

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA



DETERMINACION CINETICA DE CUATRO ENZIMAS EN CASOS
NORMALES Y PATOLOGICOS.

que para obtener el título de:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
presenta:
MALLINALLI ROBLES SORIANO

MEXICO, D. F.

1973.

M-172424



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

A MIS PADRES Y HERMANOS:

A MIS MAESTROS Y AMIGOS:

Q. F. B. OSCAR AMOR DODERO

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio Clínico del Hospital de Gineco Obstetricia No. 2 del I. M. S. S. bajo la dirección del Dr. José Luna del Villar y Q. F. B. Guillermo Burgos Tovar, a quienes agradezco infinitamente su colaboración.

PRESIDENTE	Profr.	OSCAR AMOR DODERO
VOCAL	Profra.	ESTELA SANCHEZ DE J.
SECRETARIO	"	JAVIER PEREZ VILLASEÑOR

JURADO

1er. SUPLENTE	"	SERGIO ESTRADA ORIHUELA
2do. SUPLENTE	"	ENRIQUE PIÑA GARZA

SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA: Laboratorio Clínico del Hospital de Gineco Obstetricia/ No. 2 C. M. N. del I. M. S. S.

NOMBRE	ROBLES S. MALLINALLI
ASESOR DEL TEMA	OSCAR AMOR DODERO
SUPERVISOR TECNICO	Dr. JOSE LUNA VILLAR

A B R E V I A T U R A S

DHL	Deshidrogenasa Láctica.
DHHB	Deshidrogenasa alfa-hidroxibutírica.
TGP	Transaminasa Glutámico Pirúvica.
TGO	Transaminasa Glutámico Oxalacética.
DHM	Deshidrogenasa Málica.
NAD	Nicotinamin-Adenin Dinucleótido. (antes DPN).
ADP	Nicotinamin-Adenin Dinucleótido Fosfato (antes TPN)
mU/ml	Miliunidades internacionales por mililitro.
Rib.	Ribosa.
P	Fosfato.
Ad.	Adenina.
nm	nanómetros (1×10^{-9} metros).
Å	Angstrom.
U.V.	Ultra Violeta. (radiación empleada en el método espectrofotométrico).
m	moles.
min	minuto.
ác.	ácido.
et al y colaboradores.
glutám.	glutámico.
I.M.S.S.	Instituto Mexicano del Seguro Social.
C.M.N.	Centro Médico Nacional.
de	Desviación estándar.

C O N T E N I D O

	Pag.
Introducción	1
Consideraciones Generales	3
Material y Métodos	9
Resultados	27
Comentarios	30
Comentarios a los resultados	34
Resumen	37
Bibliografía	38

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

Las primeras investigaciones sobre enzimas se remontan a principios del siglo XIX, pero los avances más significativos en este campo datan de los últimos cuarenta años. La primera identificación de una enzima se realizó en 1833 por Payen y Persoz 1/, quienes aislaron de la malta una fracción termolábil precipitable con alcohol y capaz de convertir el almidón en glucosa.

Años después Liebig 2/ postuló que las fermentaciones y otros procesos semejantes se debían a la actividad de sustancias químicas específicas y Pasteur agregó que los procesos enzimáticos de la fermentación, eran inseparables de la célula viva.

Los estudios de Emil Fisher 3/ sobre especificidad enzimática, a finales del siglo pasado, así como la obtención de enzimas puras por Willstatter 4/ y la cristalización de éstas por Sumner 5/, permitieron, con las aportaciones de Michaelis y Menten 6/, avanzar rápidamente en el conocimiento de la estructura y comportamiento físico-químico de las enzimas.

El significado de estos catalizadores en el metabolismo celular es bien conocido y sabemos que el patrón enzimático de cada tejido determina sus funciones fisiológicas. El suero sanguíneo proporciona un interesante material para estudiar alteraciones celulares basándose en la elevación o disminución de enzimas circulantes, ya que en situaciones normales éstas se mantienen dentro de límites estrechos.

La aplicación diagnóstica de las determinaciones enzimáticas sólo aparecen después de 1936 cuando Warburg 7/ desarrolla una metodología basada en la propiedad que tienen las coenzimas NAD y NADP de absorber la luz a 340 nm.

Muchas enzimas se han investigado exhaustivamente en diversos estados patológicos y paradójicamente muy pocas han recibido aceptación para usarlas rutinariamente en la clínica. Entre las más conocidas tenemos:

- a) Enzimas digestivas de estómago, intestino delgado y páncreas: lipasa, amilasa, pepsina y tripsina.
- b) Fosfatasa ácida y alcalina.
- c) Aldolasa y fosfo-hexosa isomerasa.
- d) Transaminasas y deshidrogenasas.

El objeto de nuestro trabajo es estudiar cuatro enzimas: DHL, DHHB, TGP y TGO, que por su valor diagnóstico son útiles en el laboratorio. Tomando en cuenta que los métodos usuales para determinarlas se efectúan generalmente por colorimetría y ya que estas técnicas no parecen ser las ideales por estar sujetas a variaciones no siempre fáciles de controlar. Se considera la necesidad de implantar un sistema analítico sin los inconvenientes de los métodos colorimétricos, pero que al mismo tiempo sea accesible al laboratorio clínico.

Las determinaciones espectrofotométricas de enzimas, tanto directas (deshidrogenasas) como indirectas (transaminasas), particularmente para el grupo DPN dependiente, significa una mayor precisión y posiblemente este sistema de análisis permita discriminar mejor los diferentes estados patológicos que se estudian. Algunos autores están de acuerdo con esta opinión, entre ellos Amador y colaboradores 8/, quienes al estudiar casos de infarto de miocardio, no encontraron buena correlación entre la determinación colorimétrica de TGO y los datos clínicos, en tanto que al determinar la misma enzima por espectrofotometría, la correlación fue satisfactoria.

CONSIDERACIONES GENERALES

CONCEPTO DE ENZIMA.- Las enzimas son sustancias de naturaleza proteica con actividad biológica y propiedades catalíticas. Estas propiedades son importantes en varios aspectos: las enzimas son catalizadores eficientes, y bajo condiciones óptimas la mayoría de las reacciones enzimáticas se efectúan a una velocidad de 10^8 a 10^{11} veces más rápidamente que las correspondientes reacciones no enzimáticas. Las enzimas son específicas en relación a la naturaleza de la reacción catalizada y a la estructura del substrato utilizado. El espectro de las reacciones catalizadas es muy amplio. Las enzimas en sí mismas están sujetas a diversos controles por parte de la célula y su velocidad de síntesis, así como su concentración final quedan bajo control genético.

Algunas enzimas requieren de una fracción no proteica o cofactor para desarrollar su actividad, éstos se enlazan a la proteína y se les denomina grupo prostético cuando la unión es fuerte, pero cuando es débil se les llama coenzimas.

Además muchas enzimas requieren para desarrollar su actividad la presencia de iones metálicos como Mg^{++} y Mn^{++} , entre otros. Durante los procesos de purificación pueden perderse los cofactores débilmente enlazados, lo que se traduce en una disminución o pérdida de su actividad, aún cuando la porción proteica de la enzima se conserve pura. Con el término de apoenzima designamos la porción proteica de la enzima, mientras que la enzima completa se ha denominado Holoenzima.

FACTORES QUE INFLUYEN EN LA VELOCIDAD DE REACCION ENZIMATICA.- Los principales factores que determinan la velocidad inicial de una reacción en particular son: Concentración de enzima, concentración del substrato, pH , temperatura y

la presencia de activadores e inhibidores.

CLASIFICACION DE ENZIMAS.- Se han propuesto diferentes clasificaciones basándose en el tipo de reacción química que catalizan, pero los nombres de las enzimas han sido arbitrarios e incompatibles creando cierta confusión.

En 1961 la Comisión de enzimas de la Unión Internacional de Bioquímica (I.U.B.) 9/, estableció una clasificación y nomenclatura sistemática. Recomienda que para la nomenclatura se tome como base la reacción total, como se expresa por la ecuación formal. El sistema ideado procura una clasificación de las enzimas y un sistema para numerarlas. El número de cada enzima contiene cuatro dígitos separados por puntos.

El primer número indica a cual de las seis divisiones principales, o grupos de enzimas, corresponde la enzima de que se trata. Estos grupos son los siguientes:

- 1.- Oxidorreductasas. Catalizan reacciones de oxidación-reducción.
- 2.- Transferasas. Catalizan reacciones de transferencia de grupos.
- 3.- Hidrolasas. Catalizan reacciones hidrolíticas.
- 4.- Liasas. Catalizan reacciones en que interviene la eliminación de un grupo, dejando un doble enlace, o la adición de un grupo a un doble enlace.
- 5.- Isomerasas. Catalizan reacciones que suponen isomerización.
- 6.- Ligasas o sintetetasas. Catalizan reacciones que consisten en la unión de dos moléculas, acopladas con la rotura de un enlace pirofosfato de ATP o de un trifosfato similar.

El 2º, 3º y 4º números, representan la subclase, sub-subclase y número de serie en la sub-

subclase respectivamente.

En donde no se ha creado una categoría específica para una enzima dada, las enzimas se alistan con una cifra final de 99, a fin de dejar espacio para nuevas subdivisiones.

UNIDADES ENZIMATICAS.- Puesto que en la mayoría de los casos no es posible determinar la cantidad de una enzima en términos absolutos, es decir, en miligramos o moles, la concentración deberá expresarse en Unidades de enzima y la I.U.B., por medio de su Comisión ha propuesto lo siguiente:

Una Unidad Internacional (U.I.) de enzima es la cantidad de ésta que en un minuto transforma una micromol de substrato bajo condiciones estandard.

La unidad definida es un valor absoluto, lo que permite comparar la actividad de diferentes enzimas, pero ocasionalmente no presenta el inconveniente de que algunas enzimas tienen actividad extremadamente alta o baja y para facilitar el manejo de unidades, se permite expresarlas como miliunidades (mU), kilounidades (KU), etc.

Para expresar la concentración de enzimas existen las siguientes definiciones:

CONCENTRACION DE UNA ENZIMA EN SOLUCION. Se expresa como U/ml.

ACTIVIDAD ESPECIFICA: Se expresa como unidades de enzimas/mg de proteína.

ACTIVIDAD MOLECULAR: Se define como unidades/micromol de enzima a concentración óptima de substrato, o sea, número de moléculas de substrato

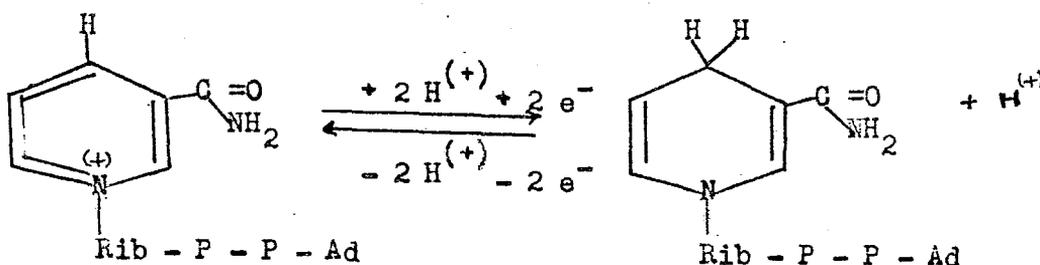
transformados por minuto por molécula de enzima.

COENZIMAS DE LAS OXIDO - REDUCTASAS

Las enzimas que transportan hidrógeno durante la fermentación, la glicolisis y en diferentes reacciones, tienen dinucleótidos como grupo activo, en ellos la base es un derivado piridínico llamado "amida del ácido nicotínico". Los nucleótidos son por tanto, nucleótidos de piridina y al unirse a dos o tres radicales fosfóricos, se les ha denominado: Difosfo-Piridín-Nucleótidos (DPN⁺) y Trifosfo-Piridín-Nucleótidos (TPN⁺). Recientemente la I.U.B., ha propuesto para el DPN el nombre de Nicotinamin-Adenin-Dinucleótido, abreviadamente NAD⁺ y para el TPN el de Nicotinamin-Adenin-Dinucleótido Fosfato, con abreviatura NADP⁺ 9/

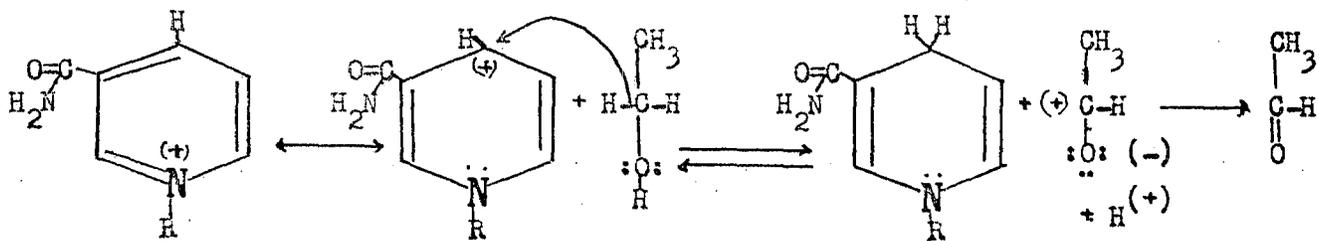
En las coenzimas el anillo piridínico está unido a la ribosa en forma de N-glicósido. Este enlace sólo es posible con el catión de piridinio que lleva hidrógeno en el átomo de nitrógeno. Mediante el ác. pirofosfórico el ribósido se une a la adenosina formando el difosfo-piridín-nucleótido o NAD⁺.

La función de estas coenzimas estriba en su capacidad para fijar el hidrógeno en forma reversible; con ello el anillo piridínico se reduce quedando sólo con dos dobles enlaces, mientras que el nitrógeno pierde su carga positiva.



Esta alteración modifica de una manera característica la absorción de la luz y el sistema reducido presenta una amplia zona de máxima absorción a 340 nm, mientras que el sistema oxidado no absorbe en esta zona. Si en una reacción se forma NADH, la absorción se desvaza paulatinamente a 340 nm. Como el aumento de la absorción lumínica puede medirse sin problemas, existe la posibilidad de seguir ópticamente la transformación $\text{NAD}^+ \longrightarrow \text{NADH}$. El aumento de la absorción por unidad de tiempo constituye una medida directa de la velocidad de reacción; si la concentración de substrato es elevada (saturación de la enzima), en este caso la absorción es proporcional a la concentración de enzima.

Al estudiar a fondo el mecanismo de fijación de hidrógeno al anillo, se han hecho dos observaciones muy notables: En primer lugar; el hidrógeno unido al anillo, se transfiere con su par de electrones, es decir, como ion hidruro; - al mismo tiempo el NAD^+ reacciona en forma mesómera que lleva la carga en posición cuatro. Un ejemplo característico lo tenemos en una reacción catalizada por la alcohol deshidrogenasa:



En segundo lugar se demostró utilizando deuterio que la reacción es estereo específica. 10/, 11/

MATERIAL Y METODOS

El material humano estuvo representado por un grupo de 56 personas aparentemente normales, 19 del sexo masculino y 37 del sexo femenino, con edad promedio de 29 años. Se les indicó ayu- no de 8 horas y se obtuvieron las muestras de -- sangre por punción venosa, el suero fue separado por centrifugación y se procedió inmediatamente a la determinación de las cuatro enzimas: DHL, DHHB, TGP y TGO. Los sueros hemolizados se des- cartaron.

Se estudiaron además 67 sueros patológicos obtenidos en pacientes del Hospital General del C.M.N. del I.M.S.S. y se agruparon en la forma -- siguiente:

17 casos de Hepatitis, 13 de Cirrosis Hepá- tica, 15 de Infarto de Miocardio y 22 de diver- -- sas patologías.

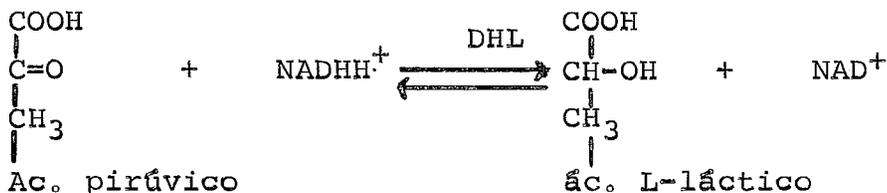
METODOS: Los métodos seleccionados para el estudio de las 4 enzimas se basa en la medida de la velocidad con que desaparece el NADH a 340 -- nm. Las lecturas cada 60 seg para los 4 méto- -- dos se realizaron en un Espectrofotómetro Gil- -- ford Digital modelo 300-N provisto de sistema de succión y block de calentamiento con temperatu- -- ras regulables a 30, 32 y 37°C. En nuestro estu- -- dio todas las lecturas se efectuaron a 32°C en -- celdilla con recorrido óptico de 1 cm.

DESHIDROGENASA LACTICA (DHL)

Esta enzima se determinó por la técnica de Wröblewski 12/; Elliott y Wilkinson 13/, cuyo -- fundamento es el siguiente:

La deshidrogenasa láctica cataliza la reduc- ción de piruvato a lactato en presencia de NADH

de acuerdo con la siguiente reacción:



REACTIVOS:

SUBSTRATO AMORTIGUADOR: Se prepara a partir de una solución 1/15M de Na_2HPO_4 y una solución 1/15M de KH_2PO_4 mezclando 85.2 ml de la solución de la sal sódica con 14.8 ml de la solución de la sal potásica. Se ajusta el pH a 7.5.

La solución de trabajo se obtiene agregando piruvato a la solución amortiguadora para obtener una concentración de 6.5×10^{-4} m.

NADHH^+ : Concentración de $2.3. \times 10^{-4}$ m.

Se empleó el producto liofilizado proporcionado por la casa Merck, el cual se reconstituyó con 3 ml del substrato-piruvato obteniéndose una cantidad suficiente para 3 pruebas.

TECNICA:

- 1.- Se regula la temperatura del block a -32°C .
- 2.- En tubo de 10 x 75 se miden 0.75 ml de substrato y se agregan 0.025 ml de la muestra.
- 3.- Mezclar bien y pasar a la celdilla mediante el aditamiento de succión.
- 4.- Después de un minuto leer cada minuto y por 5 veces a 340 nm.

CALCULOS:

El decremento promedio por min se multiplica por el factor 5,000 obtenido mediante la fórmula siguiente, y el resultado se obtiene en mU/ml.

$$\text{mU/ml} = \frac{\Delta E}{\epsilon \times d} \times 10^6 \times \frac{1}{t} \times \frac{VT}{VM}$$

ΔE = Absorción

ϵ = Coeficiente de extinción (6.22×10^3)

d = Distancia del paso de luz (1 cm).

10^6 = Factor para convertir Moles/litro o milimoles/ml a mU/ml.

t = Tiempo (1 min).

VT = Volumen total.

VM = Volumen de muestra.

$$1 \text{ mU/ml} = \frac{\Delta E}{6.22 \times 10^3 \times 1} \times 10^6 \times \frac{1}{t} \times \frac{0.775}{0.025}$$

$$1 \text{ mU/ml} = \Delta E \times 5,000$$

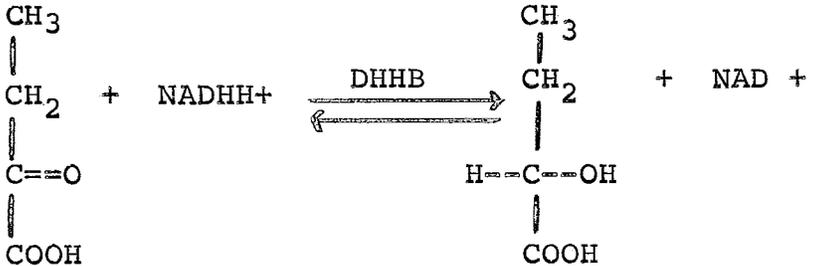
FORMULA:

Concentración de enzima = $\Delta E/\text{min} \times 5,000$
= mU/ml de suero.

Si al empezar la medición, las diferencias de extinción ($\Delta E/\text{min}$) son mayores de 0.15 a 340 nm, se repetirá la determinación empleando suero diluido a 1 + 4 con solución salina fisiológica, y se multiplicará por 5 el resultado.

DESHIDROGENAZA ALFA-HIDROXIBUTIRICA (DHHB)

Se utiliza la técnica de Wröblewski y La Due 12/, que se basa en la reducción del alfa-cetobutirato a alfa-hidroxitobutirato con NADHH⁺, según la ecuación siguiente:



Ac. alfa-cetobutírico

ác. alfa-hidroxitobutírico

En la prueba se deja actuar el suero problema sobre el alfa-cetobutirato y el NADHH⁺, midiendo el decremento de extinción a 340 nm, y temperatura constante.

REACTIVOS:

Se emplea la misma solución reguladora de fosfatos preparado en el método anterior, con la adición de alfa-cetobutirato a concentración de 3.2×10^{-3} m.

NADHH⁺. La coenzima debe tener una concentración de 2.3×10^{-4} m en la prueba. Se usaron frascos comerciales proporcionados por la casa Merck de NADHH⁺ liofilizados. Se reconstituyen con 3 ml del buffer de sustrato.

TECNICA:

1.- Se regula la temperatura del block a -32°C.

2.- En un tubo de 10 x 75 se miden 0.75 ml de substrato y se agrega 0.025 ml de la muestra.

3.- Mezclar bien y pasar a la celdilla mediante el aditamento de succión.

4.- Después de un min leer cada min por 5 veces a 340 nm.

CALCULOS:

El decremento promedio por min se multiplica por el factor 5,000, calculado en el método anterior y el resultado se obtiene en mU/ml.

FORMULA:

Concentración de enzima = $\Delta E/\text{min} \times 5,000 =$
= mU/ml.

Si las diferencias de extinción de $\Delta E/\text{min}$ al principio de la medición son mayores de 0.15 a 340 nm, se repetirá la determinación empleando suero diluido 1 + 4 con solución salina fisiológica, y se multiplica por 5 el resultado.

TRANSAMINASA CLUTAMICO PIRUVICA (TGP)

Determinación con deshidrogenasa láctica como enzima indicador.

Este método fue descrito primeramente por Henley et al 14/, y la siguiente descripción está basada en el método de Wröblewski y La Due 12/.

PRINCIPIO:

La TGP cataliza la reacción:

suelto en agua).

- II Coenzima: NADHH⁺.
- III Solución de cetoglutarato
- IV Deshidrogenasa láctica.

SOLUCIONES:

- I Amortiguador-enzima: Amortiguador de fosfato a pH 7.4, 0.1 m.

DL = alanina, 0.08 m.
DHL, 10 mg/litro.

Mezclar la DHL con la solución amortiguador-substrato.

- II Coenzima: NADHH⁺, 0.01 m.

Disolver el contenido liofilizado de NADHH⁺ en 1 ml de agua bidestilada. (se conserva a 4°C. cuatro semanas)

- III Cetoglutarato: Cetoglutarato de sodio, 0.5 m.

La solución de cetoglutarato se conserva a 4°C durante un año.

PREPARACION:

Se calienta la solución amortiguador-enzima (1) a 25°C.

TECNICA:

Se regula la temperatura del block a 32°C.

Se llevan con pipeta a un tubo de ensayo:

Solución de amortiguador-enzima.....	1.5	ml
Suero.....	0.25	ml
Solución de coenzima.....	0.025	ml

Mezclar, dejar en reposo a 25°C 5 min.

Solución de cetoglutarato.....0.025 ml

Mezclar bien, verter inmediatamente a la celdilla mediante el aditamiento de succión; medir al cabo de un minuto la extinción. Medir durante 5 minutos con intervalo de un minuto.

CALCULOS:

El decremento promedio por minuto de la extinción ($\Delta E/\text{min}$), multiplicado por el factor 1,160 obtenido mediante la fórmula siguiente, y el resultado se obtiene en mU/ml.

$$\text{mU/ml} = \frac{\Delta E}{6.22 \times 10^3 \times 1} \times 10^6 \times \frac{1}{t} \times \frac{1.8}{0.25} = 1,160 \times \Delta E$$

FORMULA:

Concentración de enzima = $\Delta E/\text{min} \times 1,160 = \text{mU/ml}$.

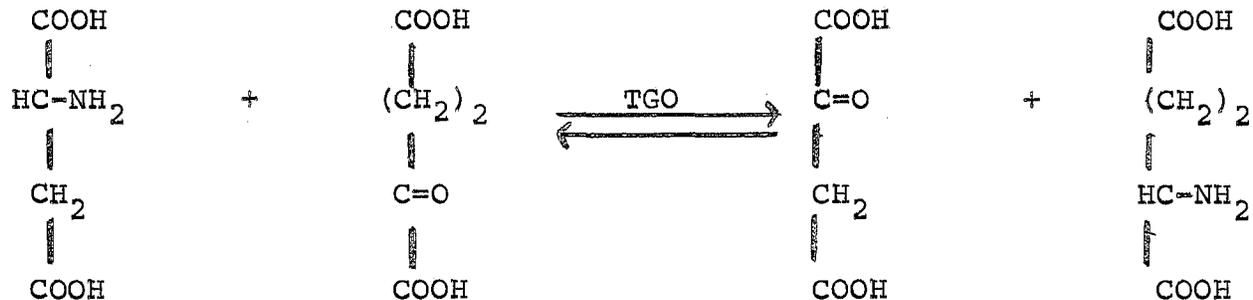
Si las diferencias de extinción $\Delta E/\text{min}$ al comenzar la medición son a 340 nm mayores de 0.1, se repite la determinación con una dilución del suero con solución salina fisiológica (1 + 4) y el resultado se multiplica por 5.

TRANSAMINASA GLUTAMICO OXALACETICA (TGO)

Determinación con deshidrogenasa málica (DHM) como enzima indicador.

PRINCIPIO:

La TGO cataliza la reacción:



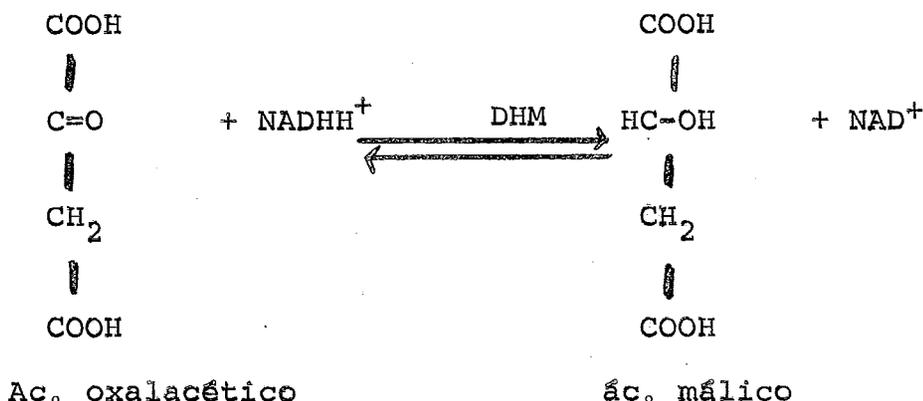
Ac. L-aspartico

ác. alfa-cetoglutárico

ác. oxalacético

ác. L-glutám.

La actividad de la transaminasa es medida por el incremento de oxalacetato con el tiempo, tal como la reacción que procede de izquierda a derecha. El oxalacetato es determinado con la reacción indicadora catalizada por la DHM.



La oxidación del NADHH^+ , que es proporcional a la cantidad de oxalacetato formado, es medido por el decremento en la densidad óptica a 340 nm (15)

SOLUCIONES DE REACTIVOS EMPLEADOS

I) Amortiguador-enzima: Amortiguador de fosfato a pH 7.4, 0.1 m.

L-aspartato, 0.25 m. (Merck)

DHM, 10 mg/litro (Merk)

DHL, 10 mg/litro (Merk)

Verter el contenido de enzima en la solución de substrato-amortiguador. (se conserva a 4°C durante 4 semanas).

II) Coenzima: NADHH^+ , 0.01 m.

Disolver el contenido del frasco conteniendo

do la coenzima liofilizada en 1 ml de agua bi-
destilada. (Se conserva a 4°C cuatro semanas).

III) Cetoglutarato: Cetoglutarato de sodio 0.5
m.

La solución de cetoglutarato se conserva a
4°C durante un año.

PREPARACION:

Se regula la temperatura de block a 32°C.

Se llevan con pipeta a un tubo de ensayo:

Solución de amortiguador-enzima.....	1.5	ml.
Suero.....	0.25	ml.
Solución de coenzima.....	0.025	ml.

Mezclar, dejar en reposo a 25°C durante --
5 min.

Solución de cetoglutarato.....	0.025	ml.
--------------------------------	-------	-----

Mezclar bien, verter inmediatamente a la --
celdilla mediante el aditamiento de succión; me-
dir al cabo de un min la extinción. Medir du--
rante 5 min con intervalo de un minuto.

CALCULO:

El decremento promedio por min de la extin-
ción ($\Delta E/\text{min}$) multiplicado por el factor 1,160
obtenido en el método anterior, y el resultado -
se exprese en mU/ml de suero.

FORMULA:

Concentración de enzima = $\Delta E/\text{min} \times 1,160$
= mU/ml.

Si las diferencias de extinción $\Delta E/\text{min}$ al

comenzar la medición son a 340 nm. mayores de ~~---~~
0.1, se repite la determinación con una dilución
del suero con solución salina fisiológica (1 + 4)
multiplicándose por 5 el resultado.

C U A D R O I
PACIENTES NORMALES

ENZIMA	No. DE CASOS	MEDIA (32° C)	DESV. ST. (32°C)	MEDIA (30° C)	DESV. ST. (30°C)	MEDIA (25° C)	DESV. ST. (25°C)
DHL	37	167.0	\pm 16.08	144.2	\pm 38.8	132.9	\pm 37.7
DHHB	46	121.6	\pm 35.7	103.3	\pm 30.4	96.2	\pm 28.1
TGP	55	13.0	\pm 8.4	9.5	\pm 6.1	8.3	\pm 5.3
TGO	56	18.3	\pm 7.6	14.1	\pm 5.9	12.6	\pm 5.3

NOTA: Los resultados están expresados en mU/ml.

C U A D R O II
 PACIENTES CON HEPATITIS
 TEMPERATURA 32°C

C A S O	DHL (mU/ml)	DHHB (mU/ml)	TGP (mU/ml)	TGO (mU/ml)
1	---	125	---	74
2	---	1550	---	151
3	320	250	---	86
4	315	190	155	104
5	400	240	43	23
6	195	110	79	169
7	299	160	118	237
8	188	110	39	93
9	326	180	81	56
10	261	142	--	223
11	133	60	58	162
12	290	150	158	274
13	271	160	232	78
14	200	110	88	91
15	234	240	95	50
16	310	140	348	534
17	---	---	1763	1578
\bar{X}	267.3	244.8	250.5	234.3
de	70.5	352	462	366.6
t	8.2	2.4	3.9	4.5
P	0.01	0.01	0.01	0.01

C U A D R O I I I
 PACIENTES CON CIRROSIS HEPATICA
 TEMPERATURA 32° C

C A S O	DHL (mU/ml)	DHFB (mU/ml)	TGP (mU/ml)	TGO (mU/ml)
1	---	225	39	50
2	308	183	23	93
3	280	210	--	--
4	271	135	23	93
5	486	235	49	357
6	327	160	--	135
7	218	98	25	98
8	625	357	53	202
9	261	142	--	223
10	200	110	88	91
11	275	150	220	290
12	415	200	35	186
13	875	105	10	19
\bar{X}	378.4	177.7	56.5	153
de	198	70.5	61.4	100.8
t	6.6	3.9	5.2	10.1
P	0.01	0.01	0.01	0.01

C U A D R O I V
 PACIENTES CON INFARTO DE MÍOCARDIO
 TEMPERATURA 32°C

C A S O	DHL (mU/ml)	DHHB (mU/ml)	TGP (mU/ml)	TGO (mU/ml)
1	564	270	29	29
2	1270	850	42	172
3	406	265	13	19
4	405	229	17	25
5	1930	1420	104	371
6	450	250	23	151
7	464	315	12	16
8	2580	1450	79	209
9	2300	1450	58	113
10	1470	1050	46	232
11	1200	870	58	255
12	975	675	17	35
13	575	---	--	56
14	1200	800	58	220
15	870	550	35	81
\bar{X}	1110.6	746	42.2	132.3
de	703.3	461.4	27.1	108.3
t	8.3	9.3	6.9	8.0
P	0.01	0.01	0.01	0.01

C U A D R O V
 PACIENTES CON DIVERSAS PATOLOGIAS
 TEMPERATURA 32°C.

P A T O L O G I A	DHL (mU/ml)	DHBB (mU/ml)	TGP (mU/ml)	TGO (mU/ml)
Cardiopatía Mixta Ateriosclerosa	900	560	204	42
Cardiopatía Reumática	470	234	203	112
Coledocolitiasis	255	130	---	---
Colecistitis Aguda	322	132	34	87
Colecistitis Aguda	585	260	179	371
Colecistitis y Pancreatitis	---	175	223	153
Colecistitis y Pancreatitis	500	240	90	93
Colecistitis y Pancreatitis	235	140	42	81
Colitiasis Infrahepática	220	129	58	70
Colitiasis Infrahepática	310	171	81	165
Hidrocolicistitis	---	450	77	255
Hígado Metastásico	275	600	70	139
Ictericia Obstructiva	---	228	--	87
Infarto Pulmonar	1000	123	128	371
Insuficiencia Renal Aguda	1280	858	15	26
Insuficiencia Renal Aguda	850	550	17	10
Insuficiencia Renal Crónica	680	290	10	24
Leucemia Granulocítica Crónica	708	374	17	22
Leucemia Granulocítica Crónica	905	460	28	34
Leucemia Mielóide	440	245	267	216
Post Colecistitis	422	160	181	592
Precoma Hepático	520	230	225	626
Sangrado del Tubo Digestivo Alto	319	185	58	93

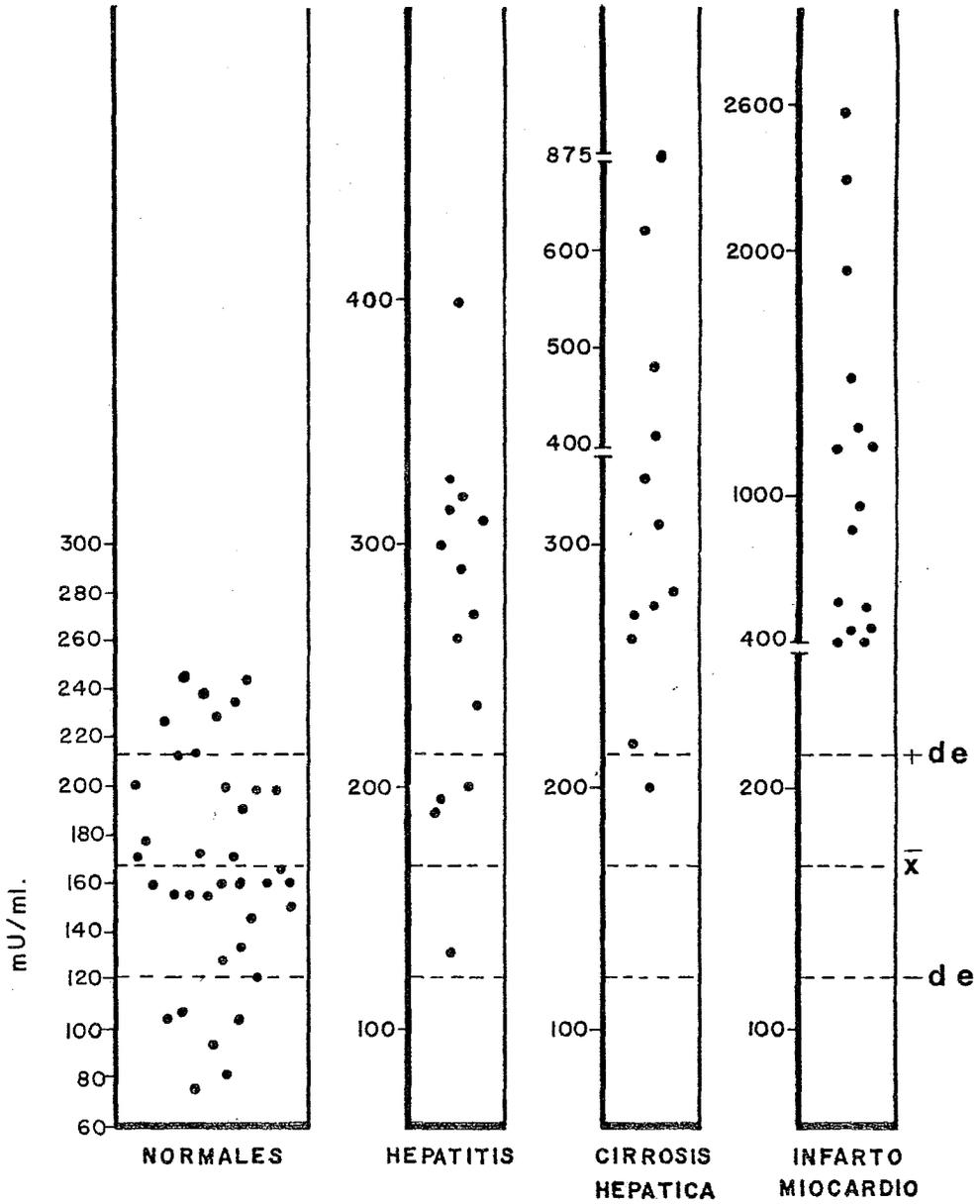
C U A D R O V I
CASOS DE INFARTO DE MIOCARDIO

No.	D H L		D H H B		T G O	
	TEC.U.V. (32°C)	TEC.COL.	TEC.U.V. (32°C)	TEC.COL.	TEC.U.V. (32°C)	TEC.COL.
1	564	660	270	361	29	41
2	1270	1800	850	1340	172	132
3	406	600	265	114	18.6	28
4	405	1010	229	---	14.8	30
5	1930	2300	1420	1255	371.2	170
6	450	515	250	268	151	25
7	464	660	315	400	16.2	17
8	2580	2150	1450	1650	209	170
9	2300	3200	1450	1805	112.5	76
10	1470	2000	1050	1460	232	76
11	1200	1110	870	455	255	340
12	975	1450	675	635	35	--
13	575	1225	---	850	56	70
14	1200	1060	800	1173	220.4	150
15	870	1060	550	651	81.2	100

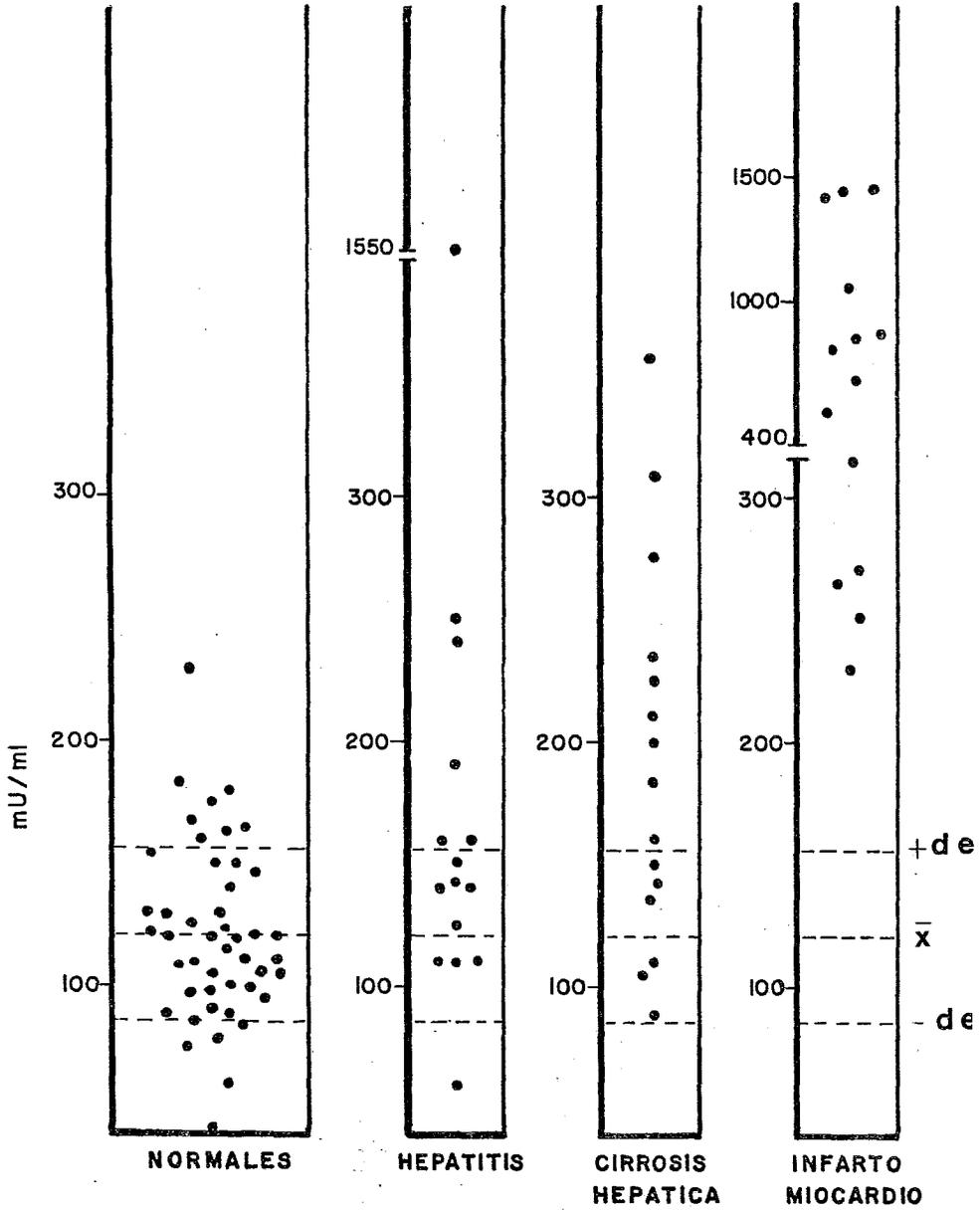
NOTA: Para la técnica espectrofotométrica, los datos están expresados en mU/ml.

Para la técnica colorimétrica, las unidades se expresan de acuerdo a las notas bibliográficas (18), (19) y (20).

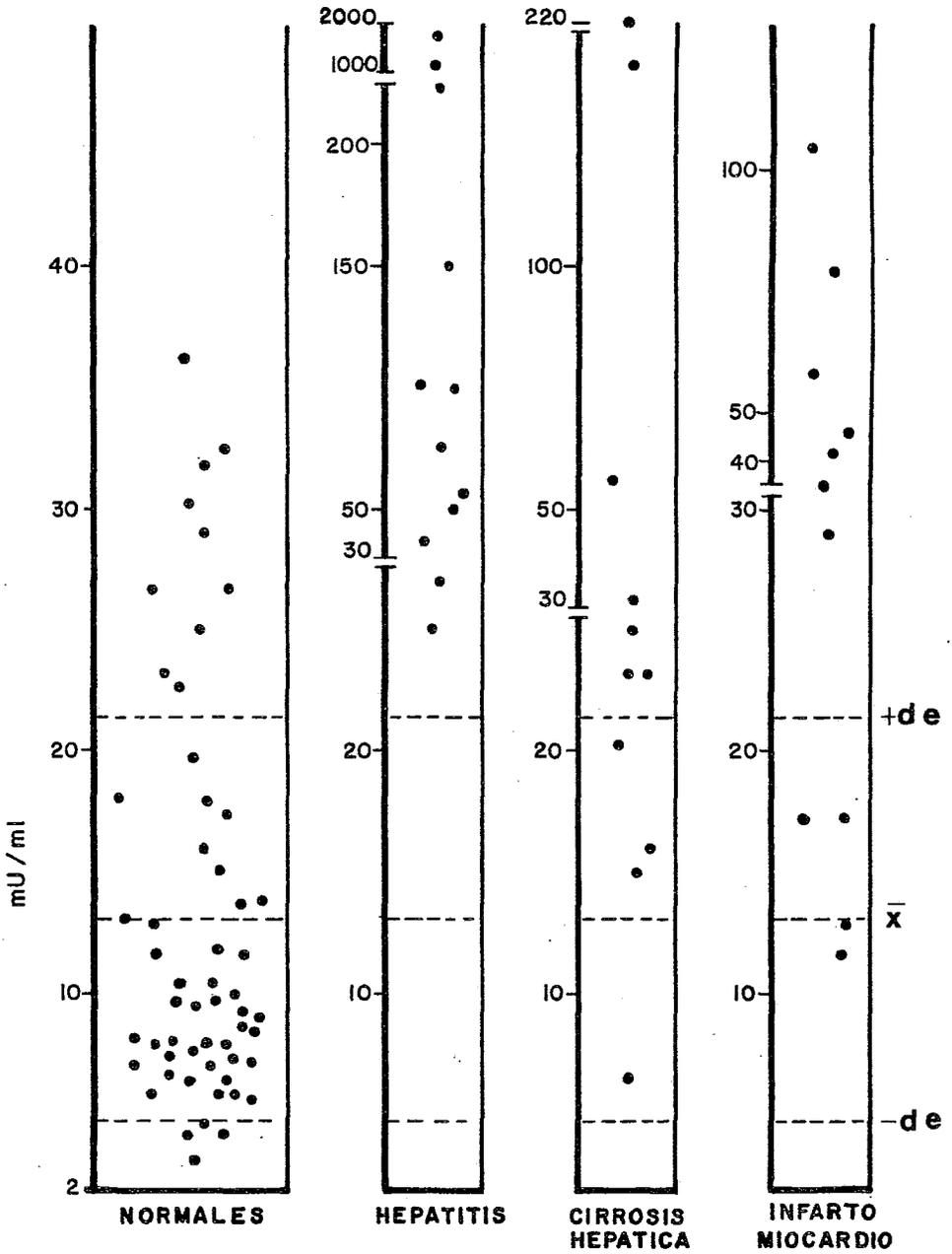
DESHIDROGENASA LACTICA



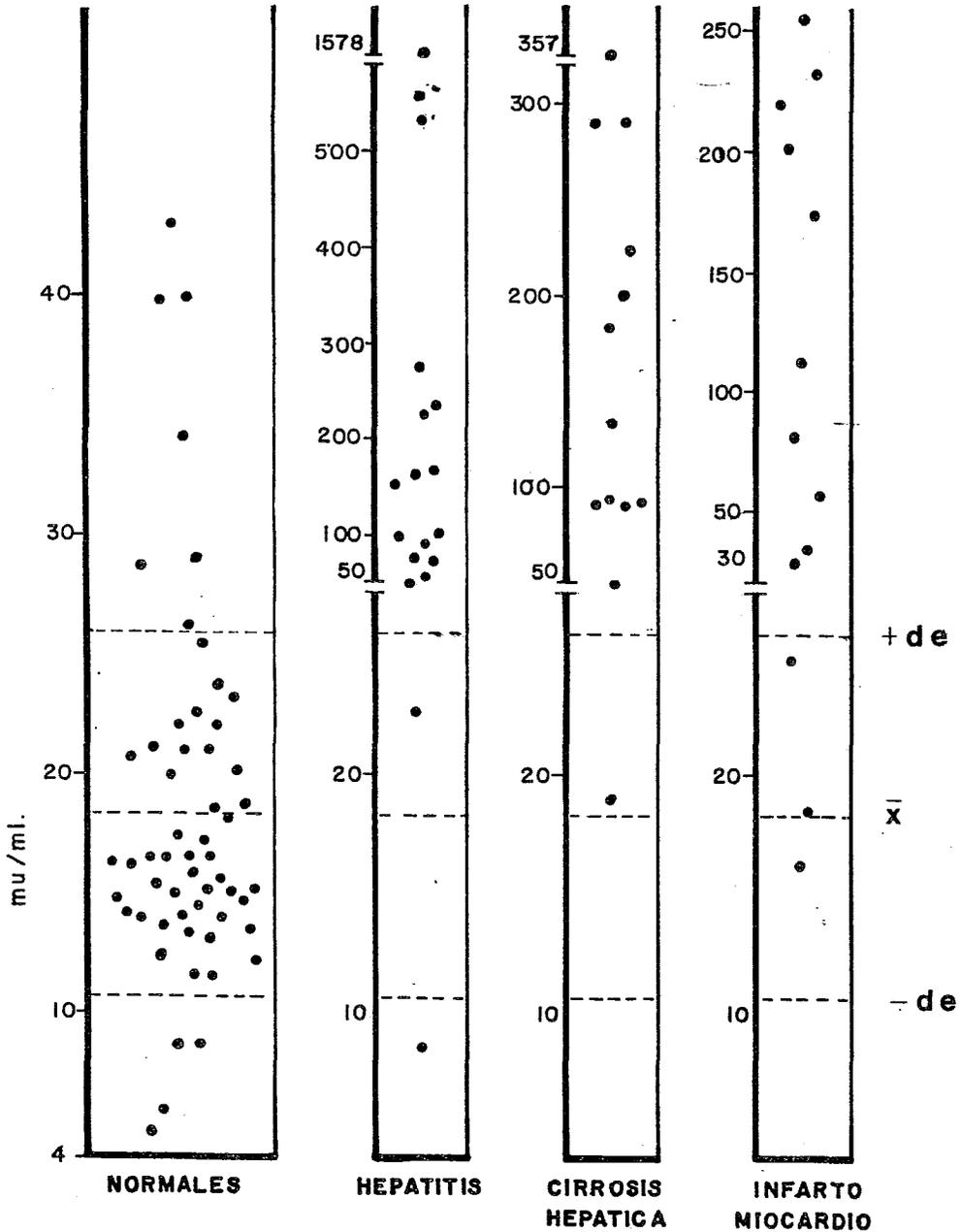
DESHIDROGENASA α HIDROXIBUTIRICA



TRANSAMINASA GLUTAMICO-PIRUVICA



TRANSAMINASA GLUTAMICO-OXALACETICA



R E S U L T A D O S

Los resultados obtenidos en el grupo normal se exponen en el cuadro I y se han calculado a 3 temperaturas. Aún cuando la I.U.B. recomienda que para el estudio cinético de enzimas en suero se trabaje a 30°C, algunos autores son partidarios de efectuar las pruebas a 25°C, como se acordó en la primera publicación de la I.U.B.; pero se ha hecho notar la dificultad que ello presenta en algunos laboratorios, ya que frecuentemente la temperatura ambiente sobrepasa los 25°C. (16).

Existen tablas con factores de conversión para transformar los resultados obtenidos a una temperatura dada en cualquier otra. En nuestro caso, las reacciones se desarrollaron a 32°C y los resultados a 30 y 25°C se calcularon con los siguientes factores de conversión. (17).

TEMP. DE MEDICION 32°C	FACTOR	FACTOR
ENZIMA	30°C	25°C
DHL	0.86	0.80
DHHB	0.85	0.79
TGP	0.73	0.64
TGO	0.77	0.69

El análisis estadístico se efectuó de acuerdo con las fórmulas para media y desviación estándar que se expresan a continuación:

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

$$S = \sqrt{\frac{\sum (X - \bar{X})^2}{n - 1}}$$

X = Cada una de las determinaciones.

S = Desviación estándar.

\bar{X} = Media

n = Número de determinaciones.

Los datos correspondientes a los grupos patológicos representados por 17 casos de hepatitis, 15 de infarto y 13 con diagnóstico de cirrosis, se presentan en los cuadros II-IV y se anota lo sig.: La DHL aumenta en forma significativa en 10 de 17 casos de hepatitis, o sea, en un 66.6% de ellos y se observan datos semejantes en los pacientes con cirrosis, pero alcanzando cifras mayores en éstos como en el No. 13 con 875 mU/ml. En los enfermos con infarto demiocardio, todas las cifras sobrepasan las 400 mU/ml y no existe superposición con las cifras normales, lo cual indica una mayor especificidad en este padecimiento. Los datos se resumen en la gráfica I.

En lo que se refiere a la DHHB, tanto en los casos de hepatitis, como de cirrosis, un 73% y 46% respectivamente, de los valores, se superponen con las normales, lo cual aparentemente significa menor utilidad diagnóstica para éstos. En el infarto la actividad mínima fue de 229 mU/ml, que sobrepasa el límite superior normal estimado en 157 mU/ml y en 9 de las 15 determinaciones, los niveles de la enzima son mayores de 400 mU/ml, con cifras máximas de 1450 mU/ml para los casos más severos. Ver gráfica II.

De las transferasas es notable la elevación de TGP en los problemas de hepatitis y en todos ellos las cifras rebasan los límites normales. En los enfermos con cirrosis, la elevación de esta enzima no es constante y sólo en un caso llegó a 220 mU/ml, el incremento es poco significativo en los restantes. En el infarto de miocardio, la actividad de TGP no se eleva en relación a otras enzimas miocárdicas y aún con valores elevados de DHL y TGO, el incremento es moderado como se aprecia en la gráfica III.

Finalmente la TGO aparece aumentada y guardando relación con la TGP en la hepatitis, pero generalmente con niveles inferiores. En la cirrosis hepática es invariablemente más alta que la TGP. En el infarto, la TGO se eleva considerablemente y en apariencia tiene una sensibili-

dad semejante a la DHL y DHHB en este tipo de pa-
decimiento. Los datos agrupados se exponen en -
la gráfica IV.

En la tabla V se presentan los resultados -
obtenidos en 23 pacientes con diversas patolo-
gías y sólo es notable el resultado de DHL en el
infarto pulmonar y Leucemia granulocítica cróni-
ca.

En el cuadro VI encontramos expresados los
datos comparativos de DHL, DHHB y TGO con técni-
cas colorimétricas (18), (19), (20); cuyas norma-
les colorimétricas son: DHL = de 200 a 600 (U. -
Kabaud y Wroblewski); DHHB = de 120 a 260 (U. -
Rosalki) TGO = de 8 a 40 (U. de Reitman y Fran-
ckel).

En nuestro trabajo se ha preferido informar
los resultados en unidades o miliunidades inter-
nacionales preferentemente a las convencionales,
ya que éstas no permiten comparaciones entre sí,
a menos que se transformen a un mismo tipo de -
ellas por medio de factores.

La introducción de unidades estándar en me-
dición de enzimas es útil, pero no una solución
definitiva y basta pensar que las U.I. no permi-
ten comparación cuando se han usado diferentes -
buffers, pH, fuerzas iónicas o tiempos de incuba-
ción o temperaturas. Es de esperar que en el -
futuro al establecer nuevos métodos para enzimas,
se haga bajo las condiciones óptimas de cada -
reacción y se exprese la actividad en U.I. supri-
miendo definitivamente las unidades propuestas -
por cada autor.

COMENTARIOS

Para el estudio de enzimas con aplicación clínica, se dispone de diversos sistemas analíticos, entre ellos los más importantes son la colorimetría y la espectrofotometría o métodos U.V. En nuestro trabajo se ha elegido el segundo grupo, considerando que por sus características y fundamentos, las técnicas U.V. ofrecen mayor exactitud, menor consumo de tiempo y solo requiere pequeñas cantidades de muestra, siendo fácil adaptarlas a micrométodos. Estos procedimientos exigen, por otra parte un riguroso control de reactivos, particularmente substrato y coenzima.

Los instrumentos para valorar correctamente la actividad enzimática en los métodos cinéticos, deberán poseer un alto grado de precisión en los diferentes componentes del sistema espectrofotométrico. La fuente luminosa deberá suministrar suficiente luz a 340 nm para favorecer una medición adecuada. Las oscilaciones se conservarán en niveles mínimos (menores de 0.001 Å) durante el tiempo de registro.

El monocromador proporcionará únicamente luz con longitud de onda de ámbito muy estrecho, ya que si no es suficientemente monocromática, la absorbancia del NAD reducido, será a 340 nm menor que la indicada por la Ley de Beer, que solo es cierta cuando la luz es perfectamente monocromática.

Estas exigencias por parte del equipo, se han resuelto ventajosamente con el espectrofotómetro Gilford, modelo 300 N, cuyo costo es relativamente bajo, considerando su versatilidad, ya que puede usarse para los más diversos fines en el laboratorio.

En las determinaciones de actividad enzimática, la temperatura de la mezcla de reacción, deberá ser cuidadosamente controlada en virtud

de que diferencias de un grado centígrado, alteran la velocidad de reacción en un 7% aproximadamente. Para eliminar este problema, el equipo descrito dispone de una termocubeta, en la cual la muestra es rápidamente equilibrada a la temperatura de trabajo.

Es recomendable el espectrofotómetro Gilford de absorbancia directa, por ofrecer absoluta resolución y precisión en el orden de 0.001 a 0.002 Å en todo el ámbito de absorbancia entre 0 a 2 Å; ello hace posible detectar pequeños cambios de absorbancia muy frecuentes en las determinaciones espectrofotométricas de sueros normales.

Amador y su grupo (8), han hecho objeciones definitivas a las técnicas colorimétricas, que emplean como reactivo de color la 2-4 dinitro fenilhidrazina y hace notar que métodos como los de Reitman y Frankel (20), no resultan seguros para detectar aumentos de actividad en la TGP y TGO, aún en casos con diagnósticos de infarto clínicamente demostrable y la correlación con los métodos espectrofotométricos resulta pobre. El motivo de estas discrepancias se atribuye a la inespecificidad de la 2-4 dinitro fenilhidrazina que reacciona con el substrato, con los productos de la reacción y con los cetoácidos de la sangre. La curva de calibración en estas técnicas relaciona un trazo preparado con la dinitro fenilhidrazona del ác. pirúvico y la actividad de las transaminasas; con ello se viola una regla fundamental de la química analítica, o sea, que el standard debe tener la misma composición que la substancia estudiada. La absorbancia del blanco de reactivos en los Métodos con dinitro fenilhidrezina es mucho mayor que las de los productos coloreados y en consecuencia, pequeñas variaciones en el blanco, producen errores considerables en la medición de la actividad enzimática.

Este hecho se hace evidente el estudiar las

enzimas DHL, DHHB y TGO en 15 sueros y comparando los métodos U.V. y colorimétricos, cuyos resultados se exponen en el cuadro VI. Es notoria la mayor sensibilidad de las mediciones por U.V., por ejemplo: en el suero 1, un paciente con diagnóstico de infarto, presenta una elevación de 300% en DHL por el método espectrofotométrico, mientras que por la técnica colorimétrica, el incremento es de sólo 10%, y si consideramos una normal de 600 unidades para este procedimiento, el valor diagnóstico se limita considerablemente. Observaciones semejantes se pueden hacer en los casos 3, 6 y 7. La misma situación se repite con la TGO en los sueros 6 y 10.

Las enzimas oxidantes como las estudiadas por nosotros, en las que el segundo compuesto reaccionante (acceptor de hidrógeno), sufre cambios de absorción al ser reducido por el sustrato y el hecho de que el NAD y NADP tengan bandas de absorción a 340 nm. en estado oxidado, pero no en forma reducida, permite que gran número de deshidrogenasas sean accesibles a esta metodología y así prácticamente todas las enzimas oxidantes pueden cuantarse convenientemente en un espectrofotómetro.

Desafortunadamente, muchas reacciones que involucran transferencia de grupos fosfato o glicosil, no van acompañadas de cambios en las bandas de absorción, pero es posible medirlas por otros métodos, ya sea con sustratos artificiales que presenten bandas específicas, o bien, por adición de una segunda enzima, que al acoplarse con un producto de la reacción, manifieste los cambios deseados.

Debemos hacer notar que, independientemente de la metodología seleccionada para valorar enzimas con fines diagnósticos, en ningún caso se determina la concentración de estos compuestos, sino únicamente la actividad de ellos. Esto es una consecuencia de la complejidad de la molécula enzimática y constituye un factor limitante

para la obtención de resultados exactos, ya que esa actividad está condicionada por los más variados factores, o sea: pH, temperatura, concentración del substrato, concentración de enzima, cantidad óptima de coenzima y fuerza iónica, sin olvidar la importancia que tiene el controlar los productos de la reacción, que de no ser removidos, modifican la actividad. De manera semejante pueden influir la presencia de drogas o de iones metálicos inseparables del suero humano.

Sorprende que en los métodos establecidos, las ventajas de rapidez substituyen a la exactitud y en consecuencia, los resultados en enzimología clínica, son enteramente empíricos; es indispensable que cada laboratorio establezca sus propias normales con una rigurosa evaluación estadística.

COMENTARIOS A LOS RESULTADOS

Los datos obtenidos en el grupo normal están acordes con trabajos publicados previamente (21), (22), sin embargo, no siempre es posible una comparación estricta, ya que las condiciones de trabajo varían notoriamente de un laboratorio a otro y no siempre son óptimas como lo han demostrado Henry y su grupo (21).

Las cifras presentadas en la gráfica I denotan la importancia de la determinación de DHL en los casos de infarto al miocardio, en donde se obtienen las máximas elevaciones, igual valor podemos atribuirle en el infarto pulmonar agudo, estos resultados son semejantes a los reportados previamente por métodos espectrofotométricos (23) cuya exactitud está apoyada por Massod y su grupo (24). Se ha llegado a considerar que la DHL es superior a la TGO en el diagnóstico de infarto de miocardio, Snodgrass (25) encontró elevación en 28 casos de infarto corroborados por autopsia y proclama que si la DHL permanece baja cuando hay sospecha de infarto, éste puede descartarse con certeza. Otros autores no comparten esta opinión y Hanson y Brorsk (26) sostienen que la DHL es menos específica que la TGO en el diagnóstico de infarto.

En la hepatitis y cirrosis, la actividad de DHL es inespecífica y no hay correlación con los datos encontrados en otras enzimas.

Los niveles de transaminasa se estudiaron en hepatitis aguda, encontrándose incrementos de actividad en todos los casos y en la mayoría de ellos, la elevación fue mayor para la TGP, como lo ha descrito Wröblewski y cols. (27).

El diagnóstico enzimático representa a sí mismo un gran progreso en el estudio de las hepatopatías crónicas y sabemos que la actividad enzimática en suero de paciente con cirrosis, está

menos alterada, pues la lesión celular pierde importancia frente al predominio de la inflamación crónica del mesénquima. Gracias a las enzimas podemos apreciar pequeños trastornos con mayor seguridad que la biopsia, porque informa sobre el hígado en conjunto. En nuestros enfermos de cirrosis, la relación TGO/TGP siempre es mayor de 1 y en 12 de los 13 pacientes estudiados, la cifra de TGO fue superior a 50 mU/ml.

Se ha discutido sobre el grupo de enzimas con mayor utilidad en el diagnóstico de infarto, pero según los datos encontrados en nuestro estudio, así como las publicaciones de Elliott y Jepson (28), la DHHB parece ser la más prometedora y se le ha conferido mayor sensibilidad que otras enzimas del miocardio, aceptando que cifras de 140 mU/ml (25°C) son definitivas para un diagnóstico de infarto, esta aseveración ha sido objetada.

La actividad de DHHB en 46 adultos normales, encontrados por nosotros es de 121.6 ± 15.7 mU/ml a 32°C y en los 14 pacientes con infarto, las cifras sobrepasan las 250 mU/ml.

Elliott y su grupo (28), al estudiar 122 pacientes con diagnóstico de infarto encontraron alteración electrocardiográfica en 60 de ellos y elevación de TGO y DHL en 88 y 87 respectivamente; pero todos dieron cifras anormales de DHHB, por lo cual los autores consideran que las falsas negativas no son problema, al emplear esta enzima. Además dicha enzima se caracteriza por mantenerse elevada por lo menos 5 días después del infarto y no se eleva en el infarto pulmonar.

En las hepatopatías, Elliott y Wilkinson (29) encontraron elevación significativa de DHHB en 30 de 63 pacientes con hepatitis aguda y en 3 de 45 pacientes con afección hepática crónica. Nuestra casuística fue limitada para sacar conclusión definitiva sobre la utilidad de esta enzima en afecciones hepáticas.

zima en afecciones hepáticas.

RESUMEN

1o.—Se estudió por espectrofotometría la actividad de cuatro enzimas: DHL, DHHB, TGP y TGO en 56 personas normales. Los resultados se analizan estadísticamente.

2.—En 67 sueros patológicos, agrupados en casos de Hepatitis Infarto, Cirrosis Hepática y diversos, se midió la actividad de las 4 enzimas descritas.

3.—Se considera la mayor especificidad de la deshidrogenasa alfa-hidroxibutírica en el diagnóstico de infarto.

4.—Se discuten los resultados en relación a publicaciones previas.

5.—Se estudian comparativamente los métodos U. V. y los colorimétricos, discutiéndose las características y ventajas de ambos.

6.—Se propone el sistema de análisis espectrofotométrico como superior a las técnicas colorimétricas tradicionales.

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

- 1.- Payen, A., and Persoz, J. F.; Ann. Chim. -- (Phys.), 53, 73, (1833). (1)
- 2.- Dixon, M., and Webb; The Enzymas. Academic Press, N. Y., (1966).
- 3.- Fischer, E.; Berdtsch. Chem. Ger., 27 2985, (1894).
- 4.- Willstatter, R., And Kraut, H.; Berditsch, Chem. Ger.; 56 1117, (1923).
- 5.- Sumner, J. B.; J. Biol. Chem.; 69, 435, -- (1926).
- 6.- Michaelis, L., and Menten, M.L.; Biochem. Z., 49, 333, (1913).
- 7.- Warburg, O.; Die Wasserstoffubertragen Den Fermente Salger; Berlin Germany, (1948)
- 8.- Amador, E., Franey, R. J., and Massod, M.F. Clin. Chem.; 12, 475, (1966).
- 9.- Florkin, M., and Stotz, E.H.; Comprehensive - Biochemistry, 13, 40, (1964).
- 10.- Vennesland, B., And Wastheimer. F. H.; ---- The Mechanism of Enzyme Action; W.D. Mc- - Elroy and B. Class eds., Jhon Hopkins, Baltimore, (1954).
- 11.- Mahler, H. R., and Cordes, E.H.; Biological Chemistry; Harper and Row Publishers. N.Y., (1966).
- 12.- Wroblewski, F., and La Due; Proc. Soc. Exp. Biol. N.Y., 90 (1955).
- 13.- Elliott, B. A. and Wilkinson, J.H.; Lancet. (i), (1961).

(1) Citados por Dixon and Webb.

- 14.- Henley, K.S. and Pollard, H.M.; J. Lab. --
Clin, Med.; 46, 785, (1955).
- 15.- Bergmeyer, H.U.; Methods of Enzymatic Ana--
lysis; Verlag Cheme. G.M.B.H. Weinheim/Ber-
gstr. Academic Press. N.Y. and London (1963)
- 16.- Henry, R.J. Clinical Chemistry; Harper and
Row Publishers; 3th. Ed. 507. (1965).
(') Citados por Dixon an Webb.
- 17.- Reactivos para fines Diagnósticos Merck; Bo
letín no. 22/v
23/2608/0.5/1070
- 18.- Cabaud, P.G., and Wroblewski F.; Am J. ---
Clin. Path., 30; 234 (1958).
- 19.- Rosalki, S.B.; J. Clin. Path.; 15 566, ---
(1962).
- 20.- Reitman. S., Franckel. S.; Am. J. Clin. ---
Path. 28; 56 (1957).
- 21.- Henry, R.J.; Chiomory, N., Golub. O. J. ---
and Berkman, S; Am. J. Clin. Path. 34, 381
(1960).
- 22.- Rosalki, S. B.; Brit, Heart J. 25 795, ---
1963.
- 23.- Amador. E., Dorfman, L.E., and Wacker, ---
W.E.C.; Clin. Chem.; 9, 391, (1963).
- 24.- Massod, M.F., Franey, R.J., Therrien, M.E.
Rideout, P.T., and Babcock, M.T.; Am. J. --
Clin. Path., 42, 623, (1964).
- 25.- Snodgrass, P.J. Wacker, W.E.C., Eppinger,
E.G., and Vallee, B.L.; New England J. Med.
261, 1259 (1959).
- 26.- Hansen, A., and Bicrok, C. Acta Med, Scan--
dinav; 154 493, (1957).

- 27.- Wroblewski, F., and La Due. J. S.; Proc. --
Soc. Exper. Biol. and med. 91 569 (1956).
- 28.- Elliott, B. A. and Jepson, H.N., and -----
Wilkinson, J.H.; Clin. Sci., 23, 305, ----
(1962).
- 29.- Elliott, B. A. and Wilkinson, J.H.: Clin.
Sci.; 24; 343, (1963)