1 9 8 5 - 2 Reg. No. 78286474

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

FACULTAD DE CIENCIAS

B4

"DETECCION DE DAÑO TISULAR HEPATICO MEDIANTE LA ENZIMA ISOCITRATO DESHIDROGENASA"

MARIA GUADALUPE RAMIREZ DUEÑAS

Guadalajara, Jal. 1985

T E S I S

" DETECCION DE DAÑO TISULAR HEPATICO
MEDIANTE LA ENZIMA ISOCITRATO
DESHIDROGENASA ".

PRESENTADA POR:
MARIA GUADALUPE RAMIREZ DUEÑAS.

DIRIGIDA POR:
DR. CARLOS ASTENGO OSUNA.

A G R A D E C I M I E N T O S

AL M. EN C. GERARDO VACA PACHECO.

Investigador de la Unidad de Investigación Biomédica del I. M. S. S.

Por su apoyo dedicación y paciencia en transmitir sus conocimientos incondicionalmente para realizar este trabajo.

A LA Q. F. B. CLAUDINA MEDINA LOZANO.

Quimica de la Unidad de Investigación biomédica del I. M. S. S.

Por su inmensa ayuda.

AL DR. CARLOS ASTENGO OSUNA.

Investigador de la Unidad de Investigación biomédica del I. M. S. S.

DIRECTOR DE TESIS, por su ejemplo y por llenar de saber a las nuevas generaciones.

AL BIOLOGO JUAN CARLOS BECERRA FIGUEROA.

Que hoy más que nunca me brindo su apoyo, confianza y amor.

A CACO Y LALA.

Base principal de mi vida .

¡ la meta esta Lograda !

A MALU, GÜERA Y MAGO .

A PAU Y CAR.

El futuro hecho realidad .

L U P I T A.

C O N T E N I D O

CAPITULO I

I N T R O D U C C I O N

I N T R O D U C C I O N

La enfermedad humana, herditaria o adquirida, tiene una base bioquímica o se acompaña por alteraciones bioquímicas. El laboratorio Clinico General y el laboratorio de Bioquímica Genética tiene una función central en la identificación y medición de dichas alteraciones.

Laboratorio Clinico General.-

La enzimología tiene su primer antecedente en 1908, cuando Wohlgemuth, demostró que el ser humano exhibía una actividad de amilasa en suero y concluyó que ésta era liberada del páncreas o de la glándula parótida. Posteriormente, diferentes grupos de trabajo, demostraron el incremento en el suero de diferentes enzimas en pacientes con diversas enfermedades; simultaneamente se fueron desarrollando métodos cada vez más sensibles y específicos para la cuantificación de actividades enzimáticas y el diagnóstico se fué convirtiendo en una práctica común de la química clínica. (1).

Actualmente, la cuantificación de actividades enzimáticas en diversas muestras biológicas, se utiliza como un auxiliar de diagnóstico, control de terapia y pronóstico de daño tisular. La muestra biológica usada con mayor frecuencia es el suero sanguíneo. Normalmente en el suero están presentes múltiples enzimas debido a un "escape" o "derrame" de sus tejidos de origen, dichas enzimas son removidas de la circulación por excreción y por degradación metabólica. El "escape" o "derrame" de una enzima de su tejido de origen a la circulación puede aumentar por una enfermedad y, la especificidad diagnóstica de un cambio en el nivel de actividad de una enzima en el suero, está en relación inversa a la extensión de su distribución tisular. Así, las enzimas con una distribución tisular restringida a uno solo o a pocos órganos, tienen un significado diagnóstico elevado respecto a la localización de la enfermedad en un órgano especifico y las enzimas que tienen una distribución en múltiples tejidos, tienen un significado menos preciso, (2) .

La magnitud del incremento en la actividad de una enzima en el suero, depende de dos factores:

a) La velocidad de su liberación de su tejido de origen y
b) La velocidad de su remoción de la circulación, (2).

Un fenómeno que exhiben la mayoría de las enzimas es la ocurrencia de isoenzimas. Las isoenzimas se definen como múltiples formas moleculares, funcionalmente similares de una enzima, que ocurren en un solo individuo o en diferentes miembros de la misma especie, (3, 4).

Las causas de la generación de isoenzimas son:

a) La ocurrencia de múltiples loci genéticos que codifican para cadenas polipetídicas estructuralmente diferentes de la enzima.
b) La ocurrencia de alelismo múltiple en un solo locus, determinando versiones estructuralmente distintas de una cadena polipetídica particular y
c) La ocurrencia de formación de isoenzimas " secundarias " debido a modificaciones postraduccionales de la estructura de la enzima.

En el caso particular de cualquier enzima, puede estar operando más de una de éstas causas para generar las múltiples formas observadas, (4). Las isoenzimas pueden ser identificadas y caracterizadas por diferencias en sus propiedades cualitativas, tales como: movilidad electroforética, termoestabilidad, respuesta a inhibidores y activadores, afinidad por sus-tratos, etc. Ciertas isoenzimas están presentes en la misma célula, pero tienen una localización subcelular diferente: una forma molecular está localizada en el citosol y otra en al mitocondria. Las formas soluble y mitocondrial de la enzima son codificadas por loci genéticos diferentes, (2, 4).

Las diferentes proteínas que constituyen un set de isoenzimas pueden estar presentes en la misma célula, pero también puede haber marcadas diferencias en los patrones de isoenzimas entre células de diferentes tejidos. Para reconocer un -

extracto del tejido en estudio. Cuando en una enfermedad aumenta el "escape" o "derrame" de una enzima de un tejido (o-tejidos) en ocasiones es posible identificar su distribución tisular específica en una muestra de suero por medio de los-diferentes métodos señalados anteriormente (movilidad electroforética, termoestabilidad, respuesta a inhibidores y activadores, etc.), (1,4).

Las enzimas comunmente usadas como auxiliares en el diagnóstico de patología tisular son: Amilasa, Lipasa, Transaminasa glutámica-pirúvica (TGP), Transaminasa glutámica-oxalacética (TGO), Deshidrogenasa láctica (DHL), Fostatasas ácida(Fac) y alcalina (Fal), Aldolasa, Isocitrato deshidrogenas (ICD),-Sorbitol deshidrogenasa (SORD), Creatín fosfoquinasa (CK), -(2).

Amilasa y Lipasa.- El diagnóstico de enfermedad pancreática aguda puede facilitarse por medio de la demostración de - niveles séricos elevados de las enzimas digestivas amilasa y lipasa pancreáticas. Al cuantificar actividad de amilasa debe distinguirse entre la isoenzima de origen salival y la isoenzima de origen pancreático, la separación puede efectuarse - poe medio de electroforesis, (2).

TGO y TGP.- En ciertas enfermedades que involucran teji-dos ricos en éstas enzimas, particularmente el hígado y el - miocardio, ocurre un incremento en los niveles séricos de actividad de transaminasas. Esto se debe presumiblemente a la-liberación de cantidades anormales elevadas de los tejidos - dañados. En lesiones inflamatorias, degenerativas y neoplásicas del hígado, se producen niveles séricos elevados de TGO-y TGP. La forma de enfermedad cardiaca en la cual la determinación de los niveles séricos de TGO es de mayor valor, es - el infarto del miocardio, el cual se acompaña característicamente de un aumento significativo en la actividad de TGO. El nivel de TGP puede permanecer relativamente sin cambios (2).

DHL.- La DHL es una proteína tetramérica formada por cuatro subunidades polipeptídicas, las cuales pueden ser de dos tipos: subunidades H (heart) y subunidades M (muscle); las subunidades H y M son codificadas por loci genéticos diferentes. La DHL es una enzima que exhibe múltiples formas moleculares (isoenzimas), debido a la ocurrencia de múltiples loci geneticas que codifican para las cadenas polipetídicas H y M. Hay cinco tetrámeros posibles de DHL: H_4, H_3M, H_2M_2, HM_3, M_4. Estos tetrámeros corresponden a las isoenzimas DHL-1, DHL-2, DHL-3, DHL-4, DHL-5 respectivamente. En un corrimiento electroforéticoa pH alcalino la DHL-1 tiene la mayor movilidad anódica, seguida por la DHL-2 y así sucesivamente hasta la DHL-5 la cual es la isoenzima con menor movilidad. La DHL-1 y DHL-2 predominan en el corazón, mientras que la DHL-5 es más abundante en el hígado. La DHL-1 es relativamente estable al calor, es activa en presencia de urea 2M y tiene además, actividad de α hidroxibutirato deshidrogenasa; la DHL-5 es inestable al calor, es inhibida por urea 2M y no tiene actividad de α hidroxibutirato deshidrogenasa. Por lo tanto en el infarto del miocardio se puede demostrar los niveles séricos elevados de DHL-1 midiendo DHL sérica estable al calor o resistente a la urea. o bien estimando la actividad de α hidroxibutirato deshidrogenada sérica. En pacientes con hepatitis aguda ocurre un incremento en los niveles de DHL en suero, a expensas de la DHL-5, (2,4).

ICD.- niveles séricos elevados se observan consistentemente en presencia de enfermedad hepática aguada, (2).

SORD.- A semejanza de la ICD, niveles séricos elevados de SORD, son virtualemente específicos de enfermedad hepato-celular aguda, (2).

Aldolasa.- En la hepatitis viral, en la necrosis hepática y en las enfermedades malignas del hígado, ocurren un incremento en los niveles séricos de ésta enzima. La aldolasa sérica puede estar significativamente elevada en la distrofia muscular progresiva, aún en estadíos iniciales cuando el

diagnóstico es difícil. Su determinación es de valor, ya que la regla es que en enfermedades musculares de origen nervioso (atrofia espinal progresiva, poliomielitis) los valores - sean normales. Esisten múltiples formas involucradas de la - aldolasa, (2).

FAl.- La medición de la Fal en suero tiene valor clínico- principalmente en el estudio de pacientes con enfermedades - del esqueleto, del higado y del tracto biliar, Su determinación es útil en el diagnóstico diferencial de los desórdenes esqueleticos, particularmente en aquellos acompañados de una deficiente mineralización, La actividad de FAl sérica está - consistente y considerablemente elevada en el raquitismo y - en la osteitis deformans (enfermedad de Paget), y está considerablemente disminuída o ausente en la hipofosfatasia. -- También se encuentran niveles séricos elevados de FAl en ictericia obstructiva y menos freceuntemente en la ictericia - hepatocelular. La FAl exhibe la ocurrencia de isoenzimas, (2).

FAc.- El significado en un incremento en los niveles séricos de FAc es el siguiente:-Corrobora el diagnóstico de cáncer prostático metastásico sugerido por otros métodos de exámen. -Puede proporcionar evidencia de metástasis antes de que ésta sea demostrable de otra manera. - Indica el origen prostático de las lesiones metastásicas cuendo el tumor primario no puede ser detectable clínicamente. - Detecta recurrencia o progresión después de un período de quiescencia, (2).

CK.- Esta enzima se encuentra en grandes cantidades en músculo esquelético, pero también en cantidades muy apreciables en músculo cardíaco y cerebro. La CK es una enzima diméreica, formada por dos subunidades tipo B o tipo M. La subunidad M- es predominante en el músculo y la subunidad B es predominante en el cerebro. Se han reconocido tres isoenzimas de CK en el plasma de acuerdo a su composición de subunidades, Las -- cuales son referidad como BB, MM y MB. En las enfermedades - de músculo esquelético ocurre un marcado incremento en los - niveles de CK en suero. Por ejemplo en la distrofia nuscular tipo duchen, los niveles de Ck en suero son hasta 50 veces - superiores a los normales. En éste caso la actividad total -

de CK se eleva principalmente a expensas de la isoenzima MM, los niveles séricos elevados de CK total, son un indicador - muy sensible de daño agudo del miocardio; con elevaciones -- significativas en 95-100% de los pacientes con infarto. La - demostración de niveles séricos elevados de laisoenzima MB - le confiere especificidad al diagnóstico de infarto del miocardio (2,3).

Son numerosos los métodos (colorimétricos, espectrofotométricos, fluorométricos, radioisotópicos) para la cuantificación en suero de las actividades enzimáticas señaladas anteriormente, (5). Si bien hay métodos colorimétricos para varias enzimas, para otras éste tipo de metodología es poco -- sensible y se hace necesario cuantificar éstas actividades - enzimáticas por métodos más finos, como los espectrofotométricos, los fluorométricos o los radioisotópicos, de éstos - últimos, los espectroforométricos son las más comunmente usados para la cuentificación de varias enzimas en el rango - Ultravioleta (340); Sin embargo, la infraestructura a nivel de equipo, para la ejecución de a metodología más sensible, -- sólo se encuentra en los laboratorios de los grandes centros hospitalarios, generalmente los llamados Hospitales de tercer nivel.

Laboratorio de Bioquímica Genética.-

Se conocen más de 150 enfermedades metabólicas cuyas características clínicas y bioquímicas son atribuídas a la deficiencia congénita de una enzima específica como consecuencia de una mutación génica, tales condiciones se denominan Errores Innatos del Metabolismo (EIM) y la mayoría de ellos se heredan como rasgos mendelianos recesivos, (4,6,7).

Las enzimas involucrados en las diferentes EIM son muy diversas y están relacionadas con múltiples aspectos de metabolismo. Las alteraciones clínicas y metabólicas resultantes, también varían ampliamente. Considerados individualmente los diferentes EIM son poco frecuentes, sin embargo, como grupo, constituyen un importante problema de salud. Frecuentemente-

sus signos y síntomas son inespecíficos, lo que dificulta el establecimiento del diagnóstico y consecuentemente el tratamiento;por ésta razón, la búsqueda de anormalidades matabólicas en pacientes con enfermedades, probablemente genéticas,- no diagnosticadas, debe ser una práctica médica sistemática, (5,8). En diversas partes del mundo existen centros para la- detección de EIM en individuos de la población en general -- (recién nacidos) y/o en pacientes de consulta hospitalaria - con sospecha de enfermedad hereditaria.

Dos de la múltiples funciones del laboratorio de Bioquímica Genética, orientadas hacia el paciente son:

- Servir como agente diagnóstico y facilitar el tratamiento- Y manejo clínico del paciente y
- Diseñar nuevos métodos para la identificación de EIM.

Como las enzimas involucradas en las diferentes EIM son - muy diversas y están relacionada con múltiples aspectos del- metabolismo y la mayoría de éstas enfermedades hereditarias- son poco frecuentes y su detección implica el estudio de un- número elevado de individuos; resulta prácticamente imposible montar un laboratorio con los recursos metodológicos y de e- quipo necesario, para la detección y caracterización de todos los EIM conocidos.

Sin embargo, los avances científicos y tecnológicos de -- las últimas décadas han hacho posible el desarrollo de procedimientos de laboratorio cualitativos, para la identificación presuntiva de individuos con EIM. Estos procedimientos incluyen:

a) Pruebas cualitativas de color, de turbidez o de precipitación para la identificación de concentraciones anormales en- orina de aminoácidos y metabolitos derivados de éstos, de ácidos orgánicos, carbohidratos y mucopolisacáridos; b)pruebas cromatrográficas para la identificación de concentraciones - anormales de aminoácidos y de azúcares en sangre y orina; -- c) Prueba microbiológicas para aminoácidos y azúcares en sangre; y d) pruebas enzimáticas cualitativas. La función prima

ria de todos los procedimientos señalados anteriormente es-de selección, un resultado positivo en cualquiera de las -- pruebas constituye una indicación para la ejecución de estudios bioquímicos confirmatorios. Las grandes ventajas de -- éstos procedimientos son: su sencillez, su facilidad de implementación y bajo costo, características tales que hacen posible la aplicación de éstos métodos a un número elevado-de individuos, con el objeto de tamizar para EIM. La confirmación del diagnóstico de un desorden hereditario se puede-hacer estudiando cuantitativamente las deficiencias enzimáticas en cultivo de fibroblastos de piel, en eritrocitos -- así como en leucocitos aislados. También se emplean estudios enzimáticos en biopsias de tejidos sólidos, (6,8).

Antes de sustentar el planteamiento del problema, motivo de ésta tesis, usaremos como ejemplo la estrategia para el-diagnóstico de los errores innatos del metabolismo del eritrocito, también conocidos con el nombre de eritroenzimopatías hereditarias.

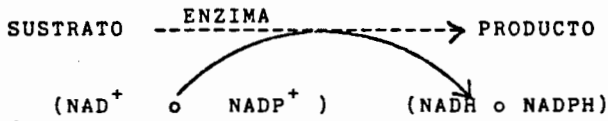
Se han descrito más de 20 diferentes deficiencias hereditarias de enzimas de eritrocito; el fenotipo clínico co-- mún en por lo menos 14 de las eritroenzimopatías heredita-- rias, está caracterizado por la presencia de anemia hemolítica aguda o crónica. En ausencia de información proporcionada por los estudios enzimáticos, es dificil distinguir -- un defecto de otro. La realización de éstos estudios enzimáticos en pacientes con sospecha de eritroenzimopatías aso-- ciadas a síndromes hemolíticos, es laboriosa,. puesto que - es necesario cuantificar por lo menos 14 actividades diferentes de una sola vez para determinar si está presente una de las multiples deficiencias conocidas. Además no compensa la cantidad de tiempo invertido debido a la prevalencia relativamente baja de una eritroenzimopatía particular, (9,10).

Recientemente en 1980 y 1981, en la División de Genética de la Unidad de Investigación Biomédica, del Centro Médico - de Occidente del IMSS, se diseñaron varios procedimientos -- enzimáticos cualitativos (11-13), los cuales usados en combinación con los métodos cualitativos similares descritos -- previamente en la literatura (14-16) permiten la detección - de 9 diferentes eritroenzimopatías hereditarias asociadas -- con anemia hemolítica. Este tipo de metodología facilita -- considerablemente la detección de errores innatos del metabolismo del eritrocito en un número elevado de individuos; -- la mayoría de las muestras darán resultados negativos y por- lo tanto son eliminados de estudios adicionales. En los ca-- sos positivos, se facilita la selección de la metodología -- cuantitativa específica con fines confirmatorios. Las características de ésta metodología cualitativa son tales, que -- por su sencillez, versatilidad y economía pueden llevarse a- la practica en laboratorios con recusos mínimos, (10).

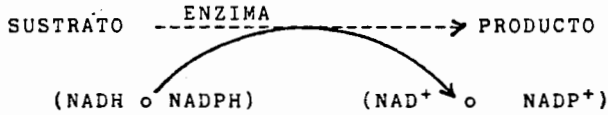
Esta metodología ha sido utilizada en el Centro Médico - de Occidente, en un programa para la detección de eritroenzimopatía hereditarias en pacientes con anemia hemolítica y en recién nacidos con hiperbilirrubinemia, cuyos objetivos son- diagnóstico, prevención y determinación de la frecuencia relativa para evaluar la magnitud como problema médico (17).

En los métodos enzimáticos cualitativos señalados anteriormente se aprovecha la propiedad que tienen los nucleó-- tidos de piridina reducidos (NADH y NADPH) de fluorescer intensamente cuando se activan con luz ultravioleta de onda - larga (14). Los ensayos se basan en la reducción de un nu-- cleótido de piridina oxidado (NAD^+ o $NADP^+$) en unos méto-- todos y, la oxidación de un nucleótido de piridina reducido (NADH o NADPH) en otros.

(Fig. I). Reducción de un nucleótido de piridina oxidado.



Oxidación de un nucleótido de piridina reducido.



El mismo procedimiento general se utiliza en todos los métodos;un volúmen de sangre se agrega a 10 volúmenes de - la mezcla de reacción que contiene el sustrato de la enzima correspondiente, el nucleótido de piridina y un agente-hemolítico (10). Inmediatamente después de la edición de-- la muestra de sangre a la mezcla de reacción, se toma una-alicuota (5 a 10 µl) de la mezcla de incubación y se coloca sobre un papel filtro (tiempo); la mezcla de incubación se introduce en un baño de 37° C y después de períodos de-tiempo específicos para cada método se toman alicuotas adicionales que se colocan sobre el papel filtro. Después de-que se han secado las manchas se examina el papel filtro - en la obscuridad bajo luz ultravioleta de onda larga para-observar la aparición o desaparición de fluorescencia se-- gún el método específico (10).

Existen procedimientos enzimáticos cualitativos de tamizaje por fluorescencia para la identificación de otros - EIM tales como: a) metahemoglobinemia; b) galactosemia por deficiencia de la transferasa o de la epimerasa de la galactosa; c) inmuodeficiencia combinada grave por la deficien-

cia de la enzima adenosina desaminasa y d) hiperargininemia por deficiencia de la enzima arginasa. Por la gravedad del cuadro clínico y por la posibilidad de terapia, la detec-- ción temprana es particularmente importante en las últimas tres enfermedades, (12-23).

JUSTIFICACION

Los Laboratorios de los hospitales de primer nivel - carecen del equipo necesario para la ejecución de estudios enzimáticos cualitativos para el diagnóstico, pronóstico,- control de terapia y evaluación de la enfermedad. Es deseable diseñar metodología enzimática cualitativa de fácil -- implementación y que no requiera de equipo sofisticado.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los estudios enzimáticos cualitativos, no se llevan a cabo en los laboratorios clínicos generales de los hospitales de primer nivel por carecer de la instrumentación necesaria (Espectrofotómetros UV); lo mismo ocurre con -- varios hospitales de segundo nivel. Por ésta razón los -- pacientes tienen que ser derivados a hospitales de nivel- superior.

A semejanza de los procedimientos cualitativos para- la detección de las eritroenzimopatías hereditarias y de- otros errores innatos del metabolismo, es factible diseñar metodología enzimática cualitativa para el diagnóstico de patología tisular, de fácil implementación y que no requiere del uso de espectrofotómetros UV. La función primaria- de ésta metodología sería de selección y únicamente en -- aquellos pacientes con resultados positivos se practica-- rían estudios cuantitativos confirmatorios y otras prue-- bas especializadas.

En la División de Genética de la Unidad de Investigación Biomédica de Occidente se está implementando un es-- tudio piloto a escala de laboratorio cuyo objetivo central es el diseño, estandarización y evaluación de metodología enzimática cualitativa para el diagnóstico de patología - tisular. Varias enzimas comunmente usadas en la practica- médica como auxiliares de diagnóstico de patología tisu-- lar, son potencialmente susceptibles de ser estimadas cualitativamente; éstas enzimas son: la CK, DHL, SORD, TGO,- TGP, FAC, FAL y la ICD.

Capitulo II

OBJETIVO

O B J E T I V O

DISEÑO, ESTANDARIZACION Y EVALUACION DE UN METODO CUALITATIVO POR FLUORESCENCIA PARA LA DETECCION DE INDIVIDUOS CON NIVELES SERICOS ELEVADOS DE ICD, ENZIMA UTILIZADA COMO MARCADOR DE DAÑO HEPATICO AGUDO.

Capitulo III

HIPOTESIS.

H I P O T E S I S

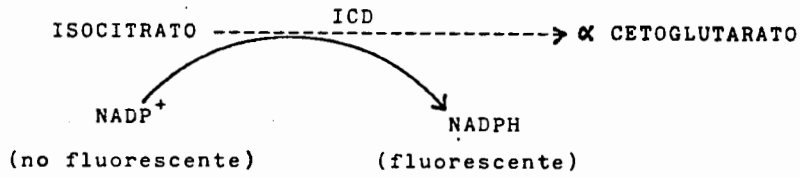
EL METODO CUALITATIVO POR FLUORESCENCIA DE LA ICD PUEDE SER UTILIZADO COMO AUXILIAR DE DIAGNOSTICO - EN LA DETECCION DE DAÑO TISULAR HEPATICO.

Capitulo IV

MATERIAL Y METODOS

MATERIAL Y METODOS.

Principio del método (Fig. 2).- Descarboxilación oxidativa de Isocitrato a α cetoglutarato por la Isocitrato - Deshidrogenasa (ICD).



La presencia de ésta actividad enzimática se estima - visualmente por la reducción de $NADP^+$ (no fluorescente) a- NADPH (Fluorescente) que ocurre cuando se forma α cetoglutarato. Normalmente los niveles séricos de ICD son muy bajos o nulos y en presencia de hepatitis viral o aguda és-- tos se incrementan notablemente. Por lo tanto, en una muestra de suero de un individuo normal no ocurrirá aparición- de fluorescencia o ésta será muy leve; mientras que en un- paciente con daño hepático la flourescencia será muy intensa debido al "escape " o "derrame" de la ICD del hígado a- la circulación.

- Material.- Lámpara de luz ultravioleta manual de onda larga (366 nm), papel filtro Whatman No. 40.

Muestras: se analizaron tres tipos de muestras de suero:

a).- Suero de pacientes con diagnóstico clínico de hepatitis, (n= 5).

b).- Suero de pacientes con niveles séricos elevados de -- Tgo y TGP. En la mayoría de éstos pacientes la impresión diagnóstica fué "en estudio", (n= 28)

c).- Suero de individuos normales; (n= 14)

Los tres diferentes tipos de muestras se obtuvieron de los laboratorios clínicos de los Hospitales de Pediatría de Especialidades del Centro Médico de Occidente y del Hospital Ayala. El diagnóstico o la impresión diagnóstica de cada paciente se obtuvo de la orden de estudios de laboratorio solicitados por el médico tratante.

En los pacientes con diagnóstico de hepatitis aguda se investigó su expediente para certificar dicho diagnostico.

Varias muestras fueron mantenidas a 20° C durante 7 días, y la actividad de ICD fué estimada al 1° y 7° día por el método cualitativo y cuantitativo.

- Reactivos.- Buffer Tris-HCl 0.4 M, pH 7.5; DL-Isocitrato 30 mM; $NADP^+$ 7.5 mM; $MnCl_2$ 20 mM.
- Composición de la mezcla de reacción y procedimiento del método cualitativo flourescente.

Adicionar los siguientes reactivos a dos tubos de ensaye de 13 x 100;

Reactivos:	Volúmen (Microlitros): Problema.	Blanco
Tris-HCl 0.4 M, pH 7.5	10	10
$MnCl_2$ 20 mM	10	10
DL- Isocitrato 30 mM	10	--
$NADP^+$ 7.5 mM	10	10
SUERO	+	+
H_2O cbp	100	100

Inmediatamente después de la adición de la muestra de suero a la mezcla de reactivos, se toma una alicuota (5µl) de la mezcla de incubación y se coloca sobre un papel --- filtro (tiempo 0); se incuban ambos tubos a 37° C durante una hora y cada 10 minutos se toman alicuotas adicionales que se colocan sobre el mismo papel filtro. una vez que se han secado las manchas, se examinan en la oscuridad bajo - luz ultravioleta de onda larga (366 nm) para observar la - aparición de fluorescencia.

La flourescencia se gradúa por cruces, de acuerdo a la SIGUIENTE ESCALA:

-- = Ausencia de Flourescencia.
+ = Fluorescencia Leve.
++ = Fluorescencia de intensidad Media.
+++ = Fluorescencia muy Intensa

La actividad de ICD fué cuantificada por el procedimiento de Wolfson-Williams (5) modificado, para correlacionar los resultados obtenidos, con la fluorescencia resultante en el método cualitativo.

Capitulo V

RESULTADOS Y DISCUSION

RESULTADOS Y DISCUSION

Se pretendían encontrar las condiciones óptimas en las cuales, las muestras de suero de individuos noramles mostraran fluorescencia leve o ausencia de flourescencia a - tiempos de incubación prolongados y las muestras de pacientes con daño hepático a tiempos muy cortos y que fuese muy intensa a tiempos prolongados, de tal forma que la distinción entre los individuos con niveles séricos normales de ICD y los individuos con niveles elevados, fuese muy evi-- dente.

Con éste propósito se estudiaron dos variables:

1.- Efecto de la concentración de la enzima (volúmen de -- suero), contra la velocidad de la reacción (grado de - fluorescencia) en tiempos de incubación determinados.
2.- Velocidad de la reacción (grado de fluorescencia) contra tiempo de incubaci-on.

- Tiempo de incubación de 60 minutos con toma de alicuotas cada 10 minutos.

1.- Efecto de la concentración de la enzima contra velocidad de la reacción.

En varios experimientos se determinó la velocidad de la reacción contra volúmen de suero (10, 20, 30, 40 y 50 µl) de un individuo normal; el tiempo de incubación fué de 60 minutos con toma de alicuotas a los 10, 20, 30 y 60 min. - En todos los tubos sin sustrato (Isocitrato) no apareció - fluorescencia en ninguno de los tiempos de incubación. --- Asimismo, si se omite la adición de suero a la mezcla de - incubación no aparece fluorescencia. Estos resultados indi

can que la aparición de fluorescencia depende de la reacción catalizada por la ICD, ya que requiere del sustrato y de la fuente de enzima (suero). Los resultados representativos del efecto de la concentración de enzima sobre la velocidad de la reacción se muestran en la Tabla 1. Se observaron trazas de fluorescencia a los 60 min. de incubación únicamente con la alicuota de 10 µl.

Basados en éstos resultados se adoptó como alicuota de suero la cantidad de 10 µl.

2.- Velocidad de la reacción contra tiempo de incubación: Se estudiaron una muestra de suero proveniente de un paciente con hepatitis y una nuestra de suero de un individuo normal. Los resultados aparecen en la Tabla 2. Se confirmó lo observado anteriormente; la muestra del individuo normal no fluoresce a los 60 min. de incubación; por su parte la muestra del paciente mostró trazas de flourescencia desde los 10 min. a los 20 la flourescencia era leve, a los 30 min. media y a partir de los 50 min. la fluorescencia era muy intensa.

Si bien desde los 30 min. de incubación son claramente evidentes las diferencias entre el individuo normal y el paciente con hepatitis; si la observación final se realiza hasta los 60 min. la separación entre individuos normales y enfermos es categórica.Como se están tomando alicuotas de la mezcla de incubación cada 10 min., después de una hora se dispone de un registro de 7 puntos por cada muestra.

De acuerdo a los resultados presentados, se establecieron las siguientes condiciones para ser usadas rutinariamente en la estimación cualitativa de la actividad de ICD.

Volúmen de suero de 10 µl; tiempo de incubación -- 60 min.; toma de la alicuota cada 10 min.

Una vez establecidas las condiciones básicas del método cualitativo, se procedió a estimar la actividad de ICD cualitativa y cuantitativamente en las 47 muestras de suero.

De acuerdo a los resultados obtenidos en el método cualitativo, se formaron cuatro grupos representativos -- respecto a la aparición de fluorescencia, Tabla 3.

Todas las muestras de los individuos controles --- (n= 14) quedaron incluídos en el grupo A (ausencia de --- fluorescencia); de las muestras con niveles anormales de transaminasas (n= 28), 14 quedaron incluídas en el Grupo B (ausencia de fluorescencia a fluorescencia leve), 10 -- en el Grupo C (fluorescencia leve a fluorescencia media). y 4 en el Grupo D (fluorescencia media a fluorescencia -- muy intensa); de las muestras de pacientes con hepatitis (n= 5), 3 fueron incluídas en el Grupo C y 2 en el Grupo D.

Es claro que la mayoría de las muestras de los individuos con niveles séricos elevados de transaminasas quedan en los grupos B y C; y las muestras de los individuos con hepatitis en los Grupos C y D.

La fluorescencia a los 60 min. en el método cualitativo para ICD en los cuatro grupos, así como los promedios de las actividades de ICD, TGO y TGP se muestran en la -- Gráfica 1.

Como puede observarse hay una adecuada correspondencia entre el grupo de fluorescencia y la actividad de ICD; a mayor fluorescencia corresponde mayor actividad enzimá-

tica y a la ausencia de fluorescencia corresponden las -- menores actividades de ICD. Esto indica que la aparición- de fluorescencia en el método cualitativo es directamente proporcional a la actividad de ICD. También se puede observar que existe correspondencia entre los niveles de transaminasas Vs. niveles de ICD y grado de fluorescencia.

De acuerdo a los datos mostrados en la Tabla 3, el- método cualitativo dará ausencia de fluorescencia (--)- o fluorescencia leve (+) a niveles séricos de ICD inferiores a 1 nmol/hora/ml de suero; y para niveles séricos- de ICD mayores de 2 nmol/hora/ml de suero la fluorescencia será media (++) o muy intensa (+++). En éste último caso- se encuentran las muestras de los pacientes con hepatitis, en los cuales se encontraron las actividades de ICD mayores.

Recuérdese que la estimación del grado de fluorescencia en el método cualitativo no depende de una sola lectura a los 60 min. de incubación, sino se dispone de una- serie de 7 puntos como registro (0, 10, 20, 30, 40, 50 y- 60 min.) lo que facilita aún más la distinción entre individuos con niveles séricos normales de ICD e individuos - con niveles elevados.

Es muy probable que los pacientes con niveles elevados de transaminasas y de ICD y con ++ y +++ de fluorescencia a los 60 min, en el método cualitativo (Gráfica 1, grupos C y D), tuviesen daño hepático. Sin embargo, como- se mencionó en material y métodos, el diagnóstico anotado en la orden de solicitud de estudios de laboratorio fué- de "en estudio". No se investigó en el expediente de los- pacientes para confirmar la presencia de enfermedad hepática.

Si bien el método cualitativo para ICD distinguió -- inequívocamente a los pacientes con daño hepático y niveles séricos elevados de ICD ($\bar{x}$= > 2.608 nmoles/hora/ml de suero; ++ y +++ de fluorescencia a los 60 min.) de los - individuos normales con niveles bajos de ICD ($\bar{x}$= < 0.902 - nmoles/hora/ml de suero; ausencia de fluorescencia a +) - el número de muestras estudiadas fué reducido. Para validar más ampliamente la utilidad diagnóstica del método -- cualitativo se deberá realizar un estudio piloto a escala de un Hospital, estudio que deberá incluir un apartado -- sobre análisis de costos.

Las muestras de suero mantenidas a -20°C durante -- 7 días, mostraron solamente un 9% de disminución en la actividad de ICD. Estos resultados indican que la enzima es estable por lo menos durante 7 días, cuando el suero se - almacena en congelación.

Los resultados de éste estudio piloto a escala de - laboratorio, sugieren fuertemente que el método cualitativo para ICD puede ser últil como auxiliar de diagnóstico- de enfermedad hepática.

A pesar de que la ICD es una de las pocas enzimas - órgano-específicas, su utilización como auxiliar en el -- diagnóstico de enfermedad hepática aguda es limitada, ésto probablemente debido a que se requiere de una gran cantidad de suero (1 ml) para cuantificar la actividad de - la enzima. Obviamente ésta enzima no se cuantifica en los laboratorios de primer nivel, dado el requerimiento de -- espectrofotómetros de luz UV. En el método cualitativo -- para ICD solamente se requiere de 20 microlitros de suero (10 para el problema y 10 para el blanco) y en lugar de - un espectrofotómetro se requiere de una lámpara manual de

luz ultravioleta de onda larga (366 nm).

Finalmente, debe señalarse que los tejidos de mamíferos contiene dos ICD distintas; la ICD-NAD^+ dependiente (E.C.1.1.1.41) la cual es una enzima alostérica y la ICD-$NADP^+$ dependiente (E.C.1.1.1.42) la cual es una enzima no regulatoria. La localización subcelular de la enzima NAD^+ dependiente es mitocondrial, en tanto que hay dos enzimas $NADP^+$ dependiente: una se encuentra en la mitocondria y la otra en el citosol. El gen que codifica para la isoenzima mitocondrial ha sido asignado al cromosoma 15 y aquel que codifica para la ICD soluble al cromosoma 2 (24).

TABLA 1.- Efecto de la concentración de enzima contra la velocidad de la reacción.

TIEMPO (minutos)	CONCENTRACION DE ENZIMA. (volúmen de suero, microlitros)					
	0	10	20	30	40	50
0	--	--	--	--	--	--
10	--	--	--	--	--	tr
20	--	--	--	tr	+	++
30	--	--	tr	+	++	++
60	--	tr	+	++	++	+++

tr= a trazas de fluorescencia

TABLA 2.- Velocidad de la reacción contra tiempo de incubación (en un individuo normal y en un paciente con hepatitis)

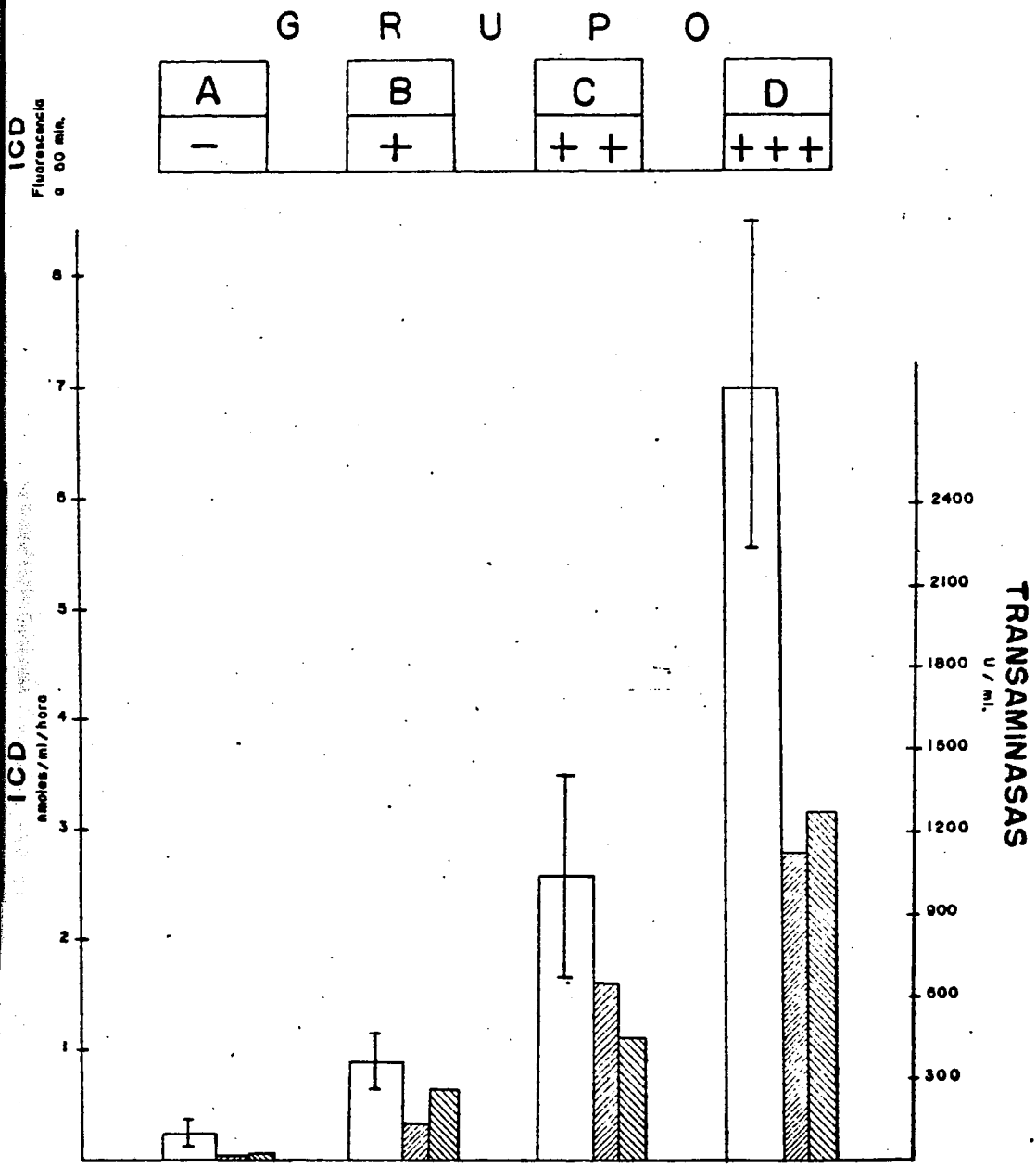
TIEMPO. (minutos)	NORMAL	PACIENTE.
0	--	--
10	--	tr
20	--	+
30	--	++
40	--	++
50	--	+++
60	--	+++

- Volúmen de suero = 10 µl

TABLA 3 .- Grupos representativos de acuerdo a la aparición de fluorescencia en el método cualitativo para ICD.

GRUPO	FLUORESCENCIA						
	0	10	20	30	40	50	60min.
A	--	--	--	--	--	--	--
B	--	--	--	tr	tr	tr	+
C	--	--	tr	tr	+	++	++
D	--	+	++	++	++	+++	+++

GRAFICA 1



ICD	$\bar{X}$ = 0.240	0.902	2.608	7.057
TGO	$\bar{X}$ = 20	143	646	1116
TGP	$\bar{X}$ = 21	268	456	1274

Capitulo VI.

CONCLUSIONES

C O N C L U S I O N E S

1.- Se diseño un método cualitativo por fluorescencia para evaluar la actividad de ICD. La intensidad de fluorescencia fué directamente proporcional a la actividad de la enzima, y para que ocurra aparición de fluorescencia se requiere - la presencia del sustrato (isocitrato) y la fuente de enzima (suero).

2.- Se determinaron las condiciones óptimas para la ejecución del método cualitativo, el cual únicamente requiere - de 20 microlitros de suero y de un período de incubación - de 60 min.

3.- El método cualitativo distinguió inequívocamente a los pacientes con daño hepático de los individuos normales.

4.- Los pacientes con niveles séricos elevados de transaminasas y de ICD mostraron las fluorescencias más intensas - en el método cualitativo.

5.- Los individuos con niveles séricos normales de ICD no-mostraron aparición de fluorescencia.

6.- Los resultados presentados sugieren fuertemente que el método cualitativo por fluorescencia para ICD puede ser -- utilizado como auxiliar de diagnóstico de daño hepático a-gudo.

7.- Los beneficios potenciales del uso de éste método son:
a) Elevar la calidad de los servicios auxiliares de diag-- nostico en los hospitales de primer nivel.
b) Reducir el traslado de pacientes a los hospitales de nivel superior.
c) Optimizar la selección de los estudios cuantifativos con firmatorios.

d) Optimizar el uso de recursos (reactivos y equipo) para-
diagnóstico enzimático.

Capitulo VII.

BIBLIOGRAFIA

(1) Roberts, R. Creatine Kinase Isozymes as Diagnostic and Prognostic Indices of Myocardial Infarction. En: Isozymes: Current Topics in Biological and Medical Research. - - Rattazzi M. C., Sandalios J. G., whitt G.S.(eds). Alan- R. Liss, Inc. New York. Vol. 3. 115-154. 1979.

(2) Latner, A. L. Clinical Biochemistry. W. B. Saunders Company, Philadelphia. 1975 .

(3) Market, C.L. Isozymes: The Development of a Concept and Its Application. En: Isozymes: Current Topics in Biological and Medical Research. Rattazzi M. C., Scandalios- J. G., whitt G. S. (eds). Alan R. Liss, inc. New York - Vol. 1. 1-17. 1977.

(4) Harris, H. The Principles of Human Genetics. Amsterdam. North-Holland. 422. 1980.

(5) Herny, R.J., Cannon D.C., winkelman J. W., Clinical -- Chemistry: Principles and Technics. Second Edition. -- Harper and Row. Maryland 815-1002. 1974.

(6) Rosenberg, L. E. Inborn Errors of Metabolism. En: Metabolic Control and Disease. Bondy P. K., Rosenberg L. E. (eds). W. B. Saunders. Philadelphia. 1980.

(7) Stanbury, J. B. Inborn Errors of Metabolism in the 1980s En: The metabolic Basis of Inherited Disease. Stanbury- J. B., Wyngaarden J. B., Fredrickson D. S., Goldstein - J. L., and Brown M. S. (eds) Mc. Graw Hill. New York -- 1983.

(8) Shih, V. E. Laboratory techniques for the Detection Of- Hereditary Metabolic Disorders C. R. C. Press. Cleve-- land. 1973.

(9) Vaca, G., Velázquez A. L., Cantú J. M. Las eritroenzimopatías Hereditarias I. Aspectos Bioquímicos y Genéticos Bol. Of. Sanit. Panam. 97 (3). 1984.

(10)Vaca, G., Velázquez A. L., Cantú J. M. Las eritroenzimopatías hereditarias II. Métodos y Procedimientos de-Tamizaje. Bol. of. Sanit. panam. 97 (4), 1984.

(11)Vaca, G., Sánchez-Corona J., Olivares N., Medina C., - Cantú J. M. A Simple Sreening Procedure for Andenilato Kinase, Hexokinase and Glucosa-6-Phosphate Dehydrogenase Deficiencies. Ann. Genet. (París). 23 (3): 190--193. 1980.

(12)Vaca, G., Wunsch C., García-Cruz D. et. al A Screening test for Phosphoglycerate Kinase Deficiency. Ann.Genet. (París) 24 (3): 191-192. 1981.

(13)Vaca, G., Medina C., Wunsch C., et. al. A simple Screening Procedure for Glucose-Phosphate Isomerase, Phosphofructokinase, Aldolase, and Gliceraldehyd-3-phosphate-dehydrogenase deficiencies Ann. Genet. (París). 24 (4): 251-253. 1981.

(14)Beutler, E. A series of New Screening procedures for - pyruvate Kinase Deficiency, Glucose-6-phosphste dehy--drogenase Deficiency, and Glutathione Reductase Defi--ciency, Blood 28: 553-562. 1966.

(15)Kaplan, J. C., Shore N., Beutler E., The Rapid Detection of Triose Phosphate Isomerase Deficiency. Am. J. Clin. Pathol. 50: 656-658. 1968.

(16)Blume, K. Beutler E. Detection of Glucose-phosphate -- Isomerase Deficiency by a Screening Procedure. Blood - 39: 685-687. 1972.

(17)Vaca, G., Ibarra B., Hernández A., et. al Screening for Inborn Errors of the Erythrocyte Metabolism in Northwestern México. Acta. Anthropogenet. 6 (4): 255-264. 1982.

(18)Kaplan, J. C., nicolás A. M., Hanzlickova-Leroux A., -- Beutler E.A. Simple Spot Screening Test for Fast Detection of Red Cell NADH-Dia-forase Deficiency. Blood 36:- 330-333. 1970.

(19)Beutler, E., Baluda M. C. A simple Spot Screening Test- for Galacto-semia. J. Lab. Clin. Med. 68: 137-141.1966.

(20)Vaca, G., Sánchez-Corona J., Olivares N., et. al. A Simple Assay for Uridine Diphosphate Galactose 4 Epimerase Activity. Ann. Genet. (París) 23: (2) 126-128. 1980.

(21)Naylor, E. W., Orfanos A.P., Guthrie R., an Improved -- Screening Test for Adenosine Deaminase Deficiency. J.-- Pediatr. 93 (3): 473-476. 1978.

(22) Vaca, G., Sánchez-Corona J., Olivares N. et. al. A Simple Rapid fluorescent Assay for Adenosine Deaminase -- Activity. Ann Genet. (París). 22(3): 182-184. 1979.

(23)Naylor, E.W., Orfanos A.P., Guthrie R. a Simple Scree-- ning Test for Arginase Deficiency (Hyperargininemia).-- J. Lab. Clin. Med. 89: 876-880. 1977.

(24)Rattazzi, M. C., Scandalios J. G., Whitt G.S. Isozymes: Current topics In Biological and Medical Research. vol. 2 Alan R. Liss, Inc. New York. 1977

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA
Facultad de Ciencias

Expediente .....
Número 698/85

Srita. María Guadalupe Ramírez Dueñas
P r e s e n t e . -

Manifiesto a usted que con esta fecha ha sido - aprobado el tema de Tesis "Detección de daño tisular hepá_ tico mediante la enzima isocitrato deshidrogenasa" para ob tener la Licenciatura en Biología con Orientación Biomédi_ ca.

Al mismo tiempo informo a usted que ha sido - aceptado como Director de dicha Tesis el Dr. Carlos Asten_ go Osuna.

FACULTAD DE CIENC 'S

A T E N T A M E N T E
"PIENSA Y TRABAJA"
Guadalajara, Jal., Diciembre 3 de 1985
El Director

Ing. Edmundo Ponce Adame.

El Secretario

Arq. Mario Patricio Castillo Paredes.

c.c.p. El Dr. Carlos Astengo Osuna, Director de Tesis.-Pte.
c.c.p. El expediente de la alumna.

'mjsd

Al contestar este oficio sírvase citar fecha y número

BOULEVARD A TLAQUEPAQUE Y CORREGIDORA, S. R., GUADALAJARA, JAL. TELEFONOS 17-58-29 Y 17-48-17

HAGO CONSTAR LAS OBSERVACIONES AQUI REALIZADAS.

Vo. Bo.

DR. CARLOS ASTENGO OSUNA.
DIRECTOR DE TESIS.