



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO**

---

---

**FACULTAD DE QUIMICA**

**ANALISIS TEORICO PRACTICO DE LA TECNICA COLORIMETRICA  
PARA DETERMINAR TRANSAMINASAS**

426

**T E S I S**

Que para obtener el Título de:

**QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO**

Presenta:

*Blanca Leticia Solano Priego*



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

TEST

1970

MT

~~4103~~ 4103



QUIMICA

PRESIDENTE Ramón Guevara E.

Jurado asignado según  
el tema.

VOCAL Ma. Elena Bustamante C.

SECRETARIO Josefina Piedras R.

1er. SUPLENTE Leticia Carrasco R.

2o. SUPLENTE Esther Gutiérrez H.

Sitio donde se desarrolló el tema: LABORATORIO 301

Nombre del Sustentante: BLANCA LETICIA SOLANO PRIEGO

Nombre del Asesor del Tema: QFB. RAMON GUEVARA ESTRADA

D

E

D

I

C

A

T

O

R

I

A

S

**A MIS PADRES:**

Les ofrezco este libro como un homenaje por la culminación de mi más grande ideal, el que he podido alcanzar gracias a su esfuerzo y al apoyo que siempre me han brindado, orientándome con cariño y sabiduría en todo momento y haciendo más livianos los escollos encontrados en el camino.

A MIS HERMANOS:

Wilberth, Ruffo, Gladys,  
Darwin y Raquel por el  
apoyo desinteresado que  
me ofrecieron durante  
todo el curso de mi ca-  
rrera.

A MIS TIOS Y PRIMOS:

Con el agradecimiento que se merecen por el apoyo que me ofrecieron en el transcurso de mis estudios profesionales.

A MI MAESTRO:

QFB. Ramón Guevara Estrada

Por el interés que puso siempre a lo largo de mi tesis y por la ayuda que me brindó en todo momento.

## I N D I C E

	Pág.
INTRODUCCION.....	1
CAPITULO	
I.- GENERALIDADES FISIOPATOLOGICAS.....	3
II.- ANTECEDENTES QUIMICOS Y BIOQUIMICOS.....	11
III.- METODOLOGIA ESTUDIADA.....	24
IV.- RESULTADOS OBTENIDOS.....	33
V.- ANALISIS DE LOS RESULTADOS.....	40
VI.- RESUMEN.....	42
VII.- CONCLUSIONES.....	43
VIII.- BIBLIOGRAFIA.....	45

## INTRODUCCION

Se han realizado diferentes y muy variados estudios para conocer el comportamiento de dos de las enzimas séricas -- más importantes; la transaminasa glutámico pirúvica y la -- transaminasa glutámico oxalacética, las cuales se ven involucradas en el funcionamiento de ciertos órganos y tejidos, como son : corazón, hígado, cerebro, hematíes, músculos, suero líquido cefalo-raquídeo y en orina. Sin embargo, poco se ha estudiado de la forma como deben manejarse en el laboratorio de enseñanza, donde privan algunas fuentes materiales y humanas de error, como son: la falta de equipo adecuado (baños de agua, termómetros, espectrofotómetro, etc.), descuido por parte de los estudiantes que realizan las técnicas y falta de la debida vigilancia por parte de los maestros, ocasionada por el exceso de estudiantes a su cargo.

El método elegido para este informe, ha sido el de -- Reitmann y Frankel, ya que es una técnica sencilla y fácil -- de manipular, lo cual representa una ventaja, sobre todo para quienes como los alumnos de Licenciatura de Química Clínica, no tienen aún el entrenamiento necesario para manejar -- métodos enzimológicos más complejos.

En la realización del método, se trataron de introducir diferentes errores, físicos, químicos y mecánicos tales como el pH, la temperatura, la concentración de sustratos, la conservación de los mismos favoreciendo la contaminación biológica y química; para conocer la manera como los resultados -- se alteran. Los valores obtenidos se compararon contra la -- misma técnica seguida correctamente, para así saber el grado

de variación resultante y la forma como ésta podría corregirse, durante el trabajo didáctico.

Por lo antes mencionado, creemos que este estudio será una valiosa ayuda para estudiantes y maestros del Laboratorio de Química Clínica.

## CAPITULO I

### GENERALIDADES FISIOPATOLOGICAS

La acción de las enzimas de un órgano determinado, re - presenta ciertas propiedades de ese órgano; y es así, como de una forma más íntima puede conocerse la parte del organismo - que en ese momento se halla alterada y la causa de la altera - ción.

Son muchas las enzimas de interés clínico que ayudan a dilucidar muchos padecimientos en los que otros métodos de - diagnóstico no resultan del todo claros. Entre estas enzimas - tenemos a las transaminasas, pero antes de hacer referencia a sus características fisiopatológicas, mencionaremos algunos - puntos de carácter general para una mejor comprensión del es - tudio enzimático.

Desde el punto de vista médico, <sup>(14)</sup> las enzimas séricas - se clasifican de acuerdo a su origen y a su función en:

- 1.- Enzimas extracelulares ó secretoras; como la  $\alpha$ -amilasa, - lipasa, fosfatasa alcalina.
- 2.- Enzimas intracelulares; como la transaminasa glutámico - oxalacética, transaminasa glutámico pirúvica, deshidrogenasa - láctica, deshidrogenasa hidroxibutírica.
- 3.- Enzimas específicas del plasma; como colinesterasa y las - enzimas propias de la coagulación.

Los cambios patológicos que se operan en ellas debido a

algunos padecimientos, se les atribuyen varios mecanismos que actúan solos ó en combinación, (14) los más aceptados son:

a) Alteraciones en la permeabilidad de las membranas celulares y necrosis; esto sucede en la hepatitis, en las intoxicaciones por envenenamientos, distrofia muscular progresiva y enfermedades cardíacas.

b) Aumento en la cantidad de producción de enzimas; como la fosfatasa alcalina en condiciones caracterizadas por un incremento en la formación de osteoblastos ó de fosfatasa ácida en carcinoma de la próstata.

c) Reducción en la concentración de la enzima; como ocurre con la colinesterasa en cirrosis hepática y en otras deficiencias enzimáticas.

d) Prevención de la salida de flujo de enzimas secretoras; un ejemplo es la fosfatasa alcalina en obstrucción de conductos biliares ó de lipasa en la obstrucción de conductos pancreáticos. (13)

\* La importancia de las transaminasas radica en el papel que desempeñan en el metabolismo intermediario de los aminoácidos; mediante ellas, al determinar su actividad es posible conocer el estado funcional de cada uno de los órganos en los cuales se hallan. \*

TRANSAMINASA GLUTAMICO OXALACETICA.- Se encuentra normalmente en: músculo esquelético, músculo cardíaco, hígado, bazo, intestino, suero, líquido cefalorraquídeo, eritrocitos- estos contienen el 80% del total de enzima que se encuentra en la sangre, las plaquetas contienen un 13%, los leucocitos- un 5% y el suero sólo un 2%; páncreas y riñón.

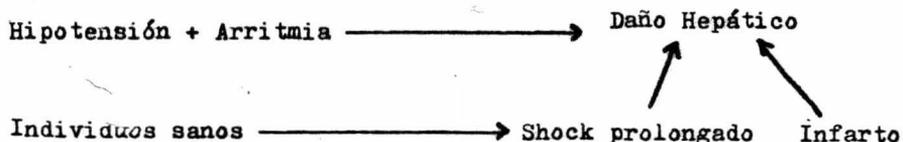
Los padecimientos en los que se altera son principalmente cardíacos, aunque en menor grado, también en los hepá-

ticos. Aumenta de manera notable en infarto de miocardio pudiendo alcanzar niveles de más de 500 U/ml de suero; comenzando a incrementarse dentro de las primeras 12 horas después del infarto, alcanzando su máximo a las 48 horas y empieza a disminuir de los 6 a 14 días después del infarto hasta llegar a sus niveles normales. (11) El aumento de la enzima es proporcional a la cantidad de músculo cardíaco destruido; en general. - puede decirse, que el incremento de enzima, sea que se trate de la oxalacética ó de la pirúvica, va a depender del tamaño de la lesión. (9)

Asociado al aumento de enzima, se hallan otros datos - clínicos, como son: tensión arterial baja, shock, insuficiencia renal y hepática; esta última es muy importante ya que - generalmente seguido al infarto, se presenta daño hepático, - debido a falta de oxígeno, la que ocasiona disminución de la actividad celular que implica la salida de enzimas intracelulares. (9) Esta falta de oxígeno, se debe a la hipotensión sanguínea que se presenta, la que a su vez, causa una baja en el gasto cardíaco; lo que provoca cambios en la resistencia vascular periférica.

Se ha podido observar, que las células hepáticas más dañadas son las más alejadas de la vena central del hígado y es esto lo que va a causar una necrosis masiva. Para conocer con exactitud el grado de la lesión, se determina la actividad de la transaminasa glutámico pirúvica, la que por hallarse normalmente en el hígado, al aumentar, va a darnos una idea de la - extensión del daño causado al órgano. (9)

Con esto se pone de manifiesto, una cierta relación entre las dos enzimas (oxalacética y pirúvica), debido a la correlación funcional que existe en los tejidos donde se localizan. El esquema que sigue explica la conexión que hay entre los dos padecimientos, cardíacos y hepáticos:



Después de lo anteriormente expuesto, se puede notar - que la salida de estas enzimas a través de las células, se -- debe a pérdida en la integridad de las membranas celulares; - esto puede ser por varias razones, como es la presencia de - agentes externos del tipo de virus, toxinas ó disturbios en - la nutrición celular. (14) Sin embargo, existen determinadas - situaciones en las que no ocurre esto pero hay elevación en - la concentración de ellas. La TGO (transaminasa glutámico -- oxalacética) aumenta normalmente después de comidas ricas en - proteínas, hasta un nivel de 270 U/ml de suero, el que al ca - bo de tres horas comienza a disminuir a sus límites normales. (20).

Esta transaminasa se incrementa patológicamente en: an - gina de pecho, insuficiencia coronaria, insuficiencia cardí - ca congestiva crónica, ictericia, enfermedad cardíaca reumá - tica con disfunción hepática progresiva, en la que se eleva - hasta 1912 U/ml de suero. Disminuye en shock neurogénico a -- 19 U/24 horas, lo que conduce al individuo a la muerte. Per - manece normal en: uremia, infarto pulmonar, neoplasias e in - fecciones agudas crónicas. (9, 18, 13, 15, 21)

Cuando se presenta una deficiencia de vitamina B<sub>6</sub>, su valor normal va a depender del peso, estatura y edad del in - dividuo; sin embargo, se han establecido límites que se deter - minan en personas sanas clínicamente; este valor va a ser di - ferente en cada líquido corporal. En suero es de 8-40 U/ml; - en líquido cefalorraquídeo es de 7-49 U/ml; en orina no debe - existir, aunque algunos autores consideran que de haber no -- será mayor de 1 U/ml. (20)

En su determinación no intervienen: el ciclo menstrual, ni la menopausia; no hay cambios durante el embarazo. En el 48% de mujeres en fase puerperal, se presenta un ligero aumento de la enzima, pero es transitorio. Ciertos medicamentos provocan incremento en su concentración como son los opiáceos y el estolato de eritromicina en adultos así como la aspirina y el salicilato de sodio en los niños, en un promedio de 25-50% de estos individuos. En estado normal, la enzima aumenta después de ejercicio violento y especialmente en personas no acostumbradas a practicarlo y en comidas ricas en proteínas. (20).

Hay otras pruebas<sup>(9)</sup> cuyos resultados se asocian al aumento de TGO y que pueden ser de gran ayuda en el diagnóstico, como son:

Bilirrubina	Aumenta
Tiempo de protrombina	Más de 60"
Fosfatasa alcalina	15-69 mU/ml de suero(menos del normal)
Prueba de floculación	Normal
Polimorfonucleares	93% (En infarto cardíaco)
Nitrógeno no protéico	Aumenta.

Se han investigado mucho las alteraciones celulares que se producen en el hígado como consecuencia de infarto cardíaco por un lado y de lesión propia del hígado, cuando este es el que se afecta. Como resultado de ellas se ha encontrado que: en los espacios centrales entre los hepatocitos por medio de un examen histológico, se ha notado la presencia de leucocitos polimorfonucleares, restos protéicos, hematíes, núcleos libres; hay proliferación fibroblástica, cambio nuclear con fragmentación pignótica, palidez del núcleo del hepatocito. Se halla además: fibrosis central hepática, necrosis central aguda, congestión central y atrofia del cordón hepático.<sup>(9)</sup>

Cuando se trata de insuficiencia cardíaca, el daño en -

contrado en el corazón es por aumento de la tensión arterial; si se trata de infarto, la tensión arterial disminuye. Tanto en rizado como en corazón, estos trastornos se presentan antes de la elevación de las enzimas correspondientes.

La velocidad de sedimentación eritrocítica aumenta después de infarto transmural cardíaco, de 16 que es su valor normal hasta 44 en el sexto día posterior al infarto y al séptimo comienza a disminuir.<sup>(11)</sup> En los glóbulos rojos, la actividad enzimática disminuye con la edad pero sin afectarse todas sus enzimas; entre las que sí se afectan están la aldolasa, -nexoquinasa y transaminasa glutámico oxalacética; sin embargo, ésta no es muy importante por no tener el eritrocito ciclo de Krebs. Cuando comienza a descender su actividad, son sacados de la circulación; se cree que la transaminasa no tiene utilidad metabólica en la maduración del glóbulo.<sup>(5)</sup>

TRANSAMINASA GLUTAMICO PIRUVICA.- Se le halla normalmente en: hígado, cerebro, riñón, eritrocitos donde es de 3-5 veces más que en suero, suero, corazón.

Se altera principalmente en padecimientos hepáticos; - sus valores normales son: de 13-55 U/ml de suero en hombres y de 6-40 U/ml de suero en mujeres; los valores para niños son más altos que los de adultos, según investigaciones realizadas usando el método de Wróblewski y LaDue, la concentraciones de 85 U/ml de suero.<sup>(20)</sup>

Al igual que en la enzima anterior, no se afecta por -- ciclo menstrual ni embarazo; se observa un leve incremento - después de ejercicio vigoroso, pero enseguida disminuye. El - líquido cefalorraquídeo a diferencia de la oxalacética, no -- contiene transaminasa pirúvica. Algunos medicamentos como - iproniazida y morfina, se han reportado que aumentan sus concentraciones en suero; en niños lo causan los salicilatos.<sup>(20)</sup>

La relación que existe en el suero entre las dos enzimas

mas se conoce con el nombre de coeficiente de Ritis y es de:  $TGO/TGP < 1$ , tomando en cuenta que los niveles en suero son:  $TGP > TGO > LDH$ , (8,14).

En el riñón, las aminotransferasas contribuyen a la producción de amoníaco por la vía del glutamato-1-deshidrogenasa. En el cuadro que sigue puede verse la actividad enzimática en los diferentes elementos sanguíneos:

Actividad enzimática en eritrocitos, leucocitos, plaquetas y suero humano.

		TGO	TGP
Eritrocitos(*)	$\bar{x}$	1.3	0.1
	S	0.7	0.1
	N	6.0	6.0
Leucocitos (+)	$\bar{x}$	10.3	36.1
	S	16.1	13.0
	N	7.0	7.0
Plaquetas (+)	$\bar{x}$	2.2	0.7
	S	0.4	0.1
	N	6.0	6.0
Suero (‡)	$\bar{x}$	8.1	7.4
	S	1.1	2.4
	N	14.0	14.0

\*: Actividad en U/g de Hb a 25°C. Al llegar a U/10<sup>11</sup> eritrocitos multiplicar por 3.

+ : Actividad en U/10<sup>11</sup> células a 25°C.

‡ : mU/ml = U/lt a 25°C.

Nota: Tomada del Clinical Enzymology Principles and Applications, H.Mattenheimer, Tabla XIV, pág. 109.

La TGO en eritrocitos tiene menor actividad que la TGP, la actividad de transaminasa glutámico oxalacética aumenta con el tiempo en sangre coagulada. (2).

En la tabla que sigue, puede apreciarse el el predominio de cada enzima en los diferentes tejidos donde se les localiza: (2,13,8,10,14,15, B, 20)

	TGO	TGP
Miopatías periféricas	A	A
Trauma muscular	A	N
Distrofia muscular	A	N
Hepatitis viral (++)	A	AA Rel. TGO/TGP > 1
Hepatitis crónica (+)	AA	A
Cirrosis	AA	A
Coma hepático	D	D ⇒ Muerte
Hepatosis tóxica	AA	AA (de moderada a elevada)
Obstrucción biliar extrahepática	A	A (moderada)
Infarto miocárdico	AAA	N
Daño cardíaco congestivo (con congestión e hipoxia del hígado)	N	AA
Angina de pecho	N	N
Miocarditis reumática	N	N
Miocarditis infecciosa	N	N
Arritmia	N	N
Síndrome nefrótico	AAA	N
Glomerulonefritis	AAA	A
Toxemia del embarazo	A	A
Crísis hemolíticas (por hemólisis intravascular)	A	A
Leucemia crónica	N	N
Leucemia aguda	A	A

Nota: A= aumentada; AA= mayor aumento; AAA= sumamente aumentada; N= normal; D= disminuye; + = en enfermedades crónicas aumenta más la TGO que la TGP; ++ = en enfermedades agudas aumenta más la TGP que la TGO.

## CAPITULO II

### ANTECEDENTES QUIMICOS Y BIOQUIMICOS

Desde hace mucho tiempo, se tenía conocimiento de ciertas sustancias que 'fermentaban' algunos medios, por lo que originalmente se les llamó FERMENTOS y de este modo se les clasificó en organizados y desorganizados. Se consideraban -- 'fermentos organizados', a los que provenían de células vivas y 'desorganizados', si no los contenían organismos vivos. (1)

Este concepto fué rebatido y aclarado por Büchner en -- 1897, mediante un experimento que realizó moliendo con arena células de levaduras, hasta lograr una total destrucción de ellas; luego las filtró, usando el filtro por él diseñado y el extracto obtenido, lo sembró en medios de cultivo específicos para el crecimiento de hongos. Días después al no haber crecimiento, comprobó que ya no existían células intactas, -- por lo que entonces colocó el extracto en un mosto con azúcar pudiendo observar poco después que este, se fermentaba. Fué -- así, como se logró demostrar la existencia de las enzimas.

La palabra 'enzima' procede del griego 'en-zyme' que -- quiere decir 'en la levadura'; y son proteínas de alto peso -- molecular. (1, 6)

El significado que se le ha dado posteriormente a este vocablo es más amplio, considerándoseles como "catalizadores biológicos que actúan acelerando las reacciones que se llevan a cabo en los organismos vivos". (12)

De acuerdo al lugar de la célula en que se les encuentra

se les dividió en endoenzimas, cuando se hallan dentro de -- ellas y exoenzimas si son secretadas y vertidas al medio que las rodea, como las enzimas del tracto digestivo.<sup>(1)</sup>

A medida que se fué avanzando en su conocimiento, fué -- ron surgiendo nuevos términos que fué necesario ir definiendo para poder entender y comprender mejor su estudio; entre ellos están:

**Sustrato.**.- Es la sustancia sobre la cual actúa la enzima para transformarla en otra sustancia llamada producto.

**Activadores.**.- Son moléculas ó iones que estimulan la actividad enzimática. Ejemplo: iones  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ .

**Inhibidores.**.- Son de varios tipos:<sup>(3,17,12,1)</sup>

- a).- **Competitivos.**.- Cuando tienen una estructura semejante a la del sustrato.
- b).- **No competitivos.**.- Cuando el inhibidor se combina más de una vez con la enzima.
- c).- **Incompetitivos.**.- Cuando uno de los sustratos varía y el otro está saturado; la inhibición por uno de los productos no se efectúa.
- d).- **Alostéricos.**.- Actúan en enzimas alostéricas e inhiben sólo uno de sus sitios activos, ya que un sitio tiene más afinidad que el otro por el mismo sustrato.

**Zimógeno.**.- Forma inactiva de una enzima.

**Cinasa.**.- Sustancia que convierte al zimógeno en activo.

Durante mucho tiempo aparecieron diferentes clasificaciones, sin embargo, no fué sino hasta que la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC) y la Unión Internacional de Bioquímica (IUB), dieron la nueva clasificación vigente<sup>(6)</sup>, que pudo ordenarse el estudio sistemático de las --

enzimas :

Nombre	Clase	Subclase
Oxidorreductasas	I	A
		B
Transferasas	II	A
		B
Hidrolasas	III	A
		B
Liasas	IV	A
		B
Isomerasas	V	A
		B
Ligasas	VI	A
		B

A la Clase II, Subclase B, pertenecen las transaminasas de las cuales nos ocuparemos durante todo este estudio.

Las transaminasas ó más correctamente aminotransferasas, son las enzimas que catalizan la transferencia de grupos aminos de  $\alpha$  aminoácidos a cetoácidos; a este proceso se le da el nombre de transaminación. (19)

Las reacciones de transaminación se llevan a cabo en diferentes organismos: bacterias, hongos, animales vertebrados y principalmente el hombre. Son muy importantes ya que mediante ellas se promueve la formación de nuevos aminoácidos a merced de otros que se descomponen; son reacciones libremente reversibles con una constante de equilibrio de aproximadamente 1. (6,12)

Consisten en la transferencia del grupo amino  $-NH_2$ , del  $\alpha$ -aminoácido donador al átomo de carbono  $\alpha$  del cetoácido; los cetoácidos involucrados son: piruvato, oxalacetato ó  $\alpha$ -ceto-glutarato. Se ha visto que no hay una desaminación neta, ya - (19)

que el cetoácido se amina a medida que el aminoácido se desamina. (12)

El ciclo de Krebs sufre varias desviaciones y una de ellas es el ciclo del ácido glutámico-aspártico y aspártico-glutámico que involucra una transaminación. (7)

Cuando se usa ácido glutámico como sustrato en cortes de tejidos, hay una reacción oxidativa que convierte al glutamato en aspartato. La mayor parte del oxalacetato reacciona por transaminación con una segunda molécula de glutamato para formar aspartato y  $\alpha$ -cetoglutarato. La reacción balanceada es la que sigue:

Formación de aspartato a partir de glutamato:

- 1) Glutamato + Oxalacetato  $\longrightarrow$   $\alpha$ -Cetoglutarato + Aspartato
- 2)  $\alpha$ -Cetoglutarato +  $1/2 O_2$   $\longrightarrow$  Succinato +  $CO_2$
- 3) Succinato +  $O_2$   $\longrightarrow$  Oxalacetato +  $H_2O$

---

Suma: Glutamato +  $1 1/2 O_2$   $\longrightarrow$  Aspartato +  $CO_2$  +  $H_2O$ .

Una parte del oxalacetato puede sufrir descarboxilación y oxidación completa por la vía del piruvato y de la acetil-coenzima A; pero si hay un exceso de glutamato (7), la oxidación del ácido glutámico es incompleta. (Fig. 1)

De modo similar es la oxidación del aspartato a glutamato. El  $\alpha$ -cetoglutarato formado como un intermediario, se une por transaminación con aspartato para dar glutamato. (7)

La reacción es la siguiente:

Formación de glutamato a partir de aspartato:

- 1) Aspartato +  $\alpha$ -Cetoglutarato  $\longrightarrow$  Glutamato + Oxalacetato
- 2) Oxalacetato + Acetil CoA  $\longrightarrow$  Citrato + CoA
- 3) Citrato +  $1/2 O_2$   $\longrightarrow$   $\alpha$ -Cetoglutarato +  $CO_2$  +  $H_2O$

---

Suma: Aspartato + AcetilCoA +  $1/2 O_2$   $\longrightarrow$  Glutamato +  $CO_2$  + CoA +  $H_2O$

El aspartato también puede dar origen a acetil-CoA:

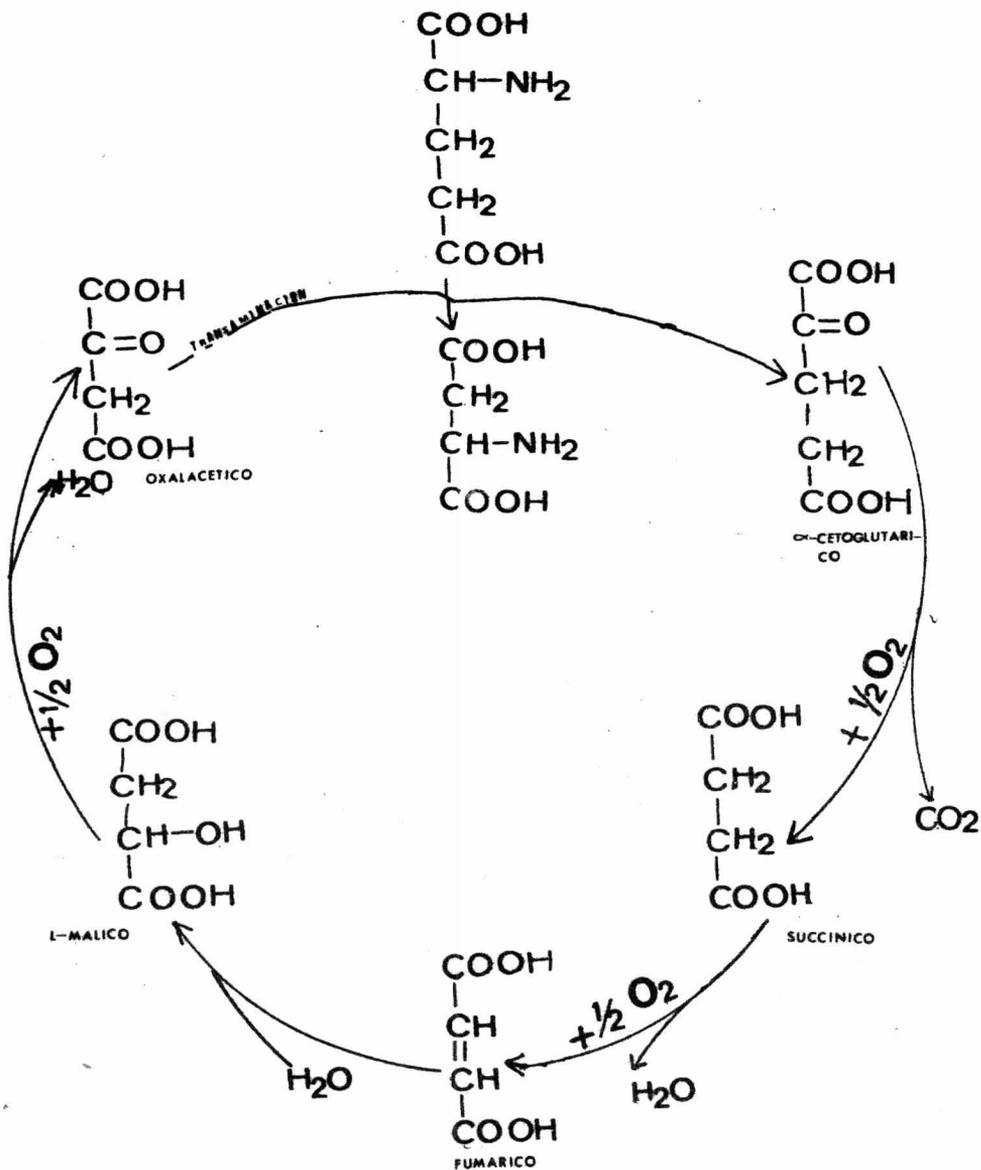


FIGURA 1.

- 1) Aspartato +  $\alpha$ -Cetoglutarato  $\longrightarrow$  Glutamato + Oxalacetato
- 2) Glutamato +  $1/2 O_2$   $\longrightarrow$   $\alpha$ -Cetoglutarato +  $NH_3$  +  $H_2O$
- 3) Oxalacetato  $\longrightarrow$  Piruvato +  $CO_2$
- 4) Piruvato + CoA +  $1/2 O_2$   $\longrightarrow$  Acetil CoA +  $CO_2$  +  $H_2O$



Cuando no hay sustratos de otra clase, 2 moléculas de aspartato pueden dar una de glutamato:



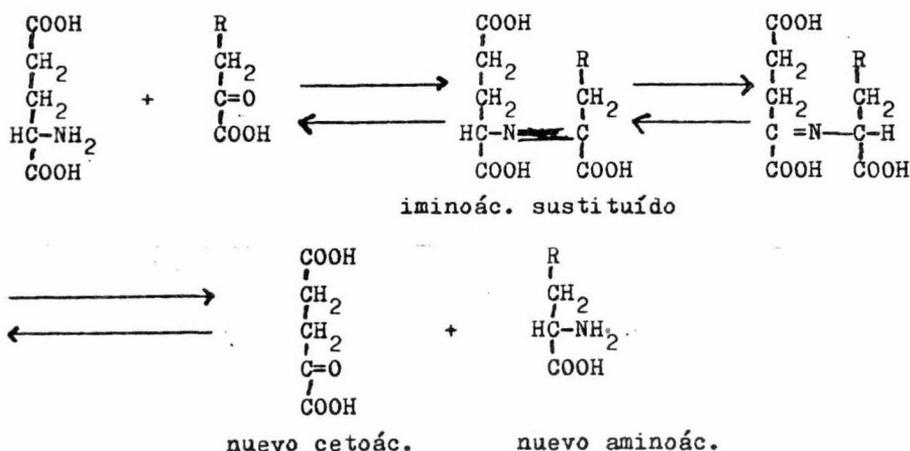
La transaminasa glutámico oxalacética tiene una gran actividad y es la única que puede interferir en mayor grado con el ciclo de Krebs; la pirúvica es demasiado débil para causar una desviación del ciclo. El aspartato y el glutamato dan origen a otros aminoácidos al igual que a pirimidinas y porfirinas (7).

El primero en conocer las reacciones de transaminación-- fué D.M. Needham, quien en 1930, notó que en preparaciones de músculo cardíaco de palomo, los ácidos glutámico y aspártico se metabolizaban sin que hubiera disminución en el contenido total de nitrógeno amínico. Sin embargo, fué hasta 1937 que -- los investigadores rusos, Braunstein y Kritzmann se dieron cuenta de lo que en realidad ocurría, al demostrar que en preparaciones de músculo y en presencia de ácido glutámico, podían -- convertir el piruvato en alanina; y dieron a conocer el proceso como un mecanismo de transaminación. (19)

Se sabía según Meister (1955), que existían 61 transaminasas, en 1972 se completó el conocimiento de 59 enzimas, que sufren esta reacción con ácido  $\alpha$ -cetoglutarico ó glutámico, -- pero sólo 2 se llevan a cabo en los tejidos humanos y son las catalizadas por las transaminasas glutámico pirúvica (TGP) ó -- más correctamente alanín-aminotransferasa y glutámico oxalacética (TGO) ó aspartato-aminotransferasa. (19, 3 Vol. IX)

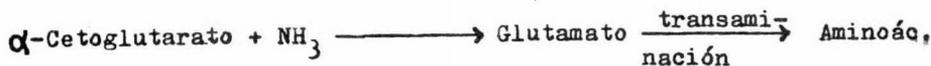
Su mecanismo de acción se ha estudiado mediante el uso de isótopos<sup>(1)</sup>, principalmente con N<sup>15</sup>. Un experimento hecho con ése fin, fué introducir en la dieta de un ratón, citrato de amonio marcado; después de 9 días se vió que el N<sup>15</sup> se hallaba ampliamente distribuído entre los aminoácidos del cuerpo, con su mayor concentración en forma de ácido glutámico.

Se ha visto que los aminoácidos reaccionan con cetoácidos para formar iminoácidos sustituidos<sup>(1)</sup> que por hidrólisis pueden formar un nuevo aminoácido; la reacción es la siguiente:



Se ha sugerido que el intercambio de grupos NH<sub>2</sub> en el metabolismo de amoniaco derivado de la desaminación de aminoácidos, es primero convertido en glutámico para después éste ceder su amino.

El α-cetoglutarato es un intermediario en el metabolismo de carbohidratos y es por esta ruta que los azúcares se convierten en aminoácidos y proteínas.



Estas enzimas para su mejor acción, requieren de una coenzima ó molécula orgánica que las estimule y es el fosfato de

piridoxal; este es un derivado de la piridoxina ó vitamina B<sub>6</sub>. (1). Debe además tomarse en cuenta que "la actividad enzimática depende de la conformación tridimensional específica de la molécula",<sup>(12)</sup> que se aprecia cuando hay desnaturalización de la enzima, ya que por ser moléculas protéicas tienen las mismas propiedades y al desnaturalizarse sufren pérdida de su actividad.

El mecanismo de acción del fosfato de piridoxal (PLP), \* durante la transaminación es el siguiente: Actúa como un transportador de grupos a través de su función aldehído que puede formar reversiblemente una base de Schiff ó cetimina con amoníaco u otras aminas. Durante su ciclo catalítico experimentamos reversibles entre la forma aldehído libre ó sea el fosfato de piridoxal propiamente dicho y su forma aminada ó fosfato de piridoxamina. El ciclo consta de dos etapas.<sup>(12,17)</sup>

El complejo enzima-piridoxal, acepta el grupo amino del donador, formándose el complejo enzima-piridoxamina, que se lleva a cabo por la formación intermedia de dos bases de Schiff. El complejo enzima-piridoxamina forma otra base de Schiff con el cetoácido y éste capta finalmente el grupo amino cedido por la base.<sup>(17,12,4)</sup>

Mediantes estudios realizados por Jenkins, se ha llegado a pensar que el grupo aldehído del piridoxal forma una base de Schiff con el grupo  $\xi$ -amino de un resto de lisina específico de la enzima cuando no está ocupado por un grupo amino procedente de un sustrato. (Fig.2).

Con NaBH<sub>4</sub> se reduce la base de Schiff a una amina secundaria y une al fosfato de piridoxal irreversiblemente a la proteína. Cuando el aminoácido se une a la base de Schiff, ocurre una transaldinación que desplaza el grupo lisil-amino y forma una nueva base con el residuo de fosfato de piridoxal.<sup>(4)</sup>

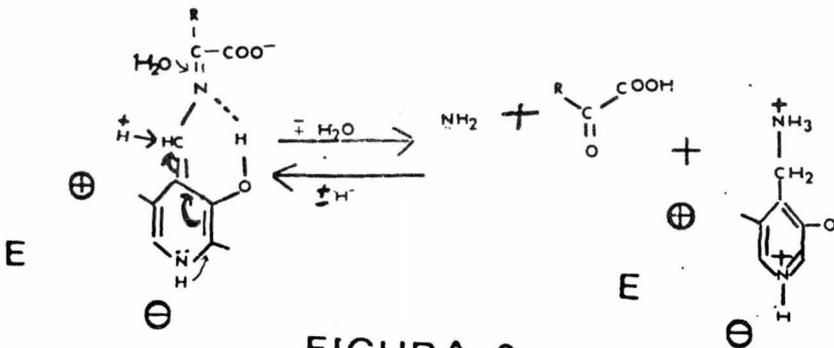
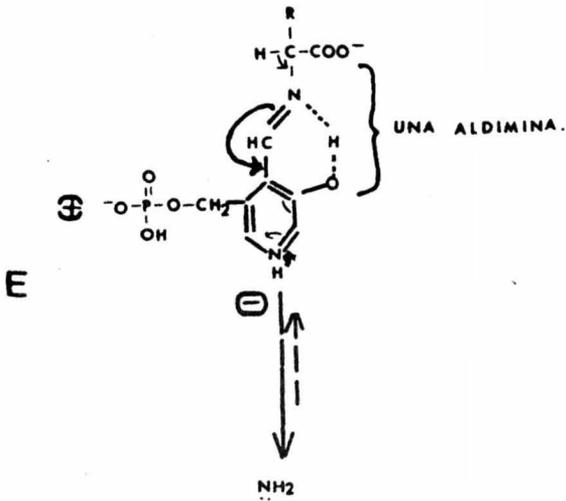
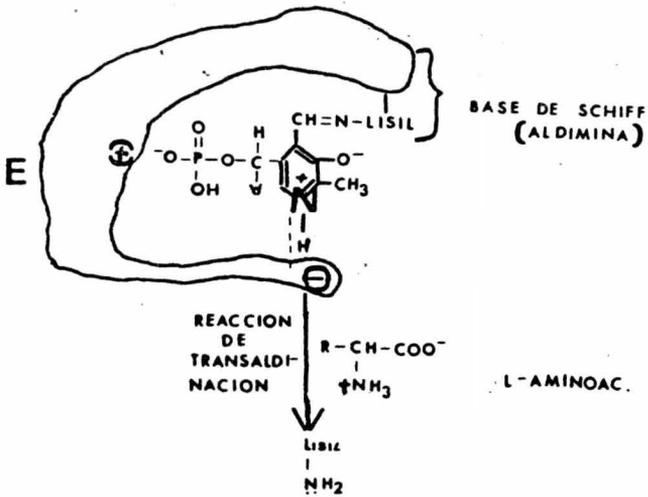


FIGURA 2.

Si se separa a la coenzima de la proteína, ésta pierde su actividad y la recupera al agregar de nuevo el PLP. (3)

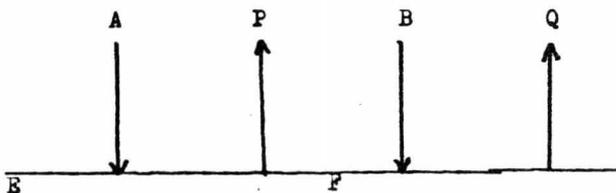
Mediante un reacomodo electrónico, el grupo amino,  $-NH_2$  es transferido a la coenzima para formar el fosfato de piri -- doxamina que reacciona con el cetoácido. El piridoxal se regenera al completarse la reacción. (3,4)

Las transaminasas al igual que otras enzimas, son sensibles a todas aquellas sustancias que impiden ó limitan su actividad, y se les conoce con el nombre de inhibidores.

La inhibición puede ser de dos tipos: Competitiva y No competitiva; se les ha estudiado a través de un mecanismo clásico llamado de Ping-Pong BiBi, por la forma en que se desarrolla. En él se considera a las letras A y B como sustratos y a las literales P y Q, como productos. (3 Vol.II)

Cuando A y Q se combinan con la enzima E, y B y P con F, dan un producto de inhibición competitiva. Si en cambio se combinan A y P ó B y Q, se tiene una inhibición no competitiva. En cada caso la inhibición se elimina por saturación con el sustrato A ó B que permanece invariable.

El siguiente esquema ilustra lo anteriormente explicado:



Se cree que en estos mecanismos sólo hay un punto de absorción en la enzima y todos los reactantes caen en él. (3 vol 19)

Hay varias sustancias que ejercen estos efectos inhibidores, como son: el  $\alpha$ -cetoglutarato, el glutarato y otros ácidos di y monocarboxílicos, principalmente adipato y maleato que no sufren transaminación y actúan como inhibidores no competitivos. Existen además el sulfato sódico de dodecilo que desnaturaliza a la aspartato aminotransferasa; las soluciones de urea a altas concentraciones (8M) las llevan a su forma inactiva. (2,13,3 vol IX).

Las inhiben por completo la p-benzoquinona, la p-fenildiamina y algunos de sus derivados, los metales pesados como los iones de  $\text{Ag}^+$  y  $\text{Hg}^{2+}$ , y en general los reactivos sulfhidrídicos por bloqueo de grupos tioles de la enzima, ya que pueden romper las uniones entre el fosfato de piridoxal y la apoenzima.

La transaminasa aspártica contiene de 6 a 7 grupos -SH, pero sólo 3 determinan su actividad; esta se inhibe por reactivos que forman mercapturos como el p-cloromercuribenzoato (p-CMB), el  $\text{HgCl}_2$  y el  $\text{AgNO}_3$ . La inactivación por p-CMB desaparece al agregar un exceso de glutatión, el PLP no tiene efecto, ya que el inhibidor no rompe las uniones entre coenzima y apoenzima. Esta sustancia aumenta la susceptibilidad de la enzima al ataque por proteinasas bacterianas y disminuye su afinidad por isoniazida y di-(amino-oximetil)-dicetopiperazina, lo que hace pensar que actúa dañando la conformación nativa del centro activo de la enzima. (3,2,13,20)

Las inhiben parcialmente los agentes alquilantes como yodoacetato, acrilonitrilo, acrilamida; los iones  $\text{CN}^-$ , la quinhidrona, las arilarsinas y los óxidos de arsina. También las pueden inactivar irreversiblemente el quinolinato y el ftalato cuando la enzima se incubaba con ellos.

El aspartato sólo puede sustituirse en la transaminasa oxalacética por glutamato ó succinato, sin embargo, el sustrato específico no protege a la enzima contra la inhibición (2).

Las aminotransferasas existen en diferentes estructuras conformacionales ó isoenzimas, ya que se les localiza en mitocondrias y porción soluble del citoplasma de células eucarióticas. Por lo tanto las más estudiadas han sido esas y que usan aspártico como sustrato. (3 vol. IX)

Son dos isoenzimas verdaderas debido a sus diferentes propiedades fisicoquímicas; cada una de ellas está compuesta por 2 subunidades protéicas iguales en las que se identifican 4 subfracciones:  $\alpha, \beta, \gamma, \delta$ .

Cada una de las subfracciones tiene un grado diferente de actividad que está en relación con el contenido de azúcares donde a mayor concentración de azúcares menor actividad; por lo que la subfracción  $\alpha$  es la más activa en la isoenzima citoplásmica.

La diferencia entre cada una de ellas estriba principalmente en el tipo de unión que presentan entre la coenzima y la enzima, en el tamaño molecular, la estructura primaria y la inmunoprecipitación.

Sus características más importantes se enlistan en la siguiente tabla:

Isoenzimas	Asp-Mitocondrial		Asp-Citoplásmica	
	Subfracciones	Punto Isoeléctrico	P.I	Actividad espec
$\alpha, \beta, \gamma, \delta$		6.8	5.68	1500 ± 100
		-	5.53	900-1370
		-	5.38	490-740
		-	5.38	490-740
Forma	Catiónica		Aniónica	
Aspecto	Soluble		Citosol	

	Asp-Mitocondrial	Asp-Citoplásmica
Sustratos	De 4 carbonos	L-Cisteinsulfinato $\beta$ -Sulfinilo $\gamma$ -Metilglutamato $\beta$ -Metilaspártato Treo- $\beta$ -hidroxi-aspártato $\alpha$ -Cetoácidos Ac. Dicarboxílicos Aminoác. monocarbox.
		93 200

Otra diferencia entre ellas es la naturaleza y concentración de iones en el medio de incubación, el  $pK_a$ , el pH óptimo, valores de  $K_m$ , características de los espectros de absorción.

Se sabe que hay (12) comunicación entre citoplasma y mitocondrias durante el proceso de desaminación, por lo que parece probable que la captación de los grupos aminos tenga lugar en el citoplasma con una formación final de glutamato, que mediante un sistema de transporte de la membrana pasa a la mitocondria.

Un factor muy de tener en cuenta es la composición iónica del amortiguador, que afecta la actividad enzimática. Las sustancias que los activan son por orden de potencia: PLP-E > PMP-E > Oxima de PLP-E > Apoenzima. (3 vol IX).

### CAPITULO III

#### METODOLOGIA ESTUDIADA

Debido a la imposibilidad de medir directamente la concentración de las enzimas del suero, se determina su actividad, la que se expresa en unidades de actividad que se define como la cantidad de enzima que transforma una micromol de sustrato en un minuto bajo condiciones estándares; sabiendo que una  $mU/ml = \mu M$  moles de sustrato convertido por ml por minuto. (14)

Los métodos más importantes para hacerlo se basan en: (14)

- a) Medir el incremento de concentración de los productos de reacción,
- b) Medir la disminución en la concentración de sustratos,
- c) Medir la variación en la concentración de sus coenzimas.

*Transaminasas*  
# Al primer grupo pertenece el método de Reitmann y Frankel elegido para la realización de este estudio; es una técnica colorimétrica que se basa en la formación del complejo colorido, 2,4-Dinitrofenilhidrazona, al combinarse la 2,4-Dinitrofenilhidrazina con el oxalacetato, el cetoglutarato ó el piruvato formado durante la reacción correspondiente a cada una de las transaminasas y con los sustratos adecuados para ellas. (16)

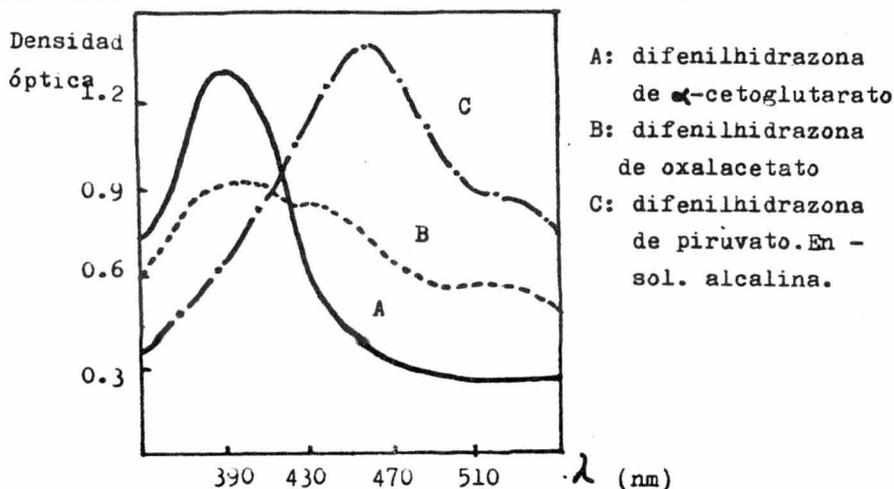
En la determinación de la transaminasa glutámico pirúvica se usan como sustratos alanina y ácido alpha cetoglutarico; donde el donador del grupo amino es el aminoácido, en este caso la alanina; funcionando como aceptor el alpha cetoglutámico, sin que halla formación de amoníaco. Los productos obtenidos son los ácidos pirúvico y glutámico, cuantificándose

el pirúvico mediante el complejo colorido a que da lugar con la dinitrofenilhidrazina, usando NaOH como medio alcalino para detener la reacción después de un cierto tiempo estipulado por la técnica.

Las lecturas se hacen a una longitud de onda de 500 a - 550 nm, con el objeto de evitar la interferencia de la hidrazona del ácido cetoglutárico, la cual al ser menos colorida absorbe a una menor longitud de onda.

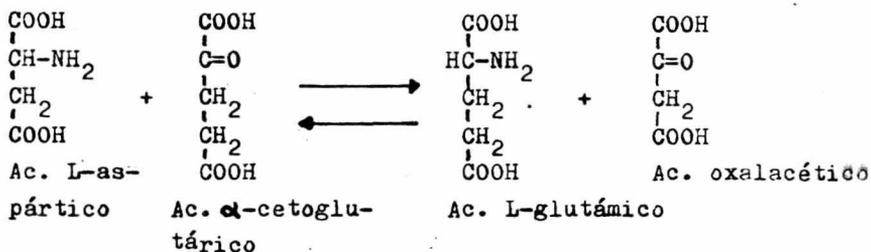
Para la transaminasa glutámico oxalacética, se requiere como sustratos, ácido aspártico y ácido alpha cetoglutárico, para dar origen a los ácidos glutámico y oxalacético; este último se determina espectrofotométricamente en solución alcalina de NaOH.

Como en el caso anterior, hay interferencia de otras hidrazonas formadas durante la reacción, habiendo además una --descarboxilación espontánea del oxalacetato a piruvato; por lo tanto, la lectura debe hacerse a longitudes de onda más altas que las de su máxima absorción, para así mantener una mayor diferenciación entre las densidades ópticas de las tres hidrazonas; es decir, a un rango de 500-550nm. La figura siguiente muestra los espectros de absorción de estos tres ce -- toácidos: (2)

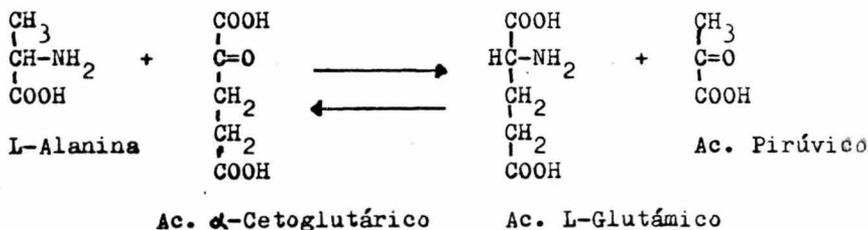


REACCIONES: (20)

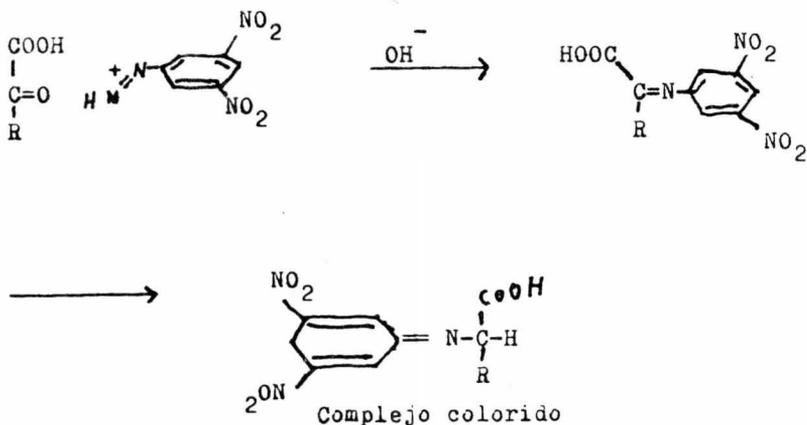
La TSGO cataliza la siguiente reacción:



La TGP- cataliza la reacción siguiente:



La reacción con la dinitrofenilhidrazina es:



Aunque este es proceso poco exacto para trabajos de investigación donde se necesitan de métodos con gran sensibilidad, es sin embargo muy bueno, en trabajos de rutina en laboratorios clínicos, donde debido al alto número de muestras que deben manejarse diariamente, resulta una técnica rápida y de fácil ejecución, donde además no se requieren de aparatos costosos para su elaboración como los que se necesitan en otros métodos; y más específicamente en el de Kar- men y Wróblewski, donde el uso de un espectrofotómetro de luz ultravioleta es causa suficiente para evitar su preferencia, a pesar de ser más sensible que el de Reitmann y Frankel.

Los reactivos usados fueron los mismos que en la técnica original, pero empleando además los requeridos para la investigación motivo de este estudio. (16)

#### Reactivos originales:

#### 1.- Solución tampón de fosfatos 0.1M a pH 7.4

420 ml de sol. de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0.1M

80 ml de sol. de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.1M

Preparar las dos soluciones por separado, procurando que no se cristalicen, lo que se evita calentando suavemente a baño maría si esto llegara a ocurrir; enfriarlas y mezclarlas en las proporciones arriba mencionadas. Mantenerla a temperatura ambiente.

#### 2.- Sol. de piruvato 2mM. Para la gráfica de calibración.

22 mgs. de piruvato de sodio R.A.

Disolverlo en solución tampón, para aforar finalmente con la misma solución a 100 ml.

#### 3.- Sustrato para TGO:

# Sol. de  $\alpha$ -cetogluturato, 2mM —  
 DL-aspartato, 200mM -

Disolver 29.2 mg de ácido  $\alpha$ -cetoglutárico R.A.

2.66 g de ácido dl-aspartico R.A.

con aprox. 15-20 ml de NaOH 1N, en un matraz pequeño --  
 hasta que la solución sea clara; ajustar el pH a 7.4 y -  
 luego aforar con solución tampón de fosfatos a 100 ml.

# Mantener en refrigeración.

#### 4.- Sustrato para TGP:

Sol. de  $\alpha$ -cetogluturato, 2mM

DL-alanina, 200mM.

Disolver 29.2 mg de ácido  $\alpha$ -cetoglutárico R.A.

1.78 g de dl-alanina R.A.

con 15-20 ml de NaOH 1N

hasta tener una sol. clara; ajustar el pH a 7.4 y aforar  
 con solución tampón a 100 ml.

# 5.- Sol. de 2,4-Dinitrofenilhidrazina, 1mM.

Disolver 19.8 mg de 2,4-dinitrofenilhidrazina R.A.

en HCl 1N y aforar con él a 100 ml. Calentar suavemente  
 para lograr una solución homogénea.

# 6.- Sol. de NaOH 0.4N

Las modificaciones de los reactivos usados fueron:

Para las gráficas de calibración:

1.- Sol. de piruvato, 2mM a pH 7.0

2.- Sol. de piruvato, 2mM a pH 7.2

3.- Sol. de piruvato, 2mM a pH 7.4

4.- Sol. de piruvato, 2mM a pH 7.6

5.- Sol. de piruvato, 2mM a pH 7.8

Sustratos para la transaminasa glutámico oxalacética:

- 1.- Sol. de  $\alpha$ -cetoglutarato, 2mM  
dl-aspartato, 200mM  
Sol. de NaOH 1N  
Sol. tampón, 100ml para aforar; a pH 7.0
- 2.- La misma solución anterior pero ahora a pH 7.2
- 3.- La misma solución anterior pero ahora a pH 7.4
- 4.- La misma solución anterior pero ahora a pH 7.6
- 5.- La misma solución anterior pero ahora a pH 7.8

Usando solución de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  ó de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  para ajustar el pH según lo que se requiera.

Sustratos para la transaminasa glutámico pirúvica:

- 1.- Sol. de  $\alpha$ -cetoglutarato, 2mM  
dl-alanina, 200mM  
Sol. de NaOH 1N, para disolver,  
Sol. tampón, 100 ml para aforar; a pH 7.0
- 2.- La misma solución anterior a pH 7.2
- 3.- La misma solución anterior a pH 7.4
- 4.- La misma solución anterior a pH 7.6
- 5.- La misma solución anterior a pH 7.8

Usando para ajustar el pH, solución de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  ó de --

$\text{H}_2\text{PO}_4$  según lo que sea necesario.

La técnica es:

En un tubo de ensaye poner 1 ml del sustrato deseado, incubar a la temperatura constante de:  $25^\circ$ ,  $35^\circ$ ,  $37^\circ$ , y  $40^\circ\text{C}$ , durante 10 min.; agregar 0.2 ml de suero, mezclar e incubar por 60 min. EXACTAMENTE para TGO y por 30 min. para TGP. Sacar el tubo del baño de agua y agregar 1 ml de solución de 2,4-dinitrofenilhidrazina, mantenerlo a temperatura ambiente por 20 min. y agregar 10 ml de NaOH 0.4N, mezclar por inversión, reposar 30 min y leer densidad óptica a 535 nm. Usar agua como blanco.

Se usó una serie de muestras para cada sustrato y para cada temperatura; llevando un control para cada serie. El control se hizo de la siguiente manera:

Sustrato	1 ml
Suero	0.2 ml
2,4-DPH	1.0 ml. Reposar a temperatura ambiente 20 min.,
	agregar 10 ml de NaOH y leer.

Las gráficas de calibración se hicieron de la forma siguiente:

No. tubos	Sol. de piruvato(ml)	Sustrato (ml)	$\text{H}_2\text{O}$ (ml)	Reactivo cetónico (ml)
1	0.0	1.0	0.2	1.0
2	0.1	0.9	0.2	1.0
3	0.2	0.8	0.2	1.0
4	0.3	0.7	0.2	1.0
5	0.4	0.6	0.2	1.0
6	0.5	0.5	0.2	1.0

Mantener a temperatura ambiente por 20 minutos. Poner en cada tubo 10 ml de NaOH, mezclar y leer a los 5 min., contra el tubo número uno. Estas se repitieron con cada uno de los sustratos usados para la transaminasa pirúvica.

Las gráficas de calibración para la transaminasa oxalacética se hace de la misma forma anterior pero usando distintas concentraciones de piruvato y de sustrato.

*Concentración*

No. tubos	Sol. de piruvato de Na (ml)	Sustrato (ml)	H <sub>2</sub> O (ml)	Reactivo cetónico(ml)
1	0.0	1.0	0.2	1.0
2	0.05	0.95	0.2	1.0
3	0.10	0.90	0.2	1.0
4	0.15	0.85	0.2	1.0
5	0.20	0.80	0.2	1.0
6	0.25	0.75	0.2	1.0

Mezclar y mantener a temperatura ambiente por 20 min., agregar 10 ml de NaOH a cada tubo, mezclar y leer a 535 nm - contra el tubo No. 1.

La gráfica se repitió usando cada sustrato a su correspondiente pH.

Se usaron dos grupos de sustratos para cada enzima; -- uno de ellos se mantuvo en condiciones desfavorables, es decir, sin conservador aunque en refrigeración, para favorecer la contaminación microbiana; especialmente la producida por hongos que son quienes más atacan este tipo de soluciones.

Uno de los factores de error que se introdujeron, fué que las pipetas empleadas, aunque se debían mantener limpias era necesario que después de tomar la cantidad debida del sustrato respectivo y antes de introducirlo en otro, lavarlas con sólo agua de la llave sin emplear jabón; esto por lo tanto provoca contaminación química entre las soluciones alterándoles el pH.

El otro grupo se manejó en condiciones ideales, esto es protegiendo los reactivos con unas gotas de cloroformo -

usado como conservador; también en refrigeración, pero teniendo cuidado en la manipulación de usar pipetas muy limpias, lavadas no con detergente sino con jabón suave (Sigma-clean) y pasadas por agua destilada; y utilizando una pipeta para cada reactivo.

Las muestras biológicas se tomaron de una mezcla de sueros libres de nemólisis, quilosis e ictericia; esto es muy importante, ya que las enzimas se hallan también en los eritrocitos, <sup>(1)</sup> lo que provoca un aumento anormal en las lecturas; lo mismo ocurre con la quilosis y la ictericia que por opacidad una y por coloración otra, dan valores erróneos.

Los sueros se mantuvieron en congelación, durante un período de tiempo de 45 días; el suero se dividió en porciones alícuotas, para evitar la descongelación continua, la que ocasiona desnaturalización de las enzimas dando por resultado falsos valores bajos.

Es importante hacer notar que el pH de las soluciones fueron ajustados con potenciómetro, lo que reduce notablemente el margen de error que pudiera existir si no se hubiera usado.

## CAPITULO IV

### RESULTADOS OBTENIDOS

Después de realizar la investigación en las condiciones antes expuestas, los resultados que se obtuvieron en - cada grupo enzimático fueron diferentes. Esto puede apreciarse mejor en las tablas subsecuentes y en las gráficas de calibración efectuadas para los distintos sustratos y temperaturas usadas.

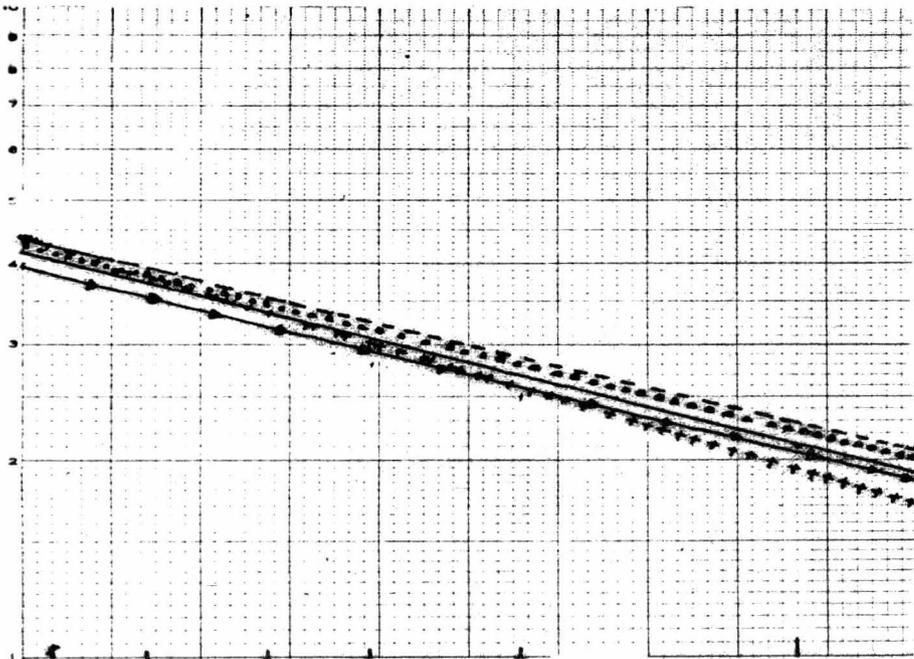
Las gráficas se hicieron colocando las concentraciones de la enzima correspondiente en las abscisas y el por ciento de transmisiones (%T) en las ordenadas. Las concentraciones - están expresadas en unidades por ml de suero (U/ml); para la transaminasa glutámico oxalacética<sup>(2)</sup> son:

21, 42, 64, 97, 140 U/ml. Para la transaminasa glutámico pirúvica son: 27, 57, 99, 137, 205 U/ml de suero.

Todas las gráficas de calibración se realizaron a temperatura ambiente ya que no deben incubarse, por no estarse efectuando una reacción enzimática, ya que sólo se trata de un proceso de desarrollo de color para ser usada como patrón de medición de las determinaciones que sí se incuban.

Se usaron sustratos con conservador tanto para la transaminasa glutámico oxalacética, como para la transaminasa glutámico pirúvica; por lo que se hizo una gráfica en estas condiciones para cada una de ellas y otras en las que no se empleó conservador. Además se realizaron a cada diferente pH empleado en la cuantificación de las enzimas: 7.0, 7.2, 7.4, 7.6 y 7.8

Gráfica No. 1  
Calibración de Transaminasa Glutámico Oxalacética.



pH	% de T						Simbología en gráfica
7.0	43	39	35	31	28	22	oooooooooooo
7.2	44	37	34	30	25	20	+++++
7.4	42	37	33	30	27	22	—————
7.6	44	39	35	32	28	33	- - - - -
7.8	40	35	32	28	25	21	→→→→→
U/ml de suero:	0	21	42	64	97	140	

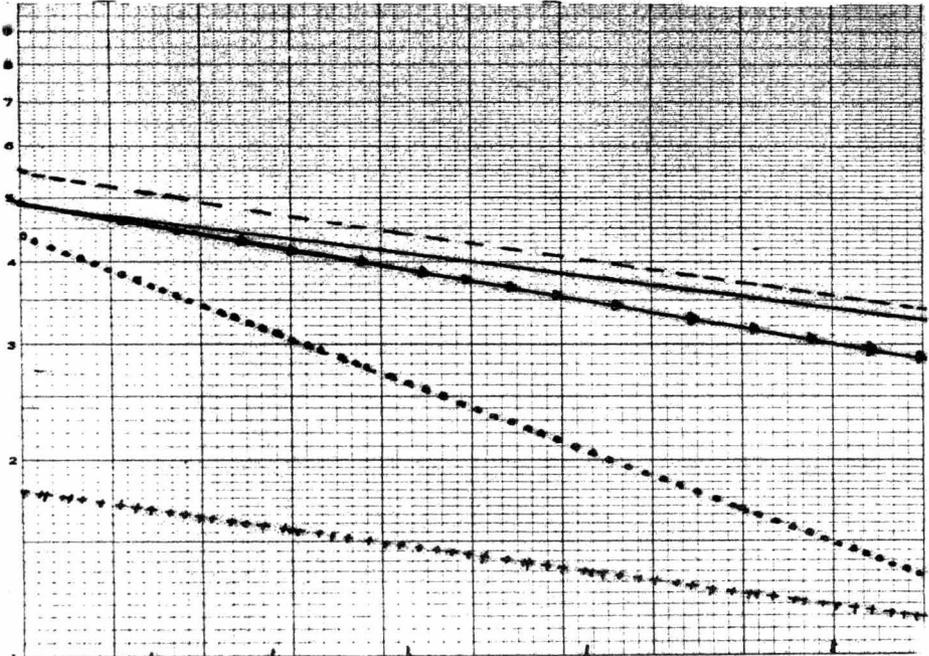
Soluciones usadas:

Patrón de piruvato de sodio, 2mM; disuelto en soluciones reguladoras a cada uno de los pH.  
2,4-dinitrofenilhidrazina, 1mM; en HCl 1.0N.  
NaOH 0.4N.

Condiciones de temperatura: Ambiente.

Conservador: Cloroformo R.A.

Gráfica No. 2  
 Calibración de Transaminasa Glutámico Oxalacética.



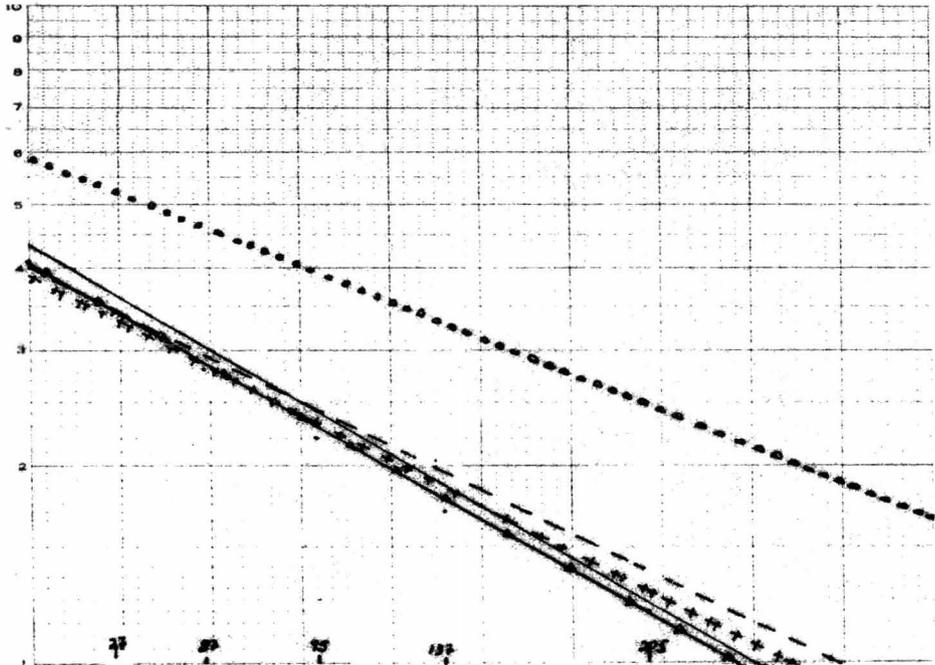
pH	% de T						Simbología en gráfica
7.0	44	37	30	25	20	15	oooooooooooooooooooooooo
7.2	18	17	16	15	13	12	+++++
7.4	49	46	42.5	40	38	34	—————
7.6	55	50	47	43	38	36.5	- - - - -
7.8	49.5	44.5	41	38	34	31	→ → → → →
U/ml de suero: 0	21	42	64	97	140		

Soluciones usadas:  
 Las mismas descritas en la hoja anterior.

Condiciones de temperatura: Ambiente.

Conservador: No se usó.

Gráfica No. 3  
Calibración de Transaminasa Glutámico Pirúvica .



pH	% de T						Simbología en gráfico
7.0	59	51	43	38	34	25	oooooooooooooooooooo
7.2	39	33	29	23	18	13	+++++
7.4	43.5	36	30	25	18	12.5	—————
7.6	40	33	28	24	19	14	- - - - -
7.8	41	34	28	22	17	12	————>
U/ml de suero:	0	27	57	95	137	205	

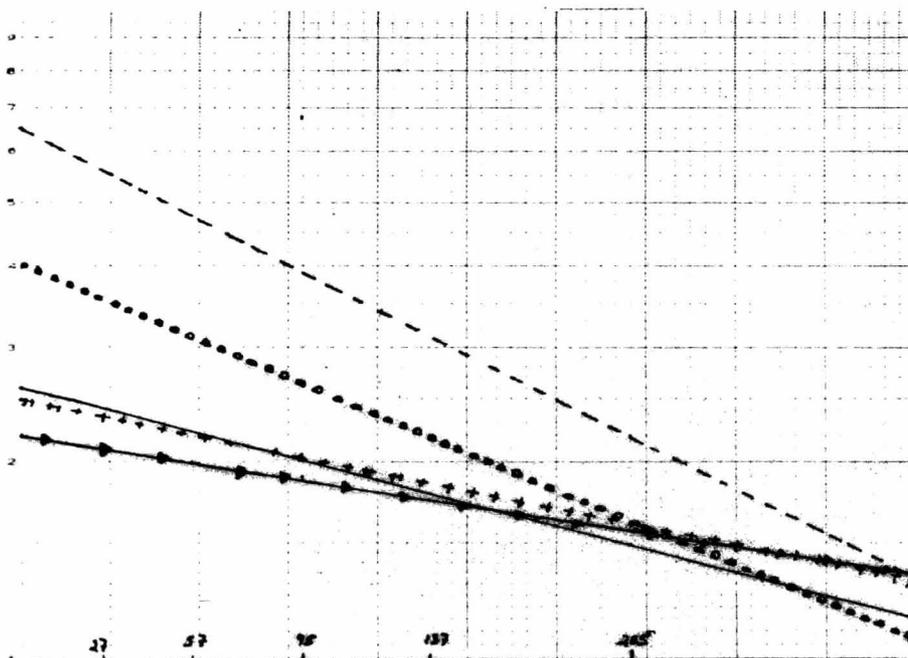
Soluciones empleadas:

Patrón de piruvato de sodio, 2mm; disuelto en sol. reguladora a cada uno de los pH anteriores.  
2,4-dinitrofenilhidrazina, 1mm; en HCl 1.0N .  
NaOH 0.4N .

Condiciones de temperatura: Ambiente.

Conservador: Cloroformo R.A.

Gráfica No. 4  
Calibración de Transaminasa Glutámico Pirúvica.



pH	U/ml de T						Simbología en gráfica
7.0	4	5	9	17	30	16	oooooooooooooooooooo
7.2	25	23	22	20.5	19	15.5	+++++
7.4	26	24	22.5	20	17.5	15	—————
7.6	65.5	55	48	40	30	22	- - - - -
7.8	22	21	20	19	17.5	16	—————x—————
U/ml de suero	0	27	57	95	137	205	

Soluciones empleadas:

Las descritas en la noja anterior.

Condiciones de temperatura: Ambiente.

Conservador: No se usó.

Resultados obtenidos de transaminasa glutámico pirúvica.

Usando sustratos con conservador:

	pH	7.0	7.2	7.4	7.6	7.8
T						
25°C		1.0	8.0	0.0	5.8	10.2
35°C		17.2	13.2	1.0	4.0	6.4
37°C		4.4	2.4	1.0	22.4	20.0
40°C		2.4	8.0	9.6	5.6	2.6

Tabla 1. Valores promedios ( $\bar{x}$ ) en U/ml.

Sustratos sin conservador:

	pH	7.0	7.2	7.4	7.6	7.8
T						
25°C		15.2	27.0	37.8	40.6	35.8
37°C		16.8	10.0	97.8	6.0	80.0

Tabla 2. Valores promedios ( $\bar{x}$ ) en U/ml.

Tabla 3. Amplitud de valores en U/ml. (Lím. sup/lím inf)

Sustratos con conservador.

	pH	7.0	7.2	7.4	7.6	7.8
T						
25°C		1/1	10/3	0/0	8/2	15/6
35°C		26/9	22/11	5/0	5/0	9/0
37°C		6/0	6/0	5/0	26/20	20/20
40°C		3/0	8/8	12/6	6/5	5/2

Tabla 4. Amplitud de valores en U/ml. (Lím. sup/lím inf)

Sustratos sin conservador.

	pH	7.0	7.2	7.4	7.6	7.8
T						
25°C		27/10	45/0	45/27	47/26	52/25
37°C		22/15	10/10	180/73	6/6	90/57

Resultados obtenidos en la determinación de la transaminasa glutámico oxalacética.

Tabla 5. Valores promedios ( $\bar{x}$ ) en U/ml.

Sustratos con conservador.						
	pH	7.0	7.2	7.4	7.6	7.8
T						
25°C		7.8	7.4	11.8	13.6	4.0
35°C		7.0	4.5	8.1	0.0	0.0
37°C		3.6	19.2	13.8	16.0	9.9
40°C		8.3	7.5	8.4	5.0	8.1

Tabla 6. Valores promedios en U/ml.

Sustratos sin conservador.						
	pH	7.0	7.2	7.4	7.6	7.8
T						
25°C		68.4	21.0	20.8	21.0	0.0
37°C		27.0	28.3	45.2	38.0	41.4

Tabla 7. Amplitud de valores en U/ml. (Lím sup/lím inf)

Sustratos con conservador.						
	pH	7.0	7.2	7.4	7.6	7.8
T						
25°C		8/7	16/0	17/8	17.5/6	4/4
35°C		8/3	7.5/0	12.5/5	0/0	0/0
37°C		9/0	20/16	18/9	24/10	12.5/3
40°C		13/3	7.5/7.5	9/8	5/5	9/7.5

Tabla 8. Amplitud de valores en U/ml. (Lím sup/lím inf)

Sustratos sin conservador.						
	pH	7.0	7.2	7.4	7.6	7.8
T						
25°C		96/27	45/9	33/15	27/17	0/0
37°C		27/27	45/12.5	53/40	38/38	43/38

## CAPITULO V

### ANALISIS DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS

En esta sección trataremos de analizar el porque de los resultados que se obtienen y las causas que interfieren en ellos.

Uno de los factores más importantes de tener en cuenta durante el desarrollo de la práctica, es evitar la contaminación microbiana de los sustratos, que por su carácter de contenido aminoacídico, es un medio propicio para el crecimiento de gérmenes principalmente hongos, debido a su nutrición autotrófica. Esto puede corregirse manteniéndolos no sólo en refrigeración sino adicionándoles además un conservador.

En las gráficas anteriores puede verse como los resultados varían cuando se usa conservador y cuando no se usa; lo que nos da una idea de la forma en que la presencia de microorganismos en los sustratos los afecta.

Además de la contaminación intervienen el pH y la temperatura de incubación. Las alteraciones en el pH son muy notables, sobre todo, si no se usa ningún preservativo; es por ello que se le debe ajustar con potenciómetro. Se ha observado que al variar el pH debe variarse la temperatura con el fin de evitar cambios en los valores finales.

Las observaciones hechas para cada enzima son diferentes; tenemos que la transaminasa glutámico oxalacética funciona bien a varias temperaturas y pH, siendo su óptimo a 37°C y a pH de 7.2, si se emplea conservador; de esta forma trabaja

oien a 25°C y a pH de 7.6, a 40°C y 7.0, a 35°C y 7.4; debe - aclararse que estos datos son dados en orden decreciente de - actividad, ó sea que ésta disminuye al variar el pH.

Cuando no se usa conservador en los sustratos, su pH óptimo es de 7.0 y la temperatura de 25°C; puede usarse también a 7.4 y 37°C la temperatura de incubación.

T (°C)	pH óptimo
25	7.6
35	7.4
37	7.2
40	7.0

Con cloroformo.

T (°C)	pH
25	7.0
37	7.4

Sin cloroformo.

Lo que ocurre con la transaminasa glutámico pirúvica es semejante; su pH óptimo es de 7.6 y la temperatura de incubación de 37°C; se le puede manejar también a 25°C y pH de 7.8; a 35°C y 7.0, y aunque con valores más bajos que los anteriores a 7.4 y 40°C.

Cuando no se emplea cloroformo el pH es de 7.6 y la temperatura de 25°C ó de 7.4 con 37°C.

T (°C)	pH óptimo
37	7.6
35	7.0
25	7.8
40	7.4

Conservador.

T (°C)	pH
25	7.6
37	7.4

Sin conservador.

En términos generales puede decirse que se obtienen valores más altos en la transaminasa glutámico pirúvica que en la oxalacética, lo que nos indica una menor actividad de esta enzima, debido tal vez a que es más sensible a los cambios - físicos.

## CAPITULO VI

### RESUMEN

El presente trabajo se desarrolló con fines didácticos, para conocer las causas por las cuales, las determinaciones en suero de las transaminasas glutámico oxalacética y glutámico pirúvica no dan los resultados esperados.

La técnica empleada para ello, fué la colorimétrica de Reitman y Frankel, en la que se introdujeron diferentes errores tanto físicos como químicos y mecánicos. Se usaron mezclas de sueros libres de hemólisis, durante un lapso de tiempo de 45 días; tomándose controles diarios para poder apreciar los cambios que pudieran presentarse.

Se utilizaron dos grupos de sustratos para cada una de las enzimas a determinar; un grupo usando cloroformo como conservador y otro grupo sin conservador. Esto fué con el fin de observar las variaciones que pudieran presentarse en el transcurso de las determinaciones.

## CAPITULO VII

### CONCLUSIONES

Después de lo anteriormente expuesto, se llega a la conclusión de que las diferentes lecturas de unidades que se obtienen para cada enzima a su correspondiente pH y temperatura, se debe probablemente a la formación de subproductos que en alguna forma interfieren en la determinación. Esto podría comprobarse mediante un análisis que permita conocer con exactitud lo que ocurre después de efectuada la reacción, como sería una espectroscopía de rayos infrarrojos y de resonancia magnética nuclear.

Debe tenerse un riguroso control, tanto sobre el pH como sobre la temperatura; el primero deberá ajustarse potenciométricamente para poder lograrlo y la segunda, mediante el uso de baños de agua con termostato regulable de alta sensibilidad.

Los reactivos empleados, deben prepararse con mucho cuidado ya que de ellos depende directamente el que se obtengan los resultados esperados y por consiguiente, que la práctica sea de buena calidad. Todos estos factores son muy importantes para que la técnica funcione a su más alto grado de sensibilidad y los valores obtenidos sean confiables.

Desde la toma de la muestra comienza la buena técnica, la que debe hacerse en el momento preciso; en los sueros no debe haber hemólisis, ictericia ni quilosis, para evitar la interferencia que provocan por razones de su propio carácter colorido. Hay ocasiones en que no se les puede eliminar por

completo, pero sin embargo, ya por sí mismo esto nos está -- dando una idea de lo que se obtendrá, sobre todo si se conocen ciertas características del paciente.

Finalmente, se debe tener presente la limpieza del material de vidrio que se usará, debido a las sustancias que actúan como inhibidores de la actividad enzimática.

Entre las situaciones que pudieron notarse de más interés durante el desarrollo de esta investigación y estamos seguros que de tomarse en cuenta, podría corregirse en su momento, el trabajo efectuado en el laboratorio, lo que permitiría alcanzar el objetivo final que se persigue al programar esta determinación en el curso de laboratorio de Análisis Bioquímico Clínico, con clave 027-Q-10.

## CAPITULO VIII

### BIBLIOGRAFIA

- 1.- Anderson, Arthur K.: Essentials of Physiological Chemistry; Cap. 7, 4a. Edición; New York 1956; John Wiley and Sons, Inc. Pág. 186-203, 270.
- 2.- Bergmeyer, H.V.: Methods in Enzymatic Analysis; 2a. Edición; New York 1965; Academic Press.
- 3.- Boyer, Paul D.: The Enzymes; 3a. Edición; Vols. II y IX: - New York 1973; Academic Press.
- 4.- Conn, E.E.; Stumpf, P.K.: Outlines of Biochemistry; 2a. Edición; New York 1966; John Wiley and Sons, Inc.; Pág. 174.
- 5.- Chapman, R.G.; Schaumburg: Glycolysis and Glycolytic Enzyme of Aging Red Cells in Man. Brit. J. of Haemat. 13:665, 1967.
- 6.- Edlbacher, S.; Leuthardt, F.: Tratado de Química Fisiológica; 12a. Edición; Madrid 1958; Aguilar; Pág. 388.
- 7.- Greenberg, David M.: Metabolic Pathways; Vol. I; 2a. Edición; New York 1960; Academic Press; Pág. 166.
- 8.- Harper, H.A.: Química Fisiológica; 2a. Edición; México 1969; El Manual Moderno.
- 9.- Killip, T. III., Mary Ann Payne.: High Serum Transaminase Activity in Heart Disease: Circulatory Failure and --

Hepatic Necrosis. *Circulation*.21:646-659. 1960.

- 10.- Kontinen, A. and Halonen, P.I.: Serum  $\alpha$ -Hydroxybutyric -  
Dehydrogenase in Myocardial Infarction: Comparison -  
with Glutamic Oxalacetic Transaminase and Lactic De-  
hydrogenase. *Am. J. Cardio*.10:525-530. 1962.
- 11.- La Due, John S.: Wróblewski, F. and Karmen, A.: Serum Gluta-  
mic Oxalacetic Transaminase Activity in Human Acute-  
Transmural Myocardial Infarction. *Science*.120:497-99  
1954.
- 12.- Lenninger, Albert L.: *Bioquímica*; la. Edición, Barcelona 1973  
Omega; Pág.463-65.
- 13.- Mattenheimer, H.: *Clinical Enzymology: Principles and Appli-  
cations.*; la. Edición, New York 1966; Ann Arbor Science  
Publishers Inc.; Pág.14,70-109.
- 14.- Merck, E.: *Clinical Laboratory of Medical-Chemical In --  
vestigation Methods*; 11a. Edición, Darmstadt (FRG) 1974  
Merck; Pág.197-207.
- 15.- Meyers, F. and Evans, J.M.: The Serum Transaminase and -  
Electrocardiogram in Autopsy-Confirmed Acute Myocar-  
dial Infarction. *Am.Heart J.* 67:15-17 1964.
- 16.- Reitman, S. and Frankel, Sam: A Colorimetric Method for -  
the Determinations of Serum Glutamic Oxalacetic and  
Glutamic Pyruvic Transaminases. *Am.J.Cli.Path.* 28:  
56-60 1957.
- 17.- Stryer, Lubert.: *Biochemistry*; la. Edición, San Francisco  
1975; W.H. Freeman and Co.; Pág.434-35.
- 18.- Vincent, W.R. and Rapaport, E.: Serum Creatine Phosphoki-  
nase in the Diagnosis of Acute Myocardial Infarction.

Am.J.Cardio. 15:17-26 1965.

- 19.- Wilkinson, J.H.: An Introduction to Diagnostic Enzymology; Cap.5, 3a. Edición ; London 1962; Edward Arnold - (Publishers) Ltd. Pág.106-19 y 140-42.
  
- 20.- Winkelman, J.W.; Cannon, D.C. and Henry, R.J.: Clinical Chemistry: Principles and Technics Bio-Science Laboratories; Cap.21, 2a. Edición; New York 1973; Harper and - Row. Pág.873-93.