

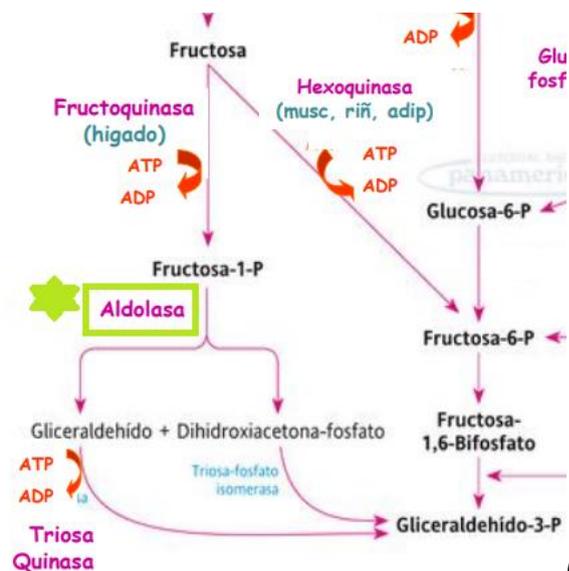
ALDOLASA

La aldolasa es una enzima de la glucólisis que cataliza el paso de fructosa-1,6-bisfosfato a dihidroxicetona fosfato y gliceraldehído-3-fosfato por hidrólisis de la fructosa; y en la gluconeogénesis cataliza el paso contrario.

Se trata de un tetrámero con subunidades que están codificadas por distintos genes, que pueden dar lugar a tres isoenzimas distintas:

1. Aldolasa A: tetrámero A4, que se expresa en la mayoría de los tejidos, pero predomina en el músculo.
2. Aldolasa B: tetrámero B4, que se expresa principalmente en el hígado.
3. Aldolasa C: tetrámero C4, que se da en el cerebro.

Como recordaréis del tema de metabolismo de glúcidos, la aldolasa también participa en el paso de fructosa-1-P a gliceraldehído y dihidroxiacetona-P. Esta reacción solo puede ser catalizada por la isoenzima B, la A y la C no puede llevar a cabo esta reacción, en cambio la B es inducible por la dieta y tiene una actividad similar para esta hidrólisis y para la de la fructos-1,6-bisfosfato.



(la que interesa es la reacción de la aldolasa, si la ponemos en la pizarra mejor porque dudo que a gente se acuerde de esto que es del tema 2 jeje)

La primera de las isoenzimas es la que se usa normalmente para la detección de patologías musculares, gracias a una detección que vamos a explicar ahora después.

INCREMENTO ACTIVIDAD ALDOLASA: Los valores de referencia de la aldolasa son:

- * **3.4/11.8, para niños entre 0 y 2 años**
- * **1.2/8.8, para niños de 2 a 10 años**
- * **< 7.5 a partir de los 10 años**

Estos niveles se pueden ver incrementados por distintas patologías que conllevan la destrucción de las células de los tejidos afectados:

- Enfermedades hepáticas, como la hepatitis aguda, necrosis hepáticas provocadas por distintas enfermedades, o metástasis de las células hepáticas.
- Infarto de miocardio
- Quemaduras
- Enfermedades del músculo esquelético de origen no neurológico, como por ejemplo rabdomiolisis, que consiste en la descomposición del tejido muscular que ocasiona la

liberación de los contenidos de las fibras musculares en la sangre. Estas sustancias son dañinas para el riñón y con frecuencia causan daño renal.

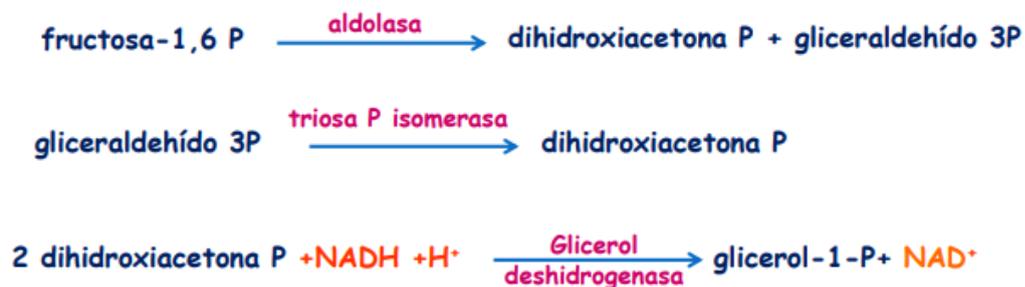
Otros ejemplos son los traumatismos musculares, la triquinosis (enfermedad parasitaria) o la dermatomiositis, que es una enfermedad del tejido conectivo, caracterizado por inflamación de los músculos y de la piel. Su causa es desconocida, pero puede resultar de una infección viral o una reacción autoinmune.

DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ALDOLASA

La actividad aldolasa puede medirse en suero o plasma, evitando muestras hemolizadas, ya que en el interior de los hematíes la concentración de aldosa es 10 veces mayor que la sérica. Por este motivo también hay que evitar conservar la muestra sin separar el suero del coágulo, ya que se libera aldosa desde el interior de los hematíes y puede incrementarse hasta un 50% respecto al suero separado, luego igual que en el caso anterior tendríamos falseados los resultados de la determinación.

La determinación se basa en una serie de reacciones acopladas, que llevan finalmente a un consumo de NADH, el cual podemos medir a una absorbancia de 340nm y relacionarlo con su concentración.

Las reacciones son las siguientes:



Esta determinación es cada vez menos utilizada en los laboratorios, ya que está siendo sustituida por la determinación de la CK, que es una enzima mucho más específica del músculo esquelético, luego para la detección de lesiones musculares es más precisa.

A pesar de ello, la detección conjunta de ambas es útil dado que la determinación de un incremento en la concentración de aldolasa también es indicadora de las patologías que hemos nombrado anteriormente.

α -amilasa

La α -amilasa es una enzima que hidroliza a intervalos aleatorios los enlaces glucosídicos α -1,4 del almidón, glucógeno y otros polisacáridos y produce cadenas de polisacáridos con enlaces α -1,6 de glucosa, maltosa, isomaltosa y oligosacáridos. Es una metaloenzima que requiere Ca^{2+} y cuyo pH óptimo es 6,9-7.

Existen dos isoenzimas codificadas por dos genes diferentes del cromosoma 1. La isoenzima S se expresa fundamentalmente en las glándulas salivales y la isoenzima P en el páncreas. También existe cierta actividad amilasa en otros tejidos, como intestino, testículos, ovarios, trompas de Falopio, pulmón, músculo y tejido adiposo. Tiene un bajo peso molecular, entre 54 y 62 kDa.

La principal causa de hiperamilasemia suele ser una alteración pancreática, como la pancreatitis aguda. En ella se produce una liberación importante de la isoenzima P y se genera un incremento de la actividad de más de tres veces el límite de referencia.

Otras causas de hiperamilasemia son

1. Parotiditis, debido a un incremento sérico de la isoenzima S. Popularmente denominada paperas, es una enfermedad contagiosa que puede ser aguda o crónica, localizada fundamentalmente en una o ambas glándulas parótidas, que son glándulas salivales mayores ubicadas detrás de las ramas ascendentes de la mandíbula.
2. Alteraciones gastrointestinales, como infarto mesentérico, úlcera péptica, gastritis, apendicitis aguda y peritonitis.
3. Abuso de ciertas drogas, como los opiáceos, que pueden contraer el esfínter de Oddi.
4. Intoxicación aguda de alcohol.
5. Embarazo ectópico, salpingitis, enfermedad renal, cetoacidosis diabética, cirugía cardíaca y tumores.

La amilasa, sobre todo la isoenzima S, puede formar complejos de elevado peso molecular con las inmunoglobulinas A o G, lo que enlentece su aclaramiento y provoca una situación llamada macroamilasemia. En ella, la actividad amilasa en el suero puede estar varias veces por encima del límite de referencia, pero sin enfermedad asociada. Sin embargo, puesto que la macroamilasa no filtra en el riñón, su actividad en la orina no aumenta. La macroamilasemia puede ser incluso la causa del 5 % de los casos de elevación de amilasa.

DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD α -AMILASA

Existen diversos métodos para determinar la amilasa. Entre los más usados están:

1. **Sacarogénicos:** miden la aparición de la glucosa producida en la reacción mediante reacciones enzimáticas acopladas.
2. **Cromogénicos o de fluorescencia:** miden el incremento de color o la fluorescencia por un compuesto que se libera en la hidrólisis de un sustrato.

El límite de referencia depende notablemente del método por lo que la International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (IFCC) recomienda el método directo, que está basado en la hidrólisis de 2-cloro-4-nitrofenil- maltotriosa a 37°C formando 2-cloro-4-nitrofenol, que se monitoriza cinéticamente y es proporcional a la actividad enzimática. El límite de referencia de la α -amilasa sérica a 37°C es de 220 U/L. La determinación se puede realizar en plasma heparinizado o en suero, pero no en plasma anticoagulado con EDTA, ya que quela el Ca²⁺ necesario para la actividad amilasa.

Aparece en la orina, ya que, debido a su bajo peso molecular puede filtrarse en el glomérulo renal y no se reabsorbe en los túmulos. De hecho, es la única enzima cuya determinación en la orina tiene utilidad en la práctica clínica habitual. Se utiliza principalmente para el diagnóstico y la monitorización de pancreatitis agudas, aunque también de pancreatitis crónicas u otras enfermedades pancreáticas.

GAMMA-GLUTAMILTRANSFERASA

Es una enzima que interviene en la transferencia de restos de gamma-glutamilo desde el glutatión a péptidos y aminoácidos para su transporte o agua (en hidrólisis), también juega un papel importante en vías de desintoxicación de drogas y xenobióticos.

El glutatión se une al aceptor que será un aminoácido, dando lugar a cisteinilglicina y un aceptor-glutamilo.

Esta enzima se encuentra en numerosos tejidos, estando en las membranas de las células con una alta capacidad absorbente o secretora, por ejemplo en el hígado, túbulo renal, páncreas e intestino. En las células del conducto biliar abunda en microsomas hepáticos (son los organelos de este órgano que catalizan las transformaciones metabólicas) y en la membrana plasmática, donde participa en el transporte de aminoácidos, transfiriendo gamma-glutamilo desde el glutatión hasta el aminoácido (imagen de la primera diapositiva de esta enzima)

La enzima en suero es heterogénea con relación a la carga y el tamaño. Esta enzima circula asociada con transportadores, como albúmina o alfa y beta- lipoproteína.

Ya que se encuentra en el hígado entre otros lugares, si el valor de enzima es normal, la probabilidad de tener el hígado sano es muy alta.

El test serológico es más sensible y precoz cuando se diagnostica alcoholismo ya que su actividad se ve incrementada con el consumo de alcohol. Se emplea como marcador de cumplimiento en la retirada del consumo de alcohol, ya que los valores disminuyen a la mitad en unas dos semanas y vuelven al intervalo de referencia en 6-8 semanas.

Esta enzima aumenta en el suero cuando hay enfermedades hepatobiliares, Al estar elevada en conjunto a la fosfatasa alcalina, el diagnóstico orienta altamente a enfermedad de la vía biliar. **Ya que esta enzima se encuentra en la membrana del hígado, es un marcador de colestasis, esto es que se detiene el flujo de bilis hacia el duodeno ya sea por acumulación o por que no se produzca suficiente bilis, entonces en este caso la enzima se va a encontrar en 30 veces su valor de referencia por esa acumulación de bilis.**

SU ACTIVIDAD SE VE INCREMENTADA TAMBIÉN POR OTRAS CAUSAS.

- Enfermedad pancreática: pancreatitis que es la inflamación del páncreas también relacionado por un uso abusivo de alcohol, que veremos como también incrementa la actividad de la enzima por el consumo de alcohol.
- infarto de miocardio, fallo renal por cálculos biliares, diabetes mellitus, obesos...
- Consumo habitual de alcohol: la GGT también se eleva posterior al consumo excesivo de alcohol. Elevaciones aisladas o desproporcionadas en comparación con el aumento del resto de otras enzimas hepáticas puede indicar el abuso de alcohol o hepatitis alcohólica. El aumento puede permanecer incluso 3-4 semanas después de la ingesta. El alcohol puede aumentar ya sea la síntesis de GGT vía microsomal o la salida de la enzima directamente desde los hepatocitos.
- Aumenta con el tratamiento de antiepilépticos, como la fenitoína o el fenobarbital, que provocan la síntesis de enzimática y afectan a los microsomas; antidepresivos, hormonas como la testosterona.

Como podemos ver es una enzima con alta sensibilidad pero es muy poco específica porque su actividad se ve incrementada en varias enfermedades o alteraciones.

DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA GAMMA GLUTAMILTRANSFERASA

Es una enzima muy estable en sangre y mantiene su actividad en muestras refrigeradas a 4°C durante un mes. Su actividad disminuye tras la ingesta, por lo que es recomendable que la extracción se realice en ayunas.

La enzima cataliza la transferencia del residuo de gamma-glutamil desde gamma-glutamil-3-carboxi-4-nitroanilida a la glicilglicina, formando gamma- glutamil-glicilglicina y 5-amino-2-nitrobenzoato. La velocidad de formación de 5- amino-2-nitrobenzoato es proporcional a la actividad de la GGT presente en la muestra y se puede medir cinéticamente a 410 nm.

(Dos últimas gráficas de la ultima diapositiva de esta enzima)

En la primera gráfica se representa una hepatitis vírica, donde aparecen diferentes enzimas que incrementan su límite de referencia conforme pasa el tiempo, podemos ver como la ALT que es la amino transferasa, ya que es la que se encuentra en mayor concentración en el hígado, cuando hay una lesión en el hígado esta enzima se libera a la sangre y aparece elevada en los análisis, aumentando sobre todo en las dos primeras semanas, también la aspartato aminotranferasa, pero en menor medida, al igual que la gamma-gt y la ALP.

En cambio en la colestasis intrahepática podemos ver como aparece en mayor cantidad la gamma-gt y la ALP ya que estas son más específicas en esta alteración como hemos dicho anteriormente, en cambio las otras dos enzimas disminuyen su concentración conforme pasa el tiempo.

Lactato deshidrogenasa (LDH)

Es una enzima de elevado peso molecular (134kDa) que cataliza la conversión reversible de piruvato a lactato



Tiene una estructura de tetrámero formada por dos subunidades codificadas por genes diferentes H y M, de la combinación de estas dos subunidades se generan cinco isoenzimas, que se enumeran por su velocidad en la migración electroforética (LD-1 es la que más migra, le siguen LD-2, LD-3, LD-4, LD-5):

- LD-1 (H4): En tejidos aeróbicos como el corazón y eritrocitos (en suero: 17-31%) se inhibe por piruvato

¿Por qué la LD-1 se inhibe por piruvato?

Cuando hay altas concentraciones de piruvato, este, inhibe a LD-1 para que no se acumule lactato y así evitar que el musculo cardiaco este trabajando continuamente produciendo fatiga muscular, mientras que con LD-5 ocurre el caso contrario, ya que el lactato que se acumula pasa a glucosa y está a glucógeno para almacenarla y usarla cuando se necesite.

- LD-2 (H₃M): leucocitos (en suero un 35-48%)
- LD-3 (H₂M₂): Pulmón (en suero un 15-28%)

- LD-4 (HM₃): Riñón y páncreas (en suero un 5-9%)
- LD-5 (M4): tejidos anaeróbicos como el musculo esquelético y el hígado (en suero un 4-10%) no se inhibe por piruvato

Se encuentra en el citoplasma de todas la células del organismo y posee una actividad 500 veces superior a la del plasma, por lo que una pequeña lesión incrementa su concentración sérica, lo cual indica una necrosis celular. Debido a su amplia distribución celular, su elevación es inespecífica y ocurre en lesiones cardiacas, hepáticas, musculares, renales...etc.

La LDH suele cambiar a las formas más anaeróbicas en tumores, con un predominio de la LD-5, por lo que en la leucemia linfoblastica aguda se observa niveles elevados de LDH y en melanoma, que indica que el tumor se ha extendido rápidamente.

En la anemia hemolítica debido a que la rotura de los eritrocitos liberan LDH, se produce un aumento de su concentración en sangre.

En infarto de miocardio se utiliza la determinación de LDH mediante una relación de las isoenzimas LD-1/LD-2, si se produce un aumento de la LD-1 haciendo que el resultado sea mayor a 1 indica que el tejido cardiaco se está necrosando, pero esta determinación hoy en día está obsoleta y se utiliza la determinación de las **troponinas cardioespecificas**:

- Es un complejo que contiene 3 subunidades (C, T, I,) la T e I son proteínas que se encuentran casi exclusivamente en el miocardio y que se secretan cuando el miocardio resulta dañado, como ocurre en el infarto de miocardio, mediante una muestra de sangre se puede determinar los niveles de troponina T, cuanto más daño se produzca en el corazón, mayor serán los niveles de troponina T.

DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DE LA LDH

Casi todos los métodos de determinación de LDH se basan en la monitorización de la cinética de conversión entre NAD⁺ y NADH a 340 nm.

Puesto que la actividad de la enzima en los hematíes es 100 veces la del suero, para la determinación de la LDH, deben tomarse precauciones especiales contra la hemolisis en la extracción de la sangre y la separación de suero.

- Altos niveles de LD-1: en infarto de miocardio
- Altos niveles de LD-5: en tumores abdominales, tumores pulmonares y metástasis hepáticas.

¿Por qué aumenta la LD-5 en estos casos?

La LDH cambia a formas anaeróbicas en tumores produciéndose un aumento de LD-5 que es la isoforma que predomina en tejidos anaerobios, por ello un aumento de LD-5 es un indicador de tumores, mieloma y leucemia linfoblastica aguda.

Determinación de isoenzimas por electroforesis:

Se realiza mediante una electroforesis típica que se usa para realizar un proteinograma, tras la electroforesis se revela para observar el resultado y a partir de esta, si hay algún isoenzima de interés, se puede coger la fracción de LDH que se desee y determinar su cantidad enzimáticamente.

Determinación de la actividad de LDH

Se basa en la reacción que llevan a cabo con el lactato que produce NADH, el cual, a su vez, reduce el nitroazul de tetrazolio (NBT) en presencia de metosulfato de fenacina, y forma un precipitado de azul formazán. El precipitado resultante es directamente proporcional a la actividad enzimática de la LDH.



Lipasa (LPS)

La lipasa pancreática es una enzima que hidroliza los ésteres de glicerol y triglicéridos (grasas ingeridas en la dieta) para producir ácidos grasos y un monoglicérido, moléculas más fáciles de absorber. Es secretada principalmente por el páncreas, aunque también se secreta por el tejido adiposo y la mucosa intestinal en mucha menor proporción. Por esta razón, la actividad lipasa se utiliza en el diagnóstico de pancreatitis aguda.

La **pancreatitis aguda** es la inflamación e hinchazón del páncreas debido a que las enzimas digestivas que produce (α -amilasa y lipasa) se acumulan dentro y se activan, digiriendo el tejido pancreático. En esta enfermedad, la actividad de la lipasa se eleva 5 veces por encima del límite superior de referencia dentro de las 24-48 horas del comienzo del ataque y permanece elevada unos 5 o 7 días. Este incremento tiene una sensibilidad del 94% y una especificidad del 96% en el diagnóstico de la pancreatitis, por lo que es un método muy fiable.

(En el gráfico se observa la evolución de la actividad de la α -amilasa y de la lipasa en un paciente con pancreatitis aguda. Se puede ver que la actividad de la lipasa está mucho más elevada que la de la α -amilasa al inicio de la enfermedad y sigue permaneciendo más elevada de lo normal durante los días posteriores, mientras que la de la α -amilasa vuelve a sus valores normales muy pronto. Por eso se hace el diagnóstico con la lipasa.)

La actividad lipasa también se incrementa con la **morfina y sus derivados** porque estas sustancias producen un espasmo del esfínter de Oddi, una válvula muscular que rodea la salida del conducto biliar y del conducto pancreático al duodeno. Normalmente está cerrado y se abre en respuesta a comida para que los jugos digestivos puedan entrar en contacto con el alimento y pueda empezar la digestión. Al producirse el espasmo se abre y sale el jugo pancreático que contiene lipasa, por eso se aumenta su actividad.

Tal y como ocurre con la amilasa, la lipasa se filtra en el glomérulo renal, pero, a diferencia de ella, se reabsorbe posteriormente en los túbulos, por lo que no se excreta en la orina. Los pacientes **con insuficiencia renal** (los riñones no son capaces de filtrar adecuadamente las toxinas y otras sustancias de desecho de la sangre) pueden manifestar una actividad lipasa elevada, hasta dos veces el límite de referencia al no filtrarse bien la sangre (todavía queda lipasa) y tampoco excretarse en la orina.

Determinación de la actividad lipasa

Uno de los métodos menos laboriosos y automatizable para la determinación de la actividad lipasa consiste en una serie de reacciones empezando por una llevada a cabo por la enzima lipasa hasta obtener al final un compuesto que se detecta mediante espectrofotometría.

Un diglicérido se hidroliza mediante la acción de la *lipasa* para obtener un *monoglicérido* y un ácido graso. Este monoglicérido se vuelve a hidrolizar por la *monoacilglicérido lipasa* para obtener *glicerol* y otro ácido graso. El glicerol reacciona con una molécula de ATP en una reacción catalizada por la enzima *glicerolcinasa*, obteniéndose *glicerol-3-P* y ADP. El glicerol-3-P en presencia de oxígeno reacciona mediante la *glicerol fosfato oxidasa* dando dihidroxiacetona-P y *peróxido de hidrógeno*. Una molécula de 4-aminoantipirina reacciona con el peróxido de hidrógeno mediante una *peroxidasa*, formando agua y *quinonimina*, un compuesto coloreado que se detecta espectrofotométricamente. Esta última reacción se conoce como *reacción de Trinder* y se utiliza también en otras determinaciones, como la glucosa sérica. Siempre consiste en la oxidación de un compuesto indicador con peróxido de hidrógeno obtenido en reacciones anteriores para generar una quinona coloreada, en este caso quinonimina. Como la quinonimina se ha obtenido gracias a una cascada de reacciones que empezaron con una hidrólisis catalizada por la lipasa, y son estequiométricamente equivalentes, conociendo la absorbancia de este compuesto conoceríamos la de lipasa y por tanto su concentración.

