

El empleo de anticuerpos para el estudio de la transaminasa glutámico-aspártico de corazón e hígado humano

FELIX CORDOBA A.

AARON PEREZ M.

LAS REACCIONES DE TRANSAMINACIÓN han sido descritas desde hace algunos años en diversos tejidos, de plantas, animales y humanos, y su trascendencia metabólica celular es bastante clara y manifiesta. Sin embargo, el significado de la aparición de estas actividades a niveles superiores de lo normal en diversos cuadros patológicos humanos es aún motivo de estudio.

Sería quizá deseable que las transaminasas de hígado que pueden liberarse al suero fuesen distinguibles de otras, por ejemplo: las de corazón, lo que permitiría un diagnóstico adecuado del órgano afectado. Pero la realidad aún no permite predecir que esto será totalmente posible.

Por los resultados de este trabajo, otros de este laboratorio¹, y hallazgos de diversos investigadores, como Boyd², las transaminasas* se encuentran localizadas dentro de la célula en dos sitios diferentes, uno, intramitocondrial y el otro citoplasmático, fuera de las partículas. Esta evidencia hace pensar que podría haber modificaciones estructurales de estas diversas amino transferasas que las haría comportarse de modo diferente permitiendo, con métodos comunes relativamente simples, determinar las diversas proteínas activas y compararlas con las de otros órganos.

Con lo expuesto se planeó un estudio comparativo de las entidades enzimáticas presentes en extractos de corazón e hígado humanos responsables de la acción amino transferante del L-aspártico al ácido alfa-oxoglutámico, denominada comúnmente transaminasa glutámico-aspártico ó glutámico oxalacético.

* En lo que resta se denominarán a las transaminasas del modo genérico aceptado recientemente³ es decir: amino transferasas.

La diferenciación protéica se llevó a cabo adecuadamente con métodos inmunológicos siendo usada entonces de manera preferencial en esta investigación. De acuerdo con este criterio las enzimas humanas originarias del corazón pueden diferenciarse serológicamente de las correspondientes de hígado, o de otros órganos.

Se comprobó como en otros casos⁴ la sensibilidad de éstas enzimas a la acción de los anticuerpos específicos, logrando diseñar experimentos que demuestran que la actividad tanto de las isoenzimas*⁵ de corazón como de hígado son totalmente neutralizadas "in vitro".

MATERIAL Y MÉTODOS.

Preparaciones de extractos con actividad enzimática

Los órganos humanos obtenidos de autopsias recientes se homogeneizaron en tres volúmenes de agua destilada fría en la licuadora "omni mixer", durante cinco minutos por periodos alternos de un minuto, El tejido molido se filtró a través de cuatro capas de gasa para deshacerse del residuo fibroso adicionando inmediatamente con la solución descrita por Jenkins⁶ para proteger la enzima en el paso subsiguiente: Por cada 100 gr. de tejido fresco se añadieron 6.5 ml de solución buffer de ácido maleico 0.05 M en amortiguador de verseno (etilendinitrilo tetracetato) 0.005 M a pH 6., y 2.2 ml de ácido alfa-oxoglutarico 0.04 M. La mezcla es agitada y el recipiente sumergido en un baño maría a 60° C. durante 20 minutos, seguido de centrifugación refrigerada a 4° C. a 2,200 r.p.m. durante una hora.

La mayor parte de la enzima está en el sobrenadante de color amarillento, el cual es dializado en frío y liofilizado. El material sólido resultante es un polvo fino, higroscópico y muy soluble que conserva la actividad si es almacenado en un desecador en frío.

Electroforesis en gel de almidón

Para la separación electroforética de los componentes protéicos, se usaron los métodos de Smithies⁷. El amortiguador descrito fue substituído por el "discontinuo" de tris (hidroximetilamino-metano) 9.2 gr., ácido cítrico 1.05 gr. para el gel, y ácido bórico 18.5 gr. e hidróxido

* Se denominan "isoenzimas" en este trabajo a las especies protéicas moleculares con una misma actividad catalítica pero diferente comportamiento electroforético en el gel de almidón. Algunas también son diferenciables serológicamente.

de sodio 2.5 gr. para las cubas⁸ disueltos cada uno en un litro de agua destilada a pH 8.3 El almidón en polvo fue obtenido de los laboratorios Connaught de la Universidad de Toronto, Canadá.

Algunas de las placas desarrolladas fueron rebanadas a lo largo y sumergidas en colorante de Negro amido en solución saturada de metanol 50 partes, agua 50 partes y ácido acético 10 partes⁷.

La distribución de las isoenzimas de éstos y otros tejidos de diferentes animales ha sido motivo de un estudio en este laboratorio aun no publicado¹, pero que ha permitido simplificar el procedimiento de elución de las enzimas de las fracciones del gel de tal manera que únicamente se efectúan tres cortes perpendiculares a la dirección de migración, (como está indicado en la misma Fig. N^o 1). Separando una zona más positiva (isoenzima I ó alfa), una segunda zona, detrás de la primera (II ó beta) y una última (la isoenzima III ó gamma), en la zona aniónica del gel.

Como la pureza desde el punto de vista inmunológico de esta última fracción III fue satisfactoria, la mayoría de las experiencias cuantitativas posteriores de este trabajo se han efectuado usando esta isoenzima.

En el mismo trabajo¹ se analizó el problema de la elución cuantitativa de las actividades enzimáticas del gel de almidón concluyéndose que el fraccionamiento observado corresponde muy probablemente a diferente índice de migración electroforética de las distintas isoenzimas de amino transferasa y no son artificios (agregamientos o desdoblamientos debido al procedimiento usado. Estos hallazgos por otra parte, están confirmados tanto por el trabajo inicial de Fleisher⁹, como con el más reciente de Boyd¹⁰ usando un procedimiento electroforético en almidón semejante al empleado en este trabajo.

Inmunizaciones de conejos y preparación de las globulinas gamma.

Se escogieron seis conejos adultos hembras los cuales fueron inyectados, con las enzimas de hígado humano a concentraciones de 1 mg. de la preparación disuelta en salina fisiológica por vía intracorneal e intracorneal e intradérmica¹¹.

Dos semanas más tarde el sangrado demostró contener pocos anticuerpos, y los animales fueron reinyectados con 5 mgs de la preparación incorporados en adyuvantes completos según Freund¹². Al cabo de otras dos semanas volvieron a inyectarse por vía intravenosa lentamente con el antígeno soluble sin adyuvantes. Recientemente, tres meses

después de las series consignadas arriba se han vuelto a inyectar intravenosamente pero usando esta vez únicamente la isoenzima III de la preparación de hígado humano. La sangre fue colectada a los tres días de la última inyección obteniéndose anticuerpos con buen poder precipitante e inhibidor.

Los sueros anti-amino-transferasa de corazón humano fueron colectados de otros seis conejos inyectados con la preparación de corazón humano precipitada en solución salina con 3 mg/ml de sulfato de aluminio de pH 6.7 con hidróxido de sodio¹³. Se aplicaron inyecciones de 1 ml de este preparado por vía intravenosa en la vena marginal de la oreja cada tercer día durante cuatro semanas. Después de un lapso de descanso éstos animales han sido reinmunizados con la preparación soluble de corazón humano eluída de la zona III gamma de los bloques de la electroforesis.

Las inhibiciones serológicas simples descritas aquí se llevaron a cabo con soluciones de las globulinas gamma del suero de los animales inyectados con amino transferasas, que fueron aisladas por precipitación con sulfato de sodio, según procedimiento descrito por Kabat y Mayer¹³. La concentración de proteínas inhibidoras se determinó por la lectura de la absorción de las soluciones a 280 m μ en el espectrofotómetro Beckman D. U. Estos valores fueron transformados a nitrógeno protéico por medio de una curva de calibración de las mismas proteínas cuanteadas con el reactivo de Nessler según Lanni¹⁴.

Medición de las actividades enzimáticas y de la inhibición serológica

Para las mediciones de actividad enzimática de transaminación aspartico-glutámico se utilizó el método general de Cohen y Cammarata¹⁵ modificado según Kun y col.¹⁶. Teniendo en cuenta las recientes consideraciones de Boyd² en conexión con estos métodos se ha modificado ligeramente: el tetraborato de potasio ha sido substituído por la sal de sodio, usando una concentración final de 100 μ M. Esta sal tiene un papel importante ya que estabiliza, ya sea la forma enólica del oxalacético formado o una mezcla estable de las formas cetónica y enólica del ácido que presenta un coeficiente de absorción intenso¹⁷.

Si la concentración de tetraborato es disminuída se favorece la aparición de una forma compleja inestable con la inseguridad de cuanteo consiguiente. Por otra parte, el exceso hasta 400 micromolas de tetraborato no da aparentemente lecturas más estables, ni aumenta sensiblemente el coeficiente de absorción.

Las concentraciones finales en la celda de sílice del aparato (3 ml) son las siguientes:

	Concentración
ácido alfa-oxoglutarico	30 micromolas.
ácido L-aspartico	300 „
tetraborato de sodio	100 „
sulfato de magnesio	1 „
Tris (hidroximetilamino-metano)	0.2 Molar
Fosfato de Piridoxal	20 microgramos.

pH 8.4

Los componentes, con excepción de cofactor que se añade aparte, son pesados y disueltos, y se conservan en pequeñas botellas en el congelador a menos de 25° C. Para efectuar el enayo se miden cuidadosamente 2 ml de la mezcla completa, que finalmente llevarán un volumen de tres mililitros, siendo completados con la dilución apropiada de la enzima en las muestras experimentales o con agua destilada en el testigo.

Inmediatamente, una vez mezclado el substrato con la enzima, se agita suavemente en el tubo varias veces, y se determina el incremento de la densidad óptica a 290 μ a temperatura ambiente 23° C. durante ocho minutos^{16, 17}. Las diferencias de D. O. se grafican en papel milimétrico contra tiempo. De esta gráfica que generalmente es lineal hasta cerca de 20 minutos, se obtiene la velocidad inicial. Las unidades (U) de actividad se definieron como el cambio de densidad óptica a 290 μ igual a 0.001/minuto y corresponden a la absorción de 0.0011 micromolas de ácido oxalacético. De acuerdo con la reciente definición de la Asociación Internacional de Bioquímica³ éstas unidades corresponden exactamente a mU (milésimas de unidad), ya que una unidad es igual a una micromola del producto por minuto. De aquí en adelante se usará uU para la explicación de resultados.

Medición de la inhibición enzimática por anticuerpos

Se prepararon diluciones adecuadas de la enzima del orden de 20 a 30 mU de actividad pipeteadas en alícuotas de 0.3 a 0.5 ml. en tubos de vidrio "Pyrex" de 120 por mm. previamente lavados con mezcla crómica. A continuación se pipeteó el cofactor (fosfato de piridoxal) en la cantidad descrita de 20 microgramos que parece ser suficiente para asegurar un exceso en todas las condiciones de actividad y por último se

añadieron las globulinas gamma de sueros de conejos inmunizados en volúmenes de 0.1 a 0.2 ml. Aunque se obtienen inhibiciones adecuadas usando el suero entero, el sistema se simplifica bastante al usar preferentemente la fracción de globulinas gamma; ya que disminuye la absorción e puria de proteínas inespecíficas en la región de los 290 mu.

La mezcla de enzima e inhibidor es agitada cuidadosamente y los tubos se pre-incuban a temperatura ambiente durante dos horas. En sistemas inhibidores similares de sueros de aves se determinó que este tiempo era suficiente para obtener el máximo de neutralización enzimática⁴. Al finalizar este tiempo se centrifugan los tubos por cuarenta minutos a 3,200 f.p.m. en frío, obteniéndose los sobrenadante y midiendo la actividad residual, agregando 2 ml. del substrato completo. En tubos preparados con substrato y enzima se hacen medidas paralelas substituyendo las globulinas gamma por solución salina. Tanto las globulinas gamma como el suero de animales normales resultan inactivos al ser ensayados de esta manera.

Precipitación de los antígenos tisulares en cajas de difusión de Ouchterlony¹⁸.

Para esta prueba se usaron cajas de Petri de 5 cm. de diámetro, llenándolas con una solución caliente de agar (Bacto, Difco) al 1.5% en salina isotónica con merthiolate (Lilly) al 1:10,000 como preservador. Los depósitos circulares para las soluciones de antígenos y anticuerpos se hicieron con el instrumento horador de tapones, llenando los pequeños recipientes cilíndricos con las soluciones por medio de una pipeta Pasteur. Al cabo de cuatro a ocho días de difusión a temperatura ambiente (no se almacenaron en cámara húmeda) las precipitaciones eran completas. Para obtener la información se hicieron esquemas dibujando las bandas de precipitación de las placas; se tomaron fotografías por contacto directo con papel sensible, se lavaron, secaron y tiñeron¹⁹ conservándose entonces toda la placa original de agar con las precipitaciones formadas.

Precipitación cuantitativa:

Aunque la evaluación más adecuada de una neutralización enzimática por anticuerpos requiere necesariamente, como todos los sistemas inmunológicos en general, de una medida de la precipitación cuanti-

tativa²⁰, este tipo de análisis no se había efectuado en el caso de las aminotransferasas por la carencia de antígenos puros.

Contando ya ahora con antígenos enzimáticos, separados de la sección III del gel que se comportan como proteínas purificadas, se llevaron a efecto neutralizaciones cuantitativas. La de este trabajo Fig. 3 corresponde a la isoenzima III de corazón humano. La correspondiente de hígado no ha sido purificada rutinariamente de un pequeño contaminante, pero se puede lograr si se sujeta a cromatografía de celulosa intercambiadora como se verá más adelante.

En el método de precipitación se efectúan diluciones crecientes del antígeno en diferentes tubos de ensayo, que son mezclados con un volumen apropiado de antisuero en cada caso. Por las características de solubilidad de los complejos antígeno-anticuerpos formados, es mejor determinar las proporciones óptimas de combinación, ensayando pequeñas dosis de antígeno hasta llegar al máximo (la concentración de antígeno que precipite todo el anticuerpo de la solución) para finalmente determinar la región del exceso de antígeno, donde se solubiliza parte del precipitado¹³.

El desarrollo de la precipitación cuantitativa de la manera clásica descrita, tiene ventajas cuando el antígeno es una proteína simple. En este trabajo el antígeno es una enzima que tiene una función catalítica específica detectable y que sirve de índice de la neutralización serológica, conviniendo mejor efectuar la prueba cuantitativa invirtiendo los parámetros, esto es: diluir en una serie de tubos la solución de anticuerpos ensayándola con concentraciones fijas de antígeno (enzima). Esto, presenta ventajas indudables ya que, agregado a una serie completa de tubos la misma actividad enzimática, que puede incluso ser considerable, fácilmente se detecta, si la hay, la neutralización de toda o parte de la actividad, aún en los casos donde la concentración del anticuerpo es moderada. Las ventajas de esta variante en el caso de las antienzimas ha sido analizado convenientemente por Cinader²¹, y Schlamowitz, por ejemplo: la usa en sus estudios de la neutralización de las fosfatasa²² habiendo efectuado recientemente comparaciones de anticuerpos precipitados de las dos maneras y llegando a la conclusión que los datos son equivalentes.

Cromatografía en columna de celulosa modificada. (Dietilaminoetil celulosa DEAE Eastman).

Debido a la persistencia de un contaminante inactivo en la fracción isoenzima III de hígado humano, definida con claridad en las placas de difusión con suero anti-transaminasa de hígado, se preparó una columna cromatográfica con cuatro gramos de DEAE que fue desarrollada de acuerdo con las instrucciones de Sober y Peterson²³. La elución se llevó a cabo en alícuotas de cinco mililitros por tubo, colectadas manualmente de la columna refrigerada a 4°C. con un baño de agua helada. Se aplicó presión moderada de un tanque de nitrógeno para favorecer la elución rápida. La Fig. 2 corresponde al espectro de la elución de esta mezcla, midiendo la salida de proteínas por la lectura del contenido de los tubos a 280 mμ. Las concentraciones de los amortiguadores y el pH están indicados en la misma Fig. 2.

RESULTADOS

Se presentan en la Tabla 1 los resultados de las purificaciones enzimáticas de las dos preparaciones empleadas. Debido al gran tamaño de un hígado humano y la dificultad consiguiente de manipulación, se usó solamente una porción de 440 gr. (Peso húmedo). El primer paso, de homogeneización en frío, se hizo rápidamente, siendo el producto mezclado con la solución protectora para el segundo paso de purificación por calentamiento, se ha podido observar que no sólo ofrece protección sino hasta un ligero efecto activador debido quizá a la destrucción de inhibidores.

En el caso de la amino transferasas de hígado humano los resultados indican con este paso una purificación de 3 a 4 X, en el primer sobrenadante del material calentado. En la amino transferasa de corazón humano este valor fue de 80 mU/mg. también del orden de 3 X. Aunque éstos valores no son altos, el procedimiento da un producto estable muy diferente del homogeneizado inicial el cual no puede conservarse activo en solución por mucho tiempo. El rendimiento en el caso de la enzima de corazón solamente llegó a ser de una tercera parte del valor inicial, ya que no se trabajó la fracción 2. En el caso de la enzima hepática se recuperó la totalidad de la actividad.

Se utilizó como tercer paso rutinario el método de electrofóresis en gel de almidón. Las razones de seleccionar este procedimiento, sobre otros

TABLA I

PURIFICACION DE LAS DOS PREPARACIONES DE TEJIDO DE HIGADO Y CORAZON HUMANO CON ACTIVIDAD AMINO TRANSFERASA.

	A. T. H. H.	A. T. C. H.
1. - Peso húmedo del tejido en gramos:	440	230
Volúmen del homogeneizado en mililitros:	1,760	630
Actividad total en unidades:	3,270,300	1,682,575
Actividad específica homogeneizado U/mg:	35	33
2. - Calentamiento y centrifugación:		
Sobrenadante liofilizado		
Peso seco en gramos:		
Fracción 1. -	23	10.4
Fracción 2. -	3.16	
Actividad total:		
Fracción 1. -	3,220,000	567,000
Fracción 2. -	234,210	
Actividad específica U/mg.		
Fracción 1. -	140	80
Fracción 2. -	74	
3. - Electroforesis en gel de almidón y separación de porciones - activas:		
Actividad específica U/mg.		
Isoenzimas: I	1,616	816
II	276	500
III	224	94

ATHH. — Amino transferasa hígado humano.

ATCH. — Amino transferasa corazón humano.

U= mU como están descritas en el texto.

propuestos y usados por diversos autores¹⁵ son las siguientes: Desde la descripción del método original de electrofóresis en gel de almidón⁷ se hizo evidente, que estos medios de soporte permitían discriminar efectivamente mezclas proteicas complejas. Aunque ya era conocido, por análisis electroforético en papel, que los extractos de tejidos similares contenían al menos dos componentes de transaminación, uno catódico y el otro anódico⁹, no se podía saber a "priori" si los mismos u otros nuevos compuestos se harían evidentes en el gel. Los experimentos iniciales mostraron que la actividad estaba distribuida ampliamente a lo largo del gel. Después de numerosos experimentos se ha concluido que existen por lo menos tres tipos de amino transferasas aspártico-alfa-oxoglutarico (T.G.O.) tanto en el tejido hepático como en el de origen cardíaco, lo que ha sido confirmado recientemente por otros autores¹⁰. Los resultados del examen de otros tejidos animales mostraron una composición distinta, motivo de un trabajo de este laboratorio¹.

En la misma Tabla se exponen los datos experimentales de actividades específicas de las soluciones eluidas de los bloques de almidón. En los dos casos las isoenzimas I corresponden a la porción del gel más cercana al ánodo Fig. No. 1. Al teñir el gel, se observa que esa región presenta varias zonas que corresponden a contaminaciones de migración electroforética semejantes, sobrepuestas a la isoenzima I.

En la región II todavía se observan varias proteínas de movilidad intermedia del mismo carácter de las anteriores. La zona gamma catódica, por el contrario, ya no presenta proteínas contaminantes visibles por la tinción.

En la mayoría de los casos la actividad enzimática medida inmediatamente de eluido el gel fue considerable, sin embargo, debido a la falta de otras proteínas en los eluidos de la zona gamma III, esta isoenzima fuera del gel demostró ser inestable. Por el contrario, la fracción I y la II conservan su actividad en solución salina (Na Cl 0.9%) por un tiempo largo. Por esta circunstancia, las actividades específicas anotadas en la Tabla 1, no reflejan el hecho de que la fracción III corresponde a la isoenzima de mayor pureza. En la actualidad se hacen experimentos concernientes a desarrollar un procedimiento que permita estabilizar a estas "isoenzimas" durante su purificación a partir del extracto crudo inicial.

Las cifras de actividad específica para la amino transferasa de hígado humano I, II y III, son de 1,616, 276 y 224 respectivamente dando un factor de purificación en relación con el homogeneizado inicial, de

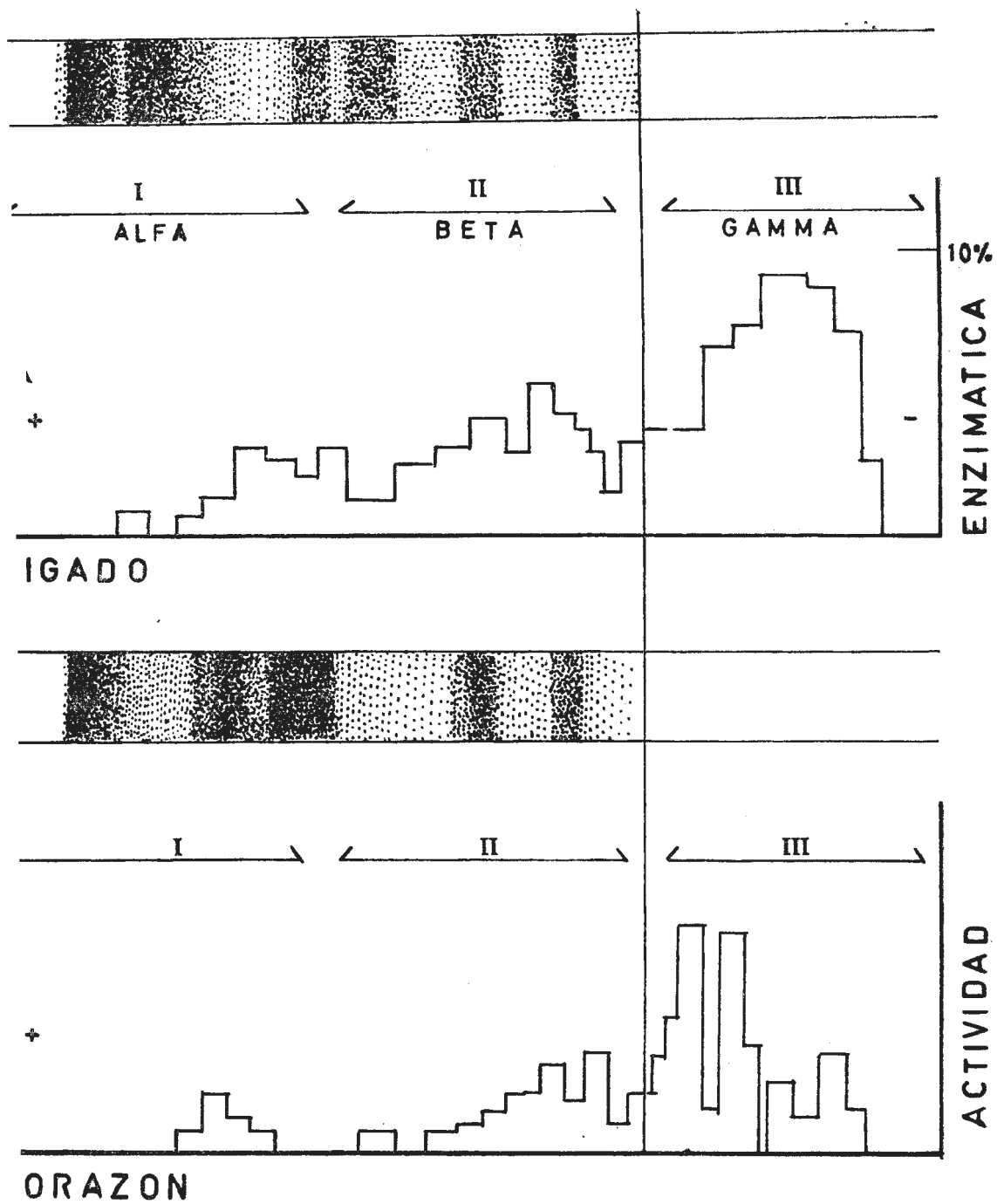


FIGURA I

Electroforesis en Gel de Almidón de las dos preparaciones usadas de A. T. H. H. y A. T. C. H. Las Isoenzimas usadas corresponden al material activo eluido de las regiones marcadas I Alfa, II Beta y III Gamma.

46 X, 9 X y de 8 X respectivamente. Para la isoenzima I de aminotransferasa de corazón humano, es de 25 X, para la II de 15 X y para la III de 3 X. Únicamente las isoenzimas de I y posiblemente en II, por lo expuesto antes, reflejan la situación real, y solamente nuevos experimentos ya planeados permitirán aclarar si la desnaturalización es la responsable de los bajos valores obtenidos con la enzima catódica III, en ambos tejidos.

Resultados del análisis antigénico

Las proteínas eluidas de los bloques de electrofóresis fueron ensayadas en las cajas de difusión tanto contra sueros anti-corazón como con sueros anti-hígado. Las bandas de precipitación de las reacciones antígeno-anticuerpo son visibles en las fotografías de las páginas siguientes. Los resultados de este tipo de análisis están computados en la Tabla No. 2. Los antígenos presentes se han dividido de acuerdo a la zona del bloque de almidón donde fueron eluidos, tomándose la presencia de una banda clara de precipitación como correspondiente a un sólo antígeno, como se explica al pie de la Tabla.

Se usó una clave para distinguir cada antígeno: la fracción I (alfa) de hígado tiene tres antígenos diferentes, el lh, el 2hc y el 3hE. El lh corresponde a un antígeno rápido, posiblemente albúmina, presente siempre en estos extractos y en los correspondientes de corazón humano. Como es sabido, estas proteínas no tienen actividad demostrable de amino transferasa. En seguida aparece un segundo antígeno, el 2hc, también presente en la porción I y en la II de corazón. No se puede decir si la actividad presente en éstas soluciones es debida a este componente, pero otras consideraciones que se hacen más adelante no favorecen esta idea. Este antígeno corresponde a proteínas de movilidad semejante a las transferrinas de los sueros humanos²⁴. En el mismo eluido I, por último, se demuestra un antígeno hepático propio que no se encuentra en corazón y que tiene actividad enzimática, el 3hE; su distribución en el gel de almidón es amplia, ya que aparece consistentemente en la región II (beta) con las mismas características que en la I.

Las soluciones eluidas de la parte catódica de geles con extracto hepático presentan dos bandas antigénicas; la primera, lh, corresponde a un antígeno propio del hígado, ausente en corazón y sin actividad enzimática y el otro, 4hE, propio también de hígado, corresponde a la isoenzima III gamma y distinto de los antígenos 3hE de las zonas anteriores.

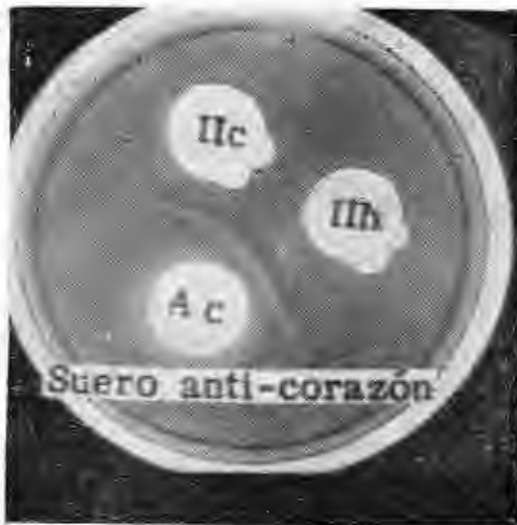
Tabla 2

COMPOSICION ANTIGENICA DE LOS EXTRACTOS HEPATICO Y CARDIACO HUMANOS OBTENIDA POR DIFUSION EN PLACAS DE AGAR (OUTCHERLONY) CON SUEROS DE CONEJO ANTI-HIGADO Y ANTI-CORAZON.

EXTRACTO CARDIACO			EXTRACTO HEPATICO		
Región eluída de los bloques de electroforesis Fig. 1			Región eluída de los bloques de electroforesis Fig. 1		
I	II	III	I	II	III
ALFA	BETA	GAMMA	ALFA	BETA	GAMMA
(Pre-Alb, Alb, Tf)	(Hp, α 2)	(γ glob.)	(Pre-Alb, Alb, Tf)	(Hp, α 2)	(γ glob.)
1hc	1hc	--	1hc	1hc	--
--	--	--	--	--	1h
2hc	2hc	--	2hc	2hc	--
--	--	--	3hE	3hE	--
3cE	(?)	--	--	--	--
--	--	4cE	--	--	4hE

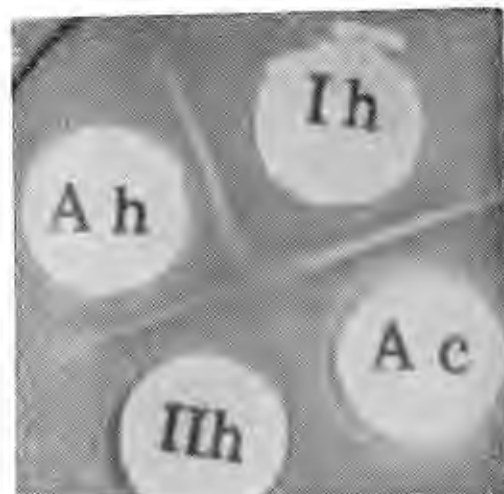
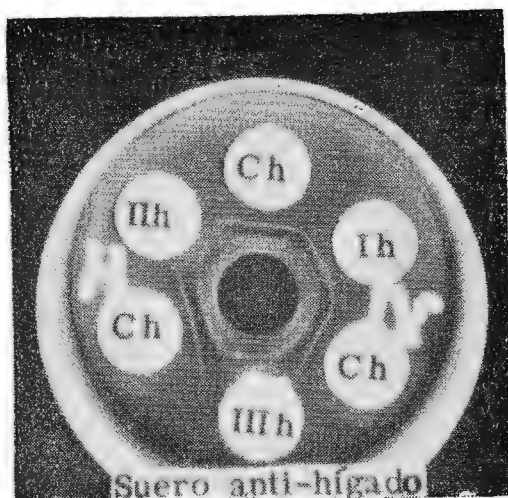
h. — Antígeno presente en hígado.
 c. — Antígeno presente en corazón.
 hc. — Antígeno presente en ambos tejidos.
 1, 2, 3 y 4. — Difusibilidad relativa del antígeno.
 I = Albúmina, el más rápido de la mezcla.

E. — Antígeno con actividad de amino transferasa.
 Pre-alb., Alb., Tf., Hp., 2 y glob., corresponden a los componentes presentes en esa región del gel cuando se desarrolla suero normal humano. (7).
 (?) Se sospecha la presencia de la enzima en este sitio.



Fotografías de placas de difusión de agar:
 a).—En el centro suero anti-corazón: Ac
 b).—Los antígenos son:

- Cc Extracto crudo corazón:
- Ic Isoenzima I de corazón.
- IIc Isoenzima III de corazón.
- IIIc Isoenzima III de corazón.



Fotografías de placas de difusión de agar:
 a).—En el centro suero anti-hígado: Ah
 b).—Los antígenos son:

- Ch Extracto crudo hepático.
- Ih Isoenzima I de hígado.
- IIh Isoenzima II de hígado.
- IIIh Isoenzima III de hígado.

La mezcla de los antígenos hepáticos en la zona III (gamma) fue fraccionada en la columna de celulosa DEAE con el resultado de la Fig. No. 2. Se aprecia que la isoenzima 4hE, aparece concentrada en el pico inicial; dando solamente una banda por difusión en gel. El, o los contaminantes sin actividad, han aparecido tanto en los pequeños picos que se ven en el diagrama como en la porción desnaturalizada obtenida con Na OH 0.1 N y algunos de ellos corresponden al antígeno lh demostrado por difusión en agar en la zona III gamma.

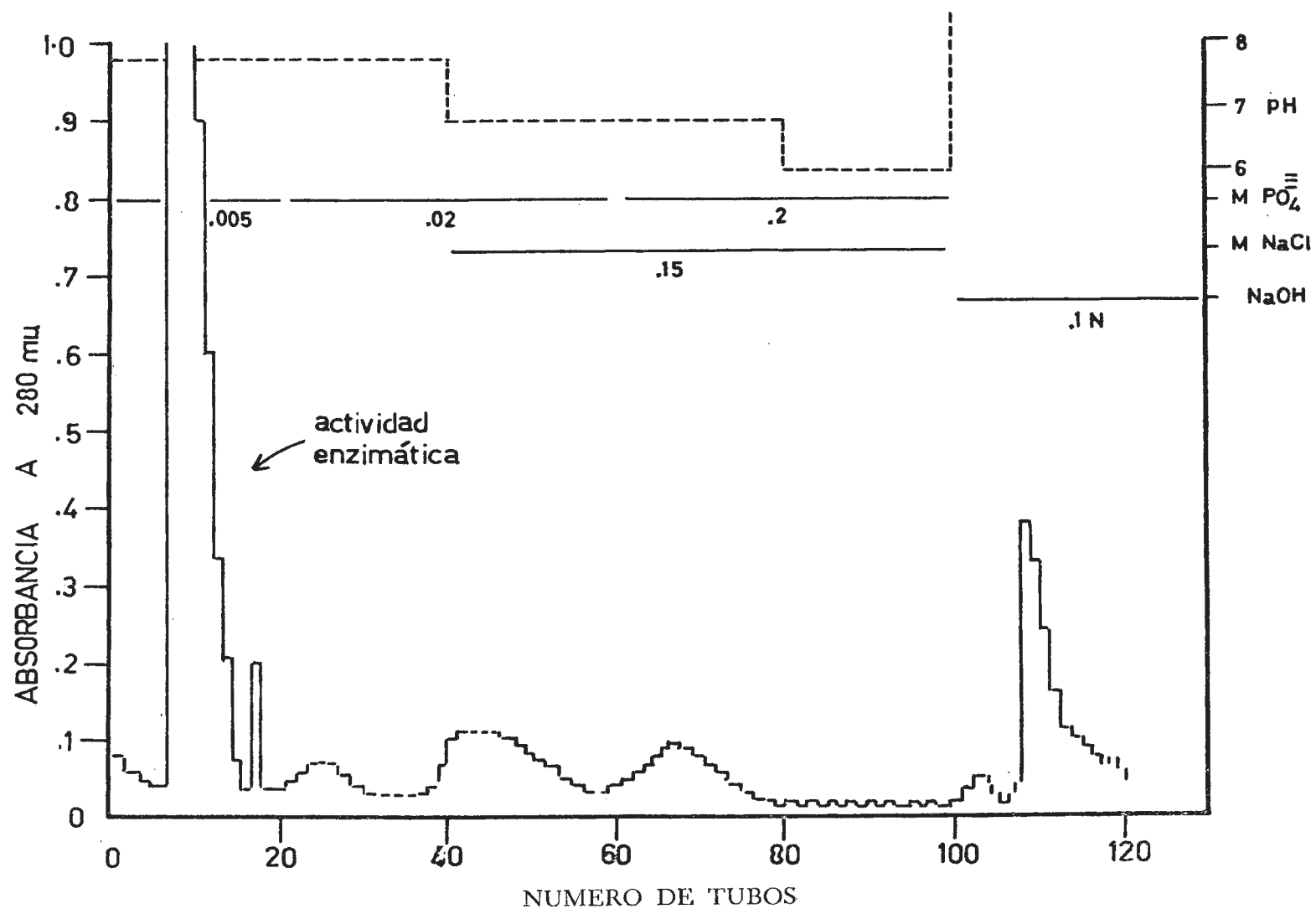
La zona de las isoenzimas I de corazón presenta tres antígenos, dos de ellos descritos arriba en el extracto hepático similar y el 3cE con actividad propia del órgano. La zona II tiene las dos impurezas ya mencionadas pero, habiendo encontrado actividad enzimática en los eluidos de esta región, debe suponerse la existencia de la enzima, que no ha sido puesta aún en evidencia por los antisueros hasta ahora empleados.

Por último, la región III negativa produce una sola banda de precipitación, correspondiente a la isoenzima de transaminación III y debido a su pureza se pensó oportuno ensayarla en una precipitación cuantitativa con el correspondiente suero de conejo anti-corazón con los resultados que se encuentran en la figura número 3. Las mezclas, aforadas a 6 ml, fueron guardadas en el refrigerador por diez días, para obtener el máximo posible de precipitado, al terminar este tiempo, se lavaron con 2.5 ml. de solución salina helada por dos veces, usándose el sobrenadante para medir la actividad residual. Se llevaron a cabo análisis simultáneos con tubos conteniendo únicamente enzima diluída con salina en unos casos y tubos con suero convenientemente diluídos como controles, en otros.

El examen de la gráfica de la Fig. No. 3 indica que la combinación de 10 mU con 2 ml. del antisuero produce una inhibición cercana al 90% con el máximo de precipitado de 75 microgramos de nitrógeno; cuando a la misma cantidad de enzima, se agregan 3 ml. del suero, el precipitado formado aumenta poco, pero la inhibición llega a ser total. El análisis de los sobrenadantes correspondientes indican de manera general que la zona de equivalencia (aproximadamente 1 ml.) está ligeramente desplazada. No podemos sospechar la existencia de otro sistema antígeno-anticuerpo diferente ya que la fracción de corazón III gamma, como se indicó antes, da consistentemente en placas de difusión una sola banda de precipitado, descartando casi totalmente la posibilidad de contaminación.

En la región de equivalencia debemos suponer que la totalidad de

FIGURA 2



Cromatografía de la fracción III hepática en celulosa modificada DEAE. Se colectó un volumen de 5 ml por cada tubo. La actividad enzimática salió únicamente en los tubos 8 al 17 como está señalado. Se recuperó el 85% de la proteína total y el 45% de la actividad total de la enzima.

la enzima III ha sido precipitada por el anticuerpo y aunque es de interés fundamental demostrar que en el precipitado formado se encuentra la actividad soluble desaparecida, hasta ahora no se ha hecho este experimento, pero existen indicios de que la unión antígeno-anticuerpo es bastante firme con posible oclusión del sitio activo de la enzima.

La forma de la curva de precipitación en esta prueba corresponde a las obtenidas con otros antígeno-anticuerpos más comunes.

En el experimento anterior se usaron como fuente de anticuerpos sueros frescos de conejos inmunes anti-corazón que presentan un pequeño nivel propio de actividad amino-transferasa. El valor de esta actividad se dedujo de las correspondientes actividades de los tubos con las mezclas experimentales usadas.

Esta prueba, en resumen, viene a confirmar los datos cualitativos obtenidos previamente con otros sistemas⁴ y los resultados actuales, tanto en la precipitación en placas de difusión, como en las inhibiciones simples.

Resultados de las inhibiciones cruzadas:

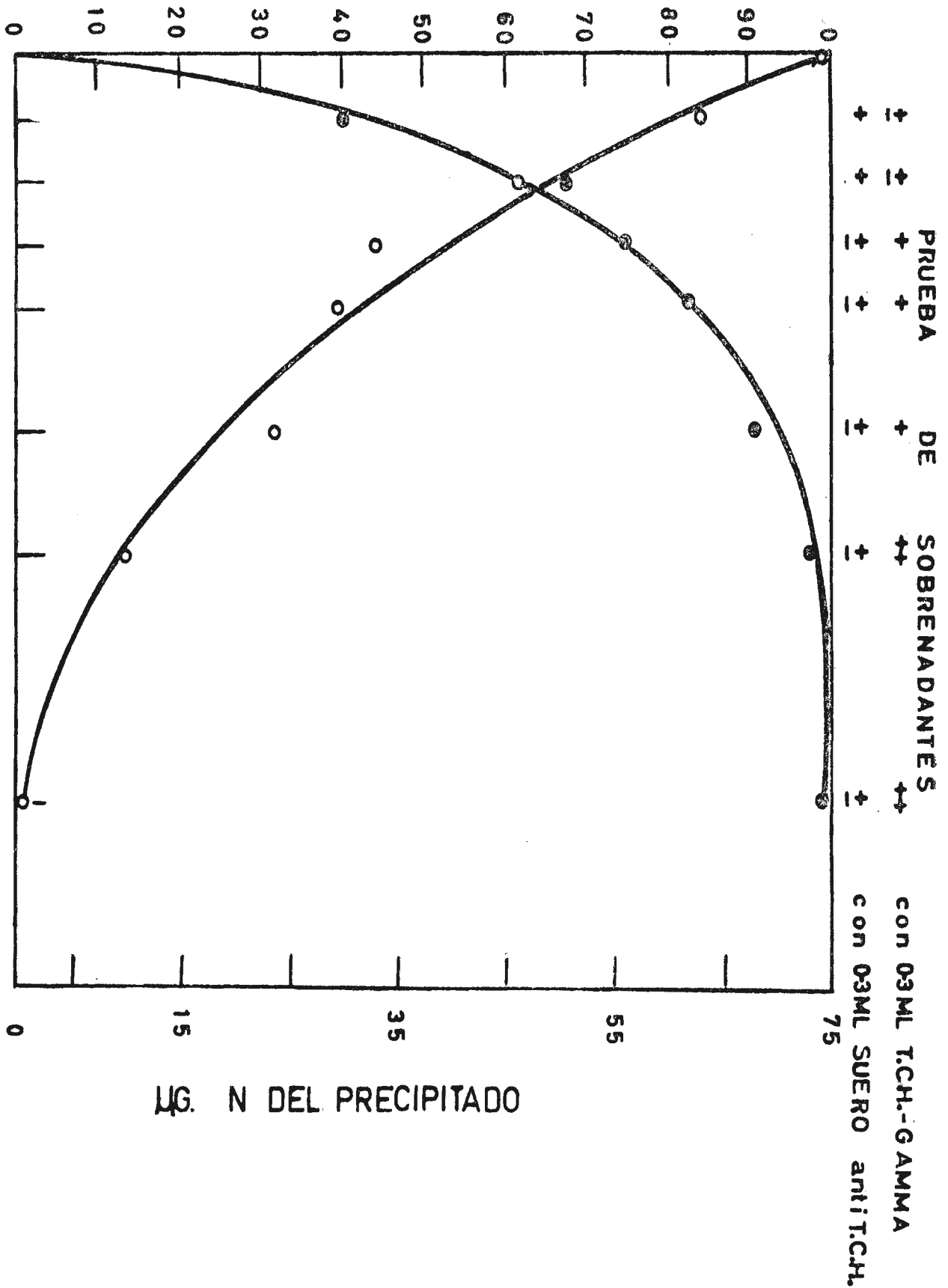
Una vez determinado el número y la sensibilidad de los diferentes antígenos presentes en los dos extractos de tejidos se procedió a estudiar su comportamiento en la inhibición cruzada. Las seis fracciones enzimáticas de los bloques de almidón, tres correspondientes a las isoenzimas I, II y III de corazón y las tres similares de hígado, fueron diluídas convenientemente con salina de tal manera de tener en un volumen de un ml. un valor aproximado de $7 \text{ mU} \pm 2$. Cada solución de isoenzima fue mezclada con dos alícuotas de globulina gamma inmune, en tubos separados: 0.1 ml. en uno y 0.2 ml. en el otro y la observación de la inhibición fue hecha como quedó descrita en la metodología.

Los resultados de la Tabla 3 indican que el poder neutralizante del suero anti-hepático es ligeramente mayor que el anti-corazón, estando las soluciones de ambas globulinas gamma ajustadas a la misma concentración proteica de 26.25 mg./ml., esto es explicable por una mayor concentración de todos los anticuerpos en los sueros anti-hígado en comparación con los anti-corazón. La isoenzima I de corazón es neutralizada 50% y 84% con las dos porciones de su propio antisuero, pero lo es mejor con el suero anti-hígado, ya que 0.1 ml. de este suero equivale en poder inhibitor aproximadamente a 0.2 ml. del suero anti-corazón.

Por el contrario, con el suero anti-corazón que en volúmenes de

PRECIPITACION CUANTITATIVA E INHIBICION ENZIMATICA CON SU ANTICUERPO

PORCIENTO DE ACTIVIDAD SOLUBLE



0.1 ml. solamente inhibe el 15% de la actividad hepática de I, se logran neutralizaciones totales al duplicar el volumen a 0.2 ml.

Estas ocho pruebas, siete de las cuales son muy similares, permiten concluir, que la isoenzima I de hígado es muy semejante a la I de corazón e integrando este resultado con los análisis antigénicos de la Tabla No. 2 vemos que el antígeno 3hE presente en amino transferasa de hígado humano I, debe ser igual, o muy parecido al 3cE de amino transferasa de corazón humano I. El resultado final es la probable existencia de un solo antígeno común para ambos tejidos: el antígeno híbrido, o mejor, común 3hcE.

Como la zona II de hígado presenta el mismo antígeno rhE de la fracción anterior, la inhibición con los antisueros debe ser parecida a la obtenida con isoenzimas I de corazón e hígado. Ambos valores de neutralización con suero anti-hepático son del 100% y el tercer valor con 0.2 ml. de anticorazón también es idéntico en ambos casos. Por estos datos se concluye que el antígeno II hepático es similar al I hepático o idéntico y semejante a una isoenzima presente en corazón en la zona I.

Por otra parte, pese a que no se demuestra fácilmente en corazón, banda de precipitación correspondiente a la isoenzima II, debe estar presente ya que los cluidos de esa región son activos. Su comportamiento a las pruebas de inhibición es muy característico ya que es la única isoenzima de las seis examinadas que no se inhibe totalmente en ninguna circunstancia, ni con suero anti-corazón homólogo, ni aún con 0.2 ml. del suero anti-hígado, que es suficiente para neutralizar totalmente a las otras isoenzimas. En este caso, el máximo es de 63%, infiriéndose de este hecho, que la enzima II de corazón es distinta de las isoenzimas de movilidad I y a las de movilidad III de ambos tejidos.

Por lo que respecta a la zona III se aprecia, tanto en el caso de extracto cardíaco, como hepático, una banda correspondiente a la isoenzima catódica. Los datos de inhibición no tan definitivos como con la II de corazón, sugieren cierta semejanza entre las dos isoenzimas particulares, aunque se antoja que deberían ser bastante específicas del órgano de origen.

Para finalizar, la isoenzima III de corazón es neutralizada de manera muy parecida con dos antisueros; la de hígado, solamente es totalmente inhibida con 0.2 ml. del suero anti-hígado pero, el anticorazón, no resulta efectivo más que en forma muy relativa. No podemos saber ahora si esto último es debido a la baja potencia inhibidora del

Tabla 3

DIFERENCIACION SEROLOGICA DE LAS ISOENZIMAS DE CORAZON E HIGADO HUMANO.

GLOBULINAS GAMMA DE
SUEROS DE CONEJO.

HUMANO.
ISOENZIMAS DE CORAZON

HUMANO.
ISOENZIMAS DE HIGADO

Porcentaje de inhibición de la actividad.

	I	II	III	I	II	III
ANTI-CORAZON						
0.1 ml 0.42 mg de N	50	20	60	15	50	50
0.2 ml	84	52	100	100	50	64
ANTI-HIGADO						
0.1 ml 0.43 mg de N	100	20	68	100	100	50
0.2 ml	100	68	100	100	100	100

———— SEMEJANTES ————

———— MUY DIFERENTES ————

———— DIFERENTES ————

ACTIVIDAD DE LA ISOENZIMAS: 5 a 10 Unidades.

suero anti-corazón, lo que no parece suficiente ya que neutraliza totalmente actividades similares de las otras isoenzimas o, esto se debe, al carácter estructural distinto de la isoenzima III hepática.

DISCUSIÓN

Las investigaciones más recientes en el estudio de los mecanismos enzimáticos en condiciones de anormalidad se ven dificultados por no tener un cuadro claro de los elementos, formas, especies o familias proteicas que intervienen para explicar una actividad enzimática interesante. Las medidas más o menos exactas de manifestaciones catalíticas en células o tejidos, no siempre reflejan la situación real respecto a las entidades moleculares que les dan origen. En sistemas complejos como éstos, las enzimas están influenciadas por: la concentración fluctuante o estable de los substratos, la concentración adecuada del cofactor específico en el momento necesario, las condiciones de pH *in situ*, la presencia de inhibidores o activadores, las hormonas y otros factores, unos conocidos y otros sospechados, cuya interrelación determina la eficiencia de esa molécula catalítica en un momento determinado. El suponer, que al igualar las manipulaciones, se nivelan y cancelan todos estos factores y se pueden sacar conclusiones fisiológicas de las diferencias en la magnitud de actividad es no sólo una actitud optimista, sino que conduce a la multiplicación de observaciones innecesarias. Los datos actuales de balance enzimático en función de mediciones netas de actividad deberán revisarse en el futuro, relacionando la información de concentraciones enzimáticas obtenida en unidades tradicionales de peso, como miligramos de nitrógeno, proteína, peso seco, etc. en la proteína activa aislada, definida y purificada.

Existen varias posibilidades que permiten explicar teóricamente “la activación” enzimática. En primer lugar, por la fabricación (biosíntesis) de nueva proteína, lo que en tejidos adultos con poco recambio debe estar sujeto a otro tipo de control, (vida media de la proteína) independientemente de la necesidad momentánea de catálisis rápida. Se debe postular la existencia de activaciones más o menos rápidas (sin que esto implique fabricación de nueva proteína) para esos casos de emergencia. Las hormonas pueden ser y de hecho se ha demostrado en numerosos experimentos, activadores o depresores de la actividad “*in vivo*”²⁵.

La síntesis neta de proteína activa se produce en caso de inducción por el substrato²⁶, pero se antoja que este fenómeno no necesariamen-

te será general y quizá sólo en sistemas enzimáticos que por su función primordial o indispensable no pueden suprimirse.

Trabajos muy recientes con transaminasas de hígado de rata apuntan a la posibilidad de explicar las activaciones por la fabricación precisamente de nueva enzima. El trabajo de Kenny³⁹ con la transaminasa tirosina alfa-cetoglutarico sugiere que la inducción de actividad con tirosina, o con hidrocortisona va acompañada de ese proceso. Los resultados de Goldstein y colaboradores⁴⁰ con esta misma enzima y otras, apuntan también a este hecho. Aunque los trabajos de Estrada y colaboradores³⁸ con la transaminasa aspártico glutámico de hígado de rata no son aún definitivos, los autores toman muy en cuenta esta posibilidad que explicaría la activación de la enzima producida por los esteroides.

La inducción de enzimas con substrato es un fenómeno que requiere revisión amplia antes de poder aceptarlo "de facto". No sería remoto suponer la existencia de una anulación de la represión central a nivel del ácido ribonucléico, cuando se exagera la concentración del substrato adecuado. Situaciones de este orden ha sido demostradas usando enzimas de sistemas bacterianos²⁷.

En células de animales superiores, plantas, mamíferos, hombre, no sabemos en cuántas instancias nos encontraremos con situaciones semejantes a las demostradas con la triptofano sintetasa de *Escherichia Coli* donde la actividad está a cargo de dos proteínas A y B controlada por sitios cromosomales vecinos, pero totalmente diferenciables serológicamente, y donde, solamente la acción simultánea y conjunta de las dos entidades conduce a la producción de triptófano²⁸.

En otras ocasiones podrá suceder algo semejante a lo encontrado por Suskind y colaboradores²⁹ donde la síntesis enzimática de bacterias es precedida por la formación de proteínas (C. R. M.*) indistinguibles de ella, pero inactivos.

La multiplicidad molecular de una sola actividad puede seguir caminos similares al caso de las colinesterasas de suero humano, cuya fabricación está condicionada por dos aleles en un sólo locus cromosomal que darán origen a la fabricación de toda una serie de estas enzimas en una determinada población humana³⁰.

Todavía, y como demuestran los experimentos de Pardee y colaboradores⁴¹ con beta-galacturonidasa de *E. Coli*, puede suceder que la

* Materiales que reaccionan cruzadamente. (M.R.C.).

síntesis enzimática esté regulada de acuerdo con la síntesis de otra entidad inmunológicamente semejante, inactiva, de beta-galacturonidasa.

Cualquiera que sean los mecanismos para explicar la multiplicidad proteica de una actividad, inclusive la posible falta de ciertos casos de especificidad estricta³¹, el hecho es que en la actualidad, con el uso de inhibidores que permiten disecar mezclas proteicas complejas por diversas electroforesis o cromatografías, se han multiplicado los informes en los cuales se demuestran patrones enzimáticos que pueden representar la situación real y característica de células, órganos y tejidos, y en casos aclaran lineamientos genéticos generales en ciertos tipos de proteínas.

Un sistema enzimático de interés médico, ampliamente estudiado en este respecto, es el de las deshidrogenasas lácticas que tienen conexión con procesos de destrucción tisular reflejado en el aumento de las actividades en el suero del paciente, con la facilidad de detectar el órgano afectado en mezclas séricas. Esto corresponde a las llamadas enzimas "de escape" diagnosticadas en diversos padecimientos^{32, 33 y 34}. Parece claro en la actualidad, que en los principales órganos del hombre se encuentra esta enzima en cinco formas distintas en cada órgano, por sus proporciones relativas. Estas cinco formas I, II, III, IV y V, permiten hacer en suero todo un balance de las actividades tanto para identificar el tejido por su patrón en "isoenzimas" como para comparar en casos de padecimientos.

El reciente trabajo de Wieme³⁵ indica que en afecciones generalizadas como la distrofia muscular primaria, también se encuentran alterados los valores relativos normales de las isoenzimas. Es de interés que en esos casos no se pueda hablar estrictamente de necrosis, como la causante del escape de las enzimas y que es el argumento que explica la elevación de D. L. V. y D. L. I en suero de enfermos con hepatitis e infarto de miocardio respectivamente.

Recientemente se ha sugerido la necesidad de revisar totalmente este concepto: el escape de enzimas en la circulación no debe ser atribuido necesariamente a la destrucción celular como se venía diciendo, sino a causas donde se sospeche un aumento de permeabilidad, o un aumento de actividad celulares. La simple inflamación, puede ser causa suficiente de escape enzimático³⁶ y los resultados arriba citados de Wieme en enfermedades con esclerosis miotróficas pueden tener esta explicación.

En el presente trabajo se hizo una evaluación de la situación de las

enzimas de transaminación aspártico-glutámico en tejidos cardíaco y hepático humanos normales, como primer paso para comprender las alteraciones en cuadros patológicos. Los resultados indican que al igual que otras situaciones semejantes las amino transferasas están presentes en estos tejidos en forma de isoenzimas. En este respecto cada tejido fue caracterizado electroforéticamente y por sus reacciones de precipitación e inhibición con anticuerpo de conejo. Se describen estas características en función de las isoenzimas halladas. El tejido cardíaco presentó dos isoenzimas claramente definidas y una tercera muy semejante a la hepática. Este tejido a su vez, tiene dos enzimas de transaminación, una diferente a la cardíaca y otra semejante aunque no se descarta totalmente la posibilidad de una tercera, distinta de las anteriores.. La situación real podría representarse como en el esquema del resumen.

Las reacciones de precipitación por anticuerpos empleadas como lo han sido en este trabajo pueden ser de utilidad para diferenciar las isoenzimas y quizá antisueros similares que pueden ser preparados con facilidad contra otros tejidos humanos, sean de mayor utilidad en comparación con los existentes.

Para finalizar, vale la pena mencionar que este tipo de sueros anti-transaminasas producen no solamente neutralizaciones "in vitro" de la actividad enzimática. Algunos resultados obtenidos de experimentos preliminares en este laboratorio indican que es posible disminuir los niveles normales de estas actividades en hígado de rata, perfundiendo un suero de conejo anti-transaminasa de hígado de rata³⁷. Si bien es cierto que la hipersensibilidad y la enfermedad del suero son riesgos que se deben tomar en consideración, el estudio del fenómeno experimental desde este punto de vista, pues puede abrir nuevas rutas a estas investigaciones.

RESUMEN Y CONCLUSIONES

Se demuestra que la actividad aspártico-glutámico amino transferante de extractos de corazón humano, es debida a la suma de las actividades de tres isoenzimas Ic, IIc y IIIc. Se concluye que existe una situación similar en el tejido hepático, donde la actividad es motivada por la suma de las acciones de las isoenzimas Ih, IIh y III. Los resultados serológicos de precipitación e inhibición permiten hacer las siguientes generalizaciones:

Situación e identidad de las isoenzimas de transaminación aspártico glutámico de los tejidos estudiados:

CORAZÓN

HÍGADO

A.—Transaminasa corazón e hígado. Isoenzima Ic	Transaminasa Corazón e hígado. Isoenzima Ih
B.—Transaminasa Corazón II Isoenzima IIc	Ausente.
C.—Transaminasa Corazón III Isoenzima IIIc	Ausente.
D.—Ausente	Transaminasa Hígado II Isoenzima IIh.
E.—Ausente.	Transaminasa Hígado III Isoenzima IIIh.

REFERENCIAS

1. Córdoba, F., Ortega, M., y González, C., (En preparación).
2. Boyd, J. W., *Biochem. J.*, 81: 434-441 (1961).
3. "Report of the Commission on Enzymes of the International Union of Biochemistry", Pergamon Press (1961).
4. Córdoba, F., Pérez, A., y González, C., *Nature* 194: 1156-57 (1962).
5. Varios autores en: "Multiple Molecular Forms of Enzymes" *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 94: (3) (1961).
6. Jenkins, W. T., Yphantis, D. A., y Sizer, I. W., *J. Biol. Chem.*, 234: 51 (1959).
7. Smithies, C., *Biochem. J.* 61: 629 (1955).
8. Poulik, M. D., *Nature* 180: 1477 (1957).
9. Fleisher, G. A., Potter, C.S., Wakim, K. G., Pankiw, M., y Osborne, D., *Proc. Soc. Exp. Biol.*, N.Y. 103: 229 (1960).
10. Boyde, T.R.C., y Lantner, A.L. *Proced. Biochem Society.* 82: 51 (1962).
11. Parks, J. J., Leibowitz, H. M. I., y Maumenee, A. E., *J. Immunol.*, 87: 199-204 (1961).
12. Freund, J., y McDermott, K., *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 49: 548 (1942).
13. Kabat, E. A. y Mayer, M. M. "Experimental Immunochemistry" Ch. Thomas Publ. Springfield, Ill, EE.UU. Second Edition (1961).
14. Lanni, F., Dillon, M.L., y Beard, J.W., *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 74: 4 (1950).
15. Cammarata, P.S., y Cohen P.P., *J. Biol. Chem.* 193: 45 (1951).
16. Kun, E., Fanishier, D.W., y Grseli, D.R., *J. Biol. Chem.* 235: 416 (1960).
17. Banks, B.E.C., y Vernon, C.A., *J. Chem. Soc.* 1698-1705 (1961).
18. Ouchtherlony, O., *Progr. Allergy.* 5: 1 (1958).
19. Uriel, J., y Scheidegger, J., *Bull. Soc. Chim. Biol.* 37 (1955).
20. Heidelberger, M., y MacPherson, C.F.C., *Science* 97: 405; 98: 63 (1943).

21. Cinader, B., *An. Rev. Microbiol.* 11: 371-390 (1957)
22. Schlamowitz, Max., *J. Immunol.* 81: 519-523 (1958).
23. Peterson, B. A., y Sober, H. A.: *J. Am. Soc.* 78: 751 (1956).
24. Smithies, C., *Biochem. J.* 71: 585 (1959).
25. *The Hormones.* G. Pincus y Thimann K. V., Academic Press. Eds. N. Y. (1955).
26. Lin, E. C. C., y Knox, W. E.: *Biochem. et Biophys. Acta* 26: 85 (1957).
27. Vogel, H. J., en "The chemical basis of heredity" Mc Elroy W. D. y Glass B. Ed. Johns Hopkins Press p 276 (1957).
28. Yanofsky, C., y Crawford, J. P., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.* 45: 1016, (1959).
29. Suskind, S. R., y Jordan, E., *Science* 129: 1614 (1959).
30. Kalow, W., y Staron N., *Can. J. Biochem. and Physiol.* 35: 1305 (1957).
31. Laguna G. J.: comunicación personal.
32. Karmen A., Wroblewsky, F., y LaDue, J. S. *J. Clin. Investigation* 34: 126-133 (1955).
33. Hill, J. R., *J. Natl. Cancer Inst.* 18: 307-13 (1957).
34. Sterkel, R. L., Spencer, J. A., Wolfson, S. K. Jr., y Williams Ashmann, H. G., *L. Lab. Clín. Med.* 52: 176-184 (1958).
35. Wieme, R. J., y Hcrpol, J. E. *Nature* 194: 287 (1962).
36. Wroblewsky, F.: *III Congreso de Medicina y Cirugía, Pueb. Méx.* (1962).
37. Córdoba, F., Estrada, O., S. González, C. y Pérez, A. *V Congreso de Ciencias Fisiológicas, San Luis Potosí, Méx.* (1962).
38. Estrada, O. S. y Córdoba, F.: *En preparación.*
39. Kenney, F. T., *J. Biol. Chem.* 237: 1605-10 (1962).
40. Goldstein, L., Stella, E. J. y Knox, E. W. *J. Biol. Chem.* 237: 1723-26 (1962).
41. Pardee, A. B., Jacob, F., y Monod, J., *J. Mol. Biol.* 1: 165 (1959).