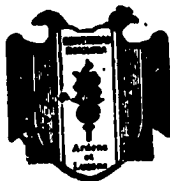


302827

UNIVERSIDAD MOTOLINIA 2

ESCUELA DE QUIMICA
INCORPORADA A LA
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO



Isoamilasas en el Suero en una Población Clínicamente sana
y en Enfermos con Niveles Anormales de Amilasa total

T E S I S

Que para obtener el Título de
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P r e s e n t a

OLIVIA SIERRA AMOR

México, D.F.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

2002 1985



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Esta tesis se realizó en el INNSZ en el Departamento de Gastroenterología bajo la dirección del Dr. Guillermo Robles Díaz Jefe del Laboratorio de dicho departamento y la QFB. Elba Galván Guerra.

A mis queridos padres con respeto
y admiración por todo el apoyo
que me han brindado y el cariño
con el cual me han impulsado
para seguir adelante.

A mis hermanas
quienes encontrándose
a mi lado me han ayudado
en todo momento.

A mi abuelita
con todo el cariño
y respeto que merece.

A mis tíos y primos
por su fraternal presencia.

A mis amigos
por los momentos compartidos
durante estos años.

**Al Instituto Nacional de la Nutrición
Salvador Zubirán, a todo el Departamento
de Gastroenterología y en especial
al Dr. Guillermo Robles-Díaz y a la
QFB. Elba Galván Guerra.**

I N D I C E

	Pags.
1.- INTRODUCCION	1
2.- OBJETIVO.	14
3.- MATERIAL	15
3.1.- Material de Laboratorio	16
3.2.- Material Clfnico.	17
4.- METODO.	18
5.- RESULTADOS.	25
6.- CONCLUSIONES.	41
7.- DISCUSION.	44
8.- RESUMEN.	51
9.- BIBLIOGRAFIA.	53

(1)

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

El término amilasa proviene de la palabra griega "Amylon" que significa almidón.

La amilasa se identificó en la sangre por Magendic en 1846 y fue determinada cuantitativamente por primera vez en animales por Foster en 1867 (1).

En 1916 Stocks sugirió que la actividad de amilasa en sangre y orina era una prueba sensible y segura para determinar varias enfermedades pancreáticas (2). En 1929 se informó el primer caso de hiperamilasemia en pancreatitis aguda (3).

La amilasa es una glucoproteína de peso molecular aproximado de 50 000 daltons. Es una alfa-amilasa (EC 3.2.1.1.) que presenta una sola cadena polipeptídica formada por 475 aminoácidos, dos grupos SH, cuatro puentes disulfuro y contiene una unión muy fuerte con el calcio. Actúa sobre polisacáridos como son el almidón, glucógeno y oligosacáridos, rompiendo al azar las uniones internas alfa 1,4 glucosídicas, dando como producto final la glucosa, maltosa y dextrinas de cadena corta. Para que se lleve a cabo la reacción enzimática es necesario tener condiciones constantes de temperatura y un pH de 6.9 . La presencia del cloro es esencial en esta reacción (4).

Se ha identificado una beta-amilasa (EC 3.2.1.2.) en vegetales, principalmente en semillas. Es diferente de la alfa amilasa en estructura y peso molecular, ya que presenta simetría tetramérica y su peso molecular es de 206 000 daltons (4).

Según se informa en la literatura la amilasa en suero es detectada desde el segundo o tercer mes de vida, sin embargo los niveles encontrados en el adulto se alcanzan hasta el primer año de vida, por lo que en los primeros meses son bajos (5,6).

Berk ha descrito una microtécnica sensible para detectar la presencia de amilasa en suero desde el nacimiento (7,8).

La determinación de amilasa en suero humano fué introducida en la química clínica desde hace aproximadamente cien años (9), constituyendo una prueba de rutina muy importante en el diagnóstico de las enfermedades del páncreas, motivo por el cual se han descrito diversas técnicas para su determinación.

Todas estas técnicas van a emplear como sustrato a la molécula completa del almidón, el cual está constituido por una mezcla de polisacáridos: la amilosa que se encuentra en un 20% formada por cadenas sin ramificar dadas por las uniones alfa 1, 4 glucosídicas, y por amilopectina en un 80%, que constituye la mayor parte de la molécula y cuyo estructura presenta cadenas muy ramificadas dadas por las uniones alfa 1,6 glucosídicas. Ya que la amilasa es específica para las uniones alfa 1,4 la gran cantidad de amilopectina va a interferir en cierta forma con su actividad enzimática.

En 1938 Somogyi describió dos técnicas para la determinación de la actividad de amilasa en líquidos orgánicos (5, 10,11); el método Sacarogénico y el método Yodométrico, cuyo fundamento es el siguiente:

1) En el método Sacarogénico se obtiene una forma ción de azúcares que provienen de la hidrólisis que realiza la amilasa sobre el almidón (7). Es un método lineal y exacto, sin embargo cuenta con un inconveniente: el sustrato es inestable por lo que debe prepararse diariamente, de tal forma que no se pueden obtener resultados reproducibles de un día a otro.

2) El método Yodométrico se basa en la hidrólisis del almidón. Durante este proceso se toman alícuotas de la mezcla amilasa-almidón y se trasladan a tubos que continen Yoduro de potasio, observándose la formación de una solución de color "azul púrpura" originada por el complejo "almidón yodo".

Los resultados de ambos métodos son expresados en Unidades Somogyi (US/100 ml). Cada unidad se define como la cantidad de sustancia reducida (azúcar) que se produce durante la incubación del suero en presencia de un amortiguador de almidón como sustrato durante treinta minutos a 40°C, expresada como miligramos de glucosa equivalentes a cien mililitros de suero.

La primera técnica sirve como base de referencia para el segundo método, pero es muy difícil realizarla con repro

reproducibilidad para personas con poca experiencia.

El método Yodométrico o Amiloclástico es probablemente el más usado y hay varias modificaciones basadas en la determinación fotométrica de la mezcla "almidón yodo".

Algunos problemas con el método Yodométrico que dan valores falsos son los siguientes:

1.- Falsos negativos:

- 1) Tubos mal lavados.
- 2) Presencia de oxalatos y citratos en el suero.

2.- Falsos positivos:

- 1) Presencia de hemólisis.
- 2) Tubos con residuos de jabón.
- 3) Contaminación con saliva.

A pesar de ser éste un método sencillo, proporciona resultados con poca reproducibilidad, aún encontrándose los valores dentro de los límites normales.

Debido a los inconvenientes antes señalados, a partir de 1957 se empezó a utilizar una técnica descrita por Caraway (12).

La técnica de Caraway es una modificación al método Yodométrico y se dice que cuenta con algunas ventajas sobre el procedimiento utilizado por Somogyi como son: realizarlo en menos tiempo, el análisis es más fácil y el sustrato de almidón es más estable. Sin embargo la preparación frecuente de éste

hace que los resultados sean poco reproducibles dado que mide la producción inespecífica de azúcares reductores presentes en la muestra como la maltosa (12).

Pese a todo esto, en nuestro medio, el método más usado parece ser el Yodométrico de Caraway, sin embargo recientemente comienza a ganar adeptos un método Cromogénico (Phadebas Amylase Test, Pharmacia Diagnostics AB, Uppsala Suecia), cuyo sustrato es insoluble en agua y está formado por cadenas de polímeros de almidón que se encuentran teñidas con un colorante azul. Al ser hidrolizado el sustrato por la alfa-amilasa se originan fragmentos azules solubles en agua y la absorbancia que se obtiene de esta solución colorida es proporcional a la actividad de la alfa-amilasa presente en la muestra (fig. 1) (13).

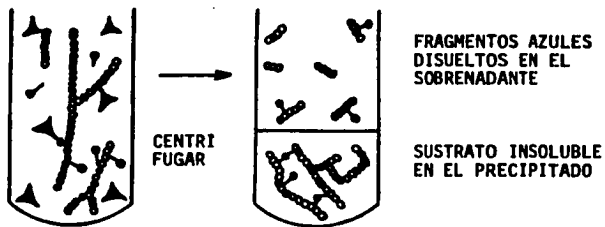
Este método nos proporciona mayor reproductibilidad y precisión, siendo más simple y seguro que las técnicas antes mencionadas (13).

Otra de las ventajas de utilizar este nuevo sustrato cromogénico, es el poder determinar las isoenzimas de amilasa aumentando de esta forma la utilidad diagnóstica de la prueba (14).

Hay que tener en cuenta que la actividad total de la alfa-amilasa en suero, representa la suma de sus dos componentes independientes: uno de origen no pancreático, que por ser

(7)

FUNDAMENTO DEL METODO CROMOGENICO



	AMILASA		POLIMERO DE AMILOSA AZUL INSOLUBLE (SUSTRATO)
	AMILOSA		FRAGMENTOS SOLUBLES AZULES
	COLORANTE		

Figura 1.- Esquema que representa el fundamento del método Cromogénico (Phadebas).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

producido principalmente en las glándulas salivales se le conoce comunmente como fracción salival (S) y otro producido únicamente en el páncreas y que recibe el nombre de fracción pancreática (P).

Además de tener un origen diferente, se diferencian desde el punto de vista fisico-químico en su contenido en carbohidratos. En la clínica su importancia estriba en la identificación del sitio de producción, como dijimos anteriormente, la fracción S se produce principalmente en las glándulas salivales, sin embargo es secretada también por el pulmón, ovario, trompas de Falopio, tumores y las glándulas mamarias y lagrimales. Por otro lado la fracción pancreática producida únicamente en ese órgano, es considerada como un parámetro organoespecífico y es por lo tanto diagnóstico de enfermedad pancreática.

Las actividades de estas fracciones en suero no guardan relación entre sí, pudiéndose encontrar independientemente niveles altos, bajos o normales (fig. 2).

Las técnicas utilizadas para separar, distinguir y cuantificar las isoenzimas de alfa-amilasa son las siguientes:

- 1.- Método de isoelectroenfoque (15).
- 2.- Método electroforético (16).
- 3.- Método cromatográfico (15).

La separación mediante el uso de estos métodos se ba

RELACION DE LAS ISOAMILASAS PANCREATICA Y SALIVAL

9

FRACCION SALIVAL

	↓ ↓	↓ Normal	↓ ↑
P A N C R E A T I C A F R A C C I O N	Normal ↓	Normal Normal	Normal ↑
	↑ ↓	↑ Normal	↑ ↑

ALTO ↑

NORMAL

BAJO ↓

Figura 2.- Posibles combinaciones de las dos fracciones de la amilasa en suero.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

(10)

sa en las diferentes cargas eléctricas que poseen las moléculas de las isoenzimas.

1.- El método de isoelectroenfoque separa a las isoamilasas en base al punto isoeléctrico de cada una (fig. 3). La amilasa sérica se puede separar en tres grandes picos que presentan generalmente el mismo tamaño, apareciendo en ocasiones otros picos menores. Estos tres picos mayores tienen puntos isoeléctricos aproximados de 5.9, 6.4 y 7.0, considerándose a este último como la fracción pancreática, debido a que desaparece cuando se realiza en ensayo con sueros de pacientes pancreotectomizados.

2.- El método electroforético se lleva a cabo en placas de acetato de celulosa, aplicando una corriente de 250 volts durante 90 minutos, utilizando para ello un sistema discontinuo de amortiguadores de Tris-barbital. Para el revelado se coloca sobre una delgada capa de agarosa al 1%, la cual se encuentra teñida con una tableta de Phadebas (Pharmacia Diagnostics AB, Uppsala, Suecia) por cada 2 ml de gel, y se incuba 90 minutos a 56°C en una cámara húmeda. Posteriormente se seca la placa con aire y se determina densitométricamente las áreas de los picos. De esta forma tendremos un pico que corresponde a la isoamilasa que proviene del páncreas y otro para la isoamilasa salival.

3.- El método cromatográfico necesita pasar primero

ISOELECTROENFOQUE DE ISOAMILASAS

//

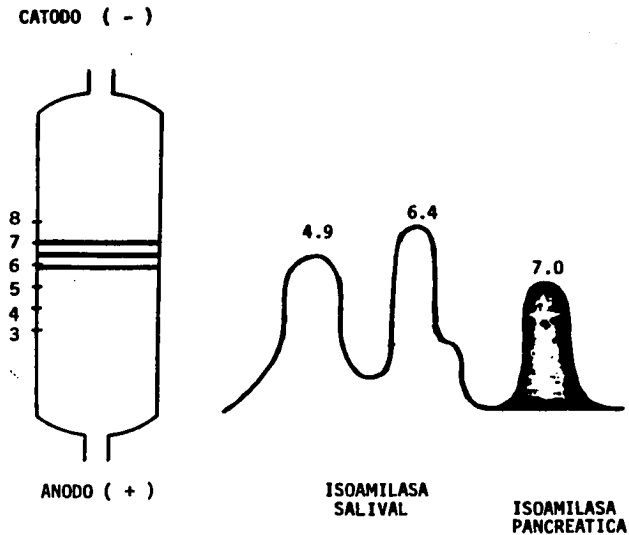


Figura.- Separación de las isoenzimas de la alfa-amilasa por Isoelectroenfoque.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

(12)

el suero por una columna de Sephadex G-100 (2.5 cm x 10 cm) para separar de esta forma la amilasa de otras protefnas presentes en la muestra. Este filtrado se aplica a una columna QAE Sephadex A-50 donde mediante intercambio iónico se obtienen las isoamilasas pancreática y salival.

Debido a que estos procedimientos para la determinación de las isoenzimas de amilasa son laboriosos y costosos, no se había podido introducir esta prueba dentro de los análisis de rutina. Sin embargo, actualmente se ha descrito un método cromogénico que utiliza un inhibidor que es extraído de las protefnas del trigo (*Triticum aestivum*). Este actúa directamente sobre la isoamilasa S inhibiendo su actividad cien veces de lo que inhibe a la isoamilasa P (9,14). De tal forma que al adicionar el inhibidor al suero, la actividad remanente corresponderá a la isoamilasa P y mediante el uso de una curva estándar y controles enzimáticos se pueden calcular los dos componentes, P y S.

La identificación de la isoamilasa P puede aumentar la utilidad diagnóstica de la prueba. Finalmente conviene mencionar que en estudios previos se han encontrado diferentes valores de amilasa en sujetos sanos (13). La variación en los niveles séricos de la actividad de esta enzima están relacionados con el método usado y la población estudiada, variando de acuerdo con la edad y probablemente con factores genéticos y

(13)

dietéticos (13); por lo que consideramos que deben establecer - se valores de referencia antes de incluir la determinación de isoamilasa en el conjunto de pruebas diagnósticas de patología pancreática.

O B J E T I V O

1) Establecer la precisión del método cromogénico (Phadebas Isoamylase Test, Pharmacia Diagnostics AB, Uppsala Suecia).

2) Conocer los límites de referencia en una muestra de población sana adulta de México.

3) Investigar las variaciones más frecuentes de las isoamilasas en el suero de enfermos con alteración de los niveles de amilasa total en la población de pacientes estudiados en el Laboratorio de Gastroenterología del Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán.

(15)

M A T E R I A L

MATERIAL DE LABORATORIO

1.- APARATOS.

- Agitador - Clay Adams
- Baño de agua para incubación - Precision
- Centrífuga - Beckman TJ-6
- Espectrofotómetro - Gilford Instrument Stasar III
- Reloj con segundero - General Electric

2.- REACTIVOS.

- Agua destilada
- Estuche comercial de Pharmacia Diagnostics para Isoamila No. de lote 6179
- NaOH 0.5 N

3.- VARIOS.

- Gradilla
- Jeringas de 5 ml
- Matraces Earlen-Meyer de 125 ml
- Pastillero
- Pipetas Gilson automáticas (200 microlitros)
- Pipetas Gilson automáticas (1000 microlitros)
- Pipetas graduadas de 5 ml
- Pipetor automático - Drumond Scientific Co.
- Probeta de 50 ml
- Tubos de 13 x 100 mm
- Vasos de precipitados de 100 ml

MATERIAL CLINICO.

- 1.- Para estudiar la precisión del método de laboratorio se utilizó un suero control hecho de una mezcla de sueros de pacientes, repartido en alícuotas y congelado hasta el momento de su medición.
- 2.- Para obtener los valores de referencia se estudió el suero de 270 adultos sanos (donadores de sangre no profesionales, familiares de pacientes y personal médico y paramédico): 184 hombres de 15 a 53 años y 86 mujeres de 18 a 62 años.
- 3.- De 225 muestras consecutivas (5-VII-83 a 5-VII-84) para determinación sérica de amilasa total en pacientes enviados al laboratorio de Gastroenterología del Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán, se seleccionaron 74 sueros con niveles anormales de esta enzima.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

M E T O D O

METODOS

1.- Preparación del Material.

El material de vidrio utilizado para esta prueba se lava con agua y jabón, se enjuaga bien y posteriormente se le da otra enjuagada con agua bidestilada, con el fin de quitar cualquier residuo de sustancia jabonosa. Se seca en horno a 150°C, y se almacena en un sitio especial para evitar contaminación con sudor o saliva.

2.- Preparación de Reactivos.

El equipo de "Phadebas Isoamylase test" consta de una curva estándar (fig. 4) y 5 frascos conteniendo:

- 1) Sustrato en tabletas formado por cadenas de polímeros de almidón teñidos con un colorante azul.
- 2) Amortiguador concentrado de NaN_3 al 0.05%.
- 3) Inhibidor liofilizado extraído de las proteínas del trigo.
- 4) Estándar humano de amilasa pancreática liofilizado.
- 5) Estándar humano de amilasa salival liofilizado.

Se utiliza agua destilada para reconstituir el equipo y se procede a preparar los reactivos:

Inhibidor diluido: Mezclar 1 parte de inhibidor reconstituido, 1 parte de amortiguador concentrado y 40 partes de agua destilada.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

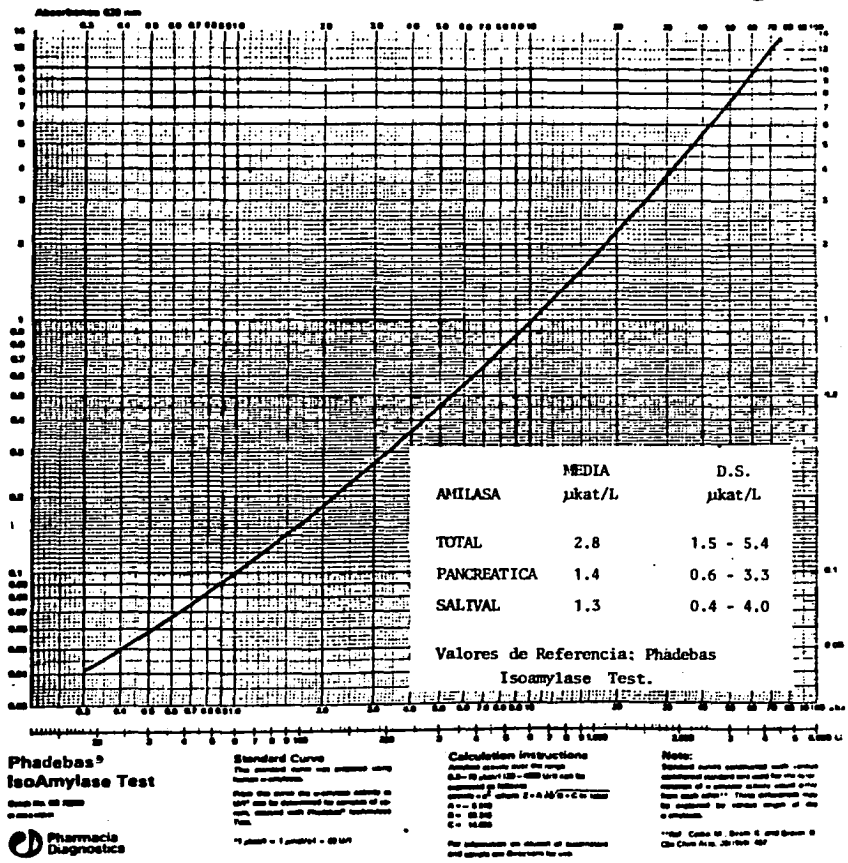


Figura 4.- Curva estándar y valores de referencia de Phadebas IsoAmylase Test.

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

Amortiguador diluido: Mezclar 1 parte de amortiguador concentrado y 40 partes de agua destilada.

3.- Toma de la Muestra.

Después de 12 horas de ayuno, se toman 5 mililitros de sangre en tubo de 13 x 100 mm sin anticoagulante, el suero es separado por centrifugación después de incubar la sangre - 30 minutos a 37°C.

4.- Determinación de las Isoamilasas.

Una vez que los pasos antes mencionados han sido realizados se lleva a cabo la siguiente técnica:

- 1) Por cada muestra se utilizan 2 tubos de 13 X 100 mm marcados como R (remanente) y T (total).
- 2) A los tubos R se les agrega 4 ml de inhibidor diluido y 200 microlitros de problema.
- 3) A los tubos T se les agrega 4 ml de amortiguador diluido y 200 microlitros de problema.
- 4) Incubar todos los tubos a 37°C durante 5 minutos.
- 5) Agregar una tableta de sustrato y agitar durante 10 segundos.
- 6) Incubar a 37°C durante 15 minutos (el tiempo se deberá marcar con reloj secundario).
- 7) Detener la reacción exactamente a los 15 minutos con 1 mililitro de NaOH 0.5 N, y agitar (agitador Clay Adams) durante 10 segundos.

8) Centrifugar 5 minutos a 1500 rpm.

9) Leer en espectrofotómetro a 620 nm contra blanco de agua.

En cada ensayo se procesan el estándar pancreático y salival, así como un blanco de agua.

5.- Cálculos.

La densidad óptica (D.O.) de las muestras se interpola en la curva estándar, con estos resultados se obtiene la relación R/T, tanto para los problemas como para los estándares.

Para poder calcular los valores de los estándares se debe emplear la fórmula siguiente:

$$\frac{\text{D.O. R}}{\text{D.O. T}} = a \quad \text{Amilasa del estándar pancreático}$$

y

$$\frac{\text{D.O. R}}{\text{D.O. T}} = b \quad \text{Amilasa del estándar salival}$$

Para obtener el resultado de los problemas se sustituyen los valores de las D.O. encontrados en cada caso en la siguiente fórmula para la actividad de amilasa pancreática:

$$P = \frac{R - T \cdot b}{a - b}$$

La actividad de amilasa S se obtiene restando la P de la total (S = T - P).

Si la muestra se diluye, debe corregirse la dilución antes de calcular las actividades de amilasa P y S.

Los resultados se expresan en $\mu\text{kat}/\text{l}$, que es igual a $1 \mu\text{mol}/\text{s}\cdot\text{L}$ y que corresponde a 60 U/l.

Los valores esperados en sujetos sanos de acuerdo al instructivo comercial se encuentran en la figura 4.

5.- Precisión del método.

Se estimó a partir de la variabilidad intra e interlotes, haciendo mediciones repetitivas en sueros controles. La variabilidad intralotes resume las mediciones efectuadas en un mismo suero 5 veces en un mismo día durante 3 días consecutivos. La variabilidad interlotes se refiere a las mediciones en un mismo suero, efectuadas cada día, durante 15 días no consecutivos en un plazo de 5 semanas. Los resultados se expresan como coeficiente de variación (C.V.).

$$\text{C.V.} = \frac{\text{D.S.} \cdot 100}{\bar{X}}$$

6.- Análisis de los resultados.

1) Se establecieron los límites de referencia utilizando los percentiles 5-95% (17) para cada década en ambos sexos. Además se calculó la media y la desviación estándar de cada grupo.

En cada población (hombres y mujeres) se compararon los valores por décadas mediante la prueba U de Mann - Whitney. La comparación entre las diferentes poblaciones (hombres contra

mujeres) de acuerdo a la edad, se hizo mediante la prueba de varianza de una vfa de Kruskal-Wallis. Se consideró diferencia estadística significativa una $P < 0.05$ (18).

2) Se determinaron las isoamilasas en 74 sueros que presentaron valores anormales de amilasa total en base a nuestros valores de referencia encontrados, separándose en 2 grupos: 49 con hiperamilasemia y 25 con hipoamilasemia. Se anotó la distribución de las fracciones (pancreática y salival) para cada grupo.

(25)

R E S U L T A D O S

1.- Precisión del Método.

Los resultados se resumen en el cuadro 1.

2.- Límites de Referencia.

La distribución de los valores obtenidos puede observarse en las figuras 5 a 11.

Los resultados de amilasa total y sus isoenzimas en promedio y percentiles se expresan para cada década y por separado para hombres y mujeres en los cuadros 2 y 3 respectivamente.

Los valores del grupo total de 270 voluntarios sanos se encuentran en el cuadro 4.

La media de los niveles de amilasa en suero encontrado por nosotros es mayor que la esperada por la casa comercial (fig. 4).

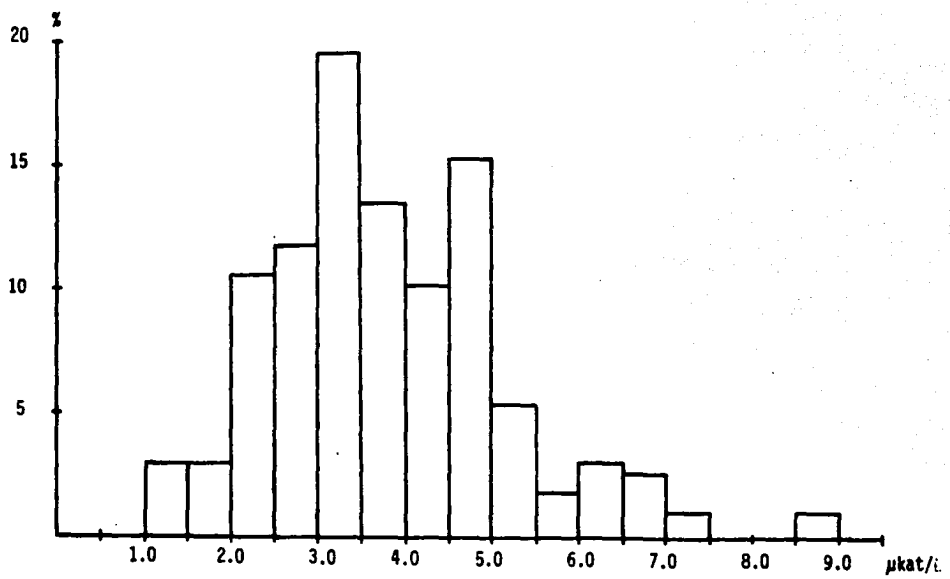
3.- Los 74 sueros con amilasa total anormal estaban constituidos por 49 hiperamilasemias y 25 hipoamilasemias (fig. 13).

Cuadro 1.- Comparación de la precisión intra e interlotes.
Coeficiente de variación expresado para la amilasa total y sus isoamilasas.

PRECISION	N	AMILASA TOTAL		AMILASA PANCREATICA		AMILASA SALIVAL	
		MEDIA $\mu\text{kat/l}$	C.V. %	MEDIA $\mu\text{kat/l}$	C.V. %	MEDIA $\mu\text{kat/l}$	C.V. %
INTRALOTES	15	4.19	2.37	2.31	4.44	1.83	10.05
INTERLOTES	15	4.32	2.31	2.55	8.63	1.77	14.70

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

AMILASA TOTAL EN 184 HOMBRES SANOS



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Figura 5.- Distribución de la actividad de amilasa total en 184 hombres sanos.

AMILASA TOTAL EN 86 MUJERES

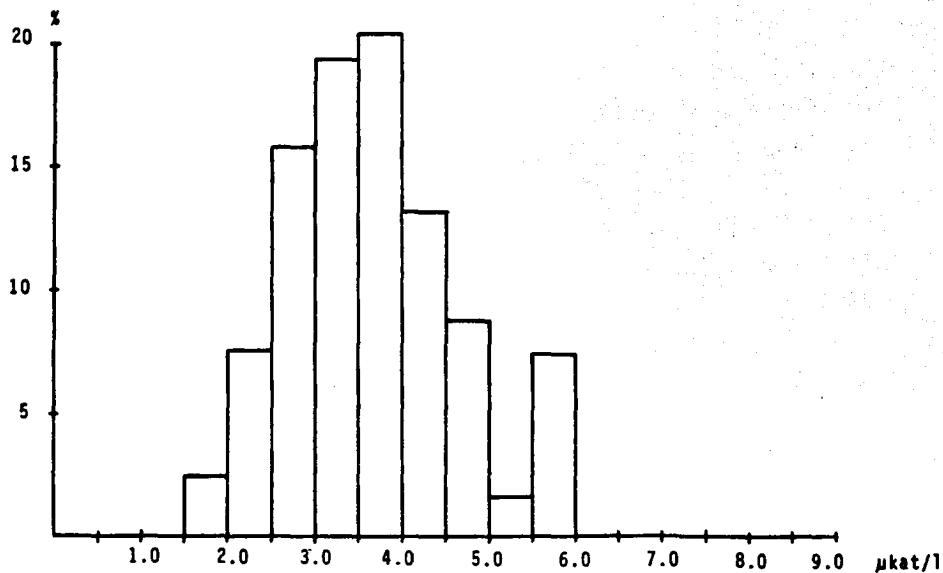


Figura 6.- Distribución de la actividad de amilasa total en 86 mujeres sanas.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

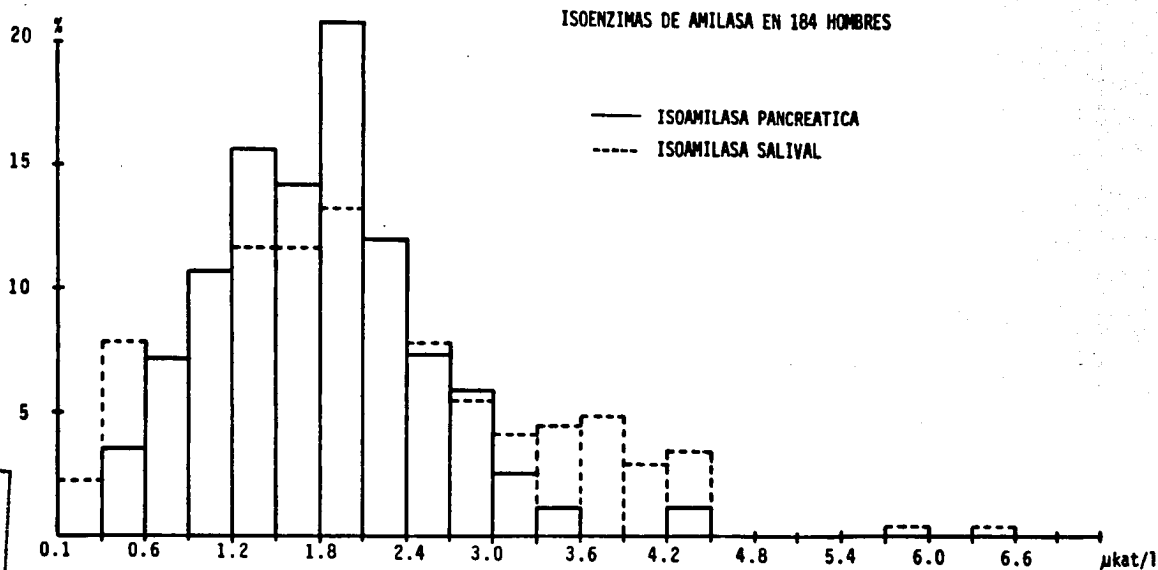


Figura 7.- Distribución de la actividad de las isoamilasas: Pancreática y Salival en 184 hombres sanos.

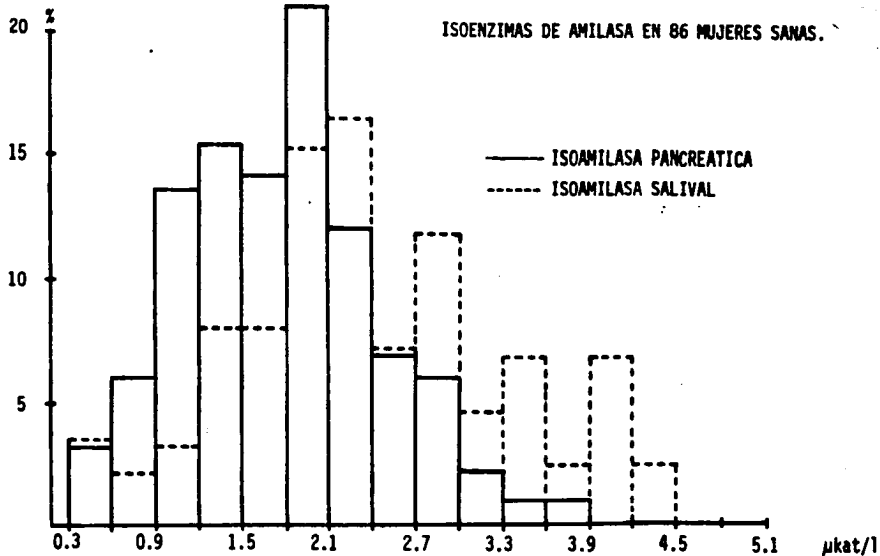


Figura 8.- Distribución de la actividad de las isoamilasa: Pancreática y Salival en 86 mujeres sanas.

AMILASA TOTAL EN 270 ADULTOS SANOS.

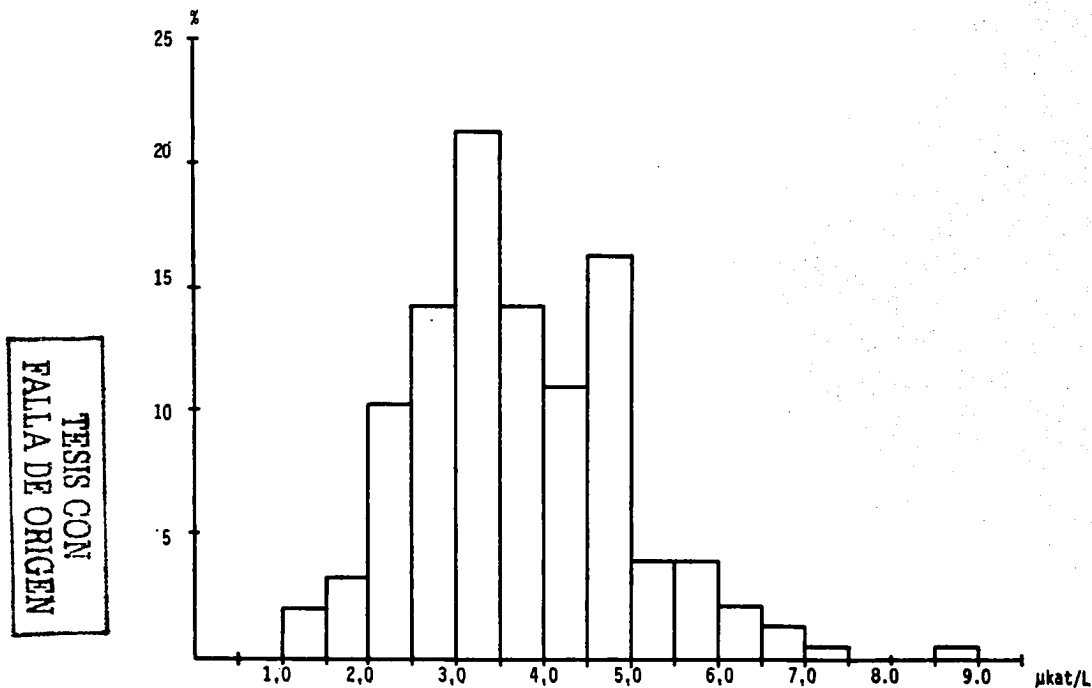


Figura 9.- Distribución de la actividad de amilasa total en 270 adultos sanos.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

AMILASA PANCREÁTICA EN 270 ADULTOS SANOS.

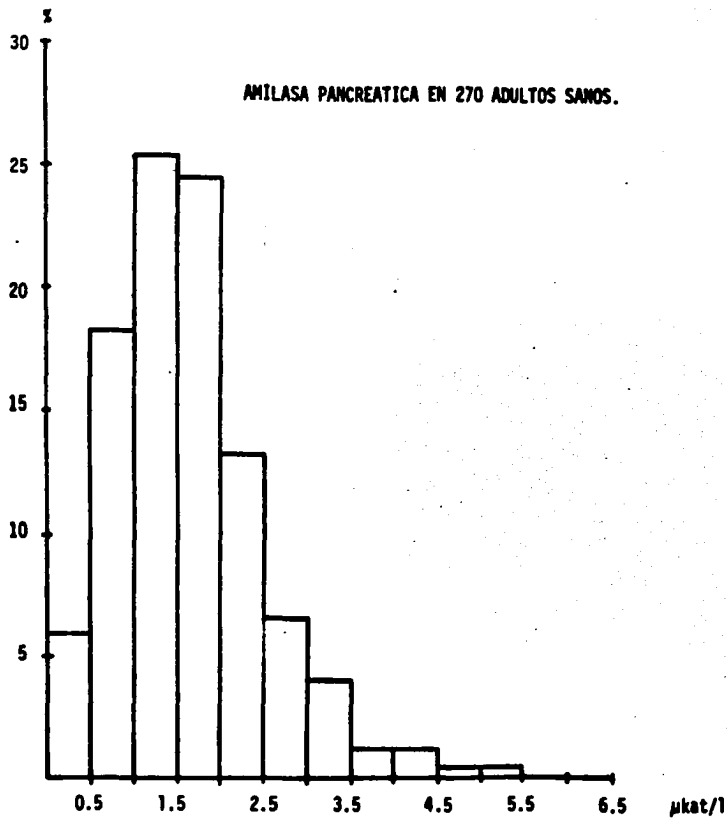


Figura 10.- Distribución de la actividad de amilasa pancreática en 270 adultos sanos.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

AMILASA SALIVAL EN 270 ADULTOS SANOS.

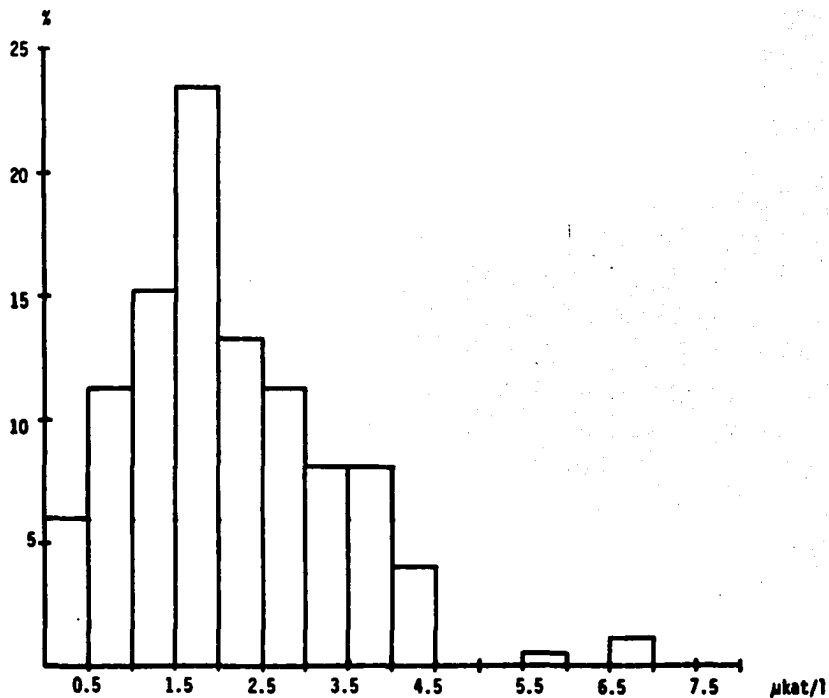


Figura 11.- Distribución de la actividad de amilasa salival en 270 adultos sanos.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Cuadro 2.- Valores de amilasa total y sus fracciones, pancreática y salival, en 184 hombres sanos. Los resultados se expresan en $\mu\text{kat/l}$.

AMILASA	EDAD (años)	N	MEDIA \pm D.S. ($\mu\text{kat/l}$)	PERCENTILES (%)		
				5	50	95
TOTAL	< 19	25	3.71 \pm 1.21	2.14	3.29	6.30
	20-29	25	3.65 \pm 1.31	1.49	3.45	6.03
	30-39	48	4.04 \pm 1.22	2.26	4.12	6.31
	40-49	29	3.52 \pm 1.12	1.82	3.47	6.25
	\geq 50	4	2.15 \pm 0.80		2.09	
	GRUPO TOTAL	184	3.72 \pm 1.27	1.87	3.50	6.00
PANCREÁTICA	< 19	25	1.38 \pm 0.44	0.51	1.44	2.12
	20-29	78	1.57 \pm 0.95	0.38	1.38	3.80
	30-39	48	1.95 \pm 1.10	0.44	1.79	3.77
	40-49	29	1.71 \pm 0.71	0.27	1.56	3.12
	\geq 50	4	0.94 \pm 0.38		0.90	
	GRUPO TOTAL	184	1.65 \pm 0.92	0.44	1.50	3.42
SALIVAL	< 19	25	2.39 \pm 1.45	0.57	1.85	5.51
	20-29	78	2.06 \pm 1.21	0.47	1.90	4.34
	30-39	48	2.07 \pm 1.04	0.31	1.94	3.75
	40-49	29	1.90 \pm 1.19	0.34	1.78	4.37
	\geq 50	4	1.21 \pm 1.02		1.16	
	GRUPO TOTAL	184	2.07 \pm 1.20	0.40	1.86	4.90

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Cuadro 3.- Valores de amilasa total y sus fracciones, pancreática y salival, en 86 mujeres sanas. Los resultados se expresan en $\mu\text{kat/l}$.

AMILASA	EDAD (años)	N	MEDIA + D.S. ($\mu\text{kat/T}$)	PERCENTILES (%)		
				5	50	95
T O T A L	< 19	6	4.35 + 1.33		4.05	
	20-29	30	3.49 \pm 1.02	1.95	3.24	
	30-39	30	3.58 \pm 0.96	1.61	3.50	5.74
	40-49	10	3.59 \pm 1.08		3.55	
	> 50	10	3.72 \pm 0.82		3.69	
	GRUPO TOTAL	86	3.62 \pm 1.00	2.11	3.50	5.51
P A N C R E A T I C A	< 19	6	1.53 + 1.42		1.10	
	20-29	30	1.47 \pm 0.64	0.41	1.39	2.41
	30-39	30	1.61 \pm 0.70	0.33	1.64	2.90
	40-49	10	1.51 \pm 0.57		1.61	
	> 50	10	1.53 \pm 0.50		1.60	
	GRUPO TOTAL	86	1.53 \pm 0.70	0.39	1.60	2.56
S A L I V A L	< 19	6	2.82 + 1.00		2.64	
	20-29	30	2.11 \pm 1.04	0.23	2.03	4.00
	30-39	30	1.96 \pm 0.97	0.32	1.92	3.74
	40-49	10	2.08 \pm 0.89		1.68	
	> 50	10	2.19 \pm 0.51		2.16	
	GRUPO TOTAL	86	2.10 \pm 0.94	0.49	2.01	3.72

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Cuadro 4.- Valores de amilasa total y sus fracciones, pancreática y salival, en 270 adultos sanos. Los resultados se expresan en $\mu\text{kat/l}$.

AMILASA	EDAD (años)	N	MEDIA + D.S. ($\mu\text{kat/T}$)	PERCENTILES (%)		
				5	50	95
T O T A L	< 19	31	3.82 + 1.24	2.22	3.35	6.29
	20-29	108	3.60 + 1.23	1.82	3.45	5.96
	30-39	78	3.86 + 1.15	2.21	3.79	5.26
	40-49	39	3.63 + 1.16	1.94	3.47	6.20
	> 50	14	3.27 + 1.07		3.37	
	GRUPO					
	TOTAL	270	3.69 + 1.19	1.98	3.50	5.95
P A N C R E A T I C A	< 19	31	1.41 + 0.70	0.39	1.40	2.11
	20-29	108	1.54 + 0.87	0.41	1.37	3.20
	30-39	78	1.83 + 0.98	0.41	1.71	3.40
	40-49	39	1.66 + 0.68	0.37	1.62	3.08
	> 50	14	1.36 + 0.53		1.41	
	GRUPO					
	TOTAL	270	1.62 + 0.86	0.45	1.50	3.26
S A L I V A L	< 19	31	2.47 + 1.37	0.63	2.00	4.67
	20-29	108	2.07 + 1.17	0.42	1.90	4.04
	30-39	78	2.02 + 0.99	0.34	1.94	3.69
	40-49	39	1.97 + 1.11	0.37	1.78	4.30
	> 50	14	1.91 + 0.80		2.07	
	GRUPO					
	TOTAL	270	2.08 + 1.13	0.46	1.91	4.09

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

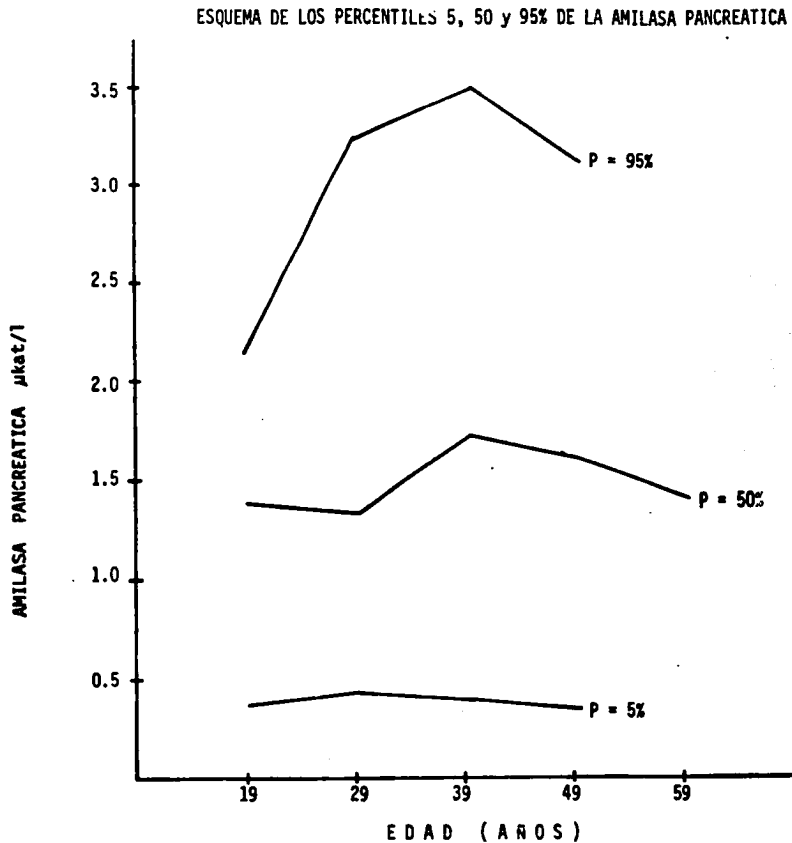


Figura 12.- Distribución gráfica de los percentiles de Amilasa Pancreática conforme a la edad del grupo total de 270 adultos sanos.

RELACION DE LA ISOAMILASA PANCREATICA Y SALIVAL

HIPERAMILASEMIA (n=49)

FRACCION SALIVAL

		↓	Normal	↑	
FRACCION PANCREATICA	↓	Normal	0	0	0
	Normal	0	5	8	
	↑	3	23	9	

HIPOAMILASEMIA (n=25)

FRACCION SALIVAL

		↓	Normal	↑	
FRACCION PANCREATICA	↓	Normal	0	7	0
	Normal	4	12	0	
	↑	0	0	0	

Figura 13.- Distribución de las fracciones de amilasa en suero con niveles anormales de amilasa total (ver figura 2).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

	ISOAMILASA PANCREATICA UI/l	ISOAMILASA SALIVAL UI/l
POBLACION ESTUDIADA Intervalo de Confianza 95%	91 - 103	117 - 133
PHARMACIA DIAGNOSTICS	84**	78**
TSIANOS y Cols.		
Ingleses	104 \pm 6*	97 \pm 7*
Asiáticos	160 \pm 25*	156 \pm 14*
Antillanos	138 \pm 30*	245 \pm 28*
(Lancet 1:856, 1982)		
ELLIS y Cols.	76 \pm 3*	120 \pm 6*
(DIG.DIS.SCI. 27:10, 1982)		

** Media

* Media y E.S.

Cuadro 5.- Intervalo de confianza de la Población estudiada, comparado con los valores presentados por otras poblaciones.

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

1.- El método usado para la determinación de la actividad de la amilasa posee un sustrato altamente específico a la acción enzimática, por lo que su afinidad para la amilasa resulta ser superior a la de los métodos informados previamente.

2.- El color producido una vez efectuada la reacción enzimática es estable durante 24 horas a temperatura ambiente, se encuentra libre de interferencias por hemoglobina, bilirrubina y azúcares. En caso de que el color resultante fuera muy concentrado, se puede diluir directamente con agua destilada, sin que exista la necesidad de repetir todo el análisis, ya que la curva de calibración que se proporciona en cada lote comercial es lineal (35 - 1000 U/1), además de que los resultados también se pueden calcular fácilmente a través de un factor de conversión (ver figura 4).

3.- El coeficiente de variación obtenido en nuestro medio para la determinación de amilasa total (2.31%) y sus isoenzimas (pancreática 8.6% y salival 14.7%) se encuentra dentro de los límites aceptables (19).

4.- Se observaron ligeras diferencias entre cada una de las décadas de la vida de la población estudiada tanto para amilasa total como para sus isoenzimas (cuadro 4). Sin embargo, sólo se encontró diferencia estadísticamente significativa al

al analizar la población global de hombres y mujeres en relación con la fracción pancreática, la cual se encontró en niveles más elevados en la cuarta década de la vida (figura 12).

5.- No se encontraron diferencias significativas con respecto al sexo, por lo que los valores de referencia podrían expresarse en forma conjunta para toda la muestra de la población estudiada (cuadro 4).

6.- Nuestra población estudiada para establecer los valores de referencia mostró niveles de amilasa total y sus fracciones, más altos que los recomendados por la casa comercial. Este aumento está dado predominantemente por la fracción salival (cuadro 4).

7.- Los sueros estudiados en los pacientes con alteración de los niveles de amilasa total mostraron principalmente variaciones en la actividad de amilasa pancreática como puede verse en la figura 13.

D I S C U S I O N

Con este nuevo método de determinación de amilasa, el laboratorio proporciona 4 resultados, el de la amilasa total, la fracción pancreática, la fracción no pancreática y la relación entre ambas isoenzimas, para ésto se emplea una cantidad mínima de suero de 400 microlitros y el tiempo requerido para el análisis es de 45 minutos aproximadamente, por lo que puede incluirse dentro del grupo de exámenes del laboratorio de rutina y de urgencia. Los resultados del estudio de precisión muestran un coeficiente de variación - aceptable tanto para intra e interlotes, tomando en cuenta que se está trabajando con enzimas para las cuales este suele ser más amplio (19). Para el caso particular de la amilasa total, el coeficiente de variación se ha logrado disminuir, ya que estudios previos (13) en este Instituto informan un coeficiente de variación del 5% y en la actualidad se encuentra en un 2.31%. La diferencia entre estos valores pudieran explicarse en base a que antes se utilizaba agua destilada como diluyente, misma que fué sustituida posteriormente por una solución amortiguadora de NaN_3 al 0.05% que se incluye en el equipo comercial (Ver pag. 19).

Nuestra población de sujetos sanos estudiada - (n = 270) no sigue una distribución normal o gaussiana como se muestra en el polígono de frecuencias de la figura 9, sino que tiende a desplazarse hacia valores elevados, por

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

lo que consideramos conveniente expresar los resultados en términos de mediana y diversos percentiles de interés clínico (5, 50 y 95%) ya que se incluye una muestra más representativa de la población sana. Este hallazgo ya había sido informado por nuestro laboratorio en relación a amilasa total en un estudio previo (13).

Tomando en cuenta un intervalo de confianza del 95% para nuestros resultados de isoenzimas y comparándolos con los valores informados por otros autores (cuadro 5) (21,23) vemos que nuestra población tiene: por un lado, niveles más elevados que los dados por la casa comercial, que los encontrados en una población de británicos estudiados por Tsianos (21) y en una muestra de sujetos norteamericanos estudiados por Ellis (23); y por otro lado, fueron menores que los informados por una población de asiáticos y antillanos (21).

Ha sido demostrado en estudios genéticos y bioquímicos que las isoamilasas se producen en dos loci diferentes, uno para la fracción no pancreática (AMY_1) y otro para la fracción pancreática (AMY_2), constituyendo de esta forma un sistema polimorfo único. Estos loci se encuentran localizados muy cerca a lo largo del brazo corto del cromosoma 1: los genes producidos codifican para cada alelo, los cuales se encuentran sujetos a modificaciones post-transcripciona-

les que dan como resultado la producción de múltiples isoenzimas (22).

Por otro lado hay que considerar que las diferencias en la composición de la dieta repercuten en forma importante en el contenido enzimático del páncreas, lo que podría determinar, al menos en parte, los diversos niveles de amilasa encontrados en las poblaciones mencionadas.

Hasta ahora los datos existentes no permiten identificar la importancia relativa que tiene cada uno de estos factores (dieta vs. carga genética) en el resultado final de la secreción pancreática (13,21). Es más, recientemente se ha informado que cambios drásticos en la composición básica de la dieta (carbohidratos, grasas y proteínas), modifican considerablemente la proporción del ARNm de las células exócrinas del páncreas a nivel de la transcripción genética. La causa primordial parece ser la adaptación dependiente del sustrato en la proporción de enzimas pancreáticas presentes en la secreción del páncreas (24).

Todo lo antes mencionado apoya la necesidad de establecer valores de referencia no sólo de acuerdo al método de laboratorio que se emplee, ya que todas estas determinaciones fueron realizadas utilizando el mismo método cromogénico de Phadebas, sino también de acuerdo a cada subpoblación étnica.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

(48)

La importancia práctica de establecer valores de referencia propios se aprecia mejor considerando que si se utiliza el límite superior proporcionado por la casa comercial, el 8% de los sujetos mexicanos adultos normales de todas las edades, serían catalogados falsamente como anormales y por tanto sometidos a otros estudios para establecer la causa de la lesión pancreática. Por otro lado, de acuerdo con la literatura extranjera, el 11% de nuestra población rebasa el límite superior para la amilasa total, el 13% para la amilasa pancreática y el 25% para la amilasa salival (20).

En nuestra población adulta mexicana tenemos que la fracción predominante es la no pancreática o salival (56%) mientras que la fracción pancreática se encuentra en un 44%, esto podría explicarse debido a que las fracciones no pancreáticas se producen en múltiples órganos, mientras que la pancreática se origina sólo en el páncreas, de ahí que se considere como un parámetro específico de enfermedad de este órgano. Esta relación entre las fracciones pancreática y salival es la habitualmente encontrada en individuos sanos, aunque los límites de valores observados pueden ser amplios (23).

Otro hallazgo interesante de este estudio fué la distribución de los valores de la fracción pancreática con

respecto a la edad, vemos como nuestros sujetos estudiados que se encontraban entre 30-39 años tuvieron niveles para la fracción pancreática superiores a los encontrados en los otros grupos. Este pico en la cuarta década de la vida resultó ser estadísticamente significativo, de hecho el 7.7% de los sujetos que se encontraban en esta década presentan valores superiores al promedio señalado para el grupo total (cuadro 4).

En el estudio actual logramos identificar que es a expensas de la isoamilasa pancreática la elevación informada antes para amilasa total (13) y que no ha sido encontrada en otra serie de estudios en adultos. Existe un trabajo previo en donde por un método de isoelectroenfoque se encontró una variación de las isoamilasas dependiente de la edad en adultos, con descenso de la fracción pancreática en la cuarta década de la vida (25).

En otro estudio, Skude en 1975 (26) informó sobre el incremento progresivo de las amilasas salival y pancreática en la infancia, considerando que la primera alcanza el nivel "adulto" a los 5 años y la segunda entre los 10 y los 20 años de edad. Desafortunadamente, su grupo de adultos fué poco numeroso y disperso por lo que no pudo apreciar más variaciones.

El contar con un método de laboratorio altamente

**ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA**

específico para la determinación de la amilasa y sus isoamilasas, nos permite identificar claramente el origen de una hiperamilasemia (16); el determinar las isoamilasas puede indicar si la elevación es por la fracción pancreática como ocurre en pancreatitis aguda o pseudoquistes del páncreas (28,29) o si bien esta elevación es debida a las fracciones no pancreáticas, por ejemplo: parotiditis o politraumatizados (30,31). Desde el punto de vista clínico esta prueba ha sido de gran utilidad para el diagnóstico temprano de muchos pacientes, permitiendo un tratamiento oportuno y evitando que se sometieran a estudios más complicados y costosos.

Por otro lado, la determinación de amilasa total no permitía identificar aquellos pacientes que teniendo una amilasa total normal, la fracción pancreática se encontraba disminuida, como es el caso de los pacientes que cursan con pancreatitis crónica, en quienes la determinación de amilasa pancreática tiene alta sensibilidad (27).

En nuestro grupo de pacientes se observó alteración principalmente a expensas de la amilasa pancreática, lo que refleja las características de la población atendida en el Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán, es decir adultos con problemas gastrointestinales, en este caso particular enfermos con pancreatitis aguda y crónica.

R E S U M E N

La determinación de la actividad de la alfa-amilasa total ha sido desde hace mucho tiempo un examen usado en el laboratorio de rutina para detectar daño pancreático; sin embargo, este método no permite distinguir claramente el origen de la hiper o hipoamilasemia. En la actualidad contamos con un equipo comercial (Phadebas Isoamylase Test) el cual está constituido por un sustrato cromogénico altamente específico a la acción enzimática, un inhibidor que va a actuar directamente sobre las fracciones salivales, y de esta forma el laboratorio proporciona 4 resultados: el de la amilasa total, la fracción pancreática, la fracción salival y la relación entre ambas isoamilasas. Se puede realizar en cualquier laboratorio de rutina, a un costo aceptable, requiere de tan sólo 400 microliros de suero, y se lleva a cabo en 45 minutos aproximadamente.

Un aspecto importante a considerar es la obtención de valores de referencia no sólo en cuanto al método de laboratorio, sino también a cada subpoblación étnica. Ya que en base a nuestros resultados, tenemos valores más altos que los informados en poblaciones de anglosajones y norteamericanos, pero más bajos que en estudios realizados en asiáticos y antillanos.

De los pacientes que presentaron una amilasa total anormal, el determinar sus isoamilasas nos permitió establecer de una forma fácil y precisa el tipo de enfermedad pancreática a la que corresponden.

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

- 1.- Foster, M Jr.: Notes on amylolytic ferment. J. Anat. Physiol I: 107, 1866-67.
- 2.- Stocks, P.: The quantitative determination of amylase in blood, serum and urine as an aid to diagnosis. Q.J. Med., 9: 216, 1916.
- 3.- Elman, R., Arnenson, N. and Graham, E.A.: Value of blood-amylase estimations in the diagnosis of pancreatic disease: A clinical study. Arch. Surg., 19: 943, 1929.
- 4.- Worthington Enzyme Manual. Editor - Lillian A. Decker. Worthington Biochemical Co. 1977, pages. 173-179.
- 5.- Davidson, I. and Henry J.B.: Todd-Snaford, Clinical Diagnosis by Laboratory Methods. W.B. Saunders Co., Philadelphia, 1974, pages. 877-881.
- 6.- Somogyi, M.: Diastatic activity of human blood. Arch. Intern. Med., 67: 665, 1941.
- 7.- Searey, R.L., Hayashi, S. and Berk, J.E.: A new microsaccharogenic method of serum amylase determination. Am. J. Clin. Pathol., 46: 582, 1966.
- 8.- Berk, J. E.: Serum amylase and lipase: Newer perspectives. A.M.A., 199:98, 1967.
- 9.- Mc Geeney K.F.: Isoamylase S-type amylase P-type amylase, Phadedoc 9, 1979. Diagnostic Communications, Pharmacia Diagnostics AB, Uppsala Sweden.
- 10.- Henry, R.J. and Chiamori, N.: Study of saccharogenic method for determination of serum and urine amylase. Clin. Chem., 6:434, 1960.
- 11.- Somogyi, M.: Micromethods for estimation of diastase. J. Biol. Chem., 125: 399, 1938.
- 12.- Willian B. Salt II, M.D., and Steven Schenker, M.D.: Amylase - Its Clinical Significance: A review of the literature. Medicine, Vol. 55 No. 4, 1976.
- 13.- Galván, E., Ponce de León, S., Loria, A., Robles-Díaz, G. Valores de referencia para amilasa en una muestra de la población mexicana. Variaciones de acuerdo a la edad. Rev. Invest. Clin. (Mex.), 36:109-114, 1984.
- 14.- Berk, J.E. MD., Simon, D., Fridhandler, L.: Inhibitor-test for amylase isoenzymes - Comparison with simplified Chromatographic method. A.J. Gastroenterology 75 128-131, 1981.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

- 15.- Berk, J.E.: Clinical application of Isoamylase Analysis. *Clinical Biochemistry* 12:264-266, 1979.
- 16.- Koehler, D.F., Eckfeldt, H., and Levitt, MD.: Diagnostic value of routine Isoamylase assay of hyperamylasemic serum. *Gastroenterology* 1982: 82: 887-90.
- 17.- Herrera L: The precision of percentiles in establishing normal limits in medicine. *J. Lab.Clin. Med.*, 52: 34, 1958.
- 18.- Siegel S: *Estadística no paramétrica*. México. Ed. Trillas 1975, pág. 143.
- 19.- Frei, J.: Quality Control in Clinical Enzymology. *Clinical Chemistry Central Laboratory, Centre Hospitalier Universitaire Vaudois, Ch-1011 Lausanne, Switzerland*.
- 20.- Magid, E., Frost-Larsen, K., Isager, H., Manthorpe, R. and Prause, J.U.: Serum Isoamylases in Sjögren's Syndrome. Concentration Levels and Intra-Individual Variation. *Scand.J.Rheumatology* 12:129-132, 1983.
- 21.- Tsianos, E.B., Jalali, M.T., Gowenlock, A.H. and Braganza, J.M.: Ethnic hyperamylasemia: clarification by isoamylase analysis. *Clin. Chem. Acta.* 124: 13-21, 1982.
- 22.- Merritt, A.D., Rivas, M.I., Ward, J.C.: Human amylase-loci: evidence for close linkage. *Nature* 1972, 239: 243-244.
- 23.- Ellis, C., Koehler, D.F., Eckfeldt, J.H. MD., Levitt, Ph.D. and M.D. MD.: Evaluation of an Inhibitor Assay to Determine serum Isoamylase Distribution. *Digestive and Diseases and Sciences*, 27(10), 1982.
- 24.- XV Meeting of the European Pancreatic Club(Abstrac).
- 25.- Bossyt, P.J., Van de Bogaert, R., Scharpé, S.L., and Van Maerche, Y.: Relation of Age to Isoenzyme Pattern and Total Activity of Amylase in Serum. *Clin. Chem.* 27:3: 451-454, 1982.
- 26.- Skude, G.: Sources of the serum Isoamylases and their normal range of variation with age. *Scand.J.Gastroenterol*, 10:577, 1975.
- 27.- Gil, S., Ramírez, J.C., Chávez, M., Sierra, O.: Dilatado de Fluoresceína, sumamente fácil, moderadamente útil en la evaluación de la función exócrina de páncreas. *Rev. Gastroent. Mex.* 49:323, 1984.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

- 28.- Uscanga, L., Rosado, L.J., Robles-Díaz, G., Campuzano, M.: Diagnóstico y tratamiento de Pseudoquistes Pancreático. Rev. Investi. Clin. (Mex.) 35:15-20, 1983.
- 29.- Kolars, J.C., Ellis, C.J. and Levitt, M.D.: Comparison of serum Amylase Pancreatic Isoamylase and Lipase in Patients with Hyperamylasemia. Digestive Diseases and Sciences 29:4: 289-293, 1984.
- 30.- Greenlee, T. MD., Murphy, K. B.S., Ram, M.D. MD., Ph.D. Amylase Isoenzymes in the Evaluation of Trauma patients. The American Surgeon 50: 637-640, 1984.
- 31.- Goynes, W.B., DDS, and Alexander J.M. DDS., Va, R.: Use of fractionated amylase to distinguish between pancreatic and parotid injury: report of cases. J.Oral.Surgery 38:522-524, 1980.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN