

11221
N:2
2Ej



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO

LABORATORIO Instituto Mexicano del Seguro Social

CENTRO MEDICO NACIONAL SIGLO XXI

CURSO DE ESPECIALIZACION EN PATOLOGIA CLINICA



[Firma manuscrita]

LABORATORIO DE CARDIOLOGIA Y NEUMOLOGIA

D. M. N.

DETERMINACION DE TIROSINA AMINOTRANSFERASA EN PACIENTES CON HEPATOPATIAS.



TESIS DE POSTGRADO

QUE PARA OBTENER EL DIPLOMA DE ESPECIALISTA EN PATOLOGIA CLINICA

P R E S E N T A :

DRA. MARGARITA GUTIERREZ AHUACTZIN



IMSS

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

México, D.F.

1991



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 está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

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

***Esta tesis fué realizada en el Laboratorio de Bioquímica de la Unidad de
Investigación Médica en Bioquímica del Hospital de Especialidades del Centro
Médico Nacional Siglo XXI del IMSS bajo la asesoría de la M. en C. Cecilia Vilar
Rojas y el Dr. Juan José Hicks Gómez.***

A Luis Alonso y Angel
con amor

A mis padres y hermanos

***A Cecy Vilar por sus consejos y su gran apoyo en la
elaboración de este trabajo***

***Al Doctor Hicks y a todas las personas que hicieron posible
la realización de esta tesis.***

CONTENIDO

1. Objetivo

2. Introducción

3. Material y Métodos

4. Resultados

5. Discusión

6. Bibliografía

OBJETIVOS.

GENERAL.

Medir la actividad de la tirosina aminotransferasa en suero.

ESPECIFICO.

Medir la actividad de la tirosina aminotransferasa en sujetos normales y en pacientes con daño hepático.

INTRODUCCION

El diagnóstico y la magnitud del daño tisular hepático, se basa frecuentemente en la elevación de los niveles séricos de alanina aminotransferasa (ALT) y de aspartato aminotransferasa (AST).(1). Estas enzimas, sin embargo, no proporcionan información acerca de la etiología, duración, presencia o ausencia de síntomas. Estos datos se pueden conocer en la actualidad gracias a la gran diversidad de métodos disponibles en el laboratorio clínico, tales como la capacidad de metabolismo y excreción de sustancias endógenas y fármacos, también por pruebas serológicas específicas para casi todos los tipos de hepatitis víricas conocidas a la fecha. (2,3). Sin embargo, el valor de las determinaciones enzimáticas en la práctica clínica diaria es lo que nos proporciona información acerca de la gravedad del daño. En condiciones normales, las células liberan sustancias derivadas de su metabolismo al torrente circulatorio. En presencia de daño tisular, la liberación de estos productos, entre ellos algunas enzimas, se incrementa en proporción directa a la magnitud de la enfermedad. La cuantificación de la actividad de estos catalizadores es de gran ayuda en el diagnóstico, pronóstico, evolución y tratamiento de diversos padecimientos, sobre todo los relacionados con hígado, corazón, páncreas y músculo.

Entre los metabolitos que contiene una célula, los aminoácidos juegan un papel muy importante, pues constituyen la materia prima para la síntesis de proteínas y de otras moléculas, como las purinas, pirimidinas y porfirinas. Además, los

aminoácidos también representan una importante fuente de energía al actuar como sustrato en diversas vías de degradación oxidativa (Fig 1). La existencia de enzimas inducibles permite a la célula adaptación y respuesta a diversas variaciones del medio ambiente que la rodea y a la vez ahorro energético y de aminoácidos al no sintetizar proteínas cuando no son necesarias. Debido a estas características, la presencia y concentración de este tipo de enzimas es una fiel representación del estado metabólico celular.

En el caso de necrosis hepática, la actividad sérica de diversas enzimas aumenta en un grado que puede contribuir al establecimiento del diagnóstico.

La enzima alanina aminotransferasa (ALT) (EC 2.6.1.2), cataliza la transferencia reversible de un grupo amino de la alanina al alfa-cetoglutarato, formando piruvato y glutamato respectivamente. Requiere como coenzima al fosfato de piridoxal. Su alta concentración en hígado en comparación con otros tejidos ha sido de gran utilidad en el diagnóstico de ciertas enfermedades hepáticas como es el caso de la hepatitis (4,5).

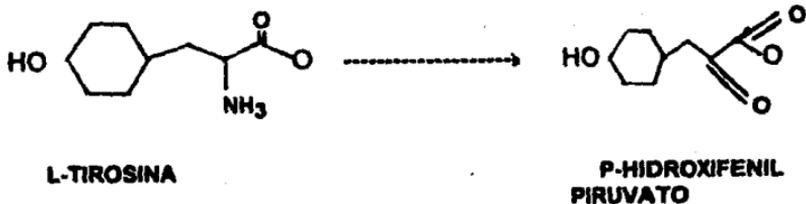
La aspartato aminotransferasa (AST) (EC 2.6.1.1), como toda aminotransferasa, requiere también como coenzima al fosfato de piridoxal, cataliza la transferencia del grupo amino del aspartato al alfa-cetoglutarato para formar glutamato y oxalacetato. Se encuentra prácticamente en todos los tejidos del organismo, sin embargo, su concentración mayor se encuentra en corazón, hígado y músculo esquelético. En pacientes con lesión hepática aguda y crónica los valores séricos elevados reflejan la gravedad del proceso. (4, 5)

La determinación de AST, ALT o ambas, es útil en el reconocimiento precoz de la hepatitis viral o tóxica. Las elevaciones en los niveles de ALT parece ser mas específica en la enfermedad hepática que los valores de AST.

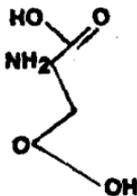
La tirosina aminotransferasa (TAT) (L-tirosina 2 oxoglutarato-aminotransferasa, EC 2.6.1.5), es una enzima específica, reguladora del catabolismo de la tirosina. Cataliza la primera reacción de degradación de este aminoácido esencial formando glutamato y para-hidroxifenilpiruvato en una reacción dependiente de fosfato de piridoxal. (4,5,6,7). (Fig. 2).

Si la actividad de la TAT se encuentra elevada, la degradación de este aminoácido también es alta, disminuyendo con esto su concentración intracelular. Si, por el contrario, su actividad está disminuída, la concentración intracelular es mayor. Siendo un aminoácido esencial, la única fuente de obtención de la tirosina es la dieta, por lo que es necesario un equilibrio preciso entre su ingestión y degradación, lo que depende en gran medida del estado metabólico de la célula así como de la concentración y actividad de la enzima en respuesta a la concentración de sustrato disponible.

En los vertebrados superiores, el órgano que más contacto tiene con las fluctuaciones dietéticas es el hígado, los trabajos realizados en este tejido han demostrado cambios en la actividad de la TAT.(8). Asimismo, se sabe que es una enzima no detectable in útero, pero se incrementa rápidamente durante las primeras horas después del nacimiento. El gene de esta enzima es inducible por glucocorticoides, insulina y glucagon por la vía del AMPc.(4,5,6,7). Su actividad ha sido comparada con la de la ALT y AST, sugiriendo que pertenece, como éstas a un grupo de transaminasas, pues su actividad depende del fosfato de piridoxal.



α-oxoglutarato



glutamato

Fig.2

Reacción de transaminación y formación de alfa oxoglutarato y glutamato en el catabolismo de la tirosina.

La estructura del grupo activo de la cadena de la TAT es semejante a la de la AST.(5,6,7).

La TAT al ser una enzima básicamente de origen hepático se desconoce su comportamiento, sensibilidad y especificidad en seres humanos, así como su presencia en otros tejidos además de hígado y útero. y que al ocurrir daño tisular, pueda liberarse a la circulación y constituir así un marcador más de necrosis celular como en el caso de las hepatopatías.

Además de ser una novedosa aportación que genera conocimiento de la bioquímica celular humana, podría ser una alternativa de magnitud o cronicidad del daño hepático adicional a la información que proporcionan las enzimas cuantificadas de rutina en estos casos.

MATERIAL Y METODOS.

Se utilizaron ratas Long Evans de 2 a 3 meses de edad con peso aproximado de 250 ± 50 g. El alimento y agua se les proporcionó ad libitum. Luego de ser sacrificadas por dislocación cervical, se perfundieron con solución salina y se obtuvo el hígado para la determinación enzimática.

El tejido se homogeneizó pesando 2 g de hígado en 4 ml de buffer de fosfato de potasio 0.2 M (pH 7.3), se centrifugó a $31000 \times g$ durante 30 min a una temperatura entre 4 y 6° C. El sobrenadante obtenido se diluyó 1:3 con el mismo buffer y se procedió a medir la actividad de la TAT por la técnica de Diamondstone. (10)

Determinación enzimática.

La mezcla de reacción se preparó con 1.4 ml de buffer de fosfato de potasio 0.2M (pH 7.3), conteniendo 19.2 μ moles de L-tirosina, 0.05 ml de fosfato de piridoxal 1.2 mM en buffer de fosfatos, 0.1 ml de dietil ditiocarbamato (utilizado para inhibir la dioxigenasa del para-hidroxifenilpiruvato) y diluciones apropiadas de la enzima. Esta mezcla de reacción se incubó a 37° C durante 10 minutos en baño maría con agitación constante. La reacción se inició al agregar 0.05 ml de una solución de alfa-cetoglutarato 0.3 M y fué seguida durante 10 minutos. La reacción se detuvo al agregar 0.1 ml de NaOH 10N mezclando inmediatamente. La adición de NaOH inicia la conversión de para-hidroxifenilpiruvato (pHPP) a para hidroxibenzaldehído (pHBA). Después de 30 minutos a temperatura ambiente se

leyó la D.O. a 331 nm (Fig. 3) contra un blanco preparado en el tiempo cero adicionando NaOH justo antes del alfa-cetoglutarato. La reacción que se lleva a cabo es la transaminación de tirosina y oxoglutarato para dar glutamato y parahidroxifenilpiruvato tal como ocurre in vivo.

Con el objeto de establecer las condiciones óptimas de reacción, se realizaron varios experimentos con diferentes concentraciones de homogeneizado y diferentes tiempos de reacción.

Una vez montada la técnica, se procedió a medir la TAT en suero. Se obtuvieron 5 ml de sangre total de 14 sujetos sanos y 27 muestras de pacientes con daño hepático, manifestado por alteración en el perfil enzimático tradicional (ALT y AST). Una vez formado el coágulo se obtuvo el suero por centrifugación a 3000 RPM/15 minutos.

La enzima TAT se midió por la técnica descrita anteriormente. (10) y se cuantificó la cantidad de proteínas por el método de Lowry. La curva estandar se realizó utilizando diferentes concentraciones de pHPP. Se utilizó un espectrofotómetro marca BECKMAN modelo DU-64.

Los resultados obtenidos se analizaron estadísticamente utilizando la prueba t de student.

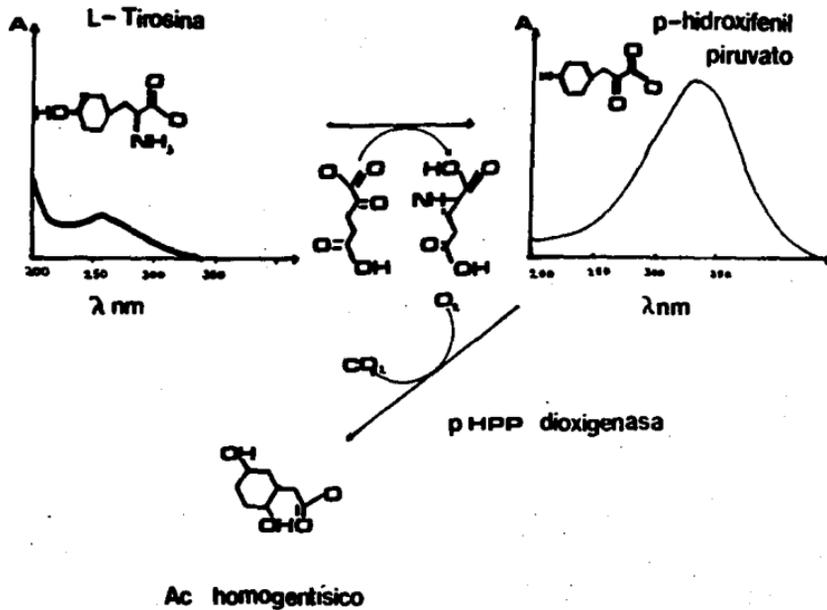


Fig. 3.
Densidad óptica a λ que se lee la reacción de conversión del pHPP a pHBA (331nm).

RESULTADOS

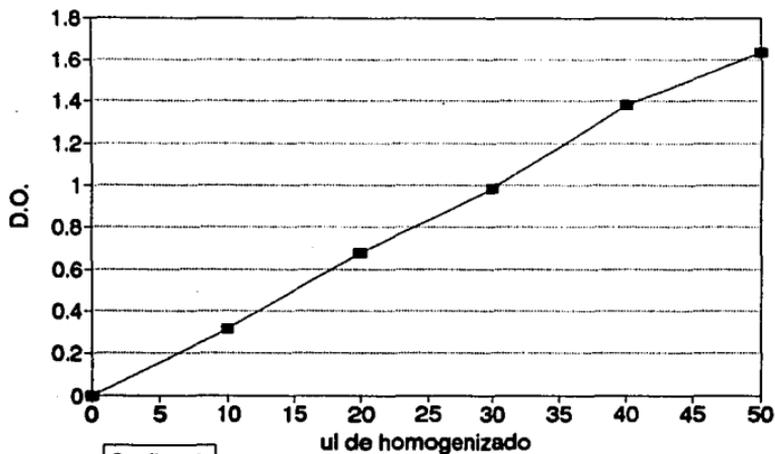
Con el objeto de encontrar las condiciones óptimas de reacción se realizaron diferentes experimentos bajo diversas condiciones utilizando hígado de rata. En la Gráfica 1 se muestran los resultados obtenidos de la actividad de la TAT utilizando diferentes concentraciones de homogeneizado. Se midió también la actividad con otras concentraciones de tejido sin observar resultados satisfactorios. La concentración óptima de homogeneizado fué de 16%.

La Gráfica 2 nos muestra los resultados que se obtuvieron al modificar el tiempo de incubación desde el minuto 1 al 10 de la reacción. La actividad de TAT se midió en todos los casos incubando durante 10 minutos.

El DDC se utilizó para inhibir la enzima pHPP dioxigenasa. En la Gráfica 3 se muestran los resultados obtenidos en presencia de DDC como se observa, no se obtuvieron diferencias significativas en las muestras.

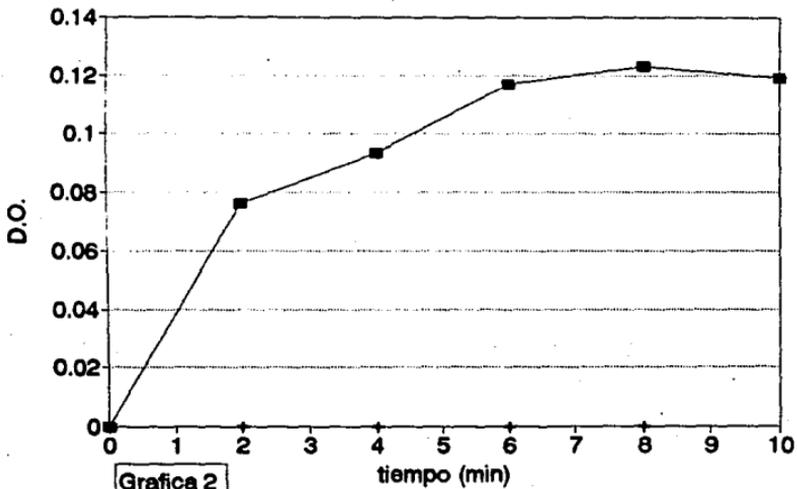
Como se mencionó en Material y Métodos, al agregar NaOH 10N se detiene la reacción de transaminación al mismo tiempo que se inicia la conversión de pHPP a pHBA. Es de vital importancia agitar inmediatamente debido a que si se retarda la conversión de este compuesto no será total la cuantificación para lo cual se realizó un experimento que se muestra en la Gráfica 4, con el objeto de observar si la adición de Na OH modificaba la conversión de pHPP. Se observa que antes de agregar la base, la conversión es muy poca y 30 minutos después de la adición se forma una cantidad considerable de pHBA.

Actividad de Tirosina aminotransferasa en hígado de rata



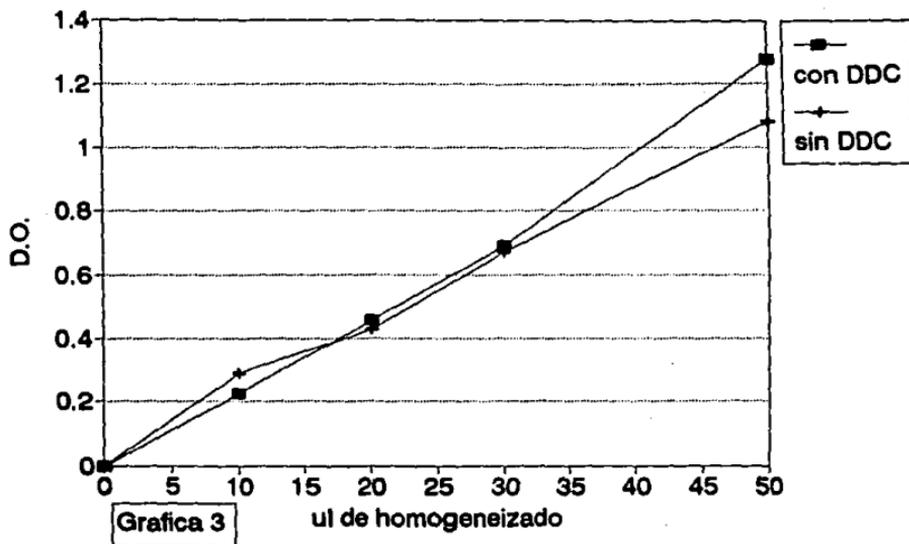
Grafica 1

ACTIVIDAD DE TIROSINA-AMINOTRANSFERASA en suero

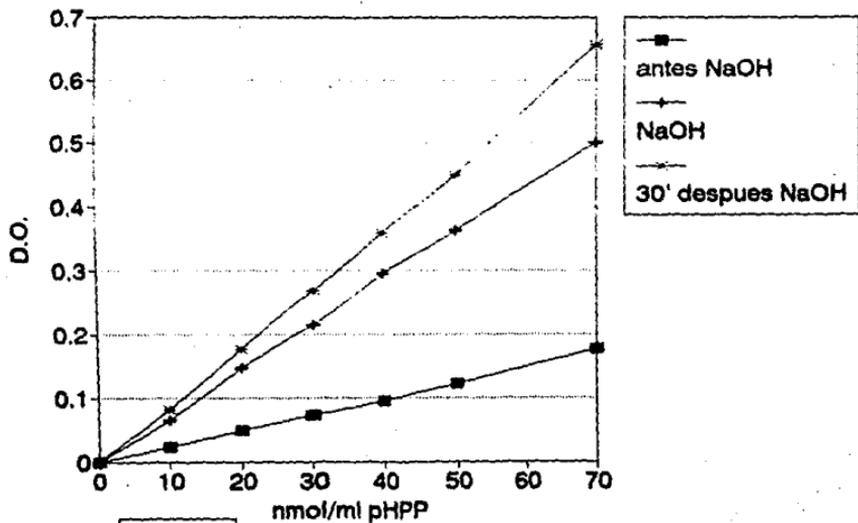


Grafica 2

Actividad de tirosina aminotransferasa en hígado de rata



CONVERSION DE pHPP a pHBA



Grafica 4

Una vez establecidas las condiciones óptimas de la reacción, se procedió a cuantificar la actividad de TAT en suero.

En la Gráfica 5 se observa la curva obtenida al utilizar diferentes concentraciones de suero. La gráfica 6 muestra la curva obtenida al utilizar como estándar pHPP. se observa que la absorbancia obtenida es proporcional a la concentración en el rango utilizado (10-70 nmoles). Esta curva se utilizó para la cuantificación de la actividad enzimática de las muestras.

En la tabla 1 se muestran los resultados de la actividad de la enzima TAT obtenida en el suero de el grupo de pacientes con problema hepático así como del grupo control el cual estaba formado de sujetos normales sin patología aparente.

La actividad enzimática del grupo control fue de 6.11 nmol/mg de proteína y la del grupo de pacientes fue de 10.11 nmol/mg de proteína. Se obtuvo una diferencia significativa al comparar ambos grupos con una $P < 0.001$. En la tabla 2 se muestra el análisis estadístico realizado de la prueba de t.

Determinación de proteínas:

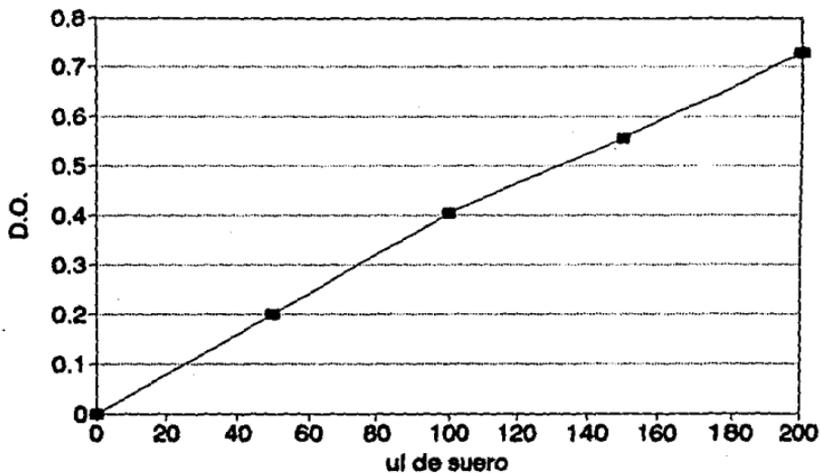
La cuantificación de proteínas por el método de Lowry se basa en el complejo colorido formado por el ion cobre del reactivo con los enlaces peptídicos de las proteínas; siendo la intensidad del color proporcional al número de enlaces peptídicos presentes.

Reactivos:

Solución A: Na_2CO_3 al 2% con tartrato de Na al 0.02% en NaOH 0.1N.

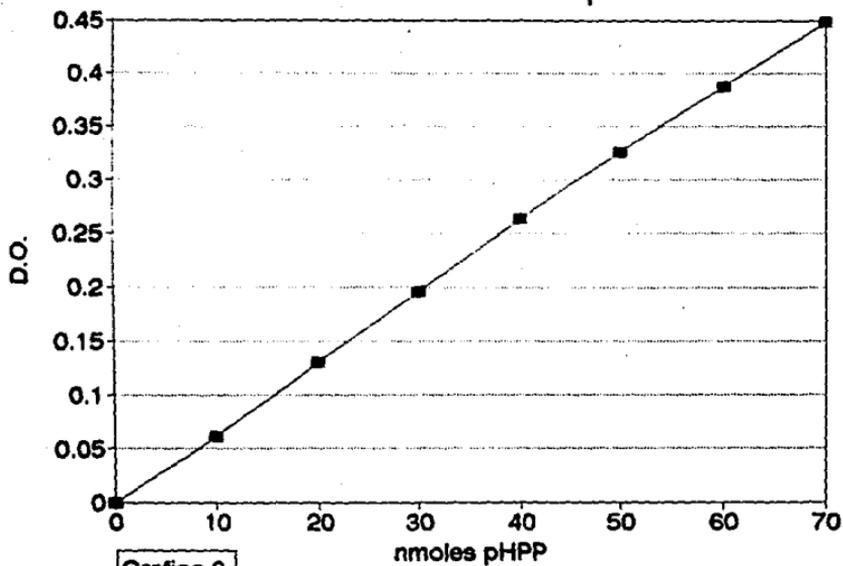
Solución B: CuSO_4 al 0.5% en agua.

Actividad de Tirosina-aminotransferasa en suero



Grafica 5

CURVA ESTANDAR DE pHPP



Grafica 6

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

Solución C: 50 ml de solución A + 1 ml de solución B (preparar al momento de usarse).

Solución D: Reactivo de Folin Ciocalteu 1.1 ml + 1.4 ml de agua.

Solución Estandar: Albúmina sérica bovina 0.3mg/ml (BSA)

tubo	Estandar (ml)	Concentración (mg)	H ₂ O (ml)	Sol C (ml)	Sol D(ml)
B	0.0	0.0	0.5	2.0	0.2
1	0.1	0.03	0.4	2.0	0.2
2	0.2	0.06	0.3	2.0	0.2
3	0.3	0.09	0.2	2.0	0.2
4	0.4	0.12	0.1	2.0	0.2
5	0.5	0.15	0.0	2.0	0.2

Después de agregar la solución C se deja reposar 10 min a T:A: y una vez adicionado el reactivo de Folin se deja reposar 20 min. La absorbancia se lee a una D:O: de 550 nm.

En la gráfica 7 se muestra la curva estándar de proteínas obtenida al utilizar BSA como estándar. Esta curva se utilizó para la cuantificación de proteínas en las muestras de suero.

TABLA -1

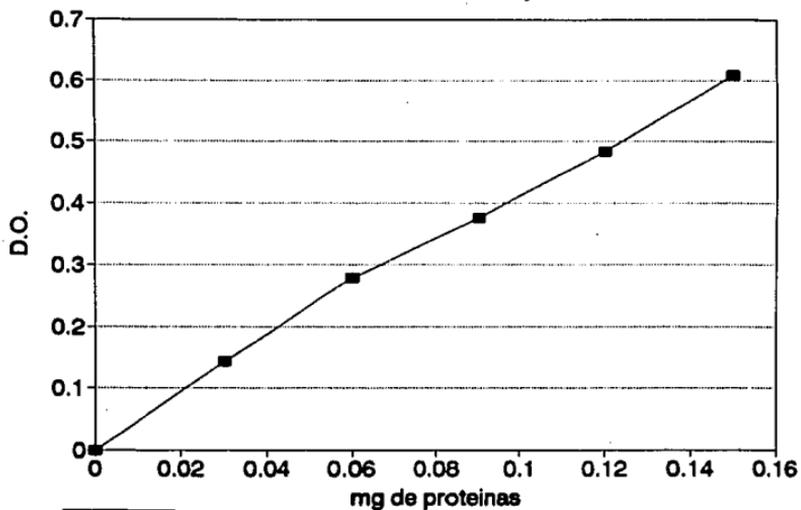
Actividad de la Enzima tirosina amino transferasa. (nmoles /mg proteína)

	promedio	desviación estandar
controles	6.11	1.5
pacientes	10.11	2.16

controles	pacientes	t-Test: Two-Sample Assuming Unequal Variances	
7,1	11		
6,7	10		
7,8	7,9	Mean	6,112143 10,11558
8,8	8,5	Variance	2,26168 4,689741
6,35	7,7	Observati	14 27
6,7	8,7	Pearson C	#N/A
4,8	12,03	Pooled Va	3,5
5,43	8,5	df	35,47697
5,23	13,7	t	-8,91434
4,76	13,34	P(T<=t) o	2,46E-08
4,8	11,9	t Critical o	1,689573
5,7	11,3	P(T<=t) tw	4,93E-08
3,4	9,5	t Critical t	2,03011
6	8,96		
	9,36		
6,112143	12		
1,503888	12		
	14,3		
	6,7		
	9,54		
	7,56		
	9,5		
	6,82		
	13,7		
	8,97		
	10,4		
	9,24		
	10,11558		
	2,165581		

Tabla 2.
Análisis estadístico de los resultados obtenidos en la determinación de TAT.

Curva Estandar de proteínas



Grafica 7

DISCUSION

El presente trabajo presenta un estudio de la determinación enzimática de la actividad de la enzima TAT en el suero de pacientes con problemas hepáticos. El estudio de esta enfermedad es de vital importancia ya que es un problema complejo muy estudiado debido a la crucial función que el hígado desempeña en el metabolismo de los seres vivos.

Se ha reportado anteriormente la cuantificación de esta enzima por esta (10) y otras técnicas (12,13,14) en hígado de rata bajo diferentes condiciones hormonales (15) así como en cultivos celulares (16) y en sitios de implantación en ratas (17). Sin embargo, no se tiene información acerca de la cuantificación de la misma en el suero de pacientes con daño hepático o en sujetos normales.

Al estudiar las propiedades cinéticas de esta enzima (14) con preparaciones crudas de la misma surgió la necesidad de implementar técnicas mas sensibles y específicas para la cuantificación de TAT. La determinación por el método de Briggs (18) no es lo suficientemente sensible para medir la actividad enzimática en ciertas condiciones. El ensayo utilizando el complejo enol-boratos, (19) en el cual la reacción es seguida por la medición de la absorbancia a 310 nm es sensible en principio, sin embargo, requiere una solución clara para la determinación así como una tautomerasa que es la enzima que cataliza la conversión de ceto-pHPP a la forma enólica.

La técnica utilizada en este trabajo (10) se basa en los estudios realizados por Pitt (20) en la oxidación de pHPP por el oxígeno molecular a pHBA y oxalato. Esta reacción se describió por primera vez en 1917. Otro reporte, muestra la determinación de pHPP en orina (21) el cual se basa en la conversión de pHPP a pHBA. Sin embargo, este procedimiento es un poco engorroso.

La técnica que se utilizó en este trabajo es una medición rápida, adecuada sensible, para la actividad de tirosina transaminasa basada en la conversión de pHPP a pHBA en condiciones alcalinas fuertes. La lectura de los blancos es un poco alta, sin embargo esto no obstaculiza la determinación de los problemas. El DDC contribuye de una manera importante en la lectura del blanco, sin embargo, a diferencia de los resultados mostrados por Diamondstone (10) no se obtuvieron diferencias al utilizar DDC o en ausencia de él.

Otra ventaja de esta técnica es que se puede trabajar con preparaciones recientes o conservadas en refrigeración.

El mecanismo exacto de conversión de pHPP a pHBA en condiciones alcalinas no se conoce perfectamente, sin embargo se ha propuesto que es mediado por radicales libres (20).

Es importante mencionar que la cuantificación de esta transaminasa pudiera ser útil en el diagnóstico del daño hepático producido en pacientes con hepatitis viral adicionalmente a la información que proporcionan las enzimas determinadas de rutina en el laboratorio clínico.

BIBLIOGRAFIA

1. Koretz, R.L. Chronic Hepatitis. 1989;9(6): 197-202.
2. Kools, A.M. Hepatitis A,B,C,D, and E. Postgrad Med 1992; 91(3): 109-114. .
3. Kumar, S., Pound, D. Serologic diagnosis of viral hepatitis. Postgrad Med 1992;92(4): 55-68.
- 4 Moore, P.S., Koontz, J. W. Insulin-mediated regulation of tyrosine aminotransferase in rat hepatoma cells: inhibition of transcription of enzyme degradation. Arch Biochem Biophys 1989; 275(2): 486-495.
5. Hayashi, H., Wada, H., Yoshimura, T. et al. Recent topics in piridoxal 5'-phosphate enzyme studies. Annu Rev Biochem. 1990; 59: 87-110.
6. Rettenmeier, R., Natt, E., Zengraf, H., Scherer, G. Isolation and characterization of the human tyrosine aminotransferase gene. Nucleic Acids Res. 1990; 18(13): 3853-3861.
7. Boshart, M., Weih, F., Schmidt, A., et al. A cyclic AMP response element mediates repression of tyrosine aminotransferase gene transcription by the tissue-specific extinguisher locus TSE-1. Cell 1990; 61: 905-916.
8. Knox, W. E., Averbach, V.H., Linc, E. Enzymatic and metabolic adaptations in animals. Physiol Rev. 1956, 36: 164.
9. Alexandrova, M. Duration of antagonizing effect of RU486 on the agonist induction of tyrosine aminotransferase via glucocorticoid receptor. J Steroid Biochem Molec Biol. 1992; 41(3): 723-725.

10. Diamondstone, T., Assay of tyrosine transaminase activity by conversion of p-hydroxifenilpyruvate to p-hydroxibenzaldehyde. *Anal Biochem.* 1966. 16: 395-401.
11. Petrazzuoli, M., Pahuja, S., Lamer, J., Hochborg, R. Biological activity of the fatty acid ester metabolites of corticoides. *Endocrinology* 1990; 127(2): 555-559.
12. Lin, E. and Knox, W. *Biochim et Biophys Acta.* 1957; 26:85
13. Sereni, F., Kenney, F.T., and Kretchmer, N. *J Biol Chem.*, 1959; 234: 609.
14. Canellakis, Z., Cohen, P. *J Biol Chem.* 1956; 222:53.
15. Braidman, I., Rose, D. Effects of sex hormones on three glucocorticoid-inducible enzymes concerned with amino acid metabolism in rat liver. *Endocrinology* 1971; 89:1250.
16. Oshima, H. Simons, S. Modulation of glucocorticoid induction of tyrosine aminotransferase gene expression by variations in cell density. *Endocrinology* 1992; 130: 2106-2112.
17. Terán Benitez, J. Actividad de tirosina aminotransferasa y triptofano dioxigenasa en el utero de rata. Tesis para obtener el título de Licenciado en Química. Universidad Iberoamericana. México, 1978.
18. Briggs, A.P., *J Biol Chem.* 1922; 51: 453.
19. Lin, E., Pitt, B. Civen, M., and Knox; W. *J. Biol Chem* 1956; 233: 668.
20. Pitt, B. *Nature* 1962; 196: 272.
21. Holcomb, I., McCann, D. and Boyle, A. *J Anal Chem.* 1965;37: 1657.