"ESTUDIO PRACTICO COMPARATIVO, DE LOS PRINCIPALES METODOS DE DOSIFICACION DE LA TRANSAMINASA GLUTAMICO OXALACETICA, EN SUEROS HUMANOS".

ADELA MUJICA MIRANDA

U. N. A. M. 1959

T E S I S | P R O F E S I O N A L

Universidad Nacional Autónoma de México
UNAM
Biblioteca Central
Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

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.

Universidad Nacional Autónoma de México

Escuela Nacional de Ciencias Químicas

"ESTUDIO PRACTICO COMPARATIVO, DE LOS PRINCIPALES METODOS DE DOSIFICACION DE LA TRANSAMINASA GLUTAMICO OXALACETICA, EN SUEROS HUMANOS".

TESIS

que para su examen profesional de Químico Farmacéutico Biólogo

PRESENTA

ADELA MUJICA MIRANDA

México, D. F.

1959.

A mis padres con cariño.

Hago presente mi gratitud a la Dirección del Instituto Nacional de Cardiología y muy especialmente al Sr. Dr. Dn. Tomás Perrín y a la Srita. Q. F. B. Clementina López Cárdenas - jefe y subjefe del laboratorio de Química de dicho Instituto.

Con afectuoso reconocimiento al Sr. Dr. Dn. Edmundo Calva C. jefe del Depto. de Bioquímica del I. N. C. por su valiosa dirección en la realización de este trabajo.

C A P I T U L O S

I.- INTRODUCCION.

II.- ANTECEDENTES.

III.- METODOS Y RESULTADOS.

IV.- OTROS METODOS.

V.- CONCLUSIONES.

VI.- BIBLIOGRAFIA.

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

Está ampliamente demostrado que la transaminasa glutámico- — oxalacética aumenta en el suero de pacientes con infarto del miocar— dio, durante la primera semana siguiente al infarto. Este hecho sirve de valiosa ayuda en el diagnóstico diferencial de dicha enfermedad.

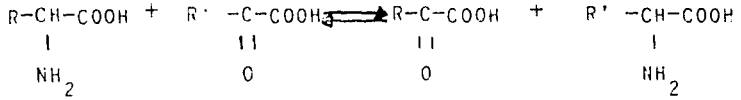
El presente estudio se realizó en el Laboratorio de Química - del Instituto Nacional de Cardiología. El propósito fué seleccionar - un método, entre los ya establecidos, para cuantificar la transamina- sa glutámico-oxalacética, en el trabajo habitual de los laboratorios- de dicho Instituto.

A N T E C E D E N T E S .

Transaminacion.-

La reacción biologica de transaminación fué observada desde -- hace más de 40 años por Neubauer y Knoop (1). La primera descripción- de la transaminación enzimática fué hecha por Braunstein y Kritzman - que la estudiaron en tejidos animales y la definieron como una trans-- ferencia intermolecular de grupos aminos (2).

La reacción se efectúa entre un aminoacido y un cetoácido; el- primero cede su grupo amino al segundo y se forman los correspondien-- tes cetoácido y aminoácido.



El aminoácido al transferir su grupo amino se oxida, mientras- el cetoácido, al transformarse en aminoácido, se reduce.

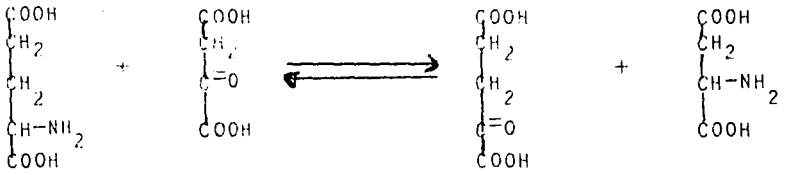
La reaccion es reversible y está catalizada por enzimas llama- das transaminasas o aminoferasas. En los casos en que se ha demostrado la participacion de una coenzima, se ha encontrado que interviene el - fosfato de pridoxal.

En investigaciones recientes se ha llegado a comprobar la - -- existencia de varias transaminasas ya que todos los aminoácidos natu-- rales conocidos pueden participar en procesos de transaminacion (1).

Transaminasa Glutámico-Oxalace . . . o tambien llamada Transaminasa glu- támico-aspartica.-

La enzima transaminasa glutamico-oxalacetica cataliza reversi- blemente y con un grado relativamente alto de especificidad la trans-- ferencia del grupo amino del acido L-glutamico al ácido oxalacetico --

con la formacion de los acidos alfa-cetoglutarico y L-aspártico.



Ac. L-glutamico — Ac.oxalacético — Ac. alfa-ceto glutarico — Ac. L-aspartico.

O'Kane y Gunsalus demostraron que el fosfato de piridoxal es el grupo prostético enzimático (3).

La enzima está ampliamente distribuida en el organismo humano. La maxima concentracion se registra en el músculo cardíaco (4). La lesion miocárdica, en los casos de infarto, va seguida de un aumento en la actividad enzimática del suero de dos a veinte veces el valor normal (5). Presentan tambien actividad transaminásica en orden decreciente: el musculo esquelético, el cerebro, el higado, el riñón, el páncreas, el bazo, los pulmones, los testiculos, etc. (6).

La presencia de la enzima en el suero sanguineo y en los glóbulos rojos humanos fue demostrada por Karmen y sus colaboradores. Estos autores encontraron que la concentración en el suero y en el plasma es la misma, pero es diez veces mayor en los glóbulos rojos (7).

El nivel de la actividad de la enzima en el suero en individuos normales es practicamente el mismo dia a día (8).

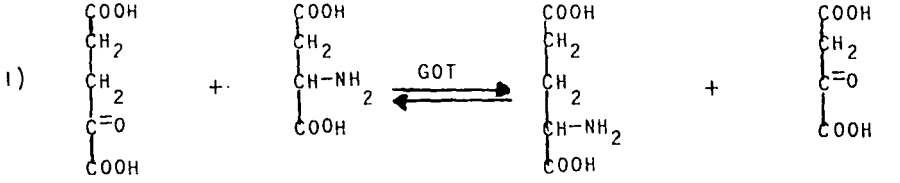
Por otra parte, la actividad enzimatica del suero permanece constante por un periodo de dos semanas, cuando se guarda a una temperatura entre 0^{o} y 5^{o} C (7). El congelamiento y la liofilizacion no producen alteración en la actividad, asi como tampoco el calentamiento a 60^{o} C durante 25 minutos. A la temperatura de la ebullicion se destruye a la enzima (7).

M E T O D O S

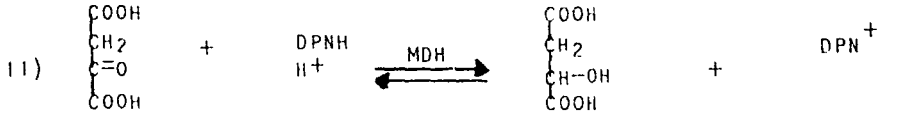
Primero.-

El primer método empleado en este trabajo, para la determinación de la transaminasa glutámico-oxalacética, fué el espectrofotométrico descrito por Karmen (9).

El ácido oxalacético, formado en la reacción de transaminación (I), es determinado por medio de una reacción auxiliar (II), en la que oxida al difosfopiridinucleótido reducido en presencia de deshidrogenasa málica y se reduce a acidos málico.



Ac. alfa-ceto glutárico. Ac. L-aspártico Ac. L-glutámico Ac. oxal-acético.



Ac. oxalacético Ac. málico

La actividad enzimática es proporcional a la cantidad de acido oxalacético reducido. La reduccion del acido oxalacetico es concomitante a la oxidacion del DPNH y esta última se mide por la disminución de absorcion luminosa a la longitud de onda de 340 mμ. En esta longitud de onda el DPNH, en contraste con su forma oxidada DPN^+, tiene un maximo de absorcion.

Aparato empleado.-

Se uso el espectrofotometro Beckman modelo DU con lámpara de-Tungsteno.

Reactivos.-

Fueron adquiridos de la "California Foundation for Biochemi-cal Research" 3625 Medford Street, Los Angeles 63, Cal.

1.- Solución estabilizada de deshidrogenasa málica, (MDH) - - conteniendo 10,000 Unidades Karmen por ml. (Preparada de-corazón de cerdo por el método de Strab).

2.- Sal disódica del difosfopiridinucleótido, (DPNH).- Dispo-nible en ampolletas de 2 mg. para disolverse en 1 ml de - solución amortiguadora de fosfato.

3.- Solución 0.1 M de ácido alfa cetoglutárico.

4.- Acido L-aspártico 0.2 M. en solución amortiguadora de pH 7.5

5.- Solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M. pH 7.5

Procedimiento.-

Para cada suero que se ensayó se usaron dos cubetas Beckman - de cuarzo de 1 cm. de grosor. La mezcla de reacción se preparó en el-siguiente orden:

Soluciones	Cubeta problema (ml)	Cubeta testigo (ml)
1- Ac. L-aspartico	0.5	0.5
2- MDH	0 1	0.1
3- DPNH	0.1	---
4- Suero	0.1	0.1
5- Sol Amortiguadora.	2.0	2.1

Se cubrio cada cubeta con su tapa respectiva y se mezclo el -- contenido por inversion. Durante 30 minutos se dejaron reposar a la -- temperatura del laboratorio. Esta preincubacion sirve para obtener una densidad optica constante, ya que una cantidad variable de DPNH es - - oxidado por substratos del suero, principalmente el acido piruvico que en presencia de deshidrogenasa lactica se reduce a acido lactico. Asimismo sirve para que la temperatura de los tubos se equilibre con la - temperatura ambiente.

Al final de los 30 minutos se añadio:

6-Ac. Alfa-ceto glutarico.	0.2	0.2

Inmediatamente despues de añadir este ultimo reactivo se empezó a contar el tiempo de incubación. La cubeta testigo sirvió para fijar el 100% de transmision y la cubeta problema se leyó a los 2, 4, 6, 8, 10 y 12 minutos contados a partir de la adicion del ácido alfa-ce-- toglutárico.

Calculos.-

Para expresar los resultados obtenidos se tomo como unidad de- Actividad Transaminasica el cambio en unidades de la densidad óptica - por centimetro . de medio absorbente, por minuto, por ml de suero y -- estando el sistema a 25°C. (6) (7).

$$\frac{U.T.}{ml} = \frac{(DO_2 - DO_1)\ 1000}{(t_2 - t_1) \times f_T\ f_p}$$

$U.T.$ = unidades de transaminasa.

DO_2 = Densidad óptica al tiempo t_2, en minutos.

DO_1 = Densidad optica al tiempo t_1, en minutos.

f_p = Longitud de medio absorbente en la cubeta, en centimetros.

f_T = Factor de conversion para la temperatura (7).

V = Volumen de suero, en ml.

Actividad de la Transaminasa Glutamico-oxalacetica en 25 sueros de personas normales.

Metodo espectrofotometrico de Karmen

Núm	Nombre	Sexo	U. de T. por ml. de suero
1	A.M.	F	18
2	E.M.	F	20
3	L.N.	F	23
4	R.N.	F	18
5	M.G.	F	17
6	R.M.	F	18
7	C.S.	F	18
8	J.S.	F	22
9	J.L.	F	25
10	R.R.	F	14
11	E.S.	M	17
12	R.M.	M	18
13	L.M.	M	19
14	M.S.	M	24
15	R.J.	M	23
16	A.S.	M	16
17	A.B.	M	13
18	C.R.	M	19
19	D.H.	M	27
20	A.P.	M	27
21	M.S.	M	15
22	J.L.	M	22
23	R.H.	M	22
24	M.V.	M	26
25	R.D.	M	37

Valores normales.-

De la grafica anterior se ve que el maximo valor registrado en sueros normales fue de 29 unidades y el minimo de 13 U. El valor promedio que se obtiene es de 22 unidades. La desviacion tipo — — — es de 3 5 unidades calculada de la ecuacion .

$$\sigma = \sqrt{\frac{\Sigma x^2 - \frac{(\Sigma x)^2}{N}}{N-1}}$$

Para esta técnica sus autores reportaron como resultados de -- las determinaciones hechas a sueros de personas normales; un valor - - promedio de 16 unidades, 33 unidades como cifra máxima obtenida y 10 - unidades como cifra mínima.

NOTA: Se tomaron como personas normales a los médicos, enfermeras y - químicas del Instituto, así mismo a los donadores de sangre que fueron aceptados en la misma institución.

Segundo Método.-

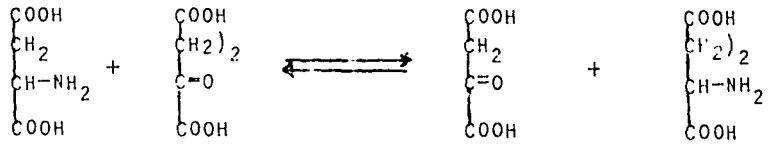
Metodo de Cabaud, Leeper y Wróblewski.-

El método que se estudió en segundo término fué el propuesto - por Thonhasy, White y Umbreit modificado por Cabaud, Leeper y Wróble-- ski (10).

Base del método.-

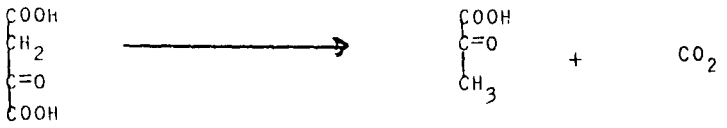
Las reacciones empleadas en este método son las siguientes:

(I)



Ac. L-aspárti- co. | Ac. alfa-ceto glutárico | Ac. oxalace- tico | Ac. glutámico

(II)



Ac. oxalacético | Ac. pirúvico

El ácido oxalacetico que se forma en la reacción (I) cataliza- da por la transaminasa, es convertido a ácido pirúvico por el citrato- de anilina en la reacción (II). El ácido pirúvico se hace reaccionar - con la dinitrofenilhidrazina y se forma la dinitrofenilhidrazona co--- rrespondiente que se extrae con tolueno. La solución de la hidrazona -

en tolueno desarrolla un color canela al tratarla con solución alcohólica de hidróxido de potasio. La intensidad de la coloración es proporcional a la cantidad de ácido pirúvico y éste a la actividad de la transaminasa.

Reactivos.-

1.- Substrato para la transaminasa: Acido DL-aspártico, 2.66 g; Acido alfa-cetoglutárico, 0.6 g; KH_2PO_4, 2.0 g. Para facilitar la solución del ácido aspártico en agua destilada se agrega su equivalente de solución 0.1 N o KOH y al final se ajusta el pH a 7.4 con la misma solución de KOH y se completa a 100 ml con agua destilada. La solución se conserva en el refrigerador al menos por un mes.

2.- Acido tricloroacético al 100%. Partes iguales de tricloroacético y agua destilada. La solución se conserva en el refrigerador.

3.- Citrato de anilina: Acido cítrico 5 g. disueltos en 5 ml de anilina. La solución se pone en frasco ámbar y al abrigo de la luz.

4.- Dinitrofenilhidrazina: A 100 mg. de 2,4-dinitrofenilhidrazina se les agregan 20 ml de ácido clorhídrico concentrado, se agita la mezcla hasta disolución y luego se agregan 80 ml de agua destilada.

5.- Tolueno.

6.- Potasa alcohólica: se Disuelven 2.5 g de KOH en 5 ml de agua destilada y se completa a 100 ml con alcohol etílico de 95%.

Procedimiento.

A.- Se preparan dos tubos de ensaye para cada suero por analizar, uno se marca como testigo y el otro como problema.

B.- A cada uno de los dos tubos se les añade 0.5 ml de suero y 0.5 ml de agua destilada.

C.- Al tiempo cero a ambos tubos se les agrega 0.5 ml del substrato y sin pérdida de tiempo al tubo marcado como testigo se le añade una gota de ácido tricloroacético y una gota de citrato de anilina y se agita su contenido.

D.- El tubo marcado como problema se incuba a 26°C. durante 20 minutos, contados desde el momento en que se añadió el substrato. Al final de este tiempo se le agrega una gota de ácido tricloroacético y una de citrato de anilina. (Estos dos reactivos nunca se mezclan antes de que sean añadidos). Se agita bien el tubo y se deja reposar durante 20 minutos como tiempo mínimo.

E.- A los dos tubos se les agregan 2 ml de tolueno. Se tapan con un tapón de hule, previamente lavado y además protegido con cubierta de plástico. Se agitan vigorosamente los tubos y se centrifugan durante 5 minutos o hasta separar la emulsión y obtener la cantidad adecuada de líquido sobrenadante.

F.- Se saca, de cada uno de los tubos, 1 ml de la capa de tolueno (líquido sobrenadante claro) y se vacía por separado en dos tubos de ensayo.

G.- Se añaden exactamente 3 ml de potasa alcohólica a cada tubo. Se mezcla su contenido se pasa a dos cubetas del colorímetro y se mide inmediatamente la transmitancia en 490 mμ, usando agua destilada para ajustar el 100% de transmisión.

Calibración.-

La curva de calibración se estableció usando una solución patrón de ácido pirúvico que contenía 1,000 μg de ácido pirúvico por ml. Esta solución fué adquirida de la casa "Harleco". También se hizo la curva con una solución de piruvato de sodio que contenía una concentración equivalente de ácido pirúvico.

Se prepararon diluciones apropiadas para obtener muestras que contuvieran de 0 a 500 /ug. por ml de ácido pirúvico.- Cada una de estas diluciones fueron analizadas igual que las soluciónes problema, excepto que no se sometieron a incubación. Tanto el testigo que no contenía ácido pirúvico, como cada una de las diluciones se leyeron a 490 mμ. El 100% de transmisión se determinó con agua destilada.

Aparato empleado.-

El aparato que se empleó fué el espectrofotómetro Coleman Jr. y las cubetas que se usaron fueron cubetas cilíndricas de 10 mm de diámetro por 75 mm. de largo (Coleman).

Resultados.-

Curva de Calibración.

Acido pirúvico (μg)	Transmisión óptica % Lecturas 1 min.	a 60 min.
0	93.0	93.0
10	88.5	89.0
25	82.5	82.5
50	71.5	71.5
100	59.5	59.5
200	39.0	39.0
250	32.0	32.0
500	15.0	15.0

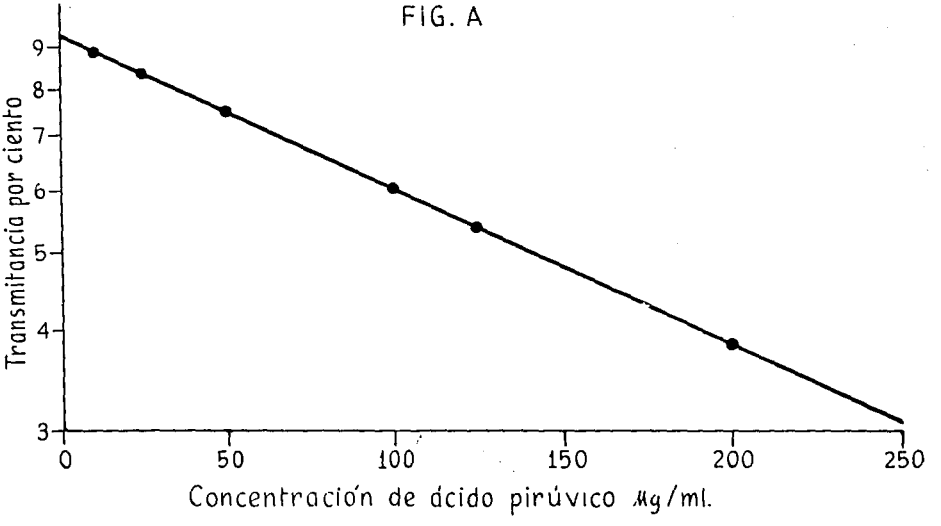
Piruvato de Sodio (μg)	Transmisión óptica % Lecturas 1 min.	a 60 min.
0	93.0	93.0
10	88.5	88.5
—	—	—
50	73.5	73.5
100	60.0	60.0
200	39.0	39.0
—	—	—
—	—	—

1.- Las lecturas permanecían constantes desde los 60 segundos hasta los 60 minutos siguientes a la adición de la potasa alcohólica.

2.- Las lecturas correspondientes a las distintas diluciones eran prácticamente las mismas con la solución de ácido pirúrivo y con la de piruvato de sodio.

3.- El logaritmo de la transmision óptica resultó función lineal de la concentración de acido piruvico hasta concentraciones de 200 μg/ml. Esto se ilustra en la gráfica trazada en papel semilogarítmico. (Fig. A). A concentraciones mayores la curva se desvia hacia arriba, por lo cual los sueros con actividad alta fueron diluidos hasta que la lectura obtenida en la reacción cayera en la posición lineal de la curva de calibracion.

FIG. A


Transmitancia por ciento
9
8
7
6
5
4
3
0
50
100
150
200
250
Concentración de ácido pirúvico Mg/ml.

Cálculos.-

Los autores de este método definieron la unidad de Transaminasa como la actividad enzimatica presente en 1 ml de suero que originala produccion de material cromógeno equivalente a 1 μg de ácido pirúvico en las condiciones del método.

Las unidades de transaminasa de un suero problema se obtenían al leer en la curva de calibracion los μg de ácido pirúvico correspondientes a la transmisión óptica obtenida en la reacción.

Determinaciones hechas en sueros de personas normales.

Método de Cabaud, Leeper y Wroblewski

Núm.	Nombre.	Sexo.	Edad (años)	Peso (kg)	U.T.*
1	R.M.	F	20-30	40-50	3
2	A.M.	F	20-30	40-50	14
3	A.N.	F	20-30	50-60	16
4	S.C.	F	20-30	60-70	6
5	C.P.	F	20-30	40-50	14
6	M.G.	F	20-30	40-50	6
7	G.L.	F	30-40	60-70	10
8	A.E.	F	20-30	40-50	15
9	L.B.	F			13
10	M.A.	F	40-50	50-60	33
11	J.O.	F	40-50	60-70	21
12	M.B.	F	30-40	60-70	27
13	A.D.	F	20-30	40-50	24
14	C.D.	F	20-30	50-60	6
15	G.E.	F	30-40	60-70	6
16	F.L.	M	30-40	50-60	11
17	A.G.	M	30-40	60-70	6
18	M.T.	M	30-40	60-70	12
19	B.L.	M	30-40	60-70	3
20	T.B.	M	40-50	60-70	24
21	L.R.	M	30-40	40-50	29
22	T.R.	M	30-40	50-60	9
23	T.T.	M	10-20		12
24	O.C.	M	10-20	50-60	12
25	M.D.	M	30-40	50-60	25
26	L.D.	M	50-60	30-40	35
27	Z.D.	M	40-50	50-60	26
28	J.R.	M	40-50	60-70	20
29	F.L.	M	20-30	50-60	33
30	C.L.	M	30-40	70-80	22

* Unidades de Transaminasa.

Cálculos.-

Los autores de este método definieron la unidad de Transaminasa como la actividad enzimática presente en 1 ml de suero que origina la producción de material cromógeno equivalente a 1 μg de ácido pirúvico en las condiciones del método.

Las unidades de transaminasa de un suero problema se obtenían al leer en la curva de calibración los μg de ácido pirúvico correspondientes a la transmisión óptica obtenida en la reacción.

Determinaciones hechas en sueros de personas normales.

Método de Cabaud, Leeper y Wroblewski:

Núm.	Nombre.	Sexo.	Edad (años)	Peso (kg)	U.T.*
1	R.M.	F	20-30	40-50	3
2	A.M.	F	20-30	40-50	14
3	A.N.	F	20-30	50-60	16
4	S.C.	F	20-30	60-70	6
5	C.P.	F	20-30	40-50	18
6	M.G.	F	20-30	40-50	6
7	G.L.	F	30-40	60-70	10
8	A.E.	F	20-30	40-50	15
9	L.B.	F			13
10	M.A.	F	40-50	50-60	33
11	J.O.	F	40-50	60-70	21
12	M.B.	F	30-40	60-70	27
13	A.D.	F	20-30	40-50	24
14	C.D.	F	20-30	50-60	6
15	G.E.	F	30-40	60-70	6
16	E.L.	M	30-40	50-60	11
17	A.G.	M	30-40	60-70	6
18	M.T.	M	30-40	60-70	12
19	B.L.	M	30-40	60-70	3
20	T.B.	M	40-50	60-70	24
21	L.R.	M	30-40	40-50	29
22	T.R.	M	30-40	50-60	9
23	T.T.	M	10-20		12
24	O.C.	M	10-20	50-60	12
25	M.D.	M	30-40	50-60	25
26	L.D.	M	50-60	30-40	35
27	Z.D.	M	40-50	50-60	26
28	J.R.	M	40-50	60-70	20
29	F.L.	M	20-30	50-60	33
30	C.L.	M	30-40	70-80	22

* Unidades de Transaminasa.

Valores normales.-

El promedio de actividad, para sueros normales, que reportaron los autores para esta tecnica es de 16.4 unidades con una desviación tipo de (± 8.4) y con una amplitud de 4 a 40 unidades.

Los resultados obtenidos de los 30 sueros ensayados, de personas aparentemente normales fueron los siguientes: Promedio de actividad 16 unidades, desviación estandard (± 9.4), valores máximo y mínimo observados 35 y 3 unidades respectivamente.

Tercer Método.-

Método de Reitman y Frankel.-

El método de Rietman y Frankel (11) es una modificación del método colorimétrico de Cabaud, Leeper y Wroblewski estudiado anteriormente.

Fundamento.-

En este procedimiento se omiten la precipitación de las proteínas, la conversión del oxalacétato a piruvato y la extracción de este último con tolueno. La solución de fenilhidrazina se agrega directamente para terminar el período de incubación. La mezcla de las fenilhidrazonas así formadas se determina clorimétricamente a 505 mμ en medio alcalino. El coeficiente de absorción de la fenilhidrazona del ácido oxalacético a esta longitud de onda es mucho mayor que el de la fenilhidrazona del ácido alfa-cetoglutárico; por lo que en posible aceptar que la absorción óptica a 505 mμ traduce la actividad de la enzima.

Material.-

1.- Solución amortiguadora de fosfatos, 0.1 M., pH 7.4
Se prepara mezclando 420 ml de fosfato disódico con 80 ml de fosfato monopotásico 0.1 M.

2.- Solución patron de piruvato. 2 mM por litro. Se disuelven 22 mg de piruvato de sodio en 100 ml de solución amortiguadora de fosfatos.

3.- Substrato, acido alfa-cetoglutárico 2 mM y ácido DL-aspár-

tico 200 mM. Se pesan 29.2 mg de acido alfa cetoglutarico y 2.66 g de acido DL-aspartico. La solucion se prepara como se señalo en el procedimiento anteriormente descrito, excepto que se usó hidroxido de sodio 1 N para obtener el pH de 7.4

4.- Dinitrofenilhidrazina, 1 mM. Se prepara disolviendo 19.8 mg de 2 4-dinitrofenilhidrazina en 100 ml de ácido clorhídrico 1 N.

5.- Solucion de hidroxido de sodio 0.4 N.

6.- Aparato empleado, fue el Coleman Jr., y las cubetas usadas fueron de 10 mm de diametro por 150 mm de largo. En la tecnica original (11) se uso un colorimetro Baush and Lomb y se usaron cubetas de 15 mm de diametro.

Procedimiento.-

A.- Se pone 1 ml del substrato en un tubo de ensayo y se lleva a 40° durante 10 minutos, en un baño de agua de temperatura constante.

B.- Se agregan al tubo 0.2 ml del suero por analizar. Se mezcla el contenido. Se incuba durante 60 minutos a la temperatura del baño (40°).

C.- Al final de los 60 minutos, se saca el tubo del baño y se le añade 1 ml del reactivo de 2,4-dinitrofenilhidrazina, con lo que se detiene la reacción.

D.- Se deja el tubo a la temperatura del laboratorio por un minimo de 20 minutos.

F.- Se añaden 10 ml de hidróxido de sodio 0.4 N. Se tapa el tubo y se mezcla el contenido por inversión. Con las precauciones que se señalaron en el procedimiento anterior

G.- Se deja desarrollar la coloracion durante 30 minutos a la temperatura ambiente. Al final de este tiempo se mide la densidad optica de la solucion a 505 mμ usando agua para ajustar el 100% de transmision

Durante la incubacion del problema conviene preparar como sigue un tubo testigo para cada suero analizado

1. Se mezclan 1 ml del substrato, 0.2 ml del suero y 1 ml del reactivo de dinitrofenilhidrazina

2.- Se deja el tubo reposar durante 20 minutos como tiempo mínimo.

3.- Al final de este tiempo se añaden 10 ml de hidróxido de sodio 0.4 N.

4.- Se deja desarrollar la coloracion y se mide la densidad optica como en el caso anterior.

Calibración.-

Rietman y Frankel expresaron sus resultados en unidades Karmen, relacionando, en una gráfica, el cambio de la densidad optica medida por su metodo contra unidades de actividad transaminásica medida espectrofotometricamente por el método de Karmen. También expresaron en una grafica, el cambio en densidad óptica correspondiente a diversas cantidades de micromoles de piruvato y en otra curva relacionaron µM de piruvato con unidades Karmen de Transaminasa.

En el presente estudio se define la Unidad de Actividad Transaminásica como la formación de cetoacidos cuya hidrazona equivale a la de 1 µg de ácido pirúvico a 40°C con una incubación de 60 minutos y en las demas condiciones de la técnica.

Con objeto de comparar las unidades que se obtenian de acuerdo con la definición anterior, con unidades Karmen, se usó la gráfica de Rietman y Frankel (11), en la que el cambio en densidad öptica está marcado contra unidades de transaminasa Karmen. Al comparar dos de los sueros se obtuvieron los siguientes resultados: aquel en que se midió un cambio en densidad óptica de 0.0469 y que correspondia a 14 unidades, éstas fueron equivalentes a 12 unidades Karmen, en otro con un cambio en la densidad optica de 0.2311 y correspondiente a 69 unidades, éstas fueron equivalentes a 66 U Karmen. Por los ejemplos analizados se observa que las correcciones no son trascendentes.

Curva de calibración.-

Se preparo de acuerdo con Rietman y Frankel usando dos soluciones, una de piruvato de sodio que contenia 2 µM/ml y otra de ácido alfa-cetoglutarico de la misma concentración.

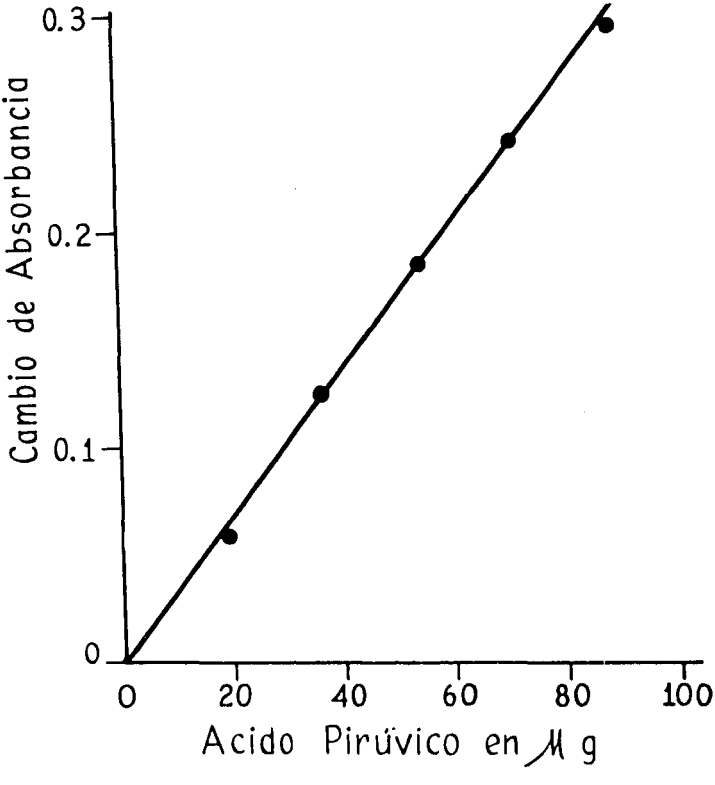
Se mezclaron cantidades conocidas de cada una de las dos soluciones de manera de obtener siempre una concentración de 2 µM de cetoácidos por ml Se prepararon cinco tubos de ensayo de la siguiente manera:

TUBOS		1	2	3	4	5
Acido pirúvico	(ml)	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5
Acido alfa-ceto glutárico	(ml)	0.9	0.8	0.7	0.6	0.5
Sol. amortiguadora	(ml)	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
2,4-dinitrofenil hidrazina	(ml)	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0

Las soluciones se dejaron reposar durante un tiempo mínimo de 20 minutos, contados a partir de la adición del reactivo de 2,4-dinitrofenilhidrazina. En seguida se añadieron 10 ml de hidróxido de sodio a los cinco tubos y se dejó estabilizar el color durante 30 minutos. La transmitancia se leyó a 505 mμ.

De la gráfica (Fig. B) en que se trazó la densidad óptica - - contra microgramos de pirúvato se determinó el coeficiente de extinción que correspondía a 1 μg de ácido pirúvico.

FIG. B


0.3
0.2
0.1
0
Cambio de Absorbancia
0
20
40
60
80
100
Acido Pirúvico en μg

Determinación de la precisión del método.-

Para calcular la precisión del método se usó una misma preparación en la que se hicieron diez determinaciones de transaminasa en igualdad de condiciones. La desviación tipo (± 5.44) se calculó usando la siguiente ecuación:

$$\sigma = \sqrt{\frac{\Sigma\, des^2}{N-1}}$$

En donde:

des = desviación de la media

N = número de determinaciones

Σdes^2 = suma de las desviaciones al cuadrado.

Núm.	Densidad Total	Optica Neta.	U de T	Desviación de la media	Desviación al cuadrado.
1	0.5120	0.2991	89.7	- 6.1	37.21
2	0.4650	0.2521	75.6	+ 8.0	64.00
3	0.4720	0.2591	77.7	+ 5.9	34.81
4	0.4980	0.2851	85.5	- 1.9	3.61
5	0.5090	0.2961	88.8	- 5.2	27.04
6	0.5050	0.2921	87.6	- 4.0	16.00
7	0.5020	0.2891	86.7	- 3.1	9.61
8	0.5020	0.2891	86.7	- 3.1	9.61
9	0.4980	0.2751	82.5	+ 1.1	1.21
10	0.4650	0.2521	75.6	+ 8.0	64.0
Testigo	0.2129				
			$\bar{M}$=83.6		267.10

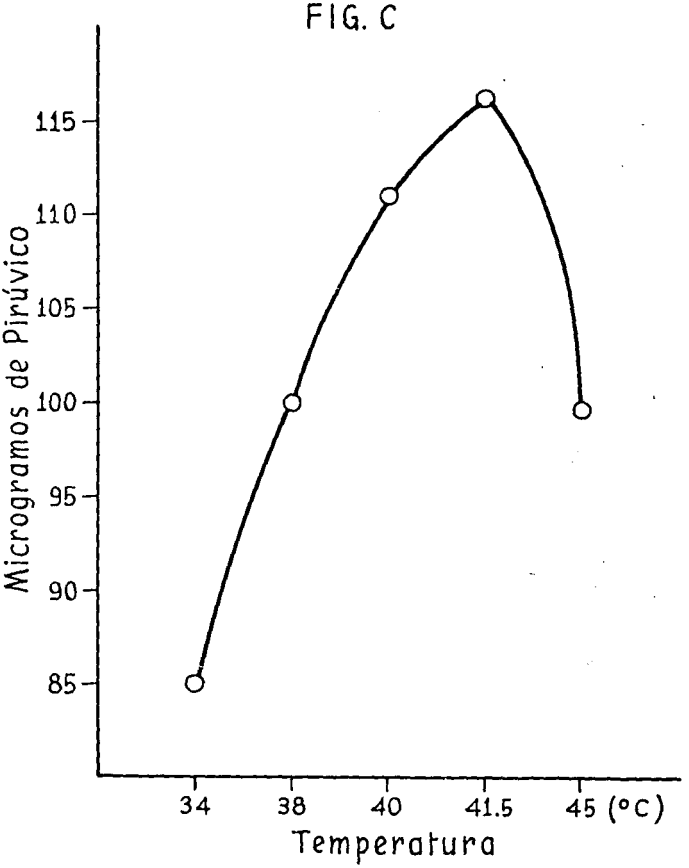
$$\sigma = \sqrt{\frac{267.10}{9}} = 5.44$$

Relación de la actividad enzimática y la temperatura.-

Para determinar la relación entre la temperatura y la máxima -

actividad de la enzima. Se preparó transaminasa de acuerdo con el método de Cammarata-Cohen (J. Biol. Chem. <u>187</u> 439 (1950)). El extracto no purificado se dializó y se le hicieron cinco determinaciones de la actividad variando la temperatura de incubación. Se observó un máximo de actividad a 40°C, muy próximo a la temperatura a la que se incuba el suero en la técnica usada en este trabajo.

FIG. C


Microgramos de Pirúvico
115
110
105
100
95
90
85
34
38
40
41.5
45 (°C)
Temperatura

Estabilidad de la coloración obtenida al reaccionar las hidrazonas — con el hidróxido de sodio.—

El tiempo de reacción entre estos dos componentes no es crí— tico: la coloración de las hidrazonas fué la misma en las lecturas — que se hicieron del problema desde 10 minutos antes del tiempo indica- do por el método hasta veinticinco minutos después.

Resultados obtenidos al variar el tiempo de reacción de la 2,4-dini— trofenilhidrazina para formar las hidrazonas del producto .

Se ve una ligera tendencia de la densidad óptica a aumentar - a medida que se alarga el tiempo; sin embargo no es considerable en - 20 minutos más de reacción. Puede dejarse este tiempo sin que los re- sultados se alteren.

FIG. D

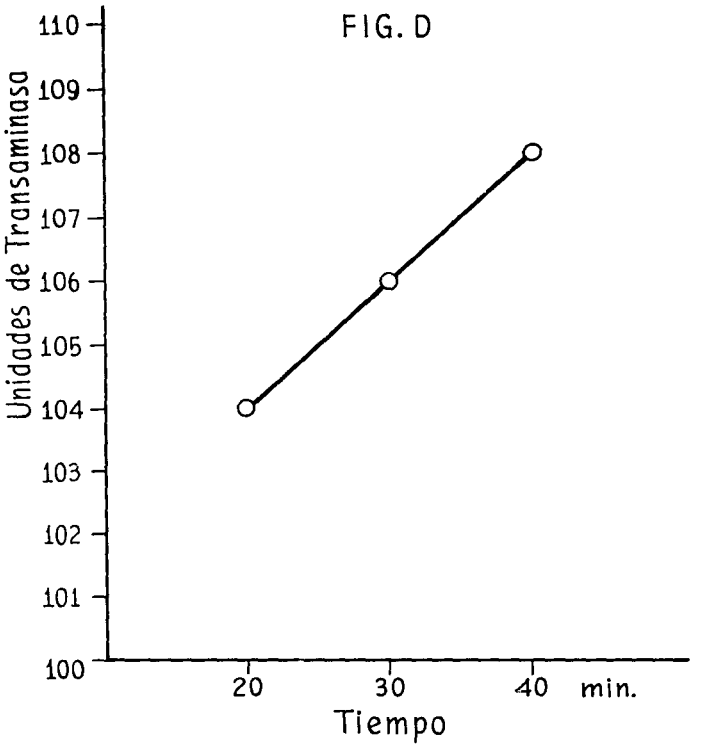

110
109
108
107
106
105
104
103
102
101
100
Unidades de Transaminasa
20
30
40
min.
Tiempo

Tabla de Valores Normales.

Resultados en unidades de transaminasa obtenidos en 130 sueros de personas normales. Métodos de Rietman y Frankel.

Núm.	Nombre	Sexo	Edad	Peso	U. de T.
1	G.H.	F	26	50	14
2	V.L.				15
3	M.C.	M	37	50	13
4	H.G.	M	46	73	15
5	F.G.	M	38	76	14
6	E.G.	M			12
7	O.S.	M	34	66	11
8	J.M.	M			14
9	R.R.	M	45	70	20
10	O.R.	M	38	68	12
11	M.M.	F	16	58	14
12	F.M.	F	18	65	8
13	F.I.	M	35	65	22
14	M.M.	M	25	77	18
15	A.T.	M	21	68	22
16	A.V.	M	21	68	19
17	M.V.	M	33	64	17
18	J.C.	M	34	76	21
19	I.C.	M	32	75	22
20	D.S.	M	16	61	15
21	A.L.	F	20	65	25
22	F.A.	M	26	75	16
23	J.R.	M	36	84	13
24	M.S.	F	33	68	9
25	G.L.	F	23	66	25
26	S.G.	M	18	60	11
27	B.B.	M	25	65	11
28	R.P.	M	28	84	16
29	P.R.	M	26	66	16
30	J.C.	M	21	85	17
31	A.V.	M	34	64	17
32	E.C.	F	31	80	13
33	J.M.	M	20	72	14
34	R.R.	M	25	72	13
35	P.O.	M	19	62	9
36	B.O.	M	23	56	17
37	M.S.	M	23	54	18
38	V.T.	M			21
39	S.P.	M	18	56	16
40	A.R.	M	29	75	17
41	N.V.	M	22	55	16

Núm.	Nombre	Sexo	Edad	Peso	U. de T.
42	F.O.	M	39	80	29
43	C.L.	F			10
44	M.G.	M			16
45	V.B.	M	19	68	15
46	S.C.	M	36	85	17
47	C.M.	M	20	65	17
48	A.M.	F			12
49	G.M.				22
50	A.S.	M	22	64	11
51	C.M.	F	26	90	20
52	S.B.	M			17
53	J.L.	M	18	57	18
54	R.F.	M	23	65	20
55	D.S.	M			20
56	C.B.	F	39	66	16
57	M.L.	F	21	52	15
58	J.M.	M	34	66	14
59	C.C.	M			12
60	B.A.	M	30	55	12
61	M.P.	M	25	66	20
62	G.H.	F	33	75	39
63	S.P.	M	18	56	18
64	C.B.	F	39	66	16
65	H.F.	M			24
66	F.R.	M	21	65	10
67	M.T.	M			28
68	S.R.	F	18	52	14
69	J.P.	M	23	68	13
70	H.E.	M	20	75	10
71	R.R.				17
72	C.M.	M			25
73	J.C.	F	29	78	32
74	E.H.	M	20	65	12
75	C.L.	F			14
76	S.A.	M	15	51	18
77	P.N.	M	29	64	18
78	M.J.	F	29	58	19
79	A.M.	M	29	78	19
80	J.C.	M	20	77	16
81	E.J.	M	23	65	24
82	F.J.	M	20	70	23
83	S.V.	M	18	65	17
84	J.R.	M	21	55	25
85	R.L.	M	26	62	18
86	R.R.	F			17
87	R.I.	M	22	73	26
88					19

Núm.	Nombre	Sexo	Edad	Peso	U. de T.
89					25
90	E.B.	M			10
91	C.N.	M	28	84	13
92	J.R.	M			11
93	J.M.	F			13
94	M.A.	M	29	78	16
95	J.C.	M	23	66	12
96	E.J.	M	22	60	19
97	F.J.	M	25	70	15
98	S.V.	M	20	70	9
99	J.R.	F	30	60	15
100	L.H.	M	25	62	13
101	B.R.	M	30	60	11
102	R.I.	M			15
103	J.I.	F			15
104	C.M.	M			17
105	V.Z.	M			13
106	D.G.	M	21		21
107	F.M.	M			14
108	E.C.	M			7
109	L.V.	M			9
110	R.L.	M			9
111	M.F.	M			20
112	A.P.	F			14
113	R.S.	M			25
114	S.C.	M			16
115	M.V.	F			28
116	G.L.	M			21
117	S.T.	M			32
118	R.R.	M			22
119	V.R.	M			33
120	J.G.	M			20
121	R.R.	M			15
122	A.M.	M			26
123	S.G.	F			18
124	L.A.	M			25
125	G.R.	M			22
126	V.A.	M			21
127	R.T.	F			24
128	F.S.	M			41
129	S.T.	F			13
130	J.M.	M			16

Cálculo de la desviación tipo.-

Se calculo aplicando la siguiente fórmula:

$$\text{Desviación estandard} = \sigma = \sqrt{\frac{\Sigma x^2 - \frac{(\Sigma x)^2}{N}}{N-1}} = 5.6$$

Se aplicó esta fórmula, en lugar de la anterior que se usó para calcular la precisión del método, porque se evitan las numerosas restas necesarias para obtener la desviación de la media. El resultado que se obtiene al final es el mismo.

Valores normales.-

El margen de las cifras normales que obtuvieron Reitman y Frankel para este metodo fué de 8 a 40 unidades, con un promedio de la diferencia con la media de -0.4 y una desviación tipo de ± 4.9. El valor promedio normal que se obtuvo en este trabajo fue de 17 unidades, con una desviación tipo de 5.6. El valor máximo fue de 41 unidades y el minimo de 7.

O T R O S M E T O D O S .

Cromatográfico.-

Se mide la cantidad de glutamato formado después de un período de incubación, por cromatografía en papel, usando ninhidrina para su estimación (7).

Electroforético.-

Se analizan las proteínas por electroforesis en papel para separar con la fracción alfa$_1$ la actividad de la transaminasa glutámico-oxalacética. Esta fracción se incuba con el substrato conveniente para determinar su actividad transaminásica ya sea por la formación de aspartato, que se estima cromatográficamente, o bién, por el método de Rietman y Frankel midiendo la hidrazona del oxalacético sintetizado -- (12).

Fluorométrico.-

Larsen T y Hansen P reportan una técnica fluorométrica para la determinación de la transaminasa pirúvica y que puede ser también aplicada a la oxalacética. En su técnica miden la formación de DPN+, en un sistema semejante al usado en el método Karmen, por la fluorescencia que produce su producto de condensación con metil etil cetona (13).

C O N C L U S I O N E S .

El método propuesto por Karmen que se ensayó en primer término, tiene como ventaja el de ser altamente específico, pero resulta costoso por el uso del reactivo DPNH y la preparación enzimática de deshidrogenasa málica y además requiere el uso de un espectrofotómetro caro y no común en los laboratorios clínicos.

El método colorimétrico de Cabaud, Leeper y Wróblewski es menos específico que el anterior. La medición colorimétrica se hace con espectrofotómetros al alcance de los laboratorios clínicos, es menos costoso, pero tiene como desventaja que el tiempo de centrifugación para separar la fase de tolueno, con el que se extrae la hidrazona, algunas veces se alarga más de lo previsto.

El método de Rietman y Frankel es más sencillo en su técnica, los reactivos usados son de fácil adquisición y menos costosos y aun cuando es menos específico que los dos anteriores sus resultados satisfacen la exactitud requerida para ser aplicado a la clínica. Por estas razones ha sido el método que se sugirió para ser usado en el Laboratorio de análisis Químicos del Instituto Nacional de Cardiología.

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

1.- Meister, A.: Advances in Enzymology, Fordham University, New York, N.Y., 1955. Interscience Publishers, INC. p 185-246.

2.- Braunstein, A.E., Kritzmann, M.G., Enzymology 2, 129 (1937-38)

3.- O'Kane, D.E., and Gunsalus, I.C.: The resolution and purification of glutamic aspartic transaminase, J. Biol. Chem. 170: 425-433, - 1947.

4.- Cohen, P.P.: Transamination with purified enzyme preparations, J. Biol. Chem 136: 565-584, 1940.

5.- S. Spiegelman, in The Enzymes, J.B. Summer and K. Myrbäck, Eds. (Academic Press, New York, 1950) Vol. I, p-267

6.- Awampara, J., and Seale, B.: Distribution of transaminases in rat organs, J. Biol. Chem. 194: 497-502 1952.

7.- Karmen, A., Wróblewski, F., and LaDue, J. S.: Transaminase activity in human blood, J. Clin. Invest. 34: 126-131, 1955.

8.- Steinberg, D., Baldwin, D., and Ostrow, B.H.: A clinical method for the assay of serum glutamic — — — — — oxalacetic transaminase, J. Lab. Clin. Med. 48: 144, 1956.

9.- Karmen, A.: A note on Spectrophotometric assay of glutamic oxalacetic transaminase in human blood serum, J. Clin. Invest. 34: - 131-133, 1955.

10.- Cabaud, P., Leeper, R., and Wróblewski, F.: Colorimetric measurement of serum glutamic oxalacetic transaminase, J. Clin. Path. 26: 1101-1105, 1956.

11.- Stanley Reitman, M.D., and Sam Frankel, PH. D.: A colorimetric - - method for the determination of serum glutamic oxalacetic and glutamic pyruvic transaminases, Am. J. Clin. Path. 28: 56-63, 1957.

12.- Sevela, M.: Determination of transaminase activity of serum protein fractions separated by paper electrophoresis, Nature, Lond. 181 (4613): 915-916, Mar. 1958.

13.- Lanrsen T From Hamsen P.: A fluorometric method for measuring - the activity in serum of the enzyme glutatamic pyruvic transaminase, Scand. J. Clin. Lab. Invest. 10 (1): 53-58, 1958.