

FRANCISCO DURAZO Q.

**METODOLOGIA
Y SEMIOLOGIA
DE LAS ENZIMAS
EN EL
LABORATORIO
CLINICO.***

LAS ENZIMAS SON catalizadores orgánicos, y como tales, aceleran las diferentes reacciones químicas que constituyen el proceso de la vida, reacciones que sin su estímulo requerirían de muchísimo tiempo para su desarrollo; por lo que puede afirmarse que las enzimas son manifestaciones de la impaciencia de la naturaleza.

Tienen como característica importante el ser altamente específicas en su acción, y en la función del órgano que las produce.

La mayor parte de las enzimas llevan a cabo su trabajo dentro de las células, es allí en donde las reacciones bioquímicas en que ellas intervienen, se traducen en actividad fisiológica de los tejidos y órganos.

Cada enzima casi siempre interviene solamente en un paso de una larga cadena de reacciones que comprenden la síntesis o el catabolismo de un compuesto, por lo que característicamente operan en equipo, constituyendo los diferentes sistemas enzimáticos.

MEDIDA DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

La medida de la concentración de una enzima se determina por medio de su actividad sobre un substrato específico, a una concentración adecuada y bajo condiciones óptimas de pH y temperatura. Dicha actividad es expresada en términos de "unidades", las que frecuentemente llevan el nombre del autor del procedimiento, y en términos generales una unidad representa la liberación de 1 mg. de uno de los pro-

* Trabajo presentado en la Mesa Redonda sobre Las Enzimas en la Medicina. Academia Nacional de Medicina. Jornadas Médicas Nacionales 1962.

ductos de la reacción enzima-substrato, en un tiempo convencional, bajo condiciones óptimas de pH y temperatura.

El procedimiento comúnmente empleado para la identificación y medición de la actividad enzimática en el Laboratorio Clínico consiste, en mezclar una muestra del líquido que contiene la enzima investigada, con un compuesto con el cual reacciona (substrato). La velocidad a la cual el substrato es transformado por la reacción, es determinada midiendo el producto de la reacción; o bien la cantidad de substrato que permanece sin reaccionar después de un tiempo determinado. Se obtiene así una estimación exacta de la concentración de la enzima en la muestra analizada.

Dicha medición puede ser hecha por diferentes procedimientos: El colorimétrico es el más comúnmente empleado, y utiliza un compuesto que tiene afinidad por uno de los productos, resultantes de la reacción de la enzima con su substrato, formando un complejo colorido cuya intensidad es directamente proporcional a la concentración de la enzima.

SEMIOLÓGIA DE LAS ENZIMAS

Decíamos anteriormente que la mayoría de las enzimas se encuentra en el interior de las células, los líquidos extracelulares (orina, bilis, plasma sanguíneo y L.C.R.), contienen cantidades muy pequeñas de diferentes enzimas. Sin embargo, recientemente se ha demostrado que el contenido enzimático de los líquidos extracelulares, puede aumentar bruscamente en el curso de varias enfermedades, y como la elevación de una o varias enzimas es característica del órgano afectado, su identificación y la medida de su concentración en el líquido extracelular, puede proporcionar una información diagnóstica de gran utilidad. La lesión del órgano o tejido afectado que determina la salida de la enzima hacia el líquido extracelular, puede ser una modificación en la permeabilidad celular; una necrosis; diversos procesos inflamatorios o bien el efecto de algún tumor maligno sobre un tejido en particular. Es así como la constante investigación bioquímica ha puesto al servicio de la clínica una serie de determinaciones enzimáticas, la mayor parte de las cuales se practican en la sangre, y le permiten al clínico conocer la existencia de un infarto del miocardio, de una hepatitis por virus, diferentes padecimientos óseos y pancreáticos y el carcinoma de la próstata; en ocasiones anticipándose a la aparición de las manifestaciones clínicas, y constituyendo prácticamente una "biopsia" bioquímica.

La fácil obtención de suero sanguíneo, y la especificidad de las enzimas en su acción, hacen que dichas determinaciones sean practicadas con facilidad y seguridad en forma rutinaria en el laboratorio clínico.

Es muy grande el número de enzimas que se han estudiado con fines diagnósticos, y en la actualidad la investigación en este campo es extraordinariamente abundante, con la esperanza de que algún día no muy lejano una determinación enzimática permita diagnosticar la presencia de algunos cánceres antes de la aparición de los síntomas.

En esta breve comunicación nos referimos exclusivamente a aquellas enzimas cuya determinación ha quedado sancionada por la experimentación clínica, y ha demostrado ser de utilidad diagnóstica práctica.

FOSFATASAS

Son enzimas que hidrolizan los ésteres del ácido fosfórico. De acuerdo con el pH óptimo a que actúan, se le llama a una fosfatasa "alcalina", que actúa a un pH de 8.6; y a otra fosfatasa "ácida", que actúa a un pH de 4.9.

FOSFATASA ALCALINA

Se mide su actividad por el método de Bodansky¹, y se expresa el resultado en unidades Bodansky por 100 c.c. de suero. Una unidad es la cantidad de enzima capaz de liberar 1 mg. de fósforo de un substrato de beta glicerofosfato de sodio a pH de 8.6 durante una hora de incubación a 37° C. Las cifras normales son de 1 a 4 unidades en el adulto de ambos sexos; y de 3 a 13 unidades en los niños. Se encuentra en diferentes tejidos, principalmente: plasma sanguíneo, huesos, riñón, mucosa intestinal, leucocitos, glándula mamaria y prácticamente todas las células del cuerpo la contienen.

Esta enzima participa en diferentes procesos metabólicos que comprenden: la formación de fosfato tricálcico. La corteza renal es rica en esta enzima y participa en la reabsorción de la glucosa en el túbulo proximal. La mucosa intestinal contiene más fosfatasa alcalina que cualquier otro tejido, y se piensa que allí participa en la reabsorción de glucosa y ácidos grasos.

El aumento de la concentración sanguínea de esta enzima ocurre principalmente en dos grupos de enfermedades: a) algunos padecimientos óseos, b) ictericia obstructiva² (Fig. No. 1).

**PRINCIPALES ALTERACIONES DE LA
FOSFATASA ALCALINA.**

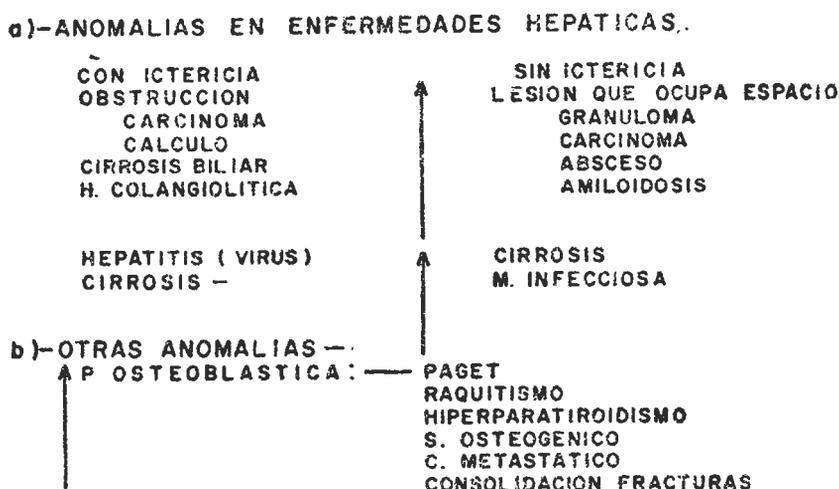


Fig. 1

Las enfermedades óseas que aumentan dicha actividad lo hacen aumentando la actividad osteoblástica; las más importantes son: osteítis deformante o enfermedad de Paget, que origina las elevaciones más importantes. Hiperparatiroidismo con balance negativo de calcio. Raquitismo: en este padecimiento la magnitud de la elevación constituye un relejo de la severidad; y su determinación una vez instituido el tratamiento, constituye un dato pronóstico de gran valor.

También cursan con elevación importante de la fosfatasa alcalina el Sarcoide de Boeck; el Sarcoma Osteogénico, y el Carcinoma Metástico de tipo osteoblástico.

En la ictericia obstructiva la causa de la elevación de la fosfatasa alcalina no ha quedado definitivamente establecida; un grupo piensa que se forma la enzima en el tejido óseo y se excreta por la bilis y en casos de obstrucción extrahepática se eleva su concentración sanguínea por acumulación. Otros creen que la enzima se origina en el hígado y aumenta su producción durante el proceso obstructivo².

Si bien los valores más altos de fosfatasa alcalina se han encontrado en la ictericia obstructiva por carcinoma, y la magnitud de la elevación es directamente proporcional al grado de obstrucción; también se ha encontrado elevada en la ictericia hepatocelular, aunque en menor grado. El diagnóstico diferencial se basa en que: en la ictericia obstructiva la actividad fosfatásica es paralela a la hiperbilirrubinemia; mientras que en la ictericia hepatocelular la elevación rara vez alcanza

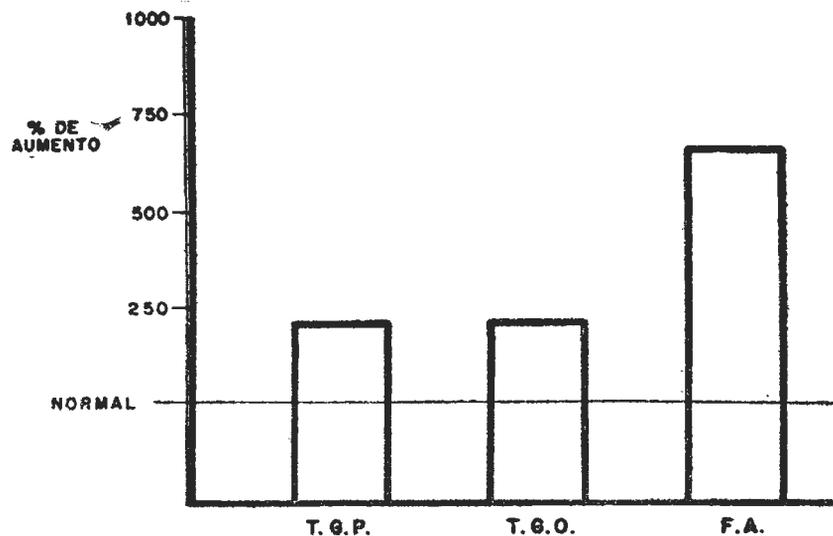
ENZIMAS SERICAS EN LA ICTERICIA OBSTRUCTIVA

Fig. 2

valores superiores a 12 U. B. y la bilirrubinemia sigue en aumento progresivo. Se han comunicado también elevaciones moderadas de la fosfatasa alcalina en cirrosis y carcinomas metastático hepáticos (Fig. No. 2).

Precisamente la falta de especificidad de la fosfatasa alcalina en el diagnóstico diferencial de las ictericias, ha estimulado nuevas investigaciones, habiéndose encontrado que la 5-Nucleotidasa es útil en el diagnóstico diferencial de las ictericias, y no es influenciada por padecimientos óseos.

5-NUCLEOTIDASA

Es una fosfatasa que hidroliza nucleótidos (adenosina 5. fosfato) con actividad óptima a un ph de 7.5 a 8. La unidad de actividad de la 5-nucleotidasa es semejante a la unidad de Bodansky. Los valores normales son de 0.3 a 3.2 unidades por 100 c.c. de suero. No está influenciada por sexo, edad o raza. La observación clínica ha demostrado que solamente en enfermedades hepatobiliares se eleva considerablemente, y de éstas, en la ictericia por obstrucción extrahepática, alcanza niveles superiores a 18 unidades %.

La fosfatasa alcalina inespecífica puede hidrolizar el substrato de adenosina 5, fosfato, por lo que es necesario agregar al suero un inactivador de la fosfatasa alcalina como el EDTA, previamente.

El nivel sérico bajo, de esta enzima en presencia de hiperbilirrubinemia progresiva, es característico de un severo daño hepático.

FOSFATASA ÁCIDA

Su actividad se mide por el método de Fishman-Lerner⁴ por hidrólisis de un substrato de fenil-fosfato disódico con liberación de fenol, realizando esta hidrólisis en presencia y en ausencia de L-Tartrato la diferencia encontrada en la cantidad de fenol liberado, se cree representa la inhibición de la fosfatasa ácida de origen prostático, según la comunicación de Abdul-Fadl y King en 1949⁵.

Su actividad se mide en unidades King-Armstrong; una unidad es igual a 1 mg. de fenol por 100 c.c. de suero, por incubación durante 60' a 38° C. y a un ph de 4.9.

Las cifras normales encontradas por nosotros en el Hospital General⁶ son para la fracción prostática de: 0 a 0.30 U. K. A.; y para la fosfatasa ácida total: de 0.90 a 2.62 U. K. A. por 100 c.c. de suero.

Las funciones de la fosfatasa ácida están menos definidas que las de la alcalina. La próstata humana y la del mono elabora esta enzima la que está presente a una alta concentración en el semen. Se cree que participa en la desfosforilación de los ésteres de glucosa, a fructuosa, la que constituye un elemento energético para los zoospermos.

El nivel de la fosfatasa ácida en el suero sanguíneo es poco afectado por otros padecimientos incluyendo neoplasias, con una notable excepción: el carcinoma diseminado de la próstata en el hombre. Gutman y Gutman comunicaron⁷ el descubrimiento de que ocurre un importante aumento en la fosfatasa ácida del suero, en el cáncer diseminado de la próstata. Esta observación ha constituido la base para una de las pruebas diagnósticas y pronósticas más importantes en la clínica de Cáncer. La práctica ha demostrado que su información está restringida a aquellos casos de carcinoma prostático que ya han rebasado la cápsula y parece poco sensible en los casos de tumor incipiente. Sin embargo, el diagnóstico del cáncer prostático en su estadio inicial, constituye un problema aún no resuelto del todo, debido fundamentalmente a que puede pasar inadvertido al examen físico habitual, por lo que cualquier procedimiento que, asociado al examen clínico permita su reconocimiento en una fase temprana, representa una ayuda valiosa.

Los niveles de fosfatasa ácida sanguínea, pueden encontrarse anor-

malmente elevados hasta 16 hrs., después de un traumatismo prostático bien sea por masaje, palpación, operación o cateterismo.

Sin embargo su información ha sido poco sensible en los casos de tumor incipiente. Kendell y col. de Ann Arbor, demuestran aumentar la sensibilidad de la prueba midiendo el incremento que sufre la fracción prostática de la F. A. 60' después de la exploración manual; en el carcinoma se obtiene un aumento de 0.78 U. K. A. o más.

La terapia estrogénica determina una disminución anormal de los mismos niveles, y la administración de andrógenos determina un aumento, por lo que es de recomendarse tener en cuenta estas observaciones antes de hacer una determinación

TRANSAMINASA

Son enzimas que catalizan la transferencia reversible de un grupo amino de un aminoácido a un cetoácido, por un proceso llamado de transaminación. Aunque se han demostrado varias transaminasas específicas de substrato en diversos tejidos animales⁸, los estudios más amplios de transaminasas séricas se han limitado a la transaminasa glutámico-oxalacética (T.G.O.) y a la transaminasa glutámico-pirúvica (T.G.P.).

TRANSAMINASA GLUTÁMICO-PIRÚVICA

Cataliza la transferencia del grupo amino de la alanina al ácido alfa-cetoglutarico, con formación de ácido pirúvico y ácido glutámico. El procedimiento más comúnmente empleado para la medida de su actividad es el de Karmen y Wroblewski⁹. Las cifras normales en adultos de ambos sexos son de 3.2 a 51 unidades¹⁰ por c.c. de suero sanguíneo.

El contenido de esta enzima relativamente bajo en el miocardio, y alto en el hígado, hizo pensar a Wroblewski y La Due¹¹ que su determinación podría ser de utilidad para distinguir la necrosis miocárdica de la hepática. Su elevación en la sangre en casos de necrosis hepatocelular obedece al mecanismo de "escape". En casos de hepatitis por virus, el aumento suele ser de 20 a 40 veces la cifra normal; mientras que en casos de cirrosis, ictericia obstructiva, carcinoma meastático y hepatomegalia asociada con insuficiencia cardíaca congestiva, suele presentarse una elevación moderada (2 a 5 veces lo normal). Algunos fármacos, como la cloropromacina, mercaptopurina y salicilatos principal-

mente, producen también elevaciones moderadas. La elevación de la T.G.P. es de gran especificidad para el diagnóstico de lesión hepatocelular aguda, siendo sus niveles séricos proporcionales a la rapidez y extensión del proceso de lisis celular, constituye una prueba de gran utilidad en el diagnóstico de las ictericias. Tiene su mayor efectividad en el diagnóstico diferencial entre hepatitis por virus e ictericias obstructiva; constituyendo una valiosa guía para el pronóstico y tratamiento de las hepatopatías agudas, especialmente en las cuatro primeras semanas. (Figs. Nos. 3, 4 y 5). Constituye una prueba de lesión hepatocelular aguda, que no valora la capacidad funcional del hepatocito; de allí su posible discordancia con las pruebas usualmente empleadas para valorar la función hepática.

TRANSAMINASA GLUTÁMICO-OXALACÉTICA

Cataliza la transferencia del grupo amino del ácido d-l-aspártico hacia el ácido alfa-ceto-glutárico, con formación de ácidos oxaacético y glutámico. Para su determinación se emplea el mismo procedimiento señalado para la T.G.P. con diferencia en el sustrato.

Las cifras normales son: de 4 a 40 unidades por c.c.

Esta enzima se ha encontrado en el suero y tejidos de una gran variedad de animales estudiados. En el hombre se ha encontrado en orden

ENZIMAS SERICAS EN HEPATITIS

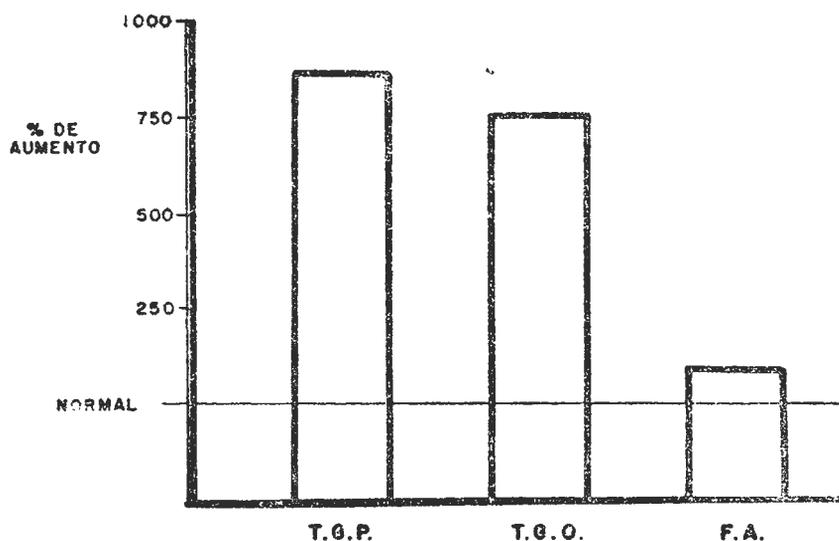


Fig. 3

ENZIMAS SERICAS EN LA CIRROSIS

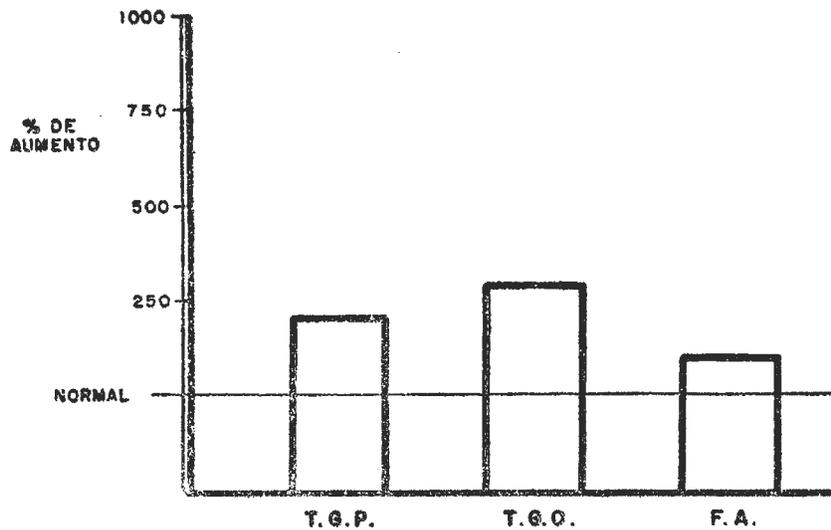


Fig. 4

de concentración decreciente: en el miocardio; hígado, tejido músculo esquelético, riñón y páncreas.

La observación de La Due y col. sobre la elevación de la T.G.O. en el suero de enfermos con infarto del miocardio abrió un amplio campo de investigación clínica en esta entidad, con otras enzimas prin-

ENZIMAS SERICAS DET. SERIADAS EN HEPATITIS

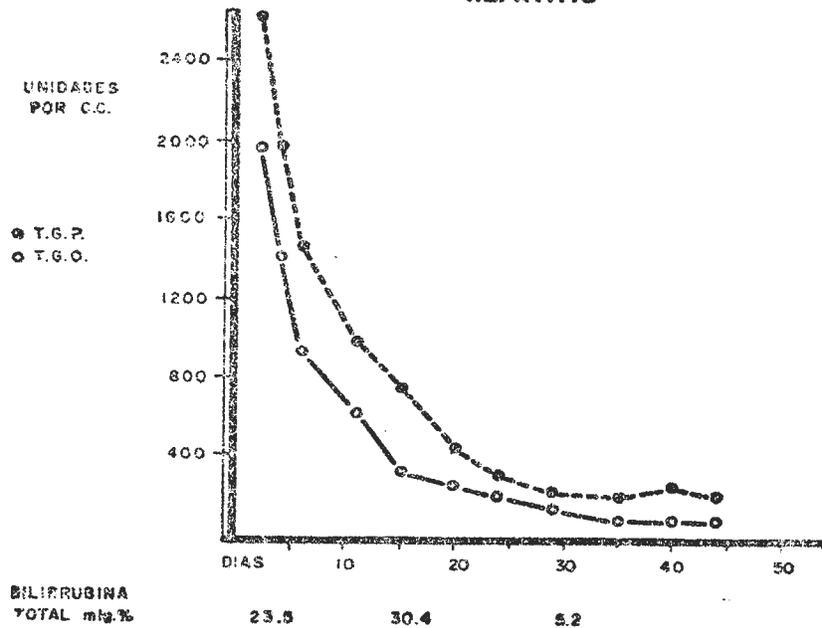


Fig. 5

principalmente deshidrogenasa láctica (D. L.), aldolasa; tributirasa y colinesterasa.

Las más ampliamente estudiadas han sido la T.G.O. y la D.L. Ambas han probado su utilidad en el diagnóstico del infarto del miocardio en ocasiones cuando éste no alcanza a producir alteración electrocardiográfica.

La T.G.O. se eleva de 2 a 20 veces la cifra normal dentro de las primeras 12 a 48 horas después del infarto; descendiendo hacia el tercer día. Elevaciones secundarias han sido observadas debido a la extensión del proceso inicial o a un nuevo infarto en el mismo paciente.

La elevación de la D.L. ocurre de 2 a 10 veces la cifra normal la que es de 200 a 680 unidades por c. c. de suero, y permanece elevada 2 a 3 días más que la T.G.O. (Fig. No. 6).

ENZIMAS SERICAS EN INFARTO DEL MIOCARDIO

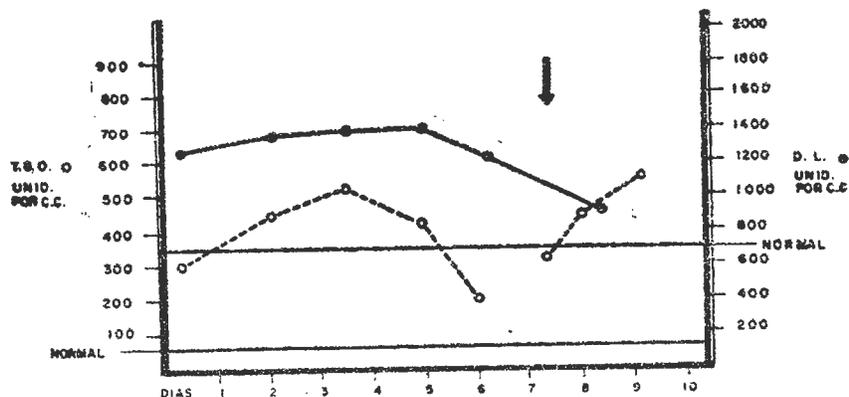


Fig. 6

En vista de la inespecificidad de ambas determinaciones, es importante que se practiquen determinaciones seriadas, pues una sola determinación, aunque valiosa, no es específica. La elevación y el retorno a lo normal de ambas determinaciones, dentro de un período aproximado de 4 a 12 días, es generalmente considerado como de ayuda significativa en el diagnóstico del infarto del miocardio.

Decíamos que la elevación de la T.G.O. y la D. L. no es específica y puede elevarse en otros procesos diferentes del infarto, entre los que han sido estudiados con más amplitud, cabe mencionar: necrosis hepática, cirrosis; tuberculosis hematógica; congestión hepática, carci-

noma metastático, ictericia obstructiva, necrosis de músculos esqueléticos, pancreatitis, necrosis renal y cerebral.

ENZIMAS PANCREÁTICAS

De las diversas pruebas utilizadas para establecer algún padecimiento o disfunción pancreáticas, la determinación de las enzimas pancreáticas en la sangre es la más utilizada por el momento.

AMILASA

Es una hidrolasa que actúa sobre un substrato de almidón cuya degradación produce liberación de malto-dextrinas y otros azúcares con propiedades reductoras, a una temperatura de 37° C y un ph de 6.8 a 7.

Existen diferentes procedimientos para medir su actividad, el más conocido es el de SOMOGYI¹².

Los valores normales varían entre 60 y 180 unidades por 100 c.c. de suero o plasma, una unidad representa la actividad reductora equivalente a 1 mg. de glucosa.

Esta enzima, que constituye un producto de secreción exócrina, en condiciones normales pasa en pequeñas cantidades de las células acinosas a través de los espacios intersticiales, hacia la circulación, lo que representa cierto grado de secreción endócrina.

Las glándulas salivales y el hígado, constituyen una fuente adicional de amilasa.

La principal significación diagnóstica del aumento importante de la concentración sanguínea (10 veces o más la cifra normal), lo da la pancreatitis aguda, en la que es frecuente observar valores superiores a 1000 unidades en las primeras 12 a 24 horas, para regresar la normalidad en 3 ó 4 días. De aquí que el valor máximo de esta determinación, está precisamente en el estadio inicial, después, aunque el proceso inflamatorio continúa activo, se encuentran cifras normales o muy cercanas a lo normal, lo que entonces puede indicar una extensa destrucción del páncreas (Fig. No. 7).

Se ha señalado también el aumento de amilasa sérica, aunque no tan elevado como en la pancreatitis aguda, en diversos procesos patológicos, intra y extra abdominales, que en ocasiones hacen difícil la interpretación; entre ellos cabe mencionar: úlceras duodenales penetrantes a páncreas.

ENZIMAS SERICAS EN LA PANCREATITIS AGUDA

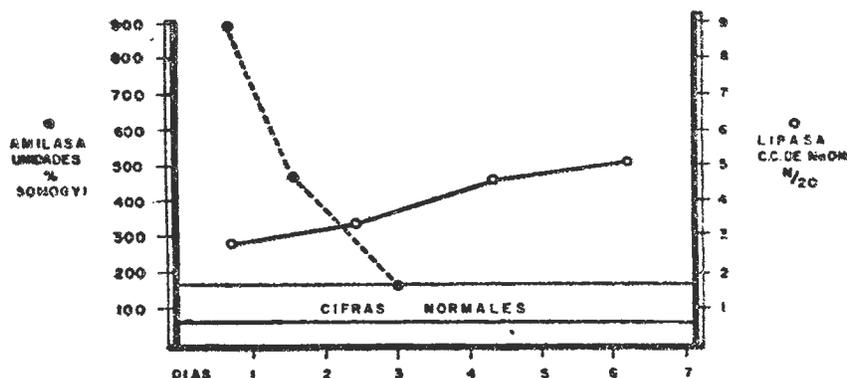


Fig. 7

LIPASA

Su determinación se lleva a cabo por el procedimiento de Cherry y Crandall¹³ el que se basa en la estimación del ácido graso producido por la hidrólisis que efectúa la enzima contenida en el suero sanguíneo, sobre un substrato de aceite de oliva, durante un período de 24 horas a 37° C y a un ph de 6.8 a 7.

El resultado se expresa en c.c. de hidróxido de sodio N/20 gastados en la titulación.

Las cifras normales se consideran entre 0.5 y 1.5 c.c. de hidróxido de sodio N/20.

Los aumentos de lipasa sérica tienden a ser paralelos a los de la amilasa, pero ocurren en fase más tardía durante la pancreatitis, para persistir por mayor tiempo.

La medición de la lipasa sérica es complemento de la amilasa, sobre todo en la fase tardía de la pancreatitis, alcanzando valores entre 2.5 y 5 c.c. de NaOH N/20. No hay comprobación de que los valores de lipasa sean afectados por algún padecimiento hepático. Sin embargo, es necesario tener presente que la hiperlipasemia puede presentarse durante la obstrucción intestinal, y durante las parotiditis.

La determinación de la actividad de tripsina en el suero en relación con las enfermedades agudas del páncreas ha sido considerada por algunos autores como de mayor sensibilidad; sin embargo, en la práctica clínica no se emplea con la frecuencia de las determinaciones anteriormente mencionadas.

PEPSINÓGENO PLASMÁTICO

Es un precursor de la pepsina, la cual es excretada en la orina y determinada como uropepsina, Se les considera al pepsinógeno plasmático y a la uropepsina, como muy buenos indicadores de la actividad péptica del estómago, ya que se ha demostrado la correlación que existe entre la cantidad de pepsina del jugo gástrico y los niveles de uropepsina y de pepsinógeno plasmático. Estos aumentan en los casos en que hay hipersecreción, como en la úlcera duodenal. En cambio, en la anaclorhidria se encuentran niveles inferiores a los normales.

La determinación del pepsinógeno plasmático se realiza por la técnica de Mirsky y col.¹⁴. Las cifras normales encontradas por Martínez y col.¹⁵ son en adultos de ambos sexos, de 96 a 238 unidades por 100 c.c. de plasma. (promedio 167). Los niveles aumentan significativamente en la úlcera péptica y disminuyen en la anemia perniciosa, y en el cáncer gástrico.

RESUMEN

Se mencionan en forma breve las principales características de las enzimas, haciendo hincapié en su especificidad y en sus características físico-químicas. Se describen los principales procedimientos empleados en el Laboratorio Clínico para medir la actividad enzimática y finalmente se hace una revisión de la semiología de las determinaciones enzimáticas, mencionando exclusivamente aquellas que ya han sido sancionadas por la experimentación clínica, como son: las fosfatasas ácida y alcalina; la 5-nucleotidasa; las transaminasas glutámico-pirúvica y glutámico-oxalacética; la amilasa y lipasa pancreáticas; y el pepsinógeno plasmático.

REFERENCIAS

1. Bodansky A.: *J. Biol. Chem.* 101: 93, 1933.
2. Innerfiel I.: "*Enzymes in Clinical Medicine*". Mc Graw-Hill Book Co. Inc., 1960.
3. Van Rymenant M. and Tagnon H. J.: "*Enzymes in Clinical Medicine*". New England J. Med. Vol. 261-1325-30-1959.
4. Fishman W. H. and Lerner F. A.: "*A method for estimating serum acid phosphatase of prostatic origin*". *J. Biol. Chem.* 200-87-97-1953.
5. Abdul Fadl M. Z. M. and King E. J.: "*Inhibition of acid phosphatase by l-tartrate*". *Biochem. J.* 42: 28-291-1948.

6. Villanueva A., Durazo F. Jiménez D.: "Valoración de la determinación de la fosfatasa ácida en suero sanguíneo". Rev. de Urología. Vol. XVII. No. 2-51-69-1959.
7. Gutman A. B. and Gutman E. B.: "An acid phosphatase occurring in serum of patients with metastazing carcinoma of prostate gland". J. Clin. Invest. 17: 473-478, 1938.
8. Cohen P. P.: "Transaminases in: *The enzymes*", Edited by Summer J. B. N. Y. Academic Press Vol. I Pág. 1040, 1951.
9. Karmen A. Wroblewski and La Due J. S.: "Transaminase activity in Human Blood". J. Clin. Invest. Vol. 34-126-133-1955.
10. Escotto J. Durazo F. y Gaitán F.: "La transaminasa glutámico-pirúvica en las hepatopatías". Rev. Med. del Hosp. General. Vol. XXIII-897-909-1960.
11. Wroblewski F. and La Due J. S.: "Serum glutamic pyruvic transaminase in Hepatic Disease". Ann. Int. Med. Vol. 45-801-811, 1956.
12. Somogyi M.: "Micromethods for estimation of diastase". J. Biol. Chem. Vol. 124-399-1938.
13. Cherry I. S. y Crandall L. A.: "Specificity of Pancreatic Lipase". Amer. Jour. Physiology. Vol. 100: 266, 1932.