

24/8



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Escuela Nacional de Estudios Profesionales  
"ZARAGOZA"

RECIBIDA EN LA SECRETARIA DE EDUCACION PUBLICA  
EL 24 DE AGOSTO DE 1968

EVALUACION DE UN METODO INMUNOQUIMICO  
PARA DETERMINAR MIOGLOBINA EN INFARTO  
AGUDO AL MIOCARDIO Y SU COMPARACION  
CON LAS ENZIMAS SERICAS LDH, TGO, TGP,  
CPK Y FRACCION CK-MB.

## T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO  
P R E S E N T A :  
SILVIA FERNANDEZ PEREZ

Director de Tesis:

Q.F.B. Francisco Acuña Moreno  
Q.F.B. Leticia Hernández Corona

**TESIS CON  
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.

# I N D I C E

	Pág.
TITULO -----	1
INTRODUCCION -----	2
HIPOTESIS -----	5
OBJETIVOS -----	6
GENERALIDADES -----	7
1.0.-Mioglobina -----	7
1.1.-Estructura de la mioglobina -----	7
1.2.-Función y localización de la mioglobina -----	14
1.3.-Diferencias entre mioglobina y hemoglobina -----	15
1.4.-Curva de saturación de oxígeno en la molécula de mioglobina -----	16
2.0.-Aspectos inmunológicos -----	18
2.1.-Inmunoquímica -----	18
2.2.-Reacciones de aglutinación -----	18
3.0.-Conceptos básicos enzimáticos -----	20
MATERIAL Y METODOS -----	27
Desarrollo -----	28
Precauciones especiales -----	28
Determinación fotométrica de la actividad de la subunidad CK-B o de la isoenzima CK-MB de creatín- cinasa de base inmunológica -----	30
Determinación fotométrica de lactato deshidrogenasa (LDH) -----	32
Determinación fotométrica de transaminasa glutámico oxalacético (TGO) -----	33
Determinación fotométrica de transaminasa glutámico pirúvico (TGP) -----	34
Determinación fotométrica de Fosfocinasa de creatina (CPK) -----	36

Determinación inmunoquímica de mioglobina sérica -----	38
RESULTADOS -----	40
DISCUSION DE RESULTADOS -----	52
CONCLUSIONES -----	56
PROPUESTAS Y/O RECOMENDACIONES -----	58
ANEXOS -----	60
a) Obtención de la mioglobina humana -----	61
b) Preparación del antisuero de mioglobina -----	61
c) Preparación de la mioglobina -----	62
d) Valoración semicuantitativa de mioglobina sérica mediante series de dilución -----	63
e) Valores de referencia de las enzimas séricas en estudio -----	63
f) Significado de los diferentes diagnósticos mencio- nados -----	64
BIBLIOGRAFIA -----	65

Evaluación de un método inmunoquímico para determinar Mioglobina en Infarto agudo al miocardio y su comparación con las enzimas séricas LDH, TGO, TGP, CPK y fracción CK-MB.

## INTRODUCCION

El infarto agudo al miocardio es una necrosis miocárdica debida a la oclusión de una arteria por un trombo. El infarto puede presentarse aún sin oclusión vascular completa en aquellos casos en que el flujo coronario se encuentra disminuido transitoriamente, tal es el caso en el choque postoperatorio o traumático, las hemorragias gastrointestinales, la hipotensión por cualquier causa o la deshidratación.

En más de una tercera parte de los casos de infarto al miocardio hay dolor súbito pero sin desarrollo instantáneo de dolor compresivo en la región anterior del tórax.

El dolor del infarto puede presentarse durante el reposo (aún en el sueño) o con el ejercicio. El dolor es similar a la angina en cuanto a la localización e irradiaciones sólo que es más intenso, no cede con el reposo y aumenta en intensidad progresivamente en unos cuantos minutos. El dolor puede durar horas sino se administran narcóticos y con frecuencia es insoportable. El paciente presenta sudación fría, se siente débil y aprensivo, se mueve buscando una posición que calme el dolor y prefiere no estar acostado en cama. Pueden acompañar al cuadro mareos, tos, respiración sibilante, náusea, vómito, distensión abdominal y fiebre.

Cabe mencionar que del 5 al 15% de los casos de infarto se presentan sin dolor o su intensidad es mínima y la presencia de complicaciones inmediatas las opacan.

El diagnóstico clínico preliminar del infarto agudo al miocardio se basa comúnmente en los resultados del electrocardiograma, que con frecuencia no son confiables durante las fases tempranas. Las modificaciones del electrocardiograma son características en fases tardías. Debe insistirse, sin embargo, que en ocasiones, no muestra alteraciones o estas son poco significativas. Por lo tanto la ausencia de datos electrocardiográficos no excluye de ninguna manera el diagnóstico.

La contribución bioquímica durante el infarto se basa general

mente en una liberación exagerada de enzimas de las células del tejido cardíaco, como son; transaminasa glutámico oxalacético (TGO), deshidrogenasa láctica (LDH) y creatincinasa (CPK). Ninguna de estas enzimas es específica del tejido cardíaco y sus actividades pueden elevarse en una gran variedad de padecimientos. Estas enzimas alcanzan sus niveles séricos máximos muchas horas después del inicio del dolor y también como en el caso del electro cardiograma el diagnóstico bioquímico temprano no es factible.

Es por lo anterior que se pretende la búsqueda de una mayor sensibilidad y especificidad en una prueba para el diagnóstico del infarto a miocardio, esta búsqueda esta centrada alrededor de los componentes específicos del tejido cardíaco que poseen un peso molecular de aproximadamente 10,000 daltons, los cuales pueden pasar rápidamente a la circulación y realizar entonces la deter minación de éstos en el laboratorio.

La mioglobina es una hemoproteína presente en el músculo esquelético y cardíaco de vertebrados, los cuales contienen aproximadamente de 2 a 3 mg/g de tejido húmedo. Tiene un peso molecular de 17,800 daltons, esta presente en accidentes como traumatismos, infarto a miocardio, intoxicación por fármacos y ejercicio exagerado donde las células musculares son destruidas.

La mioglobina puede ser eliminada rápidamente por orina debido a su peso molecular pequeño y a que se encuentra poco ligada a proteínas séricas, aproximadamente 20 mg/dl, es una proteína similar a la hemoglobina, que funciona para transportar oxígeno de la sangre al líquido intersticial en cada una de las células musculares.

La mioglobina y la hemoglobina son ejemplos de proteínas conjugadas constituidas por una proteína enlazada a un grupo prostético orgánico y a un átomo metálico.

Cuando se presenta un daño grave del tejido muscular estriado, son liberadas cantidades considerables de mioglobina al tejido ex-

tracelular para entrar por último a sangre y eliminarse por riñón. Normalmente no se encuentra en plasma, ya que al ser liberada de tejido muscular es eliminada por orina. Tiene una gran afinidad por el oxígeno, almacenándole y cediéndolo a la fibra muscular cuando la presión parcial de oxígeno celular es relativamente baja. Así mismo es responsable de la coloración roja del tejido muscular y por hidrólisis da lugar a la aparición de un 96% de globina y 4% de hierro, abunda en los músculos que se contraen con rapidez. La detección de la mioglobina y su diferenciación con la hemoglobina en fluidos biológicos es posible mediante procedimientos electroforéticos y anticuerpos específicos. Es mediante este último procedimiento que se pretende caracterizar a la mioglobina para así determinar lo más rápido posible el establecimiento del infarto a miocardio; ya que como se mencionó anteriormente los datos electrocardiográficos y enzimáticos no son capaces de diagnosticarlo tempranamente.

### HIPOTESIS

La determinación inmunoquímica de mioglobina sérica constituye el método de elección para el diagnóstico de infarto agudo al miocardio, ya que proporciona resultados positivos en fases tempranas, lo que no es posible con las enzimas séricas.

OBJETIVOS

- A) Aplicar el método inmunoquímico para determinar mioglobina y evaluar su especificidad en el diagnóstico del infarto agudo al miocardio.
  
- B) Establecer los valores de referencia de mioglobina sérica para la población en estudio.
  
- C) Establecer la correlación entre los valores de mioglobina sérica por el método inmunoquímico con los valores enzimáticos de: LDH, TGO, TGP, CPK e isoenzima CK-MB.
  
- D) Diagnosticar el infarto agudo al miocardio mediante las siguientes determinaciones: mioglobina sérica, isoenzima CK-MB, CPK, TGO, TGP y LDH.

## GENERALIDADES

### 1.- MIOGLOBINA

#### 1.1.- ESTRUCTURA DE LA MIOGLOBINA

La primera información que se obtuvo de la mioglobina, fué a partir de los trabajos con rayos X efectuados por J.C. Kendrew y sus colaboradores en 1960, fué la primer proteína de la que se obtuvo su estructura completa (31).

Kendrew y Perutz obtuvieron con este trabajo el premio Nobel en 1962. La proteína consta de una sola cadena polipeptídica de 153 residuos amincácidos, los cuales están coordinados con un grupo prostético HEMO (es decir un átomo de hierro unido a un grupo tetrapirrólico). Debido a esto se dice que la mioglobina es una hemoproteína, (figura # 1).

El grupo HEMO es un sistema planar y voluminoso, que consta de cuatro unidades pirrol unidas por puentes metenil (=C-). El átomo de hierro con un número de coordinación de seis, esta localizado al centro del tetrapirrol y forma un complejo con cada uno de los cuatro nitrógenos del grupo pirrol.

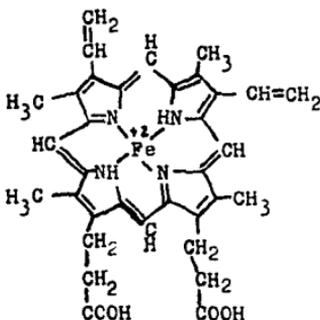


Figura No. 1.- Estructura del grupo HEMO. (3).

El hierro se encuentra en estado ferroso ( +2 ). Hay una firme evidencia de que el grupo HEMO forma un complejo con la cadena polipeptídica (globina) a través de dos residuos específicos de histidina ocupando los sitios de coordinación 5° y 6° del átomo de hierro, (figura # 2).

Cuando la mioglobina se oxigena, el oxígeno desplaza a los residuos de histidina y de esta forma es transportado en el sexto sitio de coordinación del hierro, como se observa en la figura # 3.

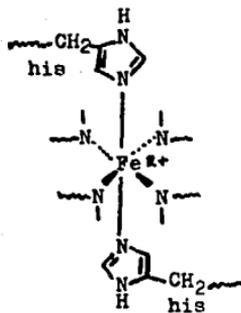


figura # 2  
Complejo que forma el grupo HEMO con la cadena de globina, a través de dos residuos específicos de histidina, (3).



Figura # 3  
Oxigenación de la molécula de mioglobina, (18).

Los diagramas de difracción de la mioglobina cristalina que contiene casi 2500 átomos, están constituidos por casi 25000 reflexiones. El análisis mediante rayos X de la estructura de la mioglobina tuvo efecto en dos etapas. En la primera que se completó en 1957, los resultados se calcularon para una resolución de  $6 \text{ \AA}$ , logro que requirió del análisis preciso de 400 manchas de difracción. Este grado de resolución es insuficiente para revelar las posiciones exactas de los átomos individuales o de los grupos funcionales de la molécula, pero indica de que modo se halla plegada la molécula de mioglobina, (Figura # 4). El esbozo de la cadena peptídica aparece como una "salchicha" alargada, plegada de modo irregular. Esta ordenación plegada de la mioglobina es su estructura terciaria. En una segunda etapa del análisis por rayos X de la mioglobina se realizó hasta una resolución de  $2.0 \text{ \AA}$ , se requirió el análisis de 10000 reflexiones y el empleo de métodos de computación electrónicos de gran velocidad. Este nivel de resolución fue lo suficientemente elevado para revelar el contorno del esqueleto y la mayor parte de los grupos R. Como se ilustra en la figura # 9, este modelo mostró la localización exacta de los esqueletos carbonados de la cadena peptídica y de todos los grupos R. De esta manera se identificaron casi todos los aminoácidos de las cadenas y se encontró que concordaban con la secuencia determinada por métodos químicos.

Se observó que el esqueleto de la mioglobina está constituido por ocho segmentos relativamente rectos, separados por curvaturas. Cada segmento está constituido por una porción de hélice alfa, el más largo consta de 23 aminoácidos y el más corto de siete, todos ellos en sentido dextrosum. Cerca del 70% de los aminoácidos presentes en la molécula se hallan en estas regiones helicoidales, cifra que confirma los resultados de las medidas de rotación óptica de las disoluciones de hemoglobina, (14).

De gran importancia es el estudio realizado por Perutz, Kendrew y Watson con respecto a la naturaleza de las interacciones respon-

sables de la integridad de la mioglobina, (18).

Figura # 4

Conformación de la molécula de mioglobina deducida de datos de baja resolución ( $6 \text{ \AA}$ ), (14).



Figura # 5

Estructura de la mioglobina deducida de los datos por rayos X de alta resolución ( $2 \text{ \AA}$ ), (14).



Se estudiaron las estructuras primarias de 18 cadenas de globina diferentes (incluyendo de la mioglobina y de la hemoglobina), de estos 150 residuos (más o menos), sólo nueve eran invariables en todas estas cadenas de globina. De estos nueve residuos, cuatro están directamente unidos al grupo HEMO y cuatro más están en la cadena generalmente en las esquinas de las hélices.

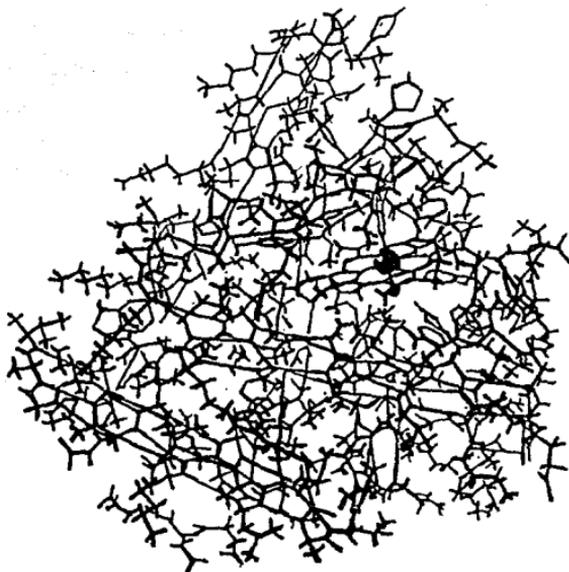


Figura # 6

Modelo completo de la molécula  
de mioglobina, (18).

A continuación se indica el contenido porcentual de aminoácidos de la mioglobina humana, (34).

Aminoácido	%
Alanina -----	5.7
Amida NH <sub>3</sub> -----	1.1
Arginina -----	2.7
Ac. aspártico -----	9.2
Cistina -----	0
Cisteína -----	0
Ac glutámico -----	17.3
Glicina -----	6.3
Histidina -----	8.2
Hidroxiprolina -----	0
Hidroxilisina -----	0
Isoleucina -----	5.0
Leucina -----	12.2
Lisina -----	16.1
Metionina -----	2.5
Fenilalanina -----	6.2
Prolina -----	4.0
Serina -----	4.6
Treonina -----	2.9
Triptofano -----	3.6
Tirosina -----	2.4
Valina -----	5.3

La molécula de mioglobina está ordenada de tal modo que proporciona un acercamiento compacto con el grupo hemo. Específicamente ocho segmentos helicoidales de longitud variable están entrecruzados con segmentos enrollados al azar alrededor del grupo hemo. Kendrew resumió las características de la molécula de mioglobina en los siguientes puntos:

- 1) La molécula es compacta y contiene en su interior cuatro moléculas de agua.
- 2) Casi todos los grupos polares (Lys, Arg, Glu, Asp, Hys, Ser, Thr, Tyr, Try,) están en la superficie externa de la molécula y por consiguiente expuestas al solvente.
- 3) Las moléculas de agua se unen a todos los grupos R polares que se encuentran en la superficie y por lo tanto están hidratados.
- 4) El interior de la molécula está compuesta de residuos no polares o hidrofóbicos y de esta manera están protegidos de la exposición del agua.
- 5) Los restos de prolina sólo aparecen en las curvaturas, que también contienen algunos aminoácidos de los que se sabe no forman enrollamientos helicoidales fácilmente, tales como isoleucina y la serina, así como aminoácidos que poseen cadenas laterales de carga semejante a  $\text{pH} = 0$ .
- 6) El sitio de coordinación del átomo de hierro está ocupado por un residuo de histidina. El 6° sitio de coordinación, en el otro lado de la estructura tetrapirrólica, está probablemente ocupado por la molécula de agua que es quizás desplazada por el oxígeno cuando la mioglobina es transformada a oximioglobina.

Se dice que la molécula de mioglobina es una proteína atípica desde dos puntos de vista: Posee un contenido relativamente alto de hélice alfa (77%) y, carece completamente de puentes disulfuro o grupos sulfhidrilo libres.

## 1.2 FUNCION Y LOCALIZACION DE LA MIOGLOBINA

Los músculos de todos los vertebrados e invertebrados contienen mioglobina. La mejor fuente de esta proteína se encuentra en los mamíferos submarinos, tales como: ballena, foca, delfín, donde hay grandes concentraciones; de esta manera almacenan suficiente oxígeno para mantenerse bajo el agua por largos períodos. En los delfines y en las focas, los músculos contienen un 3.5 y 7.7% de mioglobina respectivamente; también los músculos de las alas de las aves son ricas en esta proteína, (34). Su concentración en algunas fibras musculares es mayor de 0.8%. Es una hemoproteína parecida en su estructura y función a la hemoglobina (6).

La función de la mioglobina es el almacenamiento y transporte de oxígeno se une directamente al átomo de hierro (ferroso +2) al centro de la estructura hemo.

La distribución de la mioglobina refleja su importante función, esta localizada en ambos músculos, el esquelético y el cardíaco. Su concentración varía de músculo a músculo y de especie a especie. En el hombre esta presente en cantidades apreciables en el músculo cardíaco y es probablemente de escasa importancia en el músculo esquelético. Los músculos contienen un promedio de 700mg/100g de peso seco (31).

Cuando se escasea el oxígeno del músculo esquelético, se utiliza el que se encuentra almacenado en la mioglobina. El transporte de oxígeno de la sangre a las fibras contráctiles es aumentado por la interferencia de la mioglobina, la cual absorbe oxígeno para que posteriormente este sea utilizado por los sistemas enzimáticos respiratorios de las células con gran afinidad al oxígeno (18).

La mioglobina no solamente actúa almacenando oxígeno, sino también aumenta la velocidad de difusión del oxígeno a través de la célula (14).

### 1.3 DIFERENCIAS ENTRE MIOGLOBINA Y HEMOGLOBINA

#### MIOGLOBINA

- \_\_\_ Hemoproteína presente en las fibras musculares.
- \_\_\_ Se sintetiza en sarcoplasma de fibras musculares.
- \_\_\_ Peso molecular 17,500 daltons.
- \_\_\_ Un grupo hemo por cada molécula de mioglobina.
- \_\_\_ Una sola cadena polipeptídica.
- \_\_\_ Mayor afinidad por el oxígeno.
- \_\_\_ Una molécula de mioglobina está unida a una molécula de oxígeno.
- \_\_\_ Soluble en solución de sulfato amónico saturada (80%).

#### HEMOGLOBINA

- \_\_\_ Hemoproteína presente en células rojas sanguíneas.
- \_\_\_ Se sintetiza en precursores de eritrocitos.
- \_\_\_ Peso molecular 67,000 daltons.
- \_\_\_ Cuatro grupos hemo por cada molécula de hemoglobina.
- \_\_\_ Cuatro cadenas polipeptídicas por cada molécula.
- \_\_\_ Menor afinidad por el oxígeno.
- \_\_\_ A una molécula de hemoglobina están unidas cuatro moléculas de oxígeno.
- \_\_\_ Insoluble en solución saturada de sulfato amónico (80%).

#### 1.4. CURVA DE DISOCIACION DE OXIGENO EN LA MOLECULA DE MIOGLOBINA

Como ya se mencionó, la mioglobina es capaz de enlazar oxígeno reversiblemente. La curva de disociación de oxígeno es una hipérbola rectangular bien desplazada hacia arriba y hacia la izquierda respecto a la correspondiente hemoglobina. Las afinidades de las siguientes proteínas por el oxígeno guardan el siguiente orden: oxidasa de citocromo > mioglobina > hemoglobina. Como consecuencia, la mioglobina puede aceptar oxígeno de la hemoglobina y almacenarlo en la célula muscular para cederlo a la oxidasa de citocromo cuando el suministro de oxígeno llega a ser limitado. En el músculo en reposo el oxígeno permanece probablemente ligado a la mioglobina. Durante la concentración, cuando la demanda de oxígeno es máxima y dado que la presión parcial de oxígeno intracelular decae, el oxígeno se disocia de la mioglobina y es utilizado en oxidaciones (8).

Es notable el hecho de que la configuración terciaria de las cadenas alfa y beta de la hemoglobina sean muy semejantes a la única cadena de la mioglobina., a esto se debe su semejanza en su capacidad de unirse al oxígeno reversiblemente. Este parecido es debido al considerable número de restos aminoácidos idénticos presentes en las posiciones críticas de la secuencia aminoácida. En estas dos hemoproteínas la quinta posición del grupo hemo esta ocupada por el oxígeno o bien por otros ligandos como: CO, CN, etc.

En la mioglobina el átomo de hierro no experimenta cambio en la valencia, cuando se une o pierde oxígeno permanece en su estado Fe(II), pero puede oxidarse en su átomo de hierro (III) por agentes oxidantes como ferricianuro y experimentan cambio de color desde rojo pardo. Este producto recibe el nombre de meta-mioglobina, y este último no actúa como transportador de oxígeno.

En la figura # 8, se ilustra la curva de saturación de oxígeno en la molécula de hemoglobina y observamos que muestra una relación

sigmoideal, mientras que la mioglobina es una curva hiperbólica, esto es debido a que la hemoglobina posee cuatro cadenas polipeptídicas y cuatro grupos hemo, cada una de las cuales puede unirse a una molécula de oxígeno, mientras que la mioglobina sólo posee una cadena polipeptídica y puede unirse solamente a una molécula de oxígeno.

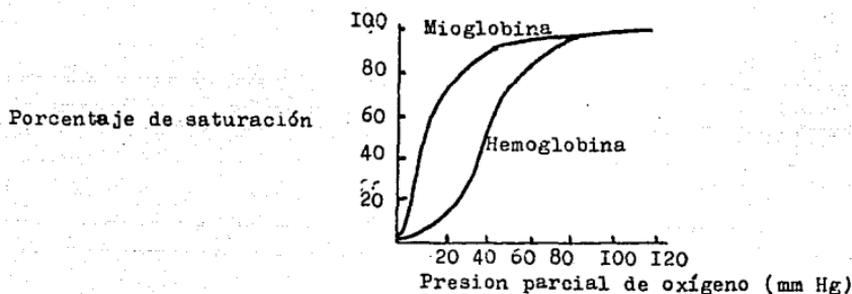


Figura # 8

Curva de saturación por el oxígeno de la mioglobina y hemoglobina, (14).

## 2.0 ASPECTOS INMUNOLOGICOS

### 2.1 INMUNOQUIMICA

Importantes progresos se lograron durante el segundo período de los estudios inmunoquímicos, cuando los estudios de la química fueron aplicados a la investigación inmunológica. Aunque Ehrlich habia sugerido años antes que las reacciones inmunitarias deberían de tener una base química y no obstante que Arrhenius estudiando las reacciones antígeno-anticuerpo, introdujo el término inmunoquímica en 1904, las aplicaciones de la teoría química y su metodología comenzaron en este segundo período. En 1914, Landsteiner estudió los antígenos artificiales conjugados; diversos grupos fueron unidos a las proteínas y la especificidad de estos grupos fue demostrada por reacciones serológicas. En 1921, Landstainer acuñó el término hapteno para aquellos grupos específicos que por sí solos no eran capaces de provocar la formación de anticuerpos, pero tenían la capacidad de reaccionar específicamente con los anticuerpos previamente formados, (1,7).

### 2.2 REACCIONES DE AGLUTINACION

La aglutinación es la reacción antígeno-anticuerpo en la cual un antígeno sólido o en partículas forma una red con un anticuerpo soluble. En la aglutinación invertida el anticuerpo está insertado a una partícula sólida y es aglutinado por un antígeno insoluble.

Las reacciones de aglutinación son la base de la mayor parte de las técnicas comúnmente empleadas en el laboratorio de inmunología. La aglutinación de los antígenos nativos insolubles o de partículas recubiertas por el antígeno puede evaluarse a simple vista con o sin ayuda del microscopio.

Ventajas importantes de las reacciones de aglutinación

son su alto grado de sensibilidad y enorme variedad de sustancias identificadas a través del uso de partículas que están recubiertas por antígenos o anticuerpos.

Según Coombs, los tres requerimientos principales de las pruebas de aglutinación son la disponibilidad de una suspensión estable de células o de partículas. La presencia de uno o más antígenos cercanos a la superficie y el conocimiento de que los anticuerpos "incompletos" o no aglutinables no son localizables sin modificación.

Las partículas de látex pueden ser utilizadas como portadoras de polisacáridos y proteínas antigénicas solubles adsorbidos.

### 3.0 CONCEPTOS BASICOS ENZIMATICOS

Las enzimas son proteínas con funciones catalíticas específicas. Se diferencian de las otras proteínas en que aceleran reacciones químicas, que sin su intervención no tendrían lugar bajo condiciones biológicas o sólo muy lentamente.

Como catalizadores tienen las siguientes propiedades:

- a) Producen efecto en cantidades mínimas.
- b) En cantidades pequeñas respecto al sustrato, las enzimas no afectan el equilibrio de la reacción reversible, sino aumenta la velocidad con la cual se alcanza el equilibrio.
- c) Resultan inalteradas de la reacción.

Las enzimas poseen todas las propiedades características de las proteínas. De suma importancia es la relativa inestabilidad de la estructura enzimática (proteica). Una alteración de la estructura o la desnaturalización son equivalentes a una pérdida de la actividad enzimática. La estabilidad depende, entre otras cosas, de la temperatura, la concentración de los iones hidrógeno (pH) y de la concentración de sales. Son sensibles a metales pesados, detergentes (medios de limpieza). El grado de ionización afecta la actividad enzimática, depende del pH.

Se consideran isoenzimas las proteínas que catalizan la misma reacción, ocurren en la misma especie, pero poseen diferentes propiedades físicas y químicas (determinadas genéticamente). Es posible diferenciarlas mediante electroforesis, cromatografía, o con ayuda de inhibidores, análogos enzimáticos, sustratos degradados o en virtud de su termoestabilidad. Pueden separarse mediante métodos inmunológicos.

Las coenzimas son sustancias orgánicas de peso molecular relativamente bajo (en comparación con las proteínas enzimáticas), asumen funciones específicas, como por ejemplo la transferencia de hidrógeno (NAD y NADP en reacciones de deshidrogenasa).

Complementos inorgánicos son sales o iones esenciales para

algunas reacciones enzimáticas, por ejemplo,  $Mg^{++}$ ,  $Zn^{++}$ , y  $Mn^{++}$ .

La actividad enzimática se mide mediante la determinación de la cantidad de sustrato transformado por unidad de tiempo, bajo condiciones exactamente definidas y controladas. El sustrato debe tener una concentración alta, y sólo una pequeña parte de este sustrato debería consumirse durante el tiempo de observación. La velocidad de transformación del sustrato puede obtenerse; midiendo la disminución de la concentración de sustrato; o, midiendo el incremento de la concentración del producto de reacción.

Este test requiere condiciones óptimas de temperatura, pH y concentración de sustrato.

Si se mantienen constantes las variables (temperatura, cofactores) y la cantidad de enzima, la velocidad de la mayoría de las reacciones enzimáticas aumentará hasta un punto determinado con concentraciones crecientes de sustrato. Llevando la actividad frente a la concentración de sustrato, se obtiene la curva que se muestra en la figura # 9, esta indica un aumento de la actividad con concentraciones crecientes de sustrato, hasta llegar a una velocidad máxima ( $V_{máx.}$ ), a la cual los aumentos ulteriores de la concentración de sustrato ya no tendrán efecto. De esta curva se deriva la regla fundamental de cinética enzimática. El análisis matemático de la curva (hiperbola rectangular) de Michaelis y Menten define las dos fases de una reacción enzimática, o sea la formación enzima-sustrato (E S) y su disociación a enzima y producto (E + P). Una constante muy importante es la llamada "constante de Michaelis" ( $K_m$ ) que es una magnitud característica para cada pareja enzima-sustrato. Numéricamente equivale a aquella concentración de sustrato (mol/l), a la cual la velocidad de reacción ( $V$ ) equivale a  $1/2$  de la velocidad máxima ( $V_{máx.}$ )

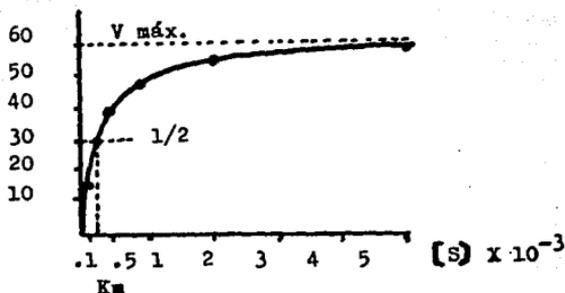


Figura # 9

Relación entre la concentración de sustrato y la velocidad de la reacción enzimática. Ejemplo teórico, (30).

La porción cuantitativa de enzimas en las proteínas totales del plasma o del suero es tan diminuta, que no puede ser separada y diferenciada por métodos usuales. Para medirlas se sirve por ello de su función; su capacidad de catalizar determinadas reacciones químicas. La velocidad de reacción catalizada es la medida de la llamada "actividad enzimática", que puede ser equiparada en la práctica, a la cantidad de enzima. Fundamentalmente hay dos caminos para medir la actividad enzimática: a) mediante la determinación del consumo del sustrato transformado en la reacción enzimática y mediante b) la medida del producto formado en la reacción enzimática.

Medición continua método cinético.- Si en una reacción intervienen las coenzimas NAD o NADP como suministradores o receptores de hidrógeno se puede seguir la reacción enzimática directamente en el fotómetro, por que tales compuestos absorben la luz ultravioleta en su estado reducido pero no en su estado oxidado es decir después de ceder hidrógeno. El test óptico fué introducido por

Otto Warburg el 1936 (figura # 10). Como ya se indicó, se basa en el hecho de que los nicotinamida-adenin-dinucleótidos en forma reducida NADH y NADPH, absorben la luz con el pico entre 338.5 y 340.5 nm, mientras que las formas oxidadas NAD y NADP no muestran absorción entre 300 y 400 nm. Cada reacción de deshidrogenasa con reducción de NAD o NADP u oxidación de NADH y NADPH pueden medirse mediante la determinación del aumento o la disminución de la extinción a 340nm o una longitud de onda muy cercana.

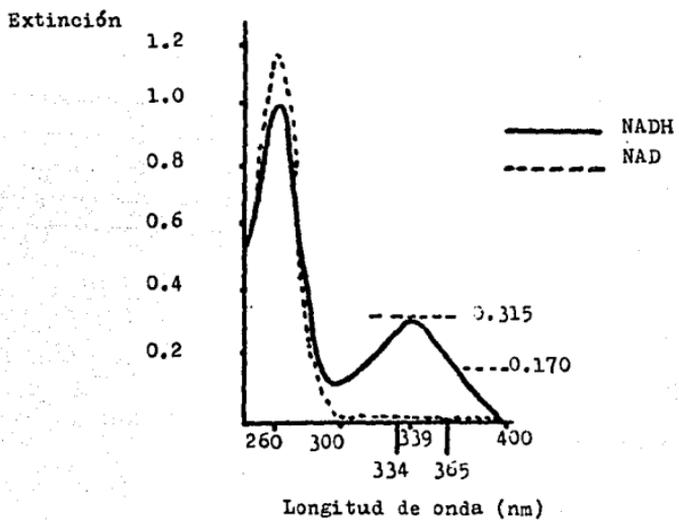


Figura # 10  
 Espectros de absorción de NADH y NAD. Para obtener esta curva se empleó una concentración de 0.05 mmol/l, longitud de onda 340nm, cubeta 1 cm, Extinción de la solución de NADH es de A = 0.315. (30).

La determinación de las actividades enzimáticas en el suero son indispensables para el diagnóstico y control evolutivo de las enfermedades. Así mismo, la determinación de las formas múltiples

y de las propias isoenzimas en el suero pueden dar indicios del origen de las elevadas actividades enzimáticas.

En la figura # 11, observamos las diferencias en el contenido enzimático, que por regla general son puramente cuantitativas, o sea, las mismas enzimas se pueden comprobar en su mayoría en todos los órganos, pero sus actividades muestran diferencias de órgano a órgano. Así, se producen diversas reacciones enzimáticas, diversos "mapas enzimáticos". Las enzimas individuales están repartidas en los espacios celulares en forma fácilmente soluble o con diversa fijación a las diferentes membranas celulares.

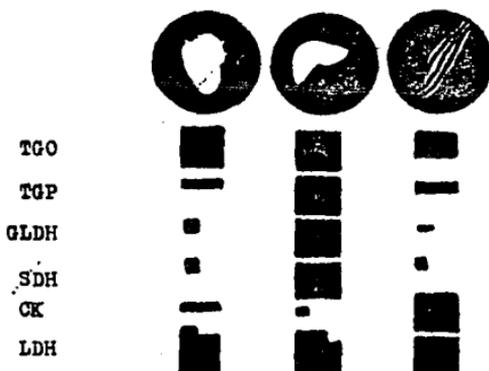


Figura # 11

Mapas enzimáticos que ilustran la diferente provisión enzimática que existe para diferentes órganos; Corazón, hígado y músculo esquelético. (30).

Correspondiendo a sus diversas funciones, los órganos poseen aisladamente diferentes mapas enzimáticos, por ejemplo el que se ilustra en la figura # 13 del infarto agudo al miocardio, o sea que son diversas interrelaciones de las enzimas en forma muy característica.

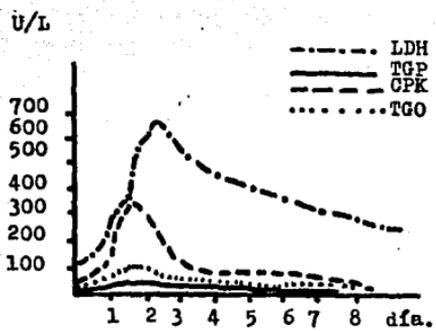


Figura # 12  
Curso típico enzimático durante el infarto agudo al miocardio (30).

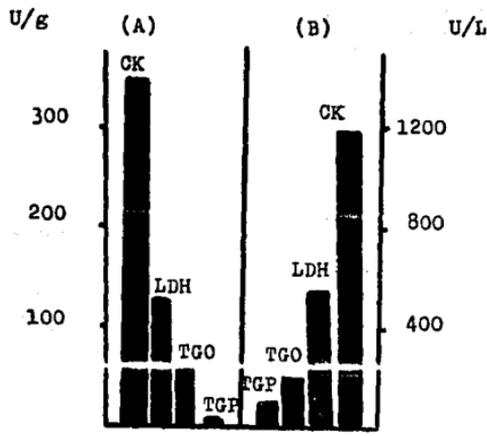


Figura # 13  
Mapa enzimático característico del infarto agudo al miocardio  
A= en el miocardio sano  
B= en el suero después del infarto (30).

CURSO ENZIMATICO CARACTERISTICO DEL INFARTO AGUDO  
AL MIOCARDIO Y CINETICA DE LA MIOGLOBINA DURANTE  
ESTE PADECIMIENTO.

	Inicia elevación después del infarto.	Alcanza niveles máximos.	Inicia descenso a intervalo de referencia normal.
Isoenzima CK-MB	0-12 horas	12-24 horas	2o. día
CPK	0-12 horas	12-24 horas	2o. día
LDH	2o. a 3er. día.	4o. a 5o. día.	6o. a 7o. día.
TGO	12-24 horas	24-48 horas	3o. a 5o. día.
MIOGLOBINA	2 a 3 horas después del inicio del dolor.	8-9 horas	Regresa en 24 horas.

## MATERIAL Y METODOS

DESARROLLO

El presente estudio se realizó en pacientes que ingresaban en el Hospital General de Zona # 29 del I.M.S.S.

Se estudiaron cuatro grupos de pacientes ( de 30 pacientes cada grupo):

- \_\_\_\_\_TESTIGO
- \_\_\_\_\_PREINFARTO E INFARTO AGUDO AL MIOCARDIO
- \_\_\_\_\_NO INFARTO AGUDO AL MIOCARDIO
- \_\_\_\_\_POST-OPERATORIO.

Se realizó la toma de muestra de sangre a cada uno de los pacientes, separándose el suero inmediatamente después de centrifugarse las muestras. Ya obtenido el suero, éste se utilizó para realizar las siguientes determinaciones:

- \_\_\_\_\_Determinación inmunológica de mioglobina sérica (Utilizando el equipo de Rapitex-Mioglobina).
- \_\_\_\_\_Determinación fotométrica de la actividad de la isoenzima CK-MB.
- \_\_\_\_\_Determinación fotométrica de la actividad de la enzima deshidrogenasa láctica (LDH).
- \_\_\_\_\_Determinación fotométrica de la actividad de la enzima creatinincinasa (CPK).
- \_\_\_\_\_Determinación fotométrica de la actividad de la enzima transaminasa glutámico pirúvico (TGP).
- \_\_\_\_\_Determinación fotométrica de la actividad de la enzima transaminasa glutámico oxalacético (TGO).

PRECAUCIONES ESPECIALES:

- a) Las muestras hiperlipémicas de suero o plasma no fueron utilizadas, pues existe posibilidad de que se presenten

reacciones inespecíficas.

- b) Todo el material de vidrio debe estar perfectamente limpio, libre de detergentes y metales pesados pues éstos afectan considerablemente la actividad de las enzimas séricas.
- c) Las determinaciones deben realizarse lo más rápido posible para evitar que las actividades enzimáticas disminuyan con el transcurso del tiempo.
- d) Las muestras que presentan hemólisis no se utilizan pues afectan las determinaciones.
- e) Todos los pacientes en estudio deben de tener como diagnóstico único, sólo uno de los cuadros clínicos en estudio ( Testigo- "aparentemente sanos"; preinfarto e infarto agudo al miocardio; No infarto agudo al miocardio; y post-operatorio).

DETERMINACION FOTOMETRICA DE LA ACTIVIDAD DE LA SUBUNIDAD  
CK-B O DE LA ISOENZIMA CK-MB DE CREATININASA DE BASE INMUNO-  
LOGICA.

FUNDAMENTO: Los reactivos para determinar la actividad de la creatinasa contienen ademas anticuerpos CK-B que inhiben totalmente la actividad de las subunidades CK-M sin influir sobre la actividad de la subunidad CK-B<sup>1-2</sup>. Por ello en la prueba se mide solamente la actividad de la CK-B existente en la prueba.

Material biológico: Suero.

Reactivos: 1) Solución amortiguadora  
2) Mezcla enzimas-coenzimas-anticuerpos  
3) Reactivo de iniciación (fosfocreatina).

Concentraciones en la mezcla reaccionante:

Amortiguador de acetato de imidazol 100 mmol/l a pH 6.7;  
fosfocreatina 30 mmol/l; glucosa 20 mmol/l; N-acetilcisteína  
20 mmol/l; NADP 2 mmol/l; AMP 5 mmol/l; adenosina (5') pentafo-  
fato (5')-adenosina 10 μmol/l; glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa  
≥ 1.5 kU/l; hexocinasa ≥ 2.5 kU/l; anticuerpos (cabra) inhibido-  
res de CK-MM (de humanos) 1000 U/l; acetato de magnesio 10 mmol/l,  
EJTA 2 mmol/l; ADP 2 mmol/l.

Preparación de soluciones:

- A) Disolver el contenido del frasco que contiene la mezcla enzimas-coenzimas-anticuerpos con 2.5 ml de solución amortiguadora. (esto sera la solución reactiva).
- B) Disolver el contenido del frasco que contiene el reactivo de iniciación con 1.0 ml de solución amortiguadora. (esto es el reag-

tivo de iniciacion)

PROCEDIMIENTO:

- \_\_\_ Adicionar a un frasco de solución reactiva 0.1 ml de muestra
- \_\_\_ Mezclar y mantener por 10 minutos a temperatura ambiente (25°C)
- \_\_\_ Posteriormente adicionar 0.1 ml de reactivo de iniciación
- \_\_\_ Mezclar y mantener durante dos minutos a 25°C, leer inmediatamente el aumento de extinción o absorción cada minuto, durante cinco minutos
- \_\_\_ Leer a una longitud de onda de 365nm, espesor de la cubeta de 1.0 cm, Temperatura de medición 25°C.

CALCULO:

Subunidad CK-B: Actividad por volumen (U/L)

El promedio de los cambios de extinción por minuto ( $\Delta E/\text{min}$ ) se multiplica por el factor 7714.

Subunidad CK-MB: Actividad por volumen (U/L)

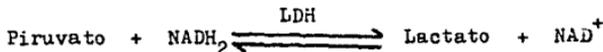
Mediante la multiplicación por el factor 2 a partir de la actividad CK-B puede calcularse la CK-MB en la muestra.

El promedio de la extinción ( $\Delta E/\text{min}$ ) se multiplica por el factor 15428.

12

DETERMINACION FOTOMETRICA DE LACTATO  
DESHIDROGENASA ( LDH )

FUNDAMENTO: Las lactato deshidrogenasas catalizan la reducción de piruvato por  $\text{NADH}_2$  según la siguiente reacción:



Para la valoración cuantitativa de la enzima se deja actuar sobre el suero problema sobre piruvato y  $\text{NADH}_2$  y se mide fotométricamente la velocidad de reacción.

Reactivos: Solución de sustrato amortiguador (disolvente)  
 $\text{NADH}_2$  (liofilizado).

Concentración en la mezcla reaccionante:

Piruvato sódico 0.6 mmol;  $\text{NADH}_2$  0.18 mmol; amortiguador de fosfatos 50 mmol a pH 7.5 .

Preparación de la solución:

Disolver el contenido del frasco que contiene el liofilizado con 3.0 ml de solución amortiguadora.

PROCEDIMIENTO:

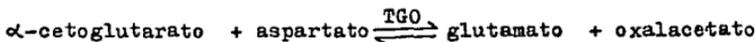
- \_\_\_ Añadir al frasco que contiene el liofilizado disuelto, 0.1 ml de suero reciente.
- \_\_\_ Mezclar y pasarlo inmediatamente a la cubeta del fotómetro, medir la extinción, a temperatura constante al cabo de un minuto y simultáneamente poner en marcha el cronómetro.
- \_\_\_ Repetir la lectura de minuto, en minuto, durante tres minutos.
- \_\_\_ Leer a una longitud de onda de 365nm y una temperatura de 25°C .

CALCULOS:

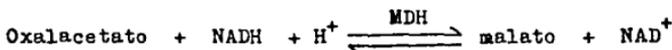
El promedio de los cambios de extinción por minuto ( $\Delta E/\text{min}$ ) se multiplica por el factor 9118 U/L.

DETERMINACION FOTOMETRICA DE TRANSAMINASA  
GLUTAMICO OXALACETICO ( TGO )

FUNDAMENTO: La transaminasa glutámico oxalacético cataliza la transferencia del nitrógeno desde el glutamato al oxalacetato según la siguiente ecuación:



Para la determinación cuantitativa de TGO se deja actuar el suero problema en solución amortiguadora sobre cetoglutarato y aspartato. El oxalacetato producido se transforma enzimáticamente en malato, en presencia de la malato deshidrogenasa (MDH), por medio de NADH:



La velocidad de consumo de NADH puede medirse por la disminución de la extinción en la región ultravioleta cercano. Sus valores son directamente proporcionales a la actividad de TGO.

- Reactivos: 1) Solución de sustrato (disolvente)  
2) Mezcla enzima y amortiguador (liofilizado)

Concentración de la mezcla reaccionante:

Amortiguador de fosfatos 80 mmol/l a pH 7.4, L-aspartato 200 mmol/l;  
 $\alpha$ -cetoglutarato 12mmol/l;  $\text{NADH}_2$  0.18 mmol/l; LDH > 1.2 U/ml;  
MDH > 0.6 U/ml.

Preparación de la solución:

Disolver el contenido del frasco que contiene el liofilizado con 2.0 ml de disolvente.

PROCEDIMIENTO:

\_\_\_ Añadir al frasco que contiene el liofilizado disuelto, 0.5 ml de suero.

\_\_\_ Mezclar y pasarlo inmediatamente en la cubeta. Después de un minuto medir la extinción a temperatura constante y simultáneamente poner en marcha el cronómetro. Repetir la medición cada minuto, durante 3, 4 y 5 minutos.

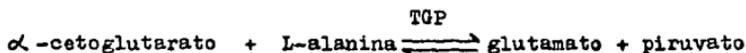
\_\_\_ Leer a una longitud de onda de 365 nm y una temperatura de 25°C

CALCULOS:

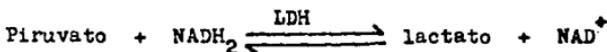
El promedio de los cambios de extinción ( $\Delta E/\text{min}$ ) se multiplica por el factor 1471 U/L.

DETERMINACION FOTOMETRICA DE TRANSAMINASAGLUTAMICO PIRUVICO (TGP)

**FUNDAMENTO:** La transaminasa glutámico pirúvico cataliza la transferencia de nitrógeno desde el glutamato al piruvato según la siguiente reacción:



Para la determinación cuantitativa de TGP se deja actuar el suero problema en solución amortiguadora sobre el cetoglutarato y L-alanina. El piruvato producido se transforma enzimáticamente en lactato por medio de lactato deshidrogenasa (LDH) en presencia de  $\text{NADH}_2$ :



La velocidad de utilización del  $\text{NADH}_2$  puede medirse fotométricamente por la disminución de la extinción en la

región ultravioleta cercano. Sus valores son directamente proporcionales a la actividad de TGP.

- Reactivos:
- 1) Solución sustrato (disolvente)
  - 2) Mezcla enzima-amortiguador (líoofilizado).

Concentraciones en la mezcla reaccionante:

Amortiguador de fosfatos 80 mmol/l a pH 7.4, L-alanina 800 mmol/l;  
ceto $\alpha$ glutarato 18 mmol/l; NADH<sub>2</sub> 0.18 mmol/l; LDH > 1.2 kU/l.

Preparación de la solución:

Disolver el contenido del frasco que contiene el líoofilizado con 2.0 ml de disolvente.

PROCEDIMIENTO:

- \_\_\_ Añadir al frasco que contiene el líoofilizado disuelto, 0.5 ml de suero reciente.
- \_\_\_ Mezclar y pasarlo inmediatamente en la cubeta.
- \_\_\_ Después de un minuto medir la Extinción a temperatura constante, poner en marcha el cronómetro. Repetir la medición cada minuto, durante 3, 4 o 5 minutos.
- \_\_\_ Leer a una longitud de onda de 365 nm y una temperatura de 25°C.

CALCULOS:

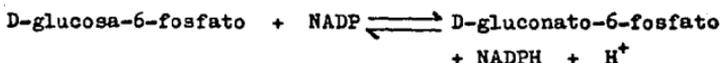
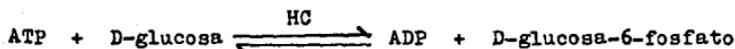
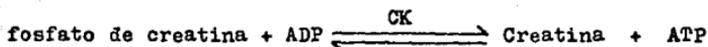
El promedio de los cambios de Extinción ( $\Delta E/\text{min}$ ) se multiplica por el factor 1471 U/L.

DETERMINACION FOTOMETRICA DE  
FOSFOCINASA DE CREATINA (CFK)

**FUNDAMENTO:** Se utilizan el ADP y el fosfato de creatina como sustratos, el ATP formado se usa generalmente para fosforilar glucosa en presencia de hexocinasa (HG).

El producto glucosa-6-fosfato (G-6-P) es entonces oxidado por NADP en presencia de deshidrogenasa de glucosa 6-fosfato (G-6-PDH) para formar D-gluconato-6-fosfato y NADPH.

La velocidad del aumento de NADPH se mide fotométricamente, sus valores son directamente proporcionales a la actividad de CK en el material de muestra.



- Reactivos:**
- 1) Solución amortiguadora
  - 2) Enzima -coenzima - sustrato (liofilizado).

Concentraciones en la mezcla reaccionante:

Amortiguador de acetato-imidazol 100 mmol/l, pH 6.7 ;  
fosfocreatina 30 mmol/l; glucosa 20 mmol/l; N-acetilcisteína  
20 mmol/l; acetato de magnesio 10 mmol/l; EDTA 2 mmol/l; ADP  
2 mmol/l; NADP 2 mmol/l; AMP 5 mmol/l; adenosina (5')pentafos-  
fato (5')-adenosina 10 μmol/l; glucosa-6-fosfato-deshidrogena-  
sa ≥ 1.5 kU/l; hexocinasa ≥ 2.5 kU/l.

Preparacion de la solución:

Disolver el contenido del frasco que contiene el liofilizado con 2.5 ml de solución amortiguadora.

PROCEDIMIENTO:

- \_\_\_ Añadir al frasco que contiene el liofilizado disuelto, 0.1 ml de suero reciente.
- \_\_\_ Mezclar y mantener la temperatura constante durante 3 minutos.
- \_\_\_ Determinar el aumento de extinción cada minuto, durante 3, 4 o 5 minutos.
- \_\_\_ Leer a una longitud de onda de 365 nm y a una temperatura de 25°C.

CALCULOS:

El promedio de los cambios de extinción por minuto ( $\Delta E/\text{min}$ ) se multiplica por el factor 7429 U/l.

DETERMINACION INMUNOQUIMICA  
DE MIOGLOBINA SERICA.

FUNDAMENTO: Se presenta una reacción inmunoquímica entre la mioglobina y los anticuerpos contra la mioglobina fijados a partículas de látex. En caso de concentración elevada de mioglobina ( $\geq 90$  mg/L) se produce una aglutinación visible de las partículas de látex, (resultado positivo).

Material biológico: Suero.

Reactivos: Equipo Rapitex-Mioglobina (Instituto Behring)

- a) Frasco de Rapitex-Mioglobina: está compuesto por una suspensión acuosa de partículas de polystrol sensibilizadas con anticuerpos contra mioglobina.
- b) Suero positivo control de mioglobina: Para Rapitex-Mioglobina es un suero humano líquido, estabilizado que contiene  $140 \mu\text{g}$  de mioglobina por litro ( $\pm 20\%$ ).
- c) Suero negativo control de mioglobina: Para Rapitex-Mioglobina es un suero humano líquido que contiene menos de  $50 \mu\text{g}$  de mioglobina por litro.
- d) Solución de absorción: se compone de una solución de anticuerpos y tiene por objeto la eliminación de los factores de reuma. Agentes de conservación para todos los reactivos mencionados: azida sódica ( máximo  $1\text{g/l}$ ).
- e) Placa de prueba.
- f) Pipetas de  $10 \mu\text{l}$  y  $50 \mu\text{l}$ .
- g) Agitadores
- h) Cronómetro.

PROCEDIMIENTO:

- \_\_\_ Llevar las muestras de suero y los reactivos a temperatura ambiente.
- \_\_\_ Colocar 50  $\mu$ l de suero y 10  $\mu$ l de solución de absorción sobre un campo de la placa de prueba. Mantener los goteros con una abertura perpendicular a la placa de prueba, las gotas deben caer libremente. Como control para cada muestra se pueden utilizar 50  $\mu$ l (1 gota) de suero control positivo y negativo.
- \_\_\_ Agitar bien el Rapitex-Mioglobina en ambas direcciones y colocar aproximadamente 25  $\mu$ l (1 gota) junto a la gota de suero-solución de absorción( o suero de control). Mezclar bien con un agitador, cubriendo aproximadamente dos tercios del campo de reacción.
- \_\_\_ Mover la placa rotándola lentamente durante tres minutos.

Interpretación:

En presencia de un infarto agudo al miocardio la mayoría de los sueros reaccionan y a los tres minutos con un resultado claramente positivo.

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

## RESULTADOS

En la tabla # 1 se describen los resultados encontrados en el grupo Testigo, de las siguientes enzimas séricas: LDH, CPK, TGO, TGP e isoenzima CK-MB; así como la determinación de mioglobina sérica.

En la tabla # 2 se describen estos mismos parámetros para el grupo de pacientes con infarto agudo al miocardio.

Como ya se mencionó, existen otros padecimientos que causan elevación de la proteína mioglobina, y que son incluidos en las tablas # 3 y 4.

En la tabla # 5 se muestran los valores promedio de las enzimas séricas (LDH, TGO, TGP, CPK e isoenzima CK-MB) y el porcentaje de positividad que presenta la determinación de mioglobina sérica en cada uno de los respectivos grupos en estudio. (Testigo; infarto agudo al miocardio; no infarto agudo al miocardio y post-operatorio).

En seguida se encuentra la gráfica # 1, donde se encuentra el valor promedio de la isoenzima CK-MB para los cuatro grupos de pacientes.

Así mismo, en las gráficas # 2,3,4 y 5 se encuentran los valores promedio de las enzimas séricas: CPK, LDH, TGO y TGP, respectivamente, para cada uno de los grupos.

En la tabla # 6, se indica el porcentaje de positividad que presenta la determinación de mioglobina sérica, para cada uno de los grupos.

TABLA No. 1.-Pacientes que pertenecen al grupo TESTIGO.

41

No.	CK Fracción MB U/L	CK U/L	LDH U/L	TGO U/L	TGP U/L	RAPITEX-MIO GLOBIN (min)				
						1	2	3	4	5
1	4	22	185	20	10	NEGATIVO				
2	3	42	273	37	25	NEGATIVO				
3	3	15	200	25	25	NEGATIVO				
4	0	10	120	20	10	NEGATIVO				
5	3	3	160	7	13	NEGATIVO				
6	3	3	186	9	18	NEGATIVO				
7	5	72	170	29	22	NEGATIVO				
8	5	206	194	39	46	NEGATIVO				
9	3	62	160	15	3	NEGATIVO				
10	0	19	143	51	11	NEGATIVO				
11	0	45	201	4	7	NEGATIVO				
12	4	27	131	33	4	NEGATIVO				
13	0	17	133	0	0	NEGATIVO				
14	0	0	85	33	11	NEGATIVO				
15	0	0	61	0	40	NEGATIVO				
16	0	0	80	0	18	NEGATIVO				
17	0	77	38	36	7	NEGATIVO				
18	6	13	88	22	15	NEGATIVO				
19	4	17	73	14	15	NEGATIVO				
20	0	8	123	33	15	NEGATIVO				
21	0	8	119	44	15	NEGATIVO				
22	0	8	105	47	14	NEGATIVO				
23	0	0	96	55	22	NEGATIVO				
24	0	0	109	50	29	NEGATIVO				
25	0	8	46	14	37	NEGATIVO				
26	0	15	9	14	7	NEGATIVO				
27	0	8	100	18	0	NEGATIVO				
28	0	12	209	15	11	NEGATIVO				
29	0	15	127	7	7	NEGATIVO				
30	0	7	127	44	15	NEGATIVO				

TABLA No. 2.-Pacientes que pertenecen al grupo de INFARTO MIOCARDIO AL MIOCARDIO (IAM). 42

No.	CK fracción MB U/L	CK U/L	LDH U/L	TGO U/L	TGP U/L	RAPIEX-MIO GLOBIN (min)				
						1	2	3	4	5
1	12	112	365	22	15			+		
2	4	38	222	29	32	NEGATIVO				
3	0	52	158	4	19	NEGATIVO				
4	8	50	230	22	30	NEGATIVO				
5	12	35	779	432	378			+		
6	15	94	325	29	7					+
7	12	25	158	81	88	NEGATIVO				
8	8	66	228	36	30	NEGATIVO				
9	0	33	137	22	37	NEGATIVO				
10	25	322	275	74	37			+		
11	0	59	182	7	36	NEGATIVO				
12	0	19	182	7	73	NEGATIVO				
13	6	37	73	110	66	NEGATIVO				
14	7	99	201	48	237	NEGATIVO				
15	31	406	1261	96	77					+
16	6	52	547	24	234	NEGATIVO				
17	52	505	1531	154	26					+
18	15	37	352	20	7			+		
19	12	82	289	32	18					+
20	123	642	474	135	30					+
21	6	116	537	37	14	NEGATIVO				
22	0	17	152	14	7	NEGATIVO				
23	0	7	258	4	4	NEGATIVO				
24	0	624	1316	123	34	NEGATIVO				
25	0	26	246	4	4	NEGATIVO				
26	15	235	869	76	33	NEGATIVO				
27	34	532	1291	22	12			+		
28	31	290	545	22	7			+		
29	18	84	180	22	4					+
30	34	140	358	26	3			+		



TABLA No. 4.-Pacientes que pertenecen al grupo POST-OPERATORIO inmediato.

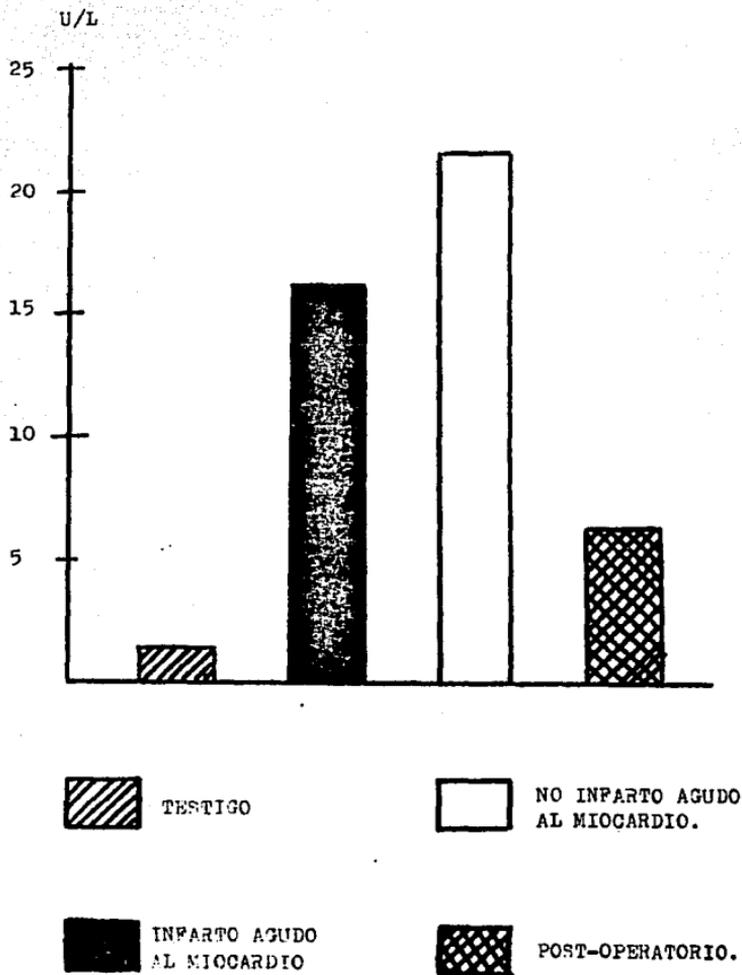
No.	Diagnóstico *	CK frac- ción MB	CPK	LDH	TGO	TGP	RAPITEX-MIO GLOBINA (min)				
							1	2	3	4	5
1	Safenectomía	8	52	219	20	150			+		
2	Cistocele	8	20	252	125	24	NEGATIVO				
3	Apendicectomía	4	119	289	20	64	NEGATIVO				
4	Apendicectomía	0	330	429	17	15				+	
5	Amigdalectomía	12	113	514	42	20			+		
6	Ext. polipos nasal.	4	47	342	24	20	NEGATIVO				
7	Ext. polipos nasal.	6	84	353	48	74	NEGATIVO				
8	Colpoperinorrafia	4	102	210	26	18	NEGATIVO				
9	Apendicectomía	22	306	248	17	12				+	
10	Herida en tórax	15	180	278	22	28			+		
11	Colpoperinorrafia	9	175	223	15	15					+
12	Safenectomía	9	72	237	51	64					+
13	Colecistectomía	10	304	159	98	33					+
14	Apendicectomía	0	65	12	24	10					+
15	Colecistectomía	0	106	27	69	33	NEGATIVO				
16	Colecistectomía	6	30	364	17	30					+
17	Colpoperinorrafia	0	13	104	12	10					+
18	Hernioplastia	5	48	131	7	66			+		
19	Prostactectomía	10	97	103	15	3					+
20	Loparotomía	5	17	88	8	74					+
21	Safenectomía	10	17	112	59	10	NEGATIVO				
22	Criopexia	0	20	88	11	10					+
23	Osteosíntesis	5	20	70	59	33				+	
24	Loparotomía	12	104	122	44	63	+				
25	Apendicectomía	10	89	164	7	22	NEGATIVO				
26	Hernioplastia	8	69	158	51	29	NEGATIVO				
27	Hernioplastia	8	104	146	46	110					+
28	Calro. sen. neoplast.	0	82	88	48	73			+		
29	Avance Rotuliano	0	37	137	74	18			+		
30	Hernioplastia	0	74	106	37	25	NEGATIVO				

\* Ver parte de Anexos.

TABLA No. 5.- VALORES PROMEDIO DE LAS ENZIMAS SERICAS Y PORCENTAJE DE POSITIVIDAD PARA LA DETERMINACION DE MIOGLOBINA SERICA EN LOS GRUPOS ESTUDIADOS.

	CK-MB (X)	CK (X)	LDH (X)	TGO (X)	TGP (X)	MIOGLOBINA, % DE POSITIVIDAD.
CON RCL	1.4	23.3	130	24.5	15.7	0
I A M	16.2	161.5	452.7	57.8	53.3	43.3
NO I A M	21.6	156.8	402.6	42.6	26.9	48.0
PCST OPERATORIO.	6.3	96.5	192.4	37.1	35.5	66.6

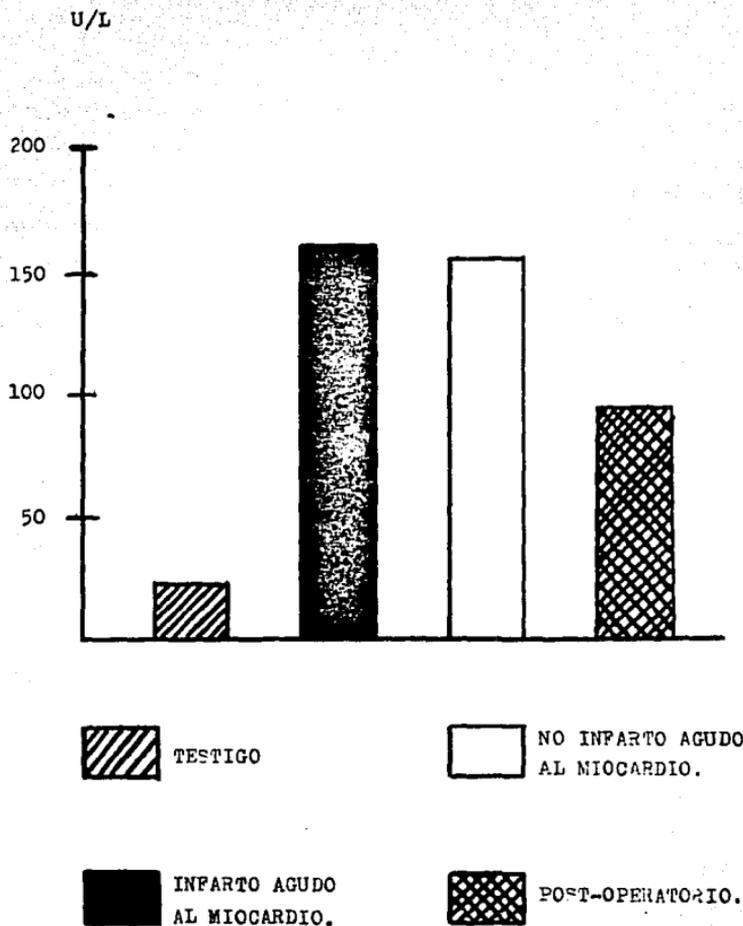
VALORES PROMEDIO DE LA ISOENZIMA CK-MB DE LOS DIFERENTES GRUPOS DE PACIENTES EN ESTUDIO.



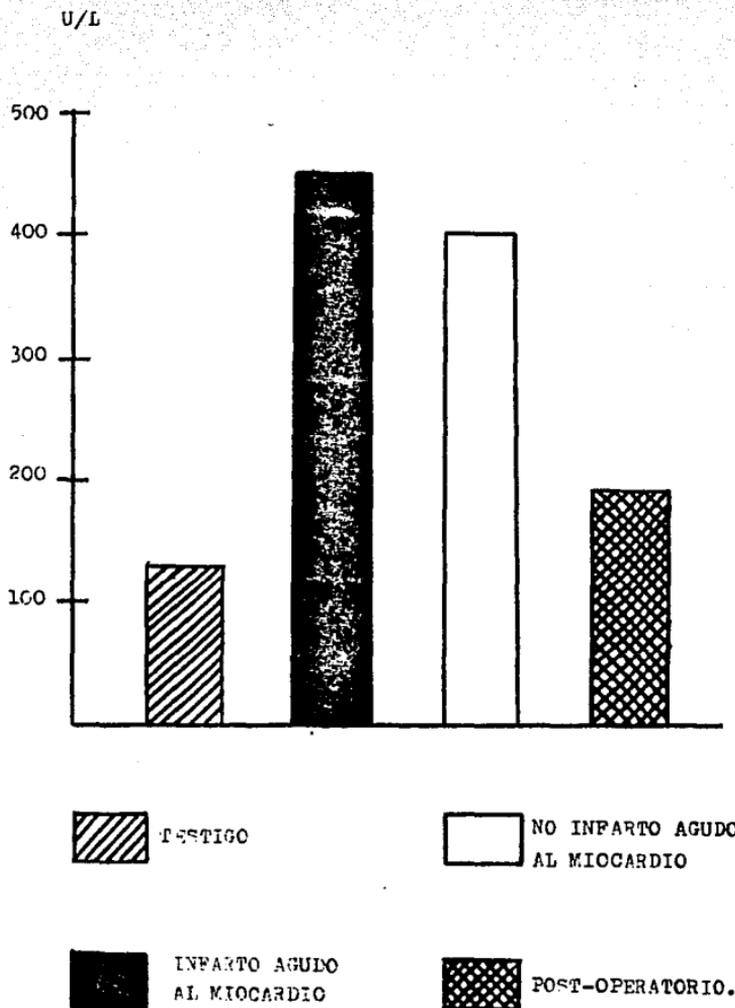
GRAFICA # 2

47

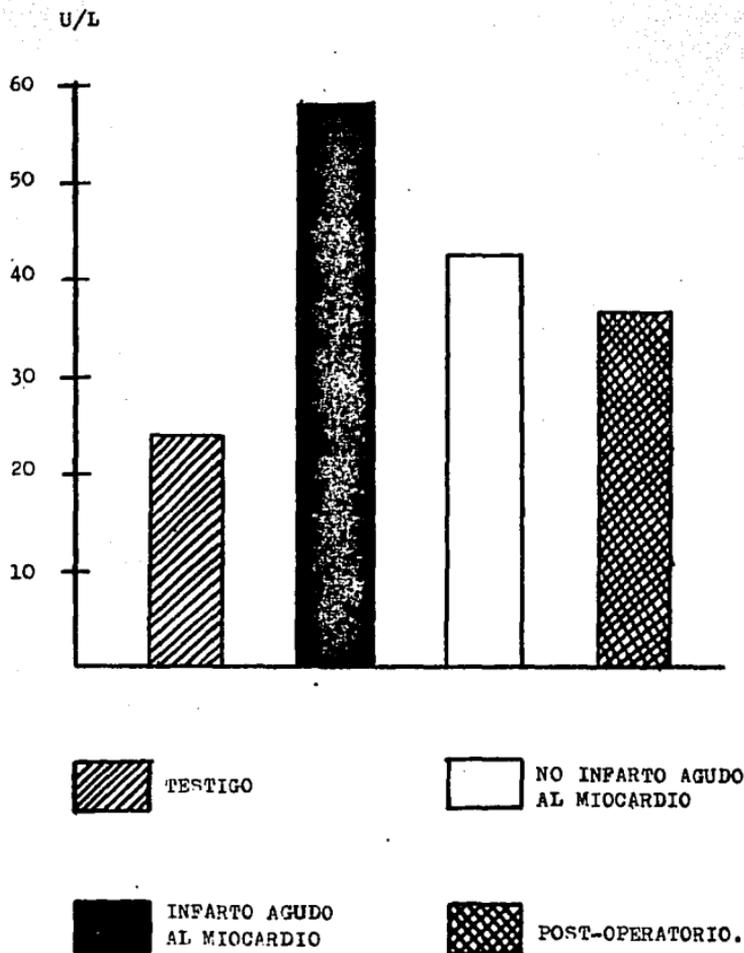
VALORES PROMEDIO DE LA ENZIMA CPK DE LOS DIFERENTES  
GRUPOS DE PACIENTES EN ESTUDIO.



VALORES PROMEDIO DE LA ENZIMA LDH DE LOS DIFERENTES GRUPOS DE PACIENTES EN ESTUDIO.



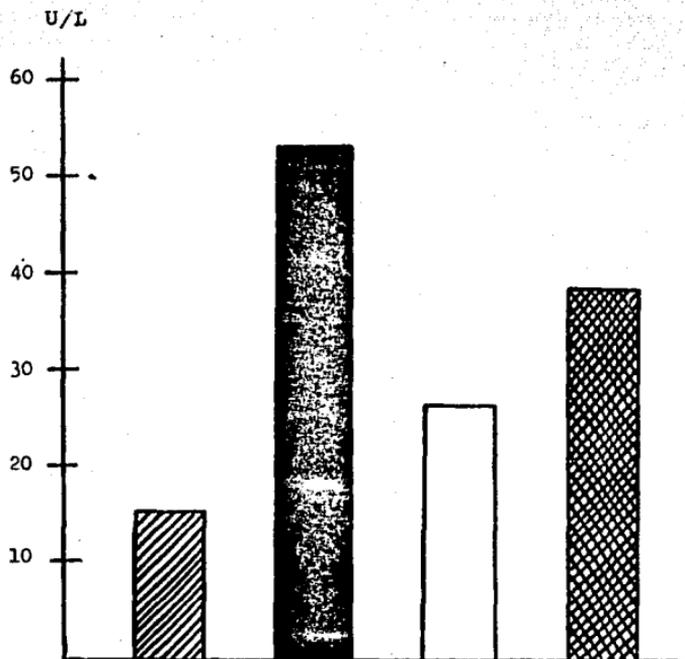
VALORES PROMEDIO DE LA ENZIMA TGO DE LOS PACIENTES  
DE LOS DIFERENTES GRUPOS EN ESTUDIO.



GRAFICA # 5

50

VALORES PROMEDIO DE LA ENZIMA TGP DE LOS DIFERENTES  
GRUPOS DE PACIENTES EN ESTUDIO.



TESTIGO



NO INFARTO AGUDO  
AL MIOCARDIO.



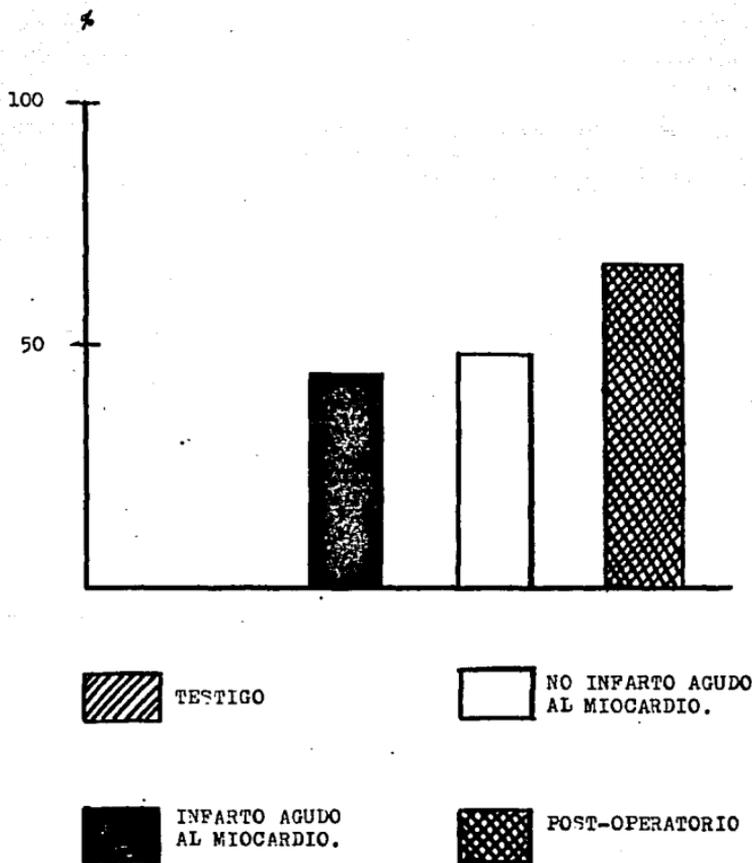
INFARTO AGUDO  
AL MIOCARDIO



POST-OPERATORIO.

GRAFICA # 6

PORCENTAJE DE POSITIVIDAD UTILIZANDO LA PRUEBA DE  
"RAPITEX-MIOGLOBIN" EN CADA UNO DE LOS DIFERENTES  
GRUPOS EN ESTUDIO.



### DISCUSION DE RESULTADOS

En el presente estudio, se utilizó un método inmunoquímico de aglutinación en látex para la determinación de mioglobina sérica, realizándose dicho trabajo en el Hospital General de Zona # 29 del I.M.S.S. Esta determinación se empleó como una prueba de emergencia para el diagnóstico del infarto agudo al miocardio.

Como ya se indicó se trabajó con cuatro grupos de pacientes, realizándose las determinaciones de Mioglobina sérica, Creatin-  
cinasa, Deshidrogenasa láctica, Transaminasa glutámico oxalacético, Transaminasa glutámico pirúvico e isoenzima CK-MB, en cada uno de los pacientes de cada grupo.

#### GRUPO TESTIGO:

En este grupo de pacientes, los valores promedio de cada una de las enzimas séricas se encuentran dentro del intervalo normal de referencia y la determinación de mioglobina sérica (Rapitex-Mioglobina) mostró 0% de positividad.

Estos resultados en este grupo de pacientes eran los que se esperaban puesto que esas personas aparentemente sanas, carecen de alguna lesión muscular, que implica la liberación patológica de los componentes celulares en estudio.

Por lo tanto sabemos que la determinación inmunoquímica de mioglobina sérica con el equipo de "rapitex-mioglobina" da resultados negativos cuando los niveles séricos de mioglobina son menores de  $90 \mu\text{g/l}$ , por lo que se puede decir que la población en estudio del grupo "testigo" tiene niveles séricos de mioglobina menores de  $90 \mu\text{g/l}$ .

#### GRUPO DE PACIENTES CON DIAGNOSTICO DE INFARTO AGUDO AL MIOCARDIO

En este grupo de pacientes el valor promedio de cada una de las enzimas séricas se encuentra por arriba del intervalo normal de referencia, mostrando un perfil enzimático característico del infarto agudo al miocardio.

Con respecto a la determinación de mioglobina sérica, este grupo de pacientes mostró el 43.3% de positividad. Este grupo consta de 30 pacientes, de los cuales 13 muestran elevaciones enzimáticas características de la infartación miocárdial y su correspondiente determinación de mioglobina mostró resultados claramente positivos, esto es debido a que durante la infartación miocárdial esta afectada la función de las membranas celulares del músculo cardíaco presentándose necrosis por déficit de riego coronario y consumo de oxígeno, las sustancias celulares incluyendo las enzimas en estudio y la mioglobina van a ser transportadas hacia la corriente sanguínea donde posteriormente fueron detectadas.

En la tabla # 2 puede observarse que de los 17 pacientes con resultado negativo para la determinación de mioglobina, los pacientes con No. 16, 21, 24, y 26, muestran alteraciones enzimáticas características. Para explicar lo que ocurre en estos casos es necesario recordar que la Mioglobina tiene un peso molecular de 17,200 daltons, es más pequeño que el peso de la GPK (80,000) ó LDH (130,000) por lo tanto aparece en la corriente sanguínea a concentraciones superiores y más rápidamente que las enzimas mencionadas (ver figura # 12).

La mioglobina tiene elevaciones significativas con valor diagnóstico de 2 a 3 horas después del inicio de los síntomas, más tempranamente que las enzimas séricas, alcanza un máximo aproximadamente a las 8.5 horas y posteriormente, debido a su rápida filtración renal, la concentración de mioglobina en sangre disminuye considerablemente, regresando a su intervalo normal de referencia en 24 horas.

Esto nos sugiere que cuando la concentración de mioglobina va descendiendo hasta regresar a su intervalo normal de referencia, las enzimas séricas están alcanzando sus concentraciones máximas en sangre.

Debido a esto se puede pensar que en este tipo de pacientes ya transcurrió tiempo de haberse iniciado el infarto, puesto que la

concentración de mioglobina sérica se encuentra en su intervalo normal de referencia y la enzima que más tiempo tarda en alcanzar sus niveles máximos e iniciar su descenso a la normalidad es la LDH y en estos casos es la enzima que observamos se encuentra elevada. (Ver generalidades).

#### GRUPO "NO INFARTO AGUDO AL MIOCARDIO"

En este grupo hay un total de 20 pacientes con diagnóstico de cardiopatía isquémica, de los cuales 10 mostraron un perfil enzimático característico del infarto agudo al miocardio y su correspondiente determinación de mioglobina sérica fué positiva. Sabemos que cuando por algún motivo de la enfermedad coronaria se produce desequilibrio entre la oferta y demanda de oxígeno en la célula miocárdica, es decir cuando la sangre que llega a una determinada zona es más escasa y por lo tanto llega menos oxígeno, el miocardio sufre isquemia y su metabolismo se altera. Por consiguiente cuando la etapa de isquemia se agrava se produce una lesión y posteriormente la necrosis miocárdial. Probablemente fue lo que ocurrió en estos pacientes.

En la tabla # 3 el paciente 29 presenta diagnóstico de cardiopatía isquémica, su perfil enzimático se presenta dentro del intervalo normal de referencia, pero sin embargo la determinación de mioglobina sérica fué positiva. En este caso quizá se este iniciando la necrosis miocárdial, donde como ya se mencionó, la mioglobina es la primera que pasa a la corriente sanguínea y se eleva su concentración.

Los otros nueve pacientes con diagnóstico de cardiopatía isquémica mostraron un perfil enzimático que esta dentro del intervalo normal de referencia y su correspondiente determinación de mioglobina sérica fué negativa lo que nos indica que no hay necrosis celular.

Cuatro pacientes con diagnóstico de angina inestable muestra-

ron un perfil enzimático dentro del intervalo normal de referencia y su correspondiente determinación de mioglobina fué negativa. Estos resultados confirman la bibliografía que nos indican que no existen por definición alteraciones enzimáticas, por lo tanto los cambios en el electrocardiograma son transitorios y no indican necrosis.

#### GRUPO POST-OPERATORIO

El valor promedio de cada una de las enzimas séricas en este grupo, se encuentra levemente elevado y el porcentaje de positividad para la determinación de mioglobina sérica es el más alto de los cuatro grupos en estudio, (66.6%).

Esto es debido a que en lesiones musculares severas se presentará la liberación exagerada de los componentes celulares, por lo tanto la mioglobina que se encuentra en el sarcoplasma de las fibras musculares pasará rápidamente al torrente circulatorio.

Como ya se mencionó el porcentaje de positividad para la determinación de mioglobina es el más alto debido a que la mayoría de los pacientes sufre directamente agresión muscular y debido a que la toma de muestra se realizó en el post-operatorio inmediato se detectaron concentraciones considerablemente elevadas de mioglobina sérica.

Además de que se estudiaron estos cuatro grupos de pacientes, se realizaron también las mismas determinaciones en pacientes con los siguientes padecimientos: Insuficiencia renal crónica, cirrosis hepática y politraumatizados; obteniéndose resultados claramente positivos para la determinación de mioglobina sérica.

### CONCLUSIONES

Por medio de un método inmunoquímico, se detectaron concentraciones elevadas de mioglobina sérica en pacientes que sufrían infarto agudo al miocardio, debido a que durante este padecimiento se presenta necrosis del músculo cardíaco y por lo tanto la liberación patológica de esta proteína.

La determinación inmunoquímica de mioglobina sérica es inespecífica para el diagnóstico de infarto agudo al miocardio, pues los resultados indican que además de que aparece durante este padecimiento también lo hace en pacientes post-operados, en pacientes que sufren cardiopatía isquémica, en politraumatismos y en cirrosis hepática.

Un buen funcionamiento renal es de gran importancia en la determinación de mioglobina sérica, pues el presente estudio mostró que también en pacientes con insuficiencia renal crónica se obtienen resultados "falsos-positivos" para el diagnóstico de infarto agudo al miocardio.

Se determino por medio del método inmunoquímico, que la concentración de mioglobina sérica en los pacientes "sanos" del grupo testigo, fué siempre menor de 90  $\mu\text{g}/\text{l}$ .

Durante el infarto agudo al miocardio, no siempre se encontró una correlación directa entre los resultados de los análisis enzimáticos y la determinación de mioglobina sérica. Esto significa que durante este padecimiento no siempre se observó el perfil enzimático alterado característicamente con niveles elevados de mioglobina sérica. Esto debido a la gran diferencia que existe en la cinética que presentan cada uno

de estos marcadores.

La determinación inmunoquímica de mioglobina sérica, es principalmente útil en los pacientes que no tienen más de cuatro horas de haberse iniciado los síntomas característicos del infarto agudo al miocardio.

Es conveniente que antes de confirmar el diagnóstico de infarto agudo al miocardio, utilizando la determinación de mioglobina sérica, se verifique que el paciente en estudio no presente ningún otro padecimiento ya mencionado donde también se pueden obtener resultados positivos.

Así mismo, para emitir un diagnóstico confiable de infarto agudo al miocardio, es necesario tener presente el tiempo que ha transcurrido desde el inicio de los síntomas y la toma de muestra, pues como ya se indicó, la mioglobina tiene la característica de elevar su concentración rápidamente después de haberse presentado la necrosis celular, pero así mismo, se elimina rápidamente por la orina, por lo que se recomienda realizar la toma de muestra máximo cuatro horas después de haberse iniciado los síntomas, pues de no ser así se obtendrán resultados "falsos negativos" para este diagnóstico.

Por todo lo que se ha mencionado anteriormente y debido también a la inespecificidad de la determinación de mioglobina sérica para diagnosticar infarto agudo al miocardio, se recomienda utilizar esta determinación como una prueba de apoyo, pues las determinaciones enzimáticas son indispensables para dar un diagnóstico confiable.

### PROPUESTAS Y/O RECOMENDACIONES

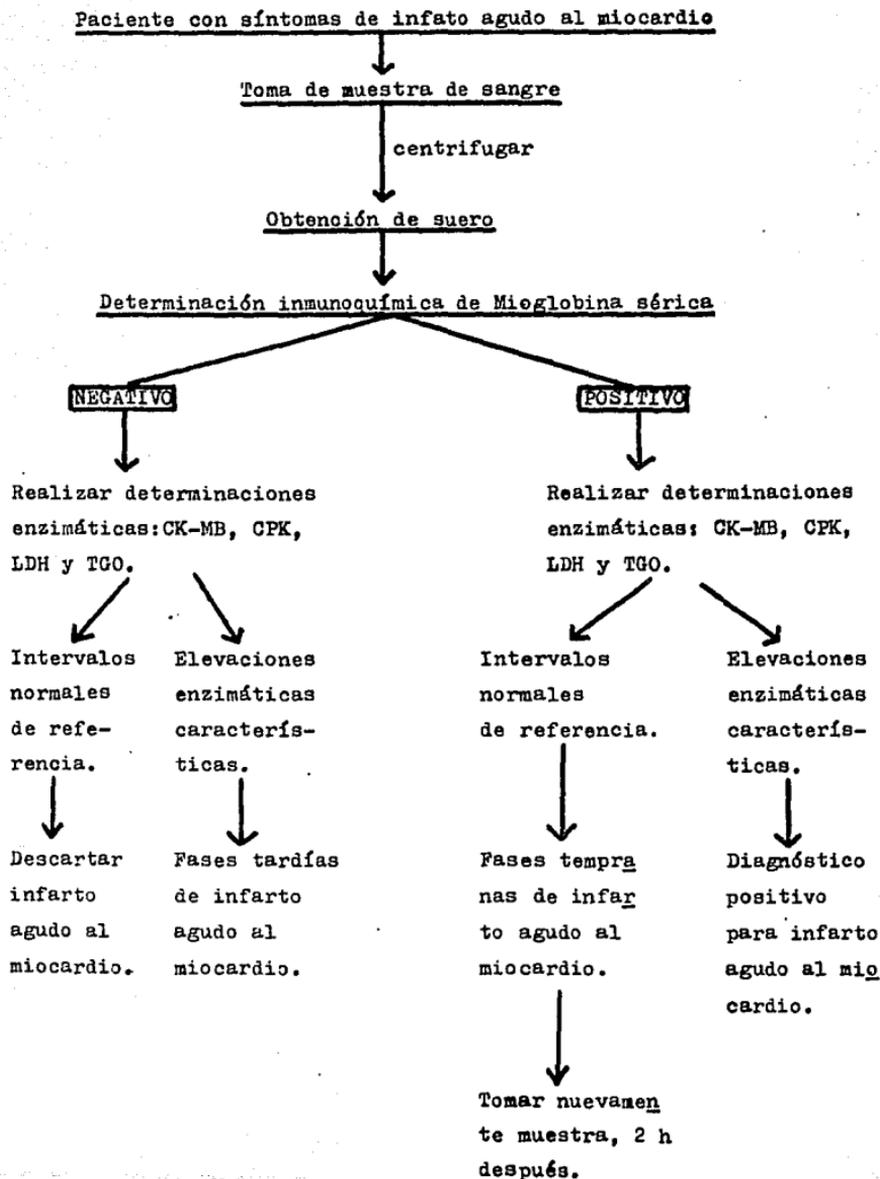
Se sugiere que se continúe este trabajo con los pacientes que presentan: cirrosis hepática, insuficiencia renal crónica y politraumatismos; para evaluar el porcentaje de positividad que se presenta para la determinación inmunquímica de mioglobina sérica, pues como ya se indicó en la discusión, éstos pacientes mostraron resultados claramente positivos para dicha prueba.

Así mismo, es muy importante que el médico de a conocer al químico, si el paciente con síntomas de infarto agudo al miocardio presenta otro padecimiento que pueda causar mioglobi-nemia, de ser así se recomienda realizar las determinaciones enzimáticas de : CK-MB, CPK, LDH, y TGO, así como la determinación de mioglobina.

Si se presentan elevaciones enzimáticas y la determinación de mioglobina es positiva, se confirma el diagnóstico de infarto agudo al miocardio.

En caso de no haber elevaciones enzimáticas y la determinación de mioglobina es positiva, se recomienda tomar nuevamente otra muestra de sangre dos horas después. Si aún después de este tiempo no se presentan elevaciones enzimáticas, se descarta el diagnóstico de infarto agudo al miocardio.

Se propone la siguiente secuencia de trabajo para el diagnóstico de infarto agudo al miocardio:



**ANEXOS**

#### A) OBTENCION DE LA MIOGLOBINA HUMANA

Se puede extraer la mioglobina del tejido muscular humano, obtenido seis horas después de su muerte, utilizando ultrafiltración por presión negativa (30 mm Hg) y diálisis exhaustiva con agua bidestilada para eliminar sales y pequeños péptidos.

Con una combinación de procedimientos electroforéticos, esta preparación se puede purificar para posteriormente ser analizada (2).

También la mioglobina humana puede purificarse del tejido del corazón por el método de Yamazaki et al (35), modificado por Stone (28).

La pureza de la mioglobina aislada se demostró por electroforesis utilizando discos de poliacrilamida (4), los resultados mostraron una banda simple de protefna mioglobina. La purificación del antígeno fué buena, por lo que posteriormente se congeló y se almacenó en seco; hasta ser requerida para preparar el antígeno y clasificarse por métodos de radioinmunoensayo y soluciones estándar, (16).

#### B) PREPARACION DEL ANTISUERO DE MIOGLOBINA

La mioglobina (500g): fué disuelta en solución salina fisiológica estéril (0.5 ml) y mezclada con adyuvante incompleto de Freund.

La mezcla se emulsificó y se inyectó intradérmicamente en cada uno de seis conejos adultos albinos. La toma de sangre fué realizada de 10-14 días después de cada inyección y la inyección se aplicó a intervalos de un mes. Seis meses después de la inyección inicial los conejos se sangraron por completo y el antisuero óptimo fué utilizado para el ensayo de mioglobina (16).

### - C) PREPARACION DE LA MIOGLOBINA

300g de tejido muscular fueron obtenidos por autopsia seis horas después de su muerte. El tejido fué macerado y lavado tres veces con PBS (0.01M,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ; NaCl 0.14M, pH 7.2;  $\text{NaN}_3$  0.01M como preservativo) y el residuo fué homogenizado a 4°C. Posteriormente centrifugado (3000 rpm, 4°C, 15 min.) el sobrenadante fué ultrafiltrado en tubos Viskin 8/32, a 30 mm Hg de presión. El filtrado fué dializado exhaustivamente con agua bidestilada para eliminar sales y pequeños péptidos. El material no dializable fue congelado en seco. Posteriormente redisolviendo en PBS (10-50 mg/ml) 23-27% el material seco restante insoluble (2).

#### Otro metodo alternativo:

Se obtuvieron biopsias de musculo, durante la autopsia tres horas despues de su muerte, en pacientes con enfermedad cardíaca o muscular. Los tejidos fueron homogenizados y extraídos de acuerdo al método de Surger y colaboradores. Los extractos de mioglobina fueron disueltos en pequeñas cantidades de agua destilada para colocarse en una columna de cefadex. La columna de 3 X 100cm fué eluida con buffer de fosfato 0.01M, pH 7.2, 5°C. La mioglobina conteniendo el eluyente fué perfectamente purificada por cromatografía en columna de celulosa (DEAE 2 X 10 cm) con la muestra de buffer usada como eluyente. Se obtuvo de 3-5 mg/g de mioglobina por peso de biopsia de tejido muscular.

**D) VALORACION SEMICUANTITATIVA DE MIOGLOBINA SERICA MEDIANTE SERIES DE DILUCION.**

El suero a analizar se diluye con solución isotónica de cloruro de sodio o con solución tampón de fosfato y se examina con el equipo de Rapitex-Mioglobina como se realizó en la determinación inmunofísica de mioglobina sérica (ver sección de material y métodos). Se valora la dilución del suero en la cual, en el transcurso de cinco minutos se observa clara aglutinación.

Aglutinación de la dilución de suero:	Corresponde a una concentración mínima de:
	$\mu\text{g/L.}$
1:2	200
1:4	400
1:8	800
1:16	1600

**E) VALORES DE REFERENCIA DE LAS ENZIMAS SERICAS EN ESTUDIO:**

- CK-MB:** En el suero de personas sanas las actividades de la isoenzima CK-MB son inferiores a 10 U/L.
- CPK:** Hombres de 10-80 U/L  
Mujeres de 10-70 U/L.
- LDH:** 80-240 U/L.
- TGO:** Hombres de 5-17 U/L.  
Mujeres de 5-15 U/L.
- TGP:** Hombres de 5-23 U/L.  
Mujeres de 5-19 U/L.

**F) SIGNIFICADO DE LOS DIFERENTES DIAGNOSTICOS MENCIONADOS**

**Angina inestable:** Dolor en el área cardíaca, en reposo o en marcha.

**Avance rotuliano:** Operación de la rótula.

**Cistocele:** Caída de la vejiga en diferentes grados.

**Colecistectomía:** Retirar la vesícula.

**Colpoperinorrafia:** Acto quirúrgico para reparar la caída de la vejiga.

**Loparatomía:** Acto quirúrgico donde se explora la cavidad abdominal.

**Osteosíntesis:** Acto quirúrgico donde se implanta material de ortopedia (clavo, placas, etc.)

**Safevatomía:** Retirar vena safeva.

**Hernioplastia:** Reparación del orificio de la hernia.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Barret, T.J. (1972). Introducción a la inmunología y la inmunobiología. Ed. Interamericana. 1a. ed. México. pp. 11-12, 17, 20, 23.
- 2.- Boesken, W.H. (1976). Human Mioglobin, Preparation, Quantitation and Standardization. Med. Clin. 55, D-7800
- 3.- Bohinski, R.C. (1973). Modern concepts in Biochemistry. Allyn and Bacon Inc. 2nd. ed. New York. pages. 123-129.
- 4.- Bulton, F.E. and Hustman, R.G. (1971). The detection of mioglobin in urine and its distinction from normal and variant haemoglobin. J. Clin. Pathol. 24: 816-821.
- 5.- Brobeck, J.R. (1973). Physiological basis of medical practice. The Williams Wilkins Company. 9 ed. Baltimore. pages 110-113.
- 6.- Burnham, S., and Walker, M.D. (1956). Biochemistry and human metabolism. The Williams Wilkins Company. 2nd. ed. Baltimore. pages. 152-153, 720.
- 7.- Fudengerg, H.H. (1983). Inmunología básica y Clínica. El Manual moderno, . 4a ed. México. pp 7,298, 366, 757.
- 8.- Gran Enciclopedia Larousse. Ed. Planeta S.A. Córcega. 1980. Tomo VII (10 tomos) p. 330.
- 9.- Grossman, R.A. (1974). Nontraumatic rhabdomyolysis and acute renal failure, . New. Engl. J. Med. 291: 807-811.
- 10.- Johnson, W.J. (1959). Unrecognised myocardial infarction. Arch. Intern. Med. 103-253.
- 11.- Kagen, L.J. (1967). Immunologic detection of mioglobinuria

- after cardiac surgery. *Ann Int. Med.* 67 : 1183-1189.
- 12.- Keller, P., and Munscher, G.P. (1976). Immunogischer Myoglobinnachweis beim Herzinfarkt. *Therapiewoche.* 11: 1974.
- 13.- Kossmann, R.J. (1963). Idiopathic recurrent myoglobinuria. *Am. J. Med.* 34:554-564.
- 14.- Lenhinger, L.A. (1972). *Bioquímica*. Ed. Omega S.A. 5a. ed. Barcelona. pp. 125-195.
- 15.- Levinc, R.S. (1971). Myoglobinuria in myocardial infarction. *Am. J. Med. Sci.* 262: 179-183.
- 16.- Maddison, A., Craig, A., and Peter Sleight. (1980). The role of serum Myoglobin in the detection and measurement of myocardial infarction. *Clin. Chem. Acta.* 106: 17-28.
- 17.- Maddison, A. ( 1978). The role of serum and urine myoglobin estimations in the detection and measurement of myocardial damage, Ph. D. Thesis. Brunel University (London).49.
- 18.- Mahler, R.H. (1971). *Biological Chemistry*. Harper & Row Publishers. 2nd ed. New York. 150-155, 164.
- 19.- Norregaard-Hansen, K. (1984). A rapid latex agglutination test for detection of elevated levels of myoglobin in serum and its value in the early diagnosis of acute myocardial infarction. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 44: 99-103.
- 20.- Norregaard-Hansen, K. (1979). Rapid and sensitive radioimmunoassay for human myoglobin. *Scand. J.Clin. Lab. invest.* 39: 525.
- 21.- Olerud, J.E. (1975). Factors affecting assay of myoglobin by complement fixation or immunodiffusion. *Clin. Chem.*

21: 1657-1667.

- 22.- Reichlin, M. (1980). Rapid immunoassay for serum myoglobin. Am. J. Physiol. 239: 565-H.
- 23.- Rowland, L.P. (1968). Myoglobin and muscular dystrophy. Arch. Neurol. 18 : 141-150.
- 24.- Roxin, L.E. (1980). A fast sensitive radioimmunoassay of human myoglobin for use in the early diagnosis of heart infarction. Clin. Chem. Acta. 107: 129.
- 25.- Saranchak, H.S. (1974). A new diagnosis test for acute myocardial infarction. J.A.M.A. 228: 1251-1255.
- 26.- Shapiro, M. Eduardo Meaney, and Simon Horwist. (1979). Infarto agudo del miocardio. Ed. Continental. 3a ed. México. pp. 46-53.
- 27.- Sobel, B.P., and Shell, W.E. (1972). Serum enzyme determinations in the diagnosis and assesment of myocardial infarction. Circulation. 45: 471-482.
- 28.- Stone, M.J. Willerson, J.T., Gómez Sánchez, and Waterman, M.R. (1975). Radioimmunoassay of myoglobin in human serum. Results in the patients with acute myocardial infarction. J. Clin. Invest. 56: 1334-1339.
- 29.- Strand, L.F. (1982). Fisiología Humana. Ed. Interamericana. 1a. ed. México. pp. 37. 523.
- 30.- Tietz, N. (1972). Química clínica moderna. Ed. Interamericana. 1a ed. México. pp 269-289.
- 31.- Vernon, B.M. (1968). Medical physiology (II). T.C. Company.

3rd ed. Saint Louis. pages. 165-167.

- 32.- Volk, P. (1973). Myoglobin in serum nach Herzinfarkt, Munch. Med. Wschr. 115: 2222-2228.
- 33.- Wagner, G.S. The importance of identification of the myocardial specific isoenzyme of creatine phosphokinase (MB form) in the diagnosis of acute myocardial infarction. Circulation. 47: 263-269.
- 34.- White, A. (1970). Principios de bioquímica. Mc Graw Hill. 4a. ed. México. pp 140, 772.
- 35.- Yamasaki, I., Yakota, K.N., and Shikama, K. (1974). Preparation of crystalline oxymyoglobin from horse heart. J. Biol. Chem. 239: 4151-4153.