

7. PRÁCTICA. PRUEBAS DE FUNCIONALIDAD HEPÁTICA

DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD FOSFATASA ALCALINA EN SUERO

ESQUEMA

- Introducción
- Fundamento teórico
 - Unidades de medida de la actividad enzimática
 - Pruebas de funcionalidad hepática
 - Tabla resumen de las enzimas relacionadas con las pruebas de funcionalidad hepática
 - Determinación cinética de la actividad fosfatasa alcalina en suero
- Procedimiento práctico: Materiales y reactivos
 - Procedimiento experimental y resultados
- Análisis y discusión de los resultados obtenidos, comentarios y conclusiones

I. INTRODUCCIÓN

En esta práctica se va a realizar la determinación cinética de la actividad de la fosfatasa alcalina (FAL) en plasma sanguíneo. Para ello se va a emplear el método colorimétrico del p-nitrofenil-fosfato, determinando el incremento de absorbancia en función del tiempo de incubación. Asimismo se estudiarán otras determinaciones enzimáticas que se utilizan como pruebas de funcionalidad hepática. Finalmente se discutirá la importancia de dichas determinaciones en la Bioquímica Clínica, su relación con la actividad de ciertos órganos (ej. hígado, músculo cardíaco y tejido óseo), así como su valor diagnóstico y/o pronóstico en ciertas patologías.

II. FUNDAMENTO TEORICO

Ila. Unidades de medida de la actividad enzimática

Unidad enzimática (U): cantidad de enzima que cataliza la transformación de un μmol de sustrato por minuto a 25 C y en condiciones óptimas de trabajo para la enzima. Dimensiones: $\mu\text{mol min}^{-1}$.

Katal (Kat): unidad del SI. Actividad catalítica que permite aumentar la velocidad de una reacción en un factor de un mol por segundo. Dimensiones: mol s^{-1} .

Relación entre ambas unidades:

$$1\text{Kat} = \frac{1\text{mol}}{1\text{s}} ; 1\text{U} = \frac{1\mu\text{mol}}{1\text{min}} ; \frac{1\mu\text{mol}}{1\text{min}} * \frac{1\text{mol}}{10^6 \mu\text{mol}} * \frac{1\text{min}}{60\text{s}} ; \quad \boxed{1\text{U} = 16.67\text{nKat}}$$
$$\boxed{1\mu\text{Kat} = 60\text{U}}$$

En ciertos casos, las unidades de actividad enzimática no se refieren a cantidad de sustancia, sino a concentración. Así, también se habla de U/L ó de Kat/L.

Otros conceptos importantes.

- Actividad total: número total de unidades de enzima que existen en una muestra.
- Actividad específica: número total de unidades de enzima por mg de proteína. Determina el grado de pureza ó el factor de purificación de una enzima en un extracto.

Ilb. Pruebas de funcionalidad hepática

Alanina aminotransferasa (ALAT/GPT)

L-alanina:2-oxoglutarato aminotransferasa (EC 2.6.1.2)

Esta enzima se localiza principalmente en el hígado, pero también en riñones, corazón y músculo (aunque en menores cantidades). Sus niveles en sangre aumentan por lesión hepatocelular que cursa con muerte celular e inflamación.

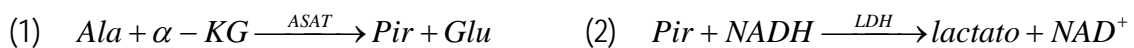
Los niveles de ALAT aumentan

- x10 en hepatitis agudas (ya sean de origen vírico ó tóxico) y se mantienen elevados durante 3 – 6 meses.

- x4 (como máximo) en hepatitis crónicas y se mantienen elevados durante 1 - 2 meses.
- generalmente, los niveles de ALAT > ASAT en hepatitis.

Los niveles de ALAT no tienen por qué estar aumentados en otro tipo de patologías hepáticas, tales como la colestasis biliar, cirrosis ó algunos tipos de cáncer hepático. Por ello, los niveles de ALAT se solicitan para determinar el tipo de lesión hepática y su posible evolución.

La determinación de ALAT se basa en el acoplamiento de la reacción de transferencia del grupo amino que cataliza la propia enzima con una reacción que consume NADH.



La extinción de la absorbancia del NADH en función del tiempo se puede determinar midiendo la disminución de la absorbancia a $\lambda = 340 \text{ nm}$ durante varios intervalos de tiempo. Como esta longitud de onda no se encuentra en el espectro visible, es necesario utilizar un espectrofotómetro con lámpara de Hg.

Aspartato aminotransferasa (ASAT/GOT)

L-aspartato:2-oxoglutarato aminotransferasa (EC 2.6.1.1)

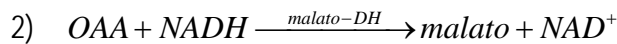
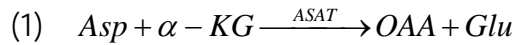
Enzima localizada principalmente en hígado y en músculo estriado y cardiaco, aunque no de manera exclusiva. Sus niveles en sangre aumentan por lesiones hepatocelulares ó en determinadas patologías musculares.

Los niveles de ASAT aumentan

- x10 en hepatitis agudas (de origen vírico ó tóxico) y se mantienen elevados durante 1 - 2 meses (que pueden no normalizarse hasta 3 - 6 meses después).
- x4 (como máximo) en hepatitis crónicas y se mantienen elevados durante 1 - 2 meses.
- los niveles de ASAT > ALAT en hepatopatía y cirrosis alcohólicas, si bien también puede darse el caso en lesiones musculares y en infarto agudo de miocardio (IAM).

Al igual que en el caso de la ALAT, se suelen determinar los niveles de ASAT para establecer el tipo de lesión hepática y su posible evolución. Igualmente, los niveles de ASAT no tienen por qué estar aumentados en otro tipo de patologías hepáticas, tales como la colestasis biliar, cirrosis ó algunos tipos de cáncer hepático.

La determinación de ASAT también se basa en el acoplamiento de la reacción de transferencia del grupo amino que cataliza la propia enzima con una reacción que consume NADH. Posteriormente se determina la extinción de la absorbancia del NADH en función del tiempo a $\lambda = 340 \text{ nm}$.



Fosfatasa alcalina (FAL/ALP)

Ortofosfórico monoéster fosfohidrolasa, (EC 3.1.3.1)

Enzima presente en hígado, hueso, riñón, intestino y placenta. En hígado, la fosfatasa alcalina se localiza en las células de los canalículos biliares, y en tejido óseo está implicada en los procesos de consolidación de hueso (que cursan con un aumento de la actividad osteoblástica). Sus niveles en sangre aumentan por enfermedad hepática u ósea.

Los niveles de FAL aumentan

- si es de origen hepático

principalmente por enfermedad hepatobiliar – colestasis intrahepática.

también en hepatoma, cirrosis ó hepatitis (si bien en menor medida que la ASAT y ALAT).

- si es de origen óseo

en situaciones patológicas – crecimiento anómalo del hueso: por enfermedad ósea como el Paget, raquitismo, osteomalacia ó cánceres óseos.

en situaciones fisiológicas - aumento de masa ósea: crecimiento en niños y adolescentes, durante el tercer trimestre del embarazo y durante la consolidación de fracturas.

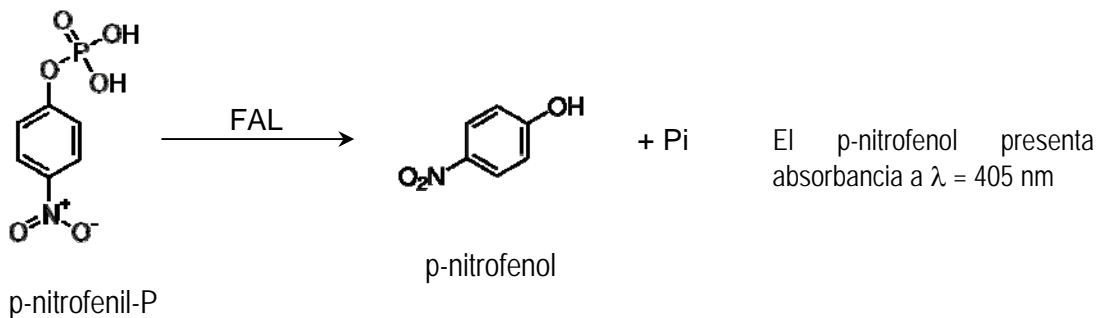
Cuando la enfermedad remite, los niveles de FAL vuelven a sus valores normales, por lo que esta prueba se puede utilizar para el seguimiento y el pronóstico de una enfermedad (como las mencionadas anteriormente).

Para diferenciar el origen del aumento de FAL en sangre, se pueden determinar las isoenzimas ó bien realizar un diagnóstico diferencial:

- si el aumento es debido a una enfermedad hepática también estarían elevadas otras enzimas como la γ -GT, ASAT, ALAT, así como la bilirrubina.

- si existen niveles anómalos de calcio y fosfatos, el aumento de los niveles de FAL es de origen óseo.

La determinación de FAL se lleva a cabo mediante el método del p-nitrofenil-fosfato: la fosfatasa alcalina cataliza la hidrólisis del éster fosfórico, liberando fosfato inorgánico y p-nitrofenol. Este último compuesto presenta absorbancia a $\lambda = 405 \text{ nm}$ (color amarillo), por lo que el aumento de la absorbancia del p-nitrofenol en función del tiempo es un indicador de la actividad enzimática.



γ -glutamyl transferasa (γ -GT/GGT)

(5-L-glutamyl)-péptido:aminoácido 5-glutamyltransferasa (EC 2.3.2.2)

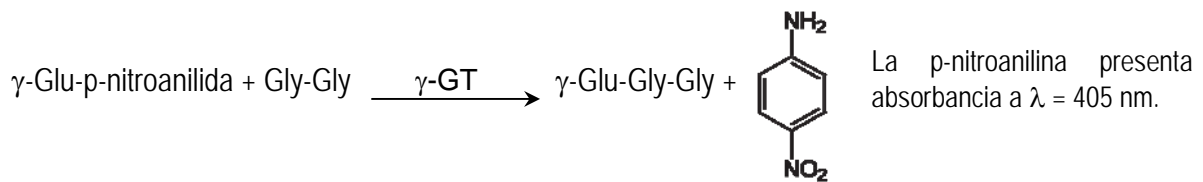
Es una enzima muy específica de hígado y muy sensible a alteraciones en la función hepática, especialmente de los conductos biliares.

Los niveles de γ -GT se encuentran aumentados

- en enfermedad hepatocelular aguda – hepatitis alcohólica.
- en enfermedad hepatobiliar (lesión y/o obstrucción de los canalículos biliares) – colestasis extrahepática.

El aumento es directamente proporcional al grado de lesión hepática. No obstante, los niveles de γ -GT pueden estar alterados por el consumo de alcohol y fármacos (AINES, hipolipemiantes, antibióticos, antiepilépticos, antidepresivos y de hormonas como la testosterona); a su vez, los anticonceptivos orales pueden disminuir los niveles de γ -GT en sangre.

La determinación de los niveles de γ -GT se realiza por el método de Szasz.



Lactato deshidrogenasa 5 (LDH-5)

(S)-lactato:NAD⁺ oxidorreductasa (EC 1.1.1.27)

Enzima presente en diversos tejidos, si bien existen diferentes isoenzimas en cada uno de ellos.

Isoenzimas: LDH₁ – corazón, glóbulos rojos, córtex renal

LDH₂ – similar a la LDH₁, pero en menor cantidad que la LDH₁

LDH₃ – pulmones

LDH₄ – glóbulos blancos, músculo e hígado, pero en menor cantidad que la LDH₅

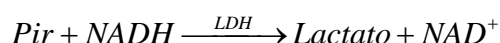
LDH₅ – músculo esquelético e hígado

Un aumento de los isoenzimas de la LDH es indicativo de lesión tisular que cursa con destrucción celular.

- en hígado: los niveles de LDH₅ (principalmente) aumentan en enfermedad hepatocelular – hepatitis, cirrosis y cáncer hepático.
- músculo cardiaco: aumento de la LDH en IAM, apareciendo el fenómeno de la LDH invertida: los niveles de LDH₂ > LDH₁. Aunque antiguamente se utilizaba para diferenciar el IAM de una angina de pecho (y determinar la necesidad de terapia fibrinolítica), hoy en día es un marcador obsoleto.

Los niveles de LDH también pueden estar alterados en otras patologías como en anemias (hemolítica, megaloblástica), mononucleosis, enfermedad renal, muscular etc. ó por el consumo de fármacos (anestésicos, aspirina, narcóticos etc) y de alcohol.

La determinación de los niveles de LDH, al igual que la de ASAT y ALAT, se basa en el cálculo de la extinción de la absorbancia de NADH en función del tiempo a $\lambda = 340 \text{ nm}$.



Otras determinaciones no enzimáticas de rutina en el perfil hepático

- Albumina y proteínas totales: sus niveles en sangre disminuyen por enfermedad hepática, aunque también existen otras causas no hepáticas: malnutrición, malabsorción de proteínas, ó bien por pérdidas renales (aparición de proteinuria).
- Bilirrubina (total y conjugada): aumento de los niveles en sangre en ictericia (prehepática ó posthepática). Si la ictericia tiene causa prehepática (como la anemia hemolítica), aumenta la bilirrubina no conjugada, mientras que la bilirrubina conjugada aumenta en ictericia posthepática. En este último caso, el aumento de bilirrubina en sangre es indicio de enfermedad hepática como cirrosis, hepatitis o cálculos biliares.

IIc. Tabla resumen de las enzimas relacionadas con las pruebas de funcionalidad hepática

Enzima	Valores normales*	Situaciones en las que los valores en suero están aumentados
ALAT	25 C (U/L) ♂ < 22 & ♀ < 17 37 C (U/L): 10 – 40	en lesión hepatocelular x10 en hepatitis agudas (víricas ó tóxicas) x4 en hepatitis crónicas niveles de ALAT > ASAT en hepatitis
ASAT	25 C (U/L) ♂ < 18 & ♀ < 15 37 C (U/L): 10 – 40	en lesión hepatocelular x10 en hepatitis agudas (víricas ó tóxicas) x4 en hepatitis crónicas niveles de ASAT > ALAT en hepatopatía y cirrosis alcohólicas (tb. IAM)
FAL	25 C (U/L): 12 – 30 37 C (U/L): 44–147 * <i>gran variabilidad, según el método empleado</i>	si es de origen hepático: - principalmente por enfermedad hepatobiliar – colestasis intrahepática - también en hepatoma, cirrosis ó hepatitis (menos que ASAT y ALAT) si es de origen óseo: - en situaciones patológicas: Paget, raquitismo, osteomalacia ó cánceres óseos - en situaciones fisiológicas: crecimiento en niños y adolescentes, en el tercer trimestre del embarazo y durante la consolidación de fracturas

γ-GT	25 C (U/L) ♂: 6–28 & ♀: 4–18 37 C (U/L) ♂: 5–30 & ♀: 5–30	muy sensible y específica - en enfermedad hepatocelular aguda – hepatitis alcohólica - en enfermedad hepatobiliar - colestasis extrahepática
LDH	25 C (U/L): 140 – 280 37 C (U/L): 105 - 333	lesión tisular que cursa con destrucción celular - en hígado: en enfermedad hepatocelular - hepatitis, cirrosis y cáncer hepático - músculo cardíaco: en IAM; LDH invertida: LDH ₂ > LDH ₁ . (marcador obsoleto) - anemias, mononucleosis, enfermedad renal, muscular etc - por el consumo de fármacos y de alcohol

* El rango de valores normales depende en gran medida del método de detección y de equipo empleado; por ello, es necesario realizar controles y no se pueden extrapolar directamente los valores obtenidos de un laboratorio a otro.

IId. Determinación cinética de la actividad fosfatasa alcalina en suero

La fosfatasa alcalina cataliza el hidrólisis de ésteres fosfóricos, teniendo unas condiciones óptimas de pH = 9 - 11. Así, a pH alcalino esta enzima es capaz de hidrolizar el p-nitrofenil-fosfato a p-nitrofenol y fosfato inorgánico. En estas condiciones, el p-nitrofenol presenta absorbancia a $\lambda = 405$ nm (color amarillo). En las etapas iniciales de la reacción, y en ausencia de inhibidores, el aumento de la absorbancia es directamente proporcional a la cantidad de producto formado. Por lo tanto, si se determina la absorbancia de la muestra a diferentes intervalos de tiempo, se puede determinar la actividad enzimática en la muestra. A continuación se detallan las transformaciones que hay que realizar.

Teniendo en cuenta que la Ley de Beer-Lambert relaciona la absorbancia y la concentración

$$Abs = \varepsilon * l * c$$

$$\Delta Abs = \varepsilon * l * \Delta c \quad (1) \text{ y sabiendo que } Act.enzimatica = \frac{\Delta c}{\Delta t} \quad (2) \text{ para la velocidad inicial.}$$

$$\text{Sustituyendo } \Delta Abs = \varepsilon * l * Act.enzimatica * \Delta t \quad (3)$$

agrupando el valor de las constantes en un factor, se obtiene que $\Delta Abs = F * \Delta t$ (4),

que es igual a la ecuación de una recta $y = a * x$,

donde la pendiente es igual a $a = \epsilon * l * Act.enzimatica$,

por lo que despejando términos $Act.enzimatica = \frac{a}{\epsilon * l}$

Por lo tanto, para hallar el valor de la actividad de la fosfatasa alcalina en suero es necesario medir la absorbancia de la muestra a $\lambda = 405$ nm a diferentes intervalos de tiempo, y posteriormente realizar una regresión lineal con los datos obtenidos (recordando que esto sólo es válido para las etapas iniciales de la reacción).

III. PROCEDIMIENTO PRACTICO

IIIa. Materiales y reactivos

- tubos de ensayo
- pipetas de vidrio y pipeteador manual
- espectrofotómetro
- reactivo con p-nitrofenil-fosfato en tampón alcalino
- micropipetas y puntas
- tubos de espectrofotómetro
- suero humano (¡precaución!).
- tampón alcalino 0.1 M pH = 9.8

IIIc. Procedimiento experimental y resultados

Determinación de la hidrólisis espontánea

Es necesario determinar si existe hidrólisis del p-nitrofenil-fosfato en ausencia de enzima; en caso de ser así, aparece una absorbancia inespecífica que ha de restarse de la absorbancia total. Esta medición se realiza con un "tubo blanco" (= sin muestra de suero).

- pipetear 2 mL solución sustrato + 1 mL tampón alcalino.
- mezclar por inversión.
- leer la absorbancia a $\lambda = 405$ nm a intervalos de 30" durante 10'. Anotar los datos en una tabla.

Determinación de la actividad fosfatasa alcalina en suero

- pipetear 2 mL solución sustrato + 1 mL tampón alcalino + 0.2 mL de suero humano.
- mezclar por inversión.
- leer la absorbancia a $\lambda = 405 \text{ nm}$ a intervalos de 30" durante 10'. Anotar los datos en una tabla.

Consideraciones: inicialmente el aumento de absorbancia es directamente proporcional al tiempo transcurrido, pero llega un momento en que la concentración de sustrato disminuye y el comportamiento ya no es lineal.

Análisis de los resultados

- obtener la absorbancia específica para cada medición, restando el valor del blanco de la absorbancia total.
- representar gráficamente la Absorbancia vs. tiempo.
- realizar la regresión lineal y hallar el valor de la pendiente solamente para el intervalo de valores que conserven un comportamiento lineal. Si el valor de la pendiente es mayor de 0.25/min, la muestra presenta unos niveles muy elevados de fosfatasa alcalina; en estos casos es necesario diluir la muestra, volver a hacer las mediciones y tener en cuenta el nuevo factor de dilución para hacer los cálculos.
- determinar la actividad específica de la fosfatasa alcalina en suero, expresándolo en U/L y en Kat/L. Para ello, hay que tener en cuenta el factor de dilución utilizado y la conversión de unidades.

datos necesarios: $\epsilon = 1.881 \text{ mmol}^{-1} \text{ mm}^{-1} \text{ L}$

$l = 1 \text{ cm}$ (paso de luz)

IV. ANÁLISIS Y DISCUSION DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS, COMENTARIOS Y CONCLUSIONES

Además de realizar las determinaciones y los cálculos anteriormente descritos, es necesario analizar de una manera crítica los resultados obtenidos y situarlos en un posible contexto clínico.

Un esquema a seguir sería:

1. Analizar los resultados obtenidos por el grupo y compararlos con los de otros grupos.

2. Discutir las diferencias encontradas entre los grupos y determinar si la variabilidad observada se encuentra dentro del rango esperable, o bien es posible que exista algún error experimental ó de cálculo. Indicar si la actividad de fosfatasa alcalina encontrada se sitúa dentro de los valores normales.
3. Indicar qué mecanismo bioquímico puede ser el responsable de la aparición de valores alterados en suero y qué situaciones fisiopatológicas están relacionadas con dichas alteraciones.
4. Sean tres pacientes a los que se les ha practicado las pruebas de funcionalidad hepática, siendo una de ellas la determinación de la actividad fosfatasa alcalina anteriormente realizada. Incluya el valor obtenido en la tabla y señale razonadamente la posible patología del paciente.

Paciente & Valores enzimáticos	<i>Del Campo, Flor</i>	<i>McArron, John</i>	<i>JB</i>
<i>ALAT</i> (U/L)	15	187	35
<i>ASAT</i> (U/L)	12	234	27
<i>FAL</i> (U/L)			
<i>γ-GT</i> (U/L)	9	20	87
<i>LDH</i> (U/L)	99	368	122
Posible patología <i>(fundamentación del diagnóstico)</i>			

Si en el caso de la primera paciente también se ha estudiado el perfil óseo, y aparecen niveles elevados de fosfatos y calcio en sangre, ¿cambiaría el diagnóstico? ¿Por qué? Explíquelo razonadamente.

5. Comentarios y conclusiones