

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA



COMPORTAMIENTO DE LAS ISOENZIMAS DE
LA FOSFATASA ALCALINA Y LEUCINA AMINO-
PEPTIDASA EN PADECIMIENTOS HEPATICOS

T E S I S
QUE PRESENTA
JULIETA WOO GONZALEZ
PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BILOGO

México, D. F.

1976



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

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

Jurado asignado originalmente según el tema

PRESIDENTE: GUADALUPE VELEZ PRATT
V O C A L: DEA CORONADO PARDOMO
SECRETARIO: MA. ELENA BUSTAMANTE CALVILLO
1er. SUPLENTE: ESTER GUTIERREZ HIDALGO
2do. SUPLENTE: LETICIA CARRASCO RIVERA

Sitio donde se desarrolló el tema: CENTRO MEDICO LA RAZA

Nombre completo del sustentante: JULIETA WOO GONZALEZ

Nombre completo del asesor del tema: DEA CORONADO PARDOMO

A MIS PADRES:

ARTURO Y JUANITA

CON CARIÑO Y AGRADECIMIENTO.

A MI ESPOSO E HIJO

CON AMOR Y TERNURA.

A MIS HERMANOS:

ARTURO Y LILA

ANGEL Y DANIRA

MARIO Y ZORINA

JORGE Y MARTHA

PAPY

GRISELDA

LORENA

MARY

CON CARIÑO.

A LA MAESTRA DEA,

CON AGRADECIMIENTO.

A MIS AMIGOS Y COMPAÑEROS.

Y A TODAS LAS PERSONAS QUE
AYUDARON A LA REALIZACION
DE ESTA TESIS.

CAPITULO	I.- Introducción
CAPITULO	II.- Generalidades
CAPITULO	III.- Material y Métodos
CAPITULO	IV.- Resultados
CAPITULO	V.- Discusión
CAPITULO	VI.- Resumen y Conclusiones
CAPITULO	VII.- Bibliografía

CAPITULO I

INTRODUCCION

CAPITULO I

INTRODUCCION

Tomando en cuenta que todas las enzimas son estrictamente-- de origen intracelular, su actividad medida en el suero refleja -- solo la entrada en el sistema circulatorio de la enzima liberada - al nivel celular. No se ha establecido en la actualidad un meca--- nismo por el cual es regulada la actividad enzimática, sin embargo- se puede mencionar que en un individuo adulto en estado de salud,- el nivel de actividad de la enzima permanece constante dentro de - los límites normales de acuerdo a su edad y sexo, al igual que su- modelo de isoenzimas, por lo tanto en presencia de un estado pato-- lógico que altere el mecanismo de un tejido pasan al sistema circu- latorio dando lugar a un aumento de actividad enzimática en el sue- ro. Un modelo de isoenzimas reflejará las características del te-- jido que sufre la lesión, cualquier dificultad que se presente pa- ra una interpretación acertada se deberá al desconocimiento de los mecanismos íntimos que regulan la actividad enzimática en el suero en condiciones normales y patológicas.

En este trabajo se hará un estudio comparativo del compor-- tamiento de las enzimas leucina aminopeptidasa y fosfatasa alcalina, en pacientes que presenten cuadros ictericos obstructivos o hepatocelulares y con sospecha de neoplasia, así como la actividad de las diferentes isoenzimas de las fosfatasa alcalina de acuerdo- a los órganos que la producen, ayudando con los resultados obteni-

dos al diagnóstico de estos padecimientos.

CAPITULO II

GENERALIDADES

CAPITULO II

GENERALIDADES

FOSFATASA ALCALINA (F.A.).-

La fosfatasa alcalina (fosfohidrolasa de monoesteres de ácido ortofosfórico) es una enzima que hidroliza propiamente ésteres fosfato en un medio alcalino, y no tiene especificidad alta por sustrato. Es producida por diferentes órganos, osteoblastos, hepatocitos, células renales, de la mucosa intestinal y placentarias.

Desde 1930, Alexander B. Gutman usó la determinación de la actividad de la fosfatasa alcalina como un instrumento en el diagnóstico de enfermedades hepáticas y oseas. En su estudio de 1959--reconoció dos tipos de reacciones para la F.A.: 1o. Actuando como hidrolasa entre uniones fósforo-oxígeno y 2o. Actuando como una fosfatasa transferasa en que, el grupo fosforilo es transferido a una molécula aceptora con la aparición de fosfato inorgánico.

Esta enzima producida por diferentes órganos, posee una actividad idéntica o muy similar en ellas, no son proteínas idénticas ya que exhiben diferencias fácilmente demostrables en sus propiedades físicas, químicas e inmunológicas, se cree que la estructura del centro activo es idéntico en la enzima de una especificidad dada, cualquiera que sea su origen, pero los órganos de sucesión de aminoácidos puede variar.

Tiene una actividad óptima a un pH + ó - de 9.8 que será va

riante según el substrato sobre el cual actúa, la naturaleza del amortiguador usado, así como la presencia de activadores e inhibidores. La fosfatasa alcalina puede actuar sobre una gran variedad de substratos fisiológicos y no fisiológicos, aunque en realidad se desconocen los substratos naturales sobre los cuales actúan en el cuerpo.

Los iones Mg^{++} y Mn^{++} son activadores de la enzima observándose actividad óptima con el Mg^{++} 0.001M. Un cambio en la concentración de substratos o iones Mg^{++} puede variar su pH óptimo. Entre los amortiguadores que afectan la velocidad de acción de las enzimas se encuentran, barbital, glicina, piperacina, 2 metil-2 aminopropanol-1 (MAP), trishidroximetilaminometano (TRIS) y dietanilamina. La glicina deprime la actividad, quizá por enlazar Mg^{++} , los reactivos que contienen grupos hidroxilos alcohólicos aumentan su actividad, tal vez por reaccionar como aceptores de fosfato. Los iones fosfato, Zn^{++} , Be^{++} , AsO_4^{-4} , oxalato y CN^- , son inhibidores de la enzima. Entre los métodos que inhiben la enzima también se encuentran: combinación de inhibidores específicos (L-fenilalanina y L-homoarginina) su inactividad al calor, desnaturalización por urea, compuestos sulfhidrílos.

En 1930, Kay introdujo el uso de β -glicerofosfato como substrato y Bodansky lo uso en 1932 como base de su procedimiento clásico, uso un amortiguador de barbital débil que daba un pH de 8.8 a 37°C, posteriormente Shinowara, Jones y Reinhart modificaron el amortiguador barbital haciéndolo más alcalino y encontraron que

el pH óptimo para la reacción era de 9.0 con lo que consiguieron -- mayor actividad de la enzima.

En 1934, King y Armstrong propusieron el uso de fosfato --- de fenilo como sustrato. La velocidad de reacción se sigue por -- medición del fenol formado.

En 1947, Bessey, Lowry y Brock propusieron el uso de fosfa- to de fenilo substituido cromogénico (fosfato de p-nitrofenilo) co- mo sustrato. Es un ester incoloro pero se sigue la reacción por - observación de la velocidad de formación del color amarillo del -- ión p-nitrofenolato. La reacción es función lineal del tiempo.

Huggins y Talalay introdujeron el uso de difosfato de fenol ftaleína liberada en la reacción, la que se mide por la formación- del color rojo de la fenolftaleína en medio alcalino. El sustrato tuvo la desventaja (un ester difosfato) de efectuar dos reacciones hidrolíticas distintas y que transcurrían a velocidades diferentes, resultando una reacción enzimática que no es función lineal del -- tiempo. Recientemente Babson y sus colaboradores han preparado mo- nofosfato de fenolftaleína y demostraron juntos con otros investi- gadores que en este sustrato la cinética de reacción es función - lineal del tiempo y el sustrato es útil y sensible para determi-- nación de fosfatasas.

Todos estos métodos clásicos de "dos puntos" dependen de la medición del producto de reacción en el tiempo cero y después de - un período de incubación de 30 a 60 minutos.

Entre los substratos más utilizados en investigación y análisis clínicos son: β -glicerofosfato, p-nitrofenilfosfato, fenilfosfato, iodoxilfosfato, β -naftilfosfato, fenolftaleín monofosfato y difosfato. Se han empleado otros más recientes como metilumbeliferilfosfato y naftol AS-MX fosfato para métodos sensitivos a fluorescencia.

En el cuadro No. 1 se presenta una comparación de métodos para la determinación de la actividad de fosfatasa alcalina en suero.

	BODANSKY	SHINOWARA Jones-Rein- hart	KIND- KING	Besey-Lowry Brock
TIPO Amortiguador pH reacción	Manual Barbital 8.5-8.7	Manual barbital 9.4-9.8	Manual Carbonato 9.5-9.7	Manual Glicina 9.8-10.1
Unidad de determinación	1 mg P pro- ducido en 60 min.	1mg P pro- ducido en 60 min.	1mg fe- nol prod. en 15 min	1mmol PNP formado en 60 min.
Substrato	β -glicerofos- fato	-glicero- fosfato	fosfato de fenilo	fosfato de p-nitrofenilo
Intervalo normal	1.5-4.0 U/100 ml	2.2-6.5 U/100ml	3.5-13 U/100ml	0.7-2.7 U/litro
Intervalo normal convertido a U.I. mol/min/ml	8-22 mUI/ml	15-35 mUI/ml	25-92 mUI/ml	13-38 mUI/ml

Abreviaturas: PNP p-nitrofenol

U Unidad

mUI miliunidad internacional

Cuadro No. 1

ISOENZIMAS DE LA FOSFATASA ALCALINA.-

Entre 1952 y 1959 Pfleiderer, Wieland, Wieme, Market y otros investigadores, establecieron que una enzima podría existir en varias formas designándoles el nombre de isoenzimas o heteroenzimas, proteínas presentes en un mismo individuo con una actividad similar o parecida que pueden provenir de diferentes fuentes y exhiben diferencias en sus propiedades físicas y bioquímicas. En 1959 por medio de una técnica electroforética se logró separar las diferentes isoenzimas, siendo nombradas de acuerdo a su movilidad electroforética relativa a las fracciones proteicas, Figura No. 1

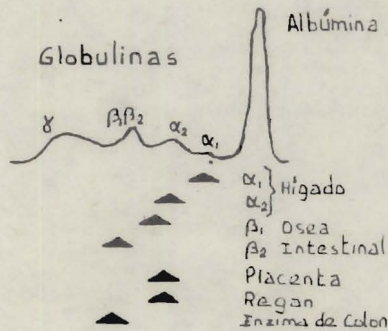


Figura No. 1

De acuerdo a su origen en el organismo, han sido observadas diferentes isoenzimas de la F.A.: hígado (se presentan dos tipos -- con movimiento electroforético diferente, clasificándolas como hígado rápido e hígado lento), hueso, placenta intestino y bilis, más -

recientemente isoenzimas de tejido neoplásico, Regan, Nagao y Hepato ma, pudiéndose indentificar por el descubrimiento de inhibidores organo-específicos los cuales inhiben la actividad de la F.A. de un -- órgano determinado. Esta especificidad orgánica de inhibición, Fishman y Sie sugirieron que existe un sitio "hidrofóbico", en el cen--- tro de actividad de la enzima que probablemente esta unida al grupo- hidrofóbico del inhibidor, los sitios hidrofóbicos de las diferen--- tes isoenzimas de la F.A. se piensa son distintas y que estas pro--- veen la especificidad del inhibidor a la isoenzima.

Las técnicas utilizadas para la determinación de isoenzimas -- son:

- a) Especificidad de algunas isoenzimas a determinados subs--- tratos.
- b) Inactivación por agentes químicos.
- c) Procesos inmunológicos.
- d) Inactivación por calor.
- e) Cromatografía y electroforesis usando diferentes medios -- de soporte.

Se hablará más específicamente sobre el método de electrofo-- resis ya que fue el que se utilizó en este estudio.

Es de gran importancia en los estudios de isoenzimas la espe- cificidad de sustrato, los más comunmente usados en investigaciones clínicas son: β -glicerofosfato, indoxil fosfato, fenil fosfato, β - naftil fosfato, monofosfato de fenolftaleina y difosfato.

El uso de activadores e inhibidores son también de gran im---

portancia para la diferenciación de isoenzimas, Mg^{++} ó Co^{++} son ac tivadores de todas las fosfatasa alcalinas (Ahmed y Col.) y subs-- tratos semejantes a EDTA inactivan la enzima. Según Schwartz y Col. la fosfatasa de hueso e hígado son inhibidas cerca de un 70 % por Ni^{++} 10^{-2} M. El Zn es esencial en la actividad de la enzima, se a -- observado que un tratamiento de la molécula con agentes quelantes - o procedimientos prolongados de diálisis los que remueven el Zn de la molécula o uniones Zn, siempre resulta en pérdida de la activi-- dad de la enzima.

También el uso de diferentes inhibidores órgano-específico - pueden inhibir la F.A. de un determinado órgano ayudando al análi-- sis diferencial de las isoenzimas de fosfatasa alcalina.

Fishman ⁽¹²⁾ observó que la L-fenilalanina es un inhibidor --- efectivo de F.A. intestinal. Ghosh reportó que F.A. intestinal y -- placentaria son inhibidas en un 80% por L-fenilalanina 5×10^{-3} M; las isoenzimas de hueso, hígado y otras no son afectadas por L-fenilala nina.

⁽¹¹⁾ Schwartz y Col. reportaron que la F.A. intestinal es re-- sistente a inhibición por ácidos biliares, F.A. de hueso, pulmón y riñón son inhibidas en igual intensidad.

La inactivación por urea ha sido estudiada por Horne y ---- ⁽¹³⁾ Col. como un método a distinguir entre varios tejidos de F.A. Fos fatasas de diferentes tejidos fueron preincubados a $37^{\circ}C$ en presen-- cia de urea 3M durante 18 minutos, obteniendo los siguientes resul-- tados:

TEJIDO	% DE ACTIVIDAD RESIDUAL
Hueso	15.9 (7.0-23.3)
Hígado	44.3 (14.9-65.4)
Bilis	60.3 (54.5-68.0)
Intestino	78.5 (71.8-87.9)
Placenta	79.1 (71.0-87.9)

Birket y col. ⁽³⁾ reportaron la desnaturalización selectiva por urea en el orden de: hueso > intestino > placenta. Otros investigadores obtuvieron inactivación con concentraciones altas de urea en el orden de riñón > hígado > intestino > placenta.

Inactivación por calentamiento.- La sensibilidad al calor puede ser usada para distinguir F.A. de hueso, hígado, intestino y placenta. Su facilidad de medida ha contribuido a ser uno de los métodos más comúnmente usados para el análisis de isoenzimas de F.A. en fluidos biológicos.

Moss y King ⁽¹⁴⁾ notaron diferente termoestabilidad entre fosfatasa alcalina humana de hueso e hígado. Latter y Posen observaron resultados semejantes en sujetos con enfermedades esqueléticas y hepáticas.

Fishman y Ghosh ⁽¹⁷⁾ usando enzimas purificadas de hueso, hígado e intestino observaron que la enzima de hueso es más sensible al calentamiento en un 85-90% que la de intestino (50-65%) y la de hígado (50-75%).

Recientemente Fishman y Col. ⁽¹⁶⁾ reportaron la presencia de --

una isoenzima de F.A. que tiene las características de la de placenta, llamandola isoenzima de Regan, también resistente al calor. Estudios hechos por Stolbach⁽¹⁸⁾ en suero de pacientes con cáncer inactivado por calor (16 minutos a 55°C) obtuvo una isoenzima parecida a la de Regan, así mismo postuló que el suero de pacientes con cáncer óseo perdían un 80% o más de actividad por calentamiento (20% ó menos de actividad residual); niveles perdidos de actividad en un 70% o menos indican enfermedad de hígado; pérdida del 40% de actividad presencia de isoenzima de Regan en pacientes con enfermedad maligna.

El suero de pacientes con enfermedades hepatobiliares y óseas tratados por calentamiento a 56°C por 10 minutos mostraron niveles de inactivación entre 50-75% para las primeras y niveles mayor del 89-95% para las segundas.

En la tabla No. 1 se muestra un estudio de la F.A. de hueso e hígado por inactivación por calor.

Migración electroforética.- La separación de isoenzimas por migración electroforética es de gran utilidad clínica, pudiéndose utilizar diferente medio de soporte: agar, almidón, papel, acetato de celulosa y gel de acrilamida.

Johnson⁽³⁾ utilizando gel de almidón y substrato naftol AS-MX fosfato, localizó 6 areas diferentes de actividad. Nakagama y Col.⁽³⁾ reportaron una nueva isoenzima (Nagao) utilizando gel de agar como medio de soporte, encontrada en pacientes con carcinoma de pleura-

y adenocarcinoma del páncreas. Utilizando alto voltaje en la electroforesis en gel de agar, da modelos idénticos de F.A. de placenta purificada.

(3)

Smith y Col. utilizando buffer de gel tris borato 5% a pH 9.5 y detectando las bandas con fosfato β -naftil, identificaron bandas de hígado, hueso, intestino y riñón humano, en base a su movilidad electroforética. Kaplan y Rodgers, identificaron 4 bandas por electroforesis en gel de poliacrilamida. Taswell y Jeffers⁽²⁰⁾ usando electroforesis en gel de almidón vertical, detectaron 8 isoenzimas que agruparon en tres modelos, el primero lo asociaron con enfermedades obstructivas, metastásicas o infiltración hepatobiliar; el segundo con enfermedades del parénquima hepático y el tercero con actividad osteoblástica.

(19)

Sussman y Col. usando electroforesis en gel de poliacrilamida reportaron el mismo R_f para separación de isoenzimas humanas (hígado, hueso, intestino y riñón) con excepción de isoenzima de placenta, Smith y Col. usando electroforesis en gel de acrilamida reportaron la separación de fosfatasa de placenta, hígado, -- hueso e intestino.

Estudios efectuados por Chung-Ja Mo Cha, Balduino Mastrofrancesco, Sungman Cha y Henry T. Randall,⁽²⁾ utilizando la técnica de electroforesis en membrana de acetato de celulosa observaron 7 bandas de isoenzimas de F.A.: L_1 , B, Pl, L_2 , I_1 , I_2 , y Pa. (hígado rápida, hueso, placenta, hígado lenta, intestino rápida, intestino lenta y probable cáncer de páncreas respectivamente). La ban-

da más lenta Pa la observaron en 16 pacientes (15 con cáncer del páncreas y uno con hemocromatosis). En 50 pacientes con enfermedades malignas y benignas no apareció la banda Pa, que difiere del punto de aplicación y de la banda intestinal, su calentamiento e inhibidores estereoespecíficos son diferentes de la isoenzima de intestino y es más estable que la banda L₂.

En la figura No. 2, se puede observar las diferentes bandas de isoenzimas obtenidas por el método de electroforesis en acetato de celulosa combinado con el de inactivación por calentamiento a 56°C por 10 minutos.

La isoenzima de hígado es la de movilidad más rápida al ánodo, aparece como una banda compacta. Existe otra banda de hígado pero con movilidad menor al ánodo, por calentamiento pierden de un 50-75% de actividad. La banda de hueso es la segunda en movilidad al ánodo, aparece como una banda difusa, es muy sensible al calentamiento, pierde cerca del 90% de actividad. La F.A. placentaria muestra una movilidad más lenta al ánodo que la de hueso, por calentamiento retiene prácticamente su actividad. La F.A. de intestino tiene una movilidad menor a ánodo que la de placenta.

En las figuras 3 al 8 se observa graficamente la movilidad electroforética de las bandas de isoenzimas.

Para este método se han utilizado diferentes amortiguadores con pH variante entre 7.5 - 9.3:

a) Amortiguador de Tris-citrato, 0.075M, pH 7.5

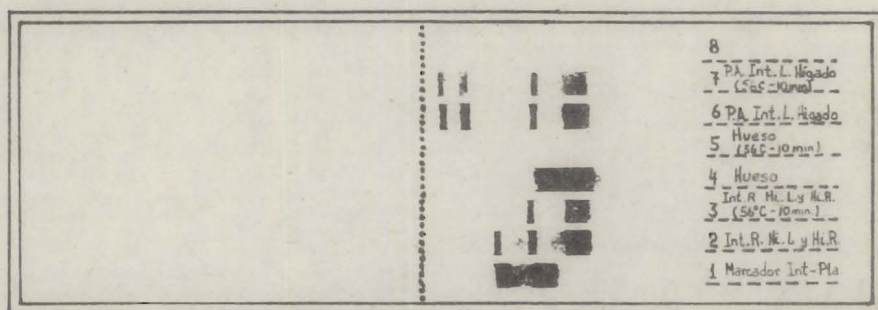


Figura No. 2.- Corrimiento de las diferentes bandas de isoenzimas - de la fosfatasa alcalina por el método de electroforesis en membrana de acetato de celulosa.

———— Suero sin inactivar
 ————— Suero inactivado

ABREVIATURAS:

HiR Hígado rápida
 HiL Hígado lenta
 InR Intestino rápida
 InL Intestino lenta
 Hu Hueso
 P.A. Páncreas

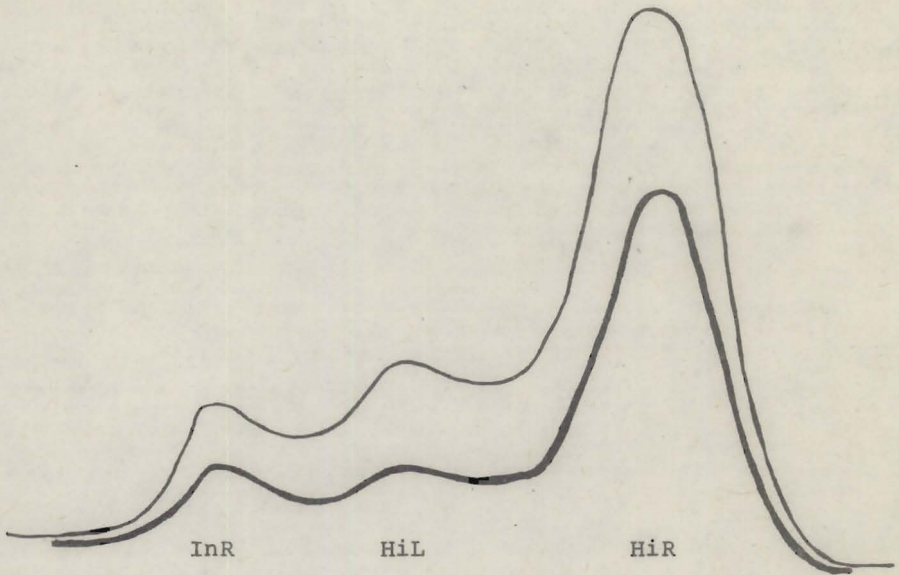


Figura No. 3.- Trazo densitométrico de las isoenzimas de F.A. de HiR, HiL e In. R.

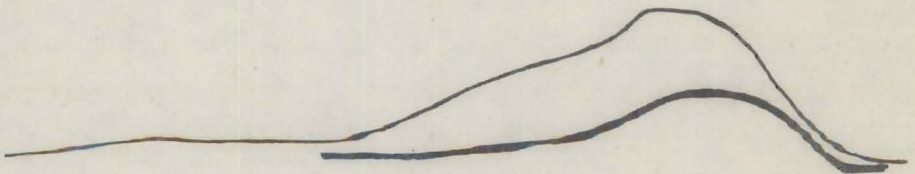


Figura No. 4.- Trazo densitométrico de las isoenzimas de F.A. de HiR, HiL, InL y P.A.

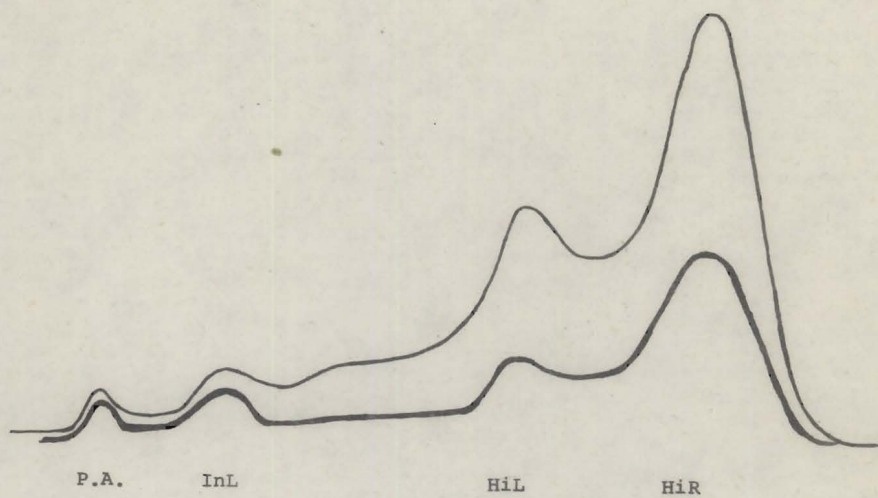


Figura No. 5.- Trazo densitométrico de las isoenzimas de F.A. de HiR, HiL, InL y P.A.

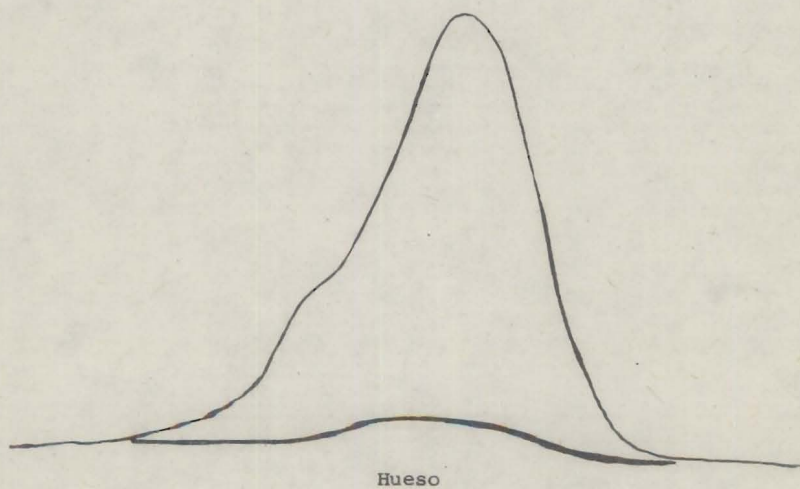


Figura No. 6.- Trazo densitométrico de las isoenzimas de F.A. de hueso.

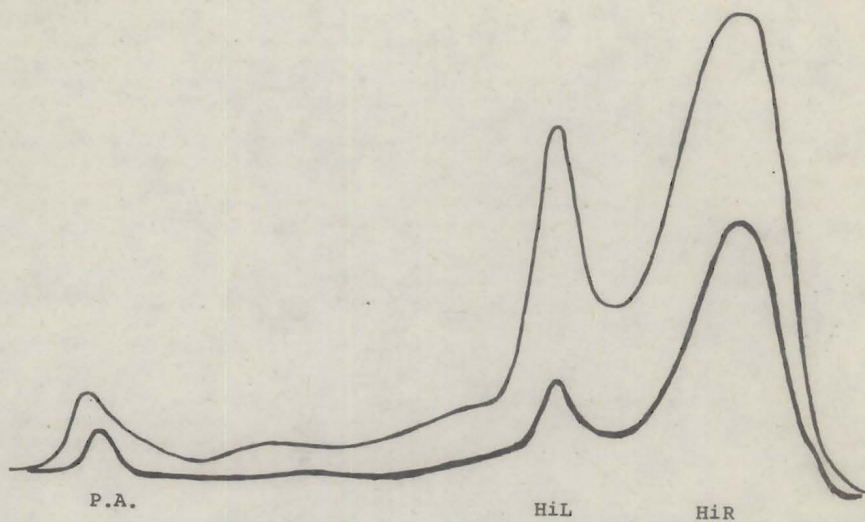


Figura No. 7.- Trazo densitométrico de las isoenzimas de F.A. de HiR, HiL y P.A.

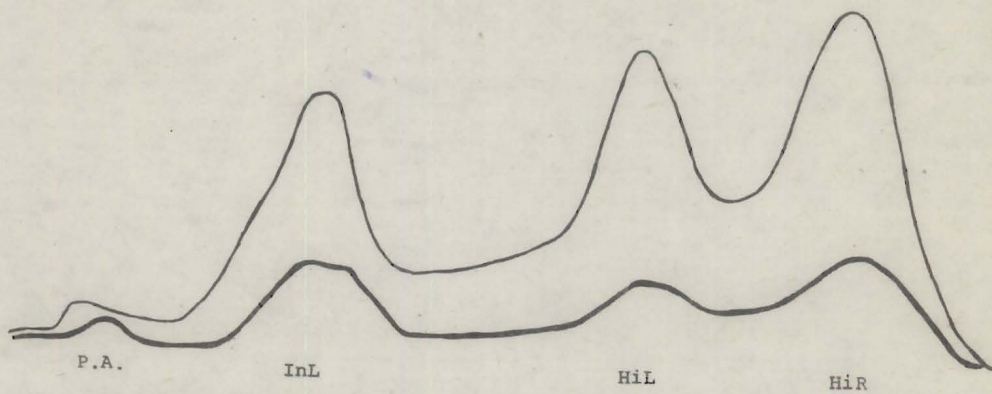


Figura No. 8.- Trazo densitométrico de las isoenzimas de F.A. de HiR, HiL, InL y P.A.

- b) Amortiguador Tris-barbital, fuerza iónica 0.04, pH 8.9
- c) Amortiguador Barbital, fuerza iónica 0.075, pH 8.6
- d) Amortiguador Tris-glicina, 0.2M, pH 9.3
- e) Amortiguador Tris-borato, 0.27M, pH 9.5

LEUCINA AMINOPEPTIDASA. (LAP)

La leucina aminopeptidasa es una enzima peptidolítica o --- proteolítica que cataliza la hidrólisis de residuos terminales N de ciertos péptidos y amidas que contienen grupo amino libre. Se ha encontrado distribuída en tejido humano en actividad creciente en riñón, intestino delgado, cerebro, intestino grueso, bazo, hígado, mucosa gástrica y páncreas.

La cuantificación de la actividad de la leucina aminopeptidasa (LAP), fue introducida por Goldberg y Rutenberg en el año de 1958, como un agregado al diagnóstico de cáncer del páncreas y enfermedades de hígado. Midieron colorimetricamente la cantidad de β -naftil amina liberada por la acción hidrolítica de la enzima sobre el sustrato L-leucil- β -naftilamina, despues de diazoación y ---- unión con N-(1-naftil)-etilendiamina, de acuerdo al procedimiento-- publicado por Green y Col.

Fleicher y Col. ⁽⁷⁾ emplearon L-leucilglicina como sustrato -- y determinaron la existencia de hidrólisis colorimétrica usando la reacción de ninhidrina.

Roth, ⁽⁷⁾ describió un método fluorométrico en el que usó como sustrato L-leucil- β -naftilamida, y midió la fluorescencia na-

tual de la naftilamina liberada después de un período de incubación sin trato especial.

Los iones magnesio pueden servir como activadores de la LAP que existe como un complejo disociable. Los iones cobalto (Co^{++}) sirven como activadores cuando L-leucil- β -naftilamina se emplea como sustrato.

Geet y Col. midieron la actividad enzimática de la LAP en tejido y suero por determinación de β -naftilamina liberada por la leucina aminopeptidasa hidrolizando L-leucil- β -naftilamina hidrocloreto. Estos trabajos determinaron colorimetricamente la cantidad de β -naftilamina liberada por la reacción de copulación con tetra-O-anisidina (diaz azul B) o una modificación de la reacción de Bratton Marshall.

La LAP en suero se encontró estable a temperatura de cuarto (25° - 28° C) por una semana mínimo y en congelación (-20° C) por tres semanas.

Puede usarse para la determinación de la LAP el plasma en lugar del suero, siempre que no se utilicen anticoagulantes que inhiban la actividad de la LAP, como oxalato de potasio, citrato de sodio o sal disódica. Ac. etilendiamina-tetracético y Co^{++} , es presentado como un activador en sustrato.

Para la determinación de la LAP en suero, actualmente se han encontrado dos métodos:

1.- Rompimiento de L-leucin- β -naftilamida. La β -naftilamina

liberada por la acción enzimática reacciona con una sal de diazo--nio estabilizada, por ejemplo Ehtrot B, originandose una unión --azo de color rojo intenso que puede ser medida fotocorimetricamente.

2.- Rompimiento de L-leucin-p-nitroanilina. La p-nitroanilina liberada en la reacción es de color amarillo intenso, pudiendo ser directamente medida por fotometría o registrada cineticamente.

La concentración elevada de la enzima en suero se han visto en una variedad de enfermedades pancreáticas, hepáticas y biliares. Estos valores son considerables en el diagnóstico de enfermedad de cáncer de páncreas y en metástasis hepática. La valoración de la LAP se compara favorablemente con niveles de F.A. excepto en presencia de enfermedades mieloide y osea, el cual no se afecta sus niveles.

Para obtener un valor diagnóstico en la determinación de estas enzimas, es necesario que se efectuen en forma simultánea, ya que individualmente no suministran una auténtica información diagnóstica.

ESTUDIO COMPARATIVO DE LA ACTIVIDAD DE LAS ENZIMAS LEUCINA-AMINO--PEPTIDASA Y FOSFATASA ALCALINA.

Se han hecho varios estudios comparando la actividad de las enzimas de LAP y F.A. Rubin Bressler, Ben R. Forsyth y Geral Klatskin.⁽¹⁰⁾ hicieron un estudio en varias enfermedades del hígado y el páncreas, y obtuvieron los siguientes resultados:

CARCINOMA DEL PANCREAS.- De 30 pacientes de 38-84 años de edad se observó una elevación de la actividad de la LAP. La F.A. tuvo niveles normales en 2 pacientes de un total de 29. La bilirrubina de 27 pacientes estuvo elevada. El resultado del exámen radiológico dentro del tracto gastrointestinal de 29 pacientes se observaron 17 normales y 12 con cáncer del páncreas. El diagnóstico fue confirmado por intervención quirúrgica o autopsia.

CANCER DE CUERPO O EXTREMIDAD DEL PANCREAS.- En 19 pacientes 17 estaban ictericos, 3 con metástasis hepática, 3 con metástasis mínima y 13 con metástasis masiva. Los valores de F.A. fueron normales, en 17 de los 19 estuvo incrementada la actividad de LAP.

COLEDOCOLITIASIS.- Se estudiaron 26 pacientes entre 23-28 años de edad. 30 pacientes con hiperbilirrubinemia y 6 anictéricos en admisión; 27 de los cuales manifestaron niveles normales de F.A. y en todos ellos los resultados de la LAP fueron variables.

COLEDOCOLITIASIS PERIODICA O RESIDUAL.- En 19 pacientes de 62-68 años de edad con colecistectomía o coledocostomía de los cuales 2 presentaron ictericia ligera y 7 fueron anictéricos, los resultados obtenidos de F.A. en 6 de ellos fue elevada y 3 con límites normales, la concentración de LAP estuvo aumentada en todos los pacientes.

HEPATITIS VIRAL.- De 50 pacientes con hepatitis viral aguda o hepatitis tóxica, el 96% de los pacientes mostraron elevación de LAP, la F.A. mostró elevación en 21 de 40 pacientes.

METASTASIS DE TUMOR HEPATICO.- Fueron estudiados 50 pacientes con metástasis hepática de carcinoma de varios órganos, 40 fueron no ictéricos y 10 ictéricos. 30 de los anictéricos tuvieron incremento de LAP. De los 36 pacientes 20 presentaron F.A. elevada y 16 normal, los 36 pacientes mostraron niveles elevados de LAP. Tabla No. 2 y 3.

En las tablas No. 4 y 5, se presentan los resultados de las investigaciones efectuadas por Esteban P. Pineda, Julius A. Goldberg, Benjamín M. Banks y Alexander M. Rutenburg,⁽⁸⁾ de la actividad de la LAP en suero y de otras pruebas hepáticas en pacientes que presenten carcinoma de la cabeza del páncreas o conductos biliares extrahepáticos y agudeza viral o hepatitis crónica.

PRUEBA	No. de pruebas	ambos normal	ambos anormal	LAP anormal otro normal	Otro anormal LAP normal
		%	%	%	%
Bilirrubina	210	5	67	12	16
Fosfatasa alcalina	114	4	67	7	22
Transaminasa <u>gluta</u> mica oxalacética.	190	8	69	10	13

TABLA No. 2.- Comparación de la actividad de LAP en suero con otras pruebas de función hepática, en pacientes con enfermedades hepatobiliares.

PRUEBA	No. de Pruebas	LAP	Valores en otras pruebas de anormalidad hepatobiliar.
		anormal	
		%	%
BILIRRUBINA Y LAP.			
Enfermedad hepatobiliar	137	84	87
Ictericia obstructiva	35	71	91
Metástasis hepática	27	93	85
FOSFATASA ALCALINA Y LAP			
Enfermedad hepatobiliar	89	76	93
Ictericia obstructiva	18	83	89
Metástasis hepática	25	92	92
TRANSAMINASA GLUTAMICA-OXALACETICA.			
Enfermedad hepatobiliar	115	86	86
Ictericia obstructiva	26	85	91
Metástasis hepática	26	88	100

TABLA No. 3.- Relativa sensibilidad de la actividad de LAP y otras pruebas de anormalidad hepatobiliar en suero, en pacientes con probable enfermedad hepatobiliar.

PRUEBA	No. de pacientes	Valores	anormales
Leucina Aminopeptidasa	42	42	100
Fosfatasa alcalina	41	36	88
Transaminasa glutámica Oxalacética	15	14	93
Transaminasa glutámica pirúvica	6	3	50

TABLA No. 5.- Actividad de la leucina aminopeptidasa y otras pruebas hepáticas en suero de pacientes con carcinoma de la cabeza del páncreas o conductos biliares extrahepáticos.

PRUEBA	No. de Pacientes	VALORES ANORMALES	
Leucina aminopeptidasa	50	48	96
Transaminasa glutámica oxalacética	36	32	89
Transaminasa glutámica pirúvica	18	15	83
Fosfatasa alcalina	40	21	52
Colesterol total	19	7	37
Bilirrubina	50	45	90

TABLA No. 6.- Actividad de la Leucina aminopeptidasa y otras pruebas hepáticas en suero de pacientes con agudez viral o hepatitis crónica.

CAPITULO III

MATERIAL Y METODOS

CAPITULO III

MATERIAL Y METODOS

MATERIAL BIOLOGICO.

Se trabajó con muestras de sangre obtenidas de 50 pacientes adultos de ambos sexos, 35 femeninos y 15 masculinos, cuyas edades fluctuaban entre 29 y 70 años, hospitalizados en el CENTRO MEDICO-LA RAZA del 7o. piso de Gastroenterología, para hacer el diagnóstico diferencial de 2 grupos de padecimientos:

- 1.- Ictericos (obstructivos o hepatocelulares)
- 2.- Sospechosos de neoplasia, con el fin de confirmar el -- diagnóstico presuntivo dado por la historia clínica.

La toma de productos se realizó en condiciones basales, se procedió a separar el suero sanguíneo media hora después de su obtención y se realizó la determinación de fosfatasa alcalina y sus isoenzimas y de la leucina aminopeptidasa por las siguientes técnicas.

FOSFATASA ALCALINA

Técnica.- BESSEY LOWRY-BROCK.

FUNDAMENTO.

Las fosfatasas rompen el grupo fosfato del p-nitrofenil fosfato con formación del p-nitrofenol libre, que en solución ácida - diluída es incoloro. En medio alcalino se transforma en ión nitro-

fenolato con coloración amarillo intenso proporcional a la cantidad de la enzima presente. La reacción se efectúa durante 30 minutos exactamente y se detiene por la adición del hidróxido de sodio que inactiva la enzima y al mismo tiempo diluye el color del nitrofenolato.

2.- MATERIAL Y EQUIPO.

2.1 Substancias

Glicina q. p.

Cloruro de magnesio hexahidratado q. p.

Hidróxido de sodio q. p.

p-nitrofenil fosfato disódico q. p.

p-nitrofenol q. p.

2.2 Reactivos

Hidróxido de sodio 0.2 N

Hidróxido de sodio 0.02 N

Amortiguador alcalino

Stock substrato en tabletas

Solución estandar concentrada 10 mM/l

2.3 Preparación de soluciones

Hidróxido de sodio 0.02N.- Tomar 100 ml de la solución de hidróxido de sodio 0.2N y aforar a 1000 ml con agua destilada.

Substrato amortiguador alcalino pH 10.3.- Se prepara en el momento de usarse. Disolver una tableta de stock substrato en --

1.2 ml de agua destilada y añadir la misma cantidad de amortiguador alcalino.

Solución estandar diluída 0.05 mM/l.- Aforar 5 ml de la solución estandar concentrada a 1000 ml con agua destilada.

2.4 Material

Tubos de ensayo

Pipetas de 0.1 ml, 1 ml, 2 ml, 5 ml, y 10 ml.

Baño maria a 37°C.

2.5 Equipo

Fotómetro modelo M, serie No. 35507

3.- METODO

3.1 Material biológico.

0.1 ml de suero

3.2 Técnica.

- a) Marcar dos tubos con los números 1 y 2, añadir a cada uno 1 ml de substrato amortiguador alcalino precalentado a 37°C.
- b) Añadir 0.1 ml de suero al tubo marcado con el No. 2 y 0.1 ml de agua destilada al tubo marcado con el No. 1.
- c) Incubar a 37°C durante 30 minutos exactamente.
- d) Añadir a los dos tubos 10 ml de hidróxido de sodio 0.02N y mezclar por inversión.
- e) Leer a 415 nm.
- f) Llevar a 100 por ciento de transmitancia con el tubo 1 y anotar la lectura del tubo No. 2.

- g) Añadir dos gotas de ácido clorhídrico concentrado en cada tubo y mezclar por inversión.
- h) Volver a leer ajustando a 100 por ciento de trasmittancia -- con el tubo No. 1

Unidades de la Unidades de la
UNIDADES DE F.A. = la. lectura - 2a. lectura.

UNIDAD DE F. A.

La unidad enzimática se define como el número de milimoles- de p-nitrofenol formado en 60 minutos por litro de suero.

4.3 CURVA DE CALIBRACION

Tubo No.	H ₂ O dest. ml.	NaOH 0.2N ml	Sol. estandar diluida 0.05 nM/l	Unidades alcalinas
1	10	1.1	0	0
2	8	1.1	2	2
3	6	1.1	4	4
4	4	1.1	6	6
5	2	1.1	8	8
6	0	1.1	10	10

Llevar a 100% de trasmittancia con el tubo No. 1. Leer a 415 nM.

4.4 VALORES NORMALES

Adultos 0.8-2.3 Unidades
Niños 2.8-6.7 Unidades

En caso de lectura muy alta, diluir con un tubo tratado como blanco y multiplicar el resultado por dos (2).

ISOENZIMAS DE LA FOSFATASA ALCALINA.

Técnica.- Procedimiento de Beckman Microzona en membrana de acetato de celulosa.

1.- FUNDAMENTO

Las isoenzimas de la F. A. son separadas por electroforesis en membrana de acetato de celulosa. La actividad relativa es determinada por incubación en un gel conteniendo un substrato iodoxil,-seguido por una determinación densitométrica de el color resultante. Para facilitar la interpretación del electrofotograma se aplica igual cantidad de suero calentado a una temperatura de 56°C por 10 minutos y suero sin calentar en la misma membrana.

2.- MATERIAL Y EQUIPO

Substrato fosfatasa alcalina

Amortiguador fosfatasa alcalina pH 10.2

Isoenzimas de F. A.

Agar-Noble Difco 2%

2.2 Preparación de reactivos.

Substrato F. A. p-toluidin 5 Br-4 Cl-3 iodoxil fosfato $2 \times 10^{-3}M$ reconstituido con 8 ml. del amortiguador pH 10.2 estable por 8 horas en refrigeración.

Amortiguador fosfatasa alcalina pH 10.2.- 2 metil amino 1-3 --
propanodiol, cloruro de magnesio $2 \times 10^{-3}M$, estable por un año
entre temperaturas de 2 a 8°C.

Isoenzimas de fosfatasa alcalina.- Una mezcla de isoenzimas de
F. A. de intestino de bovino y de placenta humana en un medio-
estabilizado. Reconstruir con 2 ml de agua destilada. Estable-
por un año en estado seco a temperatura de 2-8°C.

Amortiguador - Gelman HR.- Barbital-tris pH 8.8, fuerza iónica
0.04.

2.3 Equipo

Cámara modelo Beckman R-100 para microzona, sistema electroforé-
tico con membrana de acetato de celulosa.

Densitómetro Beckman Modelo R-110, con integrador digital para-
microzona modelo R-111.

Aplicador de microzona de 0.025 microlitros

Membrana de acetato de celulosa.

2.4 Material.

Pipetas pasteur

Pipetas de 1, 2, 5 y 10 ml.

Vasos de precipitado

Charola de plástico.

3.- TECNICA

3.1 Material biológico.

Suero sin inactivar

Suero inactivado por calentamiento a 56°C por 10 minutos

3.2 P-rocedimiento

3.2.1 Se coloca la membrana de acetato de celulosa en un recipiente conteniendo solución amortiguadora y dejarla por 5 a 10 minutos.

3.2.2 Sacar la membrana y secarla antes de colocarla en la celda -- Beckman, a la cual se le añadió solución amortiguadora Gelman - HR hasta la marca.

3.2.3 Aplicar un microlitro de suero (4 aplicaciones) en la posición cercana al cátodo.

3.2.4 Aplicar un microlitro de suero inactivado en la misma posición catiónica, y se procede a correr la electroforesis a 250 volts por 60 minutos o a 300 volts por 40 minutos, a una temperatura de 4°C. (se puede correr dentro del refrigerador). El corrimiento de las muestras se realiza de CATODO (-) AL ANODO (+).

3.3 Desarrollo del calor.

3.3.1 Reconstruir el substrato de F. A. con 5.0 ml de amortiguador-pH 10.2.

3.3.2 Durante la separación electroforética calentar el frasco de - Agar-Noble en un baño de agua hirviendo hasta que funda. Enfriar a una temperatura de 70°C aproximadamente y mezclar con el fras

co de substrato reconstruido. Colocararlo inmediatamente en la charola de plástico de manera que se extienda uniformemente -- por toda la charola y dejarlo a temperatura del cuarto a que se solidifique.

3.3.3 Cuando la separación electroforética es completa, remover la membrana de la celda y extenderla sobre la superficie de agar de manera que ésta quede invertida. Cuidar que no queden burbujas de aire entre la membrana y la superficie de agar. Incubar a 37°C por una hora.

3.3.4 Al terminar el desarrollo de color de las muestras, se remueve la membrana y se lava, primero al chorro de agua y después con ácido acético al 5% de una a tres veces. Se seca la membrana a temperatura ambiente por 1¹/₂ hora.

4. Trazos densitométricos.

Fueron obtenidos con equipo densitométrico Beckman modelo R-110, con un integrador digital modelo R-111 microzona. El -- area bajo la curva nos da el valor de las isoenzimas.

NOTA.

La inactivación del suero se realiza de la siguiente manera: Una alícuota del suero es incubada por 10 minutos en un baño -- maría con una temperatura de 56°C + ó - 1; inmediatamente se pasa a un recipiente con hielo dejándolo de 5 a 10 minutos; se saca el tubo con el suero ya inactivado y se deja a temperatura ambiente.

La temperatura del baño maría debe ser cuidadosamente controlada porque marcados cambios de calentamientos causa desnaturalización por las pequeñas variaciones de temperatura. En cada membrana de acetato de celulosa se corren 8 muestras de suero. (4 normales y 4 inactivadas).

LEUCINA AMINOPEPTIDASA.

Técnica.- Nagel W. y Szasz G.

1.- FUNDAMENTO

La LAP rompe el extremo terminal de la L-leucin-p-nitroanilina liberando p-nitroanilina, produciendo un color amarillo intenso. Se toma la lectura de la reacción al 1 minuto, 2 minutos y tres minutos, a 405 nm. La determinación de la D. O. es por diferencia por minuto.

2.- MATERIAL Y EQUIPO

Celdilla

Tubo de ensayo

Pipetas

EQUIPO

Fotometro modelo M, serie No. 35507

Soluciones.

Solución amortiguadora

Liofilizado

Solución calibrada de p-nitroanilina

Solución fisiológica 0.9%

3.- TECNICA

Material biológico.

0.2 ml de suero

PROCEDIMIENTO.

3.1 Se disuelve el liofilizado con 3 ml de la solución amortiguadora y es estable por un día a 20-25°C o una semana aproximadamente a 4°C.

3.2 Colocar en una celdilla:

Solución amortiguadora	3.0 ml
Suero	0.2 ml

3.3 Se mezclan y se lee la D. O. al minuto. Volver a leer exactamente al segundo y tercer minuto.

3.4 Se encuentra el valor de la lectura sacando la diferencia por minuto (A E/min).

NOTA.- Cuando la diferencia de la D. O. entre las muestras es mayor a 0.080 por minuto (405), se mezclan 0.1 ml de suero con 0.4 ml de solución fisiológica 0.9% y se repite el ensayo con 0.2 ml de esta dilución. El resultado obtenido se multiplica por cinco (5).

Si la lectura no puede ser tomada a 405 nm, se prepara una-

curva estandar con p-nitroanilina solución calibrada y se lleva a cabo la determinación al método de 15 minutos.

Método de 15 minutos.- Verter la solución dentro de la celdilla y leer la D. O. E_1 , dejar por 15 minutos exactamente a 25°C y leer la D.O. E_2 .

$$E_2 - E_1 = E$$

Los valores para la actividad de la LAP se obtienen de la curva de calibración.

Cuando la diferencia de D. O. es mayor a 0.500 diluir la muestra como se indicó anteriormente.

CALCULO.

$$1616 \quad X \quad E_{405 \text{ nm/min}} = \text{mU/ml}$$

ó leer en tabla No. 6

Valores normales.

$$\text{Suero } 8 - 22 \text{ mU/ml (25°C)}$$

Unidad.-

La cantidad de enzima que convierte 1μ mole de substrato por minuto, bajo condiciones óptimas altas a temperatura de 25°C y relacionado a 1 ml.

$$1 \text{ mU} = 0.001 \text{ U}$$

$$1 \text{ U/ml} = \frac{1 \text{ mole substrato convertido}}{\text{minuto por mililitro.}}$$

C - SISTEMA
LAP.

TABLA DE VALORES PARA LPA
MEDIDA A 405 nm.

E/min	mU/ml	E/min	mU/ml
0.001	2	0.041	66
2	3	42	68
3	5	43	69
4	6	44	71
5	8	45	73
6	10	46	74
7	11	47	76
8	13	48	78
9	15	49	79
0.010	16	0.050	81
11	18	51	82
12	19	52	84
13	21	53	86
14	23	54	87
15	24	55	89
16	26	56	90
17	27	57	92
18	29	58	94
19	31	59	95
0.020	32	0.060	97
21	34	61	99
22	36	62	100
23	37	63	102
24	39	64	103
25	40	65	105
26	42	66	107
27	44	67	108
28	45	68	110
29	47	69	112
0.030	48	0.070	113
31	50	71	115
32	52	72	116
33	53	73	118
34	55	74	120
35	57	75	121
36	58	76	123
37	60	77	124
38	61	78	126
39	63	79	128
0.040	65	0.080	129

CAPITULO IV

RESULTADOS

RESULTADOS

Se presentan en los siguientes cuadros una clasificación de acuerdo a los distintos padecimientos de los 50 pacientes estudiados y en la mayoría de ellos datos de laboratorio que ayudan a la confirmación o modificación del diagnóstico, lo que están indicados en columnas así como los valores de referencia que se presentan en la primera línea.

Se presentan trazos densitométricos de las isoenzimas de fosfatasa alcalina sin inactivar e inactivada.

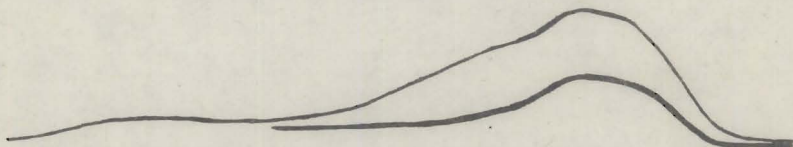


Figura No. 9.- Trazo densitométrico de una curva normal, observando 100% Hígado.

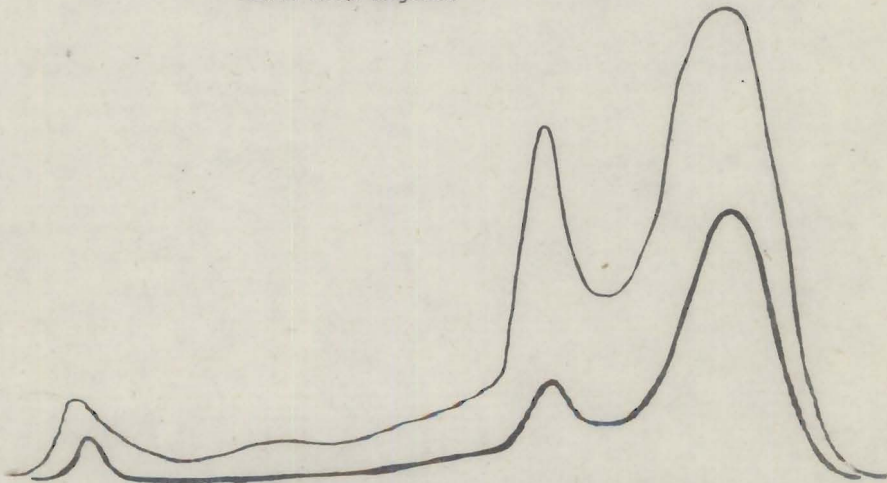


Figura No. 10.- Trazo densitométrico de un paciente que presentó coledocolitiasis, observándose bandas de isoenzimas de HiR, HiL y P.A.

CUADRO No. 1
 DIAGNOSTICO.- COLEDOCOLITIASIS

Valores normales			8-22 U.	0.7-2.7 U/ml							130-150 mg/100ml	0-0.2 mg/100	0.2-1.0 mg/100	15-40 U/ml	6-35 U/ml
Pac. No.	Edad	Sexo	LAP	F.A.	Isoenzimas de la F.A. (%)						Col	B.D.	B.I.	TGO	TGP
					HiR	HiL	Hu	InR	InL	P.A.					
1	58	F	11.0	12.0	39.95	32.85		23.32		4.0	350	5.5	4.7	64	70
2	58	F	14.5	14.0	50.2	34.44		9.4		3.9					
3	54	F	6.5	17.4	47.6	22.2		23.1		6.1	104	0.7	1.3	3.2	21
4	48	M	14.0	6.2	82.2		11.8				98	9.8	7.9	104	67
5	53	F	20.0	12.0	69.9	30.1					142	1.2	2.9	84	21
6	29	F	8.0	16.0	88.9		2.42	5.76		2.87	230	12.6	4.7	39	102
7	65	F	18.0	8.0	86.1		13.9				228	0.7	0.2	56	65
8	35	F	30.0	7.6	53.0		46.9								
9	43	F	5.0	4.4	60.2	39.8					153	0.2	0.3	36	22
10	52	F	3.0	7.3	72.0		8.5	19.5			365	1.2	5.2		
11	46	F	5.5	6.7	44.13	9.43	29.13		5.11		210/165	4.3	1.4	270	320

Se estudiaron 11 pacientes, todos presentaron niveles elevados de F.A. y solo uno de LAP. Su modelo electroforético presentó las siguientes bandas:

BANDA	No. de casos presentada	% promedio
Hígado	11/11	63.22
Hueso	6/11	19.01
Intestino	6/11	15.53
Pancreas	4/11	4.77

Abreviaturas
 HiR = hígado rapida
 HiL = hígado lenta
 Hu = hueso
 InR = intestino rapida
 InL = intestino lenta
 P.A. = Pancreas

CUADRO No. 2
 DIAGNOSTICO.- ABSCESO HEPATICO AMIBIANO

Valores normales			8-22 U	0.7-2.7 U/ml							130-150 mg/100ml	0-0.2 mg/100	0.2-1.0 mg/100	15-40 U/ml	6-35 U/ml	
Pac. No.	Edad	Sexo	LAP	FA	Isoenzimas de la F.A. (%)						Col	B.D.	B.I.	TGO	TGP	
					HiR	HiL	Hu	InR	InL	P.A.						
1	59	M	18.0	8.6	62.3	14.7	17.0				6	176	0.4	0.7	40	42
2	39	M	6.0	9.3	40.62	27.81		21.5		10.52	128	0.4	0.7	111	60	
3	29	F	8.0	16.0	89.84	89.84	3.81	6.71			230	12.6	4.7	39	102	
4	60	F	11	2.7	64.2	35.8					107	0.4	0.2	56	26	
5	43	F	7	24.7	51.72	27.6		12.64		8.04	121			102	30	
6	31	M	4	2.4	77.4		1.7	19.9			70	0.4	0.2	34	32	
7	30	M	8.0	10.4	67.0	28.0	5.0				137/91	0.5	0.4	68	75	
8	45	F	8.0	8.3	73.9	26.1					85/46	0.4	0.2	42	9	
9	52	F	9.5	12.4	54.8	45.2										
10	41	F	8.0	11.6	46.2	23.2		16.3	6.3	8.3						

Se estudiaron 10 pacientes, de los cuales 9 presentaron niveles elevados de F.A., y todos presentaron niveles normales de LAP. Su por ciento promedio observado de las bandas de -- isoenzimas fue:

BANDA	No.de casos presentada	% promedio
HIGADO	10/10	62.79
HUESO	4/10	6.89
Intestino	5/10	15.41
Pancreas	4/10	8.21

CUADRO No. 3
DIAGNOSTICO.- COLECISTITIS CRONICA

Valores normales			8-22U	0.7-2.7 U/ml						130-150 mg/100ml	0-0.2 mg/100	0.2-1.0 mg/100	15-40 U/ml	6-35 u/ml	
Pac. No.	Edad	Sexo	LAP	F.A.	Isoenzimas de la F.A. (%)					Col	B.D.	B.I.	TGO	TGP	
					HiR	HiL	Hu	InR	InL						P.A.
1	70	F	5	5.5	86.3		4.4	9.3			140	3.6	1.7	36	89
2	24	F	6.0	7.0	69.7	19.4	10.9				143/91	1.4	1.4	24	40

De 2 pacientes estudiados, ambos presentaron niveles elevados de F.A. y niveles normales de LAP. Su por ciento promedio de las bandas de isoenzimas observadas fue:

BANDA	No. de casos presentada	% promedio
HIGADO	2/2	78.0
HUESO	2/2	7.65
INTESTINO	1/2	9.3

CUADRO No. 4
DIAGNOSTICO.- CIRROSIS HEPATICA

Valores normales			8-22U	0.7-2.7 U/ml						130-150 mg/100ml	0-0.2 mg/100	0.2-1.0 mg/100	15-40 U/ml	6-35 U/ml	
Pac. No.	Edad	Sexo	LAP	F.A.	Isoenzimas de la F.A. (%)					Col	B.D.	B.I.	TGO	TGP	
					HiR	HiL	Hu	InR	InL						P.A.
1	48	F	50	5.8	60.9	39.1					85	2.8	3.1	120	69
2	51	M	55	24.0	47.33	36.24		13.12		4.13	166	0.4	1.0	16	34
3	51	M	25	10.4	69.9	30.1									
4	46	F	3	7.3	72.0		8.5	19.5			365	1.2	3.2		
5	49	M	28	8.0	48.56	24.24	27.10				107/64	0.6	0.3	29	12

Se estudiaron 5 pacientes, presentando todos niveles elevados de F.A. y solo 4 niveles de LAP. Su por ciento promedio de las bandas observadas fue:

BANDA	No. de casos presentada	% promedio
HIGADO	5/5	59.7
HUESO	2/5	17.8
INTESTINO	2/5	16.31
PANCREAS	1/5	4.13

CUADRO No. 5

DIAGNOSTICO.- OBSTRUCCION BILIAR

Valores normales			8-22U	0.7-2.7 U/ml							130-150 mg/100ml	0-0.2 mg/100	0.2-1.0 mg/100	15-40 Y/ml	6-35 U/ml
Pac. No.	Edad	Sexo	LAP	F.A.	Isoenzimas de la F.A. (%)						Col	B.D.	B.I.	TGO	TGP
					HiR	HiL	Hu	InR	InL	P.A.					
1	46	M	40	12.0	87.0		13.0				322	3.3	11.5	92	70
2	38	M	40	16.0	66.0	16.8	10.8				700	14.4	8.7	200	650
3	35	F	25	10.0	64.28		23.8	11.9							

Se estudiaron 3 pacientes, todos presentaron niveles elevados de F.A. y LAP. Su modelo electroforético presentó las siguientes bandas:

BANDA	No. de casos presentada	% promedio
HIGADO	3/3	72.42
HUESO	3/3	15.86
INTESTINO	1/3	11.9

CUADRO No. 6
 DIAGNOSTICO.- CANCER DE VESICULA

Valores normales			8-22U	0.7-2.7 U/ml						130-150 mg/100ml	0-0.2 mg/100	0.2-1.0 mg/100	15-40 U/ml	6-35 U/ml	
Pac. No.	Edad	Sexo	LAP	F.A.	Isoenzimas de la F.A. (%)					Col	B.D.	B.I.	TGO	TGP	
					HiR	HiL	Hu	InR	InL						P.A.
1	69	F	30	22.8	37.62	37.78		24.6			1040	24.4	12.9	110	102
2	64	F	25	18.0	53.4	22.3		17.6	6.3		390	22.7	15.9	92	68
3	64	F	30	21.4	56.2	33.4			8.3						
4	67	F	50	6.7	73.0	27.0					170	2.5	1.3	73	65
5	65	F	35	22.8	60.11	32.61					390/285	10.4	3.1	140	96

Se estudiaron 5 pacientes, todos presentaron niveles elevados de F.A. y LAP. Su por ciento promedio de las bandas de isoenzimas observadas fue:

BANDA	No. de casos presentada	% promedio
HIGADO	5/5	56.06
INTESTINO	2/5	21.1
PANCREAS	2/5	7.3

CUADRO No. 7
 DIAGNOSTICO.- CANCER DE ESTOMAGO

Niveles normales			8-22U	0.7-2.7 U/ml						130-150 mg/100ml	0-0.2 mg/100	0.2-1.0 mg/100	15-40 U/ml	6-35 U/ml
Pac. No.	Edad	Sexo	LAP	F.A.	Isoenzimas de la F.A. (%)					Col	B.D.	B.I.	TGO	TGP
					HiR	HiL	Hu	InR	InL					
1	52	F	25	22.8	56.75	15.3		28.2		650	9.4	6.3	111	102
2	64	F	2	2.6						150	-	-	18	6

Se estudiaron 2 pacientes, el primero presentó niveles elevados de F.A. y LAP, el segundo presentó niveles normales de las dos enzimas y su modelo electroforético presentó una curva normal. En el primero se observaron bandas de Hígado e intestino.

CUADRO No. 8
 DIAGNOSTICO.- CANCER DE COLON

Valores normales			8-22U	0.7-2.7 U/ml						130-150 mg/100ml	0-0.2 mg/100	0.2-1.0 mg/100	15-40 U/ml	6-35 U/ml
Pac.	Edad	Sexo	LAP	F.A.	Isoenzimas de F.A. (%)					Col	B.D.	B.I.	TGO	TGP
					HiR	HiL	Hu	InR	InL					
1	36	M	6	2.4	68.52		31.5			272	0.4	0.2	32	30
2	32	F	5.0	3.0	69.3	31.5		9.5						

Se estudiaron 2 pacientes los cuales presentaron niveles normales de F.A. y LAP. Su por ciento promedio de las bandas de isoenzimas fue:

BANDA	No. de casos presentada	% promedio
HIGADO	2/2	68.91
HUESO	1/2	31.5
INTESTINO	1/2	9.5

CUADRO No. 9

DIAGNOSTICO.- CANCER VIAS BILIARES

Valores normales			8-22U	0.7-2.7 U/ml							130-150 mg/100ml	0-0.2 mg/100	0.2-1.0 mg/100	15-40 U/ml	6-35 U/ml
Pac. No.	Edad	Sexo	LAP	F.A.	Isoenzimas de F.A. (%)						Col	B.D.	B.I.	TGO	TGP
					HiR	HiL	Hu	InR	InL	P.A.					
1	42	M	40.0	16.0	66.0	16.8		10.8			700	14.4	8.7	200	650
2	54	F	26.4	20.1	56.48	22.77		20.75			142	14.0	1.3	112	135

Se estudiaron 2 pacientes, ambos presentaron niveles elevados de F.A. y LAP. Su por ciento promedio de las bandas de isoenzimas fue:

BANDA	No. de casos presentada	% promedio
HIGADO	2/2	61.24
INTESTINO	2/2	15.77

CUADRO No. 10
DIAGNOSTICO.- CANCER DE CABEZA DE PANCREAS

Valores normales			8-22U	0.7-2.7 U/ml							130-150 mg/100ml	0-0.2 mg/100	0.2-1.0 mg/100	15-40 U/ml	6-35 U/ml
Pac. No.	Edad	Sexo	LAP	F.A.	Isoenzimas de la F.A. (%)						Col	B.D.	B.I.	TGO	TGP
					HiR	HiL	Hu	InR	InL	P.A.					
1	48	M	50	67.2	46.4	43.1				8.6	378	24.0	222	160	140
2	48	M	50	67.2	38.8	31.2		22.8		7.2					
3	56	M	25	18.0	53.4	22.3		17.6		6.7					

Los tres pacientes estudiados presentaron niveles elevados de la F.A. y LAP. Su por ciento promedio de las bandas de isoenzimas fue:

BANDA	No. de casos presentada	% promedio
HIGADO	3/3	47.0
INTESTINO	2/3	21.4
PANCREAS	2/3	7.65

CUADRO No. 11
DIAGNOSTICO.- HEPATOMA

Valores normales			8-22U	0.7-2.7 U/ml							130-150 mg/100ml	0-0.2 mg/100	0.2-1.0 mg/100	15-40 U/ml	6-35 U/ml
Pac. No.	Edad	Sexo	LAP	F.A.	Isoenzimas de la F.A. (%)						Col	B.D.	B.I.	TGO	TGP
					HiR	HiL	Hu	InR	InL	P.A.					
1	68	F	18.5	2.3	88.4			11.6			137	1.7	1.9	110	38
2	63	F	21.4	7.6	45.9	32.5		12.9		8.7	166	0.4	1.0	16	34
3	59	F	10.5	2.6	83.6			16.3							

De 3 pacientes estudiados, 2 presentaron niveles elevados de F.A. y todos niveles normales de LAP. Su por ciento promedio de las bandas de isoenzimas observadas fue:

BANDA	No. de casos presentada	% promedio
HIGADO	3/3	72.63
INTESTINO	3/3	13.6
PANCREAS	1/3	8.7

CUADRO No. 12
 DIAGNOSTICO.- CANCER OSEO

Valores normales			8-22U	0.7-2.7 U/ml							130-150 mg/100ml	0-0.2 mg/100	0.2-1.0 mg/100	15-40 U/ml	6-35 U/ml
Pac. No.	Edad	Sexo	LAP	F.A.	Isoenzimas de la F.A. (%)						Col	B.D.	B.I.	TGO	TGP
					HiR	HiL	Hu	InR	InL	P.A.					
1	50	F	9	17.2			100					0.4	1.2		

Se estudió únicamente un paciente, presentó niveles elevados de la F.A. y niveles normal de LAP. Su modelo electroforético presentó una banda de hueso únicamente.

CUADRO No. 13
 DIAGNOSTICO.- MIELOMA MULTIPLE

Valores normales			8-22U	0.7-2.7 U/ml							130-150 mg/100ml	0-0.2 mg/100	0.2-1.0 mg/100	15-40 U/ml	6-35 U/ml
Pac. No.	Edad	Sexo	LAP	F.A.	Isoenzimas de la F.A. (%)						Col	B.D.	B.I.	TGO	TGP
					HiR	HiL	Hu	InR	InL	P.A.					
1	55	M	7	2.4		100					250/120	0.4	0.2	15	15

Se estudió un paciente, y presentó niveles normales de F.A. y LAP. Su modelo electroforético presentó una banda de hígado únicamente.

CUADRO No. 14

DIAGNOSTICO.- TROMBOSIS MESENERICA VESICULAR CON NECROSIS DE YEYUNO
E ILEON.

Valores normales			8-22U	0.7-2.7 U/ml							130-150 mg/100ml	0-0.2 mg/100	0.2-1.0 mg/100	15-40 U/ml	6-35 U/ml						
Pac. No.	Egad	Sexo	LAP	F.A.	Isenzimas de la F.A. (%)						Col	B.D.	B.I.	TGO	TGP						
					HiR	HiL	Hu	InR	InL	P.A.											
1	39	F	5	2.5	C	U	R	V	A	N	O	R	M	A	L		104/80	0.4	0.2	52	85

Se estudió solo un paciente presentando niveles normales de F.A. y LAP. Su modelo electroforético presentó una curva normal.

CAPITULO V

DISCUSION

DISCUSION

El objetivo fundamental del trabajo, fue valorar las enzimas de la LAP y F.A. y sus isoenzimas conjuntamente como una ayuda en el diagnostico presuntivo de un grupo de pacientes ingresados en el servicio de Gastroenterología del Centro Medico La Raza. Como se puede observar en los resultados, algunos diagnosticos -- fueron confirmados y otros variaron, los cuales se presentan en los cuadros No. 1 al 14, y donde se pueden observar las determinaciones de otra prueba de laboratorio como colesterol, bilirrubina directa, bilirrubina indirecta, transaminasa glutámica pirúvica - y transaminasa glutámica oxalacética, las cuales también ayudaron al clínico al diagnóstico final del paciente.

En el cuadro No. 1 correspondiente a coledocolitiasis de los 11 pacientes estudiados todos presentaron niveles elevados de F.A. y solo uno de LAP, el modelo electroforético presentó las bandas de hígado, hueso, intestino y pancreas. Comparando este modelo con uno normal, observamos que la curva normal da un trazo correspondiente a hígado en un 100 % como se observa en la figura No. 1, la figura No. 2 pertenece a un trazo densitométrico de un paciente con coledocolitiasis, aquí podemos observar que el hígado presenta picos más definidos y no como la normal que se observa como un ligero monte. La presencia de las otras bandas de isoenzimas significa una anormalidad.

Se hace notorio la aparición en los tres casos de coledocolitiasis asociada a pancreatitis de la fracción del páncreas. - En la mayoría de ellos al tratarse de una coledocolitiasis pura vemos la frecuencia en la aparición de la banda de la isoenzima de hueso, aún cuando observamos también en el caso No.6 la presencia de la fracción de páncreas, la cual pudiera ser debida a una inflamación pancreática pasajera y que era detectada en el momento de la toma de la muestra. Los otros datos de laboratorio presentados en 10 de los 11 pacientes corresponden al tipo de padecimientos que tratamos.

La coledocolitiasis fue comprobada por intervención quirúrgica y en todos ellos aparecieron cálculos vesiculares o biliares.

En el cuadro No.2 correspondiente a absceso hepático amibiano, se estudiarón 10 pacientes de los cuales 9 presentaron elevación de la F.A. y todos niveles normales de LAP. Su modelo electroforético se presentó anormal apareciendo bandas de hígado, hueso, intestino y páncreas.

Todos los pacientes fueron anictéricos con excepción del No. 3 que también presentó coledocolitiasis, esto nos lo demostró el valor alto observado en la bilirrubina. La aparición de las diferentes bandas de isoenzimas representan por si mismas una anormalidad. Se puede observar la insidencia de intestino rápido en 5 de los 10 pacientes y la presencia de la fracción de -

páncreas en ellos.

Los valores que se tienen de las otras pruebas de laboratorio concuerdan con el cuadro clínico presentado.

En el cuadro No. 3 correspondiente a colecistitis crónica se estudiaron 2 pacientes que presentaron valores de F.A. elevada y la LAP normales. Su modelo electroforético se presentó anormal apareciendo bandas de hígado, hueso e intestino características de esta enfermedad, al igual que los datos de laboratorio se presentan concordantes con este padecimiento.

En el cuadro No.4 correspondiente a cirrosis hepática, se estudiaron 5 pacientes presentando todos niveles elevados de F.A. y solo 4 de LAP. Su modelo electroforético presentó bandas de hígado, hueso, intestino y páncreas, los 5 pacientes presentan alteraciones distintas de las bandas de isoenzimas, en los pacientes 2 y 3 en que se observa una elevación paralela de F.A. y LAP se asocian otros padecimientos como insuficiencia renal crónica y T.B. renal. Todos los otros datos de laboratorio concuerdan con el padecimiento. Dos pacientes fueron ictericos y 3 anictéricos.

En el cuadro No. 5 correspondiente a obstrucción biliar, se estudiaron 3 pacientes presentando todos niveles elevados de F.A y LAP. Su modelo electroforético se presentó anormal observandose bandas de hígado, hueso e intestino. Todos los valores obtenidos en las otras pruebas de laboratorio presentan concor--

dancia con el padecimiento debido a la falta de eliminación por vía biliar.

En el cuadro No.6 correspondiente a cáncer de vesícula, se estudiaron 5 pacientes presentando todos niveles elevados de F.A. y LAP. Su modelo electroforético presentó bandas anormales de hígado, intestino y páncreas. Los valores de FA. y LAP concuerdan con los otros datos del laboratorio en la comprobación del diagnóstico, este fué hecho por anatomía patológica y reportaron en el caso No.4 la metástasis a hígado.

En el cuadro No. 7 correspondiente a cáncer de estómago se estudiaron 2 pacientes, el primero un paciente icterico presentó niveles elevados de F.A. y LAP y su modelo electroforético anormal presento bandas de hígado e intestino. El segundo paciente presentó niveles normales de F.A. y LAP y su modelo electroforético fue normal.

Los resultados de los datos de laboratorio del primer paciente se observaron anormales ya que se asocia a esta enfermedad una metástasis multiple, sin embargo en el caso No. 2 no es demostrable la utilidad de las pruebas utilizadas para el diagnóstico de cáncer de estómago.

En el cuadro No. 8 correspondiente a cáncer de colon, se estudiaron 2 pacientes que presentaron niveles normales de F.A. y LAP. Su modelo electroforético se presentó anormal con bandas de hígado e intestino. En el paciente No.1 los datos del laboratorio

se presentan normales, sin embargo en el paciente No. 2 presentó una ictericia que en apariencia involucra un padecimiento extra-hepático probable, ya que incluso aparece la banda de isoenzima - de hígado lenta.

En el cuadro No. 9 correspondiente a Cáncer de vías biliares, se estudiaron 2 pacientes, ambos ictericos y con niveles --- aumentados de F.A. y LAP. Su modelo electroforético se presentó - anormal observándose bandas de hígado e intestino. El primer paciente presento una obstrucción debida al mismo cáncer por lo que la ictericia se presento más marcada. El segundo paciente presento una ictericia en menor intensidad debido al mismo padecimiento.

En el cuadro No.10 correspondiente a cáncer de cabeza de - páncreas, se estudiaron 3 pacientes presentando niveles elevados de F.A. y LAP. Su modelo electroforético se presentó anormal, observándose bandas de isoenzimas de hígado, intestino y páncreas.- Llama la atención en ellos la aparición de la fracción de páncreas.

En el cuadro No. 11 correspondiente a hepatoma, se estu--- diaron 3 pacientes, solo uno presentó niveles elevados de F.A. to dos presentaron niveles normales de LAP. Su modelo electroforético presentó bandas anormales de hígado, intestino y páncreas. En el paciente No. 2 llama la atención la aparición de la banda de páncreas debido probablemente a una metástasis de hígado. En los --- pacientes NO. 1 y No. 3 no existe anomalía de LAP ni de F.A. - pero observaron la fracción de intestino en ellos.

En el cuadro No.12 correspondiente a cáncer oseo se estudió un paciente que presentó niveles normales de LAP y elevados de F.A. Su modelo electroforético se presentó anormal observándose únicamente una banda de isoenzima de hueso. Fue un paciente anictérico, en este padecimiento llama la atención los resultados de una LAP normal y una F.A. elevada, debido a la actividad osteoblástica, así mismo la aparición de una sola banda correspondiente a hueso.

En el cuadro No. 13 correspondiente a mieloma múltiple se estudió un paciente anictérico, que presentó niveles normales de F.A. y LAP, y su modelo electroforético fue anormal presentando bandas de hígado rápida y lenta. En este caso la determinación de las pruebas F.A. y LAP no aportaron ninguna ayuda clínica para su diagnóstico, sin embargo el electroforetograma si presenta anomalía en las bandas correspondientes a hígado.

Cuadro No. 14 correspondiente a trombosis meséntérica vesicular. Se estudió un paciente presentando niveles normales de F.A. y LAP. Su modelo electroforético presentó una curva normal. En este caso tampoco el estudio de la F.A. e isoenzimas y LAP no son de ayuda al clínico para su diagnóstico. El paciente estudiado fue anictérico.

La frecuencia de aparición de la banda de hígado en los distintos cuadros presentados, es debido a que de acuerdo al tipo de padecimiento en ellos, involucra en mayor o menor grado al

hígado. Podemos observar en los 50 pacientes estudiados que la -- frecuencia de aparición de esta banda es de un 100 %, y la del -- intestino de un 54%.

También podemos observar que la banda de isoenzima de pán- creas aparece tanto en los casos de cáncer de cabeza de páncreas- como en pancreatitis, lo que a nuestro juicio la aparición de --- ella no nos aporta un dato 100 % positivo de presencia de cáncer- ya que una simple inflamación hace que aparezca esta banda por lo que no estamos de acuerdo con lo reportado por Chung-Ja Mo Cha, - Balduino Mastrofrancesco, Sungman Cha y Henry T. Randall.

CAPITULO VI

RESUMEN Y CONCLUSIONES

RESUMEN

En este trabajo en el que se pretende demostrar la utilidad clínica de las determinaciones de leucina aminopeptidasa y fosfatasa alcalina y sus isoenzimas, presentamos:

- 1).- Generalidades sobre las determinación de fosfatasa alcalina, isoenzimas de la misma y la leucina aminopeptidasa.
- 2).- Material y métodos donde se describen con detalles las técnicas de laboratorio empleadas así como el material biológico utilizado.
- 3).- Reporte de los resultados obtenidos de las pruebas antes mencionadas practicadas a 50 pacientes que constituyen el presente estudio, en 14 cuadros clasificados de acuerdo a los diagnósticos confirmados (coledocolitiasis, absceso hepático amibiano, colecistitis crónica, cirrosis hepática, obstrucción biliar, cáncer de vías biliares, cáncer de cabeza de páncreas, hepatoma, cáncer oseo, mieloma múltiple y trombo-sis mesentérica.
- 4).- Se presenta una breve discusión de los resultados, haciendo hincapié sobre la aparición de las bandas de isoenzimas de la fosfatasa alcalina en las distintas enfermedades y que no aparecen en un suero normal, así como la frecuencia de alteración de la fosfatasa alcalina y leucina aminopeptidasa.
- 5).- Por último las conclusiones del trabajo realizado.

CONCLUSIONES

A la revisión de los resultados obtenidos en nuestro trabajo en el que se estudiaron 50 pacientes con distintos padecimientos y valorar la ayuda diagnóstica que pudiera darnos la determinación de las enzimas leucina aminopeptidasa, fosfatasa alcalina y sus isoenzimas, observamos que la aparición de cualquier banda de isoenzimas de la F.A. indica anormalidad, por lo tanto si puede utilizarse como una prueba de ayuda al diagnóstico dependiendo de la historia clínica previa, debido a su existencia en diferentes órganos. Así como observamos que en padecimientos tipo cáncer gástrico, trombosis meséptica no representan ninguna ayuda para el diagnóstico de estas enfermedades, y que la determinación de la F. A. y Leucina aminopeptidasa son de utilidad fundamental para diferenciar padecimientos oseos de hepáticos. Sin embargo de las dos pruebas enzimáticas, sigue siendo la fosfatasa alcalina la de mayor sensibilidad para los distintos padecimientos tratados.

CAPITULO VII

BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Lee, L. Y., Kenny, M. A.; Electrophoretic method for assessing the normal and Pathological Distribution of Phosphatase Isoenzymes in Serum; Clin.Chem., 21 (8); 1128- 1135 (1975).
- 2.- Mo Cha, Ch., Mastrofrancesco, B., Cha,S., Randall, H.T.; --- Electrophoretic Patterns of Alkaline Phosphatase Isoenzymes in Human Sera with Abnormally High Activity, and an Unusual-Band Observed in Sera of Patients with Pancreatic Cancer; -- Clin. Chem., 21 (8),1067-1071 (1975).
- 3.- Fishman, W.H., Perspectives on Alkaline Phosphatase Isoenzymes; The American Journal of Medicine, 56 : 617-650.
- 4.- Phosphatase Isoenzymes in Human Serum; Scand. J. Clin. Lab. Invest., 33 : 1-4 (1974), Editorial.
- 5.- Warnes, T.W., Progress report Alkaline Phosphatase; Gut., 13 : 926-937 (1972).
- 6.- Boivin, P., Fauvert, R.; Valeur Comparé Du Dosage de Quelques Activités Enzymatiques Sériques en Pathologie Hépatique; La Presse Medicale, 72 : (54), 3271-3274 (1964).
- 7.- Rockerbie, R.A., Rasmussen, K.L.; An Ultramicro Method for the Fluorometric Determination of Leucine Aminopeptidase in Serum; Clinica Chemica Acta; 18 : 183-185 (1967).
- 8.- Pineda, E.P., Goldberg, J.A., Banks, B.M., Rutenburg, A.M.; Serum Leucine Aminopeptidase in Pancreatic and Hepatobiliary diseases; 38 : (5), 698-712, (1960).

- 9.- Martinek, R.G., Berger, L. Broida, D.; Simplified Estimation of Leucine Aminopeptidase Activity; *Clinical Chemistry*; 10: (12), 1087-1096, (1964).
- 10.- Bressler y Col.; Serum Leucine Aminopeptidase Activity in -- Hepatobiliary and Pancreatic disease; *J. Lab. & Clin. Med.* Septiembre 1960, 417-430.
- 11.- Schwartz, M. K., Fleisher, M. & Bodansky, O., *Annals of the New York Acad. Sciences*, 166: 775 (1969).
- 12.- Fishman, W.H., Green, S. & Inglis, N. I., *Nature*, 198: 685 - (1963).
- 13.- Horne, M., Cornish, C. J.; *Lab. Clin. Med.*, 72: 905 (1968).
- 14.- Moss, D.W., & King, E.J., *Biochem. J.*; 84: 192 (1962)
- 15.- Posen, S., Neale, F.C. & Clubb, J. S.; *Ann. Internal Med.*; 62: 1234, (1965).
- 16.- Fishman, W.H., Inglis, N.R., Gree, S.; Anstiss, C. L., Ghosh, N.K., Rief, A. E., Rustigian, R., Krant, M. J., Stolbach, L. L.; *Nature*, 219: 697 (1968).
- 17.- Fishman, W.H. & Ghosh, N. K.; "Advances in Clinical Chemistry" (Bodansky, O. & Stewart, C.P., Eds.) 10 : 255-370. Academic Press, New York, 1967.
- 18.- Stolbach, L. L., *Annals New York Acad. Sci.*, 166 : 760 (1969)
- 19.- Sussman, H. H., Samll, P. A., Cotlowe, Tr. E.; *J. Biol Chem.*, 243: 160-166 (1968)

- 20.- Taswell, H.F., Jeffers, D. M., Amer. J. Clin. Path.; 40 : --
349 (1963).
- 21.- Tietz, N. W., Quimica Clinica Moderna; Interamericana, 1a.
Ed., 1970.
- 22.- Lynch, R.; Metodos de Laboratorio; Interamericana; 2a. Ed.