

Universidad Nacional Autónoma de México

FACULTAD DE QUIMICA



**PRUEBAS FUNCIONALES HEPATICAS, COMO
TEMA DEL CURSO DE ANALISIS BIOQUIMI-
CO CLINICOS 027 - Q - 10**

M O N O G R A F I A

Que Para Obtener el Título de.
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P r e s e n t a

LAURA AIDA SANCHEZ ORTEGA



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

TESIS 1978
AÑO M.T. 392 392
FECHA _____
PREGO _____



Jurado asignado originalmente
según el tema.

PRESIDENTE DEA CCRONADO PERDOMO
V C C A L MA. ELENA BUSTAMANTE C.
SECRETARIO ESTHER GUTIERREZ HIDALGO
1er. SUPLENTE JOSEFA PIEDRAS ROSS
2do. SUPLENTE LETICIA GPE. CARRASCO R.

Sitio donde se desarrolló el tema : Laboratorio 301 ,
Facultad de Química.

A mis Padres:

Joaquín y Raquel.

a Chulita.

A mi Esposo Luis.

Con mucho cariño a mis hijos.

A mis Primos:

Pablo y Victor.

Un especial agradecimiento a mis maestras,
sin cuya colaboración no hubiera sido
posible este trabajo.

Esther Gutierrez H.

MA. Elena Bustamente C.

Dea Coronado P.

Contenido

Introducción	1
Anatomía y Funciones del Hígado	3
Elección de las Pruebas	24
Metodología Descripción y Fundamentos	34
Interpretación de las Pruebas	65
Conclusiones	69
Resumen	71
Bibliografía	73

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

El hígado es uno de los órganos más importantes en el hombre; ésto se debe a la gran diversidad de funciones que desempeña, ya que además de ser un regulador de la temperatura, realiza múltiples funciones metabólicas.

Es por ésto que los padecimientos hepáticos han sido motivo de gran preocupación desde hace ya mucho tiempo y se han ideado varios métodos para evaluar las funciones hepáticas, por ejemplo: las que miden actividad enzimática, - la capacidad de conjugar, destoxicar, excretar, sintetizar, etc.

Para el presente trabajo se han seleccionado unicamente - tres pruebas, debido a que son las más representativas - del comportamiento hepático, además, sirven como punto de partida para justificar estudios posteriores más especializados como son las del ácido hipúrico, bromosulfaleína, electroforesis de proteínas, etc., por lo anterior es que se decidió realizar una revisión de los conocimientos actuales relacionando la tecnología moderna con la fisiopatología hepática.

ANATOMIA Y FUNCIONES DEL HIGADO

1: Anatomía.

1:1 Propiedades Físicas.

El hígado es la glándula más grande del cuerpo, se encuentra situada por debajo del diafragma ocupando la mayor parte del hipocondrio derecho y parte del epigastrio (1). Mide de 20 a 22.5 Cm. transversalmente y, verticalmente - cerca de la superficie derecha de 10 a 12.5 cm. a nivel - de la parte craneal final del riñon izquierdo; pesa -- 1.4 Kg. en el hombre adulto y 1.2 en la mujer, es de consistencia blanda y sólida, desmenuzable, fácilmente lacerable y altamente vascular; es de color café rojizo oscuro y su gravedad específica es de 1.05 (1).

1:2 Lóbulos.

Siendo el hígado una masa compacta y continua se ha dividido convencionalmente para su estudio por la línea de inserción del ligamento falciforme en dos lóbulos (2). El lóbulo derecho que es aproximadamente seis veces más grande que el izquierdo, presenta en su superficie posterior inferior, dos pequeños lóbulos, el caudado y el cuadrado (1).

El lóbulo izquierdo es más pequeño y aplanado que el derecho, se encuentra situado en la región del epigastrio y del hipocondrio izquierdo (2); como se muestra en la figura 1.

1:3 Ligamentos.

El hígado se encuentra conectado con la pared del abdomen el estomago, el duodeno y por debajo de la superficie del diafragma por medio de bandas de tejido conectivo, y pliegues peritoneales, cuya función es la de mantener el organo en su posición, además tienen la función de transpor--

tar la sangre de los vasos aferentes y colaterales,

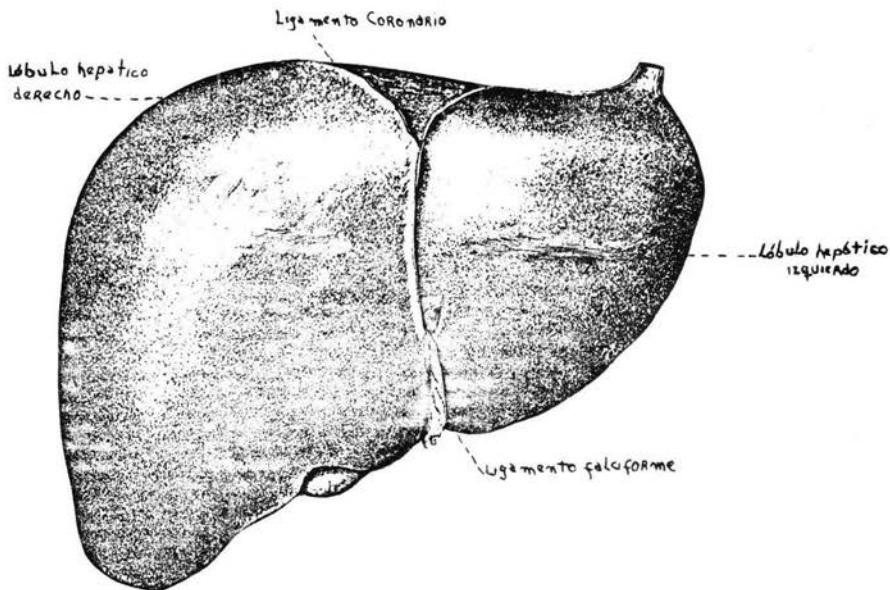


Fig. 1

así como vasos linfáticos. Estas bandas de tejido reciben el nombre de ligamentos, y son: El falciforme, el coronario, el hepatorenal y los triangulares (2).

1:4 Sistema Circulatorio Hepático.

El hígado tiene una afluencia de sangre dual, aproximadamente el 80% de la sangre que afluye llega de la vena portal y el 20% restante de la arteria hepática; este rico flujo de sangre que asciende a 1 500 ml por minuto; lleva oxígeno y materia nutritiva al hígado. La vena portal y la arteria hepática proporcionan la sangre que fluye por capilares especiales llamados sinusoides, éstos vierten a

la vena central en ángulo recto. Los sinusoides se encuentran revestidos por dentro por células endoteliales de Kupffer que son fagocíticas (3).

Las ramas de la vena porta, se subdividen en el tejido interlobular, dando origen a vasos venosos que por discorrir entre los lóbulos reciben el nombre de venas interlobulares; acompaña a éstas venas en su curso los conductos excretores y las ramas de la arteria hepática. Las ramas interlobulares se resuelven en capilares sanguíneos que circulan entre las trabéculas hepáticas por el interior de los lóbulos y confluyen en el centro de cada uno de éstos para formar una pequeña vena axil, que recibe el nombre de vena central o intralobular; las venas centrales desembocan en la base de los lóbulos en venas de mayor calibre de las cuales arrancan las venas hepáticas que finalmente vierten su contenido sanguíneo en la vena cava inferior (4). Figura 2.

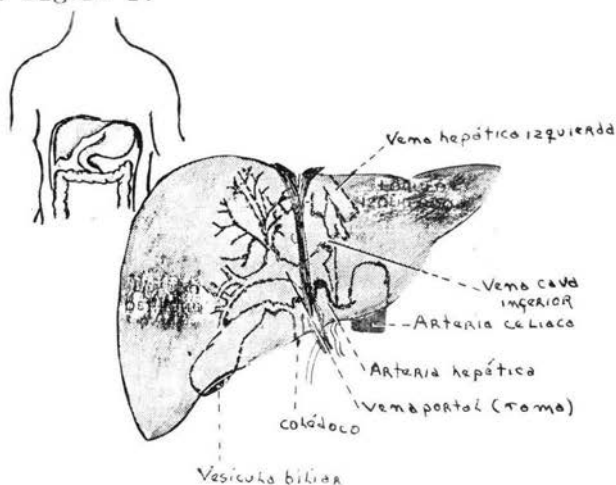


Fig. 2

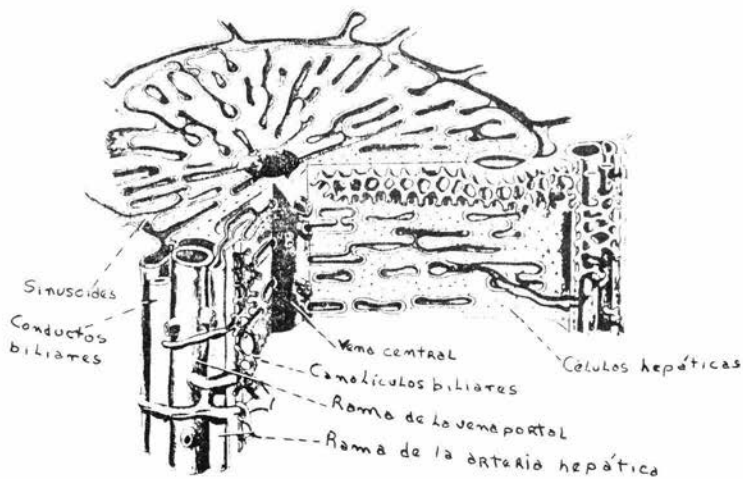
Pequeños canaliculos biliares rodean cada cédula hepática y vierten en capilares que transportan la bilis a la periferia del lóbulo (4). Fig. 3.

1:5 Citología Hepática.

Las células hepáticas son de forma poliédrica con un diámetro de 30 por 10^3 nm. aproximadamente. Presentan tres tipos de superficie, la sinusoides, que se ve grandemente incrementada por numerosas microvellosidades. Esta superficie representa la membrana donde ocurre el intercambio de sangre del hígado (2); la segunda superficie comprende cerca de la mitad del perímetro de la superficie adyacente del hepatocito; esta parte se encuentra separada de su célula mas cercana una distancia de 200 nm a 1 000 nm por 2 000 ó 3 000 nm de ancho. La función de esta superficie es la de transmitir información de una célula a otra. El tercer tipo de superficie es una pequeña porción que se encuentra entre hepatocitos adyacentes y cerca del centro de las células, esta superficie tiene la función de secretar bilis (2).

En el centro de la célula se encuentra un núcleo redondo de cerca de 10 000 nm de diámetro y se encuentra separado del citoplasma por una doble membrana que tiene de 7 a 8 nm de grueso y 12 a 14 nm de separación. En el interior del núcleo esta el nucleolo, que es el sitio de síntesis de tres formas de RNA; el nucleolo tiene de 2 000 a 4 000 nm de diámetro (2,5).

En el citoplasma se pueden reconocer numerosos organelos; el organelo más discreto es la mitocondria, se han calculado alrededor de 800; estas se encuentran dispuestas a lo largo de la célula simple (2).



Un lóbulo hepático en el cual se muestran células parenquimatosas y los sistemas de circulación vascular biliar

Fig. 3

La mitocondria se encuentra rodeada por una doble membrana, que en su interior tiene profundas invaginaciones o crestas; la matriz es ligeramente más densa que los interorganelos del haloplasma, esta matriz contiene de 3 a 10 pequeños gránulos densos para secreción, algunos contienen calcio y algo de DNA. Aquí se encuentran localizadas enzimas y cofactores necesarios para el ciclo de Krebs; así como partículas elementales que contienen flavoproteínas y citocromos del sistema de transferencia de electrón y las enzimas necesarias para la formación de ATP (2,5). De la configuración y estado interno de la membrana depende el estado de energía de la mitocondria, es además el sitio de la síntesis de proteínas mitocondriales, es aquí también donde se realiza la fosforilación oxidativa y formación de agua (2,5).

Cuando el hígado se ve dañado especialmente por sustancias alcohólicas se encuentran inclusiones de cristales -

sobre la superficie interior de la membrana especialmente a lo largo de las crestas.

La fracción microsómica esta compuesta de ribosomas libres y enlazados y de trozos de retículo endoplásmico rugoso y liso (3).

El retículo endoplásmico es la mayor proporción de la -- fracción microsómica estudiada, es un sistema de una - serie de canales paralelos adelgazados, usualmente acomodados en racimo y uniformemente distribuídos a través del citoplasma (5). La membrana se encuentra rodeada por partículas ribosomales pequeñas de 15 a 30 nm de diámetro. - El retículo endoplásmico rugoso tiene forma áspera o granular, con ribosomas pegados, aquí se efectúa la síntesis de proteínas de secreción interna, la síntesis de colesterol, la conjugación de bilirrubina y la detoxicación - de drogas (2,3,5). El retículo endoplásmico liso y el ru goso contienen la enzima glucosa-6-fosfatasa, que es la - responsable de remover el fosfato necesario para el metabolismo intracelular de la glucosa (2).

El aparato de Golgi consiste en un grupo de contornos pa ralelos o laminillas que se encuentran cerca unas de o tras y tienden a estrecharse en canales internos como en el reticulo endoplásmico rugoso. Estas laminillas tienen pequeñas vesículas de 100 nm de diámetro aproximadamente y se encuentran incrustadas en el final de los contornos largos; estan formadas por lipoproteínas y son muy numero sas en la vida fetal (2,5).

Las principales funciones del aparato de Golgi son almace nar, transportar y secretar moléculas como bilirrubina y proteínas especialmente lipoproteínas y glicoproteínas - (2,3).

Los lisosomas contienen enzimas hidrolíticas que intervienen en el metabolismo de pigmentos biliares y del hierro (2,3). Figura 4

2: Funciones del Hígado:

Las funciones pueden dividirse para su estudio en: Circulatorias, excretoras, metabólicas protectoras, detoxificadoras y hematológicas.

2:1 Funciones Circulatorias.

Por el hígado pasan de 80 a 100 ml/min. de sangre de la -



Fig. 4

vena porta a través de los sinusoides hepáticos, además - hay un flujo de sangre procedente de la arteria hepática, y el promedio total es de 1 400 ml/min (6).

El hígado ha sido denominado frecuentemente como un reservorio de sangre, porque puede almacenar hasta 400 ml de sangre, con aumento considerable del volúmen hepático; la gran permeabilidad de los sinusoides hepáticos permite -

que se produzcan grandes volúmenes de linfa. Se ha visto que de la tercera parte a la mitad del total de linfa producido en el cuerpo procede del hígado (6).

Las superficies internas de todos los sinusoides están cubiertas de un gran número de células de Kupffer; estas células son fagocíticas y extraen gran cantidad de las bacterias de la sangre procedente de la vena porta antes de que ésta pueda atravesar el hígado. El número de células de Kupffer aumenta cuando la sangre contiene partículas - formes u otros restos (6,7).

2:2 Funciones Excretoras.

2:2:1 Formación de la bilis y secreción de la misma en el intestino.

Las células hepáticas forman una pequeña cantidad de bilis que va a parar a los canalículos biliares y posteriormente pasa en forma periférica hacia los tabiques interlobulares donde los canalículos se vacían en los conductos biliares terminales, hasta alcanzar el conducto hepático y el colédoco donde se vacía directamente en el duodeno o se va a la vesícula biliar (6). La secreción total de bilis por el hígado es de 600 a 800 ml y el volumen máximo vesicular es de 40 a 70 ml (6).

La vesícula se vacía hacia el duodeno gracias a la respuesta al estímulo de la colecistocinina, que es una hormona que se encuentra en la mucosa del intestino delgado, esta hormona se activa gracias a la grasa alimenticia por esto cuando la alimentación no contiene grasa la vesícula se vacía mal, en cambio cuando la comida tiene la cantidad adecuada la vesícula se vacía en una hora aproximadamente (3,6).

3:3:2 Sales Biliares.

Las sales biliares se forman a partir del colesterol ingerido o sintetizado por el metabolismo humano, en un promedio diario de 1g. (2).

El colesterol se convierte a ácido cólico, y éste se combina con la glucocola, para formar ácido glucocólico, y en menor grado con taurina, para formar ácido taurocólico. Las sales de éstos ácidos son eliminadas con la bilis -- (3,6).

Las sales biliares tienen dos funciones importantes - que son: La de emulsionar las grasas y con ello facilitar la absorción de ácidos grasos, monoglicéridos, colesterol y demás lípidos desde el intestino, proceso que se denomina hidrotrópico; se lleva a cabo porque los iones de las sales biliares estan cargados negativamente y son absorbidos por los ácidos grasos, las cargas eléctricas de éstos iones aumentan la solubilidad de los ácidos grasos permitiendo que atraviesen la mucosa intestinal. Si no hubiera estas sales en el intestino, se perdería poco menos de la mitad de los ácidos grasos por las heces, con lo que el individuo sufriría un déficit metabólico a consecuencia de ésta pérdida de elementos nutritivos (3,6,7).

La otra función que desempeñan, es lo que se ha llamado efecto detergente, éste actúa sobre las partículas grasas del alimento disminuyendo así su tensión superficial, lo que permite la agitación de los glóbulos de grasa en el intestino para desintegrarlos hasta dimensiones muy pequeñas (6,8).

Cuando las grasas no son absorbidas adecuadamente, tampoco lo son las vitaminas liposolubles como la A,D,E y

K; aunque el cuerpo tiene depósitos suficientes de las -- tres primeras, no sucede así con la K es por esto que en -- un corto plazo suele aparecer deficiencia la que a su vez origina formación insuficiente por parte del hígado de factor VII y protrombina, lo que da como resultado un grave -- transtorno en la coagulación sanguínea (6).

2:2:3 Pigmentos Biliares.

Como se sabe la vida media del eritrocito es de aproximadamente 120 días, al final de éste período los globullos rojos son destruidos en el sistema retículo endotelial de la médula ósea, bazo, hígado (células de Kupffer). -- (3,9,10).

La hemoglobina liberada se desdobla en sus tres componentes que son: hierro, globina y el grupo hem.

El hierro se conserva en el organismo y vuelve a utilizarse en la formación de nueva hemoglobina.

La globina sufre una catabolia posterior y los aminoácidos que la componen pasan a formar parte del fondo de proteínas, para volver a utilizarse.

El grupo hem, es excretado por el organismo después -- de ser degradado a biliverdina que posteriormente se reduce a bilirrubina (9). Fig. 5

La bilirrubina por ser casi insoluble en los líquidos corporales, se combina con algunas proteínas plasmáticas -- principalmente albúmina, así combinada se transporta por la sangre y líquidos intersticiales. La bilirrubina combinada con la albúmina es absorbida en el interior de las células hepáticas por medio de los sinusoides mediante un mecanismo de transporte activo (9,10).

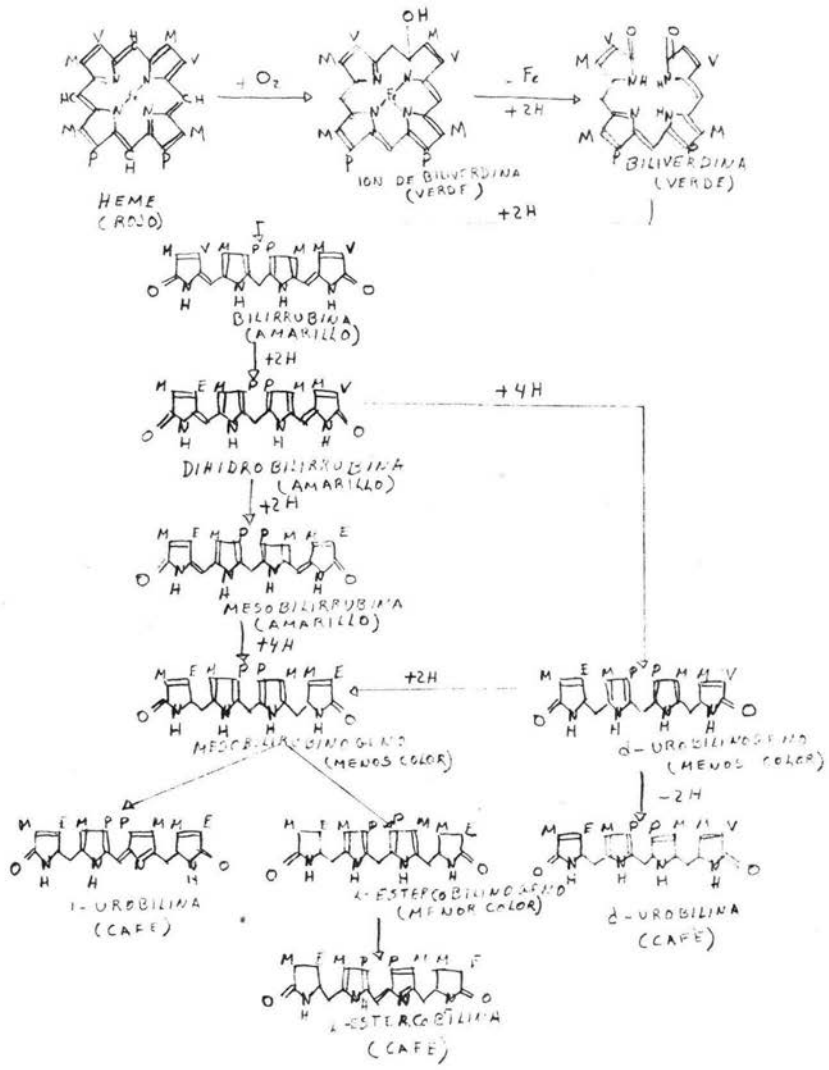
En el interior de las células hepáticas, la bilirrubina se separa de la albúmina y se transforma mediante proce

sos de conjugación en compuestos hidrosolubles. Esta -- transformación es necesaria para que pueda ser excretada - por la bilis. El pigmento así formado da la reacción de - Van der Bergh, se llama por eso bilirrubina directa, conju gada o coebilirrubina (6,9).

La conjugación de bilirrubina, se realiza principal-- mente con el ácido glucurónico y en menor proporción con - el radical sulfato. Dos moléculas de ácido glucurónico en su forma activada o de alta energía (o sea como ácido - uridín fosfo glucurónico UDPAG), se unen a una molécula de bilirrubina mediante la gluconil-transferasa, que se en - cuentra en el retículo endoplásmico liso de las células he páticas (9).

La formación del sulfato de bilirrubina se realiza median-- te la unión de bilirrubina libre con el sulfato activo, lo que requiere de ATP para que le proporcione la energía ne cesaria (9).

Una vez conjugada, la bilirrubina se concentra en for-- ma activa, cerca de la superficie canalicular de las célu las hepáticas para ser transportada a través de la membra na, al canalículo biliar, este proceso es activo y unidi-- reccional, de manera que en cuanto se refiere a la función excretora de la bilis puede decirse que la célula hepática presenta una verdadera polaridad ya que la bilirrubina -- transita a través de ella desde el sinusoides hasta el con ducto biliar (9).



-Degradación del grupo hemo a pigmento biliverdina-

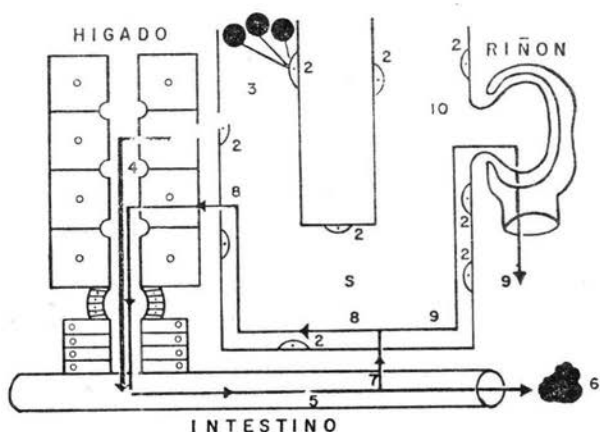
Por su tamaño y polaridad la molécula de bilirrubina conjugada pasa sin modificación alguna por la mucosa del intestino y la vesícula biliar hasta llegar al íleon terminal e intestino grueso (9). Una vez alcanzado el intestino, la bilirrubina es convertida por una serie de reacciones de reducción bacteriana. En un grupo de compuestos incoloros que reciben el nombre de urobilinógenos. Parte del urobilinógeno es reabsorbido por la mucosa intestinal, pasa a la sangre y acaba eliminada nuevamente por el hígado hacia el intestino o por los riñones con la orina (6,9). Expuestos al aire se oxidan transformándose en urobilina o se oxidan en las heces para dar estercobilina. La eliminación diaria de urobilinógeno fecal es de 40 a 280 mg -- (6,10,9). Fig. 6.

2:3 Funciones Metabólicas.

Entre las funciones metabólicas que se desarrollan en el hígado se encuentran: El metabolismo de hidratos de carbono, proteínas, lípidos, minerales, vitaminas y producción de calor.

2:3:1 Hidratos de Carbono.

El hígado es el más importante regulador del nivel de glucemia y es el órgano central de éste metabolismo, sus principales funciones son; a) formación de parte de la glucosa sanguínea y mantenimiento del nivel glucémico. b) producción y almacenamiento de glucógeno dentro del hepatocito y posterior desdoblamiento en glucosa. c) transformación en glucosa sanguínea de la galactosa, manosa y ácido láctico o pirúvico que recibe, d) formación de muchos compuestos químicos importantes partiendo de los productos intermedios del metabolismo glucídico (2,6,8).



METABOLISMO NORMAL DE LOS PIGMENTOS BILIARES

La hemoglobina de los eritrocitos viejos (1) es convertida en bilirrubina libre o indirecta principalmente en las células del sistema retículo endotelial (2). La mayor parte de la bilirrubina libre (3) llega al hígado, donde es conjugada a bilirrubina directa (4), y de esta manera es excretada al intestino. Allí es convertida por reducción en urobilinógeno (5), el cual en su mayor parte, es expulsado en las heces, por a él debemos su color (6). Una pequeña fracción de urobilinógeno se reabsorbe en el intestino (7). De esta fracción, la mayor parte regresa al hígado y vuelve a excretarse (circulación enterohepática) (8) mientras que una parte mínima es eliminada por el riñón (9).

Fig. 6.

La mayor parte de estas funciones son de suma importancia para mantener normal la concentración de glucosa en la sangre. Así al almacenamiento de glucógeno permite que el hígado suprima un exceso de glucosa de la sangre, la almacene y la devuelva al torrente vascular, cuando la concentración sanguínea de glucosa empieza a disminuir. Esta es la denominada función amortiguadora de glucosa del hígado (3,6).

El glucógeno hepático se está formando y descomponiendo continuamente y su concentración varía dentro de un amplio margen, aumentando después de la administración de -

carbohidratos y disminuyendo considerablemente durante el ayuno (2,7).

En el hígado la gluconeogénesis es de gran importancia ya que sólo tiene lugar cuando la concentración de glucosa empieza a bajar por debajo de los niveles normales. En estas circunstancias, grandes cantidades de amino ácidos son convertidas en glucosa y con esto ayudan a mantener la glicemia relativamente normal (6).

La conversión de galactosa y levulosa en glucosa es de importancia vital en el metabolismo de la galactosa, porque casi ninguna célula de la economía puede convertir la galactosa en glucosa. Al contrario de la levulosa que puede ser utilizada por todas las células al igual que la glucosa (6).

En algunos casos al glucógeno muscular produce ácido láctico en exceso y una parte de éste pasa a la sangre y es llevado al hígado donde se transforma en glucógeno. Este glucógeno hepático puede formar glucosa sanguínea y ésta ser utilizada por el músculo; a éste proceso se le denomina ciclo de Cori.

Se produce también glucógeno hepático si se administra proteína o amino ácidos. También aparece después de la administración de carbohidratos y grasas aunque esta aportación es muy pequeña y con poca producción de glucógeno (3).

La glucogenólisis, es la ruptura del glucógeno con formación de glucosa, que pasa a la sangre. Este proceso se produce en diversas circunstancias que son: a) Aumento del consumo de la glucosa por el organismo. b) Casos de hipoglucemia. c) Acidosis. d) Diabetes pancreática. e) Exce-

so de tiroides o de tiroxina. f) Estimulación del sistema simpático adrenal y g) Asfixia o anoxia (2,3).

Cuando hay disminución de glucógeno en el hígado es más lábil a los agentes tóxicos. Esta disminución se observa cuando el organismo no recibe o no utiliza una cantidad suficiente de hidratos de carbono (2).

2:3:2 Proteínas.

El metabolismo proteico en el hígado es de gran importancia, ya que si éste dejara de efectuarse por espacio de unos días se produciría la muerte del individuo. No siendo así con el metabolismo de carbohidratos y grasas (6). El hígado interviene en este metabolismo así: a) Desaminación de amino ácidos. b) Formación de urea para suprimir el amoníaco de los líquidos corporales. c) Interconversiones entre los diferentes amino ácidos y otros compuestos importantes para los procesos metabólicos que se requieren. d) Formación de proteínas plasmáticas (6).

La desaminación es una reacción por virtud de la cual un radical amino (NH_2) se separa de una molécula de amino ácido formandose una molécula de amoníaco y una de ceto ácido. La mayor parte del amoníaco se convierte a urea y se excreta por la orina, el ceto ácido puede experimentar des carboxilación por el camino del ácido tricarbóxico ó convertirse a glucosa o a grasa. Puede producirse un poco de desaminación en otros tejidos como por ejemplo el riñón, - pero es tan pequeña que carece de importancia (3,6).

La formación de urea por el hígado permite que se suprima el amoníaco de los líquidos corporales. Debido a que las bacterias intestinales estan produciendo continuamente amoníaco que pasa a la sangre, su concentración aumentaría

enormemente en el organismo en caso de disfunción hepática y acabaría produciendo un coma hepático y con ello la muerte (6,7,11).

Esencialmente todas las proteínas plasmáticas con excepción de una parte de globulinas gama son formadas por las células hepáticas. Bastaría solo esta función para considerar al hígado uno de los órganos más importantes para el bienestar y supervivencia de la economía. De acuerdo con lo anterior es ahora importante hacer notar tres funciones vitales que realizan las proteínas sanguíneas sintetizadas por el hígado. a) La protrombina y el fibrinógeno que son como ya se sabe indispensables para la coagulación sanguínea. b) Todas las proteínas de la sangre contribuyen a producir la presión osmótica sanguínea y en consecuencia son importantes para conservar el balance hídrico y --- c) Las proteínas sanguíneas contribuyen a causar la viscosidad de la sangre es por ésto que resultan indispensables para la circulación normal. Las globulinas gama restantes son los cuerpos inmunes formados por las células retículo endoteliales que se encuentran en todo el cuerpo (6,7).

Es interesante el hecho de que cuando faltan proteínas plasmáticas se origina una rápida mitosis en las células hepáticas y consecuente crecimiento del órgano hasta un volumen mayor, efectos que coinciden con una rápida salida de proteínas plasmáticas, hasta que su concentración en la sangre se ha normalizado (2,6).

Otra importante función dentro de éste metabolismo es sintetizar algunos amino ácidos y otros compuestos químicos también muy importantes a partir de amino ácidos más simples (2,6).

2:3:3 Lípidos.

Durante mucho tiempo se penso que el único organo que efectuaba el metabolismo de lípidos era el hígado. Pero -- más tarde se pudo comprobar que no solo aquí se efectuaba éste metabolismo, ya que muchos tejidos tienen esta capaci-- dad. Sin embargo el hígado sigue siendo el órgano princi-- pal de éste metabolismo porque más del 50% de las diferen-- tes interconversiones grasas ocurren en el hígado, las -- principales son: a) Beta oxidación de ácidos grasos y forma-- ción de ácido aceto acético. b) Formación de liproteínas. c) Formación de colesterol y fosfolípidos. d) conversión -- de hidratos de carbono a proteínas y grasa (6,10).

La beta oxidación es una función vital porque de aquí se obtiene energía de las grasas neutras, esto se logra -- gracias a la separación de sus componentes principales co-- mo son el glicerol y ácidos grasos, posteriormente los áci-- dos grasos se rompen por la beta oxidación en radicales -- acetilo de dos carbonos, que forman a su vez acetyl Co-A. Esta puede penetrar en el ciclo del ácido tricarbóxico y oxidarse para liberar cantidades enormes de energía (3,6).

El hígado forma fosfolípidos en mayor proporción que cualquier otro órgano, salvo la mucosa intestinal durante el período de la absorción. Transforma el acetato en grasa neutra y fosfolípidos y la formación de grasa suele ser -- más rápida por lo que se sospecha que los fosfolípidos no son intermediarios obligados (6).

El colesterol se encuentra distribuido ampliamente en los tejidos del cuerpo, sin embargo el hígado es la fuente mayor de colesterol en la sangre. Para su formación se requiere de moléculas pequeñas como acetato y acetyl Co-A.

La concentración de colesterol en suero de un individuo se encuentra ampliamente relacionado con la dieta. Este se convierte en el hígado en varios tipos de compuestos como ésteres del colesterol y ácidos biliares (3).

2:3:4 Minerales y Vitaminas.

La conversión de caroteno en vitamina A, es función del hígado, además almacena vitaminas A,B,D y K. La absorción de vitaminas liposolubles por el intestino depende de las sales biliares que normalmente hay en la luz intestinal gracias a la secreción hepática (3,6).

La mayor parte del hierro de la economía (excluyendo naturalmente el hierro de la hemoglobina), se encuentra almacenado en el hígado en forma de ferritina, esto se debe a que en las células hepáticas se encuentra en cantidades considerables la apoferritina, que es una proteína capaz de combinarse con cantidades grandes o pequeñas de hierro. Por lo tanto cuando en los líquidos corporales se encuentra elevada la concentración de hierro, éste se combina con la apoferritina y en esta forma se almacena hasta que el cuerpo lo necesita (6).

2:4 Funciones Protectoras y de Destoxificación.

El hígado por medio de las células de Kupffer extrae de la sangre gran cantidad de toxinas y metales pesados, así como fármacos, que producirían lesiones tisulares en otras partes del cuerpo. Diversos tóxicos son eliminados o destruidos por el hígado mediante conjugación, oxidación, o gracias al sistema reticulo endotelial. Sirve también como órgano de destoxificación en toda clase de intervenciones quirúrgicas. En caso de enfermedad hepática de gravedad suficiente para mermar esta función, aumenta considerablemente el peligro a cualquier intervención quirúrgica -

(2,6,11).

2:5 **Funciones Hematológicas.**

En el embrión, el hígado es el órgano hematopoyético, en el adulto almacena un principio antianémico, y en condi ciones patológicas puede también funcionar como órgano he- matopoyético, así mismo forma gran parte de las sustancias que intervienen en el proceso de la coagulación.

ELECCION DE LAS PRUEBAS

Se considera necesario hacer una buena revisión de la fisiopatología hepática, antes de conocer el tipo de pruebas de laboratorio que se van a realizar en este trabajo.

Las células hepáticas pueden verse dañadas por una gran variedad de agentes como son: virus, bacterias, toxinas bacterianas, drogas, solventes de grasas, deficiencias nutricionales, hipoxia prolongada, anoxia y metales pesados así como por factores mecánicos como son la compresión, inflamación o bloqueo biliar (12).

Aunque al conjunto de pruebas que se realizan se les denomina de "Funcionamiento Hepático"; no todas ellas miden cuantitativamente una disfunción. Esto es particularmente cierto en la prueba de floculación de proteínas; cuando se da un dato cuantitativo que represente una función, por ejemplo en la excreción, resulta muy difícil evaluar fisiológicamente el por qué de esta alteración puesto que se encuentra íntimamente relacionado también con la excreción, como puede observarse en el caso del colesterol (12); es por tanto necesario realizar una serie de pruebas antes de dar un diagnóstico de enfermedad hepática.

1: Fisiopatología de la Circulación Hepática.

Las células hepáticas son particularmente vulnerables a la privación de oxígeno y cuando éste se ve disminuido - en caso de falla cardíaca los hepatocitos empiezan a necrosarse y se alteran algunas de sus funciones metabólicas, - por ejemplo son incapaces de suministrar glucógeno normalmente y convertirlo de lactato a piruvato; se presenta acidosis láctica hay también una falla en la desaminación de amino ácidos, con el consecuente aumento en la sangre de amino ácidos con nitrógeno (2).

Así mismo por una falla en la circulación hepática se

puede presentar: Ictericia, aumento en tiempo de protrombina y el nivel de transaminasa sérica incrementada, Etc (?)

Para medir el flujo sanguíneo hepático puede utilizarse la técnica de la bromosulfaleína ó la prueba del colorante Rosa de Bengala.---

2: Fisiopatología de los Pigmentos Biliares.

Una alteración en el metabolismo de los pigmentos biliares produce su acumulación en suero y en los tejidos - produciendo un color amarillento que se conoce con el nombre de ictericia, ésta suele presentarse al rebasar el límite normal de concentración que es de 0.5 mg/100 ml de suero; el incremento en la concentración puede obedecer a varias razones entre las más importantes se encuentran: la destrucción excesiva de los eritrocitos circulantes; la conjugación defectuosa de la bilirrubina y la excreción deficiente de la bilirrubina (6,9,10).

2:1 Destrucción excesiva de los eritrocitos circulantes.

Los glóbulos rojos se hemolizan tan rápidamente, que las células hepáticas no son capaces de eliminar tal cantidad de bilirrubina formada y por lo tanto la concentración del complejo bilirrubina-proteína se ve incrementada, aumentando consecuentemente la producción de urobilinógeno - en el intestino (3); las razones por las que se presenta esta hemólisis son diversas, por ejemplo las infecciones - como el paludismo, septicemias, o después de la administración de drogas como la fenilhidracina, compuestos fenólicos, etc., ó por agentes físicos como son las quemaduras graves. Se presenta también después de múltiples transfusiones debido a las reacciones inmunológicas anti A, - - anti B y anti Rh (9).

Existen otros casos en los que la concentración de bilirrubina se ve aumentada, por ejemplo en una eritropoyesis anormal debida a la anemia perniciosa normocítica o macrocítica refractaria, talasemia mayor o una fuerte hemorragia (2,9,10).

2:2 Conjugación Defectuosa de la Bilirrubina.

El defecto en la conjugación de la bilirrubina se debe quizá a la alteración en la membrana celular o a un defecto en el enlace proteínas a nivel citoplásmico; aunque esto no es una evidencia definitiva es un factor etiológico, excepto en los casos de la administración de drogas como el rifamicin porque esta situación cesa en el momento de quitar la droga retornando la bilirrubina a su concentración normal (2). Sin embargo la causa más importante de un defecto en la conjugación es la deficiencia en la actividad de la glucuroniltransferasa que es la que cataliza la transferencia del residuo de glucuronidato del ácido uridín fosfo glucurónico a la bilirrubina (10).

Carencia del sistema enzimático que comprende transferasa de glucuronilo, es la causa de la hiperbilirrubinemia de la enfermedad de crigler-Najjar, se inicia en los primeros días de vida y generalmente lleva a la muerte por Kirschnerus (3). Se presenta también el síndrome de Gilbert o disfunción hepática constitucional en este caso no se presenta una hemólisis aumentada, además el hígado se encuentra normal, el defecto es genético y sólo es grave en herencia homocigótica (10). Un tercer caso es la ictericia fisiológica del recién nacido que se presenta principalmente en niños prematuros debido a que la actividad enzimática está disminuída (10).

2:3 Excreción Defectuosa de la Bilirrubina.

Este mecanismo de ictericia incluye la mayor parte de los casos. Todos tienen en común que la bilirrubina cuya concentración se ve elevada en suero es fundamentalmente conjugada.

Debido a la complejidad del aparato de excreción biliar es difícil el diagnóstico de éstos enfermos; y para facilitar su estudio y tratar de esclarecer en cada caso cual es la perturbación responsable se han hecho tres grandes grupos: a) Transtornos de las células parenquimatosas. b) Colestasis intrahepática. c) Obstrucción biliar extrahepática (9).

Para medir la eficacia del metabolismo de los pigmentos biliares se cuantifica la concentración de la bilirrubina en suero, orina y el urobilinógeno fecal o urinario.

3: Fallas en el metabolismo.

Difícilmente se puede demostrar una disfunción en la actividad metabólica del hígado. Esto se debe a la gran reserva de tejido hepático, no es sino hasta el momento en que el hígado está sumamente destruido cuando se pueden observar problemas en el metabolismo de carbohidratos, aminoácidos o cualquier otro proceso (12).

3:1 Carbohidratos.

Dentro del metabolismo de carbohidratos se pueden presentar disfunciones en la degradación y síntesis del glucógeno, la glucosa, la fructuosa y la galactosa, estas funciones como se sabe se llevan a cabo en el hepatocito, gracias a las enzimas específicas del ciclo de Embden-Meyerhoff-Cori (2).

La deficiencia de la actividad de una de las enzimas que intervienen en este ciclo implica una galactosemia, in

tolerancia a la fructuosa y múltiples enfermedades derivadas del almacenamiento de glucógeno. La galactosemia específicamente se debe a la deficiencia de la enzima galactosa-1-fosfato uridil transferasa. Esta enfermedad se presenta generalmente en niños y los síntomas son vómito, diarrea hepatomegalia, ictericia, amino aciduria, además de fallas en el crecimiento. Los sobrevivientes al periodo neonatal presentan retardo mental y cirrosis (2).

Intolerancia hereditaria a la fructuosa se presenta por una deficiencia en la actividad de la fosfo fructo aldolasa y trae como consecuencia una enfermedad sumejante a la galactosemia, en cuanto a sintomatología, pero el principio de la enfermedad no se manifiesta sino hasta después de haber sido administrada fructuosa en la dieta, ya sea por algunas frutas como la caña de azucar, ó después de la ingestión de alimentos comerciales infantiles que contengan al azucar (2).

Las pruebas más usadas para medir la eficacia de éste metabolismo son: La prueba de tolerancia a la galactosa, a la glucosa ó las pruebas que miden el almacenamiento de glucógeno como es la de tolerancia a la epinefrina (10).

3:2 Proteínas.

En las enfermedades hepáticas agudas o crónicas existe una tendencia general hacia la hipoproteïnemia, que se manifiesta en la fracción albúmina; el daño del parénquima hepático produce elevación de las globulinas (10). El tiempo de protrombina y respuesta a la vitamina K se consideran pruebas valiosas para el diagnóstico de las enfermedades hepáticas.

Las pruebas de tolerancia a amino ácidos pueden medir la función metabólica de las proteínas del hígado por-

que en las enfermedades hepáticas las tasas de remoción de éstos amino ácidos estan retardadas (10).

Existen pruebas de que en las enfermedades hepáticas se producen fracciones de proteínas alteradas y estas pueden ser demostradas en la sangre por medio de las pruebas de floculación de Cefalina-Colesterol, Turbidez del Timol la del Zinc o la determinación turbidimétrica de las gamma Globulinas (10).

3:3 Lípidos.

El hígado desempeña un papel importante en las distintas fases del metabolismo de lípidos, también la síntesis esterificación y excreción del colesterol, síntesis de ácidos (o sales) biliares, y cuerpos cetónicos (12).

El colesterol se encuentra elevado en ictericia obstructiva, obstrucción intrahepática, hipotiroidismo y nefrosis; se encuentra disminuido en daño del parénquima, enfermedad hepática que dá como resultado disminución en la síntesis de transferasa, la que es indispensable para la formación de ésteres del colesterol. En cirrosis hepática los niveles de los ésteres del colesterol pueden ser también bajos (3,10)

Los ácidos biliares se forman a partir del colesterol en el hígado, por medio de reacciones químicas en las que intervienen bacterias específicas formando ácidos biliares secundarios que son excretados por las heces y que en pequeña cantidad son reabsorbidos junto con el colesterol, - Los ácidos biliares tienen la función de emulsificar las grasas ingeridas con los alimentos, activan las lipasas y ayudan con ésto a la absorción de lípidos por la mucosa intestinal. Se ven elevados los valores normales de las sustancias arriba mencionadas en hepatitis e ictericia obs--

tructiva y en enfermedad hepatocelular.

Valores anormales de otros lípidos en el plasma se --
presentan en pacientes con enfermedad del tracto biliar. -
El aumento de triglicéridos se presenta por ictericia obs-
tructiva, o en pacientes alcohólicos con anemia hemolítica
e hígado graso y en caso de pancreatitis (3,13). Los nive-
les en plasma de ácidos grasos libres se ven aumentados en
pacientes que presentan todas las formas de enfermedad he-
pática parenquimatosa. Los fosfolípidos aumentan en incte-
ricia obstructiva y en cirrosis biliar (13).

4: Vitaminas.

Ocurre una depresión en los niveles de vitamina A en
el plasma en pacientes con enfermedad del parénquima hepá-
tico, ya que el hígado es el encargado de convertir el ca-
roteno de Vitamina A y requiere de las sales biliares para
su absorción en el duodeno. Esta vitamina se ve alterada -
también en cirrosis alcohólica y pelagra.

Otra vitamina que se almacena en el hígado es la B₁₂
y se encuentra alterada en plasma en pacientes con hepati-
tis viral o en caso de necrosis de las células hepáticas .
(10).

5: Alteraciones en las funciones Protectoras y de Destoxi- ficación.

El hígado realiza además de las funciones ya conoci-
das una muy importante que es la de convertir por conjuga-
ción sustancias tóxicas en productos no tóxicos; ésta capa-
cidad puede ser medida por la reacción de conjugación del
ácido benzoico con la glicina para formar ácido hipúrico,
que se excreta en la orina. La excreción del ácido hipúri-
co se ve disminuída en la hepatitis, cirrosis, carcinoma -
del hígado necrosis hepática, obstrucción biliar por cálcu

los en el colédoco. Es conveniente hacer notar que esta prueba pierde valor si hay también mal funcionamiento renal (3,10).

6: alteraciones Enzimáticas.

Como en el hígado se realizan muchos procesos metabólicos que requieren la participación de enzimas, es de esperarse que, cuando las células hepáticas están dañadas o destruidas a causa de enfermedad hepática aguda, las enzimas sean liberadas al suero (3).

Las enzimas relacionadas con el funcionamiento hepático que están presentes en el suero, pueden ser clasificadas dentro de cuatro grandes grupos, de acuerdo a los cambios producidos en sus niveles. El grupo I incluye enzimas cuyo nivel es alto en ictericia obstructiva y en hepatitis aguda el prototipo de éste grupo es la fosfatasa alcalina. El grupo II incluye enzimas cuyos niveles están muy elevados en hepatitis aguda e ictericia obstructiva los miembros de éste grupo son la glutámico oxalacética (GOT), la transaminasa pirúvica (GPT), la aldolasa (ALD) y otras enzimas de esta categoría. El grupo III tiene enzimas cuyos niveles se encuentran ligeramente elevados o normales en hepatitis e ictericia obstructiva, a éste tipo pertenecen la deshidrogenasa láctica (LDH) creatín fosfo quinasa -- (CPK), lipasa, etc. Y el grupo IV muestra disminución en hepatitis aguda y se encuentra normal o levemente disminuída en ictericia obstructiva, a éste grupo pertenece la colinesterasa (13,14).

Como ya se había mencionado antes, sólo se hará aquí referencia a tres pruebas, éstas han sido elegidas por ser las de uso común en los laboratorios, además de tener gran

valor en el diagnóstico. Estas pruebas miden excreción, se creción, actividad enzimática y metabólica, est an represen tadas respectivamente por la determinación en suero de bilirrubinas, contenido de colesterol total en suero, éste -- res del colesterol, actividad de las transaminasas GPT y GOT.

Los métodos elegidos para éstas determinaciones son a quellos que presentan mayor precisión confiabilidad y economía.

METODOLOGIA DESCRIPCION Y FUNDAMENTOS

1: Determinación de Bilirrubina en Suero.
Método de Malloy y Evelyn

Erlich en 1883 efectuó la copulación de bilirrubina con un diazo agente. Pocos años después, Van der Bergh y Muller descubren dos tipos de diazo reacción y la clasifican así: a) reacción directa, en la que se desarrolla color en 30 seg en ausencia de alcohol, esta reacción está dada por el diglucurónido de bilirrubina. b) reacción indirecta que requiere de la adición del alcohol para el desarrollo de color y esta dada por la bilirrubina no conjugada (3,13,14).

Existen por tanto métodos para medir una u otra forma de bilirrubina, sin embargo se hace necesario un método - confiable para medir ambas dentro de una sola reacción el cual ha sido dado por Malloy y Evelyn (14).

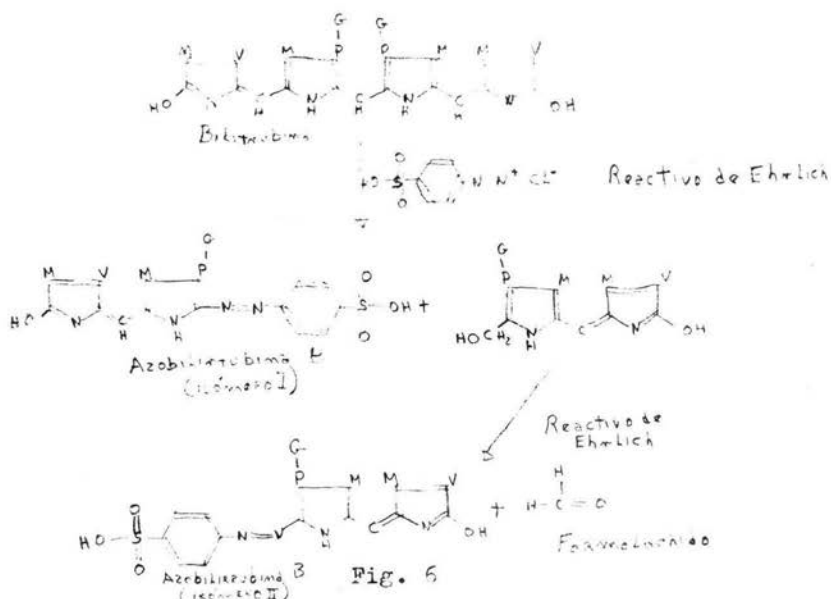
Aquí se utiliza suero muy diluido y metanol en una - concentración que impide la precipitación de proteínas, de be evitarse la hemólisis y lipemia, la muestra debe guardarse en la obscuridad y efectuarse la prueba lo más pronto posible (3).

1:1 Fundamento Químico.

La bilirrubina se trata con p-sulfonato bencen diazonio para formar azobilirrubina. Fig. 6.

La bilirrubina directa desarrolla un color púrpura - exactamente 5 min después de la diazoación, el cual puede medirse fotométricamente. La reacción se realiza en medio acuoso y en presencia de ácido sulfanílico (14). El tiempo dado originalmente para esta reacción era de un minuto, pero fué corregido por Lathe y Ruthen a 5 min. La adición de una pequeña concentración de metanol acelera la reacción - de todas las formas de bilirrubina dentro de la solución,

así la diazoación se lleva a cabo más fácilmente. El color final desarrollado representa la bilirrubina total (14).



1:2 Reactivos.

a) Metanol Absoluto.

Nota: Michaelson reporta que la velocidad y grado de la formación de color se ve disminuido aproximadamente 6% con metanol viejo.

b) Liazos reactivo

Mezclar 0.3 ml al 0.5% de nitrito de sodio con 10 ml de ácido sulfanílico en solución que se usará al poco tiempo de preparado.

c) Solución de ácido sulfanílico.

Disolver 100 mg de ácido sulfanílico en 1.5 ml de HCl concentrado y adicionar agua hasta obtener un volumen de 100 ml.

d) Solución de nitrito de sodio al 25%, que permanezca -

en refrigeración.

- e) Nitrito de sodio al 0.5%.

Solución diluída de nitrito de sodio 1:50 con agua, -
prepararla justo antes de usarla.

- f) Solución diazo blanco.

Diluir 0.5 ml de HCL concentrado con 100 ml de agua.
(14).

1:3 Procedimiento.

- a) Marcar dos tubos con B y X, adicionar a cada uno -
0.40 ml de suero o plasma y 3.6 ml de agua destilada.
b) Adicionar 1.0 de sol diazo blanco al tubo B y 1.0 ml
de diazo reactivo al tubo X, mezclar inmediatamente.
c) Exactamente 5 min después de la adición del reactivo
diazo al tubo X, leer la absorbancia contra el tubo B
a 540 nm ó con filtro para onda larga en esta región.
d) Adicionar 5.0 ml de metanol absoluto a cada tubo y -
mezclar por inversión suave, dejar reposar a tempera-
tura ambiente por 30 min. y dentro de los siguientes
30 min leer la absorbancia de X contra B. Esta será -
la absorbancia total.

Si la solución se transfiriera a cubetas antes de veri-
ficar la lectura y se presentasen burbujas, es necesa
rio evitarlas por medio de golpes suaves en las pare-
des del tubo. (14)

1:4 Cálculos.

$$\begin{aligned} \frac{\text{mg de bilirrubina directa a los 5 min}}{100 \text{ ml de suero o plasma}} &= \frac{A_{5 \text{ min}}}{2 A_S} \times 0.02 \times \frac{100}{0.4} \\ &= \frac{A_{5 \text{ min}}}{A_S} \times 2.5 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \frac{\text{mg de bilirrubina total}}{100 \text{ ml de suero o plasma}} &= \frac{A_t}{A_S} \times 0.02 \times \frac{100}{0.4} \\ &= \frac{A_t}{A_S} \times 5 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \frac{\text{mg de bilirrubina indirecta}}{100 \text{ ml de suero o plasma}} &= \text{bilirrubina total} - \text{bilirru-} \\ &\quad \text{bina a los 5 min} \\ (14). \end{aligned}$$

1:5 Calibración.

Es conveniente preparar diferentes tipos de patrones para controlar el funcionamiento del fotómetro o espectrofotómetro, hay que tomar en consideración la inestabilidad de la bilirrubina pura preparada para usarla en suero o en solución de proteínas; se recomienda utilizar al principio de la prueba una solución de bilirrubina pura y rectificarla periódicamente de manera similar.

Control con bilirrubina: Se encuentran preparaciones comerciales con varios grados de pureza, la absorción molar de la bilirrubina comercial en CHCl_3 a 453 nm se encuentra entre 43 500 a 59 800, la de azobilirrubina a 545 nm en ausencia de suero y se lee a 540 nm en presencia de suero.

Para la determinación de la absorción de la bilirrubina se debe hacer la siguiente preparación: a) pesar exactamente 20 mg de bilirrubina y disolverla en 100 ml de Na_2CO_3 al 0.2% en un matraz volumétrico en un cuarto oscuro y a -

temperatura ambiente. Este reactivo deberá usarse en un tiempo no mayor de 15 min. b) En un tubo adicionar 0.1 ml - 20 ug de la solución patrón de bilirrubina, agregar 4.9 ml de metanol y mezclar. c) A un segundo tubo adicionar 4.0 ml de agua destilada, 1.0 ml de diazo reactivo. d) Mezclar el contenido de ambos tubos. e) Preparar el blanco de reactivos 1.0 ml de sol diazo blanco, 4.0 ml de agua y 5.0 ml de metanol. f) Después de 30 min. leer el tubo control contra el blanco a 545 nm, la absorbancia será de 0.226; y se calcula como sigue:

$$\text{Absorbancia} = A_{545} \times \frac{534}{0.00002 \times 100} \times 0.97$$

Donde: 534 = PM de la bilirrubina

0.00002 = Cantidad de bilirrubina empleada

100 = Dilución

0.97 = Factor de corrección debido al 3% de pérdida en volumen sobre la mezcla igual a los volúmenes de agua y metanol.

Dado que la absorción de bilirrubina baja significativamente en presencia de suero, será necesario tener un patrón - que contenga suero o una mezcla de sueros cuyo contenido de bilirrubina sea conocido o preparado con 0.1 ml de sol patrón que contenga aproximadamente 20 mg/100 ml de Na_2CO_3 al .2% o sea 20 ug; aquí la absorbancia será menor de 0.100 a 414 nm y de 0.040 a 460 nm en dilución 1:25 en NaCl al .85%. El patrón deberá permanecer en la obscuridad y prepararse - en un tiempo no mayor de 10 min. antes de su uso.

a) marcar un par de tubos con B y X y correrlos sin adicionar solución patrón. b) Otro par de tubos se corren con patrón. c) En los tubos que tienen 0.1 ml de sol patrón adicionar 0.4 ml de suero, 3.5 ml de agua y mezclar. d) En los

tubos que no lo tiene agregar 3.6 ml de agua y 0.4 ml de --
suero y mezclar.

A_S equivalente a 5 mg/dl = A_S con patrón interno- A_S sin pa-
trón interno.

$$\text{Corrección } A_S = \frac{64\ 100}{\text{absorbancia obtenida sin suero}} = x A_S \text{ obtenida con suero}$$

$$\text{ó Corrección } A_S = \frac{59\ 800}{\text{absorbancia obtenida con suero}} \times A_S \text{ obtenida con suero} \quad (14)$$

1:6 Valores de referencia.

El límite normal superior de bilirrubina es de 0.35 mg en 100 ml y el valor normal para la bilirrubina total es arriba de 1.5 mg/100 ml. Estos valores se encuentran ligeramente más altos en hombres que en mujeres. La bilirrubina disminuye después de las comidas y se incrementa después -- del ejercicio muscular, hay diferencias en cuanto al sexo, edad, situación geográfica, hábitos alimenticios, etc. (14)

1:7 Comentarios acerca del método.

La especificidad de la determinación de bilirrubina to tal es en general buena por el método descrito, sin embargo existe una probabilidad de error del 5%; este error se debe a los factores siguientes:

- a) En pacientes urémicos aparece un color café que se debe posiblemente a Indican o glucuronato de indoxilo, la interferencia de éste color será insignificante en niveles elevados, pero tendrá gran importancia en niveles normales.
- b) Se presentará un color amarillo en la reacción cuando existan urobilinógenos en suero, sin embargo este color no a parece en suero normal.
- c) La biliverdina no interfiere por que no reacciona en la diazo reacción.
- d) La reacción en --

presencia de metanol se efectúa más rápido a la temperatura de 37°C. e) La temperatura afecta al desarrollo de color - tanto en la bilirrubina directa como en la indirecta; si la temperatura de la habitación esta arriba de 30°C es aconsejable que los tubos permanezcan en agua de la llave o en un baño cuya temperatura no exceda de 22-28°C.

f) La determinación se efectúa generalmente en suero porque la concentración de bilirrubina aquí es mayor, sin embargo esto puede estar sujeto a discusión, ya que algunos autores quizá por el método de trabajo que utilizan obtienen valores más altos en plasma que en suero. g) En cuanto a la hemoglobina se ha visto que causa un decremento en los valores, así por ejemplo encontramos que 100, 250 ó 1000 mg de hemoglobina por 100 ml de suero causa una baja de 15, 40 y 75% respectivamente en el resultado de la bilirrubina total. El grado de interferencia se relaciona inversamente con el nivel de bilirrubina y se debe posiblemente a que la hemoglobina presente es parcialmente convertida a metahemoglobina otra teoría supone que la interferencia se debe a la oxihemoglobina. Sin embargo Michaelson concluye que la interferencia de la hemoglobina en la técnica de Malloy y Evelyn - resulta de la combinación de tres factores a saber: destrucción de la bilirrubina después de la adición de metanol, - desvanecimiento de color del complejo azobilirrubina y el - incremento de la absorbancia del blanco.

2: Determinación de Bilirrubina total y directa por el método Automatizado.

Método de Jendrassik y Grof adaptado para Autoanalizador por Gambino y Schreiber.

2:1 Fundamento Químico.

La bilirrubina total se determina debido a la diazoa--

ción en presencia de cafeína y benzoato de sodio. La bilirrubina directa se determina por la diazocación a un pH ácido en el cual la bilirrubina indirecta es insoluble y por lo tanto no reacciona, la absorbancia de la azobilirrubina alcalina se mide a 600 nm. Y el blanco consiste en una mezcla de todos los reactivos exceptuando el diazo reactivo.

2:2 Reactivos.

a) Reactivo de Cafeína.

En aproximadamente 400 ml de agua a una temperatura de 50 a 60°C adicionar: 37.5 g de cafeína, 57.0 g de benzoato de sodio, y 94.5 g de acetato de sodio. Mezclar permitiendo que se enfríe y diluir a un litro con agua

b) Solución comercial de Ácido Sulfanílico.

Añadir 10 g de ácido sulfanílico y 15.0 ml de HCl conc a una cantidad conocida de agua, mezclar y diluir a un litro.

c) Nitrito de Sodio al 5%.

Disolver 5 g de nitrito de sodio en agua y diluir a un litro guardar en el refrigerador.

d) Reactivo Diazo.

Mezclar 2.5 ml de nitrito de sodio al 0.5% con 100 ml de solución comercial de ácido sulfanílico. Hacer esta solución para cada día de trabajo.

e) Acido ascorbico al 4%.

Disolver 1 g de ácido ascorbico en agua y diluir a 25 ml. Hacer esta solución cada día.

f) Amortiguador de Tartrato.

Disolver 50 g de NaOH y 175 g de tartrato de sodio y potasio en agua y diluir a un litro. Esta solución es estable seis meses.

g) HCl 0.05 N.

En un litro de agua adicionar 4.2 ml de HCl concentrado.

h) Patrones de Bilirrubina.

La calibración se puede realizar utilizando bilirrubina patrón adicionada a un suero normal. (14).

2:3 Procedimiento.

El procedimiento es igual que el de la determinación de la bilirrubina total y directa excepto, cuando en la reacción directa se agrega HCl 0.05N es sustituido por el reactivo de cafeína. Los blancos en suero fresco son usualmente bajos y relativamente uniformes; Los resultados se calculan por medio de la curva de calibración de igual manera que los métodos que obedecen la ley de Beer (14).

2:4 Exactitud y precisión.

La precisión de la bilirrubina total es $\pm 5\%$ a un nivel de 2 mg/dl. La precisión para cualquiera de las dos bilirrubinas la total o la directa es correspondientemente más baja al disminuir los niveles de bilirrubina.

2:5 Valores de Referencia.

Son iguales a los indicados para el método manual.

3: Determinación de la actividad de la Transaminasa GOT. - E.C.2.6.1.1.

Método de Karmen, modificado por Henry

Las transaminasas son enzimas que catalizan la transferencia de un grupo amino de un amino ácido a un alfa ceto ácido. Estas enzimas se llaman también amino-transferasas o aminoferasas. El ácido L-glutámico actúa como el donador del grupo amino en la mayoría de las reacciones y el fosfopiridoxal y la piridoxamina hacen las veces de coenzimas en

las reacciones de transferencia del grupo amino (3,14,15).

Las enzimas más importantes de este grupo son la transaminasa glutámico oxalacética (GOT) y la transaminasa pirúvica (GPT) (15).

Los métodos propuestos para la determinación de GOT emplean ácido alfa ceto glutámico y ácido aspártico como sustrato y determinan la velocidad de formación del ácido glutámico u oxalacético, el glutamato formado puede ser separado y cuantificado en papel cromatográfico, pero esta técnica sólo se emplea para investigación (14).

2:1 Fundamento Químico.

Los ceto ácidos formados por la acción de la transaminasa, son reducidos a hidroxiacidos con el uso de la coenzima I (NADH) reducida todo esto en presencia de una deshidrogenasa específica; a medida que transcurre la reacción la NADH se oxida a NAD^+ . Fig 7; la desaparición de NADH por unidad de tiempo se sigue por la medida de la disminución de la absorbancia durante varios minutos a 340 nm. El cambio de absorbancia por minuto (AA/min) puede relacionarse directamente con los micromoles de NADH oxidados y éstos a su vez con los micromoles de sustrato transformados por minuto. Los resultados se expresan en unidades Karmen. Es importante resaltar que las concentraciones de sustrato empleado en la modificación hecha por Henry permiten una mejor velocidad de reacción ya que su rendimiento es aproximadamente -- 20% mayor sobre el método de Karmen, cuando las muestras se procesan a una temperatura de 32°C (3,14).

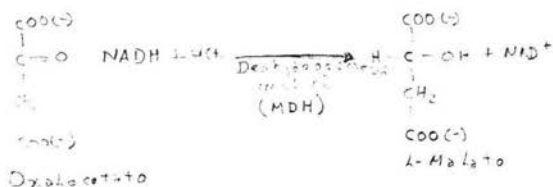


Fig. 7

3:2 Reactivos

- a) Amortiguador fosfato, 1.0 M, pH 7.4.

Se disuelven en agua 136g de KH_2PO_4 y 33g de NaOH y -- se diluye la solución a 1000 ml.

- b) Amortiguador fosfato, 0.1 M pH 7.4

Se diluyen diez tantos el amortiguador 1.0 M con agua. Los amortiguadores se guardan refrigerados.

- c) Solución de NADH, 2.5 mg de beta-NADH en forma de sal sódica (grado de 90 a 95 por 100)/ml de amortiguador fosfato 0.1 M. Es mejor preparar la cantidad necesaria para las necesidades de un día de trabajo. Se guardan alícuotas congeladas por una semana.

- d) Solución de alfa-ceto glutarato, 0.1 M, en amortiguador fosfato 0.1 M. A unos 35 ml aproximadamente de agua destilada en un vaso de precipitados se agregan 5 ml de amortiguador fosfato 1 M y 0.73 g de ácido alfa-ceto glutárico. se ajusta el pH a 7.4 + 0.1, con NaOH N (aproximadamente se necesitan 8.1 ml). Se diluye a 50

ml con agua. La solución es estable si se guarda en el refrigerador.

e) Solución de Deshidrogenasa Malica (MDH).

Se diluye una solución de depósito de deshidrogenasa málica (exenta de actividad de transaminasa), con un amortiguador fosfato 0.1 M, para tener un preparado -- que contenga 10 000 unidades/ml. La solución diluida -- habrá de prepararse no más de 4 horas antes de usarla.

f) L-Aspartato, 0.375 M, en emortiguador fosfato 0.1 M.

Se agregan 5.0 g de ácido L-aspartico a 50 ml de agua y 35 ml de NaOH N en un vaso de precipitados. Se mezcla bien y se calienta la solución en un baño de vapor hasta que se disuelven los cristales; a continuación, -- se enfría la solución a temperatura ambiente y se agregan 10 ml de amortiguador fosfato 1 M. Se ajusta el pH a 7.4 ± 0.1 con NaOH N y se diluye a 100 ml con agua -- el reactivo se guarda en el refrigerador.

g) Testigos de Dicromato.

Se prepara una solución de 30 mg de $K_2Cr_2O_7$ en 100 ml de agua y se agregan unas gotas de ácido sulfúrico con centrado. Esta solución se diluye con agua como requiere el procedimiento.

3:3 Procedimiento.

a) En una cubeta con un recorrido de luz de 1 cm, se introducen las siguientes sustancias: 1.3 ml de Amortiguador fosfato 0.1 M, 1.0 ml de solución de aspartato 0.2 ml de solución de NADH, 0.1 ml de solución de MDH 0.20 ml de suero.

Si va a efectuarse un número grande de determinaciones, es conveniente mezclar un lote de los tres primeros reactivos, suficiente para el trabajo de un día e

introducir con pipeta 2.5 ml de ésta mezcla de reactivos en la cubeta, seguidos de la MDH y el suero. Los componentes enlistados pueden mezclarse en un tubo de ensayo pequeño y preincubarse. Después de la adición del cetoglutarato, se transfiere el contenido del tubo a una cubeta de reacción y se mantiene a la temperatura de reacción.

- b) La reacción se efectúa preferiblemente a 32°C ó a 30°C . Se mezcla todo bien y se incuba durante 20 a 30 min aproximadamente, en el espectrofotómetro o en un baño de agua, a la misma temperatura. Las reacciones "endógenas" suelen completarse en este período de tiempo. Si es necesario, puede confirmarse por medición de la absorbancia a 340 nm frente a una solución de dicromato como testigo de referencia y nueva medición unos cuantos minutos después. Las dos lecturas han de ser iguales si en dicho periodo terminaron las reacciones secundarias. Si la segunda lectura es menor que la primera, se continúan las lecturas hasta que no se produzca más cambio en la A_{340} observada. El dicromato de referencia se escoge a una dilución que tenga A_{340} de 0.5 aproximadamente.

Una vez estabilizada la absorbancia se agrega 0.2 ml de solución 0.1 M de alfa-ceto glutarato, la cual se habrá precalentado a la temperatura de la reacción, y se mezcla bien. Se transfiere a una cubeta, si ello no se había hecho todavía, y se toman lecturas a intervalos de un minuto durante 7 a 10 minutos por lo menos. Se desechan las primeras lecturas en la fase de retardo y se usa el periodo lineal para calcular el valor medio de $\Delta A/\text{min}$, ya sea gráficamente ó promediando los

valores de AA/min para cada lectura (3,14).

3:4 Cálculos.

$$\text{COT, en unidades Karmen/ml} = \frac{\text{Promedio de AA/min}}{\text{ml de suero usados}} \times 1000$$

Nota: La unidad Karmen puede convertirse en unidades internacional es multiplicándola por 0.484.

Se corrigen los resultados para expresarlos a 32°C, - si es necesario, con el uso de los factores que se dan a -- continuación:

Temperatura°C	25	27	30	33	35	37	40
factor de corrección de temperatura	1.59	1.39	1.14	1.00	.94	.82	.73 .60

3:5 Valores de Referencia.

15 - 40 U .1 ml a 32°C

7 - 19 mUI/ ml a 32°C.

Se ha reportado una leve diferencia con respecto al - sexo, ya que en el hombre se encuentran valores ligeramente más altos que en la mujer. Así mismo los valores encontrados en el adulto son el doble de los de la primera semana - de vida, sin embargo estos se van acrecentando y cuando se llega al primer año de vida los valores similares a los del adulto (3,14).

3:6 Comentarios acerca del Método.

Las ventajas que ofrece esta técnica son: Primero que es posible usar las fases iniciales de la reacción lineales para determinar velocidades de reacción, segundo se obtienen análisis de múltiples puntos.

Las concentraciones de sustrato pueden ser lo bastante altas para no poner un límite a la velocidad.

Los inconvenientes son que las mezclas de sustrato son

más complejas, las mediciones llevan mucho tiempo y se debe disponer de un espectrofotómetro con buena resolución a 340 nm. La temperatura deberá regularse a un nivel conocido -- constante dentro de la cubeta de reacción. Algunos autores recomiendan una temperatura que se encuentre entre los 22° a 32°C sin embargo no existe una temperatura ideal, ya que esta se adecuará a las condiciones de trabajo de cada laboratorio.

Lo correcto es verificarla a la temperatura óptima de reacción de dicha enzima es decir de 0 a 37°C (temperatura - corporal humana).

El uso de anticoagulantes no afecta la determinación, puede utilizarse indistintamente suero o plasma para verificar este análisis.

No deberán usarse sueros hemolizados, porque la concentración de la enzima en los eritrocitos es aproximadamente 10 veces mayor que en el suero normal.

Existen sustancias que inhiben la acción de la enzima estas son el mercurio, y el cianuro así es que se deberá evitarse su uso dentro de la técnica.

La absorbancia a 340 nm de NADH en la mezcla disminu--ye a razón de 0.0004/min a 32°C. Como la mezcla de reacción tiene inicialmente una absorbancia bastante alta, se acos--tumbra usar una solución de referencia como testigo.

En caso de tener muy turbios o ictéricos los sueros - pueden diluirse para obtener la absorbancia inicial apropiada y después hacer los cálculos necesarios. Ha de incluirse en el análisis un periodo de incubación previa para des-truir ceto ácidos endógenos en el suero, antes de agregar - el ceto ácido que interviene en la reacción.

La enzima GOT en suero es estable durante 2 a 3 sema--

nas cuando se guardan los sueros en el refrigerador.

La unidad espectrofotométrica Karmen se define como la cantidad de enzima en 1.0 ml, la cual causa un cambio de ab sorbancia de NADH de 0.001 unidades por minuto.

La precisión de la prueba ofrece un variabilidad de $\pm 3\%$ debido a error de manipulación. (14).

4: Determinación de la actividad de la Transaminasa GPT.E.-

C.2.6.1.2. (Método de Karmen, modificado por Henry)

4:1 Reactivos.

a) Amortiguador fosfato.

Como se indicó para la determinación de GOT será 1M y 0.1 M.

b) Solución de NADH.

Igual que para la determinación de GOT.

c) DL-Alanina 1M, o L-alanina, 0.5 M, en amortiguador fosfato 0.1 M.

A 75 ml aproximadamente de agua destilada en un vaso de precipitados se agregan 10 ml de amortiguador fosfato 1M y 3.9 g de DL-alanina (ó 4.45 g de L-alanina).

Se ajusta el pH a 7.4 ± 0.1 , con NaOH N. Se diluye a 100 ml, con agua. Esta solución es estable en el refrigerador.

d) Solución de LLH.

Se diluye una solución de depósito de deshidrogenasa láctica, con amortiguador fosfato 0.1 M, para tener un preparado que contenga 10 000 unidades/ml. Se puede usar esta solución durante una semana aproximadamente si se guarda refrigerada.

e) Solución de alfa-cetoglutarato, 0.1 M, en amortiguador fosfato 0.1 M, como se describió para la determinación de GOT. (3).

4:2 Procedimiento

a) En una cubeta con un recorrido de luz de 1 cm se introducen: 1.3 ml de amortiguador fosfato 0.1 M, 1.0 ml de solución de alanina, 0.2 ml de solución de NADH, 0.1 ml de solución de LDH Y 0.20 ml de suero.

Se prepara una mezcla de los tres o cuatro reactivos - primeros como se sugirió en el procedimiento para determinar GOT.

b) A partir de este punto el procedimiento y los cálculos son los mismo descritos anteriormente para la determinación de GOT. (3).

4:3 Valores de Referencia.

6 - 35 U/ml a 32°C

3 - 17 mUI/ml a 32°C. (14).

5: Determinación de Transaminasas por el método Colorimétrico. Como se sabe el sistema de análisis para la determinación de la actividad de las transaminasas contendrá dos amino ácidos y dos cetoácidos. Los ceto ácidos pueden determinarse colorimétricamente por copulación con 2,4-dinitrofenilhidracina. Sin embargo éstos métodos colorimétricos tienen varios inconvenientes. Hay presentes dos cetoácidos y los dos pueden formar el producto coloreado, fenilhidrazona del ácido. En el caso de GOT estos compuestos son alfacetoglutarato y oxalacetato. Cetoácidos como piruvato, normalmente presentes en suero, producen color de fenilhidrazona y contribuyen a la alta absorbancia del testigo. A pesar de estas limitaciones, el método colorimétrico sigue siendo factible pues las hidrazonas de los dos productos de ambas -- reacciones, la catalizada por GOT y la catalizada por GPT -- son considerablemente más cromogénicas que las de alfaceto-

glutarato. Los métodos colorimétricos son relativamente simples y aunque son menos exactos que los "fotoespectrométricos" se usan mucho. El calibrado de los métodos colorimétricos se hace empíricamente, pero de modo que los resultados obtenidos sean comparables con los que se obtienen por los métodos de "velocidad de reacción".

5:1 Reactivos.

- a) Amortiguador fosfato, 0.1 M, pH 7.4.

Se disuelven en agua 23.86 g de NaHPO_4 y 4.36 g de KH_2PO_4 y se diluye a 2 000 ml.

- b) Solución de piruvato, 2.0 mmoles/litro.

Se disuelve 0.110 g de piruvato sódico en 500 ml de amortiguador fosfato. Se prepara a medida que se necesite, para que sea reciente.

- c) Sustrato de GOT.

En un vaso de precipitados agregar 0.146 g de ácido alfa-cetoglutarico y 13.30 g de ácido II-aspartico; agregar hidróxido sódico N hasta que la disolución sea completa; ajustar a pH 7.4 con hidróxido sódico, transferrir cuantitativamente, con amortiguador fosfato, a un matraz volumétrico de 500 ml y diluir hasta la marca del matraz, con amortiguador. Esta solución es estable si se guarda refrigerada.

- d) Sustrato de GPT.

En un vaso de precipitados introducir 0.146g de ácido alfa-cetoglutarico y 8.90 g de DL-alanina, agregar hidróxido sódico N hasta disolución completa; ajustar el pH a 7.4, con hidróxido sódico y transferir cuantitativamente, con un amortiguador de fosfato, a un matraz volumétrico de 500 ml y se diluye, con amortiguador, hasta la marca del matraz. Esta solución es estable si

se guarda refrigerada.

- e) Solución de 2,4-dinitrofenilhidracina, 1 mmol/litro. -
Se disuelve 0.198 g de 2,4-dinitrofenilhidracina en -
1 000 ml de ácido clorhídrico N. Debe guardarse en --
frasco oscuro en el refrigerador.
- f) Solución de hidróxido sódico, 0.4 N.
Se disuelven 16 g de hidróxido sódico en agua y se di-
luye a 1 000 ml. (3).

5:2 Procedimiento

- a) Poner 1.0 ml de sustrato de GOT o de GPT en un tubo de ensayo e introducirlo en un baño de agua a temperatura constante de 37°C durante 10 minutos.
- b) Se agrega 0.2 ml de suero y se mezcla bien.
- c) Se incuba exactamente durante 60 min para determina- -
ción de GOT y 30 min para la de GPT.
- d) Al final del periodo de incubación se agrega 1.0 ml --
del reactivo 2,4-dinitrofenilhidracina, se sacan los -
tubos del baño y se mezcla bien el contenido en cada -
tubo.
- e) Se dejan los tubos en reposo a temperatura ambiente du-
rante 20 minutos.
- f) Se agregan a cada tubo 10 ml de solución 0.4 N de NaOH
se mezcla el contenido en cada tubo por inversión del
mismo y se dejan los tubos en reposo durante 10 min.
- g) Se mide la absorbancia, usando agua como testigo. con
un espectrofotómetro a 505 nm.
- h) se obtienen las unidades de actividad a partir de las
curvas patrón respectivas. Los sueros en los cuales -
los valores exceden de los límites de las curvas han -
de diluirse con agua y ha de repetirse el análisis.
(3).

5:3 Curva de calibrado.

- a) En 5 tubos se introducen patrón de piruvato, sustrato de GOT y agua, como sigue:

Núm	ml de piruvato	ml de sustrato de GOT	ml de agua	unidades de GOT	unidades de GPT
1	0	1.00	0.2	0	0
2	0.10	0.90	0.2	24	28
3	0.20	0.80	0.2	61	57
4	0.30	0.70	0.2	114	97
5	0.40	0.60	0.2	190	150

- b) Se agrega a cada tubo 1.0 ml de solución de éinitrofenilhidracina, se mezcla bien cada contenido y se dejan los tubos en reposo 20 min, después de lo cual se agrega en cada tubo 10 ml de NaOH 0.4 N, se mezcla bien cada contenido y se dejan los tubos en reposo 10 min.
- c) Se gradúa el espectrofotómetro a absorbancia cero con un testigo de agua, a 505 nm, y se registran las absorbancias de cada uno de los tubos.
- d) Se trazan las lecturas en función de las unidades correspondientes para GOT y GPT y se unen los puntos por una línea continua. (3).

5:4 Comentarios acerca del método.

Con frecuencia no es práctico efectuar las lecturas de las muestras frente a un testigo de reactivo preparado por sustitución de agua por suero en el procedimiento, por que el testigo podría tener una absorbancia tan alta que no pueda guardarse en el espectrofotómetro con él a absorbancia cero.

No obstante habrá de introducirse un testigo de reactivo en cada operación, como comprobación de la calidad y estabilidad de los reactivos.

La lectura en éste tubo testigo ha de ser aproximadamen

te la misma en cada operación.

Aunque la reacción mide también cualquier catoácido -- endógeno del suero, el error que causa no es de importancia.

Sueros lipémicos o ictéricos pueden contribuir sustancialmente a la absorbancia final y en este caso es necesario usar un testigo de suero. La absorbancia del testigo de suero ha de restarse de la absorbancia de la muestra antes de obtener las unidades a partir de la curva de calibrado, pues esta curva no sigue la ley de Beer.

Es conveniente empezar la determinación de GOT 30 min antes que la de GPT para sincronizar el subsiguiente desarrollo de color. (3).

5:5 Valores de Referencia.

Los valores normales establecidos por el método descrito son de 8 a 40 unidades para GOT en suero y de 5 a 35 unidades para GPT en suero. (3).

6: Determinación de Colesterol Total en suero.
(Método de Abell y colaboradores)

El colesterol es un derivado alcohólico del esterano, que es un hidrocarburo saturado alicíclico constituido por cuatro anillos fusionados (3).

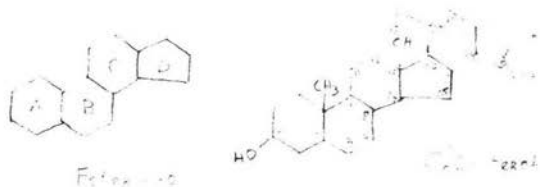


Fig. 8

La posición del OH es beta porque esta por encima del plano; esta característica lo hace insoluble en digitonina. El colesterol puro se oxida lentamente incluso a la temperatura del refrigerador, a causa de la presencia del doble en lace. (3) Fig. 8.

Aunque el colesterol es una molécula compleja puede sintetizarse en el hígado a partir de radicales simples como el acetato y acetyl Co-A. Se estima la producción en 1.5 gramos diarios en el hígado y 0.5g en tejidos extrahepáticos, desde luego que la cantidad producida se encuentra en relación con la dieta. (3).

El colesterol en circulación puede ser eliminado en forma de ácidos biliares o de sus sales. Los ácidos biliares simples pueden experimentar más modificación por condensación con glicina o con taurina para formar ácidos biliares conjugados. Los ácidos biliares además de formarse de colesterol pueden formar complejos moleculares con él y facilitan de éste modo su eliminación. Si se descompone en la vesícula biliar el complejo molecular entre ácidos biliares y colesterol; éste puede depositarse sobre algunos núcleos microscópicos y formar cálculos biliares, esto sucede en procesos infecciosos (12,13).

En el lumen intestinal, las sales biliares sirven para emulsificar las grasas ingeridas y de este modo facilitan la digestión. (12).

Se han propuesto un sin número de métodos para cuantificar colesterol y ésteres del colesterol, sin embargo casi todos tienen el mismo fundamento que se basa en la capacidad del colesterol de reaccionar con sustancias fuertemente ácidas, que separan del colesterol una molécula de agua y luego oxidan el intermedio con formación de 3,5 colestadi-

no, que posteriormente es atacado para formar el dímero -- bis-colesta-3-5-dieno y se convierte finalmente por el ácido sulfúrico en exceso en un ácido monosulfónico o disulfónico que es una molécula de color intenso (3,14).

6:1 Fundamento Químico (14).

Los esteres del colesterol presentes en suero o plasma son saponificados con KOH alcohólica. La saponificación destruye cromógenos no específicos y proteínas que pudieran interferir en la interpretación del color del producto final. El colesterol libre se extrae con eter de petróleo, y una alícuota del extracto se hace reaccionar con el reactivo de Liebermann Burchard ligeramente modificado, para dar mayor estabilidad al color formado. Fig. 9

REACCIONES DE COLOR DE COLESTEROL

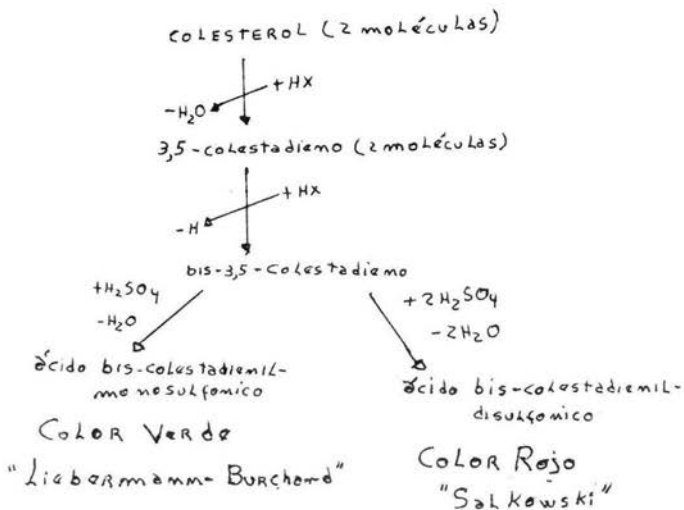


Fig. 9

6:2 Reactivos.

- a) Etanol absoluto.

Puede usarse tal como se recibe el producto de las casas comerciales.

- b) Hexano.

Puede usarse tal como se recibe.

- c) Acido acético, R.A.

- d) Acido sulfúrico, R.A.

Guardese herméticamente tapado.

- e) Hicróxico potásico, R.A.

Se prepara una solución al 33 por 100, por disolución de 10 g del sólido en forma de lentejas, en 20 ml de agua.

- f) Anhídrido acético, R.A.

- h) Solución alcohólica de KOH. Se prepara inmediatamente antes de usarla, por adición de 6 ml de la solución de KOH al 33 por 100 a 94 ml de etanol absoluto.

- i) Patrón de colesterol.

Se disuelven 200 mg de colesterol purificado en un poco de etanol absoluto tibio; se diluye ésta solución con etanol, exactamente a 100 ml.

- j) Reactivo de Liebermann-Burchard modificado.

Se enfrían a 5°C 30 volúmenes de anhídrido acético en una probeta con tapón de vidrio; a esta cantidad se agrega un volumen de ácido sulfúrico concentrado, enfriando lentamente y mezclando. Cuando la temperatura vuelve a bajar a 5°C se agregan 3 volúmenes de ácido acético glacial. A la mezcla final se agrega sulfato sódico anhidro en cantidad suficiente para tener una concentración de 2 por 100 (p/v). Este reactivo es estable a temperatura ambiente durante 2 semanas por lo --

menos. (3).

6:3 Procedimiento.

- a) Para cada muestra de suero o de plasma que va a analizarse se necesitará un tubo de centrífuga de 40 ml con tapón de vidrio. Se necesitará un tubo para testigo de reactivos y dos más para controles, uno de los cuales será incluido al comienzo de cada serie de análisis y el otro al final de la misma. En el orden que se indica, se agregan los volúmenes prescritos de los reactivos siguientes:

	T del reactivo	Estándar	Problema
solución del patrón	--	1.0	--
suero	--	---	0.5
KOH alcohólico	0.5	0.5	--
Etanol	5.0	4.0	--

- b) Se tapan los tubos, se agita bien y se incuban todos los tubos en baño de agua a 37-40°C durante 55 min. Se enfrían los tubos a temperatura ambiente.
- c) A cada tubo se agregan 10 ml de hexano, se tapan y se agitan los tubos enérgicamente durante un minuto completo por lo menos y se agregan 5 ml de agua a cada uno. Se centrifugan los tubos durante 5 minutos a 2 000 rpm aproximadamente, o hasta que se rompen las emulsiones y se separan claramente las dos capas líquidas.
- d) De cada capa de hexano (fase superior) se transfiere una porción alícuota de 4 ml a cada uno de un número igual de tubos de ensayo limpios y secos. Se evapora el disolvente en corriente suave de aire o de nitrógeno.
- e) Se colocan todos los tubos en un baño de agua a 25°C durante 5 minutos.
- f) Se introducen 6.0 ml del reactivo de liebermann-Bur--

chará modificado en el tubo testigo del reactivo; se mezcla bien y se usa este tubo para ajustar el fotómetro a cero.

- g) A intervalos de un minuto, se agregan 6.0 ml del reactivo a cada uno de los tubos restantes, mezclando bien el contenido en cada uno después de la adición del reactivo.
- h) Se dejan luego en reposo todos los tubos en el baño de agua a 25°C durante 30 minutos exactamente y después se lee la absorbancia de cada solución a 620 nm.

6:4 Cálculos (3).

$$\text{mg de colesterol/dl de suero} = \frac{A_{\text{desc.}}}{A_{\text{patrón}}} \times 2 \times \frac{100}{0.5}$$

6:5 Valores de referencia.

Adulto: 130-250 mg/100ml, lactantes 45-170 mg/100 ml en el nacimiento el valor es menor a los 10 mg/100 ml. Estos valores varían con la dieta, la edad, el sexo, la época del año, la tensión nerviosa, el ejercicio, el período de ovulación en la mujer, etc.

6:6 Comentarios acerca del método (3,14).

Este método es una ligera modificación de la versión original. Esta modificación se hizo con el fin de reducir al mínimo las fuentes de error intrínsecas provocadas por el reactivo cromogénico. Como la reacción no siempre sigue la ley de Beer, se recomienda usar patrones cuyos valores se extiendan por todo el intervalo de concentraciones esperadas.

En cuanto a la diferencia entre el método automatizado y el manual se puede decir que no es significativa.

Una lipemia moderada no afecta el método manual, pero

sí el automatizado.

La precisión en ambos métodos es de $\pm 5\%$ para concentraciones de suero en colesterol entre 100 y 400 mg/100 ml.

7: Determinación de Colesterol libre y Colesterol total en suero. (método de Zak, Dickenman White, Burnett y Cherney).

7:1 Reactivos.

a) Solución de digitonina. Se disuelve 1.0 g de digitonina en 50 ml de etanol. Se diluye la solución exactamente a 100 ml con agua.

b) Solución patrón de colesterol.

Se disuelven 100 mg de colesterol purificado en un poco de ácido acético glacial. Se diluye exactamente a 100 ml en un frasco volumétrico, con ácido acético -- glacial.

c) Solución de hierro de depósito.

Se disuelven 2.5 g de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, R.A. en 25 ml de ácido acético glacial. Se guarda en el congelador de un refrigerador hasta que se necesita. No se forma precipitado en la solución congelada, que por ello se mantiene bien.

d) Reactivo de color.

Con pipeta se introduce 1.0 ml de la solución de hierro de depósito, en un matraz volumétrico de 100 ml y se diluye hasta la marca con ácido sulfúrico concentrado R.A. haciendo girar el contenido del matraz. Toda solución en que se forme precipitado habrá de desecharse.

e) El disolvente de extracción.

Se mezclan volúmenes iguales de etanol de 95 por 100

ml y se diluye hasta la marca con ácido sulfúrico concentrado R.A. haciendo girar el contenido del matraz.- Toda solución en que se forme precipitado habrá de desecharse.

e) El disolvente de extracción.

se mezclan volúmenes iguales de etanol de 95 por 100 y acetona R.A. y se tapa herméticamente para evitar cambios de concentración por evaporación. (3).

7:2 Procedimiento.

- a) Se prepara una serie de estándar de trabajo, para lo cual se introducen con pipeta 0.1, 0.12 y 0.4 ml de la solución patrón de colesterol en tubos de ensayo correspondientes, de 30 ml. Se diluye el contenido de cada tubo a 3.0 ml con ácido acético glacial y se dejan a un lado hasta que las muestras desconocidas están listas para la adición del reactivo de color.
- b) Se prepara un testigo por introducción de 3.0 ml de ácido acético glacial en un tubo de ensayo de 30 ml que se deja con los patrones.
- c) En cada uno de tantos matraces volumétricos de 25 ml como sueros vayan a analizarse, introducir unos 10 ml del disolvente de extracción. con pipeta, gota a gota, se agrega 1.0 ml de suero a cada matraz, haciendo girar enérgicamente el contenido; se calienta hasta el punto de ebullición en baño de agua caliente. Constantemente se agitan los matraces para evitar sobreebullición explosiva, Se enfrían los matraces y se diluye el contenido exactamente hasta la marca con más disolvente de extracción.
- d) La proteína precipitada ha de estar finamente dividida para poder filtrar fácilmente el contenido de cada

- matraz, que se recoge en tubos de ensayo limpios y secos de 30 ml. Se usa papel filtro Whatman núm 41-H y cubren los embudos con vidrios de reloj para reducir la evaporación.
- e) Medir alícuotas de 2.5 ml de cada filtrado claro en los tubos de centrifuga respectivos, de 15 ml y punta cónica (para colesterol libre), y en tubos de ensayo de 30 ml (para colesterol total).
 - f) Se evaporan los contenidos de los tubos de ensayo (30 ml) a sequedad y se agregan 3.0 ml de ácido acético glacial a cada tubo para disolver el residuo de lípidos.
 - g) Se evaporan los contenidos de los tubos de centrífuga (15 ml) hasta 0.5 a 1.0 ml. Se puede facilitar la evaporación por lenta corriente de aire o de nitrógeno.
 - h) Al contenido de cada tubo de centrífuga se agrega 1.0 ml de solución de digitonina, se mezcla bien y se deja en reposo durante 30 min por lo menos.
 - i) Se centrifugan los tubos a unas 3 500 rpm durante 10 min, se decanta el sobrenadante, que se desecha y se dejan escurrir los tubos invertidos sobre papel de seda limpio durante varios minutos.
 - j) Se expelen 4.0 ml de acetona sobre cada precipitado recogido, se dispersa el precipitado con un mezclador vibratorio para lavar bien el precipitado disperso en la acetona.
 - k) Se centrifuga el precipitado lavado durante 10 min a 3 500 rpm, se decanta el sobrenadante y se vuelve a dejar que cada uno de los tubos invertidos escurran sobre un papel de seda limpio durante unos cuantos minutos.

- l) Con pipeta, se introducen en cada tubo 3.0 ml de ácido acético glacial y se calienta breve tiempo para facilitar la disolución del precipitado.
- m) A cada uno de los tubos se agregan 2.0 ml del reactivo de color, se mezcla bien y se dejan en reposo los tubos durante 20 min antes de la fotometría.
- n) Se ajusta el punto cero del fotómetro con el testigo y se lee la absorbancia del patrón y de los tubos desconocidos a 560 nm. (3).

7:3 Cálculos.

$$\text{mg de colesterol libre (o total)/dl de suero} = \frac{A_{\text{desc}} \times 25 \times 100 \times A}{A_{\text{patrón}} \times 25}$$

INTERPRETACION DE LAS PRUEBAS

1: Bilirrubina en suero.

La determinación de la bilirrubina en suero permite -- diferenciar la ictericia hepática de la hemolítica; en ictericia obstructiva asociada con carcinoma del páncreas, -- cuando la obstrucción es completa, la bilirrubina en suero alcanza valores altos; y los valores entre 20 y 30 mg por 100 ml, se encuentran en infección aguda o hepatitis tóxica (10,12).

En anemia perniciosa el nivel raramente excede de 3 mg por ciento, en anemia hemolítica crónica el incremento suele ser pequeño y sólo ocasionalmente llega a ser de 10 mg por 100 ml. Sin embargo en anemia hemolítica aguda se obtienen generalmente valores mas altos (3).

La estimación cuantitativa de bilirrubina es útil para determinar: a) Una ictericia subclínica, cuando se presentan pequeños incrementos o sea de 1.0 y 3.0 mg por 100 ml de suero. b) Ictericia clínica, muestra el desarrollo y curso de la ictericia, aporta datos confiables acerca del grado de ictericia proporcionando información de cualquier aumento o disminución que no podría obtenerse de la observación directa (16).

En la ictericia obstructiva, particularmente en la producida por la obstrucción causada por un desarrollo maligno los valores de bilirrubina son usualmente altos (16). La determinación de bilirrubina en suero es particularmente útil en ictericia reciente.

Valores elevados se presentan en niños de madres que han desarrollado anticuerpos anti Rh. En estos casos la bilirrubina se deposita en el cerebro, dando una marcada pigmentación, esto se conoce con el nombre de Kernicterus y -- causa un severo daño, que en muchos casos es fatal. Aquí la

determinación de bilirrubina proporciona los datos necesarios para decidir si se hace un cambio de sangre.

Un aumento en la fracción indirecta que representa bilirrubina no conjugada, se observa en ictericia hemolítica y en ictericia neonatal. En el recién nacido la ictericia puede ser causada por ABO o por otras incompatibilidades de grupo sanguíneo como antes se mencionó.

En hepatitis, tanto la bilirrubina conjugada como la no conjugada están aumentados en el suero. (3).

2: Transaminasas.

La determinación de la actividad de las transaminasas en suero es de gran ayuda en la clínica los datos obtenidos en el laboratorio, pueden diferenciar la ictericia hepática producida por daño celular, de la poshepática. (12).

Cuando se encuentra un valor arriba de 300 unidades por ml se sospecha de ictericia prehepática. En ictericia hepatocanalicular los niveles de GOT son parecidos a los encontrados en ictericia post-hepática, se observan valores elevados en hepatitis viral aguda (3,12).

La determinación de GOT es muy usada para reconocer entre hepatitis viral o tóxica y es por lo tanto de gran importancia en el estudio de pacientes expuestos a drogas hepatotóxicas (12).

El 60 a 70 % de pacientes cirróticos tienen altos niveles de GOT. Aproximadamente la mitad de los pacientes con carcinoma metastático tienen la GOT elevada en suero. Se encuentran niveles moderadamente elevados en pacientes con linfoma y leucemia. Un 30% de pacientes con mononucleosis infecciosa moderada muestra alteraciones en la GOT.

En hepatitis y otras formas de enfermedad hepática estarán elevados los niveles de las dos transaminasas en el -

suelo, aún antes de aparecer los síntomas clínicos.

En la mayoría de los casos el nivel de GPT es más alto que el de GOT y la razón GPT/GOT (menor que la unidad normalmente y en casos de infarto de miocardio) se hace mayor que 1.0, en especial en las últimas etapas de la enfermedad. En ictericia obstructiva el valor de GPT es más elevado que el de GOT.

3: Colesterol.

Siendo el hígado el órgano clave en la síntesis y eliminación del colesterol, cualquier tipo de enfermedad hepática o del tracto biliar habrá de afectar la concentración en plasma de las formas libre y de éster del colesterol.

En ictericia obstructiva hay un aumento desproporcionado pues el colesterol libre y ácidos biliares son eliminados normalmente por la bilis (12).

En daño del parénquima, la concentración de ésteres -- disminuirá, ya que su síntesis se verifica en el; en obstrucción aguda, el nivel en suero va de 300 a 400 mg/100 ml mientras que en la obstrucción biliar crónica da niveles al rededor de 300/100 ml. La obstrucción intrahepática tiende a producir aumento de colesterol libre y un aumento global en el nivel total puede verse en hepatitis durante el estudio temprano. En cirrosis el nivel está por debajo del normal porque esta ocurriendo una disminución de la síntesis. (3,12,13,15).

La determinación de colesterol es ampliamente usada en el diagnóstico de enfermedad hepática, sin embargo la determinación de la fracción éster no es tan frecuente.

CONCLUSIONES

En el presente estudio se describieron dos métodos para cada determinación con el fin de compararlos y de este modo poder elegir el más conveniente y aplicarlo según el caso de que se trate.

La determinación de bilirrubina en suero por el método de Malloy y Evelyn es la más práctica y de hecho la más usada en la mayoría de los laboratorios, puesto que no requiere de un equipo especializado y caro como es el caso del método automatizado sin embargo con éste último se pueden trabajar series de muestras muy pequeñas y en corto tiempo.

En la determinación de transaminasas se considera que el método más adecuado es el espectrofotométrico porque se obtienen datos más confiables. En cambio el método colorimétrico es menos exacto, más tardado y no sigue la ley de Beer.

Para la determinación de colesterol en suero todos los métodos tienen el mismo fundamento, como ya se mencionó, -- por esta razón aquí solamente se hace referencia a uno de ellos. La determinación del colesterol esterificado es muy larga y frecuentemente se obtienen valores por esto se ha considerado como el método más conveniente hasta la fecha el propuesto por Abell y Cols.

RESUMEN

Para realizar el diagnóstico de enfermedad hepática es necesario conocer antes que nada la anatomía y funcionamiento del hígado, para así comprender en que casos fisiopatológicos conviene utilizar determinada prueba.

Existe una serie de pruebas "preliminares" que son de gran utilidad porque aunque no se pueden llamar estrictamente de funcionamiento hepático, proporcionan los datos necesarios para determinar si se requiere realizar otro tipo de pruebas más elaboradas o nó, evitando así molestias al paciente.

Este tipo de pruebas son de gran utilidad tanto en el inicio del padecimiento como en sus etapas subsecuentes -- además ayudan a la diferenciación del distinto tipo de enfermedades.

Es conveniente por tanto tener una idea clara de los datos que puede proporcionar cada una de estas pruebas y -- elegir la más adecuada de acuerdo a las necesidades del paciente.

Dentro de las pruebas más frecuentemente empleadas se encuentran: la determinación de bilirrubina en suero, que -- es muy útil en el diagnóstico de ictericia; La actividad de las transaminasas GOT y GPT que aportan datos en relación al estado hepático; La determinación de colesterol libre y total en el suero esta también íntimamente relacionada con la actividad hepática.

B I B L I O G R A F I A

- 1 Gray, H.: Anatomy of the human body, Gross, vol 2, Philadelphia, 1956 pag. 1245.
- 2 Schaffer, F. y Popper, H.: Diseases of the liver. ed Schiff L. 4ta ed. 1975. USA. pag. 51, 1033.
- 3 Tietz, N.: Química clinica moderna, Ed Interamericana, 1 ra ed México 1972 pag. 770.
- 4 Schumacher, M.: Compendio de histología humana. Ed. Nacional, México 1975, pag 149.
- 5 Novikoff y Holtzman.: Estructura y dinámica celular, Ed Interamericana, México 1972, pag. 77.
- 6 Guyton, A.C.: Fisiología humana. Ed Interamericana, 4ta ed México 1975 pag. 910.
- 7 Parker, A.C.: Anatomía y fisiología. Ed Interamericana, México 1970. pag 372.
- 8 Lehnartz E.: Fisiología química. Ed Manuel Marin, Provenza 1952 pag. 38
- 9 Jinich, B.H.: El enfermo icterico. Ed Interamericana, 3ra ed, México 1970 pag. 3.
- 10 Harper, H.A.: Química fisiológica. Ed El Manual Moderno 3ra ed, México 1971 pag. 416.
- 11 Puestow, Ch.: Cirugía biliar pancreática y esplénica, Ed Interamericana, México 1972 pag. 22.
- 12 Hoffman, W.S.: Biochemistry of clinical medicine. Ed The year book publishers, USA 1955 pag. 191.
- 13 White, W.L.: Chemistry for clinical laboratory. Ed C.V. Mosby C. 4ta ed Sant Louis 1976 pag. 682.
- 14 Henry, R.J.: Clinical chemistry principles and technics, Ed Harper an Row. 2da ed, New York pag. 1043, 1435.
- 15 Amino, S.J.: Clinical chemistry principles and procedure Ed Little Brown end Company, Boston 1956 pag, 673.
- 16 Todd, y Sanford.: Clinical diagnosis by laoratory methods a working manual of clinical pathology, Philadelphia y London 1959.