

GUÍA DE TRABAJO PRÁCTICO

Enzimología clínica.
Principio del análisis en enzimas

Nadia Rosa Labandera
Elba Cristina Malarczuk

Colección: Cuadernos de Cátedra



Facultad de Ciencias Exactas,
Químicas y Naturales

EDITORIAL UNIVERSITARIA
UNIVERSIDAD NACIONAL DE MISIONES

Coronel José Félix Bogado 2160
Tel-Fax: 03764-428601

Correos electrónicos:
direccion@editorial.unam.edu.ar
Página WEB: www.editorial.unam.edu.ar

Colección: Cuadernos de Cátedra
Coordinación de la edición: Nélida González
Preparación para la web: Francisco A. Sánchez

Labandera, Nadia Rosa
Enzimología clínica : principio del análisis en enzimas : guía de
estudio práctico / Nadia Rosa Labandera ; Elba Cristina Malarczuk.
- 1a ed. - Posadas : Universidad Nacional de Misiones. Facultad de
Ciencias Exactas, Químicas y Naturales, 2019.
Libro digital, PDF - (Cuadernos de cátedra)

Archivo Digital: descarga
ISBN 978-950-766-144-0

1. Proteínas. 2. Bioquímica. 3. Análisis Bioquímico. I. Malarczuk
Elba Cristina. II. Título.
CDD 572.7

ISBN: 978-950-766-144-0
Impreso en Argentina
©Editorial Universitaria
Universidad Nacional de Misiones
Posadas, 2019

Cuerpo Docente

JTP Nadia Rosa Labandera

Prof. Adj. Elba Cristina Malarczuk

INDICE

Cuerpo docente	1
Índice	2
Introducción	4
Clasificación fisiológica de las enzimas	4, 5, 6
Nomenclatura de las enzimas	6, 7, 8
Isoenzimas	9, 10, 11
Principios del diagnóstico enzimático	12
Factores que afectan los niveles enzimáticos en plasma	12 a 16
Selección de enzimas a evaluar	17 a 20
Enzimas de uso más frecuente en clínica médica en perfiles enzimáticos	20, 21
Principio del análisis de enzimas	23
Aspectos generales sobre las enzimas	23, 24
Regulación de la actividad enzimática	24
Efecto del pH sobre la actividad enzimática	24, 25
Efecto de la concentración del tampón sobre la actividad enzimática	25
Efecto de la naturaleza del tampón sobre la actividad enzimática	26
Efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática	26
Efecto de los activadores sobre la actividad enzimática	27, 28, 29
Efecto de la concentración de los cofactores sobre la actividad enzimática	29
Efecto de la concentración de los sustratos y los productos sobre la actividad enzimática	30, 31
Efecto de los inhibidores sobre la actividad enzimática	31, 32
Modulación alosterica sobre la actividad enzimática	32
Efecto de la modificación covalente sobre la actividad enzimática	33
Regulación de la actividad enzimática por medio de isoenzimas	34
Determinación de la actividad catalítica	34, 35
Metodología Analítica: Punto Final y Cinético	36, 37, 38
Punto Final y Cinético con espectroscopia bicromática	38
Métodos optimizados	38
Calculo de la actividad enzimática	38,39
Otros métodos	39
Control de calidad en enzimología	39 a 44
Metodología enzimática: Amilasa	45, 46
Lipasa	46
Creatina Kinasa	47, 48, 49
Lactato deshidrogenasa	49,50
Fosfatasa Alcalina	50
Alanino amino transferasa	51, 52
Aspartato aminotransferasa	52
Seudocolinesterasa	53
Gamma glutamil peptidasa	53,54
5 Nucleotidasa	54, 55
Fosfatasa acida	55, 56
Métodos de separación de enzimas	56 a 60
Otros parámetros no enzimáticos utilizados en perfiles de órgano	61
Troponinas	61, 62, 63
Antígeno prostático específico	63, 64
Bibliografía	66

ENZIMOLOGIA CLINICA

INTRODUCCION

Enzimología, una rama especial dentro de la bioquímica clínica es la aplicación de la ciencia de las enzimas al diagnóstico y tratamiento de enfermedades. Es uno de los campos más importantes de la química clínica contemporánea.

Actualmente, en la mayoría de los hospitales, los ensayos enzimáticos superan el 20-25% del total del trabajo, entre 12 y 15 enzimas son evaluadas rutinariamente.

Mediciones de la actividad de enzimas digestivas en fluidos corporales como ayuda para el diagnóstico datan de comienzos del 1.900 y algunas de aquellas primeras observaciones (ej. amilasa en orina, el primer estudio fue hecho por Wohlgemuth en 1.908) aún son utilizadas

Las mediciones de la actividad enzimática en suero comenzaron entre 1.920 y 1.930 con estudios hechos por Kay, King, Bodanski y Robert, sobre la fosfatasa alcalina en enfermedades óseas y hepáticas.

Poco después, Kuutscher y Wolbergs, así como Gutman y Gutman, reconocieron el valor de los cambios de actividad en suero de la fosfatasa ácida en el diagnóstico del cáncer de próstata.

Una fase importante de la enzimología sérica comenzó en 1.943 con la observación de Warburg y Christian del incremento de enzimas glicolíticas en el suero de ratas con tumores.

La medición de enzimas celulares, libres en el plasma como consecuencia de daño tisular, tuvo un gran empuje en 1.955 cuando La Due, Wroblewski y Karmen informaron el ascenso transitorio en suero de la glutámico oxalacético transaminasa (actualmente aspartato aminotransferasa), luego de un infarto de miocardio. Esta observación marcó el comienzo de una etapa moderna de la enzimología diagnóstica, que se caracterizó por la búsqueda de métodos de mayor sensibilidad clínica y analítica para aquellas enzimas cuyas variaciones de actividad sean específicas de alguna enfermedad u órgano en particular.

Las enzimas son proteínas con propiedad catalítica sobre sustratos específicos. Esta definición indica la propiedad característica de las enzimas, la que es utilizada en el fundamento de los métodos de análisis enzimáticos.

CLASIFICACION FISIOLÓGICA DE LAS ENZIMAS:

Con respecto a su clasificación fisiológica, Buecher había sugerido una agrupación en:

- a) Enzimas plasmoespecíficas
- b) Enzimas no plasmoespecíficas

Las enzimas plasmoespecíficas son componentes funcionales de la sangre. Están por lo común allí y en un nivel de actividad superior al de los tejidos, siendo mantenido su nivel constante

por secreción activa de uno o más órganos. Ejemplo: las enzimas intervinientes en el mecanismo de la coagulación sanguínea.

Las enzimas no plasmoespecíficas no desempeñan función biológica en el plasma; no son, por tanto, constituyentes funcionales plasmáticos y sólo se aprecia una muy pequeña actividad en condiciones normales.

Según el criterio de Schmidt las enzimas pueden clasificarse en:

Enzimas de secreción, que ejercen su actividad fuera de las células que las originaron y dentro de las cuales se ubican aquellas que actúan en el plasma (mecanismo de la coagulación) y las que obran sobre el tracto digestivo (enzimas o fermentos digestivos).

Enzimas celulares, que son las que se ubican en los distintos componentes celulares y cuya salida es producto de permanente intercambio célula/plasma, o bien, producto de una alteración del receptáculo contenedor (la célula).

Se pudo lograr una suerte de conjunción de ambos criterios y clasificarlas como:

1. Plasmoespecíficas:

Cumplen su función específicamente en el plasma.

Son de síntesis hepática.

Su valor clínico está dado por la disminución de su actividad en plasma.

Ejemplo: Colinesterasa, factores de la coagulación, proteínas relacionadas al sistema fibrinolítico.

2. No Plasmoespecíficas:

Su función es a nivel intracelular o tracto gastrointestinal, en el plasma se desconoce su función.

Se cree que su presencia en circulación es producto del permanente turn over existente entre la célula y la circulación.

Su valor clínico está dado por el aumento de su actividad en plasma, y a través de sus variaciones se intentan conocer localización y naturaleza de los cambios patológicos de los tejidos en el organismo.

Ejemplo: Aspartato amino transferasa; Creatin fosfoquinasa; Aldolasa

2.a) Enzimas Secretadas o exocitoenzimas:

Son las provenientes de glándulas exócrinas (páncreas, próstata, mucosa gástrica).

No cumplen su función en circulación, pero presentan un nivel de actividad dentro de un rango de referencia. (Ejemplo: Amilasa, Quimiotripsina, Fosfatasa Ácida prostática)

2.b) Enzimas Celulares o endocitoenzimas:

Son las que dan las bases a la enzimología clínica.

Se sintetizan y actúan dentro de la célula.

Estas a su vez pueden ser:

2.b.1) Ubicuas: son las que están ampliamente distribuídas en todos los tejidos. La mayoría pertenece a este grupo. (Ejemplo: Láctico deshidrogenasa)

2.b.2) Órgano-específicas: son las más valiosas desde el punto clínico. Actúan en procesos metabólicos altamente específicos por lo tanto se las encuentra en determinados órganos. Dentro de este grupo están las isoenzimas. (Ejemplo: 5-Nucleotidasa)

Estas enzimas en las células de los tejidos, que forman parte de órganos, pueden encontrarse en diferentes áreas de la célula como ser: membrana citoplasmática, citoplasma, organelas citoplasmáticas. Así como también una enzima puede tener diferentes concentraciones en diferentes órganos., debido a sus diferentes Isoenzimas. *Fig N°1, Fig N°2 y Fig N°3*

Fig N°1 Distribución de algunas enzimas en los diferentes órganos

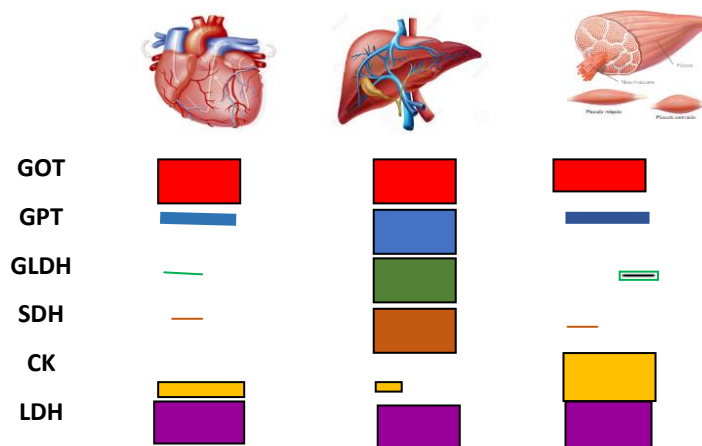


Fig N°2. Distribución de algunas enzimas dentro de la célula

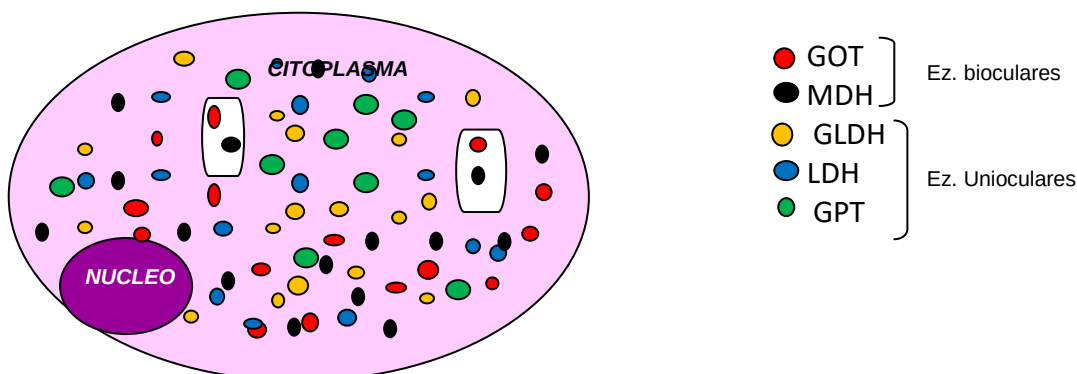
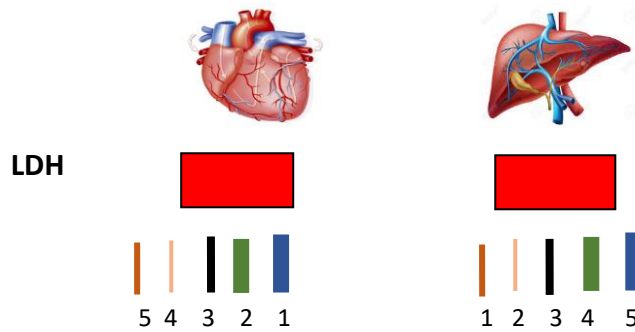


Fig N°3. Distribución de las isoenzimas de LDH, en el hígado y corazón.



NOMENCLATURA DE LAS ENZIMAS

En un principio las enzimas se denominaban según:

- ***Su Función***
- ***Tipo de Sustrato sobre el que actuaba***

Ej. Lactato deshidrogenasa (LDH). Cataliza la deshidrogenación del piruvato para convertirlo en lactato.

Ej. Ureasa: el sustrato sobre el cual actúa la enzima es la urea

Lipasa: los sustratos sobre los cuales actúa la enzima son los lípidos

“Muchas de estas denominaciones se mantienen en la actualidad”. Pero dada la creciente complejidad de nombres hallados en la bibliografía y el hallazgo de un número cada vez mayor de enzimas, es que: **La Unión Internacional de Bioquímica (UIB)**, a través de la Comisión de Enzimas (EC), establece el siguiente Código Numérico para la denominación de las enzimas:

E.C. N° N° N° N°

Dónde: E.C.= Comisión de enzimas.; N°= Número de clase; N°= Número de subclase; N°= Número de subsubclase; N°= Número específico para cada enzima.

En función de su acción catalítica específica, las enzimas se clasifican en 6 grandes grupos o clases:

CLASE 1: OXIDORREDUCTASAS

CLASE 2: TRANSFERASAS

CLASE 3: HIDROLASAS

CLASE 4: LIASAS

CLASE 5: ISOMERASAS

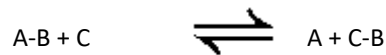
CLASE 6: LIGASAS

CLASE 1: OXIDORREDUCTASAS Catalizan reacciones de oxidorreducción, es decir, transferencia de hidrógeno (H) o electrones (e-) de un sustrato a otro, según la reacción general:

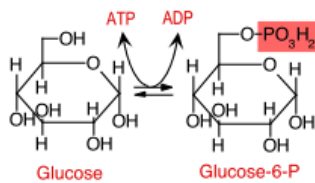


Ejemplos son el succinato deshidrogenasa o la citocromo c oxidasa.

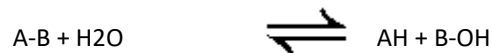
CLASE 2: TRANSFERASAS Catalizan la transferencia de un grupo químico (distinto del hidrógeno) de un sustrato a otro, según la reacción:



Un ejemplo es la glucoquinasa, que cataliza la reacción representada en la Figura de la derecha:



CLASE 3: HIDROLASAS: Catalizan las reacciones de hidrólisis:



Un ejemplo es la lactasa, que cataliza la reacción:



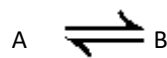
CLASE 4: LIASAS: Catalizan reacciones de ruptura o soldadura de sustratos:



Un ejemplo es la acetacetato descarboxilasa, que cataliza la reacción:



CLASE 5: ISOMERASAS: Catalizan la interconversión de isómeros:

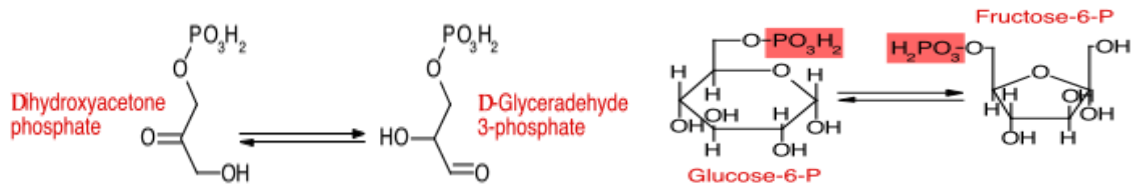


Son ejemplos la fosfotriosa isomerasa y la fosfoglucosa isomerasa, que catalizan las reacciones representadas en la tabla inferior:

fosfotriosa isomerasa

fosfoglucosa isomerasa

gliceraldehído-3-fosfato	$\rightleftharpoons$	dihidroxiacetona-fosfato	glucosa-6-fosfato	$\rightleftharpoons$	fructosa-6-fosfato
--------------------------	----------------------	--------------------------	-------------------	----------------------	--------------------



Clase 6: LIGASAS: Catalizan la unión de dos sustratos con hidrólisis simultánea de un nucleótido trifosfato (ATP, GTP, etc.):



Un ejemplo es la piruvato carboxilasa, que cataliza la reacción:



Ejemplo de la nomenclatura de la EC.: E.C. N° N° N° N°: para Láctico Deshidrogenasa, le corresponde la siguiente nomenclatura:

LDH: E.C.1.1.1.27.

Dónde:

E.C.= Comisión de Enzimas.

1= Oxido Reductasa.

1= La enzima actúa sobre el grupo -CH-OH (de dadores).

1= Indica que el aceptor es el NAD + o el NADP +.

27= Número de serie, particular de la enzima.

ISOENZIMAS

A través de las técnicas de análisis de proteínas desarrolladas, se ha demostrado que, para una misma enzima, de una misma especie, su actividad catalítica se debía a la existencia de varias formas molecularmente diferentes de esa misma enzima, pudiendo estas variantes provenir o no de un mismo órgano o tipo celular. La existencia de esto se pudo evidenciar a través de diferencias en las propiedades físicas, como la movilidad electroforética, la resistencia a determinados agentes químicos o la inactivación térmica. Sin embargo, todas estas formas de la misma enzima tienen la capacidad de catalizar la misma reacción, actuando sobre el mismo sustrato.

Así la Unión Internacional de Bioquímica (IUB), denomina a las distintas formas moleculares de una misma enzima: isoenzimas o isozimas, restringiendo en este término todas las variantes de origen genético diferente con igual actividad catalítica.

Considerando las distintas causas de multiplicidad de estas formas moleculares o isoenzimas, es que surgen 6 grupos. Tabla Nº1

Tabla Nº1. Multiplicidad Formas Moleculares o Isoenzimas

GRUPO	CAUSA DE MULTIPLICIDAD	EJEMPLO
1	Proteínas genéticamente independientes	ASTmit y ASTcit
2	Heteropolímeros (híbridos) de 2 o más cadenas polipeptídicas, de unión no covalente	LDH, CK
3	Variantes genéticas o Aleloenzimas	G- 6PDH
4	Proteínas conjugadas o derivadas: Proteínas conjugadas con otros grupos Proteínas derivadas de una sola cadena	Fosfatasa Alcalina. Quimiotripsina
5	Polímeros de una subunidad única	GLDH
6	Formas conformacionalmente diferentes	Enz. alostéricas

Si bien estos grupos representan los posibles orígenes de formación de las distintas formas moleculares o isoenzimas, a través de la lectura de diferentes bibliografías se ha logrado recabar la definición concreta de cuatro grupos: ***Isoenzima Verdadera, Forma Múltiple, Isoforma y Macroenzima.***

ISOENZIMAS VERDADERAS: Son enzimas que cumplen la misma función catalítica, pero poseen distinta constante de Michaelis-Menten (K_m). Son codificadas por diferentes genes, lo que implica diferencias en: Tabla N°2

Estructura Primaria

Inmunoreactividad

Termoestabilidad

Inhibición

Activación

Propiedades Físicas

Tabla N°2: Descripción de Isoenzimas Verdaderas

NOMENCLATURA				
UIB	Común	Abreviatura	Estructura	Nº de isoenzimas
EC.1-1-1-27	Lactato Deshidrogenasa	LDH1, LDH2, LDH3, LDH4, LDH5	Tetramero: H-M (H4, H3M, H2M2, HM3, M4)	5 (cinco)
EC-2-7-3-2	Creatinfosfo Quinasa	CK1-CK2-CK3- CKmit	Dímero: B/M (BB, MB, MM)	4 (cuatro)
EC. 3-1-3-1	Fosfatasa Alcalina	FASA, FAL, ALP	Tejido inespecífico –Cr1 Tejido intestinal-Cr2 Tejido Placentario-Cr2 Oncofetales Carcinoembrionarias	Cr 1 Cr 2 Cr2 Cr 2
			De la Placentaria	IsoE Regan IsoE Nagao IsoE PL IsoE PLAP-Like
			De la Intestinal:	IsoE Kasahra IsoE Intestinal-Like
E.C -3-1-3-55'	Nucleotidasa	5-N		Isoenzimas Kasahra Isoenzimas Intestinal-Like
EC-3-1-1-8	Pseudocolinester asa	PSCHE		USUAL: C 1/ C-2/C-3/ C-4/C 5 Atípica Fluoruro Resistente Silente Cyntiana Otras: K – H-J
Ec- Ec-2-6-1-1	Transaminasa Glutamato-Oxalacetato-Transaminasa Aspartato Aminotransferasa	ASAT/GOT ALAT/GPT		Mitocondrial (40%) Citoplasmatica (60%) Citoplasmatica (100%)
EC-2-3-2-1	Gama-Glutamil-Transferasa- G-Test	GGT		4 Isoenzimas:1,2,3, 4
EC.3.2.1.1	Amilasa Alfa-D-Glucan Glucano Hidrolasa			Salival: S1- S2- S3 Pancreatica: P1- P2
EC.3.1.1.3	Lipasa Triacil Glicerol Acilhidrolasa.			L 1, L 2, L 3
EC-3-1-3-2	Fosfatasa Acida			+ de 20 isoenzimas. Importancia clínica son 6 isoenzimas: 0 - 1 - 2 - 3 – 4-5

FORMAS MÚLTIPLES: son enzimas codificadas por gen único. Pero la molécula sufre modificaciones post-traslacionales, intracelulares. Poseen propiedades en común especialmente las relacionadas a su actividad catalítica

Ejemplos:

FASA que deriva de los tejidos inespecíficos: Se diferencian por presentar distintos grados de sialización a nivel del Aparato de Golgi.

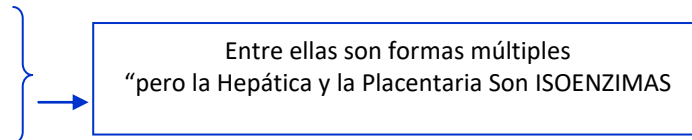
FM-Hepática

FM-Ósea

FM-Renal

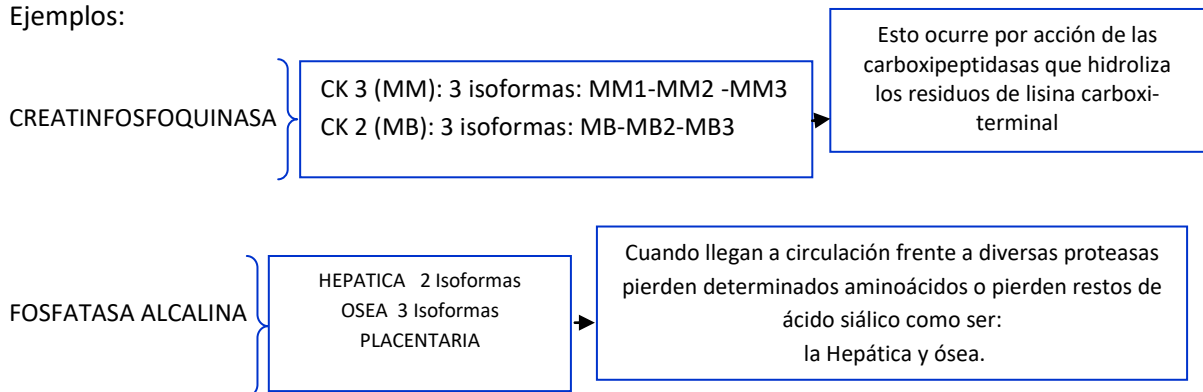
FM-Leucocitos

Amilasa pierde grupos amino.



ISOFORMAS: Enzimas codificadas por el mismo gen. Pero que sufren modificaciones moleculares cuando son volcadas al plasma (circulación).

Ejemplos:



MACROENZIMAS: Son enzimas que alcanzan circulación y en la misma presentan un PM superior al que normalmente tienen, lo que les prolonga su tiempo de vida media.

Así las podemos dividir genéricamente en dos grupos:

Enzimas unidas a Inmunoglobulinas =Forman Inmunocomplejos.

Enzimas que no están unidas a Inmunoglobulinas

Ejemplos:

MACROKINASA 1 → (MK 1); BB-IgG o IgA
MACROKINASA 2 → (MK-2): Oligómeros de CK-MM
CK-MiMi: → es una MM sintetizada en la mitocondria,
Similar a la CK-MM, pero de PM mayor

FASA-Biliar
FASA-Inmonoglobulinas
MACROAMILASA: AMILASA- IgA o IgG
MACROLIPASA:
LIPASA-RAPIDA: Lipasa unidas a moléculas NO Igs.

PRINCIPIOS DEL DIAGNOSTICO ENZIMATICO:

Todos los cientos de enzimas diferentes que se encuentran en el cuerpo humano son sintetizados intracelularmente y la gran mayoría de ellas cumplen sus funciones dentro de las células donde son sintetizadas. No obstante, algunas enzimas son secretadas en su forma inactiva, posteriormente activadas para cumplir su función en el líquido extracelular, los ejemplos más representativos de estas enzimas son las proteasas y otras hidrolasas secretadas al tracto gastrointestinal, tales como Amilasa pancreática, pueden encontrarse en la sangre. Otro ejemplo de enzimas secretadas incluye a las enzimas de los mecanismos de la coagulación y aquellas relacionadas con la fibrinólisis, las cuales se vuelven funcionalmente activas en el plasma y son llamadas plasmó-específicas. La Colinesterasa es liberada por el hígado al plasma en su forma activa, pero su función allí no está claramente reconocida.

¿Por qué hablamos de rama especial?

Esto se debe a la peculiaridad con que se valoran las enzimas, estas a diferencia de otros metabolitos no se cuantifican en forma de masa; si no que, se las valora en función de su actividad catalítica a través de la velocidad de reacciones específicas que ellas catalizan.

¿Qué utilidad clínica poseen las Enzimas? Son marcadores biológicos de ciertas situaciones clínicas, por lo tanto, permiten el:

Diagnóstico presuntivo

Diagnóstico

Confirmación de sospecha diagnóstica

Seguimiento

FACTORES QUE AFECTAN LOS NIVELES ENZIMATICOS EN PLASMA:

La medida del nivel de actividad de una enzima en plasma, resulta del balance existente entre la velocidad con la que ingresa a la circulación y la velocidad con la que es removida de la misma o inactivada.

De estos, los por mucho más importantes, son los que modifican la actividad de las enzimas en suero o plasma, por alteraciones en la velocidad con la que las enzimas entran a la circulación desde las células.

Estos factores se pueden dividir en dos categorías:

Aquellos que afectan la velocidad con que las enzimas salen de la célula.

Aquellos que reflejan alteraciones en la velocidad de producción de las enzimas; ya sea incremento en la síntesis de una enzima en particular por un tipo de células o proliferación de un tipo celular en particular encargado de producir una enzima.

1. ENTRADA DE LAS ENZIMAS A CIRCULACION SANGUINEA**Salida de las Enzimas desde las Células:**

Las enzimas son retenidas dentro de las células de origen por la membrana citoplasmática. La integridad de esta última depende entre otras cosas de la producción de energía de la célula. La producción de energía puede ser alterada, ya sea por disminución de los sustratos oxidables de las células o por disminución de la eficiencia de la producción de energía debida a restricción del ingreso de oxígeno, provocando en ambos casos el deterioro de la membrana citoplasmática.

Las moléculas pequeñas son las primeras en salir desde las células enfermas o dañadas, seguidas por moléculas más grandes como las enzimas y finalmente todo el contenido de la célula es vaciado cuando existe necrosis. A causa de la elevada concentración de enzimas dentro de las células (unas mil o diez mil veces más que en el fluido extracelular), y debido a la sensibilidad con que pequeñas cantidades de enzimas pueden ser detectadas por su actividad catalítica, el incremento en la actividad de una enzima en el plasma es un indicador extremadamente sensible de daño tisular, algunas de las causas son citadas en la Tabla N°3

Tabla N°3. Causas de Daño o Muerte Celular:

CAUSALES	EJEMPLOS
Hipoxia (frecuente en varias patologías)	Placas de Ateromas. Trombosis. Insuficiencia cardiorrespiratoria. Anemias
Drogas y Sustancias Químicas	Mercurio. Alcohol. Tabaco, etc.
Agentes Físicos	Energía Eléctrica. Radiaciones. Fríos y Calores extremos. Traumas
Agentes Microbiológicos	Bacterias. Virus. Hongos. Protozoos.
Mecanismos Inmunes	Anafilaxia. Citotoxicidad. Hipersensibilidad mediada por células.
Defectos Genéticos	Desórdenes con herencia poligénica. Desórdenes mendelianos.
Desordenes Nutricionales	Malnutrición. Deficiencia de Vitaminas y Minerales.
Proliferación celular desregulada	Aumento del N° de Células
Estimulación de síntesis celular	Inducción Enzimática

El ataque directo de las membranas por agentes tales como virus o sustancias orgánicas es una causa obvia de liberación enzimática y esto es particularmente importante en el hígado. Por otra parte, una disminución en el suministro de la perfusión de sangre oxigenada a los tejidos, promueve la liberación de enzima.

La condición clínica más representativa donde existe disminución del suministro de sangre oxigenada es el infarto de miocardio, cuando se produce la oclusión de una rama de la arteria coronaria, usualmente por un coagulo sanguíneo, esto impide que un sector del corazón sea provisto, de oxígeno y metabolitos oxidables. Las células de la región afectada rápidamente comienzan a deteriorarse, liberando su contenido enzimático. La transferencia de las enzimas al

líquido extracelular y por lo tanto a la circulación general se evidencia por el rápido ascenso de la actividad enzimática en el suero.

Los infartos hepáticos son excepcionales a causa de la doble provisión de sangre al hígado, a través de la arteria hepática y el sistema portal. La sangre desde esos orígenes, atraviesa las sinusoides y desemboca en las venas centrales (en el área centrilobulillar), las cuales a su vez desembocan en la vena hepática. La vena hepática se empalma a la vena cava inferior, la cual se extiende al atrio derecho del corazón.

El hígado es muy sensible a la hipoxia, la cual puede resultar de una reducción en el flujo de sangre esperado o de una disminución de la capacidad cardíaca (falla cardíaca). Otro factor puede ser la hipertensión venosa hepática, a causa de una falla en el lado derecho del corazón. La hipoxia debido a cualquiera de los factores, es más severa en el área centrilobulillar del hígado, con la consecuente liberación enzimática y necrosis celular. El tercer factor que más contribuye a la hipoxia centrilobulillar es la hipoxemia arterial. El efecto observado la mayoría de las veces es la elevación de la actividad enzimática en la sangre de las enzimas hepatocelulares, acompañada de una variedad de condiciones tales como: falla cardíaca congestiva, shock e hipoxemia. Si la falla del corazón es prolongada, estos procesos van produciendo cicatrices en las venas centrales de los lobulillos hepáticos, condición conocida como esclerosis o cirrosis hepática post-cardíaca.

Otros tejidos, como el músculo esquelético, también pueden liberar sus enzimas a la circulación. Nuevamente, las causas más frecuentes son: baja perfusión del músculo con sangre oxigenada, hipotermia, con la consiguiente reducción en la producción de energía, así como también traumatismo directo del músculo. Otras patologías del músculo esquelético como infección, inflamación (ej. polimiositis), cambios degenerativos (ej. distrofias), drogas, alcohol (ej. miopatía alcohólica), también causan la liberación de las enzimas desde los miocitos. Enzimas relacionadas al músculo y otros tejidos también aparecen como resultado de anestesia, probablemente debido a la combinación entre perfusión desmejorada y efecto tóxico directo del agente anestésico sobre la membrana celular.

Flujo de las enzimas que salen de las células dañadas:

Las condiciones para que las enzimas salgan de los tejidos ya han sido detalladas. Ahora, la velocidad y extensión con que estos procesos reflejan cambios enzimáticos en la sangre, depende de varios factores.

La fuerza que impulsa la salida de las enzimas es el excesivo gradiente de actividad enzimática existente entre el interior y el exterior de las células. La velocidad de escape de moléculas de enzimas es probablemente controlada en alguna medida por difusión; por lo tanto, moléculas de enzimas más pequeñas pueden llegar más rápidamente al líquido extracelular que otras más

grandes. El camino a través del cual las enzimas son transportadas al plasma desde el líquido extracelular, probablemente varíe de un tejido a otro. En el hígado exista una transferencia directa debido a que este es un tejido altamente vascularizado y con mucha permeabilidad capilar.

Por otra parte, los capilares del músculo esquelético son relativamente impermeables y probablemente en estos tejidos la llegada de las enzimas a circulación ocurra por vía linfática. Esto ha sido demostrado en experimentos en los cuales la velocidad de entrada de la enzima liberada de un miembro isquémico a circulación se veía demorada si el miembro era inmovilizado y se aceleraba si el miembro era ejercitado, lo cual estimula el drenaje linfático. Esta vía también es importante cuando existe daño de células miocárdicas. En este caso la acción de bombeo del corazón mantiene un flujo linfático permanente.

La localización intracelular de las enzimas que salen también afecta la velocidad con que ellas llegan a circulación. Como es de esperar los indicadores más sensibles de daño celular son las enzimas que se encuentran en la fracción soluble de la célula (citoplasma), Las enzimas asociadas a estructuras subcelulares como las mitocondrias, salen a circulación con menor facilidad, este factor ha sido utilizado para intentar distinguir procesos de tipo reversible, donde solamente existe daño de membrana; de otras lesiones de tipo necrótico donde las estructuras intracelulares también son destruidas. Esta diferenciación se realiza mediante la comparación de las cantidades relativas de enzimas citoplasmáticas y mitocondriales o isoenzimas que aparecen en circulación. Por otra parte, este intento no siempre se puede llevar a cabo en la práctica.

La relación entre injuria tisular y aparición de enzimas en la circulación es más claramente visualizada en el infarto de miocardio, en el que un corto episodio de daño, es seguido por una rápida transferencia de enzimas a la circulación. A las 24 hs. de transcurrido el I.M., el patrón de las actividades relativas de las enzimas en el suero es muy parecido al del tejido miocárdico. Esta relación no es tan clara en otros episodios como por ej. Enfermedades crónicas del hígado, en donde la liberación de las enzimas a la circulación continúa por un buen período. El patrón de actividades enzimáticas relativas en suero en la enfermedad crónica del hígado puede también variar por diferentes velocidades de remoción de las enzimas desde la circulación y por variaciones en las velocidades de síntesis de las enzimas, debido a la afectación del tejido.

CAMBIOS ENZIMÁTICOS QUE REFLEJAN ALTERACIONES EN LA PRODUCCIÓN DE LAS ENZIMAS.

Parte de las pequeñas cantidades de enzimas intracelulares normalmente presentes en el plasma puede resultar del deterioro normal del tejido sano. Esta contribución de enzimas a la circulación sanguínea puede decrecer por resultado de una deficiencia genética en la producción de las enzimas (ej. el caso para fosfatasa en la hipofosfatasa o en individuos homocigotas para el gen silente de la colinesterasa), o cuando la producción de la enzima está deprimida como producto de

una enfermedad (por ej. la producción de pseudocolinesterasa está deprimida en enfermedades hepáticas). Por cierto, los casos en los que existe incremento de la actividad en suero son los de mayor interés clínico y diagnóstico.

Un incremento en el número y actividad de las células del hueso productoras de fosfatasa alcalina (los osteoblastos) son los responsables de los niveles de fosfatasa alcalina en el suero de niños normales en crecimiento. Llegando al final del embarazo normal, la placenta constituye una nueva fuente de fosfatasa alcalina, con el consecuente aporte de la isoenzima placentaria a la circulación materna.

También existe incremento de la actividad osteoblástica y por ende de la actividad enzimática en suero, en varias enfermedades óseas.

Se ha demostrado recientemente que la obstrucción biliar estimula la producción de fosfatasa alcalina por el hígado, conociéndose ésto como inducción enzimática, ésta es la vía de muchos sino de todos los incrementos observados en la enfermedad hepatobiliar. De cualquier modo, la naturaleza de esta inducción aún no se conoce.

La inducción de enzimas por otros agentes como drogas o alcohol, pueden incrementar la producción, un ejemplo familiar de inducción es el aumento de la gamma-GT como resultado de la administración de drogas como los barbitúricos o fenantoína o consumo excesivo de etanol.

Proliferación de células productoras de fosfatasa ácida, responsables del incremento de fosfatasa ácida prostática, es una característica de las $\frac{3}{4}$ partes de los carcinomas metastásicos de próstata. Como las células malignas atraviesan la cápsula de la glándula prostática, es más favorable la contribución de la isoenzima a la circulación.

Sin embargo, en este caso, la cantidad de enzima producida por cada célula es frecuentemente menor que aquella producida por una célula prostática normal y puede llegar a cero cuando las células del cáncer se vuelven cada vez menos parecidas a las células prostáticas. En contraste con ésto las células del cáncer de próstata producen diez veces más antígeno prostático (PSA) (una serina proteasa) que las células prostáticas normales, por lo que es considerado un marcador superior que la fosfatasa ácida prostática para el cáncer de próstata.

OTROS MECANISMOS:

La liberación de las enzimas desde las células dañadas o enfermas y los cambios en la velocidad de producción enzimática son los mecanismos más importantes por los cuales varía una actividad enzimática en el suero o plasma.

Sin embargo, existen otras posibilidades y se intentan explicar algunos cambios de importancia diagnóstica. Por ejemplo, gran parte de la actividad de la gamma-GT del hígado está localizada en la superficie exterior de la célula. Es posible que ectoenzimas como éstas puedan ser

eluídas desde la superficie, especialmente donde ésto se incrementa por la acción detergente de la sangre y la continua acumulación de sales biliares. Este proceso no implica daño celular, sino permeabilidad de la membrana aumentada, lo que es evidenciado por la falta de correlación entre las actividades de gammaGT y amino transferasas en suero en enfermedades hepáticas de diferentes tipos.

CLEARANCE DE ENZIMAS:

Actualmente existen evidencias a cerca del camino a través del cual las enzimas son removidas de la circulación. Pocas moléculas de enzimas son lo suficientemente pequeñas para atravesar los glomérulos sanos del riñón, y por lo tanto la vía urinaria no es la principal ruta de eliminación de las enzimas de la circulación. Una excepción a esto, es la amilasa; niveles incrementados de esta enzima en plasma (ej. Pancreatitis aguda) se acompañan de incrementos de la enzima en orina.

La importancia de esta ruta está demostrada por la magnitud de la elevación de la actividad de la amilasa en el plasma en presencia de macroamilasemia.

Evidencias actuales sugieren que la inactivación comienza en el plasma y que las enzimas inactivadas son rápidamente removidas, probablemente por el sistema retículo endotelial de la médula, Bazo e hígado o, en menor grado por todas las células del cuerpo.

Los mecanismos de la endocitosis mediada por receptores incluyen: el reconocimiento, la acumulación específica y la captación de proteínas por los receptores de superficie celular específicos, seguida por fusión con los lisosomas, digestión de las proteínas ingeridas y regreso del receptor a la membrana celular. Por ej., las células hepáticas de Kupffer's han sido demostradas como captadoras mediante la endocitosis mediada por receptores, de enzimas derivadas de diferentes tejidos, como LD5, CK3, AK, AST citoplasmática y mitocondrial y la malato y alcohol deshidrogenasa, las cuales pueden tener afinidad por los residuos de lisina de estas enzimas.

En el adulto la isoforma de la fosfatasa alcalina intestinal es una glicoprotina galactosil-Terminal que reacciona con un receptor galactosil-específico de la membrana del hepatocito con la subsiguiente endocitosis. Esto es muy rápido si consideramos la corta vida media de esta isoforma en el plasma. Sin embargo, en la cirrosis hepática, en la cual hay una considerable reducción de masa celular parenquimatosa, frecuentemente ocurre que los niveles en el plasma y la vida media de esta isoforma se ven incrementados. Este ejemplo conjuntamente con el de la macroamilasemia fueron los primeros en ilustrar la importancia de la comprensión de los procesos por los cuales las enzimas son removidas del plasma. Por otra parte, se recuerda que otras isoformas de la fosfatasa alcalina son sialoglicoproteínas que no reaccionan con el receptor galactosil y son por lo tanto "protegidas" de su remoción del plasma.

Por cierto, actualmente existen muchos ejemplos de fosfatas alcalinas con exceso de sialización, producidas por células malignas, lo que prolonga su vida media y por lo tanto facilita su detección.

La existencia de activadores e inhibidores de estas enzimas en circulación tienen poco efecto sobre las medidas de las actividades en el laboratorio donde estos inhibidores son de naturaleza reversible y además las diluciones relativamente altas de los sueros usados en la mayoría de los ensayos modernos, son suficientes para eliminar cualquier posible efecto sobre las mediciones de las actividades enzimáticas.

Vida Media De Las Enzimas

La vida media de las enzimas en el plasma varía desde unas pocas horas a varios días, pero en la mayoría de los casos oscila entre las 24 a 48 h, existiendo algunas excepciones. Tabla Nº4

Tabla Nº4. Vida Media de las Enzimas más Comunes

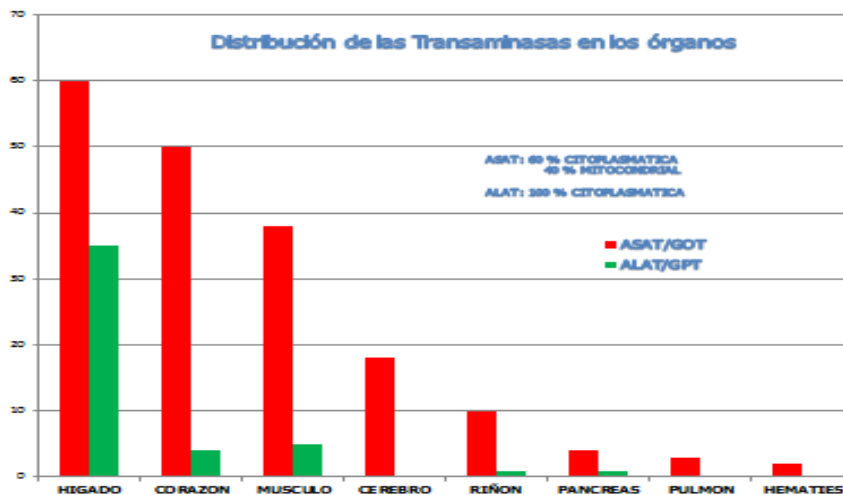
ENZIMAS	TIEMPO DE VIDA $\frac{1}{2}$ (horas)	PESO MOLECULAR
Alanina aminotransferasa	50	110.000
Aspartato amino transferasa (total)	12	-
Isoenz. Citoplasmática	14	120.000
Isoenz. Mitocondrial	6	100.000
Lactato deshidrogenasa:		
LDH 1	107	135.000
LDH 2	10	135.000
Creatin-quinasa Total	12	-
CK 1	20	85.000
CK 2	10	87.000
CK 3	3	88.400
Fosfatasa alcalina		
Intestinal	< 1	-
Ósea	40	-
Placentaria	170	120.000
Ag. Prostático específico	76	34.000

SELECCIÓN DE ENZIMAS A EVALUAR

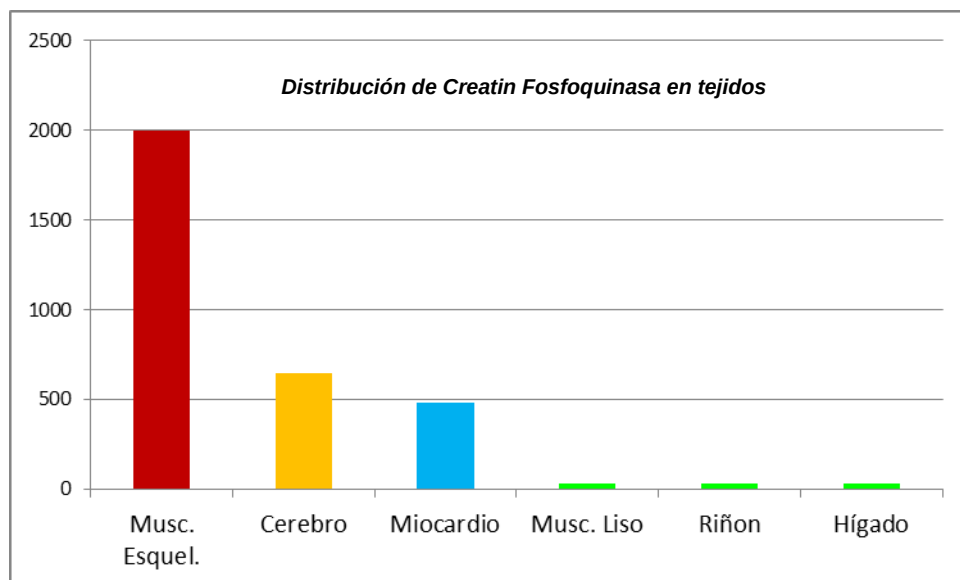
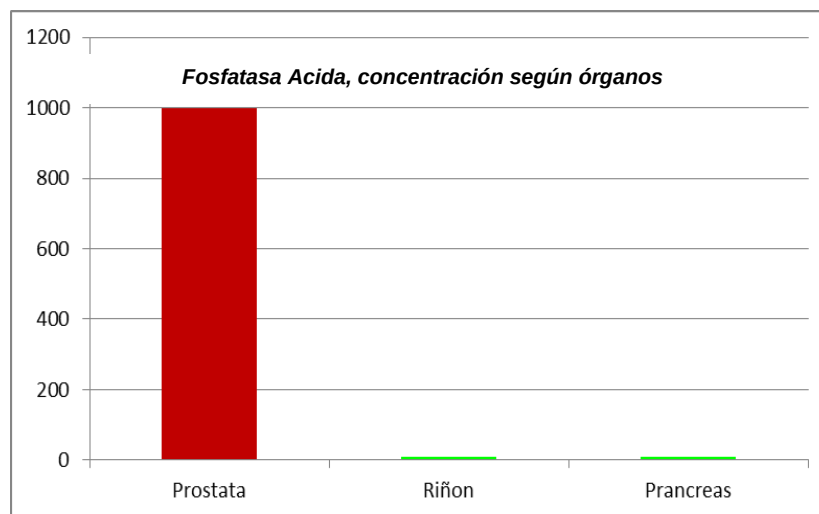
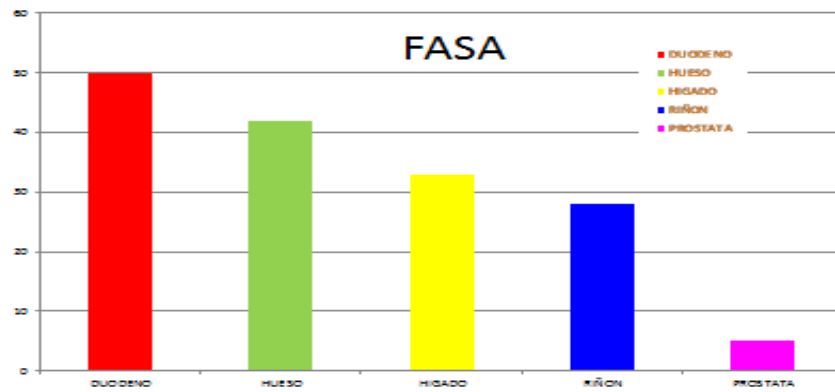
La selección de cuales enzimas medir en suero para un diagnóstico o pronóstico determinado depende de varios factores. Un factor importante es la distribución de la enzima en los diferentes tejidos. Las enzimas de mayor valor clínico, junto con sus tejidos de origen y su aplicación clínica se citan en la *Tabla Nº 5. Gráficos*,

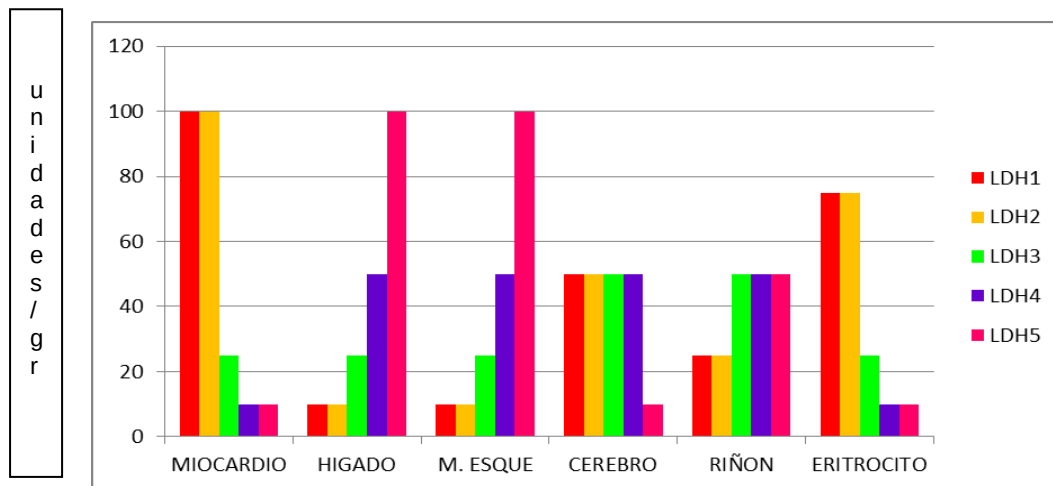
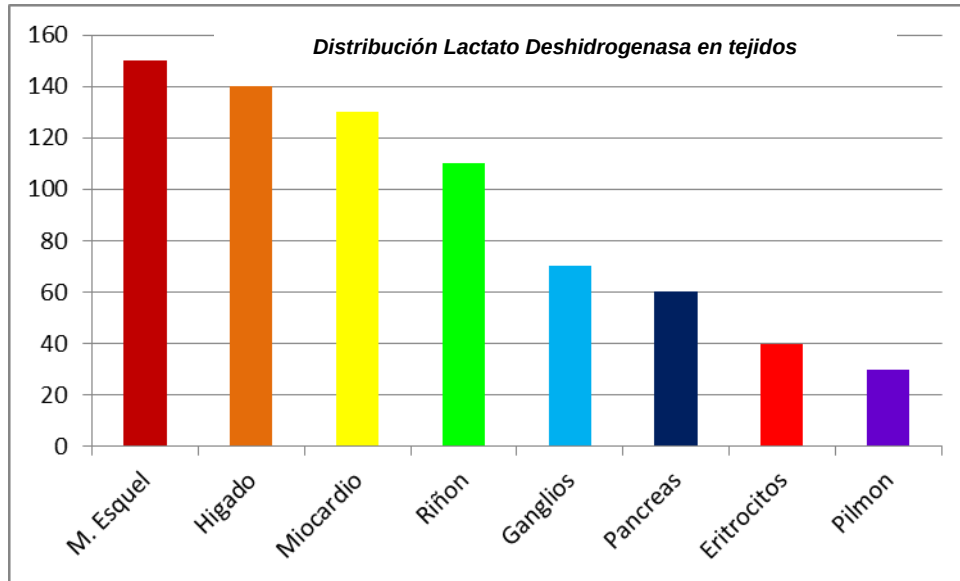
Tabla Nº 5 Distribución de las enzimas con valor clínico según órgano

ENZIMAS	TEJIDOS	APLICACIÓN CLÍNICA
Fosfatasa Ácida	Próstata. Eritrocitos.	Cáncer de próstata.
Alanina aminotransferasa	Hígado. Músculo esquelético. Corazón.	Enfermedades musculares y hepáticas.
Fosfatasa Alcalina	Hígado. Hueso. Mucosa intestinal. Placenta. Riñón.	Enfermedades óseas y hepatobiliares.
Amilasa	Glándula salival. Páncreas. Ovario.	Enfermedades pancreáticas.
Lipasa	Páncreas	Enfermedades pancreáticas.
Aspartato aminotransferasa	Hígado. Músculo esquelético. Corazón. Riñón. Eritrocitos.	Enfermedades del parénquima hepático, musculares e infarto de miocardio.
Pseudo-Colinesterasa	Hígado	Exposición a órgano-fosforados. Sensibilidad al suxametonio. Enfermedades del parénquima hepático.
Creatín fosfoquinasa	Músculo esquelético. Cerebro.	Infarto de miocardio. Enfermedades musculares.
Glutámico deshidrogenada	Hígado.	Enfermedades del parénquima hepático.
Gamma glutamil transferasa	Hígado. Riñón.	Enfermedades hepatobiliares y alcoholismo.
Láctico deshidrogenada	Corazón. Hígado. Músculo esquelético. Eritrocitos. Plaquetas. Nódulos linfoides.	Infarto de miocardio. Hemólisis. Enfermedades del parénquima hepático.
5'Nucleotidasa	Tracto hepatobiliar.	Enfermedades hepatobiliares.
Antígeno específico prostático	Próstata.	Cáncer de próstata.
Sorbitol deshidrogenado	Hígado	Enfermedades del parénquima hepático.
Tripsina	Páncreas.	Enfermedades pancreáticas.



Distribución de Fosfatasa Alcalina en tejidos





No todas las enzimas intracelulares tienen igual valor como indicadores de daño celular. Por ej. la isocitrato deshidrogenasa (ICD) es alta en músculo cardíaco, pero luego del IM, ésta es rápidamente inactivada luego de su entrada al compartimiento vascular. La ornitina carbamil-transferasa es una enzima del ciclo de la urea y por consiguiente casi totalmente específica del hígado, con una relación hígado/sangre de 10 5: 1; por lo que ante el mínimo daño del hepatocito se podrá demostrar la elevación de su nivel en sangre. Pero esta enzima no es de uso clínico frecuente, debido a los inconvenientes que tiene su determinación y por lo tanto existe poca experiencia sobre los datos obtenidos.

La masa del órgano dañado o con mal funcionamiento junto con el gradiente enzimático célula/sangre, obviamente tiene una importante influencia sobre la elevación de la actividad enzimática en la sangre. Están aquellas donde por ej. el gradiente célula/sangre es de 103:1 y la masa del órgano de 20 gr, como lo es la fosfatasa ácida en la próstata, en contraste con por ej. la fosfatasa alcalina en el hígado donde el gradiente es de 104:1 y la masa del órgano puede superar los 1.000 gr.

Obviamente menos células deben ser dañadas en el hígado que en la próstata para que se detecten incrementos en el plasma. Si por otra parte todo el órgano está comprometido, el incremento enzimático será marcadamente superior en el hígado que en la próstata. Se ha estimado que, si solo una célula hepática de cada 750 es dañada, se pueden observar incrementos de ALT detectables en el suero.

Una patología determinada sobre un tejido en particular puede presentar un amplio espectro de efectos. Por ej., en una inflamación reversible del hígado como es el caso de una hepatitis viral, es probable que solo exista aumento de la permeabilidad de la membrana con liberación a la circulación de las enzimas citoplasmáticas, pero en el caso que exista un ataque severo, también habrá necrosis con destrucción de las membranas mitocondriales, y en el suero podrán ser detectadas tanto enzimas citoplasmáticas como mitocondriales.

Finalmente, la selección de una enzima adecuada para propósitos diagnósticos no es suficiente, por lo que generalmente se requiere de la selección de un grupo de enzimas, lo que recibe el nombre de Perfil Enzimático.

Para lograr un perfil enzimático y poder establecer una correcta interpretación del mismo, se deben tener en cuenta los siguientes aspectos de los parámetros que lo conforman:

- * *Distribución en los diferentes órganos.*
- * *Ubicación dentro del órgano.*
- * *Ubicación dentro de la célula.*
- * *Bajo peso molecular*
- * *Tiempo de vida media en circulación.*
- * *Tener elevada concentración en tejido y baja en linfa y sangre.*
- * *Además, se deberá contemplar la irrigación del órgano en cuestión.*
- * *Alta solubilidad.*
- * *Practicabilidad*
- * *Sensibilidad y especificidad diagnóstica*
- * *Disponibilidad de métodos con tiempo analítico corto, económico, sensible, específico, exacto*

ENZIMAS DE USO MÁS FRECUENTE EN CLINICA MÉDICA en PERFILES ENZIMATICOS.

¿Por qué se pueden utilizar las enzimas para el diagnóstico de enfermedades? Porque son marcadoras de enfermedades o disfunciones, por sus características- propiedades.

Características de los enzimas utilizados como marcadores:

Los enzimas que se utilizan en el diagnóstico son enzimas intracelulares, cuya concentración en plasma es muy baja.

La presencia de niveles elevados de enzimas en el suero implica que ha habido lesión celular lo que permite la salida a la circulación de enzimas normalmente confinados en el interior de las células.

La cantidad de actividad enzimática medible depende de su liberación al medio, de la estabilidad del enzima, de su velocidad de eliminación.

Se trata de enzimas (o isoenzimas) que se expresan mayoritariamente en un determinado tejido, pudiendo servir de marcador tisular específico.

Cada órgano o fluido en el cuerpo tiene una cantidad determinada de enzimas intracelulares, cuando hay daño o muerte celular, esto se traduce en un cambio en los niveles de cantidad de enzima y, como consecuencia se producirá una alteración de la actividad enzimática, por lo que, midiendo este cambio en la cantidad de enzima mediante diferentes procedimientos, podemos deducir que el individuo se encuentra en un estado patológico.

Por tanto, es de vital importancia la caracterización de las enzimas.

Es importante resaltar que las decisiones diagnósticas se deben tomar integrando la historia clínica los estudios de laboratorio, y para el presente tema el perfil enzimático PE

¿En qué líquidos biológicos y cuáles son los más frecuentes a la hora de determinar actividades enzimáticas?

- * **Suero** (es la muestra más frecuente)
- * Plasma (obtenida con heparina)
- * Orina
- * Líquidos serosos (Peritoneal, Pleural y Pericárdico)
- * Líquido cefalorraquídeo
- * Líquido sinovial

PRINCIPIOS DEL ANÁLISIS DE ENZIMAS

PRINCIPIOS DEL ANÁLISIS DE ENZIMAS:

La concentración de la mayoría de las enzimas que se encuentran en circulación, es en condiciones fisiológicas, generalmente muy baja. Esto ocurre porque gran parte de ellas y sobre todo las que poseen interés clínico, son enzimas celulares, las que al invadir el plasma disminuyen con rapidez su actividad, no solo por la dilución en el espacio extracelular, sino también porque sus tiempos de vida media son bastante breves.

La cantidad de enzima presente en un fluido biológico es muy difícil de determinar en términos absolutos (mg o moles de la enzima) ya que por lo general en estos medios es muy baja y coexiste con elevadas proporciones de otras proteínas enzimáticas y no enzimáticas.

Una forma de resolver este problema es midiendo la velocidad de la reacción catalizada por la misma, empleando un sustrato específico. Esto es posible porque bajo determinadas condiciones, la velocidad de reacción es directamente proporcional a la cantidad de enzima. Por lo tanto, **el estudio de las enzimas en el laboratorio se basa en la demostración “in vitro” de su actividad catalítica.**

El nivel de actividad de una enzima en sangre es el resultado del balance entre la tasa por la cual ésta entra a circulación proveniente de las células y la tasa por la cual ésta es inactivada o removida.

Su presencia bajo circunstancias fisiológicas es el resultado del envejecimiento y del intercambio normal de las células. Las enzimas liberadas a circulación son usualmente eliminadas a través de los sistemas retículo endotelial, biliar o renal.

Se puede determinar la actividad enzimática analizando, en condiciones óptimas de reacción:

- la **aparición** de algún producto,
- la **desaparición** del sustrato, o
- la **variación** de un cofactor o de algún componente de la reacción.

ASPECTOS GENERALES SOBRE LAS ENZIMAS:

Las enzimas son proteínas que catalizan reacciones químicas en los seres vivos, es decir, sustancias que, sin consumirse en una reacción, aumentan notablemente su velocidad. No hacen factibles las reacciones imposibles, sino que solamente aceleran las que espontáneamente podrían producirse. Ello hace posible que en condiciones fisiológicas tengan lugar reacciones que sin catalizador requerirían condiciones extremas de presión, temperatura o pH.

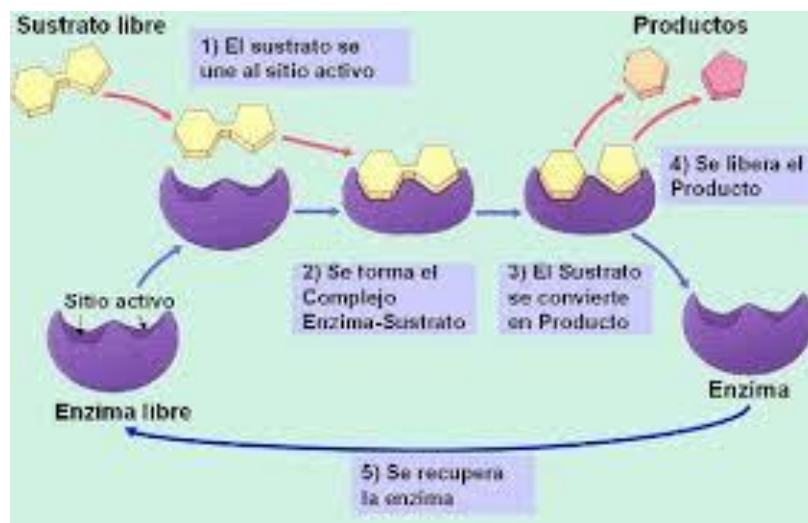
Prácticamente todas las reacciones químicas que tienen lugar en los seres vivos están catalizadas por enzimas. Las enzimas son **catalizadores específicos**: cada enzima cataliza un solo tipo de

reacción, y casi siempre actúa sobre un único sustrato o sobre un grupo muy reducido de ellos. En una reacción catalizada por una enzima:

1. La sustancia sobre la que actúa el enzima se llama **sustrato**.
2. El sustrato se une a una región concreta de la enzima, llamada **centro activo**. El centro activo comprende (1) un sitio de unión formado por los aminoácidos que están en contacto directo con el sustrato y (2) un sitio catalítico, formado por los aminoácidos directamente implicados en el mecanismo de la reacción

Una vez formados los **productos** el enzima puede comenzar un nuevo ciclo de reacción

Representación gráfica de una reacción enzimática.



Las enzimas, a diferencia de los catalizadores inorgánicos catalizan reacciones específicas. Sin embargo, hay **distintos grados de especificidad**. La enzima sacarasa es **muy específica**: rompe el enlace b-glucosídico de la sacarosa o de compuestos muy similares. Así, para la enzima sacarasa, la sacarosa es su **sustrato natural**, mientras que la maltosa y la isomaltosa son **sustratos análogos**. La enzima actúa con máxima eficacia sobre el sustrato natural y con menor eficacia sobre los sustratos análogos. Entre las **enzimas poco específicas** están las proteasas digestivas como la quimotripsina, que rompe los enlaces amida de proteínas y péptidos de muy diverso tipo.

REGULACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

Una molécula de enzima no tiene por qué actuar siempre a la misma velocidad. Su actividad puede estar modulada por:

- cambios en el **pH**
- cambios en **la concentración del tampón**
- cambios en **la naturaleza del tampón.**
- cambios en la **temperatura**

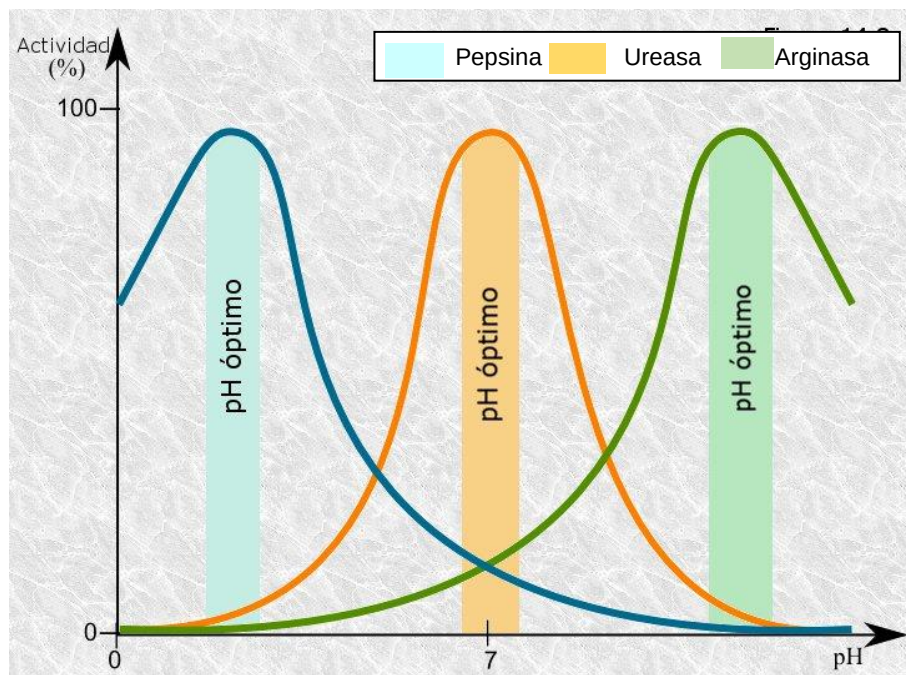
- presencia de **activadores**
- cambios en la **concentración de los activadores**
- las **concentraciones del sustrato y de los productos finales**
- presencia de **inhibidores**
- **modulación alostérica**
- **modificación covalente**
- activación por **proteólisis**
- **isoenzimas**

EFFECTO DEL pH SOBRE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

Las enzimas poseen grupos químicos ionizables (carboxilos COOH ; amino $-\text{NH}_2$; tiol $-\text{SH}$; imidazol, etc.) en las cadenas laterales de sus aminoácidos. Según el pH del medio, estos grupos pueden tener carga eléctrica positiva, negativa o neutra. Como la conformación de las proteínas depende, en parte, de sus cargas eléctricas, habrá un pH en el cual la conformación será la más adecuada para la actividad catalítica (Figura de la derecha). Este es el llamado **pH óptimo**.

La mayoría de las enzimas son muy sensibles a los cambios de pH. Desviaciones de pocas décimas por encima o por debajo del pH óptimo pueden afectar drásticamente su actividad. Así, la pepsina gástrica tiene un pH óptimo de 2, la ureasa lo tiene a pH 7 y la arginasa lo tiene a pH 10 (Figura de la izquierda). Como ligeros cambios del pH pueden provocar la desnaturalización de la proteína, los seres vivos han desarrollado sistemas más o menos complejos para mantener estable el pH intracelular: Los **amortiguadores fisiológicos**.

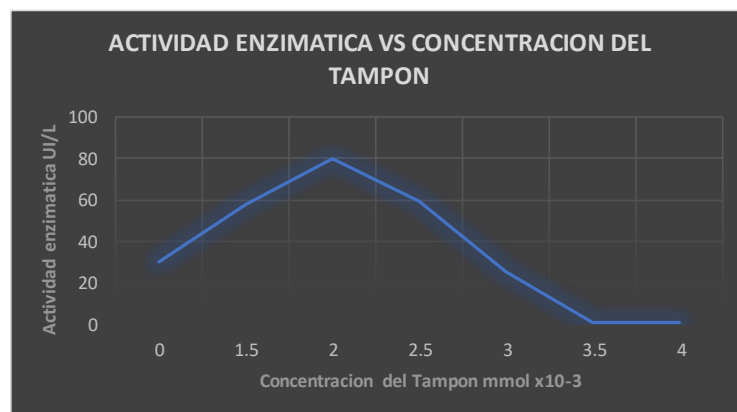
VARIACION DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA VS PH



EFFECTO DE LA CONCENTRACION DEL TAMPON SOBRE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

También en la elección de la concentración del tampón y del pH, hay que establecer un compromiso entre la capacidad tampón óptima, el valor de pH óptimo y la inhibición de la enzima.

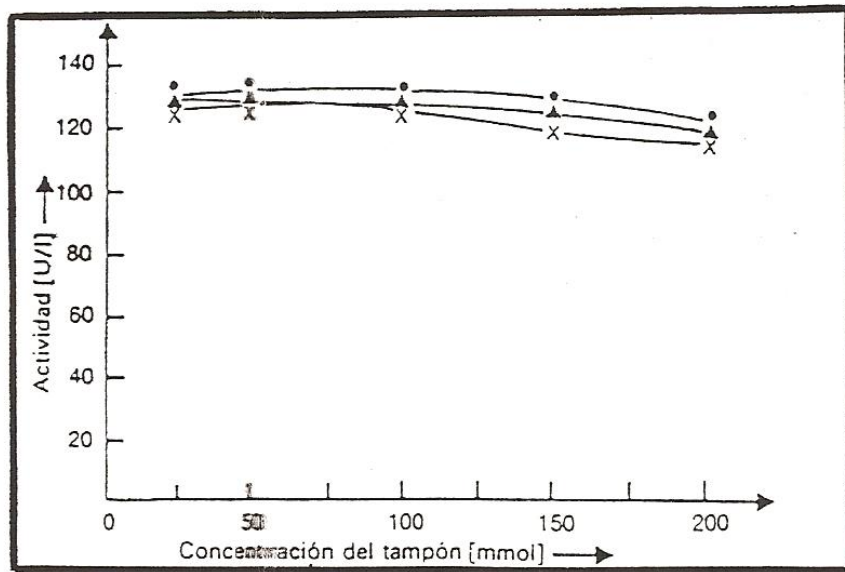
Las reacciones catalizadas enzimáticamente suelen tener lugar en medios tamponados lo suficientemente fuertes como para captar variaciones del pH durante la reacción y mantener el pH óptimo. La capacidad del tampón suele ser suficiente también para mantener el nivel de pH exigido en las muestras que reaccionan con mayor intensidad de acidez o alcalinidad.



EFFECTO DE LA NATURALEZA DEL TAMPON SOBRE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

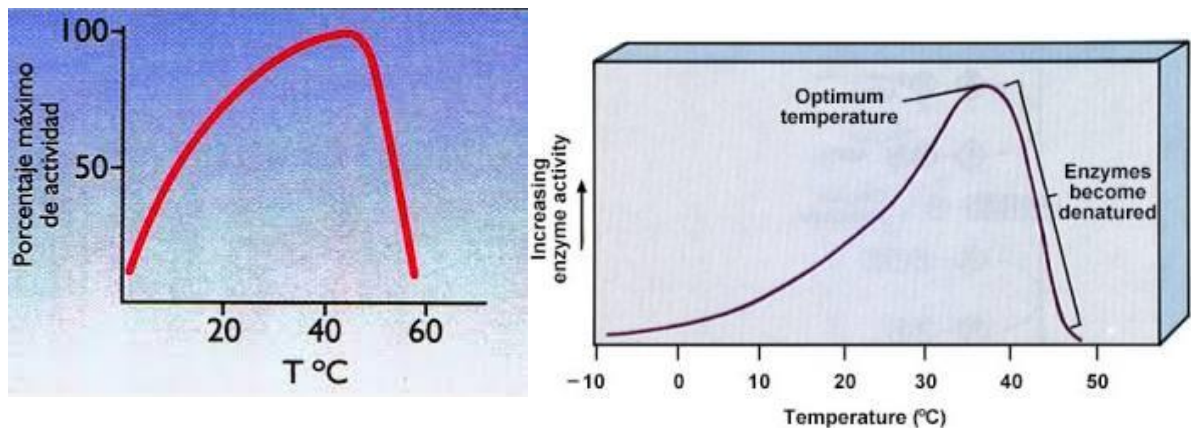
En muchas determinaciones de actividades enzimáticas, carece prácticamente de importancia el tampón que se utilice. Por ej. en la figura se muestra que no aparece diferencia esencial en las actividades de la fosfatasa alcalina al utilizar tampón fosfato, tris o trietanolamina. El tampón fosfato tiene la ventaja de inhibir glutamato-dehidrogenasas perjudiciales en reacciones de transaminación. El tampón tris-hidroximetil-aminometano (tris) actúa como estabilizador en soluciones de NADH e impide el crecimiento de microorganismos. En algunas enzimas resulta importante la clase y concentración del tampón.

Fig. Dependencia de la actividad de la leucín-arilamidasa, respecto a la concentración del tampón (•) tris, (x) trietanolamina y (Δ) tampón fosfato, pH 7,5



En general, los aumentos de temperatura aceleran las reacciones químicas: por cada 10° C de incremento, la velocidad de reacción se duplica. Las reacciones catalizadas por enzimas siguen esta ley general. Sin embargo, al ser proteínas, a partir de cierta temperatura, se empiezan a desnaturalizar por el calor. La temperatura a la cual

EFFECTO DE LA TEMPERATURA SOBRE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA



La velocidad de la reacción debido a la temperatura es contrarrestada por la pérdida de actividad catalítica debida a la desnaturalización térmica, y la actividad enzimática decrece rápidamente hasta anularse.

CONSIDERACIONES PRÁCTICA

Las soluciones o suspensiones de enzimas, y también las enzimas en soluciones de prueba, no deben calentarse en ningún caso por encima de la temperatura crítica de la enzima, si queremos que esta permanezca activa. La temperatura elevada significa una alta velocidad de reacción al principio, pero también menor estabilidad de la enzima. Si se alcanza o sobrepasa la temperatura crítica, aparece al poco tiempo una pérdida de la actividad.

Con temperaturas bajas, la velocidad de reacción se reduce. La reducida actividad de la enzima en estos casos no se basa en una estabilidad reducida, es decir en una modificación de la estructura. Al contrario: la estabilidad de la estructura proteínica de la enzima aumenta generalmente con las temperaturas bajas, lo que equivale a una prolongación de su duración. Por eso las enzimas utilizadas en química clínica se almacenan preferentemente en refrigeradores a 4º C.

La temperatura no solo influye directamente en la velocidad de la reacción, también las concentraciones óptimas de todos los componentes de la reacción, incluida la concentración de hidrógeno, dependen de la temperatura.

Cuando aumenta la temperatura descienden los valores de Km. El pH de las soluciones tampón depende de la temperatura, así como las curvas de absorción de productos de reacción en las reacciones enzimáticas y los valores de extinción de NADH.

Un aumento de temperatura de 10º C conduce a un aumento de actividad de 1, 23 a 3 veces mayor. Por lo tanto, con un aumento de 1º C, la actividad enzimática aumenta en un 2,5-20%. Si el objetivo de la estandarización de los métodos debe ser la posibilidad de comparación general de los resultados de laboratorio, es condición imprescindible un acuerdo sobre la temperatura a emplear en la medición.

Mientras que en Europa Central se mide predominantemente a 25º C, la temperatura más utilizada en otros países es de 30º C y 37º C, cuando se utilizan sistemas cerrados automatizados, en este último caso.

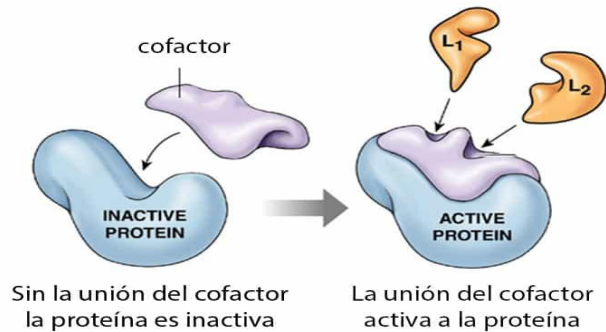
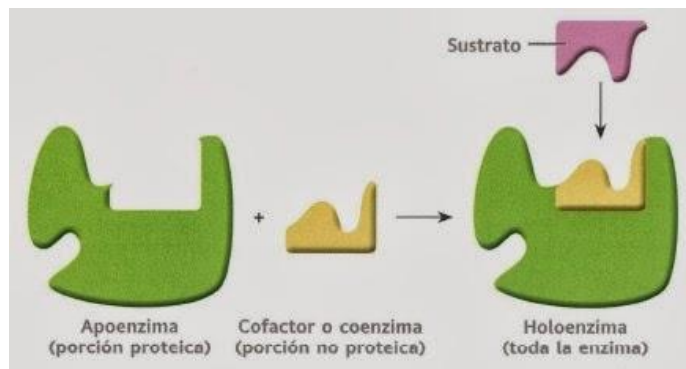
Se ha confirmado experimentalmente que se puede trabajar a 37º C solamente en sistemas cerrados que garanticen el control exacto de la temperatura, de modo que la desviación no sobrepase los 0,05º C.

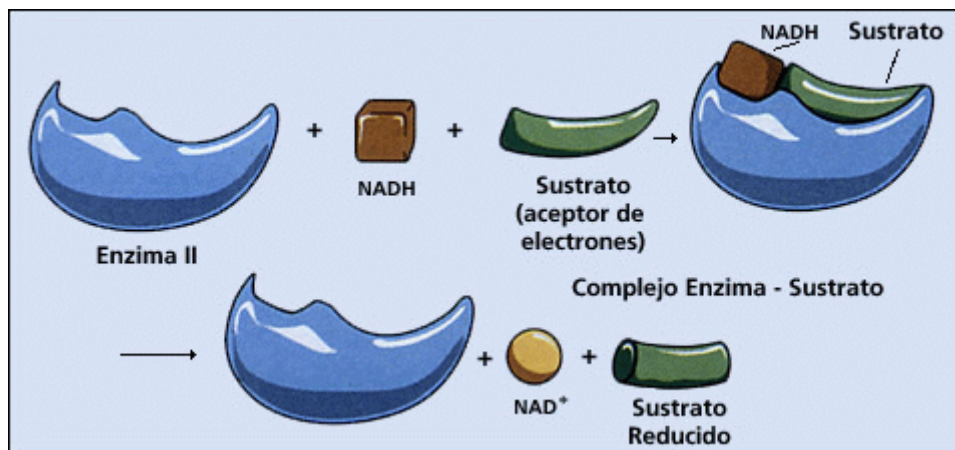
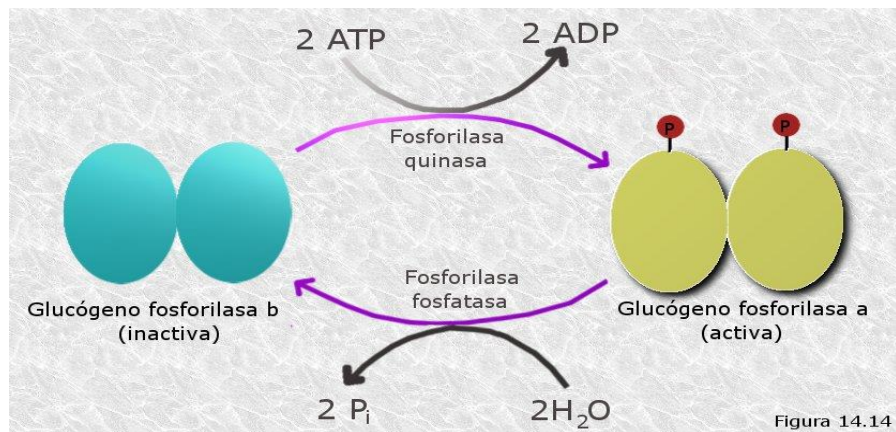
La I.F.C.C. ha estandarizado la temperatura de trabajo en 30º C. Cabe aclarar que todos los equipos automatizados (sistemas cerrados) trabajan a 37º C.

EFFECTO DE LOS ACTIVADORES SOBRE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

A veces, una enzima requiere para su función la presencia de sustancias no proteicas que colaboran en la catálisis: los **cofactores**. Los cofactores pueden ser iones inorgánicos o moléculas orgánicas, en este caso reciben el nombre de **coenzima**. Por lo tanto, el test utilizado debe contener concentraciones suficientes de estos activadores.

Las amilasas necesitan iones Cl^- , las enzimas que transforman el ATP necesitan casi siempre iones de Mg^{++} , numerosas peptidasas son activadas por Mn^{++} , Zn^{++} , Co^{++} .





Las coenzimas utilizadas con mayor frecuencia en Química Clínica son las NADH y NADPH.

RESUMIENDO:

Cofactores: son iones inorgánicos que se unen temporariamente a las enzimas.

Molécula	Papel en la reacción catalizada
Hierro Fe 2+ o Fe 3+	Oxidación / reducción
Cobre, Cu + o Cu 2+	Oxidación / reducción
Cinc, Zn2+	Ayuda a unir el NAD

Coenzimas: son moléculas pequeñas que tienen carbono, interaccionan débilmente durante la catálisis. La mayor parte son vitaminas y deben ser incorporadas con la dieta.

Molécula	Papel en la reacción catalizada
Biotina	transporta -COO- (gpo. carboxilo)
Coenzima A	transporta -CH ₂ -CH ₃ (gpo. acilo)
NAD y FAD (flavín adenín dinucleótido)	transportan electrones

Grupos Prostéticos: están permanentemente unidos a las enzimas

Molécula	Papel en la reacción catalizada
Hemo	une iones O ₂ y electrones, contiene el cofactor hierro
Flavina	Une electrones
Retinal	Cofactor en la absorción de la luz

EFFECTO DE LA CONCENTRACION DE LOS COFACTORES SOBRE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

En muchos casos también se puede observar, como lo muestran las figuras inferiores, una dependencia de la actividad enzimática con respecto a la concentración del activador.

Figura: Dependencia de la actividad de la ATPasa respecto de la ATP⁴⁻ y de la concentración de Mg²⁺.

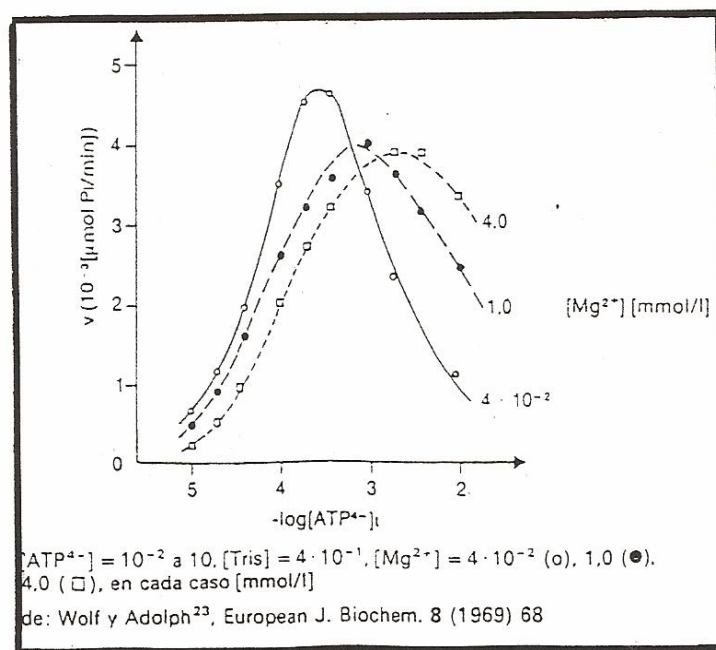
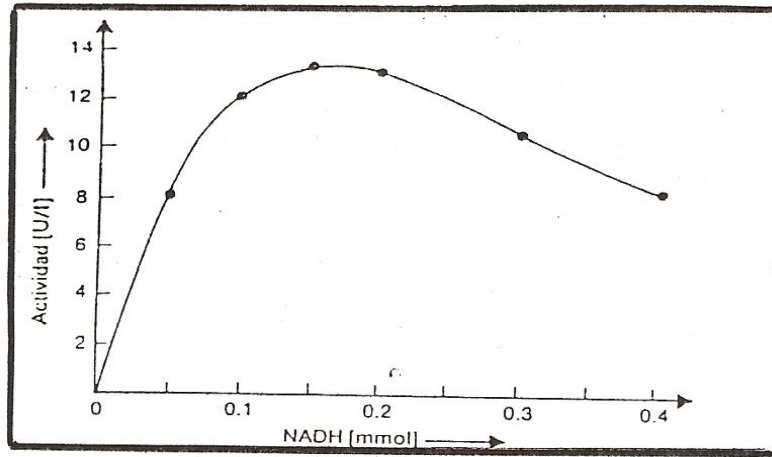


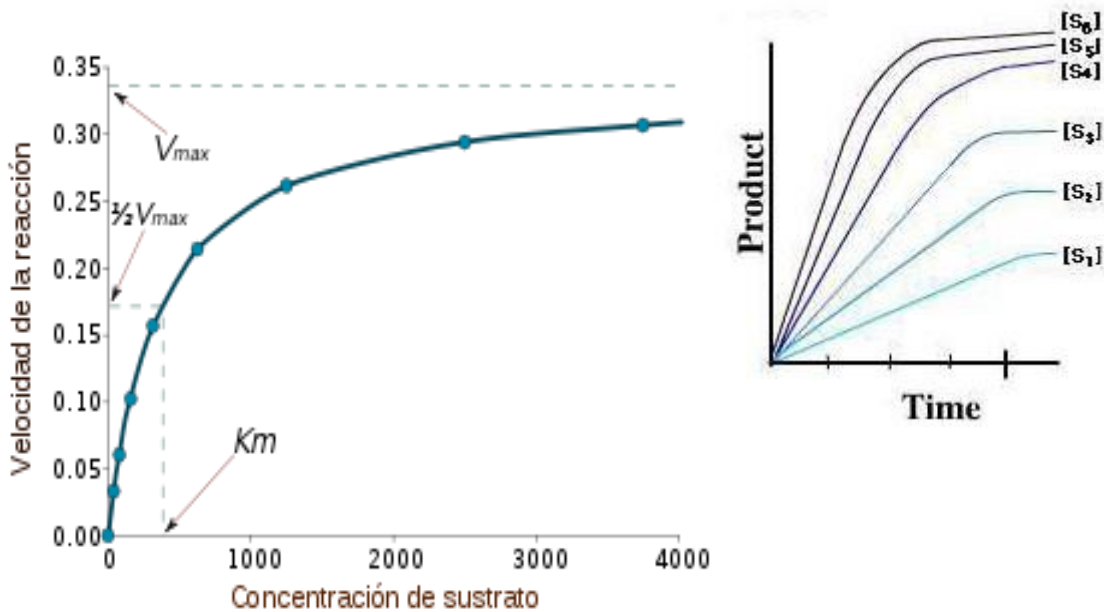
Figura: Dependencia de la actividad de la glutamato-deshidrogenasa respecto de la concentración de NADH.



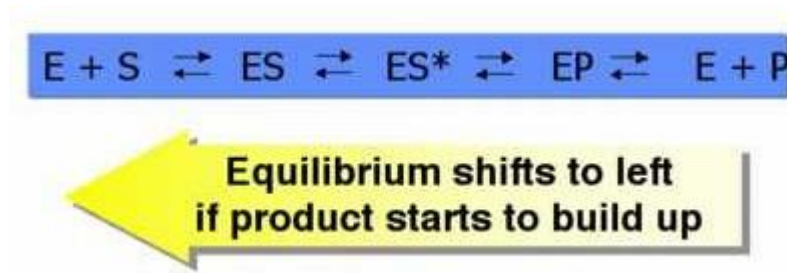
EFFECTO DE LAS CONCENTRACIONES DEL SUSTRATO Y DE LOS PRODUCTOS SOBRE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

La velocidad de una reacción enzimática depende de la concentración de sustrato. La Figura muestra la velocidad de una reacción enzimática a 6 concentraciones distintas de sustrato.

Figura: Actividad enzimática en función de la concentración de sustrato.

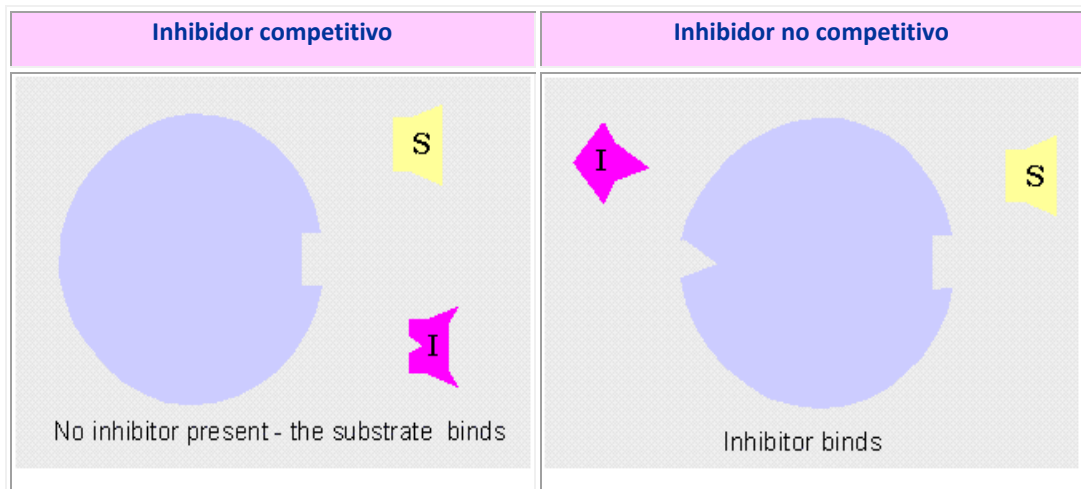


Además, la **presencia de los productos finales** puede hacer que la reacción sea más lenta, o incluso invertir su sentido (Figura inferior).

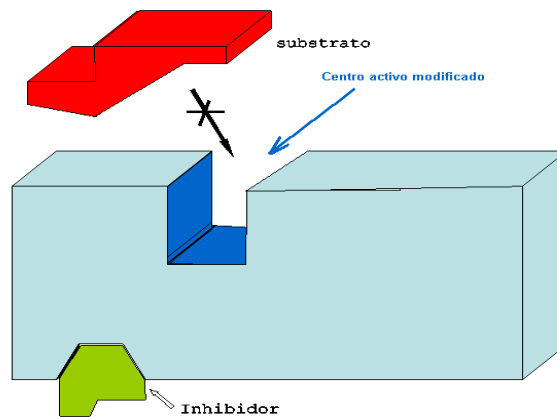


EFFECTO DE LOS INHIBIDORES SOBRE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

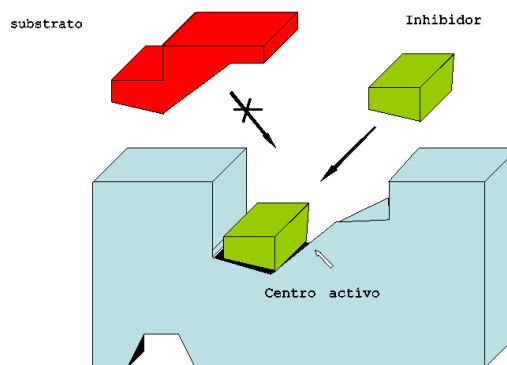
Ciertas moléculas pueden inhibir la acción catalítica de una enzima: son los **inhibidores**. Estos inhibidores bien pueden ocupar temporalmente el centro activo por semejanza estructural con el sustrato original (**inhibidor competitivo**) o bien alteran la conformación espacial del enzima, impidiendo su unión al sustrato (**inhibidor no competitivo**) (Figuras inferiores).



Inhibidor No Competitivo:



Inhibidor Competitivo:

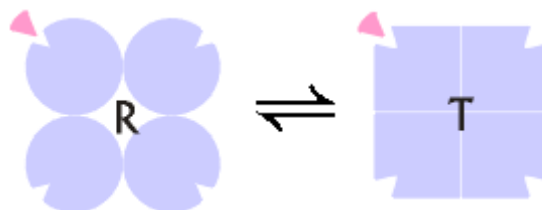


Consideraciones prácticas:

Según la definición de la unidad de actividad enzimática, ésta debe medirse en ausencia de inhibidores. Sin embargo, esta condición no se puede garantizar absolutamente en el material biológico. Los aditivos inhibidores de la coagulación (p.ej. EDTA) pueden actuar como inhibidores, por lo que no debe utilizarse. Los procesos de inactivación pueden tener lugar también por dilución de una muestra de suero en solución salina fisiológica, una solución tampón o una solución reactiva. Esto quiere decir que, en condiciones de test habitualmente iguales, se medirán valores diferentes cuando en un test se apliquen relaciones distintas entre el volumen de suero y el volumen total.

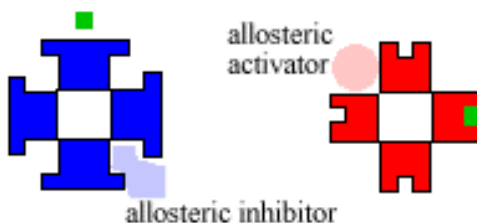
MODULACIÓN ALOSTÉRICA DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

Hay enzimas que pueden adoptar 2 conformaciones interconvertibles llamadas R (relajada) y T (tensa). R es la forma más activa porque se une al sustrato con más afinidad. Las formas R y T se encuentran en equilibrio $R \rightleftharpoons T$ (Figura inferior):



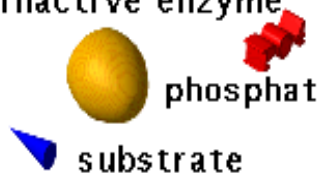
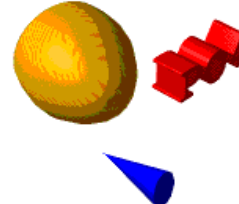
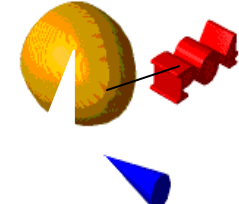
Ciertas sustancias tienden a estabilizar la forma R. Son los llamados **moduladores positivos**. El propio sustrato es a menudo un modulador positivo. Las moléculas que favorecen la forma R pero que actúan sobre una región de la enzima distinta del centro activo son los **activadores alostéricos**.

Las sustancias que favorecen la forma T y disminuyen la actividad enzimática son los **moduladores negativos**. Si estos moduladores actúan en lugares distintos del centro activo del enzima se llaman **inhibidores alostéricos**.



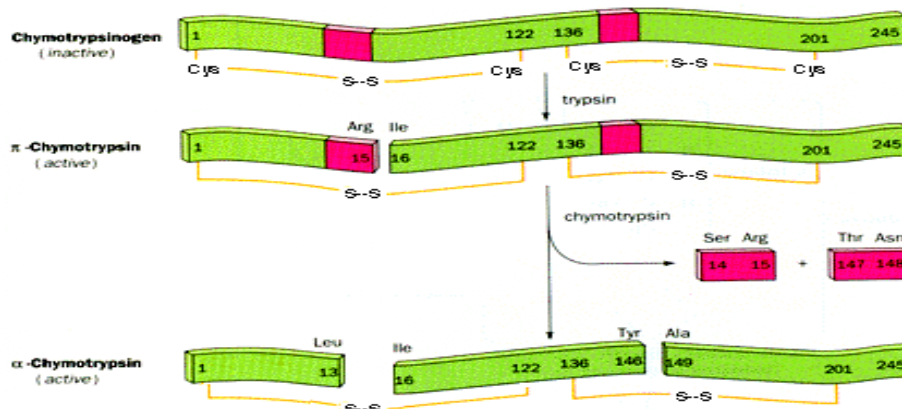
EFFECTO DE LA MODIFICACIÓN COVALENTE SOBRE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

Existen enzimas que pasan de una forma menos activa a otra más activa uniéndose covalentemente a un grupo químico de pequeño tamaño como el P_i o el AMP. También se da el caso inverso, en el que una enzima muy activa se desactiva al liberar algún grupo químico. En las enzimas de las vías degradativas del metabolismo, la forma fosforilada es más activa que la no fosforilada, mientras que en las vías biosintéticas ocurre lo contrario. En las figuras inferiores se ilustra la activación de una proteína por fosforilación.

Elementos de la Reacción	La enzima no fosforilada es inactiva	La enzima fosforilada es activa
inactive enzyme  phosphate substrate		

ACTIVACIÓN PROTEOLÍTICA DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

Algunas enzimas no se sintetizan como tales, sino como proteínas precursoras sin actividad enzimática. Estas proteínas se llaman **proenzimas o zimógenos**. Para activarse, los zimógenos sufren un ataque hidrolítico que origina la liberación de uno o varios péptidos. El resto de la molécula proteica adopta la conformación y las propiedades de la enzima activa. Muchos enzimas digestivos se secretan en forma de zimógenos y en el tubo digestivo se convierten en la forma activa. Es el caso de la **quimotripsina**, que se sintetiza en forma de quimotripsinógeno. Si estas enzimas se sintetizasen directamente en forma activa destruirían la propia célula que las produce. Así, la tripsina pancreática (una proteasa) se sintetiza como tripsinógeno (inactivo). Si por alguna razón se activa en el propio páncreas, la glándula sufre un proceso de autodestrucción (pancreatitis aguda), a menudo mortal.

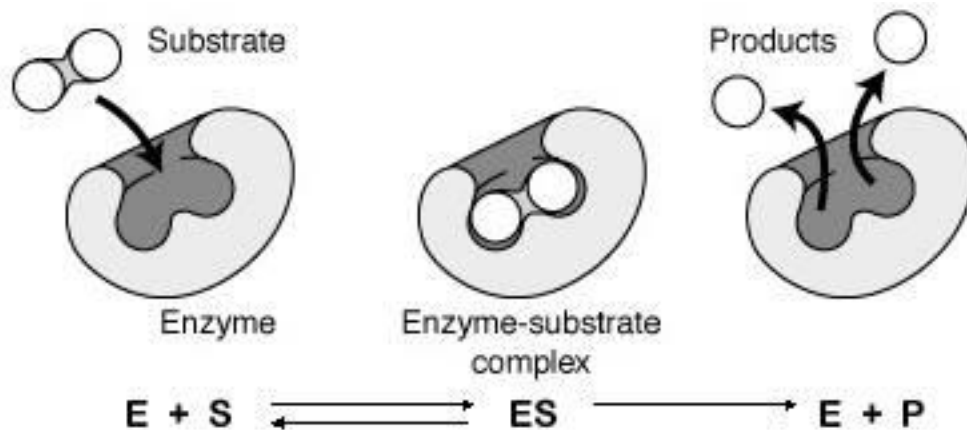


REGULACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA POR MEDIO DE ISOENZIMAS

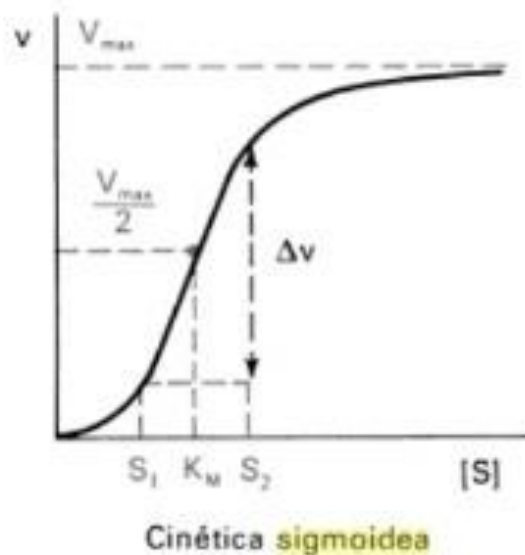
Algunas enzimas tienen distinta estructura molecular, aunque su función biológica es similar. Se llaman **isozimas o isoenzimas**. Estas diferencias de estructura se traducen en ligeros cambios en sus propiedades, de forma que cada isozima se adapta perfectamente a la función que debe realizar. Así, podemos observar la existencia de isoenzimas en función de:

- ❖ **el tipo de tejido:** Por ejemplo, lactato deshidrogenasa presenta isozimas distintas en músculo y corazón
- ❖ **el momento concreto del desarrollo** del individuo: Por ejemplo, algunas enzimas de la glicólisis del feto son diferentes de las mismas enzimas en el adulto.

DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD CATALITICA:



Al seguir la velocidad de aparición de producto (o de desaparición del sustrato) en función del tiempo se obtiene la llamada **curva de avance de la reacción**, o simplemente, la cinética de la reacción.



En la mayoría de los procesos enzimáticos se observa que la velocidad de la reacción varía en función del tiempo.

Es posible seguir la cantidad de sustrato convertida en producto, observando la velocidad de la variación de la actividad a una determinada longitud de onda.

Es así que se observan tres fases:

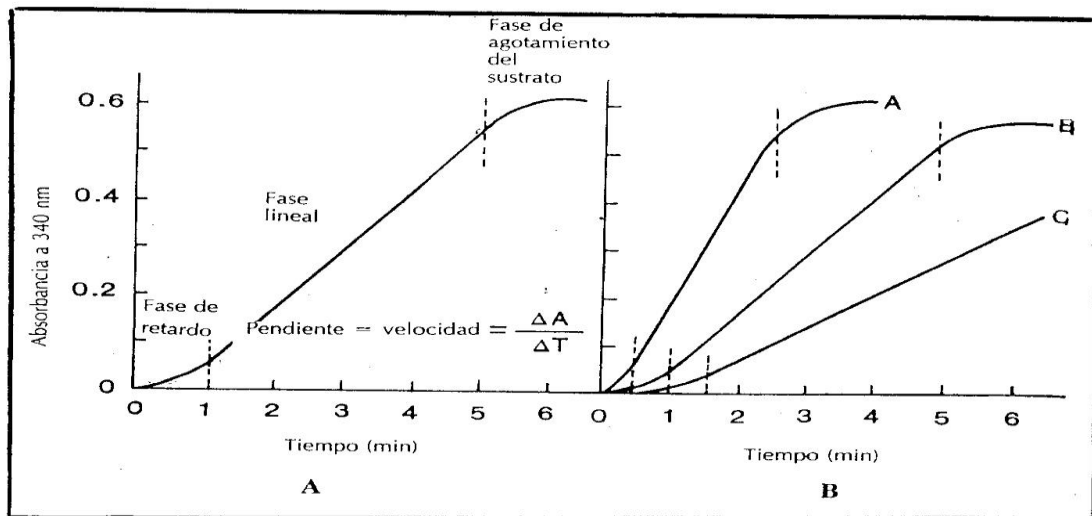
1. Fase de Retardo.
2. Fase Lineal.
3. Fase de Agotamiento de Sustrato.

Figura:

A: típica reacción enzimática con fase inicial de retardo, cambio lineal de absorbancia y fase final de agotamiento de sustrato. La actividad enzimática es la pendiente de la fase lineal.

B: reacción enzimática con tres cantidades diferentes de enzima. La curva A exhibe elevada actividad, B con actividad media y C con actividad baja.

En un sistema al aumentar la actividad enzimática, se abrevia la fase de retardo, se prolonga la fase lineal y el agotamiento del sustrato se produce más rápidamente.



La fase de retardo tiene lugar inmediatamente después de mezclar los reactivos con la muestra biológica. Es una fase de encuentro y acoplamiento de sustrato y enzima. Su duración es muy variable (segundos a minutos). Al finalizar esta fase comienza la **fase lineal** en la que la formación de producto permanece constante, siendo la concentración de la enzima de la muestra el único factor limitante. Por último, a medida que va transcurriendo la reacción, llega un momento en que el sustrato se va agotando (**fase de agotamiento de sustrato**) y la velocidad de la reacción disminuye hasta anularse.

Para determinar una actividad enzimática válida es **necesario realizarlo en la fase lineal donde el único factor limitante es la concentración de la propia enzima y las condiciones de reacción son**

óptimas. Para ello se suele trabajar con una concentración de sustrato superior al K_m . Así, en un ensayo enzimático, el límite de linealidad es la actividad enzimática más alta que se pueda medir con exactitud. Por encima de ese valor habrá que diluir el suero con solución salina y multiplicar el resultado obtenido por el factor de dilución. Puede observarse como varían las cinéticas enzimáticas, bajo las mismas condiciones de medición, pero a diferentes cantidades de una misma enzima.

METODOLOGIA ANALITICA:

1. MÉTODOS DE PUNTO FINAL:

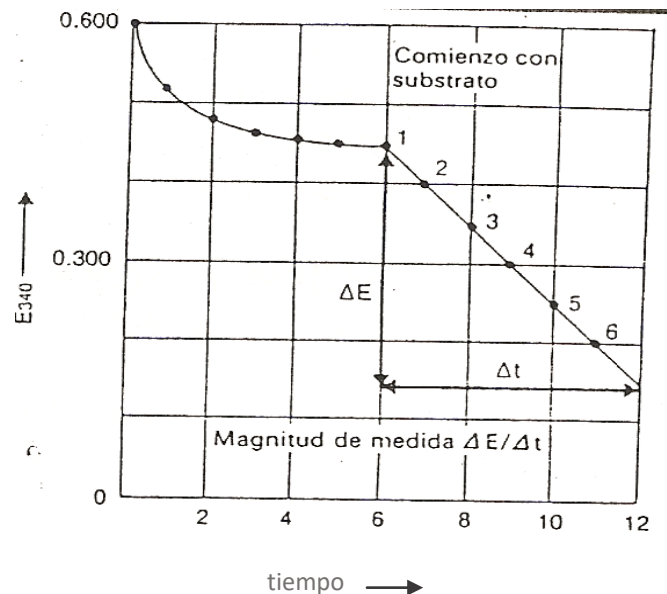
También llamados de una sola medida o de tiempo de incubación fijo.

En ellos se deja actuar la enzima durante un tiempo predeterminado sobre el sistema de reacción y se determina la actividad enzimática mediante la lectura de la absorbancia *debida a la formación de un producto o bien a la disminución de la misma por desaparición del sustrato*. Son métodos colorimétricos.

2. MEDICIÓN CINÉTICA:

Para averiguar la velocidad de una reacción enzimática, se realizan en Química Clínica preferentemente diversas mediciones intervalos de tiempo fijo y constantes.

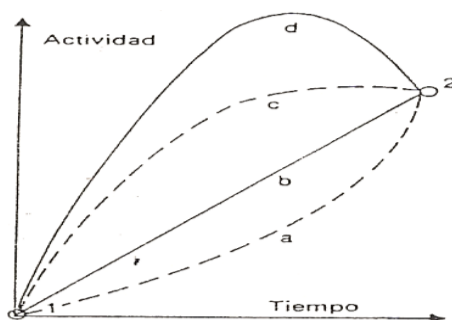
Figura: Medición cinética en puntos múltiples



2a.- Medición en dos puntos:

Aunque la medición en dos puntos es teóricamente una medición cinética, se ha generalizado al hablar de métodos cinéticos solamente aquellos que tienen más de dos puntos de medición. La medición de dos puntos adolece de muchas fuentes de error, ya que el proceso de la reacción solo se mide en dos lugares. En actividades enzimáticas elevadas, la reacción puede hacerse más lenta o detenerse por consumo del sustrato, incluso antes de la segunda medición. También puede ocurrir que la reacción se ponga en marcha en forma lenta.

Figura: Determinación cinética en dos puntos



2b.- Medición de la velocidad de reacción:

La velocidad de la reacción se averigua con diversas técnicas y según diversos principios. Entre las numerosas técnicas para la medición de enzimas, ocupan un lugar destacado los test en los que las coenzimas NADH y NADHP sirven de indicador, como se verá en la siguiente clasificación puramente práctica:

2b1-: Métodos cinéticos sin NADH o NADHP

2b2-: Métodos cinéticos con NADH o NADHP.

2b1- Métodos Cinéticos sin NADH o NADHP (colorimétricos):

Los test cinéticos colorimétricos se basan en: **un producto de reacción que aparece** y que puede comprobarse con la ayuda de una reacción de tinción, o bien por **la reducción progresiva de sustrato** colorimétrico comprobable.

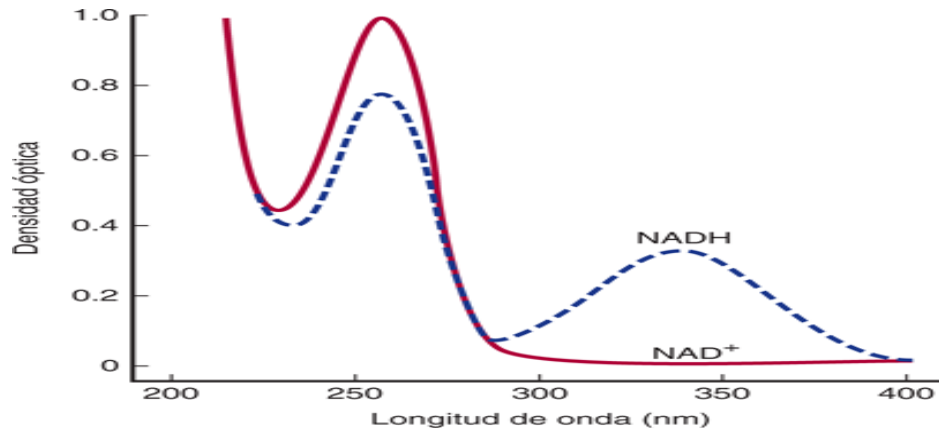
Ejemplo 1: Por la acción de la fosfatasa alcalina se desdobra el p-nitrofenilfosfato y aparece en el medio alcalino un producto de reacción coloreado amarillo.

Ejemplo 2: Reducción de la coloración azul de la reacción del yoduro de almidón como consecuencia de la desintegración del almidón catalizado por la amilasa.

2b2-Métodos Cinéticos con NADH o NADHP: (Test óptico de Warburg o Test U.V.)

El nicotinadenina-dinucleótido (NAD) o el nicotinadenina-dinucleótido-fosfato (NADP) y sus formas reducidas NADH y NADHP presentan las siguientes curvas de absorción

Figura: Espectros de absorción de los nicotinamida-adenín-dinucleótidos.



Fuente: Víctor W. Rodwell, David A. Bender, Kathleen M. Botham, Peter J. Kennelly, P. Anthony Weil: *Harper. Bioquímica ilustrada*, 30e: www.accessmedicina.com
Derechos © McGraw-Hill Education. Derechos Reservados.

El llamado test óptico fue introducido en Enzimología por Warburg. El principio de medida se basa en que las coenzimas reducidas NADH y NADHP absorben la luz U.V. en una determinada longitud de onda, mientras que las formas oxidadas de las coenzimas no presentan esta absorción. Por tanto, las actividades de las deshidrogenasas que precisan NAD o NADP como coenzima, pueden medirse a la luz U.V. con ayuda del aumento o disminución de la extinción del NADH o del NADHP. La disminución o el aumento por minuto o por segundo que aparece es directamente proporcional a la actividad enzimática.

2b2.1-Test Óptico Simple con NAD o NADH como Indicador:

Las reacciones enzimáticas que transcurren bajo la transformación directa de NAD(P) o NADH(P), pueden seguirse mediante la medición de la variación de absorción de luz a las longitudes de onda adecuadas de 340 nm., o a 334 - 365 nm. Ej. Ldh.

2b2.2-Test Óptico con Reacción Indicadora o Test Compuesto:

Las reacciones enzimáticas independientes de las coenzimas NADPH y NADH, pueden medirse mediante el acoplamiento con el test NADH-dependiente. Por cada molécula de sustrato que se transforme en la reacción enzimática a medir, aparece una molécula de coenzima reducido u oxidado. De todos modos, esto solamente puede aplicarse cuando la actividad de la enzima indicadora es por lo menos 100 veces mayor que la actividad enzimática que se va a medir. Ej. AST, ALT.

2b2.3-Test Óptico con Reacción Auxiliar y Reacción Indicadora o Test Doble Compuesto:

En algunos casos, el producto final de una reacción enzimática no puede seguirse directamente por una reacción indicadora, por lo que tiene que introducirse otro sistema enzimático para la reacción auxiliar. Para que aparezca una proporcionalidad entre el sustrato transformado, la reacción auxiliar y la concentración de NADPH o NADH, debe existir un exceso de enzimas auxiliares y de coenzimas auxiliares. Ej.CK.

MÉTODOS DE PUNTO FINAL Y/O CINÉTICOS DE ESPECTROCOPIA BICROMÁTICA O DE DOBLE

LONGITUD DE ONDA:

Tanto los métodos de punto final como los cinéticos pueden utilizar la tradicional espectroscopia de una sola longitud de onda o la bicromática. Esta última suministra información mediante el registro a dos longitudes de onda simultáneamente y dado que todos los demás factores permanecen constantes, los datos resultantes pueden ser más útiles que los obtenidos a partir de mediciones de absorbancia con doble haz y una sola longitud de onda. Consiste en la medición fotométrica de un material haciendo pasar una radiación a dos longitudes de onda distintas a través de la muestra contenida en la cubeta y las intensidades transmitidas por cada longitud de onda son procesadas de manera separada. La medida en espectrofotometría de doble longitud de onda implica la determinación de la diferencia de absorbancia ΔA , entre las absorbancias A_1 y A_2 medidas a dos longitudes de onda diferentes λ_1 y λ_2 . Para la aplicación de esta metodología, que tiene como finalidad disminuir el error debido a interferentes, se eligen dos longitudes de onda a las cuales las absorbancias de la especie interferente sean las mismas, pero las del analito sean diferente.

MÉTODOS OPTIMIZADOS U OPTIMADOS:

Son aquellos que seleccionan y estandarizan los parámetros que proporcionan a la enzima las condiciones más favorables para reaccionar con lo máximo posible de sustrato por unidad de tiempo.

Tienden a detectar la mayor actividad enzimática, en el menor tiempo, con buena sensibilidad, reproductibilidad, exactitud y en forma práctica.

Tanto los métodos de punto final como cinéticos se pueden optimizar

Cálculo de la Actividad Enzimática:

Según la ley de Lambert-Beer.:

$$E = c \times \varepsilon \times d$$

Donde:

E = extinción (absorción).

c = concentración ($\text{mmol} \times \text{l}^{-1}$)

ε = coeficiente de absorción molar ($\text{l} \times \text{mmol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$)

d = camino óptico (cm.)

donde:

$$c = \frac{E}{\varepsilon \times d} \quad (\text{mmol} \times \text{l}^{-1})$$

si:

$$U = \frac{1 \mu\text{mol transformado}}{\text{minuto}} = \frac{\Delta c}{\text{min.}}$$

En la reacción teniendo en cuenta el volumen total de la mezcla de reacción (V_t) y el volumen de muestra (V_m) y para referir a :

1 l. = 1000 ml.

$$U/L = \frac{\Delta E}{\varepsilon \times d \times \text{min.}} \times \frac{V_t}{V_m} \times 1000$$

donde

$$\text{Factor} = \frac{\Delta E}{\varepsilon \times d \times \text{min.}} \times \frac{V_t}{V_m} \times 1000$$

Si se deben tomar tiempos en segundos:

$$U/L = \frac{\Delta E}{\varepsilon \times d} \times \frac{60}{\Delta t} \times \frac{V_t}{V_m} \times 1000$$

OTROS MÉTODOS:

Métodos Fluorométricos: permiten una sensibilidad de 10 a 1.000 veces mayor que las reacciones cromáticas.

Sin embargo, la propensión a las perturbaciones es considerablemente mayor que en el test colorimétrico. Estos métodos se limitan pues a mediciones tisulares muy bajas

Métodos Voluméricos: Se utilizan aparatos de titulación y pH stat y se efectúan titulaciones cinéticas que reducen el tiempo de horas a minutos.

Métodos Electroquímicos: Entre éstos, son de especial interés los procedimientos en los que el substrato se une a geles o a resinas portadoras. Mientras el substrato se transforma enzimáticamente, aparecen continuamente diferencias de potencial eléctrico, que pueden medirse por ej. Por microelectrodos.

Métodos de Isótopos: Son aproximadamente un millón de veces más sensibles que los métodos colorimétricos, por lo que son apropiados para la determinación de defectos enzimáticos hereditarios.

CONTROL DE CALIDAD EN ENZIMOLOGIA:

Si bien hoy debemos hablar de garantía de calidad en el laboratorio, un aspecto muy amplio, cuyo desarrollo es competencia de un capítulo independiente dedicado a ello, abarcaremos aquí en relación a la temática en cuestión, las premisas básicas a tener en cuenta hasta llegar a la entrega del informe.

FASE PREANALITICA:

1. Condiciones del Paciente:

Según situación "Rutina programada" la condición ideal es **la condición basal** (ayuno y descanso nocturno).

Según situación "Urgencia Bioquímica" no cumplirá ningún requisito previo, se tendrá en cuenta las condiciones del paciente del momento del estudio.

Es importante resaltar que, en el estudio de las enzimas, se debe tener en cuenta, que:

"el **AYUNO**" no cumple un rol importante, excepto que su ausencia le torne a la muestra un aspecto lipémico importante que interfiera en la lectura de la reacción.

"la **ACTIVIDAD FÍSICA**" /ejercicio, es un factor que cobra más o menos importancia dependiendo del tipo de enzima.

2. Toma de Muestra:

"La muestra ideal es suero fresco, libre de hemólisis y no lipémico".

- En caso de no contar con dicha muestra ver la posibilidad de utilizar plasma (obtenido con heparina), de acuerdo a la enzima a determinar.
- Aquí se deberán tener en cuenta los cuidados propios de una extracción de sangre y una correcta limpieza del material a utilizar.
- Separación del suero antes de las 2 hs.
- En caso de requerirse conservación de muestras, se deberá tener cuidado con el tiempo y la temperatura aceptables que aseguren la no pérdida de su actividad. Esto deberá ser chequeado individualmente para cada enzima.

FASE ANALITICA:

En esta fase resulta de fundamental importancia tener en cuenta varias instancias:

- ***Selección del Método.**
- * **Temperatura del Ensayo y Unidades de Informe**
- ***Condiciones que debe reunir el ensayo.**

1. Selección del Método: para que un método resulte aceptable debe reunir las siguientes condiciones:

- *Aplicable a las necesidades clínicas.
- *Seguro en su ejecución analítica.
- *Compatible en los resultados obtenidos.

es decir, el método debe ser “**Sensible, Específico, Exacto, Preciso y Simple**”

“**El método cinético U.V.** es el más ampliamente difundido y aceptado como ensayo de elección.”

- *Altamente Específico:* esto se logra con una correcta selección del sustrato, de acuerdo a la enzima que se quiera determinar.
- *Buena Exactitud y Precisión:* el método debe contar con pocas medidas volumétricas que es donde se producen errores apreciables. En el caso que se requieran reacciones acopladas, con el agregado de una enzima indicadora, es importante que esta sea de correcto estado de pureza y específica para el sustrato sobre el que debe actuar.
- *Simple:* debe poder aplicarse a cualquier laboratorio de rutina, desde el punto de vista económico y el tiempo requerido para su realización.
- *Sensibilidad suficiente:* permite detectar deltas de absorbancias de 0,002, lo que implica un límite de detección de 0,1 UI/lit.

Cuadro comparativo:

METODO	LIMITE LECTURA	LIMITE DETECCION
U.V. test	Delta Abs. 0,002	0,1 UI/lit
Fluorométrico	0,01	0,001 UI/lit.
Manométrico	1	10 UI/lit.
Radioisotopico		0,0001

2. Establecimiento de la Temperatura del Ensayo y Unidades de Informe:

2-1. Temperatura: “la Unión Internacional de Bioquímica, a través de la Comisión de Enzimas, se expidió a una temperatura de trabajo de 30°”. **“La temperatura de trabajo de los equipos automatizados es de 37°”.**

Es importante denotar algunos ítems:

- ✓ Existen asociaciones que recomiendan trabajar a 25 °.
- ✓ Trabajando a 30 ° la sensibilidad es prácticamente la misma, pero resulta más fácil la termostatación en el verano (de lo contrario hay que contar con sistemas refrigerantes).
- ✓ Trabajando a 37 ° se mejora la sensibilidad, pero cuando se trabaja en sistemas abiertos hay gran riesgo de proliferación bacteriana.
- ✓ Los *valores de referencia* varían de acuerdo a la temperatura de trabajo.

2-2. Unidades de Informe: La Comisión de Enzimas recomienda el informe en “Katal”. En nuestro país aún se utiliza la “Unidad Internacional (UI).”

El **katal** (símbolo *kat*) es una unidad derivada del Sistema Internacional de Unidades para medir la **actividad catalítica**. En cinética enzimática, es la cantidad de enzima necesaria para transformar un mol de sustrato por segundo. 1 katal equivale a 60×10^6 unidades de actividad enzimática. Como es una unidad muy grande, se suele utilizar sus submúltiplos microkatal (μkat) y nanokatal (*nkat*). El nombre katal se usa desde hace 30 años, pero sólo se oficializó durante la 21ª Conferencia General de Pesos y Medidas de 1999.

1 unidad Internacional/litro (UI/lt) equivale a la transformación de un micromol de sustrato por minuto por litro de líquido biológico.

$$1 \text{ UI} = 16,67 \text{ nkat.}$$

3. Condiciones del Ensayo:

Aquí las consideraciones están relacionadas a:

⇒ **Relación Ez / Ez indicadora:** (Relación aceptable: 1 / 100)

Ez./Ez.i.	Error
1:10	-23%
1:100	-04%
1:1000	-0,7

- ⇒ **Selección de un sustrato específico para la enzima a determinar.**
- ⇒ **Selección de concentración y tipo de buffer óptimos.**
- ⇒ **pH óptimo.**
- ⇒ **Agregado de activadores en los casos necesarios.**
- ⇒ **Condiciones del aparato.**

Se debe denotar la importancia de este último ítem, porque como en enzimología al no contarse con un estándar primario; el aparato de medición pasa a tener función de estándar secundario, por lo que su exactitud fotométrica debe ser estrictamente controlada.

El aparato debe ser:

- *Termostatzado, leer a 340 nm.*
- *Tener luz monocromática.*
- *Ancho de banda igual o menor a 10 nm.*

Ancho de Banda	Absorbancia del NADH
0,25	1
5	0,998
8	0,996
10	0,982

4. Control de Calidad Interno y Externo:

Requisito de fundamental importancia, que en enzimología adquiere algunas características particulares, sobre todo en el control interno (CCI) que debe realizarse con materiales comerciales elaborados sobre matrices proteicas y enriquecidas con enzimas muchas veces no humanas, pero los procedimientos no escapan a las reglas generales del CCI y el CCE.

En los equipos automatizados, el control de calidad es un sistema de verificaciones para asegurar que el instrumento y todos los materiales asociados cumplan con los estándares de desempeño aceptables de su laboratorio. El control de calidad se lleva a cabo a través de todas las fases de producción y ensamblaje de reactivos e instrumentos. Esto garantiza la calidad y el rendimiento del producto. El laboratorio es responsable del correcto funcionamiento del sistema de química clínica después de la instalación. Los representantes del equipamiento ayudan a configurar el instrumento y aseguran que los métodos que se van a usar inicialmente se calibren y verifiquen.

Un buen programa de control de calidad debe monitorear todos los métodos y mostrar los cambios en el sistema que pueden afectar los resultados de los pacientes. Los procedimientos de control de calidad de rutina implican la comprobación de las muestras conocidas para su reproducibilidad y exactitud en el sistema. Las hojas de inserto del método describen las características de rendimiento típicas de cada método, que pueden utilizarse para comparación con los datos de su laboratorio.

Un resumen de las prácticas de control de calidad recomendadas incluye lo siguiente:

- * Realizar el chequeo del sistema al menos una vez al día.
- * Procesar dos niveles de material de CC al menos una vez cada 24 horas por el método utilizado.
- * Realizar la calibración/verificación siempre que cambie los lotes de reactivos para un método y los intervalos de calibración/verificación especificados en la hoja de inserto del método asociado.

* La calibración/verificación también puede realizarse según lo especificado por los procedimientos de laboratorio.

* Los equipos contienen un programa de software que permite al operador mantener la información necesaria para un programa de control de calidad.

El software también permite:

- Almacenar resultados de control de calidad y mostrar estos resultados como un histograma o como un diagrama similar a Levey Jennings.
- Mostrar los resultados de QC durante un período de tiempo específico e indicar las DS desviaciones estándar.

FASE POST ANALITICA:

- ♦ **Unidades de Informe.**
- ♦ **Cálculo.**
- ♦ **Informe.**
- ♦ **Correlación e Interpretación.**

1-) Unidades de Informe: Ya se han mencionado anteriormente. Cabe agregar que las unidades de los valores de referencia del informe deben ser las correspondientes al método utilizado para la valoración de la actividad enzimática, a la edad y sexo del paciente, en los casos que correspondan.

2-) Cálculo - Informe - Correlación - Interpretación: Aquí es importante realizar un control riguroso de los cálculos a desarrollar y de la transcripción de los mismos. Además, se deberá realizar un análisis metódico de los resultados obtenidos a fin de correlacionarlos e interpretarlos además de revisar los antecedentes del paciente. Para el caso particular de informe de resultados de enzimas, es muy importante tener en cuenta el método, la temperatura, el sexo y la edad para informar los valores de referencia.

METODOS DE DOSAJE DE ENZIMAS:

E.C.3.2.1.1.: AMILASA:

Las amilasas son un grupo de hidrolasas encargadas de desdoblar moléculas hidrocarbonadas complejas, constituídas por uniones alfa-D-glucosa y transformarlas en componentes más pequeños. Estas tienen la particularidad de actuar sobre las uniones alfa1,4; en tanto que las uniones alfa 1,6 no son atacadas por esta enzima. Motivo por el cual cadenas de poliglucanos lineales como la amilosa (solo uniones alfa 1,4) se degradan a diferente velocidad que las cadenas ramificadas de la amilopectina o el glucógeno (uniones alfa 1,4 y alfa 1,6).

Actualmente la metodología más difundida es la siguiente:

Métodos que miden la disminución del sustrato:

- **Ensayos Amiloclásticos.**

Métodos que miden la aparición del producto:

- **Ensayos Sacarogénicos.**
- **Ensayos Cinéticos (cromogénicos y en U.V.)**

ENSAYO AMILOCLÁSTICO:

Aquí, la actividad de la amilasa se determina a través del monitoreo de la disminución de la concentración del sustrato. Dentro del mismo el método más difundido es el iodométrico, en el cual se somete al sustrato (almidón o amilosa) a la acción de la enzima, durante un tiempo determinado y luego se corta la reacción mediante el agregado de yodo, que a su vez forma un compuesto coloreado al reaccionar con el sustrato remanente.

En 1.970 este método constituía el 50% de los ensayos en EEUU, actualmente son pocos los laboratorios que lo utilizan, aunque está disponible comercialmente. En nuestro país aún está ampliamente difundido.

Esta metodología no se puede informar en UI/L o en Katal.

Para este caso las unidades de informe son:

- Unidades amilolíticas. (UA).
- Unidades Street Close. (USC)

Donde:

UA: cantidad de la enzima contenida en 100 ml. de muestra, que puede hidrolizar 10 mgr. De almidón en 30 min.

USC: una muestra tiene una actividad de 100 USC/100 ml., cuando 0,1 ml. de la muestra hidroliza completamente 2 mgr. De amilosa a pH 7,0, T° 37 y durante un período de incubación de 15 min.

En nuestro país se encuentra disponible, para esta metodología, un kit comercial (existen

diversas marcas) denominado amilokit. El sustrato de dicho reactivo es el almidón, que como sabemos está formado por amilosa y amilopectina, y que además la proporción de las mismas no es constante y por lo tanto varían lote a lote. Motivo por el cual la velocidad de la reacción no va a ser la misma lote a lote, para una misma cantidad de enzima (sabemos que por la estructura, la hidrólisis de la amilosa es más rápida que la de la amilopectina). Esto dificulta por ejemplo el seguimiento de un paciente cuando no lo hacemos con el mismo lote; u ocasiona una amplia dispersión de resultados entre diferentes laboratorios, como se ha podido apreciar en los controles de calidad externos.

Lamentablemente no se encuentra disponible la metodología de Street Close, que utiliza como sustrato solo amilosa. Pudiendo de esta forma cumplir con los requisitos de sensibilidad, reproducibilidad y buena correlación clínica.

ENSAYO SACAROGÉNICO:

Estas técnicas se basan en la determinación de los monosacáridos o disacáridos liberados por la acción de la amilasa sobre el sustrato. El clásico método de Somogyi es una técnica sacarogénica. En éste la muestra y el sustrato se incuban por un período determinado y luego se realiza la medición de las sustancias reductoras de la muestra incubada y de un blanco de suero. Dado que los productos de la acción de la amilasa son sustancias reductoras, la actividad de la enzima es directamente proporcional a la cantidad producida de dichas sustancias.

Cabe mencionar que se han propuesto varias modificaciones de esta metodología.

Muchas veces los blancos obtenidos son muy altos por lo que se dificulta su lectura espectrofotométrica. Los reactivos son muy complejos y por ende costosos y además pierden efectividad a través de las varias reacciones acopladas que deben sucederse, por lo que la reacción rara vez sucede a velocidad máxima.

Podemos concluir diciendo que su sensibilidad es inferior a la del método amiloclástico y su precisión en la medición de los grupos reductores es inferior a la de los métodos cromogénicos.

ENSAYOS CINÉTICOS:

A-) Cromogénicos:

Estos se basan en la utilización de un sustrato para la amilasa, que lleva acoplado un grupo como el p-nitrofenil (incoloro) que tras la hidrólisis producida por la enzima se convierte en un compuesto coloreado, p-nitrofenol, cuya formación es monitoreada a 405 nm.

El fundamento del método se basa en las siguientes reacciones:



Una desventaja de este método es la probable hidrólisis espontánea del sustrato, por lo que se han desarrollado modificaciones con sustratos parecidos, que además de llevar acoplado el grupo p-NO₂fenil, llevan acoplado un grupo protector de la hidrólisis espontánea. Dentro de ellos se mencionan los siguientes: cloro, benciliden, etiliden.

Esta última metodología ha sido sugerida como de elección.

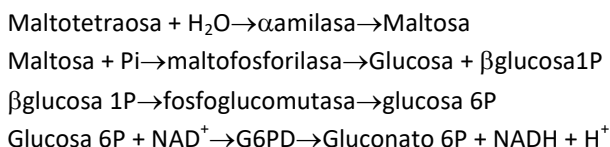
Los resultados se pueden expresar en UI/L

B-) U.V.:

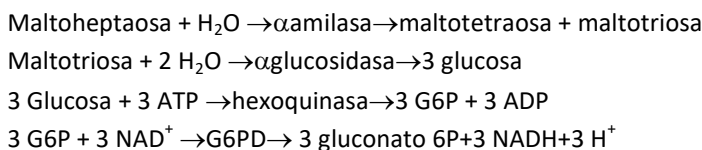
Aquí se utilizan una serie de reacciones acopladas que dan como resultado la formación de NADH, el cual es directamente proporcional a la actividad de la enzima y es monitoreado a 340 nm.

Dos son los sustratos más utilizados para dicha metodología y los fundamentos de la reacción se presentan a continuación:

1-)



2-)



Los resultados de estos métodos también se pueden expresar en UI/L.

E.C.3.1.1.3: LIPASA

Las lipasas son enzimas que hidrolizan los triglicéridos (triacylglicerols) que contienen ácidos grasos de cadena larga. Actúan sobre las uniones éster entre el glicerol y los ácidos grasos de cadena larga, liberando dos moléculas de ácido graso y una molécula de beta-monoglicérido. Se diferencian de otras esterasas porque a diferencia de éstas actúan en la interfase ester-agua.



Dos son las metodologías más difundidas:

- ◆ Titulación de los ácidos grasos liberados. (Titrimétrico)
- ◆ Aclaramiento de la emulsión. (Cinético-Turbidimétrico).

1-) Titulación de los ácidos grasos liberados. (Titrimétrico)

La técnica original pertenece a Cherry-Crandall, luego han surgido varias modificaciones. La técnica consiste en la incubación de la muestra con una suspensión de aceite de oliva (con buffer y

pH determinados) y luego titular los ácidos grasos liberados con OHNa 0,05 M, con fenolftaleína como indicador.

Es una metodología buena, pero sumamente engorrosa y larga, por lo que no se la utiliza a los fines clínicos.

2-) Aclaramiento de la emulsión. (Cinético-Turbidimétrico).

Fue ideado por Neuman. Utiliza como sustrato la trioleína (triglicérido) y requiere de la adición de sales biliares, Ca y colipasa.

La actividad de la lipasa origina una alteración del número y tamaño de los triglicéridos emulsionados en solución acuosa y por consiguiente provocan una disminución en la turbidez de la reacción y por consiguiente una variación en la dispersión de la luz que pasa por la cubeta. La disminución de la absorbancia en función del tiempo es directamente proporcional a la actividad de la enzima.

E.C. 2.7.3.2:ADENOSINA TRIFOSFATO:CREATINA

N-FOSFOTRANSFERASA: CREATIN KINASA.

La CK incorrectamente llamada creatín fosfoquinasa, cataliza la reacción reversible de fosforilación de la creatina por el ATP, como se muestra más adelante (ecuación 1, directa) y (ecuación 2, reversa) El pH óptimo para la reacción directa es de 9,0, en tanto que el pH para la reacción reversa es de 6,7. El equilibrio de la reacción dependerá del pH al cual se lleve a cabo la misma.

(1) Creatina + ATP →CK→Fosfato de creatina + ADP

(pH=9,0; Mg⁺⁺)

(2) Fosfato de Creatina + ADP→CK→Creatina + ATP

(pH=6,7; Mg⁺⁺)

Un ión activador de todas las kinasas es el Mg⁺⁺ que participa formando complejos ATP y ADP-Mg⁺⁺. El rango de concentración óptima de Mg⁺⁺ es muy estrecho, por lo que hay que tener cuidado porque el exceso produce un efecto inhibitorio. Muchos iones metálicos inhiben la enzima como por ejemplo el Mn⁺⁺, Ca⁺⁺, Zn⁺⁺ y el Cu⁺⁺, además también pueden inhibir la enzima excesos de ADP, citratos, acetatos, etc. Los uratos y cisteínas son potentes inhibidores en suero.

La enzima es relativamente inestable y su actividad se ve reducida por la oxidación de los grupos sulfhídricos del sitio activo, esta actividad es parcialmente restaurada mediante el agregado de N-acetil-cisteína, monotioglicerol o glutatión (agentes tioles). La magnitud de actividad enzimática recuperada es inversamente proporcional al tiempo en que se demora en agregar estos componentes luego de recolectada la muestra.

Las concentraciones usadas para N-acetil-cisteína y monotioglicerol son de 20 mmol/l. Así forman compuestos solubles, estables e inalterables.

Numerosos métodos fotométricos, fluorométricos y de enzimas acopladas se han desarrollado, para su determinación, usando como fundamento tanto la reacción directa como la inversa.

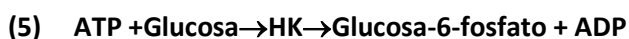
En general se prefiere la reacción reversa, medida con el acoplamiento de dos reacciones catalizadas por las enzimas HK (hexokinasa) y PGD (fosfoglucona deshidrogenasa) aunque el costo de sus reactivos es mayor.

Método Cinético U.V. NADPH dependiente:(Doble compuesto).

Su fundamento se basa en las siguientes reacciones:



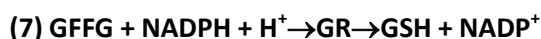
(pH=6,7)



El ATP producido en la reacción (4) es medido por el acoplamiento de las reacciones catalizadas por HK y PGD. La HK cataliza la fosforilación de la glucosa por el ATP para formar glucosa-6-fosfato (5) y ésta es entonces oxidada por el NADP⁺ y mediante la catálisis de la GPD forma 6-fosfogluconato y NADPH (6). La velocidad de formación de este último compuesto es monitoreada espectrofotométricamente a 340 nm, por lo que el aumento de la absorbancia va a ser directamente una medida de la actividad de la CK.

Existen varias causas de interferencia en este sistema de reacción:

El efecto glutatión reductasa es significativo solo cuando el glutatión reducido (GSH) contaminado con glutatión oxidado (GSSG), es utilizado como agente tiol. Bajo estas circunstancias un glutatión reductasa presente en el suero cataliza la reacción (7)



El consumo de NADPH de la reacción (3) resulta en una aparente reducción de la actividad de la enzima. Esta situación puede evitarse mediante el agregado de N-acetil-cisteína como agente tiol.

El efecto AK causa por esta enzima AK (adenilato quinasa), que se encuentra en la mayoría de los tejidos, incluidos los eritrocitos y cuya presencia se ha comprobado en suero, cataliza la siguiente reacción:



por lo que la presencia de ADP, formado en la reacción (5), produce ATP, a través de la reacción (8) que a su vez hace de producto de la reacción (4), esto también provoca un falso incremento en la

actividad de la CK. La AK, puede ser inhibida por el agregado de ión F^- , AMP o diadenosín-penta-fosfato (AP_5A). Si bien el F^- es un inhibidor de la AK, éste puede formar MgF_2 con el Mg^{++} que se agrega como activador de la CK. El AMP actúa como inhibidor competitivo de la AK proveniente de músculo y eritrocitos, pero no de la que proviene de hígado y riñón. La combinación de AMP, 5 mmol/L y AP_5A , 10 mmol/L, actúa como un perfecto inhibidor de todas las AK.

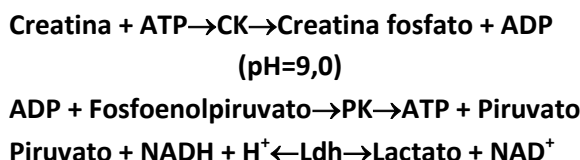
Fase lag (período previo inmediato al período lineal de una reacción), este método optimizado presenta una fase lag de aproximadamente 90 seg. para $T^{\circ}=30$. Esto es importante conocer para no efectuar mediciones incorrectas en este período y obtener resultados falsos.

La presencia de inhibidores endógenos en suero, como por ejemplo el Ca^{++} puede ser anulado con el agregado de EDTA 2 mmol/L.

La estabilidad de la CK en suero se altera fácilmente y decrece en el tiempo en el siguiente orden CK, CK-3, CK-2 y CK-1. Además, la estabilidad se ve afectada por la oxidación de los grupos sulfidrilos del sitio activo, la que se hace reversible por el agregado por grupos tioles. También existe una alteración de tipo irreversible (desnaturalización) dada por la T° , por lo que su conservación es crítica.

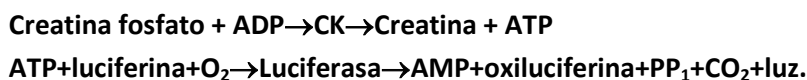
MÉTODO CINÉTICO U.V. NADPH DEPENDIENTE: DOBLE COMPUESTO:

Este método bajo el fundamento de la reacción directa es menos utilizado y se basa en la siguiente reacción:



MÉTODO DE BIOLUMINISCENCIA:

Son métodos de una sensibilidad muy superior a los espectrofotométricos, pero más costosos. Se basan en la siguiente reacción:



La luz producida en esta reacción es una medida de la actividad.

E.C.1.1.1.27.: LACTATO DESHIDROGENASA:

Es la enzima encargada de catalizar la oxidación del L-Lactato a Piruvato, con la medición del NAD^+ como aceptor de hidrogeno.



La reacción es reversible y el equilibrio de la misma está desplazado hacia la reacción reversa:



El pH óptimo para la reacción (L----P) es de 8,8-9,8

El pH óptimo para la reacción (P-----L) es de 7,4

La metodología cinética en el UV, tanto para la reacción directa como para la inversa es la más utilizada. A continuación, se mencionarán las ventajas y desventajas de cada una de ellas.

En ambas reacciones, el producto que se va formando y a partir de ciertas concentraciones, actúa inhibiendo ligeramente la enzima, esta inhibición es menor cuando la reacción transcurre en el sentido (L----P); por otro lado, en relación a la preparación de los reactivos es más óptima la preparación del NAD⁺, libre de inhibidores endógenos que la preparación del NADH y también la linealidad de la reacción en ese sentido es más prolongada.

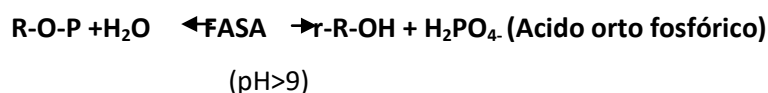
Actualmente estos criterios han ido variando y la determinación en sentido (P-----L) ha tomado cierta relevancia frente a su inversa. Se ha mejorado de manera importante la preparación del NADH (libre de inhibidores), con la ventaja de ser un test menos costoso dado que requiere menor concentración de reactivos y estos son de mayor estabilidad. La reacción transcurre a gran velocidad lo que le confiere gran sensibilidad.

Método cinético UV NADH dependiente:

El piruvato es reducido a lactato a PH 7,4 en presencia de LDH, este proceso va acompañado por la oxidación del NADH a NAD⁺ y la disminución de la absorbancia es monitoreada continuamente a 340 nm, el buffer recomendado es el TRIS-EDTA.

E.C.3.1.3.1: MONOESTER ORTOFOSFORICO FOSFOHIDROLASA: FOSFATASA ALCALINA: (FASA, FAL)

El grupo de fosfatasa inespecíficas que catalizan la reacción:



Se conocen colectivamente como fosfatasa alcalina. Las fosfatasa transfieren un grupo fosfato de un grupo a otro, formando un alcohol y un nuevo grupo fosfatado. Cuando el aceptor del fosfato es el agua, se forma un fosfato inorgánico. Estas enzimas exhiben una actividad óptima a pH 10, requieren Zn⁺⁺ y Mg⁺⁺ para su activación, en tanto son inhibidas por el Ca⁺⁺ y el fosfato inorgánico. Las velocidades de reacción dependen notablemente de las variables tales como: la fuente tisular, el tipo de sustrato, el buffer y la temperatura. Las mismas se desnaturalizan lentamente a 37C por lo que no es la temperatura recomendable. Es recomendable utilizar un buffer transfosforilante, es decir que además actúe como aceptor del grupo fosfato. Son ejemplos de buffer transfosforilantes el 2-metil-2-amino-1-propanol (MAP), la dietanolamina (DEA), y el TRIS. Dado que no se conocen los sustratos naturales de estas enzimas, los ensayos actuales utilizan como sustrato el p-

nitrofenilfosfato (pNPP), incoloro a pH alcalino, en tanto que su producto el p-nitrofenol (pNP) tiene un color amarillo intenso.

Los primeros ensayos para cuantificar la actividad total en suero median la velocidad de liberación del fosfato inorgánico. Posteriormente fueron apareciendo otros métodos que mejoraron la sensibilidad y precisión. Los más utilizados son:

King y King:

La fosfatasa alcalina desdobla el fenilfosfato de sodio en medio alcalino tamponado con aminometil propanol (AMP). El fenol liberado se determina por reacción con la 4-aminoantipirina y ferricianuro como agente oxidante. El color es proporcional a la actividad.

Bessey-Lowry:

Utiliza como sustrato el pNPP, el producto de la hidrólisis es medido colorimétricamente. Utiliza un buffer glicina 0,05 M que no tiene muy buena capacidad reguladora a pH =10. Requiere una curva de calibración, el fenol liberado es inestable.

Bowers y Mc Comb:

Ofrece la conveniencia y sensibilidad de un sustrato auto indicador (pNPP) altamente efectivo en un buffer transfosforilante que actúa como aceptor de los grupos fosfatos, lo que aumenta la velocidad de la reacción.

Buffers:

- Dietanol amina (DEA): pese a su popularidad, presenta la desventaja de que su concentración óptima (1,8M) le otorga mucha viscosidad y por otro lado contiene cantidades significativas de mono etanol amina (inhibidor de las fosfatasas alcalinas).
- 2-amino-2-metil-1-propanol (AMP): recomendado por la IFCC a una cn. 0,35 M.
- Carbonato: no es transfosforilante e inhibe parcialmente la actividad enzimática.

pH: 10,4

Sustrato: pNPP, es un sustrato cromogénico, su concentración óptima es de 10Mm, es rápidamente hidrolizado, sensible a baja actividad enzimática y presenta afinidad semejante con las diferentes isoenzimas.

La IFCC recomienda el agregado de Mg^{++} y Zn^{++} , en cantidades óptimas ya que el exceso tiene un efecto inhibitorio. Además, debe agregarse HEDTA que actúa como buffers de iones metálicos.

E.C.2.6.1.2: ALANINO AMINOTRANSFERASA:

La alanina aminotransferasa cataliza la transferencia de un grupo amino entre la L-alanina y el L-glutamato. Los cetoácidos correspondientes de este proceso son el alfa-cetoglutarato y el piruvato.

L-Alanina + Alfa-cetoglutarato → AST → Piruvato + L-Glutamato

Esta reacción es reversible, y el equilibrio químico favorece la formación de alanina y alfa-cetoglutarato. No obstante, dada la relativa dificultad del análisis de estos productos, las técnicas empleadas típicamente fuerzan la reacción en sentido inverso.

Dos son los métodos de análisis que han gozado de mayor popularidad:

- **El método de Wróblewski.**
- **El método de Reitman y Frankel.**

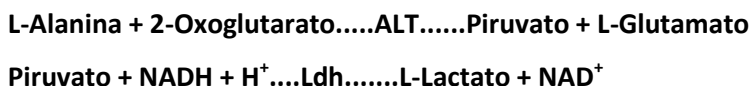
El primero requiere del acoplamiento de otra reacción en la que interviene la Ldh, y se miden sus productos de reacción.

En el segundo, la actividad de la enzima se mide por conversión del producto de reacción, el piruvato en su hidrazona.

La técnica enzimática de acoplamiento, con seguimiento continuo de la desaparición del NADH en el U.V., es el método de elección.

Método de Wroblewski:

El fundamento de este método se basa en la siguiente reacción:



Condiciones que debe reunir el sistema:

- **Agregado de Cofactores:**

Se recomienda el agregado de Piridoxal Fosfato, grupo prostético, verdadero transaminador, encargado de transportar los grupos aminos. Su presencia está garantizada en individuos sanos, porque está presente en el suero, pero no necesariamente en individuos desnutridos, cirróticos o con diálisis, donde en general la Vit.B6 está disminuída.

- **Buffers:**

La IFCC recomienda el uso de TRIS (hidroxi-metil-amino-metano), ya que el fosfato inhibe la acción del piridoxal fosfatp (PP)

- **Agregado de NaCO₃H:**

Porque es un activador de la enzima.

- **Concentración del Alfa-Oxoglutarato:**

No debe ser mayo de mayor a 20 mM porque el compuesto comienza a tener extinción propia. No debe ser menor a 15 mM. porque la concentración es subóptima.

- **Enzima Acoplante:**

Se debe agregar Ldh, en una concentración tal que la velocidad de la reacción catalizada por la misma sea por lo menos 100 veces mayor a la velocidad de la reacción directa. Además, debe estar en exceso para consumir posibles cetoácidos endógenos.

- **Concentración de NADH:**

No debe ser mayor a 0.18 mmol/lit. Porque el método pierde sensibilidad.

Método de Reitman y Frankel:

El fundamento de este método se basa en la siguiente reacción:

L-Alanina + Alfa-cetoglutarato. → .ALT. → .Glutamato + Piruvato

Piruvato + 2,4 DNFH. → .¹/₂alcalino → .Compuesto Coloreado

Este método presenta varios inconvenientes, motivo por el cual no se recomienda su uso, a no ser que este sea con finalidades de screening. Las principales desventajas son:

- Se forman dos hidrazonas, cuyos espectros de absorción se superponen. **Figura 16. Ver curva**
- La reacción no es lineal, por lo que debe realizarse una curva de calibración, la que utiliza como sustrato al piruvato.
- La concentración del Alfa-cetoglutarato es menor a la óptima, por lo que la velocidad de la reacción no es máxima.
- Interfiere todo compuesto que pueda dar una hidrazona, como por ej. los cetoácidos de los diabéticos.

E.C.2.6.1.1: ASPARTATO AMINOTRANSFERASA:

La aspartato aminotransferasa (AST) cataliza la transferencia de un grupo amino de aminoácidos específicos (L-Glutámico o el L-Aspártico)

A cetoácidos específicos (Alfa-cetoglutarico u oxalacético).

L-Aspartato+Alfa-Cetoglutarato.... AST....Oxalacetato + L-Glutamato

La metodología analítica más difundida es la misma que para el caso de ALT.

El método recomendado es el de Wroblewski.

Método de Wroblewski:

- **Agregado de Cofactores:**
Idem ALT.
- **Buffers:**
Idem ALT.
- **Concentración de Alfa-Oxoglutarato:**
Idem ALT.
- **Enzima Acoplante:**
Se debe agregar malato deshidrogenasa, en una concentración tal que la velocidad de la reacción indicadora transcurra unas 100 veces más veloz que la reacción directa. Además, se debe agregar Ldh, para consumir cetoácidos endógenos.
- **Concentración de NADH:** Idem ALT.

Método de Reitman y Frankel:

El fundamento de este método se basa en la siguiente reacción:

L-Aspartato + Alfa-cetoglutarato $\rightarrow$ AST $\rightarrow$ Glutamato + Oxalacetato

Oxalacetato (inestable) $\rightarrow \rightarrow \rightarrow$ Piruvato

Piruvato + 2,4 DNPH $\rightarrow \frac{1}{2}$ Alc. $\rightarrow$ Compuesto coloreado.

Los inconvenientes que presenta este método son los mismos que los mencionados para el caso de la ALT, solo que aquí se superpone una hidrazona más, que es la correspondiente al oxalacetato.

E.C.:3.1.1.8: ACILCOLINA ACILHIDROLASA / SEUDOCOLINESTERASA (PSCHE)

La colinesterasa sérica, también designada PSCHE, cataliza la siguiente reacción:

Acetilcolina + H₂O $\leftarrow$ SChe $\rightarrow$ Acetato + Colina

Pero es menos específica que la enzima eritrocitaria y por ende su función sería hidrolizar otros ésteres de colina.

Las metodologías más difundidas son las siguientes:

Método de Ellman: (de punto final o cinético):

Se basa en la siguiente reacción:

Ioduro de acetilcolina + H₂O $\rightarrow$ SChe $\rightarrow$ Ioduro de tiocolina + Acetato

Ioduro de tiocolina + DTNB $\rightarrow$ Ioduro d-5-ditio-trimetil-etil-amonio-2-nitro-benzoato + 2-nitro-5-tio-benzoato

Método de Knedel y Bottger:

Se basa en la siguiente reacción:

Ioduro de Butiriltiocolina + H₂O $\rightarrow$ SChe $\rightarrow$ Ioduro de tiocolina + Butirato

Ioduro de tiocolina + DTNB $\rightarrow$ Ioduro de 5-ditio-trimetil-etil-amonio-2-nitro-benzoato + 2-nitro-5-tio-benzoato

Se propuso una modificación del método de Ellman, utilizando como sustrato el ioduro de propionil tio colina, ya que produce una actividad 27 % mayor que el otro sustrato. Este se basa en la siguiente reacción y utiliza como buffer al fosfato a pH = 7,6.

Propionil tio colina + H₂O $\rightarrow$ SChe $\rightarrow$ Ac.Propiónico + Tiocolina

Tiocolina + DTNB $\rightarrow$ Tiocolina oxidada + Ac.5-tio-2-nitrobenzoico

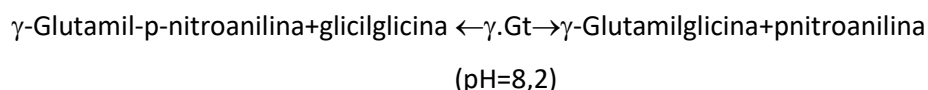
E.C.2.3.2.2: γ -GLUTAMILPEPTIDASA: AMINOACIDO γ -GLUTAMIL TRANSFERASA : γ -Gt.

Las peptidasas son enzimas que catalizan la hidrólisis de péptidos a aminoácidos o a péptidos más pequeños o a ambos.

Catalizan la siguiente reacción:



Elas constituyen un amplio grupo de enzimas de variada especificidad y algunas catalizan la transferencia de un aminoácido de un péptido a otro (o sea actúan como aminoácido transferasas)



Mucho interés se le ha dedicado a la γ -Gt por muchos años y su uso en el diagnóstico enzimático es amplio y rigurosamente ocupado desde la existencia de la primera metodología para su medición, introducida por Szasz en 1.969.

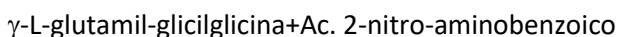
Este método y las modificaciones del mismo usan L- γ -glutamyl-p-nitroaniline (GGPNA) como substrato con glicilglycine como acceptor del residuo γ -glutamyl.

Otros substratos han sido investigados incluyendo el γ -glutamyl derivado de aminopropionitrilo, α -naftil amina y anilina, pero el GGPNA es el más conveniente porque es el más sensible y la p-nitroaniline formada puede ser medida directamente. Lamentablemente este substrato también tiene aspectos negativos, ya que su solubilidad en agua a pH=8 es limitada.

Un procedimiento alternativo se ha desarrollado en los últimos años, con la producción de derivados de GGPNA, donde varios grupos se han introducido al anillo de benceno, logrando incrementar la solubilidad en agua. El más usado de aquellos substratos es el L- γ -glutamyl-3-carboxy-4-nitroanilide. Este es realmente soluble en agua y es desdoblado por la enzima a una velocidad comparable con la del L-GGPNA. La sensibilidad es mayor debido a que se puede trabajar con mayor concentración de substrato. Es el recomendado por la IFCC.

Método de Szasz Modificado:

Se basa en la siguiente reacción:



El grupo carboxilo aumenta la polaridad del compuesto y lo hace más soluble.

Buffer: tris.

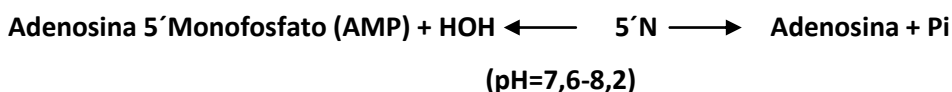
Método Recomendado por IFCC:

Utiliza el mismo fundamento, pero con buffer glicilglicina que actúa a su vez como sustrato aceptor y tiene buena capacidad amortiguadora.

E.C.3.1.3.5: 5'RIBONUCLEOTIDO FOSFOHIDROLASA: 5'NUCLEOTIDASA, (5'N) :

Es una enzima que hidroliza ésteres fosfóricos, en los que el fosfato se encuentra unido al C5' de la ribosa de un nucleótido púrico o pirimidínico.

Cataliza la siguiente reacción:



Otros sustratos pueden ser: IMP, UMP, CMP.

El más utilizado es el AMP, sin embargo, como este es un éter de fosfato, también puede ser hidrolizado en menor magnitud por otras fosfatasas (alcalina) inespecíficas.

La diferencia entre la fosfatasa alcalina y la 5'nucleotidasa está en su inhibición con iones níquel (de la 5'N), propiedad utilizada en el método de Campbell. El mecanismo de inhibición no está totalmente claro. Por otra parte, también algunas fosfatasas alcalinas también pueden ser inhibidas por el níquel. Belfield y Goldberg agregan un exceso de algunos ésteres de fosfato como el β-glicerofosfato o fenil fosfato, para reducir la proporción de la actividad de la fosfatasa alcalina que está dirigida a la hidrólisis del sustrato de la 5'nucleotidasa, debido a que estos ésteres solo pueden actuar como sustratos para las fosfatasas alcalinas. Esta ventaja no puede ser aprovechada cuando la metodología consiste en medir el fósforo inorgánico liberado, porque esta es un producto liberado por la acción de ambas enzimas.

Por otra parte e han descripto otros métodos espectrofotométricos en los cuales la adenosina (producto) es determinada por la cantidad de amonio formado.

Un método que evita la interferencia de las fosfatasas usa concavalina A, la que inhibe selectivamente a la 5'N, por lo que se puede estimar la interferencia por fosfatasas.

Los métodos automatizados se basan en la inhibición por níquel o agregado de exceso de un sustrato inespecífico.

Así tenemos dos grandes grupos metodológicos:

A- Los que miden el fósforo inorgánico liberado:

Método de Campbell:

A pH = 7,5 la fosfatasa alcalina, cataliza la misma reacción que la 5'N, por lo que en este método se determina;

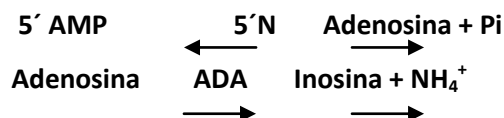
Pi₁: liberado por la acción de las fosfatasa totales.

Pi₂: liberado por la acción de todas las fosfatasa menos la 5'N.

Por lo que la actividad de la 5'N se logra mediante el agregado de níquel, que en realidad la inhibe parcialmente, por lo que el método es poco sensible para los valores al límite de referencia.

B- Los que miden la adenosina liberada:

Medición de la Inosina:



ADA = adenosinadiaminasa.

La adenosina absorbe a 265 nm., al perder -NH₂ deja de absorber, la disminución de la absorbancia es proporcional a la actividad de la enzima.

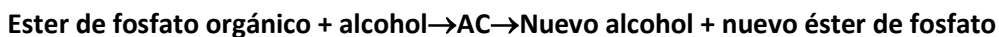
Medición del NH₄⁺ (cinético UV):



GLDH: glutamato deshidrogenasa.

E.C.: MONOESTER ORTOFOSFORICO FOSFOHIDROLASA / FOSFATASA ACIDA (A.C.P.):

Se designa así a un grupo de fosfatasa que exhiben actividad máxima cerca del pH = 5 y catalizan la hidrólisis de un monoéster ortofosfórico, produciendo un alcohol y un grupo fosfato, como se observa en la reacción bioquímica:



Los métodos para medirla son esencialmente adaptaciones de los de la fosfatasa alcalina. Por ejemplo, el fenil fosfato y 4-NPP son frecuentemente usados a pH ácido para su determinación.

Los métodos de monitoreo continuo se han basado en el principio introducido por Hillmann en el cual el α-naftol formado desde su éster de fosfato forma un compuesto coloreado el que es estabilizado con la sal de diazonio de 2-amino-5-clorotolueno-1,5-naftalen disulfonato. El método presenta varias dificultades: la velocidad depende estrechamente del pH, presenta una fase lag (de retardo) larga hasta que la reacción se estabilice y sea de orden cero, además el compuesto coloreado no es muy estable.

Luego se han introducido alcoholes como 1,5-pentanediol, éstos aceleran la reacción e incrementan la sensibilidad por que actúan como aceptores en la reacción de transferencia.

Es importante mencionar que la fosfatasa ácida prostática hidroliza algunos substratos menos que la total. Debido a que el interés diagnóstico está centrado en la determinación de la

primera, es que los sustratos elegidos siempre deben ser elegidos fundamentalmente en base a esta isoenzima.

Un método comúnmente usado es aquel que utiliza la inhibición del tartrato (inhibidor específico de la fosfatasa ácida prostática). Se realiza la determinación con y sin tartrato y por diferencia se mide la actividad de la isoenzima. Tiene la desventaja de presentar escasa sensibilidad para la detección de cáncer de próstata.

Actualmente la metodología recomendada es aquella que utiliza un sustrato altamente sensible como lo es el monofosfato de timolftaleína o bien ensayos de RIA para determinar fosfatasa ácida prostática.

El monofosfato de timolftaleína exhibe un alto grado de especificidad para la isoenzima, fue introducido por Roy y col. El suero se incuba con el sustrato en un buffer pH=5,95. La reacción se detiene agregando OHNa. La timolftaleína liberada produce un compuesto amarillo a pH alcalino que se mide a 590 nm. Este método fue modificado por Ewen para aumentar la sensibilidad, mediante el empleo del buffer de acetato (pH = 5,4), reduciendo la concentración del sustrato y el volumen de reacción.

MÉTODOS DE SEPARACIÓN DE ISOENZIMAS:

Los métodos utilizados para identificación de las diferentes isoenzimas, pueden ser de tres tipos:

SEPARATIVOS		NO SEPARATIVOS	INMUNOLÓGICOS
<i>Electroforesis:</i> *Carga Eléctrica: acetato de celulosa o agarosa. *Carga Eléctrica y PM: PAGE *Carga Eléctrica y PI (pH): *Isoelectroenfoque.	Cromatografía	*Resistencia a Químicos. *Inactivación Térmica. *Diferente afinidad por el mismo sustrato (Km)	*RIA. *ELISA. *Inmunoprecipitación. *Inmunoinhibición.

1.) MÉTODOS SEPARATIVOS:

A-) Técnica de Separación por Electroforesis Convencional:

ISOENZIMAS DE LÁCTICO DESHIDROGENASA:

Corrida Electroforética:

- Buffer Tris-barbital, pH = 8,6.
- Voltaje: 140-160 Voltios.
- Amperaje: 5mA/tira ancha.
- Tiempo: aprox. 40 minutos.

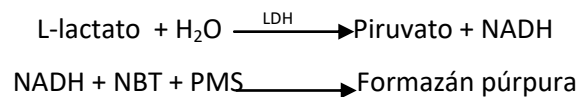
Incubación Enzima – Sustrato:

- Solución Sustrato:
 - 192 mg. L-lactato.
 - 2 ml de agua destilada.
 - 10 mg β -NAD⁺
 - 3 ml. Buffer Tris-barbital, pH:8,6.
- Tiempo: 60 minutos a 37 °C

Revelado:

- Solución Colorante:
 - 10 mg. NBT
 - 1 mg. PMS
 - 10 ml. Agua destilada.
- Fluorimetría.

Fundamento:



ISOENZIMAS DE CREATINKINASA:

Corrida Electroforética:

- Buffer agarosa, pH = 8,6.
- Voltaje: 140-160 Voltios.
- Amperaje: 5mA/tira ancha.
- Tiempo: aprox. 40 minutos.
- Sembrar en el medio de la tira.

Incubación Enzima – Sustrato:

- Solución Sustrato:
 - ADP 2 mM
 - AMP 5 mM
 - DAPP 10 M
 - NADP⁺ 2 mM
 - Creatinfosfato 30 mM
 - HK 2,5 U/ml
 - G6PGH 1,5 U/ml
 - NAC 20 mM

2 ml Buffer Imidazol, pH =6,7

- Tiempo: 90 minutos a 37 °C

Revelado:

- Solución Colorante:

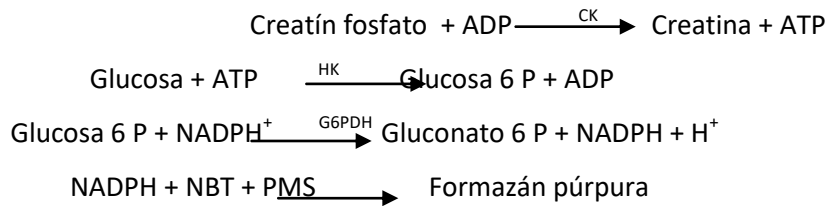
10 mg. NBT

1 mg. PMS

10 ml. Agua destilada.

- Fluorimetría.

Fundamento:



ISOENZIMAS DE LA FOSFATASA ALCALINA

Corrida electroforética:

Buffer: Tris-barbital o Agarosa, pH= 8,8

Voltaje: 140-160 voltios

Amperaje: 5mA/tira ancha

Tiempo: aproximadamente 40 min.

Incubación Enzima-Sustrato:

- Solución Sustrato:

2 mg. α -Naftil fosfato de sodio

1 ml Buffer Tris-Barbital, pH = 8,8

(agregar 0,150 ml. de $\text{Cl}_2\text{Mg} \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$, 0,1 M y 0,1 ml. SO_4Zn , 1 mM)

- Tiempo: 50 minutos a 37 °C.

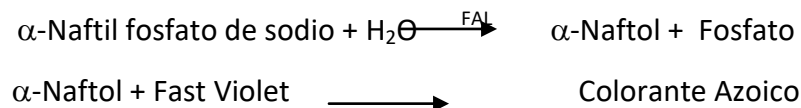
Revelado:

- Solución Colorante:

1 mg. Fast Violet salt

1 ml de H_2O destilada

Fundamento:



2.) MÉTODOS NO SEPARATIVOS:

ISOENZIMA ÓSEA DE LA FOSFATASA ALCALINA

Método de inhibición química con Lecitinas:

A- Método Artesanal:

1. En un tubo de centrifuga mezclar 5 µl de Triton X-100 al 10% (100 µl de Triton X-100 + 0,9 ml H₂O) y 50 µl de suero.
2. Incubar 30 min. A 37 ° C
3. Agregar 200 µl de lecitina (cc 6 g/l y pH= 7)
4. Incubar 30 min. A 37 ° C.
5. Centrifugar 10 min. A 2500 G y descartar el sobrenadante por inversión, escurrir bien secando la pared del tubo.
6. Resuspender en el buffer el sustrato (3 ml) y seguir la técnica para medir la fosfatasa alcalina total.

Nota: para el cálculo final se hace una corrección por volumen de suero utilizado. Lo que se mide es directamente la fosfatasa alcalina ósea, entonces hay que corregir según la modificación del volumen de suero con respecto a la técnica original.

B- Método Comercial:

1. Mezclar 0,1 ml. de suero con 0,1 ml. de la solución de lecitina de cc 2 g/l, pH= 4,5.
2. Dejar reposar 30 min. A temperatura ambiente.
3. Centrifugar 10 min. A 2500 G.
4. Utilizar el sobrenadante para hacer la determinación de fosfatasa alcalina.

Nota: Para el cálculo de fosfatasa alcalina ósea:

$$\text{FAL ósea (UI/l)} = 1,118 \times \text{FAL total} - 2,35 \times \text{FAL sobrenadante.}$$

3.) MÉTODOS INMUNOLÓGICOS:

DETERMINACIÓN DE CK-MB MASA:

El principio del método es un inmunoensayo enzimático de un paso basado en el principio "sándwich". La muestra se incuba con partículas de dióxido de cromo recubiertas con anticuerpos monoclonales específicos para la subunidad CKB y reactivo conjugado (anticuerpos monoclonales marcados β-galactosidasa específicos para la isoenzima CKMB). Durante el período de incubación se forma un sándwich de partícula/CKMB/conjugado. El conjugado no unido se elimina mediante

separación magnética y lavado. La β -galactosidasa unida al sándwich se combina con el sustrato cromogénico clorofenol rojo- β -D-galactopiranosido (CPRG). La hidrólisis de CPRG libera un cromóforo (CPR). La concentración de CKMB en la muestra del paciente es directamente proporcional a la tasa de variación del color debido a la formación de CPR medido a 577 nm. La cantidad de proteína CKMB se mide de forma inmunológica y los resultados se registran en unidades de masa (ng/mL o μ g/L).

DETERMINACIÓN DE CK-MB ACTIVIDAD:

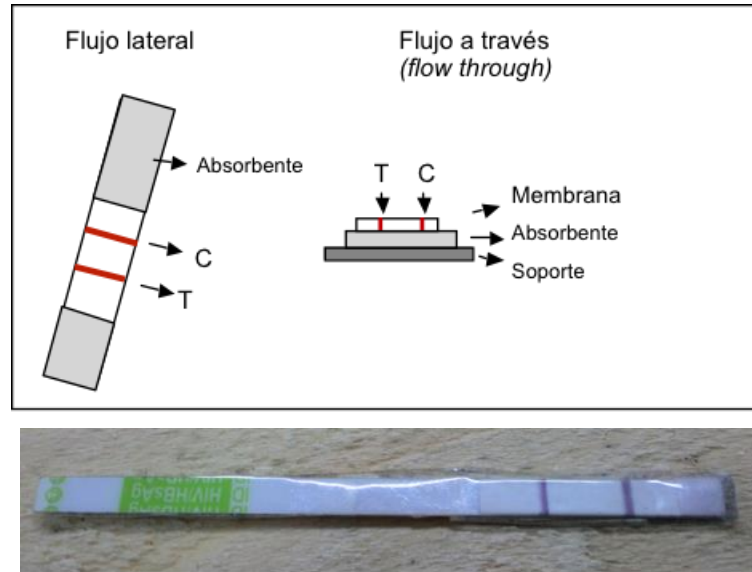
Principios del procedimiento: La actividad de la isoenzima CK-MM queda inhibida por un anticuerpo específico de la subunidad CK-M. La actividad de la subunidad B de la isoenzima creatina cinasa MB no resulta inhibida, lo que ofrece la base de la medición de la CK-MB. En una reacción enzimática acoplada, la creatina cinasa de la muestra del paciente cataliza la transfosforilación del fosfato de creatina a adenosina difosfato (ADP), para producir adenosina trifosfato (ATP). La hexocinasa (HK) utiliza la ATP para fosforilar la glucosa. La glucosa-6-fosfato resulta oxidada por la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G-6-PDH) con la reducción simultánea del fosfato de dinucleótido de nicotinamida y adenina (NADP) a NADPH. La velocidad de formación de NADPH se mide de forma bicromática a 340 y 540 nm y es directamente proporcional a la actividad de CK-B en la muestra.

OTROS PARAMETROS NO ENZIMATICOS UTILIZADOS EN PERFILES DE ORGANOS:

TROPONINAS:

MÉTODO INMUNOCROMATOGRÁFICO:

Los inmunoensayos de flujo lateral, o inmunocromatográficos, consisten en una membrana de nitrocelulosa en la que se inmoviliza un biorreactivo de interés. Posteriormente, la muestra y otros reactivos se mueven por capilaridad a unas zonas preparadas como “zona de prueba o test” y “zona de control”. Los inmunoensayos “flow through” implican el flujo de la muestra a través de la membrana porosa, colocada sobre un papel (o almohadilla) absorbente colocado debajo. El antígeno es retenido en la membrana donde se ha inmovilizado previamente un anticuerpo de captura, y la detección se lleva a cabo igual que en el caso anterior, por formación de un ensayo tipo “sándwich” con otro anticuerpo marcado. En estos test rápidos y sencillos, se suele usar conjugar el anticuerpo de detección con marcas colorimétricas, como el oro coloidal y una de las limitaciones principales que presentan, es la sensibilidad. Con este fin de mejorar la sensibilidad, se están explorando también sistemas basados en nuevas marcas nanoparticuladas o sistemas multimarca tales como nanovesículas (liposomas, niosomas, transferosomas), que encierran en su membrana varias unidades de una marca colorimétrica (para detección visual) o electroactiva



PRINCIPIO DE LA PRUEBA: El método utiliza Anticuerpos Monoclonales de ratón anti-cTnI, que reaccionan con la Troponina presente en muestra de suero, plasma o sangre total. Las muestras se mueven a través de una membrana cromatográfica por acción capilar. Muestras positivas para cTnI formarán una línea de color rojo en la región donde los Anticuerpos Monoclonales anti-cTnI están inmobilizados. Las muestras continúan siendo absorbidas por la membrana hasta la región del Anticuerpo Control, con la formación de otra línea, confirmando el procesamiento correcto del test.

REACTIVOS: Casete: Almacenar entre 2 y 30°C. No congelar. Contiene: - Región de Control: Anticuerpo policlonal de cabra anti-IgG de ratón. - Región de Test: Anticuerpos monoclonales A de ratón anti-cTnI. - Conjugado: Región Anticuerpos monoclonales B de ratón anti-cTnI conjugados con oro coloidal.

MÉTODO DE QUIMIOLUMINISCENCIA

La nueva generación de los analizadores primeros en la consolidación de tecnología y líderes en los laboratorios de urgencias incorpora la tecnología quimioluminiscente avanzada, para la determinación de marcadores cardíacos con una troponina de alta sensibilidad.

La quimioluminiscencia es un método de lectura que se basa en el principio de emisión luminosa a través de una reacción (enzima – sustrato). Este método posee una gran especificidad y sensibilidad ya que se puede determinar una reacción antígeno-anticuerpo del orden de los picogramos y con un mínimo de desnaturalización.

En la quimioluminiscencia (directa) tipo sandwich emplea como fase sólida, micropartículas paramagnéticas recubiertas de anticuerpos específicos contra la sustancia a analizar y como marca el éster de acridina.

Este ensayo es de tipo heterogéneo y se caracteriza de por emisión de luz visible debido a una reacción química producida por la oxidación del éster de acridina empleado como marca.

Ventajas: El no empleo de material radioactivo reducen los costos de mantenimiento y contaminación. Debido a que este es un método automatizado el tiempo de elaboración de la prueba es mucho más corto y mucho menos tedioso. Con esto teóricamente puede decirse que la quimioluminiscencia es un método alternativo para aquellos laboratorios grandes y pequeños que deseen montar estos inmunoensayos sin mayor complicación como lo es el RIA.

ENSAYOS PARA EL DOSAJE DE TROPONINA

La terminología empleada en la bibliografía para describir las técnicas de medición de Tn es algo confusa para aquellos no familiarizados con las prácticas de laboratorio.

Hay tres parámetros mencionados con frecuencia y que conviene conocer porque se encuentran citados en la definición universal del IM. *Uno de ellos es el coeficiente de variación (CV).*

El CV se establece por medio de mediciones repetidas de Tn en muestras con concentración conocida.

A concentraciones altas, todos los ensayos tienen CV bajo, pero a concentraciones bajas la variación aumenta y en algún momento llega a ser del 10%. Por debajo de este nivel, la medición se considera poco confiable para uso clínico. Los últimos ensayos desarrollados tienen un $CV < 10\%$ a una concentración de 1 ng/L. Con estos ensayos es posible detectar Tn en todos los sujetos considerados sanos, pero el 99% de ellos tienen niveles por debajo de 10 ng/L. Este es el nivel que se denomina percentil 99 y se utiliza como límite de referencia para distinguir valores normales de valores patológicos. Límite de detección es la concentración mínima de Tn que puede medirse. El límite de detección es muy inferior al percentil 99 y a cuando se describen las propiedades de un ensayo determinado.

Al analizar las variaciones en los niveles de Tn deben tenerse en cuenta que existen tanto la variación biológica (cambios de concentración espontáneos o “fisiológicos”) como la analítica (cambios de concentración propios del método de medición). Estas variaciones deben analizarse en conjunto y pueden alcanzar niveles del 35% al 85% en diferentes ensayos de laboratorio. En estos casos, variaciones de nivel que ocurran dentro de esa franja no necesariamente representan necrosis miocárdica.

TROPONINAS DE ALTA SENSIBILIDAD

En la definición universal del IM se exige que el nivel de Tn se mida con un ensayo que tenga un CV del 10% a nivel del percentil 99. Los ensayos utilizados tradicionalmente de Tn tienen un límite de detección de alrededor de 10-50 ng/L, un percentil 99 de 50 a 100 ng/L y un CV del 10% por encima del percentil 99. En consecuencia, estos métodos son incapaces de cuantificar la

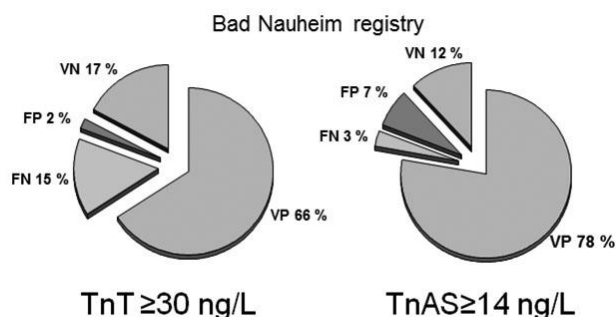
concentración sérica de Tn en individuos sanos y no cumplen con los requerimientos expresados en la definición de IM.

Recientemente se han desarrollado métodos ultrasensibles con límites de detección por debajo de 1 ng/L. Estos métodos son capaces de detectar y cuantificar con precisión el nivel de Tn en la mayoría de los individuos de la población sana, y a la vez permiten identificar casos de daño miocárdico previamente indetectables.

En comparación con los métodos previos, **los ensayos de Tn de alta sensibilidad tienen un CV del 10%** en el rango de valores que se encuentra por debajo del percentil 99. Gracias a estos nuevos métodos, ahora es posible medir la concentración de Tn de acuerdo con las recomendaciones establecidas en la definición universal del IM.

La mayor sensibilidad de las nuevas troponinas no debe confundirse con un descenso del punto de corte utilizado para definir anormalidad. En realidad, los ensayos de alta sensibilidad poseen una cantidad de mejoras técnicas que dan por resultado un incremento en la sensibilidad y precisión diagnóstica global. En consecuencia, las ventajas de las Tn de alta sensibilidad no pueden obtenerse simplemente reduciendo el punto de corte de un método de medición convencional.

Con esta nueva metodología, una proporción de los pacientes que con los métodos actuales no se identificaban como portadores de un SCA, ahora se clasifican como tales (Figura 1).



Otra ventaja importante **de las Tn ULTRASENSIBLES reside** en su cinética. La curva de liberación de Tn de alta sensibilidad es más rápida que la de los métodos antecesores. Con estos ensayos, la proporción de pacientes con necrosis que puede reconocerse en las primeras horas es significativamente superior a la lograda con ensayos de generaciones previas (16) (Figura 2). Esto constituye una gran ventaja para la toma de decisiones en el área de emergencias al reducir el período de ventana.

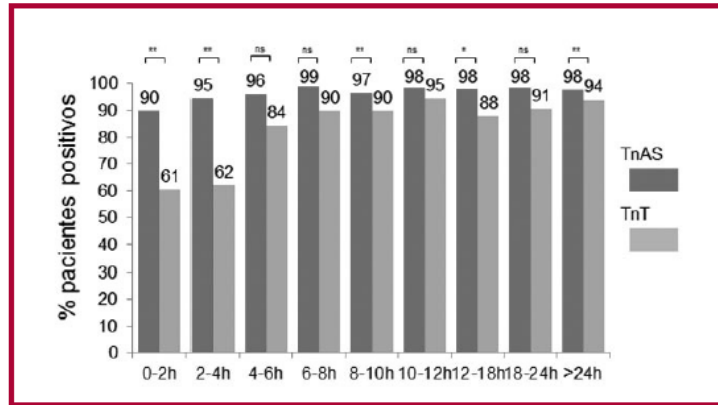


Fig. 2. Relación entre el ensayo de troponina y la ventana de tiempo. Modificada de Weber y colaboradores. (16) TnT: troponina T. TnAS: Troponina de alta sensibilidad. ns: No significativo. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

ANTIGENO PROSTATICO ESPECÍFICO PSA TOTAL Y LIBRE:

Métodos: IRMA, EIA, quimioluminiscencia.

Muestra: suero o plasma (EDTA)

Valor de referencia: hasta 4,0 ng/ml

Vida media: 2-3 días

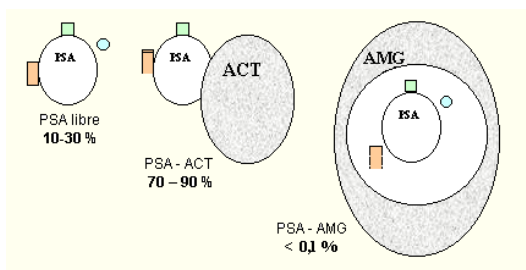
Significado Clínico: El antígeno prostático específico (PSA) es una serino-proteasa perteneciente a la familia de las kaliceínas que, aparentemente, sólo se origina en el epitelio prostático (normal, adenomatoso y maligno) y es secretada al fluido seminal. Sin embargo, con metodologías más sensibles, como las empleadas en inmunohistoquímica, se ha detectado PSA en tumores de mama, pulmón, colon, ovario, hígado, riñón, adrenal, paratiroides, tumor de piel y glándulas salivales. El PSA tiene acción lítica y su función es el clivado de la semenogelina, principal proteína del coagulo seminal, permitiendo la licuefacción del mismo a fin de facilitar la motilidad espermática. El PSA no presenta variación diurna, aunque existe gran variabilidad individual.

En suero forma complejos con varios inhibidores de proteasas, circulando en diferentes formas moleculares:

Formas moleculares	Sigla	Descripción
PSA- total	PSA-t	Son todas las formas inmunodetectables en suero. Principalmente PSA-I y PSA-ACT
PSA libre 10-30 %	PSA-I	Es el PSA no complejoado. Su acción proteásica es inactiva en suero.
	PSA-ACT (70-90%)	Es el PSA unido en forma covalente a la α 1-antiquimotripsina. Es la mayor forma inmunodetectable.
	PSA-AMG (menos del 0,1%)	Es el PSA unido y encapsulado por la α 2-macroglobulina. No es inmunodetectable.
	PSA-PCI	Es el PSA unido covalentemente al inhibidor de la proteína C y no es detectable en suero
	PSA-AT	Es el unido a la α 1-antitripsina. Se encuentra en trazas en circulación.
	PSA-IT	Es el PSA unido al inhibidor inter a tripsina. Se halla en trazas en suero.

Los métodos disponibles en el comercio pueden evaluar el PSA-I, el PSA-t (PSA-I +PSA-ACT) y el PSA complejoado (PSAc). El conocimiento del PSA complejoado, el PSA-I y sus relaciones con el PSA total generó la necesidad de un ensayo equimolar para el PSA total. Conceptualmente el ensayo equimolar para PSA total debe medir el mismo valor de PSA independientemente de cuál sea la relación PSAC:PSA-I. Los ensayos no equimolares generalmente sobrestiman PSA libre. Los ensayos estandarizados contra proporción 90:10 (PSA-ACT: PSA libre) no son equimolares y los resultados no correlacionan para las distintas concentraciones de las isoformas. En 1994 el NCCLS acordó la necesidad de un ensayo equimolar para PSA total y en mismo año la Segunda Conferencia Internacional en la Estandarización del PSA recomendó que la estandarización de los ensayos se debía hacer contra un estándar que contenga 90% de PSA-ACT y 10% de PSA-I.

Formas predominantes de PSA sérico (PSA libre y PSA–ACT) inmunológicamente detectadas.



IMPORTANTE: No se deben realizar seguimientos en distintos laboratorios. La comparación entre valores de PSA obtenidos en laboratorios diferentes, con kits distintos es usualmente pobre.

BIBLIOGRAFIA:

- Jacobo Díaz Portillo, Teresa Fernández del Barrio, Fernando Paredes Salido. Aspectos Básicos de Bioquímica Clínica. Ediciones Díaz de Santos. Madrid, España. 1997.
- Ira Targoff. Rheumatic disease clinics of North America. Vol.20, numero 4. Noviembre 1.994.
- D'Ocon Navaza MC, García-Saavedra MJ, Vicente García JC. (1999). Análisis de Muestras Biológicas. Madrid. Ed. Paraninfo.
- Salve ML, Amich S, Prieto S, Casas A. (1994). Laboratorio Clínico. Madrid. Ed. Interamericana•McGraw-Hill.
- Anderson SC, Cockayne S. (1995). Química Clínica. Méjico. Ed. Interamericana•McGraw-Hill.?
- KAPLAN. Clinical Chemistry. Interpretation and Techniques. Buenos Aires. Ed. Panamericana
- Alfonso Balcells. La clínica y el laboratorio. 17^{ma} edición. 1999
- El manual Merck. Décima edición. 1999

