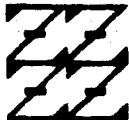


U N A M  
F E S  
Z A R A G O Z A



LO HONRABLE C. J.  
DE JUSTICIA EXP. 110/88

35  
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
"ZARAGOZA"

" VALORES DE REFERENCIA EN ADULTOS  
HOMBRES Y MUJERES DE 20 A 50 AÑOS, PARA  
ISOENZIMAS DE CPK Y LDH POR EL METODO  
DE ELECTROFORESIS "

T E S I S

PARA OBTENER EL TITULO DE:  
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO  
P R E S E N T A :  
NATALIA HERNANDEZ MENDEZ

ASESOR: MARTHA SANCHEZ R,  
JUANA VELAZQUEZ O.



MEXICO, D. F.

1995

FALLA DE ORIGEN



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.

Es bueno darte gracias, oh Señor,  
y cantarle, oh Altísimo, a tu nombre,  
anunciando tu amor por la mañana  
y tu fidelidad toda la noche,  
con arpa de diez cuerdas y guitarras  
y con liras que suenan suavemente.

Fues me alegras, Señor, con tus acciones  
y me gozo en las obras de tus manos"

Cuán grandes con tus obras, oh Señor,  
y cuán profundos son tus pensamientos!

Se agradece de manera especial a Laboratorios Beckman S.A. por el apoyo de reactivos que hizo posible la realización de la tesis.

Un reconocimiento al Dr. Ramón Verduzco Jimenez y a la Q.F.B. Guadalupe Ramírez N., así como a todas las personas del laboratorio central del Hospital de Especialidades Centro Médico la Raza por su apoyo otorgado.

## **I N D I C E**

- 1. Resumen**
- 2. Introducción**
- 3. Marco teórico**
- 4. Problema**
- 5. Hipotesis**
- 6. Objetivo**
- 7. Material y método**
- 8. Resultados**
- 9. Discusión de resultados**
- 10. Conclusiones**
- 11. Anexos**
- 12. Referencias**

## R E S U M E N

Existen en la literatura médica múltiples estudios que ofrecen valores de referencia para diferentes poblaciones; así mismo, todos los tratados de laboratorio suelen incluir un anexo con los valores de referencia de las determinaciones que indica, y también los fabricantes de reactivos para las determinaciones analíticas suelen incluir en la descripción de la técnica el rango de referencia en condiciones basales para el método en cuestión. Con toda esa información un laboratorio puede disponer de unos valores de referencia que ofrecer al médico clínico cuando éste solicite aclaraciones, aunque hay, discrepancias en cuanto a los valores por tratarse de poblaciones diferentes.

Por ello es deseable que cada laboratorio elabore sus propios valores de referencia para sus condiciones de trabajo y su población. (10,27,29,33)

Por esta razón se estudió un grupo de 100 individuos del D.F. de edades entre 20 y 50 años de ambos sexos. Se les midió el porcentaje de la actividad enzimática, de CK (CK-MM, CK-MB, CK-BB) y LDH (LDH1, LDH2, LDH3, LDH4, LDH5), utilizando el método electroforético que es un método de referencia, y un grupo de 44 individuos como control que cursaban con infarto al miocardio para determinar si en el corrimiento electroforético se observa la diferencia entre una población aparentemente sana y una población con infarto. Los resultados nos indican que ambos grupos son electroforética y

estadísticamente diferentes, aplicando la t de Student.

También fue posible observar que no existe diferencia significativa, entre sexos.

Al estudiar la distribución de los valores de las diversas isoenzimas se encuentra que prácticamente son de tipo gaussiano y solo en el caso de la CK-MB es de una sola cola.

Se considera de importancia clínica los resultados, porque es preferible utilizar los valores que obtenemos, que los de una población extranjera. (12,22,37)

Dichos valores son para las isoenzimas de CK: CK-BB 0 %, CK-MB 0-4.3 % CK-MM 95.7- 100 %, para las isoenzimas LDH: LDH1 19-32 %, LDH2 36-47 %, LDH3 14-25 %, LDH4 3.8-9.4 %, LDH5 2.0-11.0 %.

## **I N T R O D U C C I O N :**

Dentro del vasto grupo de pruebas de laboratorio que son de apoyo al diagnóstico médico se destaca la medición de la actividad enzimática, siendo más específica la determinación de las isoenzimas ya que son organoespecíficas.

Unas de las enzimas más utilizadas para ver funcionalidad orgánica son la CK y la LDH, cuyas isoenzimas son ampliamente empleadas para el diagnóstico diferencial y el seguimiento de diversos padecimientos principalmente el Infarto al Miocardio.

Para llegar al diagnóstico diferencial de un padecimiento inicialmente debe obtenerse un intervalo denominado de referencia para delimitar el rango de los parámetros bioquímicos en un grupo de sujetos "sanos".

Según la teoría de los Valores de Referencia de la Federación Internacional de Química Clínica (FIQC), es necesario tener éstos para cada población específica, y el método químico con que se evalúan. Como carecemos de Valores de Referencia de las isoenzimas de CK y LDH para la población mexicana, en este estudio se pretende obtener dichos valores para población aparentemente sana del D.F., con todas sus limitaciones del laboratorio que los va a establecer.



## M A R C O T E O R I C O VALORES DE REFERENCIA.

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) se define como salud. "Un estado de completo bienestar físico, mental y social y no meramente la ausencia de enfermedad o dolencia". Aunque es una definición difícil de limitar por ser conceptualmente diferente en distintos países, y aún en un mismo país a distintas épocas, y en el mismo individuo a diferentes edades. Por eso se dice que es un estado relativo y no absoluto (9). Los componentes de los organismos humanos están sujetos a variaciones causadas por procesos fisiológicos diferencias genéticas, enfermedades y factores ambientales. Una interpretación racional de los resultados del laboratorio exige el conocimiento de la variación de estos componentes en el individuo en estudio, o en uno o mas conjuntos de individuos de referencia adecuadamente definidos. Por lo tanto, una tarea importante para Químicos Clínicos es la de proporcionar conjuntos relevantes de Valores de referencia confiables. (11,12,18,20)

Para eso hay que tener claro la diferencia entre salud y enfermedad. Los datos para tratar de separar poblaciones, es decir, para diferenciar entre las personas que tienen la enfermedad y el resto de la población existen tres planteamientos básicos:

Que las personas que padecen la enfermedad tengan un rango de valores distinto al de aquellos que no lo padecen (fig. 1)

Que las personas que padecen la enfermedad tengan un rango de valores que coincide en un margen pequeño con los de aquellas que no la padecen (fig. 2).(36)

Que los valores se superpongan para gran parte de la población (fig. 3).(36)

El primer caso es excepcional, siendo habitual que las determinaciones analíticas brinden resultados de los otros dos tipos descritos.(36)

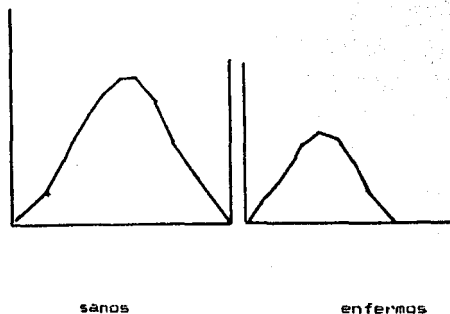


Fig. 1. Donde las personas sanas tienen un rango diferente de las personas enfermas. Santiago Prieto, 1993.

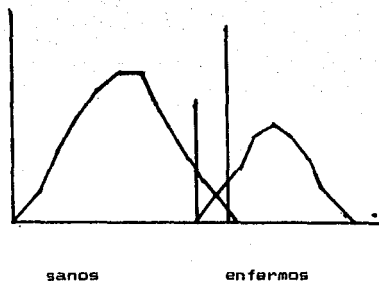


Fig. 2. Donde el rango de las personas sanas coinciden en un margen pequeño con el rango de las personas enfermas. Santiago Prieto, 1993.

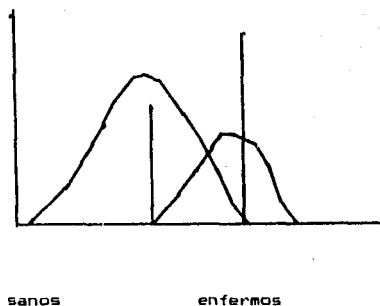


Fig. 3. Donde el rango de las personas enfermas se superponen al rango de las personas sanas. Santiago Prieto, 1993.

Por tal razón hay que tener presente que relación existe entre:

### **NORMALIDAD, VALOR DE REFERENCIA, Y ENFERMEDAD.**

Las determinaciones de laboratorio se usan, como hemos visto para ayudar al diagnóstico de las enfermedades. Pero la identificación de valor de referencia como valor normal es incorrecta, porque el enfoque "Normal" se define de acuerdo con un estado de salud ideal (actual o futuro) en el ser humano, y los valores de Referencia normalmente se definen de forma que queden incluidos en él los valores que presenta el 95 por 100 de la población aparentemente sana definiéndose para ello el tamaño de muestra, la población que va a estudiarse, las condiciones y el método. (10,14,36)

Como primer paso tenemos que definir que es lo que queremos estudiar y cual será la finalidad del mismo, una vez que tenemos planteado nuestro problema, se define el tamaño de muestra. (10,14,36,37)

### **TAMAÑO DE LA MUESTRA:**

El cálculo del tamaño de la muestra constituye una parte fundamental porque va a influir en la precisión del cálculo, es obvio que cuanto más amplia sea la muestra, más representativo será el resultado con respecto a la población. Existen técnicas para definir el tamaño de muestra en función del error que podamos permitirnos. Para la mayoría de los casos, una muestra de 40 observaciones suele ser

suficientemente representativa. (15,28,36)

Si queremos valorar diferencias por sexo, edad, etc, hay que trabajar con muestras mayores de 200 a 300 individuos.

Una vez que se tiene el tamaño de muestra para los valores de Referencia se selecciona los individuos.

#### SELECCIÓN DE INDIVIDUOS DE REFERENCIA.

La selección de individuos para la producción de valores de referencia puede ser de dos tipos (fig. 4):

- Selección a posteriori (retrospectiva) de individuos de una gran muestra de población obtenida al azar o no al azar, seguida por el agrupamiento y exclusión de acuerdo a las características de la muestra de referencia. (12)

- Selección a priori (prospectiva) de una población general usando criterios de exclusión y partición establecidos, determinados por estudios previos sobre la misma población, u obtenidos de la literatura. (12)

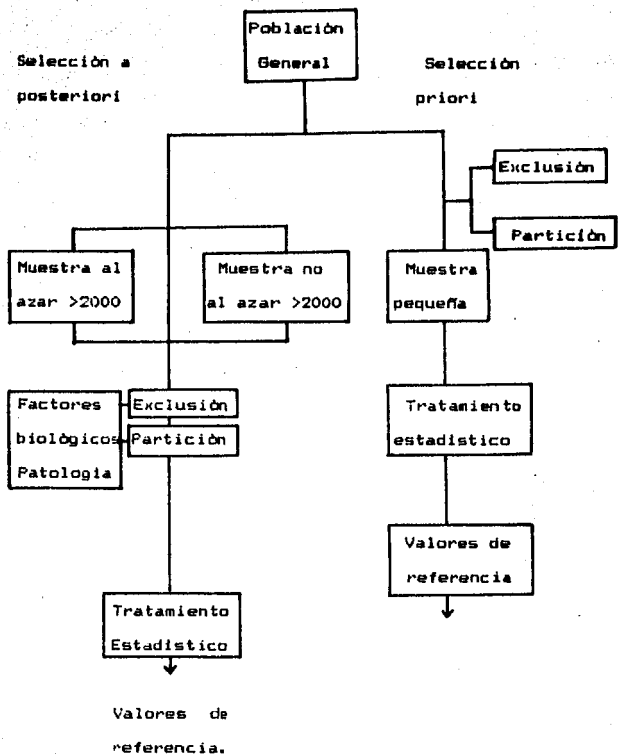


Fig. 4. Los dos tipos de selección de individuos de referencia: Selección a posteriori y a priori. Federación Internacional de Química Clínica (IFCC), 1987.

Una vez que se ha establecido que tipo de selección se usará se aplican los siguientes criterios:

#### **C R I T E R I O S   D E   E X C L U S I O N :**

Dependiendo del uso que se hará de los valores de referencia se determinará el criterio de exclusión a ser aplicado. Por ejemplo, los estudios epidemiológicos y los programas de medicina preventiva requieren valores de referencia de individuos sanos, así es que necesita la exclusión de individuos que padezcan de enfermedad. Por eso dependiendo del uso pretendido para los valores de referencia y del tipo de magnitud medida, deben ser aplicados algunos o todos de los siguientes criterios de exclusión. (12,13,33)

1. Estados fisiopatológicos. Los individuos que padecen enfermedades sistémicas y desordenes fisiopatológicos como falla renal, enfermedad cardiaca congestiva, enfermedades respiratorias etc.
2. Ingestión de agentes activos farmacológicamente. Deben ser excluidos los individuos que reciban agentes para tratamiento de enfermedades, así como terapia de suplementación o sustitución, o abuso de drogas. (12,13,36)
3. Estados fisiológicos modificados. Los individuos deben ser excluidos si pertenecen a cualquiera de las categorías siguientes: (12,13)
  - Embarazos
  - Ejercicio o actividad física
  - Desordenes mentales y psicológicos

- Ingestión de alimentos previa a la obtención de la sangre.
- Otros factores. La obesidad, la hipertensión etc.

#### **CRITERIOS DE PARTICION :**

La necesidad de particionar los grupos de referencia puede diferir con las cantidades medidas y con los usos pretendidos para los valores de referencia, y los podemos clasificar por: (13,37)

- Edad y sexo
- Criterios genéticos, socioeconómico y ambiental.
- Criterios biológicos.

#### **OBTENCION DE LA MUESTRA :**

Durante la obtención de la muestra, las interferencias pueden ser introducidas por:

- Las técnicas de obtención de la sangre: torniquete, vacío, etc.
- Equipamiento: aguja, recipientes, etc.
- Orden en el llenado de tubos.
- Manipuleo de la muestra. etc.

La preparación de los individuos, y la obtención y posterior manipuleo de los especímenes en la producción de los valores de referencia y en la de los valores observados clínicamente deberían ser los más idénticos posibles. (13,36,37)

#### **METODO ANALITICO :**

Se deben definir los métodos analíticos y la instrumentación



y usar el mismo método para el individuo de referencia y para el paciente. Es obvio que cuando se cambia el método, la preparación de reactivos, la casa fabricante del juego de reactivos, o la instrumentación, es necesario confirmar o restablecer los valores de referencia. Con frecuencia una misma institución o laboratorio tiene más de un método o instrumento para medir el mismo analito. Si no se pueden ajustar los diferentes métodos para obtener resultados comparables de una misma muestra, entonces es necesario establecer valores de referencia separados. (12,36,37)

#### **ANÁLISIS DE LOS DATOS DE REFERENCIA:**

La validez de cualquier intervalo de referencia depende de la adecuada selección de individuos, la recolección de las muestras bajo condiciones definidas, y el control, así como también la evaluación de la variación analítica en la producción de valores de referencia. Además tener definido que método estadístico se va a utilizar, para lograr obtener los valores de referencia lo podemos hacer através de los siguientes puntos:

1. Recopilar los valores de referencia
2. Distribuir los valores de referencia en subclases
3. Preparar histograma de los valores de referencia
4. Identificar posibles errores en los datos. Corregir, o eliminar datos erróneos
5. Seleccionar el método de estimación y determinar los

intervalos de referencia.

Para estimar los límites de referencia uno puede escoger el método intuitivo, el paramétrico y el no paramétrico. El método intuitivo, se usa cuando la muestra es pequeña. No hay reglas generales para su uso y se emplea cuando el número de individuos no es lo suficientemente grande para satisfacer los criterios de partición y exclusión. Se recomienda usar el sentido común, y seguir recogiendo valores de referencia hasta que se puedan calcular en una más científica. Otra posibilidad en el caso de muestras pequeñas, es no definir límites sino usar todo el rango obtenido.

El método paramétrico es más complicado que el no paramétrico y puede requerir numerosos cálculos. El método paramétrico incluye la prueba de distribución de datos, la posible transformación de los datos y volver a examinar que tipo de distribución y la estimación de fractiles usando estadística paramétrica. Cuando los datos se ajustan a la distribución Gaussiana, se calculan la media ( $\bar{X}$ ) y la desviación estándar ( $s$ ) para los fractiles 0.025 y 0.975 los respectivos Intervalos de referencia son  $\bar{X} - 1.96s$  y  $\bar{X} + 1.96s$ . (15,36)

El método no paramétrico se recomienda para uso general, debido que es muy simple. Consiste esencialmente en eliminar un determinado porcentaje de los valores en cada extremo de la distribución de referencia.

Es práctico, y permite estimar intervalos por fractiles para 0.025:  $0.025 (N+1)$  y para 0.975:  $0.975 (N+1)$ . Con este

método se recomienda usar una muestra de por lo menos 120 valores. (10,13,18,37)

Los Valores de Referencia pueden ser usados para evaluar el estado de salud de individuos y poblaciones, para identificar gente con riesgo de una enfermedad, para apoyar en las decisiones en medicina clínica o con otros propósitos científicos. Debe comprenderse que en la selección de los individuos de referencia el criterio de salud está dictado por el objetivo de la investigación del laboratorio.

Además, la utilidad que pueden tener los exámenes de laboratorio clínico depende de su confiabilidad y de que se cuente con Valores de Referencia adecuados a la población a estudiar. (25,36,37)

Como no es válido comparar los resultados obtenidos de un paciente mexicano con los valores reportados por poblaciones americanas. Se hace necesario tener nuestros propios valores de referencia. (9,15,27,33,34)

Pero esto no es todo, además debemos conocer de quién estamos obteniendo los valores de referencia, por lo que es básico conocer los principios de las enzimas e isoenzimas así como los elementos que van a participar en las reacciones, transformaciones de las mismas, y cuál va a ser su papel en el metabolismo del miocardio.

Por tal razón lo mencionaremos brevemente.

## ENZIMAS:

Las enzimas son proteínas o sea sustancias orgánicas producidas por la célula viva. La vida va unida a complejas transformaciones materiales que están energéticamente unas con otras y que transcurren a temperatura constante por la acción de las enzimas, que pueden designarse como catalizadores biológicos. La mayoría de ellas catalizan específicamente una reacción química determinada en donde transforman una molécula denominada sustrato. La mayoría de las enzimas pueden definirse además como "catalizadores químicos" que aceleran la reacción en ambos sentidos, transforman un sustrato en otro compuesto denominado producto (fig. 5). (22,23,28,30)

Se conocen hasta hoy unas 2000 enzimas, de las que mas de 100 se han podido cristalizar y purificar. Los pesos moleculares oscilan entre 12,700 y 1.000.000 daltons. (22,23,28)

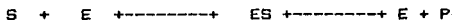


Fig. 5. Reacción General. Merck. 1989.

## ESTRUCTURA:

En los últimos años ha sido posible aclarar en muchos casos la composición y la estructura de las enzimas. Muchas de estas contienen un grupo prostético, que no es de naturaleza protéica. La parte protéica de las enzimas constituye, como

otras proteínas, un compuesto polimero con estructura polipeptídica. La cadena polipeptídica, a su vez se compone de aminoácidos unidos entre si a través de enlaces peptídicos en los restos de aminoácidos están alineados a los lados (fig. 6).

Cuando una enzima contiene un porción no protéico se disocian según la ecuación siguiente:



La coenzima son sustancias no protéicas asociadas con una enzima requerida para la actividad catalitica. La coenzima se denomina también grupo prostético de la enzima. las de mayor utilidad en química clinica son el NADH y NADPH, (22,23,36)

#### **CLASIFICACIONES:**

Al ver las enzimas protéicas pueden clasificarse por su estructura como:

##### **Estructura primaria:**

Este término indica que se conoce el número y la secuencia precisa de los aminoácidos en la proteína, conforma una cadena lineal de solo enlaces peptídica mencionada anteriormente (Fig. 6.) (8)

##### **Estructura secundaria:**

Se refiere a la extensión en que un polipéptido o cadena protéica es una estructura helicoidal. Una espiral diestra, se estabiliza mediante la presencia de enlaces peptídicos. Ello determina una secuencia regular a través de la cadena.

(Fig. 7). (B)

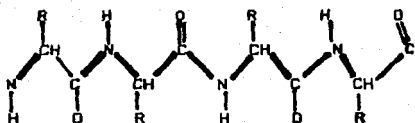


Fig. 6. Fórmula general de una cadena polipeptídica en la que se muestra la unión entre residuos de aminoácidos adyacentes mediante enlaces peptídicos. Conn y Stumpf, 1977.

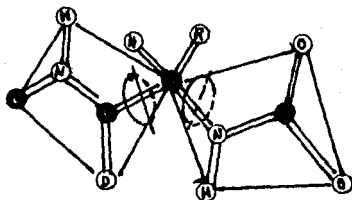


Fig. 7. Representación de una cadena polipeptídica con una configuración helicoidal. John Wiley y Sons, 1959.

### *estructuras terciarias*

Alude a la tendencia de una cadena polipeptida a sufrir dobleces o enrollamientos extensos y producir una estructura compleja y algo rigida. La estabilización de tal estructura se atribuye a las diferentes reactividades asociadas a los grupos R de los residuos de aminoácidos. Además el termino "conformación" define la participación de las estructuras secundaria y terciaria de las cadenas polipeptidas en la modelación de la estructura final (Fig. 8). (8)

### *Estructuras cuaternarias*

Esta define el grado de asociación de una unidad protéica. son subunidades que se unen para formar un dímero, y forma estructura cuaternaria homogénea si son subunidades idénticas y estructura cuaternaria heterogéneas si son subunidades diferentes (fig. 9).

La mayoría de las enzimas tienen estructuras secundarias y terciarias que ocasionan cierto plegado y enrollado de ella.  
(12,22,24)

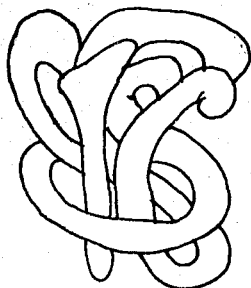


Fig. 7. Representación de una cadena polipeptídica con una configuración helicoidal. John Wiley y Sons, 1959.

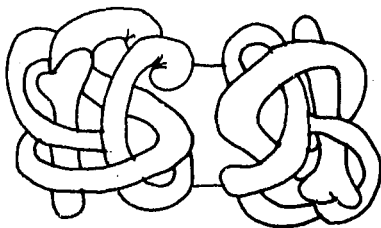


Fig. 8. Dimer de unidades protéicas que ilustra la estructura cuaternaria. Conn y Stumpf, 1977.



También se clasifican por su acción catalítica dividiéndola en 6 clases:

1. Oxidorreductasas
2. Transferasas
3. Hidrolasas
4. Liasas
5. Isomerasas
6. Ligasas.

(24)

#### **DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD CATALITICA:**

La determinación de la actividad enzimática puede realizarse por medio de la medición de la velocidad de transformación del correspondiente sustrato. Esto puede hacerse:

- a). Midiendo la disminución de la concentración de sustrato
- b). Midiendo el incremento de la concentración del producto de reacción.

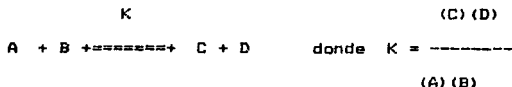
Puede observarse por medio de reacciones de punto final, o sea midiendo el sustrato o el producto hasta que termina la fase lineal o cinética, enzimática, o por medio de reacciones acopladas, en las cuales, se "acoplan" de 2 a 3 reacciones seguidas de la original para medir espectrofotométricamente un producto que no interviene directamente, como puede ser una coenzima. Esto se hace para reacciones cuyos sustratos y productos no pueden medirse espectrofotométricamente. Existe un número de sistemas enzimáticos que involucran la conversión

de NAD<sup>+</sup> (coenzima 1) en forma oxidada a la reducida (NADH), ya que esta última produce una absorción mayor a 340 nm que la forma oxidada por esta razón se usa frecuentemente. La actividad enzimática ha sido históricamente descrita en las unidades de medición empleadas por los autores que desarrollaron el método.

En 1901 la comisión de Enzimas (CE) recomendó la adopción de una Unidad Internacional de Actividad Enzimática. Esta unidad (U) se definió como la "la cantidad de enzima que convierte un umol de sustrato por minuto en condiciones estándar". 1 U = 1 umol/min. Actualmente el Sistema Internacional de unidades (SI) adoptado originalmente por la Organización Mundial de la Salud (OMS) estableció el Katal (k) como unidad de actividad enzimática se define como "1mol/seg de sustrato transformado". (22,23)

#### EQUILIBRIO DE LA REACCIÓN:

La reacción esta sometida a la ley de acción de masas con la ecuación general:



La constante de equilibrio K caracteriza toda reacción química. Las reacciones en las que el equilibrio está predominantemente desplazado al lado izquierdo tienen una constante K muy pequeña y viceversa. Si el equilibrio esta por completo del lado derecho, es decir, de lado de los

productos de reacción C y D las reacciones transcurren en forma cuantitativa. (11,19,20)

### **CINETICA DE REACCION ENZIMATICA**

El principio de reacción enzimática ha sido ya descrita a partir del sustrato y la enzima se forma un producto intermedio (o cuerpo intermedio) llamado complejo enzima-sustrato, de esta combinación se libera el producto de la enzima. La formación y destrucción del complejo enzima-sustrato se caracteriza por la ecuación mencionada anteriormente (Fig. 1.). (19,22,27)

Las pruebas experimentales de esta teoría son fundamentalmente las investigaciones cinéticas. Si las condiciones de reacción por ejem. pH, temperatura, cofactores, y la concentración de enzimas permanecen constantes la velocidad de reacción aumenta hasta cierto grado con concentraciones crecientes de sustrato. (19,22)

### **FACTORES QUE AFECTAN LAS DETERMINACIONES ENZIMATICAS:**

**pH.**

El cambio de pH afecta en gran medida la velocidad de la reacción enzimática. Para la mayoría de las enzimas existe un intervalo definido de pH en el cual la enzima es más activa. El pH cercano al centro de dicho intervalo es el habitualmente especificado para la determinación de enzima en

particular. A valores de pH inferiores o superiores al óptimo se observa una disminución de la actividad enzimática. (22,25)

#### **TEMPERATURA:**

Las temperaturas elevadas como en todas las reacciones químicas conducen a altas velocidades de reacción. En las reacciones enzimáticas la actividad de la enzima se pierde con mucha rapidez a partir de una temperatura determinada, es decir, la reacción se detiene, la proteína enzimática se desnaturaliza por lo tanto se inactiva. La temperatura crítica es característica para cada enzima y oscila generalmente entre 50 y 60 °C. Por lo tanto, la velocidad máxima de reacción es por debajo de la temperatura crítica de la enzima. (22,27)

#### **AMORTIGUADOR:**

Al realizarse la reacción enzimática, los productos tienden a alterar el pH. La mayoría de los ensayos incluye un amortiguador para mantener el pH dentro del intervalo óptimo. El amortiguador elegido debe tener un pKa de  $\pm 1$  unidad de pH respecto del pH óptimo de la enzima a fin de ejercer un control efectivo del pH de la reacción. (22,27)

#### **COENZIMAS:**

La coenzima representa en estos casos el centro activo de la enzima o parte del mismo, por lo que participa directamente en

la catálisis enzimática. Puede estar ligada a la enzima con mayor o menor fijeza. En caso de que exista un enlace fijo con la proteína enzimática, la coenzima se denomina también grupo prostético. Las "coenzimas" no son auténticos catalizadores se modifican en la reacción y transforman en ella junto con el sustrato de forma estequiométrica. Las coenzimas más frecuentemente utilizadas en química clínica son NAD y NADP. (21,24,25)

#### ACTIVADORES E INHIBIDORES :

Muchas enzimas requieren iones específicos para su máxima actividad. Todas las enzimas que transfieren fosfato, como la hexoquinasa, requieren iones magnesio (Mg). Otros iones metálicos que actúan comúnmente como activadores son el manganeso, calcio, zinc, hierro, potasio.

Los inhibidores son sustancias que reducen la actividad catalítica de una enzima. (22,27)

#### CONSERVACION DE LAS MUESTRAS:

Las muestras de suero para análisis enzimático pueden conservarse algún tiempo a temperatura ambiente o en refrigeración pudiéndose aceptar una escasa pérdida de actividad. ó también reactivarlas como es el caso de la CK. por lo tanto, hay enzimas que se mantienen con poca alteración o sin ella y otras que se deterioran rápidamente. Como por ejemplo en el cuadro 1 se expone la velocidad de envejecimiento de las enzimas CK y LDH para

evitar alteraciones se recomienda realizar la determinación el día de la toma de muestra (16,22,27,33,).

```

^-----^
^  ENZIMAS                T I E M P O                ^
^                24hrs.  48hrs.  3dias  5dias  7dias  ^
^  LDH  -4°C  0 %    4 %    8 %    9 %   12 %  ^
^                25°C  0 %    1 %    2 %   10 %  15 %  ^
^                ^                ^                ^
^  CK*  -4°C  0 %    0 %    2 %    -     0 %   ^
^                25°C  2 %    -     7 %    -     19 %  ^
^-----^
  
```

\*Sólo con reactivación por N-acetil-cisteína (NAC).

Cuadro 1. Estabilidad de las enzimas CK y LDH con respecto al tiempo. E. F. W. Schmidt, 1980.

#### **V A R I A N T E S   M O L E C U L A R E S :**

Las variantes moleculares enzimáticas se subdividen en 3 grupos:

##### **I s o e n z i m a s :**

Las isoenzimas son formas múltiples (isómeros) de una familia de enzimas que catalizan la misma reacción bioquímica.

##### **H e t e r o e n z i m a s :**

Enzimas de función semejante, específicas de las diversas especies biológicas. p. ej. la LDH del hombre y la LDH del

conejo. Así la tripsina de cerdo y la de ternero actúan como antígeno y de manera diferente cuando se inmuniza un cobayo. (19,24,29)

#### **A l o e n z i m a s :**

variantes de enzimas e isoenzimas condicionadas genéticamente que solo aparecen en parte de los componentes de una especie. La mayoría de las aloenzimas no conducen a manifestaciones patológicas, sirven para caracterizar el tipo bioquímico de un individuo (17,18,20,21,24)

Por el interés que reviste para este trabajo, procederemos a hablar de las isoenzimas.

## **I S O E N Z I M A S :**

Diferentes formas moleculares de una enzima que catalizan la misma reacción. Cada isoenzima de una familia posee una afinidad diferente por los sustratos y cofactores. De modo que la constante de Michaelis-Mente ( $K_m$ ) y la especificidad por diferentes sustratos puede variar. Las distintas isoenzimas de una familia pueden también diferir en la capacidad de ser inhibidas por agentes específicos, en sus propiedades físicas, tales como termoestabilidad y carga, y en su composición de aminoácidos (22).

Como características principales tenemos las siguientes:

- Su distribución de carga en la molécula.
- velocidad de emigración diferente, como consecuencia de lo anterior y comportamiento en el intercambio iónico, cromatografía y electroforesis (fig 9).

Por ej. en la molécula de Lactato Deshidrogenasa (LDH) puede descomponerse en dos subunidades llamada H. M. estas subunidades se combinan entre si de cuatro en cuatro para formar la isoenzima activa, resultando cinco posibilidades. que se encuentra en los órganos (fig. 9). (22, 27,35)

## **B A S E S   E S T R U C T U R A L E S :**

Las isoenzimas más comúnmente halladas en el laboratorio clínico son proteínas compuestas por 2 o más cadenas polipeptídicas o subunidades. Si las unidades son idénticas, en su estructura primaria, secundaria y terciaria, la enzima resultante es un homopolímero, si las subunidades son



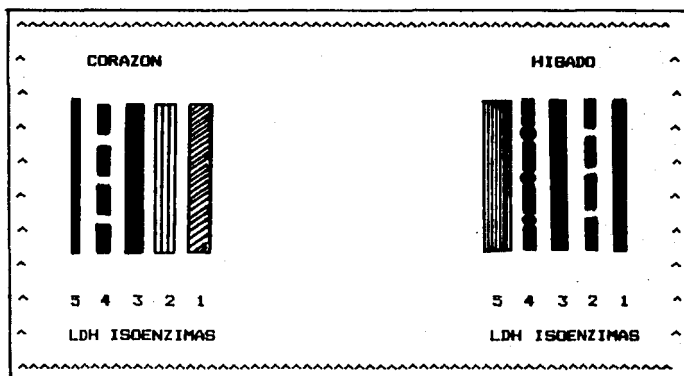


Fig. 9 Representación de la separación electroforética de LDH. en corazón y hígado. Schmidt 1966.

diferentes, la enzima es un heteropolímero. La composición final de una isoenzima depende del número de subunidades polipeptídicas que constituyen la molécula completa. (22)

#### **DISTRIBUCION DE LAS ISOENZIMAS EN EN LOS ORGANOS .**

La actividad de algunas enzimas es tan diferente según los órganos en donde se encuentra presentando una actividad elevada, cuando el órgano en cuestión es dañado y en los demás solo hay indicios de actividad. Se denominan "enzimas órgano-específicas", como ejemplo se tiene la CK y LDH. La LDH se encuentra en diferentes concentraciones en diferentes en diferentes órganos, siendo los más importantes corazón e Hígado.

Debido a que las isoenzimas son organoespecíficas. son de gran apoyo diagnóstico en algunos padecimientos como el infarto al miocardio, por eso a continuación hablaremos sobre el miocardio y sus enzimas diagnósticas. (3,5,9,19,21,22,27)

## RETABOLISMO DEL MIOCARDIO:

El corazón está formado por 3 capas musculares de las cuales el miocardio es la más importante clínicamente. La energía para mover el corazón proviene de los diversos sustratos que las células utilizan a través de diferentes vías. Estas vías incluyen el ciclo glucolítico de Embden Meyerhof, el corto circuito de las pentosas-fosfato, la oxidación de los ácidos grasos y el ciclo de Krebs del ácido cítrico. La energía producida en la degradación de los sustratos es luego transferida a través del sistema de transporte de electrones de la mitocondria para producir ATP. Esta es una forma química de energía almacenada que es utilizada por el músculo cardíaco para producir trabajo. Dado que la función cardíaca debe estar a la altura de grandes demandas metabólicas. El corazón requiere un importante sistema de almacenamiento para conservar la energía del ATP.

Los procesos metabólicos del tejido miocárdico han sido clasificados en 3 fases de energía: (22,24)

- a) Liberación
- b) Conservación
- c) Utilización

a). En la fase de liberación de energía, los sustratos cardíacos principales son degradados para formar  $CO_2$  y  $H_2O$ , con la producción de electrones de alta energía por las vías bioquímicas. (20,21,22,27,41)

b). Conservación: la energía producida es conservada químicamente como trifosfato de adenosina (ATP), este es fuente de energía para la contracción miocárdica, mantenimiento y la restauración de los gradientes iónicos a través de la membrana celular y para una serie de procesos metabólicos, celulares intermedios. (20,21,22)

c). Utilización: Durante esta fase, el ATP es hidrolizado a difosfato de adenosina (ADP) y fosfato inorgánico. El ADP es luego convertido en ATP mediante la incorporación de un grupo fosfato de alta energía proveniente de la cadena electrónica de transporte o del depósito de fosfato de creatina. (20,21,22,27)

Es importante mencionar como intervienen las enzimas e isoenzimas en el infarto agudo de miocardio.

#### ENZIMAS E ISOENZIMAS :

Después de la instalación de los síntomas del infarto agudo de miocardio (IAM) se observa en la mayoría de los pacientes un periodo durante el cual es posible detectar una elevación de las enzimas liberadas por el tejido miocárdico lesionado. Esta relación temporal es particular para cada enzima y varía de un paciente a otro, aunque se ha establecido un patrón típico, (fig. 10) (20).

Usualmente es necesario que transcurran de 4 a 6 horas desde la instalación del dolor precordial antes que pueda detectarse una elevación sérica de CK-MB en los pacientes con

IAM. Se han registrado tiempos de detección que oscilan entre 2 y 15 horas. Esta actividad muestra un pico máximo a las 12 y 24 horas y generalmente retorna a los niveles basales en el curso de 24 a 48 horas. Habitualmente se observa primero una elevación de la CK-MB seguida de una elevación de la LDH<sub>1</sub> de 5 a 20 horas, más tarde. El tiempo pico promedio para la liberación enzimática después de un infarto, en un estudio de 47 pacientes, fue de 18 horas para la CK-MB y la CK total, 24 horas para la aspartato aminotransferasa (AST) y 48 horas para la LDH (fig. 9 y 10 ). (17,34)

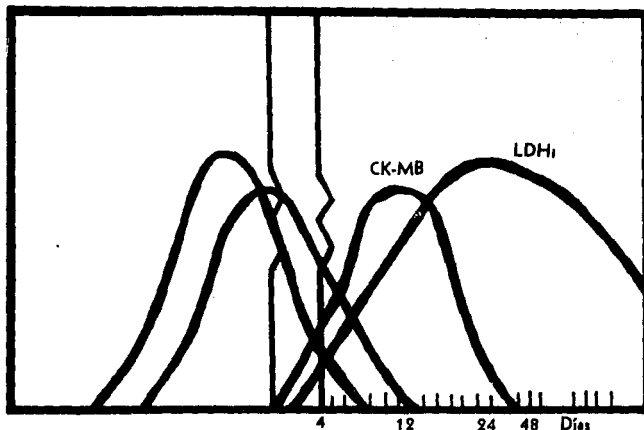


Fig. 10. Evolución temporal de los cambios bioquímicos con un típico infarto agudo de miocardio (IAM). Usategui-Gómez, 1981.

Figura 11. Actividad relativa de las enzimas é isoenzimas en suero, en función del tiempo después que inicia un pequeño infarto. Merck, 1988.

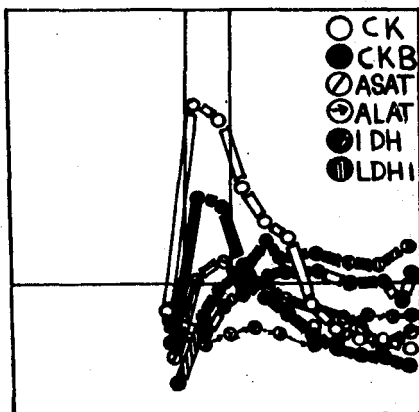
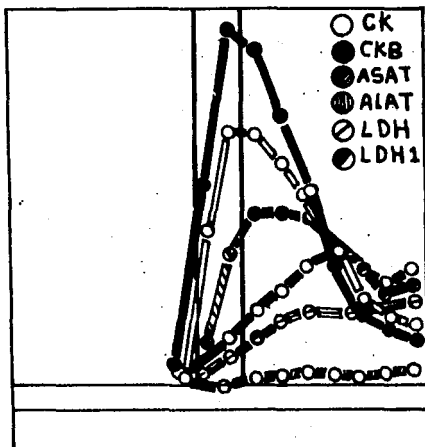


Figura 12. Actividad relativa de enzimas é isoenzimas en suero, en función del tiempo después que inicia un infarto relativamente largo. Merck, 1988.



### **CREATINA - QUINASA (CK):**

Las concentraciones disminuyen cuando la utilización de energía aumenta en forma aguda con un incremento de trabajo cardiaco. La enzima responsable de la producción de fosfato de creatina es la creatin - quinasa (CK), esta enzima que también se denomina creatina-fosfoquinasa, posee un P.M. 85,000 daltons y existe en varias formas isoenzimáticas. Las 3 isoenzimas de importancia son las que se encuentran en el citosol MM, MB, BB. (fig. 13).

Es un dímero compuesto por 2 subunidades M (Músculo) y B (Cerebro) y son fáciles de diferenciar electroforéticamente, dado que a un pH 8.6), la isoenzima MM permanece en el origen mientras que la forma BB avanza hacia el ánodo con una movilidad comparable a la albúmina. La isoenzima MB se queda en medio de estas dos si se tiene en cuenta la actividad comparada en los diversos tejidos, (cuadro 2).

La isoenzima sérica, predominante es la MM, con una cantidad ínfima de isoenzima BB y MB, sin embargo, la MB está aumentada en ciertos transtornos musculares, necrosis e infarto al miocardio. (fig. 14). Se debe tener cuidado en el manejo de los geles porque pueden surgir errores en la lectura. (21,22,41)

SUBUNIDADES DE CK	
CK1	B B
CK2	M B
CK3	M M

Fig. 13. Esquema de la estructura de subunidades CK. Merck, 1977.



( % de actividad total )			
TEJIDO	CK (MM)	CK2(MB)	CK1(BB)
Músculo esque.	100.0	0 -19	0 0
Corazón	78.0	4-42	0.0
Cerebro	0.0	0.0	100.0
Colon	3.0	1.0	96.0
Estómago	3.0	2.0	95.0
Utero	2.0	3.0	95.0
Tiroides	26.0	1.0	73.0
Riñón	8.0	0.0	92.0
Pulmón	35.0	1.0	64.0
Próstata	3.0	4.0	93.0
Bazo	74.0	0.0	26.0
Higado	90.0	6.0	4.0
Páncreas	14.0	1.0	85.0
Placenta	48.0	6.0	46.0

Cuadro 2. Actividad de creatina-quinasa en diversos tejidos humanos. Chapman, 1982.

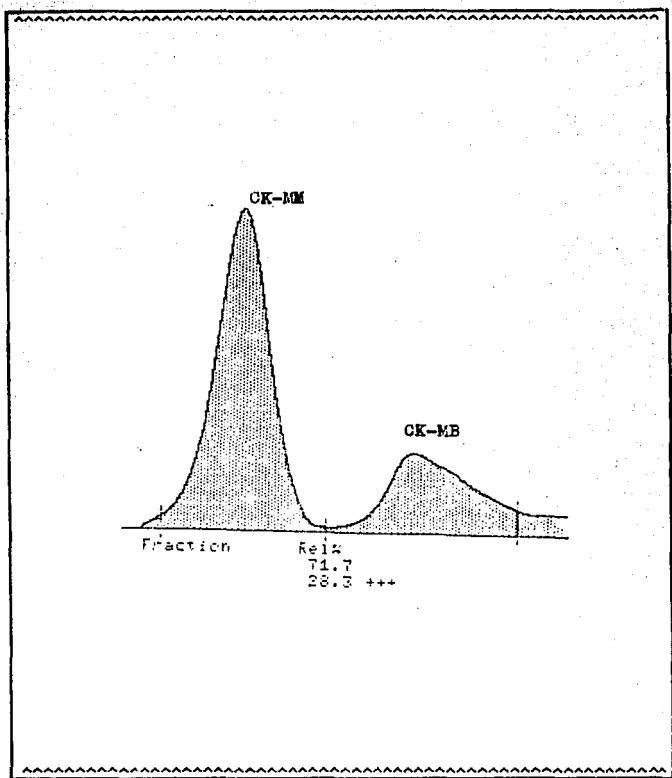


Fig. 14. Separación electroforética en gel de agarosa al 1 % cuando esta presente la isoenzima CK-MB, Infarto al Miocardio Wolf. Paul L. M. 1986.

## LACTATO DESNIDROGENASA (LDH)

Es una enzima tisular de gran ubicuidad que cataliza la reducción del piruvato a lactato mediante la utilización del dinucleótido de nicotinamida y adenina (NAD). LDH posee un P.M. de aproximadamente 140,000 daltons y un tetramero compuesto por 4 subunidades (fig. 15).

Consiste en 2 formas H ("Heart" ) corazón y M (músculo). Las cuales se encuentran polimerizadas para formar 5 isoenzimas, la subunidad H contiene una cantidad relativamente mayor de Aspartato y Glutamato que la subunidades M, la cual es rica en Arginina y Metionina, de modo que el polímero HHHH es principalmente electronegativo y el polímero MMMM es electropositivo.

Las isoenzimas de LDH, se encuentra presente en todos los tejidos son significativamente diferentes. (fig 16), (Cuadro 3). (22,23,24,29,40)

LDH1	H H H H
LDH2	H H H M
LDH3	H H M M
LDH4	H M M M
LDH5	M M M M

Fig. 15 Esquema de la estructura de subunidades de LDH. Merck, 1977.

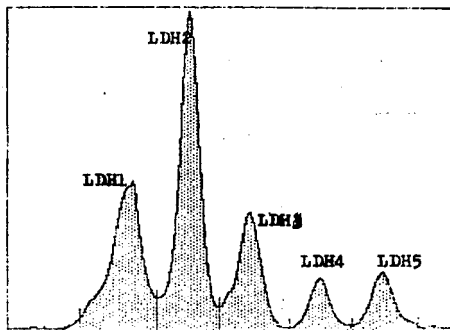


Fig. 16. Separación electroforética de isoenzimas de LDH. En suero, de un paciente aparentemente sano. Wolf, Paul L. 1986.

Organo	% de la actividad total				
	LDH <sub>1</sub>	LDH <sub>2</sub>	LDH <sub>3</sub>	LDH <sub>4</sub>	LDH <sub>5</sub>
Corazón	60	30	5	3	2
Riñón	28	34	21	11	6
Cerebro	20	32	19	16	5
Hígado	0.2	0.8	1	4	94
Músculo Esque.	3	4.0	8	9	76
Piel	0	0.0	4	17	79
Pulmón	10	18	28	23	21
Bazo	5	15	31	31	18

Cuadro 3. Actividad de Lactato deshidrogenasa distribución en % de la actividad total. Pfleiderer, 1979.

## P R O B L E M A

### PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El estudio de los Valores de Referencia es importante en el Laboratorio Clínico, dado que la finalidad es colaborar con el personal médico para el diagnóstico y tratamiento del paciente. Es de tanta importancia, que en 1970 fue creado un Panel de Expertos en Teoría de los Valores de Referencia (PEVR) por el Comité de Estándares de la Federación Internacional de Química Clínica (FIQC). Su tarea consistió en desarrollar una nomenclatura y procedimientos recomendados para la producción de Valores de Referencia y su tratamiento (12,23). Dentro de los puntos establecidos por el Comité, se encuentran que se debe escoger una población para obtener los Valores de Referencia, ya que los valores en Química Clínica son dependientes de las características y cultura de la población. (12,26,28,)

Se han realizado varios estudios sobre Valores de Referencia, en población mexicana, encontrándose diferencias en algunos parámetros y aún de estado a estado de la República; pero no se han realizado estudios sobre la actividad enzimática. (26)

Dentro de las enzimas de interés clínico encontramos que CK y LDH son ampliamente utilizadas. Aunque las determinaciones de la actividad total no tienen aplicación Clínica aceptada, la identificación y cuantificación de sus formas moleculares (isoenzimas) si la tienen, ya que son organoespecíficas.

Existen varios métodos para cuantificar la actividad enzimática de las isoenzimas CK y LDH como son:

Electroforesis. Cromatografía de intercambio iónico. inmunoinhibición y radioinmunoanálisis (RIA). (18,20)

El análisis electrofóretico es frecuentemente utilizado porque es sencillo, rápido, específico y utiliza un volumen pequeño de muestras: se basa en la movilidad de sus partículas que está en función de la magnitud de su carga y a su vez varía con el pH. Por tal razón separa las tres isoenzimas principales en CK (CK-MM, CK-MB, CK-BB) y las cinco isoenzimas de LDH (LDH1, LDH2, LDH3, LDH4, LDH5). (1,18,19,24)

Por otro lado los métodos cromatográficos no ofrecen tal eficiencia de separación. Es un método de referencia para cuantificar actividad de CK-MB, requiere de control rigurosos de parámetros. (1,4,21,22,37)

La inmunoinhibición es una técnica simple y se pueden llevar a cabo con rapidez, pero tiene la desventaja de carecer de sensibilidad y especificidad apropiada, en LDH<sub>1</sub> y en CK interfiere la CK-BB. (21,22,37)

Por tal motivo la electroforesis puede proveer, más información por ser un método específico para estas isoenzimas.

Considerando que es necesario tener nuestros propios Valores de Referencia para CK y LDH en sus isoformas moleculares, se pretende obtener estos valores para nuestra población y contribuir al diagnóstico médico de un paciente, así como diferenciar los sanos de los enfermos.

## N I P O T E S I S

La determinación de los valores de referencia para una población, específica es fundamental, porque la cantidad que existe de la isoenzima de CK y LDH en un grupo determinado de personas aparentemente sanas, será diferente dependiendo de su origen, sexo, edad, ocupación, medio ambiente y estado emocional.

Uno de los métodos que se utilizan para determinar las actividades de isoenzimas de CK y LDH, es el de electroforesis, empleando este método los valores de referencia obtenidos para nuestra población serán diferentes a los reportados en la bibliografía, ya que los demás métodos no evalúan todas las isoenzimas.



## O B J E T I V O S

\*Calcular los valores de Referencia de las isoenzimas CK y LDH, de población mexicana del D. F., hombres y mujeres de edades entre 20 y 50 años. Para el seguimiento en pacientes con lesión miocardiaca.

## DISEÑO DE INVESTIGACION

### TIPO DE ESTUDIO:

Observacional, prospectivo, transversal y descriptivo.

### CALCULO DEL TAMAÑO DE MUESTRA:

$$N = \left[ \frac{Z \cdot s}{e} \right]^2 = \left[ \frac{(1.96) (5)}{2} \right]^2 = 24 = 25$$

s = desviación estandar

Z = límite asociado a la confianza

e = error máximo

### POBLACION:

100 individuos aparentemente sanos que reúnan los siguientes

#### Criterios de inclusión

-Ambos sexos

44 % hombres

56 % mujeres

-Edad de 20 a 50 años

-No importa estado civil.

-Que vivan en la zona del D.F.

-Se haya encontrado normal en los siguientes estudios"

BH (rutina). Química Sanguinea, TGO, CK, y LDH total.

-Haya respondido al cuestionario de historia clínica

#### Criterios de exclusión.

-Ser deportista

-Fumador

-Este tomando algún medicamento

- Tenga antecedentes cardiacos o hepaticos
- Algunos de los estudios resulte alterado

Grupo control

- 44 individuos con problemas de infarto al miocardio.
- Ambos sexos
- Edad 20 -50 años
- Que se encuentre en terapia intensiva o Extensión Hospitalaria del Hospital de Especialidades. C.M.R.

NOTA: Se seleccionaron 100 individuos para asegurar una buena distribución de los datos y por disponibilidad de reactivos.

**T O M A   D E   M U E S T R A S :**

Se obtuvieron muestras sanguineas por venopunción evitando la extasis venosa y depositando en tubos de ensayo de 13 por 100 sin anticoagulante.

Las muestras fueron centrifugadas dentro de la hora posterior a la toma a 5000 rpm por 5 minutos y separado el suero inmediatamente.

Posteriormente los sueros fueron procesados por los métodos para medición de la actividad enzimática y por electroforesis.

- Tenga antecedentes cardiacos o hepáticos
- Algunos de los estudios resulte alterado

Grupo control

- 44 individuos con problemas de infarto al miocardio.
- Ambos sexos
- Edad 20 -50 años
- Que se encuentre en terapia intensiva o Extensión Hospitalaria del Hospital de Especialidades. C.M.R.

NOTA: Se seleccionaron 100 individuos para asegurar una buena distribución de los datos y por disponibilidad de reactivos.

TOMA DE MUESTRAS:

Se obtuvieron muestras sanguíneas por venopunción evitando la extasis venosa y depositando en tubos de ensayo de 13 por 100 sin anticoagulante.

Las muestras fueron centrifugadas dentro de la hora posterior a la toma a 5000 rpm por 5 minutos y separado el suero inmediatamente.

Posteriormente los sueros fueron procesados por los métodos para medición de la actividad enzimática y por electroforesis.

## M A T E R I A L

- pipetas volumétricas 1,2,5,10 ml
- pipetas aforadas 1,2,5,10 ml
- probetas 100 ml y 500 ml
- pipetas pasteur
- bulbos
- matraz aforados de 500 ml, 1000 ml.
- gradilla
- tubos 13 x 100
- tubos 12 x 75
- vaso de precipitados 100 ml, 250 ml, 1000 ml
- geles de CK (1.0 % de agarosa)
- plantillas verdes (para isoenzimas de CK)
- secantes de plantillas
- geles LDH (1.0 % de agarosa)
- plantillas rosas (para LDH)
- secantes de plantillas
- secantes de geles
- secantes gruesos
- pipeta automática de 5 microlitros.

**E Q U I P O**

- cubeta de electroforesis Power supply Paragon Beckman
- Fuente de alimentación Paragon Beckman
- Procesador de líquidos Paragon Beckman
- Secador Paragon Beckman
- Incubador y unidad de incubación Paragon Beckman
- Appraise Densitometer System

## R E A C T I V O S

-Solución amortiguadora. Para la LDH; 14 gr. 2-amino-3-metil-1,3 propanodiol 38mmol/L Reconstituido, Acido DL-aspartico, 23 mmol/L Reconstituido; glicina N,N-bis(2hidroetil) 25mmol/L Reconstituido; Sal Sódica Acido 5.5 Dietilbarbitúrico, 15 mmol/L Reconstituido.

-Substrato de LDH. Reconstituido: L-Lactato de Litio 208 mmol/L; NAD, 56 mmol/L; NBT, 2,4mmol/L; PME, 33 mmol/L y otros ingredientes no reactivos necesarios para una operación óptima.

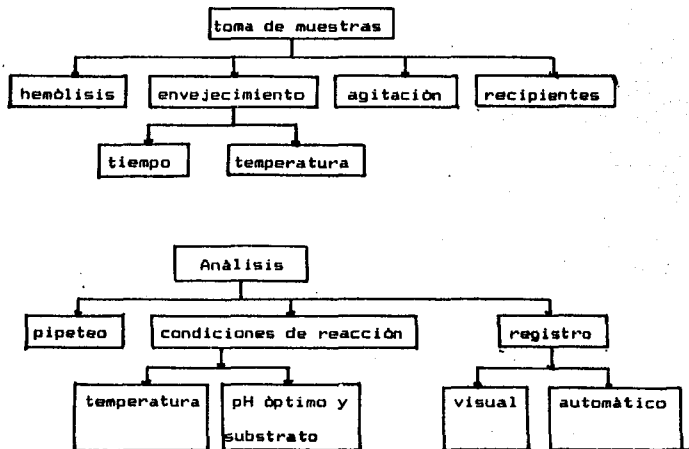
-Solución buffer para CK. 12 gr. Acido Sulfónico 3(N-Morfolino)-2-Hidroxipropano, 22 mmol/L Reconstituido, Sal sódica del Acido sulfónico 3-(N-Morfolino)-2-Hidroxipropano 28 mmol/L. Reconstituido.

-Substrato CK. Reconstituido; Creatin fosfato 120 mmol/L ADP, 9 mmol; AMP 15 mmol/L; Diadenosin Pentafosfato, 30 umol/L; Sal de Magnesio, 50 mmol/L; D-glucosa. 70 mmol/L; NADP, 9 mmol/L; NAC, 120 mmol/L; hexoquinasa (nk)(levadura) 18,000 UI/L; Glucosa 6 fosfato deshidrogenasa (GDP) (levadura). 6000 UI/L y otros ingredientes no reactivos necesarios para una operación óptima.

## TECNICAS

Se emplearon sueros frescos obtenidos en ayunas, las muestras con evidencia de hemólisis e ictericos, fueron rechazadas para ambas determinaciones.

La actividad de CK en suero es inestable, disminuyendo su valor después de 4 hrs., a temperatura ambiente, por lo que los sueros se procesaron inmediatamente. Como puede verse son varios los errores que afectan las determinaciones. Se presenta un esquema de las fuentes de error en las muestras y análisis de isoenzimas de CK y LDH (Esquema 1).



Esquema 1. Fuentes de error en la muestra y análisis de isoenzimas. Merck, 1977.



## FUNDAMENTOS Y PROCEDIMIENTOS

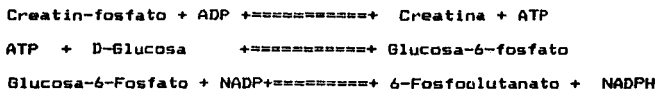
### ISOENZIMAS DE CK.

#### FUNDAMENTO:

La Creatin-Kinasa humana está formada por tres isoenzimas. Las diferencias estructurales en las subunidades de cada isoenzima producen diferentes cargas superficiales. Esta diferencia es la base en la separación electroforética de las tres isoenzimas de CK.

El principio de la electroforesis se basa en que las isoenzimas situadas en un campo eléctrico migran hacia uno de sus polos eléctricos.

El estuche para isoenzimas de CK se suministra para la separación electroforética de estas isoenzimas en un gel de agarosa amortiguado. Después de la electroforesis, se produce la detección de las isoenzimas a través de la siguiente reacción fluorométrica específica.



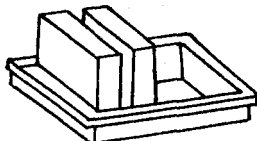
El NADPH se forma en cada banda isoenzimática el cual está marcado con fluorescencia, Este modelo se cuantifica en un densitómetro que mide la fluorescencia.

### PROCEDIMIENTO:

. Llenar cada compartimiento de la cubeta de electroforesis con 45 ml de solución amortiguadora de CK.



.Llenar el procesador de líquido con 300 ml de H<sub>2</sub>O desionizada.

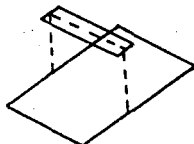


.Retirar el gel de su embalaje y colocarlo sobre papel y secar cuidadosamente.

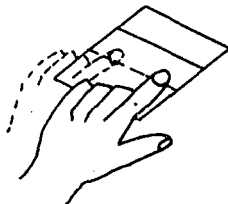


### aplicación:

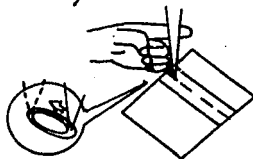
.Se extiende transversalmente la plantilla y se alinea en la posición b.



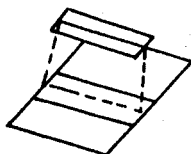
.Se aplica la plantilla en el gel de forma que las ranuras de la plantilla estén en contacto con la superficie. Alisar cuidadosamente la plantilla con un dedo para asegurar el contacto.



.Aplicar de 3 a 5 uL de muestra a través de la ranura de la plantilla. Esperar 5 minutos para su difusión.

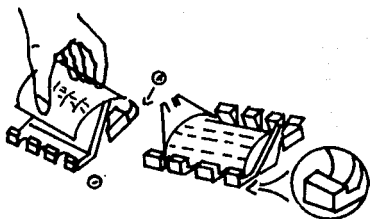


.Secar cuidadosamente la plantilla con el secante de la plantilla. y desechar ambos.

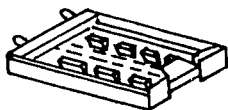


### *electroforesis*

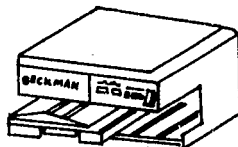
. Colocar el gel en el puente de la cubeta, alineando las posiciones (+) y negativa (-) del gel con las correspondientes posiciones del puente. Colocar el conjunto en la cubeta de Electroforesis Paragon .



.Colocar la cubeta en la Fuente de alimentación. Fijar la tensión a 100 voltios, encender y mantener la electroforesis durante 20 min.

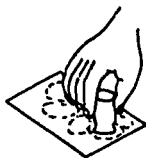


.Completada la electroforesis, el gel de la cubeta de electroforesis y colocarlo sobre un secante de CK. Situar ambos en la unidad de incubación

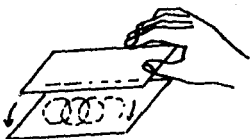


### *detecciones*

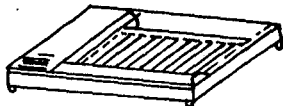
.Saturar el secante de CK con un vial reconstituido de sustrato y



colocarlo suavemente sobre la superficie del gel. Evitando burbujas entre el secante y el gel.

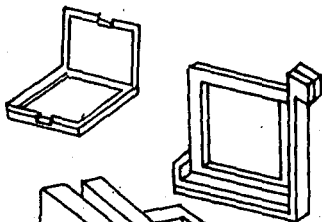


.Cerrar la unidad de incubación y ponerla en el incubador (45°C) durante 20 minutos.

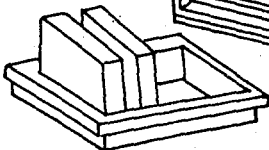


#### *secado :*

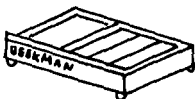
.Después de la incubación retirar el secante de la superficie del gel y desecharlo.



.Colocar el gel en un marco de geles e introducir tres veces en agua desionizada. El tiempo de lavado no debe exceder de 5 seg.

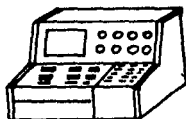


.Colocar el Gel en el secador (73°C) hasta su secado.



#### *evaluación :*

.Evaluar el gel con un densitómetro a 340 nm para excitación, y 455 nm para emisión de fluorescencia.



## ISOENZIMAS LDH.

### FUNDAMENTO:

La Lactato-Deshidrogenasa humana (LDH) está formada por cinco isoenzimas. Las diferencias estructurales en las subunidades de cada isoenzima producen diferentes cargas superficiales. Esta diferencia es la base en la separación electroforética de las cinco isoenzimas de LDH.

El principio de la electroforesis se basa en que las isoenzimas, situadas en un campo eléctrico, migran hacia uno de los polos eléctricos.

El estuche para isoenzimas de LDH suministra para la separación electroforética de estas isoenzimas un gel de agarosa amortiguado. Después de la electroforesis, se produce la detección de las isoenzimas a través de la siguiente reacción colorimétrica

LDH



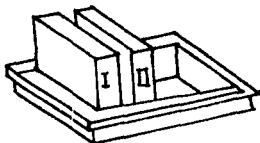
El color nitro azul de formazan se forma en cada banda isoenzimática. Este modelo se cuantifica en el densitómetro

## PROCEDIMIENTO :

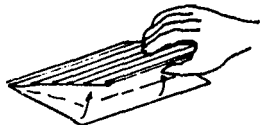
.Llenar cada compartimento de la cubeta de electroforesis con 45 ml de solución amortiguadora LDH.



.Llenar dos depósitos del procesador de líquidos Paragon con 300 ml de Acido Acético, al 5 % cada uno.



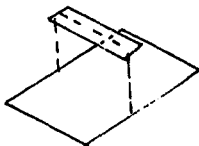
.Retirar el gel de su embalaje y colocarlo sobre una toalla de papel. Secar cuidadosamente con un secante y desecharlo.



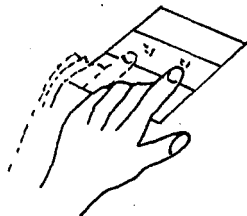
## aplicacións :

.Aplicación de la plantilla

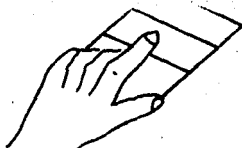
.Extender transversalmente la plantilla según se indica, se alinea con la posición "a" en el borde del gel.



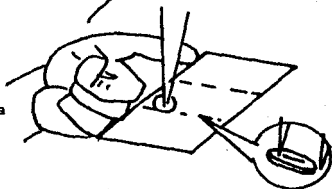
.Aplicar la plantilla al gel de forma que las ranuras de la plantilla estén en contacto con la superficie.



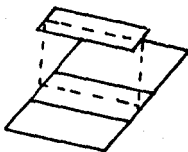
.Alisar cuidadosamente la plantilla con un dedo para asegurar el contacto



.Aplicar de 3 a 5 uL de muestra a través de las ranuras de la plantilla esperar 5 minutos para la difusión de la muestra.

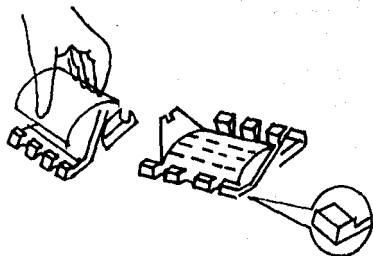


.Secar cuidadosamente la plantilla con el secante de plantilla. Desechar ambos.

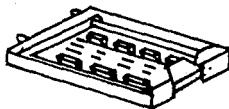


#### *electroforesis:*

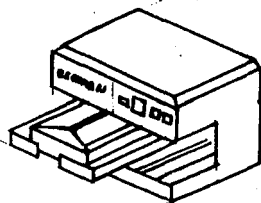
.Colocar el gel en el puente de la cubeta, alineando las posiciones positivo (+) y negativo (-) del gel con las correspondientes posiciones del puente colocar el conjunto en la cubeta de electroforesis.



.Colocar la cubeta en la fuente de alimentación Fijar la tensión a 100 voltios, encender y mantener la electroforesis durante 20 min.

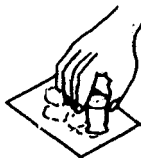


.Completada la electroforesis retirar el gel de la cubeta de electroforesis y colocarla sobre la parte superior de un secante.



#### *d e t e c c i o n s*

.Saturar un secante de gel con un vial reconstituido de sustrato LDH y colocarla suavemente sobre la superficie del gel. Evitar las burbujas entre el secante y el gel.



.Cerrar la Unidad de incubación y ponerla en el incubador Paragon (45°) durante 30 minutos.

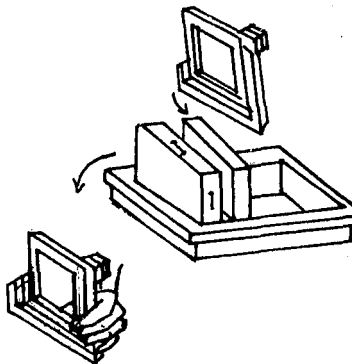


#### *f i j a c i o n s*

.Después de la incubación retirar el secante de la superficie del gel y desecharlo. Colocar el gel en un marco de geles.

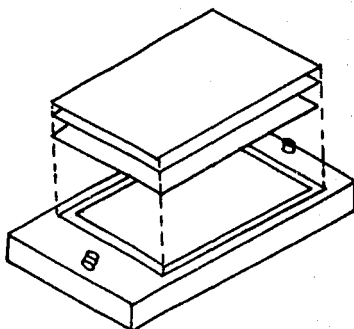
.Colocar el gel en la solución Acido Acético al 5 % durante 1 min.

.Retirar el gel del marco de geles.

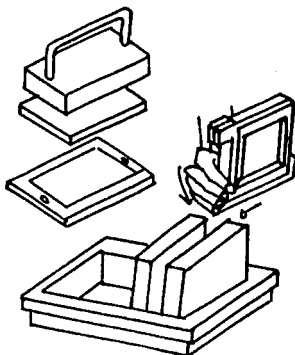




.Colocar una toalla de papel en la base de la prensa de secado y poner el gel sobre ella con la posición de agarosa hacia arriba. Colocar un secante de geles, empapado en solución de ácido acético, sobre la superficie del gel, seguido por (2) secantes. Colocar el peso sobre el conjunto y presionar durante 3 min. para secar el gel.



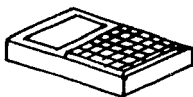
.Retirar el gel de la prensa y desechar los secantes. Colocar el gel en un marco de geles.



.Colocar el gel en solución Acido Acético 11 durante 1 min.

#### *s e c a d o s*

Retirar el gel de la solución de Acido Acético 11. Secar el exceso de solución de la parte trasera del gel y colocarlo en el secador hasta su secado total.



#### *e v a l u a c i ó n s*

.Evaluar en un densitómetro a 600 nm.



## **C O N T R O L   D E   C A L I D A D :**

\* Se introdujo en cada corrida una muestra de suero de un paciente con infarto al miocardio, previamente comparado con un suero control de BioMerieux anormal, esto para verificar que las variaciones son debidas al paciente y no al análisis. Se uso una posición de la membrana diario.

### **\* P R E C I S I O N :**

Se obtuvieron coeficientes de variación menores del 5 % en evaluaciones de precisión entre geles, usando repeticiones de un suero control de un paciente aparentemente sano en 2 geles (20 repeticiones). Para cada una de las isoenzimas CK y LDH.

### **\* A N A L I S I S   E S T A D I S T I C A :**

- .Se realizaron gráficas de distribución de frecuencias,
- .Se calcularon las medidas de tendencia central y dispersión, media y desviación estandar.
- .Se calcularon los intervalos (intervalo de referencia por el método paramétrico por fractiles 0.025 y 0.975).
- .Y se realizó la prueba de t student para ver diferencia de medias. entre el grupo de individuos aparentemente sanos y los resultados del grupo control (de individuos en infarto al miocardio).

## R E S U L T A D O S

A continuación se presentaran los resultados del trabajo con tablas de intervalos de referencia, tablas de distribución de frecuencias así como sus polígonos de frecuencias de cada isoenzima de CK y LDH, para una mejor visualización de ellos.

### VALORES DE REFERENCIA PARA ISOENZIMAS CK HOMBRES Y MUJERES APARENTEMENTE SANOS DE 20 A 50 AÑOS

ISOENZIMA	INTERVALO DE REFERENCIA
CK-BB	0 %
CK-MB	0 - 4.3 %
CK-MM	95.7 - 100 %

Método de electroforesis en gel de agarosa.

VALORES DE REFERENCIA PARA ISOENZIMAS LDH HOMBRES Y MUJERES  
APARENTEMENTE SANOS DE 20 A 50 AÑOS.

ISOENZIMA	INTERVALO DE CONFIANZA
LDH1	19 - 32 %
LDH2	36 - 47 %
LDH3	14 - 25 %
LDH4	3.8- 9.4 %
LDH5	2.0- 11.0 %

Método de electroforesis en gel de agarosa.

VALORES DE REFERENCIA PARA ISOENZIMAS CK, POR SEXO  
DE 20 A 50 AÑOS

INTERVALO DE CONFIANZA		
ISOENZIMAS	SEXO FEMENINO	SEXO MASCULINO
CK-BB	0 %	0 %
CK-MB	0.0 - 4.3 %	0 - 4.0 %
CK-MM	95.7 - 100 %	96.0 - 100 %

Método de electroforesis en gel de agarosa.

VALORES DE REFERENCIA PARA ISOENZIMAS LDH, POR SEXO  
DE 20 A 50 AÑOS.

INTERVALO DE CONFIANZA		
ISOENZIMAS	SEXO FEMENINO	SEXO MASCULINO
LDH1	18 - 31 %	18 - 32 %
LDH2	37 - 47 %	34 - 47 %
LDH3	13 - 25 %	15 - 24 %
LDH4	2 - 9 %	3 - 10 %
LDH5	2 - 10 %	2 - 12 %

Método de electroforesis en gel de agarosa.

COMPARACION DE VALORES DE ISOENZIMAS CK DE INDIVIDUOS SANOS  
 CON INDIVIDUOS DEL GRUPO CONTROL EN PROCESO DE INFARTO AL  
 M I O C A R D I O ( I A M ) .

ISOENZIMA	INDIVIDUOS SANOS	INDIVIDUOS EN IAM
CK-BB	0 %	0 - 7 % *
CK-MB	0 - 4.3 %	7.0 - 28 % *
CK-MH	95.7 - 100 %	72 - 90.5 % *

\* Estadísticamente significativo  $p < 0.05$

Método de electroforesis en gel de agarosa.

COMPARACION DE VALORES DE ISOENZIMAS LDH DE INDIVIDUOS SANOS  
 CON INDIVIDUOS DEL GRUPO CONTROL EN PROCESO DE INFARTO AL  
 MIOCARDIO (IAM).

ISOENZIMAS	INDIVIDUOS SANOS	INDIVIDUOS EN IAM
LDH1	19 - 32 %	14.2 - 60.8 % *
LDH2	36 - 47 %	21.1 - 42.0 % *
LDH3	14 - 25 %	3.25 - 18.9 % *
LDH4	3.8-9.4 %	1.9 - 11.3 %
LDH5	2.0-11.0 %	0.0 - 27.3 % *

\*Estadísticamente significativo  $p < 0.05$

Método de electroforesis en gel de agarosa.

COMPARACION DE VALORES DE REFERENCIA EN ISOENZIMAS CK  
BIBLIOGRAFIA CON DATOS EXPERIMENTALES.

ISOENZIMAS	DATOS EXPERIMENTALES	DATOS BIBLIOGRAFICOS
CK-BB	0 %	0 %
CK-MB	0 - 4.3 %	0 - 3 %
CK-NM	95.7-100 %	97-100 %

Método de electroforesis en gel de agarosa. Con el mismo reactivo y equipo del laboratorio Beckman.

COMPARACION DE LOS VALORES DE REFERENCIA EN ISOENZIMAS  
LDH BIBLIOGRAFIA CON DATOS EXPERIMENTALES.

ISOENZIMAS	DATOS EXPERIMENTALES	DATOS BIBLIOGRAFICOS
LDH1	19 - 32 %	17 - 31 %
LDH2	36 - 47 %	35 - 48 %
LDH3	14 - 25 %	15 - 29 %
LDH4	3.8- 9.4 %	3.8-9.4 %
LDH5	2.0-11.0 %	2.6- 10 %

Método de electroforesis en gel de agarosa. Con el mismo reactivo y equipo del laboratorio Beckman.

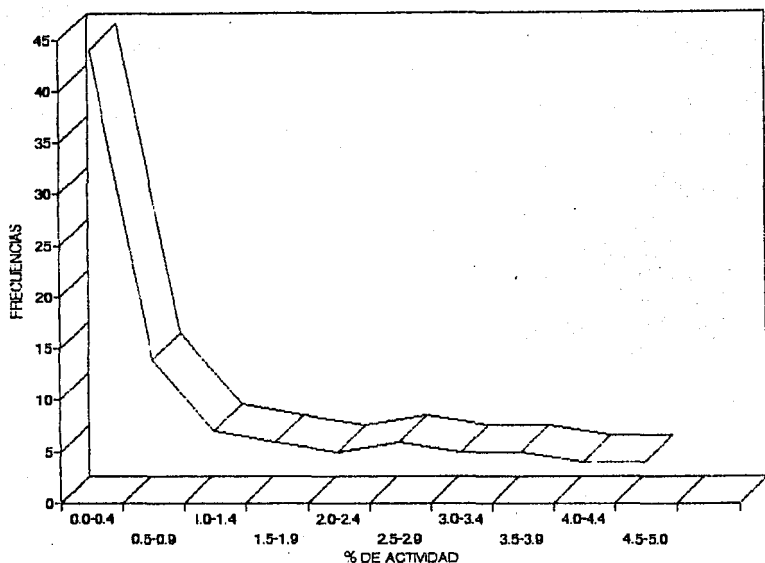
# FALLA DE ORIGEN

T A B L A 4

Distribución de frecuencias de isoenzimas CK-MB en 100 adultos  
56 mujeres y 44 hombres aparentemente sanos, (edades 20-50 años).

Mujeres		Hombres	
frec.	% actividad	frec.	% actividad
24	0	20	0
2	0.5	2	0.5
3	0.8	3	1
3	0.9	1	1.1
1	1.1	3	1.5
2	1.2	2	1.8
2	2	1	1.9
1	2.4	1	2.3
2	2.5	1	2.4
1	2.9	1	2.6
2	3.2	2	2.7
1	3.5	3	3
1	3.7	1	3.5
2	3.9	1	4.2
2	4	1	4.8
1	4.4	1	5
1	4.5		
1	4.8		





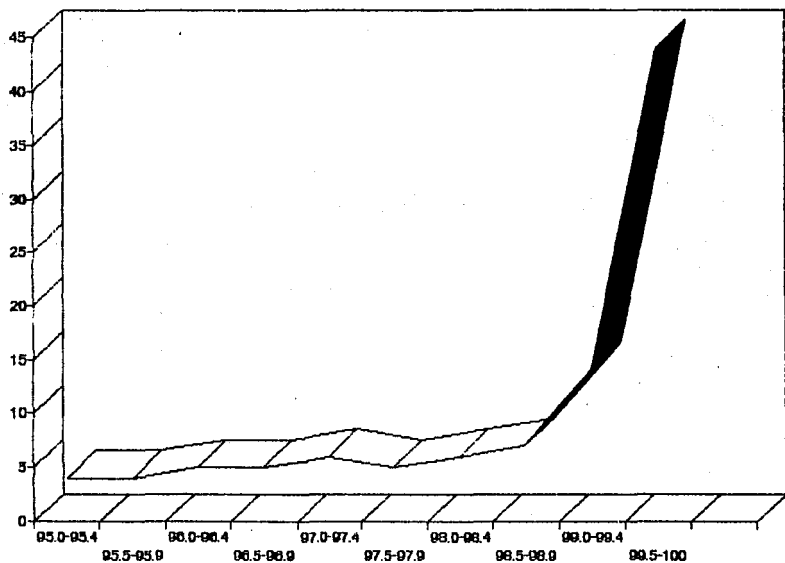
**Grafica 1. Poligono de frecuencias de los valores de referencia de la isoenzima CK-MB en 100 adultos 56 mujeres y 44 hombres aparentemente sanos, H.E.C.M.R. 1993.**

# FALLA DE ORIGEN

**TABLA 5**

Distribución de frecuencias de isoenzimas CK-MM en 100 adultos 56 mujeres y 44 hombres aparentemente sanos, (edades 20 -50 años).

Mujeres		Hombres	
frec.	% actividad	frec.	% actividad
24	100	20	100
6	99.5	2	99.5
3	99.2	3	99
3	99.1	1	98.1
1	98.9	3	98.5
2	98.7	2	98.2
2	98	1	98.1
1	97.6	1	97.7
2	97.5	1	97.6
1	97.1	1	97.4
2	96.8	2	97.3
1	96.5	3	97
1	96.3	1	96.5
2	96.1	1	95.8
2	96	1	95.2
1	95.6	1	95
1	95.5		
1	95.2		



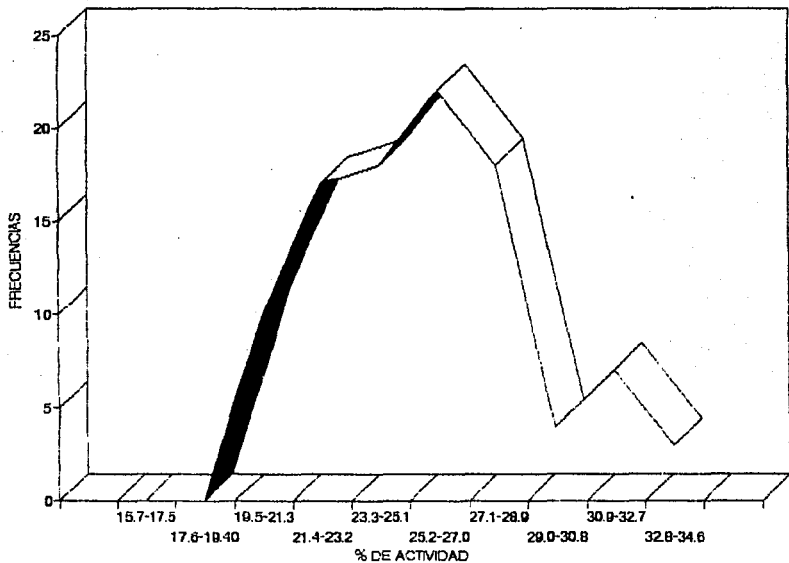
Grafica 3. Poligono de frecuencias de los valores de referencia de la isoenzima CK-MM en 100 adultos 56 mujeres y 44 hombres aparentemente sanos, H.E.C.M.R., 1993.

# FALLA DE ORIGEN

T A B L A 6

Distribución de frecuencias de isoenzimas LDH1 en 100 adultos 56 mujeres y 44 hombres aparentemente sanos (edades 20-50 años).

Mujeres				Hombres			
frec.	%act.	frec.	%act.	frec.	%act.	frec.	%act.
1	19.6	1	25.8	1	21.6	1	24.0
1	20	1	25.9	1	21.9	1	24.5
1	20.6	1	26.0	1	22.5	2	28.6
1	20.7	2	26.1	1	32.1	1	29.2
1	21.2	1	26.3	1	23.2	1	30.4
1	21.3	1	26.4	2	23.6	1	30.6
1	21.4	1	26.6	1	23.9	1	30.9
1	21.5	2	26.7	1	24.2	1	31.3
1	21.7	1	26.9	1	24.3	1	32.8
2	22.1	2	27.0	1	24.5		
3	22.3	1	27.1	1	24.6		
2	22.4	1	27.3	1	24.7		
2	22.9	1	28.3	1	25.1		
1	23.2	1	28.4	1	25.3		
1	23.6	1	28.5	1	25.4		
1	23.9	1	28.7	1	26.2		
1	24	2	29.7	1	26.3		
1	24.2	1	31.0	1	26.5		
1	24.6	1	31.2	1	26.6		
1	24.7	1	31.3	3	27.0		
1	25	1	31.6	2	27.1		
1	25.1	1	32.9	1	27.3		
2	25.6	1	34.3	1	27.6		

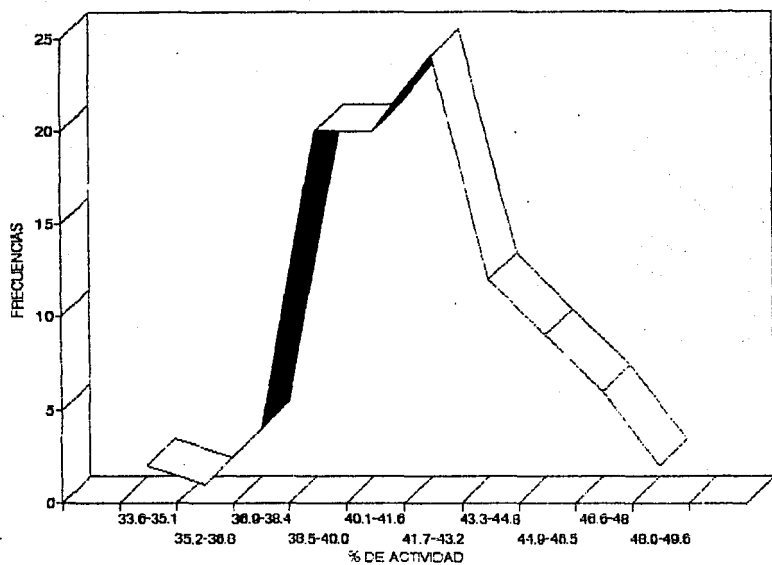


**Gráfica 5.** Polígono de frecuencias de los valores de referencia de la isoenzima LDH1 en 100 adultos 56 mujeres y 44 hombres aparentemente sanos. H.E.C.M.R. 1995.

**T A B L A 7**

**Distribución de frecuencias de isoenzimas LDH2 en 100 adultos  
56 mujeres y 44 hombres aparentemente sanos (edades 20-50 años).**

Mujeres				Hombres			
frec.	% act.	frec.	% act.	frec.	% act.	frec.	% act.
1	37.9	2	42.4	1	33.6	1	42.3
1	38.3	2	42.5	1	34.0	1	42.4
1	38.8	1	42.6	1	36.9	1	42.6
1	38.9	1	43.0	1	37.2	1	42.7
1	39.4	1	44.0	1	37.8	1	42.8
2	39.5	1	44.1	1	38.0	2	43.4
1	39.6	2	44.2	2	38.2	1	43.5
2	39.7	1	44.4	1	38.4	1	43.9
2	39.9	2	44.6	1	38.5	1	44.1
1	40.0	2	44.8	2	38.9	1	44.4
1	40.1	1	45.6	1	39.3	1	44.6
2	40.4	1	46.0	3	39.4	1	45.1
2	40.5	1	46.4	3	39.5	2	46.5
2	40.7	1	46.9	1	39.6	1	46.8
2	41.1	1	48.7	1	40.1		
1	41.3			1	40.2		
1	41.7			1	40.3		
1	41.9			1	40.4		
1	42.0			1	40.6		
2	42.1			1	41.5		
3	42.2			1	41.6		
2	42.3			1	42.1		



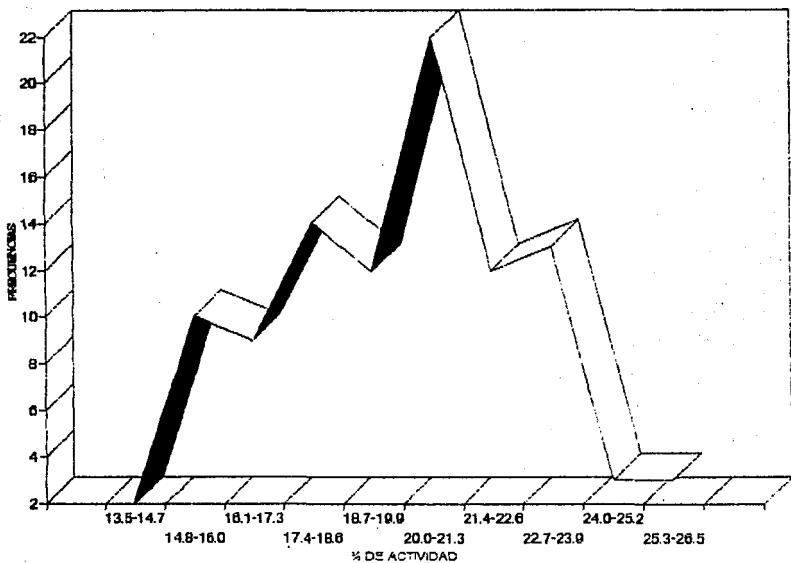
Grafica 7. Polígono de frecuencias de los valores de referencia de la isoenzima LDH2 en 100 adultos aparentemente sanos, 56 mujeres y 44 hombres, H.E.C.M.R., 1993.

**T A B L A 8**

**Distribución de frecuencias de isoenzimas LDH3 en 100 adultos 56 mujeres y 44 hombres aparentemente sanos, (edades 20-50 años).**

Mujeres				Hombres			
frec.	% act.	frec.	% act.	frec.	% act.	frec.	% act.
1	13.5	1	18.9	1	15.0	4	20.6
1	14.4	2	19.3	1	15.6	2	20.7
1	14.8	3	20.2	1	15.7	1	20.8
1	14.9	1	20.5	1	15.9	1	20.9
1	15.2	3	20.6	1	16.8	1	21.1
1	15.3	1	20.7	1	17.0	1	21.4
1	15.4	1	21.2	1	17.1	1	21.7
1	15.6	1	21.8	1	17.4	1	21.8
1	16.3	3	21.9	1	17.8	1	22.4
1	16.6	2	22.0	1	18.3	1	22.5
1	17.0	2	22.1	1	18.4	1	22.7
1	17.3	1	22.4	1	18.9	1	23.0
1	17.5	1	22.5	1	19.3	1	23.3
1	17.8	1	22.7	1	19.4	1	24.1
1	18.0	2	22.8	2	19.5	1	25.3
2	18.1	2	22.9	1	19.7		
1	18.2	1	23.4	1	19.8		
1	18.3	1	23.7	2	19.9		
1	18.5	1	23.9	1	20.0		
1	18.7	1	25.4	2	20.2		
1	18.8	1	26.1	1	20.4		



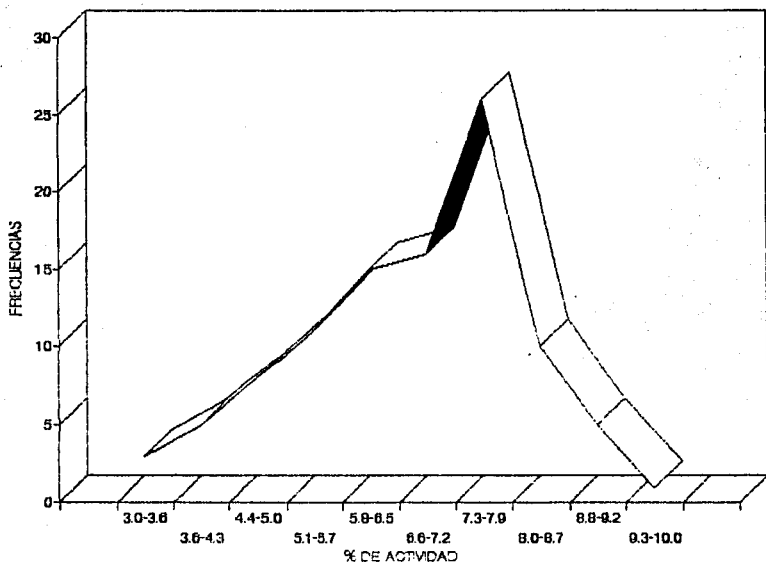


Gráfica 9. Distribución de frecuencias de los valores de referencia de la isoenzima LDH3 en 100 adultos, 56 mujeres y 44 hombres aparentemente sanos, (edades 20 - 50 años).  
H.E.C.M.R.

T A B L A 9

Distribución de frecuencias LDH4 en 100 adultos, 56 mujeres  
y 44 hombres aparentemente sanos, (edades 20 - 50 años).

Mujeres				Hombres			
frec.	% act.	frec.	% act.	frec.	% act.	frec.	% act.
1	3.0	3	7.0	2	3.6	2	8.5
2	4.0	2	7.1	1	3.9	2	8.9
1	4.2	1	7.2	2	4.6	1	9.1
1	4.3	3	7.3	1	4.8		
2	4.4	1	7.4	5	5.6		
1	4.5	3	7.5	1	5.8		
1	4.6	1	7.6	2	6.2		
1	4.9	3	7.7	2	6.4		
1	5.1	2	7.8	1	6.5		
1	5.2	1	7.9	2	6.6		
1	5.3	1	8.2	1	6.8		
1	5.4	1	8.4	2	6.9		
2	5.7	1	8.5	2	7.0		
2	6.0	1	8.6	4	7.2		
1	6.1	2	8.8	1	7.3		
2	6.2			1	7.5		
3	6.3			3	7.6		
2	6.4			1	7.7		
1	6.5			2	7.8		
1	6.6			1	8.0		
1	6.8			2	8.2		



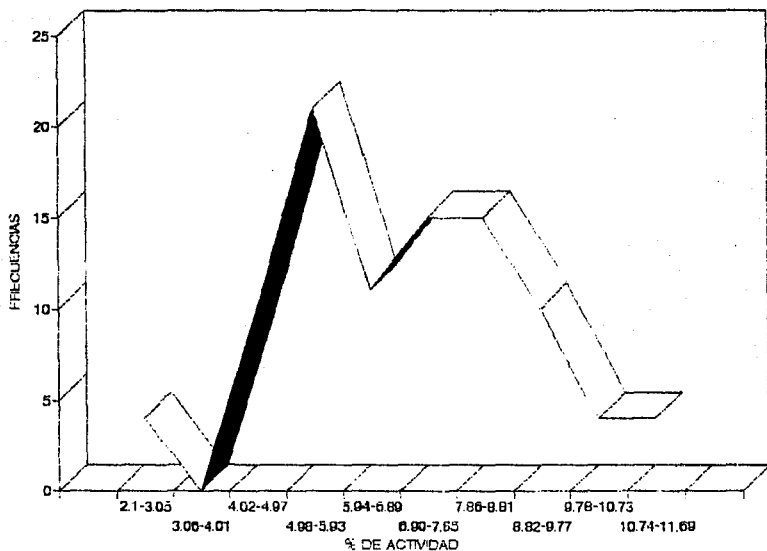
Grafica 11. Distribución de frecuencias de los valores de referencia de la isoenzima LDH4 en 100 adultos 56 mujeres y 44 hombres aparentemente sanos, (edades 20 - 50 años). H.E.C.M.R. 1993.

**T A B L A 10**

**Distribución de frecuencias de isoenzimas LDH5 en 100 adultos 56 mujeres y 44 hombres aparentemente sanos (edades 20 -50 años).**

Mujeres				Hombres			
frec.	% act.	frec.	% act.	frec.	% act.	frec.	% act.
2	2.5	1	6.3	1	2.1	1	8.0
1	2.6	1	6.6	1	2.8	2	8.1
1	2.8	3	7.1	1	2.9	2	8.2
1	3.2	1	7.4	1	3.5	2	8.5
1	3.3	1	7.5	1	4.3	2	8.8
1	4.3	3	7.6	1	4.9	2	9.3
1	4.4	1	7.8	1	5.0	1	9.4
2	4.5	1	7.9	3	5.4	2	9.5
1	4.6	1	8.0	1	5.6	2	10.6
3	4.9	1	8.2	1	5.9	1	10.8
3	5.0	1	8.3	1	6.1	1	11.0
1	5.1	1	8.4	1	6.2	1	11.6
1	5.2	1	8.5	1	6.4		
1	5.3	3	8.9	1	6.5		
1	5.4	1	9.2	2	6.7		
1	5.5	1	9.3	1	6.9		
1	5.6	1	9.7	1	7.2		
3	5.7	2	10.2	2	7.6		
2	5.9			1	7.7		
2	6.0			1	7.8		
1	6.1			1	7.9		

GRAFICA 13 VALORES DE REFERENCIA LDH5



Gráfica 13. Distribución de frecuencias de los valores de referencia de la isoenzima LDH5 en 100 adultos, 56 mujeres y 44 hombres aparentemente sanos, H.E.C.M.R. 1993.

## D I S C U S I O N   D E   R E S U L T A D O S

El estudio de isoenzimas de CK (CK-BB, CK-MB, CK-MM) y LDH (LDH1, LDH2, LDH3, LDH4, LDH5) en 100 individuos, 56 mujeres y 44 hombres, de edades entre 20 y 50 años y aparentemente en buen estado de salud según la encuesta que contestaron. Las isoenzimas fueron medidas por el método electroforético, obteniendo en % de actividad los resultados.

Aunque estos individuos eran aparentemente sanos, una vez que obtuvimos la muestra, si estaba lipémica, icterica o hemolizada no se procesaba, pues al haber ictericia probablemente habria algún problema hepático no detectado; en el caso de la hemolisis, se elevan las isoenzimas de LDH ya que los eritrocitos tienen gran cantidad de esta enzima; la lipemia interfiere con la determinación .

Una vez obtenidas nuestras muestras, se practicaron los estudios: BH, QS, TGO, TGP, LDH y CK total, si alguno de estos estudios resultaba alterado, se interrogaba nuevamente al individuo, y se le volvía a tomar la muestra y si persistia elevado el valor se descartaba, como de referencia.

Se trabajó con 100 sujetos para la obtención de los valores de referencia por 2 razones: por presupuesto ya que el material que se utiliza es muy costoso y porque el tamaño de muestra calculado fué sólo de 25 pacientes, pero para darle un mayor margen de seguridad se realizó con 100.

Al ver los valores como datos crudos, aparentemente son distintos en la isoenzima CK-MB, los valores se observan mayores en mujeres que en los hombres, contrario a lo que dice

la bibliografía (21), que indica que los valores en hombres son mayores para la CK-MB. Esto es una cuestión que se tendría que analizar, si es que la razón es fisiológica o se trata de una población de mujeres que esta sujeta a un stress cotidiano semejante al de los hombres. En las demás isoenzimas los resultados son más semejantes entre si. Sin embargo ya obteniendo los intervalos de referencia no existe diferencia significativa, por eso se cree conveniente para uso de laboratorio no separarlo por sexos.

Con respecto a las gráficas de frecuencias se encontraron curvas casi "normales" en su mayoría, a excepción de la CK-MB y la CK-MM que son asimétricas y tienen una sola cola pues el límite inferior es 0 y allí es donde empieza la curva.

Al comparar los intervalos de referencia obtenidos, con los valores obtenidos por la casa comercial que nos proporciono los reactivos la diferencia que se observa no es significativa va de 0 al 4 % en las diversas isoenzimas, pero si los comparamos con otros métodos y otros reactivos si hay diferencia.

Para corroborar que los valores obtenidos son de valor clínico se evaluó con un grupo control de pacientes que se encontraban en proceso de infarto al miocardio. Se tomaron muestras de extensión Hospitalaria y de Terapia Intensiva al azar sin controlar el tiempo de infarto (22), estas muestras se fueron pasando en cada corrida electroforética (fig. c,g, anexo 11), los resultados los agrupamos y obtuvimos un rango para pacientes infartados, las isoenzimas de

CK: CK-BB 0-7.0 %, CK-MB 7.0 - 28.0 %, CK-MM 72-90.5 %, y las isoenzimas de LDH: LDH1 14.2-60.8%, LDH2 21.1- 42.0 %, LDH3 3.25-18.9%, LDH4 1.9-11.3 %, LDH5 0-27.3 %, que al compararlos con el grupo de individuos aparentemente sanos: isoenzimas de CK: CK-BB 0 %, CK-MB 0-4.3 %, CK-MM 95.7-100% e isoenzimas de LDH: LDH1 19-32 %, LDH2 36-47 %, LDH3 14-25 %, LDH4 3.8-9.4 %, LDH5 2.0-11.0 %, se observa una diferencia estadísticamente significativa de acuerdo con la t de Student, es obvio que debe existir diferencia entre una población sana y una población enferma, sin embargo para laboratorio debe quedar claro que si se va ha captar esta diferencia, (fig. a, b,c,d,g,h,i, anexo 11). En la distribución de frecuencias no se observó ninguna curva de gauss, precisamente porque son muestras al azar y de pacientes en diferente tiempo de infarto ya que es conocido que la actividad enzimática de las diferentes isoenzimas varían según el tiempo del infarto. (2,3,4,6,14)

Con respecto a las isoenzimas de LDH los resultados son más homogéneos, la diferencia entre los datos bibliográficos y los experimentales no es significativa, van de 0 - 5 % en las diversas isoenzimas. De la misma manera la diferencia entre hombres y mujeres no es significativa.

Cuando la isoenzima LDH1 que es la isoenzima del corazón, se encuentra elevada es necesario hacer la relación entre LDH1/LDH2 y si resulta mayor que 1 (fig. h del anexo 11), tenemos presente un infarto. También ayuda a identificar otro tipo de padecimientos como son los hepáticos donde la LDH5 se



encuentra elevada, (fig.i anexo 2). (3,16,22.37).

Cabe destacar que algunos pacientes que estaban clínicamente en proceso de infarto al miocardio tenían la CK total normal y la CK-MB elevada, por lo regular cuando sucede en el Hospital, si la CK total está dentro del rango de Valores de Referencia no se realiza la fracción CK-MB. Para verificar esta incongruencia se realizaron diluciones 1:5, 1:10, 1:20, 1:50 y además se procesó un suero control obteniéndose valores reproducibles en las diluciones y el control se encontraba dentro de los valores. Uno de los motivos por los que se obtuvieron esos resultados podría ser que se trabaja con reactivos de diferentes casas comerciales por lo que no hay una relación entre la CK-total y la CK-MB. Otra causa podría ser que la CK-total se estuviera enmascarando y se captara como CK-MB (34,40).

Este hallazgo nos permite recomendar que si un paciente tiene diagnóstico de infarto deben realizarse la CK total y la CK-MB aunque la CK-total se encuentre dentro de los valores de referencia.

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

Se obtuvieron los Valores de Referencias:

CK-MM 95.7 - 100 %

CK-MB 0 - 4.3 %

LDH1 19 - 32 %

LDH2 36 - 47 %

LDH3 14 - 25 %

LDH4 3.8 - 9.4 %

LDH5 2.0 - 11.0 %

Los valores obtenidos experimentalmente son diferentes a los de la bibliografía entre un 0-1.3 % para las isoenzimas de CK y de 0-5 % para las isoenzimas LDH.

Los valores obtenidos experimentalmente de pacientes aparentemente sanos son significativamente diferentes a los del grupo control que se encuentra con Infarto al Miocardio, principalmente en sus fracciones.

La CK-MB se encuentra elevada en pacientes en infarto al miocardio aún con una CK-total normal.

## S U G E R E N C I A S

. Se sugiere que se continúe el estudio basándose únicamente en la CK-total y la CK-MB y se obtengan valores de Referencia para la CK-MB pero empleando el método enzimático con los diferentes tipos de reactivos con que se trabaja en el laboratorio, para ofrecer datos de mayor confiabilidad al personal médico.

## A N E X O 1

### PREPARACION DE REACTIVOS:

#### SOLUCION AMORTIGUADORA LDH. pH 8.2:

Disolver el contenido de un vial de amortiguador en 1000 ml de agua desionizada, almacenar la solución en un recipiente cerrado a temperatura ambiente, entre 18°C y 26°C, hasta la fecha de caducidad. No congelar ni refrigerar.

#### SUBSTRATO LDH:

Efectuar la reconstitución por adición con precaución de 2 ml de solución amortiguadora LDH. Colocar la solución sobre el vial y mezclar cuidadosamente a intervalos por 20 minutos, y antes de usarlo, para obtener una mezcla homogénea.

#### SOLUCION DE ACIDO ACETICO AL 5 %:

Mezclar 50 ml de ácido acético glacial en 950 ml de agua desionizada. Agitar la solución, se almacena a temperatura ambiente.

#### SOLUCION AMORTIGUADORA CK:

Disolver el contenido de un vial de amortiguador en 1000 ml agua desionizada. Almacenar la solución en un recipiente cerrado a temperatura ambiente entre 18°C y 26°C. Hasta la fecha de caducidad.

**SUBSTRATO CK.**

Efectuar la reconstitución por adición de 2 ml de agua desionizada. Mezclar cuidadosamente por intervalo de 20 minutos y antes de usarlo para tener una solución homogénea.

El sustrato reconstituido es estable por 24 horas y se almacena en la oscuridad entre 2°C y 6°C.

A N E X O 21

Ejemplos de los diagramas electroforéticos encontrados. Estos diagramas no ilustraran para evitar errores y leer correctamente ya que es común que en algunas ocasiones el corrimiento no sea real.

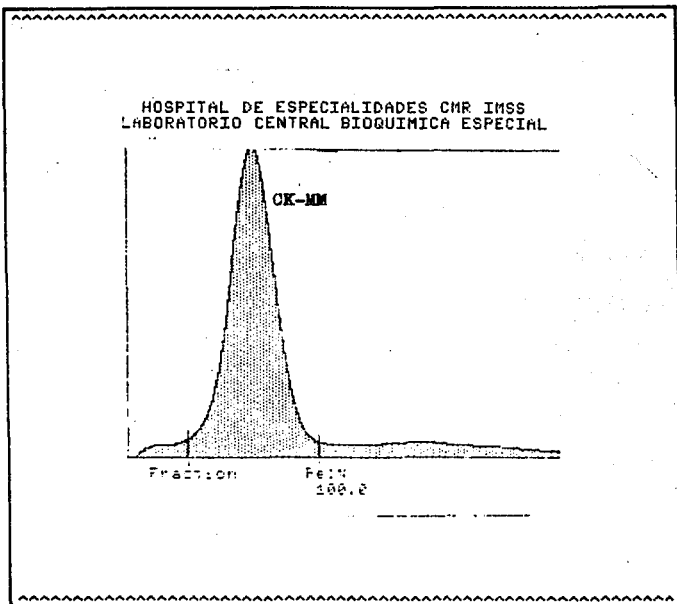


Fig. a. Separación electroforética de isoenzimas CK en suero, de sujetos aparentemente sanos donde el valor de CK-MM es el 100 % para los valores de referencia. H.E.C.M.R. 1993.

# FALLA DE ORIGEN

HOSPITAL DE ESPECIALIDADES C.M.F. IMSS  
LABORATORIO CENTRAL BIQUIMICA ESPECIAL

Patient:  
Test: CK Ge) 1 - 3      10 AGOSTO 93  
Folio:

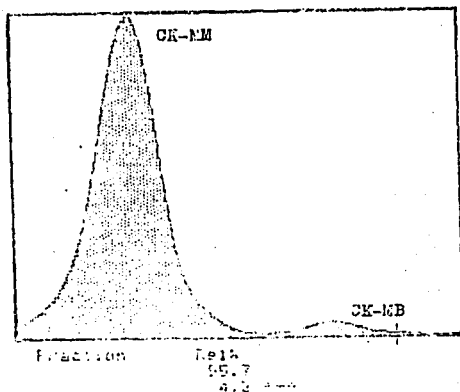


Fig. b. Separación electroforética de isoenzimas CK en suero, de sujetos aparentemente sanos donde el valor de CK-MM es 95.7 % y CK-MB 4.3 % para los valores de referencia. H.E.C.M.R., 1993.

HOSPITAL DE ESPECIALIDADES CMR IMSS  
LABORATORIO CENTRAL BIOQUIMICA ESPECIAL

Patient:  
Test: CK Gel 1 - 8 17 AGOSTO 93  
Folio

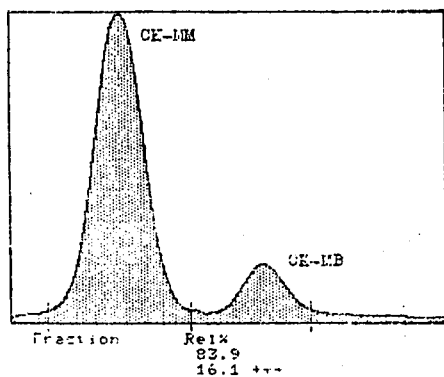


Fig. c. Separación electroforética de isoenzimas CK en suero, de sujetos con Infarto al Miocardio del grupo control donde la CK-MB esta elevada. H.E.C.M.R., 1993.



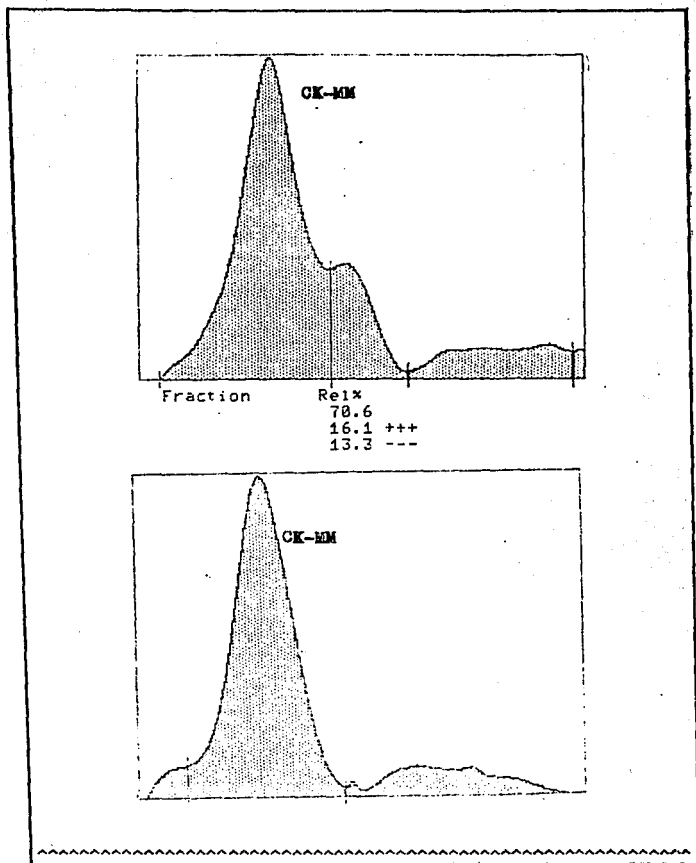


Fig. d. Separación electroforética de isoenzimas CK en suero, con interferencias en el corrimiento, errores de técnica, estos valores no fueron considerados para los valores de referencia. H.E.C.M.R. 1993.

# FALLA DE ORIGEN

Fig. e. Geles después del corrimiento electroforético de isoenzimas LDH en sujetos aparentemente sanos para los valores de referencia. H.E.C.M.R. 1993.

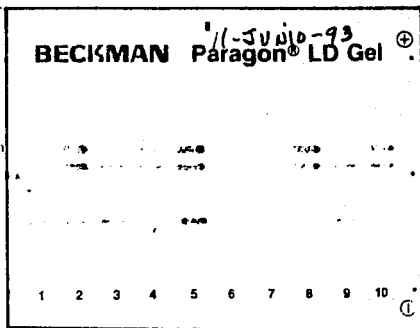
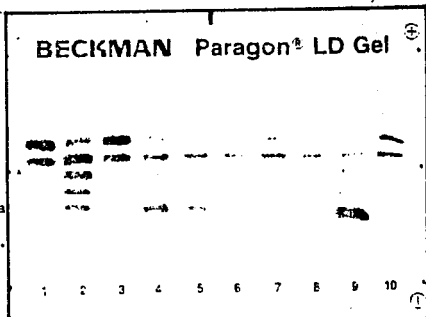


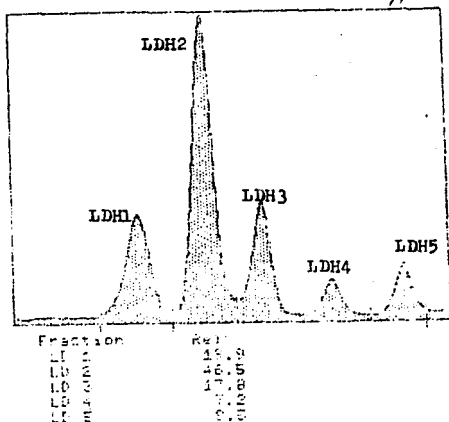
Fig. f. Geles después del corrimiento electroforético de isoenzimas LDH, para sujetos enfermos. H.E.C.M.R. 1993.



# FALLA DE ORIGEN

HOSPITAL DE ESPECIALIDADES CMR IMSS  
LABORATORIO CENTRAL BIOQUIMICA ESPECIAL

Patient: \_\_\_\_\_  
Test: LD Gel 1 - 6      26 Julio 1993  
Folio \_\_\_\_\_ #



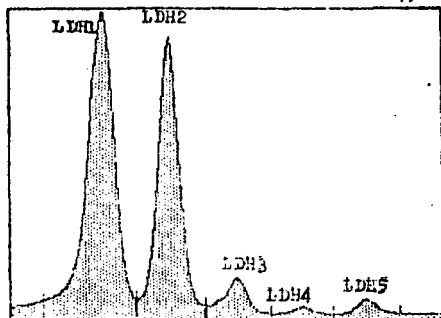
LDH/LDH: 0.43

Fig. 9. Separación electroforética de isoenzimas LDH en suero, de sujetos aparentemente sanos para los valores de referencia H.E.C.M.R. 1993.

# FALLA DE ORIGEN

HOSPITAL DE ESPECIALIDADES LMR IMSS  
LABORATORIO CENTRAL BIOQUIMICA ESPECIAL

Patient:  
Test: LD Gel 1 - 3      16 AGOSTO 93  
Folio



Fraction	Rel% +++	---
LD 1	50.7	+++
LD 2	35.9	
LD 3	6.8	---
LD 4	2.6	---
LD 5	3.9	

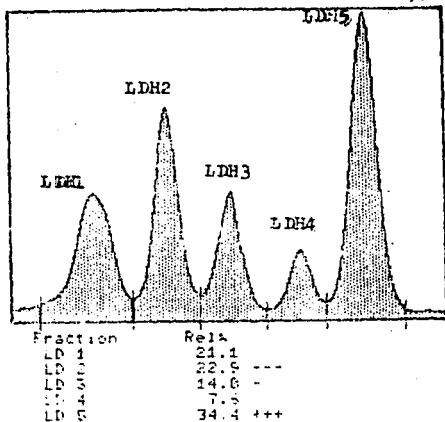
LD1/LD2: 1.41

Fig. h. Separación electroforética de isoenzimas LDH en suero, de sujetos con Infarto al Miocardio, del grupo control. H.E.C.M.R. 1993.

# FALLA DE ORIGEN

HOSPITAL DE ESPECIALIDADES CNR IMSS  
LABORATORIO CENTRAL BIOQUIMICA ESPECIAL

Patient:  
Test: LD Gel 1 - 4 16 AGOSTO 93  
Folio



LD1:LD2 0.92

Fig. i. Separación electroforética de isoenzimas LDH en suero, de sujetos con problemas hepáticos, grupo de enfermos. H.E.C.M.R. 1993.

A N E X O III

FORMULAS ESTADISTICAS

MEDIA ( $\bar{X}$ ) (media aritmética o promedio)

$$\bar{X} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n}$$

VARIANZA ( $s^2$ ) Y DESVIACION ESTANDAR ( $s$ )

$$s^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{X})^2}{n-1}$$

$$s = \sqrt{s^2}$$

RANGO (R) (amplitud)

$$R = x_{\max} - x_{\min}$$

INTERVALO DE CLASE

$$IC = \sqrt{n}$$

AMPLITUD DE CLASE

$$\frac{R}{N}$$

**INTERVALO DE REFERENCIA.**

$$\text{Fractil } 0.025 = \bar{X} + 1.96 s$$

$$\text{Fractil } 0.975 = \bar{X} + 1.96 s$$

**PARA LA t DE STUDENT.**

$$t = \frac{\bar{X}_A - \bar{X}_B}{\sqrt{\frac{(N_A - 1)s_A^2 + (N_B - 1)s_B^2}{N_A + N_B - 2}} \left( \frac{1}{N_A} + \frac{1}{N_B} \right)}$$

**PARA EL TAMAÑO DE MUESTRA:**

$$N = \left[ \frac{Z_{\alpha/2} s}{e} \right]^2$$

**e** = error máximo a tolerar

**s** = desviación estándar

**Z** = límite asociado a la confianza deseada = 1.96

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

1. Angel G. Interpretación Clínica del laboratorio. Buenos Aires: Panamericana. 1980; 284-285.
2. Barnett Ror N. Estadística en el laboratorio Clínico España: Revarte. S.A. 1983; 87-101.
3. Beckman Instruments: Appraise Densitometro y Operators manual. Brea California: Beckman Instruments y Inc. 1991.
4. Boys J. and Lacher D. Multi-stabe Gaussian Transformation Algorithm for Clinical Laboratory Dada. Clin. Chem., 1982; 28 (8). 1735-1741.
5. Bohinski Robert C. Bioquímica. México; Fondo Educativo Interamericano, S. A. 1978; 153-178.
6. Conn Eric y Stumpf P.) Bioquímica Fundamental. México: Limusa. 1977; 205-232.
7. Charis Eng. A. Elevación de los Niveles de Creatincinasa y Neoplasia. Universidad de Harvard. Revista. 55-58.
8. Ciba Corning. Sistemas electroforéticos para CK y LDH, Isoenzimas CK Y LDH. México: 1992; 21-30
10. Federación Internacional de Química Clínica. Concepto de los valores de Referencia. Noruega: Departamento de Química Clínica, 1986; 297-303.
11. Federación Internacional de Química Clínica. Selección de Individuos para la producción de Valores de Referencia. Noruega: Departamento de Química Clínica y Servicio de Bioquímica, 1988; 435-478.
12. Federación Internacional de Química Clínica. Preparación de individuos y obtención de especímenes para la producción de Valores de Referencia. Noruega: Departamento de Química Clínica y Servicios de Bioquímica, 1988; 603-621.
13. Federación Internacional de Química Clínica. Presentación de los valores observados relacionados con los valores de referencia. Noruega. Departamento de Química Clínica. 1987; 453-471.
14. Federación Internacional de Química Clínica. Tratamiento Estadístico de Valores de Referencia obtenidos. Determinación de Límites de Referencia. Noruega: Departamento de Química Clínica, 1987; 453-471.
15. Flores Benitez F. Probabilidad y Estadística. México: E.S.I.Q.I.E. I.P.N., 1993; 79-80



16. Giorgio J. Determination of Serum Lactic Dehydrogenase Isoenzymes by Use of the "Diagnostest" Cellulose Acetate Electrophoresis System. Clin. Chem., 1971; 7(4). 326-328.
17. Giorgio J. Comparison of Methods for Estimating Normal Range. Clin. Chem., 1971; 17(4). 281-284.
18. Gogchaba PH D. Nathan an Burk. Electrophoretic Techniques in Today's Clinical Laboratory. Clinics Laboratory Medicine. 1986; 6(3) 403-425.
19. Hamilton H. Diagnóstico Clínico. México: Interamericana S.A., 1985; 113-125.
20. Henry J. Wilkinson. The Diagnostic Value of LDH Isoenzyme in Clinical Medicine. Pepper Laboratory of Clinical Medicine University of Pennsylvania. California: Beckman Instruments Inc, 1968; 1(1): 1-7.
21. Henry R. y Colbs. Química Clínica, Principios y Técnicas Barcelona: Jims, 1980; 89-104; 340-360; 834-839; 822-832.
22. Kaplan A. Pesca L. Química Clínica. Buenos Aires: Panamerica, 1990; 914-922; 894-902; 1203-1216;.
23. Koepice J. Análisis de Laboratorio Clínico para Diagnóstico Barcelona: Panamericana, 1987; 30-31.
24. López Silva S. Valores de Referencia para la glucosa, Urea Creatinina, ácido úrico, hemoglobina y hematocrito en una población adulta. Enlace Químico. Órgano Oficial del Colegio de Químicos del Estado de Guerrero, A.C., enero-abril 1992; 1(1).
25. Lott John A. Creatine Kinase Isoenzymes. Clinics in Laboratory Medicine. 1986; 6(3) 547-567.
26. Mac Callister. Las enzimas y la actividad enzimática. México: Manual Moderno, 1975; 73-78
27. Mocklm arnold y Strasse. Las Determinaciones Enzimáticas en el Diagnóstico Clínico, Alemania: Beckman, 1977; 9-24.
28. Moreno Altamirano y Cano Valle. Epidemiología Clínica. México: Interamericana Mc Graw-Hill, 1994; 99-115; 260-274
29. Murali. Control de Calidad en los Laboratorios Clínicos Barcelona: Reverte S.A. 1982; 135-137.
30. Pérez Gavilán. Evaluación de la Enzima Creatinafosfocinasa durante 100 casos; de infarto al Miocardio. Tesis. México: Facultad de Química. UNAM. 1972; 24-45.

31. Passey Richard. Evaluation of the Beckman "System TR Enzyme Analyzer". Clinical Laboratories University of Texas Medical Branch Galveston, Tex. 1975; 21(8) 1107- 1112
32. Roe Charles. Combined isoenzyme analysis in the diagnosis of myocardial injury: Application of electrophoretic methods for the detection and quantitation of the creatine phosphokinase MB isoenzyme. Chicago: J. Lab Clin. Med. 1972. 80(4). 577-587.
33. Red Alled.J. Richard. Influence of statistical Method used: on the resulting Estimate of normal Range Clin. Chem., 1971; 17(4). 275-284.
34. Sánchez Rodríguez M. Breve Revisión sobre enzimología Clínica. México: FES Zaragoza, 1991; 109-118.
35. Sánchez Rodríguez M. Manual de Practicas de Laboratorio de Análisis de Bioquímica Clínica II. México: UNAM FES Zaragoza, 1991; 109-118.
36. Santiago Prieto, Silvia Amich. Laboratorio Clínico, Principios Generales. México: Interamericana, 1993; 30-120
37. V. Niffo Hipolito. Garantía de Calidad en el laboratorio Clínico. U.S.A.: Oficina sanitaria panamericana, 1992; 46-60
38. Vilchis Villaseñor Carlos Programa Nacional de Adiestramiento en Control de Calidad. México: Instituto Mexicano de Control de Calidad A.C., 1987; 5/0 -5/8.
39. Viadutiu Adrian O. Increased Creatine Kinase (CK) MB In patients with "Normal" Total CK activity suspected of acute myocardial infarction. Journal of medicine, 1989; 20(1). 73-80.
40. Wolf. Paul L. M. Interpretation of Lactate Dehydrogenase Isoenzyme, Clinics in Laboratory Mediciner 6(3) 541-545.
41. Wolf. Paul L. Common Causes of False Positive CK-MB test for Acute Myocardial Infarction. Clinics in Laboratory Medicine, 1986, 6(3) 577-5812.
42. W. Gerhardt, L.Ljungdahl. Serum Enzymes at Suspected acute Myocardial Infarction. Diagnostica Merck. Bit Verlag, 1988; 1-10.
43. W. Stein. Laboratory Diagnosis of Acute Myocardial Infarction. Germania: Diagnostica Merck, Bit Verlag. 1987; 1-45.