

ESTUDIO CRITICO DE LAS BASES DE REFERENCIA UTILIZADAS EN EL ANALISIS DEL MUSCULO ESTRIADO. METODOLOGIA QUIMICA Y VALORES NORMALES EN HUMANOS.

CARLOS R. MARCHENA

INTRODUCCION

En el presente trabajo, se describe sistemáticamente la tecnología elaborado en este laboratorio para el análisis del músculo esquelético, tomado como expresión de la fase celular del organismo, lo que constituye un gran instrumento de trabajo para futuras investigaciones sobre las modificaciones que se producirían en el medio intracelular en el curso de diversos procesos patológicos, o en muchos otros problemas biológicos. En nuestro caso particular, y como parte del plan de estudio de la insuficiencia renal, nos interesa establecer, si en ella, la bioquímica del medio intracelular se modifica, como sucede con el medio extracelular, o si, su composición es más o menos independiente de la función renal.

Uno de los principales obstáculos para la cuantificación de los elementos analizados, ha sido la falta de adecuadas bases de referencia. Ya en 1937, Hastings y Eichelberger (1) introdujeron el uso del agua intracelular como base de referencia, justificando su uso por ser ella el mayor componente de los tejidos. En 1939, Darrow y col. (2), consideraron que tenía ventaja el referir sus resultados a 100 gr. de sólidos de músculo desgrasado, en vez de expresarlos por 100 gr. de músculo desgrasado, como se hacía clásicamente. En 1950, Lilienthal y col. (3), propusieron el uso del nitrógeno no colágeno con el mismo fin, por considerarlo una medida de la masa celular funcionante; sin embargo, este autor no excluyó de sus valores el nitrógeno no proteico por asumir que no representaba más del 5% del nitrógeno total.

A nosotros nos interesaba precisar la magnitud del nitrógeno no proteico, sobre todo en la insuficiencia renal, donde puede alcanzar ci-

fras significativas, y constituir fuente de error en el cálculo del nitrógeno no colágeno. Con este objeto se hizo un estudio preliminar en un grupo de 10 cobayos normales y en otro de 11 cobayos con 48 horas de uremia post-nefrectomía, que demostró, en los normales, que el nitrógeno no proteico constituye un porcentaje elevado del nitrógeno no colágeno, el que es aún mayor en el caso de los urémicos, lo que justifica la corrección del nitrógeno no colágeno por el nitrógeno no proteico que proponemos. Introducimos así, un nuevo sistema de referencia al que llamaremos nitrógeno no colágeno verdadero.

Con el entrenamiento y la depuración de la técnica conseguida en el trabajo experimental, hemos abordado el estudio del músculo humano normal a fin de establecer sus valores medios, que nos servirán como punto de referencia para juzgar los resultados que obtendremos en un trabajo posterior en músculo de paciente con insuficiencia renal crónica. Estos valores normales así establecidos, nos dan independencia de los encontrados por otros autores, pues no son enteramente comparables entre sí por diferencias en las técnicas, material empleado, o en la expresión de los resultados. Esto pues, constituye otra de las justificaciones de nuestro trabajo.

MATERIAL Y METODOS

En 8 mujeres con litiasis vesicular, como único padecimiento, cuyas edades fluctuaban entre 24 y 50 años, y aprovechando de la intervención quirúrgica, se obtuvo una biopsia del músculo recto anterior del abdomen, bajo anestesia general (pentotal + éter) y al inicio de la intervención, sin administrar soluciones endovenosas, o sólo dextrosa al 5 % en agua, no sobrepasando en ningún caso los 500 cc. hasta antes de obtener la muestra. A esta se le liberó de todo tejido graso y fibroso visible macroscópicamente. Simultáneamente se extrajo 3 cc. de sangre venosa con anticoagulante y 20 cc. sin anticoagulante.

En las 8 muestras de músculo normal se analizó una sola vez grasa y agua total, y por duplicado: sodio, potasio, fósforo, nitrógeno total, nitrógeno no colágeno y nitrógeno no proteico. En la sangre o suero correspondiente a cada muestra de músculo se determinó agua sérica, hematocrito; y por duplicado: sodio, potasio, fósforo, nitrógeno total, nitrógeno no proteico. Tanto en músculo como en suero se analizó el cloro por triplicado por la necesidad de la mayor exactitud en el cálculo del espacio extracelular en base al cloro.

I. *Preparación del homogenizado.*— Previa pesada de la muestra, y después de dividirla en fragmentos mínimos con tijeras delgadas, se le homogenizó finamente en un homogenizador de Lucita. Para evitar la formación de espuma durante el procedimiento, se agregó de 1 a 3 gotas de alcohol caprílico. Esto resultó indispensable para la obtención de un buen homogenizado con el que se hizo una dilución al 10 % con agua destilada.

II. *Preparación de la tracción muscular no colágena* (digerido alcalino).— Para separar el tejido colágeno se han seguido las instrucciones de Lilienthal y B. A. Barnes (3 y 4 respectivamente). A un volumen de homogenizado se agrega 2.5 volúmenes de KOH o NaOH 0.074N; se mezcla bien y se deja en reposo 18 horas a la temperatura ambiente. Se centrifuga en frío (4° a 8°C) a 1400-1600 gravedades durante una hora. Se separan 3 capas diferentes: Una superior, fina, de grasa. La intermedia, acuosa, que contiene la fracción no colágena. La capa inferior constituida por tejido colágeno (el tejido colágeno y elastina no son solubles en soluciones débiles alcalinas). Se decanta la capa media que servirá para el dosaje de nitrógeno no colágeno y fósforo total.

III. *Preparación del extracto de ácido nítrico.*— (5). Se toma 0.5 cc. de HNO₃ concentrado por cada 10 cc de homogenizado, obteniéndose una concentración final de HNO₃ de 0.75N. Se agita vigorosamente durante un minuto, se filtra después de 10 minutos con papel filtro Whatmen N° 14. El extracto de ácido nítrico sirve para determinar sodio, potasio y cloro.

Determinación de agua total muscular.—

1. Se pipetea exactamente 3 cc. de homogenizado en un frasco de peso conocido. Se pesa nuevamente.
2. Se deseca en un horno a 110°C durante 24-36 horas.
3. Dejar enfriar 20 minutos. Pesar de nuevo el frasco.
4. Por diferencia de peso se conoce la cantidad de sólidos contenidos en 3 cc de homogenizado.
5. Teniendo en cuenta la dilución del homogenizado se calcula la cantidad de músculo húmedo contenido en 3 cc de homogenizado.
6. Restando 5 de 4 se obtiene la cantidad de agua que luego se refiere a porcentaje.

Determinación de grasa muscular.— (5). Después de desecar el frasco para la determinación del agua total muscular, se agrega 5 cc de éter etílico, y se deja en reposo 18 horas. Se decanta y se vuelve a agregar 5 cc de éter etílico. Después de 3 horas se decanta nuevamente el éter y se coloca el frasco en una estufa a 100°C durante una hora. Pesar el frasco después de enfriar. Por diferencia de peso se deduce el de la grasa que se expresa en gramos por 100 gr. de músculo húmedo total.

Nitrógeno total en homogenizado.— A 0.5 cc de homogenizado se agrega 4.5 cc de agua destilada. Para la digestión se toma en un tubo de 200 x 20 mm, 1 cc de esta dilución y se agrega 0.1 cc de la mezcla digestiva de Tompkins y Kirk (6). Se evapora el agua en un horno. Luego se sumergen los tubos en un baño de arena calentada a 280 — 300°C durante 3 horas. Se coloca pequeños beakers en la boca de los tubos para evitar el escape de gases. Se retiran los tubos, y se deja enfriar. Para la determinación del nitrógeno se emplea la técnica de Conway (6).

Nitrógeno no proteico en homogenizado.— A 2 cc de homogenizado se agrega 5 cc de agua destilada. Se toma una alícuota de 5 cc y se añade 1 cc de H₂SO₄ 2/3 N, más 0.5 cc de tungstato de sodio al 10 %. Esperar 10 minutos, centrifugar y filtrar. Se toma de este filtrado 1 cc y se añade 0.1 cc de la mezcla digestiva de Tompkins y Kirk. Se continúa el procedimiento como en nitrógeno total.

Nitrógeno no colágeno.— En un tubo pyrex de las dimensiones anteriormente citadas, se pipetea 0.5 cc de la fracción no colágena + 0.1 cc de la mezcla digestiva de Tompkins y Kirk. Se continúa como en nitrógeno total.

Fósforo total.— (3). Tomar 1 cc de la fracción muscular no colágena + 0.4 cc de H₂SO₄ 10N + 2 gotas de ácido nítrico fumante. Se coloca en un horno durante 20 horas a 120-130°C. Se añade 2 gotas de H₂O₂ al 30 % y se deja en el horno por 2 horas; luego se agrega 3 gotas de agua destilada y se deja en el horno por 2 horas más. El digerido se transfiere cuantitativamente a un tubo haciendo lavados sucesivos, hasta alcanzar un volumen de 12 cc. Se toma 5 cc de esta dilución, y se continúa según la técnica usual de Fiske y Subbarrow (7).

Cálculos:

$$(P)_m = \frac{X \times 12 \times 3.5 \times F.D. \times 100}{5 \times 30.98}$$

- (P)M = Milimoles de fósforo por 100 gr. de músculo húmedo total.
 X = Gramos de fósforo contenido en la muestra final.
 3.5 = Factor de dilución del digerido alcalino.
 F.D. = Factor de dilución del homogenizado.
 30.98 = Peso atómico del fósforo.

Para la determinación del sodio y potasio en músculo y suero se siguió el procedimiento de Bornes (8).

Sodio.— Tomar 4 cc de extracto de ácido nítrico + 2 cc de sulfato de litio al 2% ('), completar a 50 cc con agua destilada, leer en el fotómetro.

Cálculos:

$$(na)m = \frac{L \times V}{C \times 10} \times 1.05 \times F.D.$$

- (Na)m = No en mEq por 100 gr. de músculo húmedo total.
 L = Valor correspondiente a la lectura del fotómetro.
 V = Volumen total de la muestra.
 1.05 = Corrección por preparación del extracto de ácido nítrico.
 F.D. = Factor de dilución del homogenizado.
 C = Volumen del extracto tomado para el análisis en cc.

Potasio.— Tomar 0.5 cc del extracto de ácido nítrico + 4 cc de sulfato de litio al 2% ('), completar a 100 cc (= V) con agua destilada. Leer en el fotómetro.
 Cálculos: Iguales que para el sodio.

Cloro.— A 2 cc de extracto de ácido nítrico se agrega 1 cc de AgNO₃ 0.015N, se mezcla. Se añade 1.5 cc de HNO₃ concentrado, mezclar. Se coloca en baño maría durante 15 minutos. Enfriar en hielo. Añadir 10 gotas de alumbre férrico al 40 =. Titular con KCNS 0.02N.

(') = La concentración de litio es variable según la técnica y fotómetro empleado.

Cálculos:

$$(Cl)m = \frac{(1 \times AgNO_3) - (C \times KCNS)}{y} \times 1.05 \times F.D. \times 100$$

- (Cl)m = Cloro en mEq/100 gr. de músculo húmedo total.
 AgNO₃ = Título del nitrato de plata.
 KCNS = Título del sulfocianuro.

- C = Cantidad de sulfocianuro utilizado en la titulación, en cc.
 y = Volumen en cc. de la muestra a analizar.
 1.05 = Corrección por preparación del extracto de ácido nítrico.
 F.D. = Factor de dilución del homogenizado.

Nitrógeno total en sangre total.— Se toma 1 cc de sangre total y se completa a 100 cc con agua destilada. Se toma una alícuota de 1 cc + 0.1 cc de la mezcla digestiva de Tompkins y Kirk. Se continúa el procedimiento como en nitrógeno total en homogenizado.

Nitrógeno no proteico en suero.— Filtrado de Folin-Wu (9). Tomar 1 cc del filtrado y agregar 0.1 cc. de la mezcla digestiva de Tompkins y Kirk. Continuar como en nitrógeno total en homogenizado.

Sodio y potasio en suero.— Según técnica de Barnes (8).

Cloro en suero sanguíneo.— Según el método de Keys (10).

Agua sérica.— Se determinó desecando una cantidad conocida de suero.

Fósforo en suero sanguíneo.— Técnica de Fiske y Subbarrow (7).

NOMENCLATURA

Para los efectos de la nomenclatura, factores de conversión, y datos derivados, se ha adoptado los de B. A. Barnes (4).

En músculo.—

- (H₂O)_m = Por ciento de agua por peso.
 (G)_m = Por ciento de grasa por peso.
 (Na)_m, (K)_m, (Cl)_m = En mEq por 100 gr. de músculo húmedo total.
 (P)_m = En milimoles por 100 gr. de músculo húmedo total.
 (NNC)_m = Gr. de nitrógeno no colágeno por 100 gr. de músculo húmedo total.
 (NNP)_m = Gramos de nitrógeno no proteico por 100 gr. de músculo húmedo total.
 (NT)_m = Gramos de nitrógeno proteico total por 100 gr. de músculo húmedo total.

(NNC)v = Gramos de nitrógeno no colágeno corregido por (NNP)m por 100 gr. de músculo húmedo total.

Las correcciones en músculo se hacen por grasa, y se indican agregando una *c* a las siglas.

En sangre o suero.—

(H₂O)s = Gramos de agua por 100 cc de suero.

(Na)s, (K)s, (Cl)s = En mEq por litro de suero.

(P)s = En milimoles por litro de suero.

(NT)b = Gramos de nitrógeno total por 100 cc de sangre total.

(Hct)b = Por ciento de hematocrito.

Las correcciones en suero se hacen por agua sérica, y se indican agregando una *c* a las siglas.

FACTORES DE CONVERSION Y DATOS DERIVADOS

Factor para convertir los valores de músculo húmedo total a músculo húmedo desgrasado:

$$\frac{100}{100 - (G)m}$$

Para convertir los valores por litro de suero a valores por kilo de agua sérica:

$$\frac{100}{(H_2O)s}$$

Para expresar los valores por kilo de agua intracelular:

$$\frac{1000}{(H_2O)ic}$$

Para expresar los valores por Gr. de (NNC)c, y por Gr. de (NNC)vc:

$$\frac{1}{(NNC)c}$$

$$\frac{1}{(NNC)vc}$$

Para expresar por 100 gr. de sólidos de músculo desgrasado:

$$\frac{100}{\text{sólidos por 100 gr. músc. desgrasado}}$$

Para calcular los sólidos contenidos en 100 gr. de músculo desgrasado:

$$100 - (H2O)mc$$

(Cl)h = Cloro en hematíes en mEq/100 gr. de músculo húmedo desgrasado:

$$(Cl)h = 4.09 \times \frac{(Hct)b}{45} \times \frac{50}{1000} \quad (*)$$

(Cl)esp. = Espacio cloro en gramos de agua por 100 gr. de músculo húmedo sin grasa :

$$(Cl)esp. = \frac{(Cl)mc - (Cl)h}{\frac{(Cl)s}{0.977} \times \frac{100}{(H2O)s} \times \frac{1}{1000}}$$

(H2O)ic = Agua intracelular en gr. por 100 gr. de músculo húmedo sin grasa:

$$(H2O)ic = (H2O)mc - (Cl)esp.$$

(NT)bm = Nitrógeno total de la sangre total contenida en músculo, en gramos por 100 gr. de músculo húmedo sin grasa:

$$(NT)bm = 9.09 \times \frac{(NT)b}{100} \quad (*)$$

(NNC)c = Nitrógeno no colágeno corregido, en gramos por 100 gr. de músculo húmedo sin grasa:

(*) 4.09 cc es la cantidad promedio de hematíes contenido en 100 gramos de músculo total, según estudios de B. A. Barnes.

(*) 9.09 cc es la cantidad promedio de sangre total contenida en 100 gr. de músculo total, según los estudios de B. A. Barnes.

$$(NNC) = (NNC)_{mc} - (NT)_{bm}$$

(NNC)_{vc} = Nitrógeno no colágeno verdadero corregido, en gramos por 100 gr. de músculo húmedo sin grasa:

$$(NNC)_{vc} = (NNC - NNP) \times \frac{100}{100 - (G)_m} - (NT)_{bm}$$

(Na)_{ec} = Sodio extracelular en mEq por 100 gr. de músculo húmedo sin grasa:

$$(Na)_{ec} = \frac{(Na)_{sc}}{1000} \times \text{F.G.D.} \times (Cl)_{esp.} \quad (*)$$

(Na)_{ic} = Sodio intracelular en mEq por 100 gr. de músculo húmedo sin grasa:

$$(Na)_{ic} = (Na)_{mc} - (Na)_{ec}$$

En vista del escaso contenido de potasio y fósforo en el líquido extracelular, se ha considerado:

$$(K)_{ic} = (K)_{mc}$$

$$(P)_{ic} = (P)_{mc}$$

El espacio extracelular también ha sido calculado de acuerdo a la fórmula propuesta por Conway (11), y nos ha servido para chequear la validez del espacio cloro como medida de dicho espacio.

Trabajo experimental.— En 10 cobayos normales y 11 con 48 horas de uremia post-nefrectomía, y bajo anestesia general, se obtuvo una biopsia de músculo de la región del muslo. La muestra fue exprimida suavemente con papel filtro para liberarla lo más posible de su contenido de sangre. Esto nos evitó hacer corrección de las fracciones nitrogenadas del músculo por el nitrógeno de la sangre. Se procedió luego a la homogenización, separación de la fracción no colágena y del contenido de grasa, según los procedimientos descritos.

(*) F.G.D.: Factor Gibbs-Dannon = 0.977.

Se determinó por duplicado: nitrógeno total, nitrógeno no colágeno y nitrógeno no proteico, empleando las técnicas descritas anteriormente.

El estudio estadístico de los resultados se ha hecho según sistemas establecidos (12-13).

RESULTADOS Y DISCUSION

En la tabla I se consignan los resultados del estudio estadístico de los valores obtenidos en el trabajo experimental en cobayos. En la tabla II, los resultados de los análisis realizados en sangre o suero. En la tabla III los valores musculares corregidos por grasa y expresados por 100 gramos de músculo desgrasado, excepto la grasa que figura en por ciento de músculo total; el espacio extracelular, nitrógeno no colágeno corregido, y el nitrógeno no colágeno verdadero corregido, se han calculado según los procedimientos descritos en material y métodos. Partiendo de los valores medios, se ha calculado en la misma tabla, el porcentaje que representa el NNP del NNC y NT respectivamente, y el (NT)bm del NNC. Todos estos valores normales nos servirán para hacer los cálculos necesarios a fin de expresarlos según los otros sistemas de referencia.

En las tablas IV, V, VI, y VII, se consignan los resultados por 100 gr. de sólidos de músculo desgrasado, por kilo de agua intracelular, por gramo de nitrógeno no colágeno corregido, y por gramo de nitrógeno no colágeno verdadero corregido, respectivamente. Al inicio de cada tabla se ha colocado el elemento tomado como base de referencia expresado por 100 gr. de músculo desgrasado, a fin de dar una idea de su magnitud dentro del músculo.

En la tabla VIII se han agrupado todos los coeficientes de variación calculados, lo que nos permitirá comparar las variaciones que sufren los valores al ser expresados en los diferentes sistemas de referencia. Finalmente, la tabla IX nos permite realizar un estudio comparativo con los datos publicados por otros autores.

En la tabla I vemos que en los cobayos normales, la media del nitrógeno no proteico constituye el 11.5 % del nitrógeno no colágeno, y el 16.5 % en los urémicos, porcentajes lo suficientemente altos como para justificar la corrección del NNC por NNP (NNC-NNP). Sin embargo, las medias de los valores que resultan de esta corrección en normales y urémicos, 2.44 y 2.37 respectivamente, no son lo suficientemente distintos ($\text{Dif. } x \pm \text{E.S.} = 0.07 \pm 0.11$) como para crear una diferencia estadísticamente significativa, lo que sugeriría que no es muy importante la

corrección en el estudio comparativo entre normales y urémicos. Sin embargo, consideramos, que en casos individuales, muy urémicos, puede tener importancia esta corrección que introducimos, y que llamaremos nitrógeno no colágeno verdadero:

$$(NNC)_v = (NNC - NNP)$$

TABLA Nº 1. Análisis de músculo en Cobayos Normales y Patológicos. Los valores son expresados en Gr/100 gr. de músculo fresco. No se corrigió por grasa por ser mínimo su contenido

	10 Cobayos normales					
	(NT)	(NNC)	(NNP)	(NNC-NNP)	NNP x 100	NNP x 100
	Gr.	Gr.	Gr.	Gr.	NNC	NT
MEDIA	2.96	2.77	0.32	2.44		
D.S.	0.25	0.28	0.02	0.27		
C.V.	8.4	10.1	6.2	11.1	11.5 %	10.8 %
E.S.x.	0.08	0.09	0.006	0.08		
	11 Cobayos urémicos					
MEDIA	3.01	2.85	0.47	2.37		
D.S.	0.36	0.29	0.06	0.27		
C.V.	12.0	10.2	12.8	11.4	16.5 %	15.6 %
E.S.x.	0.11	0.09	0.002	0.08		

TABLA Nº II

Nº de casos	(Hct) ^b %	(H2O) ^s Gr.	Por litro de suero			P mM	NNP mgr.	Sangre total
			Na mEq	K mEq	Cl mEq			NT Gr. %
1	41.3	930.6	133.6	3.5	105.8	1.48	246	3.18
2	45.5	928.7	140.0	3.8	106.5	1.36	172	3.11
3	35.5	933.4	143.0	3.6	113.6	1.03	280	2.86
4	35.0	929.0	132.0	3.4	105.5	0.97	169	2.75
5	38.0	929.9	132.6	4.0	102.6	1.42	159	2.91
6	41.0	921.6	134.6	3.8	106.8	1.48	245	3.11
7	39.0	922.5	134.8	3.5	105.3	1.10	200	2.96
8	43.5	921.8	132.4	3.7	110.7	1.71	210	2.81
MEDIA	40.7	927.2	136.6	3.66	107.1	1.32	210	2.96
D.S.	4.2	4.55	5.18	0.2	3.45	0.26	43.5	0.49
E.S.	10.3	1.61	1.83	0.07	1.22	0.09	15.4	0.17
C.V. %	1.4	0.49	3.79	5.46	3.22	19.7	20.7	16.76

TABLA N° III

Por 100 Gr. de músculo sin grasa

N° de casos	Gr/100 Gr. (H ₂ O)m Gr.	(No)m mEq	(K)m mEq	(Cl)m mEq	(P) mM	(NNC)m Gr.	(NT)m Gr.	(NNP)m Gr.	(NNC)v Gr.	(Na)ic mEq	(Na)ec mEq
1	2.04	4.55	8.61	3.26	4.42	2.88	2.86	0.25	2.62	0.85	3.70
2	6.33	3.99	8.90	2.94	4.53	2.92	2.81	0.27	2.65	0.56	3.43
3	6.69	4.06	8.64	2.71	5.16	3.07	3.09	0.28	2.79	1.01	3.05
4	13.60	79.46	7.61	2.87	4.17	2.74	2.83	0.25	2.49	0.53	3.24
5	5.63	76.84	3.77	2.68	4.94	2.88	3.19	0.30	2.58	0.68	3.77
6	18.63	80.84	3.04	3.65	5.84	2.67	2.25	0.25	2.41	0.00	4.17
7	8.49	77.52	3.70	2.34	5.05	2.89	3.26	0.33	2.55	1.10	2.63
8	12.07	76.63	3.27	2.54	5.58	2.87	3.15	0.26	2.60	0.59	2.68
MEDIA	9.18	78.07	3.77	2.87	4.96	2.86	2.93	0.27	2.59	0.66	3.33
D.S.	4.9	1.4	0.46	0.42	0.58	0.12	0.33	0.03	0.11	0.34	0.54
E.S.	1.73	0.49	0.16	0.15	0.20	0.04	0.12	0.01	0.04	0.12	0.19
C.V. %	53.4	1.8	12.2	14.6	11.7	4.6	11.26	0.95	4.36	51.5	16.22

N° de casos	(Cl)esp Gr.	Esp. Ext. Conway	(NNC)c Gr.	(NNC)vc Gr.	(NT)bm Gr.	NNP x 100 NNC	NMP x 100 NT	(NT)bm x 100 NNC
1	26.37	27.50	2.59	2.33	0.289			
2	23.30	24.28	2.64	2.37	0.283			
3	20.46	20.84	2.81	2.53	0.269	9.43 %	9.21 %	9.4 %
4	23.33	23.77	2.49	2.24	0.250			
5	22.19	22.87	2.61	2.31	0.265			
6	29.21	30.34	2.39	2.12	0.283			
7	18.48	19.43	2.62	2.28	0.269			
8	19.04	20.18	2.61	2.34	0.255			
MEDIA	22.80	23.66	2.59	2.31	0.269	9.43 %		
D.S.	3.64	3.77	0.11	0.12	0.014			
E.S.	1.29	1.33	0.04	0.04	0.005			
C.V. %	16.0	15.93	4.36	5.2	5.316			

En la tabla III se aprecia que la grasa constituye el 9.18 % del músculo total, con un coeficiente de variación elevado: 53.4 %. Al corregir los valores del músculo por esta fracción elevada y variable; es decir, al referirlos a 100 gr. de músculo desgrasado, se aprecia una tendencia a reducir sus D.S. y C.V., sobre todo en el caso del agua, sodio, y nitrógeno no colágeno musculares, a la par que todos los valores medios se elevan. Por ahorrar espacio, no se ha consignado la tabla por 100 gr. de músculo total, lo que es fácil de calcular a partir de la tabla III.

Recordemos también, que en los valores de NNC dosados en la fracción muscular no colágena, va incluido el nitrógeno total de la sangre contenida en la muestra de músculo —(NT)bm—, y que en nuestras determinaciones en personas normales equivale al 9.4 % del NNC, porcentaje elevado que debe restarse del valor del NNC eliminando así este factor de error.

Se puede apreciar también, en la tabla, que el valor medio del NNP constituye el 9.43 % de la media del NNC, por lo que, dada la magnitud del NNP se debe restar su valor del NNC. La importancia de esta corrección se hace evidente al observar que la diferencia entre las medidas del NNC y (NNC)v tiene alto significado estadístico, lo que justifica la corrección que proponemos:

$$2.86 - 2.59 = 0.27$$

$$\text{Dif. } \bar{x} \pm \text{E.S.} = 0.27 \pm 0.06$$

Si tomamos la diferencia entre NNC y (NNC)v corregido por grasa y por (NT)bm, el significado estadístico es aún mayor.

De otro lado, la similitud entre las medias del NNC y del NT nos revelan la mínima cantidad de tejido colágeno que se encuentra en el músculo recto anterior del abdomen, y, por lo tanto, el ideal para esta clase de estudios. Su separación, sin embargo, está justificada porque se reduce la variabilidad de las cifras, como se aprecia en la D.S. y C.V., que de 0.33 y 11.26, respectivamente, en el NT, se reducen a 0.12 y 4.6 en el NNC.

El cálculo del espacio extracelular mediante las fórmulas del espacio cloro y la de Conway, nos dan valores casi superponibles, lo que reviste gran importancia, pues en la fórmula de Conway se considera la existencia de una fracción del cloro como intracelular, mientras que en la del espacio cloro, se asume que todo el cloro es extracelular. Esto nos revela que el cloro intracelular que hubiera, como se supone que exista al observar que el "espacio cloro" es mayor que el "espacio inu-

TABLA Nº IV

Nº de casos	Por 100 Gr. de sólidos de mús. sin grasa										
	Sólidos en Gr/100 Gr. mús. desgr.	Na mEq	K mEq	Cl mEq	P mM	(NNC)c Gr.	(NNC)vc Gr.	(H2O)mc Gr.	(H2O)lc Gr.	(Na)lc mEq	
1	21.38	21.28	40.27	15.25	20.67	12.12	10.90	367.9	244.5	3.98	
2	22.17	18.00	40.14	13.26	20.43	11.91	10.69	351.0	245.9	2.52	
3	22.88	17.74	37.76	11.84	22.55	12.28	11.06	337.0	247.6	4.41	
4	20.54	18.35	37.05	13.97	20.30	12.13	10.91	386.9	273.3	2.58	
5	23.16	16.28	38.26	11.57	21.33	11.28	9.98	331.9	236.1	2.93	
6	19.46	15.62	51.23	18.76	30.01	12.28	10.90	413.9	263.8	0.00	
7	22.48	16.46	41.46	10.41	22.46	11.66	10.15	344.9	262.7	4.89	
8	23.37	13.99	38.85	10.87	23.88	11.17	10.02	327.9	246.5	2.52	
MEDIA	21.93	17.21	40.63	13.24	22.70	11.85	10.58	357.7	252.6	2.98	
D.S.	1.37	2.18	4.50	2.76	3.20	0.44	0.45	30.0	12.55	1.52	
E.S.	0.48	0.77	1.59	0.98	1.13	0.16	0.16	10.6	4.43	0.54	
C.V. %	6.2	12.7	11.1	20.8	14.1	3.71	4.25	8.39	4.97	51.0	

lina" (14-15), sería en tan pequeña cantidad que no introduce factor de error en el cálculo del espacio extracelular en base al cloro.

En la tabla VIII podemos apreciar, panorámicamente, que los coeficientes de variación de todos los elementos analizados, según los dife-

TABLA Nº V

Por Kg. de agua intracelular								
No. de casos	(H2O)ic en Gr/100 gr. mús. desgr.	Na mEq	K mEq	P mM	(NNC)c Gr.	(NNC)vc Gr.	(H2O)mc Gr.	(Na)mc mEq
1	52.25	16.27	164.8	84.60	49.57	44.60	1504.8	87.09
2	54.53	10.27	163.2	83.08	48.42	43.47	1427.4	73.18
3	56.66	17.83	152.5	91.07	49.60	44.65	1361.2	71.66
4	56.13	9.44	135.6	74.31	44.37	39.92	1415.2	67.14
5	54.65	12.44	162.1	90.40	47.76	42.27	1406.2	68.99
6	51.33	0.00	194.2	113.76	46.56	41.30	1568.9	59.22
7	59.04	18.63	157.9	85.55	44.38	38.62	1313.2	62.68
8	57.59	10.24	157.6	96.87	45.31	40.62	1330.3	56.77
MEDIA	55.27	11.89	161.0	89.95	47.0	41.93	1415.9	68.34
D.S.	2.62	6.01	16.31	11.69	2.16	2.21	86.5	9.54
E.S.	0.93	2.12	5.76	4.13	0.76	0.78	30.6	3.37
C.V. %	4.7	50.5	10.1	13.0	4.6	5.3	6.1	13.96

TABLA Nº VI

Por Gr. de (NNC)c								
Nº de casos	(MNC)c en Gr/100 gr. mús. desgr.	Na mEq	K mEq	P mM	(H2O)mc Gr.	(H2O)ic Gr.	(Na)mc mEq	
1	2.59	0.33	3.32	1.71	30.35	20.17	1.76	
2	2.64	0.21	3.37	1.72	29.50	20.66	1.51	
3	2.81	0.36	3.07	1.84	27.45	20.16	1.44	
4	2.49	0.21	3.06	1.67	31.94	22.54	1.51	
5	2.61	0.26	3.39	1.89	29.43	20.94	1.44	
6	2.39	0.00	4.17	2.44	33.76	21.48	1.27	
7	2.62	0.42	3.56	1.93	29.73	22.53	1.41	
8	2.61	0.23	3.48	2.14	29.35	22.07	1.25	
MEDIA	2.59	0.25	3.42	1.92	30.18	21.32	1.45	
D.S.	0.12	0.13	0.35	0.26	1.87	0.98	0.16	
E.S.	0.04	0.05	0.12	0.09	0.66	0.35	0.06	
C.V. %	4.6	52.0	10.2	13.5	6.2	4.6	10.24	

rentes sistemas de referencia, son bastante uniformes. Si aceptamos que el C.V. es un índice para apreciar las ventajas de tal o cual base de referencia, dicha uniformidad nos indica que ninguna tiene ventaja sobre las otras, en cuanto a exactitud; sin embargo, creemos conveniente la utilización de los diferentes sistemas en la expresión de los resultados en el análisis de una muestra de músculo x, especialmente en casos patológicos que modifiquen las proporciones anátomo-químicas del músculo. En este último caso, la observación de la variación de las mismas bases de referencia empleadas, se prestarían para importantes interpretaciones del material empleado.

De otro lado, las razones por la que Darrow justifica la ventaja de expresar los resultados por 100 gr. de sólidos de músculo desgrasado sobre el músculo total desgrasado, no son enteramente válidas, pues los coeficientes de variación son muy similares en ambos casos.

En el caso particular del (Na)ic, su coeficiente de variación es alrededor de 50% lo que nos permite considerar al sodio intracelular como normalmente muy variable; en cambio, en el caso del (Na)mc —don-

TABLA Nº VII

Por Gr. de (NNC)vc							
Nº de casos	(NNC)vc en Gr/100 Gr. mús. desgr.	Na mEq	K mEq	P mM	(H2O)ic Gr.	(H2O)mc Gr.	(Na)mc mEq
1	2.33	0.36	3.70	1.90	22.42	33.73	1.95
2	2.37	0.24	3.76	1.91	23.01	32.84	1.68
3	2.53	0.40	3.41	2.04	22.40	30.46	1.60
4	2.24	0.24	3.40	1.86	25.06	35.44	1.68
5	2.31	0.29	3.84	2.14	23.66	33.27	1.63
6	2.12	0.00	4.70	2.75	24.21	28.01	1.43
7	2.28	0.48	4.09	2.21	25.89	34.03	1.62
8	2.34	0.25	3.88	2.38	24.61	32.72	1.40
MEDIA	2.31	0.28	3.85	2.15	23.91	33.81	1.62
D.S.	0.12	0.14	0.41	0.30	1.27	2.2	0.17
E.S.	0.04	0.05	0.14	0.11	0.45	0.78	0.06
C.V.%	5.2	50.0	10.6	13.9	5.3	6.51	10.49

de se elimina el factor de distribución del sodio entre el medio intra y extracelular—, dicho coeficiente se reduce a 10-13 %, a pesar de que está incluido el (Na)ic. Esto sería debido a que el (Na)ic es una pequeña parte del (Na)mc y no afecta la menor variabilidad del sodio extracelular que constituye la mayor porción.

TABLA Nº VIII

Coeficientes de variación

	(Na)ic	(K)ic	CI	(P)ic	(NNC)c	(NNC)vc	(H2O)ic	(H2O)vc	(Na)mc
Por 100 gr. de músc. desgrasado	51.5	7.5	14.6	11.7	4.36	5.2	4.7	1.8	12.2
Por 100 gr. sólido, músc. desgrasado	51.0	11.1	20.8	14.1	3.71	4.25	4.97	8.39	12.7
Por Kg. de agua intracelular	50.5	10.1		13.0	4.6	5.3		6.1	13.96
Por gramo de (NNC)c	52.0	10.2		13.5			4.6	6.2	10.34
Por gramo de (NNC)vc	50.0	10.6		13.9			5.3	6.5	10.49

TABLA Nº IX

	Por 100 gr. músculo desgrasado										Por 100 gr. sólidos músc. desgr.						
	(Cl)asp Gr.					(H2O)m Gr.					(H2O) Gr.						
	Clasp Gr.	(H2O)m Gr.	Na mEq	K mEq	Cl mEq	P mM	NNC Gr.	Na mEq	K mEq	Cl mEq	P mM	NNC Gr.	Na mEq	K mEq	Cl mEq	P mM	NNC Gr.
Nosotros	Media D.S.	22.8	78.07	3.77	8.87	2.87	4.96	357.7	17.21	40.63	13.24	22.7	11.85				
	D.S.	3.64	1.4	0.46	0.67	0.42	0.58	30.0	2.18	4.5	2.76	3.2	3.71				
Barnes (4)	Media D.S.	19.3	80.3	4.36	9.13	2.31	5.37	314.0	8.13	46.9	—	27.6	11.9				
	D.S.	5.81	1.6	1.1	0.83	0.65	0.63	—	—	—	—	—	—				
Lorenzini (16)	Media D.S.	17.9	77.7	3.07	8.65	2.07	5.24	—	—	—	—	—	—				
	D.S.	3.54	0.66	0.38	0.47	0.36	0.49	—	—	—	—	—	—				
Wilson (17)	Media D.S.	22.08	77.52	4.06	9.23	2.56	—	—	18.07	40.8	11.51	—	—				
	D.S.	4.52	6.6	6.01	7.6	5.07	—	—	2.56	3.2	2.28	—	—				
Talzo (18)	Media D.S.	16.55	77.6	3.37	9.4	1.91	—	—	—	—	—	—	—				
	D.S.	33.3	6.4	6.4	5.94	3.9	—	—	—	—	—	—	—				
Mudge (19)	Media D.S.	—	79.3	3.97	8.56	2.84	—	—	—	—	—	—	—				
	D.S.	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—				
Eliel (20)	Media D.S.	—	79.1	2.95	8.38	2.03	—	—	—	—	—	—	—				
	D.S.	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—				

	Por Kg. de (H2O)ic					Por Gr. de (NNC)c				
	Na mEq		K mEq	P mM	(NNC)c Gr.	Na mEq		K mEq	P mM	(H2O)ic Gr.
	Na mEq	(H2O)ic Gr.	K mEq	P mM	(NNC)c Gr.	Na mEq	K mEq	P mM	(H2O)ic Gr.	
Nosotros	Media D.S.	11.89	161.0	89.95	47.0	0.25	3.42	1.92	21.32	0.98
	D.S.	6.01	16.3	111.69	2.16	0.13	0.35	0.26	0.98	—
Barnes	Media D.S.	26.01	150.0	88.3	37.9	0.69	3.96	2.33	26.5	2.35
	D.S.	12.6	11.0	10.3	3.27	0.35	0.28	0.22	2.35	—
Wilson	Media D.S.	13.1	165.7	—	—	—	—	—	—	—
	D.S.	8.9	19.8	—	—	—	—	—	—	—
Talzo	Media D.S.	16.9	152.7	—	—	—	—	—	—	—
	D.S.	7.6	7.9	—	—	—	—	—	—	—

Los valores encontrados por otros autores y que aparecen en la tabla IX, en líneas generales, están más o menos de acuerdo con los nuestros, especialmente los de B. A. Barnes, cuya sistemática hemos seguido. Sin embargo, sus D.S. y C.V. tienden significativamente a ser más altos que los nuestros, lo cual se explica porque tomó muestras de músculo de diferentes regiones del organismo y en pacientes que padecían de gangrena diabética, cáncer o insuficiencia arterial. Obviamente, sus resultados, aparte de su variabilidad, no pueden ser calificados como normales.

Lorenzini, que analiza el mismo músculo que nosotros, encuentra algunas diferencias significativas entre los valores de hombres y mujeres. Para compararlos con los nuestros hemos tomado los correspondientes a mujeres, que los expresa por músculo desgrasado y que son muy similares a los nuestros.

CONCLUSIONES

El nitrógeno no colágeno verdadero que introducimos como base de referencia, está justificado por la considerable magnitud del nitrógeno no proteico, que introduce un factor de error en el cálculo del nitrógeno no colágeno. De otro lado, los coeficientes de variación de los elementos referidos a esta nueva base son similares a los obtenidos en los otros sistemas.

La cantidad de tejido colágeno contenido en el músculo recto anterior del abdomen es mínima, como se deduce de la similitud de los valores del nitrógeno no colágeno y nitrógeno total; sin embargo, las desviaciones standard y coeficiente de variación del nitrógeno no colágeno son bastante inferiores a los del nitrógeno total, lo que justifica la precipitación del tejido colágeno.

El cálculo del espacio extracelular, empleando la fórmula clásica del "espacio cloro", en el músculo normal, coincide con los hallados según el procedimiento reciente de Conway que hace intervenir en el cálculo los iones cloro y potasio, tanto intra como extracelulares. Esta observación abona a favor de la exactitud de nuestra técnica para la determinación del cloro en músculo y suero sanguíneo, y certifica la validez del "espacio cloro" como medida del espacio extracelular.

Las diferentes bases de referencia tienen significado fisiológico distinto, según el elemento básico tomado, y, por tanto, se complementan en el estudio integral de los constituyentes musculares. Además, la uniformidad de los coeficientes de variación a través de todos estos sis-

temas de referencia los hace igualmente satisfactorios en cuanto a su exactitud.

La corrección de los valores por grasa aceptada por todos los autores, también se hace evidente en nuestro trabajo, pues constituye el 9.18% del músculo total recto anterior del abdomen, y con un coeficiente de variación de 53.4 %. Un criterio similar justifica la corrección del nitrógeno no colágeno por el nitrógeno total de la sangre contenida en la muestra de músculo y que en nuestras determinaciones constituye el 9.4 % del nitrógeno no colágeno.

Dejamos establecido los valores normales del músculo, y recomendamos la selección del fragmento anatómico utilizado por nosotros, la tecnología química descrita, y el empleo del nitrógeno no colágeno corregido por la fracción no proteica como sistema de referencia, y que denominamos nitrógeno no colágeno verdadero.

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

1. Hostings, A. B., and Eichelberger, L.: The exchange of salt and water between muscle and blood. I. The effect of an increase in total body water produced by the intravenous injection of isotonic salt solutions. *J. Biol. Chem.*, 1937, 117, 73.
2. Darrow, D. C., Harrison, H. E., and Taffel, M., Tissue electrolytes in adrenal insufficiency. *J. Biol. Chem.* 1939, 130, 487-502.
3. Lilienthal, J. L., Jr., Zierler, K. L., Folk, B. P., Buka, R., and Riley, M. J.: A reference base and system for analysis of muscle constituents. *J. Biol. Chem.*, 1950, 182, 501.
4. Barnes, B. A., Gordon, E. B., Cope, O., Skeletal muscle analysis in health and in certain metabolic disorders. I. The method of analysis and the values in normal muscle. *J. Clin. Invest.* 1957, 36, 1239.
5. Lowry, O. H., and Hastings, A. B.: Histochemical changes associated with aging. *J. Biol. Chem.*, 1942, 1943, 257.
6. Conway, E. G., *Microdiffusion analysis and the volumetric error.* London, Crosby Locked & Ltda., 1950.
7. Fiske, C. H. and Subbarrow, Y.: The colorimetric determination of phosphorus. *J. Biol. Chem.*, 1925, 66, 375.
8. Barnes, R. B., Richardson, D., Berry, J. W., and Hood, R. L., *Ind. and Eng. Chem., Anal., Ed.*, 17, 605, 1945.
9. Hawk, Ph., B., B. L.: Oser and W. H. Summerson, *Practical Physiological Chemistry.* XIII. Edit. The Blakiston Company, Inc. New York, 1954.
10. Keys, A.: The microdetermination of chlorides in biological materials. *J. Biol. Chem.*, 1937, 119, 389-403.
11. Conway, E. J., Nature and significance of concentration relations of potassium and sodium ions in skeletal muscle. *Physiol. Rev.* 1957, 37, 84.
12. Hurtado, A.: Métodos estadísticos. *An. Fac. Med., Lima*, 1945, 28, 125.
13. Waugh, A. E.: *Elements of statistical method.* Mc Graw Hill Book Company Inc. New York, 1952.

14. Wilde, W. S.: The chloride equilibrium in muscle. *Am. J. Physiol.* 1945, 143, 66.
15. Mokotoff, R., Ross, G., and Leiter, L.: The electrolyte content of skeletal muscle in congestive heart failure: A comparison of results with inulin and chloride as reference standards for extracellular water. *J. Clin. Invest.*, 1952, 31, 291-299.
16. Lorenzini, L.: Contenuto in acqua, potassio, sodio, cloro e fosforo del muscolo scheletrico umano normale, 1959, 109, 619.
17. Wilson, A. O.: Electrolyte content of muscle samples obtained at surgical operation. *Brit. J. Surg.* 1955, 43, 71.
18. Talso, P. J., Spafford, N., and Blaw, M.: The metabolism of water and electrolytes in heart failure. I. The electrolyte and water content of normal skeletal muscle, *J. Lab. & Clin. Med.* 1953, 281, 41.
19. Mudge, G. H., and Vislocky, K., Electrolyte changes in human striated muscle in acidosis and alkalosis. *J. Clin. Invest.* 1949, 28, 482.
20. Eliel, L. P., Hellmon, L., Pearson, O. H., and Katz, B., The effects of ACTH on the electrolyte content of various body tissues, in *proceedings of the Second Clinical ACTH Conference*, edited by Mote, J. R., The Blakiston Co., New York, 1951, Vol. I, p. 196.