



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

96

«EVALUACION DE LA METAHEMALBUMINA»
COMO PRUEBA DIAGNOSTICA
EN PANCREATITIS

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A :
ROSA BEATRIZ MARTINEZ GOMEZ

MEXICO, D. F.

1977



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.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Tesis 1977
M-~~857~~ 259
FECHA _____
PÁG. _____



Con cariño, admiración y agradecimiento

a mis padres:

Sr. Manuel Martínez Rosique y

Sra. Rosa Gómez de Martínez.

A mi hermana:

Sra. Carmen Martínez de Pier

como muestra de mi cariño.

Con especial cariño a Beto.

Con admiración y respeto a la

Q. F. B. Dea Coronado Perdomo

Al personal del Laboratorio (5o. Piso)
del Centro Médico La Raza, por su
valiosa cooperación en el desarrollo
de este trabajo.

A mis familiares, amigos y compañeros

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE	Q.F.B. GUADALUPE VELEZ PRATT
VOCAL	Q.F.B. DEA CORONADO PERDOMO
SECRETARIO	Q.F.B. MA. ELENA BUSTAMANTE CALVILLO
1er. SUPLENTE	Q.F.B. LETICIA CARRASCO RIVERA
2do. SUPLENTE	Q.F.B. LUZ MA. HERNANDEZ BELTRAN

SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA
LABORATORIO CENTRO MEDICO LA RAZA

S U S T E N T A N T E :

ROSA BEATRIZ MARTINEZ GOMEZ

ASESOR DEL TEMA :

Q.F.B. DEA CORONADO PERDOMO

I N D I C E

CAPITULO I.	PAG.
INTRODUCCION	1
CAPITULO II	
GENERALIDADES	3
CAPITULO III	
MATERIAL Y METODO.....	17
CAPITULO IV	
RESULTADOS.....	27
CAPITULO V	
DISCUSION.....	37
CAPITULO VI	
RESUMEN.....	43
CAPITULO VII	
CONCLUSIONES.....	45
CAPITULO VIII	
BIBLIOGRAFIA.....	48

C A P I T U L O I

I N T R O D U C C I O N

La pancreatitis aguda hemorrágica es un padecimiento de corta evolución, de pronóstico grave y con un índice de mortalidad muy alto (aproximadamente 90 %), cuyo diagnóstico diferencial con la pancreatitis aguda edematosa y otros procesos patológicos gastrointestinales presenta dificultades.

Debido a que los dos tipos de pancreatitis aguda presentan el mismo cuadro clínico, en épocas pasadas solo podían diferenciarlas por medio de una laparotomía exploradora y en muchos casos en el exámen postmortem; al confirmarse la muerte por pancreatitis hemorrágica, se observó que el suero de estos pacientes presentaba un color verde-pardo característico, que más tarde Fairley describió como metahemalbúmina.

La metahemalbúmina es un complejo que resulta de la combinación de una de las proteínas más abundantes en el plasma, la albúmina, y de un cromógeno derivado de la hemoglobina, la hematina. Se presenta normalmente en el suero de pacientes que cursan con una pancreatitis aguda hemorrágica, debido a la extravasación de sangre alrededor del páncreas y a la posterior transformación de la hemoglobina por acción de las enzimas pancreáticas liberadas.

Es, por tanto, objetivo de este estudio cuantificar la metahemalbúmina como prueba diagnóstica diferencial entre las dos formas de pancreatitis aguda, la edematosa y la necrótico-hemorrágica, pretendiendo ayudar al clínico a aplicar un tratamiento adecuado y, en consecuencia, disminuir el alto porcentaje de mortalidad de este padecimiento.

Asimismo, establecer los valores de referencia para nuestra población (Zona Norte de la Ciudad de México) en 120 personas "clínicamente sanas" y evaluar la prueba en 80 pacientes con diagnóstico de pancreatitis aguda para verificar la confiabilidad del método.

C A P I T U L O I I

G E N E R A L I D A D E S

La pancreatitis aguda hemorrágica es un padecimiento de pronóstico grave que se presenta de improviso en personas aparentemente sanas, de edad media y sin predominio de sexo. - Generalmente se trata de individuos obesos o alcohólicos con antecedentes hepáticos o litiásicos.

La etiología de esta enfermedad es alguna combinación de obstrucción de los conductos, con reflujo del contenido duodenal o biliar o sin él, e insuficiencia vascular impuesta sobre un páncreas exocrino estimulado.

1.- Signos Funcionales:

- a) Dolor súbito, violento, al punto de producir a veces el síncope, de localización inicial epigástrica, se presenta desde el comienzo en toda su magnitud, es tenaz y en algunos casos resistente a los calmantes.
- b) Los vómitos raramente son únicos, a menudo muy frecuentes a veces ininterrumpidos e incohercibles.
- c) Retención de heces y gases incompleta pero no invencible, del mismo orden es la retención de orina.

2.- Signos Generales:

Se presenta casi de inmediato el estado de shock, la ansiedad extrema, las manchas de cianosis, disnea, discordancia del pulso y la temperatura.

Entre los factores que más comunmente desencadenan un cuadro clínico de este tipo están; una comida copiosa y la ingestión excesiva de bebidas alcohólicas. (1)

P a t o g e n i a :

La pancreatitis aguda es un proceso de autodigestión, ya que al producirse lesiones tisulares en el páncreas se libera citocinasa que es activador de la tripsina y otras enzimas como la amilasa y la lipasa que en condiciones normales permanecen inactivas; éstas acentúan la autodigestión liberando una cantidad creciente de citocinasa, con lo cual se provoca una reacción en cadena, esto explica la extensión progresiva de las lesiones. Es por lo tanto una enfermedad grave que requiere tratamiento médico o quirúrgico inmediato; la denominación de pancreatitis aguda debe limitarse a los casos de inflamación primaria del páncreas, en el curso de la cual puede haber edema, necrosis, supuración o hemorragia. (2)

Se presenta bajo dos formas: la edematosa y necrótico-hemorrágica. Independientemente de la forma anatómica de la pancreatitis el denominador común de las lesiones es el daño que las enzimas proteolíticas del páncreas ejercen sobre él. Esta proteólisis es la responsable del edema, la necrosis y la hemorragia; afectando el parénquima, las paredes vasculares, el tejido conjuntivo y la grasa.

Pancreatitis Edematosa:

El páncreas está hinchado, con edema a tensión y con escasas manchas de necrosis grasa, no existe hemorragia. Microscópicamente se observa dilatación vascular, edema intersticial e infiltración directa de polinucleares.

Pancreatitis Necrótico-Hemorrágica:

La necrosis es de grado variable y puede en algunos casos llegar hasta la gangrena; lo que más llama la atención macroscópicamente es la infiltración hemorrágica y la necrosis grasa; entre los cambios más importantes que se pueden observar son los siguientes:

- a) Parénquima: Pérdida de los gránulos de zimógeno, cariólisis y desintegración citoplasmática.

La destrucción es muy importante, hay zonas en las que el parénquima ha desaparecido y solo queda infiltración hemorrágica, esto es, en los casos muy severos.

b) **Vasos Sanguíneos:** Algunas arterias y venas de los septos interlobulillares muestran necrosis, en algunos solo se daña la parte externa, lo cual indica que la tripsina difundida en los tejidos lesiona los vasos de afuera hacia adentro. A causa de este ataque vascular se encuentra sangre extravasada y fibrina.

c) **Necrosis Grasa:** Macroscópicamente se observan manchas de color amarillo pálido, opacas que hacen contraste con el aspecto normal del tejido adiposo; estas placas de necrosis no solo se pueden encontrar en el páncreas, sino también esparcidas por el mesenterio, peritoneo y aún en el pericardio y pleura.

Microscópicamente se observa una malla laxa y granular que representa los límites de las células adiposas, en algunos casos pueden reconocerse acúmulos de ácidos grasos que resultan -

del desdoblamiento de la grasa producida por la acción de la lipasa. (3)

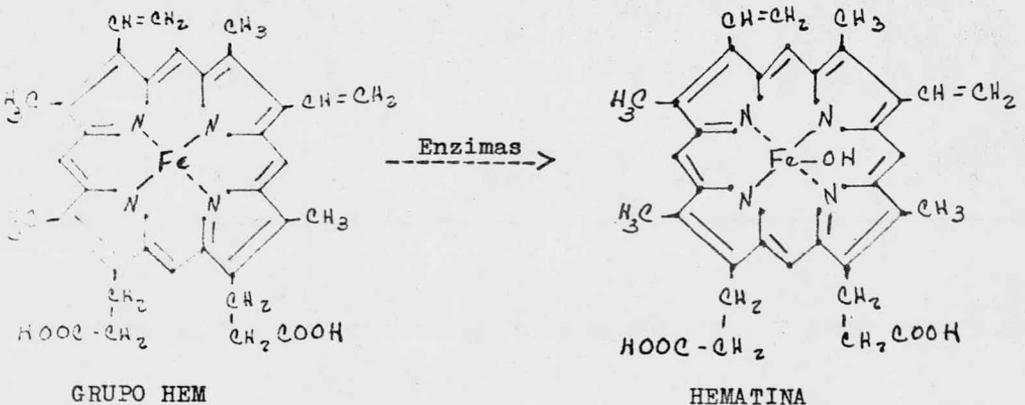
Otro dato importante en la diferenciación de las - pancreatitis, es el nivel de amilasa en suero y orina; aunque - no es muy específico, por lo general en las pancreatitis edema- tosas alcanzan niveles muy altos que se mantienen por varios -- días y en las hemorrágicas son altos, pero disminuyen considerable y rápidamente al mismo tiempo que se eleva la metahemalbúmina.

Metahemalbúmina :

La pancreatitis aguda es a menudo asociada con - hemorragia interna alrededor de la glándula, este tipo de padecimiento es de pronóstico grave.

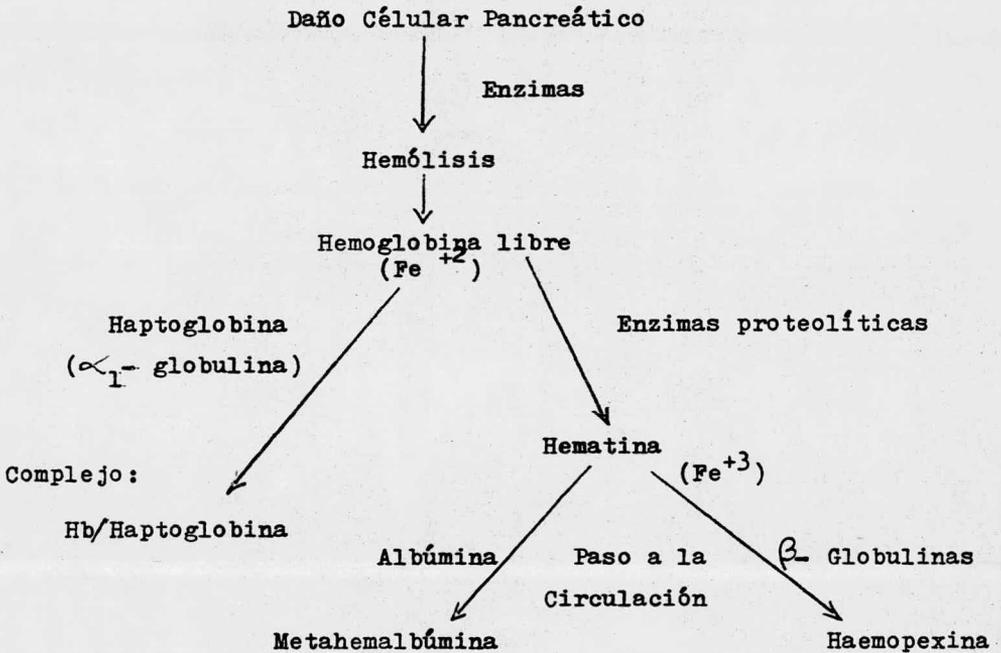
En el proceso de evolución de una pancreatitis - existe liberación de gran cantidad de enzimas que provocan lesiones tisulares, que llegan inclusive a los vasos sanguíneos, lo que ocasiona extravasación de sangre en toda la zona dañada.

Las enzimas pancreáticas actúan sobre los hematíes liberando hemoglobina en el área inflamada y a todo su alrededor. Estas mismas causan también el rompimiento de la hemoglobina del que se deriva la formación de la hematina, siendo esta el resultado de la oxidación del grupo Hem ($Fe^{+2} \rightarrow Fe^{+3}$).



Cuando la hemólisis es leve, la hemoglobina libre se une a la Haptoglobina (α_1 -globulina) para ser transportada y degradada en el hígado; pero al existir un exceso de hemoglobina, la capacidad y la cantidad de haptoglobina se reducen - (sin llegar a desaparecer), lo que trae como consecuencia la - producción de hematina que pasa a la circulación periférica don - de se une con la albúmina para formar la metahemalbúmina, cuyos niveles en suero con un índice importante para diferenciar la - pancreatitis hemorrágica aguda de la edematosa. La hematina li - berada al plasma no sólo se une a la albúmina sino también for - ma complejos con las β -globulinas (Haemopexina), esto desde lue - go en menor proporción debido a los diferentes porcentajes de - ambas proteínas presentes.

Como se observa en el esquema No. 1 la formación - de la metahemalbúmina es el resultado de una secuencia de reac - ciones provocadas por la alteración del catabolismo de la hemo - globina. Su presencia en la circulación en una concentración - sérica medible, se debe a la acción de enzimas pancreáticas li - bres así como a la de sus activadores, inhibidores y cofactores presentes en el suero.



ESQUEMA NO. 1

FORMACION DE LA METAHEMALBUMINA

Historia de la determinación de la Metahemalbúmina:

El estudio de la metahemalbúmina se inició a principios de siglo, cuando se reportaron casos de pacientes cuyo suero o plasma presentaba un color "café o té" (verde-pardo) debido a la presencia de la metahemalbúmina y en algunos casos de aspecto lechoso.

La primera descripción de la metahemalbúmina fue realizada por Fairley y Bromfield (4) en 1934 presentándola como un complejo de ferri-hem y albúmina, que se encontraba en casos de hemólisis intravascular, en anemias hemolíticas o a causa de una transfusión con sangre incompatible.

Fairley adoptó la reacción de Schumm (1912) modificándola; en la que la metahemalbúmina fue determinada por la aparición de dos bandas de absorción, una más intensa a 558 nm y la otra a 530 nm.

Los primeros tres casos de metahemalbuminemia descubiertos por medio de la reacción de Schumm modificada por Fairley fueron reportados en 1961; dos de ellos debidos a hemorragia intraperitoneal (4) y el otro a causa de una pancreatitis aguda necrótico-hemorrágica (5).

En 1963 Northan y colaboradores (6), realizaron un estudio con el suero de 20 pacientes con diagnóstico de pancreatitis, en 6 de ellos se encontró la presencia de metahemalbúmina por medio de la reacción de Schumm, en los restantes la prueba fué negativa. Señalaron que la metahemalbuminemia era por lo tanto, encontrada en condiciones hemolíticas severas y que su presencia coincidía con la disminución o desaparición de la haptoglobina, ya que esta al saturar su capacidad de enlace no alcanzaba a transportar toda la hemoglobina liberada. Esto fué -- posteriormente aclarado por R.W. Richardson (7), quien encontró que no existía la ausencia ni la saturación de la haptoglobina en pacientes con pancreatitis y describió la presencia de la metahemalbúmina en el suero de una paciente con hemorragia por embarazo extrauterino.

De los resultados anteriores se dedujo que la presencia de la metahemalbúmina en el suero de pacientes con pancreatitis era una prueba de la existencia de un padecimiento de tipo hemorrágico.

Otro antecedente de interés sobre la diferenciación entre las dos formas en que se presentaban las pancreatitis fué encontrada por Weeb (9) y fué la presencia de hipocalcemia y tetania unidas a la metahemalbuminemia en un caso de pancrea-

titis hemorrágica aguda fulminante.

En agosto de 1963 Shinowara y Walters (10), realizaron un estudio sobre la determinación de la hematina en plasma humano, en presencia de hemoglobina y bilirrubina, así como su capacidad de enlace con las proteínas complejas presentes en él. Se puso de manifiesto que la hematina no solo formaba complejos con la albúmina, sino que también lo hacía con las y globulinas.

Durante el desarrollo de la investigación se demostró que la presencia de la hemoglobina y la hiperbilirrubinemia enmascaraban a la hematina, lo que trajo como consecuencia baja de la sensibilidad de la reacción de Schumm modificada; lo mismo sucedió con la lipemia, sólo que ésta podía ser eliminada por medio de la filtración (seitz), a diferencia de los pigmentos - que no pueden ser removidos y concluyeron que la diferencia de absorbancias obtenida entre 615 y 675 nm es altamente específica para la evaluación del complejo Hematina-Proteína ya que cumple con la Ley de Lambert y Beer, aún en presencia de hemoglobina y bilirrubina. (En este método la cuantificación de metahemalbúmina se da en mg% de Hemoglobina, ya que el patrón se prepara a partir de una solución de hemoglobina de concentración conocida)

En un estudio realizado por Winstone en 1965 (11)- se encontraron resultados evidentes sobre el valor de la determinación de la metahemalbúmina en pacientes con pancreatitis, - donde evaluó tres técnicas para cuantificar la metahemalbúmina; la reacción de Schumm, en exámen por espectroscopía directa y - por electroforesis y obtener en todos resultados similares. Además por medio de una estimación del porcentaje de mortalidad en tre las dos formas de pancreatitis aguda, dedujo la importancia de la prueba; ya que por medio de ella podía llegarse a una fá-cil diferenciación entre ambas y por lo tanto al tratamiento - adecuado.

Una nueva técnica fué propuesta por Chong y Owen - en 1967 (12), basada en el incremento de absorción a 569 nm producido por la reducción de la metahemalbúmina debida a la adi-ción de tiosulfato de sodio al suero diluído. Esta prueba demostró una gran sensibilidad a pequeños cambios en la longitud de onda, de lo que podían resultar errores significativos.

En 1968 fueron reportados (13) cinco casos de metahemalbuminemia encontrados en el suero de pacientes que presen-taban como síntoma común abdomen agudo. Dos de ellos tenían pancreatitis hemorrágica; dos más de infarto del intestino delgado y el otro un hematoma intrahepático.

Lo anterior indicó que la presencia de la metahemalbúmina no era exclusiva de un padecimiento pancreático de tipo hemorrágico, sino que era el resultado de la destrucción enzimática de la hemoglobina liberada en el transcurso de una hemorragia intensa.

Una investigación realizada con perros (14) a los que se les provocó pancreatitis por diferentes medios, demostró que la evaluación de la metahemalbúmina (reacción de Schumm modificada) era significativa en la diferenciación de ambas pancreatitis.

Posteriormente (15), se encontraron nuevos indicios de que la metahemalbuminemia no era específica de la pancreatitis hemorrágicas, sino común en condiciones de abdomen agudo en padecimientos donde se presentaba una hemorragia intraperitoneal como embarazo extrauterino, gangrena intestinal, etc.

En 1972 se realizó un nuevo experimento en animales de laboratorio (perros) causándoles diversas lesiones intraperitoneales como pancreatitis, obstrucción, infarto intestinal, etc. Conjuntamente se estudiaron 73 pacientes con abdomen agudo. La evaluación de la metahemalbúmina (método de Shinowara) tanto en los pacientes como en los animales de laboratorio,

reveló niveles elevados en los casos de pancreatitis necrótico-hemorrágica en los dos grupos (17).

Walberg y colaboradores en 1973 (19) describieron un procedimiento diferente para la determinación de la metahemalbúmina en suero, basado en la presencia de una banda de absorción característica a 625 nm y su desaparición después de una reducción con tiosulfato de sodio.

En una investigación llevada a cabo en 1974 (20) - por medio de la técnica anterior se concluyó que la detección de la metahemalbúmina en suero, líquido de ascitis y pleural en pacientes con pancreatitis aguda, era una prueba valiosa y clara para diferenciar un padecimiento de tipo hemorrágico.

Conjuntamente se realizó la evaluación de amilasa en suero, orina, líquido de ascitis y pleural y se encontraron valores elevados en ambos tipos de padecimiento, por lo que este dato no era de mucho interés para el diagnóstico diferencial. Así mismo se estudiaron las posibles causas que producían las pancreatitis agudas en su forma hemorrágica, encontrándose que el alcoholismo era en muchos casos el factor desencadenante.

C A P I T U L O I I I

M A T E R I A L Y M E T O D O

La evaluación del método para cuantificar la metahemalbúmina como prueba diagnóstica y diferencial entre las dos formas de pancreatitis aguda, (edematosa y necrótico-hemorrágico) fué el objetivo principal de este estudio. El material biológico utilizado fué suero sanguíneo obtenido de 200 personas - que se dividieron en dos grupos:

Grupo No. 1, constituido por 120 personas "clínicamente sanas", con el objeto de establecer los valores de referencia de nuestro medio.

Grupo No. 2, formado por 80 pacientes con diagnóstico de pancreatitis aguda; estos enfermos pertenecientes al servicio de Gastroenterología del Centro Médico La Raza.

La toma de la muestra se llevó a cabo en condiciones basales (ayunas), separando el suero sanguíneo por centrifugación y procesándolo dentro de la primera hora después de haber sido obtenido.

El estudio realizado consistió en :

1.- Determinación de la metahemalbúmina en una solución patrón investigando:

- a) El espectro de absorción en su forma oxidada y reducida, con el fin de determinar la longitud de onda más adecuada y sensible para realizar la prueba.
- b) Estabilidad de la reacción en la solución patrón y la muestra.
- c) Variaciones que pudiera sufrir la muestra con respecto al tiempo.
- d) Variaciones de la reacción por hemólisis, ictericia, y lipemia.

2.- Determinación de la metahemalbúmina en el grupo control, con el objeto de establecer los valores de referencia.

3.- Determinación de la metahemalbúmina y amilasa sérica en el grupo de pacientes con diagnóstico de pancreatitis aguda.

El método utilizado para la cuantificación de la metahemalbúmina fué el de Chong, G.C.-Owen, J.A. (9) y Walberg,

C.B. - Geokas, M.C. y Rinderknecht, (16) modificado. Y para la -
determinación de amilasa el método de Street Close.

A. FUNDAMENTO: M E T A H E M A L B U M I N A

La metahemalbúmina sérica es determinada por la me
dida del cambio de absorción del suero diluido a 620 nm antes y
después de adicionar $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$, y comparando con un patrón de hema
tina y albúmina bovina de concentración conocida.

B. REACTIVOS Y EQUIPO UTILIZADO:

1.- Sustancias:

Hidróxido de sodio

Fosfato disódico

Fosfato monopotásico

Albúmina bovina al 22 %

Hematina

Tiosulfato de sodio

Agua destilada

2.- Reactivos:

Hidróxido de sodio 1.0 M

Buffer de fosfatos 0.1 M, pH = 7.4

Albúmina bovina al 4 %

Solución patrón de hematina 1 mg/Ll.

3.- Preparación de reactivos:

a) Hidróxido de sodio 1.0 M

Disolver 4 gr. de NaOH en agua destilada cbp -
100 ml.

b) Buffer de fosfatos 0.1 M, pH = 7.4

Disolver 1.42 g de Na_2HPO_4 en agua destilada -
cbp 100 ml. Disolver 1.36 g de KH_2PO_4 en agua -
destilada cbp 100 ml. Mezclar tres volúmenes de
fosfato disódico con un volúmen de fosfato mono-
potásico en solución; medir el pH. Si la mezcla
es alcalina ajustar adicionando fosfato mono-
potásico, y si es ácida ajustar con fosfato di
sódico.

c) Albúmina bovina al 4 %

Disolver 18.1 ml de albúmina al 22 % en agua des-
tilada cbp 100 ml.

d) Tiosulfato de sodio

Cristales frescos de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$

e) Patrón de Hematina:

Disolver 50 mg de Hematina pura en la menor cantidad posible de NaOH 1.0 M, en solución y diluir a 50 ml con solución de albúmina al 4 %.

4.- Material y Equipo:

Espectrofotómetro (ZEISS)

Centrífuga Clínica

Potenciómetro

Agitador magnético

Balanza analítica

Celdillas del espectrofotómetro

Matraces aforados de 10, 50 y 100 ml.

Vasos de precipitado de 10, 50, 100 y 250 ml.

Pipetas graduadas de 0.1, 0.2, 0.5, 1.0 y 2.0 ml.

Tubos de ensayo de 13 x 100

Probetas graduadas de 100 y 500 ml.

5.- Material Biológico:

Suero sanguíneo libre de hemólisis.

C. PROCEDIMIENTOS:

Colocar 1.0 ml de suero problema en un tubo de ensayo, agregar 0.5 ml de solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M pH = 7.4, mezclar y centrifugar por cinco minutos.

Leer a 620 nm usando agua destilada como blanco, - devolver la muestra a un tubo limpio y seco, añadir aproximadamente 2.5 mg de cristales de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$, mezclar y dejar reposar -- cinco minutos, centrifugar.

Leer a la misma longitud de onda; calcular la diferencia de absorbancias y extrapolar en la gráfica de calibración.

Tratar en la misma forma el patrón de trabajo.

D. CALCULOS:

Abs. ox. - Abs. red. = Δ Abs. de la muestra

Δ Abs. referir a la gráfica de calibración = mg %

de
Hematina
(Metahemalbúmina)

E. CALIBRACION:

Medir 0.1, 0.2, 0.4, 0.5 y 0.8 ml del patrón de -

1 mg/ml y llevar a 10 ml con solución de albúmina bovina al 4%, esto corresponde a concentraciones de 1.0, 2.0, 4.0, 5.0 y 8.0 mg %.

A. FUNDAMENTO:

AMILASA: METODO STREET-CLOSE

Se evalúa la actividad de la enzima siguiendo la disminución de la concentración del substrato (almidón), en presencia de yodo, que da por resultado una coloración azul característica.

B. REACTIVOS Y EQUIPO UTILIZADO:

1.- Substancias:

Amilosa
Fosfato disódico
Fosfato monopotásico
Cloruro sódico
Yoduro potásico
Yodato potásico
Acido clorhídrico
Enzotrol y/o Monitrol
Agua destilada

2.- Reactivos:

a) Substrato amortiguador;

Amilosa 0.2 g

NaCl 8.77 g

Sol. Reg. de pH, cbp. 1.00 l

b) Solución reguladora de pH = 7.1

Fosfato monopotásico anh. 2.72 g

Fosfato disódico anh. 2.84 g

Agua destilada, cbp. 1.00 l

c) Solución de yodo 0.008 N.

Solución de yoduro potásico 500 ml

Solución de yodato potásico 500 ml.

3.- Material y Equipo:

Espectrofotómetro o fotómetro de filtro

Celdillas

Baño de agua de temperatura constante (37°C)

Cronómetro

Tubos de ensayo de 13 x 100 y 15 x 150

Pipetas graduadas de 1.0, 5.0 y 10.0 ml

Micropipetas de 10 microlitros.

4.- Material biológico:

Suero fresco

C. PROCEDIMIENTO:

Para cada problema se marcan tres tubos: A, B y C, donde A será el problema, B el blanco y C el patrón.

	TUBO A	TUBO B	TUBO C
Substrato amortiguador (a)	1.0 ml	1.0 ml	1.0 ml
Se dejan en baño de agua a 37° C			
S u e r o	0.01 ml	-	-
Enzotrol (reconstituido)	-	-	0.01 ml
Se mezclan e incuban durante 15 minutos a 37° C			
Agua destilada	10 ml	10 ml	10 ml
Reactivo de color (c)	0.5 ml	0.5 ml	0.5 ml

Se mezclan bien, y se comparan cinco ó diez minutos más tarde sus absorbancias contra agua destilada a 620 nm.

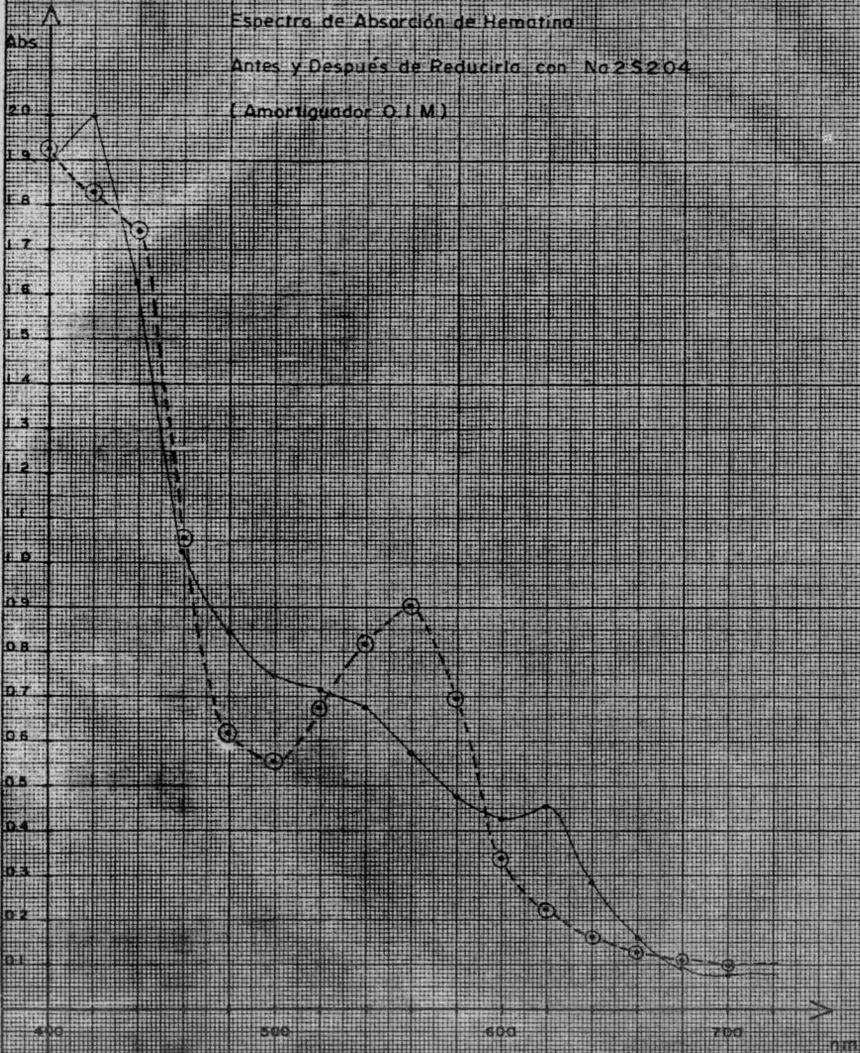
D. CALCULOS:

$$\text{Factor} = \frac{\text{U. Patrón}}{\text{Abs. B} - \text{Abs. P}}$$

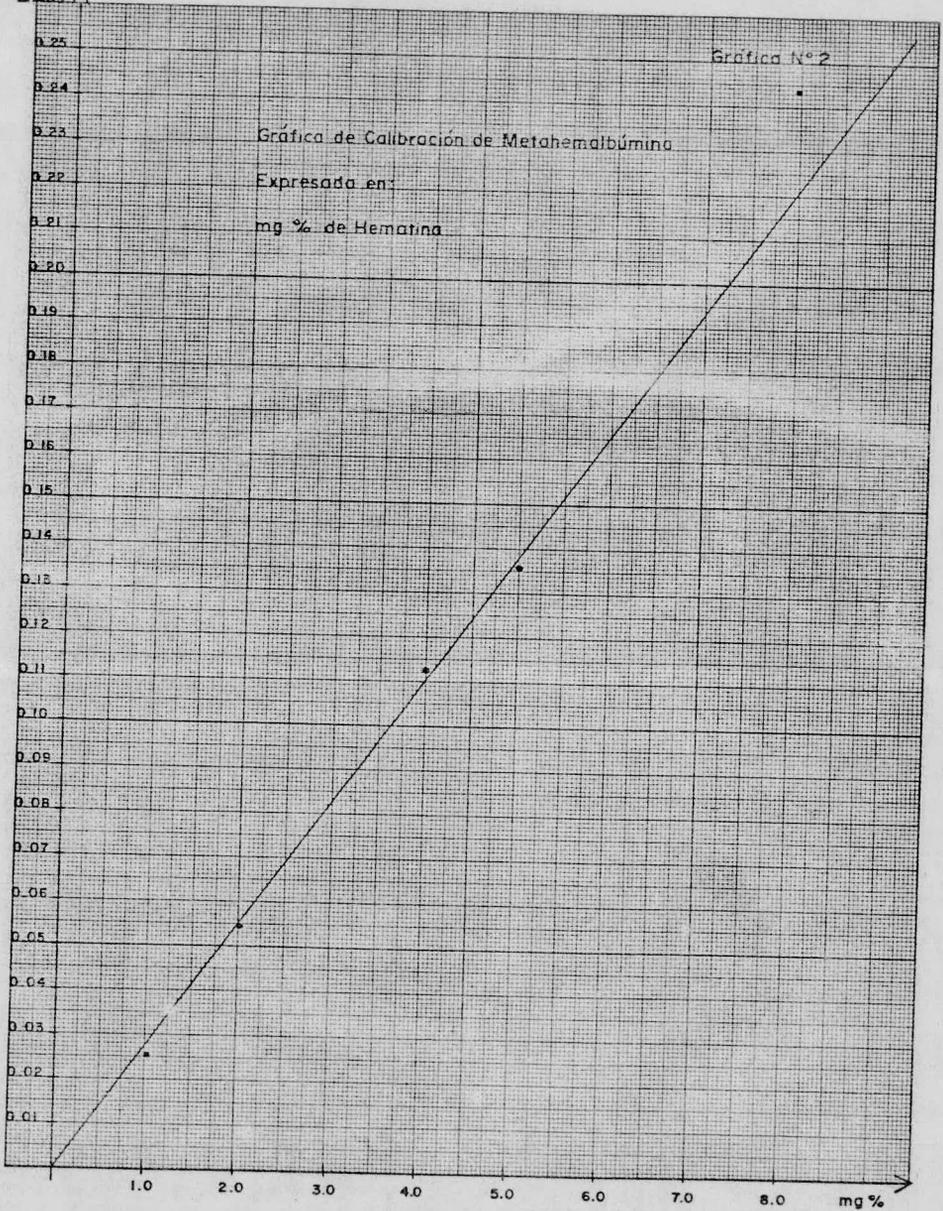
$$\text{Abs. B} - \text{Abs. P}$$

Nota; El patrón utilizado fué Enzatrol, producto -
comercial DADE, con una concentración de 270 U/100 ml.

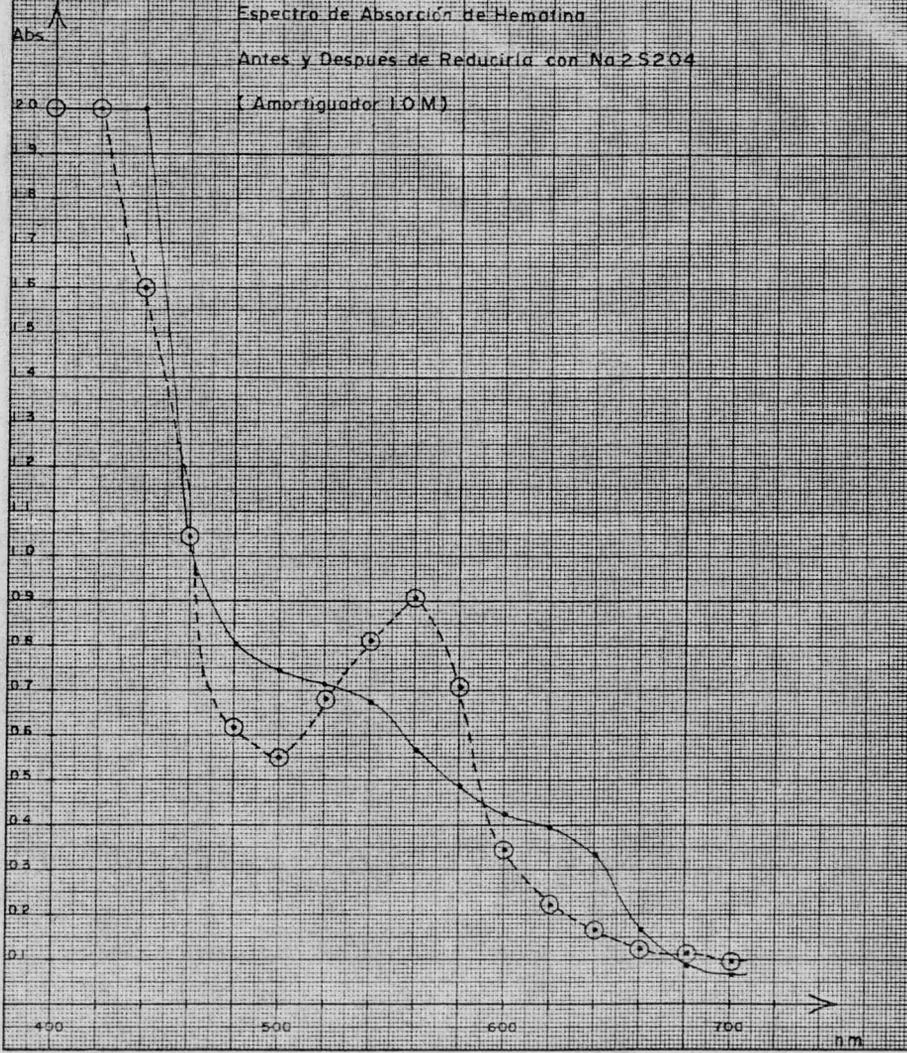
$$\text{Conc. de la Enzima} = F \times (\text{Abs. B} - \text{Abs. Problema})$$



Δ Abs \wedge



Espectro de Absorción de Hematina
 Antes y Después de Reducirla con $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$
 (Amortiguador L.O.M.)



C A P I T U L O I V

R E S U L T A D O S

RESULTADOS DE LA EVALUACION DE LA
METAHEMALBUMINA EN PERSONAS
"CLINICAMENTE SANAS"

Persona No.	Metahemalbúmina mg %
1	0.00
2	0.00
3	0.00
4	0.00
5	0.01
6	0.05
7	0.05
8	0.05
9	0.05
10	0.05
11	0.05
12	0.05
13	0.08
14	0.08
15	0.10
16	0.10
17	0.11
18	0.11

Persona.	Metahemalbúmina mg %
19	0.11
20	0.12
21	0.12
22	0.12
23	0.12
24	0.12
25	0.12
26	0.12
27	0.13
28	0.13
29	0.13
30	0.13
31	0.13
32	0.13
33	0.15
34	0.15
35	0.15
36	0.15
37	0.15
38	0.15
39	0.15
40	0.15

Persona No.	Metahemalbúmina mg %
41	0.17
42	0.17
43	0.17
44	0.17
45	0.17
46	0.18
47	0.18
48	0.20
49	0.20
50	0.20
51	0.20
52	0.21
53	0.22
54	0.22
55	0.22
56	0.22
57	0.22
58	0.22
59	0.22
60	0.22
61	0.23
62	0.23

Persona No.	Metahemalbúmina mg %
63	0.23
64	0.25
65	0.25
66	0.25
67	0.25
68	0.27
69	0.28
70	0.28
71	0.28
72	0.28
73	0.28
74	0.28
75	0.28
76	0.28
77	0.28
78	0.28
79	0.30
80	0.30
82	0.32
83	0.32
84	0.32
85	0.35

Persona No.	Metahemalbúmina mg %
86	0.35
87	0.35
88	0.38
89	0.38
90	0.38
91	0.38
92	0.40
93	0.40
94	0.40
95	0.40
96	0.40
97	0.42
98	0.42
99	0.42
100	0.45
101	0.45
102	0.48
103	0.50
104	0.50
105	0.50
106	0.55
107	0.58

Persona No.	Metahemalbúmina mg %
108	0.58
109	0.58
110	0.62
111	0.62
112	0.65
113	0.65
114	0.67
115	0.70
116	0.70
117	0.72
118	0.80
119	0.80
120	0.85

CALCULOS:

$$\bar{X} = \frac{\sum X}{n}$$

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum (X - \bar{X})^2}{n}}$$

donde:

σ = Desviación standard

\bar{X} = Valor promedio

n = No. de casos

$$\bar{X} = 0.27$$

$$\sigma = \pm 0.19$$

$$\bar{X} \pm 2\sigma \begin{matrix} 0.27 + 0.38 = 0.65 \\ 0.27 - 0.38 = 0.00 \end{matrix}$$

Valores de Referencia: 0.00 a 0.65 mg % de Hematina como

Metahemalbúmina.

T A B L A No. 2
RESULTADOS DE LA EVALUACION DE METAHEMALBUMINA
Y AMILASA EN PACIENTES
CON DIAGNOSTICO DE PANCREATITIS

Paciente No.	Metahemalbúmina mg %	Amilasa U.S.
1	0.00	222
2	0.05	327
3	0.05	400
4	0.08	1280
5	0.08	243
6	0.09	711
7	0.10	400
8	0.10	214
9	0.10	310
10	0.10	576
11	0.10	239
12	0.10	431
13	0.15	240
14	0.15	250
15	0.15	281
16	0.17	294
17	0.18	1358
18	0.18	271

Paciente No.	Metahemalbúmina mg %	Amilasa U.S.
19	0.20	520
20	0.20	496
21	0.20	576
22	0.20	218
23	0.25	496
24	0.25	556
25	0.25	321
26	0.25	1050
27	0.25	348
28	0.27	669
29	0.28	1042
30	0.28	337
31	0.28	3650
32	0.28	448
33	0.28	1320
34	0.30	536
35	0.30	360
36	0.32	217
37	0.32	1224
38	0.35	669
39	0.40	1337
40	0.40	322

Paciente No.	Metahemalbúmina mg %	Amilasa U.S.
41	0.40	402
42	0.40	1280
43	0.42	448
44	0.45	520
45	0.45	305
46	0.47	271
47	0.48	324
48	0.48	220
49	0.48	536
50	0.50	218
51	0.50	440
52	0.50	698
53	0.50	662
54	0.52	426
55	0.52	660
56	0.53	229
57	0.57	496
58	0.60	358
59	0.60	496
60	0.60	490
61	0.60	250
62	0.60	380

Paciente No.	Metahemalbúmina mg %	Amilasa U.S.
63	0.63	249
64	0.63	299
65	0.65	389
66	0.65	229
67	0.65	314
68	0.68	320
69	0.70	2650
70	0.70	1234
71	0.70	1247
72	0.71	244
73	0.72	228
74	0.73	210
75	0.80	346
76	0.80	324
77	0.82	324
78 (Deceso)	4.85 (1:5)	2750
79 (Deceso)	8.40	1804
80 (Deceso)	10.35 - 13.9 (1:2)	700

CALCULOS :

$$\bar{X} = 0.39 \text{ mg \%}$$

$$\sigma = 0.20$$

$$\bar{X} \pm 2 \sigma = 0.00 - 0.79 \text{ mg \%}$$

CAPITULO V

DISCUSSION

En las técnicas originales empleadas por Chong y Owen (9); Walberg, Geokas y Rinderknecht (16), para la determinación de la metahemalbúmina se utiliza una longitud de onda de 569 (9) en una y de 625 nm (16) en la otra; ambos emplean la hematina en solución de albúmina humana al 4% como patrón y una solución de fosfatos 1.0 M, pH = 7.4 como amortiguador.

Las modificaciones introducidas por nosotros a la combinación de estas técnicas fueron:

a) El empleo de una solución de albúmina bovina al 4% como solvente de la hematina, debido a la dificultad para obtener albúmina humana.

b) Cambio de la molaridad de la solución amortiguadora a 0.1 M, pH = 7.4, debido a que la solución 1.0 M de fosfatos como marca la técnica original nos produjo precipitaciones durante la reacción; así se consiguió la clarificación de la misma. Además se obtuvo mayor amplitud y resolución en el espectro de absorción y, por lo tanto, mayor sensibilidad a la longitud de onda escogida por nosotros, como puede observarse comparando las dos gráficas números 1 y 3.

c) Al correr el espectro de absorción del complejo hematina-albúmina con las modificaciones señaladas encontramos dos puntos de sensibilidad máxima, uno a 560 nm y el otro a 620 nm.

Decidimos realizar las lecturas a 620 nm debido a que a 560 nm podíamos tener interferencias por la presencia de cantidades considerables de hemoglobina y bilirrubina en los sueros problema.

Posteriormente se calculó el porcentaje de recuperación de la prueba utilizando las modificaciones hechas a ésta.- En una serie de 20 sueros (normales) a los que previamente se les determinó la metahemalbúmina. agregándoles cantidades equivalentes a 1.0, 2.0, 4.0 y 5.0 mg/100 ml de hematina (como metahemalbúmina), se obtuvieron los siguientes resultados:

Cantidad eq. en mg %	Porcentaje de recuperación
1.0	97.5 %
2.0	101.0 %
4.0	102.0 %
5.0	117.0 %

Los datos anteriores nos indican que los valores

permisibles de lectura deberán ser de 1 a 4 mg % de hematina como metahemalbúmina; en caso de exeder estos, se recomienda ha--cer dilución del suero problema para obtener la reproducibili--dad adecuada.

Se investigó también la estabilidad de las muestras biológicas con respecto al tiempo, haciendo la determinación de la metahemalbúmina a 1, 2 y 24 hr., después de la primera cuan--tificación en el mismo suero y no se obtuvieron variaciones.

En sueros con cantidades elevadas de metahemalbúmi--na se encontró solo una pérdida del 5% a los 8 días de la cuan--tificación original.

En los sueros hemolizados no se pudo hacer, en de--finitiva, la determinación de la metahemalbúmina, ya que existió una inversión de los valores debido a que, el grupo Hem de la --metahemalbúmina reducida se adiciona al grupo Hem de la hemoglo--bina libre presente en el suero.

Del proceso de sueros lipémicos se llegó a la con--clusión de que, la metahemalbúmina no se ve afectada por niveles altos de lípidos, ya que resultó normal su evaluación en ellos.



En los sueros ictericos en que se realizo la prueba Practicamente no existio alteracion, (se elevó el valor al límite normal máximo) por la presencia de niveles altos de bilirrubina.

En la tabla No. 1 se reportan en orden ascendente los resultados de la evaluación de metahemalbúmina en 120 personas "clínicamente sanas", con los que se obtuvieron los valores de referencia. Estos fueron:

$$\bar{X} = 0.27 \pm 2\sigma 0.19$$

Valores de Referencia

para Metahemalbúmina: 0.0 - 0.65 mg %

En la tabla No. 2 se presentan los resultados de la cuantificación de la metahemalbúmina, así como los de la amilasa sérica, parámetro que fué tomado como referencia debido a que es la prueba de elección y de mayor sensibilidad para descartar o - confirmar un diagnóstico de pancreatitis, de los 80 pacientes - que por la sintomatología presentada entraron al servicio de Gastroenterología con diagnóstico de pancreatitis aguda y de esta - forma detectar en su inicio la fase hemorrágica de este padeci- miento.

Nota: Se tomó como base en estos pacientes una elevación de amilasa sérica sobre 400 U.S.

A la revisión de los datos obtenidos, se observa - que en 77 de ellos los rangos encontrados de metahemalbúmina varían de 0.00 a 0.82 mg %, con una media aritmética de 0.39 y una desviación standard de ± 0.4 (2 σ), (0.0 - 0.79 mg%), por lo que se comprobó la pancreatitis de curso benigno en 39 de ellos, en los 38 pacientes restantes la amilasa se encontró por debajo de 400 U.S., por lo tanto se consideró que el cuadro doloroso abdominal y la elevación de la amilasa pudo ser ocasionada por otra patología ajena a lesión pancreática, como por ejemplo actividad vesicular por litiasis, úlcera péptica, oclusión intestinal mecánica, etc.

Los niveles altos de amilasa sérica que indicaron la presencia de una pancreatitis aguda edematosa no guardaron relación con los valores obtenidos de metahemalbúmina (pacientes - Nos. 4, 17, 26, 29, 31, 33, 37, 39, 42, 69, 70 y 71), que se consideraron normales en nuestro medio, lo que apoya la utilidad -- del método para el diagnóstico diferencial entre ambas patologías. Estos pacientes se recuperaron totalmente y fueron dados de alta en el servicio.

En tres pacientes que presentaron elevación de metahemalbúmina tampoco se observó relación directa entre ésta y - los valores de amilasa sérica.

El diagnóstico de pancreatitis hemorrágica como -- causa de la muerte se comprobó en dos de ellos por estudio anatomopatológico (pacientes No.s 78 y 80). La pancreatitis fué secuen daria a ingesta importante de alcohol.

El tercer caso (paciente No. 79) correspondió a un adenocarcinoma de vesícula con metástasis a páncreas, duodeno, - hígado, pleura y peritoneo. La autopsia reveló la presencia de - focos de pancreatitis necrótica.

C A P I T U L O V I

R E S U M E N

En el estudio para evaluar la determinación de la metahemalbúmina como prueba diagnóstica diferencial entre las - pancreatitis agudas, edematosa y necrótico-hemorrágica, se presentan:

1.- Generalidades sobre la pancreatitis aguda en sus dos tipos y su patogénia.

2.- Un breve resumen sobre metahemalbúmina (origen y formación) así mismo la historia de su determinación.

3.- Se presenta la técnica de Chong y Walberg modificadas por nosotros con detalles como; cambio en la molaridad de la solución amortiguadora, comparación de los espectros de absorción, estabilidad de la reacción y las variaciones que presenta la técnica en presencia de hemólisis, ictericia y lipemia.

4.- Obtención de los valores de referencia para la metahemalbúmina, los cuales fueron: 0.00 a 0.65 mg %.

5.- Resultados de la evaluación de metahemalbúmina y amilasa sérica en 80 pacientes que ingresaron al servicio de Gastroenterología del Centro Médico La Raza con diagnóstico de pancreatitis aguda.

6.- Así mismo se presenta una breve discusión sobre los resultados obtenidos tanto de la técnica modificada como de la valoración de la metahemalbúmina en los 80 pacientes con diagnóstico de pancreatitis aguda.

C A P I T U L O V I I

C O N C L U S I O N E S

Después de revisar cuidadosamente los datos obtenidos, podemos concluir que:

a) La técnica modificada que se empleó en la determinación de la metahemalbúmina sí puede adaptarse para su valoración, ya que es confiable (mantiene reproducibilidad y exactitud).

b) Y que puede usarse también junto con la evaluación de amilasa sérica para diferenciar la pancreatitis aguda - edematosa de la necrótico-hemorrágica.

Sin embargo, en este aspecto dejamos un campo abierto para una comprobación efectiva (por los pocos casos encontrados debido a la baja incidencia del padecimiento de tipo hemorrágico) y que al mismo tiempo sea adoptada como una prueba de urgencia por el rápido curso de la enfermedad.

C A P I T U L O V I I I
B I B L I O G R A F I A

- 1.- Mondor, H.: Abdomen agudo. Editorial Toray -Masson, S.A., Barcelona, Esp., pags. 967 - 1006.- 1963.
- 2.- Müller, S.: Manual de exploración clínica y de diagnóstico medico. Editorial Marín. Barcelona, Esp., pags. 138 -142.- 1968.
- 3.- Sabiston, D.C.: Tratado de patología quirúrgica. Editorial Interamericana. 10a. ed., México, D.F., pags. 1054 - 1060. 1972.
- 4.- Adner, P.L.: Methaemalbuminemia caused by intrperitoneal hae morrhage. Acta. Soc. Med. Upsal. 66 : 22, 1961.
- 5.- Mazundar, P.M.H.: A case of acute pancreatitis with methaem albuminemia. Brith. Med. J. 2: 1617, 1961.
- 6.- Northam, B.E. y col.: Methaemalbumin in the differential -- diagnosis of acute haemorrhagic and edematous pancreatitis. Lancet. 4 : 348, 1963.
- 7.- Richardson, R.W. y col.: Methaemalbumin in the diagnosis of pancreatitis. Lancet. 1 : 608 , 1963.
- 8.- Wieme, R.J.: Methaemalbumin in the diagnosis of pancreatitis. Lancet. 1 : 1162, 1963.
- 9.- Webb, A.J. : Hypocalcaemic tetany and methaemalbuminemia in acute fulminanting pancreatitis. Postgrad. Med. J. 39 : 361, 1963.

- 10.- Shinowara, G.Y. y Walters, M.I.: Hematin studies on protein complexes and determination in human plasma. Amer. J. Clin. Path. 40 : 113, 1963.
- 11.- Winstone, N.E.: Methaemalbumin in acute pancreatitis. Brith. J. Surg. 52 : 804, 1965.
- 12.- Chong, G.C. y Owen, J.A.: Determination of methaemalbumin in plasma. J. Clin. Path. 20 : 211, 1967.
- 13.- Bank, S. y col. : Methaemalbuminemia in acute abdominal emergencies. Brith. Med. J. 2: 86, 1968.
- 14.- Anderson, M.C. y col.: Assessment of methaemalbumin as a diagnostic test for acute pancreatitis. Arch. Surg. 98 : 776, 1969.
- 15.- Goodhead, B.: Significance of methaemalbuminemia in acute abdominal emergencies. Arch. Surg. 101 : 376, 1970.
- 16.- Battersby, C. y Green, M.K.: The surgical significance of methaemalbuminemia. Gut. 12 : 995, 1971.
- 17.- Kelly, T.R. y col.: Methemalbumin in acute pancreatitis: an experimental and clinical appraisal. Ann. Surg. 175: 15, 1972.
- 18.- Murray, K. y col.: Measurement of methaemalbumin in plasma. J. Clin. Path. 26 : 446, 1973.

- 19.- Walberg, C.B. y col. : Determination of serum methemalbumin.
Clin. Chem. Acta. 48 : 229. 1973.
- 20.- Geokas, M.C. y col.: Methaemalbumin in the diagnosis of --
acute pancreatitis. Ann. Intern. Med. 81 : 483, 1974.