UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

Carrera Química Farmacéutico Biológica

Área Bioquímica Clínica

Manual de Laboratorio
Química Clínica

Fecha de aprobación: 8 de agosto de 2025
Vigente hasta: 8 de agosto de 2028

Profesores participantes

V.2

Dra. Martha Asunción Sánchez Rodríguez

QFB María del Pilar Cedillo Martínez

M en C Ángel García Sánchez

Mtra. Carina Gutiérrez Iglesias

Dra. Mirna Ruiz Ramos

V.0 y V.1

Dra. Martha Asunción Sánchez Rodríguez

QFB María del Pilar Cedillo Martínez

M en C Ángel García Sánchez

Mtra. Carina Gutiérrez Iglesias

Dra. Mirna Ruiz Ramos

Mtro. César Octavio Jiménez Pierre

Índice

INTRODUCCIÓN 7
OBJETIVOS 8
GENERAL 8
ESPECÍFICOS 8
REGLAMENTO GENERAL DE LABORATORIOS 9
LINEAMIENTOS DEL LABORATORIO DE QUÍMICA CLÍNICA 9
CRITERIOS DE EVALUACIÓN 13
Práctica 1 14
GARANTÍA DE CALIDAD Y CONTROL DE CALIDAD INTERNO 14
1.1 Verificación del funcionamiento del espectrofotómetro 15
1.1.1 Verificación de la longitud de onda utilizando el disco de Newton 16
1.1.2 Linealidad espectrofotométrica con anaranjado de metilo 17
1.1.3 Calibración de cubetas 18
1.2 Puntos isosbésticos y uso de las pipetas 20
1.2.1 Determinación de puntos Isosbésticos del rojo de cresol 21
1.2.2 Determinación de puntos Isosbésticos del rojo Congo 21
1.2.3 Pipeteo 22
Práctica 2 24
GLUCOSA 24
2.1 Método de Glucosa Oxidasa-Peroxidasa (GOD-PAP ó Trinder) 25
2.2 Método de Glucosa Hexoquinasa 26
Práctica 3 30
PROTEÍNAS SÉRICAS 30
3.1 PROTEÍNAS TOTALES 31
MÉTODO DE BIURET 31
3.2 FRACCIONAMIENTO DE PROTEÍNAS 34
3.2.1 ALBÚMINA 35
MÉTODO DE UNIÓN A COLORANTES 35
Práctica 4 38
PERFIL DE LÍPIDOS 38
4.1 COLESTEROL TOTAL 39
MÉTODO ENZIMÁTICO. CHOD-PAP (TRINDER) 39

4.2 TRIGLICÉRIDOS 41
MÉTODO ENZIMÁTICO GPO-PAP (TRINDER) 41
4.3 HDL-COLESTEROL, LDL-COLESTEROL Y COLESTEROL-NO-HDL 43
Práctica 5 47
IONES INORGÁNICOS SÉRICOS (ELECTROLITOS) 47
5.1 SODIO Y POTASIO 48
5.2 CLORUROS 50
VALORACIÓN MERCUROMÉTRICA 50
Práctica 6 53
METABOLISMO MINERAL Y ÓSEO 53
6.1 CALCIO 55
MÉTODO DE REACCIÓN CON UN INDICADOR 55
6.2 Fosfato 57
MÉTODO COLORIMÉTRICO 57
Práctica 7 60
ELEMENTOS TRAZA 60
HIERRO SÉRICO 61
Práctica 8 64
ANÁLISIS GASOMETRICO 64
Práctica 9 68
PERFIL BIOQUÍMICO RENAL 68
9.1 UREA 69
9.1.1 MÉTODO DE BERTHELOT 70
9.1.2 MÉTODO DE O-FTALALDEHÍDO 73
9.2 ÁCIDO ÚRICO 75
MÉTODO URICASA-PAP 75
9.3 CREATININA 80
9.3.1 MÉTODO CINÉTICO DE JAFFÉ 81
9.3.2 MÉTODO TRINDER 83
Práctica 10 87
Análisis General de Orina 87
10.1 Examen físico 88
10.2 Examen químico 91
10.3 Examen de sedimento urinario 94
Práctica 11 99

PERFIL HEPÁTICO 99
BILIRRUBINAS 100
MÉTODO DE JENDRASSIK-GROF (DIAZORREACCIÓN) 100
Práctica 12 105
PERFIL ENZIMÁTICO HEPÁTICO 105
12.1 AMINOTRANSFERASAS 105
12.1.1 MÉTODO DE REITMAN-FRANKEL 106
12.1.2 MÉTODO CINÉTICO 111
ALANINA AMINOTRANSFERASA (ALT) 112
ASPARTATO AMINOTRANSFERASA (AST) 113
12.2 COLINESTERASA Y Γ-GLUTAMIL TRANSFERASA 117
12.2.1 Colinesterasa (CHE) [EC 3.1.1.8] 117
MÉTODO CINÉTICO 117
12.2.2 γ-Glutamil transferasa (GGT) [EC 2.3.2.2] 120
MÉTODO DE SZASZ 120
Práctica 13 124
PERFIL ENZIMÁTICO CARDIACO 124
13.1 CREATINA CINASA (CK) [EC 2.7.3.2] 125
MÉTODO DE ROSALKI (NAC ACTIVADO) 125
13.2 CK-MB 128
MÉTODO INMUNOLÓGICO 128
13.3 LACTATO DESHIDROGENASA (LDH) [EC 1.1.1.27] 130
MÉTODO CINÉTICO 130
13.4 LD1 O Α−HIDROXIBUTIRATO DESHIDROGENASA (HBDH) 133
MÉTODO DE ROSALKI-WILKINSON 133
Práctica 14 137
PERFIL ENZIMÁTICO PANCREÁTICO 137
Α-AMILASA (AMS) [EC 3.2.1.1] 138
MÉTODO 2-CLORO-P-NITROFENILA-D-MALTOTRIÓSIDO (CNP-G3) 138
Práctica 15 142
ENZIMAS DE PROCESOS MALIGNOS 142
15.1 LIPASA SÉRICA (LPS) [EC 3.1.1.3] 143
MÉTODO CINÉTICO-COLORIMÉTRICO 143
15.2 FOSFATASAS 148
15.2.1 FOSFATASA ALCALINA (ALP) [EC 3.1.3.1] 148

MÉTODO DE BESSEY-LOWRY-BROCK 148
15.2.2 FOSFATASA ÁCIDA (ACP) [3.1.3.2] *152*
MÉTODO DE ANDERSCH-SZCZYPYNSKI 152
Práctica 16 155
ANÁLISIS DE LÍQUIDO SEMINAL 155
16.1 EXAMEN FÍSICO 156
16.2 EXAMEN MICROSCÓPICO 157
Práctica 17 162
ANÁLISIS DE LÍQUIDO CEFALORRAQUIDEO 162
Práctica 18 167
ANÁLISIS DE HORMONAS 167
Práctica 19 170
AUTOMATIZACIÓN EN QUÍMICA CLÍNICA 170
BIBLIOGRAFÍA GENERAL 173
A N E X O 175
PREPARACIÓN DE REACTIVOS 175

INTRODUCCIÓN

Hoy en día, se considera que la Química Clínica comprende una actividad analítica central, concerniente a la composición química de materiales y elementos biológicos, como: sangre, orina, células, tejidos, órganos, secreciones, excreciones, etc., necesaria para el diagnóstico, pronóstico, tratamiento, control de tratamiento e investigaciones relacionadas con la enfermedad. Por tanto, podemos decir que es una parte esencial de la Medicina, considerándose como una extensión de la exploración física, por lo que es un apoyo fundamental para el profesional de la salud (médico, odontólogo, psicólogo).

Una de las personas encargadas de trabajar en la Química Clínica es el químico farmacéutico biólogo (QFB); por ello, con este manual se pretende preparar al alumno de QFB con orientación Bioquímica Clínica para el enfrentamiento con la realidad profesional y crearle la conciencia del importante papel que desempeña dentro del equipo de salud.

Aunque en la actualidad la mayoría de los laboratorios clínicos ya cuentan con metodologías que incluyen el uso de equipos automatizados y semiautomatizados, es importante que el químico clínico conozca los métodos manuales ya que con ello comprenderá los fundamentos de las técnicas y la interpretación clínica de las diferentes determinaciones.

Un aspecto básico para establecer la confianza del resultado de un procesamiento analítico es el control de calidad. Esta herramienta se ha convertido en un eje central para los laboratorios clínicos en los últimos años, principalmente en el estudio de la Química Clínica, por lo que este manual comienza con ese importante tema; posteriormente se encuentran las prácticas.

Otro punto importante es el reporte de los resultados. A nivel internacional cada vez es más común el uso del Sistema Internacional de Unidades (SI) para el informe de los parámetros de laboratorio, por lo cual se anexa en cada apartado el factor de conversión de unidades tradicionales a unidades SI y los valores de referencia en ambas unidades.

Se incluyen también algunos procedimientos que no pueden ser realizados en la facultad por riesgo o falta de equipo, que son tratados como seminarios, para cubrir la mayoría de las pruebas diagnósticas de Química Clínica.

Es importante resaltar que más del 90% de la bibliografía señalada en cada actividad de laboratorio es de acceso libre y puede obtenerse de las bases de datos *PubMed*, *medigraphic*, *Imbiomed* o *REDALYC*, la primera para referencias en inglés y las tres últimas en español; y toda la bibliografía general está disponible en las bibliotecas de la facultad.

Finalmente, en el anexo se encuentra la preparación de soluciones necesarias para algunos procedimientos, las cuales están identificadas con un número entre paréntesis en el apartado correspondiente.

OBJETIVOS

GENERAL

Analizar muestras biológicas llevando a cabo la medición de parámetros bioquímico-clínicos y procedimientos que no pueden llevarse a cabo en el laboratorio, interpretar los resultados y concluir sobre el uso de las diferentes determinaciones como ayuda al diagnóstico del paciente.

ESPECÍFICOS

- Organizar las actividades para llevar a cabo la ejecución de las prácticas de laboratorio.
- Identificar el fundamento de los procedimientos de las prácticas del laboratorio.
- Analizar muestras biológicas aplicando procedimientos específicos para cada determinación siguiendo las buenas prácticas de laboratorio.
- Comparar los resultados obtenidos en las determinaciones con los parámetros de referencia.
- Interpretar clínicamente los resultados obtenidos en las diferentes prácticas de parámetros bioquímico-clínicos.
- Conocer los procedimientos que no pueden realizarse en el laboratorio y discutir la interpretación de los resultados.

REGLAMENTO GENERAL DE LABORATORIOS

Los alumnos deben cumplir con lo establecido en el reglamento general de laboratorios de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza aprobado por el H. Consejo Técnico disponible en la dirección https://www.zaragoza.unam.mx/wp-content/2023/Reglamentos/reglamento_general_laboratorios_FESZ.pdf, además hacer caso a los lineamientos siguientes:

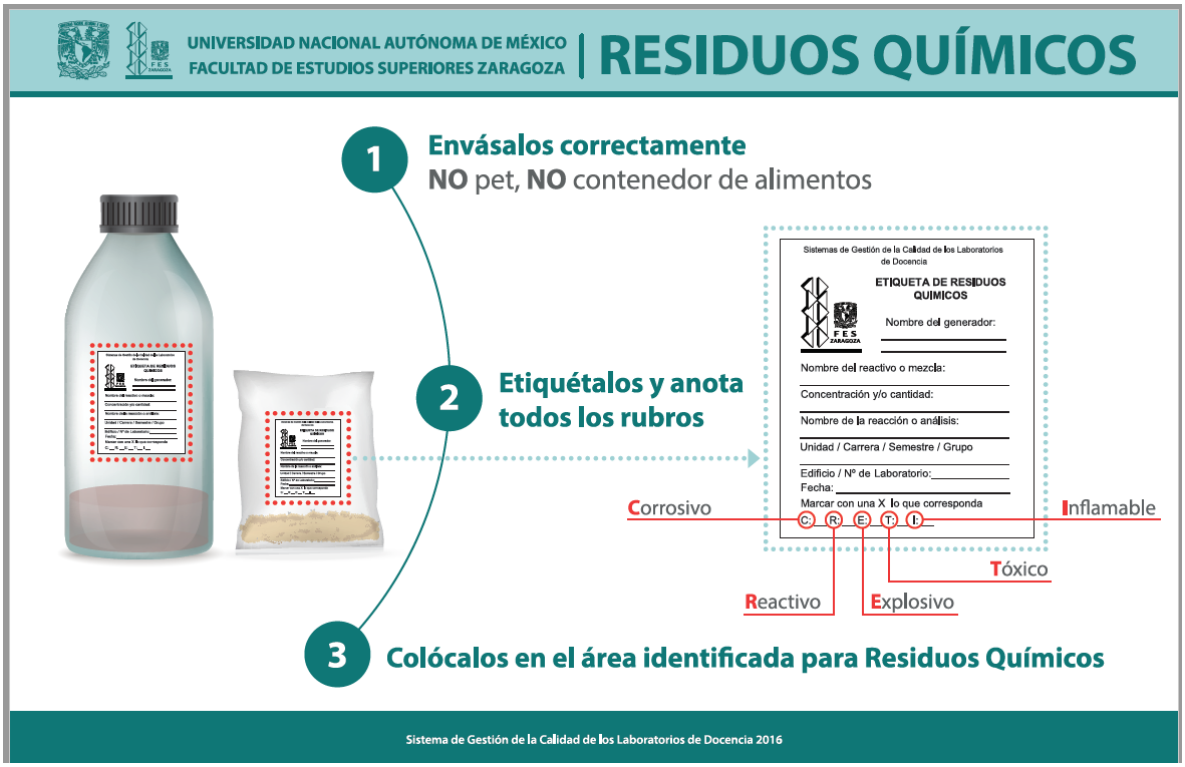
LINEAMIENTOS DEL LABORATORIO DE QUÍMICA CLÍNICA

1. Todos los usuarios del laboratorio deberán seguir el presente reglamento.
2. Sólo se permitirá trabajar en el laboratorio con bata blanca de algodón con manga larga, limpia y cerrada, y zapatos cerrados.
3. Lo(a)s profesor(e/a)s y lo(a)s alumno(a)s deben conservar el orden y la disciplina durante la práctica.
4. Lo(a)s alumno(a)s deberán trabajar en el laboratorio siempre con la presencia de al menos un(a) profesor(a).
5. Para el desarrollo de las prácticas deberán emplearse guantes de látex o nitrilo.
6. En el caso de tener el cabello largo, éste debe estar recogido para que no interfiera con el desempeño de las actividades del laboratorio.
7. Las superficies de trabajo deben ser limpiadas antes y después de una sesión de trabajo e inmediatamente después de algún derrame de material líquido.
8. Lo(a)s usuario(a)s deberán lavarse las manos al salir del laboratorio.
9. Lo(a)s usuario(a)s del laboratorio deberán mantenerlo limpio y lavar todo el material utilizado antes de retirarse del laboratorio.
10. Lo(a)s usuario(a)s del laboratorio deberán de notificar de forma inmediata al responsable en turno, si algún aparato falla o si ocurre alguna contingencia.
11. No se permite tomar con la pipeta con la boca ningún líquido.
12. Está prohibido ingerir alimentos, bebidas y/o golosinas en el laboratorio.
13. Está prohibido fumar dentro del laboratorio.
14. El tiempo de permanencia en el laboratorio no debe exceder del fijado en su horario de práctica.
15. No se permite recibir visitas en el horario de la práctica.
16. Se prohíbe utilizar radio, audífonos y MP3 durante el horario de desarrollo de la práctica.
17. Se prohíbe el uso del celular dentro del laboratorio. Si por alguna razón debe hablar o contentar una llamada, deberá salir un momento del laboratorio solicitando permiso al profesor(a).

18. Lo(a)s usuario(a)s del laboratorio deberán seguir las normas de seguridad e higiene para el control de los residuos generados que se encuentran especificadas en cada práctica de este manual.
19. Evitar salir del laboratorio durante las sesiones, si es necesario, se deberá avisar al profesor(a).

Esquema de manejo de residuos de acuerdo con la NOM-087-SEMARNAT-SSA1-2002 y el Procedimiento SGC-FESZ-PO06. Procedimiento de manejo de residuos generados en los laboratorios de docencia

Esquema de manejo de residuos químicos de acuerdo con el Procedimiento SGC-FESZ-PO06. Procedimiento de manejo de residuos generados en los laboratorios de docencia



REQUISITOS LEGALES Y REGLAMENTARIOS APLICABLES

- PROY-NOM-007-SSA3-2017. Para la organización y funcionamiento de los laboratorios clínicos.
- NOM-087-SEMARNAT-SSA1-2002. Protección ambiental. Salud ambiental. Residuos peligrosos biológico infecciosos. Clasificación y especificaciones de manejo.
- NOM-052-SEMARNAT-2005. Que establece las características, el procedimiento de identificación, clasificación y los listados de los residuos peligrosos.

CRITERIOS DE EVALUACIÓN

El módulo de Química Clínica consta de una parte teórica y una práctica. Al ser complementarios, para la evaluación total corresponde el 50% a cada una, debiendo ser aprobatorias ambas partes.

Para acreditar el laboratorio es necesario cubrir el 80% de asistencia a las sesiones programadas[a] y cumplir con los siguientes criterios:

Criterio	Porcentaje
Participación en seminarios*	40%
Exámenes previos[†]	20%
Exámenes de unidad[‡]	40%
Entrega de reportes	Obligatorio sin porcentaje

*Se deben tener al menos dos participaciones por seminario.

[†]Si el promedio en los exámenes previos es ≥8, se exenta el examen de unidad y ese promedio es la calificación que corresponde a la unidad.

[‡]Los exámenes de unidad deben ser aprobatorios con una calificación mínima de 6. Si no se obtiene calificación aprobatoria, se debe presentar el examen de reposición correspondiente en el periodo de ordinario A. Se presentan todas las unidades no aprobadas. Si las 3 unidades no son aprobadas en los exámenes parciales correspondientes, se presenta cada una de ellas por separado. No se aplica un examen global en el componente de laboratorio. Si no se aprueban las unidades, automáticamente se reprueba el laboratorio y por consiguiente el módulo.

[a]Se tiene un tiempo de tolerancia de 10 min. para cada sesión de laboratorio, después del cual no se considerará asistencia, a menos que sea por causa de fuerza mayor. Las faltas a las sesiones de laboratorio pueden ser justificadas, siempre y cuando sean por cuestión médica o cualquier razón no controlada que los profesores consideren. Para justificar una falta, deberá comentarse con los profesores responsables de la sección cuál fue la situación en la sesión siguiente a la falta. La asistencia después del pase de lista y dentro de la tolerancia se considerará retardo, tres retardos equivalen a una falta que se contabilizará para el porcentaje de asistencias.

Nota: Los cuestionarios de cada práctica son una guía para los exámenes, tanto previos como de unidad, cuyas preguntas pueden ser incluidas en los exámenes.

Práctica 1

GARANTÍA DE CALIDAD Y CONTROL DE CALIDAD INTERNO

La relación de los servicios de medicina clínica y los de laboratorio clínico, no puede restringirse únicamente a la solicitud de exámenes por parte de unos, y a la toma de muestras y análisis de los especímenes de los otros. El laboratorio clínico no es una fábrica de bioanálisis, en él, los informes de las mediciones deben evaluarse, correlacionarse entre sí, conocer el valor de las estadísticas, de su variación, la sensibilidad y especificidad de los métodos; todo esto con fines interpretativos adecuados y garantizando la confianza en ellos.

En este sentido, actualmente se habla de garantía de calidad en los laboratorios clínicos, la cual comprende un programa total de normas y procedimientos que asegura de manera continua que los servicios, productos o resultados son confiables, pertinentes y oportunos. Los componentes básicos de los sistemas de garantía de calidad son: control de calidad interno, evaluación externa del desempeño, trazabilidad, auditorias, educación continuada, bioseguridad, mantenimiento de equipos e infraestructura y documentación de todo lo anterior, entre otros, y está regulado a través de la NOM-007-SSA3-2011.

Se define como control de calidad Interno al conjunto de acciones que se aplican durante la ejecución de cada prueba para asegurar que los resultados, productos o servicios pueden ser entregados, y que el médico y el paciente obtengan una información correcta en el menor tiempo posible. Es considerado un problema multifacético que va más allá de la inclusión de materiales con valores conocidos en cada una de las pruebas que se efectúan en el laboratorio, ya que abarca desde las instrucciones a los pacientes y toma de muestras hasta la entrega de los resultados.

La parte del control de calidad interno en la que haremos más énfasis en este manual es la llamada analítica o examen, que es la fase en la que se realizan las mediciones y observaciones de los especímenes.

1.1 VERIFICACIÓN DEL FUNCIONAMIENTO DEL ESPECTROFOTÓMETRO

Objetivos

– Aprender a verificar el funcionamiento del espectrofotómetro, que es el instrumento de trabajo diario en el laboratorio de análisis clínicos.
– Conocer el funcionamiento y la manera de detectar problemas en el espectrofotómetro.

Introducción

En el trabajo diario en el laboratorio de análisis clínicos, es conocido que la mayoría de las mediciones químicas se realizan a través de la cantidad de energía radiante absorbida por una solución; para ello utilizamos el espectrofotómetro, ya sea como instrumento único o integrado a un equipo automatizado o semiautomatizado. De aquí que sea de suma importancia su mantenimiento y verificación de funcionalidad.

El tener un espectrofotómetro en mal estado implica entregar resultados erróneos para un paciente, por ello debe verificarse que emite las longitudes de onda adecuadas desde el momento de la compra y consecuentemente al usarse, considerando la vida de la lámpara, llevando un mantenimiento preventivo, etc.

En la actualidad, ya no es posible que nosotros calibremos los equipos, pues son sistemas cerrados, pero si es factible verificar el funcionamiento, aunque sean equipos semiautomatizados con fotocolorímetros de filtros, y así hacer el reporte de las desviaciones para su compostura.

Por procedimientos muy simples y poco costosos, es posible revisar el funcionamiento del aparato. Cabe mencionar, que no son métodos muy modernos ni muy exactos, pero nos dan una muy buena idea de cómo se encuentran, siendo entonces posible detectar los principales problemas que pueden ocurrir al mismo.

Material y reactivos

- Hoja de papel blanco
- Soluciones de anaranjado de metilo en concentraciones de: 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 y 1.0 mg/dL…….. (1-6)
- Tubos de ensayo de 13X100 mm
- Celdas para espectrofotómetro

Equipo

- Espectrofotómetro

Servicios

- Energía eléctrica

- Agua

1.1.1 Verificación de la longitud de onda utilizando el disco de Newton

Técnica

Sólo es aplicable a espectrofotómetros de barrido.

Hacer una tira de papel blanco de un tamaño que entre en la celda del espectrofotómetro y barrer el espectro a partir de la menor longitud de onda a la mayor. Colocar el ojo en la celda, de tal manera que se pueda ver el color de la luz reflejada en el papel, si es necesario, tape la luz externa lo más que pueda para observar la luz. Observar que coincidan los colores con la longitud de onda marcada en el centro de cada color de acuerdo con el disco (Figura 1).

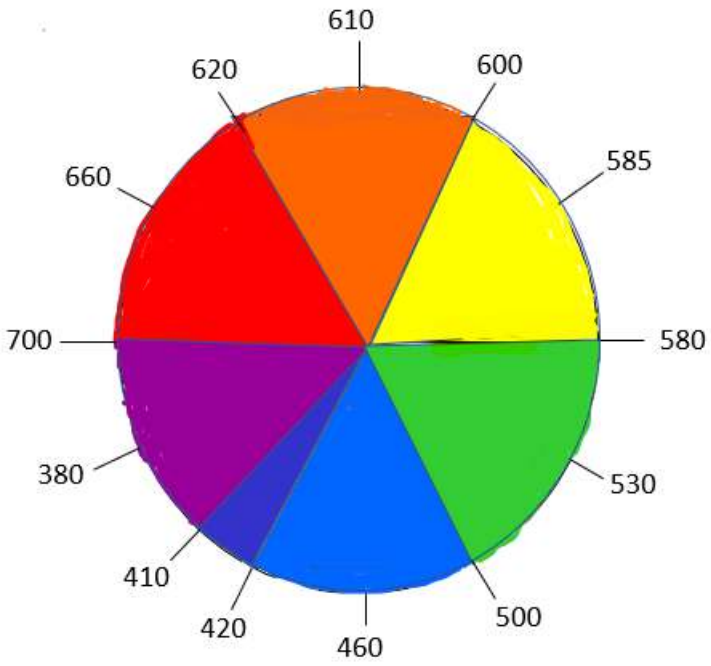


Figura 1. Representación del disco de Newton para verificación de la longitud de onda. Los puntos marcados son los valores de la longitud de onda en nm.

1.1.2 Linealidad espectrofotométrica con anaranjado de metilo

Fundamento

El anaranjado de metilo en diferentes concentraciones proporciona una curva que cumple exactamente con la Ley de Lambert-Beer proporcionando una línea recta perfecta.

Técnica

Medir las absorciones de las soluciones de anaranjado de metilo a las concentraciones: 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 y 1.0 mg/dL, a 465 nm.

1.1.3 Calibración de cubetas

Hoy en día, el precio de las cubetas o celdas ha aumentado considerablemente, por lo que se hace necesario calibrar nuestros tubos para poder emplearlos como celdas. Esto es posible si los tubos son de marca conocida (Pyrex o Kimax) y nuevos, ya que aseguran las paredes lisas y un cristal homogéneo.

Técnica

Llenar una celda con agua destilada y ajustar a 0 de absorción a 585 nm, después llevar la escala del espectrofotómetro al 50% de transmisión. Colocar el tubo seleccionado, también con agua destilada en el portacubetas, y tomar la lectura, la cual no deberá variar más que en ± 1%. Si varía más, rote el tubo hasta que obtenga la variación mínima. Marcar los tubos en la variación mínima y tratarlos como celdas posteriormente.

Resultados: Construir una gráfica de absorción vs. concentración de anaranjado de metilo en papel milimétrico y calcular la regresión para verificar la línea perfecta (valor r = 0.999). Hacer un cuadro en donde se muestre el color observado en la luz y la longitud de onda seleccionada en el espectro.

Seminario: ESPECTROFOTOMETRÍA

Cuestionario

1. ¿Qué importancia tiene conocer el disco de Newton en espectrofotometría?
2. ¿Cuál es el fundamento de la ley de Lambert-Beer?
3. Haga el esquema de un espectrofotómetro simple y señale sus principales partes.
4. Defina qué es:
   - Linealidad espectrofotométrica
   - Curva de calibración

- Luz monocromática
- Ancho de banda
- Luz extraña, espuria o parásita

5. ¿Cómo se verifica la exactitud y linealidad fotométrica en un equipo automatizado?

Bibliografía

- Pum J. A practical guide to validation and verification of analytical methods in the clinical laboratory. Adv Clin Chem. 2019; 90: 215-281. doi: 10.1016/bs.acc.2019.01.006.
- Duymovich C, Acheme R, Sesini S, Mazziotta D. Espectrofotómetros y fotocolorímetros. Guía práctica de actualización. Acta Bioquím Clín Latinoam 2005; 39(4): 529-39.
- Meltzer R. Absorbance nonlinearity resulting from stray light: quanty the effect. Clin Chem 1992; 38: 1027.
- Murali-Dharan M S. Control de calidad en los laboratorios clínicos. España: Reverté; 1992.
- Alva S, Benito M C, Cabañas E, Pizano F. Programa de evaluación de la calidad entre laboratorios. I Diagnóstico del funcionamiento de fotómetros. Laborat-acta 1991; 3(2): 17-19.
- Federación Internacional de Química Clínica. Pauta provisional (1979) de lista de especificaciones de espectrofotómetros en química clínica. Bioquimia 1981; 3: 748-52.
- Frigs Ch, Broussard L. Calibration and monitoring of spectrometers and spectrophotometers. Clin Chem 1979; 25: 1013-7.

Manejo de residuos

En las actividades de esta parte de la práctica no se generan residuos peligrosos, sin embargo, y en apego al Sistema de Gestión de Calidad (SGC) de la FES Zaragoza, procedimiento SGC-FESZ-PO06, los residuos químicos deberán ser depositados en un envase plástico de capacidad no mayor de 5 litros identificado con la etiqueta oficial del SGC para este tipo de desechos y colocado en la zona amarilla marcada para tal fin en el laboratorio. El envase será recolectado por el Departamento encargado de acuerdo con un calendario previamente elaborado por el Coordinador del Área.

1.2 PUNTOS ISOSBÉSTICOS Y USO DE LAS PIPETAS

Objetivos

- Determinar el uso de los puntos isosbésticos para la verificación de la longitud de onda espectrofotométrica.
- Calcular la precisión de la medición con pipetas serológicas de cada alumno.

Introducción

Continuando con la verificación del correcto funcionamiento del espectrofotómetro, también se puede hacer uso de los puntos isosbésticos para verificación de la longitud de onda. Los puntos isosbésticos permiten encontrar una concordancia entre la longitud de onda que indica el selector del espectrofotómetro y la longitud de onda de referencia.

Otra herramienta importante para el trabajo analítico es el material de laboratorio que cumple con funciones primarias de contención, medición y realización de reacciones. Los utensilios más utilizados están construidos en vidrio, aunque hay muchos, actualmente, en una variedad de plásticos.

Existen muchas variedades de material de vidrio disponible comercialmente que varían en su resistencia a la tracción, el calor y la luz. Dado que los vidrios blandos no son recomendables para el laboratorio, la mayor parte de los utensilios están construidos en vidrio de borosilicato.

Así mismo, en la mayoría de los métodos de Química Clínica se requieren mediciones de volumen exactas. En el trabajo de precisión nunca es seguro suponer que el volumen contenido o extraído de un material de medición es exactamente el indicado por la marca de graduación. Idealmente todo material volumétrico habrá de compararse con un certificado de calibrado o ser calibrado por un analista.

Dentro del material volumétrico más empleado en los análisis clínicos están las pipetas, instrumentos de vidrio, plástico o pistón empleados para dispensar, contener y medir volúmenes. Siendo éstas de suma importancia en los análisis químicos, es necesario que sepamos emplearlas correctamente ya que es una herramienta en el trabajo cotidiano.

Material y reactivos

- 10 tubos de ensayo de 18X150 mm
- 3 tubos de ensayo de 13X100 mm
- 1 pipeta graduada de 10 mL
- 1 pipeta graduada de 1 mL

- Solución madre de rojo de cresol al 1%..... (7)
- Solución de rojo Congo 14 mg/L……(8)
- Solución de dicromato de potasio al 10%.....(9)

Equipo

- Espectrofotómetro

Servicios

- Energía eléctrica
- Agua

1.2.1 Determinación de puntos Isosbésticos del rojo de cresol

Fundamento

El rojo de cresol (o-cresolsulfonftaleína) es un indicador de pH muy sensible que tiene dos virajes de color: uno de pH 0.0 a 1.0 (rojo a amarillo) y otro de pH 7.0 a 8.8 (amarillo a púrpura). Esto significa que su espectro en la región visible es diferente en solución ácida o alcalina y en el intervalo de pH de 1.0 a 7.0.

Técnica

Preparar tres diluciones a partir de la solución madre de rojo de cresol para obtener una concentración de 0.0005% del colorante en medio ácido, alcalino y a pH 4.0 como sigue:

Añadir 100µL de la solución madre a:

- 100 mL de ácido sulfúrico (500 mmol/L)……(10)
- 100 mL de hidróxido de sodio (500 mmol/L)……(11)
- 100 mL de solución amortiguadora pH 4.0.

Las soluciones ácida y básica sólo son estables por 1 hora.

Medir la absorción de cada solución contra blanco de agua en el espectrofotómetro variando la longitud de onda a intervalos de 20 nm desde 360 hasta 700 nm.

Resultados: Realizar las gráficas de absorción contra longitud de onda para cada solución en un mismo papel milimétrico.

1.2.2 Determinación de puntos Isosbésticos del rojo Congo

Fundamento

El rojo Congo tiene la particularidad de que los espectros de las formas ácida y básica en igual concentración presentan la misma absorción a una longitud de onda denominada punto isosbéstico.

Técnica

Preparar dos disoluciones a partir de la solución de rojo Congo, una ácida y otra alcalina:

Añadir 5 mL de la solución de rojo Congo a un tubo A (ácido) y tubo B (alcalino). Las soluciones son estables 1 hora.

- Al tubo A agregarle 20 μL de ácido clorhídrico 5N……(12)
- Al tubo B añadirle 20 μL de hidróxido de sodio 5N……(13)

Ajustar el espectrofotómetro con blanco de agua a 520 nm. Medir la absorción de cada solución en el espectrofotómetro a las siguientes longitudes de onda: 520, 525, 530, 535, después variando un nm hasta 545, 550, 560, 570 nm, sin volver a ajustar a 0.

Cálculos: obtener el corrimiento que presenta el instrumento de la siguiente manera:

$$Corrimiento\ (nm) = p.isosbéstico\ encontrado - p.isosbéstico\ teórico$$

Resultados: Realizar las gráficas de absorción contra longitud de onda para cada solución en un mismo papel milimétrico. El punto isosbéstico teórico en las condiciones de experimentación es 541 nm. Determinar si existe corrimiento.

Interpretación

Intervalo óptimo: Corrimiento entre ± 2 nm

Límites de aceptabilidad: Corrimiento entre ± 3 nm

1.2.3 Pipeteo

Técnica

Diluir la solución madre de dicromato de potasio 1:50 con agua destilada 10 veces por persona en tubos por separado. Usar para ello pipetas de 10 mL y de 1.0 mL. Mezclar cuidadosamente cada tubo y leer contra blanco de agua a 507 nm.

**NOTA*: Si derrama algo de solución, limpie inmediatamente con abundante agua.

Resultados: Calcular: media, desviación estándar y coeficiente de variación para cada analista.

Interpretación

Precisión óptima: %CV < 5%

Precisión aceptable: %CV 5 – 10%

Seminario: TIPO Y USO DE LAS PIPETAS

Cuestionario

1. ¿Por qué los puntos isosbésticos permiten verifican el corrimiento de la longitud de onda de un espectrofotómetro? Explique su respuesta.
2. Diga cuál es la diferencia entre una pipeta Mohr y una serológica.
3. Describa como se realiza la medición con una pipeta de vidrio y con una de pistón.
4. Describa de qué forma se pueden calibrar las pipetas de pistón.
5. Defina que es exactitud y que es precisión.

Bibliografía

- Pum J. A practical guide to validation and verification of analytical methods in the clinical laboratory. Adv Clin Chem. 2019; 90: 215-81. doi: 10.1016/bs.acc.2019.01.006
- CENAM-EMA. Guía técnica sobre trazabilidad e incertidumbre en los servicios de calibración de recipientes volumétricos por el método gravimétrico. México: 2009. Disponible en: http://s3.amazonaws.com/academia.edu.documents/36565923/_pdf_calibracion_CALIBRACION.pdf?AWSAccessKeyId=AKIAJ56TQJRTWSMTNPEA&Expires=1483480962&Signature=1kWH%2FLwCPpYuqC6DGgW8N%2FNDOQ4%3D&response-content-disposition=inline%3B%20filename%3DGuia_GUIA_TECNICA_SOBRE_TRAZABILIDAD_E_I.pdf.
- Duymovich C, Acheme R, Sesini S, Mazziotta D. Espectrofotómetros y fotocolorímetros. Guía práctica de actualización. Acta Bioquím Clín Latinoam 2005; 39(4): 529-39.
- Trujillo-Juárez S, Morales-Estrada AI. Variación de los resultados de medición de volumen en las pipetas de pistón respecto de las condiciones de uso de la punta desechable y la humedad del ambiente. Simposio de Metrología 2004, 25 al 27 de octubre. Disponible en: http://www.cenam.mx/fyv/publicaciones/ta-064.pdf
- Alva-Estrada S, Uhtthoff-Brito EC, Fuentes-Mancilla LM, Cabañas-Cortés EM. Programa de evaluación de la calidad entre laboratorios. XX. Verificación del uso y funcionamiento de micropipetas. Lab-acta 1998; 10: 115-8.

Manejo de residuos

A pesar de que en las actividades de esta parte de la práctica se utilizan soluciones fuertemente ácidas y básicas, los residuos pueden ser neutralizados por dilución. En apego al Sistema de Gestión de Calidad (SGC) de la FES Zaragoza (SGC-FESZ-PO06), estos residuos químicos deberán ser depositados en un envase plástico de

capacidad no mayor de 5 litros identificado con la etiqueta oficial del SGC para este tipo de desechos, agregándole aproximadamente 100 mL de agua corriente. El recipiente debe estar colocado en la zona amarilla marcada para tal fin en el laboratorio. El envase será recolectado por el Departamento encargado de acuerdo con un calendario previamente elaborado por el Coordinador del Área.

Práctica 2

GLUCOSA

Objetivos

- Cuantificar la concentración de glucosa en una muestra biológica por un método enzimático.
- Interpretar el resultado en un contexto clínico.

Introducción

La concentración de glucosa es uniforme en la fase acuosa del plasma y eritrocitos. El plasma contiene aproximadamente 12% más agua que la sangre completa, de aquí se deduce que la cantidad total de glucosa en 100 mL de plasma es aproximadamente 12% menor que en 100 mL de sangre completa.

Es importante tomar en cuenta que la concentración de glucosa varía en el eritrocito, la sangre completa y el plasma, por ello se ha decidido convencionalmente que las determinaciones de glucosa se realicen en plasma o suero, para evitar confusiones de interpretación clínica debido a la discrepancia de los valores. Así mismo, la sangre posee componentes reductores, como los compuestos sulfhidrílicos, glutationa y ergotioneína que se encuentran en los eritrocitos, incrementando con algunos métodos el valor total de glucosa en sangre completa en aproximadamente 20 mg/dL sobre el valor "real".

Antiguamente las determinaciones se hacían por métodos químicos, pero ninguno era específico para la glucosa; por lo que se desarrollaron nuevas tecnologías en donde el empleo de enzimas es un procedimiento alternativo para conseguir una mayor especificidad.

Se utilizan dos enzimas específicas para la determinación de glucosa, la glucosa oxidasa y la glucosa hexoquinasa

Obviamente, estos métodos son comerciales, pues es necesario que la enzima esté purificada para que se pueda efectuar la reacción, además de que son metodologías que incluyen una cadena de reacciones acopladas para obtener, finalmente, un producto que sea fácilmente leíble en el espectrofotómetro.

La determinación de la glucosa sanguínea es un parámetro básico en la clínica, de tal forma que es el componente de la química sanguínea que más se procesa en los laboratorios clínicos, ya que el médico y el odontólogo lo solicitan por diferentes

circunstancias como conocer el estado de salud de un paciente, control de embarazo, control de diabetes, parte de los prequirúrgicos, etc.

2.1 MÉTODO DE GLUCOSA OXIDASA-PEROXIDASA (GOD-PAP Ó TRINDER)

Esta enzima fue descubierta por Müller en 1928 y es específica para β-D-glucosa. En el organismo la glucosa se encuentra de forma α en un 36% y de forma β en un 64% y se conoce que la GOD sólo reacciona con la forma β; por ello, la oxidación de la glucosa sanguínea requiere de una mutorrotación de la forma α a la β para hacer una cuantificación total. Algunos preparados comerciales de GOD contienen una enzima mutorrotasa que acelera la reacción. Este método se ha adaptado a equipos automatizados con mucho éxito.

Fundamento y reacción:

La glucosa oxidasa (GOD) oxida a la glucosa según la reacción:

$$\beta\text{-glucosa} + O_2 \xrightarrow{\text{GOD}} \beta\text{-glucono-}\delta\text{-lactona} + H_2O_2$$

$$H_2O_2 + \text{4-amino-fenazona (PAP)} + \text{Fenol} \xrightarrow{\text{Peroxidasa}} \text{4-(benzoquinona-monoimino) fenazona (Quinonaimina)}$$

Figura 2. Reacción de determinación de glucosa por el método de GOD-PAP. Tomado de: Pesce y Kaplan 1990.

Material y reactivos

- Suero, plasma o cualquier líquido biológico.
- Estuche comercial para la determinación de glucosa por este método.

Equipo

- Espectrofotómetro

Servicios

- Energía eléctrica
- Agua

Técnica

Debido a que el procedimiento es dependiente del estuche comercial que se tenga para la práctica, la metodología no será incluida. Debe seguirse al pie de la letra el procedimiento especificado y tomar en cuenta si existen notas aclaratorias.

**NOTA:* Generalmente los procedimientos son microtécnicas, por lo cual el volumen final es de 500 o 1000 μL, tomar en cuenta esto, pues las celdas del Spectronic 20 necesita un volumen mínimo de 2.5 mL, lo que hace necesario que se dupliquen o tripliquen las cantidades equivalentemente.

Cálculos: los indicados en el procedimiento del estuche utilizado.

Factores de conversión: $\frac{mmol}{L} = \frac{mg}{dL} X 0.055$

$$\frac{mg}{dL} = \frac{mmol}{L} X 18.02$$

Valores de referencia

Muestra	Tradicional	SI
Sangre total, suero o plasma	50 – 100 mg/dL	2.8 – 5.6 mmol/L
LCR (lumbar)	45 – 70 mg/dL	2.5 – 3.9 mmol/L
Orina	Hasta 30 mg/dL	Hasta 1.7 mmol/L

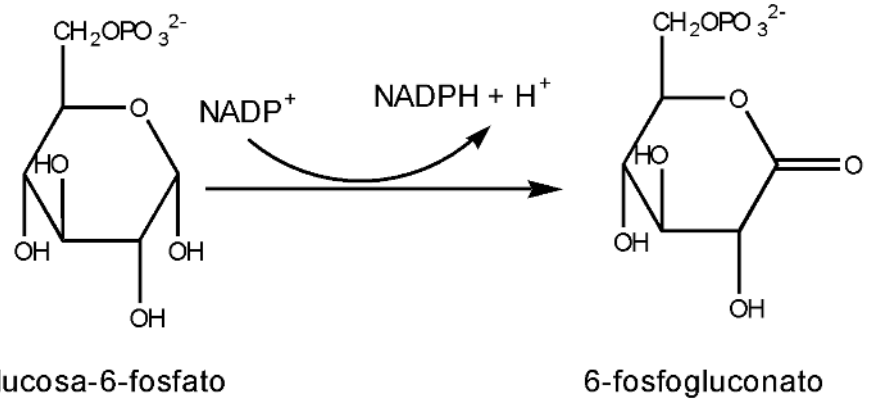
2.2 MÉTODO DE GLUCOSA HEXOQUINASA

Este procedimiento habitualmente se ha empleado para la determinación de glucosa en sangre, orina y líquido cefalorraquídeo y da resultados que coinciden excelentemente con las técnicas con base en Glucosa-oxidasa. Este se ha adaptado también a equipos automatizados. Es el método considerado como de referencia, aunque no tan popular como el GOD-PAP porque su medición es en UV.

Fundamento

La *hexoquinasa (HK)* cataliza la fosforilación de la glucosa por el trifosfato de adenosina (ATP) para formar glucosa-6-fosfato (G-6-PO_4) y difosfato de adenosina (ADP). Una segunda enzima, la *glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G-6-PD*), cataliza la oxidación de glucosa-6-fosfato por el dinucleótido de nicotinamida-adenina-fosfatada ($NADP^+$) para formar el compuesto reducido NADPH. El aumento de la absorción del NADPH se mide a 340 nm, el cual es directamente proporcional a la concentración de glucosa en la muestra.

Reacción:



Glucosa-6-fosfato 6-fosfogluconato

Figura 3. Reacción de determinación de glucosa por el sistema glucosa hexocinasa. Tomado de: Newsholme y Leech, 1987.

Material y reactivos

- Suero, plasma o cualquier líquido biológico.
- Estuche comercial para la determinación de glucosa por este método.

Equipo

- Espectrofotómetro

Servicios

- Energía eléctrica
- Agua

Técnica

Este procedimiento también es dependiente del estuche comercial disponible, por lo que se recomienda seguir al pie de la letra el que se emplee.

Cálculos: los indicados en el manual de procedimientos de acuerdo con el estuche utilizado.

Valores de referencia y factores de conversión: igual al método anterior.

Resultados: Obtener el resultado de la concentración de la muestra analizada e indicar si el valor se encuentra dentro de rango normal o patológico.

***Seminario:* DIABETES MELLITUS**

Cuestionario

1. Mencione brevemente el mecanismo por el cual la insulina introduce la glucosa a las células. Puede ayudarse de un esquema.
2. ¿En qué padecimientos se encuentran alterados (aumentados y disminuidos) los valores de glucosa?
3. Diga brevemente cual es la fisiopatogenia de la diabetes mellitus y sus complicaciones.
4. ¿Qué exámenes de laboratorio deben utilizarse para el seguimiento del paciente diabético?
5. ¿Qué es el síndrome metabólico y cómo se diagnostica?

Bibliografía

- Gallardo Jiménez P, Martín-Carmona J, Lorenzo Hernández E. Diabetes mellitus. Medicine. 2020; 13(16): 883-90.
- Nisar O, Pervez H, Mandalia B, Waqas M, Sra HK. Type 3 diabetes mellitus: a link between Alzheimer's disease and type 2 diabetes mellitus. Cureus. 2020; 12(11): e11703. doi: 10.7759/cureus.11703.
- Nguyen TT, Ta QTH, Nguyen TKO, Nguyen TTD, Giau VV. Type 3 diabetes and its role implications in Alzheimer's disease. Int J Mol Sci. 2020; 21: 3165. doi: 10.3390/ijms21093165
- Zendjabil M. Glycated albumin. Clin Chim Acta. 2020; 502: 240-4. doi: 10.1016/j.cca.2019.11.007.
- Zeng Y, He H, Zhou J, Zhang M, Huang H, An Z. The association and discordance between glycated hemoglobin A1c and glycated albumin, assessed using a blend of multiple linear regression and random forest regression. Clin Chim Acta. 2020; 506: 44-9. doi: 10.1016/j.cca.2020.03.019.
- Petersmann A, Müller-Wieland D, Müller UA, Landgraf R, Nauck M, Freckmann G, et al. Definition, classification and diagnosis of diabetes mellitus. Exp Clin Endocrinol Diabetes. 2019; 127(S 01): S1-S7. doi: 10.1055/a-1018-9078.

- Roden M, Shulman GI. The integrative biology of type 2 diabetes. Nature. 2019; 576: 51-60. doi: 10.1038/s41586-019-1797-8.
- Diario Oficial de la Federación. Proyecto NOM-015-SSA2-2018. Para la prevención, tratamiento y control de la diabetes. 03 de mayo de 2018.
- American Diabetes Association. 2. Classification and diagnosis of diabetes. Diabetes Care 2017; 40(Suppl. 1): S11-S24. doi: 10.2337/dc17-S005
- Lipska KJ, Krumholz HM. Is hemoglobin A1c the right outcome for studies of diabetes? JAMA. 2017; 317(10): 1017-8. doi: 10.1001/jama.2017.0029.
- Kumar R, Nandhini LP, Kamalanathan S, Sahoo J, Vivekanadan M. Evidence for current diagnostic criteria of diabetes mellitus. World J Diabetes 2016; 7(17): 396-405. doi: 10.4239/wjd.v7.i17.396.
- Pajvani UB, Accili D. The new biology of diabetes. Diabetologia 2015; 58(11): 2459-68. doi: 10.1007/s00125-015-3722-5.
- Hernández-Ávila M, Gutiérrez JP, Reynoso-Noverón N. Diabetes mellitus en México. El estado de la epidemia. Salud Publica Mex. 2013; 55 supl2: S129-S136.
- Task Force on Diabetes and Cardiovascular Diseases of European Society of Cardiology (ESC) and European Association for the study of Diabetes (EASD). Guidelines of diabetes, pre-diabetes, and cardiovascular diseases: full text. Eur Heart J 2007. doi:10.1043/eurheartj/eh1260.
- Guzmán-Juárez N, Madrigal-Bujaidar E. Revisión de las características clínicas, metabólicas y genéticas de la diabetes mellitus. Bioquimia 2003; 28(2): 14-23.
- Islas-Andrade SA, Revilla-Monsalve C, García-Alcalá H. Diabetes mellitus. Enfoques fisiopatológicos modernos para una epidemia mundial. Med Int Mex 2001; 17: 163-8.

Manejo de residuos

Debido a que se manejan muestras biológicas y reactivos químicos, los residuos deben ser tratados y desechados con base a lo establecido en la Norma Oficial Mexicana NOM-087-SEMARNAT-SSA1-2002, Protección ambiental-salud ambiental-residuos peligrosos biológico-infecciosos y el procedimiento SGC-FESZ-PO06. Para ello deben seguirse las indicaciones señaladas en este manual, según corresponda. Los residuos biológicos deberán colocarse en la zona roja y los químicos en la zona amarilla marcada en el laboratorio, y serán recolectados por el Departamento encargado de esta actividad siguiendo el calendario previamente elaborado por el Coordinador del Área.

Práctica 3

PROTEÍNAS SÉRICAS

Objetivos

- Realizar las determinaciones de proteínas totales y de la fracción de albúmina por métodos colorimétricos.
- Calcular e interpretar los componentes no medidos de las fracciones proteicas.
- Establecer su importancia como elementos de diagnóstico.

Introducción

Las proteínas, en general, participan prácticamente en todos los procesos del ser vivo: transporte, catálisis enzimática, control homeostático, regulación hormonal, coagulación sanguínea, inmunidad, crecimiento, herencia, etc.

Del total de proteínas en el organismo, desde el punto de vista clínico las más importantes son las llamadas *proteínas séricas.* A pesar de encontrarse en el mismo espacio, las diversas proteínas del plasma no tienen su origen en la misma fuente. El hígado es el órgano principal para la síntesis de albúmina, además de las α y β globulinas, y quizá de algunas γ globulinas no inmunes, entre éstas figuran las proteínas de la coagulación y transporte en la sangre. Las células del sistema fagocítico mononuclear (bazo, médula ósea, nodos linfáticos) son la fuente de anticuerpos, γ globulinas inmunes y quizá de algunas β globulinas.

Los valores de proteínas séricas tienen una variación diurna de 0.5 g/dL, y son el reflejo de los pequeños cambios entre el líquido vascular y el no vascular en el curso de la actividad diurna, lo que indica que la medición debe hacerse durante la mañana, cuando los niveles son más constantes.

La concentración de proteínas en una solución se expresa universalmente en forma de peso de las mismas por unidad de volumen obtenida, principalmente por métodos gravimétricos. Los métodos gravimétricos son un tanto complicados, por lo que no son aplicables a la rutina. De aquí que los métodos de determinación empleados en el laboratorio sean estandarizados por los métodos gravimétricos.

Debido a la complejidad de algunas proteínas, se ha propuesto establecer como base la determinación del contenido en polipéptidos. Las proteínas séricas pueden cuantificarse en total o fraccionadas. El número de fracciones encontradas depende del método de análisis empleado y su propósito.

3.1 PROTEÍNAS TOTALES
MÉTODO DE BIURET

Las proteínas totales son comúnmente determinadas por alguna modificación de la reacción de Biuret, en la cual las proteínas dan un color violeta con una solución de tartrato cúprico alcalino.

El máximo de absorción del complejo proteína-Biuret, en la zona de la luz visible, se produce a 545 nm cuando se hace frente a un blanco de agua. Este complejo también tiene otro pico de absorción máxima a 300 nm, teniendo una sensibilidad cuatro veces mayor, pero la interferencia por turbidez en la solución es también potenciada.

La reacción se efectúa directamente con suero diluido o no diluido. En el suero están presentes algunos péptidos, pero no contribuyen al aumento de color en el Biuret. Los iones amonio (NH_4^+) interfieren por amortiguar el pH a un nivel bajo, pero la concentración de iones amonio en suero es tan baja que no llega a interferir en la medición.

Con la mayoría de los métodos basados en la reacción de Biuret se pueden determinar proteínas en el intervalo de 0.5 a 1.5 ng de proteína por alícuota que se mide. Los resultados que se obtienen por este método son reproducibles y coinciden con los del método Kjeldahl, considerado como el método de referencia.

Fundamento

Las proteínas y los péptidos, al contrario de otros compuestos nitrogenados como urea, creatinina, ácido úrico, etc., forman en solución alcalina, un complejo color violeta con iones de cobre. La reacción se lleva a cabo con el enlace peptídico y para que se efectúe requiere como mínimo dos enlaces peptídicos.

Reacción:

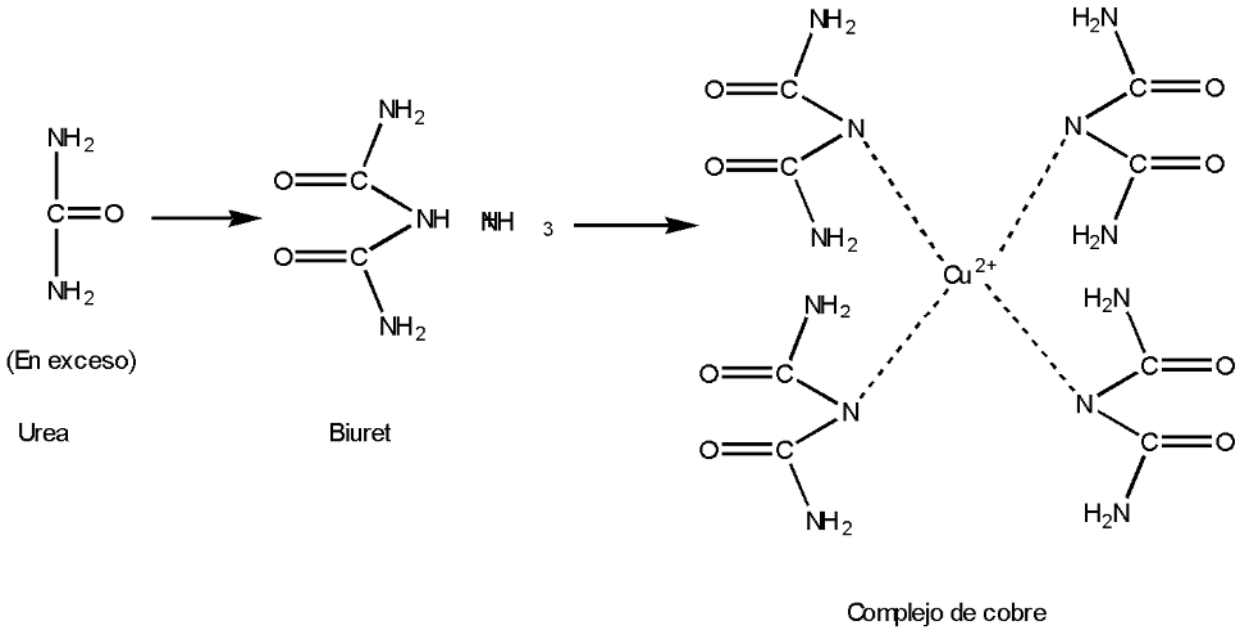


Figura 4. Reacción de proteínas totales en el método de Biuret, el ejemplo es con urea. Tomado de: Henry, 1980.

Material y reactivos

- Suero, plasma o cualquier líquido biológico.
- Estuche comercial para la determinación de proteínas totales por el método de Biuret.

Equipo

- Espectrofotómetro

Servicios

- Energía eléctrica
- Agua

Técnica

Es dependiente del estuche comercial disponible. Debe seguirse al pie de la letra las instrucciones.

Cálculos: los indicados en el instructivo del estuche utilizado.

Factor de conversión: no se pueden expresar en moles debido a la variedad de estructuras químicas, por lo que se reportan en g/L, de ahí que el factor de conversión es 10.

Valores de referencia

Muestra		**Tradicional**	**SI**
Suero			
Mujeres*	0 – 3 años	6.1 – 8.2 g/dL	61 – 82 g/L
	> 4 años	6.2 – 8.2 g/dL	62 – 82 g/L
Hombres*	0 – 3 años	5.9 – 7.5 g/dL	59 – 75 g/L
	> 4 años	6.5 – 8.2 g/dL	65 – 82 g/L
LCR (lumbar)	Adultos y niños	15 – 45 mg/dL	0.15 – 0.45 g/L
	Recién nacidos	hasta 90 mg/dL	hasta 0.9 g/L

LCR: líquido cefalorraquídeo. *Para población mexicana. Tomado de: Olay-Fuentes G, 2013.

3.2 Fraccionamiento de Proteínas

Todos los líquidos biológicos contienen una mezcla heterogénea de proteínas, muchas de las cuales se encuentran en trazas, por ejemplo, las enzimas y las hormonas. La separación química o física de los componentes proteicos de tales mezclas se denomina "fraccionamiento".

De todas las proteínas séricas, dos son los grupos más importantes desde el punto de vista diagnóstico, la albúmina y las globulinas, pudiéndose obtener la razón albúmina/globulinas como un simple fraccionamiento, ya que en algunos estados patológicos disminuye la albúmina y aumentan las globulinas modificando el valor de la razón.

Si se desea obtener un mejor fraccionamiento proteico, el método principal es la electroforesis; pero hay algunos métodos químicos que dan buena resolución para la cuantificación de albúmina y demás proteínas componentes de las fracciones de globulinas.

Hay dos métodos químicos de fraccionamiento proteico que son simples y cómodos para realizarse en trabajos analíticos rutinarios:

- Fraccionamiento salino, en el que se efectúa la separación de albúmina y globulinas por grupo, que da información clínica muy útil.
- Cuantificación con colorantes, donde reacciona la albúmina y por diferencia se obtienen las globulinas.

3.2.1 Albúmina

MÉTODO DE UNIÓN A COLORANTES

Las técnicas para la determinación de albúmina por conjugación con colorantes aprovechan la propiedad de algunos de éstos de formar un complejo colorante-proteína que muestra propiedades ópticas diferentes a las que posee el colorante libre. Los radicales a los que se une el colorante son capaces de unirse también reversiblemente a otras sustancias como: bilirrubinas, ácidos grasos libres y algunos fármacos.

Fundamento

Cuando la albúmina es adicionada a una solución amortiguada de un colorante indicador, se une por puentes de hidrógeno y fuerzas de Van der Waals al colorante, produciendo un cambio en el color de la solución.

En ciertos rangos, la cantidad del cambio de color es proporcional a la cantidad de albúmina presente, las demás seroproteínas no reaccionan. Este método emplea verde de bromocresol, a pH 4.0, que presenta una menor interferencia con bilirrubina que otros colorantes.

Material y reactivos

- Suero, plasma o cualquier líquido biológico.
- Estuche comercial para determinar albúmina por este método.

Equipo

- Espectrofotómetro

Servicios

- Energía eléctrica
- Agua

Técnica

Dependiente del estuche comercial disponible. Debe seguirse al pie de la letra las instrucciones.

Cálculos: para la concentración de albúmina, seguir los indicados en el instructivo del estuche utilizado.

Fracción globulínica:

$$Globulinas\ (\frac{g}{dL}) = Proteías\ totales\ (\frac{g}{dL}) - Albúmina\ (\frac{g}{dL}$$

$$Razón\ G = \frac{A}{\frac{Albúmina\ (\frac{g}{dL})}{Globulina\ (\frac{g}{dL}}}$$

Factores de conversión: $\frac{mmol}{L = \frac{g}{dL\ X\ 0.151}}$

$\frac{g}{dL = \frac{mmol}{L\ X\ 6.65}}$

Valores de referencia

	Tradicional	**SI**
Albúmina		
Suero o plasma	3.5 – 5.1 g/dL	0.53 – 0.77 mmol/L
Globulinas totales		
Suero	2.3 – 3.5 mg/dL	23 – 35 g/L
Razón albúmina/globulinas	1.1 – 1.8	1.1 – 1.8

Resultados: Obtener el resultado de la concentración tanto de proteínas totales como de albúmina de la muestra analizada. Calcular la fracción de globulinas y la relación albúmina/globulinas. Indicar si los valores se encuentran dentro de rango normal o patológico.

Seminario: MIELOMA MÚLTIPLE

Cuestionario

1. ¿En qué padecimientos se encuentran alterados los valores de proteínas y sus fracciones (aumentados y disminuidos)?
2. ¿Qué es una gamapatía monoclonal?
3. ¿Cuáles son las características de la proteína de Bence-Jones y cómo se detecta en el laboratorio?
4. ¿Cómo se observa una electroforesis de proteínas de un suero normal y de un paciente con mieloma múltiple? Describa las características principales.
5. ¿Qué pruebas de laboratorio complementan el diagnóstico de mieloma múltiple?

Bibliografía

- Navarro-Almenzar B, Cabañas-Perianes V, Moreno Belmonte MJ. Mieloma múltiple. Medicine. 2020; 13(20): 1142-8
- Morrison T, Booth RA, Hauff K, Berardi P, Visram A. Laboratory assessment of multiple myeloma. Adv Clin Chem. 2019; 89: 1-58. doi: 10.1016/bs.acc.2018.12.001.
- Rajkumar SV. Multiple myeloma: Every year a new standard? Hematol Oncol. 2019; 37 Suppl 1(Suppl 1): 62-5. doi: 10.1002/hon.2586.
- Medical Masterclass contributors; Firth J. Haematology: multiple myeloma. Clin Med (Lond). 2019; 19(1): 58-60. doi: 10.7861/clinmedicine.19-1-58.
- Jenner EL, Evans JAR, Harding SJ. Serum free light chain (FLC) analysis: a guiding light in monoclonal gammopathy management. J Appl Lab Med. 2017; 2(1): 98-106. doi: 10.1373/jalm.2016.021352.
- Dhakal B, Girnius S, Hari P. Recent advances in understanding multiple myeloma. F1000Res 2016; 5(F1000 Faculty Rev): 2053. doi: 10.12688/f1000research.8777.1
- Hong J, Lee JH. Recent advances in multiple myeloma: a Korean perspective. Korean J Intern Med 2016; 31: 820-34. doi: 10.3904/kjim.2015.408.
- Olay-Fuentes G, Díaz-Piedra P, Hernández-Gómez R, Cervantes-Villagrana RD, Presno-Bernal JM, Alcántara-Gómez LE. Determinación de intervalos de referencia para química clínica en población mexicana. Rev Latinoam Patol Clin 2013; 60(1): 43-51.
- Castagnino JM. Análisis de las proteínas humanas y de sus aportes al laboratorio clínico [Ed]. Acta Bioquím Clín Latinoam 2010; 44(1): 1-2.
- Davids MS, Murali MR, Kuter DJ. Serum free light chain analysis. Am J Hematol 2010; 85: 787-90. doi: 10.1002/ajh.21815.
- Kyle RA. Rajkumar SV. Multiple myeloma. N Engl J Med 2004; 351: 1860-73.
- Graziani MS, Merlini G. Measurement of free light chains in urine [Letter] Clin Chem 2001; 47: 2069.
- Attaelmannan M, Levinson SS. Understanding and identifying monoclonal gammopathies. Clin Chem 2000; 46(8B): 1230-8.

Manejo de residuos

Debido a que se manejan muestras biológicas y reactivos químicos, los residuos deben ser tratados y desechados con base a lo establecido en la Norma Oficial Mexicana NOM-087-SEMARNAT-SSA1-2002, Protección ambiental-salud

ambiental-residuos peligrosos biológico-infecciosos y el procedimiento SGC-FESZ-PO06. Para ello deben seguirse las indicaciones especificadas en este manual, según corresponda. Los residuos biológicos deberán colocarse en la zona roja y los químicos en la zona amarilla marcada en el laboratorio, y serán recolectados por el Departamento encargado de esta actividad siguiendo el calendario previamente elaborado por el Coordinador del Área.

Práctica 4

PERFIL DE LÍPIDOS

Objetivos

- Determinar los componentes del perfil de lípidos: colesterol, triglicéridos y HDL-colesterol.
- Reconocer y calcular el LDL-colesterol y el colesterol-no-HDL.
- Interpretar los resultados obtenidos del perfil de lípidos en el contexto clínico.

Introducción

Los lípidos son derivados de los ácidos grasos que con otros compuestos adquieren propiedades similares de solubilidad: insolubles en agua y solubles en solventes no polares. Anteriormente eran denominados lípidos sanguíneos, pero actualmente son considerados como lípidos séricos, pues el eritrocito contiene lípidos en su membrana que no están considerados dentro del metabolismo de lípidos, por lo que no se toman en cuenta.

La química clínica se ocupa fundamentalmente de los lípidos del suero o del plasma y de las heces. Los componentes de mayor interés son los triglicéridos, los fosfolípidos, el colesterol y sus ésteres, los ácidos grasos libres y las lipoproteínas. En la sangre, como mínimo, el 95% de los lípidos están en combinación con proteínas constituyendo las lipoproteínas. El manejo y análisis cuantitativo de lípidos requiere escrupulosa atención a los pormenores y plantea algunos problemas que no se presentan en análisis de otro tipo de moléculas. Como en general los lípidos son insolubles en agua, se emplean comúnmente en su manejo muchos disolventes volátiles e inflamables y ello representa un riesgo constante.

Los lípidos que se encuentran en mayor concentración son el colesterol y sus ésteres y los fosfolípidos, los cuales están presentes en cantidades aproximadas de 150-300 mg/dL en individuos normales (sanos). La cantidad de triglicéridos es más o menos de 50-150 mg/dL y los demás tienen concentraciones mucho más

pequeñas. Actualmente la medición de los ésteres de colesterol no tiene ninguna importancia clínica, de tal forma que se realiza la cuantificación de colesterol total.

Al ser las lipoproteínas las transportadoras de los lípidos en el plasma ahora forman parte del diagnóstico, sin ser necesario cuantificarlas todas, sino únicamente la HDL-colesterol y la LDL-colesterol.

Por otro lado, se denomina perfil en química clínica, al grupo de determinaciones que en conjunto nos dan apoyo para un diagnóstico; en este sentido, debido a que la determinación de lípidos totales no brinda realmente una información diagnóstica, fue eliminada del perfil por ser considerada actualmente una prueba obsoleta, de ahí que el perfil de lípidos está conformado por colesterol total, triglicéridos y lipoproteínas.

4.1 COLESTEROL TOTAL
MÉTODO ENZIMÁTICO. CHOD-PAP (TRINDER)

El colesterol en el suero o plasma se encuentra libre o esterificado con ácidos grasos, lo mismo que en el eritrocito, sólo que, en diferente proporción, 1:3 en el primero y 4:1 en el segundo. Las cifras de colesterol sérico son alteradas por algunos factores que no afectan la concentración de este compuesto en el interior del eritrocito, siendo por ello preferible efectuar la determinación de colesterol total en suero o plasma en lugar de hacerlo en sangre total.

En la actualidad, prevalecen los métodos enzimáticos sobre los químicos para las diferentes determinaciones, y en el caso de colesterol, el método rutinario enzimático es el más específico para su determinación y emplea dos enzimas: colesterol esterasa y colesterol oxidasa. Este método se puede utilizar para la determinación de colesterol libre, no añadiendo la esterasa, aunque no es común hacerlo. Si es que se lleva a cabo el análisis del colesterol libre debe efectuarse el mismo día de la extracción de la sangre o congelarse el suero. El colesterol total es estable en las muestras durante 7 días a temperatura entre 2° – 8°C.

Fundamento

El colesterol se determina en el suero después de ser hidrolizado para liberarlo de sus ésteres, y oxidado enzimáticamente. En la oxidación se produce H_2O_2 que, en presencia de peroxidasa, por reacción con 4-amino-fenazona (PAP) y fenol se transforma en el colorante quinonaimina que puede ser valorado por fotometría, por lo que se ha automatizado.

Reacción:

$$\text{Ésteres de colesterol} + H_2O \xrightarrow[\text{esterasa}]{\text{Colesterol}} \text{Colesterol} + O_2 + \text{ác. grasos}$$

$$\text{Colesterol} + O_2 \xrightarrow[\text{oxidasa}]{\text{Colesterol}} \text{Colesten-3-ona} + H_2O_2$$

$$2H_2O_2 + \text{4-amino-fenazona (PAP)} + \text{Fenol} \xrightarrow{\text{Peroxidasa}} \text{Quinonaimina} + 4H_2O$$

Figura 5. Reacciones acopladas para determinar colesterol enzimáticamente. Tomado de: Pesce y Kaplan, 1990.

Material y reactivos

- Suero o plasma.
- Estuche comercial para la determinación de colesterol enzimático CHOD-PAP (Trinder).

Equipo

- Espectrofotómetro

Servicios

- Energía eléctrica
- Agua

Técnica

Es dependiente del estuche comercial disponible. Deben seguirse las instrucciones como lo indica la casa comercial.

Cálculos: los indicados en el instructivo del estuche usado.

Factores de conversión: $\frac{mmol}{L = \frac{mg}{dL\ X\ 0.026}}$

$\frac{mg}{dL = \frac{mmol}{L\ X\ 38.67}}$

Interpretación: en el caso en particular del perfil de lípidos, los valores de referencia no son de utilidad, deben considerarse de importancia los valores de corte clínico,

de acuerdo con la NOM-037-SSA2-2012. La interpretación se hace de todos los componentes del perfil, por lo que se presentan al final de esta sección.

4.2 TRIGLICÉRIDOS
MÉTODO ENZIMÁTICO GPO-PAP (TRINDER)

Los triglicéridos se mantienen en solución unidos a proteínas, principalmente con las β (LDL) y las pre-β (VLDL) lipoproteínas. Se encuentran también en suero, aunque en pequeñas cantidades, mono y diglicéridos.

Los triglicéridos del plasma son más altos que los del suero del mismo sujeto debido a que, durante la formación del coágulo, una cierta cantidad de los mismos quedan atrapados en las mallas de fibrina, a pesar de todo, casi todos los estudios sobre triglicéridos publicados en la literatura se han efectuado sobre suero.

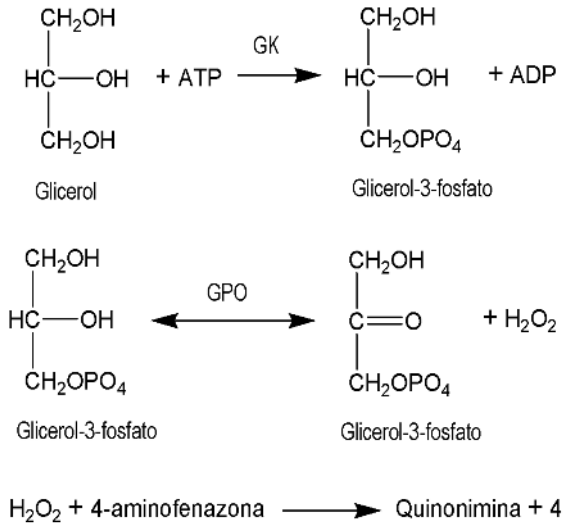
Las reacciones para la cuantificación de triglicéridos se realizan con el glicerol, por lo que es necesario hacer una hidrólisis de los ácidos grasos, la cual actualmente se hace enzimáticamente. El glicerol es cuantificado por una serie de reacciones enzimáticas acopladas para medir, finalmente, la coenzima NAD^+ oxidada o reducida, dependiendo del sentido de las reacciones.

Hoy en día, se ha difundido un método Trinder, en donde el glicerol es oxidado para producir H_2O_2 el cuál es medido por reacción de oxidación de 4-aminofenazona, el cual ha sido automatizado.

Fundamento

Los triglicéridos en el suero son hidrolizados por una lipasa (LPS), liberando el glicerol. Posteriormente, éste es fosforilado a glicerol-3 fosfato por medio de la enzima glicerol cinasa (GK). El glicerol-3-fosfato es a su vez sustrato de la glicerol fosfato oxidasa (GPO) que produce H_2O_2 en la reacción. El H_2O_2 oxida a la 4-aminofenazona formando una quinonaimina que se puede leer fotométricamente.

Reacción:



H_2O_2 + 4-aminofenazona ⟶ Quinonimina + 4 H_2O

Figura 6. Reacciones acopladas para la determinación de triglicéridos enzimáticamente. Modificado de: Anderson, 1995. GK: glicerol cinasa, GPO: glicerol fosfato oxidasa.

Material y reactivos

- Suero o plasma.
- Estuche comercial para determinación de triglicéridos por método Trinder.

Equipo

- Espectrofotómetro

Servicios

- Energía eléctrica
- Agua

Técnica

Seguir cuidadosamente el instructivo del estuche comercial.

Cálculos: los indicados en el instructivo del estuche utilizado.

Factores de conversión: $\frac{mmol}{L = \frac{mg}{dL\ X\ 0.011}}$ $\frac{mg}{dL = \frac{mmol}{L\ X\ 88.54}}$

4.3 HDL-COLESTEROL, LDL-COLESTEROL Y COLESTEROL-NO-HDL

Las lipoproteínas son partículas esféricas que están constituidas por una porción interna hidrofóbica rodeada de una capa externa hidrofílica. Se reconocen cuatro lipoproteínas que se nombran de acuerdo con su densidad y movilidad electroforética: quilomicrones, lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) o pre-β, lipoproteínas de baja densidad (LDL) o β, y lipoproteínas de alta densidad (HDL) o α. Desde el punto de vista clínico las liproproteínas de importancia son la LDL y la HDL.

Inicialmente, las lipoproteínas en el laboratorio clínico eran identificadas y cuantificadas por electroforesis. Con el estudio de la composición de ellas, se pudo observar que tanto la LDL como la HDL tenían como principal componente el colesterol, sólo que en la última éste se encuentra esterificado.

Al realizar investigaciones sobre el papel patogénico de ambas lipoproteínas, se le atribuyó a la LDL un alto poder aterogénico, mientras que a la HDL un papel

protector. Con este giro en el estudio de las lipoproteínas, fue que se consideró como de mayor importancia el cuantificarlas.

Como ambas contienen colesterol en sus moléculas, se desarrollaron procedimientos denominados HDL-colesterol y LDL-colesterol, ya que se cuantifica el colesterol. Se utiliza la propiedad que tienen la LDL, VLDL y quilomicrones de formar complejos con iones polifuncionales parecidos a la heparina y al sulfato de dextrán que precipitan en presencia de ciertos cationes como Mg^{2+} y Mn^{2+}, quedando soluble la HDL que puede ser separada rápidamente.

Recientemente se indica que el colesterol no unido a HDL es potencialmente aterogénico e indica riesgo de muerte por enfermedad cardiovascular, por lo que debe aumentarse este cálculo al perfil.

Fundamento

Las lipoproteínas de baja densidad (LDL) y de muy baja densidad (VLDL) se precipitan con ácido fosfotúngstico en presencia de iones magnesio y pueden ser removidas por centrifugación. En el sobrenadante claro quedan las lipoproteínas de alta densidad (HDL). El colesterol-HDL puede valorarse utilizando el método CHOD-PAP, ningún otro pues hay interferencia con la reacción.

Material y reactivos

- Suero o plasma.
- Reactivo precipitante para HDL
- Estuche comercial para la determinación de colesterol por el método CHOD-PAP.

Equipo

- Espectrofotómetro

Servicios

- Energía eléctrica
- Agua

Técnica

Realizar la determinación del colesterol como se indica en el inserto de la casa comercial.

Cálculos: los indicados por la casa comercial para cuantificación de colesterol.

Para obtener la concentración de LDL, se cuantifica el colesterol en el sobrenadante y el colesterol total en la muestra y se aplica la fórmula:

$$LDL(mg/dL) = Colesterol(mg/dl) - \left(\left(\frac{Triglicéridos(mg/dL)}{5}\right) + HDL(mg/dL)\right)$$

Esta fórmula es válida para las muestras de suero/plasma con triglicéridos < 400 mg/dL, ya que con valores superiores no es factible la correcta separación de las lipoproteínas.

El colesterol no HDL (C-no-HDL) se calcula a partir del colesterol total y HDL-colesterol con la fórmula:

$$C - no - HDL\ (\frac{mg}{dL}) = \ Colesterol\ total\ (\frac{mg}{dL}) - HDL(\frac{mg}{dL})$$

También es importante calcular los índices considerados para la interpretación de riesgo cardiovascular:

$$\frac{Colesterol\ total}{HDLc}\ y\ \frac{LDLc}{HDLc}$$

Factores de conversión: los mismos que para colesterol.

Valores de corte clínico

Para el perfil de lípidos, de acuerdo con la NOM-037-SSA2-2012, se considera dislipidemia si:

Lípido	**Tradicional**	**SI**
Colesterol total	≥ 200 mg/dL	≥ 5.2 mmol/L
Triglicéridos	≥ 150 mg/dL	≥ 1.65 mmol/L
HDL-colesterol	< 40 mg/dL	< 0.91 mmol/L
LDL-colesterol	> 130 mg/dL	> 3.38 mmol/L
Colesterol-no-HDL	> 160 mg/dL	> 4.16 mmol/L

	Riesgo	**Col/HDL**	**LDL/HDL**
Mujer	Promedio	4.4	3.2
	2X promedio	6.4	3.7
	3X promedio	7.5	5.0

Hombre	Promedio	5.1	3.5
	2X promedio	6.8	4.2
	3X promedio	7.8	52

Resultados: Obtener el resultado de la concentración lo de los componentes del perfil de lípidos de la muestra analizada. Calcular el colesterol no HDL y los índices de riesgo cardiovascular. Indicar si los valores se encuentran dentro de rango normal o patológico.

Seminario: ATEROESCLEROSIS

Cuestionario

1. ¿Cuál es la composición química de cada una de las lipoproteínas y cuál es su función principal?
2. Escriba la clasificación de las dislipidemias según la NOM-037-SSA2-2012.
3. De acuerdo con la NOM-037-SSA-2012, ¿qué se debe incluir para un buen diagnóstico de dislipidemia?
4. Explique la fisiopatogenia de la ateroesclerosis.
5. ¿Qué papel juegan las lipoproteínas en el proceso aterogénico?, explique.

Bibliografía

- Guijarro C, Cosín-Sales J. Colesterol LDL y aterosclerosis: evidencias. Clin Invest Arterioscl. 2021; 33: 25-32.
- Sandesara PB, Virani SS, Fazio S, Shapiro MD. The forgotten lipids: triglycerides, remnant cholesterol, and atherosclerotic cardiovascular disease risk. Endocr Rev. 2019; 40(2): 537-57. doi: 10.1210/er.2018-00184.
- Bergheanu SC, Bodde MC, Jukema JW. Pathophysiology and treatment of atherosclerosis. Current view and future perspective on lipoprotein modification treatment. Neth Heart J. 2017; 25: 231-42. doi: 10.1007/s12471-017-0959-2
- Cobos Palacios L, Caballero Martínez LF, López Carmona MD. Protocolo diagnóstico y cuantificación de los factores de riesgo cardiovascular. Medicine. 2017; 12(42): 2509-15.
- Rahman MS, Woollard K. Atherosclerosis. Adv Exp Med Biol. 2017; 1003: 121-44. doi: 10.1007/978-3-319-57613-8_7.
- Hendrani AD, Adesiyun T, Quispe R, Jones SR, et al. Dyslipidemia management in primary prevention of cardiovascular disease: Current guidelines and strategies. World J Cardiol 2016; 8(2): 201-10. doi: 10.4330/wjc.v8.i2.201.
- Ossoli A, Pavanello C, Calabresi L. High-density lipoprotein, lecithin: cholesterol acyltransferase, and atherosclerosis. Endocrinol Metab 2016; 31: 223-9. doi: 10.3803/EnM.2016.31.2.223.

- Gupta A, Smith DA. The 2013 American College of Cardiology/American Heart Association guidelines on treating blood cholesterol and assessing cardiovascular risk. A busy practitioner's guide. Endocrinol Metab Clin N Am 2014; 43: 869-92. doi: 10.1016/j.ecl.2014.08.006.
- Diario Oficial de la Federación. Norma Oficial Mexicana NOM-037-SSA2-2012. Para la prevención, tratamiento y control de las dislipidemias. 25 de junio del 2012.
- Warnick GR, Nakajima K. Fasting versus nonfasting triglycerides: implications for laboratory measurements. Clin Chem 2008; 54(1): 14-6.

Manejo de residuos

Debido a que se manejan muestras biológicas y reactivos químicos, los residuos deben ser tratados y desechados con base a lo establecido en la Norma Oficial Mexicana NOM-087-SEMARNAT-SSA1-2002, Protección ambiental-salud ambiental-residuos peligrosos biológico-infecciosos y el procedimiento SGC-FESZ-PO06. Para ello deben seguirse las indicaciones especificadas en este manual, según corresponda. Los residuos biológicos deberán colocarse en la zona roja y los químicos en la zona amarilla marcada en el laboratorio, y serán recolectados por el Departamento encargado de esta actividad siguiendo el calendario previamente elaborado por el Coordinador del Área.

Práctica 5

IONES INORGÁNICOS SÉRICOS (ELECTROLITOS)

Objetivos

– Reconocer los diferentes métodos para la cuantificación de los principales iones inorgánicos séricos: sodio, potasio y cloruros.
– Aplicar los métodos de determinación de cloruros.
– Interpretar los resultados en el contexto clínico.

Introducción

Los electrolitos se clasifican como aniones o cationes según su carga eléctrica y su migración en un campo eléctrico, hacia el ánodo o el cátodo.

Aunque los aminoácidos y proteínas en solución también llevan carga eléctrica, en Química Clínica se clasifican de ordinario a parte de los electrolitos.

Los principales electrolitos (sodio, potasio, cloruros, fosfatos, calcio y magnesio) se encuentran generalmente como iones libres, mientras que los elementos trazas ocurren de manera primaria en alguna combinación especial con proteína y por eso

se clasifican diferente, además de que los electrolitos están en el organismo en mayor concentración.

Los electrolitos desempeñan múltiples funciones en el cuerpo humano. Casi no existe ningún proceso metabólico que no dependa o no sea afectado por ellos.

La determinación de electrolitos es una de las funciones importantes del laboratorio clínico. En los últimos años se ha podido disponer de una serie de instrumentos que facilitan la determinación analítica. Entre las herramientas que se emplean actualmente se encuentran diversos micrométodos y macrométodos, basados en espectrofotometría, espectrografía de emisión, espectrofotometría de flama, análisis de activación neutrónica, espectroscopía de absorción atómica, análisis columbimétrico y electrodo ion selectivo (EIS), considerándose el de referencia la absorción atómica, aunque es poco práctico para la rutina.

El método rutinario de elección es el electrodo ion selectivo, por su facilidad para incluirse en los autoanalizadores y la sencillez de los procedimientos.

5.1 Sodio y Potasio

El sodio y el potasio son generalmente determinados electrodo ion selectivo (EIS). Los detalles analíticos varían con el aparato que se utilice, por lo que se deben leer cuidadosamente las instrucciones antes de realizar la determinación.

Los métodos con electrodos para iones usan una membrana de vidrio que permite el intercambio iónico de sodio y una membrana transportadora neutra de valinomicina para la medición de potasio. Los electrodos típicos para sodio tienen una selectividad diez veces mayor para Na^+ que para K^+ y no son afectados por pH superiores a 1.

La relación Na^+/K^+ en suero es aproximadamente 30. El potencial de cada electrodo se mide con un voltaje fijo y estable, determinado por el electrodo de referencia. Cada electrodo genera un voltaje que varía con la concentración de iones a la cual responde. La relación entre el voltaje generado y la concentración del ion percibido es logarítmica y se expresa a través de la ecuación de Nerst.

En este último sistema existen dos tipos generales de mediciones: directas, que utilizan la muestra sin diluir, o indirectas, que miden la actividad iónica en una muestra diluida (1:100, generalmente).

En la actualidad, la determinación de estos iones por EIS ha adquirido importancia por la facilidad de la automatización.

Material y reactivos

- No aplica

Equipo

- No aplica

Servicios

- No aplica

Técnica

Por carecer del equipo para hacer la medición, esta actividad será únicamente de seminario.

Valores de referencia:

Suero o plasma	Tradicional	SI
Sodio	136 – 145 mEq/L	136 – 145 mmol/L
Potasio*	3.7 – 5.2 mEq/L	3.7 – 5.2 mmol/L

*Para población mexicana. Tomado de: Olay-Fuentes G, 2013.

Resultados: No aplica.

Seminario: EMISIÓN Y ABSORCIÓN ATÓMICA, Y ELECTRODO ION SELECTIVO

Cuestionario

1. ¿Qué es un estándar interno en absorción atómica y con qué elementos químicos se debe utilizar para su cuantificación?
2. ¿Cuál es el fundamento del electrodo ion selectivo?
3. Realice un esquema de un EIS para sodio.
4. ¿Cuáles son las funciones fisiológicas del sodio y el potasio?
5. ¿En qué trastornos clínicos aumentan y disminuyen los niveles de sodio y potasio?

Bibliografía

- Skinner WS, Ong KG. Modern electrode technologies for ion and molecule sensing. Sensors**.** 2020; 20: 4568. doi: 10.3390/s20164568.
- Palmer BF, Clegg DJ. Physiology and pathophysiology of potassium homeostasis: Core Curriculum 2019. Am J Kidney Dis. 2019; 74(5): 682-95. doi: 10.1053/j.ajkd.2019.03.427.
- Zhang W, Price DJ. A statistical model for restoration of serum potassium level disturbed by hemolysis. Clin Chim Acta. 2019; 497: 137-40. doi: 10.1016/j.cca.2019.07.029.

- Cogswell ME, Loria CM, Terry AL, Zhao L, Wang CY, Chen TC, et al. Estimated 24-hour urinary sodium and potassium excretion in US adults. JAMA. 2018; 319(12):1 209-1220. doi:10.1001/jama.2018.1156
- Montford JR, Linas S. How dangerous is hyperkalemia? J Am Soc Nephrol. 2017; 28(11): 3155-65. doi: 10.1681/ASN.2016121344.
- Sterns RH. Disorders of plasma sodium — causes, consequences, and correction. N Engl J Med 2015; 372: 55-65. doi: 10.1056/NEJMra1404489
- Fijorek K, Püsküllüoğlu M, Tomaszewska D, Tomaszewski R, Glinka A, Polak S. Serum potassium, sodium and calcium levels in healthy individuals – literature review and data analysis. Folia Med Cracov 2014; 54(1): 53-70.
- Olay-Fuentes G, Díaz-Piedra P, Hernández-Gómez R, Cervantes-Villagrana RD, Presno-Bernal JM, Alcántara-Gómez LE. Determinación de intervalos de referencia para química clínica en población mexicana. Rev Latinoam Patol Clin 2013; 60(1): 43-51.
- Lee SK, Boron WF, Parker MD. Monitoring ion activities in and around cells using ion-selective liquid-membrane microelectrodes. Sensors. 2013; 13(1): 984-1003. doi: 10.3390/s130100984.
- Sam R, Feizi I. Understanding hypernatremia. Am J Nephrol 2012; 36: 97-104. doi: 10.1159/000339625.
- Kazory A. Hyponatremia in heart failure: revisiting pathophysiology and therapeutic strategies. Clin Cardiol 2010; 33(6): 322-9. doi: 10.1002/clc.20791.
- Oesch U, Ammann D, Simon W. Ion-selective membrane electrodes for clinical use. Clin Chem 1986; 32(8): 1448-59.

Manejo de residuos

No aplica.

5.2 Cloruros
Valoración mercurométrica

El ion cloruro es el principal anión extracelular, con 103 mEq/L de concentración en el suero, siendo el total de los aniones de 154 mEq/L; intervienen de un modo importante en el mantenimiento de la hidratación y la presión osmótica aproximada y del balance anión-catión normal en el mismo compartimiento.

La mayoría de las técnicas habitualmente utilizadas para la determinación de cloro recurren a una conjugación previa de este elemento con plata o mercurio para formar cloruro de plata o cloruro de mercurio no disociados.

Se ha determinado también mediante el análisis del desplazamiento del ion cromato de su forma inicial de cromato de plata o cromato potásico, y con ion tiocianato.

El principal problema de estos métodos es que son básicamente gravimétricos, por lo que el error humano puede ser muy grande.

Fundamento

Se titulan los iones cloruro (Cl^-) con una solución patrón de mercurio II (Hg^{2+}), lo que da lugar a la formación de $HgCl_2$ no disociado pero soluble. El punto final de la titulación viene detectado por la aparición de un color violeta que se produce cuando el exceso de Hg^{2+} forma un complejo con el indicador difenilcarbazona.

Reacción:

$$2Cl^- + Hg(NO_3)_2 \rightarrow HgCl_2 + 2NO_3^- + Hg^{2+}\ (\text{exceso}) + \text{Difenilcarbazona} \downarrow$$

Complejo violeta

Figura 7. Reacción de determinación de cloruros por el método mercurométrico. Tomado de: Pesce y Kaplan, 1990.

Material y reactivos

- Suero, plasma o líquido cefalorraquídeo
- Estuche comercial para la determinación de cloruros por el método mercurométrico.

Equipo

- Espectrofotómetro

Servicios

- Energía eléctrica
- Agua

Técnica

El procedimiento depende del estuche comercial disponible. Debe seguirse al pie de la letra las instrucciones del fabricante.

**NOTA:* El material de vidrio debe estar bien limpio y enjuagado con agua preferentemente bidestilada.

Cálculos: los indicados en el instructivo del estuche empleado.

Factores de conversión: $\frac{mmol}{L=\frac{mg}{dL\ X\ 0.282}}$

$\frac{mg}{dL=\frac{mmol}{L\ X\ 3.545}}$

$\frac{mmol}{L=\frac{g}{L\ X\ 28.21}}$

Valores de referencia

Muestra	Tradicional	SI
Suero	334 – 395 mg/dL	94 – 111 mmol/L
	102 – 112 mEq/L	102 – 112 mmol/L*
Orina	6 – 9 g/24 h	170 – 250 mmol/24 h
LCR	410 – 470 mg/dL	115 – 132 mmol/L

LCR: líquido cefalorraquídeo. *Para población mexicana. Tomado de: Olay-Fuentes G, 2013.

Resultados: Obtener el resultado de la concentración de la muestra analizada e indicar si el valor se encuentra dentro de rango normal o patológico.

Seminario: DESHIDRATACIÓN

Cuestionario

1. ¿Qué otros métodos existen para la determinación de cloruros? Explique el fundamento de dos de ellos.
2. Esquematice el desplazamiento de cloruros en el eritrocito para el mantenimiento del equilibrio ácido-base.
3. ¿Cuáles son los síntomas clínicos y hallazgos de laboratorio en una deshidratación?, y defina qué es una deshidratación isotónica, hipotónica e hipertónica.
4. ¿En qué padecimientos se encuentran alterados (aumentados y disminuidos) los cloruros plasmáticos y en LCR?

5. ¿Qué es la osmolaridad de una muestra biológica y cuál es su utilidad clínica?

Bibliografía

- Danziger J, Zeidel ML. Osmotic homeostasis. Clin J Am Soc Nephrol. 2015; 10(5): 852-62. doi: 10.2215/CJN.10741013.
- Díaz Mora JJ, Echezuria L, Petit de Molero N, Cardozo MA, Arias A, Rísquez A. Diarrea aguda: epidemiología, concepto, clasificación, clínica, diagnóstico, vacuna contra rotavirus. Arch Venez Pueric Pediatr 2014; 77(1): 29-40.
- Hooper L, Bunn D, Jimoh FO, Fairweather-Tait SJ. Water-loss dehydration and aging. Mech Ageing Dev. 2014; 136-137: 50-8. doi: 10.1016/j.mad.2013.11.009.
- Olay-Fuentes G, Díaz-Piedra P, Hernández-Gómez R, Cervantes-Villagrana RD, Presno-Bernal JM, Alcántara-Gómez LE. Determinación de intervalos de referencia para química clínica en población mexicana. Rev Latinoam Patol Clin 2013; 60(1): 43-51.
- de Arriba de la Fuente G. Balance hidrosalino. Medicine. 2011;10(80):5412-8
- Peruzzo M, Milani GP, Garzoni L, Longoni L, et al. Body fluids and salt metabolism - Part II. Ital J Pediatr 2010; 36: 78. doi: 10.1186/1824-7288-36-78.
- Bianchetti MG, Simonetti GD, Bettinelli A. Body fluids and salt metabolism - Part I. Ital J Pediatr 2009; 35:36 doi:10.1186/1824-7288-35-36.
- Díaz-Mora JJ, Madera M, Pérez Y, García M, León K, Torres M. Generalidades en diarrea aguda. Arch Venez Pueric Pediatr 2009; 72(4): 139-45.
- Pizarro-Torres D. Alteraciones hidroelectrolíticas y ácido-base más frecuentes en el paciente con diarrea. Bol Med Hosp Infant Mex 2005; 62: 57-68.

Manejo de residuos

Debido a que se manejan muestras biológicas y reactivos químicos, los residuos deben ser tratados y desechados con base a lo establecido en la Norma Oficial Mexicana NOM-087-SEMARNAT-SSA1-2002, Protección ambiental-salud ambiental-residuos peligrosos biológico-infecciosos y el procedimiento SGC-FESZ-PO06. Para ello deben seguirse las indicaciones especificadas en este manual, según corresponda. Los residuos biológicos deberán colocarse en la zona roja y los químicos en la zona amarilla marcada en el laboratorio, y serán recolectados por el Departamento encargado de esta actividad siguiendo el calendario previamente elaborado por el Coordinador del Área.

Práctica 6

METABOLISMO MINERAL Y ÓSEO

Objetivos

- Reconocer los diferentes métodos para la cuantificación de calcio y fosfato como componentes del metabolismo mineral y óseo.
- Aplicar los métodos colorimétricos de determinación de calcio y fosfato.
- Interpretar los resultados en el contexto clínico.

Introducción

El metabolismo mineral es la parte fisiológica relacionada con el mantenimiento de la integridad ósea, la cual es dependiente de tres iones: calcio, fosfato y magnesio, y las hormonas relacionadas con su metabolismo; de ahí que las concentraciones plasmáticas de estos tres componentes son dependientes del balance neto del depósito mineral óseo y su resorción, la absorción intestinal y la excreción renal.

El hueso está en constante remodelación a través de la hormona paratiroidea (PTH por sus siglas en inglés) que se encarga de la resorción ósea del hueso viejo, y la calcitonina que forma el hueso nuevo, este mecanismo libera estos iones a la circulación. Adicionalmente, los metabolitos de la vitamina D, principalmente el 1-25 dihidrocolecalciferol, tienen una acción importante en la absorción intestinal y la resorción ósea; además, las tres hormonas actúan a nivel renal de manera complementaria, manteniendo el nivel plasmático de calcio, fosfato y magnesio ionizados. Por lo que, con fines de diagnóstico, en el ámbito clínico se hace la solicitud de un perfil del metabolismo mineral que abarca la medición de estos tres iones.

En el organismo, el mantenimiento del nivel sérico de estos componentes en forma ionizada es necesario para diversas funciones como excitabilidad muscular y cardiaca, transmisión nerviosa, funcionalidad enzimática, entre otras acciones que son dependientes de los iones en cuestión.

Debido al importante papel del riñón para el balance mineral, principalmente de calcio y fosfato, también la medición de estos iones es básica en el seguimiento de la enfermedad renal crónica (ERC), ya que se ha descrito un desorden sistémico del metabolismo mineral y óseo debido a este padecimiento. Esta patología integra todas las alteraciones bioquímicas, esqueléticas y las calcificaciones extraesqueléticas, que resultan de los cambios del metabolismo mineral en la ERC.

Es por ello que la medición de los iones del metabolismo mineral tiene una amplia aplicación, y como el metabolismo de calcio y fosfato están tan íntimamente ligados, se justifica examinarlos al mismo tiempo.

6.1 CALCIO

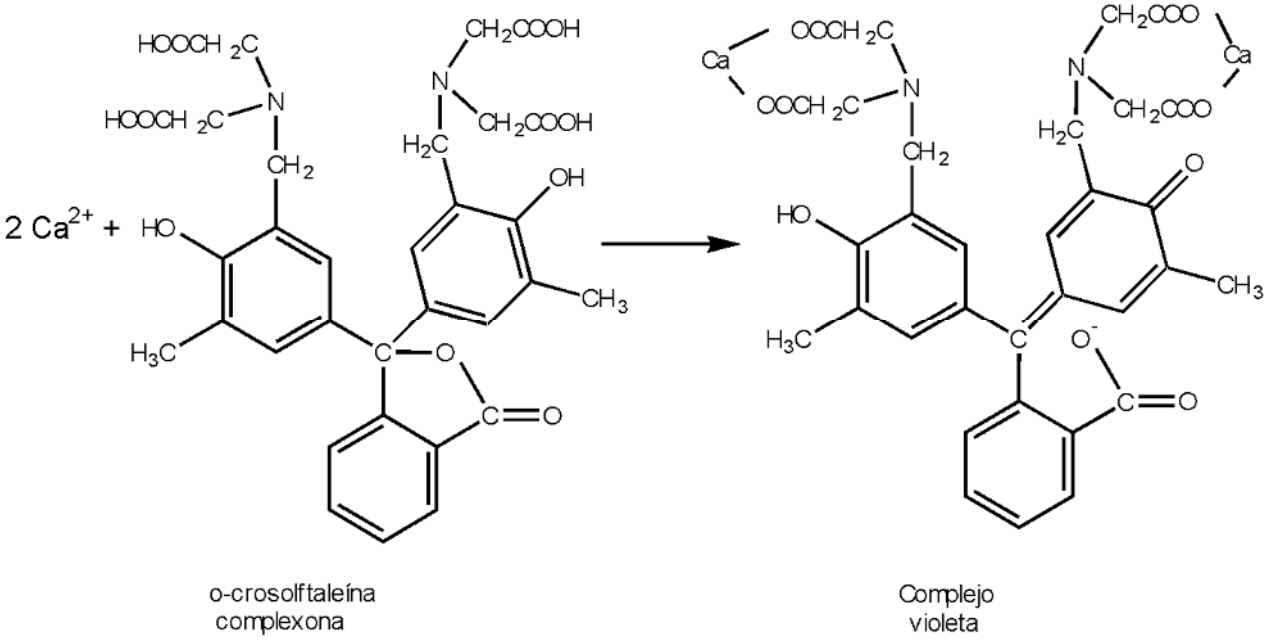
MÉTODO DE REACCIÓN CON UN INDICADOR

Se han empleado varios indicadores específicos para calcio que cambian de color en presencia o ausencia de éste, como el purpurato amónico (murexida) que es de color púrpura azulado en ausencia del ion y rosa en su presencia; negro eriocromo T [ác. 1-(1 hidroxi-2-naftilazo)-5-nitro-2-naftol-4-sulfónico] que da un color rojo cuando el pH es inferior a 6.3 y azul cuando es superior a esta cifra; y la o-cresolftaleína complexona (metalftaleína de Schwarzenbach) que forma un complejo color rojo con el calcio a pH entre 10 y 12. Este último es el más utilizado en la rutina actualmente.

Fundamento

En solución alcalina el calcio ionizado (Ca^{2+}) forma un complejo violeta con la o-cresolftaleína complexona.

Reacción:



o-crosolftaleína complexona

Complejo violeta

Figura 8. Formación del complejo de calcio con o-cresolftaleína complexona. Tomado de: AMBC, 1989.

Material y reactivos

- Suero o plasma heparinizado.
- Estuche comercial para la determinación de calcio por el método de reacción con o-cresolftaleína complexona.

Equipo

- Espectrofotómetro

Servicios

- Energía eléctrica
- Agua

Técnica
Seguir al pie de la letra las instrucciones del estuche comercial disponible.

Cálculos: los indicados en el instructivo del estuche comercial empleado.

Factores de conversión:

$$\frac{mmol}{L=\frac{mg}{dL\ X\ 0.25}}$$

$$\frac{mg}{dL = \frac{mmol}{L\ X\ 4.0}}$$

$$\frac{mmol}{L = \frac{mEq}{L\ X\ 0.5}}$$

$$\frac{mEq}{L=\frac{mmol}{L\ X\ 2.0}}$$

Valores de referencia:

Muestra	Tradicional*	SI
Suero o plasma		

0 – 12 años	9.2 – 10.9 mg/dL	2.3 – 2.7 mmol/L
> 12 años	8.7 – 10.3 mg/dL	2.2 – 2.6 mmol/L

*Para población mexicana. Tomado de: Olay-Fuentes G, 2013.

6.2 FOSFATO
MÉTODO COLORIMÉTRICO

El proceso de formación del azul de molibdeno es bastante complejo e indudablemente heterogéneo. Las distintas técnicas de reducción propuestas difieren fundamentalmente en el agente reductor utilizado: cloruro estanoso, fenilhidrazina, hidroquinona, ác. aminonaftolsulfónico, ác. ascórbico, p-metilaminofenol y N-fenilenediamina.

El p-metilaminofenol (Elon), produce un color con bastante tolerancia ácida, muy estable y con una sensibilidad considerable, por lo que es un método recomendable para estandarizar en el laboratorio.

Fundamento

El fosfato inorgánico presente en el suero y otros líquidos corporales forma fosfomolibdato con molibdato de sodio. Por reducción con ácido aminonaftolsulfónico se transforma el fosfomolibdato en azul de molibdeno. La cantidad de azul de molibdeno formado es proporcional a la de fosfato inorgánico existente.

Reacción:

$$PO_4^{3-} + Na_2MoO_4 \downarrow \quad \underset{\text{Molibdato de sodio}}{} \qquad Na_2[P(Mo_3O_{10})_4] \quad \underset{\text{Fosfomolibdato de sodio}}{}$$

$$Na_2[P(Mo_3O_{10})_4] + \text{p-metilaminofenol} \downarrow \qquad \text{Azul de molibdeno}$$

Figura 9. Reacciones llevadas a cabo en la determinación de fosfato por el método de azul de molibdeno.

Material y reactivos

- Suero, plasma u orina diluida. La orina se prepara añadiendo 1.0 mL de HCl al 25% a 1.0 mL de orina y se completa con agua destilada hasta 20 mL o 50 mL. Después de mezclar se toman 0.1 mL de esta solución para su análisis.

- Estuche comercial para la determinación de fósforo por el método colorimétrico.

Equipo

- Espectrofotómetro

Servicios

- Energía eléctrica
- Agua

Técnica

El indicado por la casa comercial del estuche que se disponga, deben seguirse las instrucciones exactamente.

Cálculos: los indicados en el instructivo de la casa comercial.

Factores de conversión: $\frac{mmol}{L=\frac{mg}{dL\ X\ 0.322}}$

$$\frac{mg}{dL = \frac{mmol}{L\ X\ 3.097}}$$

Valores de referencia

Muestra	Tradicional	SI
Suero		
Niños	4.0 – 7.0 mg/dL	1.3 – 2.3 mmol/L
Adultos*	2.3 – 6.0 mg/dL	0.7 – 1.9 mmol/L
Orina	0.7 – 1.5 g/24 h	225 – 483 mmol/L
LCR	0.9 – 2.0 mg/dL	0.3 – 0.6 mmol/L

*Para población mexicana. Tomado de: Olay-Fuentes G, 2013.

Resultados: Obtener el resultado de la concentración de ambos componentes de la muestra analizada e indicar si el valor se encuentra dentro de rango normal o patológico.

Seminario: RAQUITISMO

Cuestionario

1. ¿En qué padecimientos se encuentran aumentados y disminuidos ambos iones y cuál es su relación?
2. ¿Qué importancia tiene la cuantificación de calcio urinario?
3. Explique, ¿cómo interviene la vitamina D en el metabolismo de ambos iones?
4. ¿Qué otros hallazgos de laboratorio e imágenes complementan el diagnóstico de raquitismo?
5. ¿Qué es la osteoporosis y cuál es la diferencia con el raquitismo/osteomalasia?

Bibliografía

- Gentile C, Chiarelli F. Rickets in children: an update. Biomedicines. 2021; 9(7): 738. doi: 10.3390/biomedicines9070738.
- Chanchlani R, Nemer P, Sinha R, Nemer L, Krishnappa V, Sochett E, et al. An overview of rickets in children. Kidney Int Rep. 2020; 5(7): 980-990. doi: 10.1016/j.ekir.2020.03.025.
- Llavero Valero M, Gargallo Vaamonde J, Botella Martínez S, de la Higuera López-Frías M. Osteoporosis. Medicine. 2018;12(69):4062-74
- Manzano Canabal G, Acosta de la Vega ME, Hidalgo Calleja C, Montilla Morales C, del Pino-Montes J. Protocolo diagnóstico y tratamiento de la osteomalacia. Medicine. 2018; 12(60): 3542-6
- Sosa Henríquez M, Gómez de Tejada Romero MJ. Osteoporosis. Medicine. 2018;12(60):3499-505.
- Song L. Calcium and bone metabolism indices. Adv Clin Chem. 2017; 82. doi: 10.1016/bs.acc.2017.06.005
- Uday S, Högler W. Nutritional rickets and osteomalacia in the twenty-first century: revised concepts, public health, and prevention strategies. Curr Osteoporos Rep. 2017; 15(4): 293-302. doi: 10.1007/s11914-017-0383-y.
- Wintermeyer E, Ihle C, Ehnert S, Stöckle U, et al. Crucial role of vitamin D in the musculoskeletal system. Nutrients 2016; 8: 319. doi:10.3390/nu8060319
- Restrepo-Giraldo LM, Arévalo-Novoa J, Toro-Ramos M. Metabolismo mineral y óseo: visión general y sus métodos de medición. Med Lab. 2015; 21(11-12): 511-37.
- Christodoulou S, Goula T, Ververidis A, Drosos G. Vitamin D and bone disease. BioMed Res Int 2013; 2013. doi: 10.1155/2013/396541
- Olay-Fuentes G, Díaz-Piedra P, Hernández-Gómez R, Cervantes-Villagrana RD, Presno-Bernal JM, Alcántara-Gómez LE. Determinación de intervalos de referencia para química clínica en población mexicana. Rev Latinoam Patol Clin 2013; 60(1): 43-51.

- Prince RL, Glendanning P. 8: Disorders of bone and mineral other than osteoporosis. Med J Aust. 2004; 180(7): 354-9. doi: 10.5694/j.1326-5377.2004.tb05977.x.
- Takeda E, Yamamoto H, Nashiki K, Sato T, Arai H, Taketani Y. Inorganic phosphate homeostasis and the role of dietary phosphorus. J Cell Mol Med 2004; 8: 191-200. doi: 10.1111/j.1582-4934.2004.tb00274.x.

Manejo de residuos

Debido a que se manejan muestras biológicas y reactivos químicos, los residuos deben ser tratados y desechados con base a lo establecido en la Norma Oficial Mexicana NOM-087-SEMARNAT-SSA1-2002, Protección ambiental-salud ambiental-residuos peligrosos biológico-infecciosos y el procedimiento SGC-FESZ-PO06. Para ello deben seguirse las indicaciones especificadas en este manual, según corresponda. Los residuos biológicos deberán colocarse en la zona roja y los químicos en la zona amarilla marcada en el laboratorio, y serán recolectados por el Departamento encargado de esta actividad siguiendo el calendario previamente elaborado por el Coordinador del Área.

Práctica 7

ELEMENTOS TRAZA

Objetivos

– Reconocer el papel y la importancia de los elementos traza en el organismo.
– Determinar la concentración de hierro en una muestra biológica, como ejemplo de los elementos traza.

Introducción

El aumento fenomenal del conocimiento tanto básico como aplicado acerca de los *elementos traza* sigue constituyendo una sorpresa tanto para los investigadores como para los clínicos. Los avances en la bioquímica, la biología molecular, los métodos analíticos y la inmunología han enriquecido el campo de la investigación de los llamados *oligoelementos* o *elementos traza.*

Cada nutriente esencial tiene un rango característico de concentraciones tisulares y de ingestas compatibles con el mantenimiento de funciones y de salud satisfactorias. Un objetivo fundamental de la investigación en la nutrición es definir los niveles de ingesta que son seguros desde el punto de vista de toxicidad y adecuados para satisfacer los requerimientos.

El requerimiento absoluto de un nutriente es la cantidad promedio que debe ser absorbida diariamente para mantener las funciones específicas, principalmente enzimáticas, que dependen de dicho elemento, estas funciones no mejoran, aunque los niveles de ingesta se sigan aumentando, convirtiéndose en tóxicos pues en su mayoría son metales que no se eliminan fácilmente.

Tanto en el caso de los elementos aniónicos como catiónicos, el organismo responde a los niveles excesivos de ingesta aumentando la excreción y, en algunos casos, disminuyendo la absorción intestinal. En el caso de las moléculas aniónicas de pequeño tamaño, el exceso que no se puede excretar es almacenado rápidamente en los parénquimas; los elementos catiónicos están sometidos a un control homeostático más estricto ya que sólo se produce su entrada excesiva a los parénquimas cuando se sobrepasa la capacidad de transporte y almacenamiento en las proteínas específicas. Investigaciones efectuadas durante la última década han identificado como *oligoelementos* a algunos que habían sido considerados tóxicos en el pasado, como: selenio, cromo, níquel, arsénico y posiblemente el plomo y el cadmio, pero siempre manteniendo niveles muy bajos.

Uno de los metales esenciales para el organismo es el hierro, que forma parte de la hemoglobina, por ello será el elemento traza que servirá de ejemplo.

HIERRO SÉRICO

Existen pruebas irrefutables de que el suero o plasma contiene más hierro atribuible a la hemoglobina. Este "hierro sérico" ha recibido diferentes nombres según los autores, habiéndole llamado: hierro no hemoglobínico**,** hierro de transporte, hierro débilmente conjugado o hierro ultrafiltrable.

Casi la totalidad del hierro en suero está unida a una β-globulina, la transferrina*,* en forma de un complejo Fe^{3+}-proteína, el resto está conjugado con aminoácidos libres; por lo que la mayoría de las técnicas para la determinación de hierro sérico involucran la ruptura del complejo hierro-proteína con HCl.

También se ha demostrado que el Fe^{3+} es coprecipitado con las proteínas séricas por el ácido tricloroacético (TCA), en tanto que el Fe^{2+} no lo es.

Entre los reactivos utilizados para la cuantificación espectrofotométrica del hierro están: tiocianato, 1,10-fenantrolina y 4,7-difenil-1,10-fenentrolina (bato-fenantrolina), siendo este último es más utilizado en la rutina.

Fundamento:

El hierro unido a proteínas es escindido en un amortiguador de fosfatos débilmente ácido. Se reduce el Fe^{3+} a Fe^{2+} con ascorbato de sodio y se forma un complejo rojo con batofenantrolina sulfonada.

Reacción:

$$\text{Transferina-}Fe^{3+} \xrightarrow{H^+} Fe^{3+} + \text{Transferrina}$$

$$Fe_{3+} + \text{Ascorbato de sodio} \rightarrow \text{Batofenantrolina} + Fe_{2+}$$

Complejo

sulfonada

rojo

Figura 10. Reacciones para cuantificar el hierro por el método de batofenantrolina.

Material y reactivos

- Suero reciente no hemolizado.
- Estuche comercial para la determinación de hierro sérico por el método colorimétrico de batofenantrolina.

Equipo

- Espectrofotómetro

Servicios

- Energía eléctrica
- Agua

Técnica

Es dependiente del estuche comercial disponible. Seguir al pie de la letra el instructivo.

Cálculos: los indicados en el instructivo del estuche utilizado.

Factores de conversión: $L = \frac{\frac{\mu mol}{\mu g}}{dL\ X\ 0.179}$

$$dL = \frac{\frac{\mu g}{\mu mol}}{L\ X\ 5.585}$$

Valores de referencia:

Muestra	Tradicional*	SI
Suero		
Mujeres	10 – 150 μg/dL	1.8 – 26.9 μmol/L
Hombres	15 – 167 μg/dL	2.7 – 29.9 μmol/L

*Para población mexicana. Tomado de: Olay-Fuentes G, 2013.

Resultados: Obtener el resultado de la concentración de la muestra analizada e indicar si el valor se encuentra dentro de rango normal o patológico.

Seminario: ELEMENTOS TRAZA E INTOXICACIÓN POR METALES PESADOS

Cuestionario

1. ¿Cuál es la importancia del plomo, cromo, cobre, zinc y hierro en el organismo?
2. ¿En qué muestras pueden cuantificarse estos metales?
3. ¿En qué casos se cuantifica el hierro sérico y por qué?
4. ¿Cuáles son las consecuencias del exceso de hierro en el organismo? Explique el mecanismo.
5. Realice un cuadro que incluya las fuentes de origen, los síntomas y los trastornos que provoca la intoxicación por plomo, arsénico y mercurio.

Bibliografía

- Balali-Mood M, Naser K, Tahergorabi Z, Khazdair MR, Sadeghi M. Toxic mechanisms of five heavy metals: mercury, lead, chromium, cadmium, and arsenic. Front Pharmacol. 2021; 12: 643972. doi: 10.3389/fphar.2021.643972.
- Neira-Moscoso C, Rojas-Sánchez JM, Rodas-Espinoza C. Metales pesados. Coloquio. 2021; 66: 73-77.
- Cannas D, Loi E, Serra M, Firinu D, Valera P, Zavattari P. Relevance of essential trace elements in nutrition and drinking water for human health and autoimmune disease risk. Nutrients. 2020; 12: 2074. doi: 10.3390/nu12072074
- Mehri A. Trace elements in human nutrition (II) – An update. Int J Prev Med 2020; 11: 2. doi: 10.4103/ijpvm.IJPVM_48_19.
- Mayans L. Lead poisoning in children. Am Fam Physician. 2019; 100(1): 24-30.

- Mochizuki H. Arsenic neurotoxicity in humans. Int J Mol Sci. 2019; 20(14): 3418. doi: 10.3390/ijms20143418.
- Hon KL, Fung CK, Leung AK. Childhood lead poisoning: an overview. Hong Kong Med J. 2017; 23(6): 616-21. doi: 10.12809/hkmj176214.
- Perel C, Bevacqua RJ. Deficiencia de hierro e insuficiencia cardíaca. Insuf Card 2016; 11(2): 78-97.
- Peyrin-Biroulet L, Williet N, Cacoub P. Guidelines on the diagnosis and treatment of iron deficiency across indications: a systematic review. Am J Clin Nutr 2015; 102: 1585-94. doi: 10.3945/ajcn.114.103366.
- Tirado LR, González-Martínez FD, Martínez LJ, Wilches LA, Celedón-Suárez JN. Niveles de metales pesados en muestras biológicas y su importancia en salud. Rev Nac Odontol. 2015;11(21):83-99. doi: 10.16925/od.v11i21.895.
- Hiroshi Saito. Metabolism of iron stores. Nagoya J Med Sci 2014; 76: 235-54
- Ruiz-Delgado GJ. Deficiencia de hierro. Rev Hematol Mex 2014; 15: 85-86.
- Bernhoft RA. Mercury toxicity and treatment: a review of the literature. J Environ Public Health. 2012; 2012: 460508. doi: 10.1155/2012/460508.
- Tchounwou PB, Yedjou CG, Patlolla AK, Sutton DJ. Heavy metal toxicity and the environment. Exp Suppl. 2012; 101: 133-64. doi: 10.1007/978-3-7643-8340-4_6.
- Ganz T, Nemeth E. Iron metabolism: interactions with normal and disordered erythropoiesis. Cold Spring Harb Perspect Med 2012; 2: a011668. doi: 10.1101/cshperspect.a011668.
- McDermid JM. Iron. Adv Nutr 2012; 3: 532-3. doi: 10.3945/an.112.002261.

Manejo de residuos

Debido a que se manejan muestras biológicas y reactivos químicos, los residuos deben ser tratados y desechados con base a lo establecido en la Norma Oficial Mexicana NOM-087-SEMARNAT-SSA1-2002, Protección ambiental-salud ambiental-residuos peligrosos biológico-infecciosos y el procedimiento SGC-FESZ-PO06. Para ello deben seguirse las indicaciones especificadas en este manual, según corresponda. Los residuos biológicos deberán colocarse en la zona roja y los químicos en la zona amarilla marcada en el laboratorio, y serán recolectados por el Departamento encargado de esta actividad siguiendo el calendario previamente elaborado por el Coordinador del Área.

Práctica 8

ANÁLISIS GASOMETRICO

Objetivos

– Identificar los componentes de un análisis gasométrico.

- Distinguir los cuidados que deben tenerse en la toma y conservación de las muestras.
- Discutir los diferentes métodos empleados para realizarlo y los marcadores incluidos.

Introducción

El análisis gasométrico, gasometría o análisis de gases en sangre, suele llevarse a cabo a fin de evaluar el estado ácido-base o el estado de oxigenación respiratoria del paciente. Los parámetros básicos de un análisis gasométrico son: presión parcial de CO_2 (pCO_2), presión parcial de O_2 (pO_2), pH, CO_2 total y concentración de bicarbonato (HCO_3^-), aunque hay instrumentos que miden además la saturación de O_2 (sO_2) en la hemoglobina y calculan el exceso de base.

Se ha incluido a este panel la medición de lactato. Cuando el exceso de hidrogeniones no puede ser neutralizado por el metabolismo ácido-básico, hay un incremento de lactato que produce acidosis láctica, término utilizado cuando el pH arterial disminuye con una hiperlactinemia. Se ha reportado que el lactato sanguíneo tiene una correlación positiva con la morbi-mortalidad a corto y largo plazo, de ahí la importancia de su medición.

La gasometría en la actualidad se realiza con microelectrodos, amperímetros y co-oxímetros, sustituyendo los equipos cuyo principio de medición del gas es manométrico (diferencia de presiones a volumen y temperatura constantes) o volumétrico (diferencia de volúmenes a presión y temperatura constantes).

Dentro de las consideraciones a tomar en cuenta cuando se hace un análisis gasométrico es la temperatura y la altura del lugar en donde se está realizando y de dónde reside el paciente. Si no se efectúa el análisis a la temperatura especificada, ha de aplicarse un factor de corrección; y la altura es importante para la interpretación, ya que cambian los valores de referencia.

En la actualidad, la mayoría de los analizadores de gases en sangre disponibles requieren de muestras de sangre total de menos de 250 μL y miden simultáneamente pH, pCO_2 y pO_2; aspiran la muestra automáticamente, reduciendo así errores provenientes de la introducción manual, y algunos incluyen el lactato. Muchos son controlados por microprocesadores, de modo que la calibración es automática, a intervalos prefijados, y una vez completado el análisis se muestran en una pantalla los parámetros medidos y los calculados.

También se han desarrollado instrumentos no invasores que miden pO_2 y pCO_2, a través de electrodos transcutáneos que tienen una excelente correlación con la técnica automatizada. La dificultad que plantea el uso de rutina del electrodo transcutáneo de pCO_2 es que no provee una medición de pH para la evaluación completa del estado ácido-base.

Material y reactivos

- No aplica

Equipo

- No aplica

Servicios

- No aplica

Técnica

Por carecer del equipo para hacer la medición, esta actividad será únicamente de seminario.

Factores de conversión: $kPa = mmHg\ X\ 0.133$

El pH en unidades SI se expresa en concentración de hidrogeniones (H^+), recordando que:

$$pH = -log\ log\ [H^+]$$
$$[H^+] = antilog\ (-pH)$$

Valores de referencia:

Parámetro	Sangre arterial	Sangre venosa
pH*	7.41 – 7.48	7.39 – 7.44
Concentración de hidrogeniones (nmol/L)*	33 – 39	36 – 41
pCO_2 (mmHg)*	27 – 33	31 – 38
(kPa)*	3.6 – 4.4	4.1 – 5.0
pO_2 (mm Hg)*	56 – 70	30 – 35
(kPa)*	7.4 – 9.3	4.0 – 4.6
CO_2 (mmol/L)	23 – 27	25 – 29
HCO_3^- (mmol/L)	22 – 26	24 – 28

*Altura de la ciudad de México (~ 2200 m/NM)

Resultados: No aplica.

Seminario: ANÁLISIS GASOMÉTRICO

Cuestionario

1. ¿Qué tipo de muestra se toma para la determinación de gases sanguíneos y que cuidados preanalíticos deben tenerse al hacerlo?
2. ¿Hay alguna diferencia entre la medición de una gasometría en sangre venosa y en sangre arterial? Explique y fundamente su respuesta.
3. ¿Cuál es el fundamento para la determinación de cada uno de los parámetros medidos y calculados en la gasometría?
4. ¿Qué es el efecto Bohr? Realice un esquema que muestre las curvas de disociación de la hemoglobina en función del pH y la cantidad de CO_2.
5. Mencione la clasificación de la acidosis láctica y sus causas.

Bibliografía

- Pino RM, Singh J. Appropriate clinical use of lactate measurements. Anesthesiology. 2021; 134(4): 637-44. doi: 10.1097/ALN.0000000000003655.
- Mangasa A, Oliverd P, Casitasa R, Laordena D. Indicaciones e interpretación diagnóstica de la gasometría arterial. Medicine. 2018; 12(66): 3898-902
- Seheult J, Fitzpatrick G, Boran G. Lactic acidosis: an update. Clin Chem Lab Med. 2017; 1; 55(3): 322-33. doi: 10.1515/cclm-2016-0438.
- Dukić L, Kopčinović LM, Dorotić A, Baršić I. Blood gas testing and related measurements: National recommendations on behalf of the Croatian Society of Medical Biochemistry and Laboratory Medicine. Biochem Med (Zagreb). 2016; 15; 26(3): 318-36. doi: 10.11613/BM.2016.036.
- Wagner PD. The physiological basis of pulmonary gas exchange: implications for clinical interpretation of arterial blood gases. Eur Respir J. 2015; 45(1): 227-43. doi: 10.1183/09031936.00039214.
- Byrne AL, Bennett M, Chatterji R, Symons R, Pace NL, Thomas PS. Peripheral venous and arterial blood gas analysis in adults: are they comparable? A systematic review and meta-analysis. Respirology 2014: 19: 168-75. doi: 10.1111/resp.12225.
- Baird G. Preanalytical considerations in blood gas analysis. Biochem Med 2013; 23(1): 19-27. doi: 10.11613/bm.2013.005.
- Pérez-Padilla JR, Vázquez-García JC. Estimación de los valores gasométricos en diferentes alturas sobre el nivel del mar en México. Rev Invest Clin 2000; 52(2): 148-55.

Manejo de residuos

No aplica.

Práctica 9

PERFIL BIOQUÍMICO RENAL

Objetivos

- Reconocer los componentes de un perfil bioquímico renal.
- Determinar los componentes séricos del perfil renal.
- Reconocer el papel de estas mediciones como elementos de diagnóstico de problemas renales.

Introducción

Existen numerosos síndromes que, aislados o en combinación, tienen la posibilidad de provocar un daño renal.

La evaluación del daño renal se lleva a cabo por la medición de varios componentes séricos y la orina, lo que conforma los perfiles renales. Son dos los perfiles renales, uno que se encarga de ver la funcionalidad del riñón evaluando sus tres principales actividades: filtración, eliminación y concentración; y el perfil bioquímico renal conformado por las principales sustancias nitrogenadas no proteicas (nitrógeno ureico o urea, ácido úrico y creatinina); además del examen general de orina (EGO), aunque este último puede realizarse como un estudio independiente del perfil.

El perfil bioquímico renal es más solicitado por los médicos que el de funcionamiento, porque como consecuencia de una menor función renal, se observan mayores concentraciones de sus componentes y alteraciones en la orina; forma parte de la llamada química sanguínea, por lo que muchos profesionales de la salud no identifican que se trata de un perfil específico.

Por su parte, el perfil de funcionamiento renal es solicitado por los especialistas, ya que es más específico y ayuda a aclarar el diagnóstico de un daño renal.

El diagnóstico de enfermedad renal se hace en gran medida en el laboratorio de química clínica, ya que los signos y síntomas clínicos pueden ser mínimos o faltar totalmente, y aún, cuando los hubiera, no siempre reflejan la gravedad o el pronóstico al paciente y pueden ser confundidos con los originados en otro órgano cercano; por ello, las pruebas que miden la retención de compuestos nitrogenados no proteínicos en plasma son de suma importancia. Mediante la determinación de los síntomas clínicos de un individuo y de las anormalidades en los resultados de laboratorio, el clínico intenta establecer el diagnóstico del trastorno renal presente.

Así mismo, la medición de la urea y la creatinina es básica para el seguimiento y pronóstico de una enfermedad renal establecida, ayuda a la diferenciación de si es aguda o crónica, al establecimiento del tratamiento y seguimiento del tratamiento, dentro de las acciones más importantes.

Cabe mencionar que la alteración en los componentes del perfil bioquímico renal también puede presentarse en eventos no renales, por lo que el químico clínico debe conocer cómo diferenciarlos.

9.1 UREA

La urea es el producto final principal del metabolismo proteínico. Se forma en el hígado, se vierte a la sangre y es eliminada por el riñón. Constituye aproximadamente el 45% del nitrógeno no proteico total del suero o plasma.

La cantidad producida está acelerada por una dieta con elevado contenido proteico o bien por un aumento del catabolismo proteico endógeno, debido a una desnutrición grave o a un daño hístico.

La capacidad del riñón normal para excretar urea es notable, y en presencia de una función renal normal, solo las dietas extremadamente ricas en proteínas pueden originar un aumento de la uremia superior a los niveles de referencia.

Los métodos para la determinación de urea pueden dividirse actualmente en dos:

- Indirectos: Determinación del amonio resultante por acción de la ureasa sobre la urea.
- Enzimáticos/acoplados: Medición, a través de reacciones acopladas, de un producto formado que es directamente proporcional a la concentración de urea.

Debido a que los resultados del análisis de urea en sangre se expresaba originariamente en términos de nitrógeno liberado, la concentración de urea se reportaba en mg de nitrógeno de urea (BUN, *Blood Urea Nitrogen*)/volumen. Lamentablemente, esta forma ha sobrevivido a los años y los cambios en la metodología, por lo que actualmente, aunque el fundamento de las técnicas sea diferente, continúa su uso; además, si reportamos los resultados en unidades SI, el cálculo en mmol/L es en función el nitrógeno ureico.

Las técnicas indirectas son llamadas así porque no se cuantifica directamente el metabolito, sino algún producto de degradación o el de otra reacción. Las técnicas indirectas para la urea recurren a la enzima ureasa (*urea amidohidrolasa*, E.C. 3.5.1.5.) para descomponer la urea en amonio y CO_2. Después de la reacción se cuantifica cualquiera de los dos productos de reacción, principalmente el amonio. La reacción más comúnmente empleada es la del indofenol de Berthelot, el cual cuantifica el ion amonio producto de la reacción. Existen comercialmente algunas modificaciones al método de Berthelot, y la diferencia radica en los reactivos utilizados para cuantificar el amonio, formando productos más estables y con técnicas menos complicadas.

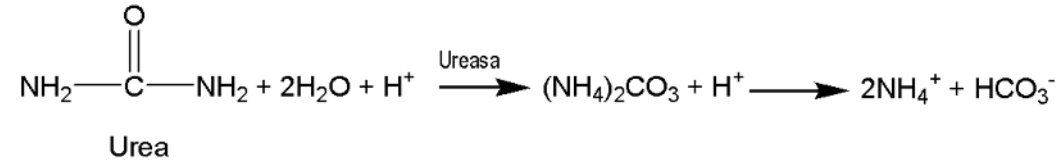
Así mismo, hoy en día existe comercialmente otro método enzimático que utiliza glutamato deshidrogenasa (GLDH) y NADH en una medición indirecta, pero tiene la desventaja que deben hacerse las lecturas a 340 nm. Otro método comercial colorimétrico es una medición directa de la urea aprovechando su propiedad de modificar al *o*-ftalaldehído, técnica que se está haciendo muy popular por su sencillez, precisión y rapidez, es un método cinético.

9.1.1 MÉTODO DE BERTHELOT

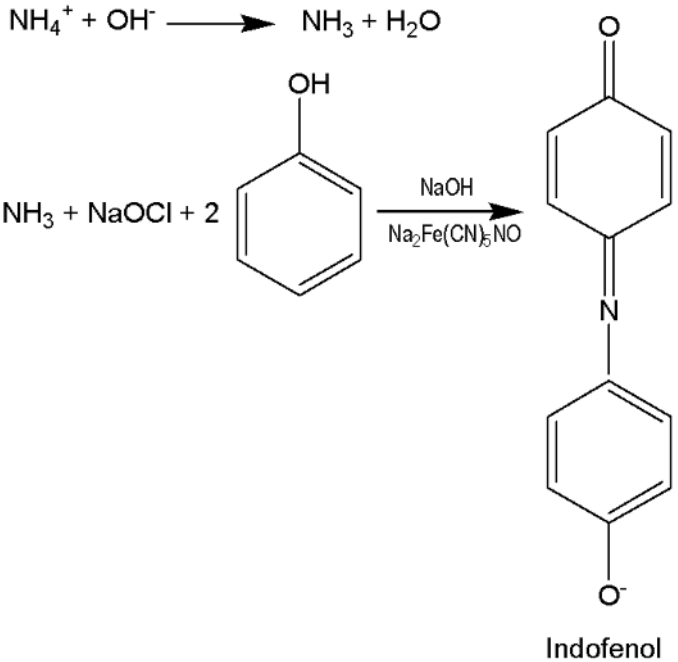
Fundamento:

La ureasa hidroliza la urea en amonio y anhídrido carbónico; el amonio liberado reacciona con fenol e hipoclorito de sodio para formar p-quinonacloramina; ésta, con una segunda molécula de fenol, produce un compuesto indofenólico de color azul, cuya intensidad es proporcional a la cantidad de urea presente. La reacción se activa en presencia de nitroprusiato de sodio.

Reacción:



Urea



Indofenol

Figura 12. Reacción de la urea por el método de Berthelot. Tomado de: Pesce y Kaplan, 1990.

La reacción ha sido modificada para que se pueda introducir a un autoanalizador, sustituyendo el fenol por salicilato de sodio y activando con nitroprusiato de sodio para formar el indofenol, por lo que el último paso de la reacción es:

$$NH4+ + \text{Salicilato de sodio} \xrightarrow{\text{Nitroprusiato de sodio}} \text{Indofenol}$$

Material y reactivos

- Suero o plasma.
- Estuche comercial para la determinación de urea por el método de Berthelot modificado.

Equipo

- Espectrofotómetro

Servicios

- Energía eléctrica
- Agua

Técnica

Ésta es dependiente del equipo comercial disponible. Debe seguirse al pie de la letra las instrucciones.

Cálculos: los indicados en el instructivo del estuche utilizado.

Factores de conversión: $\frac{N_2 uréico\ mmol}{L{=}urea\ \frac{mg}{dL\ X\ 0.166}}$

$$\frac{urea\ mg}{dL{=}N_2\ uréico\ \frac{mmol}{L\ X\ 6.006}}$$

$$\frac{N_2\ uréico\ mmol}{L = N_2 \frac{uréico\ mg}{dL\ X\ 0.357}}$$

$$N_2\ \frac{uréico\ mg}{dL{=}N_2\ uréico \frac{mmol}{L\ X\ 2.801}}$$

Valores de referencia:

Muestra		**Tradicional***	**SI†**
Suero o plasma			
Mujeres	0 – 50 años	13 – 41 mg/dL 6 – 19 mg N_2/dL	2.1 – 6.8 mmol/L
	> 50 años	17 – 56 mg/dL 8 – 26 mg N_2/dL	2.8 – 9.3 mmol/L
Hombres			
	0 – 50 años	15 – 43 mg/dL 7 – 20 mg N_2/dL	2.5 – 7.1 mmol/L
	> 50 años	19 – 58 mg/dL 9 – 27 mg N_2/dL	3.2 – 9.6 mmol/L
Relación BUN/Crea			
Mujeres		8.1 – 26.0	NA
Hombres		8.1 – 22.8	

*Para población mexicana. Tomado de: Olay-Fuentes G, 2013. †En unidades SI sólo son valores de nitrógeno uréico, no de urea.
N_2/dL: nitrógeno uréico (BUN); BUN/Crea: nitrógeno uréico/creatinina; NA: no aplica.

9.1.2 MÉTODO DE O-FTALALDEHÍDO

Fundamento:

La urea presente en la muestra reacciona con *o*-ftalaldehído en medio ácido originando un complejo colorido que absorbe a 510 nm. Es una medición directa, por lo que la intensidad del color formado es proporcional a la concentración de urea en la muestra ensayada.

Reacción:

$$\text{Urea} + \textit{o}\text{-ftalaldehído} \xrightarrow{H^+} \text{Isoindolina}$$

Material y reactivos

- Suero o plasma.
- Estuche comercial para la determinación de urea por el método *o*-ftalaldehído.

Equipo

- Espectrofotómetro

Servicios

- Energía eléctrica
- Agua

Técnica

Ésta es dependiente del estuche comercial disponible. Debe seguirse al pie de la letra las instrucciones.

Cálculos: los indicados en el instructivo del estuche utilizado.

Factores de conversión: los especificados en el método anterior.

Valores de referencia: los mismos que en el método anterior.

Resultados: Obtener el resultado de la concentración de la muestra analizada e indicar si el valor se encuentra dentro de rango normal o patológico.

Seminario: GLOMERULONEFRITIS AGUDA

Cuestionario

1. Realice un esquema del ciclo de la urea e indique las enzimas que participan.
2. ¿Qué hallazgos de laboratorio son importantes para el diagnóstico de glomerulonefritis aguda?
3. ¿Cuál es el papel de la proteinuria en el seguimiento de un paciente con glomerulonefritis aguda? Explique su respuesta.
4. ¿En qué otros padecimientos, a parte de la glomerulonefritis, se encuentran alteraciones del nitrógeno ureico?
5. ¿Cómo se clasifican las enfermedades renales crónicas?

Bibliografía

- Levey AS. Defining AKD: the spectrum of AKI, AKD, and CKD. Nephron. 2021; 1-4. doi: 10.1159/000516647. Online ahead of print.

- Ammirati AL. Chronic kidney disease. Rev Assoc Med Bras. 2020; 66(Suppl 1): s03-s09. doi: 10.1590/1806-9282.66.S1.3
- Mancha Ramos J, Blasco Medina A, Pérez Fernández M. Glomerulonefritis agudas y rápidamente progresivas. Medicine. 2019;12(80):4717-24
- Rodríguez Puyol D, Martínez Miguel P, de Arriba de la Fuente G. Glomerulopatías. Medicine. 2019; 12(80): 4711-6
- Couser WG. Pathogenesis and treatment of glomerulonephritis-an update. J Bras Nefrol. 2016; 38(1): 107-22. doi: 10.5935/0101-2800.20160016.
- Coronado CY, Echeverry I. Descripción clinicopatológica de las enfermedades glomerulares. Acta Med Colomb 2016; 41(2): 125-9.
- Floege J. Primary glomerulonephritis: A review of important recent discoveries. Kidney Res Clin Pract 2013; 32: 103-10. doi: 10.1016/j.krcp.2013.06.004.
- Olay-Fuentes G, Díaz-Piedra P, Hernández-Gómez R, Cervantes-Villagrana RD, Presno-Bernal JM, Alcántara-Gómez LE. Determinación de intervalos de referencia para química clínica en población mexicana. Rev Latinoam Patol Clin 2013; 60(1): 43-51.
- Bailie GR, Uhlig K, Levey AS. Clinical practice guidelines in nephrology: evaluation, classification, and stratification of chronic kidney disease. Pharmacotherapy 2005; 25: 491-502. doi: 10.1592/phco.25.4.491.61034.
- Isbel NM. Glomerulonephritis. Management in general practice. Aust Fam Physician 2005; 34(11): 907-13.
- Mathieson PW. Glomerulonephritis: is it worth worrying about? Clin Med 2005; 5: 264-6. doi: 10.7861/clinmedicine.5-3-264.
- Meyers CM, Geanacopoulos M, Holzman LB, Salant DJ. Glomerular disease workshop. J Am Soc Nephrol 2005; 16: 3472-6. doi: 10.1681/ASN.2005090899.
- Argote E, Castro AL, Otero LM. Glomerulonefritis. Colomb Med 2004; 35(1): 38-45.
- Kagedal B. Why “urea nitrogen” when urea is measured? [Letter] Clin Chem 1998; 44: 894-5.

Manejo de residuos

Debido a que se manejan muestras biológicas y reactivos químicos, los residuos deben ser tratados y desechados con base a lo establecido en la Norma Oficial Mexicana NOM-087-SEMARNAT-SSA1-2002, Protección ambiental-salud ambiental-residuos peligrosos biológico-infecciosos y el procedimiento SGC-FESZ-PO06. Para ello deben seguirse las indicaciones especificadas en este manual, según corresponda. Los residuos biológicos deberán colocarse en la zona roja y los

químicos en la zona amarilla marcada en el laboratorio, y serán recolectados por el Departamento encargado de esta actividad siguiendo el calendario previamente elaborado por el Coordinador del Área.

9.2 ÁCIDO ÚRICO
MÉTODO URICASA-PAP

El ácido úrico es el producto final del metabolismo de las purinas en el hombre, y es una de las sustancias nitrogenadas no proteicas. Parte del circulante es endógeno y parte es exógeno y principalmente se excreta por orina.

Las investigaciones efectuadas sobre la metodología de las determinaciones de ácido úrico se han encaminado a mejorar la especificidad de las técnicas. La reducción del ácido fosfotúngstico a azul de tungsteno por soluciones alcalinas de ácido úrico fue aplicada por primera vez al análisis de este compuesto en sangre en 1912, siendo aún un método utilizado en México.

En la búsqueda de mejores métodos, hace tiempo que se recurre a la enzima *uricasa* para aumentar la especificidad, aprovechando que, ésta oxida el ácido úrico a alantoína y peróxido de hidrógeno. La alantoína, a diferencia del ácido úrico, no posee un pico de absorción en la región de 290-293 nm del espectro de luz ultravioleta, por lo que se han empleado mediciones de absorción a estas longitudes de onda antes y después de la incubación de la muestra con *uricasa* para cuantificarlo, pero no todos los laboratorios tienen espectrofotómetros con capacidad de lectura en esas longitudes de onda, por lo que no es muy práctico para el análisis en rutina.

Una alternativa fue acoplar la reacción para la obtención de un compuesto colorido que sea más accesible para los laboratorios, desarrollándose un método que se basa en la oxidación del peróxido de hidrógeno, producto de la reacción, midiendo su respuesta cromogénica con varios oxidantes, el más utilizado

actualmente es la 4-aminofenazona, por lo que es un método PAP o Trinder adaptado a los autoanalizadores y por ello el método de rutina actualmente.

Fundamento:

Es una medición indirecta. El ácido úrico se convierte, catalizado por la *uricasa*, en alantoína y H_2O_2. El H_2O_2 formado, catalizado por la peroxidasa, oxida el ácido 3,5-dicloro-2-hidroxibencenosulfónico y la 4-aminofenazona para dar un compuesto de quinonaimina rojo-violeta que se mide espectrofotométricamente a 520 nm.

Reacción:

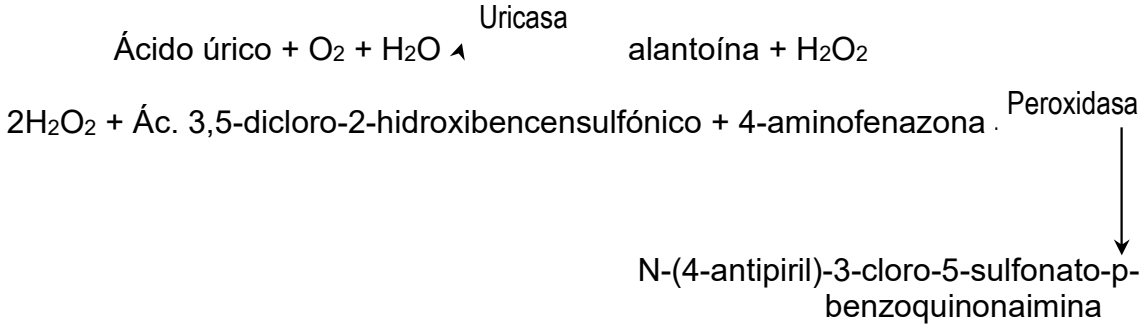


Figura 13. Reacciones para la determinación de ácido úrico por el método uricasa-PAP.

Material y reactivos

- Suero, plasma u orina diluida 1:10.
- Estuche comercial para la determinación de ácido úrico.

Equipo

- Espectrofotómetro

Servicios

- Energía eléctrica
- Agua

Técnica

Es dependiente del estuche comercial disponible. Seguir las indicaciones del inserto.

Cálculos: los indicados en el inserto del estuche utilizado.

Factores de conversión: $\mu mol = \frac{mg}{dL\ X\ 59.48}$

$$\frac{mg}{dL} = \mu mol\ X\ 0.016$$

Valores de referencia:

Muestra	Tradicional	SI
Suero*		
Mujeres	2.4 – 7.2 mg/dL	143 – 428 μmol/L
Hombres	3.2 – 9.2 mg/dL	190 – 547 μmol/L
Orina	250 – 750 mg/24 h	14.9 – 44.6 mmol/24 h

*Para población mexicana. Tomado de: Olay-Fuentes G, 2013.

Resultados: Obtener el resultado de la concentración de la muestra analizada e indicar si el valor se encuentra dentro de rango normal o patológico.

Seminario: GOTA

Cuestionario

1. ¿Cómo se realiza la síntesis de ácido úrico en el hombre? Realice un esquema.
2. ¿En qué padecimientos se encuentran alterados los valores de referencia de ácido úrico? Tanto aumentados como disminuidos.
3. ¿Qué es un tofo y por qué se forman en el proceso gotoso?

4. ¿Qué pruebas de laboratorio complementan el diagnóstico de gota?
5. ¿Cuál es el mecanismo de acción de la colchicina en la gota?

Bibliografía

- Zhang WZ. Why does hyperuricemia not necessarily induce gout? Biomolecules. 2021; 11(2): 280. doi: 10.3390/biom11020280.
- Abhishek A, Roddy E, Doherty M. Gout - a guide for the general and acute physicians. Clin Med (Lond). 2017; 17(1): 54-59. doi: 10.7861/clinmedicine.17-1-54.
- Sivera F, Andrés M, Quilis N. Diagnóstico y tratamiento de la gota. Med Clin (Barc). 2017; 148(6): 271-6. doi: 10.1016/j.medcli.2016.10.019.
- Hyndman D, Liu S, Miner JN. Urate handling in the human body. Curr Rheumatol Rep 2016; 18: 34. doi 10.1007/s11926-016-0587-7
- Vargas-Santos AB, Taylor WJ, Neogi T. Gout classification criteria: update and implications. Curr Rheumatol Rep 2016; 18(7): 46. doi:10.1007/s11926-016-0594-8.
- Álvarez-Lario B, Alonso-Valdivielso JL. Hiperuricemia y gota: el papel de la dieta. Nutr Hosp 2014; 29(4): 760-70. doi: 10.3305/nh.2014.29.4.7196.
- Olay-Fuentes G, Díaz-Piedra P, Hernández-Gómez R, Cervantes-Villagrana RD, Presno-Bernal JM, Alcántara-Gómez LE. Determinación de intervalos de referencia para química clínica en población mexicana. Rev Latinoam Patol Clin 2013; 60(1): 43-51.
- Gómez-Puerta JA. Gota: nuevos conceptos patogénicos y nuevos agentes terapéuticos. Rev Colomb Reumatol 2011; 18(3): 163-74.
- Sandoval-Castro CE, Padilla-Ibarra J. Gota. Rev Med MD 2011; 3(11): 16-22.
- Vázquez-Mellado J, Espinoza J, Hernández-Garduño A, Lino L, Burgos-Vargas R. El diagnóstico y tratamiento de la gota en la ciudad de México. Resultados de una encuesta de médicos. Rev Inv Clin 2003; 55(6): 621-8.

Manejo de residuos

Debido a que se manejan muestras biológicas y reactivos químicos, los residuos deben ser tratados y desechados con base a lo establecido en la Norma Oficial Mexicana NOM-087-SEMARNAT-SSA1-2002, Protección ambiental-salud ambiental-residuos peligrosos biológico-infecciosos y el procedimiento SGC-FESZ-PO06. Para ello deben seguirse las indicaciones especificadas en este manual, según corresponda. Los residuos biológicos deberán colocarse en la zona roja y los químicos en la zona amarilla marcada en el laboratorio, y serán recolectados por el

Departamento encargado de esta actividad siguiendo el calendario previamente elaborado por el Coordinador del Área.

9.3 CREATININA

La creatinina es el anhídrido de la creatina y es formada en gran parte en el músculo por la eliminación irreversible y no enzimática de agua del fosfato de creatina. Tanto la creatina como la creatinina son considerados compuestos nitrogenados no proteicos.

La mayoría de los métodos para la determinación de ambos se basan en la reacción de Jaffé descrita en 1886, y que tiene la distinción de ser el método de química clínica más antiguo aún en uso. Este ensayo está basado en la reacción de la creatinina con una solución alcalina de picrato de sodio. Desgraciadamente este método, tan simple, no es específico para creatinina, existiendo muchas sustancias en la sangre que también reaccionan con el picrato alcalino, además de ser dependiente de: la concentración de ácido pícrico, temperatura, precipitación de proteínas y pH.

Folin y Wu aplicaron la observación de Jaffé a la cuantificación de creatinina y creatina en un filtrado desproteinizado preparado a partir de sangre total, ya que siendo ésta una reacción de punto final, los grupos α-cetometilo o α-cetometileno

que se encuentran en las proteínas reaccionan con el picrato alcalino dando complejos muy coloreados.

Posteriormente se propuso un método cinético siguiendo la reacción de Jaffé que requiere de instrumentos capaces de realizar lecturas con intervalos precisos y reproducibles, ya que se realizan lecturas seriadas en un intervalo de 10 a 60 segundos, método que aún existe comercialmente.

En cuanto a métodos enzimáticos dos han sido las enzimas empleadas para este análisis: la *creatinina amidohidrolasa* (EC 3.5.3.10), también denominada "creatinasa" o "creatinina hidrolasa"; y la *creatinina deiminasa* (EC 3.5.4.21), también denominada "creatinina iminohidrolasa", aunque no son tan populares porque sus lecturas son UV.

El método más recientemente desarrollado es el que utiliza creatinasa y sarcosina oxidasa para finalmente observar la reducción del H_2O_2 y la formación de quinonaimina (PAP).

9.3.1 MÉTODO CINÉTICO DE JAFFÉ

Dentro de los cuidados que se deben tener con la reacción de Jaffé están el tiempo de desarrollo de la reacción y la temperatura. Si el tiempo excede a los 15 min. y la temperatura a la cual se lleva a cabo la reacción está por encima de los 30°C, el aumento de color que se observa se debe, casi seguramente, a la formación de metilguanidina y picramato en la reacción.

El método cinético sigue la reacción tradicional, pero con algunas modificaciones que lo optimizan:

- Tiene una baja concentración de ácido pícrico que no produce precipitación de proteínas, por lo que se puede emplear suero o plasma sin desproteinizar.
- Debido al rápido transcurso de la reacción, no interfieren reacciones secundarias que inician más tarde.

Fundamento:

La creatinina reacciona con el picrato alcalino para formar el picrato de creatinina alcalina (complejo de Janowski) de color anaranjado que se mide fotométricamente.

Reacción:

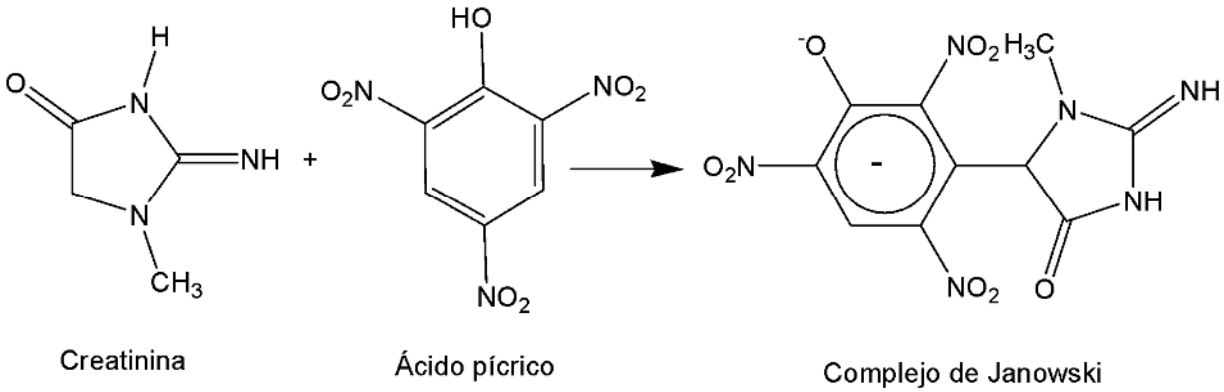


Figura 14. Reacción de la creatinina con ácido pícrico por el método de Jaffé. Tomado de: Narayanan, 1980.

Material y reactivos

- Suero, plasma u orina diluida 1:10.
- Estuche comercial para la determinación de creatinina por el método cinético.

Equipo

- Espectrofotómetro

Servicios

- Energía eléctrica
- Agua

Técnica

Es dependiente del estuche comercial disponible. Seguir las indicaciones del instructivo al pie de la letra.

*NOTA: Es muy importante realizar las lecturas EXACTAMENTE a los tiempos especificados en el instructivo.

Cálculos: los indicados en el inserto del estuche utilizado.

Factores de conversión: $\frac{\mu mol}{L = \frac{mg}{dL\ X\ 88.4}}$

$$\frac{mg}{dL = \frac{\mu mol}{L\ X\ 0.011}}$$

Valores de referencia:

Muestra	Tradicional	SI
Suero*		
Mujeres	0.6 – 1.0 mg/dL	53.0 – 88.4 μmol/L
Hombres	0.8 – 1.3 mg/dL	70.7 – 114.9 μmol/L
Orina	7.3 – 24.6 mg/kg de peso en 24 h	0.065 – 0.217 mmol/kg de peso en 24 h
Depuración de creatinina (mL/min)		
Adultos		
Mujeres		70 – 130
Hombres		75 – 140
> 60 años		
Mujeres		50 – 100
Hombres		55 – 115

*Para población mexicana. Tomado de: Olay-Fuentes G, 2013.

9.3.2 MÉTODO TRINDER

Fundamento:

Es una serie de reacciones en dos pasos esenciales. En un primer paso se degrada la creatina presente en la muestra con creatinasa, para después con sarcosina oxidasa producir H_20_2 que es eliminado por una catalasa. En el segundo paso, la catalasa presente es inhibida por el azida de sodio para posteriormente añadir creatininasa y producir creatina. Se repiten las dos reacciones anteriores para cuantificar finalmente el H_20_2 generado en la reacción con 4- aminofenazona

(PAP). Únicamente el H_2O_2 producto de la reacción sobre la creatina generada a partir de la creatinina de la muestra es el cuantificado.

Reacción:

Primer paso

$$\text{Creatina} + H_2O \xrightarrow{\text{Creatinasa}} \text{Sarcosina} + \text{Urea}$$

$$\text{Sarcosina} + O_2 + H_2O \xrightarrow{\text{Sarcosina oxidasa}} \text{Formaldehído} + \text{Glicina} + H_2O_2$$

$$H_2O_2 \xrightarrow{\text{Catalasa}} H_20$$

Segundo paso

$$\text{Creatinina} + H_2O \xrightarrow{\text{Creatininasa}} \text{Creatina}$$

$$\text{Creatina} + H_2O \xrightarrow{\text{Creatinasa}} \text{Sarcosina} + \text{Urea}$$

$$\text{Sarcosina} + O_2 + H_2O \xrightarrow{\text{Sarcosina oxidasa}} \text{Formaldehído} + \text{Glicina} + H_2O_2$$

$$2H_2O_2 + \text{.4-amino-fenazona (PAP)} \xrightarrow{\text{Peroxidasa}} \text{Quinonaimina} + 4H_2O$$

Material y reactivos

- Suero, plasma u orina diluida 1:10.
- Estuche comercial para la determinación de creatinina por el método Trinder.

Equipo

- Espectrofotómetro

Servicios

- Energía eléctrica
- Agua

Técnica

Es dependiente del estuche comercial disponible. Seguir las indicaciones del instructivo al pie de la letra.

Cálculos: los indicados en el instructivo del estuche utilizado.

Factores de conversión: los especificados en el método anterior.

Valores de referencia: los mismos que en el método anterior.

Resultados: Obtener el resultado de la concentración de la muestra analizada e indicar si el valor se encuentra dentro de rango normal o patológico.

Seminario: FILTRACIÓN GLOMERULAR, ACLARAMIENTO O DEPURACIÓN RENAL

Cuestionario

1. ¿Por qué la cantidad de creatinina sérica se mantiene constante en el organismo?
2. ¿Qué sustancias se emplean para la determinación de la filtración glomerular, aclaramiento o depuración renal?
3. Mencione qué características deben tener una substancia para poder ser utilizada para medir el aclaramiento renal y por qué.
4. ¿Qué otras fórmulas, diferentes a las de depuración de creatinina, existen para el cálculo del aclaramiento renal?
5. ¿Qué es la cistatina C y qué ventajas tiene sobre la creatinina para ser considerada de utilidad en el aclaramiento renal?

Bibliografía

- Agarwal R, Delanaye P. Glomerular filtration rate: when to measure and in which patients? Nephrol Dial Transplant. 2019; 34(12): 2001-7. doi: 10.1093/ndt/gfy363.
- Unger G, Benozzia SF, Campion A, Tissot C, Pennacchiotti GL. Utilidad clínica del valor de referencia del cambio en la medición de creatinina plasmática Rev Lab Clin. 2017; 10(3): 123-8.
- Levey AS, Becker C, Inker LA. Glomerular filtration rate and albuminuria for detection and staging of acute and chronic kidney disease in adults: a systematic review. JAMA 2015; 313(8): 837-46. doi: 10.1001/jama.2015.0602.
- Onopiuk A, Tokarzewicz A, Gorodkiewicz E. Cystatin C: a kidney function biomarker. Adv Clin Chem. 2015; 68: 57-69. doi: 10.1016/bs.acc.2014.11.007.

- Olay-Fuentes G, Díaz-Piedra P, Hernández-Gómez R, Cervantes-Villagrana RD, Presno-Bernal JM, Alcántara-Gómez LE. Determinación de intervalos de referencia para química clínica en población mexicana. Rev Latinoam Patol Clin 2013; 60(1): 43-51.
- Shlipak MG, Matsushita K, Ärnlöv J, Inker LA, Katz R, Polkinghorne KR, et al. Cystatin C versus creatinine in determining risk based on kidney function. N Engl J Med. 2013; 369(10): 932-43. doi:10.1056/NEJMoa1214234.
- Inker LA, Schmid CH, Tighiouart H, Eckfeldt JH, Feldman HI, Greene T, et al. Estimating glomerular filtration rate from serum creatinine and cystatin C. N Engl J Med. 2012; 367(1): 20-9. doi:10.1056/NEJMoa1114248.
- Endre ZH, Pickering JW, Walker RJ. Clearance and beyond: the complementary roles of GFR measurement and injury biomarkers in acute kidney injury (AKI). Am J Physiol Renal Physiol 2011; 301: F697-F707. doi: 10.1152/ajprenal.00448.2010.
- Perazzi B, Angerosa M. Creatinina en sangre: calidad analítica e influencia en la estimación del índice de filtrado glomerular. Acta Bioquím Clín Latinoam 2011; 45(2): 265-72.
- Treviño-Becerra A. ¿Por qué, cómo y para qué medir la filtración glomerular? Rev Med Inst Mex Seguro Soc 2010; 48(5): 465-7.
- Treviño-Becerra A, Baca-Enciso R, Meza-Coria C, Chávez-Zúñiga MI, Gamboa-Morales VE. Medición de la filtración glomerular comparativa por cistatina C y métodos convencionales basados en la depuración de creatinina. Rev Hosp Juarez Mex 2010; 77(1): 33-7.
- Capelini-Rodríguez F, Durazo-Quiroz F, Pantoja-Ponce I, Razo-Martínez M. Determinación del filtrado glomerular mediante la ecuación MDRD y estudio comparativo contra la depuración de creatinina en orina de 24 horas. Rev Latinoam Patol Clin 2009; 56(2): 113-6.
- Myers GL, Miller WG, Coresh J, Fleming J, Greenberg N, Greene T, et al. Recommendations for improving serum creatinine measurement: a report from the Laboratory Working Group of the National Kidney Disease Education Program. Clin Chem 2006; 48: 699-707. doi: 10.1373/clinchem.2005.0525144.
- Mendoza-Romo MA, Ramírez-Arriola MC. Consideraciones para calcular la depuración de creatinina con la fórmula de Crockcoft en pacientes con diabetes. Med Int Mex 2003; 19(3): 161-4.

Manejo de residuos

Debido a que se manejan muestras biológicas y reactivos químicos, los residuos deben ser tratados y desechados con base a lo establecido en la Norma Oficial Mexicana NOM-087-SEMARNAT-SSA1-2002, Protección ambiental-salud ambiental-residuos peligrosos biológico-infecciosos y el procedimiento SGC-FESZ-PO06. Para ello deben seguirse las indicaciones especificadas en este manual, según corresponda. Los residuos biológicos deberán colocarse en la zona roja y los químicos en la zona amarilla marcada en el laboratorio, y serán recolectados por el Departamento encargado de esta actividad siguiendo el calendario previamente elaborado por el Coordinador del Área.

Práctica 10

Análisis General de Orina

Normalmente, al análisis de la orina se le denomina examen general de orina (EGO), examen de orina o uroanálisis.

El análisis de orina con fines diagnósticos se ha practicado durante siglos y probablemente es el más antiguo de los procedimientos de laboratorio que se emplean actualmente en Medicina. Puede decirse que es una "biopsia del cuerpo" porque nos da información sobre todos los órganos y sistemas del cuerpo, además de ser un estudio no costoso, con espécimen de fácil obtención y con resultados disponibles en minutos.

El uso de pruebas sencillas como son las de: proteínas, azúcares y el examen del sedimento urinario, facilitan habitualmente al médico información valiosa respecto al metabolismo de hidratos de carbono, función renal, infecciones del sistema urinario, equilibrio ácido-base y condiciones hemolíticas.

El análisis de orina lo podemos dividir en tres partes:

- Examen físico
- Examen químico
- Examen de sedimento urinario

Para el análisis químico, se utilizan pruebas cualitativas con tiras o tabletas reactivas y métodos cuantitativos para algunos componentes como proteínas. Con la introducción de estas técnicas sencillas, en vez de hacer el proceso químico completo, se hacen más fáciles y rápidas las determinaciones ya que únicamente hay que realizar la observación de un cambio de color, aumentando a su vez el número de éstas. En la actualidad hay varias casas comerciales que producen este tipo de productos en México.

Por otro lado, debido a que los pacientes diabéticos pueden cursar con nefropatía y no ser detectada a tiempo por el límite de detectabilidad de proteínas en las tiras reactivas comunes, se han introducido al mercado unas tiras reactivas especiales para semicuantificar albúmina en muy pequeñas concentraciones (microalbuminuria).

En ocasiones, las muestras urinarias presentan sustancias que impiden efectuar una correcta interpretación de los colores de las tiras reactivas como pueden ser: metabolitos de algunos fármacos, colorantes vegetales, etc., por ello es necesario tener presente que, de no poder realizarse una correcta lectura de las tiras reactivas, deben implementarse métodos químicos para llevar a cabo el análisis.

Hoy en día, el uroanálisis también se ha automatizado, existiendo lectores de tiras reactivas que tienen como fundamento la reflactancia y equipos que cuantifican los componentes del sedimento a través de citometría de flujo.

Material y reactivos

- Orina recién emitida.
- Frasco con tiras reactivas comerciales para determinación de parámetros en orina con escala de colores.
- Solución de ácido sulfosalicílico al 3% p/v……..……..(14)
- Frasco con tiras reactivas comerciales para detección de microalbúmina.

Equipo

- Centrífuga clínica
- Microscopio óptico
- Densitómetro
- Refractómetro

Servicios

- Energía eléctrica
- Agua

10.1 Examen físico

Es la parte inicial de un análisis de rutina. Comprende la evaluación del volumen, color, aspecto, olor (cuando es diferente del normal) y densidad.

Volumen

El volumen en una muestra al azar puede no ser muy importante, pero es conveniente reportarlo como referencia de la cantidad de muestra en la que se realizó el análisis.

Técnica

- Agitar cuidadosamente la muestra antes de comenzar el análisis.
- Vaciar el contenido en una probeta y medir el volumen total de la muestra.

Color y Aspecto

La orina normal debe ser color amarillo paja. Los colores anormales pueden ser causados por padecimientos. Medicamentos o alimentos.

La orina normal debe ser clara o transparente. Cualquier turbidez u oscurecimiento aparente de la orina debe ser reportado. La causa exacta de la turbidez podrá corroborarse con el examen microscópico, habiendo una buena correlación, a mayor turbidez más sedimento.

Técnica

Observar el color de la muestra bajo buenas condiciones de luz y a través del recipiente contra un fondo blanco. Clasificarlo de acuerdo con el cuadro 10.1.

Para la turbidez, mezclar perfectamente la muestra y examinarla a través de un recipiente claro, observando con una buena fuente de luz contra un fondo que tenga letras negras o una línea gruesa del mismo color. Anotar la apariencia de la muestra, indicando si es: transparente, ligeramente turbia, turbia o lechosa, Si se aprecian las letras es transparente, si se ven un poco borrosas es ligeramente turbia y si no pueden leerse se reporta como turbia. Si la apariencia es francamente turbia, se reporta como lechosa.

Cuadro 10.1. Clasificación del color de la orina.

Color a reportar	**Observación**
Incoloro	No presenta coloración, semejante al agua
Amarillo I	Color amarillo paja
Amarillo II	Color amarillo canario
Amarillo III	Color amarillo intenso
Naranja	Francamente anaranjado
Ámbar	Color ligeramente café
Rojo	Rojo en cualquiera de sus tonos
Café	Color semejante a una cerveza obscura
Otro	Cualquier otro color debe informarse

Olor

La orina no tiene olor, excepto por una ligera fragancia aromática. Un fuerte olor a amoniaco indica la presencia de bacterias. Otros olores pueden ser causados por alimentos o medicamentos.

Técnica

Al destapar el frasco percibir el olor que despide la orina. Registrar cualquier olor fuerte o poco característico.

Densidad

La densidad o gravedad específica de la orina es definida como el peso de la orina comparada con el peso de un volumen igual de agua destilada a la misma temperatura.

Indica la cantidad de sustancias disueltas en la orina, y es una medida parcial de la capacidad del riñón para concentrar orina.

Se puede realizar con un densitómetro, hidrómetro, urinómetro o pesa orina; con un refractómetro o con tira reactiva.

Fundamento:

Los componentes de la orina, así como los elementos formes que se encuentren en ella van a darle una densidad diferente a la del agua, mientras más componentes y elementos formes tenga, mayor será la densidad.

Técnica con densitómetro

- Se requiere de un volumen mínimo de 15 mL.
- Colocar un parte de la muestra en una probeta especial para medir la densidad (aproximadamente 2/3 de la capacidad).
- Introducir el densitómetro en la muestra haciéndolo girar sobre la superficie para asegurarse que flote libremente y que no haya formación de burbujas alrededor del densitómetro.
- Leer la escala observando que el densitómetro no toque las paredes o el fondo del recipiente.
- La densidad es afectada por la temperatura y el contenido de proteínas y azúcares de la orina, por lo que hay que restar 0.004 por cada 10 g/L de glucosa, 0.003 por cada 10 g/L de proteínas y 0.001 por cada 3°C por debajo de los 25°C.

Técnica con refractómetro

Los refractómetros miden los sólidos totales en un líquido por determinación del índice de refracción (IR) de la orina.

- Limpiar primero las superficies de la tapa del refractómetro con un lienzo húmedo y luego secar.
- Verificar la calibración del refractómetro con agua destilada, el valor debe ser 1.000.
- Aplicar una gota de orina con una pipeta Pasteur en la parte ranurada de la cubierta de manera que fluya sobre la superficie prismática por acción capilar.
- Dirigir el refractómetro hacia la fuente de luz y leer directamente en la escala de densidad, teniendo en cuenta la línea definida entre la luz y el contraste obscuro.
- Si la densidad es superior a 1.030, diluir la orina a la mitad con agua y leer. Multiplicar los tres últimos dígitos por 3.

Técnica con tira reactiva:

La medición de la gravedad específica (SG) por medio de tiras reactivas está basada en las fuerzas iónicas de la orina. Seguir las indicaciones del análisis químico con tira reactiva que está a continuación.

10.2 Examen químico

El análisis químico de la orina comprende la determinación de los diversos componentes disueltos en este espécimen y que son útiles en el diagnóstico.

Medición con tira reactiva

Estas mediciones han permitido al laboratorio clínico generar resultados químicos cualitativos o semicuantitativos de los componentes urinarios más importantes de una manera rápida, precisa y eficiente.

Las tiras reactivas están formadas por una tira de plástico que contiene una o más áreas con reactivos químicos impregnados. Una reacción colorida se desarrolla al entrar en contacto estas áreas con la orina.

Técnica

- Extraer del envase una tira reactiva y volverlo a tapar herméticamente.
- Mezclar la orina y llenar con la muestra un tubo de 13X100 mL aproximadamente hasta ¾ partes.
- Sumergir la tira reactiva en la muestra impregnando perfectamente, remover el exceso de orina colocando la tira de manera lateral y horizontalmente sobre un papel secante (papel sanitario o pañuelo facial).
- Comparar el color obtenido en la tira con la carta de colores del frasco en un lugar bien iluminado. Cada parámetro químico debe evaluarse dentro del período especificado en las instrucciones del fabricante, realizando las lecturas en los TIEMPOS EXACTOS, por lo que hay que tomar el tiempo con cronómetro.
- Los resultados positivos requieren confirmación mediante el diagnóstico y métodos químicos y microscópicos si es necesario, según sea el caso.
- Es importante tener en cuenta las indicaciones de los fabricantes respecto a la identificación de fuentes de inhibidores y resultados falsamente positivos y negativos de cada una de las secciones de la tira reactiva.

Método semicuantitativo para proteínas

La albúmina no es la única proteína encontrada en la orina. La proteinuria puede ser causada por varios tipos de proteínas, como la de Bence-Jones y las globulinas.

Fundamento:

Las proteínas presentes en la orina en condiciones no normales son desnaturalizadas por un reactivo aniónico, como el ácido sulfosalicílico, precipitando

y haciendo que la muestra de orina se vuelva más turbia cuanto mayor sea la concentración de proteínas.

Reactivos:

- Solución de ácido sulfosalicílico al 3% (p/v)……..(14)

Técnica

- Colocar en un tubo de ensayo de 13X100 mm 3 mL de orina centrifugada.
- Agregar cuidadosamente, resbalando por las paredes del tubo, 3 mL del reactivo de ácido sulfosalicílico, mezclar por inversión tapando el tubo con parafilm.
- Dejar en reposo durante 5 min. Observar el grado de turbidez o nebulosidad.
- Una turbidez apenas evidente se clasifica como ± 5-10 mg/dL, aunque debe reportarse en grados crecientes de turbidez o nebulosidad de + a ++++, de acuerdo con el cuadro 10.2.

Cuadro 10.2. Interpretación de la prueba de turbidez con ácido sulfosalicílico para proteínas en orina.

Grado	**Turbidez**	**Proteínas (mg/L)**
Ninguno	Claro	Negativas
Trazas	Se puede leer con facilidad un impreso a través del tubo.	≤ 200
1+	Se puede leer con dificultad un impreso a través de la muestra.	300 – 1000
2+	El impreso se puede ver, pero no leer fácilmente a través del tubo.	1000 – 2500
3+	El impreso no se puede ver a través del tubo.	2500 – 4500
4+	Se forma un precipitado.	> 4500

Método para detección de microalbuminuria

Es una prueba para el reconocimiento y el control del curso de una nefropatía incipiente; por ejemplo, en diabetes o hipertonía. La microalbuminuria es la excreción de albúmina de 20 a 200 mg/L.

Fundamento:

En la tira reactiva, la orina pasa por una zona que contiene un conjugado de anticuerpo-enzima soluble que se fija específicamente a la albúmina en la orina. El exceso de conjugado se detiene por una zona interceptora que contiene albúmina humana inmovilizada, de manera que sólo el conjugado cargado con albúmina alcanza la zona reactiva. Ahí la enzima *β–galactosidasa* reacciona con el sustrato formando un colorante rojo, cuya intensidad de color es proporcional, después de exactamente 5 min., al contenido de albúmina en orina.

Técnica

- Disparar el cronómetro y sumergir la tira reactiva durante 5 seg. hasta la zona azul, a continuación, retirarla. **No tocar la pared del recipiente con la tira reactiva ni al sumergirla ni al retirarla.**
- Poner la tira reactiva sobre una superficie no absorbente de forma horizontal.
- EXACTAMENTE, midiendo con cronómetro, después de 5 min. comparar el color de la reacción con la escala cromática indicada en la etiqueta del envase. Para la evaluación es importante sólo el color predominante. Pequeños lugares de colores divergentes no deben tenerse en cuenta.

10.3 Examen de sedimento urinario

Una precisa identificación microscópica es importante para un reconocimiento temprano de condiciones infecciosas, inflamatorias y neoplásicas que afectan al organismo y al sistema urinario.

Son varios los procedimientos microscópicos para el examen denominado del sedimento urinario:

- Microscopía de campo claro sin coloración o examen en fresco.
- Microscopía de campo claro con coloración.
- Microscopía de fase e interferencia.
- Recuento de Addis.
- Método combinado de citocentrifugación-Papanicolau.

El más común de los métodos es la microscopía de campo claro sin coloración. La microscopía común en fresco sin coloración emplea iluminación reducida para delinear los elementos figurados más transparentes de la orina como: cilindros hialinos, cristales y filamentos mucosos.

Recientemente se ha intentado automatizar el sedimento urinario pero dada la variedad de estructuras ha sido un poco complicado sustituir el ojo humano, detectándose por esta metodología únicamente eritrocitos, leucocitos y cilindros con alguna certeza.

Por ello sigue siendo de importancia la capacitación de los químicos clínicos en la lectura microscópicas del sedimento urinario.

Técnica

La muestra de orina debe examinarse inmediatamente, ya que las células y cilindros se comienzan a desintegrar en el término de 1-3 h.

- Mezclar bien la muestra evitando la formación de remolinos.
- Colocar aproximadamente 10 mL de orina en un tubo de 13X100 mm.
- Centrifugar a 1500 rpm durante 5 min.
- Decantar el sobrenadante hasta dejar aproximadamente 1 mL.
- Resuspender el sedimento mediante golpecitos en el fondo del tubo.
- Colocar una gota de la suspensión sobre un portaobjetos limpio y cubrir con un cubreobjetos de 22X22 mm evitando a formación de burbujas.
- Verificar la iluminación del microscopio empleando la técnica de Köhler.
- Antes de comenzar a observar al microscopio es conveniente realizar una revisión de los resultados del examen fisicoquímico.
- Examinar al microscopio a seco débil (10X) y seco fuerte (40X).
    - El examen con seco débil debe efectuarse con poca luz para la búsqueda de cilindros.
    - Identificar los elementos formes que se observen, con ayuda de un atlas de sedimento urinario.
    - Tomar en cuenta las siguientes indicaciones:
        - Los cilindros se encuentran a menudo a lo largo del borde del cubreobjetos. Se debe contar el número de cilindros por campo de seco débil en 10 campos. Para identificarlos debe realizarse la observación en seco fuerte.
        - Los eritrocitos, leucocitos y células de epitelio renal se identifican con objetivo de 40X y se cuentan en 10 campos. Las células de epitelio escamosos y de transición son reportadas por apreciación de + a +++.
        - La presencia de bacterias y levaduras deben advertirse, lo mismo que los cristales, reportándose como escaso, moderado o abundante.

El informe del análisis de orina debe ser numérico siempre y cuando sea posible, por eso suele promediarse el contenido de 10 campos representativos.

Valores de referencia:

Hay variación en cuanto al volumen y la densidad, comparando niños con adultos.

Niños

Edad	Volumen (mL/24 h)	Densidad (g/cm^3)
2 – 3 días	130	1.004 – 1.005
4 – 5 días	70 – 200	1.004 – 1.005
6 – 10 días	200 – 300	1.003 – 1.004
1 – 2 meses	250 – 420	1.004 – 1.007
1 – 2 años	500 – 700	1.010 – 1.014
3 – 5 años	600 – 1200	1.010 – 1.014
6 – 8 años	800 – 1300	1.010 – 1.019
9 – 12 años	1000 – 1500	1.010 – 1.020

Adultos

Parámetro	Valor	Tira reactiva
Volumen	700 – 1800 mL/24 h	
Color	Amarillo I – ámbar	
Aspecto	Transparente	
Densidad	1.005 – 1.030 g/cm^3	
pH	5.5 – 7.7	5.0 – 8.0
Proteínas	15 – 150 mg/24h	Negativo
Cetonas	120 – 125 mg/24h	Negativo
Bilirrubina	0.02 mg/dL	Negativo
Sangre	3 – 5 eritroc/μL	Negativo
Urobilinógeno	1 – 4 mg/dL	Negativo
Nitritos	0	Negativo
Leucocitos	0 – 5/μL	Negativo
	Sedimento	
Leucocitos	0 – 5/campo	
Eritrocitos	0 – 3/campo	
Cilindros	Negativo	
Bacterias	Negativo o escasas	
Levaduras	Negativo	
Parásitos	Negativo	

Resultados: Reportar los resultados del análisis general de orina completo de la muestra analizada e indicar si los valores se encuentran dentro de rango normal o patológico.

Seminario: EXAMEN GENERAL DE ORINA

Cuestionario

1. Diga el fundamento para la determinación de: pH, proteínas, glucosa, cetonas, bilirrubina, hemoglobina, leucocitos, urobilinógeno y nitritos en la tira reactiva.
2. Diga el fundamento de la tira reactiva para la determinación de la gravedad específica y por qué es considerada equivalente a la densidad.
3. ¿Por qué algunas casas comerciales incluyen una sección para medir ácido ascórbico en las tiras de orina? ¿Cuál es su valor diagnóstico?
4. ¿Qué son los cilindros? Mencione por lo menos 5 diferentes, indicando las patologías en que es usual encontrarlos.
5. ¿Cuál es el fundamento de la medición del sedimento urinario automatizado?

Bibliografía

- Cavanaugh C, Perazella MA. Urine sediment examination in the diagnosis and management of kidney disease: Core Curriculum 2019. Am J Kidney Dis. 2019; 73(2): 258-72. doi: 10.1053/j.ajkd.2018.07.012.
- Oyaert M, Delanghe J. Progress in automated urinalysis. Ann Lab Med. 2019; 39(1): 15-22. doi: 10.3343/alm.2019.39.1.15.
- Peña Esparragoza JK, Mancha Ramos J. Protocolo diagnóstico de la hematuria. Medicine. 2019; 12(80): 4745-8
- Peña Esparragoza JK, Pérez Fernández M. Protocolo diagnóstico de la proteinuria. Medicine. 2019; 12(80): 4749-52
- Zaman Z. Automated urine screening devices make urine sediment microscopy in diagnostic laboratories economically viable. Clin Chem Lab Med 2015; 53(Suppl): S1509-S11. doi: 10.1515/cclm-2015-0476.
- Delanghe J, Speeckaert M. Preanalytical requirements of urinalysis. Biochem Med 2014; 24(1): 89-104. doi: 10.11613/BM.2014.011.
- Fernández DJ, Di Chiazza S, Veyretou FP, González LM, Romero MC. Análisis de orina: estandarización y control de calidad. Acta Bioquím Clín Latinoam 2014; 48(2): 213-21.
- Wilches C, Gallo A, Moreno A, Rivero O, Romero J. Orina particulada: ¿se correlaciona con infección urinaria? Rev Colomb Radiol. 2011; 22(4): 3334-40.
- Baños-Laredo ME, Núñez-Álvarez CA, Cabiedes J. Análisis de sedimento urinario. Reumatol Clin. 2010; 6(5): 268-72.
- Gómez-Gaviño V, Jiménez-López C, Vivar-Guzmán NP, Sánchez-Rodríguez MA. Comparación del citómetro UF-100i con el sistema Kova y el método

convencional para el conteo de leucocitos y eritrocitos en orina. Bioquimia 2008; 33(2): 51-8.
- Retrospectiva del análisis de orina. IV. LabActa 2006; 18: 61-2.
- Retrospectiva del análisis de orina. V. LabActa 2006; 18:81-6.
- St John A, Boyd JC, Lowes AJ, Price CP. The use of urinary dipstick tests to exclude urinary tract infection. A systematic review of the literature. Am J Clin Pathol 2006; 126: 428-36. doi: 10.1309/C69RW1BT7E4QAFPV.
- Brinkman J, de Zeeuw D, Ducher JJ, Gansevoort RT, Kema IP, Hillege HL, et al. Falsely low urinary albumin concentrations alter prolonged frozen storage of urine samples. Clin Chem 2005; 51: 2181-2183. doi: 10.1373/clinchem.2005.053777.
- Medina-Escobedo M, Villanueva-Jorge S, Gala-Trujano E, Larrocha-Garrido M, Medina-Escobedo C. Comparación entre las lecturas de las tiras de orina Combur^{10}Test®M y Multistix® 10 SG. Bioquimia 2005; 30: 76-81.
- Retrospectiva del análisis de orina. I. LabActa 2005; 17: 25-28.
- Retrospectiva del análisis de orina. II. LabActa 2005; 17: 63-64.
- Retrospectiva del análisis de orina. III. LabActa 2005; 17: 102-103.
- Simerville JA, Maxted WC, Pahira JJ. Urinalysis: A comprehensive review. Am Fam Physician 2005; 71: 1153-62.
- Ottiger C, Huber AR. Quantitative urine particle analysis: integrative approach for the optima combination of automation with UF-100 and microscopic review with KOVA cell chamber. Clin Chem 2003; 49; 617-623. doi: 10.1373/49.4.617.
- Froom P, Bieganiec B, Ehrenrich Z, Barak M. Stability of common analytes in urine refrigerated by 24 h before automated analyses by test strips. Clin Chem 2000; 46: 1384-1386.

Manejo de residuos

Debido a que se manejan muestras biológicas y reactivos químicos, los residuos deben ser tratados y desechados con base a lo establecido en la Norma Oficial Mexicana NOM-087-SEMARNAT-SSA1-2002, Protección ambiental-salud ambiental-residuos peligrosos biológico-infecciosos y el procedimiento SGC-FESZ-PO06. Para ello deben seguirse las indicaciones especificadas en este manual, según corresponda. Los residuos biológicos deberán colocarse en la zona roja y los químicos en la zona amarilla marcada en el laboratorio, y serán recolectados por el Departamento encargado de esta actividad siguiendo el calendario previamente elaborado por el Coordinador del Área.

Práctica 11

PERFIL HEPÁTICO

El hígado es el principal órgano en lo que respecta al metabolismo de los hidratos de carbono, proteínas, lípidos, porfirinas y ácidos biliares, o sea, es la sede el metabolismo primario. Es capaz de sintetizar la mayor parte de las proteínas orgánicas, excepto las gammaglobulinas y la hemoglobina (aunque en etapa fetal sí sintetiza esta proteína). También representa el principal sitio de almacenamiento de hierro, glucógeno, lípidos y vitaminas. Además, desempeña un papel importante en la destoxificación de xenobióticos y en la excreción de los productos metabólicos finales como bilirrubina, amoniaco y urea.

El estudio del hígado se divide en dos: pruebas de funcionamiento hepático y perfil hepático.

Las pruebas de funcionamiento hepático son generalmente utilizadas para identificar hepatopatías en ausencia de ictericia o cuando la ictericia es el resultado de una enfermedad hemolítica y existen dudas acerca de la presencia de una enfermedad hepática concomitante.

El perfil hepático está conformado de métodos analíticos que tienen como objetivos fundamentales: detectar si existe inflamación y/o necrosis celular y, en caso afirmativo, apreciar su extensión, medir su capacidad de síntesis de proteínas y conocer el estado de su participación en el metabolismo de las sustancias endógenas. Se puede decir que el perfil hepático se divide en dos partes:

- Un perfil bioquímico hepático
- Un perfil enzimático hepático

El perfil bioquímico hepático comprende la serie de determinaciones bioquímicas, dentro de las cuales los pigmentos biliares y la albúmina tienen un papel muy importante.

El perfil enzimático hepático comprende varias enzimas que son localizadas en abundancia en ese órgano, y cuya liberación hacia el torrente circulatorio nos indica un daño hepatocelular.

Por otro lado, se denominan pigmentos biliares a los productos del metabolismo de la hemoglobina, hemoproteínas (citocromos, mioglobina, etc.) y eritrocitos inmaduros. Son originados en las células fagocítico-mononucleares del hígado (incluyendo las células de Kupffer), bazo, médula ósea y ganglios linfáticos, en donde son destruidos los eritrocitos viejos. Los metabolitos que pertenecen a este grupo son: biliverdina, bilirrubinas, urobilinógenos y urobilinas; y los más importantes desde el punto de vista diagnóstico son las bilirrubinas y el urobilinógeno. Las lesiones hepatocelulares (agudas o crónicas), pueden interferir, en grado variable, las distintas secuencias que tienen lugar en el interior de la célula hepática relacionadas con el metabolismo de la bilirrubina, por lo tanto, ésta es considerada como el pigmento biliar más importante y el que rutinariamente se determina para ver funcionalidad hepática.

BILIRRUBINAS
MÉTODO DE JENDRASSIK-GROF (DIAZORREACCIÓN)

Objetivos

– Determinar las bilirrubinas como principales pigmentos biliares y parte del perfil bioquímico hepático.
– Reconocer el papel de estas mediciones como elementos de diagnóstico de problemas hepáticos.

Introducción

En el laboratorio clínico se efectúa generalmente la determinación de bilirrubina total, bilirrubina conjugada o directa y la no conjugada o indirecta. Se podría decir que hay tres métodos básicos para la determinación de bilirrubinas séricas:

- Índice ictérico
- Método directo
- Diazorreacción

Un aspecto importante por considerar es que la bilirrubina es una molécula fotosensible, por lo que las muestras deben ser analizadas lo más pronto posible y almacenadas cubiertas de la luz, ya sea natural o artificial. Esta particularidad de la molécula, así como su insolubilidad en agua, hacen que también sea difícil tener un

estándar puro como en los demás analitos, recurriéndose a soluciones con matrices proteicas o a factores para obtener los cálculos.

En 1883, Erhlich describió la reacción de copulación de bilirrubina con ácido sulfanílico diazotado, con formación de un pigmento azul, en soluciones fuertemente ácidas o alcalinas. Van der Bergh aplicó esta reacción a la determinación cuantitativa de bilirrubina en suero; al seguimiento de la reacción de Van der Bergh se ha observado que la bilirrubina prehepática, plasmática o libre solo reacciona después de añadirle una sustancia que facilite la reacción y, por lo tanto, es llamada indirecta a la reacción de Van der Bergh. La poshepática, soluble o conjugada reacciona rápidamente con el diazorreactivo, por lo que es llamada directa. En el método de Jendrassik-Grof se solubiliza la bilirrubina indirecta con una mezcla de cafeína, benzoato y acetato de sodio, para poder cuantificarla, empleando el reactivo de Van der Bergh.

Fundamento:

La bilirrubina total en la muestra se determina por copulación con ácido sulfanílico diazotado tras la adición de cafeína, benzoato y acetato de sodio, formando una azobilirrubina azul. La bilirrubina directa se mide sin la adición del álcali ni mezcla de cafeína-benzoato de sodio-acetato de sodio, como colorante azoico rojo. La bilirrubina no conjugada o indirecta se calcula por la diferencia entre la total y la conjugada.

Reacción:

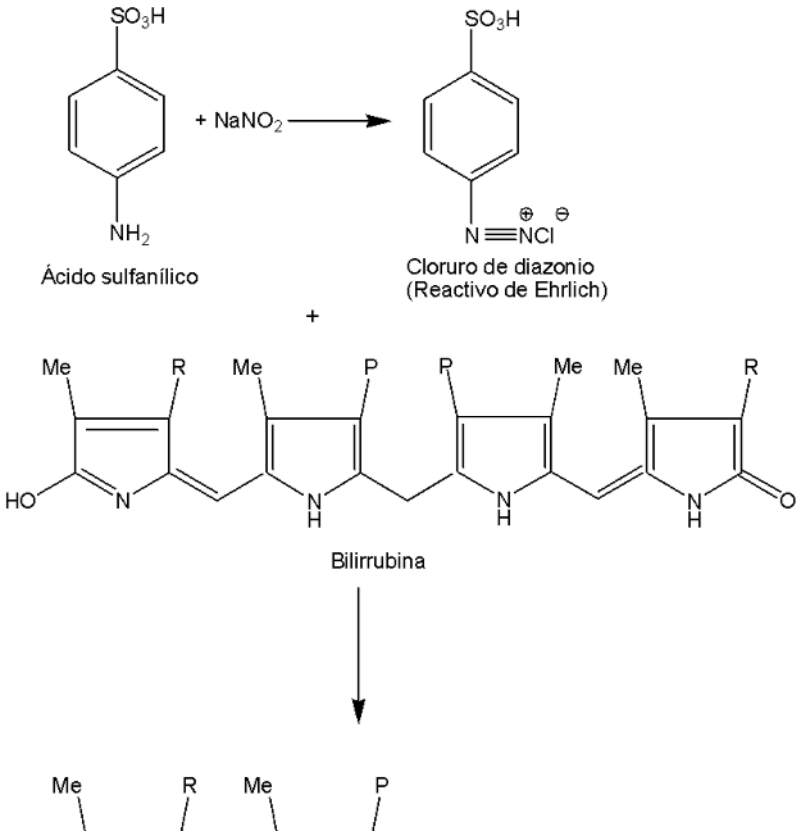


Figura 15. Reacción de bilirrubina en la diazorreacción. Tomada de: Pesce y Kaplan, 1990.

Material y reactivos

- Suero o plasma recién obtenidos.
- Estuche comercial para la determinación de creatinina por bilirrubinas por este método.

Equipo

- Espectrofotómetro

Servicios

- Energía eléctrica
- Agua

Técnica

Es dependiente del equipo comercial disponible. Seguir al pie de la letra las indicaciones del inserto, recordando que es una metodología para la bilirrubina directa y otra para la total.

Cálculos: los indicados en el instructivo del equipo utilizado, recordando que hay cálculos para bilirrubina total y bilirrubina directa. Para la bilirrubina indirecta:

Bilirrubina indirecta (mg/dL) = Bilirrubina total - Bilirrubina directa

Factores de conversión: $\frac{\frac{\mu mol}{L}}{\frac{mg}{dL}} = 17.1$

$$\frac{mg}{dL} = \frac{\frac{\mu mol}{L}}{0.058}$$

Valores de referencia:

Suero o plasma*	Tradicional	SI
Bilirrubina total	0.22 – 1.04 mg/dL	3.76 – 17.78 µmol/L
Bilirrubina directa	0.12 – 0.42 mg/dL	2.05 – 7.18 µmol/L
Bilirrubina indirecta	0.09 – 0 .65 mg/dL	1.54 – 11.12 µmol/L

*Para población mexicana a partir de 1 mes de edad. Tomado de: Olay-Fuentes G, 2013.

Reactivos: Obtener los resultados de la concentración de las tres mediciones de bilirrubinas de la muestra analizada e indicar si los valores se encuentran dentro de rango normal o patológico.

Seminario: SÍNDROME HIPERBILIRRUBINÉMICO (ICTÉRICO)

Cuestionario

1. Mencione brevemente en qué consiste la determinación de bilirrubinas por el método de índice ictérico y que inconvenientes tiene.
2. Mencione la importancia de la medición de la bilirrubina transcutánea en neonatología y diga cuál es el fundamento de la prueba.
3. Diga ¿a qué se le llama bilirrubina delta y cuál es su importancia diagnóstica?
4. ¿Cuántos tipos de ictericia se conocen y cómo se encuentran los pigmentos biliares en ellos?
5. ¿Qué pruebas de laboratorio complementan el estudio de la ictericia?

Bibliografía

- Chee YY, Chung PH, Wong RM, Wong KK. Jaundice in infants and children: causes, diagnosis, and management. Hong Kong Med J. 2018; 24(3): 285-92. doi: 10.12809/hkmj187245

- Chen HL, Wu SH, Hsu SH, Liou BY, Chen HL, Chang MH. Jaundice revisited: recent advances in the diagnosis and treatment of inherited cholestatic liver diseases. J Biomed Sci. 2018; 25(1): 75. doi: 10.1186/s12929-018-0475-8.
- Klauke R, Kytzia HJ, Weber F, Grote-Koska D, Brand K, Schumann G. Reference measurement procedure for total bilirubin in serum re-evaluated and measurement uncertainty determined. Clin Chim Acta 2018; 481: 115-20. doi: 10.1016/j.cca.2018.02.037.
- Fargo M, Grogan SP, Saguil A. Evaluation of jaundice in adults. Am Fam Physician. 2017; 95(3): 164-8.
- Gondal B, Aronsohn A. A systematic approach to patients with jaundice. Semin Intervent Radiol. 2016; 33(4): 253-8. doi: 10.1055/s-0036-1592331.
- Sticova E, Jirsa M. New insights in bilirubin metabolism and their clinical implications. World J Gastroenterol 2013; 19(38): 6398-407. doi: 10.3748/wjg.v19.i38.6398.
- Olay-Fuentes G, Díaz-Piedra P, Hernández-Gómez R, Cervantes-Villagrana RD, Presno-Bernal JM, Alcántara-Gómez LE. Determinación de intervalos de referencia para química clínica en población mexicana. Rev Latinoam Patol Clin 2013; 60(1): 43-51.
- Acosta-Torres S, Torres-Espina MT, Colina-Araujo JA, Colina-Chourio JA. Utilidad diagnóstica del método de Kramer para la detección clínica de la hiperbilirrubinemia neonatal. Inv Clín 2012; 53(2): 148-56.
- Gallegos-Dávila JA, Rodríguez-Balderrama J, Rodríguez-Bonito R, Abrego-Moya V, Rodríguez-Camelo G. Prevalencia y factores de riesgo para hiperbilirrubinemia indirecta neonatal en un hospital universitario. Med Univer 2009; 11(45): 226-30.
- Furzán JA, Expósito M, Luchón C. Correlación entre bilirrubina sérica y bilirrubinometría transcutánea en neonatos estratificados por edad gestacional. Arch Venez Pueric Pediatr 2007; 70(2): 39-46.
- Quesada LD, Zamora H, Martén A. El enfoque del paciente ictérico. Acta Méd Costarric 2005; 47(1): 15-23.
- Echeverría-Eguiluz JM, Allen-Novelo A, Osorno-Covarrubias L, Briseño-Ordoñez L, Dávila-Velázquez JR. Utilidad diagnóstica de la icterometría transcutánea para detectar hiperbilirrubinemia. Estudio de correlación clínica y bioquímica. Bol Hosp Infant Mex 2002; 59(2): 775-81.
- González-González AY, González-Escamilla HA, Garza-Ramos D, González-Aguilar L, González-Aguilar JL, García-Escobar V, et al. Ictericias. Med Univer 2000; 2: 203-210.

- Villa-Guillén M, Mata-Sandoval A, Murguía-de Sierra T. Ictericia neonatal I. Fisiopatología, etiología, diagnóstico y encefalopatía bilirrubinémica. Bol Hosp Infant Mex 2000; 57: 92-101.

Manejo de residuos

Debido a que se manejan muestras biológicas y reactivos químicos, los residuos deben ser tratados y desechados con base a lo establecido en la Norma Oficial Mexicana NOM-087-SEMARNAT-SSA1-2002, Protección ambiental-salud ambiental-residuos peligrosos biológico-infecciosos y el procedimiento SGC-FESZ-PO06. Para ello deben seguirse las indicaciones especificadas en este manual, según corresponda. Los residuos biológicos deberán colocarse en la zona roja y los químicos en la zona amarilla marcada en el laboratorio, y serán recolectados por el Departamento encargado de esta actividad siguiendo el calendario previamente elaborado por el Coordinador del Área.

Práctica 12

PERFIL ENZIMÁTICO HEPÁTICO

Está constituido por la determinación de la actividad de las enzimas que son liberadas al torrente circulatorio en casos de daño hepatocelular, con o sin necrosis, con o sin ictericia, o por inflamación, que nos ayudan al diagnóstico del tipo de daño y, en ocasiones, a determinar la magnitud del mismo.

Lo conforman las enzimas: a*spartato aminotransferasa* (AST, ASAT, GOT, TGO), a*lanina aminotransferasa* (ALT, ALAT, GPT, TGP), *colinesterasa* (pseudocolinesterasa, CHE) y g*amma glutamil transferasa* (γ−GT, GGT), como las principales.

Objetivo

– Reconocer la importancia de cada una de estas enzimas en el diagnóstico de diferentes problemas de lesión y disfunción hepática.

12.1 AMINOTRANSFERASAS

Objetivos

– Determinar la actividad enzimática de las aminotrasferasas en muestras biológicas.
– Interpretar la actividad enzimática de las aminotransferasas como parte importante del diagnóstico del perfil enzimático hepático.

Introducción

Son enzimas que se encuentran en mayor abundancia en hígado, corazón, riñón, tejido muscular, plasma, bilis, líquido cefalorraquídeo (LCR) y saliva. Una destrucción aguda de tejido da como resultado una rápida liberación de las enzimas en el suero.

Constituyen un grupo de enzimas que catalizan la interconversión de aminoácidos y α-cetoácidos, por transferencia de grupos amino. El ácido L-glutámico actúa como donador del grupo amino en la mayoría de las reacciones de transaminación; el fosfato de piridoxal (vitamina B_6) y su análogo amino, fosfopiridoxamina, funcionan como coenzimas en estas reacciones. La nomenclatura para aminotransferasas o transaminasas específicas varía y puede basarse en los dos aminoácidos que intervienen, en uno de ellos y el oxiácido con el cual reaccionan o sólo en un aminoácido bajo el sobreentendido que el otro aminoácido es ácido glutámico. Actualmente se ha acordado el nombrarlas en función del aminoácido sustrato de la reacción.

De todas las aminotransferasas existentes en el organismo, sólo dos son las empleadas para el diagnóstico clínico: la *L-alanina-2-oxoglutarato aminotransferasa* (ALT, antiguamente TGP, EC 2.6.1.2) y la *L-aspartato-2-oxoglutarato aminotransferasa* (AST, antiguamente TGO, EC 2.6.1.1).

La AST se encuentra localizada en la mitocondria y el citoplasma de las células, mientras que la ALT está sólo en el citoplasma, de ahí que, en el daño hepatocelular moderado, la ALT alcanza niveles superiores a la AST, mientras que esta última predomina en los casos en que existe algún daño hepatocelular acentuado y una necrosis. La ALT tiene una vida media más grande que la AST en el suero, por lo que los valores elevados persisten a menudo durante un largo periodo de tiempo. Para detectar el daño hepatocelular deben determinarse ambas enzimas.

12.1.1 MÉTODO DE REITMAN-FRANKEL

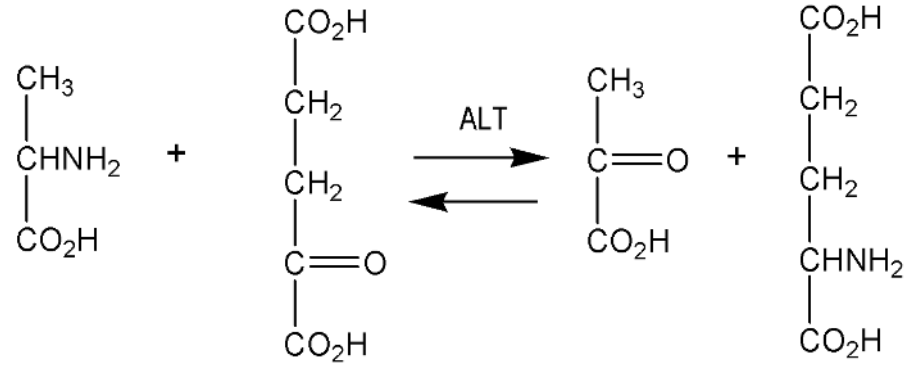
El sistema de análisis para medición de la actividad de aminotranferasas contiene dos aminoácidos y dos α-cetoácidos, y por ello se presentan ciertos problemas en la evaluación de la actividad de la enzima. No se dispone de un método cómodo para determinar uno y otro aminoácido presente en el sistema de reacción, por ello, ha de recurrirse a la medición de los α-cetoácidos, ya sea el ácido consumido o el ácido formado en la reacción. Los α-cetoácidos pueden determinarse colorimetricamente por copulación con 2,4-dinitrofenilhidrazina; sin embargo, estos métodos tienen algunos inconvenientes:

- Hay presentes dos α-cetoácidos que pueden formar la fenilhidrazona del ácido (producto colorido).
- A medida que la reacción transcurre, un α-cetoácido aumenta de concentración a la par que el otro disminuye.
- En la reacción catalizada por AST, el oxaloacetato es relativamente inestable.
- La reacción comienza con un α-cetoácido presente (un sustrato) y por ende los testigos de reactivo tienen una alta absorción.
- La concentración de sustrato debe mantenerse en el mínimo, para reducir lo más posible las lecturas altas con el testigo, y por ello pueden ser un factor limitante de la velocidad de reacción.
- α-cetoácidos como el piruvato, normalmente presentes en suero, producen color con fenilhidrazina y contribuyen a una alta absorción del testigo.

A pesar de estas limitantes, el método colorimétrico sigue siendo factible pues las hidrazonas de los productos de ambas reacciones, la catalizada por la AST y la catalizada por la ALT, son consideradamente más cromogénicas que las del α-cetoglutarato; además de que los métodos son relativamente simples. Los resultados obtenidos son comparables con los que se obtienen por los métodos cinéticos.

ALANINA AMINOTRANSFERASA (ALT) [EC 2.6.1.2]

Reacción enzimática:



Alanina — Ác. α-cetoglutárico — Ác. pirúvico — Ác. glutámico

Figura 16. Reacción llevada a cabo por *alanina aminotransferasa* (ALT). Tomado de: Anderson, 1995.

Fundamento:

La *alanina aminotransferasa* (ALT, GPT) cataliza la transferencia del grupo amino del glutamato al piruvato. Se deja actuar el suero problema en solución amortiguada sobre α-cetoglutarato y alanina, se mide la cantidad producida de piruvato al reaccionar con 2,4-dinitrofenilhidrazina y formar la hidrazona que se mide espectrofotométricamente.

Reacción:

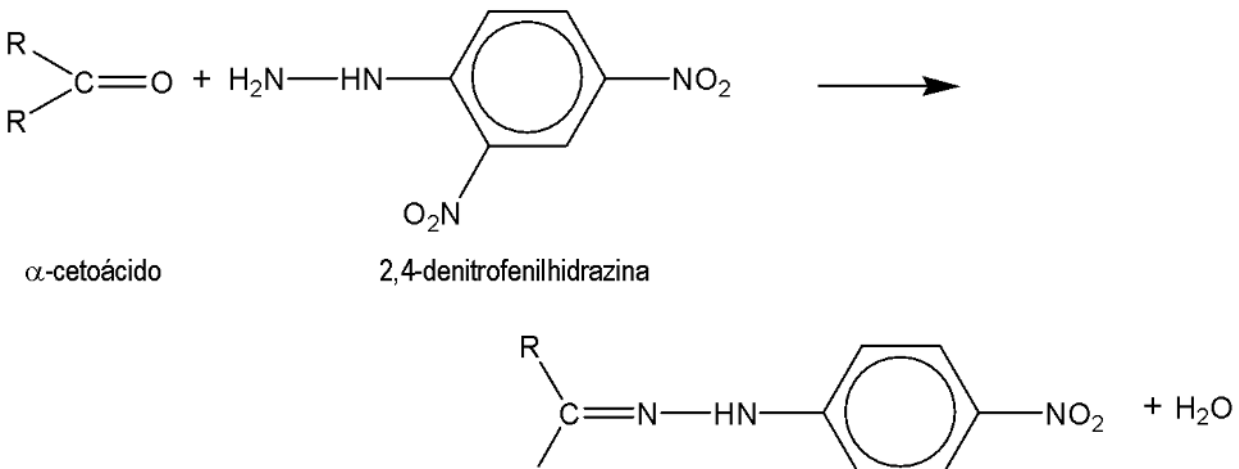


Figura 17. Reacción de formación del complejo colorido en la determinación de actividad de transaminasas según Reitman-Frankel. Tomado de: Pesce y Kaplan, 1990.

Material y reactivos

- Suero o plasma reciente, no hemolizado.
- Estuche comercial para la determinación de ALT por el método colorimétrico de Reitman-Frankel.

Equipo

- Espectrofotómetro

Servicios

- Energía eléctrica
- Agua

Técnica

Seguir al pie de la letra las indicaciones del inserto correspondiente.

* NOTAS:

- Para cada problema se requiere de un blanco testigo o blanco de suero.
- La temperatura y el tiempo de incubación son críticos y deben mantenerse EXACTAMENTE. Una variación de temperatura en un grado representa aproximadamente un 7% de error.

Cálculos: los indicados en el instructivo del estuche utilizado. Generalmente debe realizarse una curva de calibración e interpolar las lecturas en ella para obtener el valor de los problemas.

Factores de conversión: $\frac{nkat}{L=\frac{U}{L\ X\ 16.67}}$

$\frac{U}{L=\frac{\mu kat}{L\ X\ 60}}$

Valores de referencia:

	Tradicional	**SI**
Suero o plasma	Hasta 17 U/L	Hasta 283 nkat/L

ASPARTATO AMINOTRANSFERASA (AST) [EC 2.6.1.1]

Reacción enzimática:

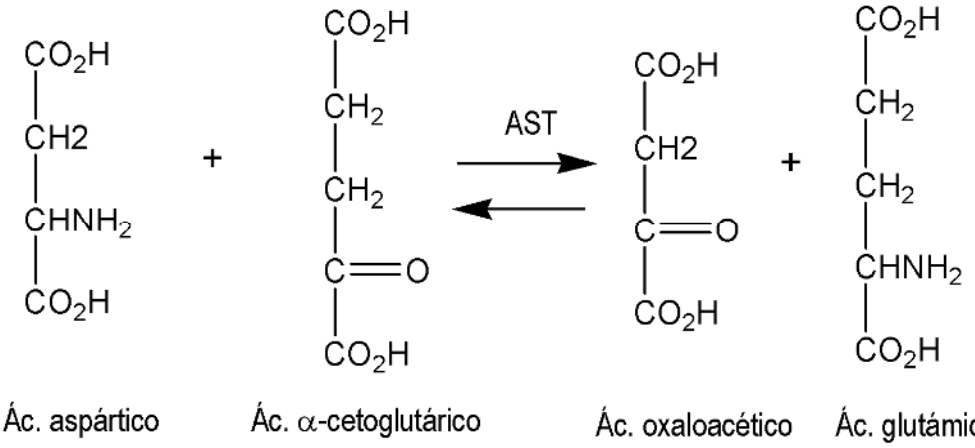


Figura 18. Reacción llevada a cabo por *aspartato aminotransferasa*. Tomado de: Anderson, 1995.

Fundamento:

La *aspartato aminotransferasa* (AST, GOT) cataliza la transferencia del grupo amino del glutamato al oxaloacetato. Para determinar su actividad se deja actuar el

suero problema en solución amortiguada sobre α-cetoglutarato y aspartato y se mide la cantidad producida de oxaloacetato.

El oxaloacetato formado reacciona en solución alcalina con 2,4-dinitrofenilhidrazina para formar la hidrazona que se mide fotométricamente.

Material y reactivos

- Suero o plasma recientes y no hemolizados.
- Estuche comercial para la determinación de AST por el método colorimétrico de Reitman-Frankel.

Equipo

- Espectrofotómetro

Servicios

- Energía eléctrica
- Agua

Técnica

Es dependiente del estuche comercial disponible. Seguir las indicaciones al pie de la letra.

* NOTAS: las ya indicadas para la ALT.

Cálculos: los indicados en el instructivo del estuche utilizado. Por lo general, para estas determinaciones es necesario realizar una curva de calibración para interpolar los resultados.

Factores de conversión: igual que para ALT.

Valores de referencia:

	Tradicional	**SI**
Suero o plasma	Hasta 20 U/L	Hasta 333 nkat/L

12.1.2 MÉTODO CINÉTICO

La naturaleza lábil de las enzimas y el hecho de que la determinación de la actividad enzimática esté basada sobre la cuantificación del grado de una reacción en la cual ellas funcionan como catalizadores, presentan aspectos particulares de técnica que no se encuentran en otros métodos usados en química clínica, donde en su mayor parte, se determinan compuestos estables.

Se denominan métodos cinéticos a los procedimientos en los cuales, una vez que se ha iniciado la reacción por el agregado de la muestra a una mezcla de amortiguador, sustrato y algunas veces activadores, el grado de reacción se determina por el monitoreo a distintos intervalos de tiempo. La mayoría de las veces se realiza por medio de reacciones acopladas, para medir finalmente la presencia de un producto secundario en una reacción o la presencia de una coenzima, como el NAD^+ en forma oxidada o reducida.

ALANINA AMINOTRANSFERASA (ALT)

Fundamento:

Para la determinación cuantitativa de la actividad de la *alanina aminotransferasa* se deja actuar el suero problema sobre una solución amortiguada, α−cetoglutarato y L-alanina. El piruvato producido se transforma enzimáticamente en lactato por medio de *lactato deshidrogenasa* (LDH) en presencia de $NADH_2$. La velocidad de utilización del $NADH_2$ puede medirse espectrofotométricamente por la disminución de la absorción en la región del ultravioleta cercano. Sus valores son directamente proporcionales a la actividad de la ALT.

Reacción:

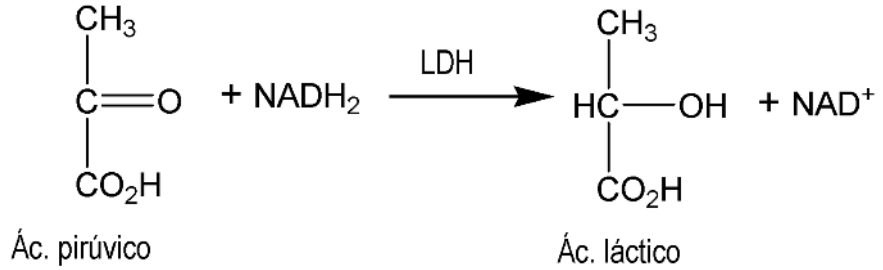


Figura 19. Reacción cinética para determinar la actividad de *alanina aminotransferasa* utilizando ácido pirúvico como sustrato. Tomado de: Anderson, 1995.

Material y reactivos

- Suero o plasma reciente, no hemolizado.
- Estuche comercial para la determinación de la actividad de ALT por el método cinético UV.

Equipo

- Espectrofotómetro

Servicios

- Energía eléctrica
- Agua

Técnica

Es dependiente del estuche comercial utilizado. Seguir EXACTAMENTE las indicaciones del fabricante.

* NOTAS:

- En estas determinaciones, la temperatura de reacción es sumamente importante.
- Los factores reportados por los fabricantes son específicos para cada coeficiente de extinción molar, sustrato, amortiguador y temperatura empleados, por lo que no deben modificarse.
- Muchos estuches comerciales tienen la prueba optimada a 25°C.
- Por lo anterior, verificar la temperatura a trabajar, controlarla y utilizar el factor correspondiente en el cálculo.

Cálculos: normalmente para realizar los cálculos debe obtenerse el valor promedio de las diferencias de extinción (⊗E) y multiplicarse por un factor que es dependiente de la temperatura de reacción.

Factores de conversión: Los mismos que para el método de Reitman-Frankel.

Valores de referencia:

Suero o plasma*	**Tradicional**	**SI**
Mujeres	7 – 36 U/L	117 – 600 nkat/L
Hombres	9 – 47 U/L	150 – 783 nkat/L

*Para población mexicana. Tomado de: Olay-Fuentes G, 2013.

ASPARTATO AMINOTRANSFERASA (AST)

Fundamento:

Para la determinación de la actividad de la *aspartato aminotransferasa*, se deja actuar el suero problema en solución amortiguada sobre α−cetoglutarato y aspartato. El oxaloacetato producido se transforma enzimáticamente en malato por medio de la *malato deshidrogenasa* (MDH) en presencia de $NADH_2$. La velocidad de utilización del $NADH_2$ puede medirse espectrofotométricamente por disminución de la extinción en la región del ultravioleta cercano.

Reacción:

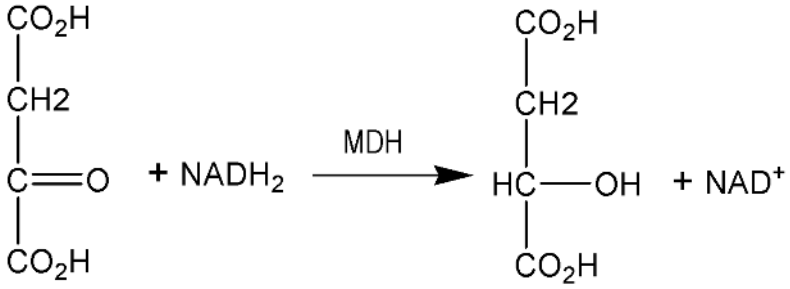


Figura 20. Reacción cinética para determinar la actividad de *aspartato aminotransferasa* usando ácido oxaloacético como sustrato. Tomado de: Pesce y Kaplan, 1990.

Material y reactivos

- Suero o plasma reciente, no hemolizado.
- Estuche comercial para la determinación de la actividad de AST por el método cinético UV.

Equipo

- Espectrofotómetro

Servicios

- Energía eléctrica
- Agua

Técnica

Es dependiente del estuche comercial disponible. Seguir EXACTAMENTE las instrucciones del fabricante.

* NOTAS: las mismas que para la ALT, más las especificadas por el fabricante.

Cálculos: son semejantes a los señalados para la ALT por el método cinético.

Factores de conversión: Los mismos que para el método de Reitman-Frankel.

Valores de referencia:

Suero o plasma*	Tradicional	SI
Mujeres u hombres	12 – 35 U/L	200 – 583 nkat/L

*Para población mexicana. Tomado de: Olay-Fuentes G, 2013.

Resultados: Obtener el resultado de la actividad de ambas transaminasas en la muestra analizada e indicar si los valores se encuentran dentro de rango normal o patológico.

Seminario: HEPATITIS VIRAL

Cuestionario

1. Mencione qué importancia tiene para el diagnóstico el uso del cociente AST/ALT (cociente de Ritis); cuál es el valor considerado como normal y cuál cuando nos indica la presencia de una enfermedad hepática.
2. Explique por qué las transaminasas se ven elevadas en la hepatitis viral.
3. Realice un cuadro que muestre cuáles son las hepatitis virales que se conocen hasta el momento y cuáles son las características principales de cada una.
4. Realice una gráfica que muestre el comportamiento de las transaminasas durante el proceso de hepatitis viral.
5. Diga cuáles son las pruebas de laboratorio que complementan el diagnóstico de las hepatitis virales, incluyendo las pruebas inmunológicas.

Bibliografía

- Mateos Muñoz B, Martínez Ortega A, Sánchez Aldehuelo R, Guerrero García A. Hepatitis víricas: virus de la hepatitis A, B y E. Medicine. 2020; 13(5): 237-44.
- Nguyen MH, Wong G, Gane E, Kao JH, Dusheiko G. Hepatitis B virus: advances in prevention, diagnosis, and therapy. Clin Microbiol Rev. 2020; 33(2): e00046-19. doi: 10.1128/CMR.00046-19.

- Taylor JM. Infection by hepatitis delta virus. Viruses. 2020; 12(6): 648. doi: 10.3390/v12060648.
- Cullen JM, Lemon SM. Comparative pathology of hepatitis A virus and hepatitis E virus infection. Cold Spring Harb Perspect Med. 2019; 9(4): a033456. doi: 10.1101/cshperspect.a033456.
- Houghton M. Hepatitis C virus: 30 years after its discovery. Cold Spring Harb Perspect Med. 2019; 9(12): a037069. doi: 10.1101/cshperspect.a037069.
- Conde I, Vinaixa C, Berenguer M. Cirrosis por hepatitis C. Estado actual. Med Clin (Barc). 2017; 148(2): 78-85. doi: 10.1016/j.medcli.2016.09.019.
- Fourati S, Pawlotsky JM. Recent advances in understanding and diagnosing hepatitis B virus infection. F1000Research. 2016; 5(F1000 Faculty Rev): 2243. doi: 10.12688/f1000research.8983.1.
- Lhomme S, Marion O, Abravanel F, Chapuy-Regaud S, Kamar N, Izopet J. Hepatitis E pathogenesis. Viruses 2016; 8: 212. doi:10.3390/v8080212
- Song JE, Kim DY. Diagnosis of hepatitis B. Ann Transl Med 2016; 4(18): 338. doi: 10.21037/atm.2016.09.11
- Olay-Fuentes G, Díaz-Piedra P, Hernández-Gómez R, Cervantes-Villagrana RD, Presno-Bernal JM, Alcántara-Gómez LE. Determinación de intervalos de referencia para química clínica en población mexicana. Rev Latinoam Patol Clin 2013; 60(1): 43-51.
- Escobedo-Meléndez G. Hepatitis virales de la A-E en México: actualización en el 2012. Rev Med MD 2012; 3(3):141.
- Hernández-Bautista RJ, Martínez-García ME. Importancia diagnóstica e interpretación de las transaminasas en el laboratorio clínico. LabActa 2010: 22(1): 15-23.
- Perdigón-Villaseñor G, Fernández-Cantón SB. Evolución reciente del comportamiento de las hepatitis virales en México, 1990-2007. Bol Hosp Infant Mex 2009; 66: 204-7.
- Barriga-Angulo G, Arumir-Escorza C, Mercado-González F, Molina-Flores X. Marcadores serológicos de hepatitis viral (A, B, C) en pacientes con hepatitis aguda y crónica. Rev Mex Patol Clin 2008; 55(3):143-8.
- Giannini EG, Testa R, Savarino V. Liver enzyme alteration: a guide for clinicians. CMAJ 2005; 172: 367-79. doi: 10.1503/cmaj.1040752.

Manejo de residuos

Debido a que se manejan muestras biológicas y reactivos químicos, los residuos deben ser tratados y desechados con base a lo establecido en la Norma Oficial

Mexicana NOM-087-SEMARNAT-SSA1-2002, Protección ambiental-salud ambiental-residuos peligrosos biológico-infecciosos y el procedimiento SGC-FESZ-PO06. Para ello deben seguirse las indicaciones especificadas en este manual, según corresponda. Los residuos biológicos deberán colocarse en la zona roja y los químicos en la zona amarilla marcada en el laboratorio, y serán recolectados por el Departamento encargado de esta actividad siguiendo el calendario previamente elaborado por el Coordinador del Área.

12.2 COLINESTERASA Y ℘-GLUTAMIL TRANSFERASA

Objetivos

– Determinar la actividad enzimática de las enzimas colinesterasa y γ-glutamil transferasa en muestras biológicas.
– Interpretar la actividad de estas enzimas como parte importante del diagnóstico del perfil enzimático hepático.

Introducción

Estas dos enzimas conforman una extensión del perfil enzimático hepático tradicional. Se ha comprobado que el hígado es la fuente principal de la *colinesterasa* (CHE, EC 3.1.1.8) plasmática. Moderadamente se ha incrementado el interés clínico por esta enzima al observarse su clara dependencia de la función hepática y su utilidad como índice y prueba de funcionamiento hepático. Es importante en el diagnóstico de hepatopatías crónicas ya que su actividad disminuye al igual que la albúmina; también se ha observado una disminución en su actividad por exposición a compuestos organofosforados.

La γ−g*lutamil transferasa* (GGT, γ-GT, EC 2.3.2.2) sérica aumenta generalmente en enfermedades hepáticas. Sufre una elevación antes que otras enzimas hepáticas en trastornos como colecistitis aguda, necrosis hepática aguda y subaguda, pancreatitis aguda y otras. Además, tiene la ventaja de no elevarse en procesos óseos. Se ha propuesto a esta enzima como una prueba de detección para el abuso de alcohol y fármacos como: barbitúricos, antidepresivos y anticonvulsivantes, porque se activa en presencia de éstos.

12.2.1 Colinesterasa (CHE) [EC 3.1.1.8]
MÉTODO CINÉTICO

Se han denominado con el nombre genérico de colinesterasas a las esterasas que hidrolizan los ésteres de colina a una velocidad mayor que los demás ésteres. Hay dos tipos de colinesterasas, fundamentalmente basados en ciertas especificidades de sustrato y las susceptibilidades a determinados inhibidores. En

primer lugar, está la acetilcolinesterasa (*acetilcolina hidrolasa*), conocida también como colinesterasa eritrocitaria, verdadera, específica o colinesterasa tipo I, que hidroliza la acetilcolina y la acetil-β-metilcolina pero no otros ésteres de colina. El segundo grupo (*acetilcolina acil hidrolasa*) también conocida como colinesterasa sérica, colinesterasa inespecífica, seudocolinesterasa o colinesterasa tipo II, que actúa sobre diversos ésteres de colina, fenílicos, nitrofenílicos y otros.

La enzima eritrocitaria es inhibida por su sustrato, acetilcolina, si éste se encuentra presente en concentraciones superiores a 10^{-2} M. Las dos son inhibidas por los alcaloides prostigmina y fisostigmina, que contienen un nitrógeno cuaternario en su estructura, e inhiben, por competencia con el residuo colina de acetilcolina, en el lugar de enlace en la superficie de la enzima.

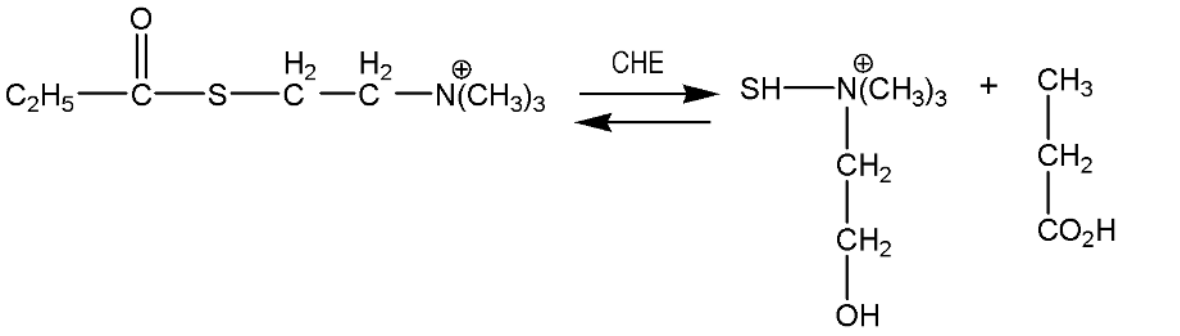
Se puede solicitar al laboratorio la determinación de la actividad enzimática como prueba de funcionamiento hepático, como indicador de posible envenenamiento por insecticidas o para descubrir formas atípicas de la enzima.

Se han empleado varios sustratos para medir la actividad enzimática: acetilcolina; propionil y butirilcolina, benzoilcolina y acetil-β-metilcolina. El empleo del sustrato butiril-tiocolina se ha adaptado a un sistema automatizado para la determinación de la actividad de esta enzima. Los sustratos propionil y butirilcolina son útiles para diferenciar las colinesterasas eritrocitarias de las plasmáticas, publicándose valores ligeramente más elevados de actividad enzimática con hemolizados que cuando se trabaja con eritrocitos intactos.

Fundamento:

Se emplea como sustrato propioniltiocolina, que es transformado por acción de la *colinesterasa* del plasma en tiocolina que se pone a reaccionar con 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoato y al cual reduce a 5-mercapto-2-nitrobenzoato. Midiéndose el color amarillo resultante del anión cinéticamente a 412 nm.

Reacción:



Tiocolina + 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoato ⇵ 5-mercapto-2-nitrobenzoato

Figura 21. Reacción para determinar la actividad de *colinesterasa* por el método cinético colorimétrico. Tomado de: Pesce y Kaplan, 1990.

Material y reactivos

- Suero o plasma.
- Estuche comercial para la determinación de la actividad enzimática de colinesterasa por el método cinético.

Equipo

- Espectrofotómetro

Servicios

- Energía eléctrica
- Agua

Técnica

Es dependiente del estuche comercial disponible. Seguir las indicaciones al pie de la letra, sobre todo, en las incubaciones y los tiempos de lectura.

Cálculos: los indicados en el instructivo del estuche utilizado.

Factores de conversión: Los mismos que para las transaminasas.

Valores de referencia:

	Tradicional	SI
Suero o plasma	4.7 – 11 U/L	78 – 183 nkat/L

12.2.2 γ-Glutamil transferasa (GGT) [EC 2.3.2.2]

MÉTODO DE SZASZ

Es una de las múltiples peptidasas capaces de romper los enlaces peptídicos terminales de los péptidos o las proteínas, siendo una carboxipeptidasa que ataca específicamente el C-terminal del ácido glutámico.

El ácido glutámico puede transferirse a diversos aceptores adecuados entre los que cabe incluir péptidos, α-aminoácido e incluso agua, pero no D-aminoácidos. La especificidad reside fundamentalmente en la porción γ-glutamil del sustrato. Se emplean varios sustratos: γ-glutamil-α-naftilamida; glicilglicina y glicilglicilglicina, siendo el más ávido de todos los aceptores la glicilglicilglicina. Se ha comprobado que realiza tres reacciones en suero: a) hidrólisis, b) transpeptidación interna y c) transpeptidación externa.

En una enzima que se encuentra en todos los tejidos, pero las concentraciones mayores corresponden al riñón; no obstante, la que está presente en el suero se origina en el sistema hepatobiliar. Su actividad se puede encontrar incrementada en afecciones de conductos biliares, cirrosis, carcinoma metastático y pancreatitis.

El método de Szasz emplea como sustrato la γ-glutamil-p-nitroanilida y como aceptor la glicilglicina. Las ventajas fundamentales de este método son: utiliza concentraciones óptimas de sustrato, posee una gran sensibilidad y es de rápida y fácil ejecución, permitiendo analizar simultáneamente un buen número de muestras.

Fundamento:

La GGT cataliza la transferencia del grupo γ-glutamil ligado por un enlace peptídico a otro péptido aceptor. En esta prueba se mide el amino-5-nitro-2-benzoato, que se separa del sustrato L-γ-glutamil-3-carboxi-4-nitroanilida y que absorbe a 405 nm. El grupo γ-glutamil se transfiere a la glicilglicina.

Reacción:

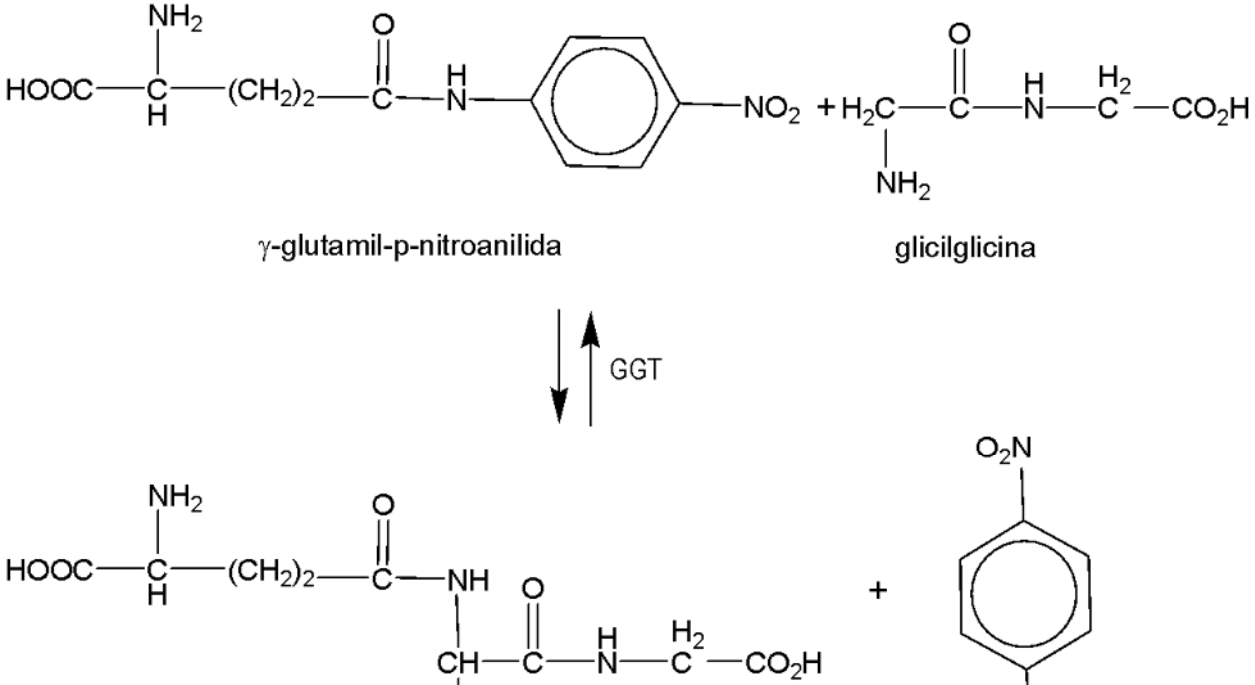


Figura 22. Reacción de determinación de la actividad de GGT por el método de Szasz. Tomado de: Baghavan, 1983.

Material y reactivos

- Suero.
- Estuche comercial para la determinación de GGT por el método cinético.

Equipo

- Espectrofotómetro

Servicios

- Energía eléctrica
- Agua

Técnica

Seguir las instrucciones del estuche comercial que se disponga. Hay que tener especial cuidado en la temperatura y los tiempos de lectura.

* NOTAS:

- La enzima es estable en suero, tanto si se conserva a temperatura ambiente o en refrigeración, sólo por una semana.

Cálculos: los indicados en el inserto del fabricante. No deben modificarse los factores propuestos en el instructivo.

Factores de conversión: los mismos que para transaminasas.

Valores de referencia:

Suero	**Tradicional***	**SI**

Mujeres	10 – 50 U/L	167 – 833 nkat/L
Hombres	13 – 82 U/L	217 – 1367 nkat/L

*Para población mexicana. Tomado de: Olay-Fuentes G, 2013.

Resultados: Obtener el resultado de la actividad de ambas enzimas en la muestra analizada e indicar si los valores se encuentran dentro de rango normal o patológico.

Seminario: CIRROSIS HEPÁTICA ALCOHÓLICA

Cuestionario

1. ¿En qué estados patológicos, a parte de la cirrosis hepática, es de utilidad medir la actividad de la *colinesterasa* y la γ-*glutamil transferasa*?
2. ¿Qué diferencia existe entre la pseudocolinesterasa (CHE) y la colinesterasa verdadera (ACHE)?
3. ¿Qué induce la actividad de la GGT y por qué mecanismo?
4. Explique brevemente el proceso patológico que se lleva a cabo en el hígado para que se convierta en cirrótico.
5. ¿Qué exámenes de laboratorio se deben realizar para un completo diagnóstico de cirrosis hepática alcohólica?

Bibliografía

- Fortea JI, García Carrera I, Puente A, Crespo J. Cirrosis hepática. Medicine. 2020; 13(6): 297-307.
- Lucendo Jiménez L, Rayón Moreno L, Clemente Sánchez A, Rincón Rodríguez D. Protocolo diagnóstico de la cirrosis. Medicine. 2020; 13(12): 699-702.
- Rachakonda V, Bataller R, Duarte-Rojo A. Recent advances in alcoholic hepatitis. F1000Res. 2020; 9: F1000 Faculty Rev-97. doi: 10.12688/f1000research.20394.1.
- Hosseini N, Shor J, Szabo G. Alcoholic hepatitis: a review. Alcohol Alcohol. 2019; 54(4): 408-16. doi: 10.1093/alcalc/agz036.
- Kong LZ, Chandimali N, Han YH, Lee DH, Kim JS, Kim SU, et al. Pathogenesis, early diagnosis, and therapeutic management of alcoholic liver disease. Int J Mol Sci. 2019; 20(11): 2712. doi: 10.3390/ijms20112712.
- Fung P, Pyrsopoulos N. Emerging concepts in alcoholic hepatitis. World J Hepatol 2017; 9(12): 567-85. doi: 10.4254/wjh.v9.i12.567.
- Liang R, Liu A, Perumpail RB, Wong RJ, Ahmed A. Advances in alcoholic liver disease: An update on alcoholic hepatitis. World J Gastroenterol 2015; 21(42): 11893-903. doi: 10.3748/wjg.v21.i42.11893.
- Ramos-López O, Martínez-López E, Román S, Fierro NA, Panduro A. Genetic, metabolic and environmental factors involved in the development of liver cirrhosis

in Mexico. World J Gastroenterol 2015; 21(41): 11552-66. doi: 10.3748/wjg.v21.i41.11552.
- Torok NJ. Update on alcoholic hepatitis. Biomolecules 2015; 5: 2978-86. doi:10.3390/biom5042978
- Cequera A, García de León-Méndez MC. Biomarcadores para fibrosis hepática, avances, ventajas y desventajas. Rev Gastroenterol Mex 2014; 79(3): 187-99.
- Geuguer-Chávez L. Pedro-González A, LópezVéjar CE, Elizalde-Barrera CI, Guerrero-González J. Concentraciones séricas de GGT como indicador pronóstico de mortalidad intrahospitalaria en pacientes con hepatitis alcohólica severa. Med Int Mex 2014; 30: 11-23.
- Olay-Fuentes G, Díaz-Piedra P, Hernández-Gómez R, Cervantes-Villagrana RD, Presno-Bernal JM, Alcántara-Gómez LE. Determinación de intervalos de referencia para química clínica en población mexicana. Rev Latinoam Patol Clin 2013; 60(1): 43-51.
- Higuera de la Tijera MF, Pérez-Hernández JL, Servín-Caamaño AI, Serralde-Zúñiga AE, et al. Hepatitis alcohólica. Rev Med Hosp Gen Mex 2009; 72(4): 215-21.
- Benítez-Bribiesca L. La cirrosis hepática ¿Puede ser reversible? Acta Med Gpo Ángeles 2003; 1(1): 37-9.
- Pagani F, Panteghini M, Biological variation in serum activities of three hepatic enzymes. Clin Chem 2001; 47: 355-356.

Manejo de residuos

Debido a que se manejan muestras biológicas y reactivos químicos, los residuos deben ser tratados y desechados con base a lo establecido en la Norma Oficial Mexicana NOM-087-SEMARNAT-SSA1-2002, Protección ambiental-salud ambiental-residuos peligrosos biológico-infecciosos y el procedimiento SGC-FESZ-PO06. Para ello deben seguirse las indicaciones especificadas en este manual, según corresponda. Los residuos biológicos deberán colocarse en la zona roja y los químicos en la zona amarilla marcada en el laboratorio, y serán recolectados por el Departamento encargado de esta actividad siguiendo el calendario previamente elaborado por el Coordinador del Área.

Práctica 13

PERFIL ENZIMÁTICO CARDIACO

Objetivos

– Determinar la actividad de CK y LDH, con sus respectivas isoenzimas, en muestras de suero.
– Reconocer el papel estas enzimas en el diagnóstico de diferentes problemas de lesiones en el corazón.

Introducción

La medición de la funcionalidad cardiaca en el laboratorio clínico se basa, principalmente, en la medición de la actividad de algunas enzimas. Las enzimas cardíacas son de importancia clínica debido a que la detección de su liberación en el torrente sanguíneo proporciona un indicio sensible y específico de lesión y muerte de la célula miocárdica. Estas enzimas, para que revistan importancia clínica, deben ser solubles y persistir en la circulación un tiempo suficientemente largo para poder ser detectadas.

Especialmente en el infarto al miocardio (IAM), las enzimas cardíacas se aumentan en cerca del 95% de los casos. Después de la instalación de los síntomas del IAM se observa en la mayoría de los pacientes un período durante el cual es posible detectar una elevación de las enzimas liberadas por el tejido miocárdico lastimado. Esta elevación temporal es particular para cada enzima y varía de un paciente a otro, pero se ha establecido un patrón típico con gran importancia

diagnóstica. El grado de elevación de los niveles enzimáticos es un índice inexacto de la extensión de la necrosis, pero sirve de pronóstico.

Son cuatro las enzimas cuya actividad es de importancia para el diagnóstico del IAM: *creatina fosfocinasa* (CK, EC 2.7.3.2), *aspartato aminotransferasa* (AST, EC 2.6.1.1), *lactato deshidrogenasa* (LDH, EC 1.1.1.27) y su isoenzima 1 (LD_1) también llamada *hidroxibutirato deshidrogenasa* (HBDH).

13.1 CREATINA CINASA (CK) [EC 2.7.3.2] MÉTODO DE ROSALKI (NAC ACTIVADO)

También es llamada *creatina fosfocinasa* (CPK). Cataliza la fosforilación reversible de creatina por trifosfato de adenosina. La posición de equilibrio de la reacción depende de la concentración de iones hidrógeno.

Es una enzima de estructura dimérica, distinguiéndose dos subunidades: M (músculo) y B (cerebro); por consiguiente, pueden derivarse tres isoenzimas: CK-MM, CK-MB y CK-BB por la combinación de las subunidades.

Es una enzima que para una máxima actividad necesita la presencia de iones de magnesio, aunque también manganeso y en menor grado calcio actúan como activadores; un exceso de cualquiera de los activadores inhibe la reacción.

Es relativamente estable en el suero, además que puede restablecerse su actividad por adición de un compuesto sulfhídrico como cisteína si ha pasado mucho tiempo desde la obtención de la muestra.

Es la enzima que se ha acreditado e impuesto a nivel internacional como la guía para el diagnóstico de IAM. En la mayoría de los casos, sube lo más tarde a las 6 h. después del infarto agudo y los valores máximos se observan aproximadamente a las 20 h. El nivel de CK facilita información valiosa sobre el tamaño del área infartada. Debido a que la CK total se incrementa en procesos musculares, incluyendo hasta una inyección, la cuantificación de la fracción CK-MB, específica cardiaca, reviste mucha importancia para aclarar el diagnóstico.

Para la determinación de la actividad de la enzima se emplea un método cinético con el uso de dos enzimas: la *hexoquinasa* y la *glucosa-6-fosfato deshidrogenasa,* para transformar finalmente el NADP en NADPH que es lo que se mide espectrofotométricamente.

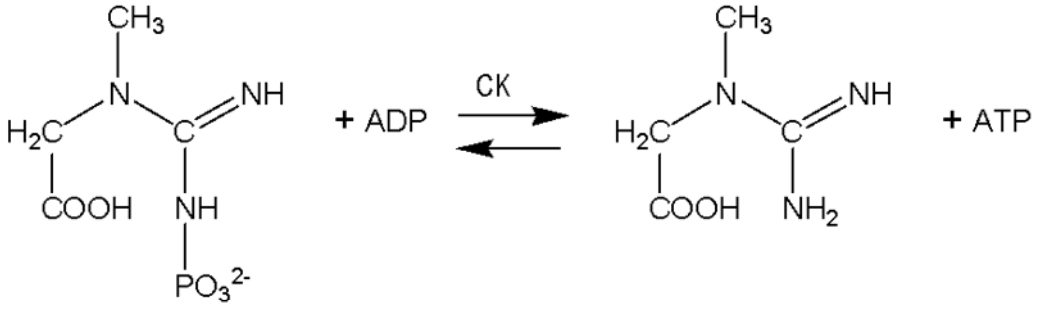
Fundamento:

Se utiliza la reacción inversa a la biológica con ADP y fosfato de creatina como sustrato. El ATP formado es generalmente un nuevo sustrato para fosforilar glucosa en presencia de *hexoquinasa* (HK). El producto glucosa-6-fosfato es oxidado por

NADP en presencia de *glucosa-6-fosfato deshidrogenasa* (G-6-PDH) para formar 6-fosfoglucono-lactona y $NADPH_2$.

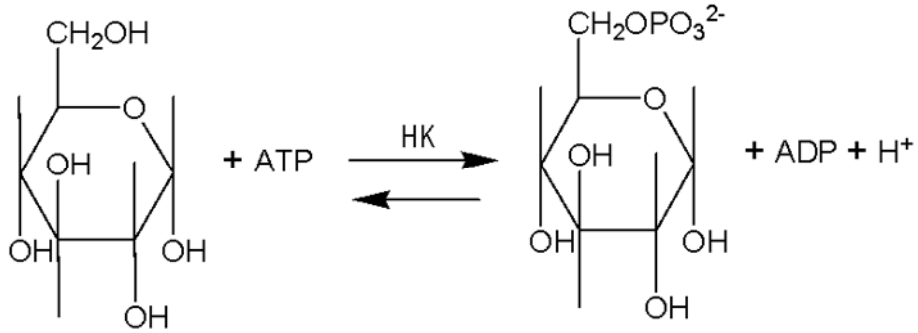
La reacción se sigue midiendo la absorción a 340 nm, a medida que se genera el NADPH. Los reactivos contienen N-acetilcisteína como activador de la CK en el suero fresco.

Reacción:



Creatina fosfato

Creatina



α-D-glucosa

α-D-glucosa-6-fosfato

Figura 23. Reacción de determinación de la actividad de CK por el método Rosalki. Tomado de: Anderson, 1995.

Material y reactivos

- Suero, plasma heparinizado o con EDTA.
- Estuche comercial para la determinación de la actividad enzimática de CK que sea NAC-activado.

Equipo

- Espectrofotómetro

Servicios

- Energía eléctrica
- Agua

Técnica

Es dependiente del estuche comercial disponible. Seguir al pie de la letra las indicaciones.

*NOTA:

- En estas determinaciones cinéticas, es importante cronometrar los tiempos, definir la longitud de onda a leer con anticipación y la temperatura de reacción.
- Tomar en cuenta estas variables para utilizar el factor de cálculo correcto.

Cálculos: los indicados en el instructivo del estuche utilizado. No modificar los factores de cálculo.

Factores de conversión: los mismos que para transaminasas, si se desea expresar en nkat/L.

Valores de referencia: los especificados en el inserto del estuche utilizado, ya que son variables dependiendo del método.

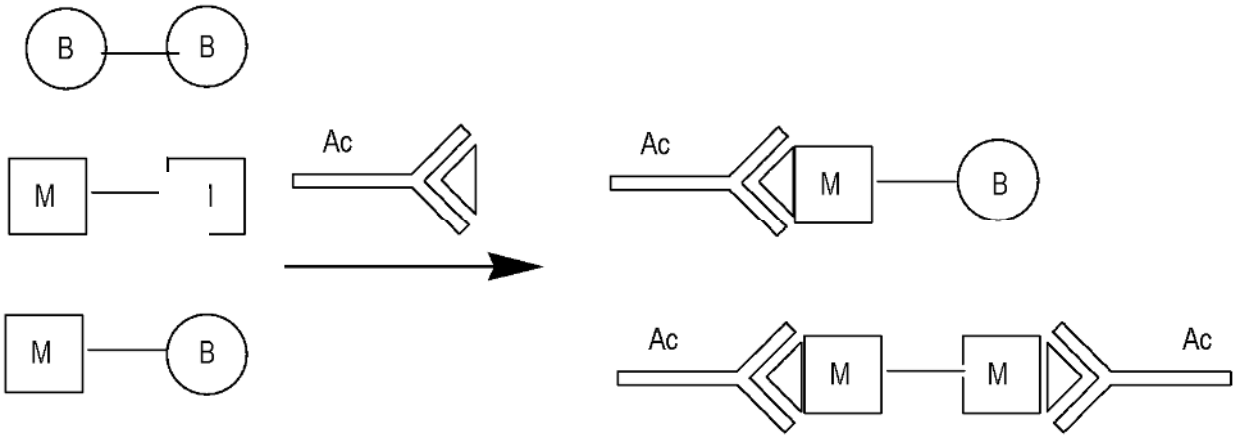
13.2 CK-MB
MÉTODO INMUNOLÓGICO

Una forma práctica de diferenciar si se tiene un daño a nivel de músculo esquelético o en el miocardio es la determinación de la fracción MB de la CK, que se obtiene por diferentes métodos analíticos, siendo el método inmunológico el más factible de utilizar para propósitos de rutina.

Fundamento:

Los reactivos para determinar la actividad de la *creatina cinasa* contienen además anticuerpos antiCK-M, que inhiben totalmente la actividad de las subunidades M (músculo) de la CK, sin influir sobre la actividad de la subunidad B. Por ello, en la prueba se mide solamente la actividad de la subunidad CK-B en la prueba, partiendo del hecho que la actividad de CK-BB en el suero es prácticamente nula en la patología cardiaca o muscular.

Reacción:



B = cerebro (*brain*); M = músculo(*muscle*); Ac = anticuerpo.

Figura 24. Reacción inmunológica para la determinación de la actividad de CK-MB. Tomado de Stein, 1988.

Material y reactivos

- Suero o plasma (con heparina o EDTA).
- Estuche comercial para la determinación de la actividad de CK-MB activada.

Equipo

- Espectrofotómetro

Servicios

- Energía eléctrica
- Agua

Técnica

La indicada en el inserto del estuche comercial disponible.

Cálculos: obtener los cambios de absorción por minuto (⊗ E/min.) y multiplicar por el factor correspondiente, de acuerdo a la temperatura y longitud de onda de trabajo.

Factores de conversión: los mismos que para transaminasas, si se desea expresar en nkat/L.

Valores de referencia:

	25°C	**30°C**	**37°C**
Adultos (U/L) < de:	10	16	25
Adultos (nkat/L) < de:	167	267	417

Interpretación:

	25°C	**37°**
	Alta probabilidad de daño miocárdico	
CK total (U/L)	> 160	> 420
(nkat/L)	> 2667	> 7000
CK-MB (U/L)	> 10	> 25
(nkat/L)	> 167	> 417
CK-MB	> 6% de la actividad total de CK.	
	Alta probabilidad de daño al músculo esquelético:	
CK-MB	< 6% de la actividad total de CK.	

En caso de infartos ocurridos en las 48-60 h anteriores al examen de laboratorio, es posible obtener actividades porcentuales de CK-MB menores al 6%.

13.3 LACTATO DESHIDROGENASA (LDH) [EC 1.1.1.27]
MÉTODO CINÉTICO

Es una enzima de transferencia de hidrógeno, que cataliza la oxidación de L-lactato a piruvato por medio de NAD^+ como aceptor de hidrógeno, es una reacción reversible estando el equilibrio fuertemente desplazado en sentido del lactato.

El pH óptimo de la reacción directa es de 8.8 – 8.9 y de la inversa de 7.2 – 7.8; y depende de una serie de factores: isoenzima más abundante cuantitativamente en el producto que se analiza, la temperatura, el amortiguador y la concentración del sustrato.

Está ampliamente distribuida en los tejidos, por lo que molecularmente existen 5 isoenzimas que se numeran de acuerdo a su movimiento electroforético a partir del ánodo: LD_1, LD_2, LD_3, LD_4 y LD_5.

La enzima purificada, es muy inestable cuando está disuelta en agua, pero bastante estable en sulfato amónico concentrado y en presencia de otras proteínas. Las muestras de suero pueden guardarse a temperatura ambiente durante dos o tres días sin pérdida significativa de actividad.

Se han descrito una gran cantidad de procedimientos para la medida de la actividad total de la LDH. El más directo es el análisis espectrofotométrico basado en registrar la velocidad con que aumenta o disminuye la absorción a 340 nm que corresponde al máximo de absorción para la NADH.

Fundamento:

Para la valoración cuantitativa de la actividad enzimática, se deja actuar la enzima sobre piruvato y $NADH_2$, y se mide la disminución de la densidad óptica a 340 nm.

Reacción:

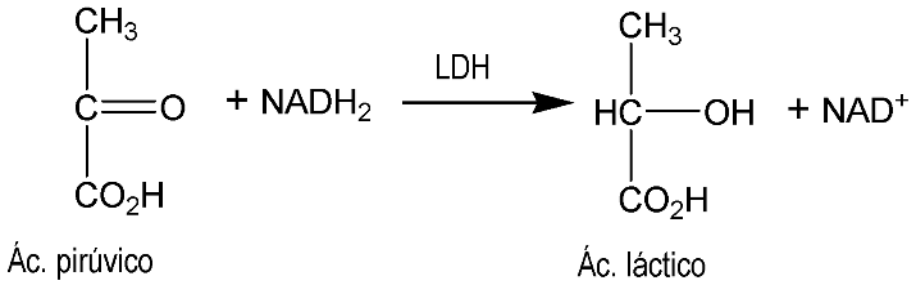


Figura 25. Reacción de determinación de la actividad de LDH por el método cinético. Tomado de: Anderson, 1995.

Material y reactivos

- Suero reciente, no hemolizado.
- Estuche comercial para la determinación de la actividad enzimática de LDH por el método cinético.

Equipo

- Espectrofotómetro

Servicios

- Energía eléctrica
- Agua

Técnica

Dependiente del estuche comercial disponible. Seguir las indicaciones al pie de la letra.

*NOTAS:
- La actividad enzimática cae rápidamente cuando en el material de vidrio que se emplea queden restos de detergente, aunque sea trazas.
- Controlar la temperatura seleccionada de reacción.

Cálculos: los indicados en el instructivo del estuche utilizado.

Factores de conversión: Si se desea transformar de U/L a nkat, emplear los mismos factores que para transaminasas.

Valores de referencia: La actividad de la enzima va disminuyendo conforme avanza la edad y es diferente para hombres y mujeres, por lo que es muy recomendable establecer valores por grupos de edad y sexo.

	Tradicional (U/L)*	**SI (nkat/L)**
Mujeres		
0 – 5 años	147 – 392	2450 – 6535
6 – 10 años	185 – 263	3084 – 4384
11 – 15 años	136 – 237	2267 – 3951
> 15 años	124 – 249	2067 – 4151
Hombres		
0 – 5 años	166 – 404	2767 – 6735
6 – 10 años	187 – 316	3117 – 5268
11 – 15 años	150 – 282	2500 – 4701
> 15 años	133 – 232	2217 – 3867

*Para población mexicana. Tomado de: Olay-Fuentes G, 2013.

13.4 LD_1 o α–Hidroxibutirato deshidrogenasa (HBDH) Método de Rosalki-Wilkinson

Cuando se hace un corrimiento electroforético para el fraccionamiento de LDH en pacientes con infarto al miocardio se observan proporciones relativamente altas de LD_1 y LD_2. Posteriormente se reportó que la fracción LD_1 y en menor grado la LD_2 tienen mucho mayor actividad si se emplea como sustrato α-hidroxibutirato en la reacción directa o α–cetobutirato en la inversa, que con piruvato.

Esta valoración, junto con la determinación de LDH total, es de gran apoyo diagnóstico diferencial, pues la razón HBDH/LDH ayuda a distinguir las alteraciones cardíacas de las hepáticas.

Fundamento:

Para la valoración cuantitativa de la actividad de las deshidrogenasas del miocardio, se deja actuar el suero problema con α-cetobutirato y $NADH_2$ midiendo la aparición del NAD^+ siguiendo la disminución de la densidad óptica a 340 nm.

Reacción:

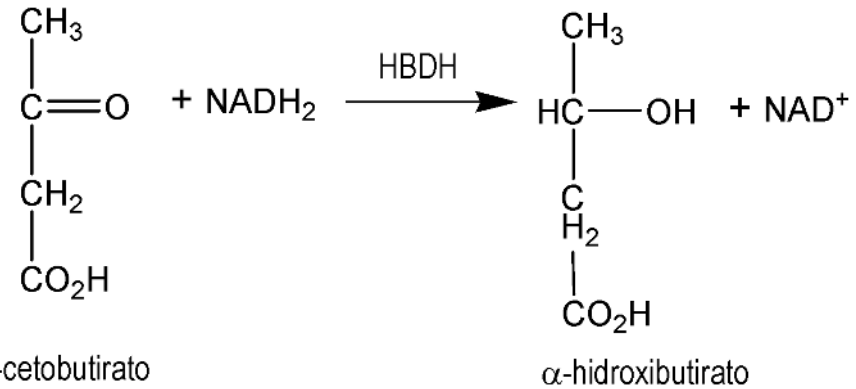


Figura 26. Reacción de determinación de la actividad de HBDH por el método de Rosalki-Wilkinson. Tomado de: Kaplan, 1986.

Material y reactivos

- Suero reciente, no hemolizado.
- Estuche comercial para la determinación de la actividad enzimática de HBDH.

Equipo

- Espectrofotómetro

Servicios

- Energía eléctrica
- Agua

Técnica

Dependiente del estuche comercial disponible. Seguir las indicaciones del fabricante sin modificaciones.

Cálculos: los indicados en el inserto del estuche utilizado.

Valores de referencia: los reportados en el inserto del estuche utilizado. Para la relación HBDH/LDH:

	25°C	**30°C**	**37°C**
HBDH/LDH	0.63 – 0.81	0.53 – 0.68	0.45 – 0.58

Resultados: Obtener el resultado de la actividad de las enzimas cardiacas en la muestra analizada e indicar si los valores se encuentran dentro de rango normal o patológico.

Seminario: INFARTO DE MIOCARDIO

Cuestionario

1. ¿Qué es el síndrome coronario agudo? Explique brevemente.
2. Realice un esquema que muestre como se incrementan y a que tiempos las enzimas: CK, CK-MB, HBDH, AST y LDH en un infarto al miocardio.
3. ¿Qué otras pruebas de laboratorio y gabinete se usan para complementar el diagnóstico de IAM?
4. ¿Qué es el péptido natriurético B?

5. Explique el papel de los nuevos marcadores cardiacos, troponinas, mioglobina y péptido natriurético B, en la patogenia del IAM.

Bibliografía

- Guedeney P, Collet JP. Diagnosis and management of acute coronary syndrome: what is new and why? insight from the 2020 European Society of Cardiology guidelines. J Clin Med. 2020; 9(11): 3474. doi: 10.3390/jcm9113474.
- Wang XY, Zhang F, Zhang C, Zheng LR, Yang J. The biomarkers for acute myocardial infarction and heart failure. Biomed Res Int. 2020; 2020: 2018035. doi: 10.1155/2020/2018035.
- Aydin S, Ugur K, Aydin S, Sahin İ, Yardim M. Biomarkers in acute myocardial infarction: current perspectives. Vasc Health Risk Manag. 2019; 15: 1-10. doi: 10.2147/VHRM.S166157.
- Anderson JL, Morrow DA, Acute myocardial infarction. N Engl J Med. 2017; 376: 2053-64. doi: 10.1056/NEJMra1606915
- Badertscher P, Mueller C. High-sensitivity cardiac troponin: a novel window to the heart. Clin Chem. 2017; 63(12): 1795-6. doi: 10.1373/clinchem.2017.281162.
- Eggers KM, Lindahl B. Application of cardiac troponin in cardiovascular diseases other than acute coronary syndrome. Clin Chem. 2017; 63(1): 223-35. doi: 10.1373/clinchem.2016.261495.
- Eggers KM. Serial measurement of biomarkers after acute coronary syndrome: which one to choose? [ed] Clin Chem. 2017; 63(7): 1181-3. doi: 10.1373/clinchem.2017.273789.
- Cervellin G, Mattiuzzi C, Bovo C, Lippi G. Diagnostic algorithms for acute coronary syndrome. Is one better than another? Ann Transl Med 2016; 4(10): 193. doi: 10.21037/atm.2016.05.16
- Cervellin G, Rastelli G. The clinics of acute coronary syndrome. Ann Transl Med 2016;4(10):191. doi: 10.21037/atm.2016.05.10
- Danese E, Montagnana M. An historical approach to the diagnostic biomarkers of acute coronary syndrome. Ann Transl Med 2016;4(10):194. doi: 10.21037/atm.2016.05.19
- Vargas-Alarcón G. Fragoso JM, Delgadillo H. Síndrome coronario agudo. Rev Inv Clin 2011; 63(1): 64-74.
- NACB Writing Group, Apple FS, Jesse RL, Newby LK, et al. National Academy of Clinical Biochemistry and IFCC Committee for Standardization of Markers of Cardiac Damage Laboratory Medicine Practice. Guidelines: analytical issues for biochemical markers of acute coronary syndromes. Circulation 2007; 115: e352-e355. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.107.182881.

- NACB Writing Group Members, Morrow DA, Cannon CP, et al. National Academy of Clinical Biochemistry Laboratory Medicine Practice. Guidelines: clinical characteristics and utilization of biochemical markers in acute coronary syndromes. Circulation 2007; 115: e356-e375. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.107.182882.
- Doust JA, Pietrzak E, Dobson A, Glasziou P. How well does B-type natriuretic peptide predict death and cardiac events in patients with heart failure: systematic review. BMJ 2005: 330; 625. doi: 10.1136/bmj.330.7492.625.

Manejo de residuos

Debido a que se manejan muestras biológicas y reactivos químicos, los residuos deben ser tratados y desechados con base a lo establecido en la Norma Oficial Mexicana NOM-087-SEMARNAT-SSA1-2002, Protección ambiental-salud ambiental-residuos peligrosos biológico-infecciosos y el procedimiento SGC-FESZ-PO06. Para ello deben seguirse las indicaciones especificadas en este manual, según corresponda. Los residuos biológicos deberán colocarse en la zona roja y los químicos en la zona amarilla marcada en el laboratorio, y serán recolectados por el Departamento encargado de esta actividad siguiendo el calendario previamente elaborado por el Coordinador del Área.

Práctica 14

PERFIL ENZIMÁTICO PANCREÁTICO

Objetivos

– Determinar la actividad de α-amilasa en muestras de suero.
– Reconocer el papel amilasa y lipasa en el diagnóstico de diferentes problemas de lesión pancreática.

Introducción

El páncreas es una glándula que se localiza hacia la pared posterior del abdomen y está rodeado en tres de sus lados por el duodeno. Cumple dos funciones diferentes:

- Es una glándula endocrina que sintetiza las hormonas glucagón, insulina y gastrina.
- Es una glándula exocrina al proporcionar las enzimas digestivas en un fluido llamado "jugo pancreático" que contiene bicarbonato con el objeto de facilitar la digestión duodenal de las sustancias alimenticias.

Las funciones endocrinas son llevadas a cabo por un grupo de células denominadas islotes de Langerhans, que contienen células alfa, beta y delta.

Las funciones exocrinas son producidas por células con agrupamiento acinar. El páncreas produce numerosas enzimas proteolíticas: α-amilasa, lipasa, fosfolipasa A, colesterol esterasa, ribonucleasa y desoxirribonucleasa.

Debido a la dualidad de funciones, para medir la totalidad de la acción pancreática es necesario verificar tanto la función endocrina como la exocrina. La evaluación pancreática se ha visto enormemente facilitada por el desarrollo de técnicas de intubación que permiten la introducción de diversas sondas en el interior de regiones específicas del tracto gastrointestinal, constituyéndose así las pruebas especiales de funcionalidad pancreática.

Desde el punto de vista bioquímico, dos son las enzimas pancreáticas utilizadas en el diagnóstico: *α−amilasa* (AMS, EC 3.2.1.1), tanto sérica como urinaria, y *lipasa* sérica (LPS, EC 3.1.1.3).

α-AMILASA (AMS) [EC 3.2.1.1]
MÉTODO 2-CLORO-P-NITROFENILA-D-MALTOTRIÓSIDO (CNP-G3)

Las amilasas forman parte de un grupo de hidrolasas que desdoblan polisacáridos como almidón y glucógeno. La enzima rompe las cadenas en enlaces α-1,4 alternos, con formación de maltosa y algo de glucosa residual, y un residuo de dextrina límite en el caso de poliglucanos de cadena ramificada.

Se conocen dos tipos de amilasas: las α-amilasas o amilasas animales y las β-amilasas o exoamilasas bacterianas.

La *amilasa* de suero humano tiene un pH óptimo entre 6.5 y 7 y proviene principalmente del páncreas y las parótidas.

Hay una gran variedad de métodos para la determinación de la actividad de *α-amilasa* que emplean diversos sustratos: almidón de papa, de maíz y "soluble" de Litner; amilosa, amilopectina y glucógeno. Estos métodos se dividen en:

- Sacarogénicos: miden los azúcares reductores formados.

- Viscosimétricos: miden la disminución de la viscosidad en una solución de almidón.
- Turbidimétricos: miden la disminución de la turbidez en una solución de almidón.
- Yodométrico o amiloclástico: miden la disminución de un complejo de yodo-almidón.
- Polisacáridos unidos a colorantes.
- Sustrato-cromogénico.

Y pese a ello, aún siguen apareciendo nuevas técnicas.

De entre los múltiples métodos y modificaciones publicados, el procedimiento amiloclástico de Street-Close continúa siendo el método de referencia. El método que utiliza 2-cloro-p-nitrofenil-α-D-maltotriósido (CNP-G3) como sustrato cromogénico es el comercialmente más difundido.

Fundamento:

La α-amilasa hidroliza el sustrato 2-cloro-p-nitrofenil-α-D-maltotriósido (CNP-G3) liberando 2-cloro-p-nitrofenol (CNP) y formando 2-cloro-nitrofenil-α-D-maltósido (CNPG2), maltotriosa y glucosa. El CNP absorbe a 405 nm y la velocidad de aparición del color es directamente proporcional a la actividad enzimática.

Reacción:

2-cloro-p-nitrofenil-α-D-maltotriósido $\xrightarrow{\text{α-Amilasa}}$ 2-cloro-p-nitrofenol + 2-cloro-nitrofenil-α-D-maltósido + maltotriosa + glucosa

Material y reactivos

- Suero reciente no hemolizado, plasma heparinizado, orina. Si se va a almacenar, ajustar el pH de la orina aproximadamente a 7.0 antes de conservar.
- Estuche comercial para la determinación de la actividad enzimática de α-amilasa por el método CNPG3.

Equipo

- Espectrofotómetro

Servicios

- Energía eléctrica
- Agua

Técnica

Dependiente del estuche comercial disponible. Seguir las indicaciones del fabricante sin modificaciones.

*NOTA:

- Es importante cronometrar los tiempos, definir la longitud de onda a leer con anticipación y la temperatura de reacción.
- Tomar en cuenta estas variables para utilizar el factor de cálculo correcto.
- La saliva y el sudor contienen α-amilasa. Evitar el pipeteo con la boca y el contacto de la piel con el reactivo o material empleado.

Cálculos: los indicados en el inserto del estuche utilizado.

Factores de conversión: Si se desean obtener los resultados en unidades SI, multiplicar por el factor indicado para transaminasas.

Valores de referencia:

	25°C	**30°C**	**37°C**
Suero o plasma hasta	85 U/L	100 U/L	125 U/L
	1.4 μkat/L	1.7 μkat/L	2.1 μkat/L
Orina hasta	455 U/L	540 U/L	680 U/L
	7.6 μkat/L	9.0 μkat/L	11.3 μkat/L

Valor crítico sérico: 1200 U/L.

Resultados: Obtener el resultado de la actividad de la enzima en la muestra analizada e indicar si el valor se encuentra dentro de rango normal o patológico.

Seminario: PANCREATITIS AGUDA

Cuestionario

1. ¿Qué diferencia química existe entre α− y β− amilasa?
2. Describa el mecanismo bioquímico de daño en el páncreas cuando existe una pancreatitis aguda.
3. Realice un esquema que muestre el comportamiento de α-amilasa y lipasa en la pancreatitis aguda.
4. ¿Qué otros exámenes de laboratorio son necesarios para dar un buen diagnóstico de pancreatitis aguda?
5. ¿Qué es la macroamilasa y cómo sabemos que está presente en la pancreatitis aguda?

Bibliografía

- de la Iglesia D, Bastón-Rey I. Pancreatitis aguda. Medicine. 2020; 13(9): 467-76.
- Guerrero A, Flores de Miguel Á, Albillos A. Pancreatitis aguda. Protocolo diagnóstico y terapéutico. Medicine. 2019; 12(87): 5140-4
- Forsmark CE, Vege SS, Wilcox CM. Acute pancreatitis. N Engl J Med 2016; 375: 1972-81. doi: 10.1056/NEJMra1505202
- Ocampo C, Basso S. Diagnóstico de la pancreatitis aguda. Acta Gastroenterol Latinoam 2016; 46(2): 126.
- Basnayake C, Ratnam D. Blood tests for acute pancreatitis. Aust Prescr 2015; 38: 128-30. doi: 10.18773/austprescr.2015.043.
- Batra HS, Kumar A, Saha TK, Misra P, Ambade V. Comparative study of serum amylase and lipase in acute pancreatitis patients. Indian J Clin Biochem. 2015; 30(2): 230-3. doi: 10.1007/s12291-013-0416-y.
- Meher S, Subhadarshan Mishra T, Kumar Sasmal P, Rath S, et al. Role of biomarkers in diagnosis and prognostic evaluation of acute pancreatitis. Jf Biomark 2015; 2015. doi: 10.1155/2015/519534
- Moriyama T, Tamura S, Nakano K, Otsuka K, Shigemura M, Honma N. Laboratory and clinical features of abnormal macroenzymes found in human sera. Biochim Biophys Acta. 2015; 1854(6): 658-67. doi: 10.1016/j.bbapap.2014.10.015.
- Talukdar R, Vege SS. Acute pancreatitis. Curr Opin Gastroenterol. 2015; 31(5): 374-9. doi: 10.1097/MOG.0000000000000201.
- Álvarez-López F, Castañeda-Huerta ND. Pancreatitis aguda. Rev Med MD 2014; 5(2): 80-5.
- Gutiérrez-Jiménez AA, Castro-Jiménez E, Lagunes-Córdoba R. Calcio sérico total y calcio corregido como predictores de severidad en pancreatitis aguda. Rev Gastroenterol Mex 2014; 79(1): 13-21.
- Díaz C, Garzón S, Morales-Uribe CH, Montoya-Jaramillo M. Pancreatitis aguda grave. Curso clínico, manejo y factores asociados con mortalidad. Rev Colomb Cir 2012; 27: 281-9.
- Fierro-López R, Bolívar-Rodríguez MA, Cazares-Aguilar MA. Martínez-García JJ, Peraza-Garay FJ, González-Jaúregui CA. Incremento de la amilasa y lipasa en pacientes con dolor abdominal agudo de origen no pancreático y pancreático. Rev Med UAS 2012; 3(2): 52-5.
- González-González JA, Castañeda-Sepúlveda R, Martínez-Vázquez MA, García-Compean D, et al. Características clínicas de la pancreatitis aguda en México. Rev Gastroenterol Mex 2012; 72(4): 167-73.
- Gutiérrez-Grobe Y. Pancreatitia aguda por hipertrigliceridemia. Rev Invest Med Sur Mex 2012; 19(3): 170-5.

- Lizarazo-Rodríguez JI. Fisiopatología de la pancreatitis aguda. Rev Colomb Gastroenterol 2008; 23(2): 187-91.
- Pandol SJ. Acute pancreatitis. Curr Opin Gastroenterol. 2005; 21(5): 538-43. doi: 10.1097/01.mog.0000174221.92708.50.
- Butler J, Bates D. Serum amylase and acute pancreatitis. Emerg Med J. 2003; 20: 550-1.
- Gutiérrez-Vázquez I, Domínguez-Maza A, Acevedo-Mariles JJ. Mecanismos fisiopatológicos de la pancreatitis aguda. Cir Gen 2003; 25(2): 95-102.
- Sánchez-Lozada R, Acosta-Rosero JV, Chapa-Azuela O, Hurtado-López LM. Etiología como determinante de la severidad en la pancreatitis aguda. Gac Med Mex 2003; 139(1): 27-31.

Manejo de residuos

Debido a que se manejan muestras biológicas y reactivos químicos, los residuos deben ser tratados y desechados con base a lo establecido en la Norma Oficial Mexicana NOM-087-SEMARNAT-SSA1-2002, Protección ambiental-salud ambiental-residuos peligrosos biológico-infecciosos y el procedimiento SGC-FESZ-PO06. Para ello deben seguirse las indicaciones especificadas en este manual, según corresponda. Los residuos biológicos deberán colocarse en la zona roja y los químicos en la zona amarilla marcada en el laboratorio, y serán recolectados por el Departamento encargado de esta actividad siguiendo el calendario previamente elaborado por el Coordinador del Área.

Práctica 15

ENZIMAS DE PROCESOS MALIGNOS

Se denominan procesos malignos a la serie de padecimientos que llevan a un cáncer. El cáncer ocupa uno de los primeros lugares en México como causa de muerte; y es un proceso a largo plazo, que progresa a través de 4 fases obligadas: inducción, localización *in situ*, invasión y diseminación.

Para el diagnóstico de cáncer se ha buscado durante muchos años marcadores tumorales que sean positivos en todos los casos de cáncer y negativos en la ausencia de ellos, pero aún no se ha encontrado un ideal, aunque tenemos algunos que resultan muy alentadores.

El estudio de los marcadores tumorales ha permitido que el supuesto marcador encontrado atraviese por 3 fases. En un principio que se considere al marcador tumoral como perfecto. Una segunda fase que se caracteriza por la desconfianza; y una tercera fase en donde hay una transición en la cual se acepta que el marcador no es tan bueno como se postuló inicialmente, pero que aún posee sus méritos en algunos casos selectos o en ciertas circunstancias.

Se han utilizado diversos compuestos bioquímicos como marcadores, de entre los cuales se destacan los antígenos de proteínas, oncogenes y enzimas.

Particularmente, se ha reportado el uso de varias pruebas enzimáticas en el manejo de pacientes con cáncer. Al igual que lo que sucede con numerosos marcadores tumorales, el empleo de los marcadores enzimáticos se acompaña de muchas dificultades. No todos los pacientes con un tipo particular de cáncer muestran elevaciones del nivel de actividad de la enzima en cuestión y muchas enfermedades no cancerosas se asocian con una elevación de muchas de estas enzimas. Por consiguiente, el empleo más frecuente de estas determinaciones consiste en la obtención de estimaciones semicuantitativas de la respuesta terapéutica o como indicadores del pronóstico, más que de diagnóstico de un proceso maligno.

Las enzimas más utilizadas para el seguimiento de los procesos malignos son las fosfatasas, ácida y alcalina; a *lipasa* y algunas enzimas hepáticas no comunes como la *5'-nucleotidasa*.

Ninguna enzima es clínicamente sensible, pero se consideran con buena especificidad, de tal manera que, si una actividad enzimática está dentro de rango normal, se puede descartar la posibilidad de un cáncer. Por el contrario, un valor elevado de la actividad enzimática es indicativo de la necesidad de complementar el diagnóstico con otros estudios.

15.1 LIPASA SÉRICA (LPS) [EC 3.1.1.3]
MÉTODO CINÉTICO-COLORIMÉTRICO

Objetivos

– Determinar la actividad de lipasa en muestras de suero.
– Reconocer su papel en el diagnóstico y seguimiento del carcinoma pancreático.

Introducción

La *lipasa* (LPS) es una triacilglicerol hidrolasa. La determinación de su actividad enzimática ha sido conocida durante mucho tiempo como un método útil para el diagnóstico de procesos pancreáticos; debido a que no aumenta en respuesta a un número de condiciones tan elevado como la α*-amilasa* sérica, se considera más específica.

Se exhibe niveles elevados en el 50% de los pacientes con carcinoma de páncreas y aumenta tan rápidamente como la *amilasa*, pero permanece elevada durante un período de tiempo más prolongado (sobre todo en pancreatitis). Aumenta también con la administración de opiáceos y colinérgicos.

Desafortunadamente ha sido muy difícil medir la actividad de la enzima con exactitud y precisión y las técnicas abreviadas han demostrado no ser confiables desde el punto de vista analítico, por lo que ha habido dudas en cuanto a su uso en el diagnóstico.

Para entender la metodología es necesario comprender que la enzima actúa sólo en la interfase éster-agua, por lo que los sustratos de la LPS deben encontrarse en forma de emulsiones, lo que dificulta las metodologías.

Hay varios métodos para determinar su velocidad de acción enzimática. El método desarrollado por Vogel y Zieve y modificado por varios autores se basa en la reducción de la turbidez de una emulsión aceite-agua medida entre 340 y 400 nm, en la interfase, la LPS hidroliza las moléculas de triglicéridos. El punto crítico de la determinación es el sustrato empleado, su pureza, estabilidad y, por lo tanto, su reproducibilidad.

Por esos problemas analíticos, se ha desarrollado un método con un éster artificial cromático que al hidrolizarse produce un compuesto colorido medible espectrofotométricamente; siendo un método más reproducible que los que utilizan emulsiones como sustrato.

Fundamento:

La lipasa cataliza la hidrólisis del substrato cromático éter de 1,2-O-dilauril-rac-glicero-3-ácido glutárico-(6-metilresorufina) obteniéndose el éster 1,2-O-dilauril-rac-glicerol y el ácido glutárico-(6-metil-resorufina)-éster, un producto intermedio inestable. En solución alcalina, éste se descompone espontáneamente en ácido

glutárico y metilresorufina, compuesto de color rojo que se mide a 570 nm. La concentración catalítica se determina a partir de la velocidad de formación del colorante.

Reacción:

1,2-O-dilauril-rac-glicero-3-ácido glutárico-(6-metilresorufina)-éster $\xrightarrow{\text{Lipasa}}$ 1,2-O-dilauril-rac-glicerol + ácido glutárico-(6-metil-resorufina)-éster

ácido glutárico-(6-metil-resorufina)-éster $\rightarrow$ ácido glutárico + metilresorufina

Material y reactivos

- Suero o plasma heparinizado reciente.
- Estuche comercial para la determinación de la actividad enzimática de *lipasa* sérica por el método cinético colorimétrico.

Equipo

- Espectrofotómetro

Servicios

- Energía eléctrica
- Agua

Técnica

La especificada en el instructivo del equipo comercial existente. Seguir las instrucciones sin realizar modificaciones.

Cálculos: los indicados en el instructivo del estuche utilizado.

Factores de conversión: Multiplicar por el factor indicado para transaminasas para convertir de U/L a nkat/L.

Valores de referencia:

	Tradicional	**SI**
Suero	12 – 60 U/L	200 – 1000 nkat/L

Resultados: Obtener el resultado de la actividad de la enzima en la muestra analizada e indicar si el valor se encuentra dentro de rango normal o patológico.

Seminario: CARCINOMA PANCREÁTICO

Cuestionario

1. Defina: neoplasia, tumor, metástasis y metaplasia.
2. ¿Cuál es la probable etiología del cáncer pancreático?
3. ¿Cómo se encuentran la α-amilasa y la lipasa sérica en el carcinoma pancreático?
4. ¿Con qué pruebas se establece la diferencia entre el carcinoma pancreático y la pancreatitis aguda?
5. ¿Cuáles son los nuevos biomarcadores para el diagnóstico de carcinoma pancreático?

Bibliografía

- Hu JX, Zhao CF, Chen WB, Liu QC, Li QW, Lin YY. Pancreatic cancer: A review of epidemiology, trend, and risk factors. World J Gastroenterol. 2021; 27(27): 4298-321. doi: 10.3748/wjg.v27.i27.4298.
- Loveday BPT, Lipton L, Thomson BNJ. Pancreatic cancer: An update on diagnosis and management. Aust J Gen Pract. 2019; 48(12): 826-31. doi: 10.31128/AJGP-06-19-4957.
- McGuigan A, Kelly P, Turkington RC, Jones C, Coleman HG, Stephen McCain R. Pancreatic cancer: A review of clinical diagnosis, epidemiology, treatment and outcomes. World J Gastroenterol 2018; 24(43): 4846-61. doi: 10.3748/wjg.v24.i43.4846.
- Herreros-Villanueva M, Bujanda L. Non-invasive biomarkers in pancreatic cancer diagnosis: what we need versus what we have. Ann Transl Med 2016; 4(7): 134. doi: 10.21037/atm.2016.03.44.
- Ilic M, Ilic I. Epidemiology of pancreatic cancer. World J Gastroenterol 2016; 22(44): 9694-705. doi: 10.3748/wjg.v22.i44.9694.
- Martínez-Useros J, García-Foncillas J. Can molecular biomarkers change the paradigm of pancreatic cancer prognosis? BioMed Res Int 2016; 2016. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1155/2016/4873089
- Sarnecka AK, Zagozda M, Durlik M. An overview of genetic changes and risk of pancreatic ductal adenocarcinoma. J Cancer 2016; 7(14): 2045-51. doi: 10.7150/jca.15323.
- Swords DS, Firpo MA, Scaife CL, Mulvihill SJ. Biomarkers in pancreatic adenocarcinoma: current perspectives. OncoTargets Ther 2016; 9: 7459-67. doi: 10.2147/OTT.S100510.

- Goral V. Pancreatic cancer: Pathogenesis and diagnosis. Asian Pac J Cancer Prev. 2015; 16(14): 5619-24. doi: 10.7314/apjcp.2015.16.14.5619.
- Fierro-López R, Bolívar-Rodríguez MA, Cazares-Aguilar MA. Martínez-García JJ, Peraza-Garay FJ, González-Jaúregui CA. Incremento de la amilasa y lipasa en pacientes con dolor abdominal agudo de origen no pancreático y pancreático. Rev Med UAS 2012; 3(2): 52-5.
- Frullini L, Patrizi F, Bernadini L, Cavallini G. Pancreatic hyperenzynemia: clinical significance and diagnostic approach. JOP. 2005; 6: 536-551.
- Fernández del Castillo C. Predicción de malignidad en neoplasias de páncreas endocrino. Rev Inv Clin 2005; 57: 481-487.

Manejo de residuos

Debido a que se manejan muestras biológicas y reactivos químicos, los residuos deben ser tratados y desechados con base a lo establecido en la Norma Oficial Mexicana NOM-087-SEMARNAT-SSA1-2002, Protección ambiental-salud ambiental-residuos peligrosos biológico-infecciosos y el procedimiento SGC-FESZ-PO06. Para ello deben seguirse las indicaciones especificadas en este manual, según corresponda. Los residuos biológicos deberán colocarse en la zona roja y los químicos en la zona amarilla marcada en el laboratorio, y serán recolectados por el Departamento encargado de esta actividad siguiendo el calendario previamente elaborado por el Coordinador del Área.

15.2 FOSFATASAS

Objetivos

- Determinar la actividad enzimática de las fosfatasas en muestras biológicas.
- Interpretar la actividad enzimática de la fosfatasa alcalina y la ácida como parte del diagnóstico de diferentes procesos malignos.

Introducción

Las fosfatasas son un grupo de enzimas de baja especificidad que se caracterizan por su capacidad para hidrolizar ésteres de fosfatos muy diversos con formación de alcohol y ion fosfato; principalmente monoésteres de ácido ortofosfórico.

Su función es la transferencia de grupos fosfato de un sustrato donador a un compuesto aceptor que contiene un grupo OH. Si el aceptor es agua, el efecto neto observado es hidrólisis.

Se reconocen dos tipos de fosfatasas perfectamente caracterizadas: la *fosfatasa alcalina* (ALP, EC 3.1.3.1) y la *fosfatasa ácida* (ACP, EC 3.1.3.2); que efectúan las mismas reacciones, pero a diferentes pHs, y se encuentran localizadas en diferentes órganos. Ambas enzimas tienen diferentes formas moleculares (isoenzimas), que son características de un órgano, por lo que para aclarar los diagnósticos es conveniente medir la actividad total y las isoenzimas específicas.

15.2.1 Fosfatasa Alcalina (ALP) [EC 3.1.3.1]
MÉTODO DE BESSEY-LOWRY-BROCK

Las fosfatasas alcalinas son un grupo de enzimas que actúan sobre ésteres alifáticos, aromáticos y heterocíclicos del ácido fosfórico. Su pH óptimo varía según el tipo de sustrato empleado y oscila entre 8.6-10.

Es una metaloenzima que contiene ácido siálico, y sus variantes moleculares se diferencian por el contenido de éste. Requiere de Mg^{2+} y Zn^{2+} para su estabilidad y máxima actividad.

Se conocen por lo menos 7 isoenzimas o formas moleculares que pueden estar en el suero y que tienen propiedades específicas en diferentes tejidos: intestinal, hepático, óseo, placentario y renal; por lo que aún hay incertidumbre en cuanto a la fuente dominante presente en el suero normal. Se desconocen los sustratos naturales sobre los cuales actúan en el cuerpo.

A temperatura ambiente la enzima mantiene su actividad durante 24 horas y en ocasiones se observa un aumento de 10% en su actividad. Si se guarda en refrigeración, la actividad desciende muy lentamente.

Debido a la gran cantidad de sustratos sobre los que actúa se tienen también una variedad de métodos, de los cuales, es empleado por excelencia el método de Bessey-Lowry-Brock. En este método se propone el uso de p-nitrofenil fosfato como sustrato. Este éster es incoloro y puede seguirse la reacción por la aparición del color amarillo del ion p-nitrofenilato. De sus principales ventajas es que: no requiere desproteinización y la reacción está en función lineal con el tiempo.

Este mismo método ha sido adoptado a equipos automatizados ya que se puede trabajar con volúmenes de suero de hasta 20 µL y hacer lecturas para la determinación en 1 o 2 min. Esta misma reacción se ha acoplado como reveladora de muchas técnicas inmunoenzimáticas (ELISA).

Fundamento:

Por acción de la enzima presente en el suero el p-nitrofenil-fosfato es escindido en fosfato y p-nitrofenol que en medio alcalino se convierte en ion p-nitrofenilato el cual asume una estructura quinoide de color amarillo. Así que se sigue el curso de la reacción a 405 nm.

Reacción:

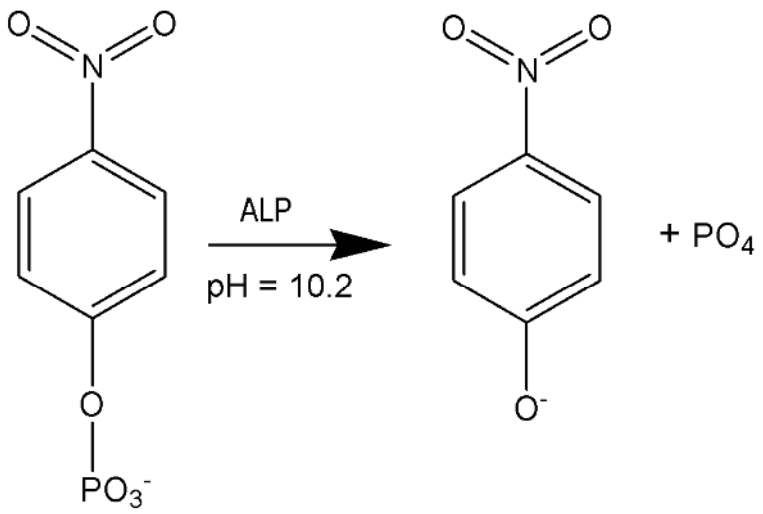


Figura 28. Reacción de determinación de la actividad de ALP por el método de Bessey-Lowry-Brock. Tomado de: Anderson, 1995.

Material y reactivos

- Suero reciente.
- Estuche comercial para la determinación de ALP por el método de Bessey-Lowry-Brock.
-

Equipo

- Espectrofotómetro

Servicios

- Energía eléctrica
- Agua

Técnica

Es dependiente del estuche comercial disponible. Seguir las indicaciones del instructivo al pie de la letra.

Cálculos: los indicados en el inserto del estuche utilizado.

Factores de conversión: Los mismos que para transaminasas.

Valores de referencia:

	Tradicional	**SI**
Suero	15 – 69 U/L	230 – 1150 nkat/L

Resultados: Obtener el resultado de la actividad de la enzima en la muestra analizada e indicar si el valor se encuentra dentro de rango normal o patológico.

Seminario: OSTEOSARCOMA

Cuestionario

1. ¿Qué es un sarcoma y un adenoma? Indique su diferencia.
2. De acuerdo a la fisiología ósea, ¿la ALP qué tipo de marcador es?
3. ¿En qué padecimientos se encuentra elevada la actividad de esta enzima?
4. ¿Cuáles hallazgos de laboratorio son útiles para el diagnóstico y seguimiento del osteosarcoma?
5. ¿Qué es la hipofosfatasia y cuál es su importancia clínica?

Bibliografía

- Rathore R, Van Tine BA. Pathogenesis and current treatment of osteosarcoma: perspectives for future therapies. J Clin Med. 2021; 10(6): 1182. doi: 10.3390/jcm10061182.
- Sheng G, Gao Y, Yang Y, Wu H. Osteosarcoma and metastasis. Front Oncol. 2021; 11: 780264. doi: 10.3389/fonc.2021.780264.
- Ferguson JL, Turner SP. Bone cancer: diagnosis and treatment principles. Am Fam Physician. 2018; 98(4): 205-13.
- Lindsey BA, Markel JE, Kleinerman ES. Osteosarcoma overview. Rheumatol Ther. 2017; 4(1): 25-43. doi: 10.1007/s40744-016-0050-2.
- Durfee RA, Mohammed M, Luu HH. Review of osteosarcoma and current management. Rheumatol Ther 2016; 3: 221-43. doi: 10.1007/s40744-016-0046-y.
- Millán JL, Whyte MP. Alkaline phosphatase and hypophosphatasia. Calcif Tissue Int 2016; 98: 398-416. doi: 10.1007/s00223-015-0079-1.
- Ren H-Y, Sun L-L, Li H-Y, Ye Z-M. Prognostic significance of serum alkaline phosphatase level in osteosarcoma: a meta-analysis of published data. BioMed Res Int 2015: 2015. doi: 10.1155/2015/160835
- Sánchez-Torres LJ, Santos-Hernández M. Osteosarcoma. Rev Mex Ortoped Pediatr 2011; 13(1): 10-9.
- Cortés-Rodríguez R, Castañeda-Pichardo G, Tercero-Quintanilla G. Guía de diagnóstico y tratamiento para pacientes pediátricos con osteosarcoma. Arch Inv Materno Infant 2010; 2(2): 60-6.

- Briozzo G, Perego MC, Moirón MC. Comparación de dos métodos para determinación de fosfatasa alcalina en suero. Rev Hosp Materno Infant Ramón Sardá 2007; 26(4): 148-53.
- Fohr B, Dunstan CR, Seibel MJ. Clinical review 165. Markers of bone remodeling in metastatic bone disease. J Clin Endocrionol Metab 2003; 88: 5059-75.

Manejo de residuos

Debido a que se manejan muestras biológicas y reactivos químicos, los residuos deben ser tratados y desechados con base a lo establecido en la Norma Oficial Mexicana NOM-087-SEMARNAT-SSA1-2002, Protección ambiental-salud ambiental-residuos peligrosos biológico-infecciosos y el procedimiento SGC-FESZ-PO06. Para ello deben seguirse las indicaciones especificadas en este manual, según corresponda. Los residuos biológicos deberán colocarse en la zona roja y los químicos en la zona amarilla marcada en el laboratorio, y serán recolectados por el Departamento encargado de esta actividad siguiendo el calendario previamente elaborado por el Coordinador del Área.

15.2.2 Fosfatasa Ácida (ACP) [3.1.3.2]
MÉTODO DE ANDERSCH-SZCZYPYNSKI

Se conocen como fosfatasas ácidas, a las fosfatasas con actividad óptima a un pH por debajo de 7, principalmente entre 4.8 y 6.0. El pH óptimo varía según la procedencia de la enzima y del sustrato empleado.

Las mayores concentraciones de estas enzimas se encuentran en hígado, bazo, leche, eritrocitos, plaquetas y glándula prostática. Esta última es la fuente más rica y contribuye en un tercio o la mitad de la enzima presente en el suero de varones normales.

Se han encontrado una gran cantidad de isoenzimas o formas moleculares, siendo las más importantes las prostáticas, que aunque actúan sobre los mismos sustratos y al mismo pH que las demás isoenzimas de otros órganos, se ve inhibida por diferentes compuestos químicos.

Los sustratos empleados para determinar su actividad son, por lo general, los mismo que para la ALP, sólo que a un pH ácido; de aquí que el método más frecuentemente empleado es una modificación al de Bessey-Lowry-Brock, llamado Andersch-Szczypynski en donde se lleva a cabo la medición de la hidrólisis de p-nitrofenilfosfato a pH = 4.9, en presencia o ausencia de tartrato de sodio 0.04 M, para observar la actividad de la ACP prostática y total, respectivamente.

Fundamento:

El sustrato p-nitrofenilfosfato es escindido por la enzima ACP en p-nitrofenol y ácido ortofosfórico. Añadiendo hidróxido de sodio se interrumpe la reacción y el p-nitrofenol formado es transformado en la forma quinoide (ion p-nitrofenilato) de color amarillo. La cantidad de p-nitrofenol es directamente proporcional a la actividad de fosfatasa.

Como la ACP prostática es inhibida por el L-tartrato, se lleva a cabo una reacción paralela añadiendo este compuesto. La diferencia de los resultados de la determinación con y sin tartrato da la actividad de la enzima prostática.

Reacción: la misma que para la *fosfatasa alcalina*, sólo que a pH ácido.

Material y reactivos

- Suero reciente, no hemolizado.
- Estuche comercial para la determinación de la ACP por el método de Andersch-Szczypynski.

Equipo

- Espectrofotómetro

Servicios

- Energía eléctrica
- Agua

Técnica

La indicada en el inserto del estuche comercial disponible.

Cálculos: los indicados en el instructivo del estuche empleado.

Factores de conversión: los mismos que para *fosfatasa alcalina*.

Valores de referencia:

	Tradicional	**SI**
Niños		
ACP total	7.8 – 21.2 U/L	130 – 252 nkat/L
Adultos		
ACP total	4.8 – 13.5 U/L	70 – 225 nkat/L
ACP prostática	Hasta 3.7 U/L	Hasta 61 nkat/L

Resultados: Obtener el resultado de la actividad de la enzima, total y prostática, en la muestra analizada e indicar si el valor se encuentra dentro de rango normal o patológico.

Seminario: CARCINOMA PROSTÁTICO

Cuestionario

1. ¿Qué otros inhibidores químicos se pueden utilizar para determinar la actividad de la ACP prostática?
2. ¿Cuál es el papel de la ACP en la fisiología ósea y cuál es la isoenzima de utilidad diagnóstica en este caso?
3. ¿Qué es el antígeno prostático específico (PSA) y cuáles son los valores de corte clínico?
4. ¿Cuáles son los nuevos biomarcadores utilizados para el diagnóstico de cáncer prostático?
5. ¿Qué semejanzas bioquímicas existen entre el carcinoma prostático y el de mama?

Bibliografía

- Uhr A, Glick L, Gomella LG. An overview of biomarkers in the diagnosis and management of prostate cancer. Can J Urol. 2020; 27(S3): 24-7.
- Vickers AJ. Redesigning prostate cancer screening strategies to reduce overdiagnosis. Clin Chem. 2019; 65(1): 39-41. doi: 10.1373/clinchem.2018.287094.
- Barry MJ, Screening for prostate cancer. Is the third trial the charm? JAMA. 2018; 319(9): 868-9. doi: 10.1001/jama.2018.0153.
- Catalona WJ. Prostate cancer screening. Med Clin North Am. 2018; 102(2): 199-214. doi: 10.1016/j.mcna.2017.11.001.
- Cabarkapa S, Perera M, McGrath S, Lawrentschuk N. Prostate cancer screening with prostate-specific antigen: A guide to the guidelines. Prostate Int 2016; 4: 125-9. doi: 10.1016/j.prnil.2016.09.002
- Ferro M, Buonerba C, Terracciano D, Lucarelli G, Cosimato V, Bottero D, et al. Biomarkers in localized prostate cancer. Future Oncol. 2016; 12(3): 399-411. doi: 10.2217/fon.15.318.
- Sharma P, Zargar-Shoshtari K, Pow-Sang JM. Biomarkers for prostate cancer: present challenges and future opportunities. Future Sci OA 2016; 2(1): FSO72. doi: 10.4155/fso.15.72.
- Jiménez-Romero ME, Caro-Gómez I. Biomarcadores en el cáncer de próstata. Implicación en la práctica clínica. Rev Mex Urol 2014; 74(4): 226-33.
- Kong HY, Byun J. Emerging roles of human prostatic acid phosphatase. Biomol Ther 2013; 21(1): 10-20. doi: 10.4062/biomolther.2012.095.

- Muniyan S, Chaturvedi NK, Dwyer JG, Lagrange CA, Chaney WG, Lin MF. Human prostatic acid phosphatase: structure, function and regulation. Int J Mol Sci. 2013; 14(5): 10438-64. doi: 10.3390/ijms140510438.
- Martínez-Arroyo C. Salgueiro-Ergueta R, Paredes-Mendoza J, Marina-González JM, et al. Punto de corte de la fracción libre de antígeno prostático específico en la población mexicana susceptible de cáncer de próstata. Rev Mex Urol 2007; 67(5): 248-55.

Manejo de residuos

Debido a que se manejan muestras biológicas y reactivos químicos, los residuos deben ser tratados y desechados con base a lo establecido en la Norma Oficial Mexicana NOM-087-SEMARNAT-SSA1-2002, Protección ambiental-salud ambiental-residuos peligrosos biológico-infecciosos y el procedimiento SGC-FESZ-PO06. Para ello deben seguirse las indicaciones especificadas en este manual, según corresponda. Los residuos biológicos deberán colocarse en la zona roja y los químicos en la zona amarilla marcada en el laboratorio, y serán recolectados por el Departamento encargado de esta actividad siguiendo el calendario previamente elaborado por el Coordinador del Área.

Práctica 16

ANÁLISIS DE LÍQUIDO SEMINAL

Objetivo

- Reconocer el papel del análisis del líquido seminal en el diagnóstico de infertilidad masculina.

Introducción

El semen es un líquido lechoso que contiene secreciones de la próstata, glándulas bulbouretrales o de Cowper y vesículas seminales; espermatozoides y algunos de sus precursores (espermatocitos, células de Sertoli, etc.). Se acumula temporalmente en el ámpula de los conductos deferentes y de las vesículas seminales y su secreción es constante durante la edad viril.

Los espermatozoos se producen en el testículo a partir de las espermatogonias, estando la espermatogénesis y la espermiogénesis bajo la acción de la hormona folículo estimulante (FSH) de la hipófisis.

Se pueden realizar dos tipos de análisis de semen, espermatobioscopía o espermograma: directa o indirecta, funcional o Hühner. Es un estudio que aporta información sobre la espermatogénesis, la función de los espermatozoides y de las glándulas sexuales accesorias.

Es una de las pruebas básicas en el estudio de la pareja estéril y de enfermedades genitales masculinas. Cuando se trata del estudio de pareja, debe

hacerse con mucha seriedad por las implicaciones psicológicas y sociales para la pareja en cuestión. En este caso se realizan tanto el estudio directo como el indirecto.

La espermatobioscopía directa, al igual que el examen de orina, se divide en tres partes: análisis físico, análisis químico y análisis microscópico; aunque el análisis químico no se realiza rutinariamente en los laboratorios clínicos.

Por cuestiones prácticas, únicamente se realizará la espermatobioscopía directa.

Material y reactivos

- Muestra de semen obtenida por masturbación previa abstinencia sexual mínima de 3 días.
- Tira reactiva para medición de pH.
- Pipeta de Thoma para leucocitos.
- Cámara de Neubauer.
- Solución de bicarbonato de sodio al 5% en formol al 1%.....(15)
- Equipo para tinción de Wright.
- Solución de eosina-nigrosina……..(16)

Equipo

- Microscopio óptico.

Servicios

- Energía eléctrica
- Agua

*NOTA

- Después de obtenida la muestra, colocarla en un baño maría a 37°C, ahí debe mantenerse hasta terminado el análisis, éste debe hacerse dentro de las 2 h. siguientes.

16.1 EXAMEN FÍSICO

Tiempo de licuefacción y color

Técnica

Observar la muestra a partir de los 20 minutos de obtenida hasta que se encuentre completamente licuada y anotar el tiempo transcurrido. A partir de que está licuada proceder a observar el color.

Volumen y viscosidad

Técnica

Medir con una pipeta graduada de 5 mL el volumen total de la muestra. Dejar caer libremente el líquido de la pipeta, observar la forma de caer e interpretar de acuerdo con cuadro 16.1.

Cuadro 16.1. Interpretación de la viscosidad de una muestra de líquido seminal.

Viscosidad	Apariencia
Normal	Goteo
Aumentada	Gotas muy gruesas y difícil salida del líquido
Disminuida	Chorro, no goteo, salida en hilo

pH

Técnica

Con una pipeta Pasteur colocar una gota de semen en un papel para medición del pH, de preferencia que sea un papel con escala de decimales. Comparar contra la carta de colores del frasco.

16.2 EXAMEN MICROSCÓPICO

Motilidad

Técnica

Colocar 10 μL de semen entre porta y cubreobjetos de 20X20 mm. Observar al microscopio en el objetivo de seco fuerte (40X) la motilidad o no motilidad de los espermatozoides. Para llevar a cabo este examen debe observarse el grado de motilidad de los espermas e interpretar como indica el cuadro 16.2. Contar 100 células y obtener la gama porcentual de cada tipo de motilidad espermática.

Cuadro 16.2. Interpretación de la motilidad en una muestra espermática.

Observación	Calificación
Espermas con movimientos de traslación rápidos	++++
Espermas con movimientos de traslación moderados	+++
Espermas con movimiento lento	++
Espermas con movimiento *in situ*	+
Espermas inmóviles	Inmóviles

Cuenta espermática

Técnica

Medir en una pipeta de Thoma para leucocitos una muestra de semen hasta la marca de 0.5 y diluir con la solución de bicarbonato-formalina hasta la marca de 11 (1:20). Agitar bien la mezcla hasta que el moco se disuelva. Descartar las primeras cinco gotas de la pipeta y la siguiente colocarla en una cámara de Neubauer con cubrehematímetro y contar los espermas presentes en 5 cuadros medianos (80 cuadros pequeños) de la cámara central (cuadrícula para eritrocitos). Hacer esto mismo en la otra parte de la cámara de Neubauer. Obtener una media de los dos conteos y multiplicar el conteo final por 1,000,000 para obtener el número de espermatozoides/mL.

Morfología espermática

Esta parte del estudio espermático tiene por objeto determinar el porcentaje de las formas normales y establecer la fórmula cito-espermática llamada también cuenta diferencial espermática.

Este estudio puede realizarse tanto en fresco, si se cuenta con un microscopio de contraste de fases, como en frotis teñidos con colorantes selectivos, básicamente nucleares.

Técnica

Para el examen de frotis teñido se prepara éste colocando una gota de la muestra en uno de los extremos angostos del portaobjetos, y con el borde de otro portaobjetos, se extiende la muestra hacia el lado opuesto de la lámina en forma similar a la utilizada para hacer un frotis sanguíneo. Dejarlo secar y teñirlo por el método de Wright, previa fijación con metanol. Realizar una cuenta diferencial contando 200 espermas con el objetivo de inmersión (100X). Observar también la presencia de leucocitos, eritrocitos y/o células epiteliales. Obtener el porcentaje de todas las formas observadas y reportarlas.

Determinar las formas normales y anormales, como son:

- Anormalidades cefálicas: distribución irregular de la cromatina nuclear y la fragmentación del núcleo, pérdida de los límites uniformes del perímetro cefálico, tamaño de la cabeza (gigantozoospermos, macro y microcefalozoospermos), número de cabezas (bicéfalos, policéfalos).
- Anormalidades cervicales: a nivel de cuello, como el alargamiento y acodamiento del esperma a este nivel, que puede llevar a la ruptura de este sitio dando origen a cabezas o colas libres.

- Anormalidades corporales: a nivel de la pieza intermedia donde puede haber deformaciones, hinchazón, irregularidades del contorno.
- Anormalidades caudales: son las alteraciones morfológicas de la cola como ausencia de cola, colas cortas, colas enrolladas, colas en espiral, bicaudales o policaudales.
- Formas jóvenes o inmaduras: se pueden observar espermátides y metaespermátides, y las que se manifiestan en la persistencia de citoplasma envolvente a nivel cefálico o de la pieza intermedia.
- Formas hipermaduras o envejecidas: se manifiestan como espermas negros detectados únicamente con microscopio de contraste de fases o bien por la presencia de gránulos adheridos a lo largo de la cola del espermatozoide.

Vitalidad espermática

La vitalidad espermática es una estimación de la integridad de las membranas de los espermatozoides. En la última versión del manual para el análisis del líquido seminal de la OMS se indica que esta prueba no es necesaria si al menos el 40% de los espermatozoides son móviles, por lo que es importante en las muestras con pobre motilidad ya que permite discriminar entre los espermatozoides inmóviles vivos de los muertos.

La determinación se lleva a cabo con la prueba de eosina-nigrosina, en la cual se identifican los espermatozoides vivos que tienen la membrana celular intacta y que no permite la entrada de la mezcla de colorantes. Las células muertas tienen la membrana dañada y los colorantes penetran.

La prueba debe realizarse lo más pronto posible después de que la muestra seminal se ha licuado, preferiblemente a los 30 min, máximo 1 h después de la eyaculación, para limitar el efecto de la deshidratación o cambio de la temperatura en la vitalidad.

Técnica

Mezclar bien la muestra de líquido seminal y tomar 50 μL. Colocarlos en una placa de porcelana o un portaobjetos y agregar 50 μL de la solución de eosina-nigrosina, mezclar perfectamente y esperar 30 segundos. Tomar una gota y hacer un frotis en un portaobjetos secándolo al aire. Observar al microscopio óptico con objetivo de inmersión (100X).

Contar el número de células teñidas (muertas) y no teñidas (vivas) evaluando 200 espermatozoides. En la preparación se observará el fondo negro, los espermatozoides vivos tendrán las cabezas blancas y los muertos mostrarán cabezas rojas o rosa. Los espermatozoides con una ligera tinción rosa en la cabeza deben considerarse como muertos. Si la mancha se limita solo a una parte de la

región del cuello y el resto de la cabeza no está coloreada, se considera una "membrana de cuello con fugas", debiéndose evaluar como un esperma vivo.
Reportar el porcentaje de espermatozoides vivos. Adicionalmente, restar el porcentaje de espermatozoides móviles (sumando el porcentaje de rápido, lento y no progresivo) obtenida en la prueba de motilidad, del resultado del porcentaje de células vivas.

Interpretación
La presencia de una gran proporción de espermas vivos pero inmóviles puede indicar defectos estructurales del flagelo; un alto porcentaje de inmóviles y muertos puede indicar una patología del epidídimo o una reacción inmunológica debida a una infección.
Si más del 25-30% de los espermatozoides están vivos e inmóviles, es posible que el paciente tenga un problema ciliar genético.

Valores de referencia:

Determinación	**Observación**
Volumen	2.1 – 5.2 mL
Color	Blanco-grisáceo o blanco-amarillento
Aspecto	Translúcido-opalescente
Viscosidad	Equivalente a un goteo
pH	7.6 – 8.2
Tiempo de licuefacción	15 – 20 min.
Motilidad	> 78% entre 60 y 120 min.
No. espermas/mL	60 – 150 X 10^6
No. Espermas/eyaculado	90 – 900 X 10^6
Morfología espermática	Formas normales > 70% Formas inmaduras < 35%
Vitalidad espermática	< 25% de espermas vivos e inmóviles

Resultados: Reportar los resultados del análisis del líquido seminal completo de la muestra analizada e indicar si los valores se encuentran dentro de rango normal o patológico.

Seminario: ANÁLISIS DE LÍQUIDO SEMINAL

Cuestionario

1. ¿Qué es: megalospermia, oligospermia, azoospermia, teratozoospermia?
2. Explique, brevemente, como se realiza la prueba de vitalidad espermática.
3. Realice un esquema de las diferentes formas de espermas que pueden observarse en una citología espermática.
4. ¿Qué pruebas especiales se le realizan a una muestra de líquido seminal?
5. ¿En qué patologías encontramos alterados al menos uno de los exámenes realizados al líquido seminal?

Bibliografía

- Armas-González E, Mosquera-Escobar M, Alvarez-González K, Rodríguez-Hidalgo M, Duartes-García D, Guerra-Sánchez M. Relación entre los factores de riesgo de infertilidad masculina y las alteraciones del espermograma. Rev Ciencias Médicas 2022; 26(2): e5500. Disponible en: http://revcmpinar.sld.cu/index.php/publicaciones/article/view/5500
- Sharma A, Minhas S, Dhillo WS, Jayasena CN. Male infertility due to testicular disorders. J Clin Endocrinol Metab. 2021; 106(2): e442-e459. doi: 10.1210/clinem/dgaa781.
- World Health Organization. WHO Laboratory manual for the examination and processing of human semen, 6th ed. Geneva, Switzerland: WHO Press; 2021. Available online: https://www.who.int/publications/i/item/9789240030787
- Bieniek JM, Drabovich AP, Lo KC. Seminal biomarkers for the evaluation of male infertility. Asian J Androl 2016; 18: 426-33. doi: 10.4103/1008-682X.175781.
- Talwar P, Hayatnagarkar S. Sperm function test. J Hum Reprod Sci 2015; 8(2): 61-9. doi: 10.4103/0974-1208.158588.
- Triana de la Paz I, López Pérez R, García Gutiérrez MB, Santana Machado A, Fleites Vizcaíno MC, Sánchez Freire P. Caracterización morfométrica de espermatozoides en pacientes con espermograma normal (resultados preliminares). Medicent Electrón. 2015; 19(4): 225-32.
- Olsen J, Ramlau-Hansen CH. Epidemiologic methods for investigating male fecundity. Asian J Androl 2014; 16: 17-22. doi: 10.4103/1008-682X.122198.

- Wang C, Swerdloff RS. Limitations of semen analysis as a test of male fertility and anticipated needs from newer tests. Fertil Steril. 2014; 102(6): 1502-7. doi: 10.1016/j.fertnstert.2014.10.021.
- Aziz N. The importance of semen analysis in the context of azoospermia. Clinics (Sao Paulo). 2013; 68 Suppl 1(Suppl 1): 35-8. doi: 10.6061/clinics/2013(sup01)05.
- Cocuzza M, Alvarenga C, Pagani R. The epidemiology and etiology of azoospermia. Clinics 2013; 68 Suppl 1(Suppl 1):15-26. doi: 10.6061/clinics/2013(sup01)03.
- Samplaski MK, Agarwal A, Sharma R, Sabanegh E. New generation of diagnostic tests for infertility: Review of specialized semen tests. Int J Urol; 2010; 17: 839-47. doi: 10.1111/j.1442-2042.2010.02619.x.
- Toro-Montoya AI. Espermograma. Med Lab 2009; 15: 145-69.
- Vázquez RF, Vázquez-Echeverri D. Espermograma y su utilidad clínica. Salud Uninorte 2007; 23(2): 220-30.
- Gonzales GF. Function of seminal vesicles and their role on male fertility. Asian J Androl. 2001; 3: 251-8.

Manejo de residuos

Debido a que se manejan muestras biológicas y reactivos químicos, los residuos deben ser tratados y desechados con base a lo establecido en la Norma Oficial Mexicana NOM-087-SEMARNAT-SSA1-2002, Protección ambiental-salud ambiental-residuos peligrosos biológico-infecciosos y el procedimiento SGC-FESZ-PO06. Para ello deben seguirse las indicaciones especificadas en este manual, según corresponda. Los residuos biológicos deberán colocarse en la zona roja y los químicos en la zona amarilla marcada en el laboratorio, y serán recolectados por el Departamento encargado de esta actividad siguiendo el calendario previamente elaborado por el Coordinador del Área.

Práctica 17

ANÁLISIS DE LÍQUIDO CEFALORRAQUIDEO

Es el líquido presente en el interior de los cuatro ventrículos cerebrales, del espacio subaracnoideo y de la médula espinal. Sus funciones principales son de sostén mecánico, remoción de productos de deshecho, transporte de compuestos fisiológicamente activos y mantenimiento del medio químico, todo en el cerebro.

La composición iónica y molecular del líquido cefalorraquídeo (LCR) difiere de la del plasma en el caso de algunos componentes y es idéntica en el de otros.

Mucha patología del cerebro se acompaña de alteraciones en el LCR debido a modificaciones en la barrera hemato-encefálica, a la inducción de alteraciones inflamatorias, necrosis tisular o al pasaje de células tumorales.

El índice metabólico del cerebro es uno de los más elevados en el organismo humano, ya sea en estado de vigilia o durante el sueño, pero a diferencia de la mayoría de los otros órganos, los cuales almacenan y reservan un cierto aporte energético para su mantenimiento, el cerebro prácticamente no almacena recursos energéticos.

El LCR forma parte de lo que en el laboratorio clínico se denomina “líquidos biológicos”, por lo que su análisis no difiere mucho, en cuanto a las pruebas, del análisis de cualquier otro líquido orgánico; más aún, es el análisis de este líquido el ejemplo a seguir para cualquier otro. En general, el examen se divide en 5 componentes:

- físico
- químico
- microscópico
- microbiológico
- inmunológico

Estos son los componentes de un análisis básico, pero no descarta la posibilidad de hacer otro tipo de pruebas especiales como ayuda a la confirmación de un diagnóstico.

Tradicionalmente el análisis del LCR era la prueba de elección para dilucidar el diagnóstico de las meningitis, pero en la actualidad se ha ampliado su uso a la medición de biomarcadores para el diagnóstico de padecimientos cerebrales no infecciosos y hasta de cáncer.

Debido a la complejidad en la toma de la muestra, es posible que el LCR extraído de un paciente esté contaminado con sangre, por lo que los valores de proteínas y leucocitos se ve modificados por la interferencia de esta contaminación, para ello existen fórmulas que nos permiten hacer correcciones y así obtener valores reales del LCR analizado.

Corrección para Proteínas

$$Corrección = \left[\frac{(PsXHl))}{Hs} \right] 100$$

En donde: Ps = Proteínas en suero (g/dL)
Hl = Eritrocitos en LCR
Hs = Eritrocitos en sangre

Corrección para Leucocitos

$$Corrección = \left[\frac{LsXHl}{Hs} \right] 100$$

En donde: Ls = Leucocitos en sangre periférica
Hl = Eritrocitos en LCR
Hs = Eritrocitos en sangre

Material y reactivos

- No aplica

Equipo

- No aplica

Servicios

- No aplica

Técnica

Debido a que la muestra de LCR no es factible tenerla para hacer la medición, esta actividad será únicamente de seminario.

Valores de referencia:

Característica	Niños	Adultos
Volumen (mL)	Recién nacido 10 – 60	140 – 170
Aspecto	Cristalino, transparente	
Color	Incoloro	
Presión (mm Hg)	100 – 120	
Coagulabilidad	Negativa	
Leucocitos/mm^3	0 – 30	0 – 5

Proporción de células	Más monocitos	70% linfocitos 30% monocitos
Glucosa	50 – 60% menos que la sérica	
Proteínas (mg/dL)	15 – 45	
Bacterias	Negativo	

Resultados: No aplica.

Seminario: ANÁLISIS DE LÍQUIDO CEFALORRAQUÍDEO

Cuestionario

1. ¿Cuáles son las propiedades y funciones del LCR en el organismo?
2. Describa como se realizan las diferentes tomas de muestra del LCR, mencionando los cuidados y precauciones que deben tenerse para efectuar cada una de ellas.
3. Mencione en qué casos se recomienda hacer un estudio de LCR.
4. Realice un cuadro sinóptico en donde muestre cómo se realiza el diagnóstico diferencial de las meningitis por medio del análisis del LCR.
5. ¿Qué pruebas especiales se le pueden realizar a un LCR?

Bibliografía

- Julián-Jiménez A, Morales-Casado MI- Utilidad de las determinaciones analíticas en sangre y líquido cefalorraquídeo para predecir meningitis bacterianas en el servicio de urgencias. Neurologia. 2019; 34(2): 105-113. doi: 10.1016/j.nrl.2016.05.009.
- Counts SE, Ikonomovic MD, Mercado N, Vega IE, Mufson EJ. Biomarkers for the early detection and progression of Alzheimer's disease. Neurotherapeutics. 2017; 14(1): 35-53. doi: 10.1007/s13311-016-0481-z.
- Reiber H. Cerebrospinal fluid data compilation and knowledge-based interpretation of bacterial, viral, parasitic, oncological, chronic inflammatory and demyelinating diseases. Diagnostic patterns not to be missed in neurology and psychiatry. Arq Neuropsiquiatr 2016; 74(4): 337-50. doi: 10.1590/0004-282X20160044.
- Tormey WP, O'Hagan C. Cerebrospinal fluid protein and glucose examinations and tuberculosis: Will laboratory safety regulations force a change of practice? Biochem Med 2015; 25(3): 359-62. doi: 10.11613/BM.2015.035.
- dos Ramos Machado L, Livramento JA, Scaff-Vianna L. Cerebrospinal fluid analysis in infectious diseases of the nervous system: when to ask, what to ask, what to expect. Arq Neuropsiquiatr 2013; 71(9-B): 693-8. doi: 10.1590/0004-282X20130153.

- Echevarría-Pérez E, Rodríguez-González I, Fernández-Molina C. Valor práctico del líquido cefalorraquídeo en la hemaglutinación de *Treponema pallidum* para la confirmación de neurosífilis. Rev Cub Med Trop 2013; 65(2): 258-63.
- Moraes-Castro M, Camacho S, Margni C, Borbonet D. Utilidad del examen de líquido cefalorraquídeo y de la radiografía de huesos largos en neonatos asintomáticos con riesgo de sífilis connatal. Arc Pediatr Urug 2013; 84(3): 187-92.
- Iparraguirre-Góngora O, Álvarez-Pena MA, Alba-Pérez M, Piriz-Assa AR. Relación glucorraquia/glucemia y certeza del diagnóstico de meningoencefalitis viral y bacteriana en urgencias. Rev Cub Med Int Emerg 2009;8(2); 1495-504.
- Hühmer AF, Biringer RG, Amato H, Fonteh AN, Harrington MG. Protein analysis in human cerebrospinal fluid: Physiological aspects, current progress and future challenges. Dis Markers. 2006; 22(1-2): 3-26. doi: 10.1155/2006/158797.
- Petzold A, Sharpe LT, Keir G. Spectrophotometry for cerebrospinal fluid pigment analysis. Neurocrit Care. 2006; 4(2): 153-62. doi: 10.1385/NCC:4:2:153.
- Chalmers AH. Cerebrospinal fluid xanthochromia testing simplified. Clin Chem 2001; 47: 147-148.

Manejo de residuos

No aplica.

Práctica 18

ANÁLISIS DE HORMONAS

La transmisión de la información en el organismo es llevada a cabo por los sistemas nervioso y endocrino. En el sistema nervioso, el mensaje es transportado entre el tejido periférico y el cerebro mediante una red nerviosa especialmente construida; mientras que en el sistema endocrino, el mensaje es transportado desde

una célula hacia otra mediante la corriente sanguínea a través de sustancias químicas denominadas hormonas.

Las partes del organismo encargadas de la secreción de hormonas son llamadas glándulas endocrinas; dentro de las cuales, las más importantes son la hipófisis anterior y el hipotálamo. Estas dos glándulas funcionan como reguladores primarios en su totalidad del sistema endocrino.

El estudio de las hormonas es denominado *análisis hormonal*, el cual puede realizarse de dos formas:

- midiendo la cantidad de hormona activa en suero o sus metabolitos en orina
- por medio de pruebas dinámicas para determinar su actividad

El análisis hormonal también se realiza por medio de perfiles, de acuerdo al eje funcional de cada grupo de hormonas, de esta forma tenemos:

- gonadal, tanto masculino como femenino
- ginecológico
- suprarrenal
- tiroideo
- hipotalámico

Cada perfil está conformado por diferentes hormonas que permiten verificar el funcionamiento de cada eje. De estos perfiles, los más comunes son el ginecológico y el tiroideo; siendo el tiroideo el más utilizado por los médicos de todas las especialidades y en todos los grupos de edad, desde neonatos hasta adultos mayores. Los otros perfiles son más específicos, por ello sólo se llevan a cabo en los laboratorios de hormonas y pruebas especiales.

Material y reactivos

- No aplica

Equipo

- No aplica

Servicios

- No aplica

Técnica

Por carecer del equipo para hacer la medición, esta actividad será únicamente de seminario.

Resultados: No aplica.

Seminario: HORMONAS

Cuestionario

1. ¿Qué es una hormona y cuáles son sus características?
2. Realice un esquema que represente el mecanismo de acción de los diferentes tipos de hormonas.
3. Mencione tres métodos diferentes para la cuantificación de hormonas y diga sus fundamentos.
4. Anote el nombre de diez hormonas clínicamente importantes, su lugar de secreción y su célula blanco
5. ¿Qué es el tamiz neonatal y qué hormonas incluye?

Bibliografía

- Tedeschi L, Vassalle C, Iervasi G, Sabatino L. Main factors involved in thyroid hormone action. Molecules. 2021; 26(23): 7337. doi: 10.3390/molecules26237337.
- Schiffer L, Barnard L, Baranowski ES, Gilligan LC, Taylor AE, Arlt W, et al. Human steroid biosynthesis, metabolism and excretion are differentially reflected by serum and urine steroid metabolomes: A comprehensive review. J Steroid Biochem Mol Biol. 2019; 194: 105439. doi: 10.1016/j.jsbmb.2019.105439.
- Soh SB, Aw TC. Laboratory testing in thyroid conditions - pitfalls and clinical utility. Ann Lab Med. 2019; 39(1): 3-14. doi: 10.3343/alm.2019.39.1.3.
- García-Flores EP, Herrera-Maldonado N, Hinojosa-Trejo MA, Vergara-Vázquez M, Halley-Castillo ME. Avances y logros del programa de tamiz metabólico neonatal (2012-2018). Acta Pediatr Mex. 2018; SI(39): 57S-65S.
- Calzada-León R, Gómez-Vázquez V, Rivera-Hernández AJ, Ruiz-Reyes ML, Valles-Sánchez VE. Utilidad y limitaciones del tamiz neonatal para hipotiroidismo congénito. Rev Mex Endocrinol Metab Nutr. 2017; 4: 89-101.
- Esfandiari NH, Papaleontiou M. Biochemical testing in thyroid disorders. Endocrinol Metab Clin North Am. 2017; 46(3): 631-48. doi: 10.1016/j.ecl.2017.04.002.
- Moon J-Y, Choi MH, Kim J. Metabolic profiling of cholesterol and sex steroid hormones to monitor urological diseases. Endocr Relat Cancer 2016; 23: R455-67. doi: 10.1530/ERC-16-0285.
- Romero-Villarreal JB, Palacios-Saucedo GC, Ocaña-Hernández LA, Pompa-Garza M, et al. Valores de referencia de triyodotironina total (TT3), tiroxina libre (FT4) y tirotropina (TSH) obtenidos por quimioluminiscencia en niños menores de seis años del noreste de México. Gac Med Mex 2014;150(Suppl 2): 248-54.
- Castells E, González EC, Frómeta A, Pérez PL, et al. Modified T4 UMELISA to 3 mm discs for a more rational use of dried blood newborn samples on filter paper. Biotecnol Apl 2013; 30: 137-41. Disponible en:

http://elfosscientiae.cigb.edu.cu/PDFs/Biotecnol%20Apl/2013/30/2/BA003002TN137-141.pdf

- Koulouri O, Moran C, Halsall D, Chatterjee K, Gurnell M. Pitfalls in the measurement and interpretation of thyroid function tests. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab. 2013; 27(6): 745-62. doi: 10.1016/j.beem.2013.10.003.
- Maidana P, Bruno OD, Mesch V. Medición de cortisol y sus fracciones. Una puesta al día. Med (Buenos Aires) 2013; 73: 579-84.
- Rosner W, Hankinson SE, Sluss PM, Vesper HW, Wierman ME. Challenges to the measurement of estradiol: an Endocrine Society position statement. J Clin Endocrinol Metab 2013; 98: 1376-87. doi: 10.1210/jc.2012-3780.
- Taylor NF. Urinary steroid profiling. Methods Mol Biol. 2013; 1065: 259-76. doi: 10.1007/978-1-62703-616-0_17.
- Vela-Amieva M, Ibarra-González I, Fernández-Lainez C, Belmont-Martínez L. Fundamentos teórico-prácticos para la toma correcta de la muestra de sangre del talón para el tamiz neonatal. Acta Pediatr Mex. 2012; 33(6): 273-8.
- Pérez-Rivero JJ, Aguilar-Setién A, Villa-Godoy A, Serrano H. Relación entre estructura y función de receptores para hormonas esteroidales: Receptores estrogénicos. Vet Mex 2005; 36(4): 437-52.
- Holst JP, Soldin OP, Guo T, Soldin SJ. Steroid hormones: relevance and measurement in the clinical laboratory. Clin Lab Med. 2004; 24(1): 105-18. doi: 10.1016/j.cll.2004.01.004.

Manejo de residuos

No aplica.

Práctica 19

AUTOMATIZACIÓN EN QUÍMICA CLÍNICA

Un autoanalizador es un equipo, o más bien, una máquina capaz de realizar un gran número de determinaciones, exigiendo escasa atención por parte de los

operadores. La automatización en Química Clínica es relativamente reciente, ya que data de 1957.

Hacia los años 60's, la Química Clínica, y principalmente hospitalaria, experimentó un profundo cambio, originando como consecuencia dos innovaciones simultáneas y relacionadas:

- la mecanización de las determinaciones
- la producción industrial de equipos de reactivos

Actualmente existen en el mercado muy diversos tipos de analizadores para Química Clínica y se clasifican de acuerdo con su funcionamiento como:

- completo o parcial
- seriado o paralelo
- discreto o de flujo continuo
- monocanal o multicanal

Estos aparatos, además, nos pueden medir la velocidad de una reacción, el punto final o una posición de equilibrio; o hacer los tres tipos de medidas.

Hoy por hoy, se utilizan mucho más frecuentemente los sistemas de flujo continuo, aunque también se han desarrollado sistemas discretos que utilizan la tecnología de la película o química seca.

Cuando estamos frente a un autoanalizador es importante considerar:

a) No todos funcionan como sería de esperar al leer los impresos que los describen.
b) Si no se posee experiencia directa sobre el sistema, es un buen índice para juzgarlo la aceptación que haya tenido por parte de otros consumidores.
c) Hay sistemas con un porvenir aparentemente brillante que prácticamente desaparecen del mercado un año después.
d) Es muy útil enfocar la discusión del sistema sobre los principios generales en que se basan la mayoría de ellos.

Estas consideraciones más la cantidad de análisis que se realizan por día en un laboratorio, son la guía para la adquisición de un equipo.

Aunque los equipos automatizados son rápidos y tienen la posibilidad de detener una corrida para introducir una muestra de urgencia, para obtener un resultado mucho más rápido en áreas de urgencia se diseñaron los instrumentos de respuesta rápida al lado del paciente (*point of care testing* [POCT]). El objetivo de este tipo de instrumentos es generar un resultado rápido para la implementación de un apropiado tratamiento. En ocasiones, de cualquier forma, se envía la muestra sanguínea al laboratorio para corroborar, pero con esta respuesta rápida se inicia un tratamiento que después se puede rectificar o continuar.

Material y reactivos

- No aplica

Equipo

- No aplica

Servicios

- No aplica

Técnica

Por carecer del equipo para hacer la demostración, esta actividad será únicamente de seminario.

Resultados: No aplica.

Seminario: AUTOMATIZACIÓN EN QUÍMICA CLÍNICA

Cuestionario

1. ¿Cuáles son las partes fundamentales de un autoanalizador en Química Clínica?
2. ¿Qué es el "arrastre" en un autoanalizador de Química Clínica?
3. ¿Cuál es la diferencia entre un analizador de flujo continuo y uno centrífugo?
4. En automatización ¿qué es el tiempo de retardo y el volumen muerto?
5. ¿Para qué pruebas de laboratorio se han diseñado equipos POCT?

Bibliografía

- Nichols JH. Utilizing Point-of-Care Testing to optimize patient care. EJIFCC. 2021; 32(2): 140-4.
- Trenti T. Synergy between Point-of-Care Testing and laboratory consolidations. EJIFCC. 2021; 32(3): 328-36.
- Chavarría Chavarría T. Herramienta de evaluación de equipos biomédicos automatizados para laboratorios clínicos. Rev Ing Biomed. 2018; 12(23): 13-24.
- Archetti C, Montanelli A, Finazzi D, Caimi L, Garrafa E. Clinical laboratory automation: a case study. J Public Health Res. 2017; 6(1): 881. doi: 10.4081/jphr.2017.881.
- Amundson B, Apple FS. Cardiac troponin assays: a review of quantitative point-of-care devices and their efficacy in the diagnosis of myocardial infarction. Clin Chem Lab Med 2015; 53(5): 665-76.
- Armbruster DA, Overcash DR, Reyes J. Clinical chemistry laboratory automation in the 21st century - Amat Victoria curam (Victory loves careful preparation). Clin Biochem Rev 2014; 35(3): 143-54.
- Felder R. Advances in clinical laboratory automation. Clin Lab News. Dec 1, 2014. Disponible en:

https://www.aacc.org/publications/cln/articles/2014/december/lab-automation.aspx
- St John A, Price CP. Existing and emerging technologies for Point-of-Care Testing. Clin Biochem Rev. 2014; 35(3): 155-67.
- Theodorsson E, Magnusson B, Leito I. Bias in clinical chemistry. Bioanalysis 2014; 6(21): 2855-75. doi: 10.4155/bio.14.249.
- Price CP. Point of care testing. BMJ 2001; 322: 1285-8.
- Middleton SR. Developing an automation concept that is right for your laboratory. Clin Chem 2000; 46: 757-63.
- Orsulak PJ. Stand-alone automated solutions can enhance laboratory operations. Clin Chem 2000; 46: 778-83.
- Seaberg RS, Stallone RO, Statland BE. The role of total laboratory automation in a consolidated laboratory network. Clin Chem 2000; 46: 751-6.
- Wing AK. Laboratory automation and optimization: the role of architecture. Clin Chem 2000; 46: 784-91.

Manejo de residuos

No aplica.

BIBLIOGRAFÍA GENERAL

- Diario Oficial de la Federación. Proyecto NOM-007-SSA3-2017. Para la organización y funcionamiento de los laboratorios clínicos. México, 31 enero de 2018.

- Farreras-Valentí P, Rozman C. Medicina interna. 18ª ed. Barcelona: Elsevier; 2016.
- Kumar V, Abbas AK, Fausto N. Robbins y Cotran: patología estructural y funcional. 9ª ed. Amsterdam: Elsevier; 2015.
- Moreno-Muñoz F. Anatomofisiología y patologías básicas. Jaén: Formación Alcalá; 2015.
- Brunzel NA. Fundamentos del análisis de orina y fluidos corporales. Colombia: Amolca; 2014.
- Gómez-Gutiérrez A, Casas-Gómez MC, Gómez-Tobón PE. Ángel. Interpretación clínica del laboratorio. 8ª ed. Bogotá: Médica Panamericana; 2014.
- Lieberman M, Marks AD, Peet A. Bioquímica médica básica: un enfoque clínico. Barcelona: Wolters Kluwer Health; 2013.
- Longo DL, Fauci AS, Kasper DL, Hauser SL, Jameson JL, Loscalzo J. Harrison: Manual de Medicina. 18ª ed. México: McGraw-Hill; 2013.
- Williamson MA, Snyder LM. Jacques Wallach. Interpretación clínica de pruebas diagnósticas. 9ª ed. Barcelona: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins; 2012.
- Prieto-Valtueña JM, Yuste-Ara JR. Balcell. La clínica y el laboratorio: interpretación de análisis y pruebas funcionales: exploración de los síndromes: cuadro biológico de las enfermedades. 21ª ed. Barcelona: Masson; 2010.
- Ruiz-Reyes G, Ruiz-Argüelles A. Fundamentos de interpretación clínica de los exámenes de laboratorio. 2ª ed. México: Médica Panamericana; 2010.
- Siegenthaler W, Aeschlimann A. Diagnóstico diferencial en medicina interna: de los síntomas al diagnóstico. México: Manual Moderno; 2009.
- Pagana KD, Pagana TJ. Guía de pruebas diagnósticas y de laboratorio. 8ª ed. Barcelona: Elsevier; 2008.
- Crocker J, Burnett D. La ciencia del diagnóstico de laboratorio [recurso electrónico]. México: McGraw Hill/Interamericana; 2007.
- Baynes JW, Dominiczak MH. Bioquímica médica 2ª ed. Madrid: Elsevier; 2006.
- Fernández-Castillo R, Fernández-Gallegos R. Laboratorio de diagnóstico clínico. Jaén: Formación de Alcalá; 2006.
- Farías-Martínez C. Gasometría: equilibrio ácido base en la clínica. 2ª ed. México: Manual Moderno; 2004.
- Diario Oficial de la Federación. Norma Oficial Mexicana NOM-087-SEMARNAT-SSA1-2002. Protección ambiental - Salud ambiental - Residuos peligrosos biológico-infecciosos - Clasificación y especificaciones de manejo. México, 22 enero de 2003.

- Fuentes-Arderiu X, Castiñeiras-Lacambra MJ, Ferré-Masferrer M. Codéx del laboratorio clínico. Madrid: Elsevier; 2003.
- Christenson RH, Gregory LC, Johnson LJ. Appleton & Lauge's online review clinical chemistry. New York: Appleton & Lauge-McGrawHill; 2001.
- Anderson SC, Cockayne S. Química clínica. México: Interamericana-McGraw-Hill; 1995.
- Bennington J. Diccionario enciclopédico del laboratorio clínico. Buenos Aires: Médica Panamericana; 1991.
- Pesce A, Kaplan L. Química clínica: métodos. Buenos Aires: Médica Panamericana; 1990.
- Henry J. Todd-Sanford-Davidsohn. Diagnóstico y tratamiento clínicos por el laboratorio. 8ª Ed. [2 vol.] México: Salvat; 1988.
- Bauer J. Análisis clínicos: métodos e interpretación. 9ª Ed. México: Reverté; 1986.
- Kaplan L, Pesce A. Química clínica. Teoría, análisis y correlación. Buenos Aires: Médica Panamericana; 1986.
- Iovine E, Selva A. El laboratorio en la clínica. Metodología analítica, fisiopatología e interpretación semiológica. 3ª Ed Buenos Aires: Médica Panamericana; 1985.

A N E X O

PREPARACIÓN DE REACTIVOS

1. Solución Madre de Anaranjado de metilo (100 mg/dL):

Anaranjado de metilo…… 100 mg
Agua destilada cbp…… 100 mL
Disolver en colorante en un matraz aforado de 100 mL con un poco de agua destilada. Aforar a 100 mL con el agua.

2. Solución de anaranjado de metilo, concentración 0.2 mg/dL:
   Solución madre de anaranjado de metilo…… 0.2 mL
   Agua destilada cbp …… 100.0 mL
   Colocar el colorante en un matraz aforado de 100 mL y diluir con el agua hasta el aforo.

3. Solución de anaranjado de metilo, concentración 0.4 mg/dL:
   Solución madre de anaranjado de metil…… 0.4 mL
   Agua destilada cbp …… 100.0 mL
   Colocar el colorante en un matraz aforado de 100 mL y diluir con el agua hasta el aforo.

4. Solución de anaranjado de metilo, concentración 0.6 mg/dL:
   Solución madre de anaranjado de metilo…… 0.6 mL
   Agua destilada cbp …… 100.0 mL
   Colocar el colorante en un matraz aforado de 100 mL y diluir con el agua hasta el aforo.

5. Solución de anaranjado de metilo, concentración 0.8 mg/dL:
   Solución madre de anaranjado de metilo…… 0.8 mL
   Agua destilada cbp …… 100.0 mL
   Colocar el colorante en un matraz aforado de 100 mL y diluir con el agua hasta el aforo.

6. Solución de anaranjado de metilo, concentración 1.0 mg/dL:
   Solución madre de anaranjado de metilo…… 1 mL
   Agua destilada cbp …… 100 mL
   Colocar el colorante en un matraz aforado de 100 mL y diluir con agua hasta el aforo.

7. Solución madre de rojo de cresol al 1% (p/v):
   Rojo de cresol …… 250 mg
   Etanol 96°…… 10 mL
   Agua destilada cbp …… 25 mL

Disolver el colorante en el etanol en un matraz aforado de 25 mL, aforar con el agua destilada. Conservar en frasco ámbar aislado de la luz.

8. Solución de rojo Congo 14 mg/L
   Rojo Congo …… 7 mg
   Agua destilada cbp …… 500 mL
   Disolver el colorante en un poco de agua en un matraz aforado de 500 mL, aforar con el agua destilada. Conservar en frasco ambar aislado de la luz.

9. Solución de dicromato de potasio al 10% (p/v):
   Dicromato de potasio…… 10 g
   Ácido sulfúrico concentrado…… 1 mL
   Agua destilada cbp …… 100 mL
   Disolver el dicromato de potasio en un matraz aforado de 100 mL con un poco de agua y el ácido sulfúrico, llevar al aforo con el agua.

10. Solución de ácido sulfúrico 500 mmol/L
    Ácido sulfúrico (90% de pureza y densidad de 1.84)…… 1.4 mL
    Agua destilada cbp …… 100 mL
    Colocar en un matraz aforado de 100 mL aproximadamente 50 mL de agua destilada y adicionar el ácido cuidadosamente, mezclar y aforar con agua destilada.

11. Solución de hidróxido de sodio 500 mmol/L
    Hidróxido de sodio…… 2.0 g
    Agua destilada…… 100 mL
    En un matraz aforado de 100 mL colocar aproximadamente 50 mL de agua destilada y adicionar el hidróxido de sodio. Disolver auxiliándose de un baño frío y aforar con agua destilada.

12. Solución de ácido clorhídrico 5 N
    Ácido clorhídrico concentrado …… 4.2 mL
    Agua destilada cbp …… 10 mL
    En un tubo de ensayo de 18X150 mm colocar 5 mL de agua destilada y adicionar lenta y cuidadosamente el ácido, homogeneizar. Agregar 5 mL más de agua con cuidado.

13. Solución de hidróxido de sodio 5 N
    Hidróxido de sodio…… 2.0 g
    Agua destilada…… 10 mL

En un tubo de ensayo de 18X150 mm colocar 5 mL de agua destilada y adicionar el hidróxido de sodio. Disolver y agregar 5 mL más de agua destilada.

14. Solución de ácido sulfosalicílico al 3% p/v
    Ácido sulfosalicílico …… 3.0 g
    Agua destilada cbp …… 100 mL
    Colocar un poco de agua destilada en un matraz aforado de 100 mL, agregar el ácido sulfosalicílico y disolver. Aforar con agua destilada.

15. Solución de bicarbonato de sodio al 5% (p/v) en formol al 1% (p/v):
    Bicarbonato de sodio …… 5 g
    Formaldehído al 40% …… 1 mL
    Agua destilada cbp …… 100 mL
    En un matraz aforado de 100 mL, colocar un poco de agua y añadir el bicarbonato de sodio, disolver y agregar el formaldehído. Aforar con agua destilada.

16. Solución de eosina-nigrosina
    Eosina Y …….. 0.67 g
    Cloruro de sodio …….. 0.9 g
    Nigrosina …… 10.0 g
    Agua destilada cbp …….. 100 mL
    Colocar en un matraz Erlenmayer de 250 mL la eosina Y y el cloruro de sodio, agregarle 100 mL de agua destilada y calentar ligeramente hasta disolución. Agregar la nigrosina y hervir la suspensión. Después de que llegue al punto de ebullición, dejar enfriar a temperatura ambiente. Una vez que la solución se ha enfriado, filtrarla con papel filtro para eliminar el precipitado, colocando la solución en un frasco ámbar. Se almacena a temperatura ambiente.