



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

"IDENTIFICACION Y CUANTIFICACION DEL IOHEXOL POR  
ELECTROFORESIS CAPILAR EN MUESTRAS DE PLASMA Y  
ORINA DE RATA"

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

**Q U I M I C A**

P R E S E N T A :

**LILIANA IRENE PEREZ REYES**



EXAMENES PROFESIONALES  
FACULTAD DE QUIMICA

MEXICO, D.F.

2005



m351952



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

Jurado asignado:

Presidente	Prof. Francisco Rojo Callejas
Vocal	Prof. Araceli Patricia Peña Álvarez
Secretario	Prof. Leonila Irma Laura Escobar Pérez
1er suplente	Prof. Evangelina Camacho Frías
2º suplente	Prof. Erika María Ramírez Maya

Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, UNAM.

ASESOR



---

Dra. Leonila Irma Laura Escobar Pérez.

SUSTENTANTE



---

Liliana Irene Pérez Reyes.

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Pérez Reyes Liliana

Irene

FECHA: 25-02-05

FIRMA: 

## **Gracias Señor...**

por los días de sol y los nublados...

por las noches tranquilas y por las inquietas horas oscuras...

por la salud y la enfermedad, por las penas y las alegrías...

por las flores y las estrellas, la existencia de los niños y de las almas buenas...

por la sonrisa amable y la mano amiga...

por la soledad, por los trabajos,

por las dificultades y las lágrimas...

por todo lo que Tú sabes que me acerca a Tí

más íntimamente y que en su alternativa

me hicieron valorar tus dones...

por todo lo que me prestaste y después me pediste...

por Tu presencia maravillosa...

por tanto y tanto que continuamente me das...

## AGRADECIMIENTOS

A Dios por permitirme existir y disfrutar de sus regalos amorosos y aprender de mis tropiezos.

A mis padres Jesús y Ma. Soledad, a mis hermanas Carolina y Natalia por el gran amor, paciencia, respeto y apoyo infinitos que me han tenido.

A mis compañeros: Manuel, Martín, Margarita, Mauri, Ofe, Nadia, Rubén, Juanita, Chayo, José Antonio, Ma. Elena, Antonio, Alfonso, Arnaldo, Gregorio, Marisol, Enrique, Esteban y Gaby por su apoyo que no espera recompensa, en especial a Bety, Alain, Ana Ma., Ivonne, Rosario, Antonieta, Irene y Malena que con su ejemplo me han dado el ánimo que había perdido.

A mis compañeros de andanzas: Eleaneth, Asael, Manuel, Juan José, Liz, Xiomara, Sibila, Abraham, Luis, Juan Luis, Mariana, Eduardo, las dos Almas, Manolo, Alfredo, en especial a Juanita, Citlalli y José Luis pues me enseñaron que en los momentos difíciles el compañerismo es un don invaluable.

A mis compañeros de la Facultad: Gaby, Sigfrido, Víctor, Jorge, Adriana, Carmen, Francisco, Lety, Rosalba, Martha, Maru, Cristina, Eduardo, Manuel, Patí, las dos Normas, Diana, Bruno, Ángel, Blanca, Mireya, Edith, Natalia, especialmente a Miriam, Eli, Guille, Ubaldo, Alfredo y Oli que han estado conmigo en las buenas y en las malas.

A mis abuelitos Fernand† y Julián†, a mis tíos Lupe, Carmel†, Julián†, José†, Joaquín†, Victoria, Gabriela, Fernando, José Antonio, Aurora, Esteban, Rosario, Cristina, Pili, Paty, Fabián, Román, Javier, Teresa, Estela y Concha; a mis primos Malena, Jesús, Víctor, Belén, Misarem, Luis, Andrés, César, Fabiola, Alejandro, Mauricio, Isabel, Fernanda, Arturo, Abraham, Issac, Jacob, Julián; a mis cuñados Leonel y Adolfo.

A mis compañeros del laboratorio 510: Caro, Rolando, Ivonne, Ana, Emilio, Noe y Perla que me han permitido formar parte de un equipo multiindisciplinado y aprender de él.

A Gisela, Claudia, Susana, Alejandro, Eric, Gloria, Jorge, Israel, Luisa, Sol, Pablo, Cristians, Dianas, Ilse, Jessi, Juan, Sol, Dany, Alex, Javier, Isela, Denisse, Antonio, Christopher, Gaby que a pesar de mis ausencias los tengo siempre presentes.

Al profesor Fernando León Cedeno que con su apoyo y confianza me ayudó a dar los primeros pasos hacia este sueño.

A todos aquellos que han sido parte de mi vida pues con su presencia me han formado.

A la UNAM por todo lo que me ha dado.

En especial a la Dra. Laura Escobar pues su asesoramiento, apoyo y confianza fueron determinantes para iniciar, realizar y culminar este trabajo.

Al M. en C. Francisco Rojo Callejas y a la Dra. Araceli Patricia Peña Álvarez por las valiosas observaciones y tiempo dedicados a esta tesis.

A la Dra. Norma Bobadilla y la M. en C. Jazmín Marlen Pérez Rojas que además de aportar las muestras necesarias para realizar este trabajo, su asesoramiento técnico y apoyo incondicionales fueron una pieza importante para la culminación de esta tesis.

A la Q. F. B. Gloria García Ramírez que con su apoyo técnico me introdujo al conocimiento de la electroforesis capilar.

Esta tesis fue realizada con el apoyo de una beca del CONACYT con número Id 7484 correspondiente al proyecto "Caracterización funcional y molecular de canales catiónicos de la médula interna renal" con número 41365 M

Al Ing. Rubén Pérez de Beckman-Coulter por su apoyo técnico.

## ÍNDICE

	Pág.
<b>Abreviaturas empleadas en esta Tesis</b>	<b>1</b>
<b>Resumen</b>	<b>3</b>
<b>Introducción</b>	<b>4</b>
Electroforesis Capilar	4
Iohexol	16
Los riñones	18
<b>Objetivo</b>	<b>25</b>
<b>Hipótesis</b>	<b>25</b>
<b>Desarrollo Experimental</b>	<b>26</b>
Materiales	26
Equipo	26
Condiciones de trabajo en el laboratorio	26
Uso del equipo	26
Preparación de las disoluciones y las muestras biológicas	27
<b>Resultados</b>	<b>30</b>
Controles en plasma	32
Controles en orina	37
Determinación de la concentración del iohexol en el plasma y orina de rata sana	40
<b>Análisis Y Discusión De Resultados</b>	<b>43</b>
<b>Conclusiones</b>	<b>47</b>
<b>Perspectivas</b>	<b>48</b>
<b>Bibliografía</b>	<b>49</b>



## ABREVIATURAS EMPLEADAS EN ESTA TESIS

<b>min.</b> minutos	<b>CLAE</b> cromatografía de líquidos de alta eficiencia
<b>l</b> litro	<b>HPCE</b> High Performance Capillary Electrophoresis
<b>ml</b> mililitro ( $10^{-3}$ l)	<b>ECZ</b> Electroforesis Capilar de Zona
$\mu$ l microlitro ( $10^{-6}$ l)	<b>MEKC</b> Micellar Electrokinetic Chromatography
<b>nl</b> nanolitro ( $10^{-9}$ l)	<b>ECG</b> Electroforesis Capilar de Gel
<b>ppm</b> partes por millón	$\mu_{eo}$ movilidad electroosmótica e carga eléctrica
<b>M</b> concentración molar	$\kappa$ constante de Boltzman
<b>mM</b> concentración milimolar ( $10^{-3}$ M)	<b>T</b> temperatura
<b>kV</b> kilovoltios ( $10^3$ V)	$\zeta$ potencial z
<b>pH</b> potencial de hidrógeno	$\mu_{ap}$ movilidad aparente
<b>m</b> metro	<b>L<sub>d</sub></b> longitud de la columna desde el punto de inyección hasta el detector
<b>cm</b> centímetro ( $10^{-2}$ m)	<b>L<sub>t</sub></b> longitud total de la columna
<b>mm</b> milímetro ( $10^{-3}$ m)	<b>t</b> tiempo
$\mu$ m micrómetro, micra ( $10^{-6}$ m)	$\Delta T$ variación de temperatura
<b>°C</b> grados Celcius	$\Delta P$ variación de presión
<b>D</b> constante dieléctrica	$\lambda$ conductividad molar de la solución (en termodinámica)
<b>r<sub>D</sub></b> radio de Debye	$\lambda$ longitud de onda (en óptica)
<b>s</b> exceso de carga	$\lambda_{max}$ longitud de onda máxima (en óptica)
<b>I</b> fuerza iónica	<b>d</b> diámetro
<b>F</b> fuerza eléctrica	$\kappa_b$ conductividad del buffer
<b>q</b> carga	$\kappa_s$ conductividad de la muestra
<b>E</b> campo eléctrico	
<b>V</b> voltaje	
<b>f</b> fuerza de fricción	
$\eta$ viscosidad	
<b>r</b> radio	
$\mu_{ef}$ movilidad electroforética	
<b>v</b> velocidad	

**UV** ultravioleta

**C** concentración

**SDS** Dodecil sulfato de sodio

**ADN** Ácido desoxiribonucleico

**EI** Electrospray Ionization

**MALDI** Matriz Assisted Laser

Desorption Ionization

**PM** peso molecular

**Fig.** figura

**g** gramos

**TFG** Tasa de Filtración Glomerular

**U<sub>x</sub>** Concentración de la sustancia x  
en la orina

**P<sub>x</sub>** Concentración de la sustancia x en  
plasma

**51Cr-EDTA** Ácido

Etilendiaminotetraacético de cromo

**99Tc-DTPA** Ácido

Dietiléntriaminpentaacético de  
tecnecio

**mgI** miligramos de iodo

## RESUMEN

Los problemas de salud por insuficiencia renal son cada vez mayores. La detección temprana de los problemas renales es de gran importancia para poder dar un tratamiento adecuado a los pacientes.

La Tasa de Filtración Glomerular (TFG) es una medida del funcionamiento de los riñones. Recientemente se introdujo la cuantificación del iohexol como un marcador de la TFG por electroforesis capilar.

El objetivo de este trabajo fue la estandarización de la cuantificación del iohexol por electroforesis capilar en muestras de plasma y orina de ratas normales. La determinación se realizó con una columna capilar de 50 cm y un amortiguador de boratos 220 mM, pH = 8.8; a una temperatura de 23° C y con un voltaje de 12 kV. La detección se realizó por UV a 254 nm. El tiempo de retención del iohexol fue de 11.5 minutos. El límite de cuantificación del iohexol en plasma fue de 11.42 ppm y el límite de detección de 3.99 ppm. La curva de calibración presentó un coeficiente de correlación de 0.9978. Para las muestras de orina se encontró un límite de cuantificación de 0.889 ppm y un límite de detección de 0.329 ppm. La curva de calibración presentó un coeficiente de correlación de 0.9993.

La identificación y cuantificación del iohexol en muestras biológicas por electroforesis capilar es un método confiable y preciso para la determinación de la TFG.

# INTRODUCCIÓN

## ELECTROFORESIS CAPILAR

### Orígenes

En general, la electroforesis es la migración de iones presentes en una disolución por influencia de un campo eléctrico [1-3].

Las leyes de la electrostática establecen que la fuerza eléctrica  $F$  de un ión específico con carga  $q$  en un campo eléctrico  $E$  ( $E = V/L$ , en donde  $V$  es la diferencia de voltaje aplicado en los electrodos) se expresa por

$$F = q E \dots(1)$$

Esta fuerza hace que los iones se dirijan hacia el electrodo con carga opuesta y al aumentar la velocidad, el contacto con los alrededores genera una fricción ( $F_f$ )

$$F_f = v f \dots (2)$$

En donde  $f$  es el coeficiente de fricción, que de acuerdo a la ley de Stokes para partículas esféricas de radio  $r$  que se mueven a través de un fluido de viscosidad  $\eta$  es

$$f = 6\pi\eta r \dots(3)$$

En un campo eléctrico constante, las fuerzas ejercidas sobre el ión se equilibran entre sí

$$qE = v f \dots(4)$$

sustituyendo 3 en 4 y despejando  $v$

$$v = qE/6\pi\eta r \dots(5)$$

sustituyendo los términos constantes por  $\mu_{ef}$ ,

$$v = \mu_{ef} E \dots (6)$$

en donde  $\mu_{ef}$  es la movilidad electroforética para un ión específico y se define como la constante de proporcionalidad entre la velocidad del ión y el campo eléctrico. De la ecuación 5 podemos sacar varias conclusiones, por ejemplo, como la movilidad electroforética es igual a  $q/f$ ; cuanto mayor es el radio, menor es la movilidad, y que las moléculas neutras exhiben una movilidad electroforética igual a cero. Finalmente, también podemos decir que para las proteínas y otros

polielectrolitos que poseen propiedades ácido-base, la carga iónica, y por lo tanto la movilidad electroforética depende del pH.

Para la movilidad Huckel encontró la expresión siguiente:

$$\mu_{ef} = D\zeta_{ef}/6\pi\eta \dots (7)$$

en donde D es la constante dieléctrica del medio y  $\zeta$  es el potencial zeta electroforético definido por la ecuación:

$$\zeta = 4\pi r_D \epsilon / D \dots (8)$$

en donde  $\epsilon$  es el exceso de carga total en la solución por unidad de área y  $r_D$  es el radio de Debye definido por la expresión de Debye-Huckel:

$$r_D = D\kappa T / 8\pi e^2 I \dots (9)$$

en donde  $\kappa$  es la constante de Boltzman, T es la temperatura absoluta, I es la fuerza iónica del medio y e es la carga eléctrica del ión. En esta última ecuación podemos apreciar la importancia de la fuerza iónica pues al aumentar ésta en el medio disminuye el radio de Debye, lo que implica que el potencial zeta también disminuye. En consecuencia un aumento de la fuerza iónica provoca una menor movilidad y aumenta el tiempo de retención (eq. 7)

En el caso de la electroforesis capilar el medio es un electrolito de fondo y resulta de gran importancia, pues además de proporcionar los iones necesarios para mantener la corriente eléctrica a través del capilar, su concentración es un factor determinante en la resolución de la muestra siendo de gran importancia mantener su valor constante, pues de eso depende en gran medida que los tiempos de retención sean reproducibles.

Cuando inició la electroforesis, ésta se hacía utilizando como soporte medios de celulosa agar, almidón o poliacrilamida, que presentan resistencia al paso de la corriente por lo que se genera calor que puede desnaturalizar solutos lábiles, dañar el gel o favorecer la evaporación del disolvente. También este calentamiento puede crear gradientes de temperatura que generan corrientes de convección por lo cual en algún momento los compuestos que se habían logrado separar, nuevamente se mezclaban. Otro factor que afecta los resultados de la

electroforesis es la electroósmosis, fenómeno por el cual se llegan a arrastrar partículas de soporte o de electrolito, disminuyendo la resolución de la separación.

Para poder optimizar la técnica se llegó a la conclusión de que lo más conveniente era limitar la resistencia que presenta el soporte, disminuir la longitud que tenía que atravesar la mezcla, además de que la electroósmosis, que se veía como una gran desventaja, podía ser de gran utilidad en una nueva variante de esta técnica de separación: la electroforesis capilar.

### **Generalidades**

La electroforesis capilar es una técnica utilizada para separar e identificar desde partículas iónicas hasta macromoléculas. Su historia es muy reciente, pues fue en 1971 que se empezó a utilizar en la separación de compuestos como una alternativa a la cromatografía líquida de alta eficiencia (CLAE) que en esa época y por dos décadas más fue considerada como la técnica de separación e identificación por excelencia. A partir de esa fecha, la electroforesis capilar ha ido desarrollándose aprovechando la experiencia acumulada en la CLAE y actualmente la supera por mucho en sensibilidad, resolución y velocidad. También tiene la ventaja de que se pueden hacer variantes a la técnica de acuerdo con lo que se quiera realizar [2]. Ejemplos de esta especialización de la electroforesis capilar de alta resolución (HPCE, por sus siglas en inglés high performance capillary electrophoresis) son la electroforesis capilar de zona (ECZ), la cromatografía capilar electrocinética micelar (MEKC, por sus siglas en inglés micellar electrokinetic chromatography), la electroforesis capilar de gel (ECG) y la electrocromatografía capilar.

Una de las ventajas de la electroforesis capilar es que esta completamente automatizada, disminuyendo así errores debidos tanto al manejo de la muestra como de los electrolitos. La columna en que se realiza la separación tiene una vida útil muy larga y por sus dimensiones (diámetro interno de 10 a 300  $\mu\text{m}$  y longitud de 20 a 100 cm), se disminuye el riesgo de generar gradientes de temperatura que impidan la separación de la muestra. Gracias a que el volumen de la muestra que

se necesita es del orden de nanolitros (nl), la electroforesis capilar se considera una técnica ideal para hacer análisis a microescala.

En la figura 1 se muestran los principales componentes de un instrumento de electroforesis capilar. Se observa que los extremos de una columna de sílice fundida están inmersos en viales que contienen soluciones con el electrolito de trabajo. Los electrodos también están inmersos en estos viales para que a través del electrolito de trabajo haya contacto entre la fuente generadora del alto voltaje y el capilar. La muestra se inyecta en el capilar al reemplazar uno de los viales por un vial que contenga la muestra y se aplica ya sea un alto voltaje (inyección electrocinética) o presión (inyección hidrodinámica), para que la muestra entre al capilar. Una vez realizada la inyección, se intercambia el vial por el que contiene el electrolito de trabajo y se aplica el campo eléctrico para que la separación se lleve a cabo. La detección se puede hacer en el lado opuesto al que se hizo la inyección, ya sea directamente a través de la pared del capilar por detección UV o acoplando el capilar con alguna otra técnica de detección como la espectroscopia de masas o detección electroquímica a través de interfaces diseñadas específicamente para ello. [4]

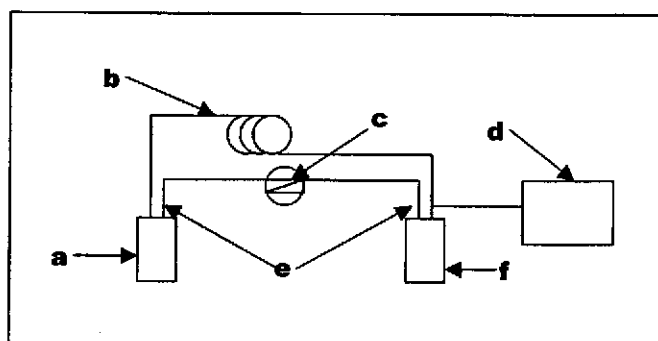


Fig. 1. Esquema básico de un instrumento de electroforesis capilar. a) vial de entrada, b) columna capilar, c) fuente de poder, d) detector, e) electrodos y f) vial de salida.

La parte esencial de la técnica de electroforesis capilar es la columna capilar. De acuerdo con la muestra que se vaya a utilizar se puede usar una

recubierta internamente con diferentes sustancias, ya sea para reducir la adsorción de la muestra o para cambiar la carga eléctrica de la pared interna del capilar.

La columna más empleada es la de sílice fundida (también llamada negativa) pues además de que ésta no absorbe en el ultravioleta, la carga negativa que empieza a adquirir el capilar a partir de un pH de 2 [1] permitiendo que una gran variedad de compuestos se puedan separar.

La pared interna de una columna capilar de sílice fundida está recubierta de grupos silanol (Si-OH) que tienen una carga negativa (Si-O<sup>-</sup>) por encima de un pH>2. Esta carga negativa se ve equilibrada por una capa cargada positivamente formada por los cationes del buffer, lo que da origen a una doble capa.

En un campo eléctrico, los cationes son atraídos por el cátodo y los aniones por el ánodo, el exceso de cationes en la doble capa se mueve hacia el cátodo, lo que ocasiona que el líquido que está en el capilar también se mueva hacia el cátodo a una velocidad constante. Este proceso es conocido como electroósmosis y la constante de proporcionalidad entre la velocidad electroosmótica  $v_{eo}$  y el campo aplicado se llama movilidad electroosmótica ( $\mu_{eo}$ ) y se define como:

$$v_{eo} = \mu_{eo}E \dots (10)$$

$$\mu_{eo} = D\zeta/4\pi\eta \dots (11)$$

en donde D es la constante dieléctrica del medio,  $\eta$  es la viscosidad del medio y  $\zeta$  es el potencial zeta a través de la interfase sólido-líquido.

Tomando en cuenta el flujo electroosmótico generado por la doble capa del capilar, la velocidad observada (también llamada aparente) de cada ión resulta de la suma de su movilidad electroforética y de su movilidad electroosmótica:

$$v_{ap} = (\mu_{ef} + \mu_{eo}) E \dots (12)$$

Como resultado, los aniones pueden ser forzados a moverse en la misma dirección que los cationes si la magnitud del flujo electroosmótico es mayor que la movilidad electroforética de los aniones. Los compuestos neutros pueden migrar a la misma velocidad que el flujo electroosmótico. (Fig.2) A pesar de que la formación de la doble capa se ve favorecida a un pH>2, se ha observado que



debajo de pH=4 la ionización es pequeña y el flujo electroosmótico es poco significativo, mientras que a pH>9 los grupos silanol están completamente ionizados y el flujo electroosmótico es muy fuerte. [3]

Para fines prácticos la movilidad aparente ( $\mu_{ap}$ ) de una especie dada es la velocidad neta ( $v_{ap}$ ) de la especie dividida por el campo eléctrico (E)

$$\mu_{ap} = v_{ap}/E = L_d L_t / V t \dots (13)$$

en donde  $L_d$  es la longitud del capilar desde el punto de inyección hasta el detector,  $L_t$  es la longitud total de la columna de extremo a extremo, V es el voltaje aplicado entre los dos extremos y t es el tiempo necesario para que un soluto migre desde el extremo de la inyección hasta el detector.

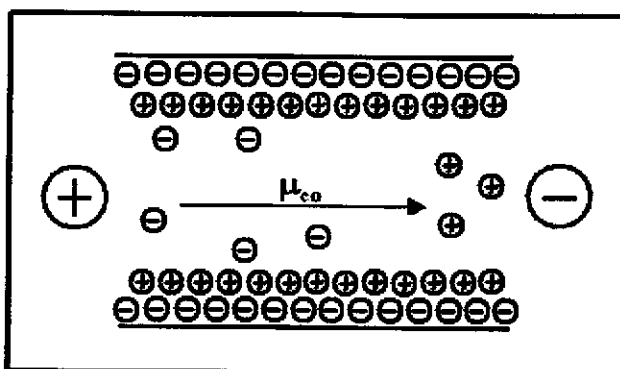


Fig. 2 El flujo electroosmótico arrastra a las partículas cargadas negativamente hacia el cátodo.

Para determinar el flujo electroosmótico, se inyecta una muestra neutra que absorba en el UV y se mide el tiempo de migración ( $t_{neutra}$ ) hacia el detector. La movilidad electroosmótica es la velocidad de las especies neutras ( $v_{neutra}$ ) dividida por el campo eléctrico:

$$\mu_{eo} = v_{neutra}/E = L_d L_t / V t_{neutra} \dots (14)$$

Con estos valores se puede obtener la movilidad electroforética pues

$$\mu_{ef} = \mu_{ap} - \mu_{eo} \dots (15)$$

El flujo electrosmótico de perfil plano contribuye a la gran resolución de la electroforesis capilar. Cualquier efecto que altere el perfil produce un ensanchamiento de la banda y disminuye la resolución. La corriente eléctrica en el capilar (flujo de iones) genera calor (fenómeno conocido como calentamiento joule) lo que produce un incremento en la temperatura de acuerdo a la proporcionalidad:

$$\Delta T \sim E^2 \lambda r^2 \dots (16)$$

En donde  $\lambda$  es la conductividad molar de la solución y  $r$  es el radio del tubo. De acuerdo con esto, tanto los campos eléctricos muy altos como una alta conductividad en el buffer pueden llevar a un incremento en el calentamiento joule, por lo que es de gran importancia utilizar un diámetro pequeño (de 25 a 200  $\mu\text{m}$ ) en la columna para poder emplear voltajes de hasta 30 kV y obtener separaciones rápidas.

Además del diámetro de la columna, los instrumentos de la electroforesis capilar cuentan con un sistema regulador de la temperatura que hace pasar un líquido enfriador alrededor de toda la columna para mantener una temperatura constante en todo el proceso de separación.

Para introducir la muestra al capilar existen varias técnicas [5], la más utilizada es la inyección hidrodinámica o a presión; esta se realiza ejerciendo una presión en el extremo de inyección y haciendo vacío en el extremo opuesto. El volumen inyectado es una función de la diferencia de presión ( $\Delta P$ ) a través del capilar, el tiempo de inyección ( $t$ ) y el diámetro interno del capilar ( $d$ ) y se expresa como:

$$\text{Volumen} = \Delta P \pi d^4 t / 128 \eta L_t \dots (17)$$

En la práctica el tiempo de inyección o la diferencia de presión son utilizados como variables para modificar la cantidad de muestra inyectada, siendo los volúmenes típicos inyectados de 10 a 100 nL de muestra.

En la inyección electrocinética se aplica un voltaje a través del capilar, usualmente de 3 a 5 veces menor que el voltaje de corrida. Los moles de cada ión tomados en el capilar durante  $t$  segundos son:

$$\text{Moles inyectados} = \mu_{ap}(E \kappa_b/\kappa_s) t \pi r^2 C \dots (18)$$

En donde C es la concentración de la muestra y  $\kappa_b/\kappa_s$  es la relación de las conductividades del buffer y de la muestra. Debido a que cada analito presenta una movilidad diferente, la composición de la muestra inyectada es diferente a la de la muestra original, por lo que la inyección electrocinética es menos reproducible que la inyección hidrodinámica. Sin embargo, la inyección hidrodinámica no puede realizarse cuando se emplea la electroforesis capilar de gel, pues en este caso el líquido en el capilar es demasiado viscoso para una inyección hidrodinámica.

Si el volumen de la inyección llega a ser muy grande la longitud del capilar que esté ocupado por la muestra puede ser de algunos milímetros, lo cual llega a ser de importancia para columnas que en ocasiones apenas alcanzan los 20 cm de largo, pues disminuye la longitud de la separación de la muestra. Para evitar esto se han buscado técnicas por las cuáles se puede concentrar la muestra para favorecer su separación.

En la técnica de concentración de muestra más usada se ha encontrado que la concentración óptima de buffer en la disolución de la muestra es 1/10 la concentración del electrolito de fondo y la muestra debe ser 1/500 de la concentración del electrolito de fondo [5]. Dado que la disolución de la muestra tiene una fuerza iónica menor, su conductividad es menor y su resistencia mayor que la del electrolito de fondo. El campo eléctrico a través de la muestra inyectada en el capilar es mucho mayor que el campo eléctrico en el electrolito de fondo. Los iones dentro de la muestra migran rápido porque el campo eléctrico es muy grande. Cuando los iones llegan al límite de la zona, se ven frenados (se estancan) porque el campo eléctrico es menor fuera de la muestra. Este proceso, llamado apilamiento (stacking), continúa hasta que la mayoría de los cationes se concentran en el extremo de la muestra, y la mayoría de los aniones lo hacen en el extremo opuesto. Por este medio se puede concentrar una inyección en bandas estrechas de cationes y aniones. La zona de inyección puede llegar a ser de un 10

a 20 % de la longitud del capilar, permitiendo así analizar concentraciones diluidas.

Debido a que la mayoría de los componentes de las muestras tienen grupos ionizables, el pH del buffer es el factor de mayor importancia para la selectividad del método, pues si se tienen dos o más compuestos con pesos moleculares iguales, se pueden buscar las condiciones de pH necesarias para que su carga neta sea diferente y así sus movilidades efectivas permitan una buena separación. Lo anterior se puede ver en compuestos anfóteros o con varios  $pK_a$ 's, como los aminoácidos, péptidos y proteínas.

Otra modalidad para cambiar las propiedades del electrolito de fondo es adicionar al buffer disolventes orgánicos y aditivos como el SDS. Estos últimos modifican la estructura del analito produciendo cambios en su movilidad.

En la elección del electrolito de trabajo también se debe tomar en cuenta que no interfiera en la detección de la muestra, por ejemplo, si la detección se hace por UV, entonces el electrolito no debe absorber a la  $\lambda$  de trabajo y si la detección se hace por masas, el electrolito debe evaporarse rápidamente al hacer la inyección al detector para que no interfiera en la determinación.

Debido a la gran versatilidad de la técnica de la electroforesis capilar [6-10], esta se puede dividir en la electroforesis capilar de zona (EZ), la cromatografía micelar electrocinética (MECK) y la electroforesis capilar de gel (CGE).

### **Electroforesis Capilar de Zona**

Hasta el momento, todas las propiedades descritas de la electroforesis capilar corresponden a la electroforesis capilar de zona a menos que se haya indicado otra cosa. En esta técnica la separación se basa en las diferencias de movilidad electroforética, de modo que los analitos deben ser especies cargadas o con posibilidad de tener carga, esto es, muestras de iones metálicos, aniones inorgánicos, organometálicos, pequeños ácidos y bases orgánicas, péptidos y proteínas.

La diferencia en la movilidad se debe principalmente a las diferencias en la densidad de carga de cada una de las especies iónicas, la cual se ve afectada por el pH del electrolito de trabajo. Debido a esto, en el caso de ser necesario optimizar la separación de la muestra se hacen cambios de pH en el electrolito de trabajo.

Cuando no es suficiente un ajuste de pH, se pueden agregar aditivos al electrolito de trabajo, los cuales incluyen agentes complejantes (ácidos policarboxílicos, agentes quelantes), disolventes orgánicos (metanol, acetonitrilo, etc.), éteres policíclicos y sus derivados, etc. [4].

Recientemente se ha encontrado que con un electrolito de trabajo hecho a base de una especie anfótera "isoelectrica", como el ácido aspártico, ácido iminodiacético o la histidina, se pueden hacer separaciones por aplicación de un campo eléctrico muy alto, de hasta 120 kV (comparado con los 30 kV o menos empleados en una electroforesis capilar cotidiana) gracias a la baja conductividad de las especies utilizadas. [8].

Debido a que este tipo de separación se basa en la diferencia de densidad de carga de las especies en la muestra a separar, la separación de especies neutras es muy difícil y si se llega a dar, la resolución es muy baja, pues las especies neutras pasan prácticamente juntas a través del detector.

### **Cromatografía Capilar Electrocinética Micelar (MECK)**

Para resolver la separación de las especies neutras se ideó la cromatografía capilar electrocinética micelar (MECK) que utiliza como aditivo en el electrolito un surfactante, el cual es generalmente el dodecilsulfato de sodio (SDS), el cual debe encontrarse por arriba de la concentración micelar crítica. El analito establece un equilibrio entre el interior de la micela y el exterior, modificando así su movilidad aparente y su tiempo de migración. Debido a que el equilibrio es específico para cada analito, por esta técnica se logra separar una mezcla de analitos neutros, cosa que no se logra por la electroforesis capilar de zona.

La parte más importante de este tipo de separación es el tensoactivo, pues de sus características (tamaño de la cadena hidrofóbica y carga de la parte polar) depende que los componentes neutros de la muestra a analizar lleguen a separarse satisfactoriamente. Esta técnica es muy versátil pues se pueden añadir surfactantes aniónicos, catiónicos, híbridos y neutros para cambiar los coeficientes de reparto de los analitos. Para algunos péptidos grandes y proteínas se han utilizado disolventes orgánicos, ciclodextrinas y urea para incrementar la solubilidad del analito en el agua, reduciendo la interacción con la fase micelar, aunque la adición de disolventes orgánicos puede dañar las micelas.

### **Electrocromatografía Capilar**

Como las micelas llegan a actuar como una pseudofase estacionaria la cromatografía capilar electrocinética micelar se puede considerar como una separación cromatográfica. Hay una técnica más reciente llamada electrocromatografía capilar en la que sí se utiliza una fase estacionaria pues el capilar se empaca, generalmente con sílice  $C_{18}$  y se aprovecha el que las partículas se reparten entre esta fase y el electrolito soporte para lograr su separación. Aunque esta técnica es muy parecida a la CLAE, tiene la gran ventaja de que el electrolito no se mueve a través del capilar por aplicar una presión, sino que lo hace por la aplicación de un voltaje que genera un flujo electroosmótico, con lo que se logra una mejor resolución. Aunque todavía se está buscando como resolver problemas como la formación de burbujas y la absorción de especies cargadas, se piensa que en el futuro puede ser una técnica con muchas aplicaciones.

### **Electroforesis Capilar de Gel**

Otra técnica derivada de la electroforesis capilar es la electroforesis capilar de gel, en la cual se empaca el capilar con gel de poliacrilamida como en la electroforesis tradicional y los compuestos se van separando preferentemente por su peso molecular. Ésta es la técnica ideal para separar proteínas, oligonucleótidos y fragmentos de ADN debido a que la relación carga-peso es

prácticamente constante para estos biopolímeros de gran tamaño por lo que técnicas como la electroforesis capilar de zona o la micelar no logran su separación. Sin embargo, por el momento la técnica aún tiene problemas como son que el gel presente fracturas o se degrade por hidrólisis, además el extremo de la inyección llega a taparse y el tiempo de vida de la columna es corto.

### **Detectores**

Además de la importancia que tiene el elegir la técnica de acuerdo a las propiedades de la mezcla que se vaya a separar, es muy importante tomar en cuenta el tipo de detector que se va a utilizar, pues implica que el detector necesita tener una alta sensibilidad debido a que los compuestos que se observan llegan a estar en concentraciones del orden de  $10^{-5}$  a  $10^{-9}$ M.

El primer detector empleado en la electroforesis capilar fue el detector de UV. La aplicación de electrolitos permite que se utilice en un amplio rango que va desde 185 nm hasta 380 nm. Este método de detección también resulta efectivo para hacer mediciones de absorbancia cada décima de segundo, lo que posibilita detectar la separación de compuestos que debido al flujo electroforético y al flujo electroosmótico es muy rápida. El límite de detección que se llega a alcanzar es de  $10^{-4}$  a  $10^{-5}$ M.

El detector de diodos para láser detecta compuestos con fluorescencia intrínseca o tratados previamente a concentraciones del orden de  $10^{-7}$  M. La sensibilidad aumenta de 100 a 1000 veces con respecto a la detección por UV. Se aplica cuando se desea analizar muestras biológicas en donde el analito no absorbe en el UV y/o llega a estar en concentraciones mínimas.

Tanto en la detección por UV como en la detección por fluorescencia se puede hacer uso de la determinación indirecta, por la cual se pueden detectar compuestos que no absorben o no fluorescen o que lo hacen muy poco. Esta técnica consiste en adicionar al electrolito una sustancia que absorba fuertemente en el ultravioleta o que fluoresca al interactuar con el láser, permitiendo así tener una absorbancia o fluorescencia constante durante toda la separación; así

cuando el compuesto pasa por el detector, genera un pico negativo en el electroferograma.

Recientemente se ha logrado acoplar la espectrometría de masas a la electroforesis capilar, logrando con esto una mayor sensibilidad y selectividad que en otras técnicas, además de que se llega a recabar información estructural, lo que hace de esta técnica la más completa en la electroforesis capilar. La clave para lograr esta unión de técnicas es mediante interfaces que conectan la salida del capilar con el espectrómetro de masas. Las dos interfaces son las de ionización por electronebulizado (electrospray ionization, EI) y "matrix-assisted laser desorption ionization, MALDI".

A pesar de que la electroforesis capilar acoplada a masas es una técnica muy completa, llega a tener limitantes como el que la sensibilidad a compuestos pequeños es baja o nula y que se debe tener especial cuidado en la elección del electrolito soporte para que no interfiera con la determinación del analito.

### **Electroferograma**

Una vez que los detectores captan variaciones de los parámetros que están midiendo, estos se transforman en señales que se pueden visualizar en una pantalla de computadora, las cuales permiten de manera rápida y sencilla observar cómo se desarrolla la separación.

### **IOHEXOL**

Este compuesto (Fig. 3) tiene un PM de 821.14 g/mol y es soluble en agua. Se conoce con los nombres de:

- 5-[acetil(2,3-dihidroxiopropil)amino]-N,N'-bis(2,3-dihidroxiopropil)2,4,6-triyodo-1,3-bencenodicarboxamida
- N,N'-bis(2,3-dihidroxiopropil)-5-[N-(2,3-dihidroxiopropil)acetamido]-2,4,6-triyodoisotalamida Omnipaque
- Exipaque, etc. [11].



Se detecta fácilmente en la región del UV presentando una  $\lambda_{\text{max}}$  a 244 nm [12] y genera una señal intensa a 254 nm (Fig. 4).

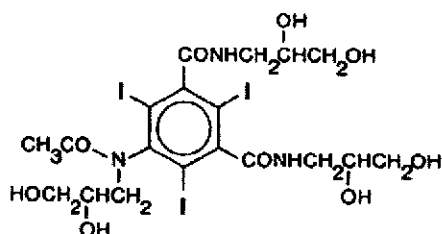


Fig. 3 Estructura química del iohexol

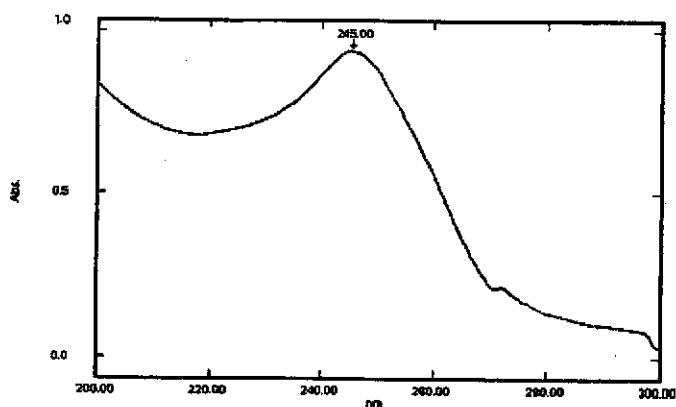


Fig. 4 Espectro de absorción del iohexol con el ultravioleta

El iohexol cotidianamente se utiliza como medio de contraste en rayos X. Debido a que se filtra libremente por el glomérulo se utiliza para medir la Tasa de Filtración Glomerular (TFG), además de que resulta menos tóxico que los compuestos radiactivos empleados con este propósito. La determinación de este compuesto en muestras de plasma y orina se ha hecho por medio de la CLAE, la cual presenta varios inconvenientes al determinar muestras clínicas, pues utiliza

un gran volumen de disolventes lo que aumenta el costo de la determinación; el tiempo que se utiliza entre muestra y muestra para lavar y acondicionar la columna es inclusive de horas, por lo que esta técnica es poco práctica para un laboratorio clínico. [13, 14]

Desde 1992 se ha podido determinar el iohexol en muestras de plasma y orina por medio de la electroforesis capilar. [15, 16] Se realiza el análisis en cuestión de minutos lo cual incluye los lavados para acondicionar la columna. Además únicamente se utilizan ml de electrolito de trabajo y agua para estos lavados. Debido a esto y a que la electroforesis capilar presenta una buena resolución y reproducibilidad se presenta con amplias ventajas sobre la CLAE para determinar el iohexol en estas muestras biológicas. Esto se puede aprovechar para la determinación de la TFG pues es prioritario encontrar métodos para la detección temprana de los problemas renales; pues la frecuencia con que se presentan y el costo que genera su tratamiento son altos.

## **LOS RIÑONES**

Los riñones están localizados en la parte media de la espalda; junto con los uréteres, la vejiga urinaria y la uretra constituyen el sistema urinario.

Si se practica un corte transversal del riñón, las dos regiones principales que pueden verse son la corteza externa y la región interna llamada médula. La médula se divide en numerosas porciones de tejido de forma cónica llamadas pirámides renales. (Fig.5) La corteza y las pirámides renales están formadas por aproximadamente 1.3 millones de nefronas, las cuales constituyen la unidad anatómica mínima funcional del riñón y de la cual se hablará más adelante.

Los riñones realizan funciones diversas [17] como son:

- Excreción de los productos metabólicos de desecho y de sustancias químicas extrañas. Esto se logra a través de un proceso de filtración de plasma realizado por las nefronas, después del cual se secretan productos de desecho, y se reabsorben metabolitos importantes como electrolitos y agua. Los productos principales de desecho son: la urea, la creatinina, el ácido úrico y las toxinas (plaguicidas, fármacos) ingeridas por el cuerpo.

- Regulación del equilibrio hídrico y electrolítico. Para mantener al cuerpo en buen estado físico, los riñones desechan electrolitos como el cloruro, potasio, magnesio, hidrógeno, calcio y fosfato en caso de que se encuentren en exceso. Es en los riñones en donde se regula la homeostasis de todo el cuerpo.

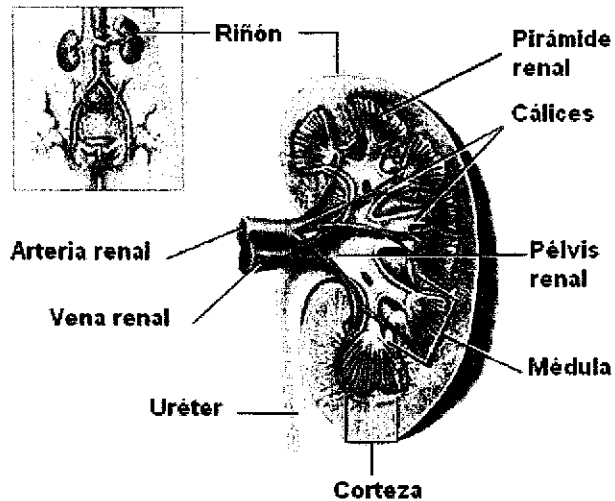


Fig. 5 Esquema general de un riñón

- Regulación de la presión arterial. Esto se hace a largo plazo gracias a la excreción de cantidades variables de sodio y agua, además de que a corto plazo se produce y secreta la renina que da origen a la angiotensina II que es un vasoactivo, es decir, puede regular la constricción arterial incrementando la presión sistólica y diastólica.
- Regulación de la producción de eritrocitos. En los riñones se produce el 85% de la eritropoyetina en los adultos, por lo que cuando sufren algún daño que reduzca su masa, se produce anemia. La eritropoyetina es una hormona que incrementa la cantidad de células progenitoras de los eritrocitos que se encuentran en la médula ósea. Dependiendo de la cantidad de eritropoyetina liberada al torrente sanguíneo será la cantidad de eritrocitos producidos.

- Regulación de la producción de 1,25-dihidroxicolecalciferol (calcitrol). Este compuesto es determinante en la absorción de  $\text{Ca}^{2+}$  en el intestino, en la reabsorción de calcio por los riñones y en la movilización de  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{PO}_4^{3-}$  en los huesos. En caso de que este compuesto no se sintetice en forma adecuada, genera problemas óseos que en casos graves provoca raquitismo en los niños y osteomalacia en los adultos.
- Síntesis de glucosa. En situaciones de ayuno extremas, los riñones al igual que el hígado, sintetizan glucosa a partir de aminoácidos (gluconeogénesis).

Cuando llega a presentarse algún problema renal todas estas funciones se ven alteradas siendo necesario en muchos casos practicar la hemodiálisis. Con este tratamiento se llega a reestablecer el equilibrio de los líquidos y electrolitos corporales de manera artificial.

### **La nefrona**

Para comprender la función de los riñones es importante saber que toda la sangre del cuerpo humano (3 l en promedio) se filtra por los riñones, repitiéndose este proceso 60 veces en un día por lo que los riñones llegan a filtrar hasta 180 l de plasma al día [18].

La sangre llega por medio de la arteria renal y a medida que se interna en el riñón se va dividiendo en arterias interlobulares, arciformes y finalmente en arteriolas aferentes.

La arteriola aferente llega a la nefrona la cual es la unidad funcional del riñón. La nefrona está formada por un glomérulo (formado por capilares glomerulares) que está contenido en la cápsula de Bowman, la cual es seguida por la parte tubular de la nefrona. La nefrona se subdivide en el túbulo proximal, el asa de Henle, el túbulo distal y el túbulo colector, siendo este último el que se conecta con el uréter.

La sangre que pasa por los capilares glomerulares atraviesa la pared del capilar y pasa al espacio de la cápsula de Bowman dando origen a la filtración del plasma. Este proceso es conocido como filtración glomerular y se hablará de él

más adelante. En esta filtración todas las proteínas y partículas con diámetros mayores a 8 nm permanecen en los capilares, mientras que el resto de las partículas atraviesan el capilar y entran a la cápsula de Bowman, de donde pasan al sistema tubular de la nefrona. En esta región se reabsorben sustancias como la glucosa, aminoácidos, agua y iones como el bicarbonato, el sodio y el cloruro. Además de la reabsorción, en los túbulos se llegan a secretar sustancias como el ácido p-aminohipúrico, esteroides, sulfatos de éter, penicilina y otras sustancias, para finalmente desecharlos en forma de orina.

La secreción y la reabsorción de sustancias se llevan a cabo gracias a que los túbulos se encuentran rodeados por sistemas capilares que se originan ya sea en la arteriola aferente (vasos rectos) o en la arteriola eferente (vasos peritubulares). Estos vasos se conectan finalmente a la arteria renal para que la sangre prosiga su circulación. (Fig. 6)

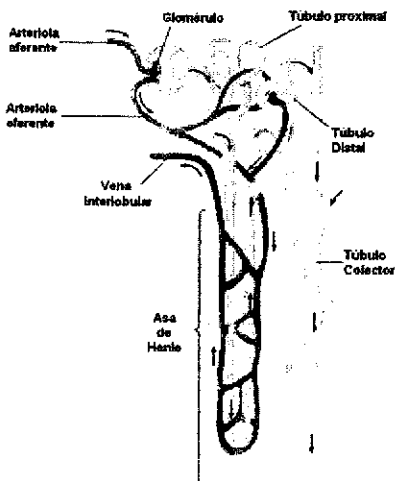


Fig.6 Esquema general de una nefrona

### Filtración Glomerular

Como se comentó anteriormente, los capilares glomerulares están contenidos en la cápsula de Bowman; es en este sitio en donde se realiza la filtración del plasma conocida como filtración glomerular.

Los capilares glomerulares son los únicos en el cuerpo humano formados por tres partes: el endotelio, la membrana basal y el epitelio [18] que permiten el paso libre de sustancias menores a los 8 nm de diámetro, pero excluyen prácticamente a todas las proteínas (que además de ser grandes llegan a estar cargadas negativamente). Esta selectividad de los capilares glomerulares se da gracias a que los poros que se presentan en estas capas tienen un diámetro de 8 nm, además de que están recubiertas por cargas negativas.

Cuando estas cargas negativas se llegan a perder debido a algún daño en el riñón, algunas proteínas como la albúmina, llega a filtrarse y se desecha por la orina, dando origen a lo que se conoce como proteinuria o albuminuria. [18]

Para que la filtración glomerular se lleve a cabo, es necesario que existan diferencias de presión entre los capilares glomerulares y la cápsula de Bowman. En los capilares glomerulares la presión hidrostática favorece la filtración del plasma, mientras que la presión osmótica se opone a la filtración glomerular. Un factor que puede alterar la presión osmótica es el flujo sanguíneo. De esta manera, el aumento del flujo sanguíneo que pasa por el glomérulo tiende a elevar la filtración glomerular, mientras que el descenso del flujo sanguíneo tiende a disminuir la filtración glomerular.

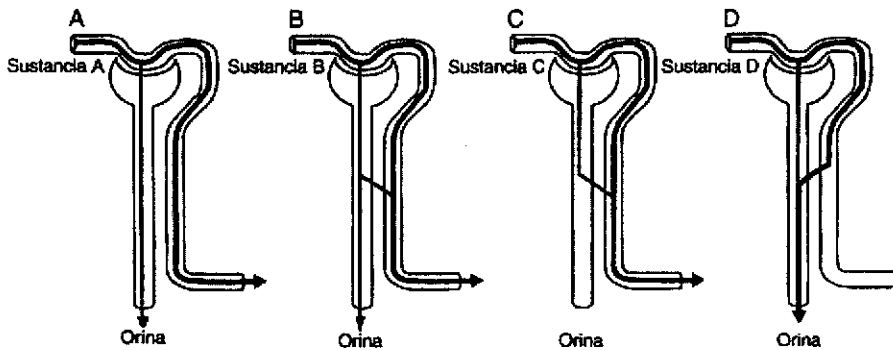
### **Tasa de Filtración Glomerular (TFG)**

En animales y humanos se puede determinar la tasa de filtración glomerular (TFG) con una sustancia que se filtre libremente por el riñón. (Fig. 7)

La TFG equivale a la concentración de una sustancia X en la orina ( $U_x$ ), multiplicada por el flujo urinario por unidad de tiempo ( $V$ ), y el resultado dividido entre la concentración plasmática arterial de X ( $P_x$ ). Este valor se denomina depuración de X ( $C_x$ ), es decir:

$$C_x = (U_x) (V) / (P_x) \dots (17)$$

La TFG se puede afectar por alguna enfermedad renal, la hipertensión, la diabetes mellitus, la obstrucción de vías urinarias, etc., por lo que en muchas ocasiones una buena medición de la TFG puede dar o confirmar algún diagnóstico relacionado con este tipo de padecimientos.



**Fig. 7 Manejo renal de cuatro sustancias hipotéticas.** La sustancia A se filtra libremente. La sustancia B se filtra libremente, pero parte de la carga filtrada se reabsorbe. La sustancia C se filtra libremente, pero la totalidad de la sustancia filtrada se reabsorbe por los túbulos y regresa a la sangre. La sustancia D se filtra libremente, pero además se secreta desde la sangre de los capilares peritubulares a los túbulos renales. [18]

Las sustancias ideales para medir la TFG son aquellas que no se secretan por el cuerpo y que pasan libremente por el glomérulo sin que se reabsorban o secreten por los túbulos de la nefrona. Las sustancias que se han utilizado con este propósito son los radioisótopos  $^{125}\text{I}$ -yodotalamato, el ácido etilendiaminotetraacético de cromo ( $^{51}\text{Cr}$ -EDTA) y el ácido dietilentriaminopentaacético ( $^{99}\text{Tc}$ -DTPA). Estas sustancias debido a su carácter radiactivo presentan el problema de ser tóxicos, ocasionando algunas reacciones adversas en los pacientes, por lo que se han buscado otros marcadores. Las sustancias que se utilizan frecuentemente para determinar la TFG en clínicas son la creatinina y la inulina las cuales son menos tóxicas y su cuantificación suficientemente confiable. Sin embargo, la inulina presenta la desventaja de su alto costo y de que su determinación es laboriosa. Por lo que el marcador más empleado es la creatinina, pues su manejo en la clínica es sencillo y su costo es menor debido a que no se tiene que administrar creatinina sino simplemente

determinar la que el organismo en sí está generando y desechando constantemente; la determinación se logra haciendo reaccionar la creatinina con ácido picrico y monitoreando la formación de un complejo colorido a 520 y 560 nm. Sin embargo, debido a que la toma de muestras de orina en humanos se realiza por los mismos pacientes muchas veces se hace de manera incorrecta pues no se hacen las tomas de muestras en los tiempos indicados, generando resultados erróneos en la medición del flujo urinario. Además de esto, cuando llega a existir alguna insuficiencia renal leve, la creatinina se llega a secretar por los túbulos dando también resultados erróneos de la TFG [19-21]. Lo anterior genera errores en la medición de la TFG aunque muchas veces es preferible a los efectos adversos de los compuestos radioactivos.



## **OBJETIVO GENERAL**

Determinación del iohexol por electroforesis capilar en muestras biológicas de ratas normales.

## **OBJETIVOS PARTICULARES**

- Optimización del método.
- Determinación del iohexol en muestras de orina y plasma de ratas normales.
- Comparación de los resultados con los obtenidos por la determinación colorimétrica de la creatinina.

## **HIPÓTESIS**

Si el iohexol se filtra libremente en el riñón, la cantidad que se administre a la rata se desechará completamente, por lo que su cuantificación en el plasma y la orina de la rata será una medida precisa de la tasa de filtración glomerular en el riñón.

## **OBJETIVO GENERAL**

Determinación del iohexol por electroforesis capilar en muestras biológicas de ratas normales.

## **OBJETIVOS PARTICULARES**

- Optimización del método.
- Determinación del iohexol en muestras de orina y plasma de ratas normales.
- Comparación de los resultados con los obtenidos por la determinación colorimétrica de la creatinina.

## **HIPÓTESIS**

Si el iohexol se filtra libremente en el riñón, la cantidad que se administre a la rata se desechará completamente, por lo que su cuantificación en el plasma y la orina de la rata será una medida precisa de la tasa de filtración glomerular en el riñón.

## **DESARROLLO EXPERIMENTAL**

### **MATERIALES**

El estándar de iohexol se consiguió en su forma comercial OMNIPAQUE de 350 mg/ml de los laboratorios NYCOMED IMAGINS AS, NORUEGA. El electrolito de trabajo se preparó con ácido bórico de SIGMA CHEMICAL CO. USA en agua bidestilada y desionizada. El hidróxido de sodio de MERK-MEXICO y el ácido clorhídrico de J. T. BAKER-MEXICO. Para desproteínizar se utilizó acetonitrilo CHROMASOLV grado HPLC de SIGMA CHEMICAL CO. USA

### **EQUIPO**

Se utilizó un equipo de electroforesis capilar de la Compañía Beckman Coulter, de la Serie P/ACE 5010 equipado con un detector UV con un rango de 190 a 380 nm y con filtros para 200, 214, 254 y 280 nm.

### **CONDICIONES DE TRABAJO EN EL LABORATORIO**

Las condiciones utilizadas en este trabajo para la determinación del iohexol se basaron en las reportadas en la bibliografía [15]. Después de evaluar la concentración, el pH del electrolito de trabajo y las condiciones del lavado del capilar, se decidió trabajar con un electrolito preparado con ácido bórico 220 mM a pH 8.8. La temperatura fue de 23°C y el voltaje de 12 kV, una columna de sílice fundida de 57 cm de longitud total, 50 cm al detector y un diámetro interno de 75 µm. Se inyectaron 18.8 nl de muestra.

### **USO DEL EQUIPO**

Para realizar los lavados de la columna, la solución se hace pasar a través del capilar de un vial con la solución de lavado hacia otro vial vacío. Los lavados del capilar al iniciar la jornada son de ácido clorhídrico 0.5 M por 5 min., agua desionizada por 3 min., hidróxido de sodio 2 M por 10 min., agua desionizada por 3 min. y electrolito de trabajo por 15 min. Para los lavados del capilar entre

corridas se empleó hidróxido de sodio 2 M durante 0.7 min. y electrolito de trabajo por 1.5 min.

En la inyección de la muestra, ésta pasa del vial en el que está contenida hacia el capilar, y al final de éste se encuentra un vial con el electrolito de trabajo. Durante la separación, a la entrada del capilar y a la salida se encuentran viales con el electrolito de trabajo. Se utilizan diferentes viales para los lavados y para la separación.

Al finalizar los ensayos se lava el capilar con agua y luego con aire para evitar que la columna se deteriore. Además se hace una limpieza semanal de los electrodos, los extremos de la columna, la ventana del capilar y el área de la interfase entre los viales y el cartucho de la columna para el buen funcionamiento del equipo.

Cuando el equipo se reutiliza después de un periodo de 5 o más días, el capilar se lava con ácido clorhídrico 0.5 M durante 10 min., agua desionizada por 4 min., hidróxido de sodio 2 M durante 20 min., agua desionizada por 4 min. y con el electrolito de trabajo 30 min.

## **PREPARACIÓN DE LAS DISOLUCIONES Y LAS MUESTRAS BIOLÓGICAS**

Se preparó una disolución de iohexol en H<sub>2</sub>O de 100 ppm para determinar la concentración y el pH del electrolito de trabajo.

También se prepararon disoluciones de iohexol en plasma con las concentraciones finales de 33, 66, 100, 200 y 400 ppm (40, 80, 120, 240, 485  $\mu$ M, respectivamente) en las cuales el plasma está diluido 1:2.5 en acetonitrilo y esta disolución finalmente se diluye 1:6 en BBS 20 mM pH = 8.8. Con estas disoluciones se obtiene la linealidad del método en plasma de rata diluido 15 veces, además de los límites de cuantificación y detección del método.

De la misma manera se preparan disoluciones de iohexol en orina con las concentraciones finales de 5, 25, 50, 80, 100, 150, 200 y 400 ppm (6, 30, 60, 100, 120, 185, 245 y 490  $\mu$ M, respectivamente). Con estas disoluciones se obtienen la

linealidad del método, límites de detección y de cuantificación en orina de rata diluida 1500 veces.

### **MUESTRAS DE PLASMA Y ORINA DE RATA**

Las muestras de plasma y orina de rata (Fig. 8) fueron obtenidas en el laboratorio de la Dra. Norma Bobadilla por la M. en C. Jazmín Marlen Pérez Rojas en el Departamento de Nefrología del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán".

Se coloca a la rata en una mesa termorreguladora a 37° C, se le anestesia con pentobarbital sódico (30 mg/kg de peso corporal) y se revisan continuamente sus signos vitales y sus reflejos para en caso necesario, administrar más anestesia por el peritoneo. Se cateteriza la tráquea, las venas yugulares, las arterias femorales y la vejiga. La presión arterial promedio se registra continuamente con un transductor de presión.

La rata se mantiene en condiciones de euvolemia (volumen constante) a través de una infusión de 10 ml/kg de plasma y se toma una muestra de plasma como control. Se continúa con la infusión de iohexol de 188.75 mg/ml a una velocidad de 2.2 ml/hr. Se toma una muestra de sangre de la arteria femoral a los 60, 90 y 120 min. de haber infundido el iohexol. La orina se colecta durante este periodo en dos muestras a los 60 y 90 min. de haber perfundido el iohexol.



**Fig. 8. Las muestras biológicas se obtienen de ratas tratadas con iohexol**

Las muestras de sangre se centrifugan para obtener las muestras del plasma y se mantienen en congelación a  $-20^{\circ}$  C hasta un día antes de la determinación del iohexol por electroforesis capilar. Para desproteinizar estas muestras de plasma se diluyen 1:2.5 en H<sub>2</sub>O con acetonitrilo, esta mezcla se agita durante 1 min. y luego se centrifuga a 13000 rpm durante 5 min. El sobrenadante se diluye 1:12 en BBS 22 mM pH=8.8 para tener finalmente el plasma diluido 1:30. De esta manera las muestras diluidas se mantienen en congelación hasta el momento del análisis.

Las muestras de orina se mantuvieron en congelación durante el tiempo previo al análisis. Momentos antes de iniciar el análisis se descongelan a temperatura ambiente y se diluyen 1:1500.

En este trabajo se presentan los resultados que se obtuvieron con 6 ratas sanas. Por cada rata se obtuvieron 3 muestras de plasma y dos de orina para determinar la concentración del iohexol en cada una de ellas.

## RESULTADOS

En la identificación del iohexol por electroforesis capilar se estudió el efecto del manejo de la muestra de plasma, de la concentración y del pH del electrolito. Para estudiar los dos últimos se realizaron tres determinaciones en cada caso, utilizando soluciones de iohexol en H<sub>2</sub>O. Para evaluar la calidad de la señal obtenida, se determinó la cantidad de platos teóricos obtenidos para un electroferograma representativo de cada grupo de determinaciones de acuerdo a la ecuación:

$$N = \left[ \frac{t_r}{w_b} \right]^2 \quad \dots(20)$$

en donde N es el número de platos teóricos,  $t_r$  es el tiempo de retención en minutos y  $w_b$  es el ancho de la banda a la mitad de la altura de la misma. Entre mayor sea el número de platos teóricos es mejor la resolución de la banda.

### a) Efecto del tratamiento de las muestras de plasma.

Se probaron tres formas de desproteínizar el plasma encontrándose que al desproteínizar con acetonitrilo se obtuvieron los mejores resultados.

### b) Efecto de la concentración del electrolito. (Tabla 1)

En este caso para un valor constante de pH = 8.8 se utilizaron tres concentraciones del electrolito evaluándose cada una de ellas por triplicado (Fig. 9). Se obtiene un mayor número de platos teóricos con una concentración de 220 mM del buffer.

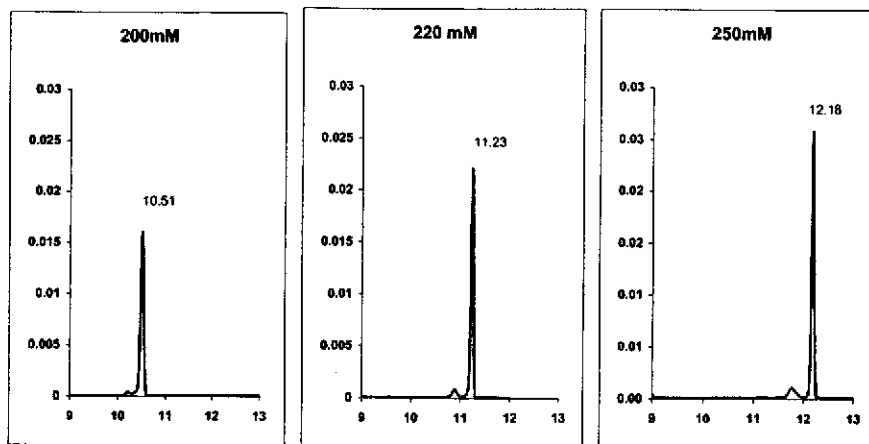
Concentración (mM)	Área	(No. de platos)
200	1.244 ± 0.01	175484
220	1.356 ± 0.008	502660
250	1.440 ± 0.014	321354

**c) Efecto del pH del electrolito. (Tabla 2)**

La concentración del electrolito fue de 220 mM y se utilizaron tres valores de pH (n=3), (Fig10). A pH = 8.8 se obtiene el mayor número de platos teóricos.

Tabla 2. Efecto del pH del electrolito		
pH	Área	No. de platos
8.5	1.04 ± 0.007	371727
8.8	1.356 ± 0.008	502660
9	2.581 ± 0.025	264221

Con base en estos resultados se estableció que el buffer de boratos se debe utilizar en una concentración 220 mM a un pH = 8.8 en las determinaciones del iohexol.



**Fig. 9** Efecto de la variación en la concentración del electrolito. Electroferogramas de absorbancia vs. tiempo (min.) para 3 concentraciones diferentes del electrolito



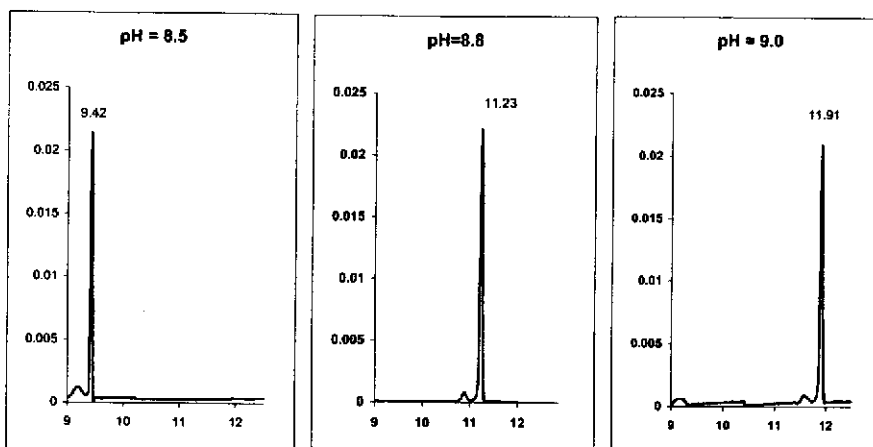


Fig. 10 Efecto de la variación en el pH del electrolito. Electroferogramas de absorbancia vs. tiempo (min.) para 3 valores diferentes de pH del electrolito

### CONTROLES EN PLASMA

Se evaluó la linealidad en plasma en un intervalo de 0 a 400 ppm de iohexol (Tabla 3 y Figs. 11, 12 y 13) utilizando el electrolito soporte de boratos 220 mM pH= 8.8. Las curvas se obtuvieron al graficar el área del pico contra la concentración del iohexol. Cada punto se evaluó por triplicado.

Tabla 3. Datos obtenidos para la evaluación del intervalo lineal del método en plasma	
Muestra (ppm)	Área $\pm$ desviación estándar (n=3)
0	0
33	0.3042 $\pm$ 0.0058
66	0.5923 $\pm$ 0.0128
100	0.8136 $\pm$ 0.0298
200	1.7041 $\pm$ 0.0472
400	3.1218 $\pm$ 0.0708

Los electroferogramas de las figuras 11 y 12 corresponden a muestras de plasma sin iohexol y con iohexol respectivamente, observándose que no hay señal cuando no se tiene iohexol en la muestra.

En la gráfica de la Fig. 12 se puede ver que el coeficiente de la ecuación de regresión del estudio de linealidad del método es cercano a la unidad por lo que podemos decir que el modelo de línea recta se ajusta para representar el comportamiento de los datos obtenidos. En la misma gráfica podemos observar la ecuación de regresión que corresponde a la forma  $y = bx + a$ .

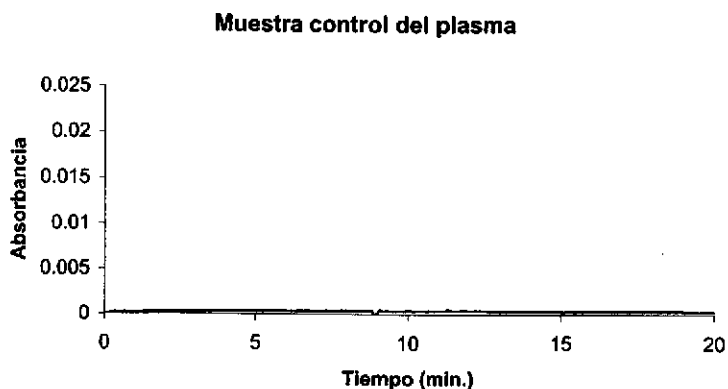


Fig. 11 Electroferograma de una muestra de plasma de rata sin iohexol

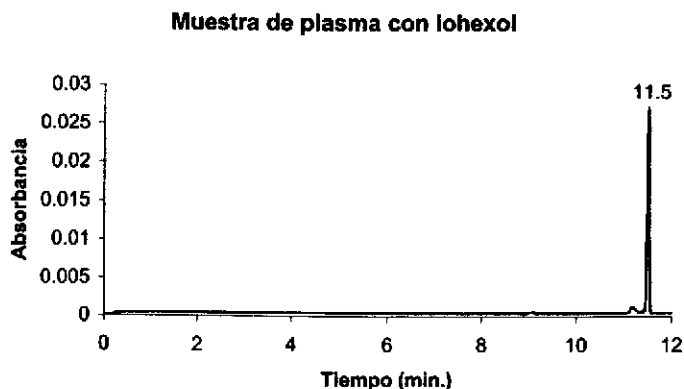


Fig. 12 Electroferograma de una muestra representativa de plasma de rata sana

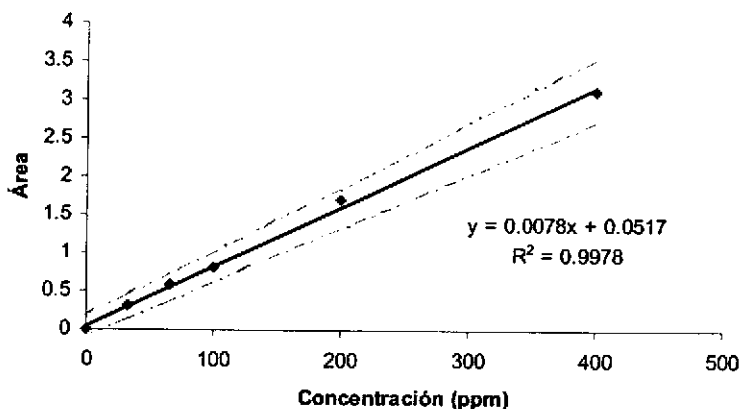


Fig. 13 Gráfica para evaluar el intervalo lineal del método para la determinación del iohexol en plasma con la indicación de su intervalo de confianza

Para evaluar si el coeficiente de correlación ( $r$ ) es realmente significativo se calcula  $r$  de acuerdo a la ecuación

$$r = \frac{\sum\{(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})\}}{\{\sum (x_i - \bar{x})^2\} [\sum\{(y_i - \bar{y})^2\}]^{1/2}} \quad \dots (19)$$

En donde  $x_i$  corresponde a los valores de concentración de las soluciones en ppm,  $\bar{x}$  es el valor promedio de las concentraciones,  $y_i$  representa los valores de área del pico mientras que  $\bar{y}$  corresponde al valor promedio de las mediciones del área. Con el resultado obtenido en la ecuación anterior se emplea el estadístico de prueba

$$t = \frac{|r|\sqrt{(n-2)}}{\sqrt{(1-r^2)}} \quad \dots (20)$$

El valor calculado de  $t$  se compara con el tabulado para una prueba  $t$  de student con  $(n-2)$  grados de libertad y un nivel de significancia  $\alpha = 0.01$ . Considerando la hipótesis nula de que no existe correlación entre  $x$  e  $y$ , si el valor

calculado de t es mayor que el tabulado, la hipótesis nula (H<sub>0</sub>) se rechaza; es decir, se concluye que existe una correlación significativa. En nuestro método se encontró que existe una correlación significativa entre x e y. (Tabla 4)

r	t <sub>calculado</sub>	n	t <sub>0.05, 4</sub>	¿Aceptar H <sub>0</sub> ?
0.998	36.89	6	2.353	No

### Límites de confianza

Para evaluar los límites de confianza en donde los errores aleatorios de la pendiente y la ordenada al origen (b y a respectivamente) sean mínimos, se calcula el valor estadístico s<sub>y/x</sub> dado por la ecuación:

$$s_{y/x} = \left\{ \frac{\sum (y_i - \hat{y}_i)^2}{n-2} \right\}^{1/2} \quad \dots (21)$$

En la ecuación  $\hat{y}$  representa los puntos sobre la recta de regresión calculada. Después de obtener un valor de s<sub>y/x</sub>, se pueden calcular s<sub>b</sub> y s<sub>a</sub> que son las desviaciones estándar para la pendiente (b) y la ordenada al origen (a) de acuerdo a las ecuaciones siguientes:

$$s_b = \frac{s_{y/x}}{\{ \sum (x_i - \bar{x})^2 \}^{1/2}} \quad \dots (22)$$

$$s_a = s_{y/x} \left\{ \frac{\sum x_i^2}{n \sum (x_i - \bar{x})^2} \right\}^{1/2} \quad \dots (23)$$

Con los valores de s<sub>b</sub> y s<sub>a</sub> se estiman los límites de confianza para la pendiente y la ordenada al origen de la forma siguiente:

$$b \pm t s_b$$

$$a \pm t s_a$$

en donde t se obtiene para un  $\alpha = 0.01$  y (n-2) grados de libertad. Los resultados obtenidos se resumen en la tabla 5.

Z	Valor	$t_{0.01, 4}$	$s_z$	Límite de confianza
b	0.0077	3.747	0.00018	0.00068
a	0.327	3.747	0.03477	0.13029

Con estos resultados se graficaron los límites de confianza en la gráfica de la Fig. 13.

#### Límite de detección del método para las disoluciones en plasma

Para obtener el límite de detección del método (LDD) se realizó el análisis de 8 mediciones de la solución de 33 ppm en plasma por el método analítico desarrollado. El LDD se estima mediante la ecuación:

$$LDD = t_{(n-1, \alpha=0.005)} S \dots (24)$$

donde  $t_{(n-1, \alpha=0.005)}$  es el valor de t de student apropiado para un nivel de confianza del 99% con (n-1) grados de libertad y S es la desviación estándar expresada en unidades de concentración.

El límite de cuantificación del método (LDC) se estima multiplicando por 10 la desviación estándar expresada en unidades de concentración.

n	$t_{(7, \alpha=0.005)}$	S	LDD ppm	LDC ppm
8	3.707	1.1427	3.99	11.427

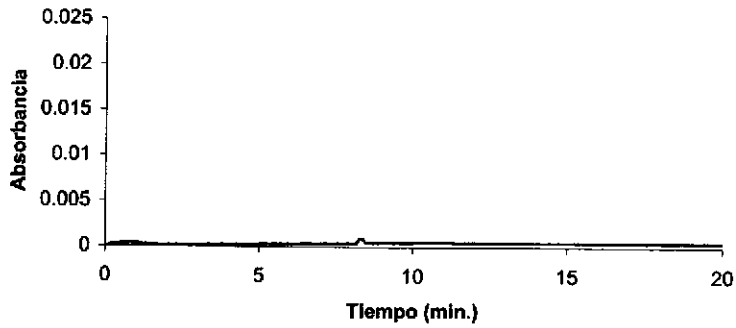
## CONTROLES EN ORINA

La linealidad en orina se evaluó en un intervalo de 0 a 400 ppm de iohexol de la misma manera que para el iohexol en plasma (Tablas 7 y 8; Figs. 14, 15 y 16). Se realizó la separación en un electrolito soporte de ácido bórico 220 mM pH= 8.8.

Muestra (ppm)	Área $\pm$ desviación estándar (n=3)
0	0
5	0.0604 $\pm$ 0.0002
25	0.2375 $\pm$ 0.0015
50	0.4577 $\pm$ 0.0096
80	0.7200 $\pm$ 0.0055
100	0.9173 $\pm$ 0.0058
150	1.3512 $\pm$ 0.0040
200	1.7581 $\pm$ 0.0259
400	3.3990 $\pm$ 0.0049

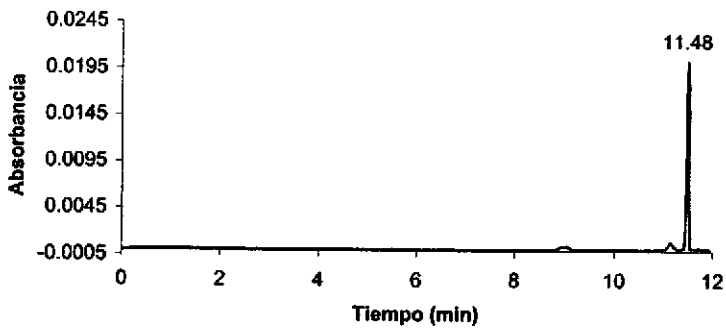
r	t <sub>calculado</sub>	n	t <sub>0.05, 8</sub>	¿Aceptar H <sub>0</sub> ?
0.999	99.97	8	1.943	No

**Muestra control de la orina**

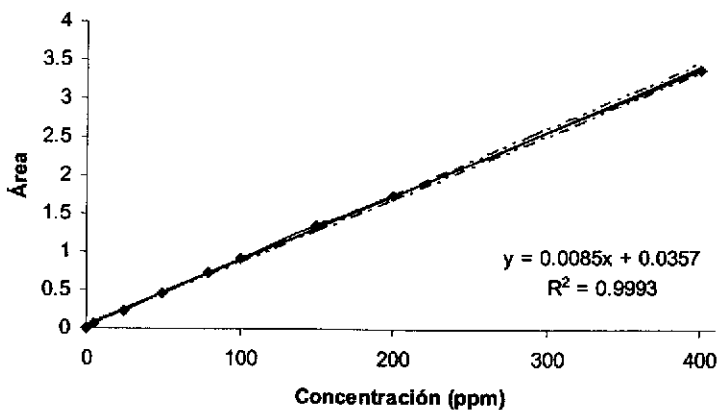


**Fig. 14** Electroferograma de una muestra de orina de rata sin iohexol

**Muestra de orina con iohexol**



**Fig. 15** Electroferograma de una muestra representativa de orina de rata sana



**Fig. 16** Gráfica para evaluar el intervalo lineal del método para la determinación de soluciones de iohexol en orina

Al igual que para el iohexol en plasma, también se evaluaron los límites de confianza, (Tabla 9) LDD y LDC (Tabla 10) del iohexol en soluciones de orina de rata.

**Tabla 9.** Obtención de los límites de confianza de b y a en soluciones de orina

Z	Valor	$t_{0.01,7}$	$s_z$	Límite de confianza
b	0.0077	2.998	0.000047	0.00014
a	0.327	2.998	0.000654	0.00196

Con estos resultados se graficaron los intervalos de confianza para la curva de calibración del iohexol en orina (Fig. 16). Comparando los intervalos de confianza para las gráficas de linealidad de plasma y orina se encuentra que la determinación del iohexol en las muestras de orina es más precisa que la determinación en plasma.



Para calcular los límites de detección y cuantificación en muestras de orina se hicieron 7 mediciones de la solución de 5 ppm en orina, encontrándose los siguientes resultados:

<b>Tabla 10. Determinación del LDD y del LDC en soluciones de orina</b>				
<b>n</b>	<b>t(6, <math>\alpha=0.005</math>)</b>	<b>S</b>	<b>LDD ppm</b>	<b>LDC ppm</b>
7	3.707	0.0888	0.3294	0.8886

**DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DEL IOHEXOL EN EL PLASMA Y LA ORINA DE RATA SANA (MUESTRAS DE LAS RATAS A, B, C, D, E y F)**

Las muestras 1 a 18 corresponden a las muestras de plasma de 6 ratas sanas. (Tabla 11) Las muestras se diluyeron 30 veces. Como se indica en la tabla y de acuerdo al proceso descrito anteriormente, algunas muestras se toman a los 60, 90 y 120 min. después de haber perfundido el iohexol.

Las muestras 19 a 30 son de orina de las 6 ratas sanas (Tabla 12) que se obtuvieron de acuerdo al procedimiento descrito anteriormente. Como se indica en la tabla y de acuerdo a lo descrito en la página 25 de esta tesis, una se recolectó a los 60 y otra a los 90 min. de haber perfundido el iohexol.

Diariamente se hicieron curvas de calibración en plasma y orina con las cuales se determinó la concentración de las muestras analizadas en el transcurso de ese día.

**Tabla 11. Relación de los resultados del iohexol en las muestras de plasma de ratas sanas**

Rata	Toma al minuto:	Muestra	Área promedio $\pm$ desviación estándar (n=3)	Concentración (ppm) $\pm$ desviación estándar (n=3)
A	60	1	1.2403 $\pm$ 0.0302	134.51 $\pm$ 3.437
	90	2	1.2509 $\pm$ 0.0557	135.7268 $\pm$ 6.330
	120	3	1.8649 $\pm$ 0.0189	205.4962 $\pm$ 2.157
B	60	4	1.2014 $\pm$ 0.029	134.436 $\pm$ 3.120
	90	5	1.371 $\pm$ 0.0101	152.769 $\pm$ 1.095
	120	6	1.598 $\pm$ 0.0218	177.163 $\pm$ 2.348
C	60	7	1.120 $\pm$ 0.0149	119.271 $\pm$ 1.704
	90	8	1.605 $\pm$ 0.0135	174.376 $\pm$ 1.543
	120	9	1.655 $\pm$ 0.0348	180.104 $\pm$ 3.960
D	60	10	1.447 $\pm$ 0.0148	158.011 $\pm$ 1.686
	90	11	2.357 $\pm$ 0.071	261.420 $\pm$ 8.077
	120	12	2.518 $\pm$ 0.0415	279.79 $\pm$ 4.725
E	60	13	1.402 $\pm$ 0.0350	156.123 $\pm$ 4.072
	90	14	1.426 $\pm$ 0.0159	158.954 $\pm$ 1.851
	120	15	1.419 $\pm$ 0.0252	158.060 $\pm$ 2.934
F	60	16	1.263 $\pm$ 0.0147	148.537 $\pm$ 1.824
	90	17	1.477 $\pm$ 0.0254	174.919 $\pm$ 3.141
	120	18	1.500 $\pm$ 0.0086	177.790 $\pm$ 1.069

Tanto en las muestras del plasma como en las muestras de la orina (que se muestran a continuación) se esperaría que para una misma rata las tres muestras del plasma presentarían una concentración muy parecida, al igual que con las dos muestras de la orina, sin embargo, gracias a este estudio se observa que esto únicamente se cumple para las tres muestras de plasma de la rata E, mientras que en los otros casos no es así, lo cual se debe a que la rata necesitaba más tiempo para que esto sucediera.

<b>Tabla 12. Relación de los resultados del iohexol en las muestras de orina de ratas sanas</b>				
<b>Rata</b>	<b>Toma al minuto:</b>	<b>Muestra</b>	<b>Área promedio ± desviación estándar (n=3)</b>	<b>Concentración (ppm) ± desviación estándar (n=3)</b>
<b>A</b>	<b>60</b>	<b>19</b>	<b>0.89 ± 0.004</b>	<b>95.330 ± 0.467</b>
	<b>90</b>	<b>20</b>	<b>1.09 ± 0.009</b>	<b>117.976 ± 1.076</b>
<b>B</b>	<b>60</b>	<b>21</b>	<b>0.99 ± 0.001</b>	<b>91.320 ± 0.161</b>
	<b>90</b>	<b>22</b>	<b>0.85 ± 0.002</b>	<b>76.844 ± 0.237</b>
<b>C</b>	<b>60</b>	<b>23</b>	<b>1.031 ± 0.018</b>	<b>90.551 ± 1.632</b>
	<b>90</b>	<b>24</b>	<b>1.281 ± 0.009</b>	<b>112.854 ± 0.878</b>
<b>D</b>	<b>60</b>	<b>25</b>	<b>1.020 ± 0.023</b>	<b>100.100 ± 2.421</b>
	<b>90</b>	<b>26</b>	<b>1.848 ± 0.019</b>	<b>184.619 ± 1.969</b>
<b>E</b>	<b>60</b>	<b>27</b>	<b>1.521 ± 0.027</b>	<b>157.118 ± 2.900</b>
	<b>90</b>	<b>28</b>	<b>1.645 ± 0.014</b>	<b>170.105 ± 1.477</b>
<b>F</b>	<b>60</b>	<b>29</b>	<b>1.077 ± 0.016</b>	<b>121.827 ± 1.944</b>
	<b>90</b>	<b>30</b>	<b>1.429 ± 0.014</b>	<b>162.743 ± 1.649</b>

## ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

El efecto de aumentar la concentración del electrolito y el pH tuvo como consecuencia un aumento en el tiempo de retención. De acuerdo a las ecuaciones 5 y 6 al aumentar la concentración del electrolito, la viscosidad aumenta y en consecuencia, la movilidad electroforética disminuye. En el caso de aumentar el pH se aumenta la carga negativa. De acuerdo a la ecuación 5 el efecto de aumentar la carga provoca una mayor movilidad electroforética que al ir en contra del flujo electroosmótico también genera un mayor tiempo de retención de acuerdo con la ecuación 9.

La curva de calibración para el iohexol en plasma fue lineal en un rango amplio de concentraciones (de 0 a 400 ppm) y presentó un coeficiente de determinación ( $r^2$ ) de 0.9978, el cual junto con los límites de detección y de cuantificación deben mejorarse, probablemente esto se logre al realizar una nueva curva de calibración con un mayor número de puntos cercanos a 0.

En cuanto a la curva de calibración para el iohexol en orina, se encontró que para un rango amplio de concentraciones (de 0 a 400 ppm) el comportamiento fue lineal, presentando un coeficiente de determinación ( $r^2$ ) de 0.9993.

Los límites de cuantificación del iohexol en plasma y en orina fueron de 11.42 y 0.8886 ppm respectivamente y los límites de detección en plasma y en orina fueron de 3.99 y 0.3294 ppm, respectivamente. En la bibliografía no se encontraron estos datos reportados [15, 16]. Por CLAE se encontró que el límite de cuantificación del iohexol en plasma es de 9 ppm [14], mientras que el límite de detección es de 1.2 ppm [13], los cuales están en el rango de nuestros resultados. Para la orina no se encontraron estos datos.

El que las determinaciones en orina hayan presentado desviaciones estándar menores que en plasma (Tablas 11 y 12) se debe a que la orina tiene una osmolaridad mayor que el plasma [18], esto deriva en una mayor concentración de iones, es decir una mayor fuerza iónica que ayudó en la determinación del iohexol (eqs. 7, 8 y 9).

Debido a que las muestras de plasma y orina se diluyeron en H<sub>2</sub>O no se encontraron diferencias significativas entre las movilidades del iohexol en las diferentes preparaciones en los análisis realizados en un mismo día, mientras que en las determinaciones realizadas en diferentes días se encontraron diferencias significativas (el tiempo de retención varió de 11.5 a 11.0 min. durante el tiempo que duró el análisis) por lo que fue necesario agregar a las muestras del plasma y de la orina alícuotas de la solución estándar del iohexol como un control. Al aumentar el pico correspondiente al iohexol, se corroboró que efectivamente se trataba del compuesto analizado (Fig. 17). También fue necesario realizar diariamente una curva de calibración tanto en el plasma como en la orina con lo cual se disminuyó el riesgo de tener lecturas erróneas. La variación en los tiempos de retención se debe al desgaste de la columna, pues estos análisis se realizaron en un periodo de 8 meses.

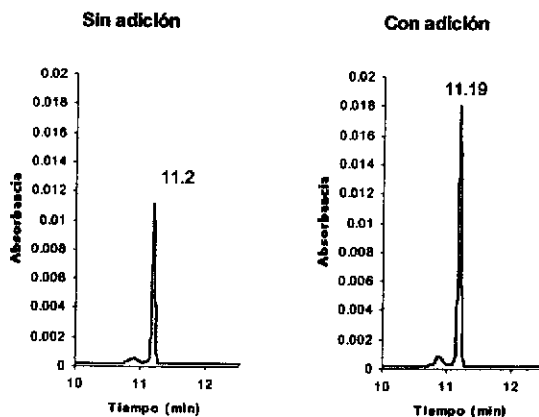


Fig. 17 Prueba de adición del iohexol para verificar la identidad del pico en una muestra de plasma de rata sana

Con las concentraciones de iohexol obtenidas por este método se determinó la tasa de filtración glomerular de acuerdo a la ecuación general siguiente:

$$C_x = (U_x) (F) / (P_x)$$

En donde  $U_x$  es la concentración del marcador X en la orina (en nuestro caso X = iohexol),  $P_x$  es la concentración del marcador en el plasma y F es el flujo urinario que es igual al volumen de orina recolectado por unidad de tiempo.

En la tabla 13 se muestran los valores obtenidos para la TFG de acuerdo con la determinación del iohexol por EC:

<b>Tabla 13. Resultados de la TFG para las ratas</b>	
<b>Rata</b>	<b>TFG(ml/min)</b>
<b>A</b>	2.6148
<b>B</b>	1.8754
<b>C</b>	1.7287
<b>D</b>	1.2207
<b>E</b>	1.9798
<b>F</b>	1.8456
<b>PROMEDIO</b>	1.8775
<b>D.E.</b>	0.41
<b>C.V.</b>	21.837

Se observa que a pesar de tratarse de animales sanos hay una variación relativa de 21% en los valores obtenidos, lo cual puede deberse a problemas en la toma o el tratamiento de las muestras.

En la tabla 14 se comparan los resultados obtenidos de la TFG con la medición de la creatinina y del iohexol en las muestras biológicas de las mismas ratas. La creatinina es un marcador endógeno por lo que se pudieron determinar simultáneamente la creatinina y el iohexol.

Se observa que para ambas determinaciones los resultados obtenidos son muy semejantes, pues tomando en cuenta que la TFG para una rata normal se encuentra entre 1.5 y 2 ml/min tanto el promedio de las determinaciones de creatinina como el del iohexol se encuentran dentro de este rango, observándose lo mismo en el caso de la desviación estándar y el coeficiente de variación, pues aunque se observan diferencias, estas no son significativas.

<b>Tabla 14. Comparación de los resultados de la TFG por determinación de creatinina y de iohexol en ratas sanas</b>		
<b>Rata</b>	<b>Creatinina-TFG(ml/min)</b>	<b>Iohexol-TFG (ml/min)</b>
<b>A</b>	1.998	2.6148
<b>B</b>	1.611	1.8754
<b>C</b>	1.240	1.7287
<b>D</b>	0.995	1.2207
<b>E</b>	1.934	1.9798
<b>F</b>	1.508	1.8456
<b>PROMEDIO</b>	1.54	1.8775
<b>D.E.</b>	0.355	0.41
<b>C.V.</b>	22.96	21.84

Sin embargo, si omitimos el resultado mas alto y el más bajo de las determinaciones de la TFG (de acuerdo a la experiencia que se tiene en el laboratorio de la Dra. Norma Bobadilla) que corresponden a las ratas A y D respectivamente y obtenemos la desviación estándar y el coeficiente de variación estándar (Tabla 15), podemos observar que con la medición del iohexol por electroforesis capilar se obtienen resultados de la TFG más confiables, pues la desviación estándar es menor para el iohexol que para creatinina, mientras que el coeficiente de variación estándar nos está diciendo que para las mediciones de creatinina hay una variación del 15.7%, mientras que para el iohexol sólo es del 4.8%.

<b>Tabla 15. Comparación de los resultados de la TFG por determinación de creatinina y de iohexol en ratas sanas para una n= 4</b>		
	<b>Creatinina-TFG(ml/min)</b>	<b>Iohexol-TFG (ml/min)</b>
<b>PROMEDIO</b>	1.573	1.8754
<b>D.E.</b>	0.248	0.89
<b>C.V.</b>	15.79	4.816

## CONCLUSIONES

- Se pudo identificar y cuantificar en forma confiable el iohexol en las muestras de plasma y orina de rata.
- La electroforesis capilar (EC) demostró ser una técnica muy sensible en la detección del iohexol por lo que la dosis administrada a la rata puede incluso ser menor a la administrada en este trabajo.
- Los valores de los límites de cuantificación y de detección en plasma fueron parecidos a los de la CLAE [13 y 14] sin embargo la EC presenta la ventaja de requerir un tiempo menor para el análisis de las muestras. En las muestras de orina los valores obtenidos fueron mejores que los obtenidos para plasma por cualquiera de las dos técnicas
- Otra ventaja de la EC sobre la CLAE es el uso de volúmenes pequeños (ml) de soluciones acuosas. Lo anterior es impensable en una técnica como la CLAE en donde se utilizan litros de solventes orgánicos al día para reacondicionar la columna para una cantidad equivalente de muestras.
- Al comparar el método de la creatinina y el del iohexol para determinar la TFG se encontró que el método del iohexol fue más preciso pues presentó un coeficiente de variación de 4.8% mientras que el de la creatinina fue de 15.7%. Además, la ventaja de la electroforesis capilar es la rapidez y el tratamiento mínimo de las muestras en la determinación del marcador.



## **PERSPECTIVAS**

Se continuará con el estudio de la medición de la TFG en ratas con insuficiencia renal. Debido a que se obtuvieron buenos resultados en la identificación y cuantificación del iohexol por electroforesis capilar en las muestras biológicas, se contempla la posibilidad de aplicar esta técnica de manera sistemática en animales de experimentación en los laboratorios del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán", ya que la cantidad de reactivos y tiempo utilizados se verían disminuidos.

Por otra parte se hará la validación formal del método de determinación del iohexol pues esta técnica ha llamado la atención para ser empleada en la determinación de la TFG en pacientes, lo cual ayudaría a decidir si su insuficiencia renal todavía puede ser tratada con medicamentos o si es necesario que se proceda a la diálisis.

## BIBLIOGRAFÍA

- [1] Guzmán N.A., *Capillary Electrophoresis Technology*, Chromatographic Science Series, New York, USA, 1993.
- [2] Tejada A., *Bioseparaciones*, Ed. UniSon, México, 1995.
- [3] Altria K., *Capillary Electrophoresis Guidebook*, Humana Press, New Jersey, E.U.A., 1996.
- [4] Yang Q., Hidajat K., Li S.F.Y., *J. Chromatogr. Science*, 35, August 1997, 358-373 "Trends in capillary electrophoresis: 1997".
- [5] Harris D., *Análisis Químico Cuantitativo*, 2ª edición, ed. Reverté S.A., España, 2001.
- [6] Altria K.D., *J. Chromatogr. A*, 856, 1999, 443-463 "Overview of capillary electrophoresis and capillary electrochromatography".
- [7] Altria K.D., Bestford I., *J. Cap. Elec.* "Main component assay of pharmaceuticals by capillary electrophoresis: considerations regarding precision, accuracy and linearity data".
- [8] Kasicka V., *Electrophoresis*, 20, 1999, 3084-3115, "Capillary electrophoresis of peptides".
- [9] Voet D., Voet J.G., *Bioquímica*, Ediciones Omega S.A., España, 1992.
- [10] Poinot V., Bayle C., Couderc F., *Electrophoresis*, 24, 2003, 4047- 4062 "Recent advances in amino acid analysis by capillary electrophoresis".
- [11] Budavari S., "The Merck Index", Twelfth Edition, Merck and Co., New Jersey, E.U.A., 1996.
- [12] Ford T.C., Rickwood D.; *Biochem. Soc. Trans.*; 1982, 10 (5), 364-5 "Characterization of Nycodenz, a new non-ionic, iodinated gradient medium".
- [13] Brändström E., Grzegorzczak A., Jacobsson L., Frieberg P., Lindahl A., Aurell M., *Nephrol. Dial. Transplant.* (1998) 13: 1176-1182 "GFR measurement with iohexol and <sup>51</sup>Cr-EDTA. A comparison of the two favoured GFR markers in Europe".
- [14] Laroute V., Hervé L., Costes G., Toutain P. L.; *J. Pharmacol. Toxicol.*, 41, (1999), 17-25. "Measurement of glomerular filtration rate and effective renal

plasma flow in the conscious beagle dog by single intravenous bolus of iohexol and p-aminohippuric acid”.

[15] Shihabi Z.K., Constantinescu M.S. Clin. Chem., 38, 10, 1992, 2117-2120, “Iohexol in serum determined by capillary electrophoresis”.

[16] Rocco M.V., Buckalew V.M., Moore L.C., Shihabi Z.K.; Am. J. Kidney Diseases, 28, 2, 1996, 173-177, “Capillary electrophoresis for the determination of glomerular filtration rate using nonradioactive iohexol”.

[17] Ganong W.F., Fisiología Médica, 18ª edición, Ed. Manual Moderno, México, 2002.

[18] Guyton A.C., Hall J.E.; Tratado de Fisiología Médica, 10ª edición, Ed. Mc. Graw Hill Interamericana, México, 2001

[19] Tan G.D., Lewis A.V., James T.J., Altmann P., Taylor R.P., Levy J.C.; Diabetes care, 25, 11, 2002, 2004- 2009, “Clinical usefulness of Cystatin C for the estimation of glomerular filtration rate in type 1 diabetes”.

[20] Leyva R., Álvarez C., López M.G., Rev. Med. IMSS 2004; 42, (1): 5-10 “Función renal en diabéticos tipo 2, determinada por fórmula de Cockcroft-Gault y depuración de creatinina”.

[21] Fernández-Fresnedo G., Francisco A.L.M. de, Rodrigo E., Piñera C., Herráez I., Ruiz J.C., Arias M., Nefrología, Vol. XXII. Número 2, 2002, 144-151 “Insuficiencia renal <oculta> por valoración de la función renal mediante la creatinina sérica”.

[22] Miller J.C., Miller J.N., Estadística para química analítica, Ed. Addison Wesley Iberoamericana, U.S.A., 1993.

[23] Rangel L., Tesis 2002 “Estudio de un inmunoabsorbente específico para herbicidas feniluréicos y su evaluación como técnica alternativa de extracción en fase sólida”, M.C. Q. Analítica, Fac. de Química, UNAM

[24] Rodríguez T. Tesis 2001 “Evaluación de metodologías analíticas para la determinación de arsénico en muestras sólidas ambientales”, M.C. Q. Analítica, Fac. de Química, UNAM

[25] Elizalde M.N. Tesis 2003 "Desarrollo de la metodología analítica para la determinación de nonilfenoles en el acuífero del Valle del Mezquital, Hgo. (DR-03)", M.C. Q. Analítica, Fac. Química, UNAM.

[26] Vázquez J.C. Tesis 2003 "Desarrollo, evaluación y caracterización de inmunoabsorbentes para la extracción en fase sólida de pesticidas a partir de muestras acuosas y su determinación por cromatografía líquida", Doctorado en Ciencias Químicas, Fac. de Química, UNAM.