

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

30 DE JUNIO DE 1959

NUMERO 6

REVISIONES DE CONJUNTO

LOS ENZIMAS EN EL DIAGNOSTICO CLINICO

F. GARCÍA FERRÁNDIZ y F. MAYOR ZARAGOZA

Departamento de Bioquímica del Instituto Español de
Fisiología y Bioquímica
Madrid

(Continuación)

PEPTIDASAS

Estos enzimas que, como su nombre indica, catalizan la hidrólisis de los péptidos, han sido encontrados en sangre por FLEISHER¹⁸², quien ha comunicado que la glicil-l-leucina es hidrolizada por una peptidasa leucocitaria que requiere Zn como cofactor y es de poca especificidad. Los linfocitos son más ricos en peptidasas que los leucocitos. Este autor¹⁸³ ha descrito las dipeptidasas y tripeptidasas sanguíneas, algunas de las cuales presentan cifras elevadas en ciertas condiciones patológicas^{182, 183}. El profesor J. LUCAS GALLEGOS ha publicado un extenso trabajo sobre el valor diagnóstico de las d-peptidasas séricas en cáncer, utilizando como substrato la d-leucil-glicil-glicina, encontrando que la actividad hidrolizante es mayor en los casos de sueros procedentes de enfermos cancerosos.

Utilizando como substrato el glicil triptofano, la acción peptidásica del líquido cefalorraquídeo es un índice de valor diagnóstico, puesto que sirve para diferenciar la meningitis tuberculosa, de resultado positivo, de los otros tipos de meningitis.

BURSTONE y colaboradores¹⁸⁴ han realizado pruebas histoenzimáticas de aminopeptidasas, utilizando como substratos la l-leucil.2.naftil amida y la dL-alanil.2.naftil amida. La 2 naftil amida liberada se copula con un compuesto azoico, dando un complejo coloreado estable.

ELDIN y WILKINSON¹⁸⁵ han determinado la actividad peptidásica de los glóbulos blancos de la sangre por medio de una técnica que utiliza el papel cromatográfico. Para ello, los leucocitos son separados y extraídos con glicerol al 30 por 100; el extracto es incubado con glicil-glicina, glicil-glicil-glicina o leucil-glicil-glicina. La glicina liberada se determina mediante cromatografía de papel. La acti-

vidad peptidásica por millón de leucocitos era alta en leucemias agudas y en leucemias mieloideas crónicas, pero normal en leucemias linfáticas crónicas y enfermedad de Hodgkin.

LONDON y colaboradores¹⁸⁶ han propuesto un nuevo método para la valoración de peptidasas, basado en la diferente densidad óptica del complejo cíprico de la diglicil-glicina y el producto de su hidrólisis.

PEPSINA

La pepsina es el único enzima importante del jugo gástrico. Como la tripsina y la quimotripsina, pertenece al grupo de las proteinasas. Hidroliza las proteínas a proteosas, peptonas y péptidos, sobre los que actúa la tripsina duodenal liberando sus constituyentes elementales en algunos casos y más generalmente dipéptidos y oligopeptidos, substratos de las peptidasas. La pepsina puede ser valorada en el jugo gástrico como índice de la función gástrica, pero no se considera habitualmente como una determinación muy útil. La pepsina casi nunca está ausente si existe ácido ClH libre en el jugo gástrico, puesto que el ClH es el inductor del paso de pepsinógeno a pepsina. Por este motivo, el examen del jugo gástrico se limita normalmente a determinaciones de ClH libre y total, y constituyentes anormales.

La pepsina se valora normalmente por medio de digestiones artificiales. Su investigación es conveniente hacerla sobre el quimo bruto (métodos de Mette y Kleiner), para lo cual utilizan claras de huevo que, filtradas, se disponen en tubos de vidrio de capacidad conocida y se introducen en baño a 85° C. La albúmina se coagula, obteniéndose unas tiras, que son empleadas en fragmentos exactamente medidos. Para valorar la actividad pépsica de una muestra, se mide exactamente la parte de cilindro de albúmina coagulada que ha sido digerido, y, según BORRISSOW, las longitudes de albúmina digeridas crecen en razón directa de las raíces cuadradas de las cantidades de pepsina contenidas en el jugo. Las cifras normales son de 2,8 a 3 mm., aunque la cantidad de pepsina suele expresarse por el cuadrado de la longitud de albúmina digerida en veinticuatro horas, a

37° C., en cuyo caso los valores normales están entre 7,44 y 9. La digestión de la caseína puede también servir para la determinación de pepsina; y la digestión realizada puede ser medida por el Kjeldahl o por el método de Willstätter. Es muy conveniente el método colorimétrico de ANSON y MIRSKY¹⁸⁷, que emplea la hemoglobina como substrato, valorando los grupos tirosínicos liberados por el método fenólico de Folin y Ciocalteu.

HEINKEL y colaboradores¹⁸⁸ han estudiado la pepsina y catepsina histoenzimáticamente en cuanto a su distribución en mucosa normal, gastritis superficial y gastritis atrófica, observando variaciones características.

Para la valoración histoenzimática de los enzimas proteolíticos se utiliza el método descrito por LINERSTRÖM, LANG y HOLTER¹⁸⁹, basado en la valoración acetónica de los grupos amino. En un trabajo posterior, el mismo autor¹⁹⁰ valora la actividad proteásica alcalimétricamente.

El plasma normal contiene importantes cantidades de pepsinógeno¹⁹¹, que son posiblemente de origen gástrico, encontrándose en pacientes con úlcera gástrica o de duodeno niveles de pepsinógeno en plasma muy elevados¹⁹² y¹⁹³, siendo bajos después de una gastrectomía subtotal, en casos de carcinoma de estómago y enfermos de anemia perniciosa. Cuando el nivel de pepsinógeno en plasma es bajo en casos de úlcera gástrica, indica la presencia de cáncer.

SCHAPIRA y colaboradores han indicado que el pepsinógeno plasmático no posee valor diagnóstico en la determinación de estados de ansiedad¹⁹⁴.

FABIANI y colaboradores¹⁹⁵ han realizado un extenso trabajo sobre las proteasas defensivas en las enfermedades infecciosas, discutiendo los valores prácticos de la reacción de Aberhalden en el diagnóstico de brucelosis humana y tuberculosis.

UROPEPSINA

A pesar de que la pepsina no ha sido hallada en la sangre, es verosímil que cierta cantidad de enzima entre en el torrente sanguíneo, probablemente directamente de las células secretoras gástricas, ya que un enzima parecido a la pepsina se encuentra en la orina, con las mismas propiedades que el obtenido del jugo gástrico: su pH de actuación óptimo es 1-2, depende de la presencia de iones Cl⁻ y posee las mismas características hidrolíticas. A este enzima se le llama normalmente uropepsina.

A pesar de que, por la facilidad de manejo, se han intentado sustituir las determinaciones de pepsina por las de uropepsina, parece que, hasta el momento, esta sustitución no es efectiva, puesto que los valores obtenidos en casos de úlcera gástrica y duodenal y carcinoma gástrico no concuerdan con los datos suministrados por la pepsina gástrica y con el diagnóstico. Sin embargo, la excreción de uropepsina aumenta en casos de "stress", por lo cual parece que la cantidad en orina de este enzima está parcialmente controlada por las glándulas adrenocorticales. BUCHER¹⁹⁶ ha publicado una revisión sobre este tema, y NACHELES y colaboradores¹⁹⁷ han estudiado el efecto de la cortisona sobre la secreción de uropepsina. El método utilizado para su valoración es el mismo que en el caso de la pepsina, empleando muestras de orina recogidas durante veinticuatro horas.

LEVY y LEVINE, en un amplio estudio¹⁹⁸ sobre el valor diagnóstico de esta determinación, concluyen

que, si bien es cierto que en algunos casos la cantidad de uropepsina decrece como consecuencia de una gastrectomía parcial, la vagotomía no afecta esta cantidad, no pudiéndose tomar la cantidad de uropepsina como índice de la secreción gástrica, según se pretendía. Sin embargo, en el mismo año, MENKYN y RAZUS¹⁹⁹ han recomendado la determinación de uropepsina como un test clínico simple y útil en el diagnóstico.

PEAK y colaboradores²⁰⁰ han sugerido un método más rápido para determinar la uropepsina que el de ANSON y MIRSKY¹⁸⁷, y han propugnado que su determinación es de gran valor en el diagnóstico de las enfermedades gastrointestinales, úlceras pépticas y carcinomas gástricos. Puede servir de prueba diferencial en anemias macrocíticas asociadas a una aclorhidria que no se altera por inyección de histamina, siendo posible excluir del diagnóstico la existencia de anemia perniciosa.

GRAY y colaboradores²⁰¹ han señalado que la uropepsina se incrementa en todos los estados de hiperactividad adrenal y han estudiado el posible valor de este enzima para distinguir la úlcera gástrica benigna de la maligna (adenocarcinoma de estómago). En la úlcera gástrica, la cantidad de uropepsina es sensiblemente mayor que el nivel normal y, a su vez, marcadamente menor que la cantidad excretada en casos de úlcera duodenal. El descenso de uropepsina es muy acusado en pacientes con cáncer gástrico, atrofia gástrica y anemia perniciosa. No se puede señalar como una prueba absoluta de diagnóstico, pero sí de utilidad como coadyuvante de otros datos. BALFOUR y colaboradores²⁰² han señalado que el propionato de testosterona aumenta la cantidad de uropepsina en orina. Contrariamente a los datos obtenidos por este autor, NACHELES y colaboradores¹⁹⁷ señalan que la administración de cortisona no aumenta la eliminación de uropepsina.

WOODWARD y colaboradores²⁰³ han comunicado que existe una clara relación entre la uropepsina excretada y la secreción de jugo gástrico.

FOSFOHEXOSA ISOMERASA

Es uno de los enzimas glucolíticos. En el metabolismo de la glucosa hay, en primer lugar, una fosforolisis, en la que se forma glucosa-1-fosfato; la molécula de fosfórico pasa después a la posición 6 en la molécula de la glucosa. El siguiente paso es el cambio de glucosa-6-fosfato en fructosa-6-fosfato, siendo la fosfohexosa isomerasa el enzima que lleva a cabo este último cambio. WARBURG y CHRISTIAN²⁰⁴ sugieren que existe una actividad glucolítica excesiva en tejidos cancerosos, encontrándose elevada la proporción de enzimas glucolíticas en plasma sanguíneo. BODANSKY²⁰⁵ ha comprobado que la determinación de fosfohexosa isomerasa en plasma puede ser de gran utilidad en la investigación del cáncer.

La determinación de la fosfohexosa isomerasa se basa en el paso de glucosa-6-fosfato a fructosa-6-fosfato, a pH 7,4 y 37° C. durante media hora. La fructosa-6-fosfato producida se valora por el método de Selivanov, con resorcinol y ácido clorhídrico (reacción específica de la fructosa). Se ha observado que no hay diferencia en los niveles enzimáticos de personas sanas y de las que están enfermas de afecciones no cancerosas.

En pacientes que sufren carcinoma metastásico en el pecho hay un grado de correlación entre el crecimiento de tumores secundarios y óseos y el nivel de fosfohexosa isomerasa en el plasma, acompañado de

la excreción de calcio aumentada en la orina, probablemente como resultado de la invasión del esqueleto por el crecimiento tumoral. La fosfohexosa isomerasa está muy elevada en tumores de hígado, pero en este caso no hay elevación en la excreción urinaria de calcio^{205 b}. Este enzima es un buen índice para determinar el crecimiento o regresión de las metástasis secundarias en el hueso y en el carcinoma de próstata. Hay correlación entre las fosfatasas ácida y alcalina y este enzima^{205 c}. La determinación de la fosfohexosa isomerasa, junto a la deshidrogenasa del ácido málico, tiene valor diagnóstico en hepatitis aguda y en el infarto de miocardio, donde se registran valores muy elevados. BRUNS y colaboradores^{206 a} han valorado la fosfohexosa isomerasa en líquido cerebroespinal, encontrando normalmente en individuos sanos una actividad más elevada que en el suero sanguíneo.

BRUNS y colaboradores han revisado el valor diagnóstico de este enzima^{206 b}.

TRANSAMINASAS

La transaminación es una de las reacciones enzimáticas más importantes del metabolismo nitrogenado. Las transaminasas catalizan las transferencias reversibles de grupos aminos entre los ácidos alfa-aminicos y los ácidos alfa-cetónicos. El número de estos enzimas descubiertos hasta la fecha es muy elevado, y han ocupado el interés de gran número de investigadores, tanto por su papel metabólico como por su aplicación a la clínica.

BRAUNSTEIN y KRITZMAN fueron los primeros que estudiaron las transaminasas en los tejidos animales, destacando su importancia en la biosíntesis de los aminoácidos. COHEN encontró dos sistemas transaminásicos en el músculo cardíaco, uno de ellos formaba alanina y ácido alfa-cetoglutárico a partir de ácido glutámico y ácido pirúvico, y el otro, ácido alfa-cetoglutárico y ácido aspártico, a partir de ácido glutámico y ácido oxalacético. Se hallan también en músculo esquelético, cerebro, hígado, riñones, testículos y pulmones, siguiendo el orden decreciente de concentración.

LA DUE y colaboradores²⁰⁷ comunicaron, en 1954, que la transaminasa glutámico-oxalacética en suero se encontraba considerablemente alterada en infarto de miocardio y enfermedades hepatocelulares. KARMEN y colaboradores²⁰⁸ encontraron que el enzima estaba presente en todas las muestras de suero humano ensayado. RUDOLF y colaboradores²⁰⁹ produjeron infartos experimentales mediante clampaje de las venas coronarias, pulmonares, esplénicas y mesentéricas, y encontraron, en consecuencia, considerables incrementos de la actividad transaminásica sérica. La cantidad de transaminasa probablemente refleja la cantidad de tejido afectado por el proceso patológico.

AGRESS y colaboradores²¹⁰ provocaron asimismo infartos de miocardio en perros, encontrando un claro paralelismo entre la cantidad de tejido lesionado estimado en la autopsia y los niveles de transaminasa sérica que aparecieron elevados de nueve a veintitrés horas después de producida la lesión. La hipoxemia de corta duración no produjo aumento en la actividad enzimática. Los niveles altos de transaminasa reflejarán, pues, la existencia de estados necróticos, o bien de un trauma intenso del músculo esquelético. CHINSKY y colaboradores²¹¹ realizaron estudios sobre transaminasas en gran número de en-

fermos afectos de infartos de miocardio agudo, destacando que, habitualmente, los niveles del enzima llegan a ser notablemente altos después del umbral del dolor de pecho, alcanzando la cifra máxima unas veinticuatro horas después, regresando gradualmente a la normalidad, que se alcanza del tercero al sexto día. KATTUS y colaboradores²¹² encontraron resultados muy parecidos en lo que se refiere al control enzimático y al efecto patológico. Todos estos autores encontraron valores altos en casos de hepatitis y cirrosis, aunque en este último caso de afección hepática los niveles eran más discretos. En la ictericia obstructiva los incrementos encontrados fueron variables y moderados. La utilidad de esta determinación en el estudio de las disfunciones hepáticas permanece todavía en vías de exploración.

MOLANDER²¹³ ha indicado que los niveles de transaminasa sérica en casos de cirrosis son función de la lesión hepatocelular activa.

La aplicación clínica de las determinaciones de transaminasas en suero ha sido estudiada recientemente por varios autores²¹⁴⁻²¹⁶. La transaminasa glutámico-oxalacética aumenta también en las enfermedades neurológicas que afectan al músculo esquelético, como la dermatomiositis, pudiendo persistir los niveles elevados durante varias semanas²¹⁷. GREEN y colaboradores²¹⁸ encontraron que la actividad transaminásica se halla especialmente elevada en líquido cefalorraquídeo en un alto porcentaje de enfermos afectos de lesiones cerebrales, aunque los niveles séricos permanecieron normales, sugiriendo que la determinación de transaminasa en líquido cefalorraquídeo puede ser útil en la determinación de dolencias neurológicas.

La actividad de la transaminasa glutámico-pirúvica es relativamente mayor en el hígado que en los otros tejidos, comparada con la glutámico-oxalacético transaminasa. WROBLESKY y colaboradores²¹⁹ y MOLANDER y colaboradores²²⁰ sugieren que la medida de esta transaminasa puede ser, en consecuencia, más sensible que la oxalacética en la determinación de lesiones hepatocelulares agudas.

La actividad transaminásica puede medirse mediante varios métodos²²¹ a²²³. Uno de los más utilizados^{208, 224} consiste en determinar espectrofotométricamente la oxidación del difosfopiridin-nucleótido reducido (DPNH) que se produce cuando la malicodeshidrogenasa actúa sobre el oxalacético formado, junto con el glutámico, en la reacción de transaminación. TONHAZY y colaboradores²²⁵ propusieron un método de valoración, en el cual el ácido oxalacético formado es convertido en ácido pirúvico con citrato de anilina. El ácido pirúvico es entonces determinado por su reacción con la 2, 4 dinitrofenilhidrazina. Este método no posee una gran especificidad, puesto que algunos ácidos alfa-cetoínicos reaccionan con la 2, 4 dinitrofenilhidrazina. HENLEY y POLLARD²²⁶ modificaron el método de TONHAZY, convirtiendo el ácido oxalacético en ácido pirúvico mediante el calor, el cual se determina con deshidrogenasa láctica, midiendo la oxidación del DPNH espectrofotométricamente, dado que el DPNH posee, a 340 milimicras, una densidad óptica notablemente mayor que la del difosfopiridin nucleótido. Otro método que ha sido utilizado tradicionalmente para la determinación de transaminasa se basa en la medida del ácido glutámico formado mediante su descarboxilasa específica²²⁷. Tanto el espectrofotómetro como los enzimas necesarios para los métodos que acabamos de citar no son fácilmente asequibles. La extensión que a esta determinación confiere su indudable interés en diag-

néstico vendría limitada por la dificultad de manejo. CABAUD y colaboradores²²⁸ expusieron un método colorimétrico sobre la base del de TONHAZY y DUBACK²²⁹ simplificándolo enormemente. Se basa en que la hidrazone formada se extrae con tolueno y se convierte, en medio alcalino, en un compuesto de color rojo, cuya intensidad se mide fotométricamente. La intensidad del color es proporcional a la cantidad de ácido pirúvico formado.

WEST y colaboradores²³⁰ han comunicado que la cantidad de transaminasa glutámico-oxalacética no se eleva normalmente en leucemias y granulosis crónicas. Los mismos autores²³¹ han constatado los valores normales de este enzima en el embarazo y recién nacidos. LATNER y SMITH²³² han propuesto la relación transaminasa/fosfatasa alcalina en suero sanguíneo para el diagnóstico diferencial de la ictericia, que da resultados correctos en el 86 por 100 de los casos, siendo mejores que los obtenidos hasta la fecha con las pruebas combinadas de fosfatasa alcalina en suero y de flocculación con timol. FISKE y colaboradores²³³ han estudiado los valores de transaminasa sérica después de colecistotomía, histerectomías, etc. DENNY y colaboradores²³⁴ lo han estudiado en el infarto pulmonar, habiendo realizado WROBLESKY²³⁵ una revisión sobre el significado clínico de las alteraciones de transaminasa sérica. La relación de la transaminasa con otras condiciones fisiológicas y patológicas ha sido tratada por muchos autores²³⁶⁻²⁴³.

SIEGEL y colaboradores²⁴² han estudiado los niveles de transaminasa, aldolasa, isomerasa y deshidrogenasa mática en el caso de afecciones cardíacas. KESSLER²⁴³ ha comprobado los niveles de transaminasa en casos normales y patológicos. Los valores más elevados son los del infarto de miocardio, enfermedades hepáticas y traumas musculares. Sin embargo, la prueba es negativa en el caso de angina pectoral, insuficiencia coronaria, arritmias, estados inflamatorios, infecciones, terapia digitalica y enfermedades congénitas degenerativas y alérgicas.

COBE y colaboradores²⁴⁴ han estudiado la actividad enzimática en período perinatal, y ALBAUM y colaboradores²⁴⁵, después de traumatismos locales, haciendo BONATI y colaboradores²⁴⁶ después de shocks quirúrgicos. PARIANTE ha estudiado la transaminasa en líquido cefalorraquídeo²⁴⁷.

La glutámico-pirúvico transaminasa es especialmente interesante para la determinación de la hepatitis, puesto que el aumento de su actividad se puede observar hasta cuatro semanas antes de la manifestación de los síntomas clínicos, por lo que la determinación de la misma se incluye en la investigación previa obligada de los donadores de sangre en los Estados Unidos.

HERBST²⁴⁸ y el doctor MARTÍNEZ VICTORIA²⁴⁹ han publicado revisiones sobre este tema.

COBREOXIDASA

La ceruloplasmina es una alfa-globulina que contiene cobre y que existe en la sangre humana. Fue aislada en 1948 por HOLMBERG y LAURELL²⁵⁰. Los mismos autores demostraron su actividad oxidásica utilizando la parafenilendiamina como sustrato. SCHEIMBERG y colaboradores²⁵¹, BEARN y colaboradores²⁵² y KUNNINGS y colaboradores²⁵³ encontraron que los valores de esta oxidasa, decrecía sensiblemente en sangre en la enfermedad de Wilson (degeneración hepatolenticular), que se caracteriza por un

incremento en la excreción urinaria de aminoácidos y de cobre. La determinación de cobreoxidasa puede ser útil en esta enfermedad, puesto que hace posible detectar incipientes degeneraciones hepatolenticulares antes de que la enfermedad se haya manifestado claramente. MARLOWITZ y colaboradores²⁵⁴ estudiaron la concentración de ceruloplasmina y la actividad oxidásica en sueros de sujetos normales, mujeres embarazadas y pacientes afectos de infecciones y síndromes nefríticos. La actividad de la cobreoxidasa aumenta en el embarazo y en las infecciones. Este enzima se encuentra ocasionalmente disminuido en las nefrosis, debido seguramente a las pérdidas de ceruloplasmina en orina. VALLES²⁵⁵ ha encontrado una elevación persistente de este enzima después de infartos de miocardio agudos. Al igual que la aldolasa y transaminasa, la cobreoxidasa puede ser una determinación útil en las cardiopatías. AKERFELDT²⁵⁷ ha demostrado que los enfermos mentales (no simples neuróticos) tienen doble cantidad de ceruloplasmina en suero sanguíneo. ABOOD ha confirmado estos resultados en el 81 por 100 de los enfermos afectos de esquizofrenia.

Para su determinación se utiliza el método de RAVIN²⁵⁶, procedimiento colorimétrico sencillo que utiliza como sustrato la parafenilendiamina, la cual, por la acción del enzima, se oxida, produciendo coloración. La prueba es muy sencilla y de suficiente exactitud.

ALDOLASA

En la glicolisis, una vez formado el fructosa-6-fosfato por la acción de la fosfohexosa isomerasa, éste adquiere una nueva molécula de fosfato, transformándose en fructosa-1,6-difosfato, el cual, por la acción de la aldolasa, se rompe en dos moléculas tricarbonadas: gliceraldehído fosfato y dihidroxiacetona fosfato, que están en equilibrio, controlado por la triosa-fosfato-isomerasa. La aldolasa fue descubierta por MEYERHOFF y LOHMANN²⁵⁸ y se encuentra en músculo, cerebro, bazo, eritrocitos, hígado y riñones. WARBURG y CHRISTIAN²⁵⁹ encontraron aumentada la cantidad de aldolasa, de manera regular, en el suero de ratas con sarcoma de Hensen, resultados que fueron confirmados posteriormente en algunos pacientes cancerosos²⁶⁰. BAKER y GOVAN²⁶¹ observaron niveles altos de aldolasa en el suero de pacientes con carcinoma prostático en estado adelantado, y que los tratamientos terapéuticos (estrógenos) que reducían la actividad del crecimiento canceroso, disminuían también el nivel de aldolasa en sangre (suero). Los resultados observados estaban de acuerdo, en general, con los obtenidos con la fosfatasa ácida. En distrofias musculares progresivas, la aldolasa sérica está elevada²⁶². Los músculos esqueléticos son una fuente especialmente rica en aldolasa, de tal modo que, cuando las células musculares se desintegran y pierden su permeabilidad selectiva, su contenido queda vertido en la corriente circulatoria. En otras enfermedades que van acompañadas de atrofia muscular, como la distrofia miotómica, la parálisis bulbar, poliomielitis y polineuritis, no se observa aumento de este enzima en suero²⁶³⁻²⁶⁶.

SIBLEY y colaboradores²⁶⁷ encontraron un incremento de aldolasa sérica en varias circunstancias clínicas, incluyendo el infarto pulmonar, y sugirieron que se debía a la liberación del enzima por las células afectadas. VOLK y colaboradores²⁶⁸ han encontrado una estrecha relación entre los estados necróticos del miocardio y los niveles séricos de aldolasa.

La determinación de aldolasa es especialmente importante en el caso de enfermos con hepatitis aguda, donde se encuentra muy elevada²⁶⁹. Un aumento mucho más discreto se encuentra en los casos de cirrosis, hepatitis latente y obstrucción biliar²⁷⁰. La elevación de aldolasa en sangre precede en tres días por regla general a la de bilirrubina, siendo, por tanto, normal que a un nivel alto de aldolasa corresponda un nivel alto de bilirrubina. Hasta ahora, las modificaciones del hierro y cobre en el suero se consideraban como el criterio más importante para el diagnóstico de la hepatitis aguda.

La posible trascendencia de la aldolasa en el diagnóstico de la hepatitis vírica ha sido destacada por HOREJSI y colaboradores²⁷¹.

El efecto de la altitud sobre la actividad aldolásica en músculo esquelético y corazón ha sido estudiada muy recientemente por LENTI y GRILLO²⁷², y FRIEDMAN y colaboradores²⁷³ han realizado investigaciones sobre la cantidad de aldolasa durante el período perinatal.

Para la determinación de aldolasa se utiliza como sustrato la fructosa-1,3-difosfato. El método colorítmico de Sibley y Lechninger²⁷⁴ está basado en la valoración de las triosas, producto de la hidrólisis, por medio de la 2,4-dinitrofenilhidrazina, previniendo la isomerización del gliceraldehido-fosfato a dihidroxiacetona-fosfato— puesto que la triosafosfatoisomerasa se encuentra en el suero sanguíneo— por la hidrazina. SCHAPIRA y colaboradores han modificado este método. Otro procedimiento consiste en la hidrogenación del dihidroxiacetonafosfato por medio de glicerofosfatodehidrogenasa en presencia de DPNH, dando glicerofosfato.

LÁCTICO-DESHIDROGENASA

Este enzima cataliza la interconversión de los ácidos láctico y pirúvico, siendo un componente importante de los tejidos glandular y muscular. Se encuentra en mayor proporción en los eritrocitos, hígado y miocardio. WROBLESKY y LA DUE²⁷⁵ fueron, como en el caso de la transaminasa, los introductores de este enzima para el diagnóstico de las enfermedades internas. Especialmente en el caso del infarto de miocardio, la actividad de la láctico-deshidrogenasa sérica es muy notable, habiendo paralelismo entre la cantidad de enzima y el tamaño de la lesión o zona necrosada. Si bien el aumento de este enzima es a veces más manifiesto que el de la transaminasa, su aparición en suero es más lenta. La actividad de la láctico-deshidrogenasa no aparece aumentada en el caso de aquellas enfermedades que entran dentro del diagnóstico diferencial del infarto de miocardio: embolia pulmonar, pericarditis, anginas graves y colecistitis aguda. WHITE²⁷⁶ ha realizado un estudio comparativo del valor diagnóstico de la transaminasa y la láctico-deshidrogenasa. En ambos casos, cualquier alteración que cause la destrucción de tejidos eleva los niveles normales.

Algunas enfermedades de la sangre van acompañadas de una elevación de este enzima en suero²⁷⁷: leucemia mieloide, trombocitopenia y leucemia linfática aguda y crónica. Del mismo modo, la anemia perniciosa no tratada manifiesta valores que están de 5 a 25 veces por encima del nivel normal²⁷⁸. Las anemias hemorrágicas no presentan modificaciones manifiestas. En el caso de la linfogranulomatosis aumenta la cantidad de enzima. La láctico-deshidro-

nasa presenta, además, mucho interés en el caso de las enfermedades hepáticas en tanto que en la hepatitis "a virus" sólo se produce un aumento ocasional, en las metástasis hepáticas tiene lugar una elevación manifiesta²⁷⁹. También se han encontrado sensibles aumentos en el embarazo. Después de la fase aguda de una lesión de miocardio, la láctico-deshidrogenasa persiste más tiempo en suero que cualquier otro fermento glucolítico.

Su actividad se mide espectrofotométricamente, debido a la oxidación del DPNH en el paso de piruvato a lactato. CABAUD²⁸⁰ ha introducido un método colorítmico basado en la valoración del ácido pirúvico no transformado con la 2,4 dinitrofenilhidrazina.

GAVOSTO y colaboradores²⁸¹ han estudiado la actividad de la láctico-deshidrogenasa sérica en varios estados patológicos, comprobando las modificaciones citadas anteriormente y discutiendo la importancia de la determinación en clínica práctica. Su determinación en líquido cefalorraquídeo ha sido realizada por BRUNS y colaboradores²⁸², comprobando WROBLESKY y colaboradores²⁸³ que la láctico-deshidrogenasa aumenta en líquido cefalorraquídeo por afecciones del sistema nervioso central, tales como el carcinoma metastásico, linfoma y lesiones leucémicas.

WEST y colaboradores²⁸⁴ han encontrado valores elevados en leucemias y granulosis crónicas no tratadas. Los mismos autores²⁸⁵ han encontrado valores altos de láctico-deshidrogenasa en las mujeres embarazadas y en los niños recién nacidos.

MCDONALD y colaboradores²⁸⁶ han resaltado el valor diagnóstico de la láctico-deshidrogenasa en infartos de miocardio, indicando que su presencia en suero se halla exaltada en casos de necrosis hepato-ocular metastásico, acidosis diabética, anemia falciforme, linfoma maligno, mononucleosis infecciosa e infarto cerebral.

DESOXIRIBONUCLEASA

Las desoxiribonucleasas actúan despolimerizando hidrolíticamente a los ácidos desoxiribonucleicos. Si bien sus propiedades son parecidas, en términos generales, presentan peculiaridades que justifican la. Las ribonucleasas del timo y esplénica sólo han sido altamente purificadas, lográndose su cristalización. Las ribonucleasas del timo y esplénica sólo han sido parcialmente purificadas. Precisan Mg u otros iones divalentes para su actividad, y su pH óptimo es 7 en la pancreática; 5,2 la del timo, y 7,5 en la sérica. La actividad de la desoxiribonucleasa se mide por la cantidad de desoxipentosa-fosfato, ácido soluble formado al actuar el enzima sobre desoxiribonucleato sódico. (Método de LASKOWSKI²⁸⁷, modificado por ALLFREY y MIRSKY²⁸⁸.) La aparición de producto se mide por el procedimiento de Dische²⁸⁹, convirtiendo las densidades ópticas obtenidas a equivalentes de desoxipentosa-fosfato. El método espectrofotométrico de KUNITZ²⁸⁸ es también muy utilizado.

En el suero de pacientes con pancreatitis hemorrágica y en animales con pancreatitis producida por etionina, se ha encontrado elevada la desoxiribonucleasa pancreática. El nivel sérico enzimático sólo se eleva ligeramente en el caso de pancreatitis ademá-tosa. La cantidad está en relación con la necrosis del tejido pancreático²⁹⁰. La actividad de la desoxiribonucleasa en tejidos normales y neoplásicos ha sido estudiada recientemente²⁹⁰.

RIBONUCLEASAS

Son los enzimas capaces de hidrolizar a los ácidos ribonucleicos. Como en el caso de la desoxiribonucleasa, el páncreas es una fuente enzimática especialmente rica. La hidrólisis de los ácidos ribonucleicos va acompañada de un cambio en el espectro de absorción ultravioleta del sustrato. Este fenómeno ha sido utilizado para su valoración²⁹¹. Uno de los métodos más difundidos está basado en el hecho de que, durante la hidrólisis de los ácidos ribonucleicos por la ribonucleasa, el 40 por 100 del fósforo total de los ácidos nucleicos se convierte en una forma soluble en acetato de uranio (reactivo de McFadyen). El fósforo total ("fósforo soluble") se determina por el método de KING²⁹², empleándose una modificación debida a KUNITZ²⁹³.

Su actividad se inhibe por el calcio y el magnesio, y su pH óptimo es 7,2.

LEDOUX y colaboradores²⁹⁴ han estudiado el efecto de la ribonucleasa sobre los tumores de ascitis, y en los crecimientos neoplásicos²⁹⁵. El mismo autor²⁹⁶ ha comunicado que tanto la ribonucleasa como la xantino-oxidasa son cancerostáticas en los tumores de ascitis. BRODY y colaboradores²⁹⁶ han estudiado la actividad de este enzima en tejidos normales y cancerosos. DOHI y colaboradores²⁹⁷ han constatado el aumento de la actividad ribonucleásica en sueros después de nefrectomías bilaterales y ligadura temporal de los pedículos renales, destacando el posible interés de esta actividad enzimática en el fallo renal. KOVACS²⁹⁸ ha realizado un estudio de ribonucleasas, desoxiribonucleasas, nucleotidasas y alcalinofosfatas en casos de poliomielitis.

BETAGLUCURONIDASA

Este enzima produce la hidrólisis de los betaglucuronidos. Su distribución es muy amplia, encontrándose prácticamente en todos los tejidos, glándulas y humores animales. El hígado es especialmente rico en este enzima. Su papel fisiológico está estrechamente relacionado con la acción de los estrógenos, andrógenos y hormonas corticales. FISHMAN²⁹⁹ observó que la betaglucuronidasa uterina de animales ovariectomizados era notablemente menor que la de los animales no sometidos a esta intervención. Los niveles se hacían normales después de la administración de estrógenos. Con progesterona no se lograba este efecto. La betaglucuronidasa de glándulas mamarias se comportaba de un modo similar a la uterina³⁰⁰. BEYLER y SZEGO³⁰¹ encontraron un comportamiento similar en las glándulas prepuciales. La administración de andrógenos producía también el incremento de la betaglucuronidasa renal³⁰². La capacidad estimulante en riñón está prácticamente limitada a los andrógenos. Algunas hormonas adrenocorticales, que son precursoras de andrógenos, tienen poca actividad. FISHMAN³⁰³ ha publicado una extensa revisión sobre las relaciones hormonas-enzima. Propone también la betaglucuronidasa como índice de crecimiento, que LEVY³⁰⁴ explica por la alta actividad betaglucuronidásica en tejido canceroso y en endometrio uterino durante el ciclo menstrual. La función precisa del enzima no ha sido exactamente interpretada hasta la fecha, si bien es cierto que, tanto su general localización como su nivel sérico, aumentando en casos particulares y sujetos a variaciones endocrinas, le confiere un importante papel en el diagnóstico.

Para la valoración de la betaglucuronidasa pueden ser empleados diversos sustratos. El fenoltaleinglucurónido es uno de los más empleados. El método se basa en la medida fotométrica de la fenoltaleína al alcalinizar el medio después de la incubación³⁰⁵. Otro sustrato utilizado es el p-hidroxidifenil-glucurónido, en el cual el fenol liberado produce coloración con el reactivo de Folin-Cibalteu³⁰⁶. Otros métodos se basan en el empleo de distintos sustratos, tales como el p-clorfenilglucurónido, 8-hidroxiquinolin-glucurónido, 8-benzoil-amino-2naftil-glucurónido y el 2-naftil beta-D-glucopiruronídeo³⁰⁷⁻³¹⁰.

PENNATONI y colaboradores³¹¹ han determinado la actividad enzimática en homogenados de placenta y feto, destacando la sobresaliente actividad betaglucuronidásica del tejido placentario. DYRBYE y colaboradores³¹² han demostrado la presencia de este enzima en las paredes arteriales y venosas, comunicando que los valores encontrados en la aorta y arteria pulmonar son de 50 a 100 veces mayores que los del plasma humano. PELLEGRINO y colaboradores³¹³ han estudiado la concentración de betaglucuronidasa en casos de denervación atrófica experimental, y ANYLAN y colaboradores³¹⁴, y FOLLETE y colaboradores³¹⁵ han estudiado este enzima en leucemias y linfomas. ODELL y McDONALD³¹⁶ han estudiado la actividad betaglucuronidásica sérica durante la toxemia del embarazo, habiéndolo hecho este mismo autor y BURT³¹⁷ sobre los niveles de betaglucuronidasa sérica en relación al diagnóstico de las mioplasias uterinas, especialmente en relación a los cervicarcinomas. Para conocimiento y diagnóstico del cáncer ha sido determinada en suero y líquido ascítico y pleural³¹⁸, espinal y ventricular³¹⁹, y vaginal³²⁰. Los niveles de β -glucuronidasa sérica han sido asimismo estudiados intensamente en un gran número de estados patológicos³²¹ y durante el tratamiento del cáncer de pecho³²² y de cervix³²³. La β -glucuronidasa de leucocitos ha sido estudiada en varios tipos de leucemia^{314, 315, 324}. BOYLAND y colaboradores³²⁵ han comunicado la relación de niveles altos de β -glucuronidasa urinaria con el carcinoma de vejiga. Otros estudios clínicos se refieren a los niveles de betaglucuronidasa en casos de tuberculosis³²⁶⁻³²⁷ y enfermedades dentales.

La histoenzimología de la β -glucuronidasa se ha llevado a cabo empleando como sustrato el 9-hidroxiquinolin-glucurónido, propuesto por FRIENDENWALD y BECKER³²⁸, modificado posteriormente por BURTON³²⁹. SELIGMAN y colaboradores³³⁰ y RIOTTON y FISHMAN³³¹ han estudiado su localización en distintos tejidos.

MÁLICODESHIDROGENASA

BING y colaboradores³³² han encontrado valores notablemente altos de deshidrogenasa-málica en suero en casos de infarto de miocardio agudo y hepatitis, así como en estados de hipertiroidismo.

Este enzima cataliza la reacción de ácido málico a ácido oxalacético en presencia de DPN. Se encuentra en músculo cardíaco, músculo esplénico, hígado, etc., estando localizado en mitocondria. Se determina por la medida de la velocidad de oxidación de DPNH, en presencia de enzima y exceso de ácido oxalacético, determinando la extinción a 340 milímicras.

HEAS y GEHRN³³³ han estudiado las variaciones de la málicodehidrogenasa en suero, en relación con la hepatitis epidémica, infecciosa y crónica. También la poliartritis aguda produce variaciones en el nivel

89. URATA, G.—J. Biol. Tokyo, 44/6, 359, 1958.
90. LEWISON, E.—Surg. Gynecol. Obstet., 72, 202, 1941.
91. NAHAFFEY, J. H. et al.—Surg. Gynecol. Obstet., 101, 129, 1955.
92. DOZZY, D. M.—Arch. Intern. Med., 68, 232, 1941.
93. HOWELL, C. W. et al.—Gastroenterology, 16, 309, 1950.
94. VOGOCH, A. et al.—Gastroenterology, 26, 697, 1954.
95. LAXON, E. Y. et al.—Arch. Intern. Med., 99, 607, 1957.
96. McCORKLE, H. et al.—Surg. Gynec. Obstet., 74, 439, 1942.
97. CAUDEL, S. et al.—Ann. Intern. Med., 25, 88, 1946.
98. WALLAMAN, I. S. et al.—Lancet, i, 1.105, 1955.
99. CHERRY, I. S. et al.—Ann. J. Physiol., 100, 266, 1932.
100. BUNCH, L. D. et al.—Clin. Chem., 2, 75, 1958.
101. NORTMAN, M. M. et al.—J. Lab. Clin. Med., 33, 833, 1948.
102. GOLDSTEIN, N. B. et al.—J. Lab. Clin. Med., 33, 1.047, 1948.
103. CHOTEAU, J. et al.—Bull. Soc. Chim. Biol., 38/11, 1.329, 1956.
104. TURA, J. et al.—J. Lab. Clin. Med., 38, 308, 1951.
105. RONA, P. et al.—Biochem. Z., 31, 345, 1911.
106. SABOTKA, H. et al.—Biol. Chem., 105, 199, 1934.
107. RONA, P. et al.—Biochem. Z., 152, 504, 1924.
108. PETERSEN, W. E.—Laboratorio, 17, 39 y 97, 1954.
109. GOMORI, G.—Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 58, 362, 1945.
110. GOMORI, G.—Arch. Pathol., 41, 121, 1946.
111. BEEDEL et al.—Biochem. J., 37, 59, 1943.
112. VORHANS, L. J. et al.—Ann. J. Med., 14, 707, 1953.
113. NACHMANNSON, K. B. et al.—The Enzymes, 1/1, 443, 1950.
114. STEEDMAN, E. et al.—Biochem. J., 26, 2.056, 1932; idem, 29, 2.107, 1935.
115. BRAUN, H. V. et al.—Arch. Indust. Hyg., 1, 633, 1950.
116. VAHLQUIST, B.—Scand. Arch. Physiol., 72, 133, 1935.
117. BOVET, O. et al.—Compt. Rend. Soc. Biol., 135, 844, 1941.
118. PLINCK, T.—J. Gen. Physiol., 31, 289, 1938.
119. SAWYER, G. H.—J. Exptl. Food, 94, 1, 1943.
120. SAWYER, G. H. et al.—J. Lab. Clin. Med., 33, 203, 1948.
121. ALLES, G. A. et al.—J. Biol. Chem., 133, 375, 1940.
122. GLICK, T.—Biochem. J., 31, 521, 1937 y Am. J. Lab. Pathol., 22, 1.126, 1952.
123. MICHEL, H. O.—J. Lab. Clin. Med., 34, 1.554, 1949.
124. MARCHAUD, J. F.—J. Amer. Med. Assoc., 149, 738, 1952.
125. McDONALD, W. E. et al.—Am. Arch. Indust. Hyg., 6, 271, 1952.
126. ALBRIG, W. M. et al.—Brit. Med. J., 1945-1952.
127. CALLAWAY, S. et al.—Brit. Med. J., 2, 812, 1951 y Am. J. Clin. Pathol., 26, 945, 1956.
128. AMMON, R. et al.—Pfugers Arch. Ges. Physiol., 233, 486, 1934.
129. SUMMER, J. B. et al.—Chemestry and methods of enzymes, pág. 73, 1953.
130. FLEISHER, J. H. et al.—Arch. Indust. Hyg. Occup. Med., 9, 323, 1954.
131. HERSTING, S.—J. Biol. Chem., 180, 240, 1949.
132. GAL, E. H. et al.—Clin. Chim. Acta, 2, 316, 1957.
133. RAVINE, H. A. et al.—J. Biol. Chem., 191, 843, 1951.
134. SABINE, J. C.—J. Clin. Invest., 19, 833, 1940 y Blood, 10, 1.132, 1955.
135. SCUDAMORE, H. J. et al.—Blood, 6, 1.260, 1951.
136. SABINE, J. C.—Blood, 6, 151, 1951.
137. BRIDCHARD, A. et al.—J. Lab. Clin. Med., 47, 98, 1956.
138. MCARDLE, B.—Quart. J. Med., 9, 107, 1940.
139. VORHAUS, L. J. et al.—Gastroenterology, 15, 304, 1950.
140. MOERE, C. B. et al.—Am. J. Med. Sci., 234, 538, 1957.
141. BIGGS, H. G. et al.—Am. J. Clin. Pathol., 30, 181, 1948.
142. LEHMANN, H. et al.—Lancet, 271/6.934, 124, 1956.
143. WEBSTER, G. R. et al.—Guy's Hospital Rev., 106/4, 239, 1957.
144. PATHAK, M. A. et al.—Indian J. Med. Sci., 11, 588, 1957.
145. LODI, A. et al.—Giornale de Clinica Med., 33, 360, 1952.
146. MORAND et al.—Presse Med., 12, 131, 1947.
147. FREMONT-SMITH, K. et al.—Laboratorio, 16/92, 197, 1953.
148. GAUTIER-PIROTTE, M. et al.—Arch. in Physiol., 64/1, 20, 1956.
149. GIACOBINNI et al.—Nature, 177/4.500, 185, 1956.
150. DENNY JR., E. H. et al.—Science, 123/3.205, 987, 1956.
151. KOELLE, G. B. et al.—Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 70, 617, 1949.
152. KOELLE, G. B. et al.—J. Pharmacol. Exptl. Therap., 103, 153, 1951.
153. COUTEAUX, R. et al.—Arch. Anat. Microscop. et Morphol. Exptl., 41, 352, 1952.
154. ZAJICEK, J.—Acta Physiol. Scand., 40, 138, 1957.
155. BECKETT, F. B. et al.—Nature, 179, 771, 1957.
156. HUGGINS, C. et al.—J. Biol. Chem., 170, 467, 1947.
157. NACHLAS, M. M. et al.—J. Nat. Cancer Inst., 9, 415, 1949.
158. SELIGMAN, A. M. et al.—J. Clin. Invest., 29, 31, 1950.
159. AUGUSTINSSON, K.—Acta Physiol Scand., 35/1, 40, 1955.
160. BACH, S. J. et al.—Biochem. Biophys. Acta, 28, 168, 1958.
161. GOUTIER, R.—Biochem. Biophys. Acta, 19, 524, 1956.
162. KUNITZ, M. et al.—J. Gen. Physiol., 19, 991, 1936.
162. b. Idem id. id. id., 22, 293, 1939.
162. c. Idem id. id. id., 22, 429, 1939.
162. d. Idem id. id. id., 25, 53, 1941.
162. e. Idem id. Enzymologia, 7, 1, 1939.
163. SCHIERGE, M.—Z. Ges. Inn. Med., 11/6, 247, 1956.
164. CHARNEY, J. et al.—J. Biol. Chem., 140, 711, 1947.
165. KUNITZ, M.—J. Gen. Physiol., 30, 291, 1947.
166. ANSON, M. L.—J. Gen. Physiol., 22, 79, 1939.
167. AGREEN, G. et al.—Acta Med. Scand., 90, 224, 1936.
168. PAYNE, W. W.—Great Ormond St. J., 3, 23, 1952.
169. ROVERY, M. et al.—Biochem. Biophys. Acta, 14, 145, 1954.
170. LASKOWSKI, M.—Federation Proc., 13, 326, 1954 y J. Biol. Chem., 213, 609, 1954.
171. BERGMANN, M.—Adv. in Enzymology, 2, 49, 1942.
172. NEURAT et al.—J. Biol. Chem., 172, 221, 1948.
173. PARKS, R. E. et al.—J. Biol. Chem., 203, 755, 1953.
174. RAVIN, H. A. et al.—J. Biol. Chem., 208, 1, 1954.
175. WEST et al.—Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 71, 169, 1949.
176. GUIDETTI, L. et al.—Minerva Med., 47 (II)/63, 354, 1953 y Laboratorio, 24/143, 421, 1957.
177. HOMBURGER—Cancer, 3, 143, 1950.
178. WEST et al.—Cancer, 4, 177, 1951.
179. SHLYGIN, G. K.—Clin. Chim. Acta, 1, 421, 1956.
180. Idem—Biokimia, 15, 569, 1950 e ibid., 19, 437, 1954.
181. HEYMAN, W. Z.—Kinderheilk., 55, 92, 1933.
182. FLEISHER, G. A.—J. Clin. Invest., 32, 674, 1953.
182. b. Idem—J. Biol. Chem., 206, 637, 1954.
182. c. Idem—Arch. Biochem. Biophys., 61, 199, 1956.
183. Idem—Ann. N. Y. Acad. Science., 59, 1.012, 1955.
184. BURSTONE, N. S. et al.—J. Histochem-Cytochem., 4, 217, 1956.
185. ELDIN, F. N. et al.—J. Clin. Path., 9/2, 175, 1956.
186. LONDON, M. et al.—Arch. Biochem. Biophys., 64/2, 412, 1956.
187. ANSON, M. L. et al.—J. Gen. Physiol., 16, 59, 1932.
188. HEINKEL, K. et al.—Klin. Wschr., 33/45, 1.099, 1955.
189. LINDESTRÖM-LANG, K. et al.—Z. Physiol. Chem., 20, 415, 1932.
190. LINDESTRÖM-LANG, K.—Z. Physiol. Chem., 27, 131, 1935.
191. HARPER, H. A.—Ann. Rev. Med., 9, 461, 1958.
192. MIRSKY, I. A. et al.—J. Lab. Clin. Med., 40, 17, 1952.
193. HOAR, C. S. et al.—New Engl. J. Med., 255, 143, 1956.
194. SCAPIRO, A. P. et al.—J. Nervous Mental Disease, 122, 222, 1955.
195. FABIAKI, F. et al.—II progreso medico, 2, 31 enero 1952 y 4, 29 febrero 1952.
196. BUCHER, G. R.—Gastroenterology, 8, 627, 1947.
197. NACHELESS, H. et al.—J. Appl. Physiol., 8, 559, 1956.
198. LEVY, A. H. et al.—Gastroenterology, 30, 270, 1956.
199. MENKYN, R. A. et al.—Bratislavské Lékařs Listy, 36/10, 595, 1956.
200. PEAK, V. P. et al.—J. A. M. A., 162, 1.441, 1956.
201. GRAY, S. J.—Ann. Internal. Med., 45, 73, 1956 y Gastroenterology, 29, 641, 1955.
202. BALFOUR, P. C. et al.—Amer. J. Gastroenterology, 25, 341, 1956.
203. WOODWARD, E. R. et al.—J. Appl. Physiol., 8, 643, 1956.
204. WARBURG, O.—Biochem. Z., 314, 399, 1943.
205. ECDANSKY, O.—Cancer, 7, 1.191, 1954.
205. a. Idem—Idem, 7, 1.200, 1954.
205. b. Idem—Idem, 8, 1.087, 1955.
206. a. BING, Y. et al.—J. A. M. A., 164, 647, 1957.
206. b. Idem id.—J. A. M. A., 164, 647, 1957.
207. LA DUE, J. S. et al.—Science, 120, 497, 1954.
208. KARMEN, A. et al.—J. Clin. Invest., 34, 126, 1955.
209. RUDOLF, L. A. et al.—J. Clin. Inves., 34, 960, 1955.
210. AGGRESS, C. et al.—J. S. Circulation, 11, 711, 1955 y Circul. Research, 4/2, 220, 1956.
211. CHINSKY, M. et al.—J. Lab. Clin. Med., 47, 108, 1956.
212. KATTUS, A. A. et al.—J. A. M. A., 160, 16, 1956.
213. MOLANDER, D. W.—Clin. Research, Proc., 4, 63, 1956.
214. CONRAD, F. G.—New Engl. J. Med., 256, 602, 1957.
215. TICKIN, H. E. et al.—G. P. 15, 81, 1957.
216. CHINSKY, M. et al.—Arch. Internal. Med., 99, 556, 1957 y Am. J. Med., 233, 400, 1957.
217. SIEKER, R. G. et al.—Proc. Estaf. Med. Clin. Mayo, 31, 459, 1956.
218. GREEN, J. B. et al.—New Engl. J. Med., 256, 220, 1957.
219. WROBLESKY, F. et al.—Proc. Soc. Biol. Exp. Med., 91, 596, 1956.
220. MOLANDER, D. W. et al.—J. A. M. A., 163, 1.461, 1957.
221. SALL, T. et al.—Lab. Clin. Med., 50/2, 297, 1955.
222. MOHM, A.—Am. J. Clin. Pathol., 10, 394, 1957.
223. BOWERS, G. M. et al.—Am. J. Clin. Pathol., 30, 1, 1953.
224. GREEN, D. E. et al.—J. Biol. Chem., 161, 559, 1945.
225. TONHAZY, N. E. et al.—Arch. Biochem., 28, 36, 1940.
226. HENLEY, J. S. et al.—J. Clin. Med., 46, 785, 1955.
227. GALE, E. F.—Biochem. J., 39, 46, 1945 y Nature, 157, 365, 1946.
228. CABAUD, P. et al.—Amer. J. Clin. Pathol., 26, 1.101, 1956.
229. DUBACH, U. C.—Schweiz. Med. Wschr., 87, 185, 1956 y Triangulo, 3/6, 234, 1958.
230. WEST, M. et al.—Am. J. Med. Sci., 235, 699, 1958.
231. Idem id.—Idem id., 235, 443, 1958.
232. LATNER, A. L. et al.—Lancet, 2/7.053, 915, 1958.
233. FISKE, A. A. et al.—Amer. J. Med. Sci., 236, 133, 1958.
234. DENNY, J. L. et al.—J. A. M. A., 161, 614, 1956.
235. WROBLESKY, F.—Clin. Chem., 2, 251, 1956 y Am. Heart., J., 54, 219, 1957.
236. FUGIYAMA, H. et al.—Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 98, 33, 1955.
237. LARCH, F. et al.—Medizinische Klinik., 53, 1.769, 1958.
238. DONATO, R. A.—Am. J. Clin. Pathol., 28, 377, 1957.
239. MOORE, C. H. et al.—Am. J. Med., 234, 528, 1957.
240. GAVOSTO, F. et al.—Biochem. Biophys. J. Acta, 24, 250, 1957.
241. PROLUX, A. et al.—Un. Med. Can., 85/7, 769, 1956.
242. SIEGEL, A. et al.—Proc. Soc. Exper. Biol., 91/4, 604, 1956.
243. KESSLER, G. et al.—J. Alb. Einstein Med. Center, 4/3, 91, 1956.
244. COBE, S. et al.—Pediatrics, 20, 584, 1957.
245. ALBAUM, H. G. et al.—Amer. J. Physiol., 190/3, 533, 1957.
246. BONATI, B. et al.—Minerva Med., 47 (II), 267, 1956.
247. PARIANTE, F.—Boll. Soc. Ital. Biol. Sper., 34, 129, 1958.
248. HERBST, R. M.—Adv. in Enzymology, vol. IV, pág. 75, 1944.
249. MARTÍNEZ VICTORIA, M.—Laboratorio, 26/153, 201, 1958.
250. HOLMBERG, C. G. et al.—Acta Chim. Scand., 2, 550, 1948.
251. SCHEIMBERG, I. H. et al.—Science, 116, 484, 1952.
252. BEERN, A. G. et al.—J. Clin. Invest., 31, 616, 1952.
253. KUNNINGS, J. N. et al.—J. Clin. Pathol., 8, 69, 1955.
254. MARLOWITZ, H. et al.—J. Clin. Invest., 34, 1948, 1955.

255. VALLEE, D. L.—Metabolism, 1, 420, 1952.
256. RAVIN, H. A.—Lancet, 1, 726, 1956.
257. AKERFELDT, S.—Chem. Ing. News 15 octubre 1956, pág. 4.981.
258. MEYERHOFF, O. et al.—Biochem. Z., 271, 89, 1934.
259. WARBURG, O. et al.—Biochem. Z., 314, 399, 1943.
260. SIBLEY, J. A. et al.—J. Nat. Cancer Institute, 9, 303, 1949.
261. BAKER, R. et al.—Cancer Research, 12, 141, 1953.
262. SCHAPIRA, G. et al.—Sem. Hôp. Paris, 29, 1.917, 1953.
263. ARONSON, S. M. et al.—J. Med., 22, 414, 1957.
264. SPITZER, R. M. et al.—Proc. Soc. Exper. Biol., 94, 541, 1957.
265. HEARN, G. R.—Lancet, 77/3, 805, 1957.
266. Revista Clínica Española, 67/1, 43, 1957.
267. SIBLEY, J. A. et al.—Arch. Pathol., 59, 712, 1955.
268. VOLK, B. M. et al.—Amer. J. Med. Sci., 232, 38, 1955.
269. BRUNS, F.—Biochem. Z., 325, 156, 1954.
270. COOK, J. L. et al.—Proc. Soc. Exper. Biol., 87, 349, 1954.
271. HOREISI, J. et al.—Clin. Chem., 2, 251, 1956.
272. LENTI, C. et al.—Naturwissenschaften, 45/3, 68, 1958.
273. FRIEDMAN, M. M. et al.—Clin. Chem., 2, 247, 1956.
274. SIBLEY, J. A. et al.—J. Biol. Chem., 177, 859, 1949.
275. WROBLESKY, F. et al.—Proc. Soc. Exper. Biol. Med., 90, 210, 1955.
276. WHITE, L. P.—New Engl. J. Med., 255, 984, 1956.
277. FRIEND, CH. et al.—Science, 124, 173, 1956.
278. HESS, B. et al.—Klin. Wschr., 33, 91, 1955.
279. HORN, H. D. et al.—Dtsch. Med. Wschr., 82, 619, 1957.
280. CABAUD, B. J.—Am. J. Clin. Pathol., 30, 234, 1958.
281. GAVOSTO, et al.—Minerv. Med., 47 (11), 1.078, 1956.
282. BRUNS, F. et al.—Clin. Chim. Acta, 131, 63, 1956.
283. WROBLESKY, F. et al.—Amer. J. Clin. Pathol., 28, 269, 1957.
284. McDONALD, J. A. M. A., 165, 35, 1957.
285. LASKOWSKI, M.—Arch. Biochem., 11, 41, 1946.
286. ALLFREY, V. et al.—J. Gen. Physiol., 36, 227, 1952.
287. DISCHE, Z.—Mikrochhemie, 8, 4, 1930.
288. KUNITZ, M.—J. Gen. Physiol., 33, 349, 1950.
289. KOWLESSAR, O. D. et al.—J. Clin. Invest., 35/12, 1.325, 1956.
290. BRODY, S. et al.—Nature, 182/4.640, 940, 1958.
291. ROTH, J. S. et al.—J. Biol. Chem., 196, 489, 1952.
292. KING, E. J.—Biochem. J., 26, 292, 1932.
293. KUNITZ, M.—J. Gen. Physiol., 24, 15, 1940.
294. LEDOUX, L. et al.—Arch. Int. Physiol., 64/3, 537, 1956.
295. LEDOUX, L. et al.—Biochem. Biophys. Acta, 20, 369, 1953.
296. Idem, id.—Arch. Int. Physiol., 64/1, 134, 1956.
297. DOHI, S. R. et al.—Proc. Soc. Exper. Biol. Med., 98, 728, 1958.
298. KOVACS, E.—Canad. J. Biochem. Physiol., 34/3, 600, 1956.
299. FISHMAN, W. H.—J. Biol. Chem., 169, 7, 1947 y J. Biol. Chem., 152, 487, 1944.
300. KNOBIL, E.—Endocrinology, 50, 16, 1952.
301. BEYLER, A. L. et al.—Endocrinology, 54, 323, 1954.
302. FISHMAN, W. H. Ann. N. Y. Acad. Sci., 54, 548, 1951.
303. FISHMAN, W. H.—Adv. in Enzymol., 16, 361, 1955.
304. LEVY, G. A.—Brit. Med. Bull., 9, 129, 1953.
305. FISHMAN, W. H.—The Enzymes, 1/1, 635, 1950 y J. B. C., 173, 449, 1948.
306. BERNFELD, P. et al.—J. Am. Chem. Soc., 74, 4.872, 1954.
307. SPENCER, B. et al.—Biochem. J. 48, 537, 1951.
308. ROBINSON, D. et al.—Biochem. J. 53, 125, 1953.
309. RUTEMBERG, S. H. et al.—J. Biol. Chem., 203, 731, 1953.
310. TSOU, K. C. et al.—J. Am. Chem. Soc., 75, 1.042, 1953.
311. PENNATONI, M. et al.—Arch. Sci. Biol., 40/5, 5535, 1956.
312. DYRBYE, M. et al.—J. Gerout, II/1, 33, 1956.
313. PELLERINO, P. C. et al.—Arch. Sci. Biol., 41/4, 339, 1957.
314. ANYLAN, A. J. et al.—Cancer, 3, 115, 1950.
315. FOLLETTE, J. H. et al.—J. Lab. Clin. Med., 40, 825, 1952.
316. ODELL, L. D. et al.—Amer. J. Obstet. Ginec., 56, 74, 1948.
317. ODELL, L. D. et al.—J. Amer. Assoc., 142, 226, 1950.
318. FISHMAN, W. H. et al.—Amer. J. Med. Sci., 220, 55, 1950.
319. ANYLAN, A. J.—Cancer, 5, 578, 1952.
320. KASDON, S. C.—J. A. M. A., 144, 892, 1950.
321. FISHMAN, W. H. et al.—J. Clin. Invest., 30, 685, 1951.
322. COHEN, S. L. et al.—Cancer Research, 11, 52, 1951.
323. FISHMAN, W. H. et al.—Cancer, 7, 729, 1954.
324. ANYLAN, A. J.—Cancer Research, 12, 244, 1952.
325. BOYLAND, E. et al.—Biochem. J. 56, XXIX, 1954.
326. LAURENCE, S. H.—Diseases of Chest, 23, 390, 1953.
327. ZINI, F.—Pathol. Apparato Respiratorio, 3, 3, 1953.
328. FRIENDENWALD, J. S. et al.—Celular Compt. Physiol., 31, 303, 1948.
329. BURTON, J. F. et al.—Brit. J. Exp. Pathol., 33, 87, 1952.
330. SELIGMAN, A. M. et al.—J. Histochem-Cytochem., 2, 209, 1954.
331. RIGOTT, J. et al.—Endocrinol., 152, 692, 1953.
332. BING, R. J. et al.—J. A. M. A., 164, 647, 1947.
333. HESS, B. et al.—Klin. Wschr., 33, 91, 1955.
334. VON EULER, H. et al.—Ann. 455, 1, 1927.
335. KOSUGE, T. et al.—Igakuto Seigutsugaku, 31, 243, 1944.
336. CHANCE, B. et al.—Biochem. J., 46, 402, 1950.
337. GOLDRLITH, S. A. et al.—J. B. C., 187, 705, 1950.
338. YAMATAGA et al.—Laboratorio, 18/104, 191, 1954.
339. CERVIGNI, T. et al.—Boll. Oncol., 29, 529, 1955.
340. ROIZMAN, I. S.—Ukrain. Biokhim. Zhur., 28, 37, 1956.
341. CERIGGI, C. et al.—Biochem-Biophys. Acta, 18, 303, 1955.
342. NAKAGAWA, S. et al.—Gann., 46, 585, 1955.
343. GEPNER.—Excerpta Med.—2/5, 1922, 1958.
344. HOLTER, H.—Monatsch., 69, 292, 1936.
345. HOLTER, H. et al.—J. Cell. Compt. Physiol., 295, 1938.
346. STERN, K. G.—J. Physiol. Chem., 204, 259, 1932.
347. VANTHJENEN, G.—J. Dtsch. Arch., Klin. Med., 131, 113, 1920.
348. NISSEN, R.—Zschr. Klin. Med., 92, 1, 1921.
349. BERG, W.—Verh. Dtsch. Ges. Inn. Med., 216, 1929.
350. TOGEL, O. et al.—Wien. Arch. Inn. Med., 12, 633, 1957.
351. HELLER, H.—Zschr. Inn. Med., 12, 633, 1957.
352. KOSUGE, T. et al.—Igakuto Seibutsugaku, 33, 251, 1954.
353. BAIER, H.—Med. Klinik, 3, 53, 1958.
354. DOGSON, K. S. et al.—Clin. Chim. Acta, 1, 478, 1956.
355. BOYLAND, E. et al.—Brit. J. Cancer, 9, 62, 1955.
356. DZIALOSZYNSKI, L. M.—Clin. Chim. Acta, 2, 542, 1957.
357. HUGGINS et al.—J. Biol. Chem., 170, 341, 1957.
358. DZIALOSZYNSKI, L. M.—Acta Biochem. Pol., 2, 429, 1955.
359. DOGSON, J. K. et al.—Biochem. J. 65/4, 668, 1957.
360. ROUGHTON, F. J. W. et al.—The Enzymes, 1/2, 1.250, 1951.
361. SHEPARD, T. H.—Amer. J. Med. Sci., 333, 162, 1957.
362. WIASMAN, H. A.—Cancer Research, 16, 344, 1956.
363. KOCHAKIAN, C. D. et al.—Arch. Biochem., 29, 144, 1950.
364. GROSS, R. T.—J. Clin. Invest., 37, 1.976, 1958.
365. BRUNS, F. H.—Clin. Chem., 2, 247, 1956.
366. Brit. Med. S., 20-XII, 1.523, 1958.