



UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

**Departamento de Bioquímica
y Biología Molecular**

***ESTUDIO TERMODINÁMICO DE LA HETEROGENEIDAD
ENZIMÁTICA DE LA β -N-ACETILHEXOSAMINIDASA EN
DISTINTOS MEDIOS BIOLÓGICOS***

TESIS DOCTORAL EN FARMACIA

José Antonio Casal Antelo

Santiago de Compostela, Junio 2009

D. Germán Sierra Marcuño, Catedrático emérito de la Facultad de Medicina, como PONENTE de la Tesis Doctoral de D. José Antonio Casal Antelo, titulada: ***“Estudio termodinámico de la heterogeneidad enzimática de la β -N-acetilhexosaminidasa en distintos medios biológicos”***, realizada bajo la dirección de los Drs. José Carlos Tutor Valcarce y Juan Manuel Paz Fernández, cumple las condiciones exigidas para optar al grado de Doctor.

Santiago de Compostela Junio de 2009

Fdo.: Germán Sierra Marcuño

D. José Carlos Tutor Valcarce, Doctor en Farmacia, y D. Juan Manuel Paz Fernández, Doctor en Ciencias Químicas

Hacen constar:

Que el trabajo de investigación recogido en la presente Memoria titulada **“Estudio termodinámico de la heterogeneidad enzimática de la β -N-acetilhexosaminidasa en distintos medios biológicos”**, presentada por D. José Antonio Casal Antelo para optar al Grado de Doctor en Farmacia, ha sido realizado bajo nuestra dirección en el Laboratorio Central del Hospital Clínico Universitario de Santiago de Compostela, y consideramos que cumple los requisitos exigidos para ser juzgada por el tribunal correspondiente.

Santiago de Compostela, Junio de 2009.

Dr. José Carlos Tutor Valcarce

Dr. Juan Manuel Paz Fernández

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. J. Carlos Tutor Valcarce, que me propuso el tema de investigación desarrollado, por todas sus enseñanzas y estímulos durante la realización de este proyecto.

Al Dr. J. Manuel Paz Fernández por su inestimable colaboración y su continuo ejemplo de rigor y perseverancia.

Quisiera agradecer a los dos el haber depositado en mí su amistad y confianza al permitirme trabajar a su lado y poner todo su empeño y los medios necesarios para que este trabajo llegara a buen término.

A mi mujer y mi hijo por su paciencia, su compañía y por saber renunciar a todo el tiempo que no he podido dedicarles.

A mis padres que siempre me han alentado y servido de apoyo en los momentos de desánimo.

Al Dr. LF Pérez del Laboratorio Central del Hospital Clínico de Santiago por su ayuda en el desarrollo y puesta a punto de las técnicas termodinámicas y cromatográficas utilizadas para el estudio de la heterogeneidad enzimática de la β -N-acetilhexosaminidasa.

Al Dr. J Hermida del Laboratorio Central del Hospital Clínico de Santiago por su colaboración en el estudio del efecto de la proteólisis parcial de las formas enzimáticas precursoras y maduras de la β -N-acetilhexosaminidasa sobre la energía de activación.

A la Dra. MC Sá Miranda y al Dr. R Pinto de la Unidade de Enzimología del Instituto de Genética Médica "Jacinto Magalhaes" de Oporto por su colaboración en el estudio de pacientes con gangliosidosis GM2 variante B1.

Al Dr. Jesús García Devesa del Laboratorio Central del Hospital Clínico de Santiago por su colaboración en el estudio de los plasmas seminales.

Al Dr. X. Lens del Servicio de Nefrología del Hospital Clínico de Santiago por su colaboración en el estudio de pacientes con poliquistosis renal.

A la Dra. Olga Louro del Laboratorio del Hospital Gil Casares por haberme animado y apoyado durante la realización de este trabajo.

A todo el personal del Laboratorio Central del CHUS (auxiliares, ATS, técnicos, residentes y adjuntos), que siempre han estado dispuestos a colaborar con agrado en este trabajo y especialmente a mis amigos y compañeros Julio Rodríguez y Javier Fernández.

*Acercaos hasta el borde.
Podríamos caerlos.
Acercaos hasta el borde.
¡Está demasiado alto!
Acercaos hasta el borde.
Y ellos se acercaron.
Y El los empujó.
Y ellos volaron.*

**Fragmento del poema “Acércate al borde”
de Christopher Logue.**

ÍNDICE

Objeto de la memoria

Introducción	1
La energía de activación en el estudio de la heterogeneidad enzimática.....	3
Material y métodos	19
Resultados y discusión	27
I. Factores de conversión de temperatura y composición isoenzimática de la β -N acetilhexosaminidasa.....	29
II. Efecto de la proteólisis parcial sobre la energía de activación aparente de precursores de alta masa molecular y formas maduras de la β -N-acetilhexosaminidasa.....	35
III. Determinación termodinámica de las isoenzimas de β -N-acetilhexosaminidasa en suero, plasma, plaquetas, leucocitos totales y subpoblaciones de mononucleares y polimorfonucleares.....	45
IV. Caracterización termodinámica de la isoenzima A mutada de la β -N-acetilhexosaminidasa en la Gangliosidosis GM2 variante B1.....	67
V. Identificación bioquímica de pacientes homocigotos y portadores heterocigotos para la variante B1 de la Gangliosidosis.....	75
VI. Relación entre los distintos marcadores de activación monocito / macrófago en la enfermedad de Gaucher tipo 1.....	85
VII. Isoenzimas de la β -N-acetilhexosaminidasa en plasma y leucocitos de sangre periférica en la artritis reumatoide.....	95
VIII. Relación entre la concentración plasmática de amonio y la actividad isoenzimática de la β -N-acetilhexosaminidasa en la cirrosis hepática.....	109
IX. Caracterización termodinámica de la composición isoenzimática de la β -N-acetilhexosaminidasa en plasma seminal.....	121
X. Estudio comparativo de la β -N-acetilhexosaminidasa urinaria con otros marcadores de daño renal en la poliquistosis renal autosómica dominante.....	133
Conclusiones	151

OBJETO DE LA MEMORIA

La β -N-acetilhexosaminidasa (EC, 3.2.1.52) es una enzima lisosómica formada por dos subunidades polipeptídicas de tipo α y β , capaz de hidrolizar glicoproteínas, glicolípidos y glicosaminoglicanos. La Hex presenta una bien documentada heterogeneidad enzimática, que incluye tanto las verdaderas isoenzimas $\alpha\beta$ (Hex A), $\beta\beta$ (Hex B) y $\alpha\alpha$ (Hex C), como otras formas moleculares de origen post-traduccionales, con un distinto grado de sialilación o diferente grado de maduración de la molécula enzimática.

El gangliósido GM2 es únicamente hidrolizado por la forma heterodimérica $\alpha\beta$ (isoenzima Hex A), de aquí que en un principio la casi exclusiva aplicación clínica de la determinación de las isoenzimas de la Hex fuese el diagnóstico bioquímico y la detección de portadores heterocigotos de gangliosidosis GM2 (enfermedad de Tay-Sachs y enfermedad de Sandhoff). Sin embargo, estudios posteriores pusieron de manifiesto su interés en otras situaciones fisiopatológicas, hasta el punto de ser considerada una prueba de laboratorio que podría tener una amplia aplicabilidad clínica.

La energía de activación puede aportar datos de interés en relación al estudio de la heterogeneidad enzimática. En el caso de la Hex, como se ha puesto de manifiesto en trabajos previos realizados en nuestro laboratorio, la energía de activación aparente está directamente relacionada con las proporciones relativas de las isoenzimas Hex A y Hex B. La presencia de una subunidad α en el heterodímero Hex A conduce a que su energía de activación (41.8 kJ/mol) sea significativamente mayor que la del homodímero Hex B (75.1 kJ/mol), sin que los valores de esta variable termodinámica sean afectados por el grado de sialilación de la molécula enzimática.

En el estudio realizado, y cuyos resultados se exponen en la presente Memoria para optar al Grado de Doctor en Farmacia, se determinó termodinámicamente el perfil isoenzimático de la Hex en distintos medios biológicos (suero, plasma, orina, plasma seminal, y lisados de plaquetas, leucocitos totales no fraccionados, y poblaciones de leucocitos mononucleares y polimorfonucleares) de pacientes con diferentes procesos fisiopatológicos. Asimismo, y antes de exponer nuestros resultados personales, y como introducción y complemento de estos, se incluye una revisión bibliográfica de los datos publicados sobre el estudio de la energía de activación para distintas enzimas de interés bioquímico-clínico.

INTRODUCCIÓN

La energía de activación como marcador de heterogeneidad enzimática

Desde un punto de vista termodinámico, la magnitud que determina si una reacción química puede tener lugar espontáneamente es el **cambio de energía libre de Gibbs** (ΔG), que expresa la capacidad del sistema para realizar trabajo. Para que la transformación química de un substrato S en un producto de la reacción P pueda tener lugar de forma espontánea, ΔG ($G_P - G_S$) ha de ser negativo (reacción exoenergónica), es decir que la energía libre asociada a P (G_P) debe ser menor que la asociada a S (G_S), y su magnitud fija las concentraciones relativas de S y P cuando se alcanza el estado de equilibrio.

Sin embargo, el que una reacción química pueda tener lugar en base a criterios termodinámicos no implica que pueda hacerlo a una velocidad apreciable. Según la **teoría del estado de transición**, la transformación de S en P tiene lugar a través de un estado intermedio de transición (S^\ddagger), en equilibrio con S y presentando una energía libre mayor. La diferencia entre la energía libre de S^\ddagger y S es por tanto siempre positiva y se denomina **energía de activación** (E_a), y constituye una barrera energética para el transcurso de la reacción entre S y P. Sólo las moléculas de S que posean un exceso de energía suficiente como para salvar la barrera energética y llegar a S^\ddagger , pueden llegar a formar el producto de reacción P. Evidentemente, la proporción de moléculas de S capaces de cumplir este requerimiento es tanto menor cuanto mayor sea la E_a para la reacción considerada.

Estas variables termodinámicas que explican la dirección y extensión de una reacción química, han de ser consideradas, incluso a nivel docente (1), al tratar de la acción enzimática en las distintas vías metabólicas. Como cualquier catalizador, las enzimas aceleran las reacciones químicas disminuyendo la E_a asociada al estado de transición, existiendo por tanto un mayor número de moléculas de S con una energía suficiente que les permita salvar la barrera energética de S^\ddagger y tenga lugar la reacción para formar P. Como las enzimas no modifican la naturaleza de P, la ΔG asociada a una reacción determinada es idéntica en presencia o ausencia de la enzima; asimismo, ΔG determina la constante de equilibrio de la reacción, y los sistemas enzimáticos únicamente aumentan la velocidad con que se alcanza dicho equilibrio.

De acuerdo con Arrhenius, la determinación de la E_a aparente se basa en la dependencia de la actividad enzimática con la temperatura (2): $\ln K_{cat} = -E_a/RT + \ln A = \ln(U/L)$, donde K_{cat} es la constante de la reacción catalizada por la enzima, E_a la energía de activación aparente (kJ/mol), R la constante de los gases (8.3143×10^{-3} kJ/mol x grado), T la temperatura absoluta (°K) y A el factor de colisión. En las condiciones usuales de las reacciones enzimáticas K_{cat} puede ser sustituida por la actividad catalítica (U/L), y el factor de colisión se asume que es constante para el intervalo 293-313 °K. En la parte lineal de la representación de \ln actividad (U/L) frente al inverso de la temperatura (1/T) puede calcularse la E_a aparente a partir de la pendiente b de la ecuación determinada por regresión lineal:

$$-E_a/RT = b/T; E_a = -8.13143 \times 10^{-3} \times b \text{ (kJ/mol)}.$$

La proporcionalidad entre la cantidad de enzima y su actividad catalítica es un requisito necesario para la utilización de la actividad enzimática como ayuda en el diagnóstico clínico. Esta proporcionalidad depende del pH, fuerza iónica y temperatura del medio de reacción, presencia de activadores etc, por lo que estas variables deben ser estandarizadas, pero además el factor de proporcionalidad depende también de la estructura tridimensional de la molécula enzimática, cuya alteración puede conducir a su inactivación o incluso su desnaturalización irreversible. La proporcionalidad puede también ser afectada por la participación simultánea de distintas isoenzimas con diferentes actividades catalíticas específicas (actividad catalítica por unidad de masa de proteína enzimática). Como la frecuencia de colisión entre las moléculas de S para que tenga lugar la formación de P puede considerarse constante, la cantidad (concentración) de enzima puede ser calculada a partir de la actividad catalítica y la E_a (3). Una elevada E_a equivale a una baja actividad catalítica específica, y la variación de E_a tiene un efecto mucho mayor sobre la actividad catalítica específica que la variación del factor de frecuencia de colisión (3).

Los estudios termodinámicos, preferentemente de la E_a , han mostrado su interés en enzimología, tanto desde un punto de vista práctico como puramente académico. Hace años se concedió un gran interés al estudio termodinámico de reacciones enzimáticas con vistas a una posible relación con la adaptación bioquímica de las especies a las condiciones de temperatura (4, 5). Las enzimas de los animales ectotermos (de sangre fría) son más eficientes para reducir la barrera energética (menor E_a), que los sistemas enzimáticos homólogos de las aves y mamíferos (homeotermos), lo que podría ser debido

a diferentes cambios conformacionales de la proteína durante la catálisis (4). Asimismo, para distintas especies de peces se ha descrito una correlación positiva significativa de las E_a de una ATPasa miofibrilar con las temperaturas del medio en que habitan, aunque también podría sugerirse una explicación no directamente relacionada con la evolución (5).

En el campo de la enzimología clínica, la determinación de la E_a de distintas enzimas de utilidad diagnóstica ha aportado datos de indudable interés. A continuación se hace una síntesis de los datos bibliográficos previamente publicados sobre el tema.

Creatina-quinasa (CK, EC 2.7.3.2)

La CK es una enzima con localización mayoritariamente citosólica, presentando una estructura dimérica compuesta por subunidades polipeptídicas B (cerebro) y M (músculo), y habiéndose caracterizado las tres isoenzimas posibles: CKBB (predominante en cerebro), CKMB (predominante en músculo cardíaco y esquelético), y CKMM (predominante en músculo esquelético). Modificaciones post-traduccionales de la CK conducen a una mayor heterogeneidad enzimática con la existencia de tres isoformas de la CKMM y dos de la CKMB. Las formas tisulares CKMM₃ y CKMB₂ son transformadas después de su cesión a la circulación por la N-carboxipeptidasa plasmática formándose las isoformas CKMM₂, CKMM₁ y CKMB₁ respectivamente.

Los estudios de Hagelauer y cols (3, 6) pusieron de manifiesto un aumento de la E_a para las distintas isoenzimas de la CK en el orden CKMM (49 kJ/mol), CKMB (58 kJ/mol) y CKBB (62 kJ/mol), un orden isoenzimático coincidente con el obtenido para su termolabilidad (3). En mezclas de isoenzimas CKMM y CKBB se encontró una adecuada concordancia entre los valores experimentales y los calculados para la E_a aparente (3), lo que permitiría estimar la proporción relativa de ambas isoenzimas en función de la E_a ; sin embargo, el asunto se complica al considerar la posible presencia en la mezcla de la isoenzima CKMB con una E_a intermedia.

En el envejecimiento *in vitro* durante 72h a 37°C en una matriz sérica en condiciones fisiológicas de pH, las isoenzimas CKMM y CKMB, presentan una disminución de su actividad catalítica (inactivación) acompañada de un aumento gradual de las E_a , sin que se encontrasen cambios significativos para las concentraciones estimadas de ambas isoenzimas (3). Consecuentemente, la inactivación de la CK podría ser explicada por una disminución de la actividad catalítica específica debida a la formación de una mezcla de formas enzimáticas intermedias más o menos inactivas, y no de acuerdo con un proceso

de todo o nada (3). Si así fuese, moléculas enzimáticas normales activas podrían coexistir con moléculas completamente inactivas, y dado que estas no contribuirían a la transformación del sustrato y al incremento de velocidad temperatura-dependiente de la reacción, la E_a se mantendría constante.

En pacientes con infarto de miocardio la concentración estimada de CK total aumentó inicialmente de forma paralela a la actividad catalítica, pero alcanzando el máximo aproximadamente 24h más tarde y disminuyendo después más lentamente que la actividad enzimática (6). Asimismo, se encontró un aumento gradual de la E_a aparente desde un valor aproximado de 51 kJ/mol inmediatamente después del infarto hasta 68 kJ/mol tres días después (6, 7), presentando un perfil coincidente con el obtenido en el estudio de inactivación por envejecimiento *in vitro* (6). El posible efecto de distintas proporciones de isoenzima CKMB con respecto a la CK total sobre el valor de E_a aparente es despreciable, debido a su pequeña actividad catalítica comparada con la de la isoenzima CKMM, pudiendo establecerse que el aumento de E_a se debería a modificaciones de la subunidad M (7). La CKMM cedida al plasma sería la forma nativa CKMM₃ (49.8 kJ/mol), con la consiguiente transformación en CKMM₂ (60.3 kJ/mol) y CKMM₁ (67.5 kJ/mol) (7). La evolución de la actividad sérica de CK en pacientes con infarto miocárdico, es el resultado del solapamiento de dos procesos: el escape de la enzima al medio extracelular y su inactivación en el compartimento plasmático, existiendo una correlación entre la concentración enzimática y la actividad catalítica únicamente en la fase inicial post-infarto (6).

Delanghe y cols (8), encontraron que durante las 4-72h post-infarto la actividad específica de la isoenzima CKMB disminuía desde 0.88 U/ μ g hasta 0.71 U/ μ g, al tiempo que la E_a aumentaba desde 53.4 kJ/mol hasta 66.5 kJ/mol. Este incremento de la E_a es consistente con la desnaturalización de esta isoenzima después de su cesión al plasma; sin embargo, la disminución de la actividad específica es menor que la que podría esperarse en función del aumento de E_a observado, sugiriendo que los cambios conformacionales inducidos en la CKMB son multifactoriales (8).

Tanto en músculo cardíaco como esquelético la CK puede estar parcialmente glicada con manosa, galactosa y N-acetil-glucosamina en su porción glucídica, y residuos terminales de ácido siálico y sulfato. Como han demostrado Langlois y cols (9), las formas glicadas de la CK sérica presentan una E_a significativamente mayor que las formas no glicadas (105.6 kJ/mol vs 58.1 kJ/mol). Asimismo, la glicación de la CK cardíaca y

muscular está asociada con un aumento de la Ea, existiendo una correlación significativa de la unión relativa de la CK a las lectinas concanavalina A ($r= 0.911$) y *Ricinus communis* ($r= 0.912$) con la Ea (9). La presencia de restos ácido siálico y sulfato contribuyen a la estabilidad de la molécula glicada de CK, y el tratamiento de las muestras con neuraminidasa o sulfatasa conduce a una disminución de la actividad catalítica CK, con aumento de la Ea y de la unión a la lectina *Ricinus communis* (9). De acuerdo con Langlois y cols (9), la Ea de la CK sérica presentaría una disminución transitoria en el curso de las primeras 12 horas después de infarto miocárdico o trauma muscular, que correspondería a la pérdida de la porción glucídica de las formas enzimáticas tisulares durante su transporte a la circulación. A esta disminución inicial de la Ea, seguiría un progresivo aumento de la Ea en función del envejecimiento de CK, de acuerdo con el concepto general de la desnaturalización de enzimas tisulares después de su cesión al medio extracelular (3, 6).

Con el término de macroenzimas se denomina a formas enzimáticas séricas presentando una masa molecular mucho mayor que la de la enzima correspondiente normalmente encontrada tanto en condiciones fisiológicas como fisiopatológicas (10, 11). Estas formas macromoleculares pueden formarse por asociación de la enzima con inmunoglobulinas (generalmente IgG e IgA y sólo ocasionalmente IgM), denominadas macroenzimas tipo 1, o bien por asociación con otros componentes séricos (lípidos, fragmentos celulares...) o por polimerización de la propia molécula enzimática, denominadas macroenzimas tipo 2. Como estas formas son aclaradas mucho más lentamente que las correspondientes enzimas, se acumulan en plasma, con el resultado de una aumentada actividad catalítica y una posible interpretación diagnóstica errónea, lo que concede un gran interés a la detección y caracterización de macroenzimas en el laboratorio clínico.

Se ha descrito la posible formación de macroenzimas de la CK tanto de tipo 1 como de tipo 2. La macro-CK tipo 1 es un complejo de la CK con inmunoglobulinas, mientras que la más infrecuente macro-CK tipo 2 es probablemente la forma oligomérica de la enzima mitocondrial, y detectada en suero de pacientes con intensa degradación tisular por tumores (12). La prevalencia de una elevada actividad CK debida a macro-CK tipo 1 es de aproximadamente el 2%, habiéndose recomendado la introducción de una prueba para su detección sistemática, como puede ser la precipitación con polietilen-glicol que es relativamente específica para la precipitación de los complejos con inmunoglobulinas (12).

Ambos tipos de macro-CK pueden ser evidenciados en suero humano mediante cromatografía de exclusión, pero no diferenciados entre sí. Stein y cols describieron un procedimiento para diferenciar los tipos de macro-CK basado en sus diferentes E_a (13). Para la macro-CK tipo 1 (CKBB-IgG) encontraron una $E_a = 53$ kJ/mol, un valor semejante de la CKBB con una $E_a = 58$ kJ/mol. Para la macro-CK tipo 2 una $E_a = 142$ kJ/mol, semejante a las obtenidas para la CK mitocondrial de corazón (142 kJ/mol) y de músculo esquelético (130 kJ/mol). La comparación de los resultados obtenidos en 22 sueros normales, 31 macro-CK tipo 1 y 25 macro-CK tipo 2, permitió a estos autores concluir que, tras obtener en la prueba de inactivación térmica (20 min a 45°C) una actividad catalítica residual >50%, una $E_a < 75$ kJ/mol indicaría una macro-CK tipo 1, mientras una $E_a > 75$ kJ/mol una macro-CK tipo 2 (13).

α -Amilasa (AMIL, EC 3.2.1.1)

La AMIL es una endoglucosidasa que forma parte de la secreción exocrina del páncreas y glándulas salivales. Presenta dos isoenzimas la pancreática (AMILP) y la salival (AMILS), que son codificadas por dos genes distintos, si bien se pueden encontrar diferentes formas moleculares para cada una de las dos isoenzimas, resultado de modificaciones post-traduccionales (desaminaciones, glicosilaciones o desglicosilaciones).

Hafkenscheid y Hessels encontraron una considerable variación para la E_a de la AMIL sérica al utilizar distintos sustratos, y sugirieron que a esta variabilidad podría contribuir la proporción relativa de las isoenzimas (14). En efecto, estos autores encontraron en 12 sueros unos valores medios para las E_a de la AMIL total de 40.7 kJ/mol, para la AMILP de 44.8 kJ/mol y para la AMILS de 38.1 kJ/mol (14). Las E_a obtenidas para las dos isoenzimas séricas son análogos a los valores encontrados para esta variable termodinámica en las formas tisulares purificadas de AMILP (45.0 kJ/mol) y AMILS (40.1 kJ/mol) (15). El hecho de que no se encontrase una diferencia significativa entre las E_a de las isoenzimas séricas y las formas purificadas, demuestra la buena estabilidad de la AMIL en el compartimento plasmático. Aunque la E_a de la AMILP es significativamente mayor que la de AMILS, la magnitud de esta diferencia no parece que pueda permitir la estimación de la proporción relativa en suero de ambas isoenzimas.

Lactato-deshidrogenasa (LDH, EC 1.1.1.27)

La LDH es una oxidoreductasa localizada en la fracción citosólica de prácticamente todos los tejidos del organismo. La molécula de la LDH es un tetrámero de 4 cadenas polipeptídicas de tipo H (corazón) y M (músculo), lo que conduce a la existencia de 5

isoenzimas LDH1 (HHHH), LDH2 (HHHM), LDH3 (HHMM), LDH4 (HMMM) y LDH5 (MMMM). La LDH1 y LDH2 son predominantes en músculo cardíaco, riñón y eritrocitos y la LDH5 en hígado y músculo esquelético, presentando otros órganos y tejidos distribuciones isoenzimáticas intermedias.

Los resultados de Buhl y cols (16) evidencian una distinta E_a para las isoenzimas LDH1 y LDH5, sin embargo, en nuestro conocimiento, este hecho no ha sido aún utilizado como marcador de la heterogeneidad enzimática de la LDH sérica en condiciones fisiopatológicas en que interese discriminar el predominio del homotetrámero HHHH ó del MMMM.

Aspartato-aminotransferasa (AST, EC 2.6.1.1)

La AST es una enzima ampliamente distribuida en los distintos tejidos del organismo, siendo particularmente abundante en hígado, músculo esquelético y cardíaco. Presenta dos isoenzimas, una de localización citosólica (AST_{cit}) que es mayoritaria en suero, y otra mitocondrial (AST_{mit}), cuyo aumento en suero indica un daño parenquimatoso severo.

En su clásico estudio Rej y Vanderlinde (17) pusieron de manifiesto que las isoenzimas humanas purificadas AST_{cit} y AST_{mit} presentan igual E_a (52.3 kJ/mol), un valor análogo al de la AST sérica (50.6 kJ/mol), sin que la adición de piridoxal fosfato al medio de reacción tenga efecto sobre los diagramas de Arrhenius obtenidos para la AST sérica y sus isoenzimas purificadas. Estos resultados imposibilitan la utilización de la E_a para el estudio de la composición isoenzimática de la AST. Se ha descrito la posible presencia en suero de complejos macromoleculares de la AST con inmunoglobulinas (macroenzimas tipo 1); sin embargo, teniendo en cuenta los resultados obtenidos para la macro-CK tipo 1 (13), no parece tampoco probable que la determinación de la E_a tenga un interés práctico para la detección de macro-AST.

Fosfatasa alcalina (FAL, EC 3.1.3.1)

La FAL, como la gamma-glutamyltransferasa, 5'-nucleotidasa y alanino aminopeptidasa (impropiamente denominadas de forma colectiva "enzimas de tracto biliar"), está ligada por anclajes hidrofóbicos a las membranas plasmáticas celulares. La FAL constituye una familia de numerosas formas enzimáticas, algunas de ellas verdaderas isoenzimas codificadas por genes distintos, mientras otras son el resultado de muy diferentes modificaciones post-traduccionales que conducen a una gran variedad de isoformas. Las formas de origen intestinal y placentario son dos verdaderas isoenzimas,

mientras la FAL de origen hepático, biliar, óseo y renal son isoformas derivadas de una sola isoenzima.

Copeland y cols (18) encontraron unas diferencias muy discretas entre las Ea de la FAL sérica de 29 pacientes y las isoenzimas purificadas de hígado, intestino y placenta. Por su parte, Langlois y cols (19), en un estudio sobre la heterogeneidad post-traducciona de la FAL ósea en suero, encontraron una correlación significativa de la actividad específica (U/ μ g proteína- enzimática) con la actividad sérica (U/L) en grupos de controles (n= 14, r= 0.832), pacientes con osteoporosis (n= 26, r= 0.761) y pacientes con hipertiroidismo (n= 78, r= 0.572), lo que sugiere una dependencia de la actividad enzimática específica con el grado del recambio metabólico óseo. Asimismo, la Ea en el grupo control (37.7 kJ/mol) fue significativamente menor que en los grupos de pacientes con osteoporosis (63.3 kJ/mol) o con hipertiroidismo (58.5 kJ/mol). En individuos clínicamente sanos, la eliminación de los residuos de ácido siálico de la molécula enzimática mediante incubación con neuraminidasa, condujo a un aumento gradual de la Ea desde 38.0 kJ/mol a valores de 57.0 kJ/mol, 66.1 kJ/mol y 75.3 kJ/mol después de 1h, 2h y 3h de incubación respectivamente (19). Estos resultados sugieren la existencia de una heterogeneidad de la forma ósea de la FAL (¿distinto grado sialilación?) en enfermedades del metabolismo óseo, que se traduce en una menor calidad catalítica de la enzima, con una menor actividad enzimática específica y un aumento de la Ea.

Gamma-glutamilttransferasa (GGT, EC 2.3.2.2)

La GGT, es una enzima ligada a membranas y presente en muchos órganos, sin embargo, se considera que su actividad sérica es mayoritariamente de origen hepático. Aunque no se han caracterizado verdaderas isoenzimas genéticamente determinadas para la GGT, ésta presenta una gran heterogeneidad enzimática, con numerosas isoformas resultado de variaciones en la porción glucídica de la molécula, o la formación de formas macromoleculares por unión a lipoproteínas, e incluso a fragmentos de membranas celulares.

Aunque se han descrito aumentadas concentraciones séricas de asialoglicoproteínas en pacientes con enfermedad hepática, los cambios de la unión de la GGT a distintas lectinas sugieren una activa hiperglicosilación de la molécula enzimática (20, 21). Delanghe y cols (20, 21) encontraron un aumento significativo de la Ea de la GGT sérica en distintas enfermedades hepáticas (exceptuando obstrucción extra-hepática) en relación a un grupo clínicamente sano, sin que existiese una correlación significativa de la

Ea con la actividad enzimática. Sin embargo, el solapamiento de la Ea entre los distintos grupos de pacientes no permite su utilización en el diagnóstico diferencial. Los valores encontrados en individuos sanos fueron análogos a los de la GGT de distintos tejidos. El tratamiento de las muestras patológicas con neuraminidasa para eliminar los restos terminales de ácido siálico de la molécula GGT condujo a una disminución de la Ea. Asimismo, las formas enzimáticas separadas por cromatografía de afinidad ricas en ácido siálico presentaron una Ea significativamente mayor que las formas pobres en ácido siálico (20). Estos resultados ponen en evidencia la influencia de la cantidad de ácido siálico unido a la molécula de GGT sobre su Ea, posiblemente modificando la conformación de su centro activo. Los restos terminales de fucosa, galactosa y N-acetil-glucosamina tienen un mucho menor efecto sobre la Ea (20, 21).

5'-Nucleotidasa (5'NU, EC 3.1.3.5)

La 5'NU, es también una enzima localizada en las membranas citoplásmicas celulares y ampliamente distribuida en el organismo, aunque su actividad sérica se considera mayoritariamente de origen hepático. La heterogeneidad de la 5'NU resulta de la unión de la enzima a lipoproteínas y a fragmentos de membranas plasmáticas, y a la variabilidad de su porción glucídica, no presentando verdaderos isoenzimas.

Utilizando distintos sustratos se obtuvieron diferentes valores para la Ea de la 5'NU (22), de acuerdo con resultados obtenidos para otras enzimas (14, 18). En enfermedades hepáticas se ha descrito un aumento de la sialilación de la 5'NU sérica, que tendría como resultado un menor aclaramiento de la enzima por los receptores hepatocitarios (22). En un grupo de pacientes con enfermedad hepática los valores obtenidos para la Ea de la 5'NU sérica utilizando inosina-5'-monofosfato como sustrato, son significativamente mayores que en individuos sanos (67.8 kJ/mol vs 59.2 kJ/mol), y el tratamiento con neuraminidasa de las muestras produjo una disminución de la Ea hasta 63.6 kJ/mol ($p < 0.001$) y 56.7 kJ/mol (NS) respectivamente (22). Estos resultados confirman un aumento del grado de sialilación de la molécula de 5'NU en pacientes con enfermedad hepática, Sin embargo, la Ea obtenida después del tratamiento de las muestras patológicas con neuraminidasa, fue significativamente mayor que la de los controles ($p < 0.02$), lo que sugiere que esta variable termodinámica está condicionada por otros factores además del contenido de ácido siálico de la molécula enzimática (22).

Alanino aminopeptidasa (AAP, EC 3.4.11.2)

La AAP es una enzima ligada a membranas con una amplia especificidad de sustrato, y aún frecuentemente denominada leucina amino peptidasa, que es realmente otra aminopeptidasa de localización citosólica (LAP, 3.4.11.1). Como se indicó anteriormente, la FAL, GGT, 5'NU y AAP, constituye un grupo de enzimas membranas (impropiamente denominadas "enzimas de tracto biliar"), que presentan un comportamiento similar en el curso de la enfermedad hepática y alcanzan sus mayores actividades séricas en casos de colestasis intra y extra-hepática. La heterogeneidad enzimática de la AAP es debida a distintas modificaciones post-traduccionales de su molécula. La forma nativa anfifílica de la AAP puede pasar al plasma, especialmente en condiciones de colestasis, formando complejos de alta masa molecular con lipoproteínas o con fragmentos de membranas.

En un grupo de pacientes con enfermedad hepatobiliar la Ea de la AAP sérica fue significativamente mayor que en el grupo control (62.1 kJ/mol vs 55.7 kJ/mol) (23). El tratamiento de las muestras con neuraminidasa o tritón X-100 no produjo una variación significativa de la Ea, lo que indica que el grado de sialilación, o la formación de agregados de alta masa molecular (que serían disociados por el detergente) no afectan a la Ea de la AAP (23). Asimismo, la incubación durante 9 días a 37°C y pH= 7.3 de un pool de sueros de pacientes con distintas enfermedades hepatobiliares, no produjo una variación significativa de la actividad enzimática (CV= 0.98%) o la Ea (CV= 1.10%) de la AAP (23). Estos resultados demuestran la buena estabilidad de esta enzima en el medio extracelular, y descartan el posible incremento su Ea en la enfermedad hepatobiliar debido a un envejecimiento de las isoformas AAP, que podrían presentar un aclaramiento disminuido.

Por acción de la papaína, eliminando la parte hidrofóbica de la molécula anfifílica nativa de la AAP, la forma enzimática solubilizada tiene un carácter hidrofílico, igual que la isoforma "normal" sérica presente en individuos sanos. En pacientes con enfermedad hepatobiliar, isoformas hidrofílicas más o menos proteolizadas pueden coexistir con los agregados de alta masa molecular de la forma anfifílica. El tratamiento con papaína de las muestras de pacientes condujo a una progresiva disminución de la Ea de AAP, alcanzando al cabo de 8h de incubación valores análogos a los encontrados en individuos sanos (23). Estos resultados sugieren que la mayor Ea de la AAP sérica en pacientes

con enfermedad hepatobiliar, se debería a la presencia de la forma nativa anfifílica, mientras en individuos sanos la forma enzimática circulante sería la hidrofílica.

En el grupo de pacientes se encontró una correlación negativa significativa de la Ea con la actividad AAP ($r = -0.395$, $p < 0.05$). Este hecho podría deberse a la presencia en estos casos de formas hidrofílicas altamente proteolizadas, generadas por la acción de proteasas hepáticas sobre la AAP nativa en un proceso intracelular, cuyo nivel sérico estaría relacionado con la actividad total AAP.

En un grupo de pacientes con enfermedad hepática ($n = 30$) se obtuvieron elevados coeficientes de correlación entre las actividades séricas de FAL (previa exclusión de la forma ósea), GGT, 5'NU y AAP ($p < 0.001$). Asimismo, se encontraron correlaciones significativas entre las Ea de FAL y GGT ($r = 0.472$, $p < 0.005$), y GGT y 5'NU ($r = 0.613$, $p < 0.001$) (23). La elevada significación de la correlación entre las Ea de GGT y 5'NU es esperable, teniendo en cuenta el análogo efecto del grado de sialilación de la molécula sobre la Ea de ambas enzimas previamente descrito. En el caso de la FAL, en nuestro conocimiento, no se ha estudiado aún el posible efecto de la sialilación sobre la Ea de la forma hepática, pero su correlación con la de GGT fue asimismo significativa, lo que permite suponer que podría tenerlo. Con respecto a la AAP, el factor determinante de su Ea parece ser la proteólisis parcial de la molécula, lo que justifica su falta de correlación significativa con las de GGT y 5'NU, a pesar de sus semejanzas bioquímico-estructurales y de localización subcelular.

β -N-acetilhexosaminidasa (Hex, EC 3.2.1.52)

La Hex es una enzima lisosómica compuesta de dos cadenas polipeptídicas denominadas subunidades α y β , codificadas por dos genes diferentes. Las dos isoenzimas principales son el heterodímero $\alpha\beta$ (isoenzima Hex A) y el homodímero $\beta\beta$ (isoenzima Hex B), mientras el homodímero $\alpha\alpha$ (isoenzima Hex S) es inestable y tiene generalmente una muy limitada actividad catalítica. Otras formas enzimáticas como la Hex P, cuya actividad sérica aumenta en el embarazo y en la enfermedad hepática, y las denominadas formas intermedias (Hex I) derivan de la isoenzima Hex B ($\beta\beta$), por modificaciones post-traduccionales.

En la Figura 1 se indican los resultados obtenidos por el fraccionamiento cromatográfico en DEAE-celulosa de las formas maduras de la Hex en un lisado celular, utilizando como substrato un derivado fluorogénico de la metil-umbeliferona neutro, que es hidrolizado por las isoenzimas Hex A y Hex B, y negativo (sulfatado), específico de la

subunidad α , y por tanto hidrolizado por la isoenzima Hex A pero no por Hex B e isoformas derivadas (Hex P y Hex I). Sin embargo, la termolabilidad de la isoenzima Hex A, significativamente mayor que la de Hex B, es más ampliamente utilizada para la determinación de la composición isoenzimática de la Hex.

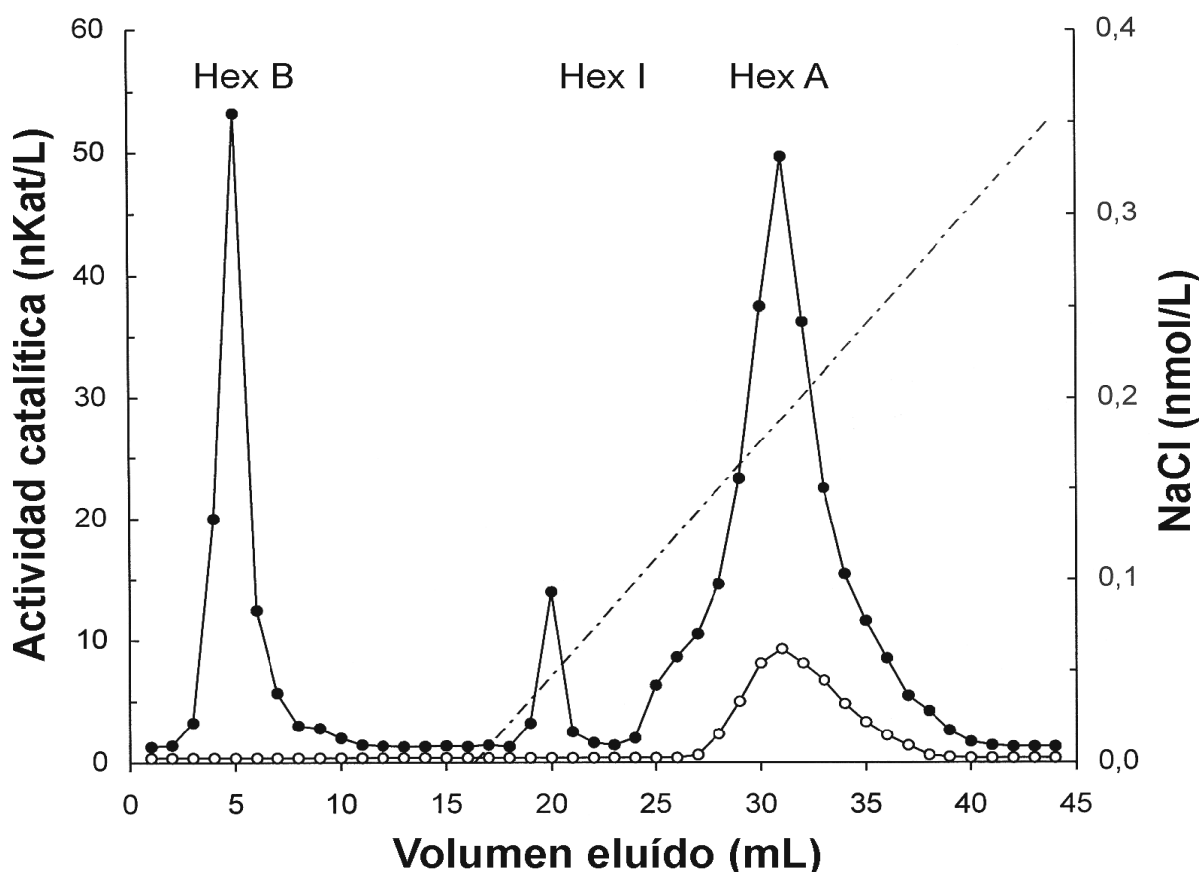


Figura 1. Fraccionamiento cromatográfico en DEAE-celulosa de las formas maduras de la Hex en un lisado de fibroblastos, utilizando como sustrato 4-metilumbeliferil-2-acetamido-2-deoxi- β -D-glucopiranosido (●) y 4-metilumbeliferil-2-acetamido-2-deoxi- β -D-glucopiranosido-6-sulfato (○). [Ver página 68].

En el estudio de la E_a aparente de la Hex sérica, utilizando como sustrato el 3,3'-diclorofenolsulfonftaleinil-N-acetil- β -D-glucosaminido, se encontró una correlación altamente significativa de esta variable termodinámica con la proporción relativa de isoenzima B ($r = 0.957$, $p < 0.001$), con una ecuación de regresión Hex B (%) = $3.0 E_a - 125.3$. Asignando al porcentaje de Hex B los valores de 0 y 100 se obtiene un valor estimado para la E_a de Hex A de 41.8 kJ/mol y para la E_a de Hex B de 75.1 kJ/mol, presentando entre si una diferencia altamente significativa (24). El valor estimado para la

Ea de la isoenzima Hex B es igual al obtenido para la forma Hex P purificada de placenta humana, cuya desialilación con neuraminidasa no condujo a un cambio significativo de la Ea o de la actividad catalítica. Asimismo, en distintos sueros de pacientes en los que se había inactivado térmicamente la isoenzima Hex A, se obtuvo un valor medio para la Ea aparente de 75.2 kJ/mol, sin que el tratamiento con neuraminidasa produjese un cambio significativo de esta variable. Para la isoenzima Hex A purificada de placenta se obtuvo una Ea de 54.4 kJ/mol, significativamente mayor que el valor estimado mediante la ecuación de regresión antes indicada (41.8 kJ/mol). Esto puede explicarse teniendo en cuenta la conversión espontánea parcial de la Hex A tisular purificada en Hex B, por reordenamiento de las subunidades α y β , un hecho ampliamente documentado y que se confirmó electroforéticamente (24).

El hecho de que la Ea de la Hex B sea mucho mayor que la de la Hex A, que se debería a la presencia en esta isoenzima de la subunidad α cuyo centro catalítico es distinto al de la Hex B, posibilitaba la determinación termodinámica de la composición isoenzimática de la Hex en distintos medios biológicos, tales como suero/plasma, orina, y lisados celulares. En este sentido, el que la desialilación de la Hex con neuraminidasa no produjese un cambio significativo de la Ea aparente, es de vital importancia ya que la única diferencia entre la isoenzima Hex B y la forma Hex P, es que esta presenta un mayor contenido de restos de ácido siálico en su molécula, y por tanto una Ea igual a la de Hex B. Las denominadas formas intermedias (Hex I), con distintos grados de sialilación, presentarían Ea análogas a la de la isoenzima de que deriven (mayoritariamente Hex B).

El cálculo de la Ea de la Hex permitió la determinación simple y precisa de su composición isoenzimática en muestras de suero/plasma, siendo los resultados muy concordantes con los obtenidos por inactivación térmica, o utilizando los substratos fluorogénicos derivados de la 4-metil-umbeliferona neutro (actividad total) y sulfatado (actividad isoenzima Hex A) (24).

Sin embargo, algunos metabolitos urinarios de baja masa molecular producen una interferencia positiva en la determinación de la Ea de la Hex, y consecuentemente en la proporción de isoenzima Hex B, lo que obligaba a una eliminación previa de estos metabolitos mediante membranas de permeabilidad selectiva para la aplicación del método a la determinación de las isoenzimas de la Hex en orina (24). En un estudio posterior se caracterizó a la urea como el único metabolito urinario capaz de interferir en

la determinación de la E_a de la Hex (25). Con la finalidad de eliminar esta interferencia, en una primera etapa se intentó hacer un pretratamiento de las muestras de orina con ureasa, pero desgraciadamente los preparados purificados comerciales de esta enzima utilizados presentaron una elevada contaminación con Hex.

La adición de urea a distintas muestras de orina, en las que previamente se habían eliminado los componentes de baja masa molecular (<7.5 kDa), condujo a un incremento lineal de la E_a de la Hex con la concentración de urea adicionada de acuerdo con ecuaciones de regresión del tipo: $E_a = bU + E_{a_0}$, en donde U es la concentración de urea (g/L) y E_{a_0} corresponde a la E_a en ausencia de urea. A medida que E_{a_0} (y también la proporción relativa de Hex B) aumenta, las pendiente de las ecuaciones de regresión (b) disminuyen gradualmente (25), existiendo una correlación negativa altamente significativa entre ambas variables ($r = -0.960$, $p < 0.001$). A partir de estos resultados, es posible deducir una expresión matemática que permite el cálculo de la E_a en ausencia de urea (E_{a_0}) en función de la E_a obtenida para una muestra particular de orina: $E_{a_0} = E_a - (78.0 - E_a/100.0 - U)U$. El valor estimado de E_{a_0} puede ser utilizado para la determinación de la proporción relativa de isoenzima Hex B urinaria, sin necesidad de eliminar la urea de las muestras, con una buena concordancia con los resultados obtenidos por fraccionamiento electroforético (25).

Bibliografía

1. Karimi R. Teaching glycolysis with the student's perspective in mind. *Am J Pharm Education* 2005; 69 (5): article 85.
2. Arrhenius S. Über die reactionsgeschwindigkeit bei der inversion von rohrzucker durch säuren. *Z Phys Chem* 1974; 27: 913-15.
3. Hagelauer U, Faust U. The catalytic activity and activation energy of creatine kinase isoenzymes. *J Clin Chem Clin Biochem* 1992; 20: 633-38.
4. Low PS, Bada JL, Somero GN. Temperature adaptation of enzymes: roles of the free energy, the enthalpy, and entropy of activation. *Proc Nat Acad* 1973; 70: 430-32.
5. Cornish-Bowden A. Enthalpy-entropy compensation: a phantom phenomena. *J Biosci* 2002; 27: 121-26.
6. Hagelauer U, Faust U, Trendelenburg C, Kruse-Jarres J, Rudolph T, Both A. Determination of activation energy of creatine kinase isoenzymes. *J Clin Chem Clin Biochem* 1983; 21: 874-76.
7. Wevers RA, Hagelauer U, Stein W y cols. Indices for the age of the creatine kinase M-chain in the blood. *Clin Chim Acta* 1985; 148: 197-210.
8. Delanghe JR, De Mol AM, De Buyzere ML, De Scheerder IK, Wieme RJ. Mass concentration and activity concentration of creatine kinase isoenzyme MB compared in serum after acute myocardial infarction. *Clin Chem* 1990; 36: 149-53.
9. Langlois MR, Delanghe JR, De Buyzere ML, Leroux-Roels GG. Glycation of human tissue and serum creatine kinase. *Clin Chim Acta* 1992; 211: 83-92.
10. Remaley AT, Wilding P. Macroenzymes: biochemical characterization, clinical significance, and laboratory detection. *Clin Chem* 1989; 35: 2261-70.
11. Turecky L. Macroenzymes and their clinical significance. *Bratisl Lek Listy* 2004; 105: 260-63.
12. Fahie-Wilson MN, Burrows S, Lawson GJ, Gordon T, Wong W, Dasgupta B. Prevalence of increased serum creatine kinase activity due to macro-creatine kinase and experience of screening programmes in district general hospitals. *Ann Clin Biochem* 2007; 44: 377-83.
13. Stein W, Bohner J, Steinhart R, Eggstein M. Macro creatine kinase: determination and determination of two types by their activation energies. *Clin Chem* 1982; 26: 19-24.

- 14.** Hafkenscheid JCM, Hessels M. Some thermodynamic parameters and temperature-conversion factors for determining α -amylase concentration in serum. *Clin Chem* 1988; 34: 2016-18.
- 15.** Hafkenscheid JCM, Hessels M. Some thermodynamic parameters of pancreatic and salivary α -amylase in serum. *J Clin Chem Clin Biochem* 1989; 27: 173-74.
- 16.** Buhl SN, Jackson KY, Lubinski R, Vanderlinde RE. Optimal conditions for assaying human lactate dehydrogenase by the lactate-to-pyruvate: Arrhenius relationships for lactate dehydrogenase isoenzymes 1 and 5. *Clin Chem* 1977; 23: 1289-95.
- 17.** Rej R, Vanderlinde RE. Effects of temperature on the steady-state kinetics and measurement of aspartate aminotransferases. *Clin Chem* 1981; 27: 213-19.
- 18.** Copeland WH, Nealon DA, Rej R. Effects of temperature on measurement of alkaline phosphatase activity. *Clin Chem* 1985; 31: 185-90.
- 19.** Langlois MR, Delanghe JR, Kaufman JM, De Buyzere ML, Van Hoecke MJ, Leroux-Roels GG. Posttranslational heterogeneity of bone alkaline phosphatase in metabolic disease. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1994; 32: 675-80.
- 20.** Delanghe J, De Buyzere M, de Scheerder I, Wieme R. Measurement of activation energy of gamma-glutamyltransferase as a marker for enzyme heterogeneity. *J Clin Chem Clin Biochem* 1988; 26: 271-76.
- 21.** Delanghe JR, de Buyzere ML, de Scheerder IK, Faust U, Wieme RJ. Activation energy and lectin affinity chromatography of gamma-glutamyltransferase as a marker for enzyme heterogeneity. *Clin Biochem* 1989; 22: 115-19.
- 22.** Sogo T, Gigirey MD, Tutor JC. Activation energy of serum 5'-nucleotidase as marker for enzyme heterogeneity. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1994; 32: 905-08.
- 23.** Perez LF, Gigirey D, Torío S, Tutor JC. Activation energy of serum alanyl aminopeptidase as a marker for enzyme heterogeneity in hepatobiliary diseases. *Clin Chem Enzymol Commun* 1998; 8: 91-101.
- 24.** Perez LF, Tutor JC. Assay of β -N-acetylhexosaminidase isoenzymes in different biological specimens by means of determination of their activation energies. *Clin Chem* 1998; 44: 226-31.
- 25.** Perez LF, Tutor JC. Assay of β -N-acetylhexosaminidase isoenzymes in urine by means of determination of their activation energies without removing endogenous low-molecular-mass components. *Clin Chim Acta* 1998; 277: 39-49.

MATERIAL Y MÉTODOS

En la determinación de la actividad de enzimas hidrolíticas como la Hex los substratos fisiológicos naturales, generalmente macromoléculas, son poco utilizados. En cuanto a los substratos sintéticos fluorogénicos derivados de la 4-metilumbeliferona gozan de gran popularidad en razón de su alta sensibilidad; sin embargo, requieren una instrumentación adecuada y una rigurosa metódica operativa, siendo además muy problemática una adecuada estandarización interlaboratorios. Es por estas razones que en los últimos años, se ha sintetizado un número considerable de substratos que permiten la determinación colorimétrica de la Hex (1, 2). La utilización de estos substratos requiere en general, tras la reacción de hidrólisis enzimática a pH ácido, una alcalinización (pH > 9.0) para la obtención de un cromóforo coloreado que absorba a una longitud de onda conveniente. Evidentemente, para su adaptación a los modernos sistemas analíticos automáticos, estos métodos discontinuos (punto final) presentarían ciertas desventajas con respecto a los métodos continuos (cinéticos) para la determinación de la Hex (3).

En 1988, Noto y *cols* sintetizaron la sal disódica del 3,3'-diclorofenolsulfonftaleinil-N-acetil- β -D-glucosaminido (CPR-NAG) proponiéndolo como un substrato adecuado para la determinación de la Hex en orina (4). El CPR-NAG es hidrolizado por la Hex con liberación del aglicón (rojo de clorofenol, CPR), tal como se indica en la Figura 1, que presenta un máximo de absorción a 575 nm. En la técnica analítica, la reacción enzimática se conduce a pH= 6.25, un valor intermedio entre el pH óptimo y el pH de máxima absorción del cromóforo (5).

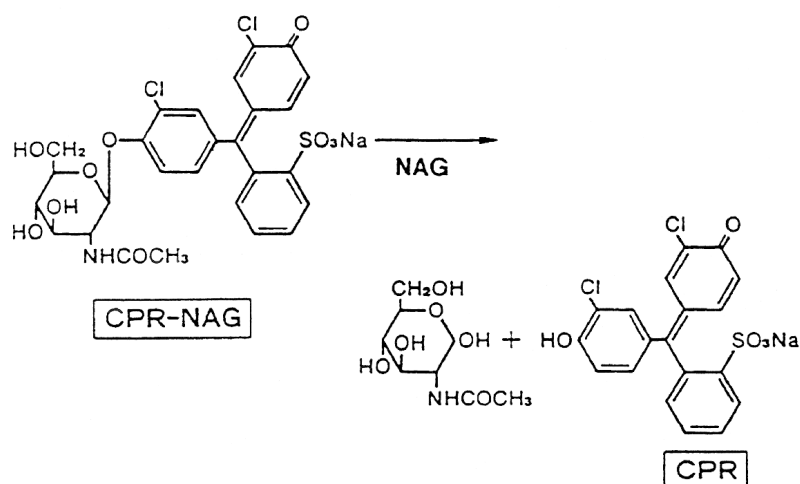


Figura 1. Hidrólisis del CPR-NAG por acción de la β -N-acetilhexosaminidasa dando lugar al cromóforo coloreado rojo de clorofenol (CPR).

El estudio de la energía de activación aparente ha aportado datos de interés en relación a la heterogeneidad de distintos sistemas enzimáticos (5-13). En el caso de la Hex, esta variable termodinámica, utilizando el sustrato CPR-NAG, está directamente relacionado con las proporciones relativas de las isoenzimas Hex A y Hex B como han puesto de manifiesto trabajos previos llevados a cabo en nuestro laboratorio (12). La presencia de una subunidad α en el heterodímero ($\alpha\beta$) de Hex A hace que su energía de activación ($E_a \approx 41.8$ kJ/mol) sea significativamente menor que la del homodímero ($\beta\beta$) de Hex B ($E_a \approx 75.1$ kJ/mol) (12, 13) sin que afecte el grado de sialilación de la molécula enzimática (12).

Se utilizaron viales de reactivo proporcionados por Shionogi and Co. Ltd. (Chuo-Ku, Osaka, Japón), adicionando al liofilizado 8.2 mL de agua destilada para la adaptación de la técnica manual al analizador centrífugo Cobas Bio (Roche Diagnostics, Basilea, Suiza). En estas condiciones, la concentración de CPR-NAG es de 3.9 mmol/L, bórax 6.7 mmol/L en tampón citrato 67 mmol/L, pH 6.25. El analizador centrífugo Cobas Bio fue programado como se indica: Actividad (U/L); calculation factor (su valor depende del tipo de muestra biológica); type of análisis, 2; wavelength, 575nm; simple volume, 10 μ l; diluent volume, 50 μ l; reagent volume, 150 μ l; incubation time, 0 sec; time of first reading, 300 sec; time interval, 30 sec; number of readings, 10; blanking mode, 1; printout mode, 2. En esta programación del analizador se incluye un blanco de reactivo en todas las series para corregir el efecto de una posible hidrólisis espontánea del sustrato.

Al aumentar la concentración de albúmina se produce un efecto de inhibición gradual (de tipo no competitivo) sobre la actividad de la β -N-acetilhexosaminidasa en la formación del cromóforo tal y como se describe en un trabajo previo (11). Consecuentemente se hace necesario la aplicación de un distinto factor de cálculo para la determinación de la actividad enzimática de β -N-acetilhexosaminidasa en función de la concentración de albúmina existente en el fluido biológico utilizado. En el análisis de orina, saliva, líquido cefalorraquídeo, plasma seminal, y lisados de leucocitos o plaquetas, el factor de cálculo utilizado en la programación del analizador fue de 863, mientras que en muestras de suero o plasma el factor de cálculo utilizado fue de 1029 (863×1.1923). El establecimiento de dichos factores de cálculo se realizó a partir de la actividad obtenida para el Stand NAG[®] control (Shionogi and Co.) reconstituido con 1mL de agua destilada o de disolución de albúmina bovina (Ektachem Solution Bovine Serum Albumin[®]) (BSA) (Johnson and Johnson Clinical Diagnostics) cuya concentración era de 4.5 g/dL, que produce una

inhibición aproximada del 16% (actividad residual del 84 %). Esta aproximación evidentemente introduce cierta inexactitud, que para concentraciones de albúmina en el intervalo de referencia podría alcanzar un máximo error del 2.5 %. En 35 muestras de suero de pacientes con distintas enfermedades hepáticas, presentando una concentración media de albúmina de 3.6 g/dL (rango 1.8- 5.1 g/dL), las actividades obtenidas para la Hex utilizando el factor de cálculo general de 1029 presentaron una correlación altamente significativa con las actividades corregidas individualmente de acuerdo con la concentración de albúmina de las muestras ($r= 0.997$; $S_{yx}= 0.45$ U/L), sin que existiese una diferencia significativa entre las medias (11.4 U/L vs 11.0 U/L) (11).

La determinación de las actividades enzimáticas se hizo por duplicado a 25, 30, 35 y 37°C y la pendiente de Arrhenius y las energías de activación aparentes fueron calculadas de acuerdo con Rej y Vanderlidge (14). Tanto el espectrofotómetro como el control de la temperatura en el analizador fueron revisados periódicamente por el servicio técnico de Roche Diagnostics.

En fluidos biológicos que tienen una baja actividad enzimática, como líquido cefalorraquídeo, es conveniente incrementar el volumen de muestra programado en el analizador hasta 40 μ L para lograr que la energía de activación pueda ser determinada de forma más precisa y en conformidad con las proporciones de Hex A y Hex B, evitando de esta forma la concentración previa de las muestras. El aumento del volumen de muestra no produce modificaciones significativas en la energía de activación obtenidas para muestras de suero, LCR, lisados leucocitarios y plaquetarios. Por el contrario cuando el volumen se incrementó en muestras de orina, se obtuvo un aumento significativo de la energía de activación de Hex. Con la eliminación de los componentes urinarios de baja masa molecular a través de una membrana de permeabilidad selectiva Centricom YM-30 (Millipore Corporation U.S.) las energías de activación obtenidas son menores que las encontradas en las correspondientes muestras de orina nativa, siendo esta diferencia proporcional a la concentración de urea en las muestras. La concentración de estos metabolitos endógenos en la mezcla de reacción parece tener un efecto significativo en el aumento de la energía de activación de Hex. Una vez que los componentes urinarios de bajo peso molecular son eliminados por filtración selectiva, el valor de la energía de activación de Hex no se modifica significativamente cuando se incrementa el volumen de muestra. Para la determinación de la Hex y sus isoenzimas en orina sin necesidad de

eliminar los compuestos endógenos de baja masa molecular se ha puesto a punto un procedimiento altamente reproducible (15).

El tratamiento estadístico de los datos se realizó con el programa SPSS (SPSS Inc; Chicago, USA). Para comprobar el ajuste de los datos muestrales a la distribución gaussiana se utilizaron los coeficientes de sesgo y curtosis, la prueba de Shapiro-wilk o el test de Kolmogorov-Smirnov en función del tamaño muestral. Para realizar estudios de comparación de medias, análisis de la varianza y análisis de regresión y correlación, se utilizaron pruebas estadísticas paramétricas, pero cuando se incumplió alguna de las condiciones de aplicabilidad, que resultó ser la mayoría de las veces, se emplearon test no paramétricos (16). Así, al comparar dos muestras o series de datos para investigar la superponibilidad de valores, se utilizó el test t-student cuando las variables se ajustaban a la normalidad, y en el caso contrario se aplicaron la prueba de rangos de signos de Wilcoxon para datos apareados o la U de Mann-Whitney para muestras independientes. El nivel de significación estadística fue aceptado con valores de $p < 0.05$.

La naturaleza e intensidad de la relación y asociación entre variables se estudió por medio del análisis de regresión y correlación. El coeficiente de correlación de Pearson se aplicó sólo si las distribuciones eran normales; pero en la mayoría de los casos se obtuvieron distribuciones no gaussianas, por lo que se utilizó el coeficiente de correlación de Spearman. En alguna situación se usó la correlación parcial cuando se pretendió desenmascarar la existencia de relaciones espúreas, así como identificar variables intervinientes y detectar relaciones ocultas. El método de regresión utilizado cuando ambas variables se ajustaron a la distribución normal y sólo una estaba sujeta a error aleatorio fue la regresión lineal simple, ajustándose en la recta por el método de mínimos cuadrados. En la situación más frecuente con ausencia de normalidad y con ambas variables sujetas a error aleatorio se utilizó el método de Passing-Bablok (17 - 20).

Bibliografía

1. Price R.G. New colorimetric substrates for the assay of hydrolytic enzymes: N-acetyl- β -D-glucosaminidase (NAG). *Chimica Oggi* 1991; 6: 15-19.
2. Price R.G. Measurement of N-acetyl- β -D-glucosaminidase and its isoenzymes in urine: methods and clinical applications. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1992; 30: 693-705.
3. Jung K, Priem F. What are the criteria to introduce new methods for the determination of urinary N-acetyl- β -D- glucosaminidase activity?. *Ann Clin Biochem* 1993; 30: 501-03.
4. Noto A Nakajima K, Sasakura K, Sugasawa T. Method for determination of NAGasa and reagent therefore. *Eur Patent Appl* 0294804, 1988.
5. Jung K. Priem F. Klein G. A new kinetic method for the measurement of β -N-acetylglucosaminidase activity in urine. *Wien Klin Wochensh* 1991; 103 (Suppl. 189): 37-42.
6. Jung K. Priem F. Klotzek S. Becker S. Henke W. Methods compared for determining activity of N-acetyl- β -D- glucosaminidase in urine without pretreatment of sample: Different sensitivity and species effect. *Enzyme* 1991; 45: 215-21.
7. Jung K. Priem F. A practical new assay for determining N-acetyl- β -D- glucosaminidase activity in urine. *Clin Chim Acta* 1991; 203: 405-08.
8. Klein G. Results of the multicenter evaluation of a new method for the determination of β -N-acetylglucosaminidase in urine. *Wien Klin Wochensh* 1991; 103 (Suppl. 189): 30-37.
9. Meier M. Wilke B. Junge W. Determination of β - N-acetylglucosaminidase and albumin in urine: Method comparison and the effect of gel filtration in human and rat urine. *Wien Klin Wochensh* 1991; 103(Suppl. 189): 37-42.
10. Klein G. results of multicenter evaluation of provisional reference ranges for β -N-acetylglucosaminidase in the urine of adults. *Wien Klin Wochensh* 1991; 103 (Suppl. 189):48-50.
11. Pérez LF, Tutor JC. Assay of serum/plasma β -N-acetylhexosaminidase by heat inactivation using a continuous spectrophotometric method adapted to a centrifugal analyzer. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1997; 6: 445-52.
12. Pérez LF, Tutor JC. Assay of β -N-acetylhexosaminidase isoenzymes in different biological specimens by the determination of their activation energies. *Clin Chem* 1998; 44: 226-31.

13. Perez L F, Ribeiro H M, Casal J A, Pinto R A, Sá Miranda M C, Tutor J C: Thermodynamic characterisation of the mutated isoenzyme A of β -N-acetylhexosaminidase in GM2 – gangliosidoses B1 variant. *Clin Chim Acta* 1999; 285: 45–51.
14. Rej R, Vanderlinde RE: Effects of temperature on steady-state kinetics and measurement of aspartate aminotransferases. *Clin Chem* 1981; 27: 213–19.
15. Perez LF, Tutor JC. Assay of β -N-acetyl-hexosaminidase isoenzymes in urine by means of determination of their activation energy without removing endogenous low-molecular-mass components. *Clin Chim Acta* 1998; 277: 39-49.
16. Sokal R R. Rohlf F.J. *Biometría. H. Blume*. Madrid, 1979.
17. Paz JM. Alumá A. estrategias estadísticas para la evaluación de sistemas analíticos Documento D, Fase 1, Versión 1. *Monografía de la Comisión de Instrumentación de la Sociedad española de Bioquímica Clínica y Patología Molecular (SEQC)*.
18. Haeckel R. Bablok W. y cols. Recomendaciones para la evaluación biométrica de resultados en la comparación de métodos con muestras de pacientes. *Boletín informativo de la SEQC* 1994; 82: 23-24.
19. Ordoñez J Queraltó J M. Técnicas estadísticas en la comparación de métodos. *Monografía de la Comisión de Educación de la SEQC. BC-03*. Barcelona, 1979.
20. Passing H. Bablok W. A new biometrical procedure for testing the equality of measurements from two different analytical methods. Application of linear regression procedures for method comparison studies in clinical chemistry. Part I. *J Clin Chem Clin Biochem* 1983; 21: 709-20.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

I. Factores de conversión de temperatura y composición isoenzimática de la β -N-acetilhexosaminidasa*

Distintos autores han mostrado el interés de la determinación de la actividad de Hex en diferentes situaciones fisiopatológicas; interés que aumentaría mediante el estudio de su composición isoenzimática (1-8). Como se indicó anteriormente se ha desarrollado un método termodinámico que permite la determinación de las isoenzimas de la Hex en distintos medios biológicos (9, 10). El procedimiento analítico, implica la determinación por duplicado de la actividad de la Hex a cuatro temperaturas (25, 30, 35 y 37 °C), lo que permite el cálculo de la energía de activación aparente con una adecuada precisión ($CV \leq 1.4\%$).

Con vistas a una posible simplificación de la técnica y su adaptación a analizadores como el Hitachi 717, que permitan la selección de dos temperaturas (30 y 37 °C), se hizo una evaluación de la determinación de la composición isoenzimática de la Hex plasmática mediante el cálculo de los factores de conversión de temperatura (FCT) 37/30 °C y 37/25 °C.

Material y métodos

La determinación de la actividad plasmática de la Hex y la evaluación termodinámica de su composición isoenzimática a través del cálculo de la energía de activación aparente se describió previamente (9). Los analizadores Cobas Bio e Hitachi 717 fueron programados de acuerdo con las especificaciones descritas para la técnica manual.

El analizador centrífugo Cobas Bio (Roche Diagnostics, Basilea, Suiza) fue programado como se indica: calculation factor 1029; type of análisis, 2; wavelength, 575nm; sample volume, 10 μ l; diluent volume, 50 μ l; reagent volume, 150 μ l; incubation time, 0 sec; time of first reading, 300sec; time interval, 30 sec; number of readings, 10; blanking mode, 1; printout mode, 2.

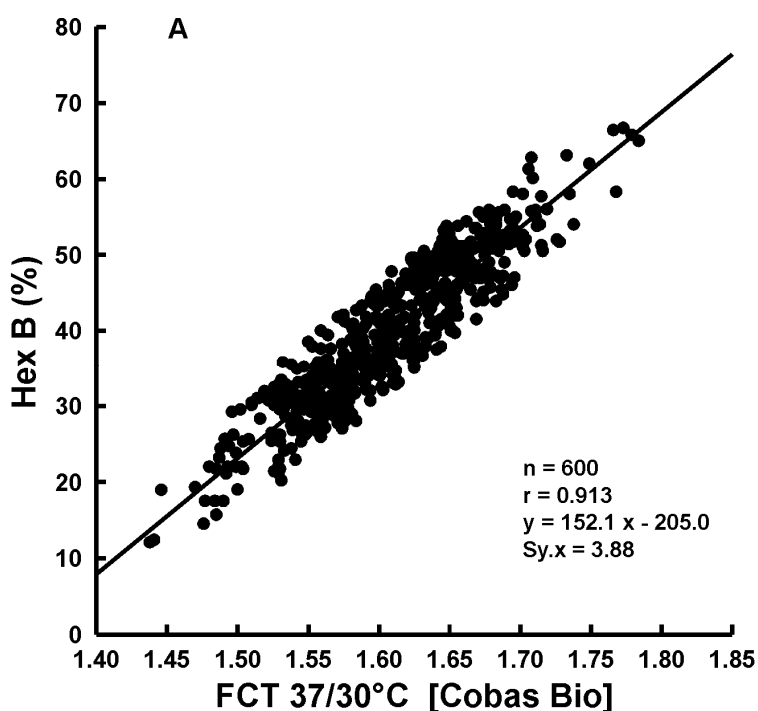
*Casal JA, Pérez LF, Tutor JC. Plasma β -N-acetylhexosaminidase isoenzyme composition and temperature conversion factors. *J Clin Lab Anal* 2000; 14: 327-29.

El analizador Hitachi 717 (Roche Diagnostics) fue programado como se indica: analysis method [Cint-A] [28] [50]; sample volume; [12.5] [6]; R1 volume [250] [20] [No]; R2 volume; [0] [20] [No]; wavelength [575]; calculation factor [9,473] Sd limit [0.1]; duplicate limit [1,000]; sensibil. limit [0]; abs. limit (ln/De) [9,000] [Increment].

Los factores de cálculo programados en los dos analizadores fueron establecidos mediante la actividad enzimática obtenida a 37 °C para el Stand NAG Control (Shionogi and Co) reconstituido con 1 mL de solución de albúmina bovina (45 g/L) como se ha descrito previamente (9). El valor clínicamente aceptable para el error estándar de la estima se estableció, de acuerdo con el rango de referencia para la proporción en plasma de isoenzima Hex B obtenidos en nuestro laboratorio (18-40%), en concordancia con criterios publicados previamente (11).

Resultados y discusión

En la Figura 1A se indica la correlación y regresión encontrada entre los FCT 37/30°C de la Hex plasmática obtenidos en el analizador Cobas Bio y la proporción en porcentaje de isoenzima Hex B obtenido por el método termodinámico convencional. El error estándar de la estima es mayor que el valor clínicamente aceptable ($S_{y,x} \approx 1.4\%$). En la Figura 1B se muestran los resultados obtenidos al utilizar los FCT 37/25 °C, que presentan un mejor coeficiente de correlación y una menor dispersión, con un error de la estima del orden del valor clínicamente aceptable.



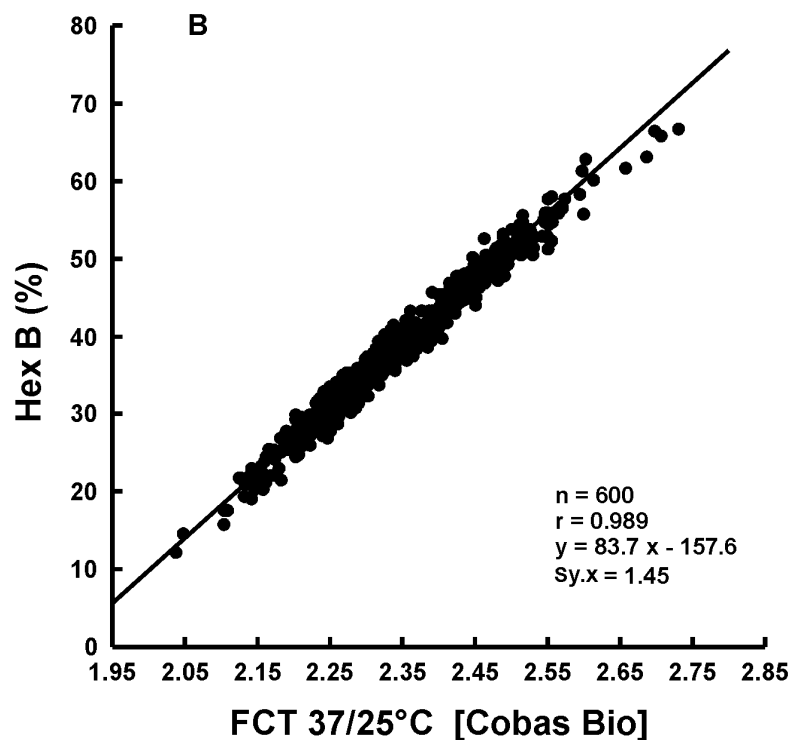


Figura 1. Correlación y regresión entre la proporción en porcentaje del isoenzima Hex B y FCT 37/30 °C (A) y FCT 37/25 °C (B) obtenidos en el analizador Cobas Bio.

Las actividades a 30 y 37 °C obtenidas para la Hex en 58 muestras de plasma en los analizadores Cobas Bio e Hitachi 717 presentaron un elevado coeficiente de correlación y la diferencia entre las medias no alcanzó la significación estadística (Figura 2A). Sin embargo, los FCT 37/30 °C calculados a partir de las actividades obtenidas en ambos analizadores presentan un peor coeficiente de correlación ($r = 0.905$, $p < 0.001$) y una diferencia entre las medias (1.65 vs 1.68) estadísticamente significativa ($p < 0.001$). En la Figura 2B se indican los resultados encontrados al correlacionar los FCT 37/30 °C obtenidos en el Hitachi 717 con la proporción en porcentaje de la isoenzima Hex B obtenida por el método termodinámico convencional, siendo el error de la estima mayor que el valor clínicamente aceptable.

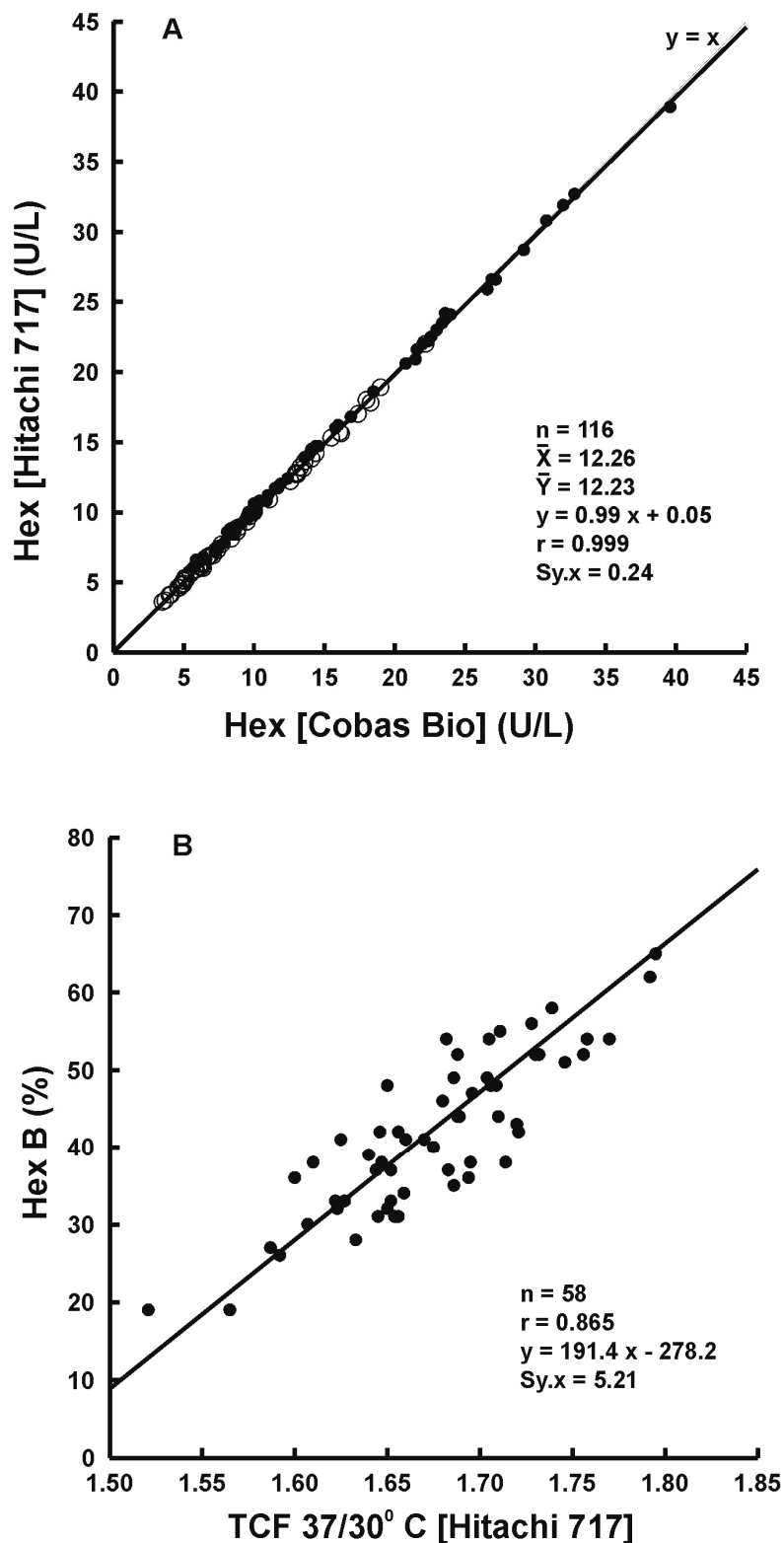


Figura 2. Correlación y regresión entre las actividades a 30°C (○) y 37°C (●) obtenidas para la Hex plasmática en los analizadores Cobas Bio e Hitachi 717 (A), y entre la proporción de isoenzima Hex B y el FCT 37/30°C obtenidos en el analizador Hitachi 717 (B).

Los resultados del estudio de heterogeneidad enzimática de la Hex mediante la determinación de su energía de activación están en pleno acuerdo con los obtenidos utilizando métodos de inactivación térmica, electroforéticos o utilizando sustratos específicos para la isoenzima Hex A (9, 10). Teniendo en cuenta los datos antes indicados, puede concluirse que, mediante el cálculo de los FCT 37/25 °C, puede determinarse la composición isoenzimática de la Hex plasmática con unos resultados análogos a los obtenidos mediante el cálculo de su energía de activación utilizando 4 temperaturas. El uso de FCT 37/30 °C conduce a peores resultados, ya que su correlación con la proporción en porcentaje de Hex B es peor y la dispersión de los valores es más amplia (Figura 1). Las actividades obtenidas para la Hex plasmática en el Cobas Bio y en el Hitachi 717 son transferibles; sin embargo, los FCT 37/30 °C presentan una diferencia estadísticamente significativa. Debe tenerse en cuenta que la selección de la longitud de onda (575 nm) en el Hitachi 717 se hace mediante un filtro interferencial, mientras el Cobas Bio utiliza un monocromador.

La determinación en duplicado de las actividades enzimáticas en el Hitachi 717 podría reducir la dispersión obtenida al correlacionar los FCT con la proporción de isoenzima Hex B (Figura 2B) y proporcionar unos resultados análogos a los encontrados en el Cobas Bio (Figura 1A). Sin embargo, la utilización de FCT 37/30 °C no parece que pueda cumplir las exigencias mínimas requeridas para la determinación de las isoenzimas de la Hex, ya que los errores de la estima son mucho mayores que el valor clínicamente aceptable. Por el contrario, el cálculo de FCT 37/25 °C permitiría la evaluación simple y económica de la heterogeneidad enzimática de la Hex. En cualquier caso los resultados recogidos en la presente memoria para la heterogeneidad enzimática de la Hex fueron obtenidos en todos los casos a partir del cálculo de la energía de activación aparente.

Bibliografía

1. Isaksson A, Hultberg B. Immunoassay of β -hexosaminidase isoenzymes in serum in patients with raised total activities. *Clin Chim Acta* 1989; 183: 155-62.
2. Costanci E, Beccari T, Francisci D, Orlacchio A. Lysosomal hydrolases in serum from human immunodeficiency virus-infected patients. *Clin Chim Acta* 1996; 255: 57-65.
3. Hultberg B, Isaksson A, Berglund M, Moberg AL. Serum β -hexosaminidase isoenzymes: A sensitive marker for alcohol abuse. *Alcohol Clin Exp Res* 1991; 15: 549-52.
4. Hultberg B, Isaksson A, Berglund M, Alling C. Increases and time-course variations in β -hexosaminidase isoenzyme B and carbohydrate-deficient transferrin in serum from alcoholics are similar. *Alcohol Clin Exp Res* 1995; 19: 452-56.
5. Hultberg B, Isaksson A, Agardh E, Agardh CD. Plasma β -N-acetylhexosaminidase isoenzymes A and B exhibit different relations to blood glucose levels in a population of type 1 diabetic patients. *Scand J Clin Lab Invest* 1995; 55: 723-28.
6. Goi G, Fabi A, Lombardo A, *et al.* The lysosomal β -D-acetylglucosaminidase isozymes in human plasma during pregnancy: Separation and quantification by a simple automated procedure. *Clin Chim Acta* 1989; 179: 327-40.
7. Isaksson A, Gustavii B, Hultberg B, Masson P. Activity of lysosomal hydrolases in plasma at term and post partum. *Enzyme* 1984; 31: 229-33.
8. Isaksson A, Hultberg B, Masson P, Landels E, Fensom A. Enzyme immunoassay of β -hexosaminidase A and B in serum: Carrier detection of G_{M2} -gangliosidosis, and equivalence of enzyme activity and enzyme protein reactivity. *Clin Chem* 1993; 39: 1412-15.
9. Pérez LF, Tutor JC. Assay of β -N-acetylhexosaminidase isoenzymes in different biological specimens by means of determination of their activation energies. *Clin Chem* 1998; 44: 226-31.
10. Pérez LF, Tutor JC. Assay of β -N-acetylhexosaminidase isoenzymes in urine by means of determination of their activation energy without removing endogenous low molecular mass components. *Clin Chim Acta* 1998; 277: 39-49.
11. Knoll E, Hafner F, Dettmer K, Wisser H. The determination of calcium, urea and uric acid using the Kodak Ektachem multilayer film technology: An evaluation. *J Clin Chem Clin Biochem* 1982; 20: 491-97.

II. Efecto de la proteólisis parcial sobre la energía de activación aparente de precursores de alta masa molecular y formas maduras de la β -N-acetilhexosaminidasa*

Al igual que en el caso de otras enzimas lisosómicas, las cadenas polipeptídicas α y β de la Hex son sintetizadas sobre los polisomas asociados al retículo endoplásmico rugoso, y el plegamiento de las cadenas, glicosilación, formación de enlaces disulfuro y dimerización, son etapas cuyo fin es la vehiculización de proenzima hasta los lisosomas. La unión de las subunidades es un proceso crítico, ya que la dimerización es necesaria para la adquisición de actividad catalítica (1, 2). En los lisosomas las cadenas polipeptídicas pro α y pro β experimentan nuevos procesos proteolíticos y glucosídicos que las transforman en subunidades maduras (1-3). Consecuentemente las formas precursoras de la Hex tienen un mayor peso molecular ($M_r \approx 150$ kDa) que las formas maduras ($M_r \approx 120$ kDa) (4), aunque ninguna de estas rupturas en las cadenas polipeptídicas son un prerrequisito para la adquisición de actividad catalítica, ya que las formas precursoras son completamente activas (1, 2). Una pequeña proporción (5-20%) de precursores enzimáticos recién sintetizados no se incorpora a los lisosomas y es secretada al medio extracelular (1, 2).

El estudio de la energía de activación aparente ha aportado datos de interés en relación a la heterogeneidad de distintos sistemas enzimáticos (5-13). En el caso de la Hex, esta variable termodinámica, utilizando el substrato cromogénico 3,3'-diclorofenolsulfonftaleinil-N-acetil- β -D-glucosaminido, está directamente relacionado con las proporciones relativas de las isoenzimas Hex A y Hex B (10). La presencia de una subunidad α en el heterodímero Hex A hace que su energía de activación ($E_a \approx 41.8$ kJ/mol) sea significativamente menor que la del homodímero Hex B ($E_a \approx 75.1$ kJ/mol) (10,12) sin que afecte el grado de sialilación de la molécula enzimática (10).

En el presente apartado se estudió el efecto de la proteólisis parcial con papaína (EC 3.4.22.2) sobre la energía de activación de las isoenzimas de la Hex plasmática, urinaria, leucocitaria y plaquetaria.

*Hermida J, Casal JA, Tutor JC. Effect of partial proteolysis on the activation energy of β -N-acetylhexosaminidase precursor and mature forms. *Clin Chem Lab Med* 2003; 41: 302-05.

Material y métodos

Para el estudio del efecto de la proteólisis parcial de la molécula enzimática sobre sus propiedades catalíticas, a 200 μ L de plasma o lisados de leucocitos o plaquetas (a los que se incorporó 0.8 g/dL de albúmina bovina) se adicionaron 60 μ L de una suspensión de papaína procedente de *Carica papaya* (Cat. N°.108014, Roche Diagnostics) con una actividad específica de 30 U/mg. La incubación se hizo a temperatura ambiente durante distintos tiempos hasta un máximo de 8 horas, deteniéndose la digestión enzimática por congelación. Posteriormente las muestras fueron descongeladas, centrifugadas y se determinaron las actividades de la Hex en los sobrenadantes. Las muestras de orina se concentraron por ultrafiltración con membranas Centricon YM-10 (Millipore Corporation, Bedford, USA) con un cut-off de 10.000 MW, y al concentrado se adicionó albúmina (0.8 g/dL), incubando 200 μ L de muestra con 60 μ L de suspensión de papaína. En todos los casos, la digestión enzimática se realizó en unas condiciones de pH análogas al valor óptimo de la proteasa utilizada (pH \approx 6-7). La inactivación térmica de la Hex A plasmática se hizo siguiendo un procedimiento previamente descrito (14).

Resultados y discusión

La digestión con papaína de las muestras de plasma produjo un aumento de la energía de activación aparente de la Hex en la primera hora de incubación, alcanzándose un valor que se mantiene para tiempos de hasta al menos 8 horas de incubación (Figura 1). El incremento de la energía de activación está directamente relacionado con la proporción relativa de Hex A plasmática, y en la Figura 2 se indican los resultados obtenidos con distintos plasmas nativos, así como con diferentes grados de inactivación térmica de la Hex A, para un tiempo de incubación con papaína de 4 horas, que produce un descenso de la actividad enzimática de aproximadamente 10%. La regresión lineal obtenida permite estimar que la proteólisis parcial con papaína produce un aumento de la energía de activación de 3.0 kJ/mol para la isoenzima Hex A, mientras que para la Hex B no se produciría una modificación significativa de esta variable termodinámica.

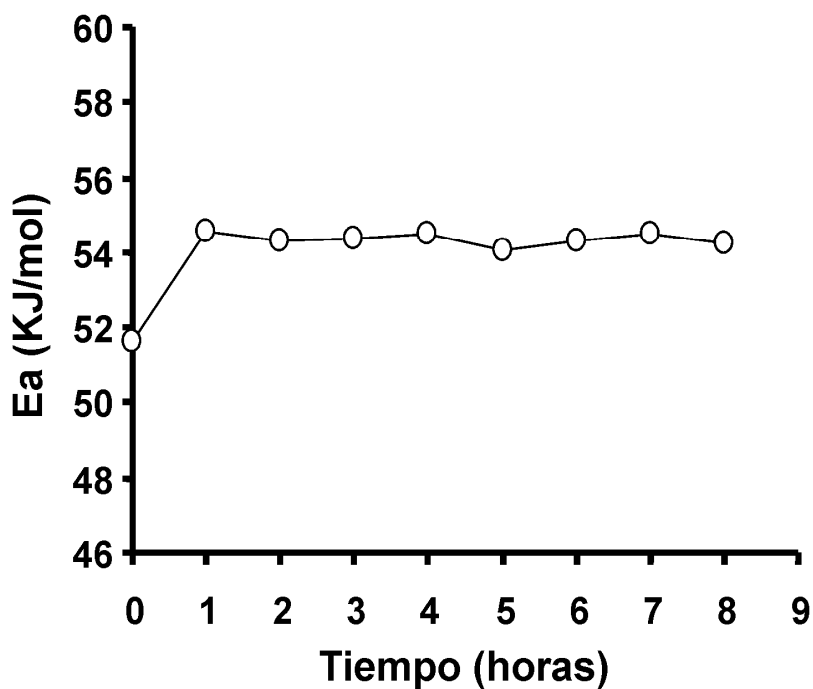


Figura 1. Relación entre la energía de activación aparente de la Hex y el tiempo de tratamiento con papaína en un pool de plasmas.

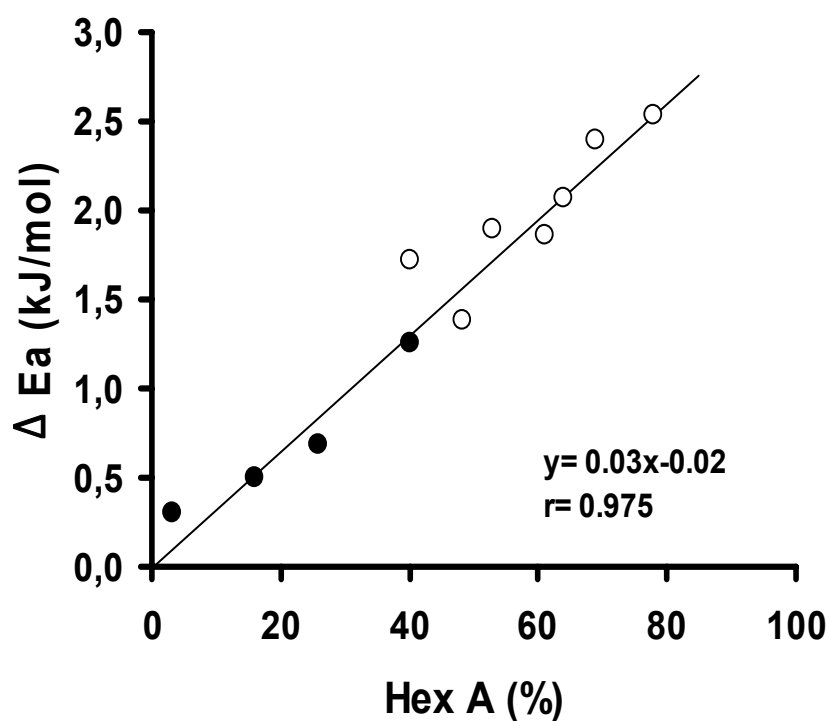


Figura 2. Relación entre el incremento de la energía de activación de la Hex después del tratamiento con papaína y la proporción relativa de la isoenzima Hex A en muestras de plasma nativo (○) y tratadas térmicamente (●).

En el caso de la Hex en lisados de leucocitos y plaquetas, el tratamiento con papaína condujo a un incremento de la energía de activación mucho menor, sea cual sea el tiempo de incubación. En la Tabla 1 se indican los resultados obtenidos para distintas muestras de plasma y lisados de leucocitos y plaquetas para un tiempo de incubación con papaína de 4 horas. En el caso de los lisados de leucocitos o plaquetas no se produjo un descenso significativo de la actividad enzimática después del tratamiento con papaína.

Tabla 1. Incrementos de la energía de activación de la Hex después del tratamiento con papaína.

	n	Hex (x)	Hex A (%)	ΔE_a (kJ/mol)
Plasma	5	8.2 \pm 1.4 (9.6)	70.4 \pm 3.7 (69.3)	2.57 \pm 0.27 (2.27)
Plaquetas	2	6.4 \pm 0.4 (6.4)	61.2 \pm 0.7 (61.2)	0.22 \pm 0.22 (0.22)
Leucocitos	3	18.9 \pm 2.5 (19.9)	57.5 \pm 0.9 (58.2)	0.33 \pm 0.19 (0.42)

(x) U/L (plasma), U/g proteína (leucocitos y plaquetas).

Los resultados son expresados como media \pm SEM (mediana).

Se hizo un estudio de la Hex en muestras de orina de 11 controles clínicamente sanos y de 28 pacientes con distintas enfermedades renales, en los que no se detectó hematuria en ninguno de los casos. Se encontraron correlaciones significativas de la actividad total de la Hex (expresada en U/g creatinina) con las actividades de Hex A ($r= 0.991$, $p< 0.001$) y Hex B ($r= 0.937$, $p< 0.001$), así como con la proporción en porcentaje de Hex B ($r= 0.471$, $p< 0.001$). Aunque el aumento de ambas isoenzimas es en paralelo, los incrementos de actividad total serían por tanto preferentemente a expensas de Hex B. La actividad total de Hex presentó una correlación significativa con la albuminuria ($r= 0.513$, $p< 0.001$) y la proteinuria ($r= 0.428$, $p< 0.001$), obteniéndose análogos coeficientes de correlación al considerar las actividades de las isoenzimas Hex A y Hex B.

Los resultados del estudio del efecto de digestión con papaína sobre la energía de activación de la Hex urinaria se indican en la Tabla 2, en la que los distintos pacientes se distribuyeron en tres grupos según presentasen normoalbuminuria (< 30 mg/g creatinina), microalbuminuria (30-300 mg/g creatinina) o macroalbuminuria (> 300 mg/g creatinina) (15). Los incrementos de la energía de activación aparente de la Hex urinaria

en ninguno de los grupos de pacientes o controles presentaron una diferencia estadísticamente significativa con respecto a los encontrados para los lisados de leucocitos o plaquetas. En el total de individuos estudiados ($n= 39$) no se alcanzó la significación estadística en la correlación de los incrementos de la energía de activación aparente de la Hex urinaria con la proporción relativa de Hex A ($r= 0.039$), la proteinuria ($r= 0.209$) o la albuminuria ($r= 0.193$).

En un estudio de la unión de la Hex a DEAE-celulosa realizado por Gupta y Raina utilizando enzima purificada procedente de testículo caprino (13), encontraron que la isoenzima Hex A presenta una energía de activación mayor en su forma soluble (libre) que en la forma insoluble (ligada). Sin embargo para la isoenzima Hex B no encontraron diferencias termodinámicas significativas entre las formas enzimáticas libre y ligada a la carboximetilcelulosa (CM-celulosa). De acuerdo con estos autores este hecho podría ser debido a que los estados de transición de la Hex A en sus formas ligada y libre impliquen diferentes configuraciones, y proporcionaría información sobre las propiedades termodinámicas de las fracciones microsomal (forma ligada) y lisosomal (forma libre) de la Hex (13).

Estudios previos han mostrado que la Hex está presente en suero / plasma en sus formas precursoras de alta masa molecular (4, 16). Aunque formas tisulares maduras fuesen cedidas al plasma, estas son rápidamente aclaradas de la circulación mediante receptores específicos, localizados principalmente en las células hepáticas no parenquimatosas (células de Kuppfer y endoteliales), que reconocen los residuos manosa/N-acetilglucosamina terminales presentes en las cadenas de oligosacáridos (17). Como se ha indicado antes, el tratamiento con papaína produce un aumento de la energía de activación aparente de la Hex plasmática. Este incremento se debería a una proteólisis parcial de la forma precursora de alta masa molecular de la isoenzima Hex A, cuya energía de activación aumentaría aproximadamente 3.0 kJ/mol, como se desprende de los resultados indicados en la Figura 2. Sin embargo, el tratamiento con papaína no parece producir un cambio significativo en la energía de activación de la Hex B plasmática, la cual está de acuerdo con resultados de otros autores que señalan la estabilidad extrema de la Hex B frente a la acción de enzimas proteolíticos (18). En leucocitos y plaquetas la Hex está incorporada a los lisosomas, encontrándose por tanto en sus formas maduras, y en el tratamiento con papaína de los lisados celulares no se encontraron incrementos significativos de la energía de activación de la Hex (Tabla 1).

Tabla 2. Incrementos de la energía de activación de la Hex urinaria después del tratamiento con papaína en controles y pacientes con enfermedad renal.

	n	Albúmina (mg/g creatinina)	Proteínas (mg/g creatinina)	Hex (U/g creatinina)	Hex A (%)	Δ Ea (kJ/mol)
Controles	11	11.4 \pm 2.1 (8.6)	108.1 \pm 20.9 (79.0)	2.5 \pm 0.3 (2.34)	80.4 \pm 3.8 (81.2)	0.17 \pm 0.18 (0.27)
Pacientes:						
Normoalbuminuria	7	10.4 \pm 2.8 (8.2)	99.7 \pm 36.5 (35.0)	22.5 \pm 9.5 (14.0)	60.5 \pm 4.1 (56.4)	0.58 \pm 0.12 (0.63)
Microalbuminuria	10	101.4 \pm 22.2 (70.9)	373.9 \pm 94.1 (253.3)	12.0 \pm 3.3 (4.9)	65.4 \pm 3.6 (61.0)	0.03 \pm 0.14 (-0.02)
Macroalbuminuria	11	4021.6 \pm 1285.3 (3111.0)	7763.0 \pm 2646.4 (5090)	36.2 \pm 8.6 (28.1)	63.5 \pm 2.26 (61.5)	0.56 \pm 0.17 (0.68)

Los resultados son expresados en media \pm SEM (mediana).

Estos resultados muestran que la proteólisis parcial con papaína produce un discreto aumento de la energía de activación en las formas precursoras de la isoenzima Hex A, pero no en las formas maduras de la misma; aunque éste hecho *per se* no permitiría afirmar que tras la incorporación de la isoenzima Hex A al lisosoma aumente su energía de activación. Por el contrario para la Hex B tanto las formas precursoras como maduras parecen verse poco afectadas, al menos desde un punto de vista termodinámico, por la digestión con papaína. El tratamiento de la Hex plasmática y leucocitaria con Tritón X-100, ha puesto de manifiesto una respuesta semejante de la energía de activación enzimática (datos no presentados). Podría suponerse por tanto que la calidad catalítica de la forma precursora de la isoenzima Hex A, posiblemente debido a la presencia de una subunidad α , es más sensible a los cambios conformacionales que la de Hex B.

En condiciones normales, la actividad de la Hex urinaria se origina exclusivamente a nivel renal y es secretada por exocitosis del contenido lisosomal. La alta proporción de Hex A en muestras de orina puede ser debido a la localización de esta isoenzima en el compartimento soluble intralisosomal, mientras que la Hex B se encuentra unida a la membrana del lisosoma (19). La excreción de la Hex urinaria aumenta con el daño celular renal preferentemente por lesiones a nivel del túbulo proximal (20), con un incremento en la proporción de la Hex B (Tabla 2). Sin embargo, aunque el peso molecular de la Hex imposibilita su filtración a través del glomérulo, para el uso de la actividad de la Hex como un índice de daño tubular, debe excluirse la posible presencia en orina de formas enzimáticas filtradas procedentes del plasma en pacientes con proteinuria.

Hace más de 20 años Kunin y *cols* señalaron que probablemente la Hex urinaria no sería resultado de un daño de la membrana basal glomerular (21). Más recientemente los resultados de Shibasaki y *cols* (22) y Costigan y *cols* (23) sugirieron que la Hex urinaria es básicamente de procedencia renal incluso en pacientes con proteinuria. Nuestros resultados también apuntan en este sentido, ya que en ninguno de los grupos de pacientes con enfermedades renales estudiados (Tabla 2), se encontró una variación de la energía de activación de la Hex con el tratamiento con papaína que pueda indicar la presencia de una significativa cantidad de formas precursoras de Hex A plasmática en las muestras de orina. Estos resultados son así mismo compatibles con los obtenidos por Zühlendorf y *cols* para las formas moleculares de Hex en orina (16). Sin embargo en muestras de orina de pacientes con hematuria si podrían encontrarse isoenzimas de la Hex de origen plasmático.

Bibliografía

1. Gravel RA, Kaback MM, Proia RL, Sandhoff K, Suzuki K, Suzuki K. The GM2 gangliosidosis. In: (Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D eds) *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. New York: *McGraw-Hill*, 2001: 3827-76.
2. Mahuran DJ. Biochemical consequences of mutations causing the GM2 gangliosidosis. *Biochim Biophys Acta* 1999; 1455: 105-38.
3. Mahuran DJ, Neote K, Klavins MH, Leung A, Gravel RA. Proteolytic processing of pro- α and pro- β precursors from human β -hexosaminidase. *J Biol Chem* 1988; 263: 4612-18.
4. Isaksson A, Hultberg B. Serum β -hexosaminidase isoenzymes are precursor forms. *Scand J Clin Lab Invest* 1995; 55: 433-40.
5. Stein W, Bohner J, Steinhart R, Eggstein M. Macro creatine kinase: Determination and differentiation of two types by their activation energies. *Clin Chem* 1982; 28: 19-24.
6. Webers RA, Hagelauer U, Stein W, Bohner J, Faust U, Van Landeghem AAJ *et al.* Indices for the age of creatine kinase M-chain in the blood. *Clin Chim Acta* 1985; 148: 197-210.
7. Delanghe JR, De Buyzere ML, De Scheerder IK, Faust U, Wieme RJ. Activation energy and lectin affinity chromatography of gamma-glutamyltransferase as a marker for enzyme heterogeneity. *Clin Biochem* 1989; 22: 115-19.
8. Sogo MT, Gigirey MD, Tutor JC. Activation energy of serum 5'-nucleotidase as a marker for enzyme heterogeneity. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1994; 32: 905-8.
9. Pérez LF, Gigirey D, Torío S, Tutor JC. Activation energy of serum alanyl aminopeptidase as a marker for enzyme heterogeneity in hepatobiliary disease. *Clin Chem Enzym Commun* 1998; 8: 91-101.
10. Pérez LF, Tutor JC. Assay of β -N-acetylhexosaminidase isoenzymes in different biological specimens by means of determination of their activation energies. *Clin Chem* 1998; 44: 226-31.
11. Pérez LF, Tutor JC. Assay of β -N-acetylhexosaminidase isoenzymes in urine by means of determination of their activation energy without removing endogenous low-molecular-mass components. *Clin Chim Acta* 1998; 277: 39-49.
12. Pérez L F, Ribeiro H M, Casal J A, Pinto R A, Sá Miranda M C, Tutor J C. Thermodynamic characterisation of the mutated isoenzyme A of β -N-

- acetylhexosaminidase in GM2-gangliosidoses B1 variant. *Clin Chim Acta* 1999; 285: 45-51.
- 13.** Gupta GS, Raina R. Kinetics and thermodynamic transitions of N-acetyl- β -D-glucosaminidase A and B in free and bound forms: Role of cellulose ion-exchanges. *Molec Cell Biochem* 1989; 86: 65-70.
- 14.** Pérez LF, Tutor JC. Assay of serum/plasma β -N-acetylhexosaminidase by heat inactivation using a continuous spectrophotometric method adapted to a centrifugal analyzer. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1997; 6: 445-52.
- 15.** American Diabetes Association (ADA). Diabetic nephropathy. *Diabetes Care* 1997; 20 (suppl.1): S24-S27.
- 16.** Zühlendorf M, Imort M, Hasilik A, Von Figura K. Molecular forms of β -hexosaminidase and cathepsin D in serum and urine of healthy subjects and patients with elevated activity of lysosomal enzymes. *Biochem J* 1983; 213: 733-40.
- 17.** Isaksson A, Hultberg B, Jonung T. Rat plasma clearance rate and organ distribution of β -hexosaminidase isoenzymes from human serum. *Clin Chem* 1992; 38: 1893-98.
- 18.** Schuette CG, Weisgerber J, Sandhoff K. Complete analysis of the glycosylation and disulfide bond pattern of human β -hexosaminidase B by MALDI-MS. *Glycobiology* 2001; 11: 549-56.
- 19.** Bourbouze R, Bernard M, Baumann F Ch, Pérez-González N, Martín-Barrientos J, Cabezas JA. Localisation subcellulaire des isoenzymes de la N-acetyl- β -D-glucosaminidase du cortex renal de lapin. *Cell Molec Biol* 1984; 30: 67-74.
- 20.** Bourbouze R, Baumann F Ch, Bonvalet JP, Farman N. Distribution of N-acetyl- β -D-glucosaminidase isoenzymes along the rabbit nephron. *Kidney Int* 1984; 25: 636-42.
- 21.** Kunin CM, Chesney RW, Graig WA, England AC, De Angelis C. Enzymuria as a marker of renal injury and disease: Studies of N-acetyl- β -glucosaminidase in the general population and in patients with renal disease. *Pediatrics* 1978; 62: 751-60.
- 22.** Shibasaki T, Gomi H, Ishimoto F, Miyahara T. Urinary N-acetyl- β -D-glucosaminidase isoenzyme activity as measured by fast protein liquid chromatography in patients with nephrotic syndrome. *Clin Chem* 1990; 36: 102-3.
- 23.** Costigan MG, Rustom R, Bone JM, Shenkin A. Origin and significance of urinary N-acetyl- β -D-glucosaminidase (NAG) in renal patients with proteinuria. *Clin Chim Acta* 1996; 255: 133-44.

III. Determinación termodinámica de las isoenzimas de β -N-acetilhexosaminidasa en suero, plasma, plaquetas, leucocitos totales y subpoblaciones de mononucleares y polimorfonucleares*¹ **

Los ensayos enzimáticos para la detección de portadores heterocigotos de la enfermedad de Tay-Sachs son ampliamente utilizados. Los métodos de inactivación térmica que utilizan los substratos fluorogénicos neutros 4-metilumbeliferil-N-acetilglucosaminido (4MU-NAG), son los más usados para determinar las isoenzimas Hex A y Hex B en suero y leucocitos (1-3), ya que bajo determinadas condiciones experimentales la isoenzima Hex B presenta mayor termoestabilidad que Hex A.

La mayoría de los laboratorios utilizan básicamente la proporción relativa en porcentaje de isoenzima Hex A para definir un rango de normalidad, y un rango donde estarían los portadores heterocigotos de Tay-Sachs, existiendo entre ambos grupos una zona no concluyente (2). Las muestras de suero pueden ser utilizadas para la detección de portadores heterocigotos de Tay-Sachs (3, 4, 5), sin embargo los anticoagulantes orales, embarazo o enfermedades hepáticas pueden incrementar la proporción de Hex B (3, 4, 5, 6) y por tanto introducir un factor adicional de solapamiento. Una alternativa aplicable cuando los resultados en suero no son concluyentes, es aislar leucocitos y realizar el tratamiento térmico de las isoenzimas en los lisados celulares (1, 2). Sin embargo la actividad específica de la Hex, así como la proporción relativa de sus isoenzimas, es diferente en linfocitos, monocitos y granulocitos, por lo que se ha sugerido el uso de poblaciones celulares homogéneas en lugar de lisados de leucocitos totales para la identificación de portadores de la enfermedad de Tay-Sachs (7-9). Con la determinación de las isoenzimas de la Hex en poblaciones de leucocitos mononucleares (MN) y polimorfonucleares (PMN) (8-9) o en plaquetas (7, 10) propuesta para el screening de la enfermedad de Tay-sachs podría obtenerse una menor variación inter e intraindividual en

***Casal JA, Chabás A, Tutor JC.** Thermodynamic determination of β -hexosaminidase isoenzymes in mononuclear and polymorphonuclear leukocyte populations. *Am J Med Genet* 2003; 116A: 229-33.

****Casal JA, Cano E, Tutor JC.** β -hexosaminidase isoenzyme profiles in serum, plasma, platelets and mononuclear, polymorphonuclear and unfractionated total leukocytes. *Clin Biochem* 2005; 38 (10): 938-42.

la proporción relativa de isoenzima Hex A. Debe tenerse en cuenta, que en leucocitos se requieren tiempos de incubación más largos, así como controlar cuidadosamente, las variables de dicha reacción. (1-3, 11-14), y en este sentido Prencz y cols (13) observaron que el porcentaje de isoenzima Hex A es inversamente proporcional a la concentración de leucocitos usados en el ensayo, sugiriendo la presencia de un componente celular no identificado que protege a la isoenzima Hex B de la inactivación térmica (12, 13). Resultados similares han sido descritos por otros autores (11, 14), y consecuentemente cada laboratorio debería establecer su propio protocolo y valores de referencia para el método de inactivación térmica utilizado, con el fin de optimizar al máximo los resultados obtenidos (12).

La Hex A también puede ser determinada utilizando el sustrato fluorogénico negativo sulfatado 4-metilumbeliferil-N-acetilglucosaminido-SO₄ (4MU-NAG-SO₄); sin embargo para el screening de grandes masas poblacionales este método no suele reemplazar a los de inactivación térmica pues el elevado costo del sustrato específico hace muy onerosa su utilización en estos casos (2). Más recientemente se han incorporado los métodos basados en la extracción de ADN para la identificación de mutaciones específicas, sin embargo estas técnicas podrían tener una pobre sensibilidad cuando son utilizadas en el screening de la enfermedad de Tay-sachs en poblaciones de origen no judío (3), por lo que estos procedimientos suelen utilizarse como pruebas complementarias a los test bioquímicos. Por tanto se hace necesario, desarrollar métodos cuya sensibilidad, especificidad y relación coste-efectividad permitan utilizarlos como pruebas de screening (3).

El objetivo de nuestro estudio, fue determinar termodinámicamente el perfil isoenzimático de la Hex en suero, plasma, así como en lisados de plaquetas, leucocitos totales no fraccionados y de poblaciones de MN y PMN.

Material y métodos

Las muestras de sangre se obtuvieron entre las 9 y 11 horas a.m. La toma de muestras se hizo en tubos Vacutainer (BD Vacutainer Systems, Plymouth, Inglaterra), sin aditivo para la separación de suero y con EDTA-K3 para la separación de plasma y leucocitos o plaquetas. Las poblaciones de leucocitos totales, MN y PMN se aislaron utilizando Polymorphoprep solution (Axis-Xield Poc As, Oslo, Noruega) siguiendo las instrucciones del fabricante y como se ha descrito en estudios previos (8, 15), el recuento

diferencial para cada una de las poblaciones celulares obtenidas se hizo mediante un analizador Technicon H3 System (Bayer Diagnostics) obteniéndose una media en porcentaje (\pm SEM) de 92.1 ± 2.8 % (rango 87-96 %) de MN y de 94.5 ± 2.3 % (rango 91-98 %) de PMN en las fracciones correspondientes. Las plaquetas se aislaron de acuerdo con el procedimiento descrito por Levy-Toledano y cols (16). Los concentrados de leucocitos y plaquetas fueron resuspendidos en 350 μ L de una disolución de 9.0 g/L de NaCl, y la suspensión fue congelada a -36 °C al menos 24 horas, y posteriormente descongelada y sonicada (6 ciclos de 10 segundos con una potencia de 60%) mediante un homogeneizador ultrasónico (Bandelin Electronic, Berlín, Alemania) y centrifugada durante 15 minutos a 10.000 g. En los sobrenadantes se determinó la concentración proteica mediante el método rojo-molibdato de pyrogalol en un analizador Dimension RxL (Dade Behring, Mosburg, Alemania). La actividad de Hex en suero, plasma, y lisados de plaquetas y leucocitos se determinó utilizando como sustrato el sodio-3,3'-diclorofenolsulfonftaleinil-N-acetil- β -D-glucosaminido. El control de calidad diario, se hizo determinando la energía de activación de la Hex en el Control Stand NAG (Shionogi and Co Osaka, Japón). Para la determinación fluorimétrica de la actividad de Hex leucocitaria, 10 μ L de los lisados (20-30 μ g de proteína) se incubaron a 37 °C durante 30 minutos con 50 μ L de 4MU-NAG (3 mmol/L) en buffer citrato (0.5 mol/L y pH= 4.4) con un volumen final de 70 μ L. Para la determinación fluorimétrica de la actividad de isoenzima Hex A leucocitaria, 20 μ L de los lisados (20-60 μ g de proteína) se incubaron a 37 °C durante 30 minutos con 150 μ L de 4MU-NAG-SO₄ (2 mmol/L) en buffer citrato-fosfato (0.2 mol/L y pH= 4.2) con un volumen final de 200 μ L. En ambos casos la reacción se detuvo añadiendo 3 mL de buffer Na₂CO₃-NaHCO₃ (0.5 mol/L y pH= 10.7), la fluorescencia se midió con una excitación de 365 nm y emisión de 445 nm siendo posteriormente comparada con los estándares de metilumbeliferona.

Resultados y discusión

En la Tabla 1 se indica la imprecisión encontrada para la determinación de la energía de activación de Hex para distintos lotes de Stand NAG Control. Aunque en éstos casos las determinaciones de la actividad enzimática a las distintas temperaturas utilizadas se hicieron por simple y no por duplicado, la imprecisión día a día del valor para la energía de activación ha de considerarse muy satisfactoria.

Tabla 1. Imprecisión día a día obtenida para el Stand NAG Control® en la energía de activación aparente de la β -hexosaminidasa.

Lote	n	Media \pm SEM (kJ/mol)	CV (%)	Intervalo (kJ/mol)
6003	87	65.75 \pm 0.10	1.40	63.80 – 67.80
8001	38	65.32 \pm 0.11	1.06	63.90 – 66.55
8002	55	65.58 \pm 0.11	1.22	64.00 – 67.04

Asimismo, los resultados obtenidos para la energía de activación aparente de la Hex en lisados de leucocitos PMN y MN (n= 86) utilizando dos analizadores Cobas Bio distintos mostró una regresión lineal de $y = 0.98x + 1.10$ con un coeficiente de correlación de $r = 0.989$ ($p < 0.001$) y energías de activación medias de 58.16 y 58.01 kJ/mol, no existiendo una diferencia estadísticamente significativa entre ellas (Figura 1).

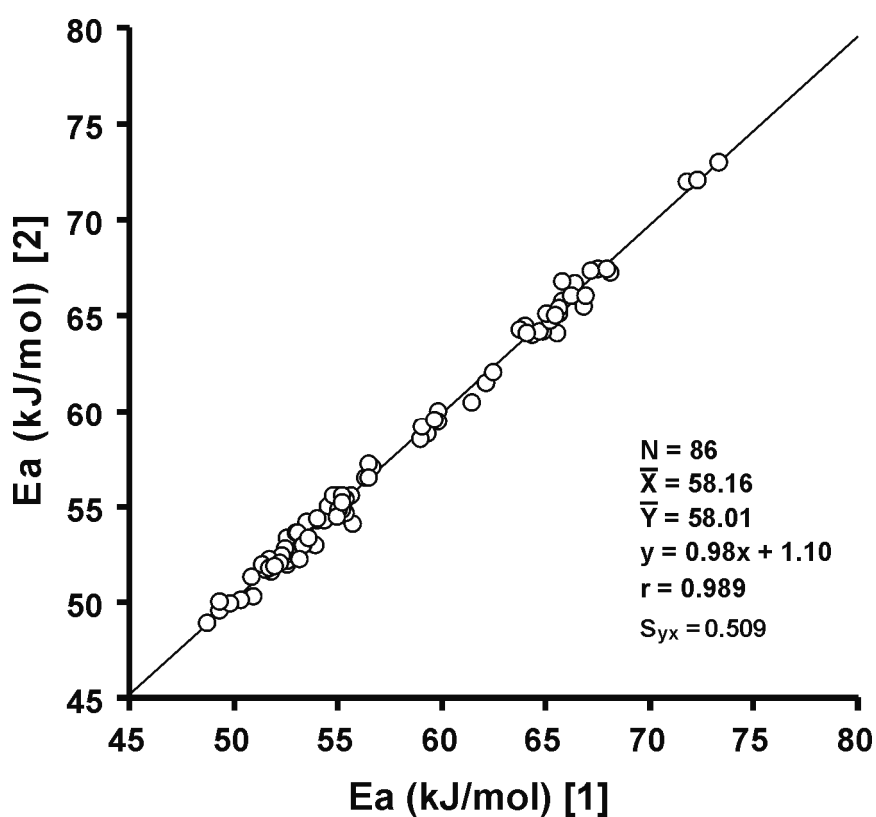


Figura 1. Correlación y regresión encontrada para la energía de activación aparente de la Hex en dos Cobas Bio diferentes.

El posible efecto de la concentración de leucocitos en las muestras sobre los resultados obtenidos para la proporción en porcentaje de Hex A, se estudió haciendo distintas diluciones de una suspensión de leucocitos MN y otra de PMN con solución 9.0 g/L NaCl y sometiéndolas posteriormente al procedimiento general. Como se indica en la Tabla 2, la concentración de leucocitos no afectó de modo significativo a los valores obtenidos para la energía de activación aparente de la enzima y por lo tanto para la proporción de Hex A. Estas variables bioquímicas se mantienen al menos durante 60 días en los pellets leucocitarios congelados a $-36\text{ }^{\circ}\text{C}$, siendo la imprecisión día-día de los resultados obtenidos para la proporción relativa de Hex A en MN (CV= 1.76%) y en PMN (CV= 2.87%) muy satisfactoria. La imprecisión en la misma serie para esta variable bioquímica en lisados de leucocitos MN y PMN (n= 10) fue también satisfactoria con un coeficiente de variación $\leq 1.6\%$.

Tabla 2. Efecto de la cantidad de muestra sobre los resultados obtenidos para la actividad específica y composición isoenzimática de la β -hexosaminidasa en leucocitos MN y PMN.

	Proteínas (g/L)	Hex (U/g proteína)	Ea (kJ/mol)	Hex A(%)
Células MN	1.48	10.4	57.9	51.6
	0.73	10.5	57.1	54.0
	0.51	10.1	58.0	51.3
Media \pm SEM		10.33 ± 0.12	57.67 ± 0.28	52.30 ± 0.85
CV (%)		2.03	0.85	2.83
Células PMN	0.98	6.5	49.8	75.9
	0.47	6.5	50.6	73.5
	0.32	6.2	50.0	75.3
Media \pm SEM		6.40 ± 0.10	50.13 ± 0.24	74.90 ± 0.72
CV (%)		2.65	0.84	1.67

Al comparar la proporción en porcentaje de isoenzima Hex A en leucocitos MN y PMN obtenido mediante el método termodinámico con el cociente de actividades enzimáticas utilizando los sustratos fluorogénicos sulfatado y neutro (4MU-NAG-SO₄ / 4MU-NAG), se encontró una correlación altamente significativa (Figura 2).

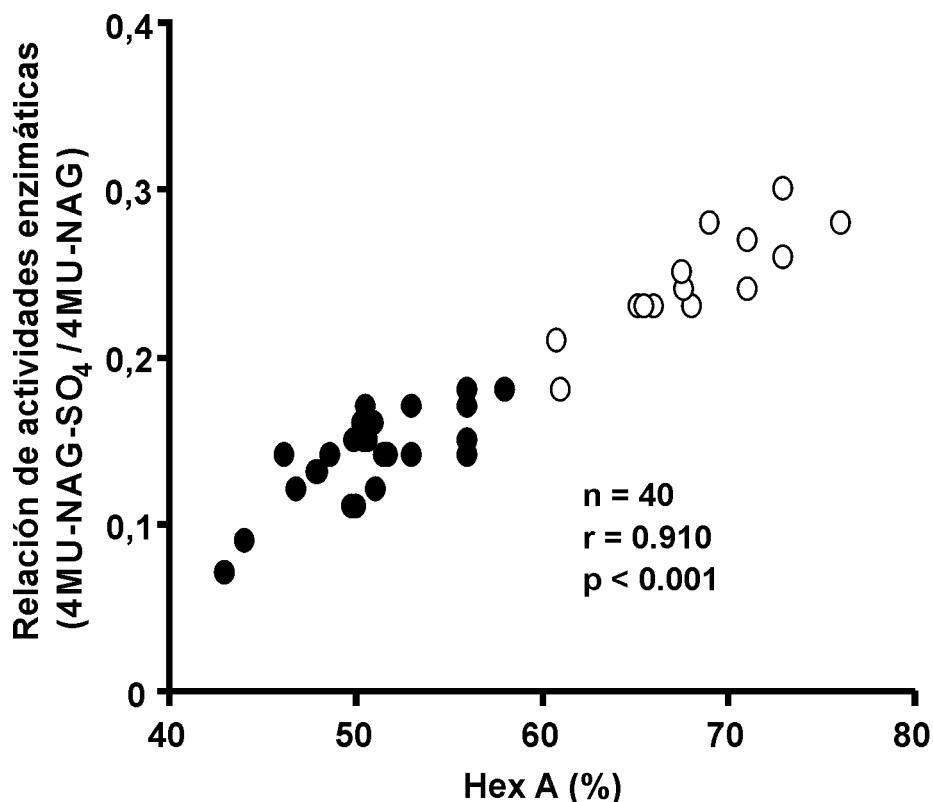


Figura 2. Correlación entre la proporción en porcentaje de la isoenzima β -hexosaminidasa A determinada mediante el método termodinámico y la relación de actividades enzimáticas utilizando sustratos fluorogénicos sulfatados y neutros (4MU-NAG-SO₄/ 4MU-NAG) en leucocitos MN (●) y PMN (○).

En la Tabla 3 se indican los valores de referencia encontrados en 163 individuos control, (82 hombres y 81 mujeres) con una edad media (\pm SD) de 31.7 ± 1.1 años (rango 18 – 68 años) para la actividad específica de Hex y la proporción relativa de la isoenzima Hex A en leucocitos MN y PMN. Los leucocitos PMN presentaron valores significativamente mayores que los MN para la actividad específica de Hex total ($p < 0,01$) y la proporción relativa de isoenzima Hex A ($p < 0.001$). Estas diferencias también son clínicamente significativas al ser mayores que los correspondientes errores clínicamente aceptables establecidos de acuerdo con los criterios descritos previamente (17 – 18), utilizando los intervalos de referencia encontrados por nosotros para las diferentes

variables bioquímicas. La actividad específica media de la isoenzima Hex A fue significativamente mayor ($p < 0.001$) en leucocitos PMN que en MN (15.11 ± 5.21 U/g proteína vs 10.37 ± 2.84 U/g proteína). Por su parte la actividad específica de la isoenzima Hex B fue significativamente mayor ($p < 0.001$) en MN que en PMN (8.67 ± 2.22 U/g proteína vs 5.95 ± 2.01 U/g proteína). Las proporciones relativas de isoenzima Hex A en leucocitos MN y PMN presentaron una correlación estadísticamente significativa entre sí ($r = 0.273$, $p < 0.001$).

Tabla 3. Actividad específica y variación interindividual de la Hex total y sus isoenzimas en leucocitos MN y PMN.

	Células MN (n= 163)		Células PMN (n= 163)	
	Media \pm SD (Mediana)	CV (%)	Media \pm SD (Mediana)	CV (%)
Hex Total (U/g proteína)	$19.01 \pm 4.92^*$ (19.37)	25.88	21.06 ± 6.99 (20.50)	33.19
Hex A (U/g proteína)	$10.37 \pm 2.84^{**}$ (10.31)	27.38	15.11 ± 5.21 (14.86)	34.48
Hex B (U/g proteína)	$8.67 \pm 2.22^{**}$ (8.82)	25.60	5.95 ± 2.01 (5.72)	33.78
Hex A (%)	$54.28 \pm 3.06^{**}$ (54.64)	5.64	71.56 ± 3.86 (71.65)	5.39

Significación: * $p < 0.01$ ** $p < 0.001$.

En 10 individuos controles sanos (6 hombres y 4 mujeres) se tomaron muestras de sangre a las 9 h y a las 18 h, indicándose en la Tabla 4 los resultados obtenidos para la Hex en leucocitos MN, PMN y plasma. No se alcanzó una diferencia estadísticamente significativa para ninguna de las variables bioquímicas en función de la hora de toma de muestra.

Tabla 4. Resultados obtenidos en leucocitos y plasma para la actividad específica y composición isoenzimática de la β -hexosaminidasa en muestras recogidas por la mañana y por la tarde de 10 sujetos clínicamente sanos

		9 : 00 Horas		18 : 00 Horas	
		Media \pm SEM	Mediana	Media \pm SEM	Mediana
Células MN	Hex (U/g proteína)	21.17 \pm 1.27	19.99	22.50 \pm 1.08	22.5
	Hex A (%)	57.54 \pm 0.63	57.54	56.79 \pm 0.79	56.23
Células PMN	Hex (U/g proteína)	30.35 \pm 1.79	29.45	30.88 \pm 1.09	29.85
	Hex A (%)	68.67 \pm 0.54	68.74	69.52 \pm 0.81	69.81
Plasma	Hex (U/L)	9.01 \pm 0.43	9.08	8.89 \pm 0.55	9.04
	Hex A (%)	70.59 \pm 1.98	70.80	70.79 \pm 2.10	68.78

En 33 individuos, con una proporción relativa de leucocitos PMN del $59.6 \pm 15.2\%$ (rango 34% - 90%), se determinaron las actividades específicas de Hex total, Hex A y Hex B en los lisados de leucocitos totales no fraccionados (Tabla 5). Aunque como se indicó anteriormente, la proporción relativa de isoenzima Hex A es mayor en leucocitos PMN que MN, en los 33 casos estudiados no se alcanzó la significación estadística en la correlación entre las proporciones relativas de isoenzima Hex A leucocitaria y de PMN ($r = 0.225$).

Tabla 5. Actividad específica y variación interindividual de la Hex total y sus isoenzimas en leucocitos totales no fraccionados.

	Mezcla de Leucocitos (n= 33)	
	Media \pm SD (Mediana)	CV (%)
Hex Total (U/g proteína)	20.6 \pm 5.5 (20.0)	26.7
Hex A (U/g proteína)	12.2 \pm 3.4 (11.8)	27.9
Hex B (U/g proteína)	8.3 \pm 2.4 (8.7)	28.9
Hex A (%)	59.4 \pm 4.2 (59.8)	7.1

En los 163 controles estudiados se encontró una actividad plasmática media para la Hex total de 8.76 ± 1.88 U/L (mediana 8.53 U/L, rango 5.6 – 16.1 U/L) con una proporción media de isoenzima Hex A de 68.58 ± 4.52 % (mediana 68.25 %, rango 56.4 – 80.9 %). La proporción de Hex A plasmática no presentó una correlación significativa con la proporción de esta isoenzima en leucocitos MN ($r= 0.013$) y PMN ($r= -0.013$).

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas para la Hex leucocitaria o plasmática en función del sexo. En los individuos mayores de 51 años se encontró un aumento estadísticamente significativo en la actividad de la Hex total en plasma ($p < 0.005$) sin que varíe significativamente la proporción relativa de Hex A.

En 81 individuos de ambos sexos (controles, embarazadas y pacientes con distintas enfermedades), y que no presentaban la enfermedad de Tay-Sachs, se determinaron las actividades de la Hex en muestras de suero y plasma. Como se indica en la Figura 3A, se encontró una elevada correlación entre los valores ($r= 0.953$, $p < 0.001$), pero la actividad enzimática en suero es significativamente mayor que en plasma ($p < 0.001$). La diferencia de actividad suero/plasma presentó una correlación altamente significativa con el número de plaquetas ($r= 0.846$, $p < 0.001$). No se encontró una diferencia estadísticamente significativa entre las energías de activación aparente de la Hex en suero y plasma, presentando los valores una elevada correlación entre si (Figura 3B).

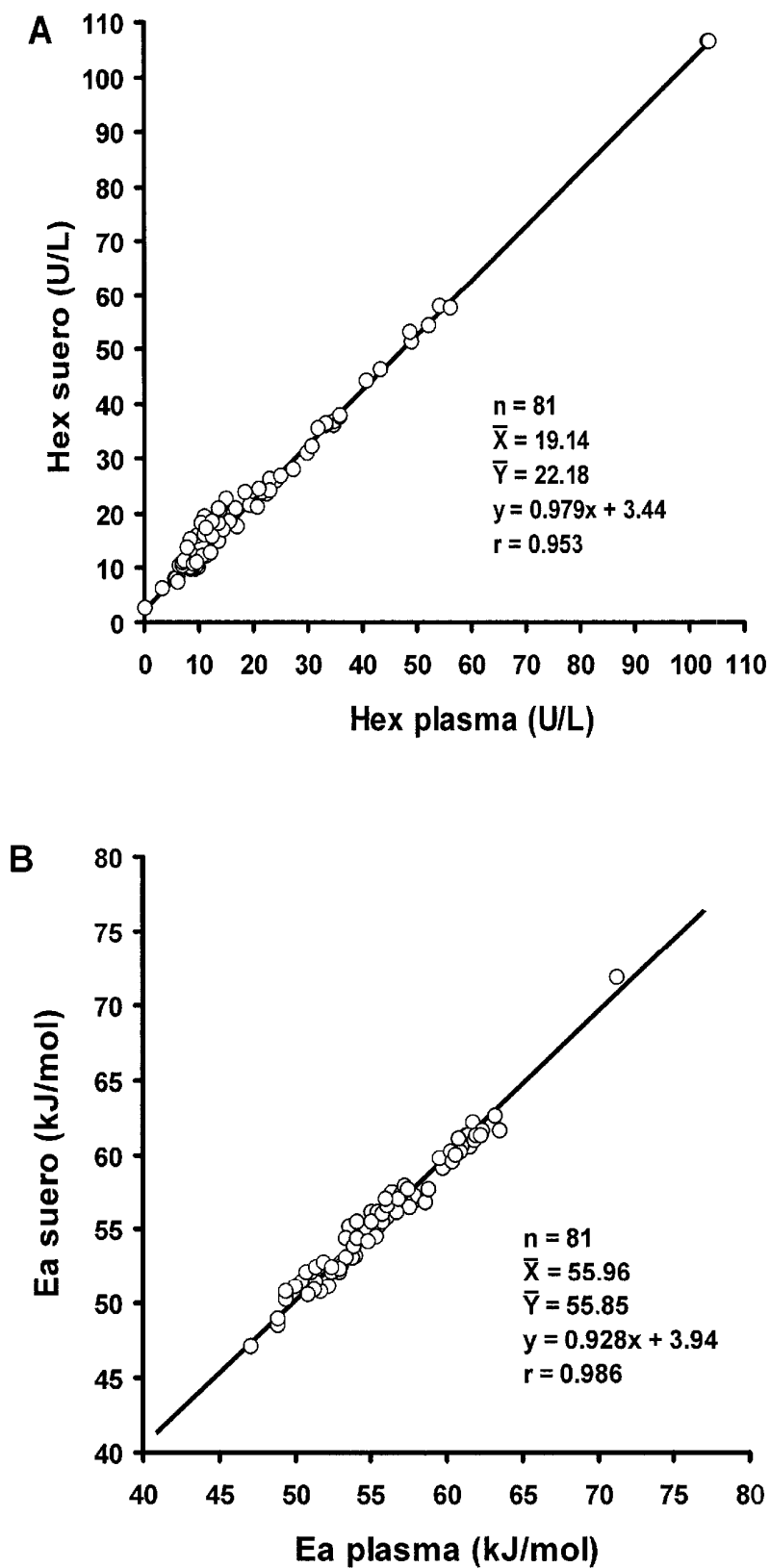


Figura 3. Relación entre la actividad de la Hex total (A) y la energía de activación aparente (B) en muestras de suero y plasma.

Estos resultados sugieren que, aunque en suero las actividades de la Hex total y sus isoenzimas son mayores que en el plasma, no se modifica la proporción relativa de las isoenzimas Hex A y Hex B como se indica en Tabla 6. Sin embargo el cociente de actividades enzimáticas de la Hex en suero/plasma presentó correlaciones significativas con el cociente de energías de activación en suero/plasma ($r= 0.303$, $p< 0.01$) y con el cociente de las proporciones relativas de Hex B en suero/plasma ($r= 0.257$, $p< 0.05$). Esto podría sugerir, que cuanto mayor es el aumento proporcional de la actividad enzimática en suero en relación al plasma, la proporción de isoenzima Hex B en suero tendería asimismo a aumentar.

Tabla 6. Variaciones interindividuales de la actividad de la Hex total y sus isoenzimas en suero y plasma.

	Suero (n= 81)		Plasma (n= 81)	
	Media \pm SD (Mediana)	CV (%)	Media \pm SD (Mediana)	CV (%)
Hex Total (U/L)	22.2 \pm 15.7** (17.5)	70.7	19.1 \pm 15.9 (12.5)	83.1
Hex A (U/L)	11.8 \pm 6.5** (10.3)	55.1	9.9 \pm 6.4 (7.4)	64.4
Hex B (U/L)	10.3 \pm 9.7* (6.5)	93.5	9.3 \pm 9.9 (4.7)	107.3
Hex A (%)	57.7 \pm 12.7 (58.0)	21.9	57.4 \pm 13.4 (58.6)	23.4

Significación: * $p< 0.05$ ** $p<0.01$.

En la Tabla 7 se indican los resultados encontrados para la Hex y sus isoenzimas en lisados de plaquetas de 31 controles sanos, 23 mujeres embarazadas y 21 pacientes diabéticos. Aunque para las actividades enzimáticas específicas se encontraron ocasionales diferencias significativas, para la proporción relativa de isoenzima Hex A no se encontraron diferencias significativas para los grupos de embarazadas y diabéticos en relación al grupo control (Tabla 7). En el grupo total ($n= 75$) no se encontró una correlación significativa entre el volumen plaquetar medio y la actividad específica total de la Hex ($r= -0.115$), Hex A ($r= -0.085$), Hex B ($r= -0.179$) o la proporción relativa de esta isoenzima ($r= 0.048$). Tampoco se encontraron correlaciones significativas entre el número de plaquetas y la actividad específica total de la Hex ($r= 0.092$), Hex A ($r= 0.089$) y Hex B ($r= -0.055$) o

su proporción relativa ($r= 0.048$). Para el total de casos considerados las variaciones interindividuales de las actividades plasmáticas de la Hex y sus isoenzimas fueron análogas a las indicadas en la Tabla 6.

Tabla 7. Actividades específicas y variaciones interindividuales de la Hex total y sus isoenzimas en plaquetas.

	Controles (n=31)		Embarazadas (n=23)		Diabéticos (n=21)		Total (n=75)	
	Media \pm SD (Mediana)	CV (%)	Media \pm SD (Mediana)	CV (%)	Media \pm SD (Mediana)	CV (%)	Media \pm SD (Mediana)	CV (%)
Hex Total (U/g proteína)	7.7 \pm 2.2 (7.6)	28.5	6.7 \pm 2.2** (6.3)	32.9	6.8 \pm 1.3 (6.7)	18.6	7.1 \pm 2.0 (6.7)	28.2
Hex A (U/g proteína)	4.3 \pm 1.4 (4.1)	32.9	3.8 \pm 1.6* (3.4)	41.4	3.6 \pm 0.8* (3.4)	23.6	4.0 \pm 1.4 (3.6)	34.3
Hex B (U/g proteína)	3.4 \pm 0.9 (3.3)	26.8	2.8 \pm 0.7 (2.8)	24.2	3.2 \pm 0.7 (3.3)	21.2	3.2 \pm 0.8 (3.0)	25.6
Hex A (%)	55.5 \pm 5.0 (55.7)	9.0	56.9 \pm 4.7 (57.3)	8.3	52.6 \pm 6.7 (50.9)	12.7	55.1 \pm 5.6 (55.7)	10.2

Significación en relación al grupo control: *p< 0.05 **p<0.01

Los métodos enzimáticos son usados para cuantificar la Hex total y sus isoenzimas en el diagnóstico de la ganglisidosis GM2 y en programas de detección de portadores de Tay-Sachs (1-3). La determinación de la actividad del enzima y la reactividad inmunológica de la misma proporcionan información similar y sugiere que no hay cantidades significativas de proteína enzimática inactiva (19). Los ensayos que implican la hidrólisis de sustrato pueden detectar casi todas las mutaciones clínicamente importantes que disminuyen la síntesis o estabilidad de la Hex (3), por el contrario, los análisis basados en el estudio de DNA, pueden detectar una o pocas mutaciones y son usados frecuentemente como una prueba complementaria a los test bioquímicos (3).

El procedimiento termodinámico para la determinación de la composición isoenzimática de la Hex en leucocitos constituye una alternativa válida a los métodos enzimáticos más ampliamente utilizados. La imprecisión obtenida en la determinación de la energía de activación en nuestras condiciones experimentales ($CV \leq 1.4\%$) es muy satisfactoria y es a partir de esta variable termodinámica que se calcula las proporciones relativas de las isoenzimas Hex A y Hex B. El método además permite una adecuada estandarización, como demuestra el hecho de que no se haya encontrado una diferencia estadísticamente significativa para las energías de activación determinadas en dos analizadores Cobas Bio distintos.

En los métodos de inactivación térmica la estabilidad de la Hex B en leucocitos a 52°C y consecuentemente la actividad aparente de la Hex A, varió significativamente dependiendo de la concentración de la muestra en la mezcla de incubación (12). En los fibroblastos, células del fluido amniótico y vellosidades coriónicas la Hex B presenta propiedades similares (13), por tanto la concentración del extracto celular debe estar estrictamente controlada y los rangos de referencia deben establecerse cuidadosamente cuando se utilizan métodos de inactivación térmica (12, 13). En el método termodinámico, la concentración de leucocitos MN o PMN no afecta de modo significativo a los valores obtenidos para la energía de activación y por tanto para la proporción relativa de isoenzima Hex A (Tabla 2).

Usando un método de inactivación térmica Peleg y cols (14) mostraron que las muestras recogidas durante la mañana presentaban valores tanto en plasma como en leucocitos significativamente mayores para la Hex A que los encontrados cuando estas muestras eran recogidas por la tarde. Sin embargo nosotros no hemos podido confirmar la existencia de variaciones diurnas para la Hex A en plasma o en leucocitos MN y PMN. Así

en 10 individuos clínicamente sanos en los que se determinó la Hex y sus isoenzimas en leucocitos MN y PMN y plasma en muestras de sangre recogidas a las 9h y 18 h no se encontró una variación estadística y clínicamente significativa para ninguna de las variables (Tabla 4).

Habitualmente la determinación de la Hex y sus isoenzimas para la caracterización bioquímica de gangliosidosis GM2 se hace en lisados de leucocitos totales (1-3, 11-14). Sin embargo, como se indica en la Figura 2 y Tabla 3 en las células PMN la proporción relativa de isoenzima Hex A es claramente mayor que en las células MN ($p < 0.001$), siendo asimismo la diferencia clínicamente significativa, lo cual está de acuerdo con resultados previamente publicados (8, 9, 15).

Los resultados encontrados para la Hex y sus isoenzimas en lisados de leucocitos totales ponen de manifiesto valores esperables teniendo en cuenta los resultados obtenidos en las poblaciones de MN y PMN (Tablas 3 y 5). Sin embargo debe señalarse que, para una proporción media de PMN del 59.6% que presentaba el grupo de 33 muestras estudiadas, en función de los valores medios encontrados para la proporción de Hex A en las poblaciones de MN y PMN (Tabla 3), podría esperarse en los leucocitos totales una proporción de Hex A aproximadamente del 64%. El hecho de que el valor medio encontrado para esta variable fuese del 59.4% podría deberse a una menor recuperación de la fracción de PMN que de MN mediante el procedimiento utilizado para la separación de las fracciones de leucocitos.

La variación intra e interindividual debe ser tenida en cuenta en el establecimiento y aplicación de los valores de referencia (20). Han sido descritas sustanciales diferencias en las hidrolasas lisosomales según el tipo de células leucocitarias estudiadas (7-10, 15, 21, 22), consecuentemente en preparados de leucocitos totales donde pueden existir diferentes proporciones de monocitos, linfocitos y granulocitos sería de esperar una mayor variación de las actividades enzimáticas entre los distintos individuos que en poblaciones celulares homogéneas. En la determinación de las isoenzimas de la Hex en lisados de leucocitos totales, la diferente proporción de MN y PMN podrían incrementar las variaciones inter e intraindividuales, con un mayor solapamiento entre los portadores heterocigotos de Tay-Sachs y controles sanos (15). Una elevada proporción de leucocitos MN en sangre periférica podría conducir a un falso positivo y una elevada proporción de leucocitos PMN a un falso negativo heterocigoto de Tay-Sachs.

La proporción relativa de isoenzima Hex A es la forma más frecuente y sencilla utilizada para la detección bioquímica de dichos portadores heterocigotos (2). Para esta magnitud la mayor variación interindividual se encontró en suero / plasma (CV= 21.9%-23.4%) y la menor en MN (CV= 5.7%) y PMN (CV= 5.3%). En lisados de leucocitos totales la variación encontrada (CV= 7.1%) fue sólo ligeramente mayor que en las poblaciones de MN y PMN, e incluso discretamente menor que la encontrada en plaquetas (CV= 10.1%). Por otra parte resulta llamativo el hecho de que no se alcanzase la significación estadística en la correlación entre las proporciones relativas de PMN y de isoenzima Hex A para el grupo de 33 lisados de leucocitos totales estudiado, que presentaba una considerable variación interindividual (CV= 25.6%) para la proporción de PMN cuyo rango era de 34-90%.

Se ha indicado que en grupos establecidos como control y de procedencia no judía, no suele encontrarse más de un caso por cada 167 estudiados cuyo valor para la Hex está en el rango de los heterocigotos (2). En un total de 165 individuos clínicamente sanos estudiados, dos casos fueron excluidos ya que las proporciones de isoenzima Hex A en células MN (37.2% y 41.2%) y en células PMN (56.4% y 58.6%) eran claramente anormales, aunque en plasma (63.4% y 66.3%) estaban comprendidas en el intervalo de referencia. Desafortunadamente no se pudo disponer de muestra adicional para la confirmación bioquímica y molecular de una posible heterocigosidad para la enfermedad de Tay-Sachs variante B y B1.

Distintos autores han sugerido que muchas de las enzimas lisosomales presentes en suero procederían al menos parcialmente de las plaquetas (23, 24). En nuestro estudio se puso de manifiesto un incremento medio del 16% para la actividad enzimática de la Hex en suero en relación a la plasmática (Tabla 6). Las plaquetas humanas secretan cantidades sustanciales de Hex cuando son estimuladas in vitro con trombina (25-27) y sus isoenzimas Hex A y Hex B son secretadas en la misma proporción (25, 27). Un aumento de la actividad enzimática de la Hex sérica se produce durante el proceso de coagulación, siendo dicho incremento proporcional al número de plaquetas como muestran los resultados anteriores.

En función de los resultados encontrados para la energía de activación aparente de la Hex (Figura 3B), podría concluirse que el perfil isoenzimático no se modifica en las muestras de suero en relación a las de plasma, como se indica en la Tabla 6. Sin embargo como se señaló anteriormente, al aumentar la relación de actividades enzimáticas de la

Hex suero/plasma, tendería también a hacerlo la proporción relativa de isoenzima Hex B en las muestras de suero. En cualquier caso, un aspecto a tener en cuenta sería la diferencia entre las proporciones relativas de ambas isoenzimas en plaquetas y plasma para los distintos casos considerados. Como se desprende de los resultados obtenidos en los distintos grupos estudiados, la proporción relativa media de isoenzima Hex B sería mayor en plaquetas que en plasma en los grupo de controles ($44.5 \pm 5.0\%$ vs $35.0 \pm 6.4\%$) y de pacientes diabéticos ($47.5 \pm 5.6\%$ vs 33.5 ± 5.0), mientras que en las embarazadas esta proporción sería mayor en plasma que en plaquetas ($55.0 \pm 6.4\%$ vs $43.1 \pm 4.7\%$). Este hecho podría explicar que, aunque se ha señalado previamente una mayor proporción relativa de Hex B en suero que en plasma (28), otros resultados de los mismos autores no lo confirmen (27).

Los resultados obtenidos para la Hex y sus isoenzimas en plaquetas (Tabla 7), concuerdan con los de Nakagawa *y cols* (10), que tampoco observaron diferencias significativas para la proporción relativa de Hex A en embarazadas y pacientes diabéticos en relación a controles sanos. Por otra parte, las actividades específicas de la Hex y sus isoenzimas o la proporción relativa de Hex A, no parecen estar significativamente afectadas por el tamaño o el número de plaquetas circulantes, por lo que esta variables hematológicas no introducirían una fuente adicional de variación interindividual para la Hex plaquetaria. No obstante, la proporción media de Hex A en plaquetas encontradas por nosotros ($55.1 \pm 5.6\%$) es discretamente menor que los señalados por Nakagawa *y cols* (62-66%) usando cromatografía en DEAE-celulosa para la separación de los isoenzimas (7, 10). Según estos autores, la proporción relativa de Hex A sería mayor en plaquetas que en leucocitos MN, mientras que en nuestro estudio se encontraron proporciones análogas en ambos tipos de lisados celulares, lo cual está de acuerdo con los resultados de Emiliani *y cols* (27).

Cerca de un 0.6% de los individuos incluidos en el programa nacional israelí para la detección de portadores de Tay-Sachs pudieran tener una forma termolábil de Hex B (28), las mutaciones producidas en el gen que codifica la subunidad β de la isoenzima Hex B termolábil podrían conducir a una interpretación errónea de los resultados anómalos obtenidos por el método de inactivación térmica (2, 28). Sin embargo el método termodinámico puede ser considerado como una alternativa en la correcta determinación de la Hex así como de sus correspondientes isoenzimas. En la mutación de la variante B1, la isoenzima es capaz de hidrolizar substratos cargados negativamente, y su evaluación

implica la utilización de sustratos sintéticos sulfatados específicos de la subunidad α como el 4MU-NAG-SO₄, esto hace que los métodos de inactivación térmica no sean aplicables en dicha evaluación (1, 2). El método termodinámico también podría ser utilizado en la detección de la variante B1, ya que la isoenzima Hex A mutada, cuya actividad enzimática deriva de la subunidad β (1), presenta una energía de activación análoga a la de Hex B (29). Los resultados obtenidos, muestran que la variación interindividual de la Hex y sus isoenzimas en lisado de leucocitos totales es sólo ligeramente mayor que en poblaciones de leucocitos MN y PMN, e incluso menor que en plaquetas. No parece por tanto que el uso lisados de leucocitos totales para el cribado de portadores de Tay-sachs presente importantes desventajas de sensibilidad o especificidad respecto al uso de lisados de celulares homogéneos. En cualquier caso el procedimiento adoptado en nuestro laboratorio utiliza las fracciones de leucocitos MN y PMN.

Como conclusión puede señalarse que la determinación de la energía de activación aparente de la Hex, en leucocitos MN y PMN, utilizando 3,3'-diclorofenolsulfonftaleinil-N-acetil- β -D-glucosaminido como sustrato, no presenta algunas limitaciones de los clásicos procedimientos de inactivación térmica de la Hex A que exigen una rigurosa estandarización de la concentración del extracto celular (27, 28) permitiendo evaluar de forma precisa la heterogeneidad enzimática de la Hex leucocitaria y puede constituir una alternativa válida a otros procedimientos analíticos ampliamente utilizados.

Bibliografía

1. Gravel R A, Clarke J T R, Kabak M M, Mahuran D, Sandhoff K, Suzuki K. The GM2 gangliosidoses. In: The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease (Scriver CR, Beaudet AL, Sly W S, Valle D eds). *Seventh Edition McGraw-Hill Inc*; New York 1995: 2839 – 79.
2. Hechtman P, Kaplan F, Tay-Sachs disease screening and diagnosis: Evolving technologies. *DNA Cell Biol* 1993; 12: 651 - 65.
3. Natowicz M R, Prencz E M; Heterozygote screening for Tay-Sachs disease: past successes and future challenges. *Curr Op Pediatr* 1996; 8: 625-29.
4. Landels EC, Ellis IH, Bobrow M, Fenson AH. Tay- Sachs disease heterozygote detection: use of a centrifugal analyser for automation of hexosaminidase assays with two different artificial substrates. *J Med Genet* 1991; 28: 101-9.
5. Isaksson A, Hultberg B, Masson P, Landels E, Fenson A. Enzyme immunoassay of β -hexosaminidase A and B in serum: carrier detection of GM2-gangliosidoses, and equivalence of enzyme activity and enzyme protein reactivity. *Clin Chem* 1993; 39: 1412-15.
6. Hultberg B, Isaksson A. Isoenzyme pattern of serum β -hexosaminidase in liver disease, alcohol intoxication and pregnancy. *Enzyme* 1983; 30: 166-71.
7. Nakagawa S, Kumin S, Fox D, Nitowsky HM. Human hexosaminidase isoenzymes. III. Distribution and activity of isoenzymes in peripheral blood leukocytes and platelets. *J Lab Clin Med* 1978; 91: 922-28.
8. Casal JA, Chabás A, Tutor JC. Thermodynamic determination of β -hexosaminidase isoenzymes in mononuclear and polymorphonuclear leukocyte populations. *Am J Med Genet* 2003; 116A: 229-33.
9. Isman F, Palomaki GE, Natowicz MR. Lysosomal enzymes in human peripheral blood mononuclear cells and granulocytes. *Clin Chem* 2005; 51: 646-49.
10. Nakagawa S, Kunin S, Chandra P, Nitowsky HM. Human hexosaminidase isoenzymes. Assay of platelets activity for heterozygote identification during pregnancy. *Clin Chim Acta* 1978; 88: 249-56.
11. Eicholtz K, Alger M T, Floridaa J A; Standardization of leukocytes for Tay-Sachs hexosaminidase assay. *Clin. Chem.* 1995; 41: S238

12. Prence E M, Natowicz M R, Zalewski I. Unusual thermolability of leukocyte β -hexosaminidase: Implications in screening for carriers of Tay-Sachs disease. *Clin. Chem.* 1993; 39: 1811 – 14.
13. Prence E M, Zalewski I, Natowicz M R; Unusual thermolability properties of beta-hexosaminidase: Studies of enzyme from cultured cells and clinical implications. *Am J Med Genet* 1996; 65: 320 - 24
14. Peleg L, Goldman B, Ashkenazi I E; Effets of inter-individual and diurnal variations on the activity of Hex A: Relevance to screening of Tay-Sachs disease carriers. In “Biologie Prospective. Comptes rendus du 8^a Colloque de Pont-a-Mousson” (Galteau MM, Siest G, Henry J. eds) John Libbey Eurotext, Paris. 1993: 309 - 312.
15. Casal JA, Pérez LF, Tutor JC. Thermodynamic determination of plasma and leukocyte beta-hexosaminidase isoenzymes in homozygote and heterozygote carriers for the GM2 gangliosidosis B1 variant. *Am J Clin Pathol* 2003; 119: 684-88.
16. Levy-Toledano S, Maclouf J, Bryon P, Savarian E, Hardisty RM, Caen JP. Human platelet activation in the absence of aggregation: a calcium-dependent phenomenon independent of thromboxane formation. *Blood* 1982; 59: 1078-85.
17. Harris E K. Proposed goals for analytical precision and accuracy in single-point diagnostic testing. Theoretical basis and comparison with data from College of American Pathologists Proficiency Surveys. *Arch Pathol Lab Med* 1988; 112: 416 – 20.
18. Knoll E, Hafner F, Dettmer K, Wisser H. The determination of calcium, urea and uric acid using the Kodak Ektachem multilayer technology: An evaluation. *J Clin Chem Clin Biochem* 1982; 20: 491 – 99.
19. Isaksson A, Hultberg B, Masson P, Landels E, Fensom A. Enzyme inmunoassay of β - hexosaminidase A and B in serum: Carrier detection of GM2 – gangliosidoses and equivalence of enzyme activity and enzyme protein reactivity. *Clin. Chem.* 1993; 39: 1412-15.
20. Fraser CG. Inherent biological variation and reference values. *Clin Chem Lab Med* 2004; 42: 758-64.
21. Nakagawa S, Kumin S, Nitowsky HM Studies on the activities and properties of lysosomal hydrolases in fractionated populations of human peripheral blood cells. *Clin Chim Acta* 1980; 101: 33-44.
22. Nakagawa S, Kumin S, Sachs G, Nitowsky HM. Heterozygote detection of type I Gaucher disease using blood platelets. *Clin Chim Acta* 1982; 118: 99-107.

23. Lombardo A, Caimi L, Marchesini S, Goi GC, Tettamanti G. Enzymes of lysosomal origin in plasma and serum: assay conditions and parameters influencing the assay. *Clin Chim Acta* 1980; 108: 337-46.
24. Leoncini G, Balestrero F, Maresca M. Lysosomal enzymes in human platelets. *Cell Biochem Funct* 1985; 3: 121-25.
25. Vladutiu GD, Dangelmaier CA, Amigone V, Van Oost BA, Holmsen H. High and low – uptake forms of β -hexosaminidase in human platelets. Selective retentions of the high – uptake form during stimulation with thrombin. *Biochim Biophys Acta* 1984; 802: 435-41.
26. Van Oost BA, Smith JB, Holmsen H, Vladutin GD. Lysosomotropic agents selectively potentiate thrombin-induced acid hydrolase secretion from platelets. *Proc Natl Acad Sci* 1985; 82: 2374-78.
27. Emiliani C, Martino S, Orlacchio A, Vezza R, Nenci GG, Gresele P. Platelet glycohydrolase activities: characterization and release. *Cell Biochem Funct* 1995; 13: 31-39.
28. Peleg L, Goldman B. Detection of Tay-Sachs disease carriers among individuals with thermolabile hexosaminidase Hex A. *Eur. J. Clin Chem Biochem* 1994; 32: 65 – 69.
29. Perez L F, Tutor J C. Assay of β -N-acetylhexosaminidase isoenzymes in different biological specimens by means of determination of their activation energies. *Clin. Chem.* 1998; 44: 226 - 31.

IV. Caracterización termodinámica de la isoenzima A mutada de la β -N-acetilhexosaminidasa en la gangliosidosis GM2 variante B1*

Como se ha señalado anteriormente la β -N-acetilhexosaminidasa (Hex) está compuesta de dos cadenas polipeptídicas denominadas α y β . Las isoenzimas Hex A ($\alpha\beta$) y Hex B ($\beta\beta$) son las formas principales, mientras que la Hex S ($\alpha\alpha$) tiene una limitada actividad catalítica y es inestable (1, 2). Las denominadas formas intermedias (Hex I) son derivadas de la Hex B y tienen un origen post-traslacional.

Las gangliosidosis GM2 son un grupo de enfermedades neurodegenerativas de carácter autosómico recesivo, causadas por la incapacidad para la metabolización del gangliósido GM2 por la isoenzima Hex A. Se pueden diferenciar tres tipos principales en función de la implicación de los distintos genes que codifican la subunidad α con deficiencia de isoenzimas Hex A (variante B), la subunidad β , con deficiencia de isoenzima Hex A y Hex B (variante 0), y el activador proteico (variante AB) (1).

Una variante del tipo B, denominada B1, se caracteriza por la presencia de isoenzima Hex A mutada que es incapaz de hidrolizar el gangliósido GM2 y los substratos artificiales sulfatados (con carga negativa), debido a una funcionalidad catalítica alterada del centro activo de la subunidad α . En los demás aspectos catalíticos, esta isoenzima es aparentemente normal frente a los substratos artificiales neutros convencionales (1, 3-5).

Utilizando el substrato neutro 3,3'-diclorofenolsulfonftaleinil-N-acetil- β -D-glucosaminido la energía de activación de la isoenzima Hex B ($E_a \approx 75.1$ kJ/mol) es significativamente mayor que la de la Hex A ($E_a \approx 41.8$ kJ/mol) debido a la presencia en esta de la subunidad α en su molécula (6). El objetivo fue comprobar si este hecho podría permitir la caracterización termodinámica de la isoenzima Hex A mutada en la variante B1 de gangliosidosis GM2, una vez aislada a partir de diferentes medios biológicos de pacientes homocigotos.

*Pérez LF, Ribeiro HM, Casal JA, Pinto RA, Sá Miranda MC, Tutor JC. Thermodynamic characterisation of the mutated isoenzyme A of β -N-acetylhexosaminidase in GM2 gangliosidosis B1 variant. *Clin Chim Acta* 1999; 285: 45-51.

Material y métodos

Se aislaron cromatográficamente las isoenzimas de la Hex de muestras de plasma y leucocitos de una niña de nacionalidad portuguesa de 10 años, homocigoto para la mutación G533→A (Arg 178 His) (7), así como de sus padres portadores heterocigotos para esta mutación y de dos controles clínicamente sanos. El paciente presentaba las características clínicas del fenotipo juvenil de la variante B1, con comienzo a la edad de 4 años de dificultades del habla como primer síntoma (5). La mutación de la Hex A en el paciente con gangliosidosis GM2 variante B1 estudiado, designada como “DN-alelo”, es una transición G→A en el nucleótido 533, implicando una sustitución arginina→histidina en el residuo 178 (9). Esta mutación (R178H) es la más frecuente en el norte de Portugal y posiblemente en Galicia.

La separación de las isoenzimas de la Hex a partir de lisados leucocitarios y plasma ($\approx 200\mu\text{L}$) por cromatografía en columna de DEAE-celulosa (DE-52, Whatman Laboratory División), se realizó sobre columnas de 0.6X6.5 siendo equilibradas con tampón fosfato sódico (10 mmol/L, pH= 6.0). La actividad enzimática no retenida se eluyó con el tampón de la columna y entonces se aplicó un gradiente lineal de concentración de ClNa (0.0-0.35 mol/L) en 12 mL del tampón de la columna. La actividad de la Hex en las diferentes fracciones cromatográficas (≈ 0.8 mL), recogidas en tubos con albúmina bovina (concentración final 0.1 g/L) se determinó utilizando 4-metilumbeliferil-2-acetamido-2-deoxi- β -D-glucopiranosido (Sigma Chemical) como sustrato, así como con 4-metilumbeliferil-2-acetamido-2-deoxi- β -D-glucopiranosido-6-sulfato. Después de una incubación a 37 °C durante 15 y 60 minutos respectivamente, la reacción se detuvo adicionando tampón glicina-NaOH (pH= 10.0) y la fluorescencia de la 4-metilumbeliferona liberada se determinó en un fluorímetro Hitachi F2000 (excitación= 365nm, emisión= 445nm). El sustrato 4-metilumbeliferil-2-acetamido-2-deoxi- β -D-glucopiranosido es hidrolizado por las isoenzimas Hex A y Hex B, pero su derivado sulfatado es únicamente hidrolizado por el centro activo de la subunidad α de la isoenzima Hex A normal (1, 8).

Las fracciones del eluido de la columna correspondientes a los picos de actividad enzimática fueron concentradas por permeabilidad selectiva (Centricon 10, Amicon) para su análisis electroforético y la determinación de la energía de activación de las diferentes isoenzimas de la Hex. La electroforesis se realizó sobre tiras de acetato de celulosa (Cellogel, Chemetron) utilizando 4-metilumbeliferil-2-acetamido-2-deoxi- β -D-

glucopiranosido (5), y para la determinación de la energía de activación de las fracciones isoenzimáticas se utilizó 3,3'-diclorofenilsulfonftaleinil-N-acetil- β -D-glucosaminido como se indicó anteriormente.

Resultados y discusión

La Figura 1 muestra los perfiles isoenzimáticos obtenidos cromatográficamente para la Hex plasmática del paciente homocigoto para la variante B1 de gangliosidosis GM2, un portador heterocigoto y un control sano. No se detectó actividad enzimática para la Hex A utilizando el sustrato sulfatado en el paciente homocigoto, pero sí utilizando el sustrato neutro. En los portadores heterocigotos el cociente de actividad sustrato sulfatado/neutro fue de 0.08, mientras que en los controles fue 0.15.

En el análisis electroforético de los eluidos de la columna, correspondientes a las isoenzimas Hex A y Hex B plasmáticas, se obtuvo una banda simple bien diferenciada con las características electroforéticas de estas isoenzimas. Sin embargo, cuando las isoenzimas de la Hex fueron aisladas cromatográficamente de lisados leucocitarios, el análisis de los eluidos correspondientes a la Hex A, puso de manifiesto dos bandas electroforéticas debido a la conversión parcial de esta isoenzima en Hex B en el eluato.

Por tanto, la determinación de las energías de activación de la Hex A y la Hex B en todos los individuos estudiados se llevó a cabo después de su aislamiento cromatográfico a partir de muestras de plasma. En la Tabla 1 se indican los resultados obtenidos.

Los resultados presentados en la Figura 1 son concordantes con los recogidos en la bibliografía (1, 3-5), mostrando como el sustrato fluorogénico sulfatado es únicamente hidrolizado por el centro activo de la subunidad α de la isoenzima Hex A normal, mientras el sustrato neutro es preferentemente hidrolizado por el centro activo de la subunidad β (8) presente tanto en Hex A como Hex B. Por el contrario, la Hex A mutada presenta un cambio de especificidad de sustrato, siendo incapaz de hidrolizar el sustrato sulfatado al estar afectada su subunidad α , cuyo modelo molecular revela alteraciones en la estructura tridimensional de la proteína (10). Los resultados obtenidos en los portadores heterocigotos y en los controles para la relación de actividades sustrato sulfatado/neutro, sugieren que en el plasma de los portadores existe una mezcla aproximadamente equimolecular de las isoenzimas Hex A normal y mutada.

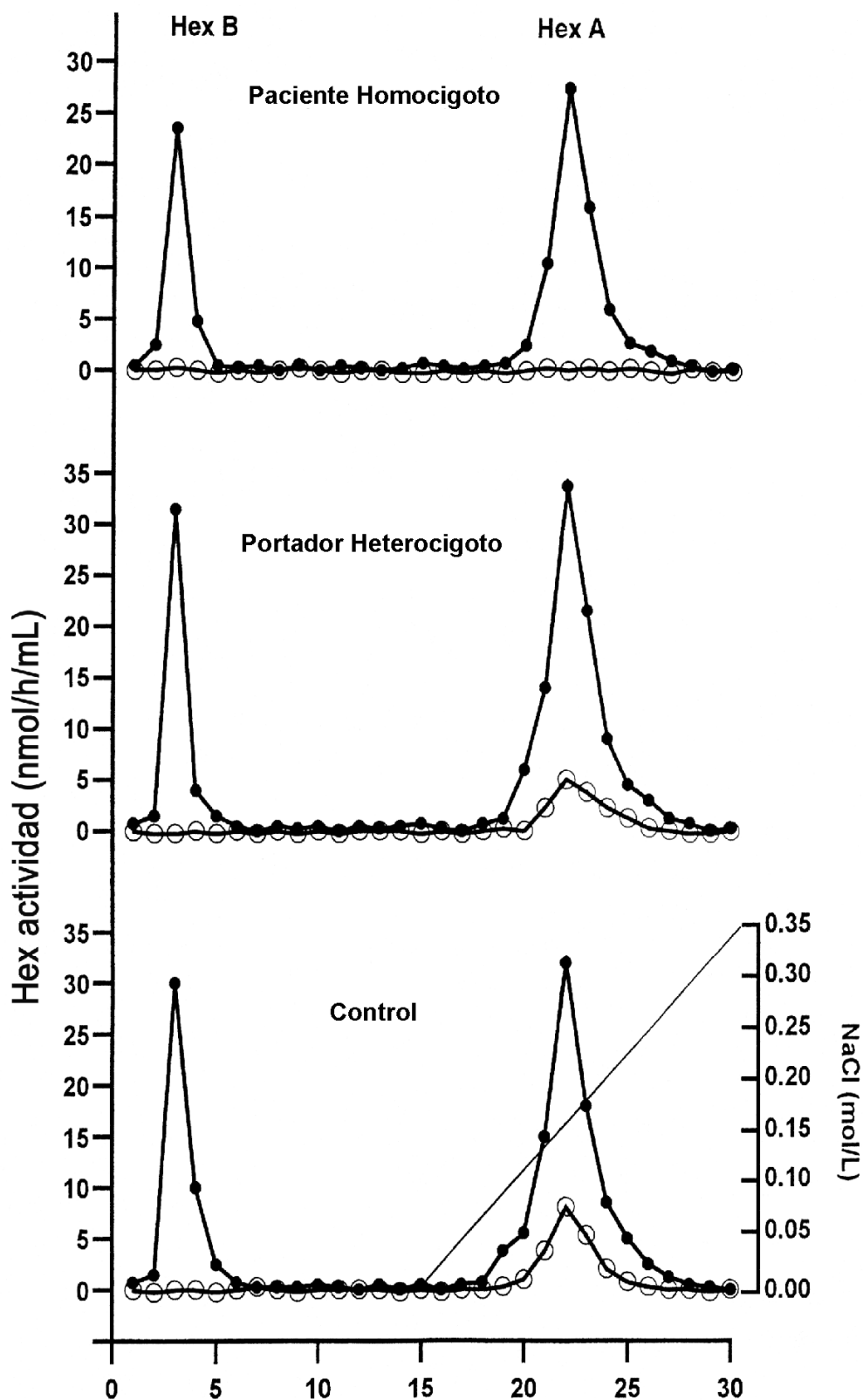


Figura 1. Separación cromatográfica en DEAE-celulosa de las isoenzimas plasmáticas de la Hex en paciente homocigoto para gangliosidosis GM2 variante B1, portador heterocigoto y control sano. Actividades enzimáticas obtenidas en las fracciones utilizando 4MU-NAG (●) y 4MU-NAG-SO₄ (○).

Los valores obtenidos para la energía de activación de la Hex B fueron análogos en todos los casos estudiados a los estimados previamente para esta isoenzima (6). Sin embargo, la Hex A mutada del paciente homocigoto presentó una energía de activación significativamente aumentada con respecto a la de la Hex A normal de los individuos control (Tabla 1), cuyos valores son análogos a los previamente calculados para esta isoenzima (6). En los portadores heterocigotos, se obtuvieron valores intermedios para las energías de activación de la Hex A, lo que sugiere asimismo la presencia en plasma de una mezcla equimolecular de isoenzimas mutada y normal, con secreción análoga de ambas formas al medio extracelular.

Tabla 1. Energías de activación de las isoenzimas para la Hex plasmática aisladas por cromatografía en DEAE-celulosa.

	Pacientes Homocigotos	Portadores Heterocigotos	Controles
Hex A (kJ/mol)	71.5	55.3-55.5	41.1-41.5
Hex B (kJ/mol)	73.8	76.1-74.9	74.8-74.5

Las subunidades α y β de la Hex poseen diferentes centros activos (8), aunque la formación de los dímeros resultando las isoenzimas Hex A y Hex B es una condición necesaria para la adquisición de actividad catalítica (1, 11). La mutación R178H de la subunidad α inactiva el polipéptido, pero no interfiere en la asociación de estas subunidades y su vehiculización hasta el lisosoma (1, 3). Consecuentemente la Hex A mutada presenta una actividad derivada de la subunidad β , lo que explicaría que su energía de activación sea análoga a la de la isoenzima Hex B (Tabla 1).

Cuando se utilizaron lisados de leucocitos para la separación de las isoenzimas de la Hex, se observó una significativa conversión de Hex A en Hex B en los eluatos. Un hecho análogo se encontró cuando se utilizaron muestras de orina (resultados no presentados). Por el contrario, la isoenzima Hex A es razonablemente estable en los eluatos obtenidos al utilizar muestras de plasma para el aislamiento cromatográfico de las isoenzimas. Esto podría deberse a que, tanto en leucocitos como en orina la Hex A y Hex B se encuentran como formas maduras de tipo tisular parcialmente proteolizadas (12), mientras en el plasma se encuentran como precursores de alta masa molecular (12,

13). La conversión espontánea de la Hex A en Hex B, por reordenación de sus subunidades en las formas tisulares purificadas, es un hecho bien documentado (1, 14).

Teniendo en cuenta la mucha mayor energía de activación de la Hex A mutada comparada con la de la Hex A normal, la determinación de esta variable termodinámica utilizando el substrato cromogénico neutro 3,3'-diclorofenolsulfonftaleinil-N-acetil- β -D-glucosaminido permite la caracterización termodinámica de la isoenzima mutada, y puede ser la base para el desarrollo de un método simple y económico para la caracterización bioquímica de la variante B1 de gangliosidosis GM2.

Bibliografía

1. Gravel RA, Clarke JTR, Kaback MM, Maduran D, Sandhoff K, Suzuki K. The GM2 gangliosidoses. In Scriver CR, Beaudet Sly WS, editors, *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited disease*. 7th ed, edition. New York; *McGraw-Hill*, 1995, pp. 2839-79.
2. Neufeld EF. Natural history and inherited disorders of a lysosomal enzyme, β -hexosaminidase. *J Biol Chem* 1989; 264: 10927-30.
3. Kytzia HJ, Hinrichs U, Maire I, Suzuki K, Sandhoff K. Variant of GM2-gangliosidoses with hexosaminidase A having a severely changed substrate specificity. *EMBO J* 1983; 2: 1201-5.
4. Ribeiro MG, Pinto RA, Dos Santos MR, Maia M, Sá Miranda MC. Biochemical characterisation of β -hexosaminidase in different biological specimens from eleven patients with GM2 gangliosidosis B1 variant. *J Inher Metab Dis* 1991; 14: 715-20.
5. Maia M, Alves D, Ribeiro G, Pintp R, Sá Miranda MC. Juvenile GM2 gangliosidosis variant B1: Clinical and biochemical study in seven patients. *Neuropediatrics* 1990; 21: 18-23.
6. Pérez LF, Tutor JC. Assay of β -N-acetylhexosaminidase isoenzymes in different biological specimens by the determination of their activation energies. *Clin Chem* 1998; 44: 226-31.
7. Dos Santos MR, Tanaka A, Sá Miranda MC, Ribeiro MG, Maia M, Suzuki K. GM2-gangliosidosis B1 variant: Analysis of β -hexosaminidase α gene mutations in 11 patients from a defined region in Portugal. *Am J Hum Genet* 1991; 49: 886-90.
8. Kytzia HJ, Sandhof K. Evidence for two different active sites on human β -hexosaminidase A. *J Biol Chem* 1985; 260: 7568-72.
9. Ohno K, Suzuki K. Mutation in GM2-gangliosidosis B1 variant. *J Neurochen* 1988; 50: 316-18.
10. Suzuki K, Vanier MT. Biochemical and molecular aspects of late-onset GM2 gangliosidosis: B1 variant as a prototype. *Dev Neurosci* 1991; 13: 288-94.
11. Proia RL, D'Azzo A, Neufeld EF. Association of alpha-and-beta-subunits during the biosynthesis of beta-hexosaminidase in cultured human fibroblast. *J Biol Chem* 1984; 259: 3350-54.
12. Zühlisdorf M, Imort M, Hasilik A, Von Figura K. Molecular forms of β -hexosaminidase and cathepsin D in serum and urine of healthy subjects and patients with elevated activity of lysosomal enzymes. *Biochem J* 1983; 213: 733-40.

13. Isaksson A, Hultberg B. Serum β -hexosaminidase isoenzymes are precursor forms. *Scand J Clin Lab Invest* 1995; 55: 433-40.
14. Pampols T, Codina J, Girós M, Sabater J, González-Sastre F. Tissue differences in the human N-acetyl- β -hexosaminidase isoenzymatic forms. *Cell Molec Biol* 1980; 26: 187-95.

V. Identificación bioquímica de pacientes homocigotos y portadores heterocigotos para la variante B1 de la gangliosidosis GM2*

El sistema enzimático de la β -hexosaminidasa (Hex, EC 3.2.1.52) comprende dos isoenzimas principales que resultan de la asociación de subunidades α y β codificados por dos genes distintos: Hex A ($\alpha\beta$) y Hex B ($\beta\beta$) (1, 2). El centro activo de la subunidad α es capaz de hidrolizar el gangliósido GM2 y los substratos artificiales con carga negativa (sulfatados), mientras el centro activo de la subunidad β hidroliza substratos neutros (1-3), aunque se ha señalado que la subunidad α también podría participar en la hidrólisis de substratos neutros (4). La isoenzima Hex S ($\alpha\alpha$) es inestable y generalmente minoritaria, con una actividad catalítica despreciable (2, 5).

Distintas mutaciones de los genes que codifican las subunidades α y β conducen a una deficiencia de isoenzima Hex A. Consecuentemente se producen desordenes lisosomales de transmisión autosómica recesiva (gangliosidosis GM2), caracterizados por la acumulación de gangliósido GM2 particularmente en las células neuronales (1). La deficiencia de Hex A producida por distintas mutaciones del gen de la subunidad α (enfermedad de Tay-Sachs), comprende dos variantes enzimológicamente diferentes: variante B con ausencia de isoenzima Hex A y variante B1 con presencia de Hex A mutada catalíticamente inactiva frente al gangliósido GM2 y substratos artificiales con carga negativa, pero activa frente a substratos neutros. En contraste a la forma clásica aguda infantil de la variante B, la variante B1 es una forma subaguda con manifestación clínica más tardía entre los 3-10 años (1).

Los estudios de las isoenzimas de la Hex mediante procedimientos de inactivación térmica de la Hex A o separación mediante técnicas cromatográficas utilizando substratos cromogénicos o fluorogénicos neutros, no son adecuados para el diagnóstico bioquímico de homocigotos o la detección de heterocigotos portadores de la variante B1 (1, 6). Han de utilizarse substratos artificiales sulfatados considerados específicos para la subunidad α (1, 2, 6), que presentan un elevado coste (6). En la variante B, la determinación de la

*Casal JA, Pérez LF, Tutor JC. Thermodynamic determination of plasma and leukocyte β -hexosaminidase isoenzymes in homozygote and heterozygote carriers for the GM2 gangliosidosis B1 variant. *Am J Clin Pathol* 2003; 119: 684-88.

actividad de Hex con un sustrato neutro o mediante la reactividad antigénica frente a la enzima proporciona datos similares, sugiriendo la ausencia de cantidades significativas de proteína inactiva (7). Sin embargo en la variante B1 se encuentra una isoenzima Hex A detectable inmunológicamente pero catalíticamente inactiva.

Estudios previos han puesto de manifiesto la posible caracterización en distintos medios biológicos de la heterogeneidad enzimática de la Hex, mediante la determinación de su energía de activación aparente utilizando el sustrato cromogénico 3,3'-diclorofenosulfonftaleinil-N-acetil- β -D-glucosaminido (8, 9, 10). El método se basa en que la presencia de una subunidad α en el heterodímero $\alpha\beta$ (Hex A) hace que su energía de activación ($E_a \approx 41.8$ kJ/mol) sea significativamente menor que la del homodímero $\beta\beta$ (Hex B) ($E_a \approx 75.1$ kJ/mol). Sin embargo la isoenzima Hex A de la variante B1, como la mutación inactiva de la subunidad α (11, 12), presenta una energía de activación análoga a la de la isoenzima Hex B (13).

El objetivo en este estudio fue determinar la heterogeneidad enzimática de la Hex plasmática y leucocitaria en pacientes homocigotos y portadores heterocigotos para la gangliosidosis GM2 variante B1 mediante la determinación de su energía de activación.

Material y métodos

Se estudiaron dos pacientes de sexo femenino homocigotos para gangliosidosis GM2 variante B1 (pacientes 1 y 2), hijas de una pareja consanguínea (el abuelo paterno y la abuela materna, así como el abuelo materno y la abuela paterna, eran hermanos), que presentaban formas juveniles de la enfermedad. El otro paciente con gangliosidosis GM2 era de sexo masculino (paciente 3) y heterocigoto para las variantes B y B1, presentando una forma infantil tardía de la enfermedad. De los 6 portadores heterocigotos estudiados (3 hombres y 3 mujeres), el padre del paciente 3 era de origen jordano y portador heterocigoto para la variante B, mientras los demás habían nacido en Galicia y eran heterocigotos para la variante B1. Exceptuando los padres de los pacientes 1 y 2, no presentaban entre si ninguna relación de consanguinidad.

Los procedimientos utilizados para el estudio termodinámico de la heterogeneidad enzimática de la Hex en plasma y leucocitos MN y PMN se han descrito en apartados anteriores. La caracterización molecular de las mutaciones de la subunidad α se realizó en el Instituto de Genética Médica Jacinto Magalhaes (Porto, Portugal).

Los 5 portadores heterocigotos originarios de Galicia para la variante B1 tenían la mutación R178H. El padre del paciente 3 era de origen Jordano y fue identificado como un portador heterocigoto de la variante B (mutación no caracterizada). Los pacientes 1 y 2 homocigotos para la variante B1 presentaban la mutación R178H, y el paciente 3 era heterocigoto para la variante B (mutación no caracterizada) y variante B1 (mutación R178H).

Resultados y discusión

La Tabla 1 muestra los resultados obtenidos usando el método termodinámico para las isoenzimas Hex A y Hex B en plasma y poblaciones de leucocitos MN y PMN procedentes de los pacientes con gangliosidosis GM2, portadores heterocigotos e individuos control.

En la determinación termodinámica de las isoenzimas de la Hex en plasma de los tres pacientes homocigotos estudiados, estos se comportaron como un grupo bien diferenciado frente al grupo control. Sin embargo, para los portadores heterocigotos la determinación de las isoenzimas de la Hex en plasma mostró una menor capacidad discriminante al utilizar los plots recomendados para el diagnóstico bioquímico de la variante B de gangliosidosis GM2 (7, 14, 15) como se muestra en la Figura 1. Por el contrario la determinación termodinámica de las isoenzimas de la Hex en lisados de leucocitos MN y PMN permitió la identificación de los pacientes (Tabla 1), y la consideración de la proporción relativa de isoenzima Hex A, identificó correctamente el grupo de portadores heterocigotos como se muestra en la Figura 2.

Tabla 1: Resultados obtenidos para los isoenzimas de la β - Hexosaminidas en plasma y leucocitos en pacientes portadores, heterocigotos y controles.

	Pacientes (n=3)			Portadores Heterocigotos (n=6)			Controles (n=163)		
	Media \pm SEM	Mediana	Intervalo	Media \pm SEM	Mediana	Intervalo	Media \pm SEM	Mediana	Intervalo
Plasma									
Hex A (U/L)	0.76 \pm 0.38	0.38	0.38-1.53	3.44 \pm 0.15	3.43	3.03-4.03	5.98 \pm 0.10	5.82	3.76-10.62
Hex B (U/L)	2.58 \pm 0.25	2.60	2.13-3.00	1.97 \pm 0.16	1.91	1.61-2.70	2.78 \pm 0.07	2.68	1.26-6.35
Hex A (%)	21.19 \pm 7.99	15.28	11.30-37.00	63.78 \pm 1.81	64.17	56.00-69.00	68.58 \pm 0.37	68.25	56.36-80.88
Células MN									
Hex A (U/g proteína)	0.31 \pm 0.18	0.16	0.11-0.67	5.29 \pm 0.76	5.65	3.17-7.22	10.37 \pm 0.22	10.49	3.61-18.35
Hex B (U/g proteína)	6.73 \pm 0.57	6.30	6.02-7.86	8.09 \pm 1.23	9.17	4.07-11.05	8.67 \pm 0.17	8.84	3.75-14.03
Hex A (%)	4.56 \pm 2.72	2.00	1.69-10.00	39.85 \pm 1.01	39.75	37.18-43.80	54.28 \pm 0.24	54.64	46.81-60.67
Células PMN									
Hex A (U/g proteína)	0.08 \pm 0.08	0.00	0.00-0.23	7.96 \pm 1.65	9.91	2.75-11.58	15.11 \pm 0.41	14.46	4.15-29.29
Hex B (U/g proteína)	5.13 \pm 1.64	4.22	2.86-8.32	6.62 \pm 1.33	7.00	1.99-9.41	5.95 \pm 0.16	5.83	1.88-10.93
Hex A (%)	0.90 \pm 0.90	0.00	0.00-2.70	53.94 \pm 1.72	54.04	49.00-58.58	71.56 \pm 0.30	71.65	63.67-80.63

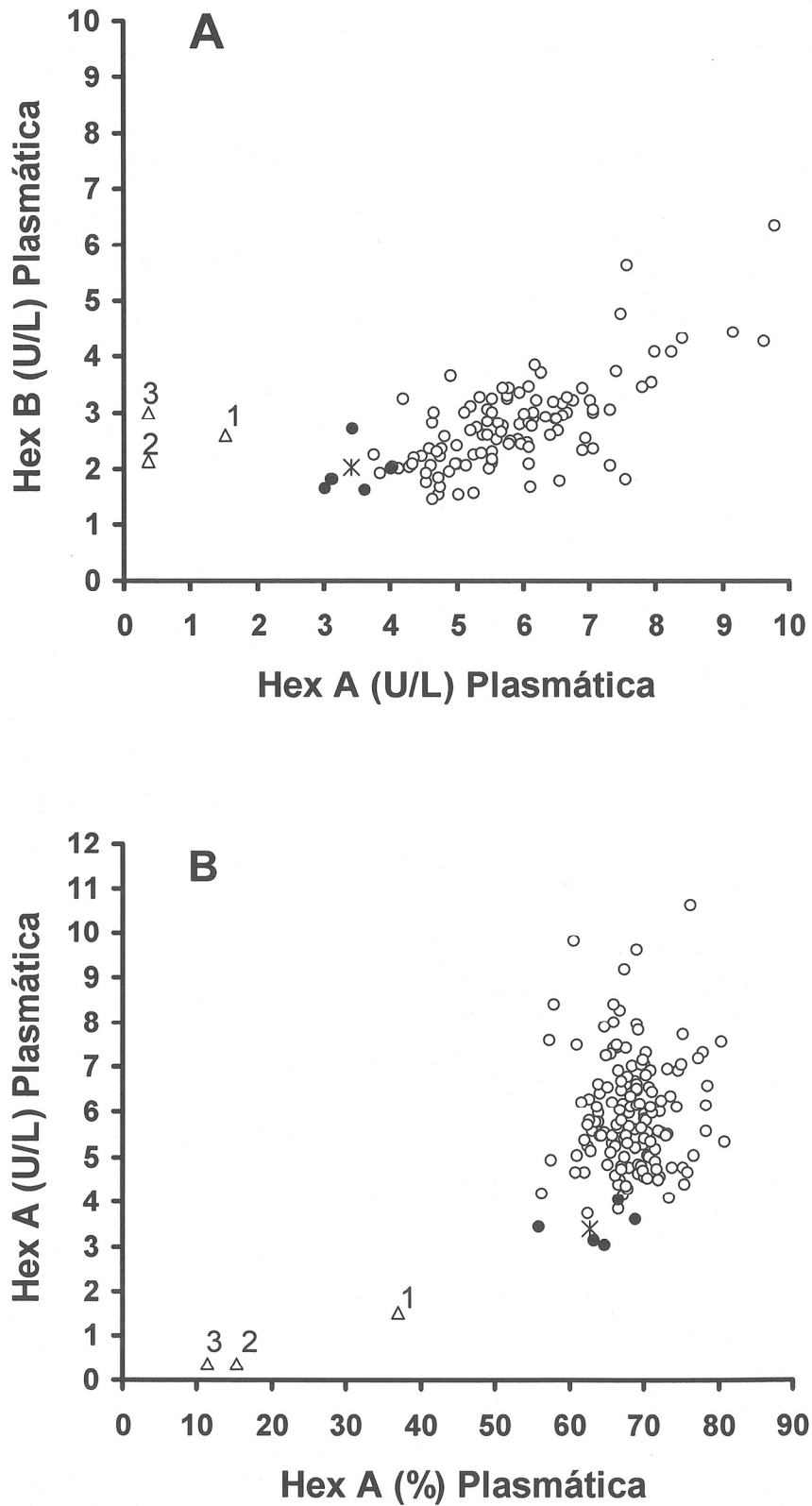


Figura 1. Actividad de Hex A plasmática vs. actividad de Hex B (A) y porcentaje de Hex A (B) en pacientes (Δ), portadores heterocigotos B (\times) y B1 (\bullet) y controles (\circ).

Distintas mutaciones de la subunidad α han sido descritas para la variante B1 de gangliosidosis GM2, aunque la más frecuente es R178H (G⁵³³→A, Arg¹⁷⁸→His) designada como “DN-alelo” (1, 16). Esta mutación tiene una amplia distribución geográfica y étnica (16, 17) aunque es particularmente alta su incidencia en el norte de Portugal, (18-20), habiéndose incluso sugerido que pudo tener su origen en esta región (16, 18). En la población portuguesa la prevalencia de la variante B1 ha sido estimada en 0.84 por cada 100.000 nacimientos, aunque esta proporción se duplicaría para la parte norte del país (21). En Galicia una comunidad estrechamente vinculada histórica y culturalmente con el norte de Portugal, se han descrito previamente dos casos de niñas no consanguíneas que padecían gangliosidosis GM2 variante B1 (22). Una de ellas tenía la forma juvenil de la enfermedad con el genotipo R178H/R178H (paciente 1 en nuestro estudio) mientras que la otra paciente presentaba una forma infantil tardía con el genotipo R178H/?? (22). Por otra parte uno de los primeros pacientes homocigotos para la variante B1 descritos en la literatura era originario de la provincia de Orense, cuyos padres habían nacido a escasa distancia de la frontera portuguesa (Sá Miranda MC comunicación personal)

Los resultados obtenidos utilizando el método termodinámico para la determinación de la heterogeneidad enzimática de Hex plasmática permitió la identificación de pacientes homocigotos con gangliosidosis GM2 variante B1 (Tabla 1). Sin embargo para los portadores heterocigotos, las proporciones relativas de Hex A estaban dentro del rango de referencia, a pesar de que la actividad enzimática de Hex A era generalmente menor que la encontrada en los individuos control. Se ha señalado que heterocigotos para el alelo de la B1 pueden presentar niveles normales para la actividad sérica de Hex A o Hex B (6), y en el screening de portadores para la variante B de Tay-Sachs, los métodos enzimáticos en suero o plasma pueden no resultar concluyentes en algunos casos (1, 6).

En leucocitos MN y PMN los resultados obtenidos para la actividad específica de la Hex A, presentó un alto valor discriminatorio tanto para los pacientes homocigotos con variante B1 como para los portadores heterocigotos (Tabla 1). La proporción relativa de la isoenzima Hex A en leucocitos MN y PMN también presentó un alto valor discriminatorio (Figura 2), aunque de acuerdo con los resultados indicados en el apartado anterior, la determinación de las isoenzimas de la Hex en lisados de leucocitos totales también podría ser utilizada.

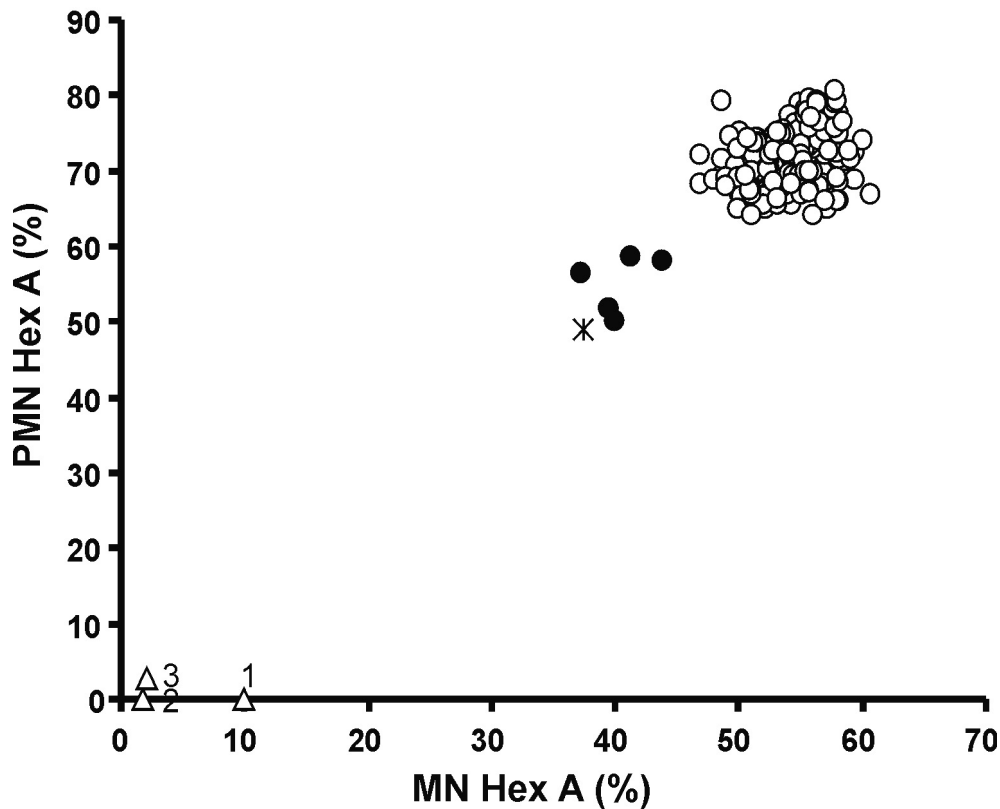


Figura 2. Porcentaje de Hex A en leucocitos PMN vs. MN en pacientes (Δ), portadores heterocigotos B (Ж) y B1 (\bullet) y controles (\circ).

Los resultados obtenidos para la Hex A por el método termodinámico son altamente concordantes con los obtenidos usando 4-metilumbeliferil-N-acetil- β -D-glucosaminido sulfatado (específico para la subunidad α) (8, 10). En la gangliosidosis GM2 se ha determinado una correlación entre la actividad residual de la Hex A y la severidad de la enfermedad, (1, 2), por lo que el fenotipo menos severo de la variante B1 podría ser explicado por la presencia de un alelo defectuoso que mantuviese una actividad residual “in vivo” de la Hex A frente el gangliósido GM2 (1, 21).

En el caso de un paciente portugués homocigoto variante B1 (mutación R178H), nosotros obtuvimos una energía de activación para la Hex A plasmática (aislada por cromatografía en gel de DEAE-celulosa) de 71.5 kJ/mol (13), ligeramente inferior a la de la isoenzima Hex B (75.1 kJ/mol), siendo esta diferencia determinada de forma segura mediante el procedimiento utilizado. En el paciente 1 se encontró una actividad específica de 0.7 U/g proteína en leucocitos MN (10% de la actividad total) y de 1.5 U/L en plasma (37% de la actividad total), actividades significativamente mayores que las obtenidas en

los otros dos pacientes estudiados. Estas actividades son en cierto modo sorprendentes, pues representan respectivamente un 18% y un 39% del correspondiente límite inferior del rango de referencia, y se ha sugerido que con una proporción de 5 a 15% de actividad normal de Hex A podría ser suficiente para mantener el catabolismo normal del gangliósido GM2 (1, 2). En cualquier caso, los resultados obtenidos para este paciente son claramente discriminatorios con respecto al grupo de portadores heterocigotos y al grupo control (Figura 1 y 2).

En conclusión la determinación termodinámica para la determinación de las isoenzimas de la Hex en plasma posibilitó la identificación de los pacientes homocigotos con variante B1 de gangliosidosis GM2, aunque en el caso de portadores heterocigotos pueden obtenerse falsos resultados negativos. Sin embargo, la determinación de las isoenzimas de la Hex en lisados de leucocitos permitió distinguir claramente los pacientes homocigotos con variante B1, portadores heterocigotos y sujetos control.

Bibliografía

1. Gravel RA, Kaback MM, Proia RL, *et al.* The GM2 gangliosidoses. In “The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease” (Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D eds) Eight edition. *McGraw-Hill*, New York 2001: 3827-76.
2. Mahuran DJ. Biochemical consequences of mutations causing GM2 gangliosidoses. *Biochim Biophys Acta* 1999; 1455: 105-38.
3. Kytzia HJ, Sandhof K. Evidence for two different active sites on human β -hexosaminidase A. *J Biol Chem* 1985; 260: 7568-72.
4. Hou Y, Tse R, Mahuran DJ. Direct determination of the substrate specificity of the α -active site in the heterodimeric β -hexosaminidase A. *Biochemistry* 1996; 35: 3963-69.
5. Neufeld EF. Natural history and inherited disorders of a lysosomal enzyme β -hexosaminidase. *J Biol Chem* 1989; 264: 10927-30.
6. Hechtman P, Kaplan F. Tay–Sachs disease screening and diagnosis. Evolving technologies. *DNA Cell Biol* 1993; 12: 651-65.
7. Isaksson A, Hultberg B, Masson P, *et al.* Enzyme immunoassay of β -hexosaminidase A and B in serum: Carrier detection of GM2-gangliosidoses, and equivalence of enzyme activity and enzyme protein reactivity. *Clin Chem* 1993; 39: 1412-15.
8. Perez LF, Tutor JC. Assay of β -N-acetylhexosaminidase isoenzymes in different biological specimens by means of determination of their activation energies. *Clin Chem* 1998; 44: 226-31.
9. Perez LF, Tutor JC. Assay of β -N-acetylhexosaminidase isoenzymes in urine by means of determination of their activation energy without removing endogenous low-molecular-mass components. *Clin Chim Acta* 1998; 277: 39-49.
10. Casal JA, Chabás A, Tutor JC. Thermodynamic determination of β -hexosaminidase isoenzymes in mononuclear and polymorphonuclear leukocyte populations. *Am J Med Genet* 2003; 116A: 229-33.
11. Kytzia HJ, Hinrichs U, Maire I, *et al.* Variant of GM2-gangliosidoses with hexosaminidase A having a severely changed substrate specificity. *EMBO J* 1983; 2: 1201-5.
12. Brown CA, Neote K, Leung A, *et al.* Introduction of the α -subunit mutation associated with the B1 variant of Tay-Sachs disease into the β -subunit produces β -hexosaminidase B without catalytic activity. *J Biol Chem* 1989; 264: 21705-10.

- 13.** Perez LF, Ribeiro HM, Casal JA, *et al.* Thermodynamic characterisation of the mutated isoenzyme A of β -N-acetylhexosaminidase in GM2 gangliosidosis B1 variant. *Clin Chim Acta* 1999; 285: 45-51.
- 14.** Gold RJM, Maag UR, Neal JL, *et al.* The use of biochemical data in screening for mutant alleles and in genetic counselling. *Ann Hum Genet* 1974; 37: 315-26.
- 15.** Landels EC, Ellis IH, Bobrow M, *et al.* Tay-Sachs disease heterozygote detection: Use of a centrifugal analyser for automation of hexosaminidase assays with two different artificial substrates. *J Med Genet* 1991; 28: 101-9.
- 16.** Suzuki K, Vanier MT. Biochemical and molecular aspects of late-onset GM2 gangliosidosis: B1 variant as a prototype. *Dev Neurosci* 1991; 13: 288-94.
- 17.** Tanaka A, Ohno K, Suzuki K. GM2-gangliosidosis B1 variant: A wide geographic and ethnic distribution of the specific β -hexosaminidase α chain mutation originally identified in a Puerto Rican patient. *Biochim Biophys Res Commun* 1988; 156: 1015-19.
- 18.** Maia M, Alves D, Ribeiro G, *et al.* Juvenile GM2 gangliosidosis variant B1: Clinical and biochemical study in seven patients. *Neuropediatrics* 1990; 21: 18-23.
- 19.** Dos Santos MR, Tanaka A, Sá Miranda MC, *et al.* GM2-gangliosidosis B1 variant: Analysis of β -hexosaminidase α gene mutations in 11 patients from a defined region in Portugal. *Am J Hum Genet* 1991; 49: 886-90.
- 20.** Ribeiro MG, Pinto RA, Dos Santos MR, *et al.* Biochemical characterisation of β -hexosaminidase in different biological specimens from eleven patients with GM2 gangliosidosis B1 variant. *J Inher Metab Dis* 1991; 14: 715-20.
- 21.** Teixeira CA, Sena-Esteves M, Lopes L, *et al.* Retrovirus-mediated transfer and expression of β -hexosaminidase α -chain cDNA in human fibroblasts from GM-gangliosidosis B1 variant. *Human Gene Ther* 2001; 12: 1771-83.
- 22.** Eirís J, Chabás A, Coll MJ, *et al.* Fenotipo infantil tardío y juvenil de la variante B1 de gangliosidosis GM2. *Rev Neurol* 1999; 29: 435-38.

VI. Relación entre los distintos marcadores de activación monocito / macrófago en la enfermedad de Gaucher tipo 1*

La enfermedad de Gaucher es debida a una deficiencia hereditaria de la enzima lisosómica β -glucosidasa (EC 3.2.1.45), con la consecuente acumulación de glicosilceramida en los lisosomas de los macrófagos (1, 2). Clínicamente, se han descrito tres formas de la enfermedad: tipo 1 no neuropática (la más común), tipo 2 neuropática aguda y tipo 3 neuropática subaguda. En los pacientes con enfermedad de Gaucher tipo 1 las manifestaciones clínicas son resultado de una acumulación de macrófagos que causan aumento de tamaño y disfunción de hígado y bazo, y el acumulo de células de almacenamiento causa alteraciones en médula ósea y daño óseo (1).

La terapia de remplazamiento enzimático es el tratamiento de elección para la enfermedad de Gaucher tipo 1, y el seguimiento bioquímico de la respuesta al tratamiento es clínicamente importante. En cultivos celulares, el mRNA de la quitotriosidasa (ChT) solamente es expresado en un avanzado estado de diferenciación de los monocitos a macrófagos activados, indicando una intensa regulación de la expresión enzimática (3). La actividad de ChT en suero/plasma en pacientes no tratados con enfermedad de Gaucher tipo 1 está significativamente elevada y disminuye gradualmente durante la terapia de remplazamiento enzimático (4-8), siendo las denominadas "células de Gaucher" la principal fuente de ChT sérica (4).

La enzima convertina-angiotensina (ECA) presente en suero es principalmente producida en el endotelio vascular, aunque en algunas situaciones patológicas los macrófagos tisulares y los monocitos circulantes pueden producir importantes cantidades de esta enzima, convirtiéndose en la principal fuente de su actividad sérica (9, 10), lo que podría explicar los aumentos de actividad sérica de ECA descritos en la enfermedad de Gaucher (11, 12). La adenosina deaminasa (ADA) puede ser un indicador de activación macrofágica y la isoenzima ADA 2 sérica parece tener su origen exclusivamente en la línea celular monocito/macrófago (13). La neopterina sería producida específicamente por los monocitos/macrófagos activados en respuesta al interferón γ producido por linfocitos T activados (14, 15). Asimismo, se ha sugerido que la Hex podría aumentar en

*Casal JA, Lacerda L, Pérez LF, Pinto RA, Clara Sá Miranda M, Carlos Tutor J. Relationships between serum markers of monocyte/macrophage activation in type 1 Gaucher's disease. *Clin Chem Lab Med* 2002; 40: 52-5.

algunos casos por activación macrofágica (16, 17), habiéndose descrito previamente aumentos de su actividad enzimática en suero/plasma de pacientes con enfermedad de Gaucher (18-20) que podrían ser de utilidad para el diagnóstico de pacientes homocigotos y la detección de portadores heterocigotos (18).

El objetivo fue mostrar las relaciones encontradas entre estos marcadores de activación monocito/macrófago en pacientes con enfermedad de Gaucher tipo 1.

Material y métodos

Se estudiaron 44 pacientes (27 mujeres y 17 hombres) con enfermedad de Gaucher tipo 1. Presentando una edad media (\pm SEM) de 33.2 ± 2.2 años (rango 9 - 63 años). Todos los pacientes procedían del norte de Portugal, y la caracterización bioquímica y molecular de la enfermedad lisosómica se realizó en la unidad de enzimología del Instituto de Genética Médica "Jacinto Magalhaes" de Oporto. Para cada paciente la severidad clínica de la enfermedad fue calculada en base al índice de Zimran (21). En 16 pacientes el estudio se hizo en el momento del diagnóstico de la enfermedad y antes de que se comenzase el tratamiento, y en los 28 casos restantes se administraba la terapia de remplazamiento enzimático con Imiglucerasa (Cerezyme[®], Genzyme, Cambridge, USA) siendo el tiempo medio de tratamiento 18.8 meses (rango 1-50 meses) antes.

La actividad sérica de la ChT se determinó usando el método fluorimétrico de Hollak y cols. (4) con ligeras modificaciones. La enzima angiotensina-convertina (ECA, EC 3.4.15.1) se determinó usando el ACE Kinetic Test de Bühlmann Laboratorios (Allschwill, Suiza). Para la adenosina deaminasa (ADA, EC 3.5.4.4) se utilizó el ADA Boehringer Test Combination (Roche Diagnostics, Basilea, Suiza), que cuantifica la actividad de la isoenzima ADA 2. La concentración sérica de neopterina se determinó por ELISA con reactivos de IBL Gesellschaft für Immunochemie und Immunobiologie GMBH (Hamburgo, Alemania). La β -Hexosaminidasa (Hex, EC 3.2.1.52) y sus isoenzimas Hex A y Hex B fueron determinadas como se describió previamente (22).

Resultados y discusión

Se identificaron tres pacientes con deficiencia de ChT; uno del grupo de pacientes no tratados y dos del grupo de pacientes tratados. Todos los pacientes no tratados presentaban niveles de ChT (excepto el caso con deficiencia de ChT), neopterina, ECA y ADA mayores que los correspondientes límites superiores de referencia; sin embargo, en

dos de los pacientes no tratados las actividades séricas de la Hex total y sus isoenzimas estaban dentro del intervalo de referencia. En el grupo de los pacientes tratados se encontró un descenso significativo para todas las variables bioquímicas estudiadas en comparación con el grupo de pacientes no tratados ($p < 0.001$). No se encontró una correlación significativa en ninguno de los grupos de pacientes estudiados entre los marcadores de activación macrofágica y el índice de severidad clínica de Zimran, o entre estos marcadores séricos y el tiempo de tratamiento en el grupo total de pacientes.

La Tabla 1 muestra el incremento de los diferentes marcadores en los grupos de pacientes tratados y no tratados expresados como múltiplos del límite superior de referencia. En el grupo de pacientes no tratados el mayor incremento corresponde a la ChT, seguido de neopterina, ECA, ADA y Hex. Aunque se encontró un incremento significativo en este grupo tanto para la Hex A como la Hex B séricas en relación a un grupo control formado por 84 personas clínicamente sanas ($p < 0.001$), la actividad total correlacionó significativamente con la proporción en porcentaje de isoenzima Hex B ($r = 0.584$, $p < 0.05$), lo que indica que el incremento de actividad se produce principalmente a expensas de la isoenzima Hex B. Sin embargo, en el grupo tratado no se encontró una correlación significativa entre la Hex total y la Hex B ($r = 0.013$). No se encontró una diferencia significativa entre la proporción de isoenzima Hex B (media \pm SEM) en el grupo de los 16 pacientes no tratados ($37.6 \pm 1.96 \%$), los 28 pacientes tratados ($33.2 \pm 1.55 \%$) y los 84 sujetos control ($30.3 \pm 0.55 \%$).

Tabla 1. Valores de los diferentes marcadores de activación macrofágica en la enfermedad de Gaucher

	Pacientes no tratados (n= 16)	Pacientes tratados (n= 28)
	Múltiplos del límite superior de referencia	
ChT^a	170.9 \pm 35.3	19.7 \pm 3.4
Neopterina	9.2 \pm 1.2	4.2 \pm 0.4
ECA	4.8 \pm 0.8	1.8 \pm 0.1
ADA	4.2 \pm 0.4	1.9 \pm 0.2
Hex Total	2.2 \pm 0.3	1.0 \pm 0.0
Hex A	1.9 \pm 0.2	1.0 \pm 0.0
Hex B	2.9 \pm 0.5	1.1 \pm 0.1

^a los casos ChT deficientes fueron excluidos; los valores se expresan en media \pm SEM

La Tabla 2 muestra coeficientes de correlación obtenidos entre los diferentes marcadores de activación de monocitos/macrófagos en los 44 pacientes estudiados, existiendo una alta significación estadística en todos los casos. Sin embargo, los coeficientes de correlación parcial entre la ChT y la neopterinina (manteniendo las otras variables constantes) no alcanzó la significación estadística ($r= 0.104$). El coeficiente de correlación entre la isoenzima Hex B y los diferentes marcadores de activación macrofágica fueron más bajos que los encontrados para la Hex A. Asimismo, no se alcanzó la significación estadística en la correlación parcial entre la Hex B sérica (manteniendo la Hex A constante) y ChT ($r= 0.044$), neopterinina ($r= 0.051$), ADA ($r= 0.143$), ECA ($r= 0.018$). En los grupos de pacientes no tratados y tratados, los coeficientes de correlación entre los diferentes marcadores de activación macrofágica fueron más bajos que en el grupo total, aunque alcanzando la significación estadística excepto entre ChT y neopterinina.

Tabla 2. Correlación entre los diferentes marcadores de activación macrofágica en pacientes con enfermedad de Gaucher (n= 44).

	Neopterinina	ECA	ADA	Hex Total	Hex A	Hex B
ChT^a	0.586*	0.882*	0.794*	0.747*	0.760*	0.685*
Neopterinina	-----	0.591*	0.862*	0.792*	0.833*	0.683*
ECA	0.591*	-----	0.809*	0.638*	0.637*	0.609*
ADA	0.862*	0.809*	-----	0.818*	0.822*	0.764*
Hex Total	0.792*	0.638*	0.818*	-----	0.973*	0.967*
Hex A	0.833*	0.637*	0.822*	0.973*	-----	0.884*
Hex B	0.683*	0.609*	0.764*	0.967*	0.884*	-----

^a los casos ChT deficientes fueron excluidos; $p < 0.001$

Se ha descrito que una duplicación 24 bp en el gen de la ChT tiene como resultado la síntesis de una proteína inactiva, siendo la prevalencia de portadores heterocigotos aproximadamente del 35 % (23) y para la deficiencia enzimática de aproximadamente el 6 % (4, 6), aunque algunos autores sugieren que sería menor del 2 % (8). En nuestro estudio de los 44 pacientes con enfermedad de Gaucher y de 103 individuos control, encontramos 3 y 6 casos con deficiencia de ChT respectivamente. En los 44 pacientes estudiados, tres eran homocigotos para la deficiencia de ChT, 19 portadores

heterocigotos y 22 presentaban un genotipo ChT normal. Los coeficientes de correlación entre los niveles séricos de ChT y neopterina fueron análogos en los grupos de portadores heterocigotos para la deficiencia de ChT ($r= 0.542$, $p< 0.001$) y con genotipo ChT normal ($r= 0.609$, $p< 0.001$). Análogos resultados se obtuvieron para las correlaciones entre la ChT y ECA, ADA y Hex para los dos grupos de pacientes.

En los pacientes no tratados el incremento en suero de los niveles ChT, fue mucho mayor que el de los otros marcadores de activación macrofágica, con un mayor descenso después del comienzo de la terapia de remplazamiento enzimático (Tabla 1). Todos los pacientes no tratados, presentaron niveles en suero de ChT (excepto para el paciente deficiente en ChT), neopterina, ECA y ADA más altos que el límite superior del rango de referencia. Con respecto a la Hex total y sus isoenzimas Hex A y Hex B, dos de los pacientes presentaron actividades séricas comprendidas en los intervalos de referencia, lo que supone una sensibilidad del 88%.

Nakagawa y cols (18) y Moffit y cols (19) observaron un aumento en la actividad de la Hex en suero/plasma de pacientes con enfermedad de Gaucher, principalmente a expensas de la Hex B. Se ha sugerido que el estudio rutinario de la Hex sérica podría ser utilizado para el diagnóstico y detección de portadores de Tay-sachs podría ser útil asimismo para el diagnóstico y screening de la enfermedad de Gaucher (18). Sin embargo, los datos de Natowicz y cols (20) no apoyan esta recomendación, ya que no todos los pacientes con enfermedad de Gaucher presentan elevaciones de la actividad sérica de Hex y de la proporción relativa de Hex B.

La marcada heterogeneidad de la actividad total de la Hex y de la proporción relativa de sus isoenzimas, en pacientes con enfermedad de Gaucher (20), podría ser debida a la inclusión de pacientes no tratados y tratados con corticosteroides, y que estos autores carecían de información clínica de la mayoría de sus pacientes. Tanto la terapia de remplazamiento enzimático (Tabla 1) como la medicación con corticosteroides (19) pueden disminuir la actividad sérica de la Hex en estos pacientes.

Debido a la liberación de enzima de origen plaquetario durante la formación del coágulo, la actividad sérica de la Hex es significativamente mayor que la actividad en plasma (24, 25), existiendo una correlación significativa entre la diferencia de actividades y el número de plaquetas (25). Como la trombocitopenia es la alteración más comúnmente observada en sangre periférica de pacientes con enfermedad de Gaucher (1, 2), debe esperarse un aumento de la sensibilidad diagnóstica de la Hex en relación a

la obtenida por nosotros (88 %), si se utiliza plasma en lugar de suero para las determinaciones enzimáticas.

En el grupo de pacientes no tratados, se obtuvo una correlación significativa entre la actividad sérica de Hex total y proporción relativa de Hex B, lo cual indicaría que, aunque aumentan las isoenzimas Hex A y Hex B, sería esta isoenzima la que aumenta en mayor medida. Sin embargo, aunque el porcentaje de Hex B en este grupo de pacientes es mayor que en el grupo de pacientes tratados y que el grupo control, no llegó a alcanzarse una diferencia significativa.

La afectación hepática en la enfermedad de Gaucher (1, 2) puede conducir a un ligero incremento en suero de las transaminasas, 5' nucleotidasa y fosfatasa alcalina (2, 26, 27), cuya actividad disminuye durante la terapia de remplazamiento enzimático (27). El daño producido en los hepatocitos, así como la obstrucción intrahepática causada por infiltración, podría contribuir al aumento de la actividad sérica de la Hex en estos pacientes, particularmente de la Hex B, cuya proporción relativa aumenta en la enfermedad hepática (28, 29). Una mejora de la función hepática podría explicar porque no se encontraron correlaciones significativas entre la actividad sérica total de la Hex y el porcentaje de Hex B en el grupo de pacientes tratados. Asimismo, los coeficientes de correlación parcial entre la actividad sérica de Hex B (manteniendo Hex A constante) y ChT, neopterina, ECA y ADA no mostraron significación estadística. Este hecho y el menor coeficiente de correlación encontrado para la Hex B, con respecto a Hex A, con los distintos marcadores de activación macrofágica, sugiere que los hepatocitos juegan un importante papel como fuente celular de la isoenzima Hex B sérica en pacientes con enfermedad de Gaucher.

En los pacientes estudiados, se encontró una correlación altamente significativa entre todos los marcadores de activación monocito/macrófago (Tabla 2). La mejor correlación se encontró entre la ChT y ECA, mientras que la peor fue entre ChT y neopterina. Asimismo, la correlación parcial entre ChT y neopterina manteniendo constantes las demás variables, no alcanzó la significación estadística. Este hecho es interesante teniendo en cuenta que ChT y neopterina son los marcadores que presentaron mayores incrementos en nuestros pacientes, y podría sugerir que la expresión de ChT es diferente a la de neopterina, cuya respuesta al interferón- γ producido por los linfocitos T es bien conocida (14, 15). El comportamiento de la neopterina en la enfermedad de Gaucher no ha sido estudiado (14), pero la posible

implicación de los linfocitos T CD_4^+ y CD_8^+ en esta enfermedad (30) puede sugerir investigaciones futuras de interés.

Bibliografía

1. Charow J, Esplín JA; Gribble TJ, Kaplan P, Kolodny EH, Pastores GM *et al.* Gaucher disease. Recommendation on diagnosis, evaluation and monitoring. *Arch Inter Med* 1998; 158: 1754-60.
2. Butler E, Grabowski GA. Gaucher disease. In: Scriver CD, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, editors. The metabolic and molecular bases of inherited disease. New York: *McGraw-Hill Inc*; 1995: 2641-70.
3. Barone R, Di Gregorio F, Romeo MA, Schiliro G, Pavone L. Plasma ChT activity in patients with β -thalassemia. *Blood Cells Molec Dis* 1999; 25: 1-8.
4. Hollak CEM, Van Weely S, Van Oers HJ, Aerts MFG. Marked elevation of plasma chitotriosidase activity. A novel hallmark of Gaucher disease. *J Clin Invest* 1994; 93: 1288-92.
5. Den Tandt WR, Van Hoof F. Marked increase of methylumbelliferyl-tetra-N-acetylChT hydrolase activity in plasma from Gaucher disease patients. *J Inher Metab Dis* 1996; 19: 344-50.
6. Guo Y, He W, Boer AM, Wevers RA, De Bruijn AM, Groener JEM *et al.* Elevated plasma ChT activity in various lysosomal storage disorders. *J Inher Metab Dis* 1995; 18: 717-22
7. Joung E, Chatterton C, Vellodi A, Winchester B. Plasma ChT activity in Gaucher disease patients who have been treated either by bone marrow transplantation or by enzyme replacement therapy with alglucerase. *J Inher Metab Dis* 1997; 20: 595-602.
8. Czartoryska B, Tyłki-Szimanska A, Gorska D. Serum ChT activity in Gaucher patients on enzyme replacement therapy. *Clin Biochem* 1998; 31: 417-20.
9. Bénéteau-Burnat B, Baudin B. Angiotensin-converting enzyme: clinical applications and laboratory investigations on serum and other biological fluids. *Crit Rev Clin Lab Sci* 1991; 28: 337-56.
10. Ehlers MRW, Riordan JF. Angiotensin-converting enzyme: new concepts concerning its biological role. *Biochemistry* 1989; 28: 5311-17.
11. Lieberman J, Beutler E. Elevation of serum angiotensin-converting enzyme in Gaucher's disease. *N Engl J Med* 1976; 294: 1442-44.
12. Silverstein E, Friedland J. Elevated serum and spleen angiotensin-converting enzyme and serum lysozyme in Gaucher's disease. *Clin Chim Acta* 1977; 74: 21-25.

13. Ungerer JPJ, Oosthuizen HM, Bissbort SH, Wermaak WJH. Serum adenosine deaminase: isoenzymes and diagnostic applications. *Clin Chem* 1992; 38: 1322-26.
14. Widner B, Murr C, Wirleitner B, Mayr C, Spöttl N, Baier-Bitterlich G *et al* . The importance of neopterin as a laboratory marker of immune activation. *Pteridines* 1999; 10: 101-11.
15. Fuchs D, Weiss G, Reibnegger G, Wachter H. The role of neopterin as a monitor of a cellular immune activation in transplantation, inflammatory, infectious and malignant diseases. *Crit Rev Clin Lab sci* 1992; 29: 307-41.
16. Elsafi ME, Hultberg B, Isaksson A, Hägerstrand I, Prytz H, Stenram U. Lysosomes and human liver disease: a biochemical and immunohistochemical study of β -hexosaminidase. *Eur J Clin Chem. Clin Biochem* 1994; 32: 669-73.
17. Elsafi ME, Hultberg B, Hägerstrand I, Isaksson A, Stenram U. immunohistochemical demonstration of β -hexosaminidase. In cirrhotic and cholestatic human livers with a monoclonal antibody. *Liver* 1991; 11: 350-54.
18. Nakagawa S, Kumin S, Sachs G, Nitowsky HM. Changes of serum hexosaminidase for the presumptive diagnosis of type 1 Gaucher disease in Tay-Sachs carrier screening. *Am J Med Gen* 1983; 14: 525-32.
19. Moffit KD, Chambers JP, Diven WF, Glew RH, Wenger DA, Farrell DF. Characterization lysosomal hydrolases that are elevated in Gaucher's disease. *Arch Biochem Biophys* 1978, 190: 247-60.
20. Natowicz MR, Prencz EM, Cajolet A. Marked variation in blood beta-hexosaminidase in Gaucher disease. *Clin Chim Acta* 1991; 203-: 17-22.
21. Zinran A, Gross E, West C, Sorge J, Kubitz M, Beutler E. Prediction of severity of Gaucher's disease by identification of mutations at DNA level. *Lancet* 1989; 2: 349-52.
22. Pérez LF, Tutor JC. Assay of β -N-acetylhexosaminidase isoenzymes in different biological specimens by means of the determination of their activation energies. *Clin Chem* 1998; 44: 226-31.
23. Giraldo P, Cenarro A, Alfonso P, Perez JI, Rubio D, Giralto M *et al*. Genotype and plasma ChT activity in Gaucher disease. 12th Workshop European Study Group on Lysosomal Diseases. *Vidago* (Portugal), 1999: 101.
24. Emiliani C, Martino S, Orlicchio A, Vezza R, Nenci GG, Gresele P. Platelet glycohydrolase activities: characterization and release. *Cell Biochem Funct* 1995; 13: 31-39.

- 25.** Pérez LF, Tutor JC. Assay of serum/plasma β -N-acetylhexosaminidase by heat inactivation using a continuous spectrophotometric method adapted to a centrifugal analyzer. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1997; 6: 445-52.
- 26.** James SP, Stromeyer FW, Chang C, Barranger JA. Liver abnormalities in patients with gaucher's disease. *Gastroenterology* 1981; 80: 126-33.
- 27.** Ciana G, Tamaro G, Martini C, Ceschel S, Cuttini M, Bembi B. ALP isoenzyme separation in type 1 Gaucher disease. *Clin Chem Lab Med* 2000; 38: 479-80.
- 28.** Hultberg B, Isaksson A. Isoenzyme pattern of serum β -hexosaminidase in liver disease, alcohol intoxication and pregnancy. *Enzyme* 1983; 30: 166-71.
- 29.** Isaksson A, Hultberg B. Immunoassay of β -hexosaminidase isoenzymes in serum in patients with raised total activities. *Clin Chim Acta* 1989; 183:155-62.
- 30.** Lacerda L, Arosa FA, Lacerda R, Cabeda J, porto G, Amaral O *et al.* T Cell numbers relate to bone involvement in Gaucher disease. *Blood Cells Molec Dis* 1999; 25: 130-38.

VII. Isoenzimas de la β -N-acetilhexosaminidasa en plasma y leucocitos de sangre periférica en la artritis reumatoide*

La artritis reumatoide (AR) es una enfermedad autoinmune crónica, casi siempre progresiva, y caracterizada por la presencia de sinovitis acompañada de erosión y daño articular permanente. La valoración de la actividad de la enfermedad utilizando parámetros de laboratorio es aun objeto de debate (1-3).

Un reciente estudio sugiere que la degradación del cartílago en la artritis reumatoide depende, al menos parcialmente, del aumento de Hex, una enzima lisosomal que puede ser liberada al torrente sanguíneo (4). La actividad sérica de Hex está significativamente aumentada en algunos pacientes con artritis reumatoide (4, 5), y esto puede ser debido a una sobreproducción de enzima a nivel articular (4), ya que se ha observado un incremento de la actividad de Hex en cultivos de condrocitos articulares incubados con IL-1 β (4, 6), una de las principales citoquinas prodegradativas en líquido sinovial. Consecuentemente, se ha sugerido que la Hex sérica podría ser un marcador de erosión independientemente del estatus inflamatorio (4). Sin embargo, la actividad de la Hex en suero humano tiene un importante origen plaquetario (7), y en pacientes con artritis reumatoide el número de plaquetas circulantes está frecuentemente incrementado (1), lo que podría conducir a engañosos resultados.

El objetivo de nuestro estudio fue evaluar los posibles aumentos de actividad de la Hex, así como de sus correspondientes isoenzimas Hex A y Hex B, en plasma y leucocitos periféricos de pacientes con artritis reumatoide, y su posible correlación con la actividad y severidad de la enfermedad.

Material y métodos

Se estudiaron 51 pacientes (15 hombres y 36 mujeres) con una edad (media \pm SEM) de 57.2 ± 1.7 años (rango 23 - 78 años) y diagnosticados de artritis reumatoide de acuerdo con los criterios del Colegio Americano de Reumatología (8) y que presentaban un período de evolución de la enfermedad de 10.9 ± 1.2 años (rango 1 - 40 años). En casi todos los casos el tratamiento antirreumático se hacía con metotrexate. La evaluación de

*Casal JA, Mera A, Pérez LF, Tutor JC. Plasma and peripheral leukocyte β -N-acetylhexosaminidase isoenzymes and disease activity in rheumatoid arthritis. *Clin Biochem* 2002; 35: 483-88.

la capacidad funcional se hizo de acuerdo con la versión española modificada del Health Assessment Questionnaire (mHAQ) (9), y la evaluación radiológica se hizo mediante el método de Sharp's modificado, que evalúa separadamente la erosión y la reducción del espacio articular con un máximo de puntuación de 160 para las erosiones en las manos y 120 en los pies como se ha descrito previamente (10, 11). El grupo control estaba formado por 58 individuos clínicamente sanos (31 hombres y 27 mujeres) con una edad de 46.0 ± 1.2 años (rango 31 - 68 años). Las mujeres embarazadas y las que tomaban anticonceptivos orales fueron excluidas.

Las muestras de sangre utilizadas para la separación del plasma y leucocitos se recogieron en tubos Vacutainer[®] con EDTAK₃ y para la obtención de suero se utilizaron tubos Vacutainer[®] sin aditivo. Los leucocitos fueron aislados de las muestras de sangre utilizando Polymorphoprep[®] solution (Axis-Xield Poc As, Oslo, Noruega), y la separación de los leucocitos mononucleares (MN) y polimorfonucleares (PMN) se hizo de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La determinación de la heterogeneidad enzimática de la Hex se hizo termodinámicamente como se ha descrito previamente (12, 13). Para el estudio de liberación de la Hex plaquetaria se realizó una activación de las plaquetas con trombina en un plasma enriquecido de acuerdo con el procedimiento descrito por Emiliani *y cols* (7) ligeramente modificado, y la actividad enzimática se determinó en el sobrenadante obtenido por centrifugación.

La enzima angiotensina-convertina (ECA, EC 3.4.15.1) se determinó utilizando el ACE Kinetic Test de los Bühlmann Laboratories (Allschwill, Suiza). Para la adenosin deaminasa (ADA, EC 3.5.4.4) se utilizó ADA Boehringer Test Combination (Roche Diagnostics, Basilea, Suiza), que cuantifica principalmente la actividad de la isoenzima ADA 2. La actividad sérica de la quitotriosidasa (ChT) se determinó utilizando el método fluorimétrico de Hollak *y cols* (14) ligeramente modificado. La concentración sérica de neopterina se determinó por ELISA con reactivos de IBL Gesellschaft für Immunochemie und Immunobiologie GMBH (Hamburgo, Alemania). La concentración sérica de proteína C reactiva fue determinada por nefelometría en un Image Immunochemical system (Beckman). El ácido siálico se determinó enzimáticamente en un analizador Hitachi 717 usando reactivos de Boehringer Mannheim (Roche Diagnostics). Las actividades séricas de la aspartato aminotransferasa (AST, EC 2.6.1.1.), alanina aminotransferasa (ALT, EC 2.6.1.2), lactato dehidrogenasa (LDH, EC 1.1.1.27), glutamato dehidrogenasa (GLDH, EC 1.4.1.3), 5'- nucleotidasa (5'NU, EC 3.1.3.5), fosfatasa alcalina (ALP, EC 3.1.3.1), γ -

glutamyltransferasa (GGT, EC 2.3.2.2) y colinesterasa (ChE, EC 3.1.1.8) se determinaron en un analizador Hitachi 717, utilizando reactivos de Boehringer Mannheim (Roche Diagnostic) y Biomérieux SA (Marcy- L'Etoile, Francia).

Resultados y discusión

En la Tabla 1 se muestran los resultados obtenidos para la actividad enzimática y energía de activación aparente de la Hex, en tres plasmas enriquecidos en plaquetas antes y después de la estimulación plaquetaria con trombina. Como puede observarse, se produjo un aumento significativo de la actividad enzimática plasmática después de la estimulación plaquetaria ($p < 0.001$); sin embargo, la energía de activación aparente de la Hex no se modificó significativamente, lo cual sugiere que la composición isoenzimática no se vería alterada. Por otra parte, el estudio en paralelo de la actividad enzimática de la Hex en suero y plasma de 81 pacientes no seleccionados mostró que los valores medios en suero fue significativamente mayor que en plasma (22.18 ± 1.74 U/L vs. 19.14 ± 1.77 U/L, $p < 0.001$), existiendo entre las actividades enzimáticas en suero y plasma una correlación altamente significativa ($r = 0.953$, $p < 0.001$). Se encontró una correlación significativa entre la diferencia de actividades enzimáticas suero/plasma y el número de plaquetas en sangre (Figura 1).

Tabla 1. Actividad enzimática y energía de activación aparente de la Hex en plasmas ricos en plaquetas antes y después de la estimulación plaquetaria con trombina.

Plasmas	Antes de estimulación		Después de estimulación	
	Actividad (U/L)	Ea (kJ/mol)	Actividad (U/L)	Ea (kJ/mol)
1	10.7	55.7	20.3	55.8
2	18.4	57.7	33.2	58.9
3	6.8	54.0	13.2	54.0
Media	12.0	55.8	22.3	56.2

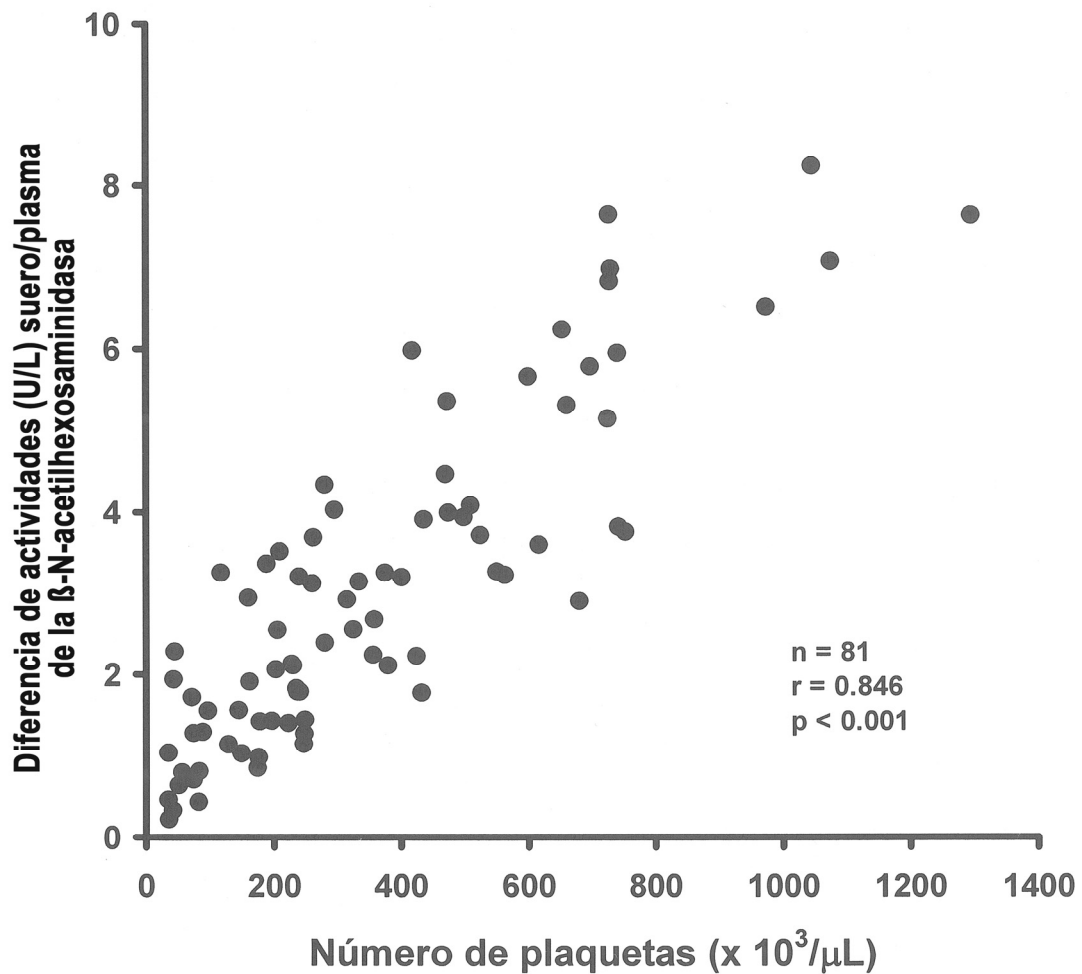


Figura 1. Correlación entre la diferencia de actividades suero/plasma de la β -N-acetilhexosaminidasa y el número de plaquetas en sangre.

Las energías de activación de la Hex en suero y plasma presentaron un alto coeficiente de correlación ($r = 0.986$, $p < 0.001$), no encontrando diferencias significativas entre las medias (55.85 ± 0.47 kJ/mol vs. 55.96 ± 0.50 kJ/mol). Estos resultados, demuestran que si bien la actividad de la Hex en suero es significativamente mayor que en plasma, su composición isoenzimática es similar en ambos medios biológicos. Debe señalarse que el anticoagulante utilizado no interfiere en la determinación de la actividad enzimática, por lo que teniendo en cuenta estos resultados, la determinación de la Hex en el grupo de pacientes con artritis reumatoide estudiados, se hizo en plasma y no en suero, que es el medio biológico utilizado por otros autores (4, 5).

No se encontraron diferencias significativas para la actividad de la Hex en plasma o leucocitos cuando se hizo una dicotomía por sexos, consecuentemente tanto en el grupo control como en el grupo de pacientes ambos sexos fueron considerados conjuntamente.

La Tabla 2 muestra los resultados obtenidos para la actividad total de Hex, así como para sus isoenzimas Hex A y Hex B, en plasma y en leucocitos MN y PMN. En el grupo de pacientes con artritis reumatoide las actividades de Hex total y Hex B plasmáticas presentaron valores significativamente mayores que los encontrados en el grupo control. Del mismo modo, la proporción relativa de isoenzima Hex B expresada en porcentaje fue también significativamente mayor en el grupo de pacientes, aunque no se alcanzó la correlación significativa entre actividad total de Hex y la proporción de Hex B ($r= 0.226$).

Tabla 2. Resultados obtenidos para la actividad de la Hex y su composición isoenzimática en plasma y leucocitos de sujetos control y pacientes con artritis reumatoide.

		Controles (n= 58)		Pacientes AR (n= 51)		Significación
		Media \pm SD	Mediana	Media \pm SD	Mediana	
Plasma	Hex (U/L)	9.29 \pm 2.26	8.94	10.54 \pm 2.61	9.82	p < 0.01
	Hex A (U/L)	6.39 \pm 1.43	6.28	6.97 \pm 1.70	6.51	NS
	Hex B (U/L)	2.90 \pm 0.98	2.64	3.57 \pm 1.13	3.32	p < 0.01
	Hex B (%)	30.78 \pm 5.44	31.06	33.62 \pm 4.67	33.40	p < 0.01
Células MN	Hex (U/g proteína)	20.10 \pm 4.38	20.00	21.11 \pm 4.67	20.75	NS
	Hex A (U/g proteína)	11.17 \pm 2.57	10.98	11.50 \pm 2.76	11.07	NS
	Hex B (U/g proteína)	9.07 \pm 1.96	9.06	9.61 \pm 2.05	9.18	NS
	Hex B (%)	44.89 \pm 3.17	44.56	45.69 \pm 2.76	45.40	NS
Células PMN	Hex (U/g proteína)	20.80 \pm 6.49	20.56	27.54 \pm 8.70	26.57	p < 0.001
	Hex A (U/g proteína)	14.96 \pm 4.23	14.49	19.57 \pm 6.15	19.22	p < 0.001
	Hex B (U/g proteína)	5.83 \pm 1.89	5.71	7.97 \pm 2.83	7.38	p < 0.001
	Hex B (%)	28.26 \pm 4.45	27.45	29.03 \pm 3.96	28.39	NS

Por lo que se refiere a leucocitos PMN, las actividades específicas encontradas para la Hex total, Hex A y Hex B, fueron significativamente mayores en el grupo de pacientes que en el grupo control; pero no se encontraron diferencias significativas entre ambos grupos para los leucocitos MN. Asimismo, no se encontraron correlaciones significativas entre las actividades de Hex en plasma y las actividades específicas en leucocitos MN y PMN. En el grupo de pacientes estudiado, sólo dos casos presentaron actividades

plasmáticas más altas que el límite superior del intervalo de referencia, y en 5 casos las actividades específicas para la Hex total, Hex A y Hex B en PMN superaron el límite superior de los correspondientes intervalos de referencia.

En la Tabla 3 se muestran los coeficientes de correlación obtenidos en el grupo de pacientes entre las actividades plasmáticas y leucocitarias de Hex con el mHAQ, índice de Sharp, número de articulaciones inflamadas y tiempo de evolución de la enfermedad. Sólo se encontró una correlación significativa entre la actividad plasmática de la isoenzima Hex B y el número de articulaciones inflamadas. El factor reumatoide presentó una correlación significativa con el mHAQ ($r= 0.286$, $p < 0.05$) y el número de articulaciones inflamadas ($r= 0.372$, $p < 0.01$), pero no con la actividad plasmática total de la Hex, Hex A ó Hex B. El mHAQ correlacionó significativamente con el índice de Sharp ($r= 0.676$, $p < 0.001$), el número de articulaciones inflamadas ($r= 0.508$, $p < 0.001$) y el tiempo de evolución de la enfermedad ($r= 0.457$, $p < 0.001$). El índice de Sharp presentó una correlación significativa con el número de articulaciones inflamadas ($r= 0.358$, $p < 0.001$) y tiempo de evolución de la enfermedad ($r= 0.680$, $p < 0.001$).

Tabla 3. Coeficientes de correlación de la Hex en plasma, leucocitos y sus isoenzimas con la actividad o severidad de la enfermedad en pacientes con AR.

		mHAQ	Índice de Sharp	Nº de articulaciones inflamadas	Tiempo de evolución
Plasma	Hex (U/L)	0.182	-0.004	0.269	0.157
	Hex A (U/L)	0.123	0.043	0.201	0.199
	Hex B (U/L)	0.265	-0.003	0.356*	0.079
Células MN	Hex (U/g proteína)	0.139	-0.104	0.058	0.031
	Hex A (U/g proteína)	0.209	-0.085	0.064	0.024
	Hex B (U/g proteína)	0.014	-0.131	0.005	0.040
Células PMN	Hex (U/g proteína)	0.201	0.058	-0.118	-0.030
	Hex A (U/g proteína)	0.261	0.106	-0.118	0.013
	Hex B (U/g proteína)	0.080	0.000	-0.150	-0.029

Significación: * $p < 0.05$

No se encontraron correlaciones significativas para la actividad plasmática o leucocitaria de la Hex con la proteína C reactiva (PCR), ácido siálico y velocidad de sedimentación (VSG), que presentaron correlaciones significativas entre sí ($r \geq 0.609$, $p < 0.001$). El mHAQ presentó una correlación significativa con VSG ($r = 0.371$, $p < 0.01$), por su parte el índice de Sharp correlacionó con la PCR ($r = 0.336$, $p < 0.01$), el ácido siálico ($r = 0.364$, $p < 0.005$) y VSG ($r = 0.302$, $p < 0.05$). El número de articulaciones inflamadas mostró una correlación significativa con la PCR ($r = 0.397$, $p < 0.005$), ácido siálico ($r = 0.404$, $p < 0.005$) y VSG ($r = 0.466$, $p < 0.001$). Por lo que se refiere a las actividades plasmáticas de Hex total, Hex A y Hex B no presentaron correlaciones significativas con los marcadores de activación macrofágica neopterin, quitotriosidasa (ChT), ADA y ECA. La neopterin correlacionó significativamente con el índice de Sharp ($r = 0.343$, $p < 0.01$) y las actividades de ADA ($r = 0.407$, $p < 0.001$) y ECA ($r = 0.348$, $p < 0.01$).

La Tabla 4 muestra los coeficientes de correlación de Hex total, Hex A y Hex B plasmáticas con otras enzimas séricas, encontrando sólo significación estadística con ChE y AST. La ALP presentó correlaciones significativas con el mHAQ ($r = 0.331$, $p < 0.05$), índice de Sharp ($r = 0.397$, $p < 0.01$), tiempo de evolución de la enfermedad ($r = 0.438$, $p < 0.001$), la PCR ($r = 0.331$, $p < 0.05$), ácido siálico ($r = 0.337$, $p < 0.05$) y VSG ($r = 0.363$, $p < 0.05$).

Tabla 4. Coeficientes de correlación de la Hex y sus isoenzimas en plasma con diferentes enzimas séricas en pacientes con artritis reumatoide. (n= 51).

	Hex	Hex A	Hex B
AST	0.373*	0.374*	0.262
ALT	0.219	0.223	0.122
LDH	0.188	0.207	0.145
GLDH	0.098	0.116	0.069
5'NU	0.128	0.108	0.156
ALP	0.148	0.147	0.109
GGT	0.265	0.275	0.229
ChE	0.461*	0.508*	0.381*

Significación: * $p < 0.01$

De acuerdo con los resultados obtenidos por Emiliani y *cols* la activación con trombina de las plaquetas provoca una liberación de actividad de Hex (7). Debido a esta liberación de enzima plaquetaria durante la formación del coagulo, la Hex en suero es significativamente mayor que en plasma, existiendo una correlación significativa entre esta diferencia de actividades y el número de plaquetas en sangre (Figura 1). La artritis reumatoide cursa frecuentemente con trombocitosis, y en el grupo de pacientes estudiado se encontró una correlación significativa entre el número de plaquetas en sangre y el número de articulaciones inflamadas ($r= 0.333$, $p< 0.05$), la PCR ($r= 0.313$, $p< 0.05$) y ácido siálico ($r= 0.459$, $p< 0.01$). Consecuentemente la determinación de Hex sérica en pacientes con artritis reumatoide realizada en estudios previos por otros autores (4, 5), podrían conducir a resultados engañosos, siendo el plasma la muestra biológica de elección.

Recientemente Shikman y *cols* demostraron que la Hex es la glicosidasa dominante en la degradación de glicosaminoglicanos, y que dicha enzima puede ser liberada por los condrocitos articulares humanos al compartimento extracelular (6). Por tanto una inhibición química de la actividad de Hex podría representar una nueva estrategia para prevenir, o incluso revertir, el proceso de degradación del cartílago en pacientes con osteoartritis (15). En pacientes con artritis reumatoide una actividad elevada de enzimas lisosómicas en líquido sinovial está asociada con una más severa destrucción de la articulación y observable por examen radiológico (16). De acuerdo con Berenbaum y *cols* (4) la Hex sérica en pacientes con artritis reumatoide tendría su origen en los condrocitos del cartílago, por lo que esta enzima podría ser utilizada como marcador de degradación del mismo. Sin embargo, los aumentos observados en nuestro estudio tanto para la Hex total en plasma como para la isoenzima Hex B, aunque estadísticamente significativos, son bastante modestos (Tabla 2).

El efecto que el tratamiento farmacológico puede tener sobre la actividad enzimática en estos pacientes es bien conocido, aunque verdaderamente no se encontró una correlación significativa entre la Hex plasmática y la destrucción articular evaluada radiológicamente mediante el índice de Sharp modificado. Tampoco se alcanzaron correlaciones significativas de la Hex plasmática con la actividad o severidad de la enfermedad estimada mediante el mHAQ, número de articulaciones inflamadas o tiempo de evolución de la enfermedad, ni con los marcadores de laboratorio de inflamación. Se podría decir de forma similar a lo señalado por Berenbaum y *cols* (4), que la actividad de

la Hex en suero es independiente del estatus inflamatorio en pacientes con artritis reumatoide.

La aumentada liberación de Hex por los condrocitos activados en medios de cultivo sugiere que el cartílago es una fuente de Hex en las articulaciones de pacientes artríticos (4). Sin embargo, teniendo en cuenta el elevado número de leucocitos presentes en líquido sinovial en la artritis reumatoide, podría también sugerirse que estas células fuesen otra fuente de actividad Hex (4). Veys y cols (17) observaron que los leucocitos del líquido sinovial de pacientes con artritis reumatoide contienen más Hex que los leucocitos de sangre periférica, y la actividad enzimática en líquido sinovial de estos pacientes es marcadamente mayor que la actividad sérica (4, 17). En nuestro estudio, no se encontraron correlaciones significativas de la actividad plasmática de la Hex total y sus isoenzimas con la LDH sérica, que se ha propuesto como una medida integrada de la lisis de PMN en todas las articulaciones de pacientes con artritis reumatoide (18, 19).

Aunque la actividad de las enzimas lisosómicas en suero o plasma pueden reflejar un aumento de actividad macrofágica total en el organismo, Falkenbach y cols sugieren la posibilidad de que la β -glucuronidasa en suero pueda ser un marcador de actividad macrofágica intra-articular (20-22), y podría ser usada como indicador precoz de la eficacia del tratamiento farmacológico en pacientes con artritis reumatoide (20). En enfermedades autoinmunes tiene lugar una activación de la inmunidad celular y el efecto de las diversas citocinas sobre las poblaciones monocito/macrofago podría ser estimado por la determinación de la neopterin sérica (23). Las enzimas ChT (24), isoenzima 2 de ADA (25) y ECA (26) son otros posibles marcadores de activación monocito / macrófago. En el grupo de pacientes estudiados ninguna de estas variables bioquímicas presentó una correlación significativa con la Hex y sus isoenzimas Hex A y Hex B, lo que podría indicar que su actividad plasmática en la artritis reumatoide no sea modulada por la activación macrofágica.

Estudios previos han mostrado que la proporción de leucocitos neutrófilos activados en sangre periférica, es significativamente más alta en pacientes con artritis reumatoide que en controles (27). No obstante, los niveles intracelulares de las enzimas lisosómicas β -glucuronidasa y lisozima de neutrófilos aislados de sangre periférica de pacientes con artritis reumatoide no están alterados en comparación con los de sujetos normales (28, 29). Asimismo, los neutrófilos aislados de pacientes con artritis reumatoide presentan una menor liberación espontánea de las enzimas lisosómicas contenidas en los gránulos específicos (29). En nuestro grupo de pacientes se encontró un incremento significativo

en la actividad específica de Hex total, Hex A y Hex B en leucocitos PMN periféricos ($p < 0.001$) pero no se encontró una correlación significativa con la actividad enzimática en plasma.

La aumentada excreción urinaria de ácido D-glucárico en pacientes con artritis reumatoide sometidos a tratamiento con fármacos antiinflamatorios probablemente refleja un aumento del metabolismo hepático (30). Un aumento de la actividad de Hex total, así como de la proporción en porcentaje de isoenzima Hex B en suero/plasma, se observa frecuentemente en enfermedades hepáticas (31, 32). Sin embargo las enzimas lisosómicas podrían ser secretadas al plasma por células intactas contrariamente a las enzimas mitocondriales y citoplasmáticas liberadas por daño celular (33). La correlación significativa en el grupo de pacientes entre la actividad plasmática total de Hex y sus correspondientes isoenzimas, con la CHE sérica, podría sugerir un origen hepático para los moderados incrementos encontrados, posiblemente debido a un aumento de secreción de precursores de alta masa molecular recientemente sintetizados. La ausencia de una correlación significativa entre la Hex plasmática y las actividades séricas de GGT, ALP y 5'Nu puede ser debido al hecho que estas enzimas podrían comportarse como marcadores de inflamación en la artritis reumatoide (34-36).

En conclusión, aunque la Hex participa en la degradación de la matriz extracelular del cartílago humano (4, 6, 15), nuestros resultados muestran que la actividad plasmática de la Hex, o incluso sus isoenzimas Hex A y Hex B, no puede utilizarse como una prueba adecuada para evaluar la actividad o severidad de la artritis reumatoide. La función hepática parece ser el principal determinante de la actividad de las isoenzimas de Hex en plasma.

Bibliografía

1. López FJ, González CM, Monteagudo I, Carreño L. Laboratorio y líquido sinovial en la artritis reumatoide. *Rev Clin Esp* 2000; 200 (monograf.1): 69-75.
2. Pinheiro RC, Pinheiro MFM, Andrade CAF *et al.* Correlation of acute phase proteins and disease activity in rheumatoid arthritis. *Clin Chem* 2000; 46 (Suppl.): A 471.
3. Ismail AA, Snowden N. Autoantibodies and specific serum proteins in the diagnosis of rheumatological disorders. *Ann Clin Biochem* 1999; 36: 565-78.
4. Berenbaum F, Le Gars L, Toussirot E *et al.* Marked elevation of serum N-acetyl- β -D-hexosaminidase activity in rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol* 2000; 18: 63-66.
5. Kar NC, Pearson CM. Elevated levels of serum β -acetylglucosaminidase in some patients with rheumatoid arthritis. *Proc Soc Exp Biol Med* 1973; 142: 398-400.
6. Shikman AR, Brinson DC, Lotz MK. Profile of glycosaminoglycan-degrading glycosidases and glycoside sulfatases secreted by human articular chondrocytes in homeostasis and inflammation. *Arthritis Rheum* 2000; 43: 1307-14.
7. Emiliani C, Martino S, Orlacchio A, Vezza R, Nenci GG, Gresele P. Platelet glycohydrolase activities: characterization and release. *Cell Biochem Funct* 1995; 13: 31-39.
8. Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA *et al.* The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1988; 31: 315-24.
9. Esteve-Vives J, Batlle-Gualda E, Reig A. Spanish version of the Health Assessment Questionnaire (HAQ): reliability, validity and transcultural equivalency. *J Rheumatol* 1993; 20: 2116-22.
10. Sharp JT, Young DY, Bluhm GB *et al.* How many joints in the hands and wrists should be included in a score of radiologic abnormalities used to asses rheumatoid arthritis?. *Arthritis Rheum* 1985; 28: 1326-35.
11. Van Der Heijde DMFM, Van Lecuwen MA, Van Riel PLCM *et al.* Biannual radiographic assessments of hands and feet in a three-year prospective follow up of patients with early rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1992; 35: 26-34.
12. Casal JA, Chabás A, Tutor JC. Thermodynamic determination of β -N-acetylhexosaminidase isoenzymes in mononuclear and polymorphonuclear leukocyte populations. *Am J Med Genet* 2003; 116A: 229-33.

- 13.** Pérez LF, Tutor JC. Assay of β -N-acetylhexosaminidase isoenzymes in different biological specimens by the determination of their activation energies. *Clin Chem* 1998; 44: 226-31.
- 14.** Hollak CE, van Weely S, van Oers MH, Aerts JM. Marked elevation of plasma chitotriosidase activity. A novel hallmark of Gaucher disease. *J Clin Invest* 1994; 93: 1288-92.
- 15.** Liu J, Shikhman AR, Lotz MK, Wong CH. Hexosaminidase inhibitors as new drug candidates for therapy of osteoarthritis. *Chem Biol* 2001; 8: 701-11
- 16.** Luukkainen R, Talonen R, Uksila E, Averma K. Relationship between some joint fluid, blood and serum variables and radiological destruction in knee joints in arthritis patients. *Scand J Rheumatol* 1986; 15: 399-401.
- 17.** Veys EM, Gabriel P, Decrans L, Verbruggen G. N-Acetyl- β -D-glucosaminidase activity in synovial fluid. *Rheumatol Rehabil* 1975; 14: 50-56.
- 18.** Thompson PW, Jones DD. Serum lactic dehydrogenase as a marker of joint damage in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 1987; 46: 263.
- 19.** Thompson PW, Houghton BJ, Clifford C, Jones DD, Witaker KB, Moss DW. The source and significance of raised serum enzymes in rheumatoid arthritis. *Quart J Med* 1990; 76: 869-79.
- 20.** Falkenbach A, Unkelbach U, Gottschalk R, Kaltwasser JP. β -Glucuronidase-konzentration un serum als potentieller indikator der krankheitsaktivität bai rheumatoider arthritis (RA) und systemischen lupus erythematodes (SLE). *Med Klin* 1991; 86: 465-68.
- 21.** Falkenbach A, Wigand R, Unkelbach U *et al.* Cyclosporin treatment in rheumatoid arthritis is associated with an increased serum activity of β -glucuronidase. *Scand J Rheumatol* 1993; 22: 83-85.
- 22.** Falkenbach A, Unkelbach U, Seiffert UB. Concentration of lysosomal enzymes and disease activity in ankylosing spondylitis. *Clin Lab* 1998; 44: 849-53.
- 23.** Widner B, Murr C, Wirleitner B *et al.* The importance of neopterin as a laboratory marker of immune activation. *Pteridines* 1999; 10: 101-11.
- 24.** Renkema GH, Boot RG, Strijland A *et al.* Synthesis, sorting, and processing into distinct isoforms of human macrophage chitotriosidase. *Eur J Biochem* 1997; 244: 279-85.
- 25.** Ungerer JPJ, Oosthuizen HM, Bissbort SH, Vermaak WJH. Serum adenosin deaminase: isoenzymes and diagnostic applications. *Clin Chem* 1992; 38: 1322-26.

26. Beneteau-Burnat B, Baudin B. Angiotensin-converting enzyme: clinical applications and laboratory investigations on serum and other biological fluids. *Crit Rev Clin Lab Sci* 1991; 28: 337-56.
27. Mccarty DA, Bernhagen J, Taylor M.J *et al.* Morphological evidence that activated polymorphs circulate in the peripheral blood of patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 1992; 51: 13-18.
28. Van de Stadt RJ, Van de Woorde-Vissers E, Feltkamp-Vroom TM. Metabolic and secretory properties of peripheral and synovial granulocytes in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1980; 23: 17-23.
29. Marinó I, Columbo M, Marone G. The releasability of lysosomal enzymes from neutrophil leukocytes in patients with rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol* 1996; 14: 387-94.
30. Addyman R, Beyeler C, Astbury C, Bird HA. Urinary D-glucuronic acid excretion in rheumatoid arthritis. Influence of disease activity and disease modifying drugs. *Ann Rheum Dis* 1996; 55: 478-81.
31. Isaksson A, Hultberg B. Immunoassay of β -hexosaminidase isoenzymes in serum in patients with raised total activities. *Clin Chim Acta* 1989; 183:155-62.
32. Pérez LF, Casal JA, Rojas P, Tutor JC. Relationship between plasma ammonia concentration and β -N-acetylhexosaminidase isoenzyme activities in liver cirrhosis. *Clin Chem Lab Med* 2000; 38 (12): 1237-41.
33. Schneider M, Pott G, Müller KM, Gerlach U. Activity of isoenzyme A of N-acetyl- β -glucosaminidase in fibrotic liver tissue. *Hepato-Gastroenterol* 1980; 27: 465-67.
34. Sing J, Chander J, Singh S, Singh G, Atal CK. γ -Glutamyl transpeptidase: a novel biochemical marker in inflammation. *Biochem Pharmacol* 1986; 35: 3753-60.
35. Brensilver HL, Kaplan MM. Significance of elevated liver alkaline phosphatase in serum. *Gastroenterol* 1975; 68: 1556-62
36. Johnson SM, Patel S, Bruckner FE, Collins DA. 5'-Nucleotidase as a marker of both general and local inflammation in rheumatoid arthritis patients. *Rheumatol* 1999; 38: 391-96.

VIII. Relación entre la concentración plasmática de amonio y la actividad isoenzimática de la β -N-acetilhexosaminidasa en la cirrosis hepática*

En las enfermedades hepáticas, la degeneración de las células parenquimatosas implica un incremento del número de lisosomas y de la actividad enzimática lisosomal (1). El incremento de actividad en suero/plasma de la β -N-acetilhexosaminidasa (Hex) en pacientes con cirrosis o colestasis hepática es un hecho bien documentado (2-5). Se ha sugerido que la Hex sérica, tanto en la cirrosis humana como en la inducida experimentalmente y en la colestasis, procede fundamentalmente de hepatocitos degenerados y también, de macrófagos activados e hipertrofiados (1, 6). El aumento de la actividad sérica de Hex es probablemente consecuencia de un incremento de su síntesis y/o de una disminución del aclaramiento plasmático de esta enzima que se realiza a través de receptores específicos (1, 3, 7, 8). Otras causas, como la alteración del flujo biliar y la activación de macrófagos / células de Kupffer podrían explicar también el aumento de actividad enzimática (2-6). Sin embargo, no se han encontrado correlaciones significativas entre las actividades en hígado y suero para la Hex (1).

Los resultados obtenidos por Hultberg y cols en cultivos de fibroblastos humanos (9), en una línea celular de hepatoma (10) y en modelos experimentales en ratas (11), han puesto de manifiesto que el amoníaco puede favorecer la secreción de Hex al medio extracelular. Consiguientemente estos autores especulan que el aumento de concentración plasmática de amonio en pacientes con enfermedades hepáticas podría contribuir a un incremento de la secreción y cesión de la enzima al plasma (9, 10). En este apartado se intentó verificar la hipótesis realizada por estos autores.

Material y métodos

Se estudiaron 35 pacientes (28 hombres y 7 mujeres) con una media de edad (\pm SD) de 55.3 ± 10.7 años (rango 30-73 años) y con diagnóstico de cirrosis hepática predominantemente de origen alcohólico (n= 30), que se confirmó por biopsia en 20 casos. Los 15 restantes, que no fueron biopsiados debido a la presencia de una

* Pérez LF, Casal JA, Rojas P, Tutor JC. Relationship between plasma ammonia concentration and β -N-acetylhexosaminidase isoenzyme activities in liver cirrhosis. *Clin Chem Lab Med* 2000; 38: 1237-41.

coagulopatía, fueron diagnosticados de cirrosis en base a la presencia de insuficiencia hepática, ascitis y/o hipertensión portal. En todos los casos, las muestras de sangre procedentes de pacientes alcohólicos se recogieron después de un período mínimo de abstinencia alcohólica de al menos 10 días. Embarazadas y pacientes con otro tipo de enfermedades malignas fueron excluidos. El grupo control lo formaron 114 individuos clínicamente sanos (88 hombres y 26 mujeres) con edades análogas a las del grupo de pacientes.

Las muestras de sangre fueron recogidas en tubos Vacutainer[®], con y sin EDTA para la separación de plasma y suero respectivamente. La actividad plasmática de la Hex total y de sus correspondientes isoenzimas Hex A y Hex B se hizo termodinámicamente utilizando el CPR-NAG como sustrato, realizando la caracterización termodinámica de la heterogeneidad enzimática de Hex en plasma en base a que la energía de activación de Hex B ($E_a \approx 75.1$ kJ/mol) es significativamente mayor que la de Hex A ($E_a \approx 41.8$ kJ/mol) (12, 13). La concentración plasmática de amonio se determinó mediante el método de azul de bromofenol en un analizador Kodak Ektachem 250 (Johnson and Johnson Clinical Diagnostics Inc; Rochester, USA), tomando particular cuidado tanto en la obtención como en el almacenamiento de las muestras (14). Las actividades en suero de la γ -glutamyltransferasa (GGT, EC 2.3.2.2), aspartato aminotransferasa (AST, EC 2.6.1.1), alanina aminotransferasa (ALT, EC 2.6.1.2), glutamato dehidrogenasa (GLDH, EC 1.4.1.3) y colinesterasa (CHE EC 3.1.1.8), así como las concentraciones de albúmina y bilirrubina fueron determinadas en un analizador Hitachi 717, usando reactivos de Roche Diagnostics (Basilea, Suiza). Los ácidos biliares totales en suero se determinaron mediante un método enzimático, utilizando reactivos de Diagnostica Merck (Darmstadt, Alemania), adaptado al analizador centrífugo Cobas Fara II (15).

Resultados y discusión

En 24 de los 35 pacientes estudiados la concentración plasmática de amonio fue mayor de 35 $\mu\text{mol/L}$, límite superior de referencia del método usado. La Tabla 1 muestra los resultados obtenidos para la actividad plasmática de Hex total y sus isoenzimas en el grupo de pacientes y el grupo de sujetos control, existiendo una diferencia significativa entre ambos ($p < 0.001$). La proporción relativa en porcentaje para la isoenzima Hex B no reveló una diferencia significativa entre ambos grupos, aunque en el grupo de pacientes

se encontró una correlación significativa del porcentaje de Hex B con la actividad total de Hex ($r= 0.498$, $p= 0.002$).

Tabla 1. Actividad plasmática de la β -N-acetilhexosaminidasa (Hex) y su composición isoenzimática en el grupo de pacientes con cirrosis hepática y en controles.

	Pacientes (n= 35)		Controles (n= 114)	
	Media \pm SEM	Mediana	Media \pm SEM	Mediana
Hex (U/L)	15.3 \pm 0.82*	13.8	7.9 \pm 0.15	7.8
Hex A (U/L)	10.6 \pm 0.50*	9.8	5.5 \pm 0.10	5.4
Hex B (U/L)	4.7 \pm 0.40*	4.0	2.4 \pm 0.06	2.3
Hex B (%)	29.9 \pm 1.17	28.5	30.3 \pm 0.28	30.0

Diferencias de significación con respecto al grupo control: * $p < 0.001$

La Tabla 2 muestra los coeficientes de correlación obtenidos para las diferentes variables bioquímicas estudiadas en el grupo de pacientes con enfermedad hepática. Se encontró una correlación altamente significativa entre la proporción en porcentaje de la isoenzima Hex B y la concentración de amonio plasmático (Figura 1). La correlación parcial manteniendo constante el resto de las variables bioquímicas de la concentración plasmática de amonio con la actividad de Hex B ($r= 0.658$, $p < 0.001$) y porcentaje de Hex B ($r= 0.501$, $p < 0.01$), fueron estadísticamente significativas. La correlación parcial entre la concentración de ácidos biliares en suero y el porcentaje de Hex B también resultó estadísticamente significativa ($r= 0.501$, $p < 0.05$).

Tabla 2. Correlación de la actividad en plasma de la β -N-acetilhexosaminidasa (Hex) y sus isoenzimas con diferentes marcadores bioquímicos de daño hepático en el grupo de pacientes cirróticos (n= 35).

	Amonio	Hex	Hex A	Hex B	Hex B (%)
Amonio	—	0.490**	0.265	0.709***	0.779***
AST	0.545***	0.585***	0.695***	0.663***	0.476**
ALT	0.417**	0.490**	0.483**	0.420**	0.436**
GGT	0.424**	0.585***	0.572***	0.548***	0.237
GLDH	0.399**	0.572***	0.475**	0.641***	0.577***
CHE	-0.405*	-0.394*	-0.374*	-0.455**	-0.264
Albúmina	-0.551**	-0.533***	-0.422**	-0.620***	-0.426**
Bilirrubina	0.604***	0.289	0.201	0.456**	0.452**
Ácidos biliares [#]	0.570**	0.712***	0.687***	0.775***	0.540**

Significación: *p< 0.05, **p< 0.01, ***p< 0.001; # n= 28

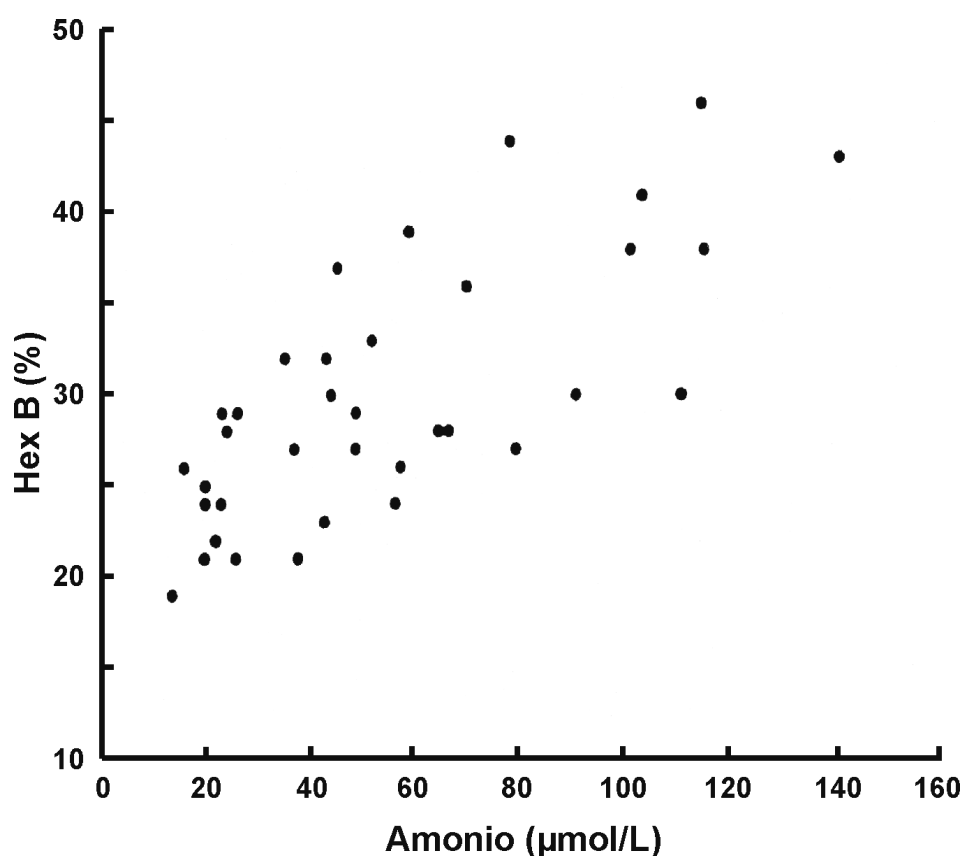


Figura 1. Correlación entre la concentración plasmática de amonio y la proporción en porcentaje de isoenzima Hex B (n= 35, r= 0.779, p< 0.001).

La adición de NH_4Cl (1.0 mmol/L) o bilirrubina (513 $\mu\text{mol/L}$) a un pool de plasmas no afectó significativamente a la energía de activación aparente ni a la actividad enzimática de la Hex (datos no presentados). La incubación a 37°C durante 48 horas de un pool de plasmas ajustado a un $\text{pH} \approx 7.3$ con ClH 1 mol/L en viales Eppendorff (Hamburgo, Alemania) cerrados y sin aire entre la muestra y la tapa para evitar pérdidas de CO_2 y un aumento del pH (16), reveló una gradual inactivación de la Hex (Figura 2). Aunque la variación de la energía de activación aparente fue despreciable durante las 7 primeras horas de incubación ($\text{CV} = 0.27\%$), después se observó un significativo incremento para esta variable termodinámica (Figura 2); sin embargo la actividad residual de las isoenzimas Hex A y Hex B nunca se diferenció más de un 20% durante el tiempo de incubación (Figura 3). Los resultados obtenidos para la composición isoenzimática de la Hex (porcentaje de isoenzima Hex B) en un pool de plasmas con pH ajustado, mediante la determinación de la energía de activación aparente enzimática y utilizando un método de inactivación térmica a 52°C (17) de la isoenzima Hex A, proporcionan resultados concordantes tanto antes (31.8% vs. 32.8%) como después de 24 horas de incubación a 37°C (40.0% vs. 40.1%).

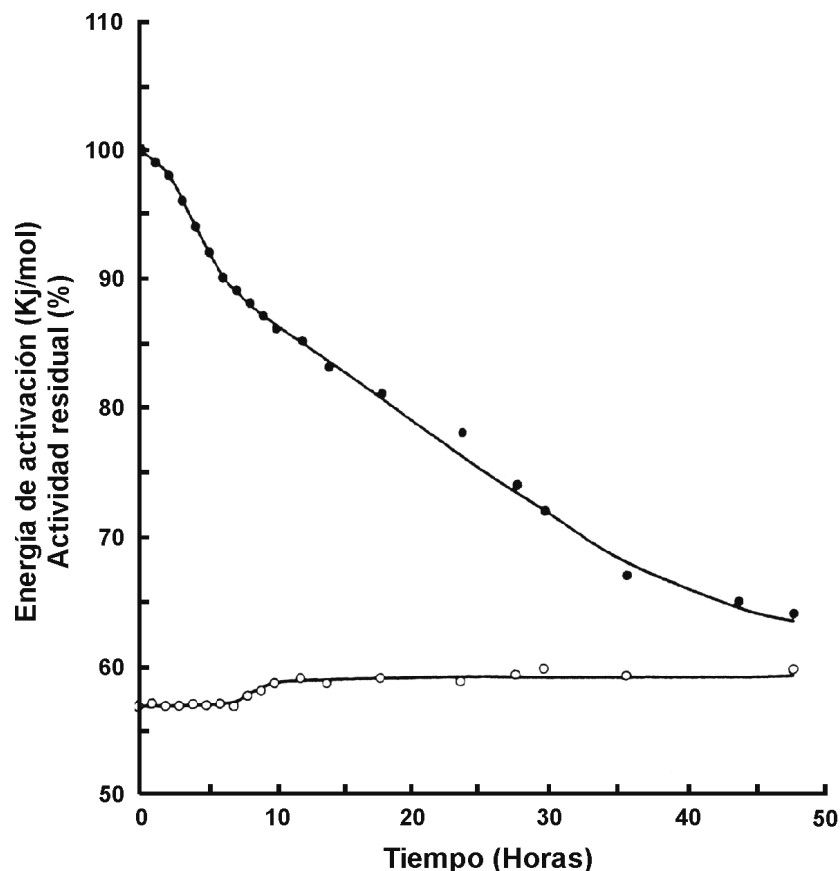


Figura 2. Efecto de la incubación a 37°C sobre la actividad enzimática (●) y la energía de activación aparente (○) de β -N-acetilhexosaminidasa total (Hex) en un pool de plasmas ajustado a $\text{pH} \approx 7.3$

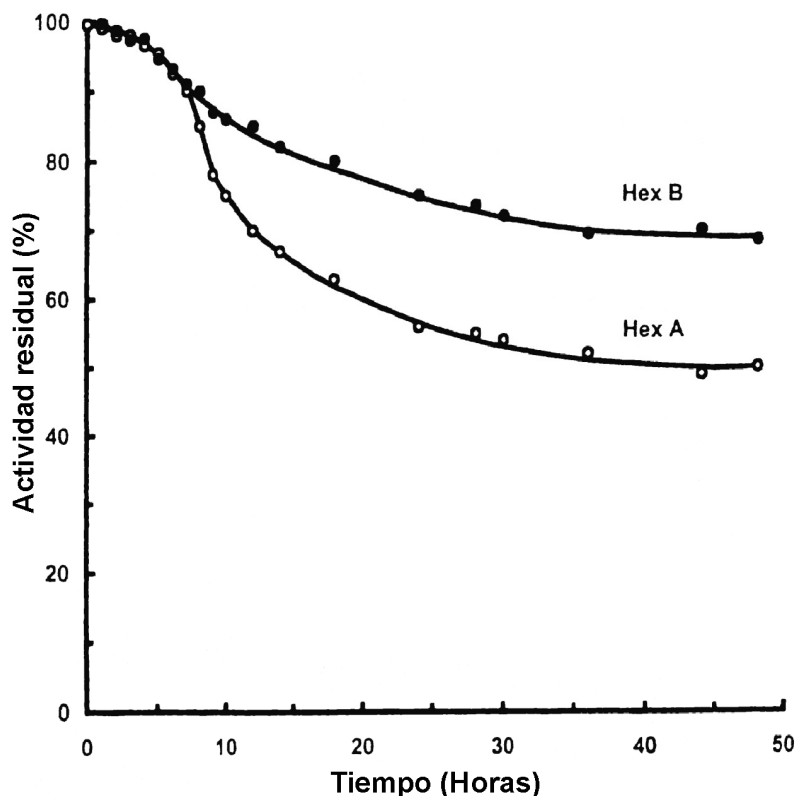


Figura 3. Efecto de la incubación a 37 °C sobre la actividad enzimática de las isoenzimas Hex A (○) y Hex B (●) en un pool de plasmas ajustado a pH \approx 7.3.

Las causas más frecuentemente asociadas a un aumento de actividad plasmática de Hex son enfermedad hepática, alcoholismo y embarazo (2, 3, 5). Este incremento de actividad enzimática es debido fundamentalmente a un incremento de la Hex P (3, 5), que básicamente sólo se diferencia de la isoenzima Hex B por presentar un mayor contenido en ácido siálico (18), con energías de activación aparente análogas para ambas formas enzimáticas (12).

En el grupo de pacientes estudiados, se encontró un aumento significativo para la actividad en plasma de las isoenzimas Hex A y Hex B (Tabla 1), sin embargo, el porcentaje de Hex B no mostró diferencias significativas con respecto al grupo control. Esto podría ser debido a la rápida desaparición que se produce en suero de la Hex B durante la abstinencia alcohólica (19, 20) y a la existencia de cirrosis en nuestros pacientes, donde la proporción de Hex A en plasma tiende a ser mayor que en otras enfermedades hepáticas (2, 3, 21).

Los resultados obtenidos por otros autores en la correlación de la actividad de la Hex en suero/plasma con los marcadores bioquímicos clásicos de daño hepatocelular o

colestasis en pacientes con enfermedad hepática o en animales de experimentación, no son del todo concordantes (4, 5, 8, 22). En el grupo de pacientes estudiado por nosotros se encontró una correlación positiva y estadísticamente significativa para Hex y sus isoenzimas Hex A y Hex B con los marcadores bioquímicos de daño hepatocelular (AST, ALT y GLDH) y colestasis (GGT, bilirrubina y ácidos biliares), y una correlación negativa con los marcadores de insuficiencia hepatocelular (albúmina y CHE) tal y como se muestra en la Tabla 2.

Los cationes NH_4^+ causan una inhibición en la maduración de los precursores de alta masa molecular de Hex, interfiriendo en su transporte hacia los lisosomas mediante receptores específicos de manosa-6-fosfato (9-11). Esto conduce a un incremento en la secreción de formas enzimáticas recientemente sintetizadas al medio extracelular. Aunque las concentraciones plasmáticas de amonio en las enfermedades hepáticas son mucho menores que las utilizadas por Hultberg y *cols* en sus modelos experimentales, estos autores sugieren que después de un largo período podría ser posible lograr concentraciones intracelulares de amonio lo suficientemente elevadas para favorecer una secreción aumentada de Hex hepática al plasma (9-11). Nuestros resultados parecen estar en la línea con esta hipótesis, pues en el grupo de pacientes cirróticos estudiados se encontró una relación significativa entre las concentraciones de amonio y las actividades de Hex B en plasma. La determinación de Hex en plasma evitaría un posible enmascaramiento de los resultados, como consecuencia de la liberación que se produce de enzima procedente de las plaquetas al suero durante el proceso de coagulación (17).

Los estudios realizados por Hultberg y *cols* en cultivos de fibroblastos (9) y células Hep G2 (10) revelaron que la adición de NH_4Cl al medio se tradujo en una aumentada liberación de Hex total. Paralelamente, la proporción de Hex B extracelular aumentó con el tiempo, debido a la rápida inactivación que se produce de la Hex A a 37 °C, y esto podría explicar el incremento de las isoformas de Hex B (particularmente Hex P) en el suero de pacientes con enfermedad hepática (9, 10). Sin embargo, se ha sugerido que la inactivación en el plasma no es aparentemente un mecanismo importante para la eliminación enzimática en el torrente circulatorio (23).

La inactivación térmica de enzimas está fuertemente influenciada por la concentración proteica del medio (24), y es importante considerar que esta concentración es mucho mayor en plasma humano que la utilizada en cultivos celulares. La estabilidad de Hex a 37 °C en muestras de suero está directamente relacionada con el pH, así a $\text{pH} \approx 6.0$ no se producen cambios significativos de la actividad enzimática en las primeras 24

horas, mientras que a $\text{pH} \approx 8.0$ existe una importante inactivación durante las 6 primeras horas de incubación (17). Como se ha visto en los resultados antes presentados, en un pool de plasmas ajustado a $\text{pH} \approx 7.3$ e incubado a $37\text{ }^\circ\text{C}$ se observó una inactivación gradual de la Hex (Figura 2). El incremento de la energía de activación aparente durante el envejecimiento de la Hex plasmática en estas condiciones de pH y temperatura, es debido a la mayor inactivación de la Hex A con el consecuente aumento de la proporción relativa de Hex B, como se muestra por los resultados obtenidos para la composición isoenzimática utilizando el método de inactivación térmica.

El descenso de actividad enzimática no puede ser explicado por la aparición de más o menos moléculas inactivas en el plasma, con mayor energía de activación y menor actividad catalítica específica. Nuestros resultados sugieren que la inactivación de Hex en plasma sucede de acuerdo con el principio de todo o nada, y normalmente las moléculas activas están presentes junto con moléculas completamente inactivas. Dado que estas moléculas inactivas no pueden contribuir a la hidrólisis del sustrato y al incremento temperatura-dependiente de la velocidad de reacción, las energías de activación de las isoenzimas Hex A y Hex B activas permanecen constantes. Así, en condiciones fisiológicas de pH y temperatura tras las primeras 7 horas de incubación, la isoenzima Hex A en las muestras de plasma se inactiva en mayor medida que la Hex B, aunque parece que la diferencia de estabilidad es menor que la descrita para las isoenzimas secretadas en cultivos celulares (9, 10).

Aunque los resultados encontrados no pueden ser totalmente extrapolados a pacientes humanos, la vida media de las formas plasmáticas de Hex humana tras ser infundidas en la circulación de ratones es de aproximadamente 2-4 horas (25). Por los resultados mostrados en la Figura 3 para la estabilidad de las isoenzimas de Hex en plasma, no parece que el incremento en proporción de Hex B en enfermedades hepáticas se deba únicamente a la inactivación de Hex A a nivel circulatorio. En cultivos celulares las subunidades α y β son sintetizadas aproximadamente en cantidades similares, aunque, estas dimerizan a diferente velocidad, posiblemente debido a paso velocidad limitante en la asociación de las subunidades α (26). En los pacientes con enfermedad hepática, las subunidades β recientemente sintetizadas podrían dimerizarse más rápidamente para formar Hex B, cuya secreción al plasma podría verse incrementada por la acción del amonio. La correlación encontrada entre la concentración plasmática de amonio y la proporción de Hex B apunta en esta dirección.

En cualquier caso, el mecanismo por el cual se producen incrementos de las isoenzimas de Hex en plasma en las enfermedades hepáticas es multifactorial. De hecho, se encontró una correlación parcial significativa entre la proporción de Hex B y la concentración de ácidos biliares, que según Hultberg y *cols* no afectarían a la secreción de Hex al medio extracelular (10). En la enfermedad hepática el deterioro de la síntesis de urea conduce a un aumento en la concentración plasmática de amonio, especialmente en la cirrosis, con una derivación de este hacia la sangre venosa portal y una pérdida de masa funcional hepática (27). Sin embargo, en pacientes cirróticos la proporción de Hex A en hígado (21) y suero (2, 3, 21) puede ser mayor que en pacientes no cirróticos, posiblemente debido a una reacción mesenquimatosas (21, 27). Estos aspectos deben ser estudiados en un amplio grupo de pacientes cuya enfermedad hepática sea caracterizada por criterios clínicos, bioquímicos y anatomopatológicos.

Bibliografía

1. Elsafi ME; Hultberg B, Isaksson A, Hägerstrand I, Prytz H, Stenram U. Lysosomes and human liver disease: a biochemical and immunohistochemical study of β -hexosaminidase. *Eur J Clin Chem Invest* 1994; 32: 669-73.
2. Isaksson A, Hultberg B. Immunoassay of β -hexosaminidase isoenzymes in serum in patients with raised total activities. *Clin Chim Acta* 1989; 183: 155-62.
3. Hultberg B, Isaksson A, Jansson L. β -Hexosaminidase in serum from patients with cirrosis and cholestasis. *Enzyme* 1981; 26: 296-300.
4. Hultberg B, Palsson B, Isaksson A, Masson P. β -Hexosaminidase in bile and plasma from patients with cholestasis. *Liver* 1995; 15: 153-58.
5. Hultberg B, Isaksson A. Isoenzyme pattern of serum β -hexosaminidase in liver disease, alcohol intoxication and pregnancy. *Enzyme* 1983 30: 166-71.
6. Elsafi M, Hultberg B, Hägerstrand I, Isaksson A, Stenram U. Immunohistochemical demonstration of β -hexosaminidase in cirrhotic and cholestatic human livers with a monoclonal antibody. *Liver* 1991; 11: 350-54.
7. Scapa E, Thomas P, Lowestein MS, Zamcheck N. serum β -N-acetylhexosaminidase as a discriminant between malignant and benign extrahepatic biliary obstruction: Comparison with carcinoembryonic antigen. *Eur J Cancer Clin Oncol* 1985; 21: 1037-42.
8. Severini G, Aliberti M, Koch M, Capurso L, Tarquini M. Clinical evaluation of serum N-acetyl- β -D-glucosaminidase as a liver function test. *Biochem Med Metab Biol* 1990; 44: 247-51.
9. Hultberg B, Isaksson A, Nordström M, Kjellström T. Release of β -hexosaminidase isoenzymes in cultured human fibroblasts. *Clin Chim Acta* 1993; 216: 73-79.
10. Hultberg B, Floren CH, Isaksson A, Jensen E. Liver disease and serum hexosaminidase levels. Studies in a human hepatoma cell-line (HepG2 cells). *Liver* 1995; 15: 99-103.
11. Hultberg B, Isaksson A, Bruge M. The effect of porta-caval shunt, ammonia infusion and alcohol administration on rat plasma β -hexosaminidase. *Liver* 1988; 8: 129-31.
12. Pérez LF, Tutor JC. Assay of β -N-acetylhexosaminidase isoenzymes in different biological specimens by the determination of their activation energies. *Clin Chem* 1998; 44: 226-31.

13. Pérez LF, Ribeiro H, Casal JA, Pinto RA, Sá Miranda MC, Tutor JC. Thermodynamic characterisation of the mutated isoenzyme A of β -N-acetylhexosaminidase in GM2-gangliosidosis B1 variant. *Clin Chim Acta* 1999; 285: 45-51.
14. Jacobs DS. Editor. Laboratory test handbook. 3rd ed. Hudson: *Lexi-Comp Inc*, 1994: 120-22.
15. Hanson NQ, Freier EG. Enzymatic measurement of total bile acids adapted to the Cobas Fara centrifugal analyzer. *Clin Chem* 1989; 35: 1538-39.
16. Demetriou JA, Drewes PA, Gin JB. Enzymes. In: Clinical chemistry. Principles and technics. Henry RJ, Winkelman JW. Editors. 2nd ed. *Hagerstown Harper and Row Publishers*, 1974: 815-1001.
17. Pérez LF, Tutor JC. Assay of serum/plasma β -N-acetylhexosaminidase by heat inactivation using a continuous spectrophotometric method adapted to a centrifugal analyzer. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1997; 6: 445-52.
18. Isaksson A, Hultberg B. Serum β -hexosaminidase isoenzymes are precursor forms. *Scand J Clin Lab Invest* 1995; 55: 433-40.
19. Hultberg B, Isaksson A, Berglund M, Moberg AL. Serum β -hexosaminidase isoenzyme: a sensitive marker for alcohol abuse. *Alcohol Clin Exp Res* 1991; 15: 549-52.
20. Hultberg B, Isaksson A, Berglund M, Alling C. Increases and time-course variations in β -hexosaminidase isoenzyme B and carbohydrate-deficient transferrin in serum from alcoholics are similar. *Alcohol Clin Exp Res* 1995; 19: 1995.
21. Pott G, Chi-Boesler D, Gerlach U. Isoenzymes of N-acetyl- β -glucosaminidase from human liver and serum: separation by electrophoresis in thin layers of polyacrylamide gel. *J Clin Chem Clin Biochem* 1978; 16: 15-18.
22. Antoniello S, Auletta M, Cerini R, Cacciatore F, Magri P. β -Hexosaminidase activity in the acute phase of CCl₄ poisoning in the rat. *Enzyme* 1990; 43: 151-54.
23. Kristensen SR, Hørder M. Principles of diagnostic enzymology. In: Moss DW, Rosalky SB, editors. Enzyme tests in diagnosis. London: *Arnold*, 1996: 7-24.
24. Wagenknecht C, Papias B. Kinetic methods for determination of isoenzyme activities. In: Multiple forms of enzymes. Scheuch D, Haschen RJ, Hofmann E, editors. Basel: *S. Karger*, 1982: 31-42.
25. Isaksson A, Hultberg B, Jonung T. Rat plasma clearance rate and organ distribution of β -hexosaminidase isoenzymes from human serum. *Clin Chem* 1992; 38: 1893-98.

- 26.** Neufeld EF. Natural history and inherited disorders of a lysosomal enzyme β -hexosaminidase. *J Biol Chem* 1989; 264: 10927-30.
- 27.** Huizenga JR, De Bruijn KM, Gips CH. Can a simple fasting arterial ammonia predict the presence of cirrhosis? In: Soeters PB, Wilson JHP, Meijer AJ, Holm E, editors. *Advances in ammonia metabolism and hepatic encephalopathy*. Amsterdam: *Elsevier Science Publishers*, 1988: 593-600.
- 28.** Schneider M, Pott G, Müller KM, Gerlach U. Activity of isoenzyme A of N-acetyl- β -glucosaminidase in fibrotic liver tissue. *Hepato-Gastroenterol* 1980; 27: 465-67.

IX. Caracterización termodinámica de la composición isoenzimática de la β -N-acetilhexosaminidasa en plasma seminal*

Aunque ya en 1986 Kapur y Gupta caracterizaron las isoenzimas Hex A y Hex B en plasma seminal humano (1), en trabajos posteriores sólo se prestó atención a la actividad enzimática total (2-5), habiéndose sugerido su utilización como un posible marcador bioquímico de azoospermia (4).

En el presente apartado, se presentan los resultados del estudio termodinámico de la heterogeneidad enzimática de la Hex utilizando la energía de activación aparente de la enzima en plasmas seminales de individuos normozoospermicos, oligozoospermicos, azoospermicos y vasectomizados.

Material y métodos

Las muestras de semen se obtuvieron por masturbación, después de un período de 4 días de abstinencia sexual, de 86 hombres con una media (\pm SEM) de edad de 34.86 ± 0.68 años (rango de 20.0-50.0 años). El recuento de espermatozoides, así como el estudio de su motilidad y vitalidad, se hizo tras la licuefacción del semen y dentro de la primera hora después de la eyaculación, de acuerdo con los métodos estandarizados propuestos por la O.M.S. (6). Una alícuota de los eyaculados se centrifugó a 800g durante 10 minutos y el sobrenadante obtenido libre de espermatozoides se congeló a -37 °C hasta el momento de ser procesada para determinar la actividad de la Hex. De acuerdo con los criterios de la O.M.S. se consideraron normozoospermicos los eyaculados que presentaron más de 20 millones de espermatozoides/mL de eyaculado y oligozoospermicos los eyaculados presentando menos 20 millones de espermatozoides/ mL.

La determinación de la Hex y el cálculo de su energía de activación aparente en las muestras de plasma seminal se hicieron como se ha descrito previamente (7). El posible efecto inhibitor de la albúmina sobre la actividad enzimática de la Hex (8) no fue considerado teniendo en cuenta la baja concentración de albúmina que

*Casal JA, Vizcaino L, Garcia-Devesa J, Tutor JC. Thermodynamic study of β -N-acetylhexosaminidase enzyme heterogeneity in human seminal plasma. *Clin Chim Acta* 2005; 355: 55-60.

presenta este tipo de muestras biológicas (0.68 ± 0.03 g/dL). La inactivación térmica de la isoenzima Hex A se realizó como se ha descrito previamente (8) para muestras de plasma sanguíneo. Las muestras de plasma seminal se ajustaron a un $\text{pH} \approx 5.8$ con ácido acético siendo incubadas posteriormente a 52°C en tubos Eppendorf[®] herméticamente cerrados y sin cámara de aire en su interior para evitar la pérdida de CO_2 y el consiguiente aumento de pH (9).

Resultados y discusión

El tratamiento térmico a 52°C de un pool de plasmas seminales, condujo a una inactivación gradual de la Hex, con estabilización de la actividad residual a las 9 horas de incubación (Figura 1), que correspondería a la isoenzima Hex B termoestable (8). La energía de activación aparente de la Hex aumentó con el tiempo de calentamiento hasta alcanzar un valor de aproximadamente de 72 kJ/mol para tiempos de incubación mayores de 8 horas como se indica en la Figura 1.

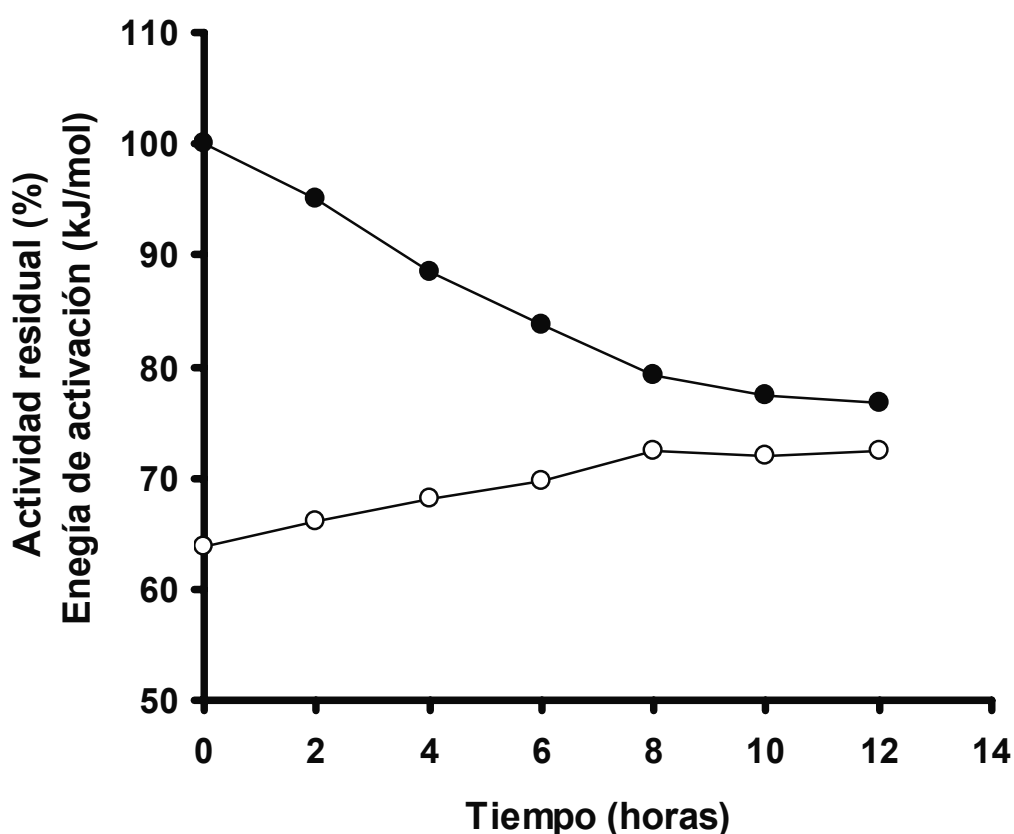


Figura 1. Actividad residual de la Hex total (●) y energía de activación aparente (○) en un pool de plasmas seminales ajustados a $\text{pH} \approx 5.8$ e incubados a 52°C .

En 11 plasmas seminales (9 nativos y dos previamente termoinactivados), se determinó la proporción relativa de isoenzima Hex B por inactivación térmica a 52 °C durante 9 horas y la energía de activación aparente de la Hex. En la Figura 2 se indica la relación existente entre ambas variables, permitiendo la determinación de la composición isoenzimática de la Hex en plasma seminal a partir de la energía de activación enzimática aparente. Asignando a la proporción relativa de Hex B los valores límite de 0% y 100%, se calcularon unas energías de activación de 41.5 kJ/mol para Hex A y 72.3 kJ/mol para Hex B.

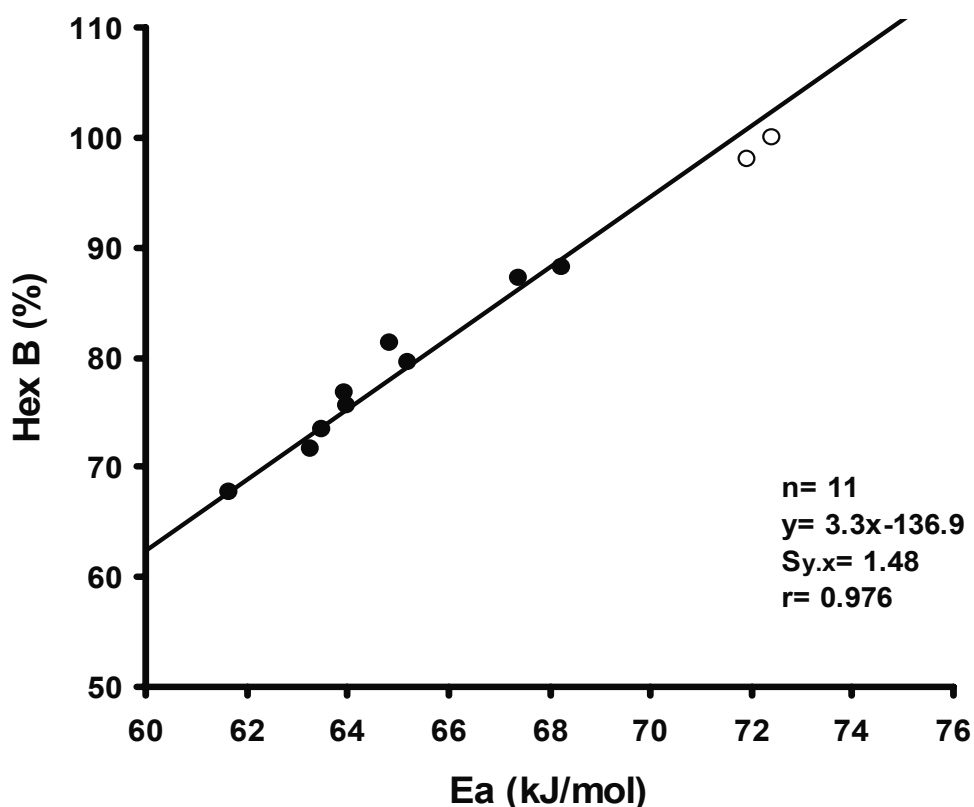


Figura 2. Correlación y regresión entre la energía de activación aparente de la Hex total y la proporción relativa de la isoenzima Hex B en plasmas seminales nativos (●) e inactivados térmicamente (○).

El total de 86 plasmas seminales estudiados se distribuyeron en cuatro grupos: normozoospermicos (n= 38), oligozoospermicos (n= 17), azoospermicos (n= 9) y vasectomizados (n= 22). En la Tabla 1 se indican los resultados para la actividad total de la Hex y sus isoenzimas en los distintos grupos estudiados. El grupo de plasmas

normozoospermicos presentó una actividad de Hex A significativamente mayor ($p < 0.05$) y proporción de Hex B significativamente menor ($p < 0.05$) que el grupo de plasmas azoospermicos; sin embargo, no presentó diferencias con respecto al grupo de plasmas oligozoospermicos. El grupo de plasmas azoospermicos presentó actividades significativamente mayores de Hex total, Hex A y Hex B ($p < 0.05$) que el grupo de vasectomizados. Los grupos de normozoospermicos y oligozoospermicos presentaron actividades significativamente más elevadas para Hex total, Hex A y Hex B ($p < 0.001$) y proporciones significativamente más bajas de la Hex B ($p < 0.05$) que el grupo de vasectomizados. En la Figura 3 se indica la distribución de las actividades de la Hex total, Hex A y Hex B en los distintos grupos de plasmas seminales estudiados. El menor solapamiento entre los grupos de normozoospermicos y azoospermicos se obtuvo para la actividad de la isoenzima Hex A, aunque no parece tener un valor diagnóstico adecuado. La consideración de las actividades enzimáticas específicas (U/g proteína) de la Hex y sus isoenzimas no aportó datos de interés adicional.

Tabla 1. Actividad de la Hex total, Hex A y Hex B en plasmas seminales.

	Normozoospermicos (n= 38)	Oligozoospermicos (n= 17)	Azoospermicos (n= 9)	Vasectomizados (n= 22)
Hex Total (U/L)	1591.2 ± 103.2 (1515.0)	1440.2 ± 104.4 (1452.5)	1329.9 ± 114.3 (1197.7)	973.2 ± 63.9 (995.6)
Hex A (U/L)	419.3 ± 37.5 (386.2)	359.6 ± 29.9 (366.2)	276.3 ± 30.0 (287.7)	202.2 ± 20.9 (199.9)
Hex B (U/L)	1171.9 ± 71.2 (1155.0)	1080.6 ± 83.5 (1054.5)	1053.6 ± 94.1 (959.0)	771.1 ± 48.1 (770.5)
Hex B (%)	74.2 ± 1.0 (74.2)	74.8 ± 1.3 (74.2)	79.2 ± 1.7 (78.1)	79.7 ± 1.37 (79.8)

En los 55 plasmas seminales de los grupos de normozoospermicos y oligozoospermicos se encontraron correlaciones simples significativas de las actividades de la Hex y sus enzimas con los contajes de espermatozoides (Tabla 2).

Tabla 2. Coeficientes de correlación de la Hex total, Hex A y Hex B con el número de espermatozoides en plasma seminal de normozoospermicos y oligozoospermicos.

	Total	Vivos	Muertos	Móviles	Inmóviles
Hex Total	0.410**	0.377**	0.494**	0.328**	0.487**
Hex A	0.359**	0.329*	0.447**	0.296*	0.443**
Hex B	0.385**	0.351**	0.468**	0.304*	0.460**

Significación: ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$.

Sin embargo, debido a la alta correlación existente entre los recuentos de espermatozoides vivos y muertos ($r = 0.902$, $p < 0.001$) y móviles e inmóviles ($r = 0.908$, $p < 0.001$), se realizó el correspondiente estudio de correlación parcial. Se alcanzó la significación estadística en la correlación parcial de espermatozoides inmóviles, manteniendo móviles constante, con Hex total ($r = 0.500$, $p < 0.001$), Hex A ($r = 0.447$, $p < 0.01$) y Hex B ($r = 0.476$, $p < 0.01$). Asimismo, se encontró una correlación parcial significativa de espermatozoides muertos, manteniendo vivos constante, con Hex total ($r = 0.339$, $p < 0.05$) y Hex B ($r = 0.356$, $p < 0.05$); sin embargo Hex A presentó una correlación parcial significativa con espermatozoides vivos, manteniendo muertos constante, ($r = 0.280$, $p < 0.05$).

La inactivación térmica de la Hex en plasma seminal en las condiciones experimentales utilizadas sigue una secuencia análoga a la descrita para las muestras de plasma sanguíneo (7), con estabilización de la actividad residual (correspondiente a la isoenzima Hex B) y de la energía de activación enzimática aparente para tiempos incubación iguales o mayores de 8 horas (Figura 1). Sin embargo, al presentar los plasmas seminales una proporción relativa de Hex B significativamente mayor, también son mayores las actividades residuales para los distintos tiempos de incubación.

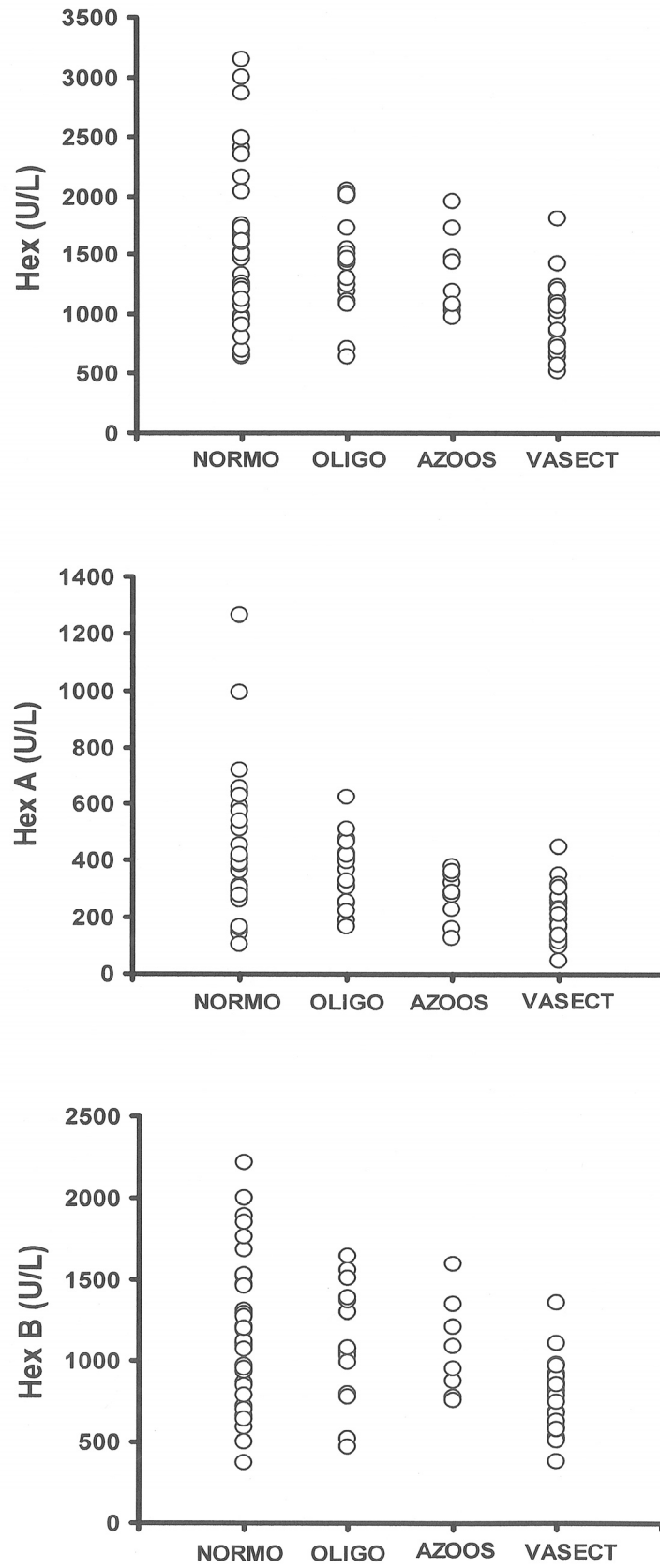


Figura 3. Distribución de la actividad de la Hex total, y sus isoenzimas Hex A y Hex B en el grupo de plasmas seminales estudiados.

La energía de activación calculada para la Hex A (41.5 kJ/mol) es similar a la previamente descrita para esta isoenzima en muestras de plasma (41.8 kJ/mol) (7). Por su parte la isoenzima Hex B en plasma seminal presentó una energía de activación (72.3 kJ/mol) ligeramente menor que la encontrada en plasma (75.1 kJ/mol). En cualquier caso, la significativa diferencia entre las energías de activación de ambas isoenzimas, permite la determinación simple y precisa de la heterogeneidad enzimática de las Hex en muestras de plasma seminal.

De acuerdo con resultados previos obtenidos para la Hex total (4), el grupo de azoospermicos presentó actividades de Hex total, Hex A y Hex B significativamente mayores que el grupo de vasetomizados ($p < 0.05$). Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre las actividades de la Hex total y Hex B en los grupos de normozoospermicos y azoospermicos (Tabla 1). Por tanto no se ha podido confirmar la sugerencia de Dandekar y Harkumar (4) de que la Hex total podría ser utilizada como un marcador bioquímico de azoospermia, siendo nuestros resultados más concordantes con los de otros autores (3). La actividad de Hex A es significativamente mayor en el grupo de normozoospermicos que en el de azoospermicos ($p < 0.05$), pero como se indica en la Figura 3 existe un amplio solapamiento entre las actividades enzimáticas de ambos grupos. El estudio de Ben Ayed y cols (3) sugiere que la Hex en plasma seminal tiene un origen principalmente prostático y epididimal. Desgraciadamente, en los casos de azoospermia estudiados, no se pudo conocer el diagnóstico diferencial de obstrucción epididimal o insuficiencia espermatogénica, condiciones clínicas en las cuales un estudio comparativo de la actividad enzimática de la Hex podría ser interesante.

Parece evidente que la Hex, no solamente es transportada en forma soluble en el interior del acrosoma del espermatozoide, sino que podría estar formando parte como una proteína integral de la membrana del mismo (10) y aunque quizás alguna actividad enzimática débilmente unida puede ser liberada durante la centrifugación (10). Los resultados de Kawakawi y cols (11) no demostraron la liberación de actividad de Hex de acrosomas intactos de espermatozoides de perro. Sin embargo, nosotros encontramos una correlación parcial significativa de las actividades de la Hex total, Hex A y Hex B con el recuento de espermatozoides inmóviles ($p < 0.01$) y de la Hex total y de la Hex B con el recuento de espermatozoides muertos ($p < 0.05$). Aunque la actividad de Hex de origen acrosomal en el plasma seminal parece cuantitativamente poco importante, los resultados antes señalados son llamativos

teniendo en cuenta que en el esperma de ratón solo se ha podido caracterizar el isoenzima Hex B (12).

A modo de conclusión puede señalarse que la actividad de la Hex total o incluso de sus isoenzimas Hex A y Hex B, no parece ser un marcador bioquímico adecuado de azoospermia. Se ha señalado que algunas enzimas de origen espermático son particularmente termolábiles (12, 13), lo cual podría estar relacionado con las bajas temperaturas requeridas para la espermatogénesis (12). Este hecho podría dificultar la utilización de métodos de inactivación térmica en la determinación de las isoenzimas de las Hex en espermatozoides y el procedimiento termodinámico descrito constituye una alternativa válida para el estudio de la heterogeneidad enzimática de la Hex en espermatozoides, a la que aun no se le ha dedicado suficiente atención.

Bibliografía

1. Kapur DK, Gupta GS. Purification, biochemical properties and active sites of N-acetyl- β -D-hexosaminidases from human seminal plasma. *Biochem J* 1986; 15: 133-39.
2. Ben Ayed S, Gonzales J, Foglietti MJ, Percheron F, Bernard M. On some glycosidases (β -D-mannosidase, α -L-fucosidase, N-acetyl- β -D-glucosaminidase) of human seminal plasma. *Andrología* 1989; 21: 432-26.
3. Dandekar SP, Harikumar P. Seminal profiles of lysosomal enzymes in normal and infertile men. *J Postgrad Med* 1997; 43: 33-37.
4. Corrales JJ, Burgo RM, Miralles JM, Villar E. Abnormalities in sperm acid glycosidases from infertile men with idiopathic oligoasthenoteratozoospermia. *Fertility Sterility* 2000; 73: 470-78.
5. Corrales JJ, Burgo RM, Galindo P, Muñoz-Barroso I, Miralles JM, Villar E. Abnormal expression of acid glycosidases in seminal plasma and spermatozoa from infertile men with varicocele. *Reproduction* 2002; 123: 411-17.
6. WHO Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Sperm-Cervical Mucus Interaction. Fourth Edition. Cambridge: *Cambridge University Press*, 1999.
7. Pérez LF, Tutor JC. Assay of β -N-acetylhexosaminidase isoenzymes in different biological specimens by means of the determination of their activation energies. *Clin Chem* 1998; 44: 226-31.
8. Pérez LF, Tutor JC. Assay of serum/plasma β -N-acetylhexosaminidase isoenzymes by heat inactivation using a continuous spectrophotometric method adapted to a centrifugal analyzer. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1997; 35: 445-52.
9. Demetriou JA, Drewes PA, Gin JB. Enzymes In: Henry JB, Winkelman JW, editors, Clinical Chemistry. Principles and Techniques. 2nd Edition. *Hagerstown: Harper and Row Publishers*, 1974, pp. 815-1001.
10. Hutchinson T, Dwivedi K, Rastogi A, Prasad R, Pereira BMJ. N-acetyl- β -D-glucosaminidase is not attached to human sperm membranes through the glycosylphosphatidyl inositol (GPI)-anchor. *Asian J Androl* 2002; 4: 27-33.
11. Kawakami E, Arai T, Oishi I. Changes in hyaluronidase, acrosin, and N-acetylhexosaminidase activities of dog sperm after incubation. *J Vet Med Sci* 1999; 61: 183-84.

- 12.** Miller DJ, Gong X, Shur BD. Sperm require β -N-acetylglucosaminidase to penetrate through the egg zone pellucida. *Development* 1993; 118: 1279-89.
- 13.** Shur BD, Neely CA. Plasma membrane association, purification and partial characterization of mouse sperm β -1,4-galactosyltransferase. *J Biol Chem* 1988; 263: 17706-14.

X. Estudio comparativo de la β -N-acetilhexosaminidasa urinaria con otros marcadores de daño renal en la poliquistosis renal autosómica dominante*

La poliquistosis renal autosómica dominante (PRAD), es la más común de las enfermedades hereditarias monogénicas y afecta a 1 de 400 - 1000 recién nacidos (1). Las manifestaciones renales son el rasgo más destacado, representando el 5% de los casos de insuficiencia renal grave en la población mundial; sin embargo la PRAD, es un desorden sistémico que afecta también a otros órganos (2, 3). La progresión de la insuficiencia renal es variable (3) y el fracaso renal se produce aproximadamente en el 50% de las personas afectadas (4). Los factores pronósticos negativos de insuficiencia renal grave son, sexo masculino, comienzo de hipertensión en estadios tempranos, aumento del tamaño renal, así como un incremento en la excreción urinaria de albúmina (3).

En los primeros estudios electroforéticos realizados en muestras de orina de pacientes con poliquistosis renal (PR), se indicó que en la fase inicial de la enfermedad, con filtración glomerular (FG) conservada, la proteinuria sería cuanti y cualitativamente normal, o de tipo glomerular altamente selectivo (5). Una vez que el deterioro de la función renal ha comenzado, la proteinuria podría ser glomerular, y sólo en fases más avanzadas de insuficiencia renal sería de tipo mixto, glomerular y tubular (5). El incremento de albúmina en orina, sin aumento de proteínas de bajo peso molecular, se considerará un marcador precoz de daño glomerular (6), y en los pacientes con PRAD la microalbuminuria es más frecuente que la proteinuria (3). La microalbuminuria en estos pacientes puede estar asociada con aumento de la tensión arterial (7-9), progresión a insuficiencia renal (8), así como una mayor formación de quistes (7); sin embargo, en pacientes con PRAD normotensos, la microalbuminuria presentaría asimismo una aumentada prevalencia (10).

La excreción urinaria aumentada de Hex, indica una liberación directa de material procedente del túbulo proximal (6, 11). Swedenborg y cols (12), encontraron un aumento de la actividad urinaria de la Hex en pacientes con PR, que estaría relacionada con los cambios de creatinina sérica producidos durante el período de un año. Este es un dato

*Casal JA, Hermida J, Lens XM, Tutor JC. A comparative study of three kidney biomarker tests in autosomal-dominant polycystic kidney disease. *Kidney Int* 2005; 68: 948-54.

interesante ya que, teniendo en cuenta las alteraciones renales, tanto estructurales como funcionales, encontradas en ratas con PR inducida por difeniltiazol, se ha sugerido que el deterioro de la función renal en las formas clínicas de PR podría ser debido primariamente a alteraciones en el túbulo en lugar de alteraciones glomerulares o vasculares (13).

El objetivo fue hacer un estudio comparativo en pacientes con PRAD de tres marcadores bioquímicos precoces de daño renal como la albúmina, y la actividad total de la Hex y sus isoenzimas en orina, así como la glutatión peroxidasa sérica (GPx EC 1.11.1.9) que ha sido considerada un marcador de la función del túbulo proximal (14). Asimismo, la GPx es un importante enzima antioxidante y distintas observaciones sugieren que la severidad de la PR puede estar modulada por el stres-oxidativo (15). Paralelamente también fueron determinados otros marcadores de disfunción renal como la cistatina C, creatinina y urea en suero.

Material y métodos

Se estudiaron un total de 92 pacientes con PRAD (42 hombres y 50 mujeres) con una edad media (\pm DEM) de 42.3 ± 1.5 años (rango 14 - 83 años), cuyo diagnóstico se realizó en base a su historia familiar, hallazgos ecográficos típicos, y test genéticos. Treinta y cinco pacientes eran normotensos y 57 con hipertensión arterial, siendo tratados con fármacos antihipertensivos, preferentemente inhibidores de la enzima angiotensina-convertina (ECA) y antagonistas del receptor II de la angiotensina. De acuerdo con la excreción urinaria de albúmina y concentración sérica de cistatina C, los pacientes se clasificaron en los siguientes grupos: I) normoalbuminuria; II) microalbuminuria; III) macroalbuminuria; IV) insuficiencia renal (cistatina C >1.3 mg/L). Asimismo, en función de los hallazgos ecográficos se clasificaron en tres grupos: I) con menos de 10 quistes en cada riñón (índice ecográfico 1); II) con ligero aumento del tamaño de los riñones y más de 10 quistes en cada uno (índice ecográfico 2); III) con marcado aumento del tamaño de los riñones y elevado número de quistes (índice ecográfico 3). En 42 de estos pacientes (7 de ellos con insuficiencia renal y 35 sin ella), con una edad media de 37.0 ± 2.5 años (rango 22-49 años) y que acudieron a revisión clínica, se realizó una segunda determinación al cabo de un año de la excreción urinaria de Hex y albúmina, así como las concentraciones séricas de cistatina C, creatinina y urea. Las variaciones relativas producidas para estos parámetros bioquímicos durante este período de tiempo se calcularon mediante la expresión: Cambio relativo (%) = $100 (V_2 - V_1) / V_1$; donde V_1 es el primer valor y V_2 el

segundo. Como grupo control se estudiaron 54 individuos clínicamente sanos, con análoga distribución por edad y sexo a la de los pacientes. Las muestras de sangre se tomaron por la mañana en ayunas y las muestras de orina utilizadas correspondieron a la segunda micción del día, recogidas de acuerdo con las recomendaciones de Itoh y cols (16) para evitar falsos resultados para la Hex como consecuencia de la contaminación con enzima de origen genital. En todos los casos las orinas presentaron un $\text{pH} < 8$.

El método termodinámico empleado para determinar la actividad enzimática de la Hex así como la evaluación de sus correspondientes isoenzimas (Hex A y Hex B) se ha descrito previamente (17) y los resultados se expresaron en U/g creatinina. La albúmina urinaria se determinó por nefelometría utilizando reactivos comercializados por Dade Behring (Liederbach, Alemania). Los resultados se expresaron como cociente entre las concentraciones de albúmina y creatinina en orina (RAC) y las unidades empleadas fueron mg/g creatinina. De acuerdo con las recomendaciones de la American Diabetes Association (18), la normoalbuminuria se definió como un valor menor de 30 mg/g creatinina, microalbuminuria de 30–300 mg/g creatinina y macroalbuminuria mayor de 300 mg/g creatinina. La GPx (masa) sérica se determinó utilizando un anticuerpo policlonal específico para la forma enzimática plasmática extracelular humana (GPx3), usando el inmunoanálisis Bioxytech pl.GPx-EIA comercializado por Oxis International Inc. (Portland, USA). La cistatina C sérica fue determinada por inmunoturbidimetría (Dako Cytomation, Glostrup, Dinamarca). La determinación de creatinina y urea se realizó con procedimientos estandarizados en un Advia 1650 analyzer (Bayer Corp., Tarrytown, USA).

Resultados y discusión

Los resultados obtenidos para las diferentes variables estudiadas en el grupo de pacientes con PRAD y en el grupo control se muestran en la Tabla 1. La dicotomía de los pacientes en función del sexo no ofreció información de interés adicional. En el caso de la GPx sérica, no se encontró una diferencia estadísticamente significativa entre los distintos grupos. Los rangos de referencia calculados para la excreción urinaria de Hex en el grupo control fueron: 1.0 - 4.4 U/g creatinina para Hex total (distribución log-normal), 0.9 – 3.4 U/g creatinina para Hex A (distribución log-normal), 0.0-1.3 U/g creatinina para Hex B (distribución no gaussiana) y 0 – 33% para la proporción relativa de Hex B (distribución no gaussiana). El grupo de pacientes con normoalbuminuria presentó valores significativamente mayores para la excreción de Hex B ($p < 0.05$) y la proporción relativa en

porcentaje de esta isoenzima ($p < 0.01$) que el grupo control. En 5 casos (12%) la excreción urinaria de la Hex B y en 18 casos (43%) la proporción relativa de Hex B fue mayor que el correspondiente límite superior de referencia.

Tabla 1. Niveles de las diferentes variables estudiadas en el grupo control y en los grupos de pacientes con ADPKD

	PACIENTES				
	Controles (n= 54)	Normoalbuminuria (n= 42)	Microalbuminuria (n= 20)	Macroalbuminuria (n= 2)	Insuficiencia renal (n= 28)
Hex Total (U/g)	2.27 ± 0.11 (2.05)	1.98 ± 0.17 (1.87)	3.69 ± 0.70 (2.85)	2.73 ± 1.22 (2.73)	8.00 ± 0.84 (6.41)
Hex A (U/g)	1.85 ± 0.09 (1.70)	1.49 ± 0.12 (1.36)	2.56 ± 0.52 (2.04)	1.83 ± 0.70 (1.83)	5.22 ± 0.61 (4.89)
Hex B (U/g)	0.42 ± 0.04 (0.42)	0.68 ± 0.09 (0.55)	1.40 ± 0.26 (1.20)	0.89 ± 0.51 (0.89)	2.78 ± 0.28 (2.42)
Hex B (%)	16.90 ± 1.37 (18.41)	29.90 ± 2.87 (32.81)	34.74 ± 2.78 (34.42)	30.43 ± 5.28 (30.43)	37.03 ± 2.10 (37.12)
GPx (ng/mL)	47.15 ± 2.97 (43.00)	47.43 ± 2.82 (43.80)	41.88 ± 5.63 (37.60)	37.8 ± 4.62 (37.8)	41.41 ± 4.56 (38.82)
Albuminuria (mg/g)	-	13.95 ± 1.37 (10.63)	79.87 ± 12.63 (62.12)	456.72 ± 129.11 (456.72)	474.50 ± 129.14 (177.47)
Cistatina C (mg/L)	-	1.07 ± 0.03 (1.07)	1.11 ± 0.04 (1.14)	0.97 ± 0.02 (0.97)	2.52 ± 0.18 (2.19)
Creatinina (mg/dL)	-	0.89 ± 0.03 (0.86)	0.97 ± 0.05 (0.99)	0.79 ± 0.10 (0.79)	2.85 ± 0.41 (1.82)
Urea (mg/dL)	-	38.83 ± 1.61 (39.00)	46.9 ± 2.51 (45.50)	27.00 ± 4.00 (27.00)	103.64 ± 12.52 (84.00)
Edad (años)	32.04 ± 1.67 (30.05)	37.24 ± 1.61 (38.50)	37.20 ± 1.48 (36.5)	19.50 ± 1.50 (19.50)	55.07 ± 2.66 (54.00)
Media ± SEM (Mediana)					

En el grupo de pacientes con microalbuminuria, la excreción de Hex total ($p < 0.05$), Hex B ($p < 0.001$) y proporción relativa de Hex B ($p < 0.001$) fueron significativamente mayores que en el grupo control. En tres casos (15%) la excreción de Hex total, en 2 casos (10%) la excreción de Hex A, en 7 casos (35%) la excreción de Hex B y en 9 casos (45%) la proporción relativa de Hex B, fueron mayores que los correspondientes límites superiores de referencia. El grupo de pacientes con microalbuminuria presentó valores significativamente mayores que el grupo de pacientes con normoalbuminuria para la Hex total ($p < 0.005$), Hex A ($p < 0.01$), y Hex B ($p < 0.01$), aunque no se encontraron diferencias estadísticamente significativas para la proporción relativa de Hex B. El pequeño número de pacientes sin insuficiencia renal presentando macroalbuminuria ($n = 2$) no permitió el tratamiento estadístico de estos datos.

En el grupo de pacientes con insuficiencia renal, 5 casos (18%) presentaron normoalbuminuria, 13 casos (46%) microalbuminuria y 10 casos (36%) macroalbuminuria. En estos pacientes la excreción de la Hex total, Hex A, Hex B, así como la proporción relativa de Hex B, fueron significativamente mayores que en el grupo control ($p < 0.001$), presentando respectivamente el 79%, 57%, 86% y 61% de los casos valores mayores que los correspondientes límites superiores de referencia. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas para la excreción urinaria de Hex total ($p < 0.001$), Hex A ($p < 0.001$) y Hex B ($p < 0.001$), aunque no para la proporción relativa de Hex B, entre el grupo de pacientes con insuficiencia renal y el grupo con microalbuminuria.

Se hizo una dicotomía de los pacientes que no presentaban disfunción renal que presentaban o no hipertensión, y los resultados encontrados se muestran en la Tabla 2. En el grupo de pacientes con normoalbuminuria, los individuos con hipertensión presentaron una excreción de Hex B ($p < 0.05$), así como una proporción de la misma ($p < 0.01$), significativamente mayor que en los sujetos normotensos. En el subgrupo de pacientes normotensos se encontró que en 8 casos (31%) la proporción relativa de Hex B fue mayor que el límite superior de referencia. El subgrupo de los pacientes con hipertensión, en 5 casos (31%) presentaron valores aumentados para la excreción de Hex B, y en 10 casos (62%) para la proporción relativa de Hex B. En el grupo de pacientes con microalbuminuria, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los subgrupos de pacientes normotensos e hipertensos para la excreción de Hex total y sus isoenzimas Hex A y Hex B. Ninguno de los pacientes con insuficiencia renal era normotenso.

Tabla 2. Niveles de las diferentes variables estudiadas en los pacientes normo e hipertensos.

	Normoalbuminuria		Microalbuminuria	
	Normotensos (n= 26)	Hipertensos (n= 16)	Normotensos (n= 8)	Hipertensos (n= 12)
Total Hex (U/g)	1.82 ± 0.14 (1.87)	2.25 ± 0.40 (1.90)	2.98 ± 0.30 (3.14)	4.16 ± 1.15 (2.70)
Hex A (U/g)	1.40 ± 0.13 (1.35)	1.68 ± 0.27 (1.59)	2.05 ± 0.19 (2.05)	2.89 ± 0.84 (2.02)
Hex B (U/g)	0.49 ± 0.07 (0.49)	1.07 ± 0.20 (0.98)	1.11 ± 0.14 (1.24)	1.58 ± 0.41 (1.16)
Hex B (%)	24.87 ± 3.33 (27.54)	39.95 ± 4.29 (41.50)	35.03 ± 2.64 (36.53)	34.55 ± 4.35 (30.03)
GPx (ng/mL)	42.90 ± 2.16 (42.60)	55.51 ± 6.43 (50.88)	34.96 ± 3.52 (36.25)	45.35 ± 8.21 (39.80)
Albuminuria (mg/g)	11.70 ± 1.65 (9.52)	17.63 ± 2.16 (19.14)	89.40 ± 27.41 (70.76)	73.52 ± 11.44 (62.12)
Cistatina C (mg/L)	1.03 ± 0.04 (1.00)	1.12 ± 0.04 (1.05)	1.07 ± 0.05 (1.06)	1.14 ± 0.05 (1.15)
Creatinina (mg/dL)	0.85 ± 0.03 (0.80)	0.95 ± 0.04 (0.92)	0.90 ± 0.08 (0.91)	1.01 ± 0.06 (1.02)
Urea (mg/dL)	36.65 ± 1.75 (37.00)	42.37 ± 3.01 (44.50)	44.87 ± 3.97 (44.50)	48.25 ± 3.33 (48.00)
Edad (años)	33.88 ± 2.01 (37.00)	42.69 ± 2.08 (41.50)	37.0 ± 2.85 (34.50)	37.33 ± 1.70 (37.0)
Media ± SEM (Mediana)				

La Tabla 3 muestra la correlación de la Hex y sus isoenzimas con las diferentes variables bioquímicas estudiadas para el total de los pacientes con PRAD. La cistatina C presentó una correlación altamente significativa con la creatinina ($r= 0.736$, $p< 0.001$) y urea ($r= 0.661$, $p< 0.001$). El índice ecográfico presentó correlaciones significativas con Hex total ($r= 0.350$, $p< 0.01$), Hex A ($r= 0.332$, $p< 0.01$), Hex B ($r= 0.445$, $p< 0.01$), porcentaje de Hex B ($r= 0.333$, $p< 0.01$), albuminuria ($r= 0.433$, $p< 0.01$) y cistatina C ($r= 0.346$, $p< 0.01$), así como con la edad de los pacientes ($r= 0.507$, $p< 0.01$). Como todas estas variables bioquímicas, excepto la proporción relativa de isoenzima Hex B, presentaron correlaciones significativas con la edad ($p< 0.01$), se hizo un estudio de la correlación parcial, manteniendo constante la edad de los pacientes, alcanzándose únicamente la significación estadística entre el índice ecográfico y la proporción relativa de Hex B ($r= 0.352$, $p< 0.01$).

Tabla 3. Correlación entre las diferentes variables estudiadas en el grupo total de pacientes (n= 92).

	Total Hex	Hex A	Hex B
Hex A	0.944**		
Hex B	0.893**	0.724**	
GPx	-0.255*	-0.173	0.145
Albuminuria	0.630**	0.602**	0.627**
Cistatina C	0.558**	0.499**	0.613**
Creatinina	0.501**	0.453**	0.540**
Urea	0.470**	0.386**	0.520**

Significación: * $p< 0.05$, ** $p< 0.001$

En 42 de los pacientes, se realizó una segunda determinación al cabo de un año para la excreción urinaria de Hex y albúmina, así como de las concentraciones séricas de cistatina C, creatinina y urea. En 13 de estos pacientes (5 hombres y 8 mujeres) que eran normotensos, con una edad media de 37 ± 2.5 años (rango 22-49) y presentaban normoalbuminuria, la concentración de cistatina C al cabo de un año fue 0.86 ± 0.04 mg/L (0.81 mg/L), significativamente menor ($p< 0.05$) que el valor inicial de 1.09 ± 0.06 mg/L (1.05 mg/L), como se muestra en la Figura 1. De acuerdo con los resultados de Larsson y cols (19), estas concentraciones séricas de cistatina C sérica se corresponden con valores

de FG de 131.5 ± 9.4 mL/min (142.0 mL/min) y 85.0 ± 8.9 mL/min (92.0 mL/min) respectivamente ($p < 0.01$). Durante este período de tiempo la excreción urinaria de la isoenzima Hex B y albúmina incrementó significativamente ($p < 0.05$), pero no se detectaron diferencias significativas para la creatinina y urea séricas. En los otros 29 pacientes, 10 hombres y 19 mujeres con una media de edad de 40.5 ± 2.1 (rango 25-74 años) con hipertensión y micro o macroalbuminuria, no se encontraron diferencias significativas entre los primeros y segundos valores de cistatina C, creatinina y urea séricas, o para la excreción urinaria de Hex y albúmina. En el grupo total de estos 42 pacientes se encontró una correlación significativa entre los cambios relativos durante este período de un año para la cistatina C con los valores iniciales de Hex B ($r = 0.336$, $p < 0.05$), y mejor aun con la proporción en porcentaje de Hex B ($r = 0.537$, $p < 0.01$) como se indica en la Figura 2. Para los 29 pacientes con hipertensión y micro ó macroalbuminuria, la correlación entre estas variables fue significativa ($r = 0.378$, $p < 0.05$); sin embargo en los 13 pacientes normotensos y normoalbuminúricos no se alcanzó una correlación significativa ($r = 0.276$). Los cambios relativos de cistatina C o creatinina no presentaron correlaciones significativas con los valores iniciales de albuminuria. Sin embargo, los cambios relativos de albuminuria presentaron correlaciones significativas con los cambios relativos de Hex total ($r = 0.390$, $p < 0.05$) y Hex A ($r = 0.456$, $p < 0.01$), pero no con los de Hex B.

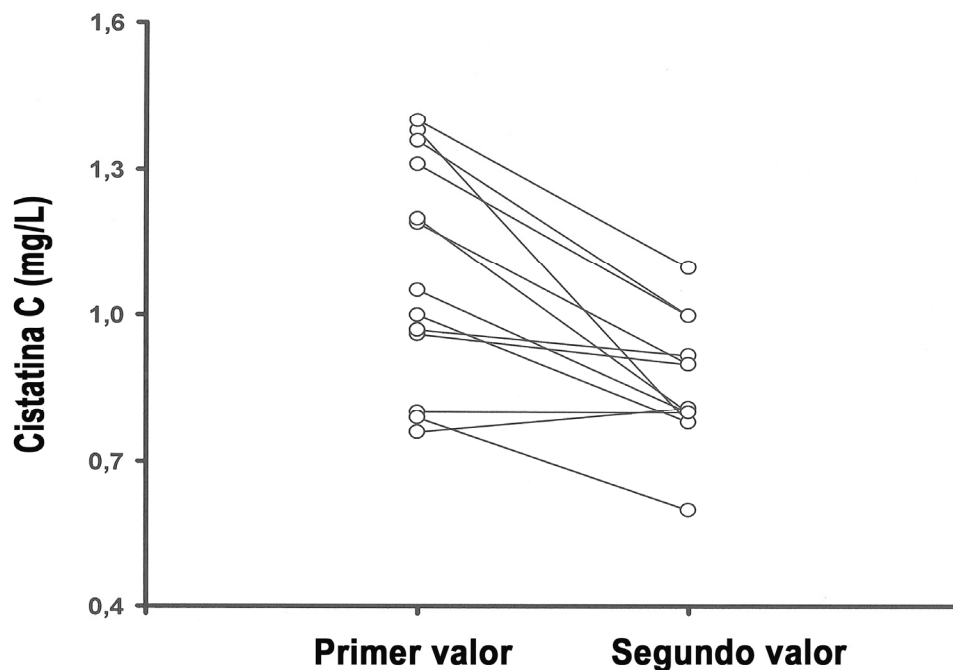


Figura 1. Evolución de la cistatina C sérica durante el período de un año en un grupo de 13 pacientes normotensos con ADPKD y normoalbuminuria. Línea base media= 1.09 ± 0.06 mg/L; un año media= 0.86 ± 0.04 mg/L ($p < 0.05$).

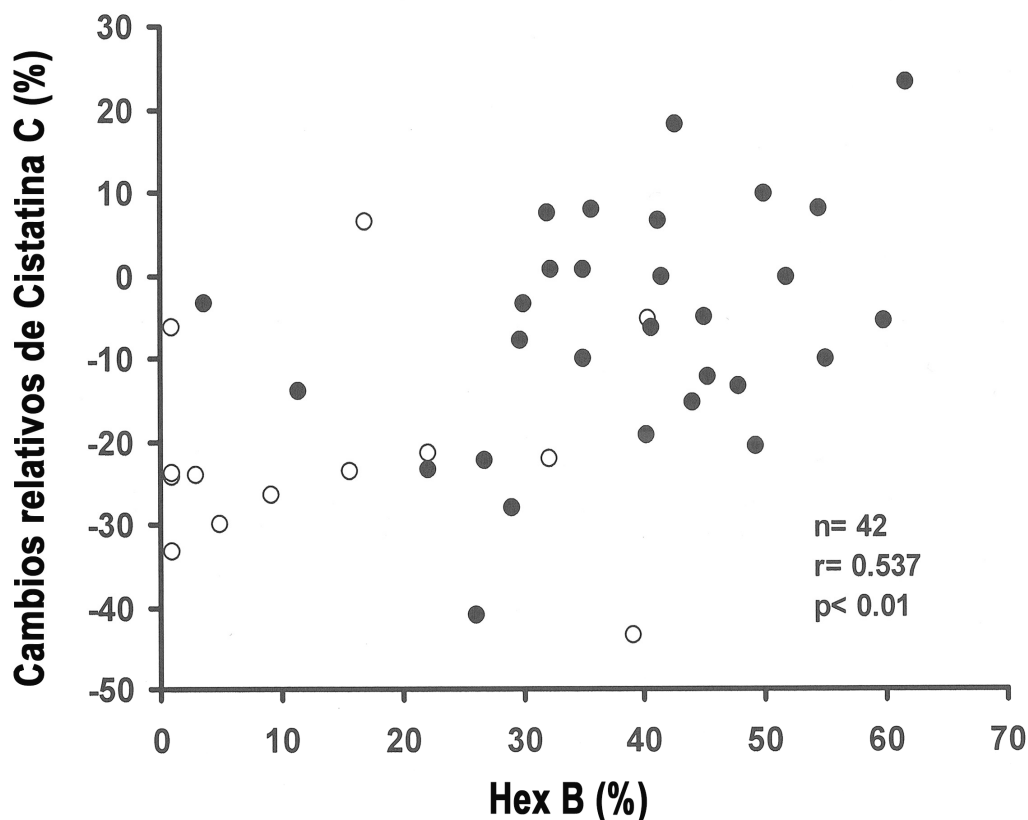


Figura 2. Relación entre los cambios relativos de la cistatina C durante el período de un año y el primer valor de la proporción de Hex B en orina en 42 pacientes con ADPKD. (○) Pacientes normotensos con normoalbuminuria; (●) pacientes hipertensos y con micro o macroalbuminuria.

La creatinina sérica presenta una escasa sensibilidad, ya que la función renal puede reducirse un 50% sin que apenas se produzcan modificaciones de los valores de creatinina (20); sin embargo, la concentración de cistatina C sérica ya aumenta cuando la de filtración glomerular cae por debajo de 80 mL/min, y por tanto sería particularmente útil para detectar un ligero deterioro de la función renal (20, 21). Teniendo en cuenta los valores de referencia establecidos en nuestro laboratorio, se consideró como indicador de insuficiencia renal un valor de corte para la cistatina C sérica > 1.3 mg/L. Estas concentraciones corresponderían a valores de FG \leq 66 mL/min (22) que están de acuerdo con la definición propuesta de enfermedad renal crónica basada en la función renal (23). Utilizando este criterio, 28 de los 92 pacientes con PRAD presentaban insuficiencia renal, sin alcanzar en ningún caso fallo renal grave. Los restantes 64 pacientes presentaban un grado variable de daño renal con FG normal o ligeramente disminuida.

Como se indica en la Tabla 1, no se encontraron diferencias significativas para los niveles séricos de GPx masa entre los distintos grupos de pacientes y con respecto al grupo control. Asimismo, la dicotomía de los pacientes según fuesen normotensos o hipertensos no aportó datos de interés adicional. Estos resultados podrían parecer sorprendentes, ya que la GPx extracelular selenio-dependiente es principalmente sintetizada en el epitelio del túbulo proximal del riñón (23), y su actividad en suero/plasma estaría significativamente disminuida en la mayoría de las enfermedades renales (14, 24-26). Algunos autores han atribuido este descenso de actividad enzimática a una disminución en la producción de GPx en el tejido renal dañado (24). Sin embargo pocos estudios han examinado los niveles de GPx masa, y Roxborough y cols (26) sugieren que la reducción de actividad sérica en el fallo renal crónico no se debería a una disminución de la síntesis de proteína enzimática, sino más bien a una inactivación de la misma. De acuerdo con estos autores, la insuficiencia renal per se es la principal causa del descenso de la actividad de la GPx debido a un daño oxidativo, glicación o carbamilación de la proteína enzimática (26). La reducción de la actividad plasmática de la GPx también se ha atribuido a una deficiencia de selenio (27, 28). Son necesarios futuros estudios para establecer la causa del descenso de la actividad plasmática de la GPx en la enfermedad renal (28).

Como se ha señalado anteriormente, en los pacientes PRAD estudiados, ninguno presentaba insuficiencia renal avanzada, y no se encontraron variaciones significativas de los niveles séricos de la GPx masa en relación al grupo control. Por su parte Schiavon y cols (24) tampoco encontraron descensos significativos de la actividad plasmática de la GPx en pacientes con enfermedad túbulo-intersticial debida a administración de aminoglucósidos. En cualquier caso, la correlación negativa encontrada en nuestros pacientes con PRAD entre la excreción urinaria de Hex total y los niveles séricos de GPx masa ($p < 0.05$), sugiere que estos podrían estar parcialmente condicionados por la implicación del túbulo proximal.

Los resultados mostrados en las Tablas 1 y 2 demuestran que en PRAD la excreción urinaria de Hex total, así como su perfil isoenzimático, se ve precozmente alterada. En el grupo de pacientes con normoalbuminuria y función renal normal se detectó un incremento significativo de la excreción de Hex B ($p < 0.05$), así como de la proporción relativa de esta isoenzima ($p < 0.001$), aumentando la significación al considerar el subgrupo de pacientes hipertensos. Estudios previos han puesto de manifiesto que en la hipertensión arterial, la

excreción urinaria de la Hex se altera en una fase más precoz que otros marcadores renales, sugiriendo que el daño tubular puede preceder al daño glomerular en estadios tempranos de la nefropatía hipertensiva (29, 30). Sin embargo, es interesante indicar que en el subgrupo de pacientes normotensos con normoalbuminuria, el 31% de los casos ya presentaban un perfil isoenzimático alterado con aumento de la proporción de Hex B. Como se indica más adelante, esta variable podría presentar una asociación significativa con los cambios de la función renal.

En el grupo de pacientes con microalbuminuria, la excreción de Hex total y Hex B estaba significativamente aumentada ($p < 0.001$), no encontrándose diferencias significativas entre los grupos de pacientes normotensos e hipertensos. Una incrementada excreción urinaria de albúmina refleja usualmente un daño glomerular, pero cuando el aumento es pequeño podría ser debido a una afectación de la reabsorción tubular, y consecuentemente la microalbuminuria es comúnmente encontrada en los pacientes con afectación tubular (31).

El aumento de la Hex urinaria es considerado un indicador de magnitud de la afectación del túbulo proximal en la enfermedad renal (9, 10), incluso en pacientes con proteinuria debida a un daño de la membrana glomerular (32, 33). Sin embargo, la excreción urinaria de Hex debe ser interpretada con cautela, pues puede comportarse como un marcador tanto del estatus funcional como del daño tubular (11). Una activación lisosomal, como resultado de la estimulación del sistema lisosomal endocítico, podría ocurrir cuando una aumentada concentración de proteínas es presentada a las células tubulares (11). Consecuentemente, en pacientes con aumentada excreción de albúmina, la actividad urinaria de la Hex puede ser reflejo de una activación lisosomal así como de daño celular tubular.

El valor clínico de la Hex urinaria puede aumentarse determinando sus isoenzimas. Bajo condiciones fisiológicas normales, la excreción urinaria de la Hex es casi exclusivamente procedente de la exocitosis del contenido lisosomal tubular. Esta enzimuria funcional se debe mayoritariamente a la excreción de isoenzima Hex A que se encuentra localizada en el compartimento intralisosomal soluble (34-36). Sin embargo en casos de daño tubular con necrosis celular, la enzimuria lesional se caracteriza por un incremento de la excreción de isoenzima Hex B; localizada esencialmente en la membrana lisosomal (34-36). Un reciente estudio sugiere que la asociación de la Hex con

las membranas, no se produciría a través de un anclaje de glicosilfosfatidil inositol, sino que esta enzima podría ser una proteína integral de la membrana (37).

Distintos estudios han puesto de manifiesto la existencia de correlaciones significativas de la Hex urinaria con la proteinuria (32, 38-40) y la albuminuria (39) en distintas enfermedades renales. Cambios funcionales en las células del túbulo renal causados por la reabsorción de proteínas pueden ser los responsables de esta asociación (39). En nuestros pacientes con PRAD se encontraron correlaciones altamente significativas de la albuminuria con la excreción de Hex total, Hex A y Hex B ($p < .001$). En los 42 pacientes en que se repitió la determinación de Hex y albúmina urinarias al cabo de un año, se encontró una correlación significativa de los cambios relativos de la albuminuria durante este período de tiempo con los de Hex A ($p < 0.01$), pero no con los de Hex B. Estos resultados podrían explicarse teniendo en cuenta que una posible activación lisosomal tubular por la albúmina favorecería la excreción de isoenzima Hex A, aunque la albúmina urinaria (modificada estructuralmente) podría producir asimismo daño tubular (41) pudiendo enmascarar la asociación entre los cambios relativos de albuminuria y Hex A urinaria. También en estos pacientes, se encontró una correlación significativa de los cambios relativos de cistatina C durante un año con los primeros valores de Hex B ($p < 0.05$) y proporción de Hex B ($p < 0.01$), pero no con los de Hex A. Una aumentada excreción urinaria de Hex B, y consecuentemente de su proporción relativa, puede estar relacionada con un daño tubular, cuyo papel central en el deterioro progresivo de la función renal en la mayoría de las formas crónicas de enfermedad renal ha sido recientemente destacado (42).

Los resultados obtenidos por diferentes autores para la relación entre el aumento del tamaño renal, número de quistes y disfunción renal son discordantes, aunque una relación estructura - función está presente cuando más precisos y seguros métodos de imagen son utilizados (43-45). Se ha sugerido que tanto factores genéticos como factores ambientales pueden influir en la severidad y progresión de la enfermedad renal en pacientes PRAD modulando el número y tamaño de quistes, y consecuentemente el volumen renal (2). Aumento del tamaño renal, hipertensión, sexo, proteinuria y disminución de la FG están relacionados, sin embargo otros factores no identificados son probablemente determinantes en el deterioro de la función renal en pacientes PRAD (44). En nuestros pacientes no se encontró una correlación parcial significativa, manteniendo constante la edad, de la concentración de cistatina C con el índice ecográfico utilizado. Estos resultados

están de acuerdo con los de Wong y cols (43), que tampoco encontraron una relación significativa del tamaño renal o del número de quistes con la FG en sus pacientes PRAD. El hecho de que en nuestro estudio se encontrase una correlación parcial significativa del índice ecográfico con la proporción de Hex B urinaria, no hace sino apuntar nuevamente al daño tubular en la patogénesis de esta enfermedad.

En el período considerado de un año no se encontró una modificación significativa para ninguna de las variables bioquímicas estudiadas en el grupo de 29 pacientes con hipertensión y con micro / macroalbuminuria. Sin embargo, podría parecer llamativo el hecho de que en el grupo de 13 pacientes normotensos con normoalbuminuria disminuyese significativamente la concentración sérica de cistatina C (ver Figura 1), aumentando por el contrario significativamente la excreción urinaria de isoenzima Hex B y albúmina ($p < 0.05$). De acuerdo con estudios previos de Chapman y cols (46) y Wong y cols (43), la hiperfiltración glomerular parece ser una manifestación temprana de PRAD que precede a la microalbuminuria e hipertensión, y que podría ponerse en evidencia mediante la cistatina C sérica (43). Como era esperable, la hiperfiltración presentó una mayor prevalencia en niños y adolescentes que en pacientes adultos con PRAD (45). Sin embargo teniendo en cuenta nuestros resultados, puede sugerirse a modo de hipótesis que, incluso en pacientes adultos sin hipertensión y microalbuminuria, se produciría un aumento gradual de la filtración glomerular. Una vez que aparecen microalbuminuria e hipertensión se produciría una disminución progresiva pero más lenta de FG en estos pacientes.

Una forma minoritaria de Hex con un pH óptimo neutro y denominada Hex C, se encuentra localizada en el citoplasma, y parece aumentar en tejidos neoplásicos renales (46). Como la hipótesis de que la PR es una neoplasia disfrazada está generando aceptación (15), la posible presencia de isoenzima Hex C en la orina de pacientes con PRAD, puede ser objeto de un estudio futuro.

Bibliografía

1. Gabow PA. Autosomal dominant polycystic kidney disease. *N Engl J Med* 1993; 329: 332-42.
2. Pei Y. Molecular genetics of autosomal dominant polycystic kidney disease. *Clin Invest Med* 2003; 26: 252-58.
3. Rizk D, Chapman AB. Cystic and inherited kidney diseases. *Am J Kidney Dis* 2003; 42:1305-17.
4. Cowley DB. Recent advances in understanding the pathogenesis of polycystic kidney disease: therapeutic implications. *Drugs* 2004; 64: 1285-94.
5. Scarpioni L, Heer EE. Fisipatología protéica en las nefropatías. *Editorial Médica Panamericana*, Buenos Aires 1977: 76-87.
6. Chapman AB, Johnson AM, Gabow PA, Schrier RW. Overt proteinuria and microalbuminuria in autosomal polycystic kidney disease. *J Am Soc Nephrol* 1994; 5: 1349-54.
7. Sharp C, Johnson A, Gabow P. Factors relating to urinary protein excretion in children with autosomal dominant polycystic kidney disease. *J Am Soc Nephrol* 1998; 9: 1908-14.
8. Van Dijk MA, Peters DJ, Breuning MH, Chang PC. The angiotensin-converting enzyme genotype and microalbuminuria in autosomal dominant polycystic kidney disease. *J Am Soc Nephrol* 1999; 10: 1916-20.
9. Martinez-Vea A, Gutierrez C, Bardaji A, Pastor R, Garcia C, Peralta C *et al.* Microalbuminuria in normotensive patients with autosomal-dominant polycystic kidney disease. *Scand J Urol Nephrol* 1998; 32: 356-59.
10. Sarasua SM, Mueller P, Kathman S, Campagna D, Uddin MS, White MC. Confirming the utility of four kidney biomarker tests in a longitudinal follow-up study. *Ren Fail* 2003; 25: 797-817.
11. Bosomworth MP, Aparicio SR, Hay AWM. Urine N-acetyl- β -D-glucosaminidase-A marker of tubular damage?. *Nephrol Dial Transpl* 1999; 14: 620-66.
12. Swedenborg P, Hultberg B, Thysell H. Urinary β -hexosaminidase excretion in polycystic kidney disease. *Acta Med Scand* 1981; 210: 471-73.
13. Carone FA, Ozono S, Samma SS, Kanwar YS, Oyasu R. Renal functional changes in experimental cystic disease are tubular in origin. *Kidney Int* 1988; 33: 8-13.

- 14.** Whitin JC, Tham DM, Bhamre S, Ornt DB, Scandling JD, Tune BM et al. Plasma glutathione peroxidase and its relation ship to renal proximal tubule function. *Molec Genet Metab* 1998; 65: 238-45.
- 15.** Quian Q, Harris PL, Torres VE. Treatment prospects for autosomal-dominant polycystic kidney disease. *Kidney Int* 2001; 59: 2005-22.
- 16.** Itoh Y, Numata Y, Morita A, Asano Y, Kawai T. Varied value of urinary N-acetyl- β -D-glucosaminidase isoenzyme B in males of reproductive age. *Kidney Int* 1994; 46 (Suppl. 47): S38-S42.
- 17.** Perez LF, Tutor JC. Assay of β -N-acetyl-hexosaminidase isoenzymes in urine by means of determination of their activation energy without removing endogenous low-molecular-mass components. *Clin Chim Acta* 1998; 277: 39-49.
- 18.** American Diabetes Association (ADA). Diabetic nephropathy. *Diabetes Care* 1997; 20 (Suppl. 1): S24-S27.
- 19.** Larsson A, Malm J, Grubb A, Hansson LO. Calculation of glomerular filtration rate expressed in mL/min from plasma cystatin C values en mg/L. *Scand J Clin Lab Invest* 2004; 64: 25-30.
- 20.** Coll E, Botey A, Alvarez L, Poch E, Quinto L, Saurina A et al. Serum cystatin C as a new marker for non invasive estimation of glomerular filtration rate and as a marker for early renal impairment. *Am J Kidney Dis* 2000; 36: 29-34.
- 21.** Lamb EJ, O'Riordan SE, Delaney MP. Kidney function in older people: pathology, assessment and management. *Clin Chim Acta* 2003; 334: 25-40.
- 22.** National Kidney Foundation. K/DOQI Clinical Practice Guidelines for Chronic Kidney Disease: Evaluation, Clasification and Stratification. *Am J Kidney Dis* 2002; 39 (Suppl. 1): S76-S110.
- 23.** Avissar N, Ornt DB, Yagil Y, Horowitz S, Watkins RH, Kerl EA et al. Human kidney proximal tubules are the main source of plasma glutathione peroxidase. *Am J Physiol* 1994; 266: C367-C375.
- 24.** Schiavon R, Guidi GC, Biasioli S, De Fanti E, Targa L. Plasma glutathione peroxidase activity as an index of renal function. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1994; 32: 759-65.
- 25.** Yoshimura S, Suemizu H, Nomoto Y, Sakai H, Katsuoka Y, Kawamura N et al. Plasma glutathione peroxidase deficiency caused by renal dysfunction. *Nephron* 1996; 73: 207-11.
- 26.** Roxborough HE, Mercer C, McMaster D, Maxwell AP, Young IS. Plasma glutathione peroxidase activity is reduced in haemodialysis patients. *Nephron* 1999; 81: 278-83.

27. Czuckejko J, Zachara BA, Staubach-Topczewska E, Halofa W, Kedziora J. Selenium, glutathione and glutathione peroxidases in blood of patients with chronic liver diseases. *Acta Biochim Pol* 2003; 50: 1147-54.
28. Zachara BA, Salak A, Koterska D, Manitius J, Wasowicz W. Selenium and glutathione peroxidases in blood of patients with different stages of chronic renal failure. *J Trace Elem Med Biol* 2004; 17: 291-99.
29. Pérez- Blanco FJ, Ruíz-Martin A, Moreno-Terribas J. Urinary activity of N-acetyl- β -glucosaminidase (NAG) in arterial hipertensión. *Clin Nephrol* 1996; 45: 65-66.
30. Tylicki L, Manitius J, Lysiak-Szydłowska W, Rutkowski B. Tubular injury: the first symptom of hypertensive kidney involvement?. *Med Sci Monit* 2003; 9: CR135-CR141.
31. Lapsley M, Sansom PA, Marlow CT, Flynn FV, Norden AGW. β 2—glycoprotein (apolipoprotein H) excretion in chronic renal tubular disorders: a comparison with other protein markers of tubular malfunction. *J Clin Pathol* 1991; 44: 812-16.
32. Costigan MG, Rustom R, Bone JM, Shenkin A. Origin and significance of urinary N-acetyl- β -D-glucosaminidase (NAG) in renal patients with proteinuria. *Clin Chim Acta* 1996; 255: 133-44.
33. Hermida J, Casal JA, Tutor JC. Effect of partial proteolysis on the activation energy of β -N-acetylhexosaminidase precursor and mature forms. *Clin Chem Lab Med* 2003; 41: 302-05.
34. Bourbouze R, Baumann FC, Bonvalet JP, Farman N. Distribution of N-acetyl- β -D-glucosaminidase isoenzymes along the rabbit nephron. *Kidney Int* 1984; 25: 636-42.
35. Bourbouze R, Bernard M, Bauman FC, Pérez-González N, Martin- Barrientos J, Cabezas JA. Localisation subcellulaire des isoenzymes de la N-acetyl- β -D-glucosaminidase du cortex rénal de lapin. *Cell Molec Biol* 1984; 30: 67-74.
36. Bernard A, Lauweris R. Cadmium, NAG activity, and β 2-microglobulin in the urine of cadmium pigment workers. *Br J Ind Med* 1989; 46: 679-80.
37. Hutchinson T, Dwivedi K, Rastogi A, Prasad R, Pereira BMJ. N-Acetyl- β -D-glucosaminidase is not attached to human sperm membranes through the glycosylphosphatidyl inositol (GPI)-anchor. *Asian J Androl* 2002; 4: 27-33.
38. Hultberg B. Urinary excretion of β -hexosaminidase in different forms of proteinurie. *Clin Chim Acta* 1980; 108: 195-99.
39. Ring E, Zobel G, Erwa W, Haim-Kuttnig M. Urinary excretion of N-acetyl- β -D-glucosaminidase in proteinuric states. *Child Nephrol Urol* 1992; 12: 15-18.

40. Hultberg B, Raunskov U. The excretion of N-acetyl- β -glucosaminidase in glomerulonephritis. *Clin Nephrol* 1981; 15: 33-38.
41. Iglesias J, Levine JS. Albuminuria and renal injury-beware of protein bearing gifts. *Nephrol Transpl* 2001; 16: 215-18.
42. Daham M, Van Kooten C. Is the proximal tubule a proinflammatory cell?. *Nephrol Dial Transpl* 2000; 15 (Suppl. 6): 41-43.
43. Wong H, Vivian L, Weiller G, Filler G. Patients with autosomal dominant polycystic kidney disease hyperfiltrate early in their disease. *Am J Kidney Dis* 2004; 43: 624-38.
44. Fick-Brosnahan GM, Belz MM, McFann KK, Johnson AM, Schrier RW. Relationship between renal growth and renal function in autosomal dominant polycystic kidney disease: a longitudinal study. *Am J Kidney Dis* 2002; 39: 1127-31.
45. Sise C, Kusaka M, Wetzel LH, Winklhofer F, Cowley BD, Cook LT *et al.* Volumetric determination of progression in autosomal dominant polycystic kidney disease by computed tomography. *Kidney Int* 200; 58: 2492-501.
46. Yoshida K. Demonstration of some properties of N-acetyl- β -D-hexosaminidase (Hex) C isoenzyme in human renal tissues: relative increase of Hex C activity in renal cell carcinoma. *Clin Chim Acta* 1994; 226: 55-65.

CONCLUSIONES

1. El cálculo de los factores de conversión de temperatura $37^{\circ}/25^{\circ}$ C permite la determinación de la composición isoenzimática de la β -N-acetilhexosaminidasa plasmática, con unos resultados superponibles a los obtenidos mediante el cálculo de la energía de activación aparente utilizando las temperaturas de 25, 30, 35 y 37° C. Sin embargo, el uso de factores de conversión de temperatura $37^{\circ}/30^{\circ}$ C no cumple los mínimos de calidad exigidos, con un error estándar de la estima mucho mayor que el valor clínicamente aceptable.

2. La digestión con papaína de la β -N-acetilhexosaminidasa plasmática (formas precursoras de alta masa molecular) produjo un incremento medio de la energía de activación aparente de 3.0 kJ/mol, debido a la proteólisis parcial de la isoenzima A, sin que se afecte la calidad catalítica de la isoenzima B. Sin embargo, el tratamiento con papaína no modificó significativamente la energía de activación aparente de las formas enzimáticas maduras de baja masa molecular existentes en muestras de orina y lisados de leucocitos y plaquetas. En controles sanos y pacientes nefrológicos, no se encontraron variaciones significativas de la energía de activación aparente de la β -N-acetilhexosaminidasa urinaria en la digestión con papaína, independientemente de la presencia de normo, micro o macroalbuminuria. Estos resultados confirman la hipótesis de que, incluso en pacientes con proteinuria, no existen en la orina formas enzimáticas de alta masa molecular de origen plasmático, siendo la actividad enzimática de origen tisular renal.

3. La determinación de la energía de activación aparente de la β -N-acetilhexosaminidasa permite la determinación simple y precisa de su perfil isoenzimático en lisados de plaquetas, leucocitos totales o en poblaciones de leucocitos mononucleares y polimorfonucleares, con indudables ventajas en relación a los procedimientos tradicionales de inactivación térmica. El uso de lisados de leucocitos totales, en lugar de poblaciones celulares homogéneas (plaquetas, leucocitos mononucleares o polimorfonucleares), no parece introducir un aumento significativo de la variabilidad inter-individual de la proporción relativa de isoenzima A, que es la variable utilizada para el diagnóstico bioquímico y la detección de portadores heterocigotos de gangliosidosis GM2.

4. La isoenzima A ($\alpha\beta$) de la β -N-acetilhexosaminidasa plasmática separada por cromatografía en DEAE-celulosa de un paciente con gangliosidosis GM2 variante B1, homocigoto para la mutación G533→A (Arg178His), presentó una energía de activación (71.5 kJ/mol) significativamente mayor que la obtenida para la isoenzima A “normal” (41.3 kJ/mol). Al ser la subunidad α inactiva, la actividad enzimática de la isoenzima A “mutada” derivaría exclusivamente de la subunidad β , presentando una energía de activación análoga a la del homodímero $\beta\beta$ isoenzima B (73.8 kJ/mol). En los padres del paciente, el valor medio obtenido para la energía de activación de la isoenzima A (55.4 kJ/mol), sugiere la presencia de una mezcla equimolecular de isoenzimas “mutada” y “normal” en el plasma de portadores heterocigotos para la mutación R178H.

5. El diagnóstico bioquímico de pacientes y detección de portadores heterocigotos para la variante B1 de gangliosidosis GM2 no puede realizarse mediante los clásicos métodos de inactivación térmica de la isoenzima A de la β -N-acetilhexosaminidasa. La determinación de la energía de activación aparente de la enzima en lisados de leucocitos mononucleares y polimorfonucleares de 3 pacientes con gangliosidosis GM2 variante B1 y 6 portadores, demostró que el procedimiento puede ser aplicado al diagnóstico de pacientes y detección de portadores. La aplicación del método termodinámico a muestras de plasma demostró un alto poder discriminante para el diagnóstico de pacientes homocigotos, pero no para la detección de portadores heterocigotos en los que pueden obtenerse falsos negativos.

6. La posible utilidad de la β -N-acetilhexosaminidasa sérica en la detección de portadores de enfermedad de Gaucher, es un tema debatido. En pacientes con enfermedad de Gaucher tipo 1 (no neuropático) se encontraron aumentados niveles séricos de distintos marcadores de activación monocito/macrófago, quitotriosidasa > neopterinina > enzima convertidora de la angiotensina > adenosina deaminasa > β -N-acetilhexosaminidasa, presentando una elevada correlación entre sí ($p < 0.001$). Sin embargo, los aumentos de actividad sérica de β -N-acetilhexosaminidasa eran debidos principalmente a incrementos de isoenzima B, cuya correlación parcial (manteniendo la isoenzima A constante) con los marcadores de activación monocito/macrófago no alcanzó la significación estadística. Esto sugiere que la isoenzima B es de origen hepatocitario, y en consecuencia la discreta elevación de β -N-acetilhexosaminidasa

en la enfermedad de Gaucher sería consecuencia de la afectación hepática observada en estos pacientes.

7. Recientemente se ha sugerido que, independientemente del status inflamatorio, la β -N-acetilhexosaminidasa sérica podría ser un marcador de la degradación del cartilago articular en la artritis reumatoide; sin embargo, las plaquetas son una importante fuente de actividad enzimática sérica y la trombocitosis es frecuente en pacientes artríticos. En pacientes con artritis reumatoide se encontró una aumentada actividad plasmática de β -N-acetilhexosaminidasa total y su isoenzima B, aunque no presentó una correlación significativa con la evaluación radiológica de la enfermedad (Sharp modificado), la capacidad funcional de los pacientes (Health Assessment Questionnaire), el tiempo de evolución de la enfermedad, o los marcadores bioquímicos de inflamación, proteína C reactiva, ácido siálico, y velocidad sedimentación globular. La actividad plasmática de la β -N-acetilhexosaminidasa, o incluso de sus isoenzimas A y B, no parece ser un marcador adecuado de erosión y degradación del cartílago en pacientes artríticos, cuya función hepática parece ser el determinante principal de los niveles de actividad enzimática.

8. En pacientes con cirrosis hepática se encontró un aumento significativo de la actividad plasmática de la β -N-acetilhexosaminidasa total y sus isoenzimas A y B ($p < 0.001$). La correlación parcial, manteniendo otros marcadores bioquímicos de daño hepático constantes, de la proporción relativa de isoenzima B con la concentración de amonio plasmático fue altamente significativa ($p < 0.001$). En el curso de la enfermedad hepática, el catión lisosomotrópico NH_4^+ podría causar una inhibición de la maduración de las formas enzimáticas precursoras de alta masa molecular, interfiriendo en su transporte al lisosoma, y aumentando su secreción al medio extracelular.

9. En plasma seminal se caracterizaron para la β -N-acetilhexosaminidasa las isoenzimas A y B, presentando unas energías de activación de 41.5 kJ/mol y 72.3 kJ/mol respectivamente, lo cual permitió la determinación termodinámica del perfil isoenzimático en este medio biológico. Se encontró una diferencia significativa entre plasmas normozoospermicos y azoospermicos para la isoenzima A, aunque con un considerable solapamiento entre ambos grupos. Se obtuvieron correlaciones significativas de la actividad enzimática total y de las isoenzimas A y B con el número de espermatozoides inmóviles, y de la actividad total e isoenzima B con el número de

espermatozoides muertos. Asimismo, la isoenzima A presentó una correlación significativa con el número de espermatozoides vivos, sin embargo la actividad enzimática de origen acrosómico parece poco importante desde un punto de vista cuantitativo. En consecuencia, no se ha podido confirmar que la β -N-acetilhexosaminidasa, sea un marcador adecuado de azoospermia. El procedimiento termodinámico desarrollado puede ser una alternativa válida para la determinación de la heterogeneidad enzimática de la β -N-acetilhexosaminidasa en espermatozoides.

10. En pacientes adultos con poliquistosis renal autosómica dominante, con y sin insuficiencia renal, y clasificados de acuerdo con un índice ecográfico (tamaño riñones y número de quistes), se encontró una frecuente elevación de la β -N-acetilhexosaminidasa urinaria y alteración de su perfil isoenzimático, con un 31% de los pacientes normotensos y con normoalbuminuria presentando ya una aumentada proporción relativa de isoenzima B (daño tubular). En el total de pacientes se encontró una correlación parcial (manteniendo edad constante) estadísticamente significativa entre el índice ecográfico y la proporción relativa de isoenzima B. En el período de un año, 13 pacientes normotensos y con normoalbuminuria presentaron una significativa disminución de la concentración sérica de cistatina C (aumento filtración glomerular), aunque paralelamente se observó un aumento significativo de la excreción urinaria de albúmina e isoenzima B. Por el contrario, durante el mismo período de tiempo, 29 pacientes hipertensos con microalbuminuria no presentaron diferencias significativas para estas variables bioquímicas. Estos resultados ponen en evidencia la importante participación del daño tubular en la patogénesis de la poliquistosis renal autosómica dominante, al tiempo que sugieren que en los pacientes normotensos y con normoalbuminuria, se produciría en principio un gradual incremento de la filtración glomerular; sin embargo, una vez se instaura la hipertensión con microalbuminuria, la filtración glomerular disminuiría progresivamente aunque más lentamente.