

22  
24



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTONOMA DE MEXICO



Facultad de Estudios  
Superiores Cuautitlán

FALLA DE ORIGEN

OBTENCION DE VALORES DE REFERENCIA DE ASPARTATO  
AMINOTRANSFERASA (AST) POR TRES METODOS DIFERENTES  
EN SUERO DE DONADORES CLINICAMENTE SANOS.

T E S I S  
Que para obtener el Título de  
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA  
p r e s e n t a  
MARIA ESTHER JONAPA MEGCHUN

Director de Tesis:  
Q. B. P. Antonio Sánchez Ortega

Cuautitlán Izcalli, Edo. Méx.

1991



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

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

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

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

## INDICE GENERAL

### INDICE DE TABLAS Y FIGURAS

### ABREVIATURAS

### RESUMEN

	Hoja
I. INTRODUCCION .....	1
II. GENERALIDADES .....	4
II.1. Enzimas e Importancia Biológica	
II.1.1. Definición, Nomenclatura y Clasificación...	4
II.1.2. Cinética Enzimática .....	7
II.1.3. Importancia Biológica .....	10
II.2. L-Aspartato:2-oxoglutarato aminotransferasa (AST)..	13
II.2.1. Propiedades Físico-Químicas de la enzima...	13
II.2.2. Reacción que cataliza la enzima .....	16
II.2.3. Importancia Clínica .....	23
II.2.4. Fundamentos Teóricos de la Determinación de actividad de AST .....	35
III. OBJETIVOS .....	37
IV. MATERIALES Y METODOS .....	38
IV.1. Materiales	
IV.1.1. Material Biológico .....	38
IV.1.2. Material Químico .....	39
IV.2. Métodos .....	41
IV.2.1. Procedimientos .....	41
IV.2.2. Cálculo de Actividad Enzimática .....	43

V. RESULTADOS .....	44
V.1. Tabulación de Datos .....	44
V.2. Análisis Estadístico .....	49
V.2.1. Valores de Referencia .....	49
V.2.2. Comparación de Métodos .....	51
V.2.3. Control de Calidad .....	53
VI. DISCUSION .....	58
VII. CONCLUSIONES .....	64
VIII. REFERENCIAS .....	66

## INDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Hoja

TABLA 1:	Clasificación internacional de las enzimas .....	6
TABLA 2:	Distribución y actividad de AST en tejidos humanos ...	25
TABLA 3:	Padecimientos en que AST aumenta su nivel sérico .....	27
TABLA 4:	Contenido de c/u de los tres sistemas reactivos .....	41
TABLA 5:	Características de Determinación de actividad de AST..	42
TABLA 6:	Factores de conversión de los 3 procedimientos usados en la determinación de actividad de AST en suero.....	43
TABLA 7:	Distribución de frecuencias de AST en U/L obtenidas por cada procedimiento en 115 hombres .....	44
TABLA 8:	Distribución de frecuencias de AST en U/L obtenidas por cada procedimiento en 30 mujeres .....	45
TABLA 9:	Niveles de actividad promedio de AST en U/L agrupados en bloques de acuerdo a la edad de 115 ♂ donadores....	45
TABLA 10:	Niveles de actividad promedio de AST en U/L agrupados en bloques de acuerdo a la edad de 30 ♀ donadoras ....	49
TABLA 11:	Obtención de percentiles como límites de actividad normal en ♂ y ♀ para cada procedimiento empleado.....	50
TABLA 12:	Valores de Referencia de AST en ♂ y ♀ a 25°C .....	50
TABLA 13:	ANDEVA para el experimento aleatorizado de una vía en la comparación de 3 métodos con n = 115 ♂.....	51
TABLA 14:	ANDEVA para el experimento aleatorizado de una vía en la comparación de 3 métodos con n = 30 ♀ .....	51
TABLA 15:	ANDEVA para comparar edades con el promedio de AST en U/L obtenido por 3 métodos en 115 hombres .....	52
TABLA 16:	ANDEVA para comparar edades con el promedio de AST en U/L obtenido por tres métodos en 30 mujeres .....	52
TABLA 17:	Variables de la ecuación representativa de cada posi- ble interacción entre métodos usados con n = 145 .....	53
TABLA 18:	Valores de AST en el suero Control de Gilford obteni- dos en 19 días no consecutivos de trabajo por 3 méto- dos diferentes .....	54

Fig. 1:	Diagrama del cambio de energía libre de activación en el curso de reacciones químicas catalizadas y no cat. .	7
Fig. 2:	Etapas intermedias de la reacción de Transaminación....	16
Fig. 3:	Piridoxina y estructuras coenzimáticas .....	17
Fig. 4:	Formas de enlace Enzima-Coenzima y Sustrato-Coenzima...	18
Fig. 5:	Tautomerismo e Hidrólisis durante la Transaminación....	19
Fig. 6:	Espectro de Absorción de $NAD^+$ y $NADH$ .....	20
Fig. 7:	Estructura de $NAD^+$ y $NADP^+$ .....	21
Fig. 8:	Cambio estructural de Nicotiramida por Redox .....	21
Fig. 9:	Flujo global de N en catabolismo de AA en mamíferos....	23
Fig. 10:	Transaminación en Vías anapleróticas de Ciclo de Krebs.	24
Fig. 11:	Perfil enzimático en suero durante Infarto Cardíaco....	28
Fig. 12:	Curva de actividad sérica de AST durante Reinfarto ....	29
Fig. 13:	Actividad sérica de AST y ALT en Hepatitis aguda .....	31
Fig. 14:	Actividad sérica de AST y ALT en Infarto del Miocardio.	31
Fig. 15:	Histograma que relaciona frecuencias vs actividad en suero de AST dada en U/L .....	46
Fig. 16:	Histograma que relaciona la distribución de frecuencias en grupos de edades de los donadores .....	46
Fig. 17:	Distribución geográfica de la muestra poblacional .....	48
Fig. 18:	Gráfica de Correlación de los niveles de actividad de AST determinados por los métodos Abbott y Beckman .....	55
Fig. 19:	Gráfica de Correlación de los niveles de actividad de AST determinados por los métodos Beckman y Gilford .....	55
Fig. 20:	Gráfica de Correlación de los niveles de actividad de AST determinados por los métodos Abbott y Gilford .....	56
Fig. 21:	Gráfica de Control de Calidad de la determinación de AST en el suero Control por el método Abbott .....	56
Fig. 22:	Gráfica de Control de Calidad de la determinación de AST en el Suero Control por el método Beckman .....	57
Fig. 23:	Gráfica de Control de Calidad de la determinación de AST en el Suero Control por el método Gilford .....	57

## ABREVIATURAS

A <sup>365</sup>	Absorbancia a 365 nm	♂	Hombre, masculino
ΔA	Variación de absorbancia	♀	Mujer, femenino
E	Absortividad molar	D	Dalton (10 <sup>-10</sup> g)
AA	Aminoácido	°C	Grados centígrados
ALT	Alanin-aminotransferasa°	l	Litro
AST	Aspartato-aminotransferasa'	ml	Mililitro 10 <sup>-3</sup> l
ATP	Adenosin-trifosfato	μl	Micro litro 10 <sup>-6</sup> l
CX	Creatinincinasa	μmol	Micromol 10 <sup>-6</sup> mol
CK-MB	Fracción MB de creatinincinasa	mmol	Milimol 10 <sup>-3</sup> mol
FA	Fosfatasa alcalina	min	Minuto
GDH	Glucosa deshidrogenasa	mm	Manometro 10 <sup>-9</sup> m
GOT	Gamma-glutamil transferasa	rpm	Revolución por minuto
GLDH	Glutamato deshidrogenasa	UI	Unidad Internacional
HBDB	Hidroxibutirico deshidrogenasa	U/L	Unidad por litro
LAP	Leucin-aminopeptidasa	C	Carbono
LDH	Lactato deshidrogenasa	CO <sub>2</sub>	Dioxido de carbono
MDH	Malato deshidrogenasa	H	Hidrógeno
NAD	Nicotinamida-dinucleotido oxidado	N	Nitrógeno
NADH	NAD reducido	NH <sub>2</sub>	Amina
NADP	NAD fosforilado	NH <sub>3</sub>	Amoníaco
PPAL	Fosfato de piridoxal	PO <sub>3</sub>	Fosfato
TGO	Transaminasa glutámico oxalacética'	SH	Tiol
TGP	Transaminasa glutámico piruvica°		
pH	Potencial de Hidrógeno		
pK	Potencial de acides y disociación		
K <sub>m</sub>	Constante de Michaelis-Menden		
ΔG	Variación de energía libre		
LC	Límite de control		
λ	Longitud de onda		
UV	Ultravioleta		

## RESUMEN

Por medio de espectrofotometría UV se determinó la actividad sérica de AST en una población aleatoria de personas clínicamente sanas y que presentan una distribución geográfica condensada en el área norte de la Ciudad y el Estado de México.

Se obtuvieron 120 muestras de hombres y 30 muestras de mujeres en las que se determinó la actividad de AST con los métodos enzimáticos manufacturados por los Laboratorios Abbott, Beckman y Gilford, todos con el mismo fundamento de reacción.

Se estimaron los percentiles  $P_{2.5\%}$  y  $P_{97.5\%}$  para obtener los Valores de Referencia que limitan la zona de normalidad de la población, con un intervalo de confianza del 95%.

El rango promedio de actividad para hombres fue de 10-29 U/L y para el grupo de mujeres de 6-23 U/L, aunque se especifican los rangos para cada método. Estos valores son útiles para establecer el diagnóstico diferencial de Infarto del Miocardio.

Con ayuda de una prueba de hipótesis se compararon entre sí los métodos de análisis, no estimándose diferencias estadísticamente significativas entre las medias de población con respecto a niveles de actividad, aunque el análisis de correlación entre los mismos demuestra dispersión de valores con coeficientes de correlación  $r$  menores a 0.9000.

A la vez, se trató de encontrar alguna relación entre dichos niveles de actividad y la edad de las personas rechazándose la hipótesis de diferencia.

Mediante una gráfica de control de Shewart se dió confiabilidad al estudio al no demostrarse valores de actividad de AST fuera de los límites de control establecidos con un suero control de Gilford.

Obtener los valores de referencia de una población específica contribuye al aumento de sensibilidad del diagnóstico diferencial en un grupo de padecimientos de dicha población siempre y cuando las estimaciones se aproximen a los valores reales.

## I. INTRODUCCION

En la actualidad el análisis de enzimas representa aproximadamente un 20 por ciento de la carga total de trabajo en un laboratorio hospitalario de análisis clínicos y pueden cuantificarse de rutina a siete de ellas: Aspartato aminotransferasa, Alanina aminotransferasa, Lactato deshidrogenasa, Creatininas, Fosfatasa alcalina, Amilasa y Lipasa. Es entonces necesario establecer cierto control de calidad y esta distinción en cada laboratorio a fin de dar mayor reproducibilidad y confiabilidad a los resultados. Toda técnica debe poseer fiabilidad y robustez, esto es, poder conservar su exactitud y precisión en el futuro sin que la afecten pequeñas variaciones para evitar diferencias entre resultados obtenidos por laboratorios diferentes a partir de una técnica aparentemente idéntica (12).

Los productores de equipos comerciales para determinaciones enzimáticas ofrecen el reactivo preestandarizado en el sitio de fabricación y todos ellos recomiendan que cada laboratorio establezca sus propios Valores de Referencia basados en la población específica atendida por el mismo, debida a la variabilidad biológica y otros factores. De dicha recomendación se deriva el presente trabajo, en donde a partir de muestras de suero obtenidas por centrifugación de más o menos 5 ml de sangre venosa de 150 adultos sanos (120 hombres y 30 mujeres) con rango de edad entre 18 y 49 años, y habitantes del norte de la ciudad de México y área metropolitana, se determinó la actividad de AST con tres kits diferentes de reactivo manufacturados por los Laboratorios Abbott, Beckman y Gilford.

El método de referencia general para la determinación de actividad enzimática es la espectrofotometría UV introducida por Arthur Karmen en 1954, mismo que se basa en la medida indirecta de un producto de la reacción catalizada (19).

La Aspartato aminotransferasa AST o TGO (EC 2.6.1.1) interviene en la reacción de transferencia del Nitrógeno amino de L-aspartato hacia el grupo carbonilo de 2-oxoglutarato, produciendo L-glutamato y oxalacetato, éste último se asocia a una reacción secundaria en donde la deshidrogenasa málica (MDH) cataliza su reducción con la oxidación simultánea de NADH a NAD (Nicotinamida-Adenin-Dinucleótido). Esta reacción de oxidación produce una disminución de la absorbancia a 365 nm proporcional a la velocidad de reacción expresada como actividad enzimática en términos de Unidades Internacionales por litro de suero (U/L), equivalente a la cantidad de enzima que catalizará la reacción de 1  $\mu$ mol de sustrato por minuto en condiciones específicas de temperatura, pH y concentración de sustrato (34, 35).

La estadística es un campo de estudio referente a la organización y el resumen de los datos y a la extracción de inferencias acerca de un grupo de los mismos cuando solo se observa una parte de ellos (2).

Es fundamental que una muestra sea representativa de la población de donde ha sido extraída, y esto implica seleccionarla aleatoriamente asegurando que todo elemento de la población tenga igual probabilidad de ser incluido (3).

La aplicación de técnicas estadísticas en biología utiliza el concepto de la curva gaussiana, normal o en forma de campana simétrica para la distribución de valores en una muestra, y en base a ella se clasifica a los métodos para obtener valores de referencia en Paramétricos o normales y No paramétricos. Debido a que la mayoría de las muestras de las poblaciones consideradas para hacer estudios biológicos presentan una distribución asimétrica con sesgo hacia la derecha, se prefieren estimaciones de zonas normales y valores de referencia realizadas por métodos estadísticos No paramétricos como la estimación de percentiles, ya que no suponen distribución alguna de la población (3, 28, 30).

Los límites normales de una determinación pueden calcularse con fines descriptivos o discriminativos; un Clínico se interesa en ellos para diagnosticar correctamente a un individuo como sano o enfermo(12).

Por medio de pruebas de hipótesis y de correlación se compararon los métodos empleados en la determinación enzimática para establecer si existen diferencias significativas entre ellos, y si los niveles de actividad se ven afectados por la edad. Además se estableció una gráfica de control de Calidad durante el proceso en varios días de trabajo.

La actividad catalítica de ciertas enzimas intracelulares puede — cambiar en algunas enfermedades al ser liberadas a la circulación sanguínea ya sea por daño celular, cambio de permeabilidad por afección patológica o por lisis celular (29)

La AST es una enzima particularmente activa en músculo cardíaco, — aunque se encuentra distribuida en varios tejidos humanos (1). Por — ello, la utilidad clínica más frecuente de su determinación es la contribución al perfil enzimático característico basado en las zonas de normalidad de la población, y que ayuda a establecer el diagnóstico diferencial de Infarto del miocardio, padecimiento que ha ocrado — importancia durante los últimos años debido al ritmo urbano de vida, sobre todo en una ciudad como el Distrito Federal.

## II. GENERALIDADES

### II.1. Enzimas e Importancia Biológica

#### II.1.1. Definición, Nomenclatura y Clasificación

Desde 1835 se realizaron los primeros reportes sobre sustancias orgánicas que catalizaban reacciones con mayor eficiencia que algunos reactivos inorgánicos, y fué en 1877 cuando dichas sustancias se definieron como Enzimas. Ahora sabemos que las enzimas son proteínas específicas que llevan a cabo las reacciones químicas en los sistemas biológicos, por tanto, son biomoléculas notables debido a su alta especificidad y poder catalítico, es decir, solo aumentan la velocidad de reacción sin intervenir en el equilibrio entre productos específicos y sustancias reaccionantes (21,35).

Las enzimas se clasifican en base a la reacción que catalizan. Era costumbre designarlas por el nombre del sustrato o grupo sobre el que ejerce acción catalítica añadiendo el sufijo asa. Por ejemplo, la ureasa que hidroliza la urea, amilasa actúa sobre almidón, fosfatasa actúa sobre ácidos fosfóricos etc. Otras veces se menciona a la reacción que involucra su acción como anhidrasa carbónica, deshidrogenasa succínica etc. Sin embargo, esta nomenclatura ha ocasionado nombres espíricos que químicamente dan poca información como pepsina, tripsina y catalasa (35). Debido al rápido crecimiento en el descubrimiento de nuevas enzimas y el estado caótico de su estandarización, durante el tercer congreso internacional de bioquímica en Bruselas en agosto de 1955, la Asamblea General de la Unión Internacional de Bioquímica (IUB) decidió establecer una Comisión internacional sobre Enzimas en consultación con la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC). Las propuestas fueron publicadas en 1964 y en 1977 se computarizó encontrándose como card index en la universidad Macquarie de Sydney (4, 17).

Los principios generales permiten para cada enzima dos nombres, - uno práctico o de trabajo y uno sistemático que describe la naturaleza de la reacción catalizada, en base a lo que son divididas en subgrupos, además de una designación numérica de cuatro dígitos separados por puntos, útil cuando se quiere identificar totalmente a la enzima como en revistas de investigación, índices o resúmenes.

La subdivisión agrupa a las enzimas en seis clases: 1. oxidoreductasas, 2. transferasas, 3. hidrolasas, 4. liasas, 5. isomerasas, 6. ligasas; y para cada una se describen subclases de acuerdo al grupo químico sobre el que actúan y al tipo de aceptor, tal y como se enlistan en la tabla 1 (17).

**E j e m p l o :**

Nombre trivial: Transaminasa Glutámico Oxalacética (TGO)

Nombre sistemático: L-Aspartato:2-oxoglutarato Aminotransferasa (AST)

Clave numérica: EC 2.6.1.1

**D o n d e :**

EC: prefijo establecido por la Comisión de Enzimas

- i) el primer número representa a cual de las seis clases pertenece  
2 = Transferasas
- ii) el segundo número indica la subclase o grupo químico de acción  
6 = Transferencia de grupos nitrogenados
- iii) el tercero da la sub-subclase y representa el tipo de aceptor  
1 = Aminotransferasas
- iv) el cuarto es el número de serie en la sub-subclase  
1 = Aspartato

**TABLA 1: Clasificación Internacional de las Enzimas (Denominación de clases, número de código y tipo de reacción catalizada)(21)**

- 
1. OXIDO - REDUCTASAS (Reacciones de óxido-reducción)
    - 1.1 Actúan sobre  $>CH-OH$
    - 1.2 Actúan sobre  $>C=O$
    - 1.3 Actúan sobre  $>C=CH-$
    - 1.4 Actúan sobre  $>CH-NH_2$
    - 1.5 Actúan sobre  $>CH-NH-$
    - 1.6 Actúan sobre  $NADH$  ;  $NADPH$
  
  2. TRANSFERASAS (Transferencia de grupos funcionales)
    - 2.1 Grupos de un átomo de Carbono
    - 2.2 Grupos aldehídicos y cetónicos
    - 2.3 Grupos acilos
    - 2.4 Grupos glucósido
    - 2.5 Grupos alquilo
    - 2.6 Grupos nitrogenados
      - 2.6.1 Aminotransferasas (1.Aspartato; 2.Alanina)
    - 2.7 Grupos que contienen Fósforo
    - 2.8 Grupos que contienen Azufre
  
  3. HIDROLASAS (Reacciones de hidrólisis de: )
    - 3.1 Esteros
    - 3.2 Enlaces glucosídicos
    - 3.4 Enlaces peptídicos
    - 3.5 Otros enlaces C-N
    - 3.6 Anhídridos de ácido
  
  4. LIASAS (Adición a los dobles enlaces)
    - 4.1  $>C=C<$
    - 4.2  $>C=O$
    - 4.3  $>C=N-$
  
  5. ISOMERASAS (Reacciones de isomerización)
    - 5.1 Rncemasas
  
  6. LIGASAS (Formación de enlaces con escisión de ATP)
    - 6.1 C-O
    - 6.2 C-S
    - 6.3 C-N
    - 6.4 C-C
-

### II.1.2. Cinética Enzimática

#### Energía Libre de Activación o de Gibbs ( $\Delta G$ ).

Es el potencial químico o cantidad de energía necesaria para llevar todas las moléculas de un mol de sustancia a una temperatura dada, al estado de transición en la cima de la barrera de activación en donde es muy elevada la probabilidad de que se establezca o se rompa un enlace químico para formar el producto P; es el límite entre reaccionantes y productos. Los catalizadores se combinan con los reaccionantes momentáneamente en un estado de transición de menor energía de activación que el correspondiente a la reacción no catalizada. Así, los catalizadores aceleran las reacciones químicas porque disminuyen la energía de activación como se aprecia en la figura uno. (21).

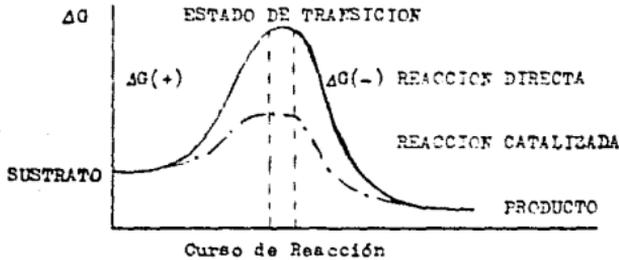


fig. 1: Diagrama del cambio de energía libre de activación ( $\Delta G$ ) en el curso de reacciones químicas catalizadas y no catalizadas (21).

#### Clasificación de Reacciones Químicas.

Las reacciones son transformaciones químicas donde una o más sustancias se convierten en otra u otras, completamente diferentes, sin transformar ningún elemento en otro (21). Se clasifican en base a el número de moléculas reaccionantes en monomoleculares, bimoleculares

o trimoleculares. También pueden clasificarse sobre una base cinética por el orden de reacción, de acuerdo a la influencia de la concentración de los reaccionantes sobre la velocidad de reacción bajo un conjunto de condiciones definidas (35).

Las reacciones de primer orden son aquellas que se realizan a una velocidad exactamente proporcional a la concentración de un reaccionante; las de segundo orden son aquellas cuya velocidad es proporcional a el producto de la concentración de dos reaccionantes o a la segunda potencia de uno de los reaccionantes; las de tercer orden son relativamente escasas y son aquellas cuya velocidad es proporcional a el producto de tres términos de concentración; finalmente las reacciones de orden cero son independientes de la concentración de cualquier reactivo. Muchas reacciones catalizadas son de orden cero, el sustrato está presente en gran exceso y la velocidad de reacción es constante con el tiempo y depende de la concentración de la enzima u otro factor distinto a la concentración de reactivos (21).

#### Reacciones Enzimáticas

Presentan los principios generales de la cinética de todas las reacciones químicas además del efecto de saturación con el sustrato - cuya concentración eleva de manera proporcional la velocidad de reacción hasta alcanzar un punto en que se independicen. Todas las enzimas muestran el efecto de saturación, pero varían ampliamente con respecto a la concentración de sustrato requerida para que se manifieste (13;7).

La teoría de Michaelis-Menten es fundamental para el análisis cuantitativo de la cinética enzimática. Supone que la enzima E se combina en primer lugar con el sustrato S para formar el complejo enzima-sustrato, y éste último se separa en una segunda etapa para formar enzima libre y producto P. Las reacciones son reversibles y las constantes de velocidad para las reacciones directa e inversa poseen un subíndice positivo y otro negativo respectivamente (2).



El complejo ES es una forma de estado activado con bajo requerimiento de energía de activación. La ecuación de Michaelis-Menten es la ecuación de la velocidad que relaciona cuantitativamente la velocidad inicial de reacción, la concentración del sustrato ( $E_m$ ) y la velocidad máxima de una enzima. La constante de Michaelis es igual a la concentración de sustrato en la que la velocidad inicial de la reacción es la mitad de la velocidad máxima; es una magnitud determinada experimentalmente y definida operativamente, útil en la determinación cuantitativa de la actividad enzimática en los tejidos y la purificación de la enzima. No es la constante de disociación del complejo ES. En condiciones intracelulares, las enzimas no se hallan necesariamente saturadas por sustrato. Las velocidades de todas las reacciones químicas están dirigidas por la concentración y no por las cantidades absolutas de reaccionantes, así, la velocidad máxima varía de una enzima a otra por la concentración de enzima, la estructura del sustrato, el pH y la temperatura (12,7).

#### Concentración de Ión Hidrógeno (pH)

En las reacciones enzimáticas se observa que a ciertos intervalos de pH no ocurre reacción y existen diferentes grados de reacción en otros valores de pH. El valor óptimo de pH en una reacción depende de una serie de factores como la estructura de la enzima que se ve afectada por el ambiente iónico provocado por amortiguadores, el grado de disociación y el grado de desnaturalización. Los amortiguadores deben ser capaces de contrarrestar los cambios de pH y su pK debe estar dentro de una unidad de pH, o cerca del pH óptimo del sistema enzimático. Los análisis de enzimas se realizan a pH óptimo por la máxima sensibilidad de la prueba y porque las variaciones afectan en lo mínimo a la actividad de la enzima (35).

## Temperatura

La velocidad de reacción aumenta en forma directamente proporcional a el aumento de temperatura en el sistema, en la mayoría, un incremento de temperatura de 10°C aproximadamente duplica la velocidad de reacción. Las enzimas se desnaturalizan en su mayoría por arriba de 40 a 45°C, por ello los preparados muy purificados son inestables. En las determinaciones espectrofotométricas la iluminación continua calienta los compartimentos de las cubetas o celdillas de reacción - llegando hasta 30-32°C por lo que se han ideado procedimientos a esa temperatura (12).

## Concentración de Sustrato

A bajas concentraciones de sustrato la velocidad de reacción se - vé aumentada en forma lineal al aumento del mismo, aunque solo puede asociarse una pequeña fracción de enzima. No puede utilizarse la con centración óptima del sustrato cuando no es completamente soluble o cuando su concentración inhibirá a otra enzima. En la práctica real, los valores son más exactos si no ha reaccionado más del 20 por cien to del sustrato. Se puede decir que el rendimiento de las reacciones enzimáticas depende del control de estos tres factores así como del volumen y tiempo de reacción (12).

## II.1.3. Importancia Biológica

### Actividad Enzimática

Teniendo en cuenta que las enzimas son proteínas, el resultado de be expresarse en unidades de peso (gramos o miligramos). Deben ais- larse las moléculas enzimáticas y ser evaluadas por métodos químicos para proteínas. En algunos casos pueden emplearse anticuerpos especí- ficos para determinar la concentración de la enzima pero también es- tas son técnicas realmente complicadas (4). Por ello, las enzimas se determinan por su actividad más que en función de su concentración,

porque existen en cantidades muy pequeñas en los líquidos biológicos y tienen una gran semejanza química (6).

La actividad enzimática es la función de la enzima, es decir, su capacidad para catalizar determinadas reacciones químicas, entonces la velocidad de reacción es la medida de actividad que puede relacionarse con la cantidad de enzima (35).

En Química Clínica se recomienda referir a las actividades enzimáticas en líquidos corporales, principalmente en suero o plasma al volumen de un litro (12).

La actividad de algunas enzimas depende de uno o más componentes dializables y acuosolubles llamados cofactores que pueden ser un ion metálico o una molécula orgánica denominada coenzima, unida a la estructura protéica llamada apoenzima que por sí sola es inactiva. El complejo enzima-cofactor catalíticamente activo se llama holoenzima. Las coenzimas actúan por lo general, como transportadores intermedios de grupos funcionales, de átomos específicos o de electrones, - los cuales son transferidos en la reacción enzimática global, por lo tanto participan activamente en la reacción y contienen en su estructura una molécula de alguna de las vitaminas (10,21).

#### Inhibición Enzimática

El término se refiere a pérdida de actividad como consecuencia de la acción de agentes químicos sobre la enzima, a diferencia de la desnaturalización que es consecuencia de un proceso físico. Los agentes inhibidores pueden ser competitivos, acompetitivos o no competitivos según compitan por el sustrato al unirse a la enzima libre, al complejo enzima-sustrato, o con ambos, de manera reversible formando un complejo enzima-inhibidor. Los inhibidores irreversibles producen una modificación química permanente de algún grupo funcional esencial en la enzima (21). En la determinación de actividad enzimática, algunos fármacos actúan como inhibidores y es importante tenerlos en cuenta de estar presentes en las muestras biológicas (2).

### Determinación de Actividad Enzimática

La actividad enzimática puede determinarse midiendo el producto formado en la reacción o registrando el consumo de un sustrato transformado. De cualquier forma la medición puede realizarse por dos procedimientos: a) reacción en dos puntos y b) método cinético (12, 35, 38).

a) La reacción en dos puntos consiste en interrumpir la reacción enzimática después de un período de incubación de la enzima con el sustrato para medir la cantidad de sustrato no transformado o la cantidad de producto formado. La transformación enzimática es equivalente a la diferencia entre las concentraciones iniciales y finales del sustrato proporcionando una medida indirecta de la actividad. El inconveniente es que no permite la observación de la cinética enzimática y en casos de elevada actividad se puede producir caída de la misma por disminución de la concentración de sustrato o por la aparición de productos que ocasionalmente inhiben la reacción (29, 37).

b) El método cinético consiste en un monitoreo continuo del desarrollo de la reacción con ayuda de un aparato registrador. El tipo de curva puede leerse directamente y se requiere de un continuo perfil de reacción a través de cromógenos o indicadores de reacción (26, 37).

La determinación espectrofotométrica de la actividad enzimática permite seguir la cinética de reacción y esto lo hace el método de elección (12). En este caso los cálculos siguen la Ley de Beer que considera cuantitativamente el fenómeno de absorción al pasar un haz de luz monocromático a través de un medio de absorción y en donde la intensidad de la luz disminuye en proporción al número de moléculas o iones absorbentes en el paso de luz (26).

En base al principio de que la absorbancia de una disolución es directamente proporcional a la concentración de las especies absorbentes cuando se fija la longitud del paso de luz o a la inversa, en las mediciones espectrofotométricas se emplea la constante de proporcionalidad llamada absortividad molar  $E$  para calcular la actividad enzimática cuando la concentración se expresa en moles por litro (23).

## II.2. L-Aspartato: 2-oxoglutarato Aminotransferasa (AST)

### II.2.1. Propiedades Físico-Químicas de la Enzima

En los últimos años se ha demostrado la presencia de AST muy activa en organismos como animales de sangre caliente, plantas y varios microorganismos. La enzima de nuestro interés, plenamente identificada, presenta un mecanismo de reacción que involucra al PPAL como grupo prostético. La AST o TGO tiene gran especificidad para el aspartato y el oxalacetato como sustratos, a los que solo la cisteína y el oxomalonato son capaces de reemplazar, pero la actividad de la enzima decrece considerablemente (34).

AST es particularmente activa en músculo cardíaco, y en la mayoría de procedimientos de purificación de la enzima el corazón de cerdo - se usa como fuente útil de material. Se ha reconocido que extractos crudos de miocardio picado, hígado u otro tejido animal contienen a las dos fracciones mayores de proteínas que dan actividad a AST, las cuales difieren en movilidad electroforética, en otras características físicas, bioquímicas, funcionales, localización celular y propiedades inmunológicas. Se cree en general que la estructura del centro activo es idéntica o al menos semejante (8).

Fue Wroblewski quien propuso designar a proteínas diferentes de un mismo individuo que presentan actividad similar como isoenzimas (35).

La AST aniónica o del sobrenadante está contenida en el citosol de células animales, mientras que la enzima mitocondrial o cationica está localizada en la mitocondria y es liberada en forma soluble al ser desintegrados esos organelos por congelamiento y descongelamiento o por otros medios (34). Las dos isoenzimas difieren en su pH de trabajo óptimo, su afinidad al sustrato y sus propiedades inmunológicas. Los valores de  $K_m$  de AST de corazón de cerdo se reportan en - buffer de pirofosfatos 0.1 M a pH 8.0; la AST mitocondrial a 25°C - tiene  $K_{asp} = 2.8$  y  $K_{glu} = 12.4$  mientras que la AST de citosol a 20°C -

presenta  $K_{asp} = 4.0$  y  $K_{glu} = 14.0$ . La AST mitocondrial es más estable al calor, es inhibida por el fosfato inorgánico y se elimina de la sangre mucho más rápido que la AST de citosol (34). Ambas difieren en función metabólica y mecanismo de regulación así como en características ópticas de las subformas de AST de citosol (32).

Martínez-Carrión y Telemier demostraron que las isoenzimas de AST de corazón de cerdo están constituidas por dos cadenas polipeptídicas de peso molecular semejante (cerca de 100 000 D), pero difieren en su composición de aminoácidos por lo que se presentan como dos proteínas diferentes después de una digestión con tripsina ya que el aminoácido N-terminal de la AST de citosol es alanina, mientras que en la mitocondrial es serina (4,34). A pesar de todo, ambas enzimas tienen propiedades catalíticas similares (35). Estos autores aislaron también tres importantes subfracciones de proteína designadas  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  en orden de mayor movilidad anódica. La actividad catalítica específica es mayor en  $\alpha$ , menor en  $\beta$  y mucho menor en  $\gamma$  (34).

Marino et al. lograron separar cinco fracciones por electroforesis anfótera. Las subformas no difieren significativamente en tamaño molecular, estructura primaria y procedimientos de inmunoprecipitación; la principal diferencia visible entre ellas está en el modo de enlace de la coenzima a la apoenzima posiblemente por subformas conformacionalmente diferentes. Para estandarizar mediciones cuantitativas de parámetros cinéticos y ópticos de la enzima en la mayoría de investigaciones químicas o espectroscópicas, son adecuadas preparaciones homogéneas de la subforma  $\alpha$ , que es la más activa y menos ácida (34).

Fasella et al. detectaron subformas adicionales en AST de corazón de cerdo fraccionando por cromatografía de intercambio iónico, caracterizadas como glicoproteínas con desigual contenido de carbohidratos y actividad catalítica variable (32). Polyanovsky y Denisova estudiaron la composición y suma relativa de carbohidratos constituyentes y ácido siálico por procedimientos colorimétricos convencionales, observando que un menor contenido de azúcares aminos y ácido siálico favorecen la actividad enzimática de la subforma  $\alpha$  (34).

Mapeos peptídicos de la enzima indican que la AST sobreradante y la isoenzima mitocondrial son ambas dímeros, cada una formada por dos subunidades idénticas de proteína. A partir de la secuencia de aminoácidos completa se calculó el peso molecular de la holoenzima dimerica en 93250 D, reportado por Braunstein y asociados (34).

Algunos grupos funcionales de la apoenzima son considerados de importancia en la actividad catalítica o al menos están situados estratégicamente en el centro activo de la misma, tales como el grupo  $\epsilon$ -amino de lisina que es el sitio de unión con la coenzima mediante un enlace aldimina como se ilustra en la figura 6, y que también puede funcionar como aceptor de protón en la transición aldimina-cetimina; los grupos imidazol de histidina son más adecuados para esta última función, la de aceptar el átomo  $\alpha$ -Hidrógeno del amino sustrato en la interconversión aldimina-cetimina, también participan en el ataje de los  $\alpha$ -carboxil de los sustratos; los grupos fenólicos de tirosina aportan el hidroxilo que se enlaza al Nitrógeno de piridina de la coenzima, la posible nitración de este grupo en el proceso catalítico puede transformar la función del centro activo; los grupos tiol SH de cisteína disminuyen la rigidez de la estructura molecular a través de enlaces disulfuro, en la enzima mitocondrial ninguno de los cinco grupos SE expuestos es esencial en la catálisis pero en la enzima de citosol puede ser de importancia crítica en la actividad a consecuencia de su proximidad estérica al sitio activo; por último, los grupos  $\beta$ -OH de treonina o serina pueden inhibirse por reducción y entonces el enlace éster fosfato de la coenzima tiende a enlazarse al sitio activo provocando la formación de un complejo irreversible inactivado con el sustrato (34,37).

La Topografía o representación gráfica de la estructura del centro activo de las enzimas puede estudiarse mediante la determinación de especificidad de sustratos, utilizando reactivos químicos específicos, por marcaje de afinidad y mediante análisis de rayos-X de los complejos cristalizados enzima-sustrato o enzima-inhibidor (12).

## II.2.2. Reacción que cataliza la Enzima

### Bases Químicas

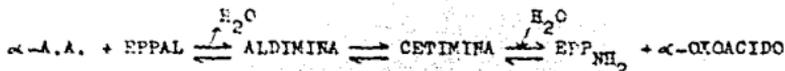
La reacción de transaminación que en resumen es un proceso de — transferencia del Nitrógeno amino de un aminoácido a un grupo carbonilo, asociado a una oxidación-reducción y catalizado por enzimas ligadas a PPAL, constituye un ejemplo de una reacción de doble desplazamiento (Que son reacciones biustrato en las que primero se debe realizar la unión de un sustrato a la enzima y transformarse en un producto que — se libera antes de la entrada del segundo sustrato y la salida del — segundo producto), por lo tanto muestra la correspondiente imagen cinética de ping-pong (21,35).

La estereoespecificidad caracteriza a muchas enzimas, así, las — transaminasas o aminotransferasas convierten en oxoácidos solamente a los isómeros L de los aminoácidos, y en su mayoría son específicas para el par  $\alpha$ -cetoglutarato: L-glutamato siendo menos rígida la especificidad para el otro par de sustratos (35).

Las reacciones de transaminación son libremente reversibles porque poseen una constante de equilibrio aproximadamente de 1.0, resultando en una reacción de biosíntesis de aminoácidos (12).

A continuación en la figura 2 se esquematiza la reacción total.

Una fase:



Reacción total:

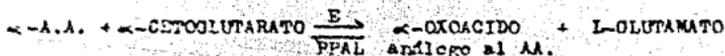
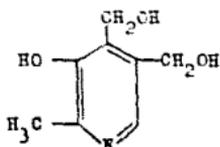


fig. 2: Etapas intermedias de la reacción de Transaminación (37).

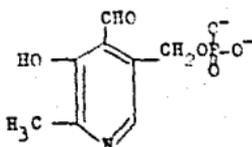
Algunos procesos de transferencia metabólica de  $\text{NH}_2$  pueden confundirse con la transaminación verdadera y pueden agruparse en dos categorías: los que difieren en el balance total de reacción y los que difieren en la naturaleza de pasos secuenciales e intermedios (34).

La reacción de transaminación fué primeramente demostrada en 1937 en músculo y otros tejidos animales; posteriormente se describió el papel del fosfato de piridoxal como cofactor de enzimas que catalizan reacciones de transaminación, algunas de las cuales difieren en especificidad de sustratos u origen biológico. Como se esquematiza en la figura 3, el fosfato de piridoxal (PPAL) procede de la piridoxina o vitamina  $\text{B}_6$ , y junto con el fosfato de piridoxamina constituyen formas coenzimáticas de la misma vitamina (21,37).

PIRIDOXINA (VIT  $\text{B}_6$ )



FOSFATO DE PIRIDOXAL



(P) DE PIRIDOXAMINA

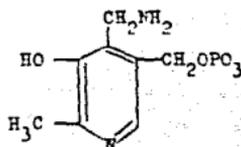


fig. 3: Piridoxina (Vitamina  $\text{B}_6$ ) y estructuras coenzimáticas (21).

Se han sintetizado análogos estructurales modificados y derivados de vitamina  $\text{B}_6$  y sus ésteres de fosfato, estudiando en detalle propiedades físicas y catalíticas vislumbrando los requerimientos estructurales (estérico y electrónico) para que se una a la enzima y los pasos secuenciales de la reacción. También se probaron sustratos análogos dilucidando la estereoespecificidad de la transaminación (21,29).

Snell y Braunstein propusieron que el fosfato de piridoxal funciona como coenzima por la capacidad de su grupo aldehído para reaccionar con el grupo  $\alpha$ -amino del aminoácido sustrato formando una base de Schiff entre el PPAL unido a la enzima y el aminoácido.

En ausencia de sustrato, el grupo aldehído del PPAL está unido y formando una base de Schiff con el grupo  $\epsilon$ -amino de un residuo específico de lisina en el centro activo de la enzima. Por lo tanto, cuando el aminoácido sustrato es reconocido por el sitio activo de la enzima, el grupo  $\alpha$ -amino de este aminoácido desplaza al grupo  $\epsilon$ -amino del residuo de lisina uniéndose al PPAL formando una nueva base de Schiff como se aprecia en la figura 4 (21,34,37).

La teoría de Snell y Braurstein es una teoría de potencialidad catalítica de la coenzima. Se requieren metales divalentes como cofactores y la porción proteica es importante en la alta eficiencia catalítica y especificidad de la enzima (21,32).

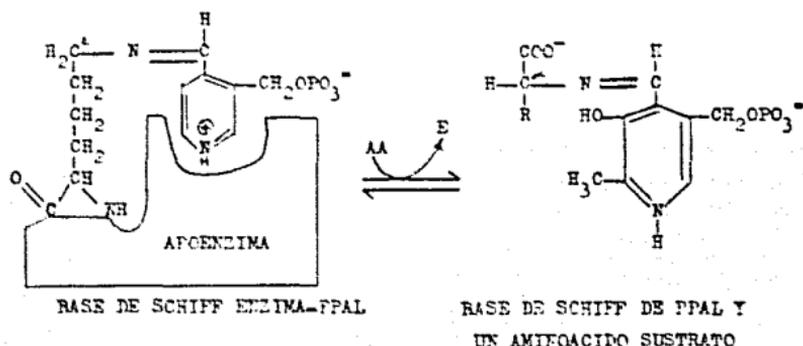


fig. 4 : Formas de enlace ENZIMA-COENZIMA y SUSTRATO-COENZIMA (21).

Las estructuras así formadas son Aldiminas, y durante la reacción la estructura sustrato-coenzima se tautomeriza para dar la Cetimina correspondiente, la cual es hidrolizada formando fosfato de piridoxamina y un  $\alpha$ -cetoácido libre. Hasta aquí se efectúa la mitad de la reacción y se ilustra en la figura 5 (21,34,37).

El fosfato de piridoxamina puede formar una base de Schiff con el  $\alpha$ -cetoácido entrante en la reacción al que cede el grupo amino por inversión de las etapas antes descritas recuperándose el PPAL. El

transporte de grupos amino desde un aminoácido hasta un crofido se realiza por el grupo prostético al oscilar las formas amino y aldehído (21,34 ).

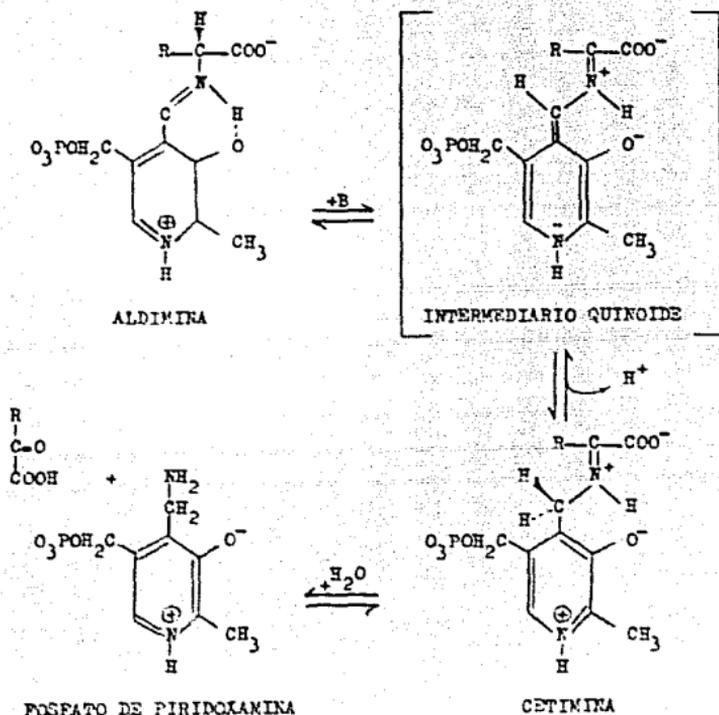


fig. 5: Tautomerismo e Hidrólisis durante la Transaminación (34).

Jenkins y cols. demostraron en modelos experimentales que un AA (con  $NH_2$  no protonado) puede formar una base de Schiff con FPAL más rápidamente por transaldirinación o transferencia de carbonilo de una imina de la coenzima que por condensación con aldehído libre(34).

### Condiciones de Reacción

En muchas reacciones enzimáticas intervienen las coenzimas Nicotin Adenin-Dinucleotido  $\text{NAD}^+$  o  $\text{NADP}^+$  (NAD fosforilado) como aceptores o donadores de Hidrógeno, por lo que se puede seguir la reacción enzimática directamente en un espectrofotómetro, ya que tales compuestos absorben la luz UV en su estado reducido ( $\text{NADH}$  y  $\text{NADPH}$ ) entre 300-400 nanómetros mientras que en su estado oxidado ( $\text{NAD}^+$  y  $\text{NADP}^+$ ) se presenta inactividad en el rango mencionado del espectro de absorción y se esquematiza en la figura 6 (15,21,37).

La velocidad de las variaciones de coenzima es proporcional a la actividad enzimática buscada. Si las formas oxidadas no intervienen en la reacción estudiada, se pueden acoplar a otra reacción que sí las ocupe empleando también algún producto formado en la primera reacción como sustrato de la reacción auxiliar (12,21).

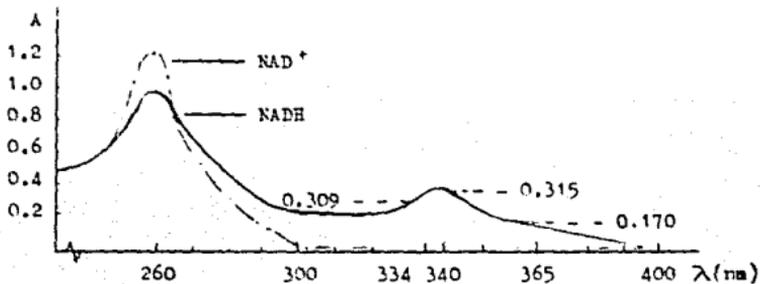


fig. 6: Espectro de Absorción de  $\text{NAD}^+$  y  $\text{NADH}$  (35,40).

Al uso de estas coenzimas en la determinación de actividad enzimática se le denomina Prueba Óptica y fué introducida por Warburg y Christian al describir un principio simple de medición apto para determinar enzimas capaces de actuar en la transferencia de iones Hidrógeno (15,40).

La prueba óptica se basa en el análisis del espectro de absorción, (con un máximo de absorción de las formas reducidas de los Nicotinamida-Adenin-Dinucleótidos entre 338.5 y 340.5 nm). Por lo tanto, midiendo la extinción a longitud de onda apropiada (334, 340 ó 365 nm) se puede seguir directamente el proceso de oxidación o reducción de la coenzima cuya estructura se presenta en la figura 7 (15,21).

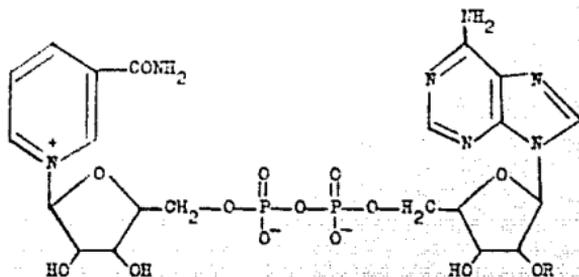


fig. 7: Estructura de NAD<sup>+</sup> y NADP<sup>+</sup> donde R-H y R-PC<sub>3</sub><sup>-</sup> para o/u (21).

El cambio entre la forma benzóide y quinóide del anillo pirimidínico de la Nicotinamida representado en la figura 8, es la causa determinante de las modificaciones experimentadas en el espectro UV de absorción por las formas oxidada y reducida de los FAD (12,29,37).

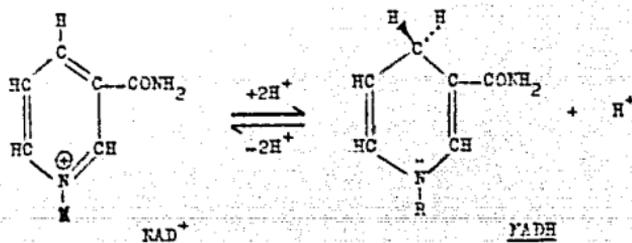


fig. 8: Cambio estructural de la fracción Nicotinamida en un proceso de Oxido-Reducción (21).

### Cálculo de Unidades Internacionales

En 1961 la Comisión de Enzimas de la Unión Internacional de Bioquímica recomendó el uso de una unidad para el ensayo enzimático, misma que se define como Unidad Internacional y corresponde a la cantidad de enzima que cataliza la transformación de 1  $\mu$ mol de sustrato, por minuto, bajo condiciones definidas; éstas comprenden a la temperatura, el pH, el sistema amortiguador, la concentración del sustrato y el co factor. Más recientemente con la introducción del Sistema Internacional de Unidades (SIU) propuesto por la Junta Internacional de Pesas y Medidas se hizo necesaria una reconsideración a las UI; ya que la unidad básica de tiempo en su sistema es el segundo, propusieron como unidad de actividad al katal que es la cantidad de enzima que cataliza la transformación de 1 mol de sustrato por segundo bajo condiciones definidas y su equivalente es de  $60 \times 10^6$  UI (8,12,17,29,35,37).

### Absortividad Molar

Como ya se mencionó en II.1.3., la absortividad molar es la constante de proporcionalidad en el fenómeno de absorción y depende de la naturaleza de la sustancia absorbente, de la longitud de onda y de la temperatura, y es independiente del disolvente. Es un factor relacionado con la probabilidad de afinidad entre fotones y partículas (38).

Desde hace algunos años se han reportado valores de absortividad molar para las coenzimas de interés en la reacción de transaminación como son *S*-NADPH, *S*-NADPH, *S*-FAD generalmente diferentes debido a que son reacciones dependientes de temperatura y afectados por factores como el pH de reacción o fuerza iónica además de la pureza de los sustratos. Horecker y Kornberg reportaron un coeficiente de extinción molar  $\epsilon$  para las formas reducidas de las coenzimas mencionadas de  $6.22 \times 10^7$  sq.cm.  $\times$  mol $^{-1}$  a 340 nm (15). Desde entonces varios grupos de investigadores han reportado valores de  $\epsilon$  a partir de varios sustratos purificados por cromatografía de intercambio iónico y otros métodos; en líneas de mercurio y diversos aparatos espectrofotométricos

llegando Ziegenhorn a establecer radios de absorptividad molar para  $\alpha$ -NADH y  $\beta$ -NADPH a (334, 334.15, 340, 365, 365.1) nm de longitud de onda y a diferentes temperaturas (0, 10, 25, 30 y 38) $^{\circ}$ C (40).

### II.2.3. Importancia Clínica

#### Distribución y Funciones Metabólicas

La AST posee función anfibólica en el metabolismo celular ya que interviene tanto en el catabolismo o degradación iniciado cuando el grupo  $\alpha$ -amino de los aminoácidos es llevado hasta amoniaco y posteriormente a la formación de urea que es eliminada del organismo, como en el anabolismo o biosíntesis de aminoácidos como resultado de la reversibilidad de la reacción de transaminación. En la figura 9 se esquematizan dichas reacciones en forma unidireccional con fines demostrativos unicamente (29,36).

En el catabolismo de doce aminoácidos (alanina, arginina, asparagina, ácido aspártico, cisteína, leucina, isoleucina, lisina, fenilalanina, tirocina, triptófano y valina) el grupo  $\alpha$ -amino es transferido al átomo de  $C^{\alpha}$  de un  $\alpha$ -cetocido (2-oxoglutarato) formandose el correspondiente  $\alpha$ -cetocido análogo del aminoácido, originando una aaminación del  $\alpha$ -cetoglutarato para formar ácido L-glutámico, este aminoácido común actúa como donador del grupo amino en una serie final de reacciones de transformación, para ser eliminado en productos nitrogenados (21).

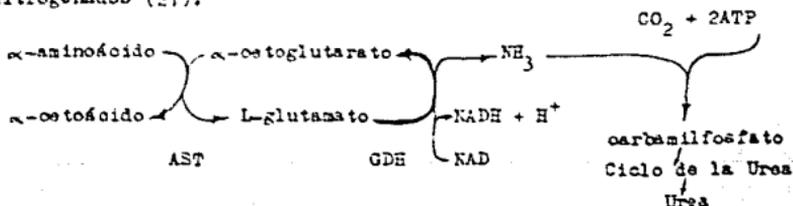


fig. 9: Flujo global del N en el catabolismo de AA. en mamíferos(29).

Las aminotransferasas también son de utilidad en las vías anapleróticas (surtidoras) del ciclo de Krebs dentro del cual proporcionan intermediarios a través de la transaminación, tanto para gluconeogénesis como en la producción de  $\text{CO}_2$  y  $\text{H}_2\text{O}$ . En la gluconeogénesis producen piruvato a partir de alanina, oxalacetato del aspartato y  $\alpha$ -oxoglutarato desde el ácido glutámico; otros aminoácidos contribuyen al integrarse todo o parte de su esqueleto de carbono al ciclo de Krebs después de la desaminación como se representa en la figura 10 (21).

El hígado y los riñones son los órganos que contienen la maquinaria completa para llevar a los constituyentes químicos del ciclo de Krebs hasta la formación neta de glucosa por gluconeogénesis (6).



fig. 10: Transaminación en las vías anapleróticas de ciclo de Krebs (21).

La AST está ampliamente distribuida en los tejidos humanos y se encuentra normalmente en plasma, bilis, líquido cefalorraquídeo, saliva, pero no en orina (8). La siguiente tabla enlista las actividades en varios tejidos con respecto a la actividad enzimática en suero considerada como la unidad.

TABLA 2: Distribución y actividad relativa de AST en tejidos humanos donde X= actividad normal de la enzima en suero (35).

---

SUERO	1 X
ERITROCITOS	15 X
PULMON	500 X
BAZO	700 X
PANCREAS	1500 X
RIÑON	4500 X
MUSCULO ESQUELETICO	5000 X
HIGADO	7000 X
MUSCULO CARDIACO	8000 X

---

Jorge Awapara y Billie Seale realizaron uno de los primeros trabajos para determinar cuantitativamente la reacción de transaminación en ocho órganos de rata por cromatografía en papel y para determinar el número de aminoácidos que intervenían en ella, los resultados sugieren que más de una enzima puede intervenir en la reacción y que las diferentes proporciones encontradas (Entonces reportadas en cantidad de aminoácido formado por gramo de tejido, por hora) guardan relación con la función del tejido (1).

#### Valor Diagnóstico de la Enzima

El conocimiento del alto contenido de AST en músculo cardíaco y la demostración de su presencia en suero de individuos normales condujo en 1954 a Karmen, Wroblesky y LaDue al descubrimiento del aumen

to de dicha enzima en suero después de presentarse un infarto del -  
Miocardio agudo que es un padecimiento patológico frecuente, dándole  
a la determinación enzimática un valor diagnóstico, no solo en enfer-  
medad cardíaca sino también padecimientos del hígado, músculo esque-  
lético y otros órganos, marcándose con ello el inicio de la enzimolo-  
gía clínica (19,29,35).

La determinación y demostración de incrementos de actividad de la  
enzima AST no es suficiente para corroborar o diagnosticar una enfer-  
medad, ya que dicho aumento puede deberse a gran variedad de ellas,  
sin embargo son de gran utilidad y se agrupan por aumentos en enfer-  
medad cardíaca, aumentos en enfermedad hepática y aumento de la enzi-  
ma en otras enfermedades, tal y como se enlista en la tabla 3 (4,37).

También se ha observado cierta distracción de los niveles séricos  
de AST con respecto a los valores en periferia en casos de emba-  
razo donde existe un metabolismo anormal del fosfato de piridoxal --  
(Vitamina B<sub>6</sub>); o en casos de mal nutrición severa (4).

El total de actividades enzimáticas en suero determinadas en for-  
ma simultánea constituyen el perfil enzimático de un organismo. Los  
beneficios prácticos se obtienen de del número de enzimas indagadas  
dado de la interrelación entre las mismas, y es necesario además co-  
nocer los factores que permiten la existencia de el perfil de enzi-  
mas séricas (35,37).

Está entendido que la mayoría de enzimas estimadas son de origen  
intracelular, y solo son liberadas al espacio extracelular debido a  
un incremento de permeabilidad o lisis de las células en las cuales  
normalmente cumplen su función. De esta manera, es reflejado en suero  
el perfil enzimático del órgano dañado (8).

TABLA 3: Padecimientos en que AST aumenta su nivel sérico renal (4).

---

ENFERMEDAD CARDIACA:	Infarto del miocardio (27)
	Pericarditis
	Arritmias cardiacas
	Insuficiencia cardiaca (4)
	Cirugía postcardiaca o toraxica
ENFERMEDAD HEPATICA:	Hepatitis (infecciosa o toxica) (10)
(Necrosis)	Cirrosis (7)
	Cirugía de tracto biliar (30)
	Mononucleosis infecciosa (29)
	Congestión hepática
	Ictericia Obstructiva (32)
	Tuberculosis hematogena
	Carcinoma metastásico (Granuloma)
OTRAS ENFERMEDADES:	Infarto pulmonar, Asma
	Distrofia muscular progresiva (11;6)
	Dermatomiositis
	Pancreatitis aguda (25)
	Necrosis renal
	Necrosis cerebral (20)
	Hemólisis ligera
	Delirium tremens (37)
	Ulcera duodenal (5)
	Embolia visceral u oclusión vascular (11)
	Shock
	Después de tensión física
	Uso de anticoagulantes
	Coaccidentalmente por el uso de esteroides anabólicos, opiáceos, ampicilina

---

El Infarto del miocardio suele ser resultado de la oclusión aguda de una arteria coronaria ya sea por ruptura de una placa arteriosclerótica o por un trombo sobreañadido a una lesión vascular (6). Si el músculo cardíaco es dañado, sus enzimas son liberadas a la circulación y las pruebas enzimáticas son una evidencia química del grado de necrosis, principalmente la determinación de CK, CK-MB, AST, LDH, HBDH, cuya actividad se eleva en el suero después del infarto en una evolución característica mostrada en la figura 11 (37). La determinación de ALT se usa como criterio de diferenciación entre una enfermedad cardíaca y una hepática (1).

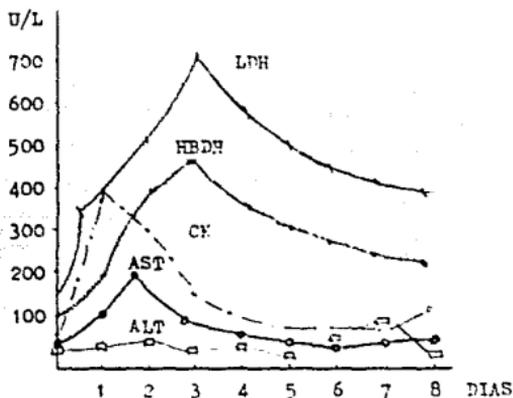


fig.11: Perfil enzimático en suero durante Infarto del miocardio(37).

La AST presenta una elevación transitoria y característica de cinco a diez veces su valor normal que dura de tres a seis días; sus niveles en suero comienzan a incrementarse 6-8 horas después de la aparición del dolor por infarto, llegar a su valor máximo en aproximadamente 48 horas y regresa al intervalo normal en 4 a 6 días, siempre y cuando no se presente un nuevo infarto (6,11,35,37). Los valores máximos son proporcionales al grado de daño que sufre el tejido.

El valor diagnóstico de estas determinaciones radica en que la mayoría de los infartos transcurren sin dolor y colabora en la detección de reinfaros ya que el trazo de un electrocardiograma ECG es frecuentemente anormal durante largos períodos después del primer infarto, arritmias o cuadros de bloqueo de rama. Como se aprecia en la figura 12, el reinfarto presenta una elevación similar aunque más pequeña que la registrada en el primer episodio (29,37).

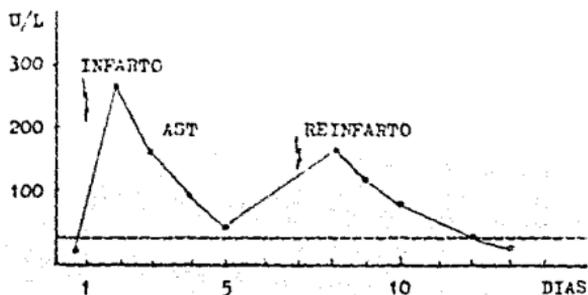


fig.12: Curva de actividad sérica de AST durante reinfarto (29).

Se recomienda efectuar lo más pronto posible dichas determinaciones de actividad enzimática después del inicio del infarto y repetirlas a las 6, 12, 24 y 48 horas y posteriormente en lapsos de uno a dos días. Así se pueden detectar niveles patológicos existentes antes del infarto o reconocer complicaciones como el reinfarto, shock e insuficiencia cardíaca derecha aguda, además de que se puede optar por un tratamiento trombolítico oportuno (29, 37).

Los valores elevados de las transaminasas y LDE en insuficiencia cardíaca se deben a una congestión hepática por lo que se corre el riesgo de confundir la insuficiencia con una hepatitis (4).

Después de una cirugía de corazón la destrucción celular origina un aumento de la actividad de AST en suero (11).

El hígado contiene un gran número de enzimas ya que en él se realizan el mayor número de reacciones bioquímicas del organismo. Un síndrome biológico de citólisis comprende al conjunto de modificaciones plasmáticas consecutivas a la destrucción celular hepática y se define por el aumento de aminotransferasas y de hierro sérico (5).

Las aminotransferasas son enzimas intracelulares que se encuentran en grandes cantidades en el hígado y se liberan a la sangre después de lesión celular, no requiere necesariamente la muerte de la célula ya que puede existir únicamente alteración en la permeabilidad (11).

La hipertransaminemia mostrada por todas las hepatopatías que cursan con necrosis celular es proporcional a la agudeza de la lesión. La importancia de la lesión hepática depende más de la intensidad y duración del trastorno circulatorio que de la etiología del mismo (5).

Aunque la mayoría de las enzimas séricas tienen valores elevados en el suero de pacientes con enfermedad hepática, AST y ALT son de utilidad en el diagnóstico de hepatitis aguda (incipiente y no icterica) ya que muestran mayor actividad que en ictericia obstructiva. La actividad de AST puede encontrarse hasta en 10 a 100 veces el valor normal cerca del tiempo en que la ictericia se presenta clínicamente. Durante el período de recuperación de la enfermedad la actividad de AST en suero regresa gradualmente a la normalidad (4,10,20,21).

En hepatitis u otra enfermedad con necrosis hepática, se elevan los valores de actividad de las dos transaminasas séricas hasta en 2000 UI. En la mayoría de los casos, el nivel de ALT es más elevado que el de AST y la razón ALT/AST, también conocida como cociente de De Ritis, se hace mayor que 1.0, mismo que en caso de infarto del miocardio es normalmente menor que 1.0 (20). Las figuras 13 y 14 presentan la distribución de actividad de las dos enzimas para ambos casos. Esta relación entre las aminotransferasas ocurre especialmente en las últimas etapas de la enfermedad y en la fase de reestablecimiento. Los valores máximos se presentan entre los días 7-12 después de iniciado el daño y se reestablecen en su nivel normal hacia la tercera y quinta semana (11).

El perfil enzimático tiene mayor valor informativo que la determinación individual de enzimas ofreciendo mayor seguridad al hacer el diagnóstico diferencial debido a que ninguna de ellas es organoespecífica (37).

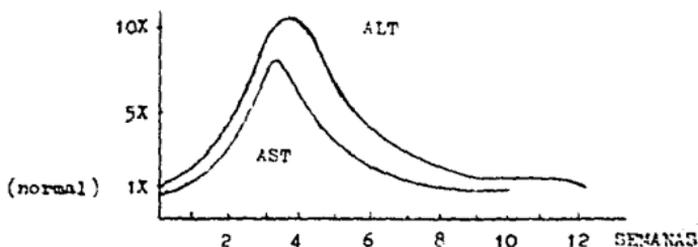


fig.13: Actividad sérica de AST y ALT en hepatitis aguda (37).

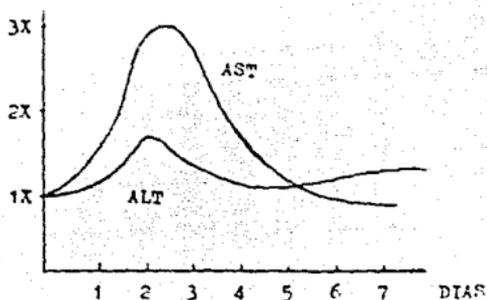


fig.14: Actividad sérica de AST y ALT en infarto del miocardio (29).

El cuadro observado en hepatitis tóxica es similar al de hepatitis vírica aguda, en donde la actividad de aminotransferasas se incrementa aún antes de la aparición de la ictericia que es la pigmentación amarilla de tejidos debida al aumento de bilirrubinas (4,37).

Por regla general la ALT en gran parte específica del hígado, se

encuentra más elevada que AST; si la enfermedad evoluciona sin complicaciones la actividad enzimática vuelve a sus niveles normales en algunas semanas y con ello disminuye el cociente de De Ritis. Por tanto las determinaciones enzimáticas son de utilidad en la vigilancia seriada de la evolución de enfermedad hepática (22,29).

La forma colestásica del padecimiento se acompaña de incremento de otras enzimas que indican el curso necrotizante o gravedad de la lesión hepática, tales son: GGT, FA, LAP, GLDH, LDH, así como la disminución de CHE. Generalmente deberían transcurrir seis meses desde la aparición de una hepatitis vírica aguda antes de ser considerada como hepatitis crónica (37).

La elevación prolongada de aminotransferasas puede ser una indicación primaria de una hepatitis que no se resuelve o que se ha vuelto crónica. La disminución precipitada de las mismas enzimas en un paciente que experimenta deterioro clínico puede ser indicio de una necrosis tan grave de las células hepáticas que no se disponga ya de más enzimas para su liberación (11).

En los casos de Ictericia obstruictiva a nivel de conducto biliar, los valores de AST y ALT suelen elevarse en forma menos marcada que en la hepatitis vírica aguda, siendo rara vez mayores de 10 veces lo normal (10X), sin embargo, se reestablecen a los pocos días (11,32).

En las colestasis extrahepáticas las aminotransferasas pueden ser normales o discretamente elevadas. Dicho aumento se explica por la hipertensión biliar en el interior de la célula hepática, que produce una necrosis celular por reflujo (6).

Alteraciones tales como congestión hepática y reducción del flujo sanguíneo del hígado que aparecen en el curso evolutivo de la insuficiencia cardíaca congestiva son características del llamado Hígado - cardíaco. La congestión hepática es responsable de la hepatomegalia que aparece en los períodos de descompensación cardíaca, mientras que una dificultad en la circulación de retorno venoso ya sea por pericarditis constrictiva, insuficiencia de ventrículo derecho o por -

valvulopatía tricuspídea ocasiona reducción de flujo sanguíneo que -  
aunado a una menor tensión de oxígeno en sangre, produce anoxia de -  
los hepatocitos. Como consecuencia de estos dos factores se presenta  
la insuficiencia hepatocelular y una necrosis centrolobulillar(5,14).

Cuando los niveles de ALT se aproximan a los de AST generalmente  
se asocian con falla severa cardíaca, shock o enfermedad hepática --  
aguda (4).

Durante las inflamaciones hepáticas crónicas como la Cirrosis y -  
la Hepatitis crónica, las determinaciones de actividad enzimática --  
son útiles para controlar el curso de la enfermedad. En casos de ci-  
rrosis los niveles observados varían con la actividad del proceso ci-  
rrótico y los valores de AST son generalmente mayores que los de ALT,  
igual sucede en casos de metamorfosis grasa del hígado, delirium tre-  
mens, carcinoma hepático e infarto del miocardio (2,15,37). El co-  
eficiente de De Ritis aumenta a medida que una hepatitis aguda evolucio-  
na hacia la cirrosis (4).

En la mononucleosis infecciosa se aprecian elevaciones moderadas  
de niveles séricos, de hasta 250 UI en el 80 por ciento de los casos  
y se piensa que dicha elevación es un reflejo de la hepatitis origi-  
nada por la mononucleosis en sí (20,37).

En la hepatitis alcohólica aguda, usualmente caracterizada por --  
ictericia, existe elevación moderada de AST en el 80 por ciento de -  
los pacientes (5,11).

También es de importancia clínica la elevación de actividad de --  
AST en casos de colestasis aguda intrahepática e ictericia extrahepá-  
tica obstructiva; así como aumentos moderados en personas con metá-  
stasis hepáticas o con carcinoma hepático debido a la presencia de un  
mayor número de células liberadoras de la enzima (4,30).

Las lesiones hepáticas tóxicas pueden ser causadas por infinidad  
de fármacos. Los exámenes clínicos y análisis químicos de laborato-  
rio identifican cuadros muy variados similares a los de colestasis o

hepatitis. Las lesiones hepáticas provocadas por medicamentos son muchas veces pasajeras y leves pero algunos casos son también graves y manifiestan hepatopatías crónicas. Ejemplos de estos fármacos son — los laxantes que contienen oxifenizatina, sedantes, antipiréticos, — tuberculostáticos, antibióticos, antimetabolitos, antiulcerosos, preparados hormonales, inhibidores de la ovulación, halotano (9,39).

Algunos casos en que no se detecta actividad enzimática no se descartan la posible inhibición enzimática por drogas; parece ser que la combinación estreptomicina-dihidroestreptomicina, opiáceos, estolato de eritromicina, aspirina y salicilato sódico, pueden causar de alguna forma aumento de la actividad de AST en niños (10).

Embolias pulmonares pueden producir elevaciones de AST hasta en dos o tres veces el valor normal a causa de la anoxia celular por — disminución de la tensión de oxígeno sanguíneo (10).

Los niveles de AST en suero se elevan también en casos de Distrofia muscular progresiva que agrupan a miopatías con características de predisposición hereditaria (Síndrome de Duchene), iniciación de debilidad con la edad y patrones clínicos bastante consistentes, cuya etiología se desconoce pero se puede decir que al menos una se debe a anomalías de la membrana celular muscular y de otros tejidos(11).

También se eleva AST hasta en 100 UI en casos de dermatomiositis o triquinosis, y son aumentos ligeros los que ocurren en trauma muscular sin importar si es causado por enfermedades sistémicas, por cirugía o en enfermedades musculares de origen neurogénico (4,11,37).

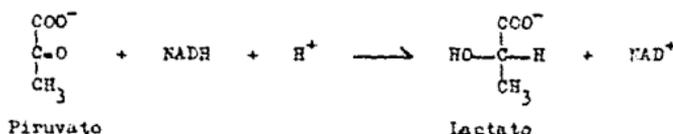
La Pancreatitis aguda produce niveles anormalmente elevados en suero debido a la obstrucción del árbol biliar por un páncreas edematoso, y a la presencia de una enfermedad hepática asociada o de un delirium tremens (4,25).

El delirium tremens puede o no estar acompañado de un cuadro cirrótico, pero los niveles aumentados de AST no reflejan evidencia de lesión hepática (37).



por unidad de tiempo, es directamente proporcional a la actividad o velocidad de reacción de AST.

El piruvato endógeno, presente normalmente a bajas concentraciones en suero y que podría interferir en la medición de AST, es destruido por la LDH incluida en los reactivos durante el período de incubación mediante la siguiente reacción:



Las modificaciones al método incluyen la importante observación de esperar cierto tiempo a que la reacción se haga lineal, corrigiendo a la vez los resultados para una temperatura estándar al mantener constante dicha propiedad en el compartimento de celdillas del espectrofotómetro; también se calibra previamente la actividad de MDH y NADH o se utilizan blancos de referencia estables (10, 77, 35).

En general, se considera al método cinético como la mejor forma de determinar actividades enzimáticas (20). La estimación de dicha propiedad contribuye a establecer si existe o no un desvío del perfil enzimático normal, de acuerdo con la elevada sensibilidad del fenómeno de liberación de enzimas (20).

### III. OBJETIVOS

#### OBJETIVO GENERAL:

Obtener los valores de referencia de Aspartato aminotransferasa AST en personas sanas que habitan la zona norte de la ciudad de México, mediante tres procedimientos preestandarizados por los Laboratorios: Abbott, Beckman y Gilford.

#### OBJETIVOS PARTICULARES:

Realizar un análisis estadístico a la determinación de actividad de AST en suero de donadores adultos clínicamente sanos radicados en la zona norte de la ciudad de México y área metropolitana para obtener los valores de referencia para tres métodos diferentes en dicha población.

Comparar con bases estadísticas a los reactivos comerciales empleados para establecer criterios de precisión, economía y confiabilidad.

#### IV. MATERIALES Y METODOS

##### IV.1. Materiales

##### IV.1.1. Material Biológico

Se obtuvieron muestras de cuando menos 5 ml de sangre de donadoras elegidas aleatoriamente dentro de la población establecida: 30 mujeres y 120 hombres, en total 150 adultos clínicamente sanos habitantes de la zona norte de la ciudad de México y área metropolitana, con distribución de edades de 18 a 49 años y una moda de 23 años para ambos sexos. El 64 por ciento de dichas muestras provenía de muestras piloto de donadoras altruistas del Banco de Sangre del Centro Médico La Raza y el 36 por ciento restante de población estudiantil del campo 1 de la FES-Cuautitlán.

Las muestras de sangre se dejaron coagular a temperatura ambiente y el suero se separó por centrifugación clínica (3000 rpm).

No se trabajaron muestras hemolizadas en base a los reportes concluyentes de que la concentración de AST en los eritrocitos es aproximadamente 10 veces superior a la que se encuentra normalmente en el suero, y al ser liberada se aumentaría el rango de valores de referencia para la población de estudio (12).

**ESTABILIDAD DE LA MUESTRA.** Ordinariamente en el Laboratorio donde se desarrolló el estudio las muestras se analizan el mismo día de su obtención, sin embargo dadas las condiciones de trabajo fue necesario verificar las condiciones de estabilidad por lo que se determinó la actividad enzimática de dos muestras el día de su obtención, al tercero y quinto día, conservándose en refrigeración durante ese lapso de tiempo. No se apreció pérdida significativa de actividad por lo que se almacenaron las muestras a 4°C.

Todas las muestras se analizaron por duplicado en series de trabajo diferentes, incluyendo un suero control de Gilford a cada una.

#### IV.1.2. Material Químico

Se utilizaron tres Kits comerciales diferentes para medir cuantitativamente la actividad sérica de AST. La fórmula óptima de cada sistema se enlista en la tabla 4. Todos son para uso diagnóstico 'in vitro' y no se ha establecido su toxicidad. Se suministran como polvos secos y estables.

##### Reactivo de prueba A-Cent para AST de Laboratorios Abbott

(6037-02: 10 x 12 ml, viales). Esta determinación de la División de Diagnósticos de Abbott es un método óptimo UV-cinético basado en la reacción descrita por Wroblewsky y cools.(10) y modificada por Henry y cools.(12).

- Las 200 U/L de LDH destruyen el piruvato en un minuto eliminando la necesidad de una solución separada de  $\alpha$ -cetoglutarato.
- Sin abrirse se almacena a temperatura ambiente ( $\leq 28^{\circ}\text{C}$ ).
- Se reconstituye agregando 12 ml de agua destilada y mezclando suavemente para disolver el liofilizado. Después el reactivo permanece estable durante 7 días cuando menos si se refrigera inmediatamente ( $2-8^{\circ}\text{C}$ ).
- Existe deterioro si la absorbancia a 340 nm es menor que 1.0

##### Reactivo enzimático AST Beckman (SPINCHEM)

Se usa para la determinación de actividad de AST en suero. Este reactivo emplea los métodos químicos proporcionados por Karmen (13) y modificados por Rodgerston D.O.(34), proporcionando un medio simple para determinar con precisión los niveles de AST en una amplia gama de actividades.

- El reactivo se formula en buffer de tris hidroximetil aminometano con pH de  $8.0 \pm 0.1$ .
- Antes de reconstituir el reactivo es estable hasta fecha de caducidad si se conserva entre  $2^{\circ}\text{C}$  y  $8^{\circ}\text{C}$ .

- Reconstituir con 20 ml de agua destilada mezclando suavemente para obtener una solución completa. No agitar para disolver. Es estable por 24 horas a 2-8°C ó 6 horas a temperatura ambiente.
- Si el reactivo absorbe menos que 1.0 a 340 nm, esto indica una pérdida excesiva de NADEH.

Reactivo AST (SGOT), Sistemas Gilford de Ciba-Corning

Para la determinación cuantitativa de la actividad de AST en suero, en una modificación de la metodología propuesta por la Federación Internacional de Química Clínica (37).

- El reactivo no reconstituido debe ser almacenado entre 2 y 8°C y puede utilizarse hasta la fecha de expiración señalada en la etiqueta.
- Reconstituir los frascos de reactivo con 7 ml de agua destilada o desionizada. Darle vueltas ligeramente para disolver. No agitar. - El reactivo reconstituido se mantiene estable por 8 horas a temperatura ambiente (18-25°C) o por 4 días refrigerando entre 2-8°C.
- No usar el reactivo si antes de ser reconstituido muestra costras debido a la posible penetración de humedad o sin haberle añadido el suero presenta una absorbancia de menos de 0.800 a 340 nm.

Suero Control de Gilford QCS<sup>TM</sup> clave 9702, lote No. 020504

Este reactivo se mantiene en refrigeración entre 2°C y 8°C. Ha sido preestandarizado en equipo ABA-100 de Abbott VP y Pri-Stat reportándose los siguientes niveles de actividad de AST para cada uno de los reactivos empleados:

Sistema Abbott : (20 ± 4) U/L  
Sistema Beckman: (17 ± 5) U/L  
Sistema Gilford: (18 ± 4) U/L

Las determinaciones se realizaron en un espectrofotómetro digital -- Perkin - Elmer modelo 35.

TABLA 4: Contenido de cada uno de los 3 sistemas reactivos utilizados

INGREDIENTES	CONCENTRACIONES APROXIMADAS		
	Abbott	Beckman	Gilford
L-Aspartato, K	97.0 mmol/l		200 mmol/l
Acido L-aspartico		110 mmol/l	
$\alpha$ -oxoglutarato	6.0 mmol/l	18 mmol/l	
2-oxoglutarato			12 mmol/l
NADH, Na <sub>2</sub> (levadura)	0.28 mmol/l	0.2 mmol/l	0.2 mmol/l
Malato Deshidrogenasa MDH (de corazón porcino)	66 U/l	600 U/l	≥ 600 U/l
Lactato deshidrogenasa LDH (Músculo de conejo)	200 U/l	1000 U/l	≥ 800 U/l
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	100 mmol/l		
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	15 mmol/l		
Buffer de fosfatos pH 7.8			en solución
Buffer de TEA pH 8.0 ± 0.1		en solución	

Nota: El sistema Abbott contiene además estabilizadores de enzimas y rellenos sin efecto sobre la medición de AST.

#### IV.2. Métodos

##### IV.2.1. Procedimientos

Se utilizaron celdillas espectrofotométricas de 1.0 cm de diámetro perfectamente limpias en donde se colocaron los 200  $\mu$ l de cada muestra de suero y se agregó el volumen de reactivo indicado en la tabla 5 para cada método. Después de agitar suavemente, la mezcla se dejó incubar el tiempo adecuado en cada caso y se registró la primera lectura de absorbancia en el espectrofotómetro a 365 nm; exactamente a los 5, 3 y 1 minutos respectivamente del tiempo de incubación para cada método (Abbott, Beckman y Gilford) se registro la segunda lectura obteniéndose la variación de absorbancia por minuto en cada caso.

La práctica ha demostrado que el error es mínimo o casi nulo si - para una muestra se hacen lecturas de absorbancia cada minuto o solamente una lectura inicial y otra al tiempo final de reacción, además la última opción permite realizar mayor número de determinaciones en menor tiempo. Con los parámetros establecidos se pueden determinar - 15 muestras en 10 minutos efectivos por el método de Abbott, 15 muestras en 5 minutos por el método de Beckman y 6 muestras en 3 minutos por el método de Gilford, lo que satisface la demanda de trabajo de el Laboratorio.

Siendo el fundamento el mismo para los tres métodos empleados se sigue un procedimiento similar variando volúmenes de reactivo e intervalos de reacción en base a cada formulación. Estos parámetros se adaptan a las necesidades y disposiciones del laboratorio y se presentan tabulados a continuación.

TARLA 5: Características de la determinación de actividad de AST

PARAMETROS	Abbott	Beckman	Gilford
Longitud de onda $\lambda$	365 nm	365 nm	365 nm
Modalidad	Absorbancia	Absorbancia	Absorbancia
Escala de Absorbancia	0 a 2	0 a 2	0 a 2
Paseo de luz de la celdilla	1.0 cm	1.0 cm	1.0 cm
Volumen de muestra (suero)	200 $\mu$ l	0.2 ml	200 $\mu$ l
Volumen de reactivo	3.0 ml	3.0 ml	2.0 ml
Tiempo de incubación	5 min	2 min	2 min
Tiempo de reacción	10 min	5 min	1 min
$\Delta A$ /minuto	$A_1 - A_2 / 5'$	$A_1 - A_2 / 3'$	$A_1 - A_2$
Máximo $\Delta A$ /min (para valores superiores diluir muestra)	0.250	0.150	0.290
Lineal hasta:	125 U/l	385 U/l	500 U/l

#### IV.2.2. Cálculo de actividad enzimática

Tomando en cuenta las características de cada método, para cada uno se obtuvo un factor de conversión en base a la fórmula general:

$$\text{ACTIVIDAD DE AST: } \frac{\Delta A/\text{min}}{\epsilon} \times \frac{V_T}{V_m} \times \frac{10^6}{1\text{cm}} = \Delta A/\text{min} \times F = \text{U/L}$$

Donde:

$\Delta A = A_1 - A_2$  = Variación de absorbancia

$A_1$  = lectura de absorbancia al tiempo de incubación

$A_2$  = lectura de absorbancia al tiempo final de reacción

min = minuto

$\epsilon$  = absorptividad molar de NADH a 365 nm y 25°C ( $3.5 \times 10^3 \text{ l.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ )

$10^6$  = conversión de mol a  $\mu\text{mol}$

1000 = factor de simplificación ( $10^6/10^3$ )

1 = paso de luz en centímetros

$V_T$  = Volumen total del sistema en mililitros

$V_m$  = Volumen de muestra en mililitros

U/L = Unidades Internacionales de actividad por litro de suero

TABLA 6: Factores de conversión de los tres procedimientos empleados en la determinación de unidades de actividad de AST en suero.

PROCEDIMIENTO	FACTOR DE CONVERSION
Sistema Abbott	$\frac{A_1 - A_2}{5 \text{ min}} \times \frac{3.2}{3.5} \times \frac{1000}{0.2} = \Delta A/\text{min} \times 914.28$ 914 = U/L
Sistema Beckman	$\frac{\Delta A/\text{min}}{3.5} \times \frac{3.2}{0.2} \times 10^3 = \Delta A/\text{min} \times 4571.42$ 4571 = U/L
Sistema Gilford	$\frac{\Delta A/\text{min} \times 10^6}{(3.5 \times 10^3)} \times \frac{2.2}{1} \times 0.2 = \Delta A/\text{min} \times 3142.80$ 3143 = U/L

V. RESULTADOS

V.1. Tabulación de datos

TABLA 7: Distribución de frecuencias de valores de actividad sérica de AST en U/L, obtenidos por cada procedimiento en hombres.

U/L	ABBOTT		U/L	BECKMAN		U/L	GILPORD	
	f	fa		f	fa		f	fa
8	1		6	1		7	1	
9	1	2	9	2	3	9	2	3
10	2	4	9.5	1	4	10.5	5	8
11	2	6	10	5	9	12	11	19
11.5	1	7	10.5	1	10	12.5	4	23
12.5	2	9	11	1	11	13	4	27
13	3	12	12	4	15	14	6	33
13.5	4	16	12.5	1	16	14.5	3	36
14	3	19	13	5	21	15.5	1	37
14.5	2	21	13.5	1	22	16	15	52
15	15	36	14	8	30	17.5	11	63
15.5	3	39	14.5	7	37	19	16	79
16	9	48	15	10	47	20.5	11	90
16.5	2	50	15.5	1	48	22	6	96
17	6	56	16	4	52	23.5	5	101
17.5	1	57	16.5	3	55	25	4	105
18	4	61	17	6	51	26.5	3	108
18.5	4	65	17.5	2	63	28	5	113
19	4	69	18	9	72	29.5	1	114
19.5	4	73	18.5	3	75	31	1	115
20	4	77	19	2	77			
20.5	3	80	19.5	3	80			
21	4	84	20	5	85			
21.5	1	85	20.5	2	87			
22	2	87	21	3	90			
23	3	90	22	5	95			
23.5	3	93	22.5	3	98			
25	3	96	23	2	100			
25.5	4	100	23.5	3	103			
26	3	103	24	2	105			
26.5	2	105	24.5	2	107			
27.5	1	106	26	2	109			
28	1	107	27.5	2	111			
28.5	1	108	28.5	1	112			
29	3	111	29	1	113			
29.5	1	112	30	1	114			
31	1	113	33	1	115			
31.5	1	114						
32	1	115						

TABLA 8: Distribución de frecuencias de valores de actividad sérica de AST en U/L, obtenidos por cada procedimiento en mujeres. (f- frecuencia y fa- frecuencia acumulada)

U/L	ABBOTT		U/L	BECKMAN		U/L	GILFORD	
	f	fa		f	fa		f	fa
6	1		6	1		6	1	
7.5	1	2	7	1	2	7.5	1	2
9	1	3	9	2	4	9	2	4
10	1	4	9.5	3	7	10.5	3	7
10.5	1	5	10	1	8	11	1	8
11	2	7	10.5	1	9	12	7	15
11.5	1	8	11	1	10	13	2	17
12	2	10	11.5	1	11	14.5	3	20
12.5	1	11	12	3	14	16	5	25
13	1	12	12.5	1	15	17.5	1	26
13.5	2	14	13	2	17	19	2	28
14.5	2	16	14	3	20	20.5	1	29
15	3	19	14.5	3	23	22	1	30
15.5	1	20	15	2	25			
16	1	21	16	1	26			
16.5	3	24	20	1	27			
17	2	26	20.5	1	28			
17.5	1	27	21	1	29			
21.5	1	28	23.5	1	30			
23	1	29						
25	1	30						

TABLA 9: Niveles de actividad de AST en U/L agrupados en bloques de acuerdo a la edad de los 115 donadores sexo masculino.  $\sigma^2$

Método	B L O Q U E S				
	< 20 años	21-25 años	26-30 años	31-35 años	≥ 36 años
No.de Muestras:	23	37	18	20	17
Abbott	17.37	18.76	21.53	19.65	16.91
Beckman	17.33	17.03	18.75	18.67	15.91
Gilford	17.13	17.07	18.33	19.97	16.97

Nota: Se tabularon los valores promedio de actividad en cada grupo.

Las siguientes figuras muestran gráficamente la distribución de frecuencias de los datos tabulados previamente para el total de 145 determinaciones en valores promedio.

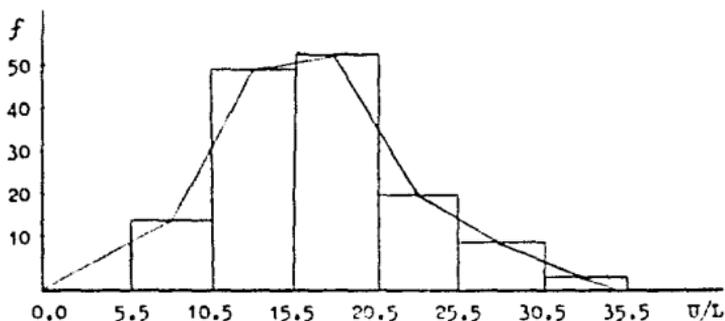


fig.15: Histograma que relaciona la distribución de frecuencias en la muestra de población con respecto a la actividad sérica de la enzima AST expresada en U/L.

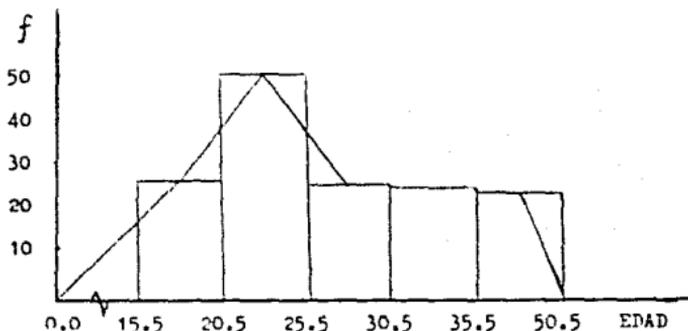


fig.16: Histograma que relaciona la distribución de frecuencias por grupos de edades de la muestra de población estimada.

La figura 17 muestra la distribución geográfica de la población donadora de muestras para obtener los Valores de Referencia de los niveles séricos de AST con el siguiente código de siglas:

○ Centro Médico La Raza

Municipios del Edo. de México	Delegaciones del D.F.
a. Zinacantepec	1. Gustavo A. Madero
b. Naucalpan	2. Azcapotzalco
c. Nicolás Romero	3. Miguel Hidalgo
d. Tlalnepantla	4. Cuauhtémoc
e. Tlaxitlan	5. Venustiano Carranza
f. Cuautitlán	6. Iztacalco
g. Cuautitlán Izcalli	7. Iztapalapa
h. Tultepec	8. Benito Juárez
i. Teoloyucan	9. Álvaro Obregón
j. Tequixquiac	10. Cuajimalpa de Morelos
k. Zumpango	
l. Nextlalpan	
m. Tezamao	
n. Pirámides	
o. Coacalco	
p. Ecatepec	
q. Ciudad Netzahualcóyotl	
r. Chicocapan	
s. Ixtapaluca	
t. Chalco	

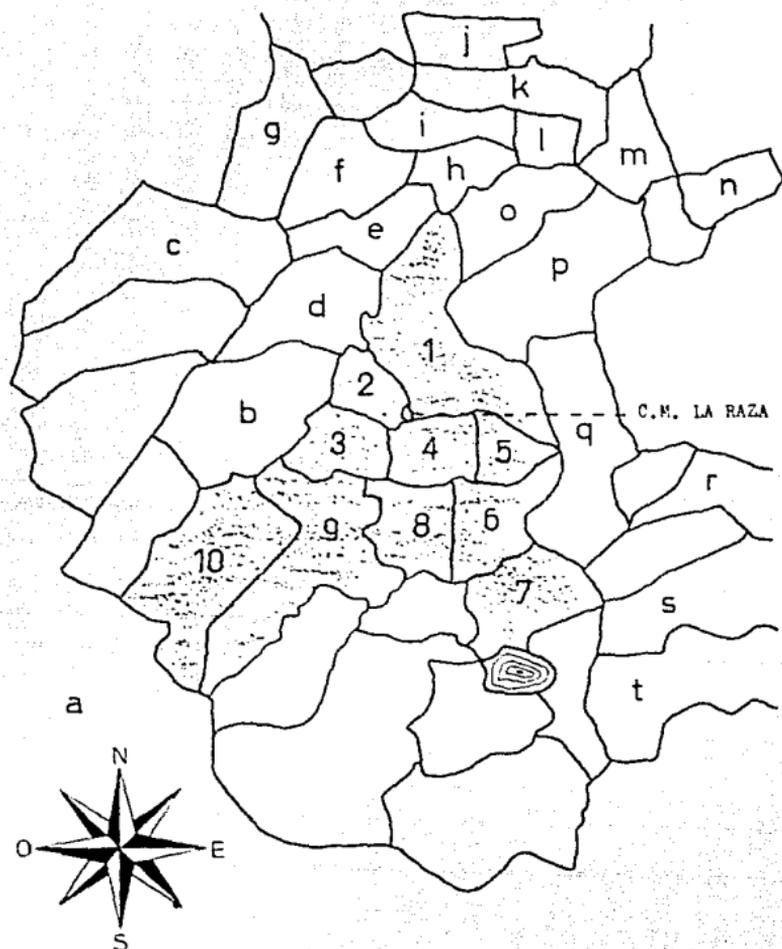


fig. 17: Distribución geográfica de la muestra de población analizada.

TABLA 10: Niveles de actividad promedio de AST en U/L agrupados en bloques de acuerdo a la edad de 30 mujeres donadoras.

Edad	B L O Q U E S				
	<20 años	21-25 años	26-30 años	31-35 años	≥36 años
No. de Muestras:	3	13	6	3	5
Método					
Abbott	12.16	13.61	14.83	14.16	16.8
Beckman	12.66	13.11	12.42	11.83	15.0
Gilford	11.50	12.81	14.66	14.66	14.5

## V.2. Análisis estadístico

### V.2.1. Valores de Referencia

Los percentiles son medidas de localización que dividen a una serie de datos ordenados en 100 partes iguales.

Los valores de referencia se obtuvieron estimando los percentiles 2.5 ( $P_{2.5\%}$ ) y 97.5 ( $P_{97.5\%}$ ) que enmarcan al 95% de los datos en la zona de normalidad y eliminan al 2.5% de las observaciones más bajas y más altas respectivamente.

Las normas locales consisten en establecer patrones en un lugar particular restringido a personas con características definidas.

Se ordenan los valores de menor a mayor magnitud como se muestra en las tablas 7 y 8, para estimar el percentil por  $P = 0.025(n + 1)$  donde n es el tamaño de la muestra.

Para el caso de muestras menores a 75, los límites normales serán considerados como el valor más bajo y el más alto obtenidos como en el grupo de mujeres.

La siguiente tabla muestra los percentiles calculados.

TABLA 11: Obtención de Percentiles como límites de actividad normal en la población de ambos sexos para cada procedimiento.

PROCEDIMIENTO	P <sub>2.5%</sub>	P <sub>97.5%</sub>
HOMBRES: P = 0,025 (120 + 1) = 3,025		
Abbott	$10.0 + (1.0 \times 0.025) = 10$	$31 - (1.5 \times 0.025) = 31$
Beckman	$9.5 + (0.5 \times 0.025) = 10$	$29 - (0.5 \times 0.025) = 29$
Gilford	$10.5 + (1.5 \times 0.025) = 10$	$28 - (1.5 \times 0.025) = 28$
MUJERES: P = 0,025 (90 + 1) = 2,275		
Abbott, Beckman y Gilford.	P <sub>2.5%</sub> = 6	$23.5 - (0.5 \times 0.275) = 23$

A continuación se muestran los datos resumidos.

TABLA 12: Valores de referencia de AST para cada procedimiento en hombres y mujeres a 25°C.

PROCEDIMIENTO	HOMBRES	MUJERES
Abbott	10 - 31 U/L	6 - 25 U/L
Beckman	10 - 29 U/L	6 - 24 U/L
Gilford	10 - 28 U/L	6 - 22 U/L
MEDIA $\bar{x}$	10 - 29 U/L	6 - 23 U/L

### V.2.2. Comparación de Métodos

Se utilizó el Análisis de Varianza de una vía o efectos aleatorios tanto para comparar a los métodos en hombres y en mujeres, como para comparar el efecto de grupos de edades en el nivel promedio de actividad enzimática determinado por los tres métodos.

TABLA 13: Tabla ANDEVA para el experimento aleatorizado de una vía en la comparación de tres métodos en 115 hombres.

FUENTE	SC	g.l.	CM	RV	F
Entre grupos	115.62	2	57.80	2.2	3.03
Dentro de gpo.	8974.81	342	26.24		
Total	9090.43	344			

Donde:

SC = Suma de Cuadrados

gl = Grados de libertad

CM = Cuadrado Medio

RV = Razón de Varianza

F = Valor crítico de la distribución F (3,33)

TABLA 14: Tabla ANDEVA para el experimento aleatorizado de una vía en la comparación de tres métodos en 30 mujeres.

FUENTE	SC	g.l.	CM	RV	F
Entre grupos	21.74	2	10.87	0.6715	3.09
Dentro de gpo.	1408.38	87	16.19		
Total	1430.12	89			

Dados los valores críticos de P con nivel de significación de el 0,05, se acepta  $H_0$  o hipótesis de igualdad de medias de población - tanto en hombres como en mujeres al no encontrarse diferencias significativas entre los métodos de determinación de actividad de la enzima, como muestran las tablas 13 y 14.

Tampoco se encontraron diferencias significativas entre los grupos de edades sobre los niveles de actividad promedio de AST como se expresa a continuación.

TABLA 15: ANDEVA para el experimento aleatorizado de una vía en la comparación de edades y el promedio de U/L de AST determinado por tres métodos en 115 hombres.

FUENTE	SC	g.l.	CM	RV	F
Entre grupos	144.6	4	36.15	1.766	2.45
Dentro de grupos	2250.65	110	20.46		
Total	2395.24	114			

TABLA 16: ANDEVA para el experimento aleatorizado de una vía en la comparación de edades y el promedio de U/L de AST determinado por tres métodos en 30 mujeres.

FUENTE	SC	g.l.	CM	RV	F
Entre grupos	26.66	4	6.66	1.64	2.46
Dentro de grupos	344.93	85	4.058		
Total	371.6	89			

Para respaldar el Análisis de Varianza realizado para comparar a los procedimientos utilizados en la determinación de actividad de -AST, se efectuó un análisis de correlación a las tres posibles combinaciones de los métodos, observándose las dispersiones mostradas en las figuras 18, 19 y 20.

Para facilitar la interpretación de dichas gráficas, en la tabla 17 se presentan agrupados los índices de correlación  $r$  y las variables de las ecuaciones respectivas.

TABLA 17: Variables de la ecuación representativa de cada posible interacción entre los métodos empleados, con  $n = 145$ .

COMBINACION DE METODOS	a PENDIENTE	b ORDENADA AL ORIGEN	r COEFICIENTE DE CORRELACION
Abbott y Beckman	0.7369	3.4100	0.7765
Beckman y Gilford	0.7031	5.1654	0.7068
Abbott y Gilford	0.6767	4.7306	0.7167

### V.2.3. Control de Calidad

Se establecieron los gráficos de control de Shewart para cada uno de los métodos en base a los datos reportados para el suero control de Gilford utilizado y se esquematizan en las figuras 21, 22 y 23 - con los valores promedio de la tabla 18.

TABLA 18: Valores de actividad de AST determinados en el suero control de Gilford durante 19 días no consecutivos de trabajo por 3 métodos diferentes. Donde a y b corresponden a la observación inicial y final respectivamente en U/L y  $\bar{x}$  es el valor promedio de ambos.

DIA	ABBOTT			BECKMAN			GILFORD		
	a	b	$\bar{x}$	a	b	$\bar{x}$	a	b	$\bar{x}$
1	20	26	22	15	16	16	16	13	14
2	21	22	22	16	18	17	19	19	19
3	18	18	18	15	14	14	16	19	18
4	25	23	24	18	18	18	19	19	19
5	26	26	26	15	16	16	13	16	14
6	17	18	18	18	15	16	16	13	14
7	19	25	22	15	12	14	22	22	22
8	33	21	27	20	24	22	22	22	22
9	23	20	22	24	24	24	22	22	22
10	21	20	20	18	14	16	19	19	19
11	23	22	22	18	18	18	28	28	28
12	21	25	23	16	15	16	19	19	19
13	25	25	25	16	21	18	22	19	20
14	26	26	26	24	23	24	22	19	20
15	26	26	26	20	20	20	19	16	18
16	25	23	24	20	20	20	19	19	19
17	33	30	32	18	20	19	19	19	19
18	25	23	24	20	20	20	16	19	18
19	25	23	24	16	20	18	19	19	19

Nota: Los valores promedio se redondearon en su última cifra hacia el número par más cercano (12).

ANALISIS DE CORRELACION

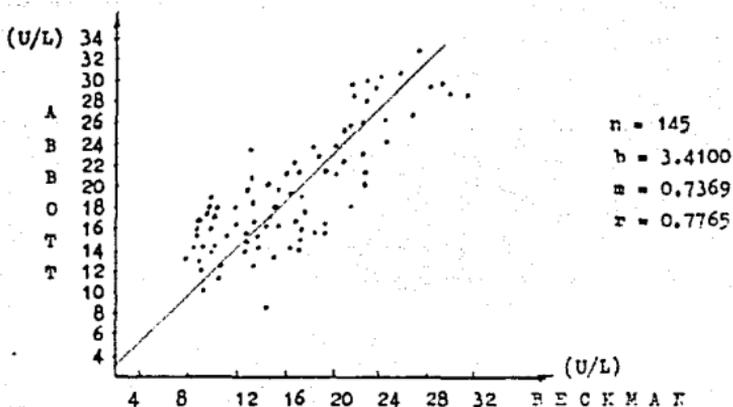


fig. 18: Gráfica de correlación de los niveles de actividad de AST determinados por los métodos Abbott y Beckman.

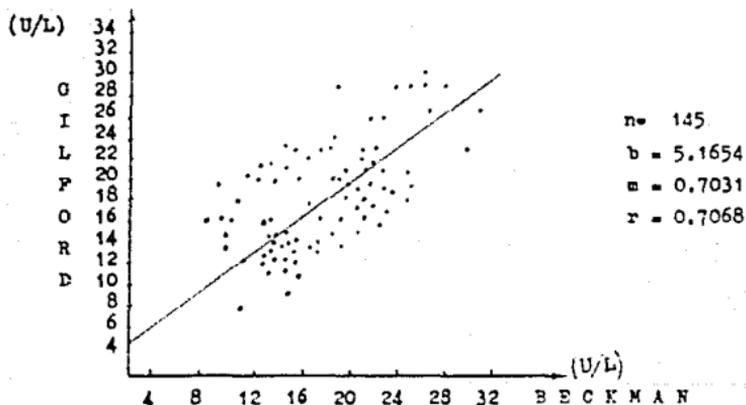


fig. 19: Gráfica de correlación de los niveles de actividad de AST determinados por los métodos Beckman y Gilford.

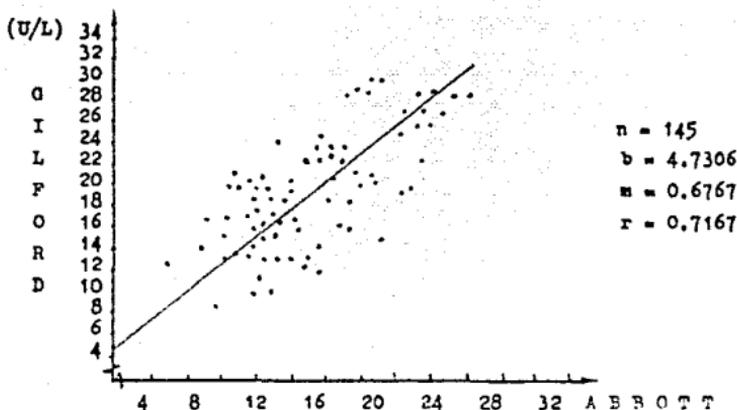


fig. 20: Gráfica de correlación de los niveles de actividad de AST determinados por los métodos Abbott y Gilford, (U/L)

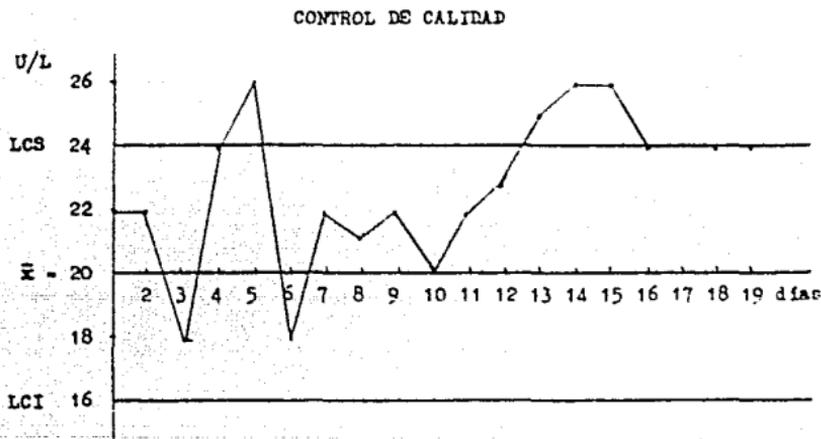


fig. 21: Gráfica de Control de Calidad de la determinación de AST en el suero control por el método Abbott ( $V.R. = 20 \pm 4$ ).

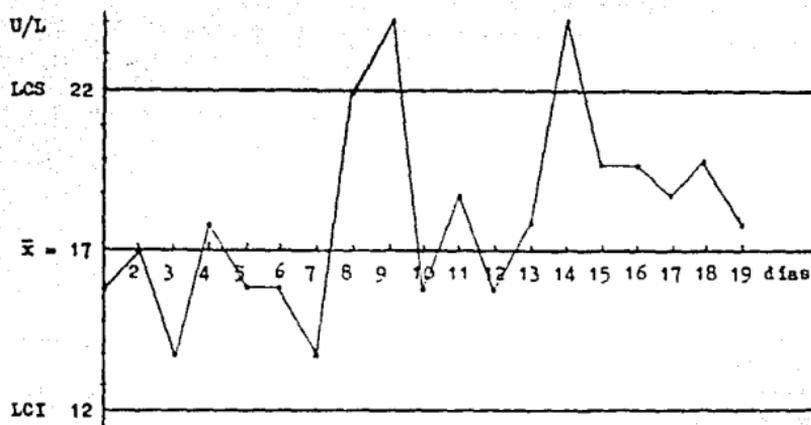


fig. 22: Gráfica de Control de Calidad de la determinación de AST en el suero control por el método Beckman (V.R.=  $17 \pm 5$ ).

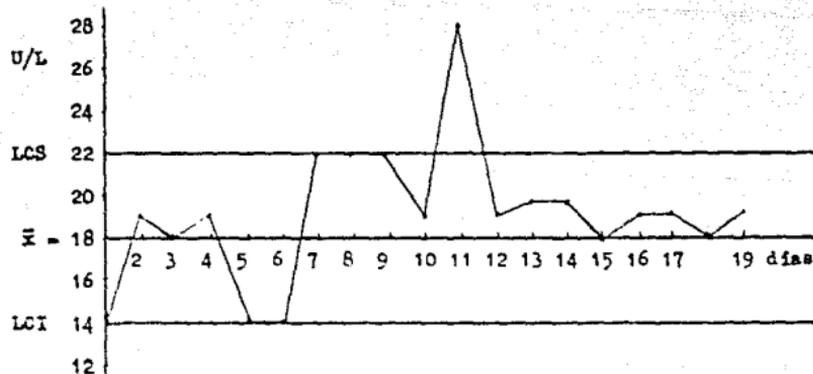


fig. 23: Gráfica de Control de Calidad de la determinación de AST en el suero control por el método Gilford (V.R.=  $18 \pm 4$ ).

LCS= Límite de Control Superior

LCI= Límite de Control Inferior

## VI. DISCUSION

Las muestras aleatorias se extrajeron de 150 personas clínicamente sanas, el 36 por ciento fueron de estudiantes de la FES-Cuautitlan, y el 64 por ciento restante de muestras piloto de donadores altruistas del Banco de Sangre del Centro Médico La Raza. Para el caso de los donadores la cantidad total de sangre extraída es de 500 ml, por lo tanto se obtuvo una estimación promedio de actividad enzimática para cada grupo por el representaba una variable más de diferenciación. El 36% presentó una media de  $18 \pm 6.3$  U/L en hombres y de  $13.5 \pm 3.6$  U/L en mujeres; en el 64% los hombres presentaron una estimación de valor promedio de  $19 \pm 6.7$  U/L y las mujeres de  $14 \pm 4.7$  U/L sin considerar una distribución homogénea de edades. En conjunto se obtuvieron 120 - muestras de hombres y 30 de mujeres por lo que se decidió realizar el análisis estadístico considerando solamente el factor sexo como índice de separación planteando un modelo que permitiera encontrar además la relación de actividad enzimática de AST con la edad.

La obtención de Valores de Referencia para delimitar la subjetiva zona de "normalidad" de la población de interés se realizó por tres métodos con el mismo fundamento enzimático pero manufacturados por laboratorios diferentes, por lo tanto, también se plantearon las condiciones necesarias para establecer si existe alguna diferencia en los valores reportados al ser determinados por diversos métodos.

El análisis estadístico no es un proceso capaz de generar información, sino que ayuda para presentar los datos e interpretarlos. La distribución no-gaussiana de la mayoría de parámetros biológicos que pueden ser analizados hacen preferir métodos estadísticos no paramétricos que no asumen ningún tipo de distribución de la población para obtener valores de referencia aunque requieren un número de muestra - mayor que los métodos paramétricos. Por ello se realizó la estimación de los percentiles 2.5% y 97.5% con intervalo de confianza del 95% al considerarse de mayor utilidad.

En la estimación de percentiles los límites consideran que existe una probabilidad en veinte (0,05) de excluir cierta cantidad de los valores de población proporcionando el nivel de significación de la prueba.

Los Herrera (13) proporciona una tabla que muestra los percentiles requeridos para asegurar con alta probabilidad la exclusión de más del 5% de los valores de población y menos que el 15% de los mismos. El 5% es deseable al defender un diagnóstico diferencial cuando se presentan ciertos síntomas o al estudiar sujetos de una pequeña población, el 15% es útil al defender grupos de individuos sanos de la proporción reservada. Se recomienda también expresar el percentil como un rango. En caso de no tener el número de muestras tabuladas se puede interpolar linealmente entre los valores más próximos. Así, en la muestra masculina los límites se encuentran entre los valores 1 a 7 con 90% de confianza y en la muestra de mujeres entre los valores 1 a 5 con 70% de confianza. Además los percentiles que aseguran con alta probabilidad la exclusión de más del 5% de los valores son: 11,56 para 120 muestras y 9,42 para 90 muestras. Reed y Henry (28) proporcionan intervalos de confianza no paramétricos del 90 y 70% para los límites normales. Con estas referencias se confirman los percentiles calculados para las muestras de trabajo.

Los datos de la tabla 10 muestran rangos semejantes dentro de cada grupo que incluyen a los tres métodos de determinación. Aquí se resalta la importancia de los valores extremos ya que en el caso de las muestras masculinas cinco de ciento veinte presentaron valores por arriba de 35 U/L por los tres métodos. Considerando hipotéticamente a la muestra total como de distribución gaussiana estos valores sobrepasarían el límite superior de  $\bar{X} \pm 2s$ , por ello y a pesar de no poder considerarlos como valores desplazados (outliers) propiamente dichos por no mostrar gran divergencia entre el último dato y el siguiente anterior, se descartan al realizar la estimación de percentiles ya que además, aún representando el 4% del grupo estimado

elevarían el límite superior en 9 U/L y se prefiere asegurar un menor rango más confiable. La precisión que es el error debido al azar se expresa en términos de la desviación estándar  $s$  para cada técnica y al disminuir el error se aumenta la potencialidad diagnóstica de la determinación, razón por la que se prefieren zonas normales estrechas.

En clínica los valores descartados no necesariamente sugieren -- anormalidad de la persona con respecto a sus niveles de actividad de AST en suero aunque podrían tratarse de casos asintomáticos o subclínicos comprobables con un grupo de pruebas químicas anexas que no -- obedecen a los objetivos del presente trabajo.

La estadística en general da exactitud al conocimiento biológico pero no debe perderse de vista que la variabilidad biológica está sujeta a la probabilidad de interrelación con otros parámetros como el sexo, la edad, la raza, el peso, el clima, la geografía, la estación del año, la dieta, la hora del día en que se extrae la muestra, el ciclo menstrual, el estado de ayuno de la persona o las variaciones de un día para otro que complican al establecimiento de la zona normal por el mayor o menor grado de inexactitud que originan, sin -- embargo, para la determinación de AST no se han comprobado estadísticamente influencias significativas de la mayoría de factores mencionados.

Manifestando la variabilidad biológica de las personas los valores de referencia promedio para hombres son de 10-29 U/L y para mujeres de 6-23 U/L recordando que el número de muestra del grupo de las mujeres solo permite utilizar los valores más bajos y más altos registrados como límites de referencia para cada método, cuyo valor -- promedio es igual al que se obtiene si se analizan las 90 determinaciones juntas.

Aún no se define con precisión la estabilidad de AST en suero, pero se tienen reportes de que la pérdida de actividad se reduce al -- máximo almacenando el suero a 0-4°C durante 1 a 3 días (hasta 7 a 10

días) recomendando congelar a  $-20^{\circ}\text{C}$  si se conserva por más tiempo. A temperatura ambiente las muestras son estables de 3 a 14 días aunque puede ocurrir disminución de actividad hasta en un 40% dependiendo de la muestra. La isoenzima presente en los sueros normales es esencialmente termoestable, por lo tanto la determinación de AST en suero puede realizarse en muestras conservadas en refrigeración entre  $-2-8^{\circ}\text{C}$ , de preferencia no hemolizadas, ya que no se aprecia una disminución de actividad considerable en el lapso de una semana.

Young y cols. reportan un amplio estudio sobre sustancias de uso farmacológico principalmente que podrían afectar la determinación de AST en aumentos aparentes de estar presentes en el suero. Esterilidad y turbidez dan lecturas iniciales mayores pero no interfieren en la determinación.

Los laboratorios Abbott y Beckman precisaron sus métodos en una población heterogénea sin clasificar por sexo a sus muestras. Los rangos de normalidad para cada uno son de 10-30 U/L a  $37^{\circ}\text{C}$  y 7-24 U por litro a  $30^{\circ}\text{C}$  respectivamente. Gilford reporta una gamma de 8-27 U/L para hombres y de 7-26 U/L para mujeres a  $30^{\circ}\text{C}$ , todos determinados a 340 nm de  $\lambda$ . Los valores de referencia obtenidos para nuestra población son semejantes y se realizaron en un espectrofotómetro digital Perkin-Elmer 35 que ofrece buen rendimiento en la práctica. Cabe hacer notar que las condiciones de trabajo son diferentes empleando una  $\lambda$  de 365 nm a  $25^{\circ}\text{C}$ . El factor de conversión para mayores condiciones de temperatura es mayor que la unidad (1.38 de  $25^{\circ}\text{C}$  a  $30^{\circ}\text{C}$  y 1.96 de  $25^{\circ}\text{C}$  a  $37^{\circ}\text{C}$ ), entonces esperaríamos un rango superior a los reportados pero además de trabajar con muestras poblacionales diferentes la  $\lambda$  no es la de la zona de máxima actividad de la coenzima - indicadora y el coeficiente de absortividad molar es menor que a 340 nm proporcionando un cálculo de actividad mayor para una misma muestra, dada la relación inversa de dichas variables.

El método espectrofotométrico UV basado en la prueba óptica es recomendable para determinar actividades enzimáticas considerando siem

pre las condiciones de longitud de onda y temperatura de reacción. Es importante disponer de material de uso exclusivo para estas determinaciones y ser cuidadosos con su limpieza evitando residuos detergentes o iónicos así como el evitar dejar las huellas de los dedos sobre la superficie de celdillas espectrofotométricas ya que constituyen causas de error.

La exactitud de la determinación de AST se estima mediante un análisis de correlación entre los resultados de cada ensayo. La tabla - 17 no presenta índices de correlación óptimos entre los métodos por lo que no podrían extrapolarse datos de un sistema a otro, sin embargo solo demuestran la gran dispersión de puntos sin que difieran notablemente a las medias de población en cuanto a los niveles de actividad de AST. Este análisis se realizó para comprobar o apoyar al Análisis de Varianza de efectos aleatorios entre métodos, en donde al aceptarse la hipótesis de igualdad  $H_0$  no se demostraron diferencias estadísticamente significativas entre la precisión de los métodos enzimáticos inferidos, utilizando la tabla F que agrupa razones de varianzas RV a diferentes grados de libertad.

Las modificaciones a los procedimientos de determinación de actividad enzimática se adaptan a las necesidades del Laboratorio respetando el fundamento general. Así, otros parámetros de comparación entre métodos pueden basarse en el tiempo de la determinación y en la cantidad y estabilidad de los reactivos.

El sistema Abbott permite realizar 15 determinaciones en 10 minutos efectivos de reacción y el reactivo es estable aún 7 días después de ser reconstituido si se conserva entre 2-8°C; con el sistema Beckman se realizan 15 determinaciones en 5 minutos efectivos y el reactivo conserva su estabilidad por dos días; por último, el sistema Gilford permite realizar 6 determinaciones en 1 minuto efectivo y 4 días después el reactivo reconstituido y refrigerado es estable. Además para el total de determinaciones se requirieron 86 viales de 12 ml de Laboratorios Abbott, 48 viales de 20 ml de Laboratorios --

Beckman y 103 viales de 7 ml de Laboratorios Gilford.

Los coeficientes de variación CV entre la muestra total delimitada para cada método son muy semejantes con valor medio de 28, parámetro que también apoya la prueba de hipótesis de igualdad entre las medias de población aunque las diferencias en frecuencias de valores de actividad proporciona índices de correlación relativamente bajos.

Las muestras se agruparon en bloques de acuerdo a la edad de los donadores quienes presentaron un rango de 18 a 49 años con una moda de 23 años, y se realizó un análisis de varianza con los niveles promedio de actividad enzimática al no demostrarse diferencias significativas entre los métodos empleados. A pesar de aceptarse la hipótesis de igualdad no se puede inferir totalmente con respecto al efecto de la edad sobre los niveles de actividad sérica de AST, para hacerlo se requiere obtener un mayor número de muestras de cada bloque de cinco edades sobre todo de personas mayores a 30 años que es además el grupo de mayor riesgo de afecciones cardíacas.

Finalmente, las gráficas de Control de Shewart establecidas permiten detectar otras causas de variabilidad no consideradas. Al graficar los valores promedio de la determinación enzimática del suero — control de Gilford por cada uno de los tres métodos empleados, los valores extremos se compensan mutuamente como se aprecia en las figuras 21, 22 y 23, aunque al analizarlos en forma individual se tienen valores tan altos como 28, 30 y 33 U/L debido a variaciones de energía eléctrica durante la determinación o al aumento de temperatura del compartimento de la celda fotoeléctrica del espectrofotómetro. — Esto apoya la observación de que a mayor número de muestras se disminuye el error hasta cierto límite.

## VII. CONCLUSIONES

- El tamaño de muestra recopilado permitió utilizar una estimación de percentiles no paramétrica que no asume distribución poblacional durante el tratamiento estadístico y que resulta tan confiable como los métodos paramétricos.
- Los rangos estimados por los percentiles 2.5% y 97.5% para cada uno de los métodos utilizados son semejantes para cada sexo con un valor promedio en hombres de 10-29 U/L, y de 6-23 U/L en mujeres; como se aprecia, el rango para hombres es mayor que para las mujeres debido a una variabilidad biológica natural.
- Los valores extremos no pueden aceptarse o rechazarse únicamente con bases estadísticas, aún así considerando a la muestra como de distribución normal; por experiencia en clínica se descartaron valores entre 35 y 50 U/L de actividad de AST, aunque estos valores no pueden asociarse con un estado de "anormalidad" clínica al considerar la distribución bayesiana de todo padecimiento donde es incierto delimitar zonas de salud y enfermedad como una situación puntual.
- No se observan diferencias significativas entre los valores de actividad obtenidos en una misma muestra por tres métodos diferentes, manufacturados comercialmente por los Laboratorios Abbott, Beckman y Gilford respectivamente, ya que el principio teórico de reacción es el mismo y la composición semejante. A pesar de que el coeficiente de variación entre los grupos es casi igual la gran dispersión de valores no permite tener una óptima correlación entre los métodos restándole exactitud a la determinación.

- Por precisión ningún método es mejor que otro, aunque el método de Gilford relativamente es más rápido, el método Beckman es más económico y el método Abbett ofrece mayor rendimiento a largo plazo al ser estable por más tiempo después de ser reconstituido.
- Los valores de referencia que delimitan una zona de "normalidad" permiten utilizar la determinación de múltiples productos biológicos como la enzima AST, en el diagnóstico diferencial de algunos padecimientos al estructurar perfiles enzimáticos.

VIII. REFERENCIAS

- 1) AWAPARA J., SEALE B., "Distribution of Transaminases in Rat Organs" *J. Biol. Chem.*, 194(2): 497-502 (1952).
- 2) BONNIER G., TEDIN O., (1966), Bioestadística: Los métodos estadísticos para la valoración de experimentos biológicos, Ed. Acribia, Zaragoza España, 1-20 pp.
- 3) DANIEL W.W., (1984), Bioestadística: Bases para el análisis de las Ciencias de la Salud, Ed. LIMUSA, México D.F., Cap. 7 y 11: 193-241 y 359-386, 155-57 pp.
- 4) DAVIDSOHN I., HENRY J.B., (1981), Diagnóstico Clínico por el Laboratorio, 6a.ed., Salvat Editores S.A., Barcelona España, 645-71 pp.
- 5) EL'SHTEIN N.V., LONO E.R., MARDNA U.B., KHEINLA Y.Y., KHERMLIN E.K., "Experience in using Cimetidine in patients with duodenal ulcer", *Klin. Med. (MOSC)*, 62(10): 44-47 (1984).
- 6) FARRERAS V.F., DOMARUS A.V., ROZMAN C., (1978), Medicina Interna, Ed. Marín S.A., México D.F., 198, 276 y 463 pp.
- 7) FRIMAN L., PERSSON U., UDFN R., "Recording of bone marrow activity in liver-spleen scintigraphy", *Acta Radiol. Diagn.* 25(6): 477-480 (1984).
- 8) GUNTON A.C., (1984), Tratado de Fisiología Médica, 6a.ed., Nva. Ed. Interamericana, México D.F., 162, 203 pp.
- 9) HAID E., LEHMANN P., ZIEGENHORN J., "Molar Absorptivities of B-NAD and B-NADH at 260 nm", *Clin. Chem.*, 21(7): 884-887 (1975).

- 10) HANTAK I., RAPOS D., "Characteristic of biochemical entrance examinations in Hepatopathies confirmed on biopsy", *Cesk. Gastroenterol. VYZ.*, 41(3): 129-135 (1987)
- 11) HARVEY A.M., JOHNS R.J., McKUSICK V.A., OWENS A.H., ROSS R.S., -- (1988), Tratado de Medicina Interna, Vol. I-VI, Ed. Interamericana McGraw-Hill, México D.F., 256-57, 712-13 pp.
- 12) HENRY R.J., CANNON D.C., WINKELMAN J.W., (1980), Química Clínica, (Principios y Técnicas), Vol. I y II, 2a.ed., Ed. JIMS, Barcelona España, I:26-28,38-40, Cap.12 y 13: 285-338 y 339-365; II: Cap.21: 821-27, 880-92, 907-13 pp.
- 13) HERRERA L., "The Precision of Percentiles in establishing Formal Limits in medicine", *J. Lab. & Clin. Med.*, 52(1): 34-42 (1958).
- 14) HICKMAN R., OAKLAND C., INNES C.R., McLEOD H., TERBLANCHE J., "The effect of Hepatic Devascularization in the pig upon the energy -- charge and ketone ratio", *J. Hepatol.(AMST)* 6(2): 193-200 (1988).
- 15) HORECKER B.L., KORNBERG A., "The Extinction Coefficients of the reduced band of Pyridins Nucleotides", *J. Biol. Chem.*, 175 (1) : 385-399 (1948).
- 16) HUGON J., TABARAUD F., RIGAUD M., VALLAT J.M., DUMAS M., "Glutamate dehydrogenase and Aspartate amino transferase in Leukocytes on patients with Motor Neuron Disease", *Neurology* 39(7): 956-958 (1989).
- 17) INTERNATIONAL UNION OF BIOCHEMISTRY, (1970), Enzyme Nomenclature, Recommendations of the nomenclature committee of the IUB on the Nomenclature and Classification of Enzymes, Academic Press Inc., USA, 3-10, 16, 21-22, 188 pp.

- 18) KARMEN A., WROBLEWSKI F., LADUE J.S., "Transaminase activity in - human blood", J. Clin. Inv., 34(1): 126-131 (1955).
- 19) KARMEN A., Appendix: "A note on the Spectrophotometric assay of - Glutamic-Oxalacetic Transaminase in human blood serum", J. Clin. Inv., 34(1): 131-133 (1955).
- 20) KUBO T., KIHARA M., KAUNYN M., "Electrical stimulation-evoked re- lease of endogenous Aspartate from rat medulla oblongata slices: - Effects of inhibitors of AST and GABA transaminase"Schwiedeberg's Arch. Pharmacol., 341(3): 221-224 (1990).
- 21) LEHNINGER A.L., (1982), Bioquímica: Las Bases Moleculares de la Estructura y Función Celular, 2a.ed., Ed. Omega S.A., Barcelona España, Cap. 8 y 9: 189-222 y 223-254, 350-51, 574-77 pp.
- 22) LYNCH H.J., RAFAEL S.S., MELLOR L.D., SPARE P.D., INWOOD M.J.H., (1985), Métodos de Laboratorio, 2a.ed., Nva. Ed. Interamericana, México D.F., 234, 344 y 352 pp.
- 23) McCOMB R.B., BOND L.W., BURNETT R.W., KNECH R.C., BOWERS G.N.Jr., "Determination of the Molar Absorptivity of NADH", Clin. Chem., 22(2): 141-150 (1976).
- 24) MUÑOZ-BLANCO J., LAIN G.B., CARDENAS T.J., "Characterization of an L-aspartate amino transferase activity in Chlamydomones reinhardtii", Physiol. Plant., 74(3): 433-439 (1988).
- 25) NORDBACK I., AUVINEN O., AUTIO V., "Clinicobiochemical factors in predicting gallstones in necrotizing pancreatitis", Surg. Gynecol. Obstet., 161(2): 139-141 (1985).

- 26) PEREZ A.M., (1975), Métodos Fisicoquímicos de Análisis, Ed. URMO, Bilbao España, 55-68 pp.
- 27) RAWLES J.M., METCALFE H.J., SHIRREFFS C., JENNINGS K., LEMURE A. C.F., "Association of patients delay with symptoms, cardiac enzymes and outcome in acute myocardial infarction". Eur. Hearth. J., 11(7): 643-648 (1990).
- 28) REED A.H., HENRY R.J., MASON W.B., "Influence of Statistical Method used on the resulting estimate of Normal Range", Clin. Chem., 17(4): 275-284 (1971).
- 29) RICHTERICH R., COLCMBO J.P., (1983), Química Clínica, 2a.ed., Salvat Editores S.A., Barcelona España.
- 30) ROBERTS-THOMSON I.C., TOULI J., "Abnormal response to Morphine-Neostigmine in patients with underfined biliary type pain", GUT, 26(12): 1367-1372 (1986).
- 31) RODGERSON D.O., OSBERG I.M., "Sources of error in Spectrophotometric measurement of Aspartate aminotransferase and Alanine amino transferase activities in serum", Clin.Chem., 20(1):43-50 (1974).
- 32) SADA E., TASHIRO S., MORINO Y., "The significance of serum Mitochondrial Aspartate amino transferase activity in obstructive - jaundice: Experimental and clinical studies", JPN. J. Surg., 20(4): 392-405 (1990).
- 33) SCHEPLER W.C., (1981), Bioestadística, 1a.ed., Fondo Educativo Interamericano, México D.F., Cap. 8 y 9: 122-147 y 148-164 pp.

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

- 34) THE ENZIMES STRUCTURE and CONTROL , Vol. I-XVIII, (1970), 3a.ed., Editada por Paul D. Boyer, Academic Press Inc, USA, IX: Cap. 10: 379 -481 pp.
- 35) TIETZ N.W., (1972), Química Clínica Moderna , 1a.ed., Nva. Ed. Interamericana S.A., México D.F., Cap. 8: 372-403, 456-457 pp.
- 36) WERNER M., YOUNG D.S., HEILBRON D.C., DIXON W.J., Letter: "Normal Ranges and Gaussian Distributions", Clin.Chem., 15(9): 809 (1970).
- 37) WILKINSON J.H., (1976), Diagnostic Enzymology, Edward, Arnold (Publishers) L.T.D. Distributed by Year Book Medical Publishers Inc, USA.
- 38) WILLARD H.E., MERRITT L.L., DEAN J.A., (1984), Métodos Instrumentales de Análisis, CECSA, México D.F., 61-100 pp.
- 39) YOUNG D.S., PESTANER L.C., GIBBERMAN V., "Effects of Drugs on Clinical Laboratory Tests", Clin. Chem., 21(5): 257D-261D (1975).
- 40) ZIEGENMORN J., SENN M., BUCHER T., " Molar Absorptivities of  $\beta$ -NADH and  $\beta$ -NADPH ", Clin. Chem., 22(2): 151-160 (1976).



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN  
SECRETARIA ACADEMICA  
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR  
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

U. N. A. M.  
FACULTAD DE ESTUDIOS  
SUPERIORES CUAUTITLAN



Departamento de  
Exámenes Profesionales

DR. JAIME KELLER TORRES  
DIRECTOR DE LA FES-CUAUTITLAN  
P R E S E N T E .

AT'NI: ING. RAFAEL RODRIGUEZ CERALLOS  
Jefe del Departamento de Exámenes  
Profesionales de la F.E.S. - C.

Con base en el art. 29 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS TITULADA:  
"Estudio de preformulación de dispersiones sólidas de furosemda  
como una técnica de mejoramiento de su cinética de disolución".

que presenta la pasante: Luz María Lara Quirveda  
con número de cuenta: 8105529-8 para obtener el TITULO de:  
Química Farmacéutica Biológica

Considerando que dicha tesis reúne los requisitos necesarios para ser discutida en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

A T E N T A M E N T E .  
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"  
Cuautitlán Izcalli, Edo. de Méx., a 7 de junio de 1991

PRESIDENTE DESS. Rodolfo Cruz Rodríguez  
VOCAL G.F.B. José A. Garduño Rojas  
SECRETARIO M. en C. Fernando Alvarez Nuñez  
PRIMER SUPLENTE G.F.B. Victor Sánchez Jacinto  
SEGUNDO SUPLENTE G.F.B. David Quintana Guerrero

**MI sincero agradecimiento a las siguientes personas:**

**D.E.S.S. Rodolfo Cruz Rodríguez, por su inapreciable apoyo como director de esta tesis, por su entusiasmo y por haberme dado la oportunidad de realizar libremente un trabajo de investigación que hizo realidad un sueño personal.**

**Q.F.B. José A. Garduño Rosas, por su valiosa y desinteresada colaboración desde el inicio del trabajo.**

**M. en C. Fernando A. Álvarez Nuñez y Q.F.B. David Quintanar Guerrero por sus valiosas observaciones y estímulos.**

**M. en C. Enrique Angeles Anguiano por su asesoría y comentarios de gran valía en la parte de espectrofotometría de infrarrojo y a la sección de Química orgánica por las facilidades brindadas.**

**Técnico Académico Rodolfo Robles Gómez por su asesoría, dedicación y entusiasmo y al Departamento de microscopía electrónica de esta Facultad por su invaluable ayuda.**

**Profesora Bertha Rodríguez Sámano, por su inapreciable ayuda siempre que fue necesario.**

**A la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (D.G.A.P.A.) por el apoyo recibido a lo largo de un año para la terminación de este trabajo.**

**A la FES-Cuautitlan, y en especial a la sección Farmacia por su apoyo en diversas formas.**

**EL PRESENTE TRABAJO SE REALIZO EN EL LABORATORIO DE INVESTIGACION DE LA SECCION FARMACIA DE LA FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO.**