0.53$ mg/dl	$9.1 \pm 0.69$ mg/dl
Calcio Urinario	$156 \pm 37$ mg/vol	$184 \pm 48$ mg/vol	$178 \pm 56$ mg/vol
Fósforo Sérico	$3.64 \pm 0.87$ mg/dl	$3.61 \pm 0.66$ mg/dl	$3.77 \pm 0.72$ mg/dl
Fósforo Urinario	$608 \pm 227$ mg/vol	$623 \pm 263$ mg/vol	$712 \pm 243$ mg/vol
Creatinina Sérica	$0.63 \pm 0.12$ mg/dl	$0.79 \pm 0.19$ mg/dl	$0.82 \pm 0.15$ mg/dl
Creatinina Urinaria	$1312 \pm 239$ mg/vol	$1298 \pm 324$ mg/vol	$1343 \pm 386$ mg/vol

Tabla 5. - Resultados de AMPc de las muestras de orina que fueron tratadas y no tratadas con HCl, pertenecientes a los pacientes de los subgrupos A, B y C.

Metabolito	Subgrupo A (Urocultivo Negativo)	Subgrupo B (Urocultivo < a 100,000 UFC)	Subgrupo C ( Urocultivo ≥ a 100,000 UFC )
AMPcU ( con HCl)	2.92±0.90 nmol/mgCr	2.89 ± 0.96 nmol/mgCr	3.04±0.71 nmol/mgCr
AMPcU ( sin HCl)	2.97±1.14 nmol/mgCr	2.98 ± 1.18 nmol/mgCr	3.69±1.26 nmol/mgCr

Resultados promedio de AMPcU del subgrupo A vs el AMPcU promedio del Grupo Control

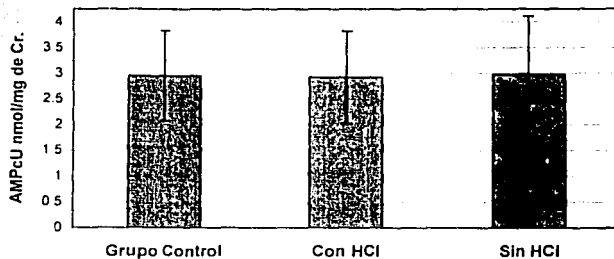


Figura 8. - Se observan diferencias muy pequeñas de AMPcU entre el grupo control y el subgrupo A. Al comparar estadísticamente estas diferencias, resultaron ser no significativas.



**Resultados promedio de AMPcU del Subgrupo B vs AMPcU promedio del Grupo Control**

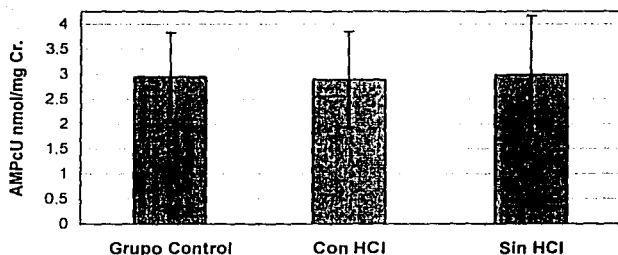


Figura 9. - Se observa que la diferencia de AMPcU promedio entre el grupo control y el subgrupo B son muy pequeñas y estadísticamente resultaron ser no significativas.

**Resultados promedio de AMPcU del Subgrupo C vs el AMPcU promedio del Grupo Control**

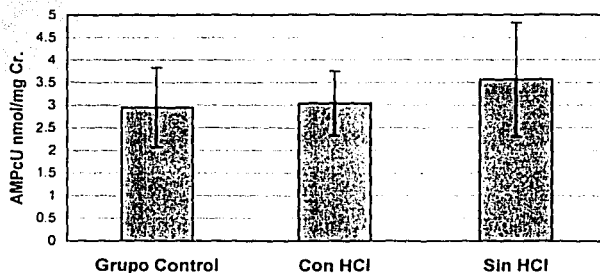


Figura 10. - Se observan las diferencias del AMPcU entre el grupo control y el subgrupo C, al evaluarlas estadísticamente resulta ser significativa cuando las muestras no son tratadas con HCl.

**Cultivos con E.coli vs Grupo Control y Subgrupo C (sin HCl)**

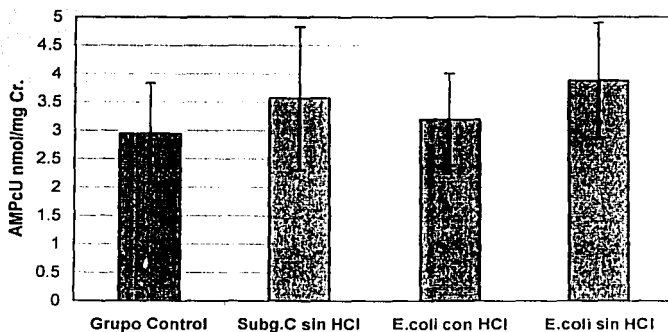


Figura 11. - Se observa el AMPcU promedio de las muestras de orina en las que se identificó a la *E. coli* y no tratadas con HCl, muestran el valor más alto de AMPcU. La diferencia con el grupo control es estadísticamente significativa.

## CAPITULO V

### DISCUSIÓN

En este capítulo analizaremos los resultados obtenidos en el grupo control y en el grupo con sospecha de infección de las vías urinarias.

#### 5.1. - Resultados de los Urocultivos

Los urocultivos negativos obtenidos en los distintos grupos de pacientes, indican que el AMPcU no puede ser afectado o alterado por las bacterias.

Los urocultivos negativos obtenidos en las muestras inoculados con *E. coli* y tratadas con HCl, indican que la cantidad de ácido agregado a cada una de las muestras fue la adecuada para inhibir en su totalidad el crecimiento bacteriano. La cantidad de ácido agregado fue de 0.100 ml por cada 5.0 ml de muestra de orina, quedando una concentración final del 2 % para el HCl y un pH de 1.

Broadus (19) usó este mismo procedimiento para eliminar las alteraciones en los resultados de AMPcU por el efecto o influencia de las bacterias presentes en las muestras de orina.

Adicionalmente, el pH ácido generado por el HCl, va a evitar la precipitación de las sales de calcio y fósforo.

## 5.2. - Resultados del Grupo Control

Los resultados séricos obtenidos para calcio, fósforo y creatinina, corresponden a un grupo de pacientes sanos, sin alteraciones en el funcionamiento renal y mantienen una adecuada homeostasis de calcio y fósforo.

Con respecto a los resultados de AMPcU para las muestras de 24 horas, el resultado promedio obtenido ( $2.95 \pm 0.88$  nmol/mgCr) es muy semejante al reportado como referencia ( $2.70 \pm 1.03$  nmol/mgCr) por el laboratorio del departamento de Nefrología (34), lugar donde se llevo a cabo el estudio.

Al comparar el resultado promedio de AMPcU de 24 horas obtenido con el reportado por E. Broadus ( $3.11 \pm 0.78$  nmol/mgCr) (18), y Nistrup ( $3.0 \pm 1.1$  nmol/mgCr) (28) se observa una pequeña diferencia, al hacer la evaluación estadística de los resultados promedio se obtiene una diferencia no significativa.

Los resultados obtenidos de AMPcU para las muestras recolectadas en 2 horas ( $2.75 \pm 1.22$  nmol/mgCr), son muy semejantes a los resultados de AMPcU obtenidos en muestras recolectadas en 24 horas ( $2.95 \pm 0.88$  nmol/mgCr). Si se compara estadísticamente los resultados de AMPcU en las muestras de 2 y 24 horas, esta diferencia resultó ser no significativa.

Resultados muy semejantes a los nuestros son los reportados por J. Thode, S. Nistrups, J. W. Shaw y colaboradores (39,40,41), ellos hicieron la determinación de AMPcU en muestras de orina recolectadas en periodos de 1, 4, 20 y 24 horas, sin

encontrar diferencias significativas. El método usado por estos investigadores, para la cuantificación del AMPcU, fue por medio de la proteína de unión.

La evaluación estadística en el contenido de AMPcU en las muestras correspondientes a los distintos tiempos de recolección, deja la alternativa de poder usar periodos más cortos, haciendo la determinación de AMPcU más practica y eficiente, debido a la comodidad y precisión que tendría el paciente para recolectar las muestra de orina.

Para la obtención de un buen volumen urinario es muy importante mantener una adecuada hidratación del paciente, en los periodos cortos de recolección es esencial este concepto. En el trabajo se les pidió a los pacientes tomar dos vasos de agua (400 ml aproximadamente), J. W. Shaw, S. Nistrup, y colaboradores (39,40,41) recomiendan tomar 10 ml de agua por cada kilogramo de peso antes o durante el periodo de recolección.

### 5.3. - Grupo de Pacientes con Sospecha de Infección Urinaria

Con respecto al calcio, fósforo y creatinina sérica y urinaria, se encuentran en los rangos de referencia obtenidos en el grupo control. Indicando que estos pacientes tenían o tienen un buen funcionamiento renal, con un adecuado metabolismo del calcio y fósforo.

En lo referente a los resultados promedio de AMPcU obtenidos en las muestras de orina tratadas y no tratadas con HCl de los subgrupos A, B y C, se observo lo siguiente:

Al comparar los resultados de AMPcU obtenidos en los tres subgrupos en función del número de bacterias presente en cada muestra (ver tabla 5), se observa una tendencia en ir aumentando la concentración de AMPcU conforme aumenta el número de bacterias presentes en la orina. Esto indica que las bacterias expulsan al medio exterior el AMPc. Este resultado coincide con el reporte de G. A. Robison, R. S. Makman, E.W. Sutherland, A.G. Tkachenko y colaboradores(13,37,38), quienes demostraron la habilidad de la *E. coli* para expulsar al medio exterior al AMPc.

Con estos resultados se puede inferir lo siguiente:

En las muestras de orina infectadas con *E.coli* se obtendrán resultados de AMPc más altos debido a la producción del AMPc bacteriano, el cual es expulsado al medio extracelular para sumarse a la cantidad AMPc ya existente en la muestra de orina.

Al comparar los resultados de AMPcU obtenidos en las muestras tratadas con HCl, con los obtenidos en las muestras no tratadas con HCl (ver Tabla 5), se observa que las desviaciones estándar (DS) de las orinas tratadas con HCl son menores o más pequeñas a las DS de las orinas no tratadas con HCl. Esto indica que en las orinas infectadas con bacterias darán resultados muy variables, y pueden afectar en forma significativa los resultados de AMPcU. Esta variabilidad en los resultados coincide con los reportes de Broadus (19), este investigador recomienda recolectar la orina de 24 horas en un recipiente que contenga 20 ml HCl 6 N, para evitar las variaciones en la concentración de AMPcU.

Resultados bajos de AMPcU (0.98 nmol/mgCr) se observaron en dos muestras de orina no tratadas con HCl, y que correspondían a urocultivos mixtos en donde se aislaron levaduras asociadas a *E. coli* o asociada a enterobacter.

En el análisis general de los resultados se puede mencionar:

La presencia de gérmenes en las vías urinarias tienden a incrementar la concentración del AMPcU, sin modificar significativamente el contenido promedio del AMPcU, siempre y cuando a las muestras de orina se les agregue HCl y/o cuando las cuentas bacterianas en las muestras de orina sean menores a 100,000 UFC.

Si no se agrega el HCl a las muestras de orina y se presentan cuentas bacterianas mayores o iguales a 100,000 UFC, el AMPc tiende a aumentar por arriba del promedio normal en forma significativa.

Si se analiza el contenido de AMPc en las muestras de orina con *E.coli*, se observa también un incremento significativo para las muestras de orina que no fueron tratadas con HCl.

Resultados bajos de AMPcU se obtuvieron en los cultivos mixtos en donde se aisló a las levaduras asociadas con alguna enterobacteria.

Estas dos propiedades de las bacterias, de poder aumentar o disminuir la concentración del AMPcU, puede influir significativamente, por lo tanto, para obtener resultados fidedignos de AMPcU, el paciente deberá presentar previamente

un urocultivo negativo y a la muestra de orina se le agregará HCl como conservador e inhibidor bacteriano.

Una limitante que enfrentamos en el trabajo fue debido al número de urocultivos positivos ( $\geq$  a 100,000 UFC) obtenidos, no fue lo suficientemente grande para poder identificar otra enterobacteria, diferente a la *E.coli*, u otro genero bacteriano, en cantidad suficiente que nos permitiera hacer una comparación estadística con el grupo control, y de esta forma poder determinar si el genero bacteriano pueda ser un factor que influya significativamente en la concentración del AMPcU.

Comparando el radioinmunoanálisis (RIA) de la PTH con el RIA del AMPcU, este ultimo resulta eficiente y económico porque en la cuantificación del AMPcU solo se evalúan los fragmentos biológicamente activos de la PTH que se encuentran en circulación. La economía en la cuantificación del AMPc permite que se use como una prueba de laboratorio clínico para evaluar todos aquellos pacientes que presenten una calciuria elevada o con sospechas de un hiperparatiroidismo.

El método de RIA para AMPc es sencillo y puede ser aplicado en cualquier laboratorio que cuente con el equipo necesario para llevar a cabo el RIA en general. La alta sensibilidad y especificidad del método esta dada por el marcador radiactivo y el anticuerpo, permitiendo cuantificar cantidades muy pequeñas del metabolito en



estudio, del orden de picomoles. El anticuerpo empleado es de alta especificidad para el AMPc, la interferencia de otras sustancias en el análisis es menor al 0.1%, esto permite emplear las muestras sin una purificación previa.

La cuantificación de AMPcU también se usa para monitorizar y evaluar los procesos pre, trans y post quirúrgicos de las paratiroides.

## CAPITULO VI

### CONCLUSIONES

- La presencia de las bacterias en las vías urinarias si alteran significativamente la concentración del AMPcU.
- La presencia de la *E.coli* en las muestras de orina, las cuales no fueron tratadas con HCl, da un aporte de AMPc bacteriano y aumenta en forma significativa la concentración de AMPcU.
- El tratamiento de las muestras de orina con HCl es necesario para eliminar las variaciones significativas ocasionadas por las bacterias.
- Para la obtención de resultados confiables y fidedignos en la cuantificación del AMPcU, el paciente deberá presentar un urocultivo negativo, previo a la determinación del nucleótido. Y la muestra de orina, destinada para el ensayo del AMPc, deberá ser tratada con HCl, por lo tanto, la recolección de la muestra de orina de 24 horas deberá efectuarse en un recipiente que contenga 20 ml de HCl al 6 N.

## CAPITULO VII

### Apéndice

#### 7.1. - Equipos y Materiales de Laboratorio

##### 7.1.1. - Equipos de Laboratorio

- Agitador mecánico, Aurbach
- Agitador magnético Mag Mix
- Agitador Vortex, Genie K 550 G
- Auto analizador de Creatinina 2, Beckman
- Balanza Analítica, Mettler H15
- Baño Maria, con agitación integrada
- Balanza Granataria
- Campana de Extracción
- Centrifuga de mesa IEC HN-SII, Damon División
- Centrifuga refrigerada PR 6000, Damon División
- Contador de radiaciones gamma Gammacord II, AMES
- Congelador Revco (- 20°C)
- Espectrofotómetro de Absorción Atómica PYE UNICAM, modelo SP90
- Espectrofotómetro CARLS ZEISS, modelo PM QII
- Estufa Bacteriológica
- Microscopio Óptico, ZEISS K7

### 7.1.2. - Materiales de Laboratorio

- Asa Calibrada
- Frascos de plástico de 100 ml
- Frascos de plástico de 1000 ml
- Frascos de plástico de 4000 ml
- Gradilla de acrílico para 300 tubos de 10 x 75 mm
- Gradillas de alambre para 72 tubos
- Matraces aforados de 100 ml
- Matraces aforados de 1000 ml
- Matraces Erlen Meyer de 50 ml
- Mechero
- Pipeta Automática Gilson P- 20
- Pipeta Automática Gilson P- 200
- Pipeta Automática Gilson P- 1000
- Pipeta Automática Gilson P- 5000
- Probeta graduada de 50 ml
- Probeta graduada de 100 ml
- Probetas graduadas de 1000 ml (de plástico)
- Probetas graduadas de 2000 ml (de plástico)
- Puntas desechables amarillas para P- 20 y P- 200
- Puntas desechables azules para P- 1000

- Puntas desechables blancas para P- 5000
- Repipetador con escala de 0.0 a 10.0 ml

### 7.1.3. - Reactivos

- Acetato de sodio de J.T. Baker
- Ácido ascórbico de Sigma Chemical
- Ácido clorhídrico, HCl de J.T. Baker
- Ácido sulfúrico, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, de J.T. Baker
- Ácido tricloro acético de J.T. Baker
- Alfa naftol de Sigma Chemical
- Anhídrido acético de J.T. Baker
- Anticuerpo BR-1, específico contra el AMPc
- S-AMPc-MET de Sigma Chemical
- Buffer MES de Sigma Chemical
- Fosfato monobásico de potasio anhidro, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> de J.T. Baker
- Heptamolibdato de amonio, (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub> Mo<sub>7</sub> O<sub>24</sub>. 4H<sub>2</sub>O de J.T. Baker
- Hidróxido de sodio, NaOH de J.T. Baker
- Reactivo de indol de E. Merck
- Rojo de metilo de E. Merck
- Sulfato de amonio (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, de J.T. Baker

#### 7.1.4. - Medios de Cultivo

- Gelosa Sangre            de Bioxon
- Gelosa Mac Conkey    de Bioxon
- Citrato de Simmons    de Bioxon
- LIA                        de Bioxon
- Ornitina                 de Bioxon
- SIM                        de Bioxon
- TSI                        de Bioxon
- Urea / Sacarosa        de Bioxon
- Voges – Proskauer    de Bioxon

7.2. - Tabla 6 Valores de referencia para Calcio, Fósforo y Creatinina  
(25,28,47).

METABOLITO	VALORES DE REFERENCIA
Calcio sérico	8.1 - 9.96 mg/dl
Calcio Urinario ( en orina de 24 h)	50 - 200 mg/vol
Fósforo sérico	2.4 - 4.5 mg / dl
Fósforo urinario ( en orina de 24 h)	340 - 1000 mg/vol
Creatinina sérica	0.6 - 1.2 mg/dl
Creatinina Urinaria ( en orina de 24 h)	800 - 2200 mg/vol

## BIBLIOGRAFÍA

- 1.- Stig Nistrup H. (1982) Measurement of Cyclic AMP in Clinical Investigations Acta Endocrinologica, Supplementum 249.
- 2.- Grant W. Liddle, Joel G. Harman. (1971) Cyclic Adenosine Monophosphate as a Mediator of Hormone Action. The New England Journal of Medicine, Physiology in Medicine, **285** (10): 560 – 566.
- 3.- Ira Pastan. (1972) Cyclic AMP, The Chemical Basis of Life, An Introduction to Molecular and Cell Biology. Scientific American Inc.: 314 – 322.
- 4.- Michael J. Berridge. (1985) The Molecular Basis of Communication Within the Cell. Scientific American Inc; **253** (4); 124-133.
- 5.- J.A.García Saenz. (1987) Hormonas, Mensajeros Químicos y Comunicación Celular. Editorial, Fondo de Cultura Económico. México.
- 6.- Ravi Iyengar, Lutz. (1987) Signal Transduction by G-Proteins. In: Atlas of Science: Pharmacology: 213-221.
- 7.- Lutz Birnbaumer, Juan Codina, Rafael Mattera. (1987) Signal Transduction by G Proteins. Kidney International, **32** (Suppl. 23): s-14 – s-37.
- 8.- Robert J. Lefkowitz and Marc G. Caro. (1988) Adrenergic Receptors, Minireview. The Journal of Biological Chemistry, **263** (11): 4993 – 4996.
- 9.- Elizabeth A. Woodcock and Colin I. Johnston. (1985) Renal Proximal Tubular  $\alpha$ -Adrenergic Receptor Oppose Urinary  $3,5'$ -Cyclic Adenosine Monophosphate Response to Parathyroid Hormone in Vivo. Endocrinology, **116** (3): 1085–1089.



- 10.- Alexander Levitzki. (1988) From Epinefrine to Cyclic AMP. Science: 241: 800 – 806.
- 11.- Arthur E. Broadus, Niel I. Kaminsky, Joel G. Hardman. (1970) Effects of Glucagon on Adenosine 3', 5'- Monophosphate and Guanosine 3',5'Monophosphate in Human Plasma and Urine. The Journal of Clinical Investigation: 49: 2237 – 2245.
- 12.- Monard D., Janecek. (1969) The Enzymic Degradation of 3',5'Cyclic AMP in Strains of *E. coli* Sensitive and Resistant to Catabolite Represión. Biochemical Biophys. Res. Commun.: 35 (4): 584-591.
- 13.- G. Alan Robison, Reginald W. Butcher, Earl W. Sutherland. (1971) Cyclic AMP, New York and London: Academic Press.
- 14.- Wai Yiu Cheung. (1971) Cycluc 3',5'- Nucleotide Phosphodiesterase. The Journal of Biological Chemistry: 246 (9): 2859 – 2869.
- 15.- Thomas P. Dousa (1999) Cyclic-3',5'-nucleotide phosphodiesterase isozymes in cell biology and pathophysiology of the kidney. Kidney International: 55: 29 – 62.
- 16.- Joseph A. Beavo. (1995) Cyclic Nucleotide Phosphodiesterases: Fuctional Implications of Multiple Isoforms. Physiological Reviews: 75 (4): 725-748.
- 17.- Marco Conti, Georges Nemoz, Claudio Sette. (1995) Recent Progress in Understanding the Hormonal Regulation of Phosphodiesterases. Endocrine Reviews: 16 (3): 370 – 388.
- 18.- Arthur E. Broadus, Jane E. Mahaffey, Federic C. Barter. (1977) Nefrogenous Cyclic Adenosine Monphosphate as a Parathyroid Fuction Test. The Journal of Clinical Investigation: 60: 771 – 783.

- 19.- Arthur E. Broadus. (1983) Nephrogenous Cyclic AMPc. Recent Progress in Hormone Research: 37: 667 – 701.
- 20.- Andrew L. Taylor, Bernard B. Davis. (1970) Factor Influencing the Urinary Excretion of 3',5'-Adenosine Monophosphate in Humans. Clinical Endocrinology: 130: 316 – 324.
- 21.- Joel G. Harman, James W. Davis, and Earl W. Sutherland. (1969) Effects of Some Hormonal and Other Factors on the Excretion of Guanosine 3', 5'- Monophosphate and Adenosine 3',5'- Monophosphate in rat Urine. The Journal of Biological Chemistry: 244 (23): 6354 – 6362.
- 22.- Lewis R. Chase and G.D. Aurbach. (1967) Parathyroid Function and the Renal Excretion of 3'- 5' Adenylic Acid. Proc. National Academy of Science, USA: 58: 518 – 525.
- 23.- G.D. Aurbach and Lewis R. Chase. (1970) Cyclic 3', 5' Adenylic Acid in Bone and the Mechanism of Action of Parathyroid Hormone. Federation Proceedings: 29 (3): 1179 – 1182.
- 24.- Niel I. Kaminsky, Arthur E. Broadus, Joel G. Harman. (1970) Effects of Parathyroid Hormone on Plasma and Urinary Adenosine 3',5'-Monophosphate in Man. The Journal of Clinical Investigation: 49: 2387 – 2236.
- 25.- S.Khoury and J.R. Tucci. (1984) Urinary and nephrogenous cyclic AMP and renal phosphate handling in normal subjects and patients with parathyroid dysfunction. Acta Endocrinologica: 106: 219 – 226.
- 26.- W.C. Alston, K.R. Allen and J.E. Tovey. (1980) A Comparison of Nephrogenous Cyclic AMP, Total Urinary Cyclic AMP and the Renal Tubular Maximum Reabsorptive Capacity for Phosphate in the Diagnosis of Primary Hyperparathyroidism. Clinical Endocrinology: 13: 17 – 25.
- 27.- John C. Babka. (1976) Nephrogenous Cyclic AMP Levels in Primary Hyperparathyroidism. Arch. Intern. Med.: 136 : 1140 – 1144.

- 28.- S. Nistrup Madsen, I. Badawi, F. Shonau Jorgensen. (1976) Urinary Cyclic AMP. (1976) Acta Med. Scand: 200: 195 – 199.
- 29.- Worthington G. Schenk and John B. Hanks. (1993) Interpretative Urinary Cyclic AMP Monitoring in Primary Hyperparathyroidism. Annals of Surgery: 217 (5): 547 – 594.
- 30.- Giofranco Mazzuoli. (1986) Endocrine Control of Calcium Homeostasis: The Role of Parathyroid Hormone. Endocrinology 85, G.M. Molinatti and L. Martini Editors: 187 – 197.
- 31.- J.A.Tamayo O. (1983) Homeostasis de Calcio y Fósforo, Nuevos Conceptos, Implicaciones y Perspectivas en la Clínica. Revista de Investigación Clínica: 35: 327 – 342.
- 32.- J. Rodes Teixidor, J. Guardia Massó. (1997) Medicina Interna (monografía en CD-ROM), Masson Multimedia
- 33.- P. Farreras, C. Rozman. (1992) Medicina Interna, 12ª Edición, Editorial Doyma, Barcelona.
- 34.- Gabriela de Alba M.(1985) Radioinmunoanálisis del AMPc Urinario y su Aplicación en el Diagnóstico Clínico de Padecimientos Paratiroideos.Tesis, Universidad Motolinia A.C., México D.F..
- 35.- A.L. Steiner, D.M. Kipnis, R. Utiger. (1969) Radioimmunoassay for the measurement of Adenosine 3'5' Cycle Phosphate. Proc. National Academy of Science: 64: 367 – 373.
- 36.- Hunter. (1974) Radioimmunoassay. Springer Verlag, New York Inc. 14: 1-32.

- 37.- Richard S. Makman and Earl W. Sutherland. (1965) Adenosine 3',5'-Phosphate in Escherichia Coli. The Journal of Biological Chemistry: **240** (8):1309 – 1314.
- 38.- A.G. Tkachenko and A.A. Choudinor. (1987) Energy Aspects of the Grow of Escherichia coli Synchronized by Starvation. Mikrobiologiya, **56** (1); 58-63.
- 39.- J. Thode, S. Nistrup Holmegaard and O. Siggaard. (1984) Serum Ionized Calcium, Nephrogenous and Total Urinary Cyclic AMP and Urinary Phosphate in Normal Subjects. Scan. J. Clin. Lab. Invest: **44**: 111 – 118.
- 40.-Jorgen Thode, Bendt Brock and Stig Nistrup. (1985) Urinary Cyclic AMP in Spot Urine of Healthy Children. Scand. J. Clin. Lab. Invest: **45**: 185 – 188.
- 41.- James W. Shaw, Susan B. Oldham, Leonard Rossoff. 1977 Urinari Cyclic AMPAnalized as a Fuction of the Serum Calcium and Parathyroid Hormone in the Differential Diagnosis of Hypercalcemia. The Journal of Clinical investigation: **59**: 24 – 21.
- 42.- Uroanálisis. (1984) Bioxorama. Editado por Bioxon de México: **1** (2): 13 – 24 .
- 43.- David L. Trudeau and Esther F. Freier. (1967) Determination of Calcium in Urine and Serum by Atomic Absortion Spectrophotometry. Reprinted from Clinical Chemistry: **13** (2): 101 – 114.
- 44.- Richard D. Beaty. (1979) Conceptos, Instrumentación y Técnicas de Espectrofotometria por absorción Atómica. The Perkin-Elmer Corporation. Printed in USA.
- 45.- P.S. Chen, Jr. T. Y. Toribara, and Humber Warner, (1956) Microdetermination of Phosphorus. Analitical Chemistry: **12**: 1756 – 1759.
- 46.- Cyrus H. Fiske and Yellapragada Subarow. (1925) The Colorimetric Determination of Phosphorus. The Journal of Biological Chemistry: **66** (2):375-400.

- 47.- Todd Sanford, I. Davidsohn. (1979) Diagnóstico Clínicos por el Laboratorio. 6ª Edición, Editorial Salvat, Barcelona.
- 48.- Wayne W. Daniel. (1991) Bioestadística, Bases para el análisis de las ciencias de la salud. Editorial Limusa. Sexta Reimpresión de la Tercera Edición. México.
- 49.- Mac Faddin. (1990) Pruebas Bioquímicas para la Identificación de Bacterias de Importancia Clínica. Editorial Médica Panamericana, México.
- 50.- Elmer W. Koneman, Stephen D. Allen, William M. Jandan. (1999) Diagnóstico Microbiológico. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires, Argentina.
- 51.- Lubert Stryer. (1990) Bioquímica. 3ª Edición. Editorial Reverté, Barcelona
- 52.- Arthur J. Vander. (1983) Fisiología Renal. 2ª Edición, Editorial Mc Graw-Hill, México.