

5

Enzimas en el laboratorio

TEMA

Francisco José Cabello Montoro

1. INTRODUCCIÓN

Las enzimas son el grupo más variado y especializado de las proteínas. Su función es actuar como catalizadores y permitir que las reacciones que tienen lugar en los seres vivos se desarrollen a un ritmo adecuado. Todas las reacciones químicas están catalizadas por enzimas. Podemos definir un catalizador como un compuesto que con su sola presencia aumenta la velocidad de la reacción sin experimentar ninguna alteración. Las enzimas pueden acelerar reacciones químicas específicas en un medio acuoso y en condiciones en las que los catalizadores no biológicos serían incapaces de realizar iguales funciones.

La enzimología clínica es la aplicación del conocimiento de las enzimas en el diagnóstico, tratamiento y pronóstico de la enfermedad.

La enzimología es una parte fundamental de la química clínica ya que la determinación de enzimas en el laboratorio suele ser una de las pruebas más requeridas en la práctica diaria. La determinación de una enzima o un grupo de enzimas en el plasma sanguíneo o en otro líquido biológico, puede proporcionarnos una información muy valiosa a cerca del tejido o células de las que provienen las enzimas detectadas en el laboratorio.

2. ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DE LAS ENZIMAS

Las enzimas están presentes en todos los tejidos aunque no todos tienen el mismo tipo de enzimas ni en igual cantidad. El conocimiento de su localización y su función en los tejidos es lo que nos permite utilizarlas como marcadores de ciertas patologías como iremos viendo a lo largo de este capítulo.

2.1. ESTRUCTURA DE LAS ENZIMAS.

Las enzimas son macromoléculas de origen proteico de elevado peso molecular compuestas por átomos de carbono, hidrógeno, oxígeno, nitrógeno y azufre.

Las enzimas están formadas por una secuencia específica de aminoácidos que constituyen de este modo la estructura primaria de las enzimas. Los aminoácidos de la cadena están unidos entre sí por enlaces peptídicos adquiriendo así la cadena una estructura tridimensional que puede disponerse de tres formas diferentes: alfa-hélice, hoja beta-plegada y espiral (estructura secundaria).

La estructura terciaria viene determinada por la capacidad de la estructura secundaria plegarse sobre sí misma. Cada proteína adquiere una estructura terciaria propia que le confiere las propiedades biológicas específicas y exclusivas de cada tipo de enzima. Las cadenas polipeptídicas de la estructura terciaria pueden unirse entre sí determinando la estructura cuaternaria.

Estas cuatro estructuras van a determinar la actividad catalítica de una enzima y su estabilidad está en función de parámetros tales como la temperatura, la concentración de hidrógeno (pH) y la concentración de sales del medio en que se encuentre.

En realidad, la parte más importante en la estructura de una enzima es la denominada sitio activo y que es el lugar por donde se une el sustrato para que la enzima pueda llevar a cabo su función catalizadora. El resto de la molécula cumple la mera misión de soporte estructural para que los componentes del sitio activo se mantengan en la conformación espacial adecuada para la enzima cumplir su misión catalítica.

2.2. FUNCIÓN DE LAS ENZIMAS.

Ya hemos dicho que las enzimas son biomoléculas cuya función en nuestro organismo es la de actuar como catalizadores de las reacciones químicas que tienen lugar en él sin sufrir modificación en el proceso. Por lo tanto lo que consiguen es aumentar la velocidad a la que estas reacciones se producen.

Para ello la enzima debe reaccionar con algún material: el sustrato que tras la reacción se transforma en producto.

Las enzimas tienen una serie de propiedades que podemos resumir:

- Son eficaces en muy pequeñas cantidades.
- No se alteran con la reacción.
- Sólo van a afectar a la velocidad con la que se alcanza el equilibrio de la reacción.
- Poseen mayor especificidad que los catalizadores químicos habituales.

Las enzimas llevan a cabo su función bien de forma solitaria o bien mediante un complejo llamado holoenzima, formado por la enzima propiamente dicha o apoenzima más

un cofactor. Este cofactor puede ser de naturaleza metalorgánica, en cuyo caso lo llamamos activador enzimático, o bien ser moléculas orgánicas, denominadas coenzimas.

La especificidad de las enzimas no es específica, esto quiere decir que enzimas diferentes pueden catalizar una misma reacción química. A éstas se les conoce con el nombre de isoenzimas. El uso de las isoenzimas como marcadores específicos de lesión tisular, celular o subcelular, como por ejemplo la creatinina quinasa (CK) y sus isoenzimas CK-MM, CK-BB y CK-MB, es lo que en realidad nos interesa a diario en la práctica en el laboratorio.

3. TERMINOLOGÍA Y CLASIFICACIÓN

Desde 1961, para la nomenclatura de las enzimas se siguen las directrices de la Comisión de Enzimas de la Unión Internacional de Bioquímica según las cuales todas las enzimas se denominan con las iniciales EC (Enzyme Comisión) y cuatro números separados por puntos. La primera cifra corresponde a la clase (una de las seis categorías de reacción), las dos siguientes indican la subclase y la subsubclase a la que se ha asignado la enzima, y la última cifra es el número de serie específico en su subsubclase.

Todas las enzimas se encuadran dentro de alguna de las siguientes seis clases posibles:

NÚMERO	CLASE	ACCIONES DESARROLLADAS
1	Oxido-reductasas	Transferencia de electrones.
2	Transferasas	Transferencia de grupos funcionales.
3	Hidrolasas	Rotura de enlaces incorporando una molécula de agua.
4	Liasas	Rotura de enlaces covalentes por adición o eliminación de grupos.
5	Isomerasas	Reacciones de isomerización: transferencia de grupos dentro de la misma molécula.
6	Ligasas	Formación de enlaces covalentes mediante reacciones de condensación.

Fig. 5.1. Clasificación de las enzimas.

Por ejemplo, la glicerolfosfato-deshidrogenasa (EC 1.1.1.8) es una enzima que cataliza una reacción de oxidorreducción (1) mediante transferencia de hidrógeno (1), en la que el receptor es la coenzima NAD^+ (1) y el dador el sustrato glicerolfosfato (8).

4. CINÉTICA DE LAS REACCIONES ENZIMÁTICAS

La acción de las enzimas es absolutamente necesaria para los sistemas vivos ya que las reacciones sin catalizar son lentas y las posibilidades que tiene una molécula de cambiar en un ambiente estable como es el medio biológico, son muy bajas, de ahí que

las enzimas proporcionen el medio adecuado para contrarrestar la lentitud en la reacción del cambio.

De forma esquemática, el desarrollo de una reacción enzimática es el siguiente:



La forma que tiene la enzima de realizar su actividad catalítica será en primer lugar unirse con el sustrato y, en segundo lugar facilitar la modificación del mismo para su cambio a producto. Las enzimas reaccionan ofreciendo su sitio activo al sustrato con el cual se acoplan y forman el complejo enzima-sustrato donde actúa con gran rapidez hasta liberar el producto transformado sin que en esta reacción se altere la enzima, la cual queda libre para fijar otra molécula de sustrato.

Dentro de todo el conjunto de enzimas, las hay que presentan una alta especificidad, es decir, sólo aceptan un tipo de moléculas sobre las que realizar la catalización. Otras, por el contrario, son menos específicas y catalizan reacciones utilizando como sustratos moléculas que presentan una cierta similitud.

La interacción entre enzima y sustrato se realiza a través de enlaces de naturaleza débil entre la molécula de sustrato y el centro activo. Cuanto mayor sea el número de estos enlaces, mayor será la especificidad de la enzima.

El estudio de la actividad enzimática implica el análisis de la velocidad de actuación de la enzima, lo cual se conoce con el nombre de cinética enzimática. La velocidad de catálisis de una enzima se determina bien como velocidad a la que se forma el producto, o bien como velocidad a la que desaparece el sustrato.

Si mantenemos constantes las condiciones de la reacción (pH, temperatura, cofactores y concentración de enzima), la velocidad aumenta a medida que aumentamos la concentración de sustrato, hasta llegar a un punto (velocidad máxima) a partir del cual la velocidad es constante aunque siga aumentando la concentración de sustrato. Esto se explica porque al aumentar mucho la cantidad de sustrato, la enzima se satura, y es entonces cuando se alcanza la mayor velocidad de reacción posible, que va a depender exclusivamente del tiempo que necesite la enzima para transformar el sustrato.

En 1913, Michaelis y Menten diseñaron un modelo o teoría general de la acción enzimática que explica el comportamiento de la velocidad de la reacción con respecto a la concentración de sustrato.

Entraremos en materia partiendo del estudio de una constante matemática relacionada con la cinética enzimática: la constante de Michaelis (K_m). La K_m es la concentración de sustrato en moles por litro con la cual la velocidad de reacción es la mitad de la velocidad máxima. Esta constante es característica de cada enzima con su

sustrato y nos permite valorar la especificidad de la enzima por el sustrato. Para una K_m elevada, la mitad de la velocidad máxima se alcanzará con una concentración alta de sustrato, lo que quiere decir que la afinidad de la enzima por ese sustrato es baja. Si la K_m de una enzima por su sustrato es baja, la afinidad de la enzima por ese sustrato será alta, y la velocidad rápida.

Cuando se estudia la actividad enzimática, se observa que a bajas concentraciones de sustrato, la velocidad es una función lineal de la cantidad de sustrato. A este fenómeno se le llama cinética de primer orden. Si la concentración de sustrato sigue aumentando, llega un momento en que la velocidad es independiente de la concentración de sustrato. En este caso se dice que es una cinética de orden cero.

En la práctica, si mantenemos constante la temperatura y el pH para que no se afecte la enzima y la concentración de sustrato empleada es por lo menos diez veces superior a la K_m , podemos determinar la concentración de sustrato de dos maneras:

1. Midiendo el aumento del producto formado a lo largo del tiempo de reacción.
2. Midiendo la disminución del sustrato a lo largo del tiempo de reacción.

Ambas mediciones se pueden hacer en un colorímetro o en un espectrofotómetro.

Cuando tiene lugar la reacción enzimática, el producto formado aumenta proporcionalmente con la concentración de enzima hasta que ésta excede a la cantidad de sustrato disponible, y se agota todo el sustrato antes de que finalice la monitorización de la reacción. En este momento la reacción deja de ser lineal y no refleja la actividad enzimática. Esto es lo que denominamos el límite de linealidad en una determinación enzimática.

4.1. UNIDADES DE MEDIDA DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA.

La actividad catalítica de las enzimas se mide en condiciones estándares, con concentración saturante y temperatura de 37° C.

Según la IUB (Unión Internacional de Bioquímica), la IFCC (Federación Internacional de Química Clínica) y la IUPAC (Unión Internacional de Química Pura y Aplicada) se debe emplear como unidad de medida de la actividad enzimática el katal/litro y que se define como la cantidad de enzima que transforma un mol de sustrato por segundo.

1 katal = 1 mol de sustrato catalizado por segundo.

Como se trata de una unidad excesivamente grande aún no es utilizada por todos los laboratorios clínicos, siendo la actividad enzimática expresada en unidades/litro. Una

Unidad es la cantidad de enzima que cataliza la conversión de un micromol de sustrato o coenzima por minuto en las condiciones de la prueba (temperatura, pH y concentración de sustrato).

$$1 \text{ U} = 17,7 \text{ nk (nanokatales)}$$

5. TÉCNICAS DE ANÁLISIS

El estudio enzimático en el laboratorio se basa de una forma general en la demostración in vitro de la actividad catalítica que una tiene in vivo. Por lo tanto, lo que en realidad nos interesa determinar es la funcionalidad de la enzima. La actividad de una enzima se mide mediante la determinación de la cantidad de sustrato transformado por unidad de tiempo, en condiciones exactamente definidas y estrictamente controladas. Existen pruebas específicas para hacer estas mediciones basadas en métodos inmunológicos, electroforéticos, cromatográficos y otros, que se emplean para el estudio de las distintas isoenzimas que componen la enzima o para aislar la forma pura de la enzima.

5.1. MÉTODOS MÁS COMUNES.

Los métodos que con mayor frecuencia son empleados por los laboratorios para las determinaciones de la actividad enzimática son los que a continuación se mencionan.

5.1.1. Métodos cinéticos colorimétricos.

Estos métodos se basan en la confirmación de un aumento del producto formado o de la reducción del sustrato mediante reacciones colorimétricas. Por ejemplo, determinación de la actividad enzimática de la fosfatasa ácida. La fosfatasa ácida actúa sobre el 1-naftilfosfato presente en el reactivo produciendo 1-naftol y fosfato. El 1-naftol reacciona con otro compuesto también presente en el reactivo y se transforma en un compuesto coloreado que puede leerse a 405 nm. Se lleva a cabo una primera lectura y a los 5 minutos otra. El aumento de absorbancia que se ha producido en este intervalo de tiempo multiplicado por un factor, nos dará la actividad catalítica de la fosfatasa ácida.

5.1.2. Métodos cinéticos con NADH o NADPH.

El fundamento de estos métodos se apoya en el hecho de que las formas reducidas de las coenzimas NADH y NADPH absorben la luz ultravioleta a una longitud de onda de 340 nm., y las formas oxidadas de estas coenzimas no lo hacen a esta longitud de onda.

De este modo, la actividad enzimática de las deshidrogenasas que necesitan NAD o NADPH como coenzimas, puede medirse a 340 nm detectando el aumento o el descenso

de la absorbancia que se produce al reducirse u oxidarse la coenzima. El aumento o la disminución que se produce en la absorbancia por unidad de tiempo es directamente proporcional a la actividad enzimática en la reacción.

Por ejemplo, determinación de lactato deshidrogenasa (LDH). La LDH actúa sobre el piruvato en presencia de NADH e hidrogeniones para dar lactato y NAD. Se hace una lectura basal a 340 nm. seguida de varias lecturas más a intervalos idénticos de tiempo. Vemos cómo se va produciendo un descenso en la concentración de NADH de forma constante. Las diferencias producidas entre cada lectura y la anterior definen el incremento de absorbancia y deben ser iguales a lo largo del transcurso de la reacción. Al finalizar, realizamos la media aritmética de las diferencias constatadas y se multiplica por un factor obteniéndose así la actividad enzimática.

Este factor por el que se multiplica el incremento de la absorbancia (ΔA) depende de las condiciones de la reacción.

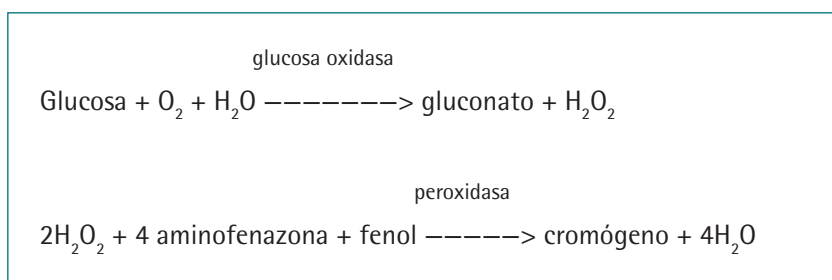
$$\Delta A \times \text{factor} = U/I$$

5.2. LAS ENZIMAS COMO REACTIVOS.

En el laboratorio, las enzimas no sólo son utilizadas para determinar su actividad sino que también son útiles en el estudio y determinación de concentraciones de sustrato.

De este modo, para determinar la concentración de un sustrato, se utiliza sistemas de reacción en los que están presentes todos los componentes necesarios para que dicha reacción tenga lugar a excepción del sustrato que es el que queremos medir y que se encuentra en la muestra problema.

Para medir la glucosa por un método enzimático utilizamos el método de la glucosa oxidasa, en el cual se producen las reacciones siguientes:



El reactivo contiene las enzimas glucosa oxidasa y peroxidasa y los sustratos necesarios para que la reacción tenga lugar. Todos ellos se encuentran en concentraciones definidas y estudiadas para que el sistema funcione en condiciones óptimas.

Al suero problema que contiene la glucosa se le añade el reactivo y se desencadena la reacción. A continuación medimos con espectrofotómetro el color que se forma.

La técnica se calibra con soluciones de concentración conocida de glucosa con las que se compara el problema.

De esta forma se miden en el laboratorio las concentraciones de muchos sustratos como la glucosa, el colesterol, ácido úrico y triglicéridos.

En la actualidad, en los laboratorios existen aparatos destinados a la medida de las actividades enzimáticas y que son capaces de conservar en memoria los factores correspondientes a cada técnica que realizan, miden el incremento de absorbancia y multiplican éste por el factor informando de la actividad de la enzima en estudio. Si se ha producido algún fallo durante la reacción también lo indican.

6. ASPECTOS PRÁCTICOS

6.1. CONDICIONES DE LA MUESTRA.

Las muestras que se van a emplear para la determinación de enzimas deben reunir una serie de requisitos y que son un aval de garantía de la calidad del resultado final.

- No se deben utilizar muestras que hayan sido congeladas y descongeladas ya que puede ser motivo de desnaturalización de la proteína constituyente de la enzima con lo que ésta perdería sus propiedades catalíticas.
- Los tubos destinados al estudio no deben ser lavados con detergentes que puedan alterar la estructura de enzimas.
- No usar muestras hemolizadas en las que están aumentados los componentes intraeritrocitarios que han sido vertidos al medio, sobre todo LDH y AST.
- Separar con la mayor brevedad posible el coágulo del suero ya que ciertas enzimas, como la LDH y la fosfatasa ácida, son componentes de los trombocitos y se liberan al medio si existe destrucción de éstos.
- La muestra de sangre debe ser extraída evitando la estasis venosa prolongada porque se produce hipoxia y un aumento de la permeabilidad de las células sanguíneas.
- Evitar el envejecimiento de las muestras, sobre todo para las determinaciones de CK y fosfatasa ácida que son muy lábiles.
- El transporte de las muestras destinadas a determinaciones enzimáticas debe realizarse en frío, sin congelar, a no ser que la determinación se vaya a realizar pasado algún tiempo.

6.2. CONDICIONES DE LOS REACTIVOS Y DEL INSTRUMENTAL.

- Conferir la fecha de caducidad de los reactivos y vigilar que no se ha producido un deterioro en las soluciones de sustrato.
- Conferir y comprobar el buen estado de los reactivos que hacen apropiado su uso.
- Cumplir siempre con las recomendaciones en cuanto a almacenamiento de los reactivos.
- Mantener una temperatura adecuada en las neveras donde se almacenan.
- Cuando se reconstituye un reactivo es útil identificarlo con la fecha y cumplir las recomendaciones del fabricante.
- Diluir los sueros cuando la reacción está fuera de la linealidad. Así disminuye la cantidad de enzima y con ella la actividad enzimática, y el sustrato presente en el reactivo puede ser suficiente.
- Los aparatos utilizados para las determinaciones enzimáticas, ya sea de forma manual o automática, debe cumplir dos requisitos importantes: ser un buen espectrómetro que nos permita obtener lecturas fiables a la longitud de onda del ensayo, y en segundo lugar, tener un buen sistema de regulación de la temperatura de modo que permita mantener la temperatura de trabajo deseada con un margen de $\pm 0,1^{\circ}\text{C}$.
- Asegurarnos de la buena calidad de las pipetas a utilizar para pipetear las cantidades con las que vamos a trabajar.

6.3. CONTROL DE CALIDAD.

El método analítico va acompañado del uso de sueros de control. Antes de procesar las muestras, hay que partir de la aceptación de los controles que se introducen en el laboratorio. Los resultados obtenidos deben ser aceptados en función de controles sucesivos, que son introducidos según el protocolo de cada laboratorio.

Con unos controles de calidad internos correctos, existirán menos posibilidades de cometer errores en la determinación de las actividades enzimáticas que estudiamos.

De cualquier manera, los resultados no esperados así como todas aquellas muestras que sobrepasen el límite de linealidad o en cuya determinación se produzca cualquier tipo de error, deben ser siempre comprobadas antes de pasar a la fase de validación.

7. ENZIMAS PLASMÁTICAS: DETERMINACIONES MÁS FRECUENTES

En el suero de individuos sanos vamos a encontrar por un lado, las enzimas denominadas plasmaespecíficas, y por otro vamos a detectar también actividades enzimáticas fisiológicas.

Las enzimas plasmaespecíficas son aquellas enzimas que van a desarrollar su propia función en el plasma. Son vertidas al plasma por órganos como el hígado (enzimas de la coagulación como la protrombina). Si el órgano responsable de su secreción está lesionado, va a ser evidenciable el descenso en la actividad de las enzimas que produce.

Las actividades enzimáticas fisiológicas tienen su origen en los procesos de renovación celular que constantemente tienen lugar en el organismo, en la actividad muscular y en el paso de enzimas de los órganos secretores al torrente sanguíneo.

Cuando existe alguna lesión en la membrana de las células, su contenido, incluidas las enzimas intracelulares, es vertido al espacio intersticial con el consiguiente aumento de la actividad enzimática en el suero. Dependiendo del grado de permeabilidad que mantenga la célula así como de la distancia a los vasos sanguíneos, mayor o menor será el tiempo transcurrido entre el momento en el que se produce el daño celular y la detección de este aumento en la actividad.

Así por ejemplo, la constatación de un aumento en la actividad enzimática hepática debido a una lesión, es cuestión de pocos minutos. Por el contrario, si se produce una lesión en el corazón, páncreas o próstata, la detección en la sangre de un aumento de la actividad enzimática puede tardar horas. Si la lesión celular se produce en el músculo, este tiempo puede alargarse varios días.

Pero la acción de las enzimas en el torrente circulatorio es limitada ya que su permanencia en él también lo es. Esto es debido a la acción de complejos sistemas encargados de la eliminación de las enzimas que llegan al torrente circulatorio mediante su captación y metabolización.

De este modo podemos deducir que el conocimiento de la procedencia celular de las enzimas, de su distribución y difusión a través de la sangre, linfa y tejido intersticial, así como de su vía de eliminación, nos permite obtener datos de gran interés en el diagnóstico de fenómenos patológicos.

Vamos a continuación a hacer una exposición de las enzimas más frecuentemente estudiadas en el laboratorio y su relación en determinadas patologías.

7.1. FOSFATASAS.

Las fosfatasa pertenecen a la clase de las hidrolasas y a la subclase de las estereras. Dentro de ellas se incluyen dos enzimas principales: la fosfatasa alcalina, con un pH óptimo de alrededor de 9, y fosfatasa ácida, con un pH óptimo alrededor de 5.

La fosfatasa alcalina es una enzima intracelular que se encuentra prácticamente en todos los tejidos. La fosfatasa alcalina tiene cuatro isoenzimas, derivadas de hígado, hueso, intestino o placenta. Aunque no está disponible de forma rutinaria, las fosfatasa alcalinas pueden ser diferenciadas mediante métodos especializados como la electroforesis o la separación en placas de gel de poliacrilamida. También existen métodos de diferenciación mediante la inactivación por calor. Pero la manera más fácil y ampliamente disponible en la práctica diaria es la confirmación con gamma glutamiltranspeptidasa (GGTP) o 5 nucleotidasa para establecer si el origen de la fosfatasa alcalina es hepático o no, ya que se la considera como un marcador muy sensible de la enfermedad obstructiva hepática, pero no específica, ya que aumenta también en enfermedades óseas y situaciones fisiológicas como el embarazo y las etapas de crecimiento.

La fosfatasa ácida tiene varias isoenzimas y está presente en numerosos tejidos. Se puede encontrar en hígado, bazo, riñón, eritrocitos, plaquetas y osteoblastos. Pero donde se encuentra en mayor proporción es en la glándula prostática.

De todas las isoenzimas de la fosfatasa ácida, sólo dos son útiles: la isoenzima prostática, ya que es la más frecuentemente determinada en el laboratorio como marcador tumoral en los carcinomas metastásicos de próstata, y las isoenzimas 1 y 5 del bazo, útiles en la enfermedad de Gaucher.

7.2. CREATININA QUINASA.

Se trata de una transferasa que cataliza la formación de ATP requerido por los sistemas contráctiles o de transporte. También cataliza la fosforilación reversible de la creatinina, siendo el ATP el dador del grupo fosfato.

Se trata de una enzima citoplasmática y mitocondrial ampliamente distribuida por los tejidos, pero en distinta concentración y de forma decreciente en músculo esquelético, miocardio, placenta y cerebro, y en menor proporción en otros tejidos.

Se encuentra formada por dos subunidades: M y B. Estas dos subunidades se combinan formando tres isoenzimas: CK-BB, CK-MM y CK-MB. Estas isoenzimas se pueden distinguir empleando métodos electroforéticos en gel de agarosa, cromatografía de intercambio iónico, inmunoinhibición y radioinmunoanálisis.

La distribución tisular de las isoenzimas es la siguiente: la isoenzima MM predomina en músculo esquelético; en el miocardio también predomina la isoenzima MM, pero existe entre un 13 y un 22% de isoenzima MB; y en el cerebro hay un 100% de isoenzima BB, retenida por la barrera hematoencefálica, que no deja pasar la CK-BB de origen cerebral. En

los demás tejidos, aunque existe menos cantidad de CK total y es más variable, el contenido de isoenzimas hay que tenerlo en cuenta a la hora de valorar un aumento de la CK.

7.3. AMINOTRANSFERASAS O TRANSAMINASAS.

Catalizan la reacción reversible de un grupo alfa-amino de un aminoácido a un alfa-cetoácido. Dentro de la clasificación de las enzimas, pertenecen a la segunda clase, es decir, son transferasas. Estudiaremos dos enzimas: la aspartato aminotransferasa (AST) y la alanina aminotransferasa (ALT).

Existen dos formas de AST: una mitocondrial, que es la más importante, y una forma citoplasmática soluble en menor cantidad. Su distribución celular es la siguiente: está presente en corazón, hígado, músculo esquelético y riñón en una cantidad parecida, pero decreciente, por lo que un aumento de AST en el suero no es específico de un órgano concreto, aunque indica algún daño tisular. La forma mitocondrial constituye el 81% de la enzima total presente en el hígado humano.

La ALT cataliza la transferencia de un grupo amino de la L-alanina al alfa-cetoglutarato.

Al contrario de la AST, la ALT se encuentra en su mayor parte en forma de enzima citoplasmática soluble. Se encuentra principalmente en hígado y en menor concentración en miocardio y otros tejidos. A pesar de esto, no es específica de enfermedad hepática.

7.4. GAMMA GLUTAMIL TRANSFERASA.

Cataliza la transferencia de un grupo gamma-glutamilo o un aminoácido o péptido a otra molécula de sustrato o al agua.

Se encuentra principalmente en el riñón, páncreas, hígado y próstata. Está muy distribuida entre los tejidos con un contenido muy variable.

Es una enzima microsómica por lo que el alcohol y algunos fármacos son capaces de producir una inducción enzimática y aumentar sus niveles séricos.

7.5. LACTATO DESHIDROGENASA.

Esta enzima cataliza la reacción reversible de lactato a piruvato.

Es más abundante en miocardio, riñón, hígado y músculo si bien se encuentra ampliamente distribuida por los tejidos. Es un tetrámero compuesto por cuatro subunidades. Existen dos subunidades diferentes: H y M, H para las cadenas de péptidos del corazón y M para las cadenas del músculo liso. Las dos cadenas admiten combinaciones de cinco formas diferentes lo que nos permite hablar de cinco isoenzimas que se separan por electroforesis. Estas cinco isoenzimas de mayor a menor movilidad electroforética son: LDH1, LDH2,

LDH3, LDH4 y LDH5. Todas ellas tienen el mismo peso molecular, pero sí diferencia en la carga que contienen.

La distribución de las isoenzimas en los tejidos es variable. La LDH existe en el miocardio y los hematíes. El riñón contiene la mayor parte de las isoenzimas de mayor movilidad como son la LDH1 y LDH2. En el hígado y músculo esquelético las principales isoenzimas son la LDH4 y LDH5. La concentración relativa de las isoenzimas en el suero normal es, de mayor a menor: LDH2, LDH1, LDH3, LDH4 y LDH5.

LDH	VALOR
Recién nacido	300-1500 U/I
Lactante	100-250 U/I
Niño	60/170 U/I
Después	60/120 U/I

Fig. 5.2. Valores normales en sangre de LDH.

De forma general, la elevación de los niveles séricos de LDH no se considera específica de ningún órgano o tejido. Para obtener mayor información y una relación más certera, es necesario separar y determinar las cinco isoenzimas.

7.6. AMILASA.

Esta enzima es la encargada de degradar las moléculas de carbohidratos complejos en componentes más pequeños. La amilasa humana es una alfa-amilasa debido a su capacidad para romper las uniones de polisacáridos alfa-1-4, sin alterar las uniones alfa-1-6 de las cadenas laterales, dando lugar a dextrano, maltosa y algunas moléculas de glucosa.

La producción de amilasa es llevada a cabo por el páncreas exocrino y las glándulas salivares para facilitar la digestión del almidón. Es filtrada con facilidad por los glomérulos renales debido a su bajo peso molecular por lo que no es de extrañar su presencia en orina cuando se encuentra aumentada en suero. Así ocurre en el caso de una pancreatitis.

Actualmente, la amilasa sérica humana puede ser fraccionada en dos isoenzimas: amilasa P, producida por el páncreas, y amilasa S, producida por las glándulas salivares y otros tejidos. Se pueden separar por electroforesis donde observamos que las isoenzimas pancreáticas avanzan más lentamente hacia el ánodo que las salivares.

La utilidad clínica de las isoenzimas pancreáticas es bastante discutida. Puede resultar útil en estudios de hiperamilasemia clínicamente inexplicada, para distinguir entre la pancreatitis aguda y otras perturbaciones asociadas a actividades elevadas de amilasa sérica.

AMILASA	VALOR
Recién nacido	5-65 U/I
>1 año	25-125 U/I

Fig. 5.3. Valores normales de amilasa en sangre.

8. INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Una vez que ya sabemos qué es una enzima, cuáles son las que con mayor frecuencia se determinan en el laboratorio y cómo las podemos medir, vamos a estudiar cuál es el valor de estas determinaciones, es decir, qué significado tiene su elevación en los diferentes fluidos biológicos. Para ello, vamos a establecer una relación entre las enzimas ya estudiadas y los procesos patológicos en los cuales se ven implicadas.

8.1. INFARTO DE MIOCARDIO.

El dato fundamental es la elevación en la concentración de enzimas plasmáticas y las más frecuentes son: la creatinfosfoquinasa (CPK), la transaminasa glutámico oxaloacética (TGO) y la deshidrogenasa láctica (DHL).

CPK total		VALOR
Recién nacido		68-58 U/I
Adulto	Varón	12/70 U/I
	Hembra	10-55 U/I

Fig. 5.4. Valores normales en sangre de CPK.

La enzima que se eleva más tempranamente es la CPK y su isoenzima CK-MB, que lo hacen en las primeras 8 horas alcanzando su pico máximo alrededor de las 24 horas y regresando a cifras normales en 2 ó 3 días. También se eleva en miopatías, diabetes, intoxicación etílica, trauma muscular, ejercicio exagerado o infarto pulmonar. Incluso se puede elevar por la administración de inyecciones intramusculares. De aquí que sea más específica la medición de la fracción miocárdica MB de la CPK, que casi siempre se eleva en los casos de infarto de miocardio. Es por tanto más específica en ausencia de lesiones del intestino delgado, diafragma, útero o próstata.

La TGO se eleva más tarde y se mantiene elevada durante más tiempo. Presenta el pico máximo alrededor de las 48 horas y se normaliza hacia el quinto día. También se eleva en enfermedades hepáticas, miopatías, miopericarditis, tromboembolia pulmonar e incluso con la administración de inyecciones intramusculares.

La DLH se eleva en el suero a las 24 ó 48 horas siendo su elevación más sostenida que las anteriores. Alcanza su pico máximo a los 4 ó 6 días descendiendo a cifras normales en 1 ó 2 semanas después del infarto. También se eleva en hemólisis, anemia megaloblástica, leucemia, enfermedades hepáticas y renales, neoplasias, miopatías y miocarditis.

Se recomienda realizar un control cada 6 horas. Una vez establecido el diagnóstico, interesa ver la evolución del enfermo, por lo que se deben realizar análisis cada 12-24 horas con el fin de observar picos de AST y LDH y su posterior normalización, lo que se interpreta como un buen pronóstico de la lesión del miocardio. Los exámenes generales

de laboratorio suelen mostrar alteraciones inespecíficas como leucocitosis y aumento de la velocidad de sedimentación globular.

8.2. PANCREATITIS AGUDA.

La autólisis del parénquima del páncreas exocrino libera lipasa y alfa-amilasa al tejido intersticial, que pasan de los vasos linfáticos a la circulación sanguínea. Como tienen un peso molecular relativamente bajo atraviesan el glomérulo renal. Los túbulos reabsorben la lipasa pero no la amilasa, que aparecerá en elevadas concentraciones en orina. Por estas razones, en el diagnóstico de la pancreatitis se determinan lipasa en sangre y amilasa en sangre y orina. Los valores considerados como normales de amilasa en orina son de 1-17 U/h.

LIPASA	VALOR
Tiezt (37°)	0,1-1,0 U/m
BMD (30°)	<140 U/I

Fig. 5.5. Valores normales de lipasa en sangre.

8.3. HÍGADO Y ENZIMAS SÉRICAS.

El hígado es el órgano más rico en enzimas por lo que las enfermedades hepáticas generan numerosas alteraciones de las actividades enzimáticas en la sangre.

Las enzimas liberadas por las células hepáticas son vertidas directamente a la sangre por lo que pueden ser detectadas en un plazo de tiempo muy corto tras la lesión.

El uso de exámenes de laboratorio automatizados ha hecho posible la identificación de muchos pacientes, en gran parte asintomáticos, con elevación de enzimas hepáticas. La elevación de estas enzimas y la alteración de otras pruebas de laboratorio como la albúmina o el tiempo de protrombina, son fundamentales para el diagnóstico de un trastorno hepático en cualquier individuo, y por lo tanto se debe iniciar una evaluación más profunda.

8.3.1. Hepatitis víricas agudas.

Se puede constatar la elevación de la ALT en mayor proporción que la AST. La elevación de los niveles séricos de estas enzimas no es directamente proporcional a la gravedad del daño hístico. En las hepatitis agudas también se produce una elevación de la GGT.

Las enzimas séricas se normalizan en un plazo de 3 a 5 semanas.

En las situaciones clínicas de hepatitis fulminante, los niveles séricos de transaminasas van a descender de forma brusca debido a que la necrosis generalizada de las células hepáticas (hepatocitos), va afectando a todo el parénquima hepático perdiendo éste su funcionalidad y por tanto es incapaz de producir más enzimas y liberarlas al medio.

Si la hepatitis se hace crónica, las enzimas no llegan a normalizarse.

8.3.2. Enzimas marcadoras de colestasis.

En la colestasis, la GGT se eleva por mecanismos no bien establecidos pero probablemente similares. Además es inducible por agentes externos. Se trata de un marcador muy sensible pero de poca especificidad. El alcohol induce manifiestamente su síntesis, por lo que es de utilidad en el control de la abstinencia alcohólica.

También se produce un aumento de la fosfatasa alcalina si bien hay que tener en cuenta que de forma fisiológica esta enzima aumenta en el torrente sanguíneo (embarazo, crecimiento, envejecimiento). Las fosfatasas alcalinas hepáticas son un grupo de enzimas ubicadas preferentemente en la membrana canalicular del hepatocito. Su síntesis está, al menos en parte, regulada por la presencia de sales biliares. Un aumento en la concentración de sales biliares, estimula la síntesis de fosfatasas alcalinas. Por esta razón, se elevan en la colestasia intra o extrahepática y pueden elevarse en procesos expansivos locales (tumoraes o inflamatorios), en los que la concentración de sales biliares aumenta en forma sectorial, estimulando la síntesis de fosfatasas alcalinas.

En el daño hepático crónico, es corriente encontrar discretas alzas en la concentración de fosfatasas alcalinas, como expresión de la colestasia que siempre está presente. Una elevación importante de fosfatasas alcalinas en estos casos, debe hacer pensar en daño hepático predominantemente colestásico (cirrosis biliar primaria, colangitis esclerosante), en la aparición de algún proceso expansivo intrahepático o en obstrucción del flujo biliar. También puede estar aumentada en algunas enfermedades extrahepáticas, enfermedad de Paget, hiperparatiroidismo primario, osteomalacia, raquitismo, insuficiencia renal crónica y en pacientes sometidos a hemodiálisis.

En conclusión, el incremento de la GGT y de la fosfatasa alcalina no parece que se deba a la retención biliar, sino a que existe un aumento de la síntesis consecutivo a la colestasis.

8.3.3. Enzimas marcadoras de alcoholismo.

La determinación de GGT en plasma como marcador sensible y precoz es de gran utilidad para llegar a un diagnóstico de etilismo crónico. El alcohol actúa como inductor enzimático y como tóxico. Por este motivo, cuando se abandona el hábito alcohólico, se produce una disminución exagerada de la actividad enzimática hasta la vuelta a la normalidad.

8.3.4. Cirrosis hepática.

En la cirrosis hay un incremento moderado de las transaminasas, siendo el incremento de AST mayor que el de ALT, al contrario de lo que ocurría en la hepatitis vírica aguda.

Si la cirrosis es de origen etílico, también se encontrará aumentada la GGT, y si es de origen biliar, lo estarán de forma clara las fosfatasas alcalinas.

Como hemos visto en el estudio de las enfermedades hepáticas, las determinaciones enzimáticas nos sirven tanto para el diagnóstico y diagnóstico diferencial como para el pronóstico, pues la normalización de las enzimas séricas es un signo de eficacia en el tratamiento.

8.4. MEDICAMENTOS.

El efecto de los medicamentos puede influir sobre el resultado de los estudios analíticos enzimáticos porque:

- Producen interferencias analíticas.
- Modifican los valores fisiológicos al provocar un mecanismo de inducción enzimática.
- Por la hepatotoxicidad de algunos fármacos.

Por estas razones es necesario tener un conocimiento exacto del tratamiento a que está siendo sometido el paciente cuando se hace un estudio enzimático encaminado al diagnóstico de algún proceso patológico.

8.5. NEOPLASIAS.

De forma general, existe un aumento no considerado específico de la LDH y fosfohexoisomerasa (PHI) en un 30-70% de todos los casos de cánceres.

8.5.1. Metástasis hepáticas.

Se observan aumentos de la fosfatasa alcalina y de la GGT.

8.5.2. Metástasis óseas.

Si existen condensaciones, signo de que aumentan los osteoblastos, se observa un incremento de las fosfatasas alcalinas.

Si, por el contrario, existen lesiones de tipo lítico que demuestran un aumento de los osteoclastos, se produce un aumento de las fosfatasas ácidas totales.

8.5.3. Cáncer de próstata.

Se detecta un aumento de la fosfatasa ácida total consecutivo al aumento de su isoenzima prostática. No es un marcador precoz de la enfermedad ya que cuando se detecta la lesión ya existen metástasis.

ENZIMA	TIPO DE ANÁLISIS
Fosfatasa ácida	Espectrofotométrico a punto final o cinético. Lectura del color a 505 nm.
Alanina aminotransferasa	Espectrofotométrico cinético. Medida de desaparición de NADH a 430 nm.
Aldolasa	Espectrofotométrico a punto final o cinético. Medida de desaparición de NADH a 340 nm.
Fosfatasa alcalina	Espectrofotométrico a punto final o cinético. Medida del color a 405 nm.
α -amilasa	Espectrofotométrico cinético. Medida de color a 405 nm.
Aspartato aminotransferasa	Espectrofotométrico cinético. Medida de desaparición de NADH a 340 nm.
Colinesterasa	Espectrofotométrico cinético o a punto final. Medida de color a 405 nm.
Creatinquinasa	Espectrofotométrico cinético o a punto final. Medida de color a 405 nm.
Gammaglutamiltransferasa	Espectrofotométrico cinético. Medida de color a 405 nm.
Lactato deshidrogenasa	Espectrofotométrico. Medida de la desaparición de NADH a 340 nm.

Fig. 5.6. Métodos de determinación más frecuentes para las principales enzimas séricas.

BIBLIOGRAFÍA

- Núñez de Castro. Enzimología. Capítulo 6: Modulación de la actividad enzimática. Tratamiento formal de inhibidores y activadores de enzimas. Madrid. Editorial Pirámide. 2001.
- Segel, I.H. Cálculos de Bioquímica. Capítulo 4: Enzimas. Zaragoza. Editorial Acribia. 1982.
- Voet D. Y Voet JG. Bioquímica. Capítulo 13: Velocidad de las reacciones enzimáticas. Barcelona. Ediciones Omega. 1992.
- M.D. de Arriaga, Soler J, Busto F. y Cadenas E. Manual de ejercicios de cinética enzimática. Capítulo 2: Inhibición enzimática. Sistemas puros. Capítulo 3: Inhibición: sistemas mixtos. Universidad de León. Secretariado de publicaciones. 1998.
- I. Núñez de Castro. Enzimología. Capítulo 8: Reacciones enzimáticas con dos o más sustratos. Madrid. Editorial Pirámide. 2001.
- Voet D. y Voet J.G. Bioquímica. Capítulo 5: Técnicas de purificación de enzimas. Barcelona. Ediciones OMEGA. 1992.

- Voet D. y Voet J.G. Bioquímica. Capítulo 14: Catálisis enzimática. Barcelona. Ediciones OMEGA. 1992.
- I. Núñez de Castro. Enzimología. Capítulo 9: Regulación de la actividad enzimática por cambio conformacional. Madrid. Editorial Pirámide. 2001.
- Mathews CK y Van Holde KE. Herramientas de la Bioquímica: Cómo medir las velocidades de las reacciones catalizadas por enzimas. Madrid. Editorial MacGraw-Hill-Interamericana. 1999.
- María José Noriega Borge. Principios de Bioquímica. Capítulo 5: Enzimas. 1ª Edición. Barcelona. Editorial Masson. 2000.
- Pedro Gabriel Martín Villamor, José María Soto Esteban. Anatómo-fisiología. Volumen II. Capítulo 20: Aparato digestivo. 1ª Edición. Barcelona. Editorial Masson. 2000.
- María Luisa Abascal Altuzarra, Lourdes Díaz Duarte. Nociones de patología y exploración funcional. Madrid. Editorial Everest S.A. 1995.
- Boyer P.D. The enzymes I-II: structure and control Kinetics and mechanism. New York. Academic Press. Student Edition. 1970.
- Cornish-Bowden, A. Fundamentals of enzyme Kinetics. Cap. 5: Inhibition and activation of enzymes. Cambridge. Portland Press. 1995.
- Whitaker J.R. Principles of Enzymology for de food sciences. New York Marcel Dekker. 1994.
- Price N.C. y Stevens, L. Protein purification: principles and practice. New York. Springer. 1993.
- Fersht A. Structure and mechanism in protein science: a guide to enzyme catalysis and protein folding. New York. W. H. Freeman. 2000.

