

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

METODOLOGIA PARA DETERMINAR ACTIVIDAD ENZIMATICA  
Y CONCENTRACION DE COMPUESTOS METABOLICOS  
INTERMEDIARIOS EN ERITROCITOS

Lidia T. Casas Torres

QUIMICO FARMACO-BIOLOGO

1978



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.

PLT. ~~80~~  
80



Presidente, Prof. Carlos del Río E.  
Vocal " Andrea Gabayet M.  
Jurado asignado originalmente Secretario, " Josefa Piedras R.  
según el tema 1er. Suplente " Alvar Loria A.  
2o. Suplente " Luz María Henández B.

Sitio donde se desarrolló el tema: Instituto Nacional de la Nutrición.

Nombre completo y firma del sustentante. Lidia T. Casas Torres

---

Nombre completo y firma del asesor del tema: Josefa Piedras Ross

---

A MIS PADRES

A MI ESOSO

## INDICE

	Pág.
PARTE I	
Capítulo 1. INTRODUCCION	1
Capítulo 2. METABOLISMO ERITROCITICO	2
PARTE II	
Capítulo 3. TECNICAS BASICAS Y EQUIPO	7
A. Soluciones anticoagulantes	7
B. Preparación del hemolizado.	8
C. Medición de hemoglobina en el hemolizado	11
D. Extractos de glóbulos rojos.	14
1. Extractos hervidos	15
2. Extracto de ácido tricloroacético	17
3. Extracto de ácido perclórico	17
4. Extracto de sulfato de cinc-hidróxido de bario.	19
5. Extracto de ácido metafosfórico	
Capítulo 4. REACTIVOS	22
A. Fuentes	22
B. Buffers	23
C. Agua	26
D. Cristalería	26
E. Almacenamiento	26
Capítulo 5. INSTRUMENTACION	29
Capítulo 6. CALCULOS DE RESULTADOS	33
A. Expresión de la actividad enzimática	33
B. Cálculo de la actividad enzimática	34
C. Blanco adicional	36
D. Cálculo de las concentraciones de metabolitos intermedarios	37

	Pág.
PARTE III	
Enzimas Glucolíticas	39
Capítulo 7. HEXOCINASA ( $H_X$ )	41
Capítulo 8. GLUCOSA FOSFATO ISOMERASA (GPI)	44
Capítulo 9. FOSFOFRUCTOCINASA (PFC).	46
Capítulo 10. ALDOLASA	50
Capítulo 11. TRIOSA FOSFATO ISOMERASA (TPI).	53
Capítulo 12. GLICERALDEHIDOFOSFATO DESHIDROGENASA (GAP D).	56
Capítulo 13. FOSFOGLICERATO GINASA (PGC).	58
Capítulo 14. MONOFOSFOGLICERATOMUTASA (MPGM).	60
Capítulo 15. ENOLASA	62
Capítulo 16. PIRUVATO CINASA (PC).	64
Capítulo 17. DESHIDROGENASA LACTICA (DHL).	66
PARTE IV	
Enzimas del Ciclo de las Pentosas y Otras	68
Capítulo 18. GLUCOSA-6-FOSFATO DESHIDROGENASA (G-6-PD) Y 6-FOSFO GLUCONICO DESHIDROGENASA (6-PGD).	69
Capítulo 19. GLUTATION REDUCTASA (GR)	73
Capítulo 20. GLUTATION PEROXIDASA	75
Capítulo 21. NADPH DIAFORASA	78
Capítulo 22. NADH METAHEMOGLOBINA REDUCTASA (NADH Diaforasa).	80
Capítulo 23. FOSFOGLUCOMUTASA (PGM)	84

	Pág.
Capítulo 24. TRANSAMINASA OXALO-GLUTAMICO (TOG)	87
Capítulo 25. ADENILATO CINASA (Ac)	90
Capítulo 26. GALACTOSA-1-FOSFATO URIDIL TRANSFERASA (G-1-PUT)	93
a) METODO DE CONSUMO	
b) METODO FLUOROMÉTRICO	
Capítulo 27. GALACTOCINASA (GC)	103
Capítulo 28. UDP-GLUCOSA EPIMERASA (EPIMERASA).	109
Capítulo 29. ADENOSIN-DE AMINASA (A.D.A.)	111
PARTE V. COMPUESTOS, METABOLICOS INTERMEDIARIOS	114
Capítulo 30. ATP	115
Capítulo 31. AMP Y ADP	118
Capítulo 32. 2,3-DIFOSFOGLICERATO (2,3-DPG)	122
Capítulo 33. (NAD <sup>+</sup> + NADH) (NADP <sup>+</sup> + NADPH)	126
Capítulo 34. GLUTATION REDUCIDO (GSH).	132
Capítulo 35. GLUTATION OXIDADO (GSSG).	136
Capítulo 36. PIRUVATO	139
Capítulo 37. LACTATO	141
PARTE VI. PRUEBAS DE TAMIZAJE	
Capítulo 38. PRUEBA DE TAMIZAJE DE LA TRIOSAFOSFATO ISOMERASA	145
Capítulo 39. PRUEBA DE TAMIZAJE DE LA PIRUVATO CINASA	147
Capítulo 40. PRUEBA DE TAMIZAJE DE LA GLUCOSA-6-FOSFATO DESHIDROGENASA	149



	Pág.
Capítulo 41. PRUEBA DE TAMIZAJE DE GLUTATION REDUCTASA	151
Capítulo 42. PRUEBA DE TAMIZAJE DE LA NADH METAHEMOGLOBINA REDUCTASA	153
DISCUSION Y CONCLUSIONES	155
BIBLIOGRAFIA	157

PARTE I

Cap. 1

Este documento es un compendio de técnicas encaminadas a medir la actividad y concentración de enzimas presentes en glóbulos rojos. Dichas enzimas participan en forma importante en el metabolismo del eritrocito y por ende, están relacionadas con la viabilidad de éste en la circulación sanguínea. El compendio está basado en un manual publicado en 1972 por E. Beutler (1) al cual se han adicionado un método publicado posteriormente. Esperamos que este compendio en español contribuya a -- que queden incorporadas estas mediciones en los laboratorios hematológicos y genéticos de Latinoamérica en vista de la importancia creciente -- que ocupan la enzimopatías eritrocíticas en la patología humana.

A. Metabolismo Eritrocítico. Previa a la descripción de métodos se -- presentan los puntos sobresalientes del metabolismo eritrocítico con el objeto de establecer el sitio de acción de las enzimas, lo cual contribuye a conocer su papel metabólico, y por ende a entender a qué puede -- conducir una deficiencia enzimática específica.

La función principal de los glóbulos rojos es la de acarrear el oxígeno de los pulmones hacia los tejidos, y el bióxido de carbono -- de los tejidos hacia los pulmones. Esta misión la realiza de manera efi-- caz el glóbulo rojo gracias a que está prácticamente lleno de una proteí-- na: la hemoglobina. La hemoglobina debe mantenerse en estado reducido y debe de estar en un medio con concentraciones adecuadas de iones orgá-- nicos e inorgánicos para realizar sus funciones de acarreo de gases. El metabolismo del glóbulo rojo está orientado primordialmente a esta tarea, y la glucosa del plasma es la fuente principal de donde obtiene energía el glóbulo rojo para sus funciones, o sea, cataliza glucosa a través de -- la glucólisis para obtener energía. Al entrar la glucosa a la vía de -- Embden-Meyerhof (Fig. 1) para su degradación a piruvato o a lactato, se -- genera adenosina-trifosfato (ATP) mediante la fosforilación de adenosina difosfato (ADP), y además se genera una sustancia reducida (NADH) a --- partir de la reducción del NAD (nicotinamida-adenina dinucleótido\*).

---

\* Antiguamente designado incorrectamente como DPN (difosfo-piridín-nucleótido)

La función primaria del ATP es la de proporcionar la energía necesaria para mantener operante la bomba de sodio y de potasio de la célula, así como para mantener la forma bicóncava del eritrocito. El NADH se requiere para reducir la forma oxidada de la hemoglobina (metahemoglobina) a hemoglobina reducida que es la funcional.

La producción de 2,3-difosfoglicerato (2,3-DPG) es otra función importante de la vía de Embden-Meyerhof. Este éster de fosfato, junto con el ATP, es un regulador importante en la afinidad de la hemoglobina por el oxígeno. El ATP, el NADH y el 2,3-difosfoglicérico se generan en la vía de Embden-Meyerhof después de la formación del ácido 1,3 difosfoglicérico (1,3-DPG), la vía se ramifica: el 1,3-DPG puede convertirse directamente al ácido 3-fosfoglicérico por la acción de la fosfoglicerato cinasa en presencia del ADP, y consecuentemente se genera ATP mediante la fosforilación de ADP. Alternativamente el 1,3-DPG puede convertirse mediante la acción de la fosfoglicerato mutasa a 2,3-DPG, y éste a su vez, a ácido 3-fosfoglicérico a través de la acción de una fosfatasa. Esto significa que el eritrocito puede metabolizar glucosa con ganancia neta de ATP (si no genera 2,3-DPG) o sin ganancia (si genera 2,3-DPG).

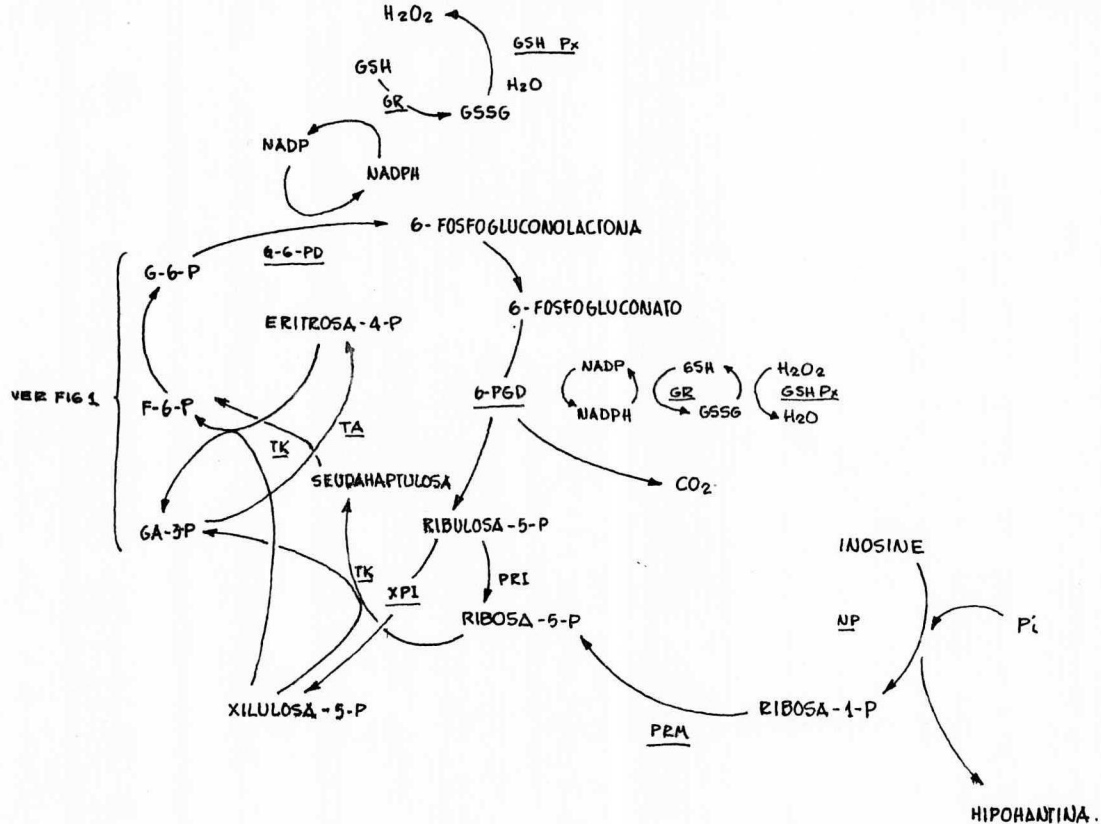
Existe en el eritrocito una vía adicional del metabolismo de la glucosa: la vía oxidativa directa o atajo de las hexosa-monofosfatos (Fig. 2). En esta vía, la substancia reducida que se genera es el NADPH a partir del NADP (nicotinamida-adenina-dinucleotido fosfato\*) y no el NADH de la vía de Embden-Meyerhof. La principal función del NADPH es la de mantener en estado reducido al glutati6n a través de una enzima, la glutati6n reductasa. El glutati6n tiene en el gl6bulo rojo la funci6n de mantener

---

\* Antiguamente designando incorrectamente como TPN (trifosfo-piridin-nucle6tido).

los grupos sulfhidrilos en estado reducido activo, y además, a través de la glutatión peroxidasa, permite desintoxicar a la célula de peróxido de hidrógeno. Por otra parte el NADPH también puede servir como donador de hidrógenos para la reducción de la metahemoglobina a hemoglobina, pero - esto sólo puede realizarse en presencia de colorantes aceptores de hidrógeno como son el azul de metileno y el azul de Nilo.

Aunque la glucosa es la fuente de energía del glóbulo rojo en circunstancias normales, el eritrocito tiene la capacidad de utilizar -- otros substratos: la ruta de utilización de la fructosa, manosa y galactosa es mostrada en la figura 1, y la de la inosina en la figura 2.



PARTE II

Cap. 3

TECNICAS BASICAS Y EQUIPO

A. Soluciones anticoagulantes

Aunque algunas de las mediciones descritas pueden llevarse a cabo con muestras de sangre capilar, es más conveniente obtener muestras de sangre venosa. Generalmente el anticoagulante más satisfactorio es el ACD (dextrosa citratada) que se prepara de la siguiente forma:

	Fórmula A	Fórmula B
Acido cítrico ( $C_6H_8O_7$ )	7.3 g	4.4 g
Citrato de sodio ( $C_6H_5O_7Na_3 \cdot 2H_2O$ )	22.0 g	13.2 g
Glucosa	24.5 g	14.7 g
Aforo $H_2O$	1000 ml	1000 ml

A 4.0 volúmenes de sangre venosa se le añaden 0.6 volúmenes de la fórmula A, o 1.0 volumen de la fórmula B.

Alternativamente la sangre puede extraerse en tubos que contengan 1 mg de etilén-diamino-tetracetato disódico ( $Na_2EDTA$ ) por ml de sangre o bien 10 unidades de heparina por ml de sangre.

A menudo no es posible realizar las mediciones enzimáticas inmediatamente después de la extracción y es necesario transportar la muestra al laboratorio en donde se hará la medición. En la tabla 1 se muestran datos sobre la estabilidad de enzimas y de compuestos interme-

diarios almacenados en los anticoagulantes recomendados. En general los constituyentes eritrocíticos son mucho más estables cuando los glóbulos rojos se mantienen en sangre completa que si son lavados antes de ser -- almacenados.

#### B. Preparación del hemolizado

Algunas cuantificaciones de constituyentes eritrocíticos -- (ATP y glutatión) se llevan a cabo en sangre, ya que la contribución del plasma y otros elementos formados es negligible. Todas las demás mediciones son realizadas en glóbulos rojos que han sido lavados en solución de NaCl 0.9 % para dejarlos libres de plasma, leucocitos y plaquetas. -- Los métodos que se utilizan para eliminar estos elementos figurados son diversos, v.gr., filtración a través de gasas de algodón, o bien centrifugación de la sangre a 1,000-2,000 G\* por 15 minutos en frío, con eliminación del plasma por aspiración y resuspensión de glóbulos rojos en un mínimo de cinco volúmenes de una solución fría de NaCl al 0.9 %; después se recentrifuga aproximadamente a 1,000 G por 10 minutos para eliminar la capa residual de leucocitos y plaquetas. Se repite una vez más el -

---

\* G = fuerza centrífuga relativa en veces la fuerza de gravedad. Se obtiene con la fórmula:  $G = \text{rpm}^2 \times r \times 1.118 \times 10^{-5}$  en que rpm son las revoluciones por minuto a las que gira la centrífuga y r es el radio (en cm) del brazo de la centrífuga (medida del eje de rotación al fondo de la camisa de la centrífuga). Así para obtener 1000 G en una centrífuga con 10 cm de radio:

$$\text{rpm} = \sqrt{\frac{1000}{10 \times 0.0001118}} = \sqrt{894453.828} = 2990$$

o sea, se debe centrifugar a 2990 rpm para obtener 1000 G en esta centrífuga de 10 cm de radio.



lavado en NaCl frío, lo cual lleva a que se reduzca unas diez veces el número de leucocitos que había originalmente en la sangre.

En el sedimento tendremos glóbulos rojos lavados y su manejo dependerá de la naturaleza de los estudios que se realicen.

Solución G. Se ha visto que una solución hemolizante usada para el análisis de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (3) es adecuada -- para otros análisis enzimáticos eritrocíticos. En este documento se le designa como solución G (4) y se prepara mezclando 0.5 ml de mercaptoetanol + 10 ml de solución neutralizada de  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  al 10 % (0.27 M) + -- 5 ml de una solución 2 mM de NADP, y la mezcla se afora a un litro con agua.

En los análisis se emplean los siguientes tipos de hemolizados:

1. Hemolizado sin estroma 1:20. A 0.2 ml de eritrocitos lavados se les añaden 3.8 ml de la solución G (ver arriba). La mezcla se coloca en hielo y se agita varias veces durante 10 minutos. Se centrifuga a 5,000 G por 10 minutos a 4°C, y el sobrenadante se etiqueta como hemolizado sin estroma 1:20.
2. Hemolizado congelado-descongelado 1:20. El sedimento que queda en la preparación del hemolizado sin estroma (ver arriba), se congela en una mezcla de hielo seco y acetona, se descongela y se almacena en hielo.

3. Hemolizado acuoso 1:20. Se toman 0.2 ml de glóbulos rojos lavados y se les añaden 3.8 ml de agua. La mezcla se congela en una mezcla de hielo seco y acetona y se descongela; se centrifuga a 5,000 G por 10 minutos a 4°C con lo cual se pierde parte del estroma. El sobrenadante de la centrifugación es el hemolizado acuoso.
4. Hemolizado cianuro-ferricianuro 1:20. Se toman 0.2 ml de glóbulos rojos lavados y se les añade una solución que contiene 100 mg de NaCN y 300 mg de  $K_3[F_e(CN)_6]$  por litro.
5. Hemolizados 1:100 ó 1:200. Para algunos análisis se requieren diluciones 1:100 ó 1:200 de los hemolizados: para ello diluir 1:5 ó 1:10 con solución G a los hemolizados 1:20 (ver arriba). Estas diluciones pueden ser hechas inmediatamente antes de llevar a cabo los análisis.

El hemolizado sin estroma se usa en la mayoría de los análisis enzimáticos ya que es una solución transparente que reduce la interferencia en las lecturas espectrofotométricas. En los casos de análisis de gliceraldehidofosfato deshidrogenasa, fosfofructocinasa y aldolasa, se usa el hemolizado congelado+descongelado, ya que grandes cantidades de estas enzimas quedan unidas al estroma.

Los análisis de glutatión-reductasa, NADH-diaforasa y UDP-glucosa-4-epimerasa requieren de un hemolizado preparado sin mercaptoetanol por lo que se usa el hemolizado acuoso. Para el análisis de glutatión-

peroxidasa se requiere el uso del hemolizado cianuro-ferricianuro.

Solamente para el caso de la fosfofructo-cinasa se debe utilizar el hemolizado inmediatamente después de preparado ya que es una enzima muy inestable.

### C. Medición de Hemoglobina en el Hemolizado

Se mide la concentración de hemoglobina en el hemolizado con un reactivo de cianuro-ferricianuro que contiene 50 mg de KCN + 200 mg de  $K_3 Fe(CN)_6$  + 1 g de  $NaHCO_3$  por litro (solución de Drabkin). Hay que esperar aproximadamente 15 minutos después de mezclar hemolizado y solución de Drabkin antes de hacer las lecturas colorimétricas. El reactivo de -- Drabkin es estable en envase obscuro y a temperatura ambiente por algunos meses.

El colorímetro o espectrofotómetro usado para la medición de hemoglobina se calibra usando una solución estándar comercial de cianometahemoglobina. Tal estándar se diluye con la solución de Drabkin para tener un rango de concentraciones que oscilen de 5 a 50 mg/dl. La densidad óptica de estos estándares es leída contra un blanco de solución de --- Drabkin. Cuando la absorbancia de las soluciones estándares diluidas son lineales con respecto a la concentración de hemoglobina, se obtendrá una línea recta. El valor de la absorbancia en la cual la línea recta de calibración interseca a 10 mg/dl de concentración de hemoglobina, es designado como A, y la constante  $5/A$  será el factor de calibración de la hemo-

globina ( $F_{Hb}$ ) para el aparato correspondiente. La concentración de hemo-  
globina (Hb) en gramos/dl en una muestra de sangre se obtiene de la si-  
guiente manera:

$$Hb = F_{Hb} \times DO_{540}$$

En donde  $DO_{540}$  es la absorbancia de la muestra cuando se añaden 0.020 ml  
de ésta a 10 ml de la solución de Drabkin. Nótese que esta fórmula sólo  
funcionará cuando se mezclen los volúmenes de 0.02 ml de hemolizado y --  
10 ml de Drabkin: si ello no se hace se deberán hacer las correcciones -  
pertinentes.

Tabla I. Estabilidad de enzimas e intermediarios metabólicos eritrocíticos en sangre almacenada en diferentes medios.

	25°C			4°C		
	ACD	EDTA	Heparina	ACD	EDTA	Heparina
oxocinasa	5+	5+	5+	20+	20+	20+
ucosa fosfato isomerasa	5+	5+	5+	20+	20+	20+
sfofructocinasa	2	1	1	20+	6	6
iceraldehido fosfato shidrogenasa	5+	5+	5+	6	6	6
sfoglicerato cinasa	5+	5+	5+	20+	20+	20+
nofosfogliceratomutasa	5+	5+	5+	20+	20+	20+
olasa	5+	5+	5+	20+	20+	20+
ruvato cinasa	5+	5+	5+	20+	20+	20+
ctato deshidrogenasa	5+	5+	5+	20+	20+	20+
ucosa-6-P deshidroge- asa	5+	5+	5+	20+	20+	20+
-fosfogluconato deshi- rogenasa	5+	5+	5+	20+	20+	20+
utación reductasa	5+	5+	5+	20+	20+	20+
utación peroxidasa	5+	5+	5+	20+	20+	20+
ADPH diaforasa	5+	5+	5+	20+	20+	20+
ADH diaforasa	5+	5+	5+	20+	20+	20+
sfoglucomutasa	5+	5+	5+	20+	20+	20+
OT	5+	5+	5+	20+	20+	20+
denilato cinasa	5+	5+	5+	20+	20+	20+
alactosa-P,P,uridil- transferasa	5+	5+	5+	20+	20+	20+
alacto cinasa	5+	2	2	20+	6	6
DP glucosa-4-epimerasa	1	1	1	6	6	6
ADP+ NADPH	5+	5+	5+	20+	20+	20+
AD+ NADH	1	5+	5+	20+	20+	20+
SH	5+	1	2	20+	6	6

Los números indican el número de días de almacenamiento con menos de 10% de pérdida de actividad. Las muestras de sangre completa se almacenaron a temperatura ambiente (25°C ± 2) y a 4°C bajo condiciones de esterilidad. Los análisis se realizaron después de 1, 2 y 5 días de almacenamiento a temperatura ambiente, y después de 6 y 20 días de almacenamiento a 4°C.

D. Extractos de glóbulos rojos

En general los métodos de extracción que pueden ser empleados son: 1) - extractos hervidos; 2) extractos de ácido tricoloro acético; 3) extractos de ácido perclórico; 4) extractos de una mezcla de  $ZnSO_4 \cdot Ba(OH)_2$ ; y 5) extractos de ácido metafosfórico. Cada uno tiene ventajas y desventa  
jas.

En el cálculo de la concentración de substancias en glóbulos rojos es necesario hacer la corrección apropiada correspondiente - al grado de dilución sufrido durante el proceso de extracción: cuando - el hemolizado se diluye mucho en la extracción, el cálculo de dilución es relativamente simple, pero cuando la preparación de glóbulos rojos es tratada con un volumen pequeño de alguna solución precipitante, la correc---ción debe ser hecha tomando en cuenta que la porción de glóbulos rojos es un sólido proteico: por ello es conveniente hacer una aproximación en base a que cada mililitro de un paquete de glóbulos rojos contiene 0.7 ml - de agua o bien a que la sangre contiene 0.8 ml de agua por ml. Por lo -- tanto la dilución (D) de un hemolizado durante el proceso de precipitación se obtiene de la siguiente forma:

$$D = \frac{V_r}{V_w + V_p + 0.7 V_r}$$

En donde  $V_r$  es el volumen de glóbulos rojos,  $V_w$  el volumen del agua (o soluución salina) en el cual están suspendidos los glóbulos rojos y  $V_p$  el voluumen de la solución precipitante. El cálculo de la dilución durante una extracción se ilustra con los siguientes dos ejemplos:

Ejemplo 1. A 5 ml de una suspensión eritrocítica al 50 % se le agrega -  
1 ml de una solución precipitante:

Datos

$$V_r = 5 \times 50/100 = 2.5$$

$$D = \frac{V_r}{V_p + V_w + 0.7 V_r} = \frac{2.5}{1.0 + 2.5 + 2.5 (0.7)} = \frac{2.5}{5.25} = \frac{1}{2.1}$$

$$V_w = 5 \times 50/100 = 2.5$$

$$V_p = 1.0$$

La dilución es de 1: 2.1 y no de 1:2.4 (2.5/6.0) como se podía -  
haber pensado.

Ejemplo 2. A 5 ml de una dilución de glóbulos rojos 1:100 (1 %) se le agregan 5 ml de una solución precipitante. En este caso, la muestra de glóbulos rojos está muy diluída por lo que los sólidos eritrocíticos - pueden ser ignorados. La dilución es entonces 1:200. Si se hiciera el - cálculo exacto, la dilución sería:

Datos

$$V_r = 5 \times 1/100 = 0.05$$

$$V_w = 5 \times 99/100 = 4.95$$

$$D = \frac{0.05}{5.0 + 4.95 + 0.05 (0.7)} = \frac{0.05}{9.985} = \frac{1}{199.7}$$

$$V_p = 5.0$$

o sea la dilución es de 1: 199.7 y no de 1:200

### 1. Extractos hervidos

La ebullición de glóbulos rojos es la forma más sencilla --

de obtener extractos pobres en proteínas y además no se añaden otras --- substancias. La técnica es especialmente adecuada para enzimas o com--- puestos metabólicos que son lábiles a los ácidos. Por otra parte, la -- desventaja de los extractos hervidos es que su transparencia es inferior a la de otro tipo de extracto pero si la concentración de la substancia a medir es muy alta o si el método analítico es muy sensible, de tal modo que se pueda usar una dilución del extracto 1:10 ó más, se mejorará la - transparencia del extracto.

Para obtener el extracto se colocan glóbulos rojos lavados - y de preferencia diluídos en solución salina, en un tubo de centrifuga - resistente al calor y éste se coloca en baño maría a ebullición y la --- mezcla se agita vigorosamente por un agitador. Es conveniente ajustar la concentración de NaCl de la muestra a 0.15 M, lo cual lleva a que se for me un precipitado grueso que es fácil de eliminar por centrifugación.

En el caso de los hemolizados diluídos (1:10 ó más), un minu to de ebullición es suficiente, pero cuando se hierve una muestra concen trada de glóbulos rojos, se requiere una mayor y mejor exposición al ca- lor, ya que el coágulo formado en los lados del tubo tiende a proteger a la porción central de la muestra. Después de calentar, la muestra se en fría rápidamente en hielo (excepto en hemolizado para cuantear ATP) (ver/ capítulo 29), se centrifuga y el sobrenadante es el extracto hervido.



## 2. Extracto de ácido tricloroacético

El ácido tricloroacético (ATA) es adecuado para extractos de estudios enzimáticos en los que se desea una buena transparencia del extracto.

La concentración de ATA depende de si la muestra es sangre completa o paquete celular y de la dilución de la muestra: las concentraciones mínimas requeridas para muestra normales están dadas en la Tabla II. En todo momento el ATA y el hemolizado deberán estar en hielo, y la solución de ATA se añade poco a poco al hemolizado, agitando éste constantemente. Se deja reposar por unos minutos y se centrifuga en frío a 1000-2000 G para obtener el sobrenadante que será el extracto.

El ATA se elimina del extracto por tratamiento con éter: se añaden varios volúmenes de éter al extracto, se tapa el tubo con un tapón de corcho, de vidrio o de hule (no usar parafilm) y se agita vigorosamente; se deja reposar en frío por unos minutos y se separa la fase etérea (parte superior) de la fase acuosa (parte inferior) y el éter se desecha. El proceso se repite tres o cuatro veces, y el éter residual se elimina con una corriente de aire o de nitrógeno, burbujeando el gas suavemente con una pipeta Pasteur. Primero la solución se sentirá fría pero cuando ésta espontáneamente retorne a temperatura ambiente, significa que el éter se ha eliminado. Si el ATA ha sido eliminado completamente, el extracto tendrá un pH mayor de 6, lo cual puede comprobarse con un papel pH.

## 3. Extracto de ácido perclórico.

Con ácido perclórico (APC) se obtienen extractos especialmente transparentes. El APC es adecuado para la extracción de algunos compues-

tos lábiles a los ácidos, como son en NADPH o el NADH o los compuestos fácilmente oxidables, como el GSH. Una alícuota de una solución de APC frío se añade a una muestra de sangre o de hemolizado (tabla II). La mezcla, después de reposar por unos minutos, se centrifuga en frío y se mide cuidadosamente el volumen del sobrenadante al transferirlo a un tubo graduado. Se puede llevar a cabo una segunda extracción y almacenarse juntamente con la primera. El extracto se neutraliza con una solución de carbonato de potasio 1 a 3M.

La adición de carbonato de potasio produce una efervescencia y la formación de un precipitado grueso de color blanco. El tubo debe agitarse vigorosamente después de añadir cada gota de carbonato de potasio. Cuando al añadir una gota ya no haya efervescencia, la solución es tará neutralizada, y el pH se ratifica con papel pH (deberá estar entre 6 y 8). Otra alternativa es la de añadir una gota de una solución 0.05 % (w/v) de anaranjado de metilo como indicador, antes de neutralizar con el bicarbonato de potasio: cuando el color se torne amarillo la solución estará neutra. Se forma un precipitado que desaparece espontáneamente en unos minutos, y no es necesaria una recentrifugación. El sobrenadante está relativamente libre de perclorato y es adecuado para muchos análisis en los cuales se requiere de enzimas auxiliares.

4. Extracto de sulfato de cinc-hidróxido de bario.

Los extractos de glóbulos rojos o de sangre con  $\text{Ba(OH)}_2\text{-ZnSO}_4$  se usan para el estudio de azúcares, tales como glucosa y galactosa. La solución precipitante se prepara mezclando volúmenes iguales de soluciones de  $\text{ZnSO}_4$  0.15 M y de  $\text{Ba(OH)}_2$  0.15 M. Estos reactivos deben ser titulados para tener la seguridad de que la mezcla de volúmenes iguales dan una solución neutra: en un recipiente se colocan 50 ml de agua, cuatro gotas de una solución alcohólica de fenolftaleína al 0.2 % y 10 ml de una solución de  $\text{ZnSO}_4$  0.15 M. Se titula el sulfato de cinc lentamente con una solución de  $\text{Ba(OH)}_2$  0.15 M hasta que al añadir una gota del hidróxido la solución de sulfato en el matraz vire a un color rosa pálido. Si se requieren exactamente 10 ml de hidróxido para neutralizar, las soluciones son equivalentes. Si se requirieron menos de 10 ml del hidróxido para neutralizar el sulfato, se diluye el hidróxido con agua de tal manera que:  $10 - V = \text{ml de agua que se deben agregar a cada 10 ml del hidróxido}$ , en que V son los mililitros que se gastaron en la neutralización. Si se requirieron más de 10 ml de hidróxido para neutralizar, entonces la solución de sulfato de zinc es diluída de tal modo que:

$V - 10 = \text{ml de agua que se debe agregar a cada 10 ml de sulfato.}$

Una vez que las soluciones son equivalente se almacenan por separado en frascos bien tapados. El frasco de  $\text{Ba(OH)}_2$  debe tener un tapón bihoradado: en uno de los hoyos debe ir un recipiente con  $\text{CaCl}_2$  que esté en contacto con el aire del interior del frasco, y en el otro hoyo debe ir un tubo de vidrio que llegue hasta el fondo del frasco. A éste tubo se le pone un pedazo de plástico que se sella con una pinza: de

esta manera se podrá extraer  $\text{Ba(OH)}_2$  con una jeringa a través del -- plástico, y no habrá pérdida de hidróxido por la formación de  $\text{BaCO}_3$  - a partir del  $\text{CO}_2$  del aire, ya que el aire que entra al frasco será - liberado de  $\text{CO}_2$  al pasar por el  $\text{CaCl}_2$ .

El extracto se prepara mezclando 1.5 ml de agua y 0.1 ml de sangre o de paquete celular en un tubo de centrifuga. Se añaden 0.2 ml de la solución de  $\text{Ba(OH)}_2$ , se mezcla y se deja reposar 1 minuto. Se añaden 0.2 ml de la solución de  $\text{ZnSO}_4$ , se mezcla y se deja reposar de 3 a 5 minutos. Se centrifuga 10 minutos a 1000 G, y el sobrenadante - es el extracto.

#### 5. Extracto de ácido metafosfórico.

Es útil para extraer sustancias estables a ácido y que van a ser -- analizadas en técnicas no enzimáticas, v.gr., niveles de glutatió-- n reducido, ya que se eliminan iones metálicos que contaminan la san-- gre. Cada 100 ml de la solución precipitante contiene 1.67 g de áci-- do metafosfórico glacial (mezcla de  $\text{HPO}_3$  y  $\text{NaPO}_3$ ) + 30 g de  $\text{NaCl}$  + -- 0.2 g de  $\text{Na}_2$  EDTA o  $\text{K}_2$ -EDTA (Ref. 6). Esta solución es transparente ya que contienen EDTA sin disolver, pero es estable a 4° C por unas 3 semanas.

El extracto se prepara mezclando 3 volúmenes de solución precipitan-- te con dos volúmenes de una dilución 1:4 de sangre. Se mezcla, se - deja reposar unos minutos y se filtra por papel filtro para obtener el extracto.

Tabla II. Concentración mínima de agente precipitante requerido para obtener un extracto satisfactorio.

Concentración sangre o glóbulos rojos	ATA sangre 1:2	ATA glóbulos 1:2	ATA sangre 1:1	ATA glóbulos 1:1	ATA sangre 4:1	ATA glóbulos 4:1
100	20%	20%	10%	10%	5%	5%
50	20%	20%	10%	10%	2.5%	5%
25	10%	10%	5%	5%	2.5%	2.5%
10	10%	10%	5%	5%	2.5%	2.5%
1	10%	10%	5%	5%	2.5%	2.5%

	APC sangre 1:2	APC glóbulos 1:2	APC sangre 1:1	APC glóbulos 1:1	APC sangre 4:1	APC glóbulos 4:1
100	8%	8%	4%	4%	2%	2%
50	4%	4%	2%	2%	1%	1%
25	4%	4%	2%	4%	1%	1%
10	4%	2%	2%	2%	1%	1%
1	4%	2%	2%	2%	1%	1%

usaron paquetes celulares lavados o sangre, y ajustados a un hematocrito de 50% (v. gr. el 100% denota a ambos: al paquete celular al 100% o una suspensión de glóbulos rojos en plasma al 50%)

Las siguientes concentraciones (w/v) de ATA fueron estudiadas: 50%, 20%, 10%, 5%, y 2.5% .

Las siguientes concentraciones de APC se estudiaron : 20%, 10%, 8%, 6%, 2.5% 1% y 0.5%.

Las concentraciones menores que producen un filtrado satisfactorio están dadas en la tabla. En la práctica se observa que es mejor usar concentraciones altas para tener la certeza de tener un filtrado claro en cada muestra.

A= ácido tricloroacético  
C= ácido perclórico.

Cap. 4

4. REACTIVOS

A. Fuentes. Los reactivos comerciales que pueden usarse provienen de tres fuentes, aún cuando no tienen porque restringirse a ellas. Estas son:

1. Sigma Chemical Company  
3500 Dekalb Street  
St. Louis, Mo. 63118
2. Boehringer Mannheim  
582 Market Street  
San Francisco, Calif. 94104
3. Calbiochem  
3625 Medford Street  
Los Angeles, Calif. 90063

En los reactivos orgánicos empleados es indiferente el uso de ácidos libres o de sus correspondientes sales de potasio o de sodio, pero no se deberán emplear sales de otros metales. Por tanto no importa que sean usados el ácido 6-fosfogluconico o el 6-fosfogluconato de sodio o de potasio, siempre y cuando se usen pequeñas cantidades y el pH se ajuste antes de usarse. En general no hay dificultades con reactivos comerciales, excepto con algunas preparaciones enzimáticas y con la galactosa radioactiva.

Las enzimas comerciales no poseen a veces la potencia especificada por el proveedor, especialmente después de que han sido almacenadas por un tiempo. A menudo contienen trazas de agentes contaminantes:

es común, por ejemplo, que la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa contenga triosafosfato isomerasa. Si uno de los contaminantes es la propia enzima que se analiza, se tienen que hacer correcciones adecuadas. Así las determinaciones de blancos en los cuales se substituye el hemolizado por la solución G, sirven para este propósito, y el blanco de la solución G deberá ser restado del valor obtenido con el hemolizado (ver pag 36). -- En los casos en los cuales la pureza y la concentración de los reactivos comerciales es dudosa o que son críticas en el análisis, se estandariza la concentración del reactivo antes de usarlo, o se lleva a cabo un procedimiento de purificación adecuado. Algunos métodos de purificación se describen en algunas secciones de este documento.

#### B. Buffers :

Es importante tener en mente que el pH de los buffers es afectado tanto por cambios de temperatura como por la dilución. El pH de los buffers dados en este manual es para temperatura de 25° C.

En los buffers de tris se pesa la cantidad de tris necesaria para lograr la molaridad especificada, se agrega el 80 % del volumen final de agua, se mide el pH de la solución tris bajo agitación continua y se añade ácido hasta obtener el pH deseado, y se lleva al volumen final. La concentración del ácido en la composición final es indiferente, pero debe ser lo suficientemente fuerte como para no exceder el volumen final deseado, y lo suficientemente débil para que no ocurran cambios muy bruscos de pH. Usualmente se ajusta el pH a 0.2-0.3 unidades antes del valor deseado.

do con un ácido concentrado, y el ajuste final se hace con una solución de ácido más diluida. Para la preparación de los buffers de tris se usa habitualmente ácido clorhídrico o bien ácido acético.

Ejemplo: preparar 100 ml de un buffer tris-HCL 1 M, pH 8. - Se pesan 12.1 g de tris y se disuelven en aproximadamente 80 ml de agua destilada a temperatura ambiente. Se añade HCL concentrado hasta que el pH sea más o menos de 8.2, y se ajusta al pH final con solución de HCL - 2 M. La mezcla se transfiere a un matraz de 100 ml y se ajusta el volumen final a 100 ml.

Los buffers de citrato se hacen pesando la cantidad necesaria de ácido cítrico y se procede como en los buffers tris, pero se ajusta el pH con NaOH. Los buffers de fosfatos se preparan con mezclas de soluciones madre 1 M de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  y solución madre 1 M de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  en las proporciones mostradas en la tabla III.

Ejemplo: Preparar 100 ml de un buffer de fosfato 0.1 M, pH de 7.4. Se observa en la tabla III que a 0.1 M y a pH 7.4 hay 0.802 partes de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ . Por tanto se mezclan 0.802 partes de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  y 0.198 --- (1- 0.802) partes de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ : se pipetea 8.02 ml de una solución madre - 1 M de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  y 1.98 ml de una solución madre 1 M de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  en un matraz aforado de 100 ml y se afora con agua. Es necesario tener presente que - si este buffer 0.1 M, pH 7.4, buffer se diluye por ejemplo 1:10 en el sistema del análisis, el pH del buffer estará entre 7.6 y 7.7 (ver tabla III) pues su molaridad ahora es 0.01 M.



bla III. Preparación de buffers de fosfatos de diferentes valores de pH y molaridad.

Concentración total de fosfatos en moles por litro

0.01 0.04 0.10 0.20 0.30 0.40 0.50 0.60 0.80 1.0

Fracción del total de fosfatos como  $K_2HPO_4$

							.099	.119	.134
						.109	.121	.141	.157
				.104	.121	.132	.145	.165	.182
		.085	.110	.129	.146	.158	.171	.192	.212
.065	.083	.106	.135	.155	.173	.186	.200	.224	.244
.081	.103	.132	.163	.185	.203	.219	.236	.259	.277
.100	.126	.160	.195	.220	.239	.256	.273	.295	.312
.122	.155	.192	.232	.261	.281	.298	.312	.333	.349
.150	.190	.232	.276	.305	.326	.341	.354	.372	.386
.183	.230	.278	.325	.353	.373	.385	.398	.414	.424
.222	.274	.328	.376	.403	.421	.435	.444	.458	.466
.266	.325	.381	.429	.457	.473	.484	.493	.503	.508
.369	.440	.497	.543	.565	.578	.586	.590	.594	.594
.315	.380	.438	.486	.511	.526	.535	.543	.549	.551
.425	.498	.557	.598	.617	.629	.634	.636	.638	.636
.484	.556	.615	.651	.669	.677	.681	.683	.681	.676
.544	.614	.668	.701	.716	.722	.724	.725	.721	.725
.604	.670	.717	.747	.758	.764	.763	.762	.758	.751
.659	.720	.762	.785	.796	.801	.800	.797	.790	.780
.710	.763	.802	.822	.829	.832	.832	.828	.821	.814
.756	.805	.837	.854	.860	.860	.859	.855	.848	.840
.796	.840	.866	.880	.883	.884	.883	.879	.872	.864
.831	.869	.890	.902	.905	.905	.904	.901	.904	.885

C. Agua

Varias enzimas se inhiben por la presencia de trazas de substancias que se encuentran habitualmente en el agua, tales como los iones metálicos presentes en el agua de la llave así como en el agua almacenada en alambiques o surtida a través de tuberías. Por ello debe emplearse agua destilada: un destilador ordinario produce un agua adecuada.

D. Cristalería

Toda la cristalería del laboratorio deberá estar lavada cuidadosamente. Para ello se remoja en mézcila crómica toda la noche y se enjuaga copiosamente primero con agua de la llave, luego con agua destilada y finalmente con agua desionizada. Después se lava con acetona y se deja secar. Algunas veces es necesario usar detergentes. Periódicamente las celdillas espectrofotométricas deberán permanecer toda una noche en ácido dicrómico para asegurar una limpieza adecuada.

E. Almacenamiento (Tabla IV).

Es conveniente almacenar todos los reactivos en estado congelado, exceptuando a algunos que serán discutidos más adelante, por ejemplo, el  $MgCl_2$  y EDTA que son bastante estables a temperatura ambiente.

El congelamiento evita el crecimiento de bacterias y hongos. Es importante tener la certeza de que los reactivos se encuentran bien tapados, y deben ser agitados antes de usarse ya que pueden formarse capas de agua y de soluto en el proceso de congelación.

Existen algunos reactivos que siempre deben almacenarse a --  
4°C: el NAD, el NADP y las soluciones o suspensiones enzimáticas ya  
que son más estables a 4° C que congeladas a menos que el fabricante es-  
pecifique que se almacene congelado. Existen soluciones que no requie-  
ren almacenamiento especial: el NADPH, NADH, GSH y el flavín-adenín-di-  
nucleótido (FAD). Los reactivos que contienen beta-mercaptoetanol sólo -  
pueden almacenarse por dos o tres semanas.

Tabla IV. Estabilidad de reactivos almacenados.

Reactivos estables a  $-20^{\circ}\text{C}$  o  $4^{\circ}\text{C}$  por varios meses

Buffers de tris	Solución ACD
Buffers de fosfato	Citrato
Buffers de glicina	GSSG
Buffers de nicotinamida	Arsenato de sodio
MgCl <sub>2</sub>	KCl
EDTA	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> y K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
Galactosa	K <sub>3</sub> Fe(CN) <sub>6</sub>
Glucosa	L-Aspartato
Glucosa-6-P	Azul de metileno
2,3-difosfoglicerato	Azida de sodio
Fosfoenolpiruvato	Saponina
UDPG	NaF
Piruvato de sodio	Reactivo de Drabkin
Etano	

Reactivos estables a  $-20^{\circ}\text{C}$  por varios meses

Galactosa-1-P	Glucosa-1-P
ATP	DL-gliceraldehido
ADP	Acido 2-fosfoglicérico
Acido 6-fosfogluconico	Acido 3-fosfoglicérico
Fructosa-5-P	Piridoxal-5'-P
Fructosa 1,6-diP	Acido alfa-cetoglutárico
Glucosa 1,6-diP	UDPG deshidrogenasa (semanas)
<sup>14</sup> C-galactosa	Deshidrogenasa málica

Reactivos estables a  $4^{\circ}\text{C}$  por varios meses

NAD <sup>+</sup>	Péroxido de hidrógeno al 30%
NADP <sup>+</sup>	Deshidrogenasa málica en
Albumina de suero bovino	sulfato de amonio

Reactivos estables a  $4^{\circ}\text{C}$  por dos semanas

Substrato Hb para el análisis	MTT
de NADH diaforasa	Extracto de luciernaga
Solución G	

Reactivos preparados diariamente

NADH	GSH
NADPH	Metosulfato de fenacina
FAD	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> diluido

INSTRUMENTACION

Se emplean tres tipos básicos de instrumentos de medición: el espectrofotómetro de luz ultravioleta, el colorímetro y el fluorómetro. - Además, para el análisis de actividad de la galactosacinasa se necesita un equipo de conteo de isótopos. Casi todas las técnicas descritas en -- este documento se hacen en base a la absorbancia de la luz de los piridín-nucleótidos reducidos (NADPH o NADH) a 340 nm. En algunos métodos se mide la concentración de fosfoenolpirúvico (PEP) a base de medir la absorción a 240 nm, aún cuando la absorción es considerablemente mayor a 200 nm. El empleo de 240 nm obedece posiblemente a que esta longitud de onda fue usada inicialmente por Warburg y Christian (10) en las primeras mediciones de PEP, y a que la mayoría de los aparatos son más estables a mayor longitud de onda.

Cuando se miden enzimas de actividad alta, v.gr., glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, triosafosfato isomerasa y fosfogliceratocinasas, no se requieren instrumentos de gran sensibilidad. Se pueden obtener -- buenos resultados con el uso de espectrofotómetros de poca sensibilidad como el Beckman DU, Beckman DB, Beckman modelo B o algunos fotómetros de filtro producidos por Eppendorf. Pero para enzimas de baja actividad, - v.gr., hexocinasas, aldolasas y monofosfatogliceromutasa, se requieren aparatos muy sensibles, v.gr., el espectrofotómetro Gilford Modelo 2000 ó - el modelo 2400 que poseen registro automático de datos y un control de - temperatura del compartimento de las celdillas espectrofotométricas.

Todos los procedimientos espectrofotométricos descritos se basan en los cambios de absorbancia que ocurren en una sola celdilla y -- por tanto no es necesario juegos de celdillas ópticamente idénticas. Las celdillas de vidrio son satisfactorias para las lecturas a 340 nm, pero para las lecturas a 240 nm se necesitan celdillas de cuarzo o de sílice. Si bien se puede usar cualquier medida de celdilla, es preferible usar celdillas con un volumen mínimo de menos de 1 ml, tales como la Pyrocell 1007 (Pyrocell Mfg. Co., 91 Carver Avenue, Westwood, N.J.) y la celdilla SM 69 de la Rho Scientific Inc. (P.O. Box 295, Commack, N.Y.). El uso de tales celdillas tiene varias ventajas: permite usar cantidades pequeñas de reactivos muy caros, son fáciles de limpiar, y el uso de 1 ml de volumen simplifica los cálculos posteriores. Son más caras que las habituales de 3 ml de volumen mínimo. Como el volumen mínimo de una celdilla varía de acuerdo al instrumento empleado, se debe establecer el volumen mínimo de una celdilla: para ello se prepara una dilución aproximadamente 1:200 de sangre en el reactivo de Drabkin (ver inciso C); se coloca en la celdilla un volumen medido de sangre diluida el cual se sepa que es menor que el volumen mínimo de la celdilla y se lee la densidad óptica a 540 nm contra un blanco de aire. Se añade un pequeño volumen medido de la sangre diluida y se lee la densidad óptica de nuevo; después se repite el -- proceso de adición y de lectura hasta que las últimas adiciones de la sangre diluida no produzcan cambios en la lectura de la densidad óptica. El volumen total menor que produce una lectura constante es el volumen mínimo de la celdilla: este volumen debe ser el mínimo que se alcance en todas las mezclas usadas en los sistemas espectrofotométricos.

Para análisis realizados a 340 nm se utiliza una lámpara de tungsteno, y para 240 nm una lámpara de hidrógeno o de deuterio.

En espectrofotómetros debidamente ajustados, una solución -- de 0.1 mM (0.1  $\mu\text{M}/\text{ml}$ ) de NADH o de NADPH tiene una densidad óptica de -- 0.622. En este caso, la apertura ("slit") del instrumento no es de im-- portancia crítica. Pero no es así para una solución de fosfoenolpirúvi-- co (PEP) 0.1 mM que se lee a 240 nm ya que a esta longitud de onda se es-- tá en el declive de la curva de absorción del PEP, y por ello se obtie-- nen resultados diferentes según la apertura del instrumento. Así, en un espectrofotómetro Gilford modelo 2400, se obtiene una absorbancia de -- 0.167 con una apertura de 0.8 mm (ancho de banda = 0.14 nm), pero con -- una apertura de 1.0 mm de ancho (ancho de banda = 0.18 nm) se obtiene -- una densidad óptica de 0.162, y con una apertura de 1.5 mm (ancho de ban-- da = 0.25 nm), una densidad de 0.144. Para mediciones con el espectro de luz visible es más conveniente usar un colorímetro que un espectrofotóme-- tro de luz visible, v.gr., un Coleman Jr modelo 14 sirve para medir la -- concentración de hemoglobina, glutatión, y para la lectura de la banda -- Soret de hemoglobina que se emplea en el cálculo de la galactosa-1-fosfa-- to uridil transferasa (ver capítulo 26).

Para algunos métodos un fluorómetro es mucho más satisfacto-- rio y mucho menos caro que un espectrofluorómetro: un Turner modelo 110 ó 111 es satisfactorio, y el aparato y las celdillas son baratos.

Las cantidades de los reactivos usadas en los análisis enzi--

máticos son generalmente pequeños. Por esta razón no es deseable usar - pipetas serológicas ordinarias de la variedad de 0.1 ml, pero tampoco las micropipetas que , si bien son precisas, son incómodas de lavar. Pi peteadores semiautomáticos de tipo Eppendorf son recomendables para volú menes de 5 a 100 ul, particularmente cuando se realizan numerosos análi sis.

Las cantidades de agua usada en los análisis se ha calculado para dar un volumen final de 1.0 ml. Por eso se vuelve problemático me dir cantidades tales como 605 ó 715 ul, pero la exactitud de una pipeta serológica de 1.0 ml es suficiente para estas mediciones ya que un error de 10 ul de pipeteo introduce sólo un error de un 1 % en la concentración final.

Es necesario calentar el contenido de las celdillas usadas - en los análisis espectrofotométricos antes de la iniciación de la reacción. Esto se puede lograr colocando las celdillas en el compartimento con ter mostato del espectrofotómetro.

Otros aparatos necesarios son un potenciómetro, una balanza analítica, una centrífuga refrigerada y un contador de centelleo.



Cap. 6

CALCULOS DE RESULTADOS

A. Expresión de la actividad enzimática

La actividad de las enzimas eritrocíticas puede ser expresada de tres maneras: 1) actividad por célula, o más convenientemente por  $10^{10}$  células; 2) actividad por mililitro de glóbulos rojos y 3) actividad por gramo de hemoglobina.

Cuando el contenido de hemoglobina de los glóbulos rojos es normal, la interpretación de resultados no depende de la forma de expresión usada, pero en un paciente con anemia microcítica hipocrómica por deficiencia de hierro, la actividad enzimática por gramo de hemoglobina puede estar normal o alta, pero la actividad por glóbulo rojo puede estar disminuída. Para mayores detalles sobre la expresión de mediciones en -- glóbulos rojos existe una revisión reciente (Ref. 11).

Por varias razones se ha elegido a la concentración o actividad en función de hemoglobina como la forma más adecuada de expresar los resultados. Si bien la relación entre enzimas y hemoglobina no es unívoca, se ha preferido usarla ya que dar la actividad en función del número de glóbulos rojos plantea mayores dificultades técnicas: la medición de hemoglobina se realiza con mucho más rapidez y con menos error que la -- cuenta de glóbulos rojos en los laboratorios en donde no se cuenta con un

equipo de conteo automático de células.

Cuando los glóbulos rojos son normales en su contenido de -- hemoglobina y en su volumen, todas las formas de expresar concentración son equivalentes. En tales circunstancias, se pueden emplear los factores de conversión dados en la tabla VII. En los casos en que los glóbulos rojos no tienen un volumen normal o contenido normal de hemoglobina, la conversión de cantidad o actividad por gramo de hemoglobina a cantidad o actividad por mililitro de glóbulos rojos, puede hacerse con facilidad determinando el hematocrito, la cuenta de glóbulos rojos y la hemoglobina en la sangre periférica del paciente, y con ellos se calculan la concentración globular media de hemoglobina (CGMHb), el volumen globular medio (VGM) y la hemoglobina globular media (HbGM) para emplear en las conversiones de la tabla VII. Estos 3 índices se obtienen con los siguientes cálculos:

$$\text{CGMHb (\%)} = \text{Hb} \times 10^2 / \text{Ht}$$

$$\text{VGM (fl)} = \text{Ht} \times 10^7 / \text{G.R.}$$

$$\text{HbGM (pg)} = \text{Hb} \times 10^7 / \text{G.R.}$$

en donde

Hb = hemoglobina en g/dl; Ht = hematocrito en %;

y G.R. = número de glóbulos rojos por ul de sangre.

#### B. Cálculo de la actividad enzimática

En el cálculo de la actividad enzimática (E) dada en unidades internacionales por gramo de hemoglobina:

$$E = \frac{100 A}{Hb} \quad (1)$$

En donde A es el número de unidades enzimáticas por mililitro de hemolizado y Hb es la concentración de hemoglobina en g/dl en el hemolizado. El factor 100 es para corregir el hecho de que la Hb está dada en g/dl y no en g/ml (1 dl = 100 ml). La Hb de un hemolizado 1:20 es generalmente de 1 g /dl. No es recomendable medir la Hb de hemolizados diluidos 1:100 ó 1:200, sino que se mide la Hb cuando está diluida 1:20 y se calcula la concentración por la dilución sufrida.

En el caso de análisis enzimática asociados a NAD o NADP en los cuales una sola molécula de enzima se reduce o se oxida por cada molécula de substrato consumido:

$$A = \frac{\Delta DO}{6.22} \times \frac{V_c}{V_h} \quad (2)$$

En donde  $V_c$  es el volumen de la celdilla espectrofotométrica (igual a -- 1.0 ml en los sistemas descritos en la parte II),  $V_h$  es el volumen de hemolizado usado en el sistema,  $\Delta DO$  es el cambio de densidad óptica por minuto a 340 nm. En cambios enzimáticos asociados con NAD o NADP en los cuales dos moles de enzima son oxidados o reducidos por cada molécula de substrato consumido:

$$A = \frac{\Delta DO}{12.44} \times \frac{V_c}{V_h} \quad (3)$$

En análisis realizados con PEP (fosfoenolpiruvato) como substrato a 240 nm y con un ancho de banda menor de 0.2 nm (apertura no mayor de 1.1 mm en un Gilford):

$$A = \frac{\Delta DO}{1.67} \times \frac{V_c}{V_h} \quad (4)$$

En el cálculo de  $\Delta DO$  de las curvas es importante seleccionar la porción correcta de la curva: a menudo los cambios de  $\Delta DO$  en las --- reacciones acopladas son crecientes en los primeros minutos de reacción, y después se vuelven lineales, siendo este segmento lineal de mayor velocidad el que debe ser empleado para medir  $\Delta DO$ . Por otra parte, a veces la reacción tiende a ser de menor velocidad con el paso del tiempo al --irse consumiendo el sustrato, pero nuevamente debe seleccionarse el segmento de mayor velocidad para obtener  $\Delta DO$ .

En el cálculo de  $\Delta DO$  es importante recordar que se debe dividir el cambio total de DO entre el número de minutos durante los cuales se midió el cambio, es decir, se debe obtener  $\Delta DO$  en unidades de absor--bancia/minuto. El  $\Delta DO$  del sistema de medición debe corregirse leyendo -siempre el sistema de la muestra problema versus un sistema blanco, o --sea, un sistema que contenga todos los reactivos menos el sustrato de -la enzima que se está midiendo.

C. Blanco adicional. El  $\Delta DO$  medido puede estar falsamente alto por la presencia de enzima contaminante en las enzimas auxiliares. Por ello se requiere comprobar la presencia de tales contaminantes a base de hacer -blanco y sistema de la enzima en cuestión, pero en el que se substituye el hemolizado por solución G (ver Cap. 3, inciso B). La lectura del sistema sin hemolizado leído contra el blanco sin hemolizado deberá dar una  $\Delta DO$  de cero o muy pequeña, lo cual indica que las enzimas auxiliares no

están contaminadas por la enzima que se está tratando de medir. Si este sistema tiene por otra parte actividad, el  $\Delta$ DO de este blanco adicional deberá restarse del  $\Delta$ DO visto en el sistema de medición con hemolizado para así emplear  $\Delta$ DO ya corregido para obtener A (número de unidades enzimáticas/ml de hemolizado) con las ecuaciones 2, 3 ó 4, según el caso.

El empleo de blanco adicional es necesario en la mayoría de las mediciones enzimáticas de las Partes III y IV de este documento, y se indica en cada una de ellas cuándo es necesario emplearlo.

D. Cálculo de las concentraciones de metabolitos intermediarios.

Las concentraciones de metabolitos intermediarios o de coenzimas eritrocíticas se presenta en forma individual en cada uno de los métodos en vista de que las técnicas difieren en varios aspectos. Pero algunas generalidades son pertinentes:

Si la concentración se calcula a partir del coeficiente de extinción de un producto presente en el sistema de medición, la concentración milimolar (C) de la substancia en la celdilla espectrofotométrica se obtiene con la ecuación:

$$C = \frac{R}{e} \quad (5)$$

en donde e es el coeficiente de extinción de una solución 1 mM del producto presente en el sistema de medición, y R es la absorbancia de la muestra problema. Para obtener la concentración final de la substancia en la muestra

original de glóbulos rojos, será necesario corregir el dato de la ecuación 5 por las diluciones sufridas durante el proceso de extracción --- (ver Cap. 3, inciso D) y por las diluciones subsecuentes que se hagan - del hemolizado en el sistema de medición

Si la concentración se calcula en base a la lectura obtenida con una solución estándar, la concentración milimolar (C) de la substancia se obtiene con la ecuación:

$$C = \frac{R \times C_{est}}{R_{est}} \quad (6)$$

en donde  $C_{est}$  es la concentración milimolar de la solución estándar, --  $R_{est}$  es la absorbancia de la muestra estándar, y R es la absorbancia de la muestra problema. En esta situación, es necesario considerar todas las diluciones que sufre la muestra desde que se midió la concentración de Hb en ella (ver Cap. 3, inciso C) hasta el momento en que se maneja - en forma idéntica a la solución estándar.

En los procedimientos descritos en la Parte V de este documento, ya están incorporados los factores de dilución en los cálculos - dados, pero debe recordarse que se tendrán que hacer correcciones adecuadas en los casos en que, por algún motivo, no se pueda seguir exactamente el procedimiento descrito.

### PARTE III

#### Enzimas Glucolíticas

##### Generalidades

En la mayoría de las mediciones presentada en esta Parte III se describen con blanco y con sistemas designados 1 y 2. El sistema 1 - sirve para medir la concentración de enzima que va a ser informado por - el laboratorio. El sistema 2 es igual al 1 excepto en que la concentra- ción de sustrato es menor a la del sistema 1 (5 a 20 %): ello sirve -- para comprobar que el sustrato no es limitante de la reacción en el sis tema 1, o sea, que si al hacer el siguiente cálculo:

$$\frac{\Delta DO \text{ del sistema 2}}{\Delta DO \text{ del sistema 1}} \times 100$$

se debe caer dentro de los límites porcentuales dados para cada medición. Si el valor porcentual cae abajo del límite inferior dado, se plantea la posibilidad de que el sustrato no esté a saturación en el sistema 1, y por tanto, que las mediciones deben repetirse empleando una mayor concen tración de sustrato.

##### Premezclado de reactivos

Se puede hacer en todas las mediciones descritas en esta Par te III. Esta posibilidad es útil cuando se van a hacer múltiples medi- ciones ya que se pueden premezclar varios reactivos y colocar en la cel- dilla el volumen adecuado de la premezcla. En cada método se dan los -- reactivos que pueden premezclarse.

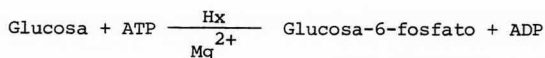
Valores normales.

En todos los casos los valores normales se dan como media + desviación estándar: en general, la media + 2 veces la desviación estándar engloba al 95.5 % de los casos y son los límites habituales en que se expresa la normalidad.

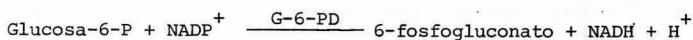


HEXOCINASA (Hx).

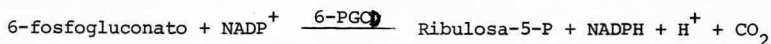
A. Fundamento. La hexocinasa cataliza la reacción:



La glucosa-6-fosfato (G-6-P) se mide acoplando la reacción -- anterior con la reacción del NADP a través de la reacción de la glucosa-6-P deshidrogenasa:



El fosfogluconato reduce aún más el NADP a NADPH por la des-- hidrogenasa de 6-fosfogluconato presente en exceso en casi todos los he-- molizados:



La reducción del NADP se sigue a 340 nm.

B. Procedimiento. Pueden premezclarse buffer,  $\text{MgCl}_2$ , glucosa, ATP, -- NADP y agua.

	Blanco (ul)	Sistema 1 (ul)	Sistema 2 (ul)
Buffer tris-HCl pH, 8.0, 1 M	100	100	100
MgCl <sub>2</sub> 0.1 M	20	20	20
Glucosa 0.02 M	100	100	5
ATP (neut) 0.02 M	---	100	100
NADP 2 mM	100	100	100
Hemolizado sin estroma 1:20	50	50	50
G-6-PD 10 U/ml (diluída en solución G)	10	10	10
H <sub>2</sub> O	620	520	615

Después de preincubar por 15 min a 37° C, se miden los incrementos de densidad óptica de los sistemas 1 y 2 contra el blanco a 340 nm.

C. Blanco adicional. Sí (ver Cap. 6, inciso C). Comprobar que la G-6-P deshidrogenasa está libre de hexocinasa, midiendo  $\Delta DO$  durante 45 min sin preincubación. Si  $\Delta DO$  es de 0.0005 unidades de absorbancia/minuto o más es mejor obtener una preparación mas pura de G-6-PD. Si es menor hacer un blanco adicional en cada día de trabajo.

D. Comentarios. La hexocinasa es la menos activa de las enzimas glicolíticas y por tanto es esencial contar con un buen espectrofotómetro. Los cambios de DO no se hacen lineales hasta que han transcurrido 15 a 20 minutos de haber iniciado la reacción, y deberá tenerse la certeza de que la velocidad de reacción haya llegado a la máxima antes de que el análisis de dé por terminado.

La actividad de la 6-fosfogluconato deshidrogenasa del hemolizado es mayor que la actividad de la hexocinasa, y como la deficiencia de aquélla es muy rara, no es necesario añadir 6-fosfogluconato deshidrogenasa como enzima auxiliar en el sistema.

E: Cálculos, valores normales e interpretación. Si hubo actividad del -- blanco adicional (ver C arriba) el  $\Delta$ DO del blanco adicional se multiplica por dos y se resta del  $\Delta$ DO del sistema 1 original. Esto debe ser hecho -- porque sólo una molécula de NADP se reduce por molécula de glucosa en ausencia del hemolizado, pero se reducen dos moles cuando está presente la - 6-fosfogluconato deshidrogenasa del hemolizado.

La actividad de Hx se calcula con la fórmula 3 (ver Cap. 6, -- inciso B) ya que se reducen dos moles de NADP por molécula de glucosa fosforilada.

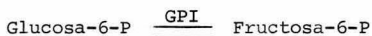
Los glóbulos rojos de adultos normales contienen  $0.64 \pm 0.27$  UI. La actividad del sistema 2 normalmente es  $63 \pm 12$  % del sistema 1.

Los glóbulos rojos jóvenes tienen mayor actividad que las células viejas ya que la hexocinasa es una de las enzimas cuya actividad baja rápidamente con la edad del eritrocito: por tanto una actividad enzimática normal en presencia de reticulocitosis deberá tomarse con reserva. Se han informado en la literatura algunos pacientes con deficiencia de hexocinasa.

Cap. 8

GLUCOSA FOSFATO ISOMERASA. (GPI) (FOSFOHEXOSA)+

A. Fundamento. La glucosa fosfato isomerasa interconvierte a la glucosa-6-P y a la fructosa-6-P.



En el análisis la fructosa-6-P sirve como sustrato, y la glucosa-6-P se mide por la asociación de ésta a la reducción del NADP a través de la reacción acoplada con la glucosa-6-P deshidrogenasa. El 6-fosfogluconato formado se oxida a través de la reacción que cataliza la 6-fosfogluconato deshidrogenasa reduciendo un NADP adicional, (ver capítulo 7 sección A). La reducción del NADP se mide a 340 nm.

B. Procedimiento. Pueden premezclarse, buffer,  $\text{MgCl}_2$ , NADP, fructosa-6-P y agua.

	Blanco (ul)	Sistema 1 (ul)	Sistema 2 (ul)
Tris-HCl, pH 8.0, 1M	100	100	100
$\text{MgCl}_2$ 0.1M	100	100	100
NADP, 2 mM	100	100	100
Glucosa-6-P deshidrogenasa 10 U/ml (diluida en solución G)	10	10	10
Fructosa-6-P, 0.02M	--	100	5
6-Fosfogluconato deshidrogenasa 4 U/ml	10	10	10
$\text{H}_2\text{O}$	675	575	670
Preincubar a 37° C por una hora			
Hemolizado sin estroma 1:20	5	5	5

El incremento de la densidad óptica del sistema 1 y 2 se mide a 340 nm por 10 a 20 minutos.

C. Blanco adicional. Sí (ver cap. 6, inciso C). Este puede realizarse fácilmente, midiendo el cambio de DO del sistema 1 contra el blanco durante 10 minutos antes de añadir el hemolizado. Si no se observa cambio en la densidad óptica, las enzimas auxiliares no están contaminadas con la GPI.

D. Comentarios. Se requiere un largo período de incubación sin el hemolizado, porque algunas veces se presenta inicialmente un incremento gradual en la densidad óptica independiente de alguna actividad de la GPI. Esto probablemente se deba a la oxidación gradual de la glucosa-6-P contaminada con fructosa-6-P. Aunque en algunas preparaciones se necesita una hora completa de incubación para reducir este porcentaje no específico a niveles sin importancia, éste puede no ser siempre el caso ya que algunas veces no se presenta cambio alguno de DO en estas condiciones.

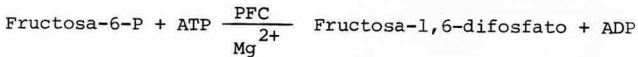
E. Cálculos, valores normales e interpretación. Dos moles de NADP se reducen por cada mol de fructosa-6-P convertida a glucosa-6-P: por tanto deberá usarse la ecuación 3 (ver cap. 6, inciso B). No olvidar corregir blanco adicional en caso de ser necesario (ver C arriba).

Los glóbulos rojos de adultos normales contiene  $28.4 \pm 6.87$  UI de GPI/g Hb. La actividad del sistema 2 generalmente es  $62 \pm 7$  % del sistema 1. Se han reportado varios casos de anemia hemolítica no esférica en casos de deficiencia de GPI.

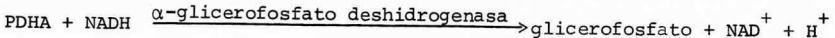
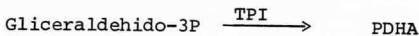
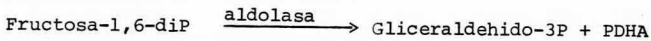
Cap. 9

FOSFOFRUCTOCINASA (PFC)

A. Fundamento. La fosfoructocinasa cataliza la fosforilación de la -- fructosa-6-P por el ATP a fructosa-1,6-difosfato:



La fructosa-1,6-difosfato formada se mide por su conversión a - fosfato de dihidroxi-acetona (PDHA) a través de las reacciones acopladas con la aldolasa y con la triosafosfato isomerasa (TPI), y finalmente el PDHA se reduce por acción de la  $\alpha$ -glicerofosfato deshidrogenasa, oxidando el NADH a NAD.



La oxidación del NADH se mide a 340 nm.

B. Procedimiento. Pueden premezclarse buffer, ATP,  $\text{MgCl}_2$ , F-6-P, NADH y agua.

	Blanco (ul)	Sistema 1 ul)	Sistema 2 (ul)
Buffer Tris-HCl pH 8.0, 1M	50	50	50
ATP(neut) 0.02 M	--	100	100
MgCl <sub>2</sub> 0.1 M	50	50	50
Fructosa-6-P 0.02 M	100	100	5
NADH 2 mM	100	100	100
Solución de enzimas auxi- liares*	100	100	100
Hemolizado congelado-des- congelado 1:20	10	10	10
H <sub>2</sub> O	590	490	585

Después de 10 minutos de preincubación a 37° C se mide el -- decremento de la DO a 37° C por 10 a 20 minutos en los sistemas 1 y 2 -- contra el blanco.

El espectrofotómetro será puesto inicialmente a un valor de densidad óptica de 0.3 ya que la absorbancia del sistema disminuirá.

C. Blanco adicional. Sí (ver cap. 6 inciso C). Debe notarse que -- en caso de que sí haya contaminación con PFC, será difícil determinar cuál de las 3 enzimas auxiliares es la fuente de contaminación. La -- mejor manera de detectar la fuente de contaminación consiste en preparar

---

\* Solución de enzimas auxiliares. Hacer una suspensión de 50 unidades/ml colocando 100 unidades de aldolasa + 100 unidades de TPI + 100 -- unidades de ~~α~~-glicerofosfato deshidrogenasa en un tubo, y llevando a un volumen final de 2 ml con una solución saturada de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> SO<sub>4</sub>. La suspensión es estable a 4° C. Diluir 1:15 en un buffer tris-HCl pH 8.0, diluido éste previamente 1:10 y conteniendo 2 mg/ml de albúmi--na de suero bovino.

tres nuevas suspensiones, cada una conteniendo doble cantidad de cada una de las enzimas auxiliares. El incremento de la actividad al usar en el blanco adicional con cada una de estas 3 soluciones de enzimas auxiliares por separado, indicará cuál es la enzima contaminada con PFC.

D. Comentarios. La PFC es la menos estable de las enzimas glicolíticas del hemolizado. Cerca del 10 % de la actividad se pierde cuando un hemolizado congelado-descongelado 1:20 se almacena en hielo por 3 horas. La pérdida de la actividad de la enzima es mayor en el sistema 1 que en el sistema 2, lo cual se debe a que los glóbulos rojos contienen dos isoenzimas de la fosfofructocinasa, y el  $K_m$  de la fructosa-6-fosfato del componente inestable es aparentemente mayor que el del componente estable.

En el sistema 2 se observa un cambio rápido de DO si la muestra no se preincuba por 10 minutos antes de realizar las mediciones. Esto probablemente se debe al hecho de que la fructosa-6-P se transforma en una mezcla en equilibrio de glucosa-6-P y fructosa-6-P en presencia de la fosfoglucoisomerasa. Puesto que la concentración de fructosa-6-P limita la velocidad de reacción en el sistema 2, esta velocidad irá disminuyendo en mayor grado que el sistema 1 en tanto no se alcance la concentración de equilibrio de fructosa-6-P y glucosa-6-P.

E. Cálculos, valores normales e interpretación! Dos molas de NADH se oxidan por cada mol de fructosa-6-P fosforilada. Por tanto deberá usarse la ecuación 3 (ver Cap. 6, inciso B). (No olvidar corregir por blanco adicional de ser necesario (ver C arriba). Los glóbulos rojos en adultos norma

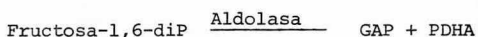


les contienen  $12.60 \pm 1.66$  UI de PFC/ g de Hb. La actividad en el sistema 2 normalmente es  $17 \pm 6.6$  % del sistema 1. Hay descritos casos de deficiencia de PFC en algunos casos de anemia hemolítica congénita no esférica.

Cap. 10

ALDOLASA

A. Fundamento. La aldolasa cataliza el rompimiento de la fructosa-1,6-diP en dos moléculas de triosafosfato: la gliceraldehido-3-fosfato (GAP) y el fosfato de dihidroxiacetona (PDHA).



La cantidad de GAP y de PDHA formados se mide a través de las reacciones acopladas de la triosafosfatoisomerasa (TPI), y la reducción del PDH por la  $\alpha$ -glicerofosfato deshidrogenasa (ver reacciones en Cap. 9, inciso A). La oxidación del NADH a NAD del proceso se mide a 340 nm.

B. Procedimiento. Pueden premezclarse buffer, NADH y agua.

	Blanco (ul)	Sistema 1 (ul)	Sistema 2 (ul)
Tris-HCl pH 8.0, 1M	100	100	100
NADH 2 mM	100	100	100
Solución de enzimas auxiliares*	100	100	100
Hemolizado congelado-descongelado 1:20	10	10	10
Agua	690	590	680
Preincubar 10 minutos a 37° C			
Fructosa-1,6-diP 0.01 M	---	100	10

\* Solución de enzimas auxiliares. Hacer una suspensión de 50 U/ml de cada enzima: añadir 100 unidades de TPI + 100 unidades de  $\alpha$ -GPD en un tubo y llevar a un volumen de 2 ml con solución saturada de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . La suspensión es estable a 4° C. Para el análisis se diluye 1:15 en buffer tris-HCl 1 M, pH 8.0 diluido éste previamente 1:10 y conteniendo 2 mg/ml de albúmina de suero bovino. Almacenar en hielo por dos a seis horas antes del análisis.

El decremento de la densidad óptica en ambos sistemas se mide a 37° C por 10 a 20 minutos contra el blanco a 340 nm.

El espectrofotómetro deberá ser puesto con el blanco a un valor de densidad óptica de 0.1 ya que la absorbancia disminuirá.

C. Blanco adicional. SÍ (ver cap. 6, inciso C).

D. Comentarios. Debido a la baja actividad de la enzima, se deberá contar con un espectrofotómetro muy sensible para obtener resultados satisfactorios.

Existe una gran cantidad de aldolasa unida al estroma de eritrocito por lo que no se debe centrifugar el hemolizado. El hemolizado - congelado-descongelado incrementa la actividad de esta enzima, pero congelar y descongelar varias veces el hemolizado no incrementa más la actividad. Los detergentes como el Triton-X-100 y la digitonina no aumentan la extracción de la enzima. Parece haber un pequeño aumento en la actividad de la enzima durante las dos horas siguientes a la preparación del hemolizado, pero después de este intervalo, la actividad de la enzima permanece relativamente estable.

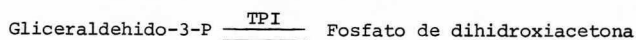
E. Cálculos, valores normales e interpretación. Como dos moles de NADH se oxidan por cada mol de fructosa-1,6-diP convertida a triosa fosfato, - se usará la ecuación 3 (ver Cap. 6, inciso B) en los cálculos. No olvidar corregir  $\Delta DO$  por blanco adicional en caso necesario. Los glóbulos rojos de adultos normales contienen  $3.22 \pm 0.49$  UI/g Hb. La actividad en

el sistema 2 generalmente es  $67 \pm 10$  % del sistema 1. La actividad de la aldolasa se ve afectada por la edad de los glóbulos rojos, y se incrementa en general en pacientes con enfermedades hemolíticas.

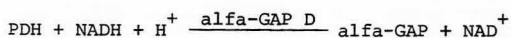
Cap. 11

TRIOSA FOSFATO ISOMERASA (TPI)

A. Fundamento. La triosa fosfato isomerasa interconvierte al gliceraldehido-3-P (GAP) y al fosfato de dihidroxiacetona (PDHA):



La formación de PDHA a partir del GAP se mide acoplando esta reacción a la de la alfa-glicerofosfato deshidrogenasa:



La oxidación del NADH a NAD en la reacción acoplada es la que se mide a 340 nm.

B. Procedimiento. Pueden premezclarse buffer, NADH y agua.

	Blanco (ul)	Sistema (ul)
Tris-HCl, pH 8, 1 M	100	100
NADH 2 mM	100	100
Hemolizado sin estroma 1: 2,000	10	10
Alfa-GAP D (~2 U/ml)	50	50
Agua	740	640
	Preincubar 10 minutos a 37° C	
*D-GAP 30 mM	---	100

---

\* Ver pie de página siguiente

El decremento de DO del sistema se mide contra el blanco por 10 minutos a 37°C y a 340 nm. El espectrofotómetro deberá ser puesto -- con el blanco a un valor de DO de 0.3, en vista de que la DO del sistema disminuye con el tiempo.

C. Blanco adicional. Sí (ver Cap. 6, Inciso C).

D. Comentarios. Esta reacción tiene un orden cinético de 1 con respecto a la concentración de D-GAP, o sea, que la concentración de sustrato es crítica. Por ello se deben analizar todos los lotes nuevos de DL-GAP para determinar la concentración real de D-GAP, y así preparar una solución 30 mM. Existen dos configuraciones de D-GAP: una es metabolizada

---

\* El D-GAP 30 mM se prepara a partir de DL-GAP comercial (50 mg/ml, -- Sigma) que se diluye 1:10 y se analiza en el siguiente sistema:

	Blanco (ul)	Sistema (ul)
Tris-HCl pH 8, 1 M	100	100
NADH 2 mM	100	100
TPI (sin diluir)	5	5
Alfa-GAP D (~ 2 U/ml)	50	50
Agua	740	740
	Leer DO inicial a 340 nm	
DL-GAP (1:10)	-	5
Agua	5	-

Leer DO hasta que ésta no varíe. Restar la DO inicial para obtener  $\Delta$ DO.

La concentración milimolar (C) de D-GAP en la solución de DL-GAP es:

$$C = \frac{\Delta DO \times 2000}{6.22}$$

Tomar 0.3 ml de DL-GAP sin diluir y llevar a un volumen de 0.01 C ml con agua para obtener una solución 30 mM de D-GAP.

rápida, y la otra lo es lentamente. Por tanto, la reacción tendrá una fase rápida inicial que deberá ser empleada para calcular el  $\Delta$ DO del sistema de medición, y se hace caso omiso de la fase lenta.

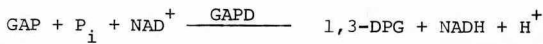
Otro factor que afecta los resultados es que la TPI se inhibe con el  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , y debe recordarse que la alfa-glicerofosfato deshidrogenasa que se utiliza como enzima auxiliar en el sistema, se encuentra como una suspensión en  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . Por otra parte la cantidad de sulfato de amonio que se introduce al sistema depende de la actividad de la alfa-glicerofosfato deshidrogenasa disponible: así se observará una inhibición relativamente pequeña de TPI cuando la alfa-glicerofosfato deshidrogenasa tiene una actividad alta (600 U/ml). Un dato útil en estas consideraciones es que una concentración de 0.5 mM de sulfato de amonio en la suspensión final puede producir aproximadamente un 10 % de inhibición de la TPI.

E. Cálculos, valores normales e interpretación. Una molécula de NADH se oxida por cada molécula de DL-GAP convertido a PDH. Por tanto se deberá usar la ecuación 2 (ver Cap. 6, inciso B). No olvidar corregir por blanco adicional en caso de ser necesario (ver C arriba). Los glóbulos rojos de adultos normales contienen  $1440.88 \pm 160.84$  UI de TPI/g Hb. Se presenta anemia hemolítica congénita no esferocítica en algunos casos con deficiencia de TPI.

Cap. 12

GLICERALDEHIDOFOSFATO DESHIDROGENASA (GAP D)

A. Fundamento. La gliceraldehidofosfato deshidrogenasa cataliza la fosforilación y la oxidación del gliceraldehido-3-P (GAP) a 1,3-difosfoglicerato (1,3-DPG):



Para ayudar a desviar la reacción a la derecha, el fosfato inorgánico -- ( $\text{P}_i$ ) se substituye por arsenato en el sistema ya que el éster de arsenato y GAP se hidroliza espontáneamente. La reducción del  $\text{NAD}^+$  a NADH se mide a 340 nm.

B. Procedimiento. Pueden premezclarse buffer, NAD, arsenato y agua.

	Blanco (ul)	Sistema 1 (ul)	Sistema 2 (ul)
Tris-HCl pH 8.0, 1M	100	100	100
NAD 10 mM	100	100	100
Arsenato disódico pH 8.0, 0.15 M	100	100	100
EDTA 0.027 M	50	50	50
H <sub>2</sub> O	630	530	610
Hemolizado congelado-des- congelado 1:200	20	20	20
	Preincubar 10 minutos a 37°C		
D-GAP* 10 mM	---	100	20

---

\* Ver Capítulo anterior, inciso B para la preparación de un D-GAP -- 30 mM (diluir el 30 mM 1:3 con agua para obtener 10 mM).



El incremento de la densidad óptica de los sistemas 1 y 2 se mide contra el blanco a 340 nm, a 37° C y por 10 a 20 minutos.

C. Blanco adicional. Ninguno

D. Comentarios. Esta enzima se encuentra unida fuertemente al estroma, y el grado de unión es aparentemente mucho mayor a un pH ligeramente alcalino que a un pH ácido. Por eso es esencial realizar el análisis en un hemolizado no centrifugado. Se requiere una alta concentración de NAD para obtener resultados lineales. Si bien esto se logra con concentraciones -- de 0.5 mM de NAD, el empleo de concentraciones mayores nos dan un margen -- de seguridad, ya que las preparaciones de NAD muestran un decremento en -- su contenido cuando se almacenan, inclusive en forma sólida.

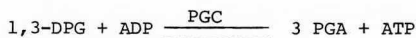
Existe mayor variación en los resultados al repetir el análisis en el mismo hemolizado que la que se observa usualmente en otros análisis enzimáticos: este mayor error se puede deber a que la enzima se encuentra unida al estroma, lo cual la hace menos accesible que si estuviera en forma soluble.

E. Cálculos, valores normales e interpretación. Una mol de NAD se reduce a NADH por cada mol de D-GAP convertido a 1,3-DPG: por tanto se usa la --- ecuación 2 (ver Cap. 6 inciso B) para los cálculos. Los glóbulos rojos de adultos normales contienen  $56.72 \pm 5.97$  UI de GAPD/g Hb. La actividad del sistema 2 generalmente es de  $41 \pm 5.2$  % del sistema 1.

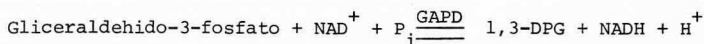
Cap. 13

FOSFOGLICERATO CINASA (PGC).

A. Fundamento. La fosfoglicerato cinasa cataliza la reacción de fosforilación y oxidación del ADP a ATP por el 1,3-difosfoglicerato (1,3-DPG):



La reacción se mide en dirección reversa (de derecha a izquierda). La formación del 1,3-DPG se determina a través de la reacción acoplada de la gliceraldehidofosfato deshidrogenasa (GAPD):



En esta reacción se mide la oxidación de NADH a NAD<sup>+</sup> (de derecha a izquierda).

B. Procedimiento. Pueden premezclarse buffer, MgCl<sub>2</sub>, ATP, NADH y agua.

	Blanco (ul)	Sistema (ul)
Tris-HCl pH 8.0, 1M	100	100
MgCl <sub>2</sub> 0.1M	100	100
ATP (neut) 0.02 M	400	400
GAPD 40 U/ml (diluída en solución G)	100	100
NADH 2 mM	100	100
Hemolizado sin estroma 1:200	20	20
H <sub>2</sub> O	180	80
	Preincubar 10 minutos a 37° C	
3-PGA 0.01 M	---	100

El decremento de la densidad óptica del sistema se mide a --  
37° C por 10 a 20 minutos contra el blanco. El espectrofotómetro será --  
puesto en blanco a un valor de densidad óptica de 0.6 unidades.

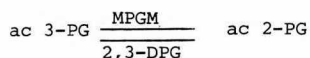
C. Blancos adicionales. Sí (ver Cap. 6, inciso C). La lectura se --  
hará después de 45 minutos y sin la preincubación de 10 minutos.

E. Cálculos, valores normales e interpretación. Una mol de NADH se --  
oxida por cada mol de 3-PCA convertido a 1,3-DPG: por tanto se usará la  
ecuación 2 (ver cap. 6 inciso B). Los glóbulos rojos de adultos norma--  
les contienen  $159.98 \pm 9.52$  UI de PGC/g Hb. Se han observado casos de -  
deficiencia de PGC en anemia hemolítica no esferocítica congénita.

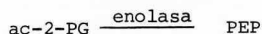
Cap. 14

MONOFOSFOGLICERATOMUTASA (MPGM).

A. Fundamento. La monofosfogliceratomutasa cataliza el equilibrio entre el ácido 3-fosfoglicérico (ac 3-PG) y el ácido 2-fosfoglicérico (ac 2-PG):



En el análisis se usa como sustrato el ac 3-PG y además el 2,3-DPG que es un cofactor esencial de la MPGM. El ac 2-PG se convierte a fosfoenol piruvato (PEP) a través de la reacción acoplada de la enolasa:



La formación del PEP se mide directamente a través del incremento de la densidad óptica a 240 nm.

B. Procedimiento. Pueden premezclarse buffer, 2,3-DPG, MgCl<sub>2</sub> y agua.

	Blanco (ul)	Sistema 1 (ul)	Sistema 2 (ul)
Tris-HCl pH 8.0, 1M	100	100	100
Enolasa 10 U/ml	10	10	10
2,3-DPG 1 mM	10	10	10
MgCl <sub>2</sub> 0.1 M	10	10	10
Hemolizado sin estroma 1:20	20	20	20
H <sub>2</sub> O	850	750	840
	Preincubar	10 minutos a 37° C	
3-PGA 0.01 M	---	100	10

El incremento de la densidad óptica de los sistemas 1 y 2 se mide a 37°C

por 10 a 20 minutos contra el blanco a 240 nm.

C. Blanco adicional. Sí (ver Cap. 6, inciso C).

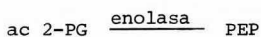
D. Comentarios. Se requiere un espectrofotómetro muy sensible, ya que la actividad de la enzima es baja y la amplitud de la longitud de onda usada es crítica (ver Cap. 5).

E. Cálculos, valores normales e interpretación. Una molécula de PEP se forma por cada molécula de ac 3-PG convertido a ac 2-PG, por tanto deberá usarse la ecuación 4 (ver Cap. 6, inciso B). No olvidar corregir por blanco adicional en caso necesario (ver C arriba). Los glóbulos rojos de -- adultos normales contienen  $22.3 \pm 3.48$  UI de MPGM/g Hb. La actividad del sistema 2 normalmente es  $53 \pm 2$  % del sistema 1.

Cap. 15

ENOLASA

A. Fundamento. La enolasa cataliza la reacción de equilibrio entre el ac 2-fosfoglicérico (ac 2-PG) y el ácido fosfoenol pirúvico (PEP):



En este análisis el ac 2-PG actúa como sustrato y el porcentaje de formación del PEP se mide a 240 nm.

B. Procedimiento. Pueden premezclarse buffer,  $\text{MgCl}_2$  y agua.

	Blanco (ul)	Sistema 1 (ul)	Sistema 2 (ul)
Tris-HCl pH 8.0, 1M	200	200	200
$\text{MgCl}_2$ 0.1 M	5	5	5
$\text{H}_2\text{O}$	775	675	765
Hemolizado sin estroma 1:20	20	20	20
Preincubar 10 minutos a 37°C			
Ac 2-PG 0.01 M	---	100	10

El incremento de la densidad óptica de los sistemas 1 y 2 se miden a 37°C contra el blanco a 240 nm.

C. Blanco adicional. Ninguno

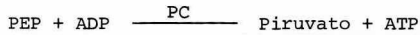
D. Comentarios. Se necesita un espectrofotómetro muy sensible por la baja actividad de la enzima y la necesidad de medir la densidad óptica a 240 nm (ver Cap. 5).

E. Cálculos, valores normales e interpretación. Una molécula de PEP se forma por cada molécula de Ac 2-PG utilizado: deberá usarse la ecuación 4 (ver Cap. 6, inciso B). Los glóbulos rojos de adultos normales contienen  $7.54 \pm 1.37$  UI de enolasa/g Hb. La actividad del sistema 2 normalmente es  $58 \pm 13$  % del sistema 1.

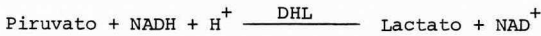
Cap. 16

PIRUVATO CINASA (PC).

A. Fundamento. La piruvato cinasa cataliza la fosforilación del ADP a ATP por el fosfoenolpiruvato (PEP):



El porcentaje de la formación del ATP se mide por su asociación con la oxidación del NAD en una reacción acoplada con la deshidrogenasa láctica (DHL):



Se mide el decremento de la densidad óptica a 340 nm que ocurre cuando el NADH se oxida a NAD.

B. Procedimiento. Pueden premezclarse buffer, KCl, MgCl<sub>2</sub>, NADH, ADP y agua.

	Blanco (ul)	Sistema 1 (ul)	Sistema 2 (ul)
Tris-HCl pH 8.0, 1M	100	100	100
KCl 1.0 M	100	100	100
MgCl <sub>2</sub> 0.1 M	100	100	100
NADH 2 mM	100	100	100
ADP (neut) 4 mM	---	100	50
H <sub>2</sub> O	380	280	380
DHL 60 U/ml	100	100	100
Hemolizado sin estroma : 1:20	20	20	20
Preincubar a 10 minutos a 37°C			
PEP 0.015 M	100	100	50



El decremento de la densidad óptica de los sistemas 1 y 2 -- se mide a 37°C contra el blanco a una densidad óptica de 340 nm.

El espectrofotómetro será puesto en blanco a un valor de densidad óptica de 0.3.

C. Blanco adicional. Sí (ver Cap. 6, inciso C).

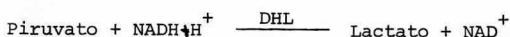
D. Comentarios. Los glóbulos blancos son una fuente rica en piruvato - cinasa, y la actividad de esta enzima no disminuye en los glóbulos blancos aún cuando haya deficiencia de piruvato cinasa en los glóbulos rojos. Si se observan resultados normales con la sangre de un paciente con sospecha de deficiencia de PC, puede ser necesario un tratamiento especial, tal como la sedimentación de los glóbulos rojos con polivinilpirrolidona, para liberarlos de glóbulos blancos.

E. Cálculos, valores normales e interpretación. Una molécula de NADH - se oxida por cada molécula de PEP desfosforilado: por tanto deberá usar se la ecuación 2 (ver Cap. 6, inciso B). No olvidar corregir por blanco adicional de ser necesario (ver C arriba). Los glóbulos rojos de adultos normales contiene  $5.38 \pm 1.67$  UI de PC/g Hb. La actividad del sistema 2 normalmente es  $55 \pm 3$  % del sistema 1. La deficiencia de piruvato cinasa probablemente es la causa más común de anemia hemolítica congénita no esférica. Se han reportado mutaciones que dan como resultado una enzima con una actividad normal a altas concentraciones de sustrato pero con actividad disminuída a bajas concentraciones de sustrato.

Cap. 17

DESHIDROGENASA LACTICA (DHL).

A. Fundamento. La deshidrogenasa láctica cataliza la reducción del piruvato a lactato por el NADH:



En el análisis la oxidación del NADH a  $\text{NAD}^+$  se sigue espectrofotométricamente a 340 nm.

B. Procedimiento. Pueden premezclarse buffer, NADH y agua.

	Blanco (ul)	Sistema (ul)
Tris-HCl pH 8.0, 1 M	100	100
NADH 2 mM	100	100
Hemolizado sin estroma 1:200	20	20
H <sub>2</sub> O	780	680
Preincubar 10 minutos a 37°C		
Piruvato de sodio 10 mM	---	100

El decremento de la densidad óptica se mide a 37°C contra el blanco a 340 nm. El espectrofotómetro deberá ser puesto a un valor de DO de 0.6.

C. Blanco adicional. Ninguno

D. Comentarios. Ninguno

E. Cálculos, valores normales e interpretación. Una molécula de NADH se oxida a  $\text{NAD}^+$  por cada molécula de piruvato reducido. Por tanto deberá usarse la ecuación 2 (ver Cap. 6, inciso B). Los glóbulos rojos de adultos normales contienen  $142.37 \pm 34.59$  UI de DHL/g Hb. No se han reportado en la literatura deficiencias de deshidrogenasa láctica.

PARTE IV

ENZIMAS DEL CICLO DE LAS PENTOSAS Y OTRAS

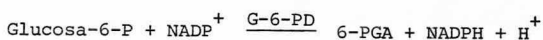
GENERALIDADES

1. Sólo en adenilatocinasa (Cap. 25) se presenta a sistema adicional - de substrato bajo (ver generalidades de Parte III).
2. Hay premezclado en la mayoría de las mediciones.
3. Los valores se dan en medio  $\pm$  desviación estándar.

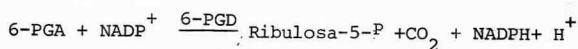
Cap. 18

GLUCOSA-6-FOSFATO DESHIDROGENASA (G-6-PD) Y 6-FOSFOGLUCONICO DESHIDROGENASA (6-PGD)

A. Fundamento. La glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G-6-PD) cataliza la oxidación de la glucosa-6-fosfato a 6-fosfogluconolactona, la cual hidroliza espontáneamente a 6-fosfogluconato (6-PGA):



La deshidrogenasa del 6-fosfogluconico cataliza la oxidación del 6-PGA a ribulosa-5-P y CO<sub>2</sub>:



El análisis más comúnmente usado para medir la actividad de la G-6-PD (sistema 1 abajo) es la de medir el porcentaje de reducción del NADP a NADPH cuando el hemolizado se incuba con glucosa-6-P. Sin embargo, el producto formado es en gran parte oxidado en la reacción de la 6-PGD, de modo que más de una molécula (casi dos) de NADP se reducen por cada molécula de glucosa-6-P oxidado (Ref. 13). Los resultados del sistema 1 pueden corregirse trabajando un sistema adicional en el que haya cantidades saturantes de G-6-P y de 6-PGA (sistema 3) y al cual se le resta la  $\Delta$ DO de un sistema en el que haya una cantidad saturante de 6-PGA pero al que no se le añada G-6-P (sistema 2). Este tipo de corrección fue utilizado por primera vez por Glock y McLean (Ref. 14).

La inclusión de 3 sistemas permite conocer al mismo tiempo:

- 1) la actividad de G-6-P D como se mide habitualmente; 2) la actividad de G-6-P D pero corregida por la 6-PG D presente en el hemolizado; y --
- 3) la actividad de 6-PG D.

B. Procedimiento. Pueden premezclarse buffer,  $MgCl_2$ , NADP y agua.

	Blanco (ul)	1 (ul)	2 (ul)	3 (ul)
Tris-HCl pH 8.0, 1 M	100	100	100	100
$MgCl_2$ 0.1 M	100	100	100	100
NADP 2 mM	100	100	100	100
Hemolizado sin estroma 1:20	20	20	20	20
Agua	680	580	580	430
Preincubar 10 minutos a 37°C				
G-6-P 6 mM	---	100	---	100
6-PGA 6 mM	---	---	100	100

El incremento de la densidad óptica de los sistemas 1, 2 y 3 se mide contra el blanco a 37°C y a 340 nm.

C. Blanco adicional. Ninguno

D. Comentarios. El sistema 1 se asemeja al método recomendado por la Organización Mundial de la Salud para la G-6-PD, pero difiere en la temperatura a la cual se realiza ya que aquí es a 37°C y no a 25°C como se realiza el método de la OMS: el resultado a 37°C no sólo es más alto - por el aumento en la temperatura sino que también hay un pH menor en este sistema que en el utilizado por la OMS. Si se desea llevar a cabo -

el procedimiento recomendado por la OMS, sólo tendrá que bajarse la temperatura de 37°C a 25°C y no se modifican los demás detalles del análisis. El resultado obtenido restando la actividad de la 6-PG D (sistema 2) de la actividad obtenida con ambos substratos (sistema 3), normalmente expresa en forma más exacta la actividad de la G-6-PD. Sin embargo, en el caso de muestras con baja actividad de G-6-P D, como sucede en las deficiencias hereditarias de tal enzima, esto requiere restar una cantidad alta de una ligeramente mayor dándonos un error experimental que puede resultar grande por lo que este método puede ser inadecuado para muestras con baja actividad de G-6-P D.

E. Cálculos, valores normales e interpretación. Si bien cerca de 2 -- moles de NADP se reducen para cada molécula de glucosa-6-P oxidada, los cálculos para el sistema 1 asumen que sólo 1 molécula de NADP se reduce: por tanto se utilizará la ecuación 2 (ver Cap. 6, inciso B) para los cálculos.

En la reacción de la G-6-P D por cada molécula de 6-PGA oxidado: se reduce 1 molécula de NADP por tanto la actividad de esta enzima se calcula con la misma ecuación 2. La actividad en el sistema 3 se obtiene restando  $\Delta$ DO del sistema 2 al  $\Delta$ DO del sistema 3, y se calcula la actividad usando también la ecuación 2.

Los glóbulos rojos de adultos normales contiene  $8.87 \pm 1.59$  UI de G-6-PD/g Hb (sistema 3 menos sistema 2) y  $13.55 \pm 2.45$  UI de G-6-PD/g Hb (sistema 1). Usando el método recomendado por la OMS (sistema 1 a 25°C)

la actividad es de  $6.63 \pm 1.10$  UI de G-6-PD/g Hb. Los glóbulos rojos de adultos normales contiene  $8.60 \pm 1.08$  UI de 6-PGD/g Hb (sistema 2).

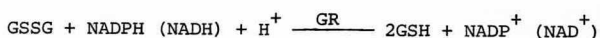
La deficiencia de G-6-P D es la más común de todas las deficiencias eritrocíticas conocidas. La deficiencia se observa en casos de anemia hemolítica inducida por drogas, en favismo, en ictericia neonatal y en algunos casos de anemia hemolítica congénita no esferocítica. La deficiencia severa de 6-PG D es extremadamente rara, y sus efectos clínicos no han sido claramente esclarecidos.



Cap. 19

GLUTATION REDUCTASA (GR).

A. Fundamento. La glutati3n reductasa cataliza la reducci3n del glutati3n oxidado (GSSG) a glutati3n reducido (GSH) usando NADH o bien -- NADPH como donador de hidr3geno:



La actividad de la enzima se mide siguiendo la oxidaci3n del NADPH espectrofotom3tricamente a 340 nm.

B. Procedimiento (Ref. 15).

	Sin FAD		Con FAD	
	Blanco (ul)	Sistema (ul)	Blanco (ul)	Sistema (ul)
Tris-HCl pH 8.0, 1 M	50	50	50	50
EDTA (neut) 0.2 M	10	10	10	10
Hemolizado acuoso 1:20	10	10	10	10
Agua	880	780	780	680
FAD 10 uM	---	---	100	100
Preincubar 10 minutos a 37°C				
GSSG neut 33 mM	---	100	---	100
Preincubar de nuevo 10 minutos a 37°C				
NADPH 2 mM (espec- trofotom3trica- mente estandar- izado*)	50	50	50	50

\* Ver estandarizaci3n en Cap. 32.

El decremento de la densidad óptica del sistema a 340 nm y a 37°C del sistema sin FAD se mide contra el blanco sin FAD, y el sistema con FAD se mide de la misma forma pero contra el blanco con FAD.

El espectrofotómetro deberá ser puesto en blanco a un valor de densidad óptica de 0.15.

C. Blanco adicional. Ninguno

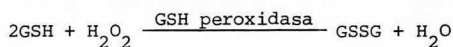
D. Comentarios. La enzima se vuelve más activa cuando aparece el producto de la reacción ya que se observa un incremento en la velocidad -- después de los primeros minutos de haberse iniciado la reacción. La -- glutati6n reductasa es una flavoenzima, y se ha encontrado que su activaci6n por el FAD requiere una preincubaci6n, la cual debe ser hecha antes de a~adir GSSG y NADPH al sistema, ya que 6stos parecen interferir en la activaci6n de la enzima por el FAD.

E. Cálculos, valores normales e interpretaci6n. Por cada mol6cula de GSSG reducido se oxida una mol6cula de NADPH: por tanto se deber6 usar la ecuaci6n 2 (ver Cap. 6, inciso B). Los gl6bulos rojos de adultos -- normales contienen  $5.68 \pm 1.52$  UI de GR/g Hb en el sistema sin FAD, y  $7.44 \pm 1.63$  UI de GR/g Hb con FAD. El grado de aumento de actividad -- inducida por el FAD puede servir como guía si hay o no una nutrici6n adecuada de riboflavina. La baja actividad de GR en los eritrocitos puede ser debida a una deficiencia hereditaria, pero frecuentemente se puede -- corregir in vitro con FAD, e in vivo por la administraci6n de 5 mg de -- riboflavina diariamente durante algunos días (Ref. 15).

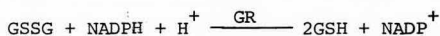
Cap. 20

GLUTATION PEROXIDASA.

A. Fundamento. La glutatión peroxidasa cataliza la oxidación del GSH por el peróxido de hidrógeno:



La formación de GSSG se mide acoplándola a la reacción de la glutatión reductasa:



La oxidación del NADPH se mide a 340 nm.

Se añade azida a la mezcla de reacción para inactivar la catalasa ya que ésta reduce el peróxido de hidrógeno.

El empleo de hemolizado de cianuro-ferricianuro minimiza la interacción entre la hemoglobina y el NADPH, y si bien tal interacción no parece ser cuantitativamente importante en ausencia del azul de metileno (ver capítulo 21), se obtienen resultados más lineales cuando se emplea este tipo de hemolizado.

B. Procedimiento (modificación de Ref. 16). Pueden premezclarse --- buffer, GSH, EDTA, azida y agua.

	Blanco (ul)	Sistema (ul)
Buffer de fosfatos pH 7.0, 1 M	100	100
GSH 0.1 M	---	10
EDTA (neut) 0.2 M	20	20
Glutati6n reductasa 10 U/ml	100	100
Azida de sodio 0.4 M	10	10
NADPH 2 mM	100	100
*Hemolizado cianuro-ferricianuro 1:20	20	20
H <sub>2</sub> O	640	630
	Preincubar 10 minutos a 37° C	
**H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 10 mM	10	10

El espectrofot6metro se pone en blanco a un valor de densidad 6ptica de 0.6.

C. Blanco adicional. SÍ (ver Cap. 6, inciso C). Se hace substituyendo el hemolizado por la soluci6n de cianuro-ferricianuro. Se realiza con el fin de corregir la oxidaci6n no enzimática de GSH y de NADH hecha por el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: esta actividad será de aproximadamente 0.015 a 0.020 unidades de DO por minuto.

D. Comentarios. El buffer tris-HCl pH 8.0 que se usa en los demás análisis enzimáticos, no se puede emplear aquí porque se obtiene un blanco con actividad muy alta.

- \* Se añade un volumen de células a 19 volúmenes de una soluci6n que contenga 100 mg de NaCN y 300 mg de K<sub>3</sub>(Fe(CN)<sub>6</sub>) por litro.
- \*\* Se mide la densidad 6ptica a 230 nm de 0.9 ml de una soluci6n de - buffer de fosfatos 1M, pH 7.0 diluida 1:10 con agua: Ésta será la DO<sub>1</sub>. A la celdilla de lectura se añaden 0.1 ml de una soluci6n de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30% diluida 1:100, y se lee nuevamente la densidad 6ptica (DO<sub>2</sub>). Ya que el coeficiente de extinci6n milimolar del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> es de 0.071 (Ref. 17), la concentraci6n C de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de la soluci6n de per6xido diluido 1:100 es de: C = 141 (DO<sub>2</sub>-DO<sub>1</sub>) mM. Para obtener una soluci6n 10 mM, se coloca 1 ml de la diluci6n 1:100 de per6xido y se lleva con agua al volumen en ml que resulta de dividir C/10.

La reacción depende de la concentración de  $H_2O_2$  al 30 %. -- Sin embargo, el análisis del contenido de  $H_2O_2$  no necesita realizarse -- diariamente sino que después de algunas semanas de hacer mediciones se podrá tener una buena idea de la concentración real del peróxido al 30%.

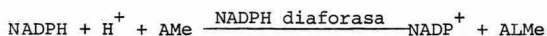
La solución de GSH también debe ser recién preparada. El GSH siempre contiene algo de GSSG, lo cual resulta en algo de oxidación de NADPH: cuando hay demasiado GSSG contaminante en el GSH se verá en el sistema que, al agregar el peróxido, no habrá cambio de absorbancia o habrá un ligero cambio de poca duración. En este caso se debe usar -- un GSH más puro o añadir NADPH adicional al sistema.

E. Cálculos, valores normales e interpretación. La actividad del blanco adicional (ver C arriba) debe de restarse de aquella medida en presencia de hemolizado. Por cada molécula de  $H_2O_2$  reducido se oxida una molécula de NADPH: por tanto deberá usarse la ecuación 2 (ver Cap. 6, inciso B). Los niveles de esta enzima parecen ser algunas veces menores cuando los glóbulos rojos se obtienen en ACD que cuando se colectan en EDTA o heparina. Los glóbulos rojos de adultos normales en ACD contienen  $5.32 \pm 1.79$  ul de GP/g Hb. Se ha reportado en la literatura deficiencia de glutatión peroxidasa en la anemia hemolítica congénita no esferocítica. También se han observado bajos niveles de glutatión peroxidasa en glóbulos rojos de recién nacidos, pudiendo contribuir a la enfermedad -- hemolítica del recién nacido.

Cap. 21

NADPH DIAFORASA

A. Fundamento. Esta enzima cataliza la transferencia de un hidrógeno - del NADH al azul de metileno (AMe), reduciendo éste a azul de leucometileno (ALMe):



La velocidad de la reacción puede estimarse midiendo la oxidación del -- NADPH a 340 nm.

B. Procedimiento (modificación de Ref. 18)

	Blanco (ul)	Sistema (ul)
Tris-HCl pH 8.0, 1 M	100	100
NADPH 2 mM	---	20
Hemolizado acuoso 1:20	50	50
H <sub>2</sub> O	840	820
Preincubar a 37°C por 10 minutos		
Azul de metileno 0.8 mM (0.03 %)	10	10

El decremento de la densidad óptica del sistema se mide contra el - blanco a 340 mM y a 37°C. El espectrofotómetro deberá ser puesto - con el blanco a un valor de densidad óptica de 0.3 unidades.

C. Blanco adicional. Sí. Se debe corregir la oxidación no enzimática del NADPH por el azul de metileno: el  $\Delta$ DO es de aproximadamente --

0.023 unidades de DO/minuto.

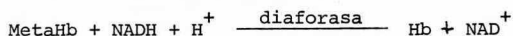
- D. Comentarios. La pequeña cantidad de AME en el sistema es suficiente ya que el ALMe es rápidamente oxidado por el oxígeno atmosférico. Las preparaciones viejas de azul de metileno hacen que la actividad del blanco sea mayor; cuando esto ocurre, se prepara una nueva solución de azul de metileno.
- E. Cálculos, valores normales e interpretación. La actividad del blanco (ver inciso C arriba) se resta de la actividad medida en presencia -- del hemolizado. La ecuación 2 (ver Cap. 6, inciso B) deberá usarse -- para calcular los resultados. Los glóbulos rojos de adultos normales contienen  $1.34 \pm 0.32$  UI de NADPH diaforasa/g Hb. Se ha reportado un solo caso de deficiencia de esta enzima.

La ausencia de esta enzima dará resultados falsos positivos para algunas pruebas de tamizaje de la deficiencia de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, tales como la prueba de reducción de la metahemoglobina o la prueba de reducción de azul de cresil brillante. Sin embargo la deficiencia de la enzima no produce patología clínica.

Cap. 22

NADH METAHEMOGLOBINA REDUCTASA (NADH DIAFORASA)

- A. Fundamento. La NADH diaforasa cataliza normalmente la reducción de la metahemoglobina por el NADH:



Sin embargo, esta reacción es lenta y difícil de seguir espectrofotométricamente. Pero se ha visto que el complejo ferricianuro y metahemoglobina sirve como un excelente sustrato de la enzima, y que esta actividad puede seguirse espectrofotométricamente midiendo la reducción de dicho complejo a 575 nm.

- B. Procedimiento (modificación de Ref. 19). Primeramente se lleva a cabo una determinación de hemoglobina en la muestra de sangre por el procedimiento habitual (ver Cap. 3, inciso C).

Mezcla de reacción. A continuación se mezclan los siguientes reactivos en un tubo de centrífuga:



	ml
EDTA (neut) 0.27 M	0.01
Buffer de citratos 0.05 M, pH 4.7	0.5
Ferricianuro potásico 0.5 mM	1.5
*Substrato de Hb (purificado)	1.0
Agua	1.74

A 4.75 ml de la mezcla de reacción se le añaden 5 ul de sangre problema, y se centrifuga 10 minutos a 9500 G y a 4°C. Con este sobrenadante se monta el sistema de medición en celdillas espectrofotométricas:

	Blanco (ul)	Sistema (ul)
Sobrenadante	950	950
Agua	50	-
	Preincubar 10 min a 37°C	
NADH 2 mM	-	50

Leer el incremento de DO del sistema versus el blanco a 575 nm y -- 37°C.

---

\* El substrato de Hb debe estar libre de diaforasa: para ello se centrifuga una sangre heparinizada o citratada cualquiera, se elimina el plasma y el paquete celular se lava dos veces con 10 volúmenes de salina. A cada 10 ml de paquete lavado se le añaden 60 ml de agua y -- 1.6 g de DEAE-celulosa seca (v.gr. Whatman DE-11). Se deja reposar -- 10 minutos mezclando ocasionalmente y se filtra. Se repite dos veces añadiendo al filtrado nuevas porciones de 1.6 g de DEAE-celulosa. Se mide la Hb del sobrenadante claro usando solución de Drabkin, y al remanente se ajusta a una concentración de Hb de 1.224 g/dl.

Con este substrato se hace un análisis preliminar: se prepara una mezcla de reacción (ver arriba) y se mide actividad usando 950 ul de mezcla y 50 ul de NADH 2 mM. En estas condiciones, el sistema debe mostrar una actividad baja de diaforasa ( $\Delta DO$  menor de 0.003/min), pero -- si la actividad es mayor, deberá repetirse el tratamiento del substrato de Hb con DEAE-celulosa tantas veces como sean necesarias para alcanzar una actividad baja. El substrato de Hb así purificado es estable por 2 semanas si se mantiene refrigerado.

- C. Blanco adicional. Sí. Es necesario determinar el grado de contaminación del substrato de Hb en cada día de trabajo. Para ello se corre el substrato de Hb tal como se describe en el pie de la página anterior: deberá haber una actividad baja, o bien corregir por la lectura de este blanco adicional.
- D. Comentarios. Si bien este método es posiblemente el más engorroso de los descritos en este documento, es uno de los mejores para medir NADH diaforasa. La relación ferricianuro/substrato de Hb es relativamente crítica ya que si hay demasiado ferricianuro, el inicio de la reacción se retrasa, y una vez iniciada, la reacción es lenta.
- E. Cálculos, valores normales e interpretación. Es necesario restar la actividad del blanco adicional en caso de haberla (ver C arriba). La actividad se calcula en base al hecho de que la diferencia de densidad óptica de la ferro-Hb y la ferri-Hb es de 42 unidades de DO cuando se comparan soluciones 1 mM. La actividad (A) en mM de Hb reducida en el sistema de 1 ml es:

$$A = \frac{(\Delta DO_r - \Delta DO_b)}{420}$$

en donde las  $\Delta DO$  son el cambio de densidad del problema (r) y del blanco (b) que ocurre en 10 minutos (leídas a 575 nm).

La actividad (E) en UI/g Hb es:

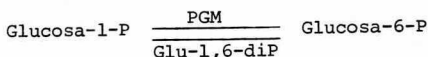
$$E = \frac{A \times 100,000}{Hb}$$

en donde Hb es la concentración en g/dl de la sangre problema, y 100,000 es un factor que considera la transformación de Hb en g/dl a Hb en g/ml y las diluciones que sufre la muestra en el procesamiento.

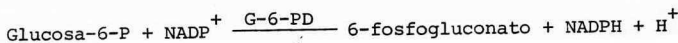
Los eritrocitos del adulto normal contiene  $3.40 \pm 0.50$  UI de NADH diaforasa/g Hb.

FOSFOGLUCOMUTASA (PGM)

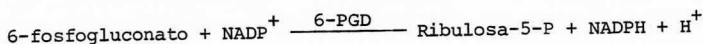
A. Fundamento. La fosfoglucomutasa cataliza la interconversión de la - glucosa-1-P a glucosa-6-P:



La glucosa-1-P sirve como sustrato, y la formación de la glucosa-6-P se mide por la asociación de esta reacción con la oxidación del NADP a través de la reacción de la glucosa-6-P deshidrogenasa:



El 6-fosfogluconato formado es entonces oxidado por la deshidrogenasa fosfogluconica, presente en exceso en casi todos los hemolizados, reduciendo más el NADP a NADPH:



B. Procedimiento. Pueden premezclarse buffer,  $\text{MgCl}_2$ , NADP, G-1,6-diP y agua.

	Blanco (ul)	Sistema (ul)
Tris-HCl pH 8.0, 1M	100	100
MgCl <sub>2</sub> 0.1M	50	50
NADP 2 mM	100	100
Hemolizado sin estroma 1:20	50	50
G-6PD 10 U/ml diluída en Sol. G	20	20
G-1,6-DiP 0.7 mM	200	200
Agua	480	430
	Preincubar 10 minutos a 37° C	
Glucosa-1-P 0.05 M	--	50

El incremento de la densidad óptica del sistema se mide contra el blanco a 37°C y a 340 nm.

C. Blanco adicional. Sí (ver cap. 6, inciso C).

D. Comentarios. La glucosa-1,6-diP es un cofactor esencial para la -- reacción, pero es muy cara y difícil de obtener comercialmente. Si no se puede obtener este cofactor, puede usarse un extracto fresco hervido de glóbulos rojos como sustituto medianamente satisfactorio ya que contiene algo de glucosa-1,6-diP.

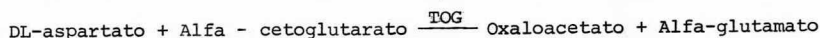
E. Cálculos, valores normales e interpretación. Dos moles de NADP se -- reducen por cada molécula de glucosa-1-P convertida a glucosa-6-P: -- por tanto deberá usarse la ecuación 3 (ver Cap. 6, inciso B). La -- actividad del sistema se corrige por la actividad del sistema blanco

adicional (en caso de existir actividad en éste). Los glóbulos rojos de adultos normales contienen  $3.08 \pm 0.60$  UI de PGM/g Hb. La PGM juega un papel importante en el metabolismo del glucógeno de tejidos, en la interconversión de la galactosa a glucosa. El papel de esta enzima en el metabolismo eritrocítico no está claramente establecido. Se ha reportado un caso parcial de deficiencia de PGM.

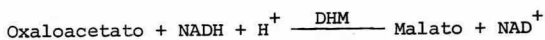
Cap. 24

TRANSAMINASA OXALOACETICA-GLUTAMICA (TOG)

A. Fundamento. La enzima cataliza la reacción:



El oxaloacetato formado reduce al NADH a través de la deshidrogenasa málica (DHM):



Al igual que otras transaminasas, el fosfato de piridoxal sirve como un cofactor para la actividad enzimática de TOG: el incremento de la actividad enzimática después de la adición de este compuesto sirve como índice del grado de saturación de la apoenzima con el cofactor.

B. Procedimiento. Pueden premezclarse buffer, NADH, aspartato y agua.

	<u>Sin fosfato de piridoxal</u>		<u>Con fosfato de piridoxal</u>	
	Blanco (ul)	Sistema (ul)	Blanco (ul)	Sistema (ul)
Tris-HCl pH 8.0, 1M	200	200	200	200
NADH 2mM	100	100	100	100
L-aspartato pH 8.0, 0.1 M	100	100	100	100
*Deshidrogenasa málica 1 U/ml	10	10	10	10
Piridoxal-5 <sup>t</sup> -fosfato 0.4 mM	--	--	50	50
H <sub>2</sub> O	570	470	520	420
Hemolizado sin estroma 1:20	20	20	20	20
Preincubar a 37°C por 10 minutos				
Alfa-cetoglutárico monosódico 0.1 M	--	100	--	100

El decremento de la densidad óptica de cada sistema se mide a 37° C contra el blanco de cada sistema a 340 nm.

El espectrofotómetro deberá ser puesto en blanco a un valor de DO de 0.3.

C. Blanco adicional: Sí (ver Cap. 6, inciso C). Pero si resulta libre de actividad de TGO, no será necesario hacer el blanco adicional siempre y cuando se use la misma preparación de DHM. /+G

---

\* La solución madre de deshidrogenasa málica se prepara a una concentración de 10 U/ml en sulfato de amonio 2.5 M, y después se diluye en buffer tris-HCl, pH 8.0, 0.1 M.



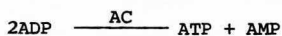
D. Comentarios. La velocidad máxima con frecuencia se alcanza hasta los 10-15 minutos de haberse iniciado la reacción.

E. Cálculos, valores normales e interpretación. Una molécula de NADH se oxida por cada molécula de glutamato transaminado: por tanto se deberá usar la ecuación 2 (ver Cap. 6, inciso B). Deberá corregirse en caso de que haya actividad de blanco adicional (ver C. arriba). Los glóbulos rojos de adultos normales contienen  $3.08 \pm 0.58$  UI de TGO/g Hb y  $4.91 \pm 0.64$  UI de TGO/g Hb cuando se estimula con fosfato de piridoxal. La enzima se usa comúnmente como indicador de la edad de glóbulos rojos, ya que su actividad es considerablemente mayor en células jóvenes que en viejas. El grado de activación de TGO por el fosfato de piridoxal puede dar alguna indicación sobre el estado de nutrición de piridoxina.

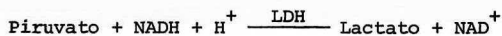
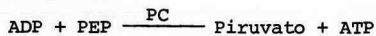
Cap. 25

ADENILATO CINASA (AC)

A. Fundamento. La adenilato cinasa cataliza la siguiente reacción:



En este análisis se mide la reacción reversa, y se sigue la formación de ADP acoplando las reacciones de piruvato cinasa (PC) y de lactato deshidrogenasa (LDH).



La oxidación del NADH se mide a 340 nm.

B. Procedimiento. Pueden premezclarse buffer, ATP, NADH, PEP, KCl, --  
MgCl<sub>2</sub> y agua.

	Blanco (ul)	Sistema 1 (ul)	Sistema 2 (ul)
Tris-HCl pH 8.0, 1M	100	100	100
ATP (neut) 0.02 M	50	50	10
NADH 2 mM	100	100	100
PEP 0.015 M	50	50	50
KCl 1 M	20	20	20
LDH 60 u/ml	50	50	50
MgCl <sub>2</sub> 0.1 M	50	50	50
PC(Sigma tipo II) 50 U/ml	20	20	20
Hemolizado sin estroma 1:200	5	5	5
H <sub>2</sub> O	555	505	585

Preincubar 10 minutos a 37° C

AMP (neut) 0.02 M	---	50	10
-------------------	-----	----	----

El decremento de la densidad óptica de los sistemas 1 y 2 - se miden a 37° C contra el blanco a 340 nm por 10 a 20 minutos. El espectrofotómetro deberá ser puesto con el blanco a un valor de DO de 0.3.

C. Blanco adicional. Sí (ver Cap. 6, inciso C).

D. Comentarios. Ninguno.

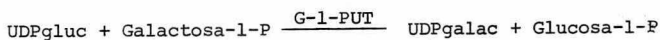
E. Cálculos, valores normales e interpretación. Dos moles de NADH se oxidan por cada molécula de ATP que reacciona con el AMP: por tanto deberá usarse la ecuación 3 (ver Cap. 6, inciso B). Deberá restarse la -

actividad del blanco adicional en caso de haberla (ver C arriba). Los glóbulos rojos de adultos normales contiene  $199.53 \pm 27.4$  UI de AC/g Hb. La actividad del sistema 2 normalmente es  $49 \pm 2.9$  % del sistema 1. Se ha reportado deficiencia de AC en casos de anemia hemolítica congénita - no esferocítica moderada.

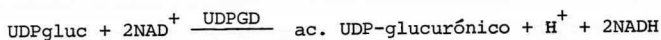
Cap. 26

GALACTOSA-1-FOSFATO URIDIL TRANSFERASA (G-1-PUT). METODO DE CONSUMO.

A. Fundamento. La galactosa-1-fosfato uridil transferasa cataliza el intercambio en la reacción:



La desaparición del UDPgluc de la mezcla que contiene UDPgluc, galactosa-1-P y hemolizado, se estima midiendo la UDPgluc residual acoplado la reacción de NAD en la reacción catalizada por la deshidrogenasa de la UDPgluc:



La reacción no es lineal ya que la enzima no está completamente saturada con el UDPgluc a la concentración a la que se realiza el análisis, y por el efecto inhibitorio del producto de reacción, la UDPgalactosa. Se puede hacer una corrección empírica para la falta de linealidad (ver inciso E abajo).

La epimerasa presente en el hemolizado cataliza una ruta alterna por la cual la UDPgluc puede consumirse por su conversión a UDPgalac. Sin embargo, la epimerasa requiere para ello de cantidades pequeñísimas de NAD, y como la preincubación del hemolizado destruye el NAD endógeno por presencia de NADasa, se inactiva así a la epimerasa y no opera esta ruta alterna. Pero, en el caso de niños recién nacidos, casi no hay NAD-

asa, y por tanto se requiere una preincubación con NADasa exógena para inactivar a la epimerasa del hemolizado.

B. Procedimiento (Ref. 21). Se mezclan glóbulos rojos lavados con un volumen igual de agua destilada fría; se congelan y descongelan, y se incuban a 37°C por 10 minutos. Si la sangre es de un niño menor de -- tres meses de edad, se añaden 0.025 partes de una solución de NADasa - (0.63 U/ml) por cada parte de hemolizado antes de la incubación a 37°C. Los reactivos se mezclan en los volúmenes indicados abajo. La galactosa-1-P y la UDPgluc-glicina se pueden premezclar.

	Blanco (ul)	Sistema (ul)
UDPgluc-glicina*	200	200
Galactosa-1-P 8 mM	---	100
H <sub>2</sub> O	100	---
	Preincubar 3 - 5 minutos a 37° C	
Hemolizado (1:1)	200	200
	Preincubar exactamente por 15 minutos a 37°C	
NaCl 0.154 M a temperatura de hielo	1000	1000

Colocar el blanco y el sistema en un baño de agua hirviendo por 2 minutos, agitando intermitentemente. Centrifugar y tomar el sobrenadante. La UDPgluc residual en el sobrenadante tanto del blanco como del sistema se determina de la siguiente forma:

---

\* UDP-gluc-glicina: Preparar diariamente mezclando una parte de --- UDPgluc 7 mM con cuatro partes de buffer de glicina-HCl pH 8.7, 1 M.

	Blanco y Sistema (ul)
Glicina-HCl pH 8.7, 1 M	200
NAD 2 mM	500
Sobrenadante	200
UDPgluc deshidrogenasa (800 Sigma U/ml = 0.032 UI/ml)	100

La reacción se inicia al agregar la UDPgluc deshidrogenasa.

La reacción se sigue a 340 nm leyendo sistema contra blanco hasta que no haya cambio en la densidad óptica.

C. Blanco adicional. Ninguno

D. Comentarios. El extracto hervido para medir UDPgluc se puede almacenar durante la noche a  $-20^{\circ}$  C ya que sólo hay una pérdida pequeña de UDPgluc. La solución de UDPgluc deshidrogenasa congelada se mantiene -- activa por varias semanas, pero la NADasa es relativamente inestable y debe ser recién preparada. Han sido descritos numerosas variaciones del -- método de consumo de UDPgluc pero hay resultados (Ref. 22), que indican -- que el método descrito arriba da los datos más reproducibles. Si se uti-- lizan concentraciones suficientemente altas de UDPgluc para obtener resul-- tados lineales se introducen errores. Algunos autores han preconizado la adición de reactivos con sulfhidrilos al sistema de medición (Ref 23) pe-- ro esta medida no afecta la actividad de glóbulos rojos sino solamente la de glóbulos blancos: por ello no es adecuada para contrarrestar la falta

de linealidad de sistemas con baja concentración de sustrato.

E. Cálculos, valores normales e interpretación. La concentración de UDPgluc en el filtrado se calcula extrapolando la primera porción de la curva al tiempo cero. El DO así obtenido se resta del obtenido al completarse la reacción (cuando toda la UDPgluc se oxidó). Se alcanza un valor constante de DO a los 30 a 45 minutos de iniciada la reacción tan en el blanco como en el sistema, pero a veces pueden aumentar o disminuir la DO después de este lapso: en ese caso siempre se deberá tomar el máximo valor estable visto.

La actividad (E) de la transferasa en uM de UDPgluc consumidos/g Hb/hora se obtiene con la ecuación:

$$E = \frac{(\Delta DO_b - \Delta DO_r) \times 1210}{Hb}$$

en donde  $\Delta DO_b$  es el cambio visto en el sistema blanco y  $\Delta DO_r$  es el cambio visto en el sistema (es mayor en el blanco pues se mide UDPgluc residual). El factor 1210 considera las diluciones empleadas y el hecho de que 2 molas de NAD se reducen por cada molécula de UDPgluc oxidado, y Hb es la concentración de hemoglobina (g/dl) en el hemolizado. Si  $(\Delta DO_b - \Delta DO_r)$  es mayor de 0.2, deberá usarse un factor de corrección empíricamente obtenido ( $F_c$ ) para mantener la linealidad, de modo que E se multiplica por  $F_c$ : los valores de  $F_c$  se dan en la tabla VI para distintos valores de  $(\Delta DO_b - \Delta DO_r)$ .

Para convertir las unidades de uM/g Hb/hora a UI/g Hb, sólo es



necesario dividir entre 60, pero lo tradicional es la de dar resultados en  $\mu\text{M/g Hb/hora}$ . La actividad de la G-1-PUT es de interés en la detección de galactosemia. Es difícil presentar valores normales de la enzima, ya que existen variantes genéticas con diferente actividad. La oscilación normal para la enzima parece ser aproximadamente de 18.5 a 28.5  $\mu\text{M/g Hb/hora}$ . Los heterocigotos que poseen la variante genética Duarte tienen una actividad entre 13.5 y 18.5  $\mu\text{M/g Hb/hora}$ , en tanto que los heterocigotos para el gen de la galactosemia y los homocigotos de la variante Duarte tienen una actividad entre 8.5 y 13.5. Los individuos doble heterocigotos para los genes Duarte y galactosemia tienen una actividad entre 3.5 y 8.5, y en los homocigotos a galactosemia prácticamente no hay actividad de galactosa-1-fosfato uridil transferasa.

V. Factores de corrección para el análisis de la UDPG

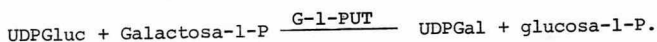
---

$- DO_R$	$F_C$	$DO_B - DO_R -$	$F_C$
.200	1.000	0.265	1.132
.200	1.010	0.270	1.144
.205	1.020	0.275	1.160
.210	1.029	0.280 /	1.175
.215	1.037	0.285	1.189
.220	1.045	0.290	1.203
.225	1.053	0.295	1.220
.230	1.061	0.300	1.243
.235	1.072	0.305	1.269
.240	1.083	0.310	1.294
.245	1.094	0.315	1.317
.250	1.100	0.320	1.353
.255	1.110	0.325	1.412
.260	1.119	0.330	1.479

---

GALACTOSA-1-FOSFATO URIDIL TRANSFERASA (G-1-PUT). METODO FLUOROMETRICO.

A. Fundamento. En esta técnica la transferasa se mide a base de medir la formación de la glucosa-1-P en la reacción:



La fosfoglucomutasa y la glucosa-1,6-diP endógenas del hemolizado dan por resultado la conversión de glucosa-1-P y el NADP en la mezcla de reacción se reduce a NADPH en el curso de las reacciones de la glucosa-6-P deshidrogenasa y la 6-fosfogluconato deshidrogenasa, que son enzimas presentes en exceso en la mayoría de los hemolizados. En el caso de una deficiencia severa de glucosa-6-P deshidrogenasa (v.gr. tipo Mediterráneo, mas no en la deficiencia africana tipo A) puede ser necesario añadir glucosa-6-P deshidrogenasa exógena.

Después de que la mezcla de reacción ha sido incubada con la sangre, la reacción es detenida mediante una dilución, y el NADPH formado se mide fluorométricamente. Se usa la misma muestra diluida para calcular la concentración de hemoglobina utilizando la banda de absorción de Soret (410 nm).

B. Procedimiento (Ref. 24). La mezcla de reacción se prepara utilizando los siguientes volúmenes o múltiples de ellos. Esta mezcla se puede almacenar congelada por cerca de un mes.

	Volumen (ml)
UDPglu: 10 mM	0.6
Galactosa-1-P 27 mM	0.6
NADP 6 mM	0.8
Tris-acetato pH 8.0, 0.75 M	2.0
Saponina (Sigma) 1 %	0.8
EDTA disódico 27 mM	0.09
MgCl <sub>2</sub> hexahidratado 0.1 M	0.13
Agua	1.0
Glucosa-6-P deshidrogenasa 30 U/ml (en caso necesario)	0.05

La adición de glucosa-6-P deshidrogenasa es opcional: usualmente no se requiere, pero puede ser utilizada si existe deficiencia severa de G-6-PD en la muestra por analizar. Se añaden 10 ul de sangre completa a 10 ul de la mezcla de reacción. Después de 30 minutos de incubación a 37° C se diluyen 20 ul de la mezcla en 4 ml de buffer de fosfatos 0.01 M, pH 7.4. Las mediciones fluorométricas se hacen en una celdilla de 10 mm de diámetro interno contra un blanco preparado con 20 ul de la mezcla de reacción sin sangre + 4 ml de buffer de fosfatos. Se usa un filtro Corning primario 7-60 y un filtro secundario 3-72. Posteriormente, la muestra de sangre diluida en la mezcla de reacción se transfiere a una celdilla adecuada para un colorímetro fotoeléctrico, y se mide la densidad óptica a 410 nm contra el blanco, para estimar el contenido de hemoglobina.

C. Blanco adicional. Ninguno

D. Comentarios. La cantidad de fluorescencia producida depende de un número de variables, incluyendo las características electrónicas del instrumento detector y de la intensidad de la fuente de luz. Esta en particular está sujeta a cambios con el tiempo y por lo tanto, la calibración del aparato debe ser realizada periódicamente.

E. Cálculos, valores normales e interpretación. La actividad (E) de la galactosa-1-P uridil transferasa en  $\mu\text{M}$  de UDPglu consumidos/g Hb/hora se obtiene de la siguiente manera:

$$E = \frac{FC}{A}$$

En donde F es la fluorescencia de la muestra, C es el factor combinado de calibración del fluorómetro y del espectrofotómetro (ver abajo) y A la absorbancia a 410 nm del sistema diluido.

El factor de calibración (C) debe ser determinado para el fluorómetro y el colorímetro usados en el procedimiento. Para calibrar el fluorómetro, se prepara una solución de NADPH conteniendo aproximadamente 1 mg/ml, y su concentración real se mide como se describe en el Cap. 4, inciso B. Se preparan una serie de diluciones conteniendo de 0.25 a 1.25  $\mu\text{M}$  de NADPH en buffer de fosfatos 0.01 M, pH 7.4, y las lecturas de fluorescencia se hacen contra un blanco del buffer. Las lecturas son graficadas contra la concentración de NADPH. La lectura de fluorescencia dada por 1  $\mu\text{M}$  de NADPH se lee en la curva y se designa  $F_1$ .

La calibración del colorímetro se realiza con una muestra de sangre hemolizada por congelación y descongelación: se determina en una alícuota la concentración de hemoglobina con el reactivo de cianuro-ferricianuro (ver Cap. 3, inciso C). Después se toma 0.1 ml del remanente de la sangre hemolizada y se añade a 1.0 ml de una solución de saponina al 0.133 %. Con esta sangre-saponina se preparan diluciones 1:100, 1:200 y 1:400 en buffer de fosfatos 0.01 M, y la densidad óptica de cada dilución se determina a 410 nm contra un blanco del buffer. La concentración de hemoglobina en g/l se grafica contra la DO de cada dilución. Se puede observar una desviación leve de la ley de Beer en algunos colorímetros, pero ésta no es lo suficientemente grande como para introducir un error serio. La densidad óptica obtenida a una concentración de hemoglobina de 0.1 g/l se lee de la curva y se designa como  $A_1$ .

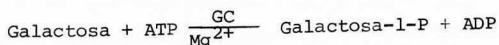
El factor de calibración C puede entonces ser calculado:

$$C = \frac{10 \times A_1}{F_1}$$

Los resultados obtenidos en este procedimiento analítico son ligeramente mayores a los obtenidos con el método de consumo de UDPG, ya que en el método de consumo descrito en la primera parte de este capítulo, la concentración de sustrato es menor y la enzima no está completamente saturada por el sustrato. Además, en el presente análisis, la inhibición competitiva ejercida por el producto de reacción (UDPg<sub>al</sub>) no es de importancia.

GALACTOCINASA (GC)

A. Fundamento. La galactocinasa cataliza la reacción:



En este análisis la l-<sup>14</sup>C-galactosa sirve de substrato al ser inoculado con ATP y el hemolizado. La reacción se detiene diluyendo con un exceso de galactosa no radiactiva. La galactosa-1-P radiactiva formada se separa de la galactosa radioactiva no fosforilada colocando la solución incubada en el papel DEAE, el cual fija solamente a la galactosa fosforilada, por lo cual al lavar el papel con agua se remueve del papel la galactosa no fosforilada.

B. Procedimiento. (Refs. 25 y 26). Es necesario purificar la l-<sup>14</sup>C-galactosa comercial para eliminar trazas de azúcar que podrían ser fosforiladas por la hexocinasa del hemolizado y para eliminar contaminantes radioactivos, los cuales podría adherirse al papel DEAE dando valores altos en el sistema blanco. Para ello se prepara una pequeña columna, colocando una pequeña cantidad de lana de vidrio en el fondo de una jeringa de tuberculina, y se prepara una columna de microgránulos de DEAE --- (Whatman DE-52), hasta lograr un volumen de 0.2 - 0.3 ml. La columna se lava con unas cuantas gotas de una solución de galactosa 3.8 mM seguida por 5 ml de agua. La galactosa radiactiva se diluye hasta contener aprox

ximadamente 10 uCi/ml. A cada mililitro de galactosa radioactiva se --  
añaden dos ul de buffer tris-HCl 1M, pH 8.0, 5 ul de  $MgCl_2$  0.1 M, ---  
100 ul de hexocinasa conteniendo 2 U/ml de agua y 10 ul de ATP 60 mM neu-  
tralizado. Después de 60 minutos de incubación a 37° C, la mezcla se -  
pasa a través de la columna, la cual es entonces lavada con suficiente  
agua destilada para dar 5 veces el volumen original (unos 5.5 ml). La  
solución de galactosa radioactiva recolectada contiene aproximadamente  
2 uCi/ml y es estable si se almacena congelada.

Una mezcla de reacción parcial se prepara mezclando los si-  
guientes reactivos:

	ul
NaF 100 mM	100
$MgCl_2$ 100 mM	100
Tris-HCl 1M, pH 7.4	400
Galactosa no radioactiva 7.6 mM	100
Galactosa- <sup>14</sup> C 2 uCi/ml	200
ATP 0.12 M	100

Se añaden 4 volúmenes de solución a un volumen de paquete -  
celular lavado, y se realiza una cuantificación de hemoglobina en 50 ul  
de esta mezcla. Cien ul del remanente se mezclan con 100 ul de la mez-  
cla de reacción parcial, e inmediatamente se extraen 2 alícuotas de --  
50 ul de la mezcla que se adicionan a tubos que contienen 20 ul de so-  
lución de galactosa 1M no radioactiva. Cincuenta ul de cada una de es-  
tas 2 mezclas se colocan inmediatamente en papel DEAE (Whatman DE 81) -



en círculos de 15-20 mm de diámetro. Uno de estos 2 papeles se coloca inmediatamente en un recipiente conteniendo agua destilada (muestra -- tiempo cero) mientras que el otro papel se deja secar al aire (estándar de 100 %). El remanente de la mezcla de reacción se incuba 60 minutos a 37° C, y al cabo de este tiempo, se toma una alícuota de 100 ul que se trata en forma idéntica a la muestra de tiempo cero (esta será la -- muestra de 60 minutos). Las muestras de tiempo cero y la de 60 minutos se colocan cuando están aún húmedas, en embudos de vidrio poroso y se lavan con 600-800 ml de agua destilada, la cual es eliminada a través del embudo con vacío. Estas dos muestras se dejan secar por completo al aire y están listas para el conteo.

Los tres papeles secos (estándar de 100 % y tiempos 0 y 60 minutos) se colocan en planchetas para ser contadas en un contador de flujo de gas, o de una manera más eficaz, colocarse en una solución de centelleo, como el tolueno adicionando 0.3 g de POPOP y 5 g de PPO por litro, y se determina la radioactividad de las muestras.

C. Blanco adicional. No se necesita blanco adicional. La muestra de -- tiempo cero sin ATP se usa como blanco, ya que el ATP del hemolizado puede fosforilar algo de galactosa.

D. Comentarios. Es importante que no se utilice solución de galactosa recién preparada. Cuando la alfa- o la beta-D-galactosa se disuelven en agua, se llevan a cabo varias reacciones: la alfa- y beta-galactosa -- se interconvierten hasta formar una mezcla en equilibrio que contie---

ne aproximadamente 30 % de alfa -galactosa y 70 % de beta -galactosa, y además de estas formas piranosas, se generan formas furanosas. Finalmente se forma un ceto-azúcar, presumiblemente la tagatosa, aún cuando su formación es relativamente lenta. Las soluciones de galactosa preparadas recientemente pueden ser incubadas a 37° C cuatro horas antes de su uso, para facilitar el equilibrio entre las formas reaccionantes y las no reaccionantes de la galactosa, o bien pueden incubarse 3 ó 4 días a 4° C antes de usarla.

Las impurezas contenidas en las soluciones comerciales de galactosa radiactiva representan una fuente de error en este análisis pero el procedimiento de purificación dado arriba es satisfactorio. Cuando se compra una nueva preparación de galactosa radiactiva, es útil medir el contenido de galactosa después de haber hecho la purificación ya que hay preparaciones que no contienen o contienen muy poca galactosa. Esto puede ser hecho preparando una mezcla de reacción parcial, como el usado para el análisis de galactocinasa, pero eliminando la galactosa no radiactiva. Si 100 ul de esta mezcla de reacción se incuban por varias horas con 100 ul de hemolizado 1:2 (preferiblemente de sangre de cordón umbilical) del 70 al 85 % de la galactosa deberá fosforilarse. El que no haya una fosforilación completa probablemente se debe a que parte de la galactosa radiactiva está en formas que no reaccionan en el sistema, y que por otra parte tampoco se interconvierten en solución a formas reaccionantes.

E. Cálculos, valores normales e interpretación. La actividad (E) de galactocinasa en micromoles de galactosa fosforilada/g Hb/min se obtiene de la siguiente forma:

$$E = \frac{(A_t - A_o) \times C \times 100}{(A_{100\%} - bg) \times Hb \times T \times 0.5}$$

En donde  $A_t$  es la radioactividad de la muestra después de t minutos de incubación,  $A_o$  es la radioactividad de la muestra al tiempo cero,  $A_{100\%}$  es la radioactividad de estándar de 100%, bg es la radioactividad ambiental, C es la concentración de galactosa en el sistema de análisis final (en uM/ml), Hb es la concentración de Hb en g/dl, y T es el tiempo de incubación en minutos (en el análisis = 60 minutos). Para calcular C tenemos la siguiente fórmula:

$$C = C_1 + \frac{R}{S}$$

En donde  $C_1$  es la concentración final de galactosa no radioactiva en uM/ml (0.38 en el sistema aquí descrito), S es la actividad específica de la galactosa radioactiva en uCi/uM, y R es la radioactividad del sistema de análisis en uCi/ml (0.2 en el sistema descrito). Usualmente es más conveniente dar la actividad enzimática en términos de 1000 E, o sea miliunidades de actividad por gramos de Hb (1 mU/g Hb = 1000 uM/g Hb/min)

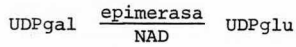
Los glóbulos rojos de adultos normales contienen  $29.7 \pm 4.9$  miliunidades / 9 de galactocinasa/g Hb. Los glóbulos rojos de los niños tienen una actividad tres a cuatro veces mayor que los adultos.

La deficiencia de galactocinasa en homocigotos causan una forma de galactosemia la cual se asocia con la aparición de cataratas - oculares, mas no con deficiencia mental o con enfermedades del hígado - Los heterocigotos tienen aproximadamente la mitad de la actividad enzimática normal, pero también pueden tener incrementada la susceptibilidad a cataratas, incluso cuando apenas son jóvenes adultos.

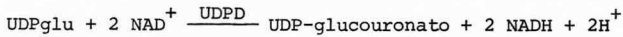
Cap. 28

UDP-GLUCOSA-4-EPIMERASA (EPIMERASA).

A. Fundamento. La UDP-glucosa-4-epimerasa cataliza la conversión de - UDP-galactosa a UDP-glucosa en la reacción:



La formación se puede seguir espectrofotométricamente acoplando esta reacción con la de la UDP deshidrogenasa:



La reducción del NAD se mide a 340 nm.

B. Procedimiento. Pueden premezclarse buffer, NAD y agua.

	Blanco (ul)	Sistema (ul)
Tris-HCl pH 8.0, 1M	100	100
NAD 10 mM	100	100
*UDPglu deshidrogenasa (800 U/ml Sigma = 0.032 UI/ml)	500	500
H <sub>2</sub> O	250	200
Hemolizado acuoso 1:20	50	50
	Preincubar 10 minutos a 37°C	
UDPgal 5 mM	—	50

\* Disolver y centrifugar por 10 minutos, y usar el sobrenadante claro.

El incremento de densidad óptica del sistema se mide a 37° C contra el blanco a 340 nm.

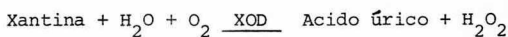
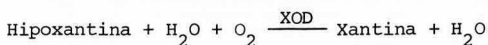
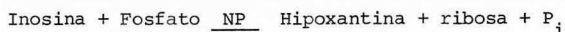
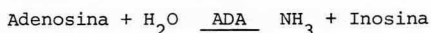
C. Blanco adicional. Sí. (Ver Cap. 6, inciso C.).

D. Comentarios. De todas las enzimas analizadas espectrofotométricamente ésta es la que presenta menor actividad: por tanto se requiere de -- instrumentación muy sensible y de una buena habilidad del operador.

E. Cálculos, valores normales e interpretación. Dos moles de NAD se reducen por cada molécula de UDPGal convertida a UDPGlu. Por tanto deberá -- usarse la ecuación 3 (ver Cap. 6, inciso B) corrigiendo previamente por -- actividad del blanco adicional en caso de haberla (ver C arriba). Los -- glóbulos rojos de adultos normales contiene  $0.137 \pm 0.026$  U<sub>I</sub> epimerasa/g - Hb. No se han reportado deficiencias de epimerasa.

ADENOSIN DEAMINASA (ADA)

A. Fundamento.



La inosina que se origina de la adenosina, se convierte a hipoxantina por la nucleósido fosforilasa (NAP) en presencia de fosfato inorgánico. La hipoxantina se convierte a xantina y a ácido úrico por acción de la xantina oxidasa (XO), así resulta un incremento de la absorbancia a 293 nm al formarse el ácido úrico.

B. Procedimiento Ref. (39)

	Sistema ml	Blanco ml
Solución substrato	1.0	1.0
Solución de XOD 4 U/ml	0.05	---
Hemolizado acuoso 1:4	0.025	0.025
H <sub>2</sub> O	----	0.05
Agitar vigorosamente y preincubar durante 4 min.		

Leer el incremento de DO a 293 nm.

C. Blanco adicional. Ninguno

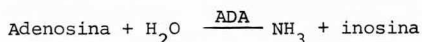
---

Solución substrato: A 26 ml de buffer de fosfato de sodio 0.1 M añadir 0.25 ml de solución acuosa de saponina (20 mg/ml) y 7.5 mg de adenosina QP.

Solución de XOD (mezclar 1 volumen de XOD en 9 volúmenes de agua).

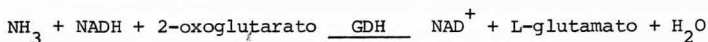
D. Comentarios. Existen otros métodos para medir la actividad de la adenosín deaminasa, pero se ha escogido éste por tener sus ventajas con respecto a ellos:

Método directo con el siguiente fundamento



En este método la conversión de adenosina a inosina se mide a 265 nm, pero no da resultados confiables ya que la solución de adenosina 0.1 mM tiene una absorbancia de 1.350 la cual hace difícil trabajar con una cantidad mayor de adenosina que logra saturar a la enzima: en las condiciones habituales del método directo y solo mide el 50 % de la actividad de ADA (Ref. 39 y 40).

Método de la glutamato deshidrogenasa (GDH):



Este método mide la deaminación de la adenosina por acoplamiento de esta reacción a la aminación reductiva asociada con el NADH y el 2-oxoglutarato. El método es teóricamente el mejor ya que las concentraciones de adenosina pueden ser mayores de 20 mM y sus desventajas son las siguientes: 1) el  $\text{NH}_3$  en el sistema presente en la muestra tiene que eliminarse completamente antes de añadir la adenosina (la muestra y la mezcla de reacción deben preincubarse durante 10 min antes de añadir la adenosina). Se requieren 5 o más minutos después de la adición de la adenosina para que la reacción alcance un decremento lineal a 340 nm. -- (Ref. 54 y 55); 3) La absorbancia es muy alta si se usan eritrocitos --



lisados y por otro lado el volumen de la muestra no puede reducirse porque la caída de absorbancia por minuto sería muy pequeña.

El método descrito aquí tiene la desventaja de que la nucleósido fosforilasa se inhibe a concentraciones mayores de 1 mM/l de adenosina (Ref. 39 y 41). Sin embargo con 1 mM/l de adenosina la ADA eritrocítica alcanza el 90 % de su velocidad máxima.

E. Cálculos, valores normales e interpretación.

Para calcular la actividad de la enzima en unidades/l se utiliza la siguiente fórmula:

$$U/l = DO \times 3413$$

y para miliunidades por gramo de Hb:

$$mU/g \text{ Hb} = \frac{U/l \times 100}{Hb}$$

La actividad de ADA eritrocítica oscila entre 500 y 1040 mU/g Hb a 25° C, y a 37° entre 1050 y 1900 mU/g Hb.

PARTE V

COMPUESTOS METABOLICOS INTERMEDIARIOS

GENERALIDADES

1. Los cálculos para medir productos metabólicos en esta parte V - son peculiares a cada medición, y debe notarse que son aplicables sólo si se reproducen las condiciones de medición. Si no, habrá que considerar correcciones adecuadas tomando en cuenta las posibles diferencias - en las diluciones de muestras y estándares, o bien en donde no hay es--tándares, las posibles diferencias que ocurran en el coeficiente de ex--tinción al cambiar las condiciones de lectura.

2. Los valores se dan en  $X \pm \text{DEst}$

Cap. 30

ATP

A. Fundamento. La adición de ATP a un extracto de luciérnagas produce una emisión de luz por el sistema luciferina-luciferasa: la cantidad de luz emitida es proporcional a la cantidad de ATP añadida.

B. Procedimiento. (Refs. 27 y 28). El pH de una solución de tris 0.04 M se ajusta a pH 9.2 con una solución de ácido bórico 0.04M. Una solución de ATP 0.5 mM en el buffer de tris-borato sirve como estándar, y se puede -- congelar por tres meses: 0.1 ml de una solución de ATP 0.5 mM se añade a un tubo que contiene 2.5 ml de tris-borato + 0.4 ml de una solución al 7 % de albúmina bovina. En un segundo tubo se colocan 0.2 ml del ATP + 2.4 ml del tris-borato + 0.4 ml de albúmina bovina al 7 %. Ambos estándares se -- colocan en un baño de agua hirviendo por cinco minutos, y se transfieren -- a un baño de hielo. Una décima de mililitro de sangre se añade a 2.9 ml del buffer tris-borato, y una alícuota de 0.5 ml de este lizado se trans-- fieren a 10 ml de solución de Drøbkin para la cuantificación de hemoglo-- bina. El resto del hemolizado es inmediatamente colocado en un baño de -- agua hirviendo por cinco minutos y transferido a un baño de hielo.

El extracto de luciérnaga (Sigma), se prepara reconstituyéndolo con agua destilada de acuerdo a las instrucciones del fabricante. El extracto se diluye con una solución recién preparada de volúmenes iguales -- de arsenato de sodio 0.1 M, pH 7.4, y  $MgCl_2$  0.04 M, pH 7.4: una dilución 1:5 del extracto de luciérnaga es usualmente adecuada, pero a veces es ne-- cesario cambiar la dilución del extracto para obtener resultados lineales.

Las lecturas se hacen en un fotofluorómetro cuyo filtro primario se substituye por un cartón cuadrado de modo que sólo permita medir el flujo de luz endógena. Se colocan alícuotas diluídas de 4 ml del extracto de luciérnaga en los tubos del fotofluorómetro y se enfrían en un baño de hielo (uno de los tubos se utilizará como blanco). Se agregan 0.2 ml del hemolizado hervido y turbio a uno de los tubos con extracto de luciérnaga frío, y se echa a andar un cronómetro. El tubo se mezcla por inversión cuatro veces, se limpia el exterior del tubo y se mide la emisión de luz en el fluorómetro exactamente un minuto después de haber echado a andar el cronómetro. Se hace este mismo procedimiento -- con blanco (substituyendo el hemolizado por buffer tris-borato) y con los 2 estándares de ATP que se hirvieron. A las lecturas de problema y estándares se les resta la lectura del blanco. La lectura del estándar que contiene 0.2 ml de solución estándar de ATP se divide entre 2, y el promedio de esta lectura y la del estándar que contiene 0.1 ml de ATP es la -- lectura  $R_{est}$  (ver cálculos abajo).

C. Blanco adicional. Ninguno

D. Comentarios. Este método es simple, rápido y exacto. Sus mayores -- desventajas con el requerir un fluorómetro y el depender de un extracto -- biológico crudo. El método tiene alta especificidad para el ATP, pero se pueden obtener lecturas menos sensibles con cantidades grandes de ADP o -- GTP. El extracto de luciérnaga es relativamente caro, pero puede ser almacenado en frío y usado después de varias horas, o después de cierto -- tiempo a temperatura ambiente. A veces es funcional después de permanecer

una semana a 4° C sin que se congele, pero si la actividad del extracto baja a niveles indeseables, se puede "rejuvenecer" añadiendo una cantidad apropiada de extracto de luciérnaga recién reconstituido y sin diluir.

Se ha encontrado que la adición de albúmina de buey a los estándares es importante en algunos lotes de extracto por el efecto estimulante que la albúmina ejerce sobre la emisión de luz del extracto.

El hemolizado hervido es estable por varias semanas si se almacena congelado.

E. Cálculos, valores normales e interpretación. La concentración (C) de ATP en  $\mu\text{M/g Hb}$  se calcula de la siguiente manera:

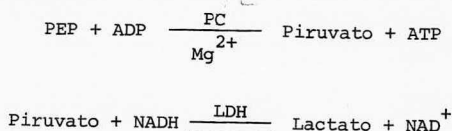
$$C = \frac{1.67 R}{R_{\text{est}} \times \text{Hb}}$$

En donde R es la lectura de la muestra de sangre,  $R_{\text{est}}$  la lectura del estándar y Hb la concentración de Hb (g/dl) en la muestra de sangre diluida. El factor 1.67 se deriva de que los 500  $\mu\text{M}$  del estándar de ATP se diluyen 1:30 ( $500 \mu\text{M}/30 = 16.7 \mu\text{M}$ ) y la concentración de Hb en g/l es diez veces la concentración en g/dl ( $1 \text{ l} = 10 \text{ dl}$ ), y por ende  $16.7/10 = 1.67$ . Los niveles de ATP en glóbulos rojos son de interés en el estudio de sangre preservada, y también en el estudio de enfermedades eritrocíticas. Los glóbulos rojos del adulto caucásico contienen  $4.05 \pm 0.38 \mu\text{M}$  de ATP/g Hb; en los negros se encuentra menos:  $3.65 \pm 0.57 \mu\text{M}$  de ATP/g Hb.

Cap. 31

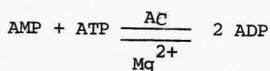
AMP y ADP

A. Fundamento. El ADP se mide en un extracto de ácido perclórico a través de las reacciones siguientes:



La cantidad de piruvato guarda una relación estequiométrica con la cantidad de ADP disponible, y de ahí que la oxidación del NADH corresponde a la cantidad de ADP en el filtrado.

La adición de adenilato cinasa convierte el AMP a ADP en la reacción:



El ADP formado sirve entonces como substrato en la reacción -- piruvato cinasa y se puede medir a través del decremento de la densidad óptica que ocurre cuando el NADH se oxida a  $\text{NAD}^+$ .

B. Procedimiento. La medición se puede llevar a cabo en sangre completa. La cuantificación de hemoglobina se hace añadiendo 0.02 ml de sangre a 10 ml de reactivo de Drabkin. Un mililitro de una solución fría de áci

do perclórico al 20 % se añade a 2 ml de sangre fría y se mezclan bien. Se pipetea un ml del sobrenadante después de centrifugar, se neutraliza con una solución de  $K_2CO_3$  3 M usando como indicador anaranjado de metilo, y se ajusta el volumen a 1.5 ml. El análisis se lleva a cabo de la siguiente forma:

	Blanco (ul)	Sistema (ul)
Tris-HCl pH 8.0, 1 M	50	50
MgCl <sub>2</sub> 0.1 M	20	20
Extracto de Ac. perclórico	--	700
Agua	705	5
PEP 15 mM	50	50
NADH 2 mM	100	100
Lactato deshidrogenasa 240 U/ml	50	50
ATP (neut) 20 mM	5	5
	Leer la DO a 340 nm	
Piruvato cinasa (Sigma II) 140 U/ml	10	10
	Leer la DO a 340 nm hasta que el - valor de DO sea constante.	
Adenilato cinasa (miocinasa) 725 U/ml	10	10
	Leer la DO a 340 nm hasta que el valor de la lectura sea constante.	

El espectrofotómetro deberá ponerse con el blanco a un valor de densidad óptica de 0.35, ya que la DO del sistema descenderá.

C. Blanco adicional. Ninguno

D. Comentarios. La densidad óptica es relativamente estable antes de añadir la piruvato cinasa, pero se pueden observar cambios si la deshidrogenasa láctica está contaminada de piruvato cinasa. La piruvato cinasa tipo I no es satisfactoria para este análisis.

Se debe tener cuidado de no sobretitular el extracto de ácido perclórico, ya que un filtrado muy alcalino puede inhibir la reacción enzimática.

E. Cálculos, valores normales e interpretación. El decremento de la DO después de añadir la piruvato cinasa representa la oxidación de una molécula de NADH a NAD<sup>+</sup> por cada molécula de ADP en el sistema. La concentración (C) de ADP en micromoles/g Hb se obtiene de la siguiente manera:

$$C = \frac{\Delta DO \times 44.79}{Hb}$$

En donde  $\Delta DO$  es el cambio de DO a 340 nm después de la adición de piruvato cinasa, Hb es la concentración de Hb en sangre (g/dl), y 44.79 es el factor combinado que se obtienen del coeficiente de extinción del NADH, de la dilución del filtrado en la celdilla, de la conversión de Hb de g/dl a g/ml, y de la dilución de la muestra original en donde se asume que el contenido de agua de la sangre es de 80 % (ver Cap. 3, inciso D). El cambio de DO después de la adición de adenilato cinasa representa el AMP en el sistema: 1 molécula de AMP resulta de la oxidación de 2 moles de NADH, y la concentración (C) de AMP en  $\mu M/g$  Hb se obtiene de la siguiente



te forma:

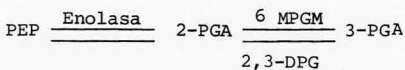
$$C = \frac{\Delta DO \times 22.4}{Hb}$$

Los glóbulos rojos de adultos normales contienen  $0.589 \pm$  --  
 $0.079$   $\mu$ M de ADP/g Hb y  $0.079 \pm 0.013$   $\mu$ M de AMP/g Hb.

Cap. 32

2,3-DIFOSFOGLICERATO (2,3-DPG)

A. Fundamento. Este análisis se basa en que la monofosfoglicerato mutasa (MPGM) requiere de 2,3-DPG como coenzima para su acción. Para la medición se acopla la del fosfoenol piruvato (PEP) que se interconvierte en el 2-fosfogliceraldehído a través de la reacción de la enolasa:



se deja que las concentraciones de PEP y 2PGA se equilibren. Si hay -- 2,3-DPG en el sistema, el 2-PGA se convierte a 3-PGA desplazando el equilibrio hacia la derecha, y la desaparición del PEP de la mezcla de reacción se mide espectrofotométricamente a 240 nm.

B. Procedimiento. (Ref. 29, modificado por Ref. 30). Se añaden 0.2 ml de sangre a 2 ml de agua destilada fría. Una alícuota de 0.2 ml del hemolizado se mezcla con el reactivo de cianuro-ferricianuro para la -- cuantificación de hemoglobina. Se hace una dilución del hemolizado -- 1:100 con una solución diluída 1:100 de tris-HCl 2 M, pH 7.4. Esta solución es adecuada para el análisis durante el mismo día si se mantiene a 4° C, o por varios días si se congela. Si se desea conservar por más -- tiempo, se coloca en un baño de agua hirviendo durante 10 min. y se congela: el pequeño coágulo que se forma al hervir se deposita en el fondo

y se puede usar directamente el sobrenadante en el análisis. En el caso de muestras con muy poca actividad, se mezclan 0.2 ml de sangre con ---- 0.8 ml de agua destilada fría y 1 ml de una solución fría de NaCl 2 % y - se mide la Hb en una alícuota de 0.2 ml. El remanente se coloca en baño a ebullición por 10 minutos y se centrifuga: el sobrenadante se usa para el análisis. Se prepara una solución estándar madre que contenga 1 mM de 2,3-DPG en agua, lo cual es estable por un mínimo de varios meses a -20°C. Antes del análisis se hace una dilución del estándar 1:1000 en una solución diluída 1:100 de tris-HCl 2 M, pH 7.4.

Se prepara una mezcla de reacción el día de trabajo mezclando los siguientes reactivos:

	ml
Tris-HCl 2M, pH 7.4	0.4
MgCl <sub>2</sub> 0.5 M	0.2
PEP 0.025 M	0.6
EDTA (neut) 0.27 M	0.2
MPGM aprox. 1600 U/ml	0.2
Enolasa aprox. 32 U/ml	0.2
Albúmina bovina 5 mg/ml	1.8
Agua	14.4

Es indispensable preparar un volumen suficiente de la mezcla para el número de muestras en el día de trabajo.

Nueve décimas de mililitro de la mezcla de la mezcla de reacción se colocan en cada celdilla, y se dejan a temperatura ambiente por diez minutos. Se añade extracto o solución estándar y luego suficiente agua para dar un volumen total de 1 ml, y se mide el cambio de DO a 240nm

a 25° C contra un blanco de agua o aire. Se miden estándares de 0.25, - 50, 75 y 100 ul de la solución 1:1000 de 2,3-DPG al principio y al final del día. Cuando se examinan muestras de 2,3-DPG con una actividad normal, 10 a 20 microlitros de un hemolizado 1:100 son adecuados para el análisis.

C. Blanco adicional. Ninguno

D. Comentarios. La velocidad de la reacción no sólo depende de la concentración de 2,3-DPG sino también de la actividad de monofosfoglicerato mutasa. Por consiguiente puede ser necesario ajustar la concentración de la enzima de tal forma que el cambio de densidad óptica con 50 ul de estándar esté entre 0.014 a 0.18 unidades de DO por minuto, ya que hay mucha variabilidad en las preparaciones comerciales de MPGM. Por razones no claras, los resultados son más reproducibles a 25° C que a 37° C.

E. Cálculo, valores normales e interpretación. El cambio de la densidad óptica a 240 nm de cada estándar se grafica contra la concentración de 2,3 - DPG en la celdilla: será de 25 nM en la celdilla que contiene 25 ul de estándar, de 50 nM para la celdilla que contiene 50 ul del estándar, etc. Es importante incluir en la curva de calibración un blanco que no contenga 2,3-DPG. La concentración de 2,3-DPG en los filtrados de las muestras se mide en la curva (será la R de cálculos). La concentración (C) de 2,3-DPG en uM/g Hb puede ser calculada con la siguiente ecuación:

$$C = \frac{DxR}{\frac{v}{h} \times Hb \times 10,000}$$

en donde D es la dilución hecha del extracto problema hervido (100 para una dilución 1:100, etc), R es la lectura del problema (en uM) en la curva de calibración,  $V_h$  es el volumen (en ml) de extracto que se colocó en la celdilla (0.01 ó 0.02 para una sangre normal), Hb es la concentración de Hb (en g/dl) del hemolizado antes de hervir, y 10,000 es un factor que engloba transformar Hb en g/dl a g/l y nM a uM.

El 2,3-DPG eritrocítico es importante ya que regula la cantidad de oxígeno liberado en la curva de disociación de hemoglobina. Los glóbulos rojos normales contienen  $15.36 \pm 1.98$  uM de 2,3-DPG/g Hb. Los niveles de 2,3-DPG se incrementan en casos de anemia, y decrecen rápidamente en sangres almacenadas, particularmente en medio ácido. Los niveles de 2,3-DPG de incrementan en pacientes con deficiencia de piruvato - cinasa.

(NAD<sup>+</sup> + NADH) y (NADP + NADPH)

A. Fundamento. La velocidad de la reducción de NADP a NADPH en la reacción de la glucosa-6-P deshidrogenasa está limitada por la cantidad de NADP disponible cuando la concentración de NADP es muy baja. El porcentaje de reducción de NADP a NADPH se puede medir reoxidando el NADPH formado con metosulfato de fenacina (PMS) el cual a su vez reduce de una manera no enzimática al azul de tetrasolio, o sea, el bromuro del 3(4,5-dimetiltiazolil-2)-2,5-difenil tetrazolio (MTT).

El mismo principio se usa para medir NAD, pero para este propósito se usa una enzima, la alcohol deshidrogenasa, que requiere específicamente el NAD como coenzima, y de nuevo la velocidad de reducción del NAD a NADH se estima acoplándola al MTT a través de metosulfato de fenacina (PMS).

B. Procedimiento (Ref. 31). A 0.2 ml de glóbulos rojos lavados se les añaden 1.5 ml de agua destilada. Las células y el agua se mezclan y se colocan en hielo por cinco minutos. Se añaden 0.3 ml buffer de glicilglicina-nicotinamida\*, al hemolizado, se mezclan, y 50 ul de esta mezcla se añaden a 10 ml del reactivo cianuro-ferricianuro para la determina---

---

\* Mezclar volúmenes iguales de glicilglicina 0.1 M y nicotinamida 0.1 M, y ajustar el pH a 7.4 con HCl.

ción de hemoglobina. El resto del hemolizado se coloca en baño de agua hirviendo y se incuba exactamente por un minuto con agitación continua del tubo. El tubo se enfría en hielo y se centrifuga en frío a 12000 G por 15 minutos: el sobrenadante es estable durante 10 días almacenado a 4° C. Este extracto se usa para las mediciones descritas más adelante.

La glucosa-6-P deshidrogenasa comercial contiene usualmente grandes cantidades de NADP, por lo cual se debe eliminar antes de que la enzima se utilice. Para ello se prepara una pequeña columna de 0.3 ml de microgránulos de DEAE celulosa (DE-52), en una jeringa de 1 ml y la resina se equilibra con una dilución 1:10 de buffer tris-HCl 1 M, pH 8.0. La G-6-P deshidrogenasa comercial se diluye en el mismo buffer diluido para dar una concentración aproximada de 40 U/ml. Medio ml de la enzima diluida se pasa a través de la columna, y la enzima se eluye de la resina con varias alícuotas pequeñas de buffer diluido, hasta alcanzar un volumen final de 1.5 ml. Al eluido se le añaden beta-mercaptoetanol y EDTA hasta lograr concentraciones finales de 7 mM y 2.7 mM, respectivamente. Esta solución algunas veces es estable por unos meses a 4° C, pero su actividad puede disminuir rápidamente, pero no es necesario reanalizarla cada día de trabajo, siempre y cuando se obtengan curvas estándares similares a la obtenida recién purificada. La actividad de la G-6-P deshidrogenasa de esta preparación puede ser evaluada haciendo una dilución 1:50 en solución G, y en 20 ul de esta dilución, se mide la glucosa-6-P deshidrogenasa tal como se describe en el capítulo 18: la actividad enzimática en U/ml se puede obtener multiplicando por 40 el cambio de densidad óptica que haya en 10 minutos.

Las curvas estándares se preparan a partir de soluciones madres que contienen 10  $\mu\text{M}$  de NAD o de NADP, las cuales son relativamente estables y se pueden mantener por muchas semanas a 4° C. El contenido exacto de NAD o NADP del estándar debe medirse de las siguientes maneras:

Para NADP	Blanco (ul)	Sistema (ul)
Solución madre de NADP 100 $\mu\text{M}$	---	900
Tris-HCl 1 M, pH 8.0	50	50
Glucosa-6-P 6 mM	50	50
Agua	900	---

Medir la densidad óptica del sistema contra el blanco a 340 nm ( $\text{DO}_1$ )

G-6-P deshidrogenasa (purificada)	10	10
-----------------------------------	----	----

La densidad óptica del sistema se mide contra el blanco a 340 nm hasta que no haya cambio de ésta ( $\text{DO}_2$ ).

Para NAD	Blanco (ul)	Sistema (ul)
Solución madre de NAD 100 $\mu\text{M}$	---	900
Tris-HCl pH 8.0, 1 M	50	50
Etanol 1 M	50	50
Agua	900	---

La densidad óptica del sistema se mide contra el blanco a 340 nm ( $\text{DO}_1$ ).

*ADH de levadura 20 U/ml	5	5
--------------------------	---	---

\* La ADH (alcohol deshidrogenasa) comercial puede no ser enteramente soluble en agua. Una suspensión de unas 20 U/ml se hace en agua destilada y si ésta se enturbia, se centrifuga a 5000 G por 10 min. El 90 % de la enzima activa se encuentra en el sobrenadante y la enzima clara obtenida de esta forma se usa para el análisis. La concentración exacta de ADH no es crítica, pero si hay alguna duda sobre la potencia de la preparación, puede ser rápidamente analizada, usando esencialmente el mismo sistema que es usado para medir la concentración de NAD, pero usando una dilución 1:20 de ADH: en estas condiciones 5 ul de la ADH 1:20 dan un cambio de DO ( $\text{DO}_2 - \text{DO}_1$ ) de 0.311 en 10 minutos.



La densidad óptica del mismo se mide contra el blanco a -- 340 nm hasta que no haya cambio de ésta ( $DO_2$ ).

Estos cambios de DO ( $DO_2 - DO_1$ ) se utilizan para establecer la pureza de los estándares (ver inciso E de cálculos). Para hacer las mediciones en muestras problema (filtrados del hemolizado), se colocan los siguientes reactivos en celdillas espectrofotométricas. Pueden -- premezclarse los 4 primeros reactivos:

Para NADP	Blanco (ul)	Sistema (ul)
Glicilglicina 0.5-M- Nicotinamida 0.1 M, pH 7.4	300	300
Albúmina 20 mg/ml	100	100
G-6-P deshidrogenasa purificada 12 U/ml	---	10
H <sub>2</sub> O	150	140
Filtrado	100	100
MTT-PMS**	150	150

Preincubar a 37° C por 10 minutos.

Glucosa-6-P 6 mM	200	150
------------------	-----	-----

Leer la DO del sistema versus blanco a 556 nm y a 37° C.

---

\*\* Dos mililitros de MTT de 2 mg/ml + 0.1 ml de PMS de 4 mg/ml + 0.9 ml de H<sub>2</sub>O. Se preparan diariamente y se almacenan en frasco ámbar.

Pueden premezclarse los 3 primeros reactivos:

Para NAD

	Blanco (ul)	Sistema (ul)
* Glicilglicina nicotinamida	300	300
** ADH de levadura, 20 U/ml	---	100
Agua	150	50
*** MTT-PMS	150	150
Filtrado	100	100
	Preincubar a 37°C por 10 minutos.	
Etanol 1M	300	300

Medir el cambio de densidad óptica del sistema contra el -- blanco a 556 nm y a 37°C.

C. Blanco adicional. Ninguno

D. Comentarios. Ninguno

E. Cálculos, valores normales e interpretación. Se prepara una curva - estándar colocando en celdillas espectrofotométricas, 0, 5, 10, 20, 30, 40 y 50 ul de una dilución 1:10 de la solución madre de NAD o de la de - NADP; se añade a las celdillas suficiente agua para dar un volumen total de 1.0 ml. Se leen las DO de las 6 celdillas con estándar versus la del blanco a 556 nm. Las DO se grafican en el eje de las Y versus la can-- tidad de NAD o NADP en el eje de las X. La celdilla con 5 ul del estándar corresponde a 50 mM de NAD o NADP, la de 10 ul de estándar correspon- de a 100 mM de NAD o NADP, etc.

---

\* Mezclar volúmenes iguales de glicilglicina 0.5 M y nicotinamida - 0.1 M y ajustar a pH 7.4 con HCl.

\*\* Ver pié de 2 páginas atrás.

\*\*\* Ver pié de página anterior.

La concentración (C) de NAD o NADP en nM/g Hb es:

$$C = \frac{P \times R}{Hb}$$

en donde R es la concentración leída en la curva de calibración de NAD o NADP en la celdilla a la cual se añadió 100 ul del filtrado, Hb es la -- concentración de hemoglobina en el hemolizado (en g/dl) antes de hervirse, y P la pureza del estándar:

$$P = \frac{DO_2 - DO_1}{0.56}$$

en donde  $DO_1$  es la densidad óptica basal y  $DO_2$  la densidad óptica final cuando las soluciones de NAD o NADP fueron estandarizadas (ver arriba -- estandarización de NAD o NADP). Si la solución es de hecho de 100 uM, - el cambio de densidad óptica será de 0.56, y la P será 1 (pureza de 100%) y no cambiará el dato de R/Hb en la ecuación del cálculo de C (ver arriba).

Los glóbulos rojos de adultos normales contienen  $71.42 \pm 11.75$  nM de -- ~~NADH + NADP~~ <sup>14 D</sup> / g Hb y  $94.01 \pm 24.81$  nM de NADH + NAD/g Hb.

CAP. 34

GLUTATION REDUCIDO (GSH)

A. Fundamento. Prácticamente todos los compuestos no proteicos que contienen radicales sulfhidrilos en el eritrocito están en forma de GSH. El ácido 5,5'-ditiobis (2-nitrobenzoico) conocido con las siglas DTNB es un compuesto disulfurado que es fácilmente reducido por compuestos sulfhidrilos: el DTNB reducido es un anión amarillo que puede ser medido espectrofotométricamente a 412 nm.

B. Procedimiento (Ref. 37). Se añaden 0.2 ml de sangre a 2 ml de agua. Se mezclan y se toma una alícuota de 0.2 ml para medir la Hb usando 10 ml de solución de Drabkin. Al remanente de 2 ml de hemolizado se le agrega 3 ml de una solución precipitante\*, se deja reposar 5 minutos y se filtra en papel filtro grueso. A 8 ml de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0.3 M colocados en celdilla con volumen mínimo de 10 ml, se le agregan 2 ml del filtrado, y se lee a 412 nm versus un blanco (8 ml de fosfato + 2 ml de una mezcla 2:5 de agua y solución precipitante): será  $\text{DO}_1$ .

Se agrega 1 ml de DTNB (20 mg/dl en citrato sódico al 1 %) a las celdillas blanco y problema, se mezclan y se hace una segunda lectura a 412 nm: será  $\text{DO}_2$ .

---

\* Solución acuosa que contiene 1.67 g de ácido metafosfórico glacial + 0.2 g de  $\text{Na}_2$  - EDTA + 30 g de NaCl en cada 100 ml.

C. Blanco adicional. Ninguno. Pero si van a hacer dosificaciones a lo largo del día, es conveniente blancos junto con cada lote de problemas, y leer problemas con su blanco correspondiente.

D. Comentarios. Se pueden hacer las mediciones a temperatura ambiente. No se debe dejar el hemolizado mas que unos minutos en reposo antes de agregar la solución precipitante: el GSH del hemolizado se oxida en --- tanto que el filtrado ácido es estable por varias horas a temperatura -- ambiente. La solución precipitante puede estar turbia por presencia de EDTA no disuelto, pero no tiene efecto en la medición. La solución precipitante es estable por varias semanas en refrigerador y si bien va per--- diendo gradualmente su eficacia, puede ser usado mientras se obtengan fil--- trados claros al ser mezclado con el hemolizado.

En casos de GSH bajo se pueden usar 0.5 ml de sangre o bien - 0.2 ml de paquete eritrocítico lavado.

El desarrollo de color con DTNB es inmediato y debe ser leído en los primeros 10 minutos ya que después ocurren bajas en el color.

E. Cálculos, valores normales e interpretación. El coeficiente de ex--- tinción molar del DTNB reducido es 13,600. Sin embargo, cuando se usa -- una apertura que produzca un ancho de banda monocromática mayor de 6 nm, se obtendrá un coeficiente menor. Por ello se obtiene un factor de correc--- ción para ancho de celdilla y para ancho de banda, a base de hacer una -- medición de GSH que se lea en celdilla de 1 cm de ancho y apertura --- ("slit") muy estrecha (será lectura  $D_1$ ) y leyendo la misma muestra en las

condiciones que se desean hacer (será lectura  $D_2$ ). El factor de corrección será:

$$F_c = \frac{D_1}{D_2}$$

En un Coleman Jr el  $F_c$  es aproximadamente de 0.542 (es menos de 1 pues el ancho de la celdilla del Coleman es mayor de 1 cm).

La concentración (C) de GSH en  $\mu\text{M/g Hb}$  es:

$$C = \frac{(DO_2 - DO_1) \times 101}{Hb} \times F_c$$

en donde 101 es un factor que engloba a las diluciones de la muestra, el coeficiente de extinción del DTNB reducido y transformaciones de unidades.

En las ocasiones en que el filtrado del hemolizado precipitado tenga un color rojizo intenso, hay que corregir las lecturas:

$$DO_2 - \frac{11}{10} DO_1$$

Para obtener datos de GSH en  $\text{mg/dl}$  de eritrocitos se hacen dos cosas: a) modificar el inicio del procedimiento colocando 0.2 ml de sangre con 1.8 ml (no 2 ml) de agua; b) hacer medición de hematocrito en la sangre. En este caso, la concentración (C) de GSH en  $\text{mg/dl}$  de eritrocitos:

$$C = (DO_2 - DO_1) \times \frac{31040}{Ht} \times F_c$$

en donde Ht es el hematocrito en %.

Los eritrocitos de adultos normales contienen  $6.57 \pm 1.04$  uM de GSH/g Hb, que equivalen a  $68.5 \pm 10.8$  mg/dl.

En la deficiencia de G-6-P deshidrogenasa hay una estabilidad disminuída del GSH eritrocítico, y que se refleja en la inhabilidad del eritrocito para mantener sus niveles de GSH en presencia de la acetilfenilhidracina. Asimismo, hay virtual ausencia de GSH eritrocítico en la deficiencia de glutatió<sup>n</sup> sintetasa, padecimientos raro que cursa con anemia hemolítica congénita no esferocítica. Contrariamente, hay GSH -- elevado en los eritrocitos de pacientes con mielofibrosis.

GLUTATION OXIDADO (GSSG)

A. Fundamento. La cuantificación de glutati6n oxidado (GSSG) se lleva a cabo en base a la siguiente reacci6n:



La cantidad de NADPH oxidado tiene una relaci6n estequi6métrica con el GSSG disponible y su desaparici6n se mide a 340 nm. En vista de que los gl6bulos rojos contienen cientos de veces m6s GSH que GSSG, la oxidaci6n de GSH durante la preparaci6n del filtrado lleva a errores en la medici6n de GSSG. Para evitarlo se alquila el GSH eritrocítico a~nadiendo un exceso de N-etilmaleimida (NEM), y se elimina el exceso de NEM por extracci6n con 6ter al mismo tiempo que se extrae el 6cido tricloroac6tico que se usa en un paso del proceso.

B. Procedimiento. Se colocan 0.2 ml y 0.5 ml de paquete globular en tubos de centrífuga que contienen 0.5 ml de una soluci6n 0.25 M de NEM. La soluci6n de NEM y de eritrocitos se mezclan y se dejan reposar en fríoo por 10 minutos, se a~naden 10 ul de la mezcla a 10 ml de soluci6n de Drabkin para medir la Hb. Al remanente se le a~naden 2 ml de 6cido tricloroac6tico al 30 % (w/v) a temperatura de hielo y se mezclan. Despu6s de centrifugar a 1,000 G por 15 minutos, se separa una alícuota de 1.5 ml de sobrenadante, a la cual se le hacen 3 extracciones con 5 ml de 6ter --



a temperatura de hielo. El exceso de éter se elimina con una corriente de aire o de nitrógeno. El análisis se lleva a cabo en el siguiente sistema de reacción:

	Blanco (ul)	Sistema (ul)
Buffer de fosfatos LM, pH 7.4, con EDTA 4 mM	80	80
NADPH 12 mM	10	10
Extracto de Ac. tricloroacético	--	900
Agua	900	---

Mientras alcanza temperatura de 37° C o de 25° C, se lee la -- absorbancia a 340 nm hasta que los cambios de densidad óptica sean constantes en función del tiempo.

Glutación reductasa 90 U/ml	10	10
-----------------------------	----	----

Leer la densidad óptica por unos minutos hasta que los cambios de ésta sean constantes en función del tiempo. Poner inicialmente el espectrofotómetro con el blanco a un valor de DO de 0.08 ya que la DO del sistema descenderá con el tiempo.

C. Blanco adicional. Ninguno

D. Comentarios. Una extracción incompleta del ácido con el éter puede llevar a que haya un decremento muy rápido de la densidad óptica (antes de la adición de glutación reductasa) debido a la inestabilidad del NADPH en medio ácido. Se debe tener cuidado en que esto no ocurra.

E. Cálculos, valores normales e interpretación. Se trazan líneas rectas

que se ajusten a la velocidad inicial (antes de la adición de glutatión reductasa) y a la velocidad final (después de la adición): la distancia que hay entre las dos rectas será  $\Delta DO$  y representa NADPH oxidado, y por tanto la cantidad de GSSG en el filtrado. La concentración (C) de GSSG en  $\mu M/g$  Hb es:

$$C = \frac{\Delta DO \times 30.4}{Hb}$$

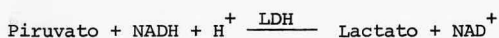
en donde Hb es la concentración de Hb (en g/dl) y 30.4 engloba la conversión de g/dl de Hb a g/ml, las diluciones del hemolizado en la celdilla de medición (10/9) y la de la preparación del extracto (4.24/2.49) y el factor de 6.22 (DO de NADPH de 1.0  $\mu M/ml$ ).

Los glóbulos rojos de adultos normales contienen  $0.0123 \pm 0.0045$   $\mu M/g$  Hb. Se han observado que los niveles de GSSG se elevan cuando existe deficiencia eritrocítica de G-6-P deshidrogenasa.

Cap. 36

PIRUVATO

A. Fundamento. El piruvato se reduce cuantitativamente a lactato en -- presencia de lactato deshidrogenasa:



La cantidad de NADH utilizada se asocia estequiométricamente al piruvato, y su desaparición se mide a 340 nm.

B. Procedimiento. Se añaden 1 ml de sangre a 3 ml de ácido perclórico a temperatura de hielo, se mezclan y se centrifuga. Una alícuota de 1.5 ml del sobrenadante se neutraliza ajustando el volumen final a 2 - ml (ver Cap. 3, inciso D, subinciso 3).

A continuación se coloca en celdillas:

	Blanco (ul)	Sistema (ul)
Tris-HCl 1 M, pH 8.0	200	200
NADH 2 mM	100	100
Extracto de ácido perclórico	---	500
Agua	690	190
	Leer la DO basal a 37° C y a 340 nm	
LDH 100 U/ml	10	10
	Medir la DO a 340 nm hasta que no - haya cambio alguno, ha diferencia - de esta lectura con la basal = $\Delta$ DO.	

El espectrofotómetro deberá ser puesto con el blanco a un valor de densidad óptica de 0.08 ya que la densidad óptica del sistema descenderá.

C. Blanco adicional. Ninguno

D. Comentarios. Si bien las soluciones puras de piruvato son relativamente estables, puede desaparecer rápidamente de los filtrados de sangre con ácido perclórico. Por ello es importante que los filtrados no se -- almacenen, sino que se neutralicen y se usen inmediatamente en el análisis.

E. Cálculos, valores normales e interpretación. Ya que el piruvato se difunde a través de la membrana eritrocítica y se redistribuye en plasma y glóbulos rojos, las concentraciones en sangre (C) de piruvato se expresan en micromoles:

$$C = \frac{\Delta DO \times 10.13 \times 1000}{6.22} = \Delta DO \times 1628$$

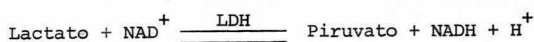
El factor 10.13 toma en cuenta la dilución 1:3.8 de sangre en el filtrado original (asumiendo que tiene el 80 % de agua), la dilución de 1.5 a 2.0 ml durante la neutralización y la dilución 1:2 en la celdilla. El factor 1000 es para transformar los milimoles a micromoles, y 6.22 es el coeficiente de extinción milimolar del NADH.

La concentración de piruvato en sangre fresca es de  $53.3 \pm 2.5 \mu M$ . La cuantificación de niveles de piruvato es de interés en el estudio de la glicolisis eritrocítica.

Cap. 37

LACTATO

A. Fundamento. El lactato y el piruvato establecen un equilibrio en -- presencia de NAD y de la lactato deshidrogenasa:



Los niveles fisiológicos del equilibrio lactato-piruvato tien den a estar a favor del lactato; sin embargo a un pH alto y a concentra- ciones altas de NAD, aunado a la presencia de hidrazina para remover el piruvato formado en el equilibrio, se logra empujar la reacción hacia la derecha. Bajo estas condiciones el lactato reduce estequiométricamente el  $\text{NAD}^+$  a NADH, y la cantidad de lactato en la mezcla se puede medir por el cambio de densidad óptica a 340 nm.

B. Procedimiento. Un ml de sangre completa se añade a 3 ml de ácido per clórico a temperatura de hielo. Se mezclan bien y se prepara un - extracto neutro a partir de 1.5 ml del sobrenadante, ajustando a un volu- men final de 2 ml (ver Cap. 3, inciso D, subinciso 3). A continuación se colocan en celdillas:

	Blanco (ul)	Sistema (ul)
Buffer de glicina-hidracina*	500	500
NAD 5 mM	200	200
Extracto de ácido perclórico	---	100
Agua	290	190
	Leer la DO basal a 37°C y a 340 nm.	
LDH 2500 U/ml	10	10

Medir la DO a 340 nm hasta que no haya cambio alguno. La diferencia de esta lectura y la basal es la  $\Delta$ DO.

C. Blanco adicional. Ninguno

D. Comentarios. Se debe tener especial cuidado en no contaminar el material de vidrio con el sudor de las manos ya que éste es rico en lactato.

E. Cálculos, valores normales, e interpretación. Ya que el piruvato se difunde a través de la membrana celular y se distribuye a través del plasma y glóbulos rojos, las concentraciones (C) de lactato en sangre se expresan en micromoles:

$$C = \frac{\Delta DO \times 50.67 \times 1000}{6.22} = \Delta DO \times 8146$$

El factor 50.67 toma en cuenta la dilución 1:3.8 de sangre en

---

\* La solución madre contienen 7.5 g de glicina + 5.2 g de sulfato de hidracina + 0.2 g de EDTA disódico en 49 ml de agua. Se almacena en el refrigerador. Antes de usarse añadir 5.1 ml de NAOH 2 M a 4.9 ml de la solución madre.

el filtrado original (asumiendo el 80 % de contenido en agua para la san  
gre), la dilución de 1.5 ml a 2.0 ml durante la neutralización y la dilu  
ción 1:10 en la celdilla. El factor 1000 transforma las milimolas a mi-  
cromoles, y 6.22 en el coeficiente de extinción milimolar del NADH.

La concentración normal de lactato en sangre fresca es de 932  
+ 211  $\mu$ M. La determinación de lactato es importante en el estudio de la  
glicolisis eritrocítica.

PARTE VI

PRUEBAS DE TAMIZAJE

GENERALIDADES

Los métodos presentados en las partes III y IV permiten la estimación cuantitativa de la actividad enzimática en glóbulos rojos. Sin embargo en la práctica, frecuentemente es suficiente con saber si existe o no una marcada deficiencia de la actividad de la enzima en cuestión, ya que usualmente no son de importancia clínica las deficiencias leves de enzimas. Por esta razón se ha desarrollado un número de técnicas de tamizaje para la detección de deficiencias enzimáticas. Estas técnicas son útiles para laboratorios que no tienen la instrumentación requerida para el análisis enzimático cuantitativo, o en algunas circunstancias en las cuales es suficiente saber si existe o no un estado de deficiencia severa. Todos los procedimientos presentados en esta sección, dependen de la reducción de algunos de los piridín-nucleótidos, pero en lugar de medir el por ciento de oxidación o reducción del piridín-nucleótido espectrofotométricamente, se usa como indicador la fluorescencia que se puede observar a simple vista. Esta fluorescencia se observa en el piridín-nucleótido reducido cuando se ilumina con luz ultravioleta, lo cual no sucede con el piridín-nucleótido oxidado.

En las pruebas de tamizaje, la muestra de sangre se añade a la solución de tamizaje y se coloca un poco de la mezcla en papel Whatman No. 1 ó en otro papel adecuado para esto: después de secar la mancha, se examina con luz ultravioleta.



Cap. 38

PRUEBA DE TAMIZAJE DE LA TRIOSAFOSFATO ISOMERASA (Ref. 33).

A. Fundamento. Es idéntico al usado en el análisis para triosafosfato isomerasa (ver Cap. 11) pero la pérdida de fluorescencia del NADH bajo luz ultravioleta sirve como un indicador de la actividad enzimática en lugar de la medición espectrofotométrica del cambio de absorbancia.

B. Mezcla de tamizaje. Cada mililitro de la mezcla contiene lo siguiente:

	Volumen (ul)
NADH 7 mM	100
DL-Gliceraldehído-3-fosfato 50 mg/ml (~290 mM)	10
Alfa gliceraldehído fosfato deshidrogenasa 8 U/ml	1
Buffer de trietanolamina 0.1 M, pH 8.0	500
EDTA 0.027 M	200
Agua	200

C. Procedimiento. La muestra de sangre se recolecta en EDTA, heparina o ACD. Diez ul de la sangre se añaden a 3 ml de agua destilada y se mezclan. Diez ul del hemolizado se añaden a 100 ul de la mezcla de tamizaje, una alícuota de la nueva mezcla se coloca en papel filtro, y el resto de la mezcla se deja reposar por 20 a 30 minutos, y se hace una segunda mancha en el papel. Se dejan secar unos minutos las manchas y se examinan con luz ultravioleta.

D. Interpretación. La primera mancha deberá fluorescer brillantemente, pero la segunda mancha (la de 20 - 30 minutos) normalmente presentará una pequeña fluorescencia o no presentará fluorescencia. Sin embargo en la deficiencia de TPI, la fluorescencia en la segunda mancha será casi tan brillante como la mancha hecha antes de la incubación de la mezcla. Es útil examinar una muestra control normal junto con la muestra del paciente.

Cap. 39

PRUEBA DE TAMIZAJE DE LA PIRUVATO CINASA (ref. 34).

A. Fundamento. El principio del procedimiento es idéntico al usado en el análisis de piruvato cinasa (ver Cap. 16), pero se observa la pérdida de fluorescencia del NADH con luz ultravioleta en lugar de medirla es--pectrofotométricamente. Como los leucocitos de los pacientes con defi--ciencia de piruvato cinasa en eritrocitos tienen una actividad normal, - es particularmente importante excluir a las células blancas de la muestra a analizar. Esto se logra mediante dos formas: la primera es centrifugar la sangre, y eliminar la capa de células blancas; la segunda emplea una lisis hipotónica con solución salina al 0.1 %.(evitar el uso de - agentes como la digitonina o la saponina ya que los leucocitos deben permanecer intactos para que sus enzimas no se vierten en el hemolizado).

B. Mezcla de tamizaje.

	Volumen (ul)
Fosfoenol piruvato (PEP), sal de ciclohexil- amonio (neut) 0.15 M	30
ADP (neut) 30 mM	100
NADH (neut) 15 mM	100
MgCl <sub>2</sub> 80 mM	100
Buffer de fosfatos 0.25 M, pH 7.4	50
Agua	620

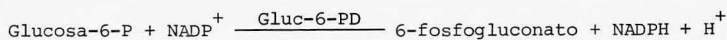
La mezcla es estable por solo cuatro días en forma congelada debido a la inestabilidad del NADH. Es posible preparar una mezcla de reacción parcial sustituyendo el NADH por agua en la solución. La mezcla parcial es estable indefinidamente en forma congelada. Cuando se necesite, se añade suficiente muestra parcial a un frasco seco preparado con NADH, para lograr una concentración de NADH de 1 mg/ml, v.gr. -- 0.5 ml de la mezcla parcial a 0.5 mg del NADH.

C. Procedimiento. La sangre se puede colectar en EDTA, heparina o ACD. Se centrifuga y se elimina el plasma y capa leucocitaria cuidadosamente por aspiración. Se prepara una suspensión de glóbulos rojos al 20 % -- añadiendo 4 volúmenes de solución salina al 0.9 % a un volumen de paquete. Diez ul de la suspensión al 20 % se añaden a 100 ul de la mezcla de tamizaje. Una alícuota de la mezcla se coloca inmediatamente en papel filtro, y el resto de la mezcla se incuba a 37° C por 30 min. Después de la incubación se hace una segunda mancha en el papel. Después de secar el papel se examinan las manchas con luz ultravioleta.

D. Interpretación. La primera mancha deberá fluorescer brillantemente, pero la fluorescencia debe desaparecer en la segunda mancha. Una muestra con deficiencia de PC muestra fluorescencia en ambas manchas. Haciendo manchas cada 10 minutos, es posible identificar provisionalmente heterocigotos para la deficiencia de piruvato cinasa. Es útil incluir una muestra control normal junto con la muestra del paciente.

PRUEBA DE TAMIZAJE DE LA GLUCOSA-6-FOSFATO DESHIDROGENASA (Ref. 35)

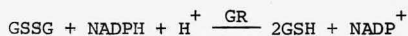
A. Fundamento. En presencia de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa y NADP, la glucosa-6-P se oxida a 6-fosfogluconato en la reacción:



Ya que la fosfogluconato deshidrogenasa (6-PGD) está presente en todos los hemolizados, asimismo se lleva a cabo la reducción del NADP en la reacción:



Cuando existe una deficiencia leve de G-6-PD, los hemolizados se incuban con glucosa-6-P y NADP formándose una pequeña cantidad de NADPH. Con la presencia de GSSG en la mezcla de tamizaje, éste se reoxida en la reacción de la glutatión reductasa (GR):



Por lo tanto las mediciones en la prueba se hacen viendo la diferencia - aproximada entre la actividad de G-6-PD y la actividad de glutatión reductasa.

B. Mezcla de Tamizaje

	Volumen (ul)
Glucosa-6-P 0.01 mM	100
NADP 7.5 mM	100
Saponina 1 %	200
Tris-HCl 0.75 M, pH 7.8	300
GSSG 8 mM	100
Agua	200

La mezcla congelada es estable por varios meses.

C. Procedimiento. La sangre se colecta en heparina, EDTA o ACD. Se -- pueden usar las muestras de sangre por algunas semanas así como manchas de sangre colectadas en papel filtro y secadas. Diez ul de sangre se -- añaden a 100 ul de la mezcla de tamizaje, y se hace una mancha en el papel filtro. El remanente de la mezcla se incuba a temperatura ambiente por 5 a 10 minutos, y se hace una segunda mancha.

D. Interpretación. En muestras normales la primera mancha fluoresce -- débilmente, y la segunda mancha fluoresce brillantemente. En muestras -- con deficiencia de G-6-PD las muestras no presentan o presentan una pequeña fluorescencia. Es adecuado examinar una muestra normal control -- junto con la muestra del paciente.

Cap. 41

PRUEBA DE TAMIZAJE DE GLUTATION REDUCTASA (Ref. 34)

A. Fundamento. Es el mismo al usado en la medición espectrofotométrica (Cap. 19) pero se usa la pérdida de fluorescencia al irse oxidando el -- NADPH, como índice de la actividad enzimática.

B. Mezcla de tamizaje.

	ul
GSSG 33 mM	100
NADPH 15 mM	100
Buffer de fosfatos 0.25 M, pH 7.4	600
Saponina 1 %	200

La mezcla es estable por unos 10 días congelada. Se puede preparar una - mezcla parcial substituyendo el NADPH por agua: esta mezcla congelada -- es estable indefinidamente, y se puede agregar a NADPH preparado el día - de trabajo de modo que haya NADPH a concentración final de 1 mg/ml.

C. Procedimiento. Puede usarse sangre con heparina, ACD o EDTA y almace-- nada hasta por 3 semanas. A 100 ul de la mezcla de tamizaje se le agre-- gan 10 ul de sangre, se mezclan e inmediatamente se hace una mancha en pa-- pel filtro. Se incuba a 37° la mezcla y se hacen manchas a intervalos -- de 15 minutos. Se dejan secar las manchas y se examinan con luz ultravio-- leta.

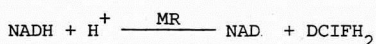
D. Interpretación. La primera mancha debe fluorescer siempre. Si la actividad de glutatión reductasa es alta, la fluorescencia desaparece -- en la primera media hora de incubación, pero si está baja, la fluorescencia persiste por una hora o más de tiempo de incubación.



Cap. 42

PRUEBA DE TAMIZAJE DE LA NADH METAHEMOGLOBINA REDUCTASA (NADH DIAFORASA)  
(Ref. 36)

A. Fundamento. La NADH metahemoglobina reductasa (MR) cataliza la reducción de la metahemoglobina en circunstancias fisiológicas. Sin embargo el colorante diclorofenol-indofenol (DCIF), también sirve como sustrato de esta enzima, reduciéndose a su forma incolora (DCIFH<sub>2</sub>). El procedimiento depende de la reacción:



La oxidación del NADH a NAD se puede observar con luz ultravioleta para la pérdida de fluorescencia. La muestra de sangre debe ser primero tratada con nitrito para oxidar la hemoglobina a metahemoglobina, ya que la hemoglobina reduciría el DCIF de una manera no enzimática.

B. Mezcla de tamizaje.

	Volumen (ul)
Tris-HCL 0.06 M, pH 7.5, con 2.7 mM de Na <sub>2</sub> -EDTA	1000
DCIF 19 mM (6.25 mg/ml)	10
Saponina 1 %	200

Añadir esta mezcla a un frasco conteniendo 0.5 mg de NADH seco.

C. Procedimiento. Seis ul de una solución recientemente preparada de nitrito de sodio 0.18 M se añade a 0.1 ml de sangre colectada en heparina o ACD. La mezcla se deja reposar a temperatura ambiente por 30 minutos, y se añaden 20 ul de ésta a 0.5 ml de la mezcla de tamizaje. Se hacen manchas en papel filtro con intervalos de 15 minutos durante 45 minutos.

D. Interpretación. La primera mancha debe fluorescer brillantemente, pero la fluorescencia desaparece de la mancha aproximadamente después de 30 minutos de incubación. En la deficiencia de la NADH diaforasa la fluorescencia persistirá por 45 minutos o más.

## DISCUSION Y CONCLUSIONES

La finalidad fundamental de este trabajo ha sido presentar en forma resumida y en español una recopilación de las técnicas más confiables y viables para determinar la actividad enzimática presente en eritrocitos, así como la concentración de compuestos metabólicos intermediarios en las mismas.

Esto se pudo lograr en base a la revisión que se hizo del trabajo de E. Beutler (38) y las publicaciones sobre estudios enzimáticos en eritrocitos hechas por diferentes autores de los años de 1972 a 1976 (bibliografía B). Las conclusiones a las que se llegaron son las siguientes:

- a. El glóbulo rojo tiene una creciente importancia en la realización de estudios enzimáticos por la disponibilidad y el fácil manejo de los eritrocitos así como por la importancia de las enzimopatías en la patología humana.
- b. De la metodología presentada en las publicaciones hechas por otros autores, se añadió el método de la determinación de la actividad de la adenosina deaminasa a los métodos presentados por E. Beutler en su publicación (38) por ser un método colorimétrico sencillo. Las fichas mencionadas en la bibliografía B desarrollan métodos inmunológicos, genéticos, bioquímicos y radioisotópicos adecuados para un laboratorio de investigación pero que pueden servir para desarrollar nuevas metodologías que se empleen posteriormente en laboratorios clínicos.

c. Los métodos presentados en este documento pueden contribuir al ejercicio de una medicina a nivel molecular ya que dichos métodos son realizables en un laboratorio hematológico que posea la infraestructura necesaria, v.gr. laboratorios de investigación o los de hospitales de concentración. La aplicación inmediata sería la ayuda en el diagnóstico de anemias hemolíticas congénitas no esferocíticas, y posteriormente en la detección de enzimopatías a otros niveles, ya que se ha visto que algunas deficiencias enzimáticas eritrocíticas también se manifiestan en -- otros tejidos causando alteraciones orgánicas diversas.

BIBLIOGRAFIA

1. Busch, D., and Pelz, K.: Erythrozytenisolierung aus Blut mit Baumwolle. *Klin. Wschr.* 44: 983-984, 1966.
2. Danon, D., and Marikovsky, Y.: Determination of density distribution of red cell population. *J. Lab. Clin. Med.* 64: 668-674, 1964.
3. Kirkman, H. N.: Glucose-6-phosphate dehydrogenase from human erythrocytes. I. Further purification and characterization. *J. Biol. Chem.* 237: 2364-2370, 1962.
4. Beutler, E., Mathai, C.K., and Smith, J.E.: Biochemical variants of glucose-6-phosphate dehydrogenase giving rise to congenital nonspherocytic hemolytic disease. *Blood* 31: 131-150, 1968.
5. van Kampen, E. J., and Zijlstra, W. G.: Standardization of hemoglobinometry. II. The hemiglobincyanide method. *Clin. Chim. Acta* 6: 538-545, 1961.
6. Beutler, E., Duron, O., and Kelly, B.M.: Improved method for the determination of blood glutathione. *J. Lab. Clin. Med.* 61: 882-890, 1963.
7. The Merck Index. Rahway, N.J., Merck & Co., Inc.
8. Green, A.A.: The preparation of acetate and phosphate buffer solutions of known pH and ionic strength. *J. Amer. Chem. Soc.* 55: 2331-2336, 1933.
9. Lowry, O.H., Passonneau, J.V., and Rock, M.K.: The stability of pyridine nucleotides. *J. Biol. Chem.* 236: 2756-2759, 1961.
10. Warburg, O., and Christian, W.: Isolation and crystallization of enolase. *Biochem. Z.* 310: 384-421, 1941.

11. Hjelm, M.: The mode of expressing the content of intracellular components of human erythrocytes with special reference to adenine nucleotides. *Scand. J. Haemat.* 6: 56-64, 1969.
12. Wintrobe, M.M.: In *Clinical Hematology*, ed. 4. Philadelphia, Lea & Febiger, 1956, pp. 392-393.
13. Report of a WHO scientific group: Standardization of Procedures for the Study of Glucose-6-phosphate Dehydrogenase. WHO Techn. Rep. Ser. 366, 1967.
14. Glock, G. E., and McLean, P.: Further studies on the properties and assay of glucose-6-phosphate dehydrogenase and 6-phosphogluconate dehydrogenase of rat liver. *Biochem. J.* 55:400, 1953.
15. Beutler, E.: Effect of flavin compounds on glutathione reductase activity: in vivo and in vitro studies. *J. Clin. Invest.* 48: 1957-1966, 1969.
16. Paglia, D.E., and Valentine, W.N.: Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J. Lab. Clin. Med.* 70: 158-169, 1967.
17. Chance, B.: Catalases and peroxidases, part II. In Glick, D. (Ed.), *Special Methods in Methods of Biochemical Analysis*, Vol. 1. New York, Interscience, 1954, pp. 408-424.
18. Huennekens, F.M., Caffrey, R.W., Basford, R.E., and Gabrio, B.W.: Erythrocyte metabolism. IV. Isolation and properties of methemoglobin reductase. *J. Biol. Chem.* 227: 261-272, 1957.
19. Hegesh, E., Calmanovici, N., and Avron, M.: New method for determining ferrihemoglobin reductase (NADH-methemoglobin reductase) in erythrocytes. *J. Lab. Clin. Med.* 72: 339-344, 1968.
20. Levin, E., and Beutler, E.: Human erythrocyte adenylate kinase. *Haematologia Hungarica* 1: 19-25, 1967.

21. Beutler, E., and Baluda, M.C.: Improved method for measuring galactose-1-phosphate uridyl transferase activity of erythrocytes. *Clin. Chim. Acta* 13: 369-379, 1966.
22. Ellis, G., and Goldberg, D.M.: The enzymological diagnosis of galactosaemia. *Ann. Clin. Biochem.* 6: 70-73, 1969.
23. Mellman, W.J., and Tedesco, T.A.: An improved assay of erythrocyte and leukocyte galactose-1-phosphate uridyl transferase. Stabilization of the enzyme by a thiol protective reagent. *J. Lab. Clin. Med.* 66: 980-986, 1965.
24. Beutler, E., and Mitchell, M.: New rapid method for the estimation of red cell galactose-1-phosphate uridyl transferase activity. *J. Lab. Clin. Med.* 72: 527-532, 1968.
25. Sherman, J. R., and Adler, J.: Galactokinase from Escherichia coli. *J. Biol. Chem.* 238: 873-878, 1963.
26. Mathai, C.K., and Beutler, E.: Biochemical characteristics of galactokinase from adult and fetal human red cells. *Enzymologia* 33: 224-230, 1967.
27. Beutler, E., and Baluda, M. C.: Simplified determination of blood adenosine triphosphate using the firefly system. *Blood* 23: 688-689, 1964.
28. Beutler, E., and Mathai, C.K.: A comparison of normal red cell ATP levels as measured by the firefly system and the hexokinase system. *Blood* 30: 311-320, 1967.
29. Krinsky, I.: D-2,3-Diphosphoglycerate. In Bergmeyer, H. U. (Ed.), *Methods of Enzymatic Analysis*. New York, Academic Press, 1965, pp. 238-240.
30. Beutler, E., Meul, A., and Wood, L. A.: Depletion and regeneration of 2,3-diphosphoglyceric acid in stored red blood cells. *Transfusion* 9: 109-114, 1969.

31. Nisselbaum, J.S., and Green, S.: A simple ultramicro method for determination of pyridine nucleotides in tissues. *Anal. Biochem.* 27: 212-217, 1969.
32. Srivastava, S.K., and Beutler, E.: Accurate measurement of oxidized glutathione content of human, rabbit and rat red blood cells. *Anal. Biochem.* 25: 70-76, 1968.
33. Kaplan, J. C., Shore, N., and Beutler, E.: The rapid detection of triose phosphate isomerase deficiency. *Amer. J. Clin. Path.* 50: 656-658, 1968.
34. Beutler, E.: A series of new screening procedures for pyruvate deficiency, glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency, and glutathione reductase deficiency. *Blood* 28: 553-562, 1962.
35. Beutler, E., and Mitchell, M.: Special modifications of the fluorescent screening method for glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Blood* 32: 816-818, 1968.
36. Kaplan, J.C., Nicolas, A.M., Hanzilickova-Leroux, A., and Beutler, E. A simple spot screening test for fast detection of red cell NADH-diaphorase deficiency. *Blood* 36: 330-333, 1970.
37. Beutler, E., Duron, O., and Kelly, B.M.: Improved method for the determination of blood glutathione. *J. Lab. Clin. Med.* 61: 882-890, 1963.
38. Beutler, E.: A manual of biochemical methods. Editorial Grune & Stratton.
39. Körber, W., Meisterernst E.B., & Hermann, G.: Quantitative measurement of adenosine diaminase (ADA), from human erythrocytes. *Clin. Chem. Acta* 63: 323-333, 1975.



40. Agarwal, R.P., Sagar, S.U., & Parks, E.R.: Purification and effects of adenosine deaminase (ADA), analogs. *Biochem. Pharm.* 24: 693-701, 1975.
41. Tratta, P.P., Smithwick, M.E. & Balis, E. M.: A normal level of adenosine deaminase (ADA) activity in the red cell lysates of carriers and patient with severe combined immunodeficiency. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 73: 104-108, 1976.

BIBLIOGRAFIA (B)

- Rojas, E.J.: Método rápido para visualizar las anhidrasas carbónicas - eritrocíticas. Acta Cient. Venezolana 22: 26-27, 1971.
- Norgaard Pedersen B. & Shapira, E.: Specific immunoassay for quantitative determination of human erythrocyte catalase. J. Lab. Med. 81: 133-139, 1973.
- Ben Yoseph Y. & Shapira, E.: Specific immunoassay for quantitative determination of human erythrocyte malic dehidrogenase. J. Lab. Clin. Med. 77: 459-469, 1971.
- Tedesco, T.A.: Human galactose 1-phosphate uridyltransferase. Purification, antibody production, and comparison of the wild type, Duarte variant, and galactosemic gene products. J. Biol. Chem. 247: 6631-6636, 1972.
- Dlae, G. L. & Popjaks, G.: Inactive galactosemic galactose-1-phosphate uridyltransferase from human red cells. J. Biol. Chem. 251: 1057-1063, 1976.
- Moses, S.W., Bshan, N. & Gutman, A.: Properties of glycogen syntetase in erythrocytes. Eur. J. Biochem. 30: 205-210, 1972.
- Frisher H. Carson, P.E., Bowman, J.E. & Rieckmann, K.H.: Visual test for erythrocytic glucose-6-phosphate dehydrogenase, 6-phosphogluconic dehydrogenase, and aglutathione reductasa deficiencies. J. Lab. Clin. Med 81: 613-624, 1973.
- An improved procedure for rapid isolation of glucose 6-phosphate dehydrogenase. Arch. Biochem. Biophys. 169: 362-363, 1975.
- Nicholson, J.F., Bodourian, S.H. & Pesce, M.A.: Measurement of glucose-6-phosphate dehydrogenase and 6-phosphogluconate dehydrogenase activites in erythrocytes by use a centrifugal analyzer. Clin. Chem. 20: 1349-1352, 1974.

- Okonkwo, P.O., Askari & Korgolg, L.: Human erythrocyte kinase. Purification, properties, and interaction with its antibody. *Biochim. Biophys. Acta* 321: 503-511, 1973.
- Gerber, G., Preissler, H., Heinrich, R. & Rapoport, S.M.: Hexokinase of human erythrocytes. *Eur. J. Biochem.* 45: 39-52, 1974.
- Brinkmann, B. & Thoma, G.: Simultaneous electrophoresis of three isoenzyme polymorphisms: 6-phosphogluconate dehydrogenase (6-PGD), adenosine deaminase (ADA), adenylate kinase (AK). *Vox. Sang.* 21: 9-93, 1971.
- Ghangas, G.S. & Milman, G.: Radioimmune determination of hypoxantine phosphoribosyltransferase crossreacting material in erythrocytes of Lesch-Nyhan patient. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 72: 4147-4150, 1975.
- Blume, K.G., Lohr, G.W. & Beutler: Additional diagnostic procedures for the detection of abnormal red cell pyruvate kinase. *Clin. Chim. Acta* 42: 443-446, 1973.
- Chern, Ching, J., Rittenberg, M.B. & Black, J.A.: Purification of human erythrocyte pyruvate kinase. *J. Biol. Chem.* 247: 7173-7180.