

REVISTA CLÍNICA ESPAÑOLA

Depósito Legal M. 56 - 1958.

Director: C. JIMENEZ DIAZ. Secretarios: J. DE PAZ y F. VIVANCO
REDACCION Y ADMINISTRACION: Antonio Maura, 13, MADRID. Teléfono 22 18 29

TOMO LXXIII

15 DE JUNIO DE 1959

NUMERO 5

REVISIONES DE CONJUNTO

LOS ENZIMAS EN EL DIAGNOSTICO CLINICO

F. GARCÍA FERRÁNDIZ (*)

y

F. MAYOR ZARAGOZA (**)

Doctores en Farmacia del Departamento de Bioquímica
del Instituto Español de Fisiología y Bioquímica.
Madrid.

Consideramos innecesario insistir sobre la importancia de los enzimas como sistemas rectores y administrativos del metabolismo. El lector que consulte asiduamente la bibliografía bioquímica actual se habrá dado perfecta cuenta de que el porcentaje de publicaciones que directa o indirectamente se refieren a los enzimas es de una superioridad abrumadora en número e interés. Este trabajo, uniéndose a los aparecidos recientemente en España sobre temas relacionados^{1, 2}, reúne los datos que hemos considerado sobresalientes acerca de la importancia actual y previsible de los enzimas en el campo del diagnóstico clínico. Cuando se conozca la etiología última de los fenómenos patológicos y las condiciones reales de los estados normales, la trascendencia de estos agentes catalíticos que dan tono a las reacciones bioquímicas, que dinamizan los componentes del organismo, tendrá la luz propia de lo que es base y fundamento. Es lógico que, siguiendo las etapas normales de prospección, la Enzimología haya ocupado el primer plano, sustituyendo a la Fisiología, la cual, a su debido tiempo, sustituyó a la Anatomía. Nada es menos importante, pero lo último en tiempo pasa a ser lo primero en lugar.

Si se piensa en las circunstancias fisicoquímicas que deben concurrir para la actividad fisiológica de los enzimas, en que las vitaminas y oligoelementos son componentes de los fermentos, y que las hormonas son efectores de su acción, se comprenderá que, prácticamente, todo estado patológico es consecuen-

cia de una alteración de la función enzimática normal y todo tratamiento terapéutico eficaz es el que restablece las condiciones biológicas adecuadas.

La Química-Clinica podríamos definirla como aquella parte de la ciencia analítica que estudia las anomalías químicas provocadas por un agente patógeno.

La expresión de PETERS de *lesión bioquímica* ha aportado a la Patología General un concepto nuevo. Como señalan JAYLE y SCHAPIRA³ expresa la idea de que los trastornos patológicos pueden desencadenarse por alteraciones bioquímicas de los tejidos. Se distinguen dos categorías: las que son primarias o patogénicas se sitúan al nivel de la estructura molecular de los tejidos donde interesan preferentemente a los enzimas y sistemas enzimáticos; representan la forma submicroscópica de la lesión anatómica. Las lesiones bioquímicas, secundarias a las precedentes, son anomalías que provienen de la alteración en el funcionamiento de un fermento, lo que da lugar a que la reacción que él cataliza normalmente esté disminuida, bloqueada o desliada; esto puede acarrear la ruptura de un equilibrio normal, que modifica las cantidades de ciertos metabolitos, haciendo aparecer unos o desaparecer otros.

El que la anatomía química del medio interior pueda ser desviada de sus normas y, por tanto, que la lesión bioquímica sea accesible al análisis clínico, es de la mayor importancia para el diagnóstico, debiendo considerar la posibilidad de que esas variaciones repercutan en los enzimas mismos existentes en los tejidos del organismo en general y del tejido sanguíneo en particular, así como en los líquidos de secreción y excreción y, muy especialmente, entre estos últimos, en la eliminación urinaria.

Múltiples son las causas que pueden determinar la llamadas lesiones bioquímicas, pues si bien son siempre patógenas, su naturaleza puede ser genética, química, física, microbiana, parasitaria, etc.

La ausencia de un gene, por ejemplo, tiene como consecuencia la pérdida de facultad de la síntesis citoplasmática del biocatalizador que le corresponde. Si se trata de una desmolasa se puede romper o aminorar la eficacia de una cadena metabólica, lo que se traduce en la aparición de una sustancia anor-

(*) Becario del Patronato "Santiago Ramón y Cajal".

(**) Becario del Patronato "Juan de la Cierva".

mal o en la desaparición de un compuesto habitual (albinismo, porfirias congénitas, cistinosis, etc.).

Las enzimopatías congénitas o estados disenzimáticos congénitos ocupan, en efecto, un lugar de especial trascendencia entre los problemas teratológicos. La oligofrenia fenil-pirúvica, alcaptonuria, galactosemia o enfermedad de Kalckar, tesaurosismos, hiperlipemia esencial, uricemia idiopática, etc., son ejemplos de defectos enzimáticos congénitos que pueden dar clara idea del volumen e interés de este capítulo.

Las llamadas *enfermedades moleculares de Pauling* son consecuencia de una anomalía estructural y hereditaria de una molécula citoplasmática. Recordemos la existencia de diferentes hemoglobinas y la posibilidad de una enfermedad molecular que va desde una anemia ligera a una grave, por la presencia de un determinado tipo de hemoglobina (anemia falciforme, talasemia, etc.). No olvidemos también, por ejemplo, la posibilidad de una enfermedad molecular en relación con las lipoproteínas beta₁, que aparecen en la sangre de los ateromatosos, y entrando en un campo más especulativo y resbaladizo, podría relacionarse la etiología del cáncer con un vicio de estructura y síntesis nucleoprotídica, consecuencia de un estado disenzimático inducido.

El hecho de que múltiples procesos químicos pueden dar lugar a lesiones bioquímicas es conocido desde hace ya muchos años. ¿Qué son sino las que denominamos carencias vitamínicas en su mayor parte? La carencia de vitamina B₁ o tiamina incapacita a la célula para realizar la síntesis de la carboxilasa pirúvica necesaria para un metabolismo normal y aparecen, en consecuencia, los trastornos nerviosos bien característicos. La vitamina B₁₂ y el ácido fólico intervienen en los fenómenos de metilación y formilación necesarios para síntesis tan trascendentes como las de purinas, que conducen a los nucleoproteídos. Asimismo la avitaminosis B₆, es decir, la insuficiente cantidad de PLP o piridoxal fosfato, afectará las reacciones enzimáticas que lo precisan —transaminaciones, descarboxilaciones, etcétera— produciendo trastornos en el metabolismo protídico especialmente...

La carboanhidrasa, tan importante para la producción de líquido ceforraquídeo, del humor acuoso del ojo, para la secreción del ácido clorhídrico en el estómago y, entre otras acciones indispensables, para la reabsorción del sodio a nivel de los túbulos contorneados del riñón, si se inhibe —lo cual puede lograrse experimentalmente y se busca terapéuticamente— daría lugar a múltiples afecciones renales, gástricas, oculares e incluso ceforraquídeas.

Los microorganismos, en general, como los virus, bacterias y protozoarios, pueden determinar igualmente lesiones submicroscópicas de las células, que han permitido decir a FLORKIN que la enfermedad es siempre, en último término, la resultante de una anomalía bioquímica causal.

Bajo la denominación de semiología bioquímica se comprenden los síntomas que resultan de la puesta en evidencia en un líquido biológico de una sustancia eventual o de una anormal concentración de un constituyente regular. Como es lógico, la determinación de los enzimas no puede dejarse a un lado, a la luz de los conocimientos actuales, como ayuda para un diagnóstico clínico que pretenda ser lo más exacto posible. Su aplicación es especialmente importante en el diagnóstico diferencial.

Junto con los últimos adelantos en el campo de la enzimología clínica ofrecemos una recapitulación de

los ensayos "clásicos" con el fin de lograr, con una mejor visión de conjunto, una publicación de mayor utilidad para los interesados.

En el caso de los análisis clínicos enzimáticos, como en el de los químicos, es necesario atenerse estrictamente al método que se emplea, puesto que los valores clínicos, normales o patológicos, están en relación con el valor hallado mediante un método determinado, con el cual ha sido previamente establecido el valor medio habitual en una serie de individuos clínicamente normales trabajando en idénticas condiciones. Es evidente, pues, que si bien no todos los métodos utilizados habitualmente en el análisis clínico son los mejores, sí son los más representativos hasta el momento en que no se acuerde referir los resultados a un nuevo procedimiento.

Hemos procurado no limitar las citas bibliográficas para el mejor servicio de aquellos lectores interesados en conocer más a fondo alguno de los capítulos tratados, recomendando especialmente las publicaciones de KING⁴, ABDERHALDEN^{4a} y WHITE y colaboradores^{4b}.

Con el mismo criterio hemos preferido no eliminar de esta revisión aquellos enzimas cuya utilidad práctica no está claramente definida.

FOSFATASA ALCALINA.

En 1922, ROBINSON^{2a} encontró, entre los productos de la fermentación del azúcar por la levadura, un éster fosfórico de la glucosa, el glucosa monofosfato, llamado desde entonces "éster de Robison". El éster de Cori —glucosa difosfato— había sido identificado anteriormente. La sal cálcica del glucosa monofosfato era soluble en agua y, por acción de la misma levadura, precipitaba fosfato cálcico inorgánico.

Este hecho hizo suponer a ROBISON la existencia de un enzima capaz de producir la fosforilisis del éster, dando, como productos de reacción, azúcar libre y fosfato inorgánico, el cual precipitaba, en presencia de iones calcio, como fosfato cálcico insoluble. Este autor supuso que era posible la existencia de un enzima similar en el tejido óseo, y que incluso la formación del mismo hueso se llevaría a cabo por un proceso paralelo, comprobando que, en efecto, un extracto de hueso joven producía el mismo resultado.

La demostración de la presencia de fosfatasa en el hueso fue la base de la bien conocida teoría de ROBISON sobre la osteogenesis, la cual supone que la fosfatasa libera, en las células hipertróficas donde la osificación tiene lugar, fosfato inorgánico a partir de los ésteres orgánicos de fósforo contenidos en los flúidos que bañan el hueso o cartílago, produciéndose, de este modo, un incremento local de la cantidad de fósforo inorgánico en solución. Por la acción de masas, cualquier incremento en la concentración de ión fosfato llevará a un depósito de fosfato cálcico en presencia de iones Ca⁺⁺.

El mismo autor^{3a} demostró la existencia de una intensa actividad fosfatásica en cultivos de hueso embrionario, cuando aparecen los centros de osificación. ENGEL y FUTURA^{4a} demostraron la existencia de fosfatasa en la pulpa dentaria de dientes embrionarios. BODANSKY⁵, HUGGINS⁶, BOTTERELL⁷, BOURNE⁸, etc., han confirmado la distribución de las fosfatasas en el esqueleto y su íntima relación con la formación del hueso. ROBISON y ROSENHEIM⁹ sugirieron la posibilidad de un ciclo —"phosphate cycle"—, en el cual los ésteres fosfóricos serían sin-

etizados en una primera fase del proceso e hidrolizados por la fosfatasa de los osteoblastos en una fase ulterior. Posteriormente^{10, 11} se han dado nuevas directrices a la teoría inicial de ROBISON: existiría un enzima sintetizante de ésteres fosfóricos —fosforilasa—, que llevaría a cabo la fosforilisis, en el hueso, del glucógeno con el fosfato inorgánico del plasma para producir glucosa-1-fosfato, el cual se convierte en el sustrato principal de la fosfatasa ósea. Ulteriormente se han propuesto otros mecanismos para la actuación del enzima^{12, 13, 14, 15}. Se ha constatado¹⁶ la inhibición producida por concentraciones altas de sustrato, especialmente a pH bajo, y que el pH óptimo de hidrólisis varía considerablemente con la concentración de sustrato.

Otros datos concernientes a las propiedades enzimáticas de la fosfatasa alcalina pueden encontrarse en el sobresaliente trabajo de ROCHE y NGUYEN-VAN-THOAI¹⁷.

MARTLAND y ROBISON¹⁸ demostraron que el plasma sanguíneo contiene asimismo fosfatasas, y KAY estudió la actividad fosfatásica del plasma en relación a diversos estados clínicos, encontrando una marcada elevación de la misma en enfermedades óseas generalizadas, tales como la osteomalacia, enfermedades de Paget y Recklinghausen, etc.

Históricamente, la fosfatasa alcalina del suero fue la primera que se utilizó para el diagnóstico clínico. Su actividad se encuentra aumentada en el sarcoma osteógeno, carcinoma osteoblástico metastásico, ictericia obstructiva, hepatitis y carcinoma o linfoma metastásico del hígado, en ausencia de ictericia. Valores ligeramente elevados se encuentran ocasionalmente en pacientes con osteoporosis generalizada, hipertiroidismo marcado, etc. Puesto que los valores de fosfatasa alcalina son paralelos a la velocidad de formación del hueso, se encuentran valores normales más altos en los niños que en los adultos. Los niveles de fosfatasa, bajos al nacer, alcanzan rápidamente un máximo durante el primer mes de vida, permaneciendo estables hasta los dos años y decreciendo luego hasta alcanzar los valores normales en el adulto.

Cuando existen niveles altos de bilirrubina sérica, la determinación de la fosfatasa alcalina es utilizada a menudo en diagnóstico diferencial: valores normales de fosfatasa alcalina se encuentran en la ictericia hemolítica, mientras que valores elevados indican lesiones hepatocelulares u obstrucción biliar. A pesar de que los incrementos van asociados con fenómenos de obstrucción biliar mejor que con lesiones hepáticas, se precisa la ayuda de otras pruebas para un resultado inequívoco.

El valor diagnóstico de la fosfatasa alcalina, unido a otras determinaciones de diagnóstico diferencial, sigue estando al orden del día, como lo demuestran las numerosas publicaciones que sobre el particular aparecen continuamente en la bibliografía. La fosfatasa alcalina no se altera en las distrofias musculares progresivas, pero sí lo hacen la aldolasa —en niños y adultos— y la transaminasa —sólo en niños—²⁰, habiendo sido estudiada en leucemia y linfomas²¹ y²², en el conocimiento del estado de los intestinos humanos unida a la determinación de enterocinasa²³, su origen en el curso de las hiperfosfatemias²⁴ y el efecto de los andrógenos y la hipofisectomía sobre su actividad²⁵. También han sido estudiadas las modificaciones de actividad —incremento— en el caso de granulomas, como ejemplo de inflamaciones focales²⁶. La fosfatasa alcalina está presente en gran cantidad en las células de exudados in-

flamatorios (líquido pleural), pero no existe en los trasudados²⁷. El homogenado de placenta es, aproximadamente, 50 veces más rico en fosfatasa que el suero sanguíneo, habida cuenta de su carácter de órgano de rápido desarrollo²⁸.

La actividad del enzima es máxima en los pH comprendidos de 8 a 10, dependiendo el pH óptimo del éster utilizado como sustrato: el etil-fosfato a pH 8,1, el glicero-fosfato a pH 9,4 y el fenil-fosfato y nitro-fenil-fosfato a pH 9,8. Un sustrato de gran utilidad lo constituye el fenolftaleín fosfato. Los iones magnésicos son activadores de la reacción.

El método original de MARTLAND y ROBISON empleaba glucosa fosfato como sustrato, a pH 8,4. Posteriormente se introdujo el glicero-fosfato, más asequible. En 1934, KING y ARMSTRONG²⁹ propusieron el fenil-fosfato como sustrato de la reacción, el cual era hidrolizado mucho más rápidamente que el glicero-fosfato. El método de Folin-Ciocalteu para el fenol hizo posible la utilización del plasma y suero en pequeñas cantidades y cortos períodos de incubación (15 min. de hidrólisis y 0,2 ml. de plasma). La unidad del método del glicero-fosfato se expresa en relación a los miligramos de fósforo liberado, mientras que la del fenil-fosfato se refiere a los miligramos de fenol. El paranitro-fenil-fosfato^{30, 31, 32} es un sustrato casi incoloro, que libera, en la hidrólisis, el paranitro-fenol, de color intensamente amarillo, el cual puede ser medido colorimétricamente o, por adición de hidróxido sódico, valorar el fosfórico al final del período de incubación. Otro sustrato cromogénico es el fenolftaleín-fosfato, incoloro, que libera fenolftaleína en su hidrólisis, la cual produce coloración intensamente roja en solución alcalina^{33, 34, 35, 36}. Se han propuesto otros sustratos, tales como naftil-fosfato, ácido adenílico, etc.

Los métodos de valoración más utilizados son los de BODANSKY y KING-ARMSTRONG. En el de KING-ARMSTRONG³⁰ se utiliza el fenil-fosfato a 37° C., determinándose el fenol mediante la adición de carbonato sódico, después de precipitar las proteínas con el reactivo de Folin y Kolthoff. El color es probablemente debido a la formación de complejos entre el fosfotungstato y fosfomolibdato y el fenol, definiéndose la unidad de fosfatasa alcalina como la cantidad de enzima que libera un miligramo de fenol de una solución de fenil-fosfatodisódico 0,005 M en quince minutos, a 37° C., en buffer carbonato-bicarbonato, a pH 10.

El método de BODANSKY³⁵ utiliza el glicero-fosfato sódico disuelto en dietilbarbiturato monosódico. Las medidas se llevan a cabo a 37° C., incubando el sustrato con un ml. de suero centrifugado. El fósforo liberado se valora con molibdato después de haber precipitado con ácido tricloroacético las proteínas existentes. La unidad de fosfatasa se define como el equivalente a un miligramo de fósforo liberado de glicero-fosfato sódico al estado de ión fosfato durante una hora, a pH 8,6 y 37° C. En adultos las cantidades normales son de 1,5-4 unidades por 100 centímetros cúbicos; niños de 5 a 12; en osteoporosis de 5 a 10 unidades, hiperparatiroidismo, 25 U., Paget localizada de 5-20 U., Paget polioestótica de 50-135 unidades, etc.

Utilizando unidades King-Armstrong los valores normales son de 4-10 UKA por 100 ml. en los adultos y 10-20 en los niños. En osteomalacia, 20-40 unidades; hiperparatiroidismo, 20-200; carcinoma metastásico, 10-50; sarcoma osteogénico, 10-40; etcétera. En ictericia obstructiva se encuentran valores de 30 a 200 U. si la obstrucción es casi completa, y

menos de 30 U. si es parcial o intermitente. Valores de 15 a 30 U. (ocasionalmente más altos) se encuentran en hepatitis infecciosas, cirrosis e ictericia tóxica. En la ictericia hemolítica no hay incremento. La bibliografía que se refiere a las variaciones de fosfatasa sérica es copiosa^{37, 43, 55, 57}.

Se han hecho varios intentos de relacionar la fosfatasa alcalina salival con la caries dental, sin que se haya podido llegar a una conclusión definitiva a causa de la interferencia de los organismos ricos en este enzima de presencia habitual en la boca⁴⁴⁻⁴⁶.

En 1930^{19b} se constató la presencia de fosfatasa alcalina de gran actividad en los leucocitos y ha sido estudiada por gran número de autores⁴⁷, sin que se haya podido descubrir ninguna relación útil entre esta alta actividad fosfatásica y estados patógenos.

La *glucosa-6-fosfatasa* es una fosfatasa alcalina "especial" encontrada en el hígado⁴⁸. Presenta una alta especificidad por su substrato, glucosa-6 fosfato, no atacando la gran variedad de ésteres fosfóricos primarios sobre los cuales es activa la fosfatasa alcalina plasmática. Su posible utilidad en el diagnóstico ha sido estudiada⁴⁹.

La aplicación de la fosfatasa alcalina a la histoquímica, es decir, a la demostración "in situ" de la actividad enzimática, puede encontrarse en el magnífico libro de GLICK⁵⁰, en una reciente revisión de conjunto⁵¹. Son muchas las publicaciones de última hora relacionadas con este tema: citamos como ejemplo la determinación histoquímica de la fosfatasa alcalina en los estados iniciales del aparato urinario durante el desarrollo prenatal del hombre⁵², fosfatasa alcalina en el estómago y su relación con los diversos estados de gastritis⁵³, así como valoraciones de este enzima en leucocitos sanguíneos y médula ósea en diversas enfermedades⁵⁴.

FOSFATASA ÁCIDA

DEMUTH⁵⁸ describió, en 1925, un enzima fosforolítico encontrado en la orina, que era activo en medio ácido, en contraste con la fosfatasa descrita anteriormente en hueso y plasma, que sólo actuaba en medio marcadamente alcalino. Posteriormente⁵⁹ se confirmó la presencia de esta fosfatasa en la orina de varones, siendo mucho menor el contenido de la femenina. Investigando su procedencia, se llegó a la conclusión de que en la próstata existían grandes cantidades de este enzima, al igual que en el fluido seminal. Puesto que su pH óptimo es 5 se la denominó "fosfatasa ácida", existente en pequeñas cantidades en el plasma sanguíneo y en la orina. Además de la fosfatasa prostática existen otras fosfatasas ácidas en varios tejidos: hígado, riñón, bazo, etcétera⁶⁰⁻⁶³, habiéndose encontrado una alta concentración de fosfatasa ácida en los hematíes⁶³, los cuales contienen alrededor de 100 veces mayor cantidad que el plasma, si bien parece que esta fosfatasa es completamente distinta de la fosfatasa ácida plasmática, procedente en su mayor parte de la próstata, junto con fosfatasa ácida, no prostática, también distinta de la hemática. La fosfatasa hemática no ha encontrado hasta el momento ninguna aplicación al diagnóstico, puesto que no parece estar relacionada con ningún estado patológico.

Las notables variaciones observadas en suero de los niveles de la fosfatasa prostática han hecho que su determinación sea altamente útil en el estudio de la patología prostática.

Para la determinación de la fosfatasa ácida pueden ser utilizados los mismos métodos que en el caso

de la fosfatasa alcalina, realizando la experiencia a pH 5, pH en el cual la fosfatasa alcalina es prácticamente inactiva. El método del fenilfosfato²⁹ es el utilizado normalmente, incubando en buffer citratos durante una hora. Si una excesiva concentración de fosfatasa hace innecesario este tiempo de incubación, los valores obtenidos en tiempos menores serán referidos a la hora. La unidad de fosfatasa ácida es igual a los miligramos de fenol hidrolizados a pH 5 durante una hora, a 37° C.⁶⁴⁻⁶⁶. El método del glicerofosfato es igualmente utilizado e incluso preferido por algunos autores⁶⁷. Para diferenciar la fosfatasa prostática de la sérica se han utilizado distintos procedimientos: HERBER⁶⁸ basa la diferenciación en la rápida destrucción del enzima prostático por el alcohol, haciéndolo otros autores con formaldehído al 0,5 por 100, que destruye totalmente la fosfatasa sérica⁶⁹. Se ha demostrado asimismo la manifiesta labilidad de la fosfatasa prostática frente al l-tartrato, que la inactiva selectivamente. Sobre la base de esta última propiedad es posible hacer una determinación altamente específica de la fosfatasa prostática viendo su actividad en dos determinaciones, una de las cuales incluye el l-tartrato. La diferencia entre las dos determinaciones corresponde a la cantidad real de fosfatasa prostática presente⁷⁰.

Muy recientemente, STOLBACH y colaboradores han simplificado al máximo el método de valoración de la fosfatasa ácida, sustituyendo la desproteinización por el uso de un agente diazotante de copulación para medir el fenol liberado, requiriéndose solamente medio ml. de suero. Otras modificaciones han sido propuestas por DAVIS y colaboradores⁷².

El interés de la significación diagnóstica de la fosfatasa ácida lo ponen de manifiesto las constantes publicaciones que se refieren a las posibilidades patológicas de su presencia: CARR y TUCHMAN⁷³ han observado que la cantidad de fosfatasa ácida aumenta sensiblemente en las lipoidosis (enfermedades de Gaucher y Niemann-Pick). Asimismo ha sido estudiada en leucemias y linfomas. Otros recientes estudios se refieren exclusivamente a la detección y diagnóstico del carcinoma prostático con metástasis localizada y en caso de hipertrofia benigna de la próstata^{74, 76}, habiendo sido observada por algunos autores la influencia que algunos agentes terapéuticos poseen sobre su cantidad normal⁷⁷⁻⁷⁸.

La aplicación de las fosfatasas ácidas al diagnóstico del carcinoma prostático fue introducida por GUTMAN y colaboradores⁶⁴, que encontraron que este enzima no aparece hasta la pubertad, siendo capaces de inducirlo precozmente en monos "rhesus" mediante la aplicación de propionato de testosterona. En el carcinoma de próstata observaron que el enzima está presente en el tejido carcinomatoso y en las metástasis esqueléticas producidas por esta enfermedad. La cantidad de fosfatasa ácida en suero era sólo claramente anormal en el caso de enfermos con metástasis. El nivel normal de fosfatasa ácida en plasma es alrededor de 5 U. de fosfatasa prostática y no prostática, correspondiendo sólo 4 U. a la prostática, según se determina por el método del formaldehído y del tartrato; si utilizando estos métodos selectivos el número de unidades se eleva a 5 puede suponerse la posibilidad de carcinoma de próstata localizado.

HUGGINS y colaboradores⁶⁵ postularon que los tumores prostáticos se deben a un crecimiento anormal de las células epiteliales adultas de próstata, y que las células epiteliales prostáticas tienden a atrofiarse cuando se disminuye el aporte de hormonas

androgénicas (por castración o por administración de estrógenos). La castración y la administración de andrógenos han sido comprobadas por gran número de autores como el remedio terapéutico más eficaz en los casos de cáncer de próstata^{79, 80}, siendo la determinación de este enzima de gran utilidad para seguir el curso del tratamiento y la efectividad del mismo. Muchos autores han advertido reiteradamente^{81, 82} que el trauma, e incluso la suave manipulación propia de la palpación de la próstata en el examen clínico, pueden causar una elevación considerable de la fosfatasa ácida plasmática, aconsejando que la determinación enzimática se realice pocos días después del examen clínico.

Hombres jóvenes y sanos excretan considerable cantidad de fosfatasa ácida en la orina⁸³, parte de la cual parece provenir de la secreción prostática y parte de la excreción renal. La cantidad de fosfatasa ácida en los pacientes de carcinoma de próstata con hipertrofia benigna es mucho menor que la de los hombres normales. Mujeres sanas y mujeres afectas de carcinoma de pecho excretan igualmente fosfatasa ácida en su orina, siendo sus valores alrededor del 20 por 100 del de los hombres. El origen de la fosfatasa ácida femenina es desconocido. Para el conocimiento de su determinación y posibilidades histoenzimológicas remitimos al lector a las mismas citas que en el caso de la fosfatasa alcalina.

AMILASAS

Las amilasas hidrolizan los puentes alfa-1,4-glucosídicos de los poliglucósidos (amilosa, amilopectina, glucógeno y dextrina). La primera fase de acción de este enzima se caracteriza por un rápido descenso del peso molecular del sustrato, que se visualiza mediante el cambio de sus propiedades coloreantes respecto al yodo —actividad dextrinizante— y por pérdida de viscosidad del sustrato (almidón). Estos fenómenos son producidos por la hidrólisis de un pequeñísimo número de puentes glucosídicos, puesto que van acompañados de sólo un ligero incremento del poder reductor —actividad sacarificante—. Los productos finales de la acción de la amilasa son la maltosa, dextrinas de bajo grado de polimerización (3 a 7 moléculas) y pequeñas cantidades de glucosa; los puentes alfa 1,6-glucosídicos —puntos ramificantes— no son hidrolizados por este enzima.

La alfa-amilasa salival es idéntica en algunas propiedades a la alfa-amilasa pancreática: poseen un pH óptimo de actividad idéntico, y ambos enzimas requieren Cl⁻. Difieren, sin embargo, en su movilidad electroforética, en su solubilidad y en su estabilidad a distintos pH.

El método de determinación más utilizado es el de SOMOGYI⁸⁴, que está basado en la cantidad de azúcares reductores formados. Los resultados se expresan en miligramos de glucosa por 100 ml. de plasma, medidos por el incremento de sustancia reductora después de incubación de la mezcla almidón-suero, menos la cantidad contenida por el suero solo.

Puesto que no existe ningún sustrato homogéneo puro para la amilasa, el almidón soluble es sin duda alguna el material de elección. Se consigue una solución estable durante una semana en nevera e indefinidamente si se esteriliza por el calor del siguiente modo: hervir un gramo y medio de almidón soluble en setenta ml. de agua, enfriar y llevar el volumen a 100 ml. con fosfato buffer M/15 a pH 7.2. La cantidad de azúcares reductores que contiene esta solución es muy pequeña, de tal modo que el valor obte-

nido en el tubo control es prácticamente idéntico al valor normal de azúcar en sangre. En relación con este punto tenemos que señalar que los valores altos de azúcar en sangre disminuyen la precisión del método, ya que la actividad amilásica se determina por diferencia. Si, como acontece con algunas muestras de almidón soluble, el filtrado obtenido no es límpido, el almidón soluble deberá ser sustituido por la misma cantidad de almidón de maíz.

A pesar de que los valores se refieren siempre a glucosa, debemos resaltar, como hemos indicado anteriormente, que el azúcar producido por la acción amilásica no es glucosa, sino maltosa y algunos sacáridos de alto peso molecular. Por esta razón, el método utilizado para la valoración del azúcar tiene influencia en los resultados obtenidos. La interferencia de los azúcares no reductores presentes en el suero es nula en los resultados, puesto que se hallan tanto en las muestras problema como en las de control.

La prueba de SOMOGYI se lleva a cabo con 1 ml. de plasma, incubando a 40° C. treinta minutos.

La cantidad de azúcar reductor se determina, después de defecar, por el método de FOLIN-WU⁸⁵. El valor normal medio es el de 98 miligramos por 100, pudiéndose considerar como normales los valores comprendidos entre 80 y 160 unidades.

El método de SOMOGYI también puede expresarse por la cantidad de eritrodextrina formada, medida por la reacción del yodo, y por el tiempo necesario para que 1 ml. de plasma digiera 3 miligramos de almidón.

Otro método es el de KING⁸⁶, en el que la unidad se define como la cantidad de amilasa precisa para hidrolizar 1,5 gramos de almidón en 8', incubándose 0,5 c. c. de plasma con la cantidad de sustrato indicada y viendo el tiempo que tarda la mezcla en no dar reacción azul con el yodo.

La determinación de *amilasa (diastasa) en orina*, procedente de la secreción pancreática, y que, absorbida por vía digestiva, se elimina por el riñón, se hace normalmente por el método de Wohlgemuth o Fabricius-Möller, de fácil realización.

Las unidades utilizadas son las de Wohlgemuth, que se refieren al número de ml. de una solución de almidón al 0,1 por 100 digeridos por un mililitro de orina en treinta minutos. Expresada en estos términos, los valores normales son del orden de 6-30 unidades por ml. En anormalidades pancreáticas estos valores alcanzan las 100 U.

El método consiste en mezclar distintas diluciones de orina, tamponadas a pH 6,1 con solución de fosfato, con solución de almidón al 0,2 por 100. Después de una incubación a 37° C. se adiciona yodo a las muestras, y el último tubo en que no se produce color se toma como la máxima dilución a la que el almidón ha sido completamente digerido.

Algunos resultados obtenidos por este método son: pancreatitis aguda, 200 U./ml.; pancreatitis crónica 10 a 50 U./ml., y páncreas invadido por neoplasia, 30 a 100 U./ml.

La amilasa sanguínea se incrementa enormemente (200 a 1.000 unidades) en las pancreatitis agudas no hemorrágicas desde el primer momento de la enfermedad. Esta elevación puede persistir durante pocas horas o pocos días, según la intensidad del ataque. Las pancreatitis crónicas no producen habitualmente incremento en la actividad amilásica sérica. La enfermedad hemorrágica del páncreas da resultados variables. También se obtienen incrementos de actividad en neumonía, tirotoxicosis y nefri-

tis con azotemia. Valores bajos se encuentran sólo después de elevaciones muy agudas producidas por pancreatitis, hepatitis y cirrosis hepática.

MUSGROVE y colaboradores⁸⁴ han indicado que, de acuerdo con otros autores, un nivel normal de amilasa sérica elimina la posibilidad de pancreatitis agudas, mientras que un nivel muy elevado (5 veces el valor normal) indica con seguridad la existencia de esa enfermedad, siendo debidas las elevaciones moderadas a algunas de las causas siguientes: a) Afección del páncreas por un proceso patológico. b) Inflamación aguda de las glándulas salivales. c) Insuficiencia renal que disminuye la secreción renal de amilasa. d) Perforación libre de lesiones gastroduodenales con liberación de amilasa dentro de la cavidad peritoneal y subsiguiente absorción de la misma.

En otros trabajos de reciente aparición se cita la correlación entre la actividad amilásica del plasma y la concentración de ácidos grasos no esterificados⁸⁵ y la influencia de los iones inorgánicos sobre la actividad amilásica, destacándose la precisión que del ión Cl⁻ presenta la alfa amilasa salival⁸⁶.

La cantidad de amilasa se eleva, aproximadamente, alrededor de setenta y dos horas después del ataque de pancreatitis aguda. Una caída rápida puede indicar una pronta resolución de la inflamación, excepto en el caso en que el páncreas quede tan fuertemente lesionado que repercuta en la producción de enzimas.

La amilasa se eleva igualmente en afecciones de la vesícula biliar⁹⁰, úlceras pépticas perforadas⁹¹, uremia⁹², después de una colangiografía⁹³ y después de la administración de narcóticos del tipo de la morfina y drogas parasimpaticomiméticas⁹⁴. La amilasa es excretada libremente por los riñones, de tal modo que la cantidad excretada en un tiempo dado puede reflejar la cantidad segregada por el páncreas en la sangre⁹⁵. LAXON y colaboradores han informado de este paralelismo entre la amilasa urinaria y sérica, indicando, además, que la de la orina permanece, por regla general, de siete a diez días después que la concentración en suero ha vuelto a la normalidad, lo cual es muy útil cuando el enfermo no es examinado dentro de los primeros días después del ataque o cuando este ataque es benigno.

En el plasma, valores de más de 1.000 U./ml. los encontramos sólo en casos de pancreatitis aguda. McCORKLE y GOLDMAN⁹⁶ hicieron un estudio comparativo entre numerosos enfermos, encontrando variaciones entre 225 U. y 2.500, con un promedio de 670 unidades, hallando también que el valor de amilasa plasmática puede estar elevado en colecistitis, úlcera péptica perforada y obstrucción intestinal.

En caso de paperas, los estudios realizados por GANDEL y WHELOCK⁹⁷ demuestran la existencia de altos niveles de amilasa. En ausencia de pancreatitis se encuentra que los niveles altos de enzima están relacionados con afecciones de las glándulas parotidas. WARREN indica que aun desapareciendo la parotiditis, se conservan los niveles altos de amilasa en suero, y piensa que se debe a una complicación de las glándulas cerocimogénicas intestinales. En apoyo de esta sugerencia, WALLMAN y VIDOR⁹⁸ han encontrado 8 casos de paperas meningoencefalíticas que mostraron altos niveles de amilasa en ausencia de ningún otro estado morbozo de las glándulas salivales y páncreas. Esto es importante, puesto que la etiología de la meningoencefalitis puede ser oscura y no es fácil distinguirla de otras infecciones virásicas, tales como la poliomielitis no paralítica.

LIPASAS

Las grasas digeridas en los alimentos (triglicéridos, fosfolípidos, etc.) son hidrolizadas en el intestino delgado por la acción de la lipasa, presente en la secreción pancreática. Existe también, según demostró WILLSTÄTER, una lipasa de secreción gástrica, cuya importancia en la digestión de las grasas es secundaria. La lipasa produce la hidrólisis de las uniones ésteres entre los ácidos grasos y el glicerol de los triglicéridos y de los fosfolípidos. La hidrólisis parcial produce diglicéridos, monoglicéridos y ácidos grasos libres. La hidrólisis completa resulta en sólo dos componentes: glicerol y ácidos grasos. La actividad lipásica se determina midiendo cuantitativamente, por acidimetría, los ácidos grasos liberados.

Los substratos más utilizados son los triglicéridos —como el aceite de oliva—, los ésteres etílicos de ácidos grasos de larga cadena, tales como el etilpalmitato, y los derivados solubles en agua, como el sorbitanmonolaurato ("Tween 20") y el betanaftilaurato. El mayor inconveniente de los triglicéridos es su insolubilidad en agua, lo cual hace necesario su emulsificación previa. La actividad lipásica tiene lugar en medio alcalino, y es activada por proteínas, jabones e iones cálcicos. Estos últimos actúan eliminando los productos de hidrólisis de la solución, precipitando los ácidos grasos liberados al estado de jabones cálcicos. Por otra parte, los ésteres solubles en agua mencionados presentan el inconveniente de que no son atacados sólo por la lipasa, sino también por esterases inespecíficas sanguíneas que existen en ciertos procesos patológicos en cantidades considerables, y que pueden dar altos niveles de hidrólisis atribuibles erróneamente a la acción lipásica. Puesto que la especificidad de la lipasa depende del enlace de la cadena de los ácidos grasos en el substrato, no se ha encontrado hasta este momento un producto que sustituya con ventaja al aceite de oliva. Como la cantidad de lipasa en sangre es pequeña y la velocidad de hidrólisis del aceite de oliva es lenta, las cantidades de ácidos grasos liberados en un tiempo dado no son muy grandes, lo cual obliga a una incubación del orden de veinticuatro horas, con la finalidad de obtener cantidad suficiente de ácidos grasos para una valoración exacta.

Varios son los métodos utilizados para la valoración de lipasa sérica. Desde el de Loewenhardt, modificado por CHERRY y CRANDALL⁹⁹ hasta el de BUNCH y EMERSON¹⁰⁰, otros procedimientos, como el de NORTHMAN y colaboradores¹⁰¹, el de GOMORI y GOLDSSTEIN y colaboradores¹⁰², han obtenido una notable difusión. En el método de BUNCH y EMERSON se expresa la unidad como el número de mg. de sosa 0,05 N requeridos para la valoración de los ácidos grasos liberados en cuatro horas, a 37° C. por un ml. de suero en las condiciones experimentales. CHOTEAU y colaboradores¹⁰³ han propuesto un nuevo método para la valoración de la lipasa sérica mediante un sistema potenciométrico. TUBA y HOARE¹⁰⁴ han descrito asimismo un semimicrométodo para la determinación de la actividad lipásica sérica.

Otros procedimientos de valoración son el estalagmométrico, basado en el incremento de la tensión superficial de los substratos por la acción lipásica¹⁰⁵, ¹⁰⁶, el manométrico, que mide CO₂ desprendido, a partir de un buffer de bicarbonato, por el ácido liberado en la hidrólisis enzimática¹⁰⁷ y otros métodos de menor interés, como son el procedimiento dilatométrico y turbimétrico.

Puesto que la lipasa se forma principalmente en el páncreas, es en relación a la actividad pancreática para lo que es útil la determinación de la actividad lipolítica sérica. Como sucede en el caso de la amilasa, la lipasa afluye a la sangre en cantidades mucho más elevadas que las normales en caso de patología de la glándula secretora. Su determinación no es tan ampliamente utilizada como la de la amilasa, debido a la menor facilidad de su determinación y al hecho de que su incremento en los estados de disfunción pancreática no es tan manifiesto como el de la amilasa.

Los valores francamente elevados corresponden, como se deduce, a pancreatitis aguda. Incrementos moderados de lipasa se producen también en pancreatitis crónica, a diferencia de la amilasa, en casos de carcinoma de páncreas, de la ampolla de Vater y en ciertos casos de enfermedades crónicas del tracto biliar, observándose también ocasionalmente valores elevados en cirrosis hepáticas, hepatitis, úlcera duodenal, esclerosis múltiple, coelitis, etc. Los valores elevados persisten, como en el caso de la amilasa, durante un cierto tiempo después del ataque agudo de pancreatitis, regresando luego lentamente a su nivel normal.

Se ha sugerido el empleo de la lipasa sanguínea en el diagnóstico de la tuberculosis pulmonar¹⁰⁸.

GOMORI¹⁰⁹ fue el primero en adaptar un método de lipasa a la determinación histoquímica, siendo su trabajo posterior¹¹⁰ un estudio de la distribución de la lipasa en los tejidos en condiciones normales y patológicas.

ESTERASAS. COLINESTERASAS

Las esterasas catalizan la reacción de hidrólisis de los ésteres de ácidos grasos de bajo peso molecular, lo que las diferencia de las lipasas, que lo hacen sobre los ésteres de ácidos grasos de alto peso molecular. Las esterasas de varios tipos están presentes en muchos tejidos. Describiremos primero la esterasa, cuya función fisiológica es hidrolizar la acetilcolina, acetilcolinesterasa o colinesterasa, cuya significación biológica y diagnóstica le confieren un lugar de privilegio, y que puede ser distinguida de las otras esterasas por un buen número de propiedades biológicas y enzimológicas. La acetilcolina se libera durante el paso del impulso nervioso y luego es rápidamente destruida por la colinesterasa. La colinesterasa ha sido obtenida a partir del plasma y de los eritrocitos de los mamíferos. Las preparaciones enzimáticas, tanto plasmáticas como hemáticas, hidrolizan la acetilcolina, pero la del plasma hidroliza también los ésteres derivados de los alcoholes alifáticos, mientras que la de los eritrocitos hidroliza sólo la acetilcolina, siendo inactiva frente a otros ésteres. Por esta razón, la colinesterasa del plasma recibe el nombre de pseudocolinesterasa, y la de los eritrocitos el de eucolinesterasa. Es una diferenciación referida a la especificidad¹¹¹. La acción de la colinesterasa es fuertemente inhibida por los alcaloides de la fisostigmina, eserina, prostigmina y atropina, aún utilizados a grandes diluciones. Es también inhibida irreversiblemente por los insecticidas organofosfóricos. VORHAUS y KARK¹¹² han revisado la importancia clínica de la colinesterasa en suero. En general, se encuentran niveles bajos en pacientes afectados de enfermedades hepáticas, nutrición deficiente, debilitamiento crónico, dolencias infecciosas agudas y anemias. Se encuentran niveles normales en los enfermos de ictericia obstructiva, miastenia

grave e hipertiroidismo. También aparecen niveles bajos en el síndrome nefrítico.

Las valoraciones de colinesterasa se han utilizado como pruebas funcionales del metabolismo hepático, anemia megaloblástica, deficiencia de vitamina B₁₂, tireotoxicosis y diabetes; pero sobre todo la importancia clínica de estas investigaciones reside en el campo de las dolencias hepáticas, en las cuales se observa una disminución esencial de este enzima, muy especialmente en la cirrosis hepática. Hay niveles inferiores al normal en las hepatitis "a virus", en la colangitis creciente y en la hepatomegalia. En la ictericia obstructiva sencilla las actividades están manifiestamente rebajadas.

La colinesterasa sérica se produce aparentemente en el hígado, y su formación es paralela con la formación de albúmina, de tal modo que su síntesis parece ser estimulada e inhibida por los mismos factores que actúan de un modo semejante sobre la formación de albúmina.

La potente acción farmacológica de la acetilcolina fue descubierta, en 1906, por REID, HUNG y TABEAU, y se la consideró como el transmisor neurohumoral desde el final del nervio al órgano o desde el final de un nervio a la célula nerviosa del segundo.

Ulteriores y extensas investigaciones han demostrado que la acetilcolina es un factor esencial para la generación de las corrientes bioeléctricas que propagan los impulsos a lo largo de los nervios y de las fibras musculares. Actualmente se acepta que la acetilcolina genera estas corrientes cambiando la permeabilidad del ión sodio al ser afectados los gradientes de concentración iónica entre el interior de la fibra y su exterior inmediato, fuentes potenciales de la fuerza electromotiva. Habiendo producido su acción, el éster es inactivado por la acetilcolinesterasa, hidrolizándole en dos componentes inactivos: la colina y el ácido acético. De este modo se restaura la relajación, pudiendo pasar ya el siguiente impulso. La acción del enzima es, pues, esencial para el proceso de la conducción nerviosa. Debido a su función vital, este enzima ha atraído el interés de gran número de investigadores, y sus propiedades han sido discutidas y expuestas en varias revisiones (NACHMANNSON y AUGUSTINSSON¹¹³).

Como hemos indicado, los productos de la reacción son el ácido acético y la colina. Será posible, por tanto, medir la actividad enzimática por la cantidad de colina liberada y, de una manera más fácil, por el incremento de acidez en la mezcla reaccionante debida a la liberación de ácido acético.

Entre los métodos titrimétricos —alcalimetrías— podemos citar los de STEDMAN y colaboradores¹¹⁴, modificado por BRAUN y colaboradores¹¹⁵, VAHIQUIST¹¹⁶, BOVET y colaboradores¹¹⁷, PLICK¹¹⁸, SAWYER¹¹⁹ y GAWYTSKY¹²⁰, han descrito asimismo métodos titrimétricos que utilizan como indicadores el rojo de fenol, la fenoftaleína o el azul de bromotimol.

Los métodos electrométricos, basados también en la valoración de la acidez producida en la reacción enzimática, medida mediante un pH metro, son preferidos a los anteriores^{103, 121, 126}.

En el método electrométrico, que consiste en incubar la sangre con acetilcolina en una solución muy débilmente tamponada, se emplean las unidades pH, que son iguales a la variación del pH inicial multiplicada por 100. Según CALLAWAY y colaboradores¹²⁷ los valores normales de colinesterasa de las células rojas están dentro del margen comprendido entre las 75 y las 142 U.

La colinesterasa puede ser también determinada prácticamente en el aparato de Warburg. La determinación está basada en la medida del CO_2 liberado por la acción del ácido acético sobre el bicarbonato sódico empleado como buffer ^{128, 129}.

Otro método muy sensible para la determinación colorimétrica de colinesterasa en los eritrocitos o sangre total ha sido descrito por FLEISHER y POPOV ¹³⁰.

HERSTING ¹³¹ demostró que la acetilcolina reacciona con la hidroxilamina para formar ácido acetohidroxámico, el cual produce color rojo con las sales férricas en solución ácida, y la intensidad del color es proporcional a la concentración de acetilcolina. Esta propiedad proporciona un método muy sensible para seguir la velocidad de hidrólisis de la acetilcolina en la reacción catalizada por la esterasa. También han sido utilizados métodos espectrofotométricos ¹³². Cuando es necesario determinar la actividad de la eucolinesterasa deben emplearse los eritrocitos, aunque también puede ser utilizada la sangre total ¹³³.

SABINE ¹³⁴, destacando la mayor concentración de colinesterasa hemática, ha ideado un simple método colorimétrico para el empleo clínico rutinario en la determinación de eucolinesterasa. La determinación puede hacerse utilizando sangre total con adición de quinidina, que inhibe selectivamente la actividad de la pseudocolinesterasa.

Muy recientemente, BIGGS y colaboradores ¹⁴¹ han publicado una revisión de los métodos útiles para la valoración de colinesterasa, proponiendo uno nuevo consistente en la determinación de la cantidad de ácido acético liberado por la alteración de la absorción del azul de bromotimol en las condiciones experimentales. Recomendamos este trabajo al lector interesado en el tema.

Según SCUDAMORE y colaboradores ¹³⁵, la cantidad de eucolinesterasa en la sangre periférica puede ser un indicador, incluso más sensible que el recuento de reticulocitos, de la actividad hematopoyética. Estudios llevados a cabo en pacientes de varios tipos de anemia indican que la eucolinesterasa disminuye en la anemia perniciosa no tratada y en la anemia hipoblástica, siendo alta su concentración en los anémicos por hemorragias y en la anemia espruescrotal. SABINE ¹³⁶ cree que la actividad de la eucolinesterasa puede usarse como una prueba de la función de la médula ósea en estados anémicos, sirviendo de indicador de la eficacia terapéutica. BRIDCHARD y VEIDMANN ¹³⁷ han estudiado el efecto del aumento de eritropoyesis en la preñez normal sobre el contenido de colinesterasa de las células rojas.

MCARDLE ¹³⁸ encontró que la colinesterasa sérica disminuye sensiblemente en relación al nivel normal en caso de ictericia. En los casos de cirrosis y hepatitis los valores disminuyen sensiblemente, mientras que en la ictericia obstructiva la disminución es muy suave. VORHAUS y colaboradores ¹³⁹ han realizado un uso extensivo de la medida de la colinesterasa sérica en sus estudios sobre las enfermedades hepáticas y sistema biliar. Sin embargo, esta determinación no ha obtenido, de momento, una aplicación tan amplia como las otras pruebas empleadas para estos estados patológicos, tales como la determinación de bilirrubina, colesterol, fosfatasa alcalina y las pruebas de floculación proteica.

MOERE y colaboradores ¹⁴⁰ han estudiado los cambios que se producen en el nivel de pseudocolinesterasa en pacientes del corazón, hígado y sistema muscular esquelético, señalando que es muy útil su estudio en el hígado, que, como hemos dicho, parece

ser el órgano formador de este enzima, y que, en el caso del sistema muscular esquelético, sirve para la diferenciación de dermatomiositis y otras enfermedades del colágeno.

La colinesterasa sérica ha sido estudiada también por PATHAK y colaboradores ¹⁴⁴ en sujetos normales y enfermos afectados de enfermedades hepáticas, resaltando su valor diagnóstico. LODI y RAGAZZONI ¹⁴⁵ han realizado una serie de estudios en enfermos hepáticos con el fin de observar hasta qué punto puede servir la valoración de la actividad colinesterásica del suero en la determinación de la intensidad de las lesiones hepáticas. Para ello han utilizado el método de MORAND y colaboradores ¹⁴⁶, en el que la actividad colinesterásica se expresa en décimas de centímetro cúbico de NaOH N/100. Dan cifras normales entre 54 y 70 U. En los enfermos cirróticos el promedio era de 30 U., siendo los valores más bajos en casos muy graves, con pronto fallecimiento. En el plasma aprecian también una disminución de las proteínas plasmáticas, que relacionan con la disminución de colinesterasa. En los casos de hepatitis hay valores más o menos bajos, dependiendo del curso evolutivo de la enfermedad. La prueba de la colinesterasa no es específica de las hepatopatías, y aunque tampoco es diferencial en el diagnóstico de las ictericias obstructivas y hepatocelulares, puede tener cierto valor en lo que respecta al diagnóstico de la causa de las obstrucciones. Asimismo otros autores ¹⁴⁷ han examinado el valor de la seroacetilcolinesterasa en diagnóstico.

Los compuestos organofosfóricos utilizados como insecticidas inhiben, como hemos apuntado, a los enzimas que hidrolizan a la acetilcolina. Sus propiedades tóxicas son debidas a la acumulación consecuente de la acetilcolina en el organismo. La prueba de la acetilcolinesterasa es en este caso de especial importancia como índice de la intoxicación producida por estos compuestos.

LEHMANN y colaboradores ¹⁴² comunican haber encontrado niveles de pseudocolinesterasa bajos que guardan relación con el parentesco.

WEBSTER y colaboradores ¹⁴³ han estudiado los niveles de pseudocolinesterasa en plasma y líquido cerebro espinal en enfermos afectados de esclerosis múltiple.

GOUTIER, PIOTTE y colaboradores ¹⁴⁸ han estudiado la actividad colinesterásica, pseudocolinesterásica y benzilcolinesterásica en el intestino delgado e hígado de cobayas. GIACOBINI ¹⁴⁹ ha determinado cuantitativamente la actividad colinesterásica en células nerviosas aisladas mediante el método de la tiocolina modificado.

DENNY y HAGERMAN ¹⁵⁰ han comunicado que, en contra de la opinión sustentada hasta ahora, los leucocitos humanos contienen apreciables cantidades de colinesterasa.

Consecuentemente a su importante papel en la conducción de los impulsos nerviosos, la localización de la acetilcolinesterasa es de un gran interés biológico, empleándose, en los intentos para localizar el enzima, técnicas micro y ultramicrobioquímicas. KOELLE y FRIEDENWALD ¹⁵¹ han descrito un método histoquímico para su determinación, que consiste en incubar durante diez a sesenta minutos la preparación de tejido en un medio que contiene acetiltiocolina como sustrato y glicinato de cobre saturado con tiocolina de cobre. Después de este tratamiento, la sección de tejido es lavada con solución saturada de tiocolato de cobre y sumergida entonces en una solución de sulfuro amónico. Este último convierte el

precipitado blanco de tiocolina de cobre en un depósito de sulfuro de cobre negro parduzco. Ulteriores investigaciones sobre este procedimiento histológico pueden encontrarse en los trabajos de KOELLE y COUTEAUX^{152, 153}. ZAJICEK¹⁵⁴ ha realizado estudios sobre la histogenia de plaquetas y megacariocitos en la sangre, llevando a cabo investigaciones histológicas de acetilcolinesterasa en el sistema eritrocito-eritropoyético y plaqueta-megacariocítico de varios mamíferos. Utilizando asimismo técnicas histoenzimológicas, BECKETT y colaboradores¹⁵⁵ han estudiado la colinesterasa en músculo normal y patológico.

El otro tipo de esterases, encuadradas en la denominación general de "esterasa hepática", "esterasa inespecífica" o "alísterasa", catalizan la hidrólisis de ésteres de ácidos grasos de bajo peso molecular. Como en el caso de la acetilcolinesterasa, son posibles varios métodos de valoración: el titrimétrico, en el cual el ácido liberado es medido por alcalimetría; el manométrico, en el que el CO₂ desprendido a partir del bicarbonato que se emplea como tampón es medido en Warburg, y el colorimétrico, basado en que los ésteres que se utilizan como sustrato producen una base coloreada al ser hidrolizados (por ejemplo, el paranitrofenilacetato o propionato que producen para-aminofenol¹⁵⁶). En otros métodos colorimétricos la base producida se une con sales de diazonio para formar azocolorantes (por ejemplo, el betanaftilacetato produce betanaftol, el cual pasa a azocolorante)^{157, 158}.

AUGUSTINSSON¹⁵⁹ ha indicado que la butiril-colinesterasa plasmática es normalmente mucho más elevada en los varones que en las hembras, mientras que la acetilbeta-metilcolinesterasa de los eritrocitos no muestra diferencias en relación al sexo. BACH¹⁶⁰ indica que la actividad de la esterase hepática se redujo sensiblemente después de practicada la adrenalectomía, produciéndose también cambios, menos notables, después de inyectar cortisona. GOUTIER¹⁶¹ ha realizado un estudio muy completo sobre las distintas clases de esterases séricas, consiguiendo separarlas por electroforesis.

TRIPSINA

La tripsina fue uno de los primeros enzimas digestivos descritos, siendo el principal fermento proteolítico del jugo pancreático. Hidroliza a las proteínas y a los productos de su hidrólisis parcial procedentes del estómago, al estado de oligopéptidos y constituyentes elementales. La transformación del tripsinógeno en tripsina se lleva a cabo asimismo por un proceso proteolítico, catalizado por la enterocinasa. La transformación no es cuantitativa, puesto que, además de la tripsina, se forma una proteína inerte, cuya cantidad relativa depende del pH y de la presencia de iones en el medio de activación¹⁶².

Al contrario de lo que ocurre en el caso de la amilasa y la lipasa, la tripsina no existe en la sangre en cantidad suficiente para hacer útil su determinación en ella, pero sí lo es su medida en el jugo duodenal para la interpretación diagnóstica de las disfunciones pancreáticas, especialmente en los niños. La digestión incompleta de las proteínas puede sospecharse del examen de las heces, pero es preferible determinar el contenido enzimático en una muestra de jugo, que da concentraciones considerablemente reducidas de enzimas en el caso de la insuficiencia pancreática.

La actividad tripsica hemática puede ser determinada por la reacción xantoproteica, después de la activación del suero con acetona, usando como sustrato la caseína.

Habitualmente el contenido de enzima se determina por la velocidad a la cual una muestra dada digiere la caseína. La cantidad de productos de hidrólisis formados en un tiempo determinado están en relación con la cantidad de enzima presente. La hidrólisis se controla determinando la cantidad de péptidos y aminoácidos liberados, midiendo el incremento de los grupos carboxílicos o amínicos mediante el método de WILLSTÄTER o SÖRENSEN para los primeros, y el de VAN SLYKE para los grupos amínicos. CHARNEY y TOMMARELLI¹⁶⁴ han empleado un sustrato proteico cromogénico: la sulfanilamida azocaseína. En las heces, y también en el jugo duodenal, la actividad tripsica es determinada a menudo por el método de licuefacción de la gelatina⁸⁵. Otros métodos son el de la digestión de la caseína, de KUNITZ¹⁶⁵, que sigue la hidrólisis por densidades ópticas. ANSON¹⁶⁶ utiliza la hemoglobina desnaturada como sustrato, determinando los productos de hidrólisis colorimétricamente o espectrofotométricamente.

AGREN y colaboradores¹⁶⁷ encontraron que, en la pancreatitis aguda, se producía una disminución de la amilasa en jugo duodenal, pero no de la tripsina, mientras que en la insuficiencia pancreática ambos enzimas estaban disminuídos.

Después de los tres días de vida, las heces de los recién nacidos poseen una gran actividad proteolítica. A los doce años esta actividad decrece marcadamente, mientras que la del jugo duodenal permanece constante. Por esta razón sólo en los niños es útil la investigación de la actividad proteolítica fecal. PAYNE¹⁶⁸ demostró que las heces de los recién nacidos normales poseían una actividad tripsica capaz de digerir la gelatina a una dilución del 1/100, mientras que la de los niños afectados de enfermedades fibrocísticas del páncreas eran capaces de digerirla únicamente a una dilución menor del 1/50.

QUIMOTRIPSINA.

Se conocen varias quimotripsinas y dos quimotripsinógenos, uno de los cuales, el alfa-quimotripsinógeno, fue cristalizado por KUNITZ y NORTHROP^{162 a}. Pequeñas cantidades de tripsina activan el paso de alfa-quimotripsinógeno a alfa-quimotripsina, la cual se transforma en beta y gamma-quimotripsina, que han sido obtenidas cristalizadas. Las delta y pi quimotripsinas, estable la primera e inestable la segunda, son de posterior descubrimiento. El proceso de activación ha sido intensamente estudiado¹⁶⁹.

La actividad de la quimotripsina puede determinarse utilizando sustratos naturales y sintéticos. Están basados en la medida de la velocidad de proteólisis. El método más representativo es el de KUNITZ¹⁶⁵, en el cual se utiliza la caseína como sustrato. Este método ha sido modificado por LASKOWSKY¹⁷⁰. Otros métodos utilizan como sustrato natural la leche, viendo la capacidad coagulante de este enzima. La introducción de sustratos sintéticos para los enzimas proteolíticos se debe a BERGMANN¹⁷¹. El uso de péptidos sintéticos hace posible establecer para cada enzima proteolítico la unión peptídica sobre la que actúa. Las técnicas utilizadas con sustratos sintéticos han sido revisadas críticamente por NEURATH y SCHWERT¹⁷². PARKS y cola-

boradores¹⁷³ han introducido el método manométrico, y RAVIN y colaboradores¹⁷⁴ un método colorimétrico basado en el uso como sustrato del N-benzil-DL-fenilalanina-beta-naftil-éster, que produce en su hidrólisis naftol, el cual se copula con di-orto-anisidinatetraazotiazida, extrayéndose con éter el colorante azoico resultante.

Como en el caso de la tripsina, existen factores naturales inhibidores de la actividad de la quimotripsina. El poder antiproteolítico del suero, es decir, la concentración de factores inhibidores séricos del enzima, ha sido estudiada en enfermos y sanos por medio del método de WEST y HILLIARD¹⁷⁵ y GUIDETTI y colaboradores¹⁷⁶, observándose que la titulación antiquimotripsínica sérica puede ser anormal en muchos síndromes morbosos, tales como la fase aguda de ciertas infecciones, insuficiencia cardíaca descompensada, hipertensión, afecciones alérgicas, curso del embarazo y neoplasias malignas. El suero de los pacientes afectados de tumores malignos contiene habitualmente una elevada concentración de antiquimotripsina, que remite en los casos de regresión del proceso neoplásico^{177, 178}. El valor pronóstico de la actividad antiquimotripsínica sérica es, por el momento, limitado; pero puede ser útil para seguir objetivamente el curso del proceso morbo en los casos en los cuales el cuadro general del enfermo está de acuerdo con el aspecto antienzimático sérico.

ENTEROCINASA

SHLYGIN¹⁷⁹ ha estudiado en el intestino delgado las concentraciones de enterocinasa, fosfatasa alcalina y sacarasa en casos normales y patológicos. La enterocinasa, enzima altamente específico, se encuentra exclusivamente en la mucosa y secreciones del intestino, siendo producido especialmente en el duodeno y en el yeyuno, debiéndose destacar que en su cantidad no toma parte la flora intestinal, siendo su producción función exclusiva de la mucosa intestinal. Lo mismo ocurre en el caso de la fosfatasa alcalina. En la producción de sacarasa sí toma parte la microflora intestinal. FOMINA ha indicado que existe una íntima relación entre la formación de enterocinasa y los cambios en el sistema glandular causados por las acciones tróficas del sistema nervioso central. La concentración de enterocinasa en un amplio número de casos no ha mostrado fluctuaciones pronunciadas, permaneciendo prácticamente constantes. La cantidad de enzima no se afecta por el contenido en el jugo duodenal de los enzimas pancreáticos.

La enterocinasa puede determinarse por el método de SHLYGIN¹⁸⁰ y por el de KUNITZ¹⁸², de mayor aplicación, en el que una solución de tripsinógeno, a pH determinado, es activada por la enterocinasa. Se toman partes alicuotas, en las que se valora la cantidad de tripsina producida, y se define la unidad como la cantidad de enterocinasa que activa 0,065 miligramos de tripsinógeno cristalino en tampón fosfatos Sörensen 0,02 molar, a pH 5,8 durante una hora a 5° C.

Está establecido que los pacientes que tienen una porción del estómago eliminada en el curso del tratamiento de una úlcera gástrica, muestran un incremento de enterocinasa en el jugo duodenal, aproximadamente, entre 1.100 y 4.000 unidades por centímetro cúbico. En los casos de tuberculosis pulmonar se ha encontrado un descenso relativamente acusado

en el contenido de enterocinasa (hasta 100 U./ml.). No se han detectado cambios apreciables en la mayoría de los casos de desinteria aguda. Para relacionar estos valores con los normales se estudió un grupo de personas sanas, que dieron como niveles normales de enterocinasa, de 300-670 U./ml. La determinación de enzima en el jugo duodenal, unida a otras pruebas, puede ser usada para conocer el estado de los procesos digestivos durante el curso de investigaciones clínicas de enfermedades del sistema digestivo.

Normalmente, la enterocinasa realiza su acción en el intestino delgado mezclada al quimo: en el ciego, debido a la absorción de agua, su concentración aumenta, y en las siguientes secciones del intestino decrecen sus valores por destrucción, siendo mínimas las cantidades de este enzima que se pueden encontrar en las heces. Vemos que es en el intestino grueso donde se realiza la destrucción de la enterocinasa, lo cual indica que en esa zona existe algún factor que la motiva, el cual, para su acción, depende del pH. Cierta número de enfermedades del intestino grueso resultan de la alteración del proceso de inactivación de la enterocinasa, indicada por la presencia de este enzima en grandes cantidades en las heces. Es muy poco probable que un aumento en la cantidad de enterocinasa producida en la porción superior del intestino delgado pueda afectar la cantidad de enzima en las heces, puesto que, en condiciones normales, sería rápidamente destruido en el intestino grueso. Por tanto, valorando la cantidad de enzima que se produce en el intestino delgado (en el jugo duodenal), y conociendo sus fluctuaciones, que nunca son grandes, la cantidad de enterocinasa en las heces constituye un factor determinante de ciertos aspectos del funcionamiento del intestino grueso. El aumento de 1.000 U./g. en las heces, por ejemplo, tiene valor diagnóstico en el caso de enfermedades disentericas. La aplicación de este índice enzimático, unido a otros ensayos clínicos (fosfatasa alcalina, etc.), nos puede indicar variaciones en el funcionamiento normal del intestino grueso que no podrían ser determinadas por métodos convencionales de observación clínica, tales como la determinación de leucocitos neutrófilos o la reacción de Triboulet, que generalmente se ven afectados por otros procesos patológicos.

Estos índices enzimáticos en heces son de gran valor en pediatría, pero su interpretación debe ser diferente. Así, los recién nacidos presentan cantidades considerables de enterocinasa en heces, debido a que no tienen sistema destructor del enzima en el intestino grueso y las cantidades formadas son, precisamente, las apreciadas en las heces. De este modo, los disturbios nutricionales, resultado de enfermedades agudas o desórdenes alimenticios, se relacionan con una marcada disminución de la enterocinasa excretada en heces. Estos cambios son muy grandes en pacientes con síntomas clínicos pronunciados de hipertrofia. HEYMAN¹⁸¹ ha confirmado en casos de decrecimientos enzimáticos, como el indicado anteriormente, que la causa probable puede ser una rickettsiosis, que ataca frecuentemente a los niños.

Los índices de ciertos enzimas que caracterizan algunos aspectos de la actividad intestinal pueden ser utilizados en la práctica en relación con problemas médicos, siendo los fisiólogos y clínicos los que finalmente decidirán el valor diagnóstico de los mismos.

(Continuará)