

# Enzimas en Suero I y II

**1) Dr. José G. Castaño**

# Objetivos

- Describir y manejar los parámetros fundamentales que definen la actividad enzimática.
- Métodos de medición de enzimas como catalizadores y como proteínas.
- Principales enzimas y utilidad clínica: Transaminasas, Fosfatasas, Creatina kinasa, troponinas, amilasa, GGT y PSA

# Enzimas- Catalizadores biológicos

- Catalizadores
  - aumentan velocidad de reacciones químicas
  - un catalizador no se consume y convierte varias moléculas de sustrato
  - La concentración final de sustratos y productos se rige por la ley de equilibrio químico
- Enzimas
  - Mayor parte proteínas, algunas RNAs
  - Aumenta velocidad de  $10^6$  a  $10^{12}$
  - Condiciones de reacción suaves
  - Especificidad
  - Regulación

# Propiedades de los Enzimas

- Reacciones químicas - rotura, formación y reordenamiento de enlaces químicos
- Especificidad
  - Dictada por el sitio activo del enzima
  - Algunos sitios activos permiten la entrada de varios sustratos
- Cofactores
  - Las cadenas laterales de los aminoácidos de las proteínas tienen un pequeño repertorio de grupos activos ⇒ Necesidad de cofactores.
  - Cofactores: Derivados de vitaminas, metales (Fe, Ca, Mg, Mn) pueden unirse como co-sustratos o estar unidos al enzima de forma covalente (grupo prostético) y permanecer unidos al enzima en múltiples ciclos catalíticos

# Nomenclatura de Enzimas

- Oxidoreductasas (EC Clase 1)
  - Transferencia electrones (RedOx)
- Transferasas (EC Class 2)
  - Transferencia grupos funcionales entre moléculas
- Hidrolasas (EC Class 3)
  - Rompen enlaces por entrada de H<sub>2</sub>O
- Liasas (EC Class 4)
  - Reacciones de eliminación para formar dobles enlaces
- Isomerasas (EC Class 5)
  - Reordenamiento de enlaces intramolecularmente
- Ligasas (EC Class 6)
  - Unen dos moléculas con nuevos enlaces

# Base de datos de enzimas

## <http://www.expasy.ch/enzyme>

### Ejemplo

- ID 2.3.1.43
- DE Phosphatidylcholine--sterol O-acyltransferase.
- AN Lecithin--cholesterol acyltransferase.
- AN LCAT.
- AN Phospholipid--cholesterol acyltransferase.
- CA Phosphatidylcholine + sterol = sterol ester +
- CA 1-acylglycerophosphocholine.
- CC -!- Palmitoyl, oleoyl, and linoleoyl can be transferred; a number of
- CC sterols, including cholesterol, can act as acceptor.
- CC -!- The bacterial enzyme also catalyses the reactions of EC [3.1.1.4](#) and
- CC EC [3.1.1.5](#).
- DI Norum disease; [MIM:245900](#).
- DI Fish-eye disease; [MIM:136120](#).
- PR PROSITE; [PDOC00110](#);
- DR BRENDA; [2.3.1.43](#).
- DR EMP/PUMA; [2.3.1.43](#).
- DR WIT; [2.3.1.43](#).
- DR KYOTO UNIVERSITY LIGAND CHEMICAL DATABASE; [2.3.1.43](#).
- DR P10480, [GCAT AERHY](#); P53760, [LCAT CHICK](#); P04180, [LCAT HUMAN](#);
- DR P16301, [LCAT MOUSE](#); Q08758, [LCAT PAPAN](#); P30930, [LCAT PIG](#) ;
- DR P53761, [LCAT RABIT](#); P18424, [LCAT RAT](#) ;
- //

# Concepto de Isozimas

Isozimas son dos o más formas de un enzima que **catalizan la misma reacción química** pero tienen **distinta secuencia primaria**.

Por tanto codificada por distintos genes

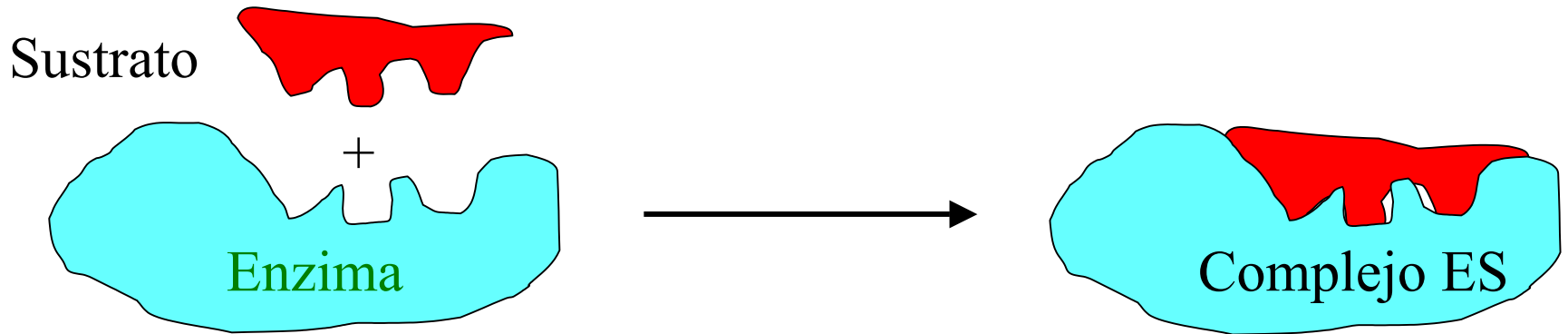
## **Formación de un complejo enzima-sustrato es el primer paso de la catálisis**

- Sustrato se une al enzima en el sitio activo.
- A cantidad de enzima fija, la velocidad de la reacción aumenta con la concentración de sustrato hasta que se alcanza la velocidad máxima de la reacción.

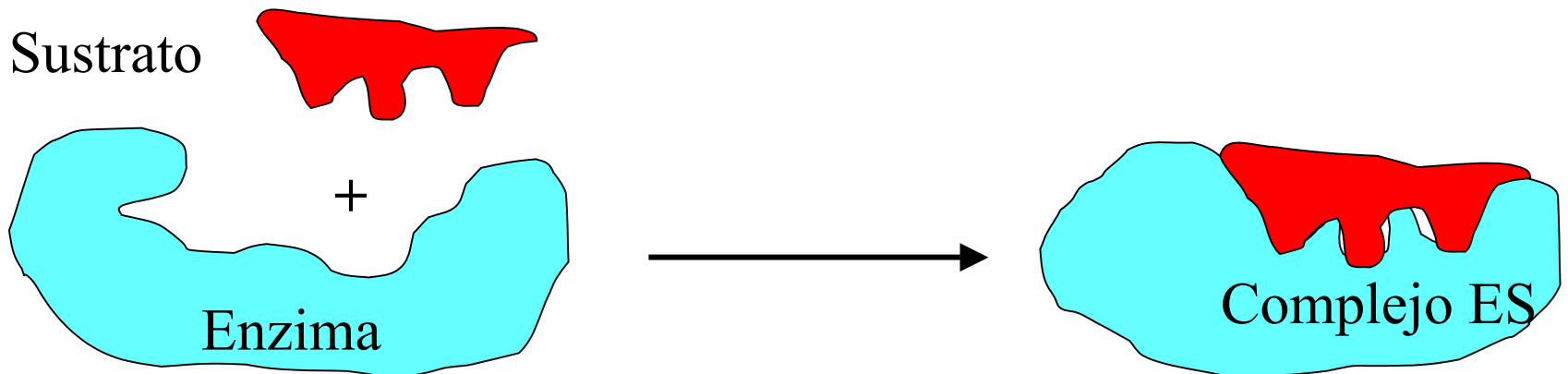


# Sitio activo

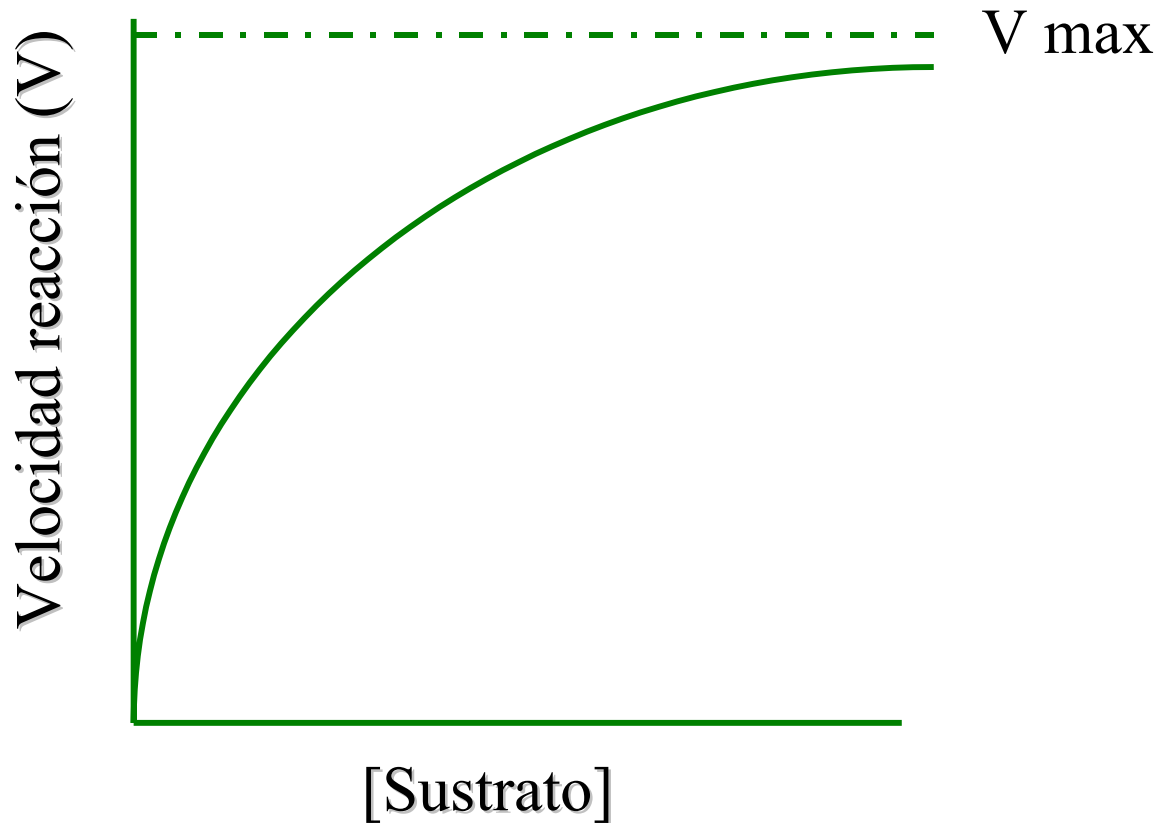
## Llave cerradura - Emil Fischer (1890)



## Ajuste inducido - Daniel E. Koshland Jr. (1958)

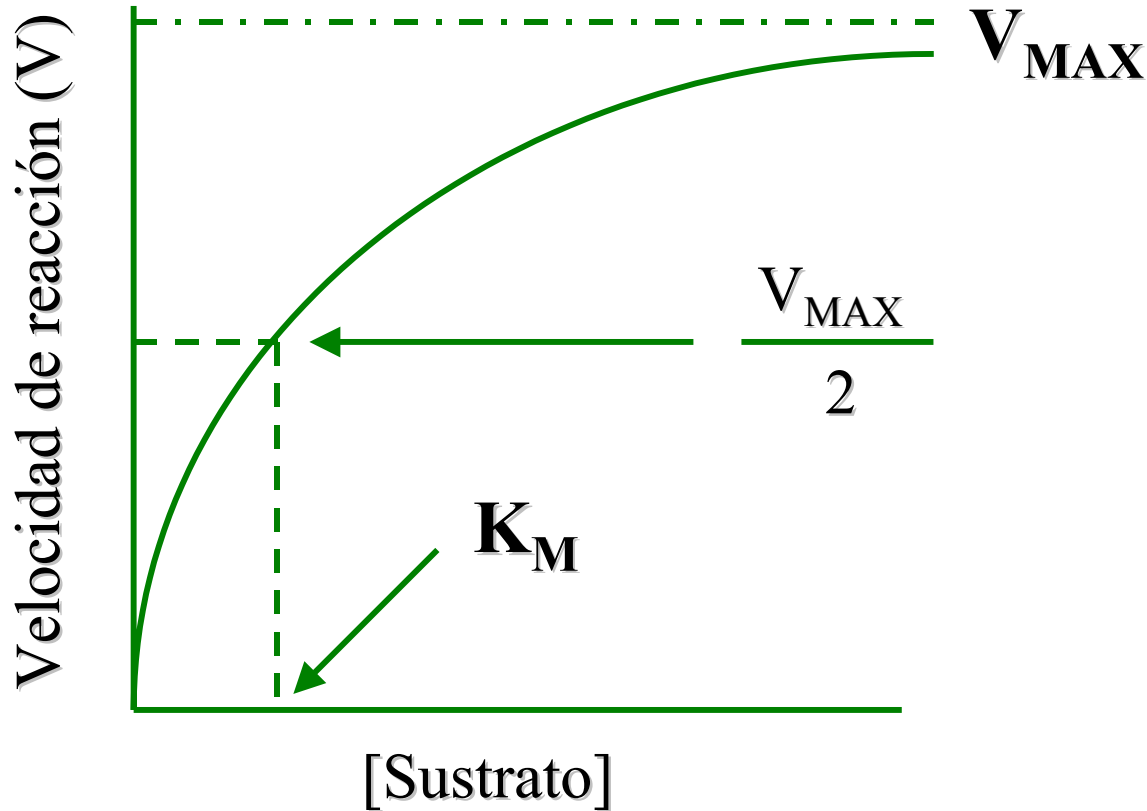


# Velocidad de reacción en función cantidad de sustrato



Velocidad: número de moles convertidos por unidad de tiempo

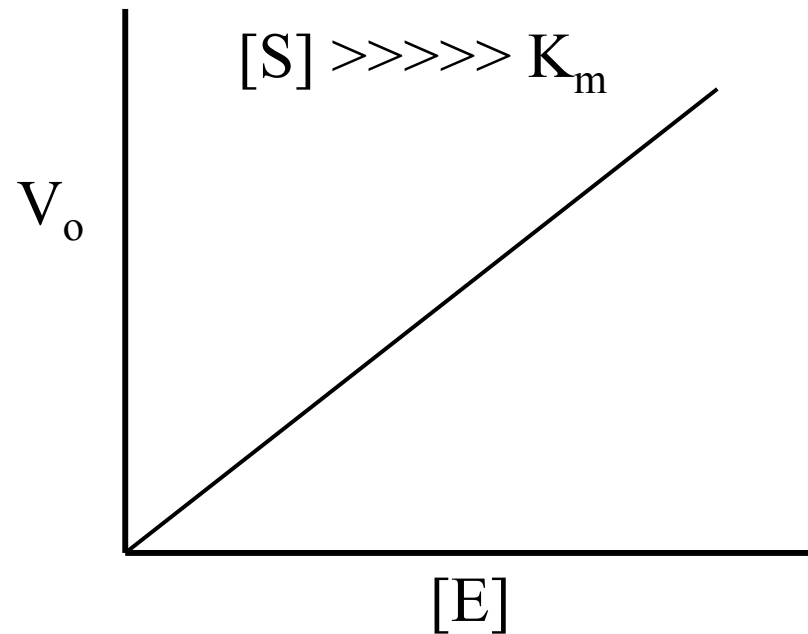
# Concepto de $V_{MAX}$ y $K_M$ de una reacción enzimática



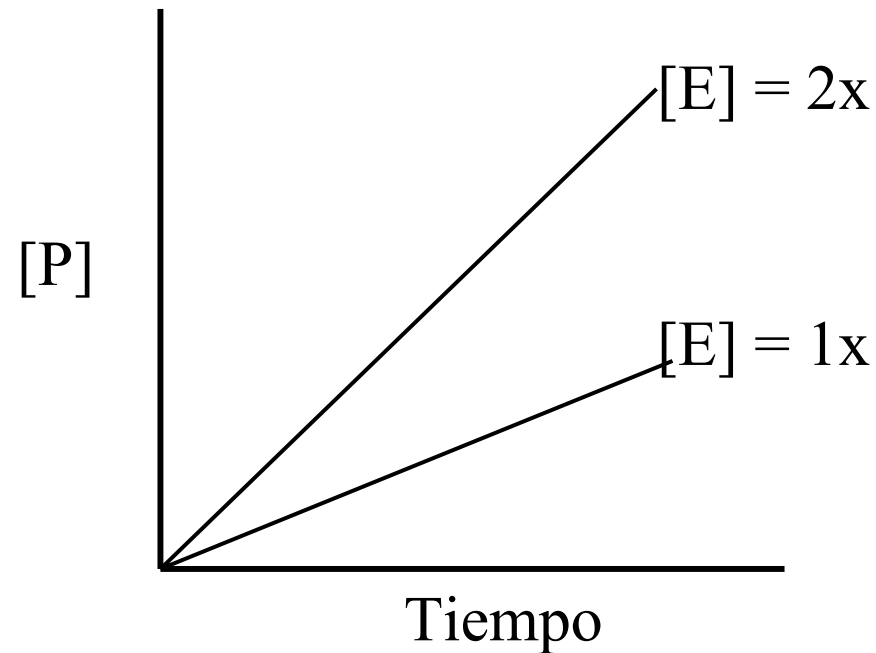
# Ensayo de actividad: ¿Cuanta enzima está presente?

Usar: pH óptimo, temperatura óptima, etc  
Cantidades saturantes de sustrato y cofactores

$$[\text{Sustrato}] = 10 \times K_m$$



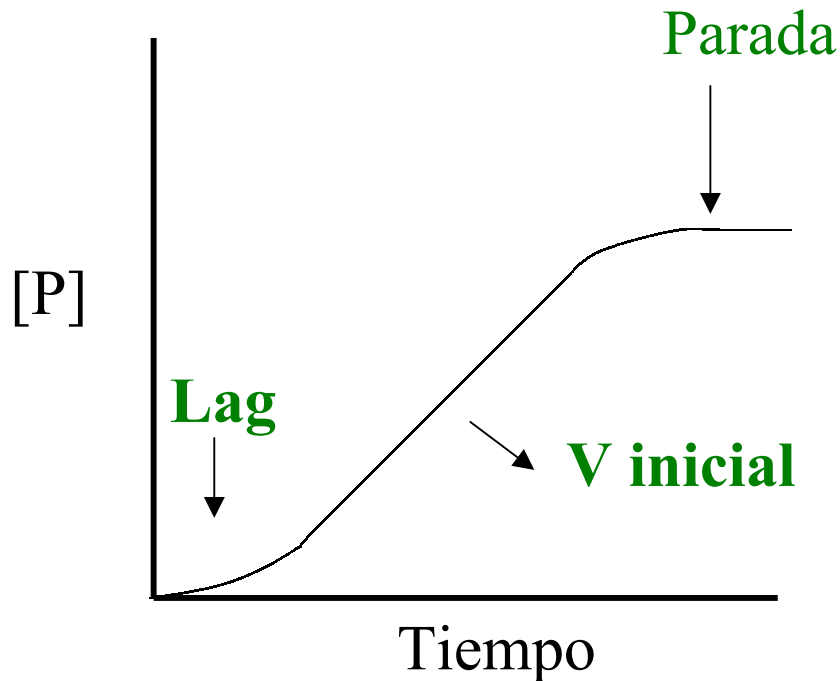
Linearidad con la cantidad de enzima



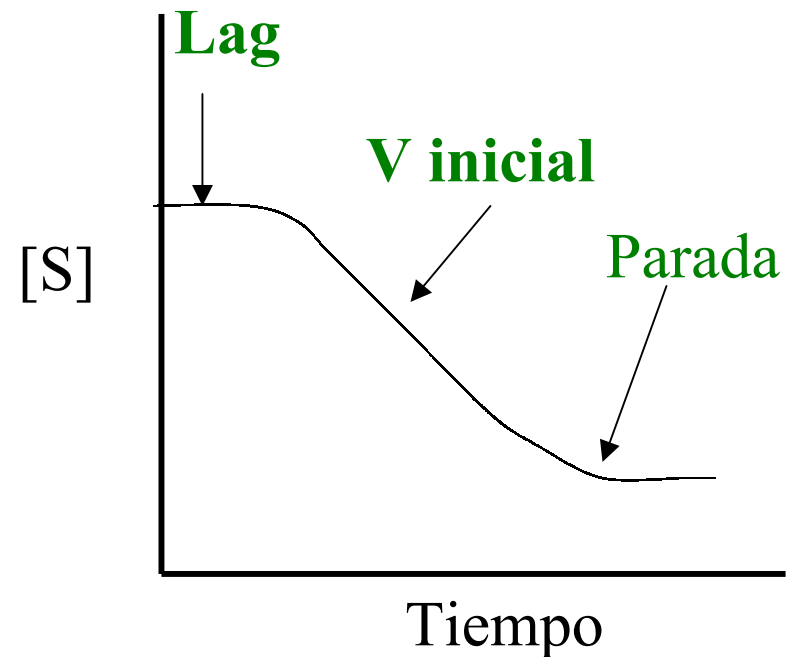
Linearidad con el tiempo de reacción

# Curvas de progreso de la reacción enzimática

Aparición de producto



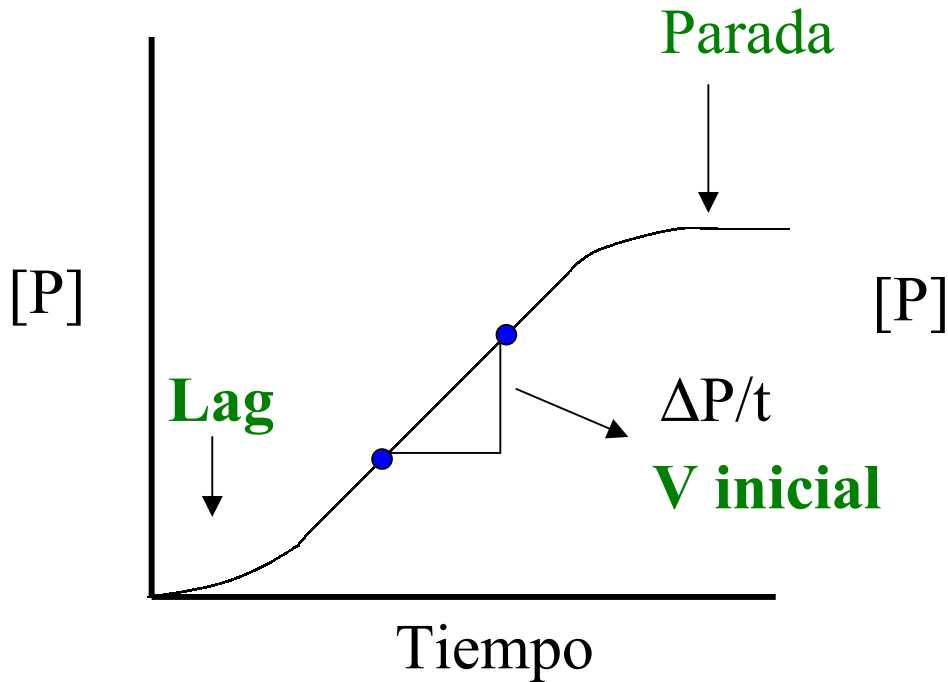
Desaparición de sustrato



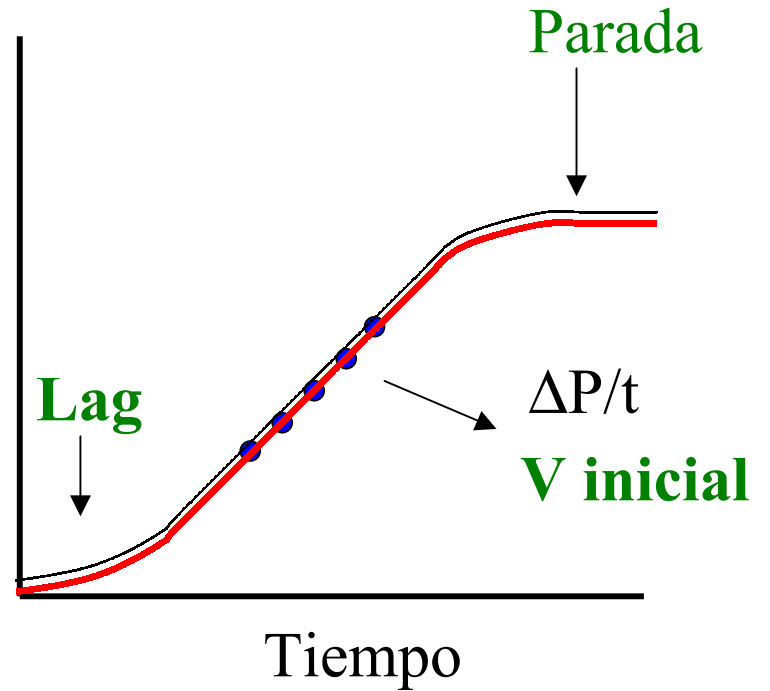
Velocidad inicial se considera cuando se ha consumido < 10% del sustrato

# Medición de actividad enzimática

Medición 2 puntos



Medición múltiple y continua



# Medición de actividad enzimática: métodos directos y acoplados

## Directo



Desaparición de absorbancia de NADH a 340 nm

## Acoplado



Desaparición de absorbancia de NADH a 340 nm

**E2= 5X E1; E3= 10 X E1. Concentraciones saturantes de sustratos: Creatina, ATP, PEP, NADH**

# Medición de enzimas como proteínas

- Un defecto enzimático es una disminución en la actividad de un enzima.
- Esto puede ser debido.
  - **Tipo I:** Cantidad reducida, pero la *actividad específica*\* es normal
  - **Tipo II:** Cantidad es normal, pero la *actividad específica*\* está reducida debido a un **defecto en el enzima**.

\**actividad específica* = actividad enzimática ( $\mu\text{moles/min}$ ) por mg de proteína



# Enzimas como Proteínas

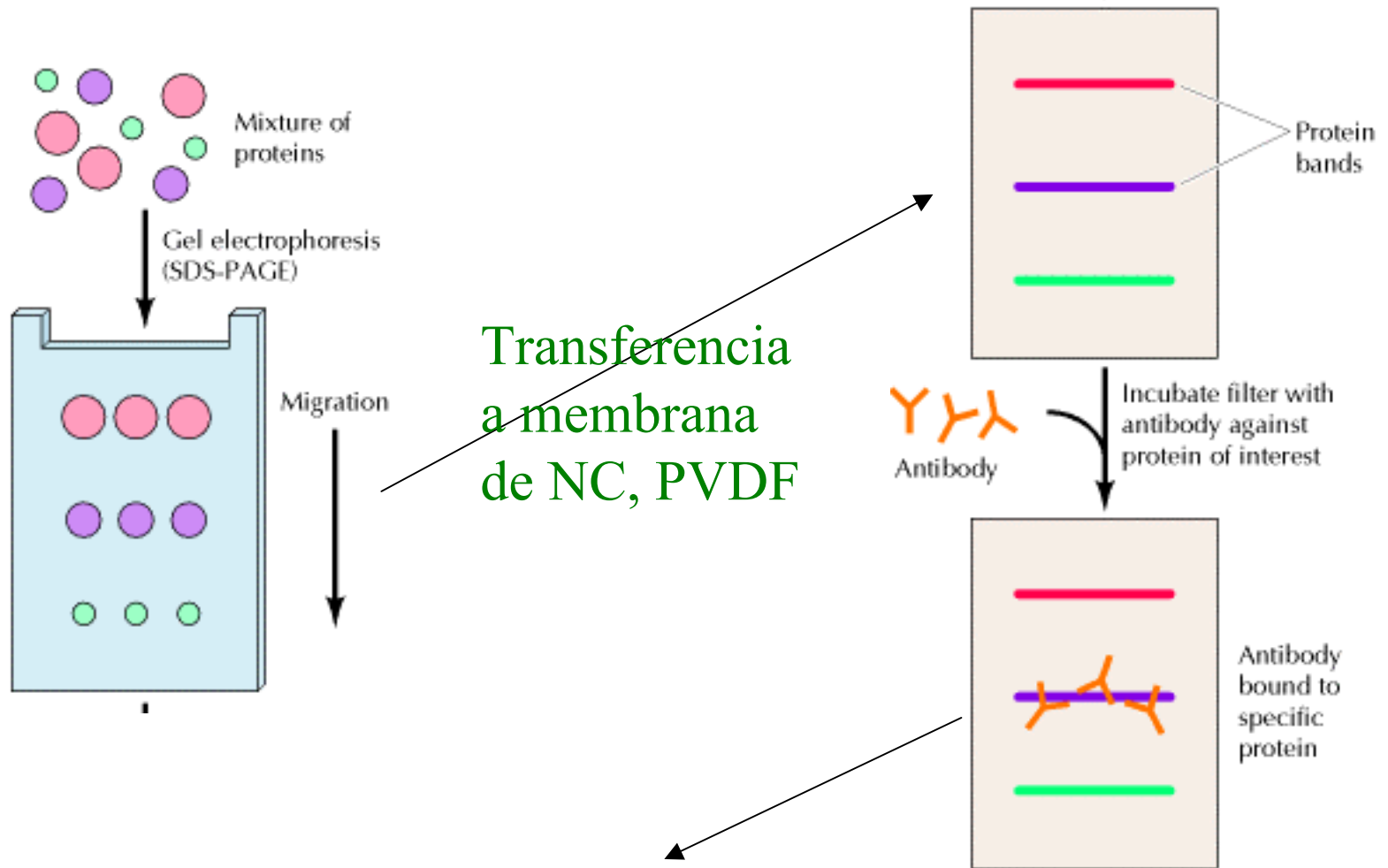
## (Ensayo enzimático vs. Ensayo inmunológico)

- Los enzimas se siguen ensayando por su actividad enzimática: desaparición de sustrato o aparición de producto. ES UNA AMPLIFICACION BASADA EN LA REACCION ENZIMATICA.
- Técnicas inmunológicas permiten medir la cantidad de enzima como proteína (independiente de su actividad):
  - ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) - *La detección de cualquier enzima por medio de anticuerpos específicos contra esa proteína*
  - Western blot (Detección de enzimas por anticuerpos específicos) - Nos da el peso molecular y la carga (IEF) -> isozimas
  - RIA (radioinmunoensayo)

# Western blot e Inmunoblot

- Proteínas se obtienen de suero ( o de células) , y se preparan en solución para cargar en los pocillos de un gel de proteínas (en condiciones nativas; o desnaturalizadas con detergentes, i.e. SDS). Se corre el gel y tras la electroforesis las proteínas separadas se transfieren a una membrana (nitrocelulosa, PVDF, etc). La membrana se bloquea los sitios inespecíficos y se añade anticuerpos contra la proteína que queremos detectar (anticuerpo primario). Se lava el exceso de anticuerpo no unido. Se incuba la membrana con un anticuerpo anti- anticuerpo primario que lleve unido covalentemente una enzima que permita detectar posteriormente donde se ha unido. Se revela el Iblot con los sustratos adecuados que darán lugar a la formación de color o a la emisión de luz (quimioluminiscencia)

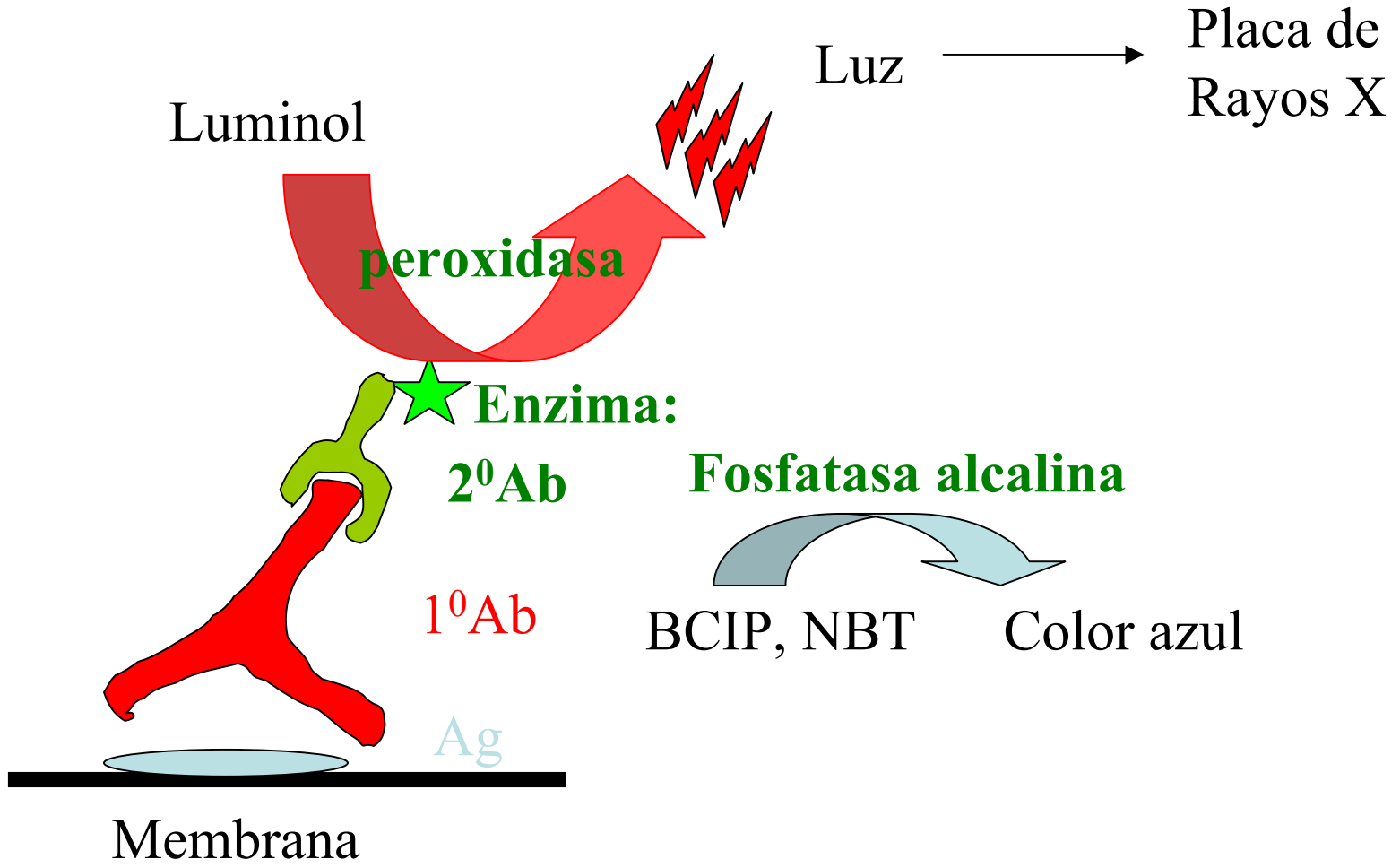
# Western e Inmunoblot



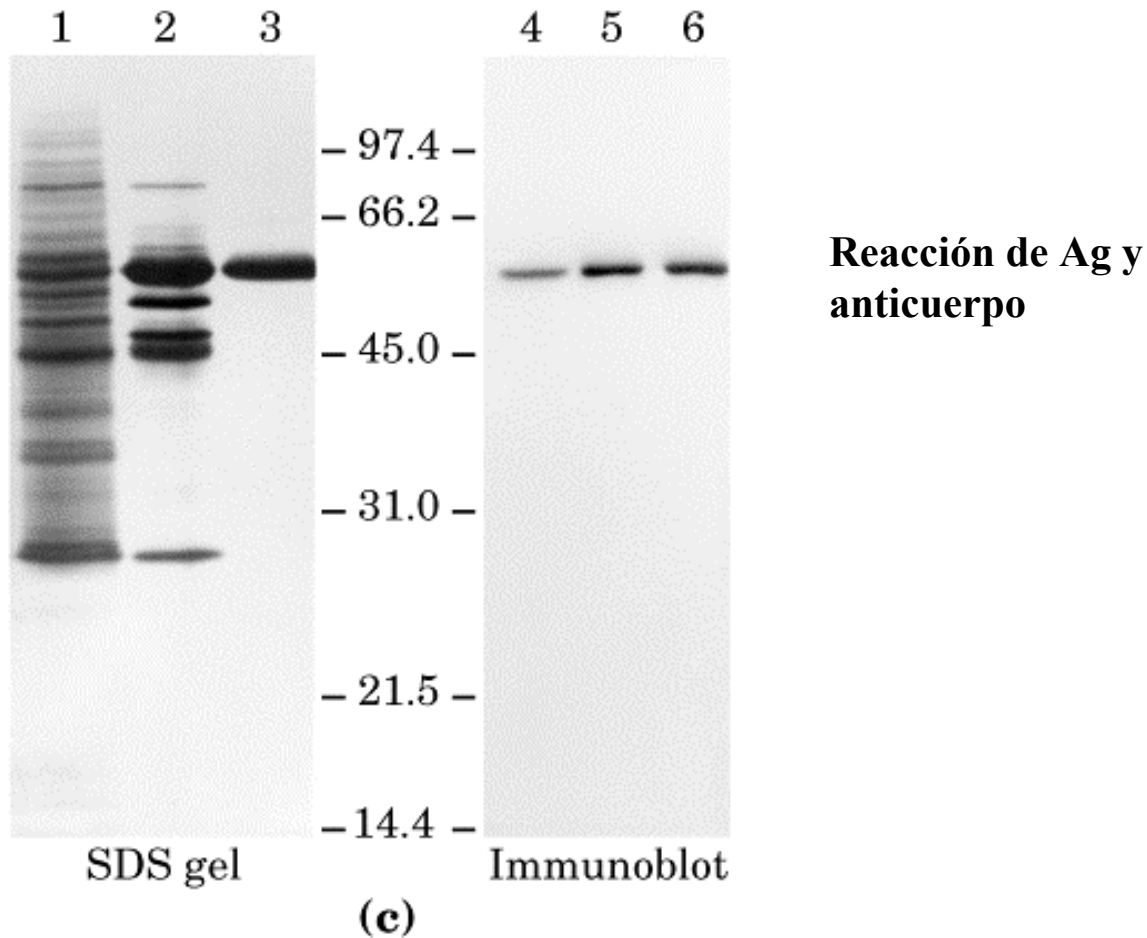
Transferencia  
a membrana  
de NC, PVDF

Revelado con  
Anticuerpo secundario

# Inmunoblot Revelado : quimio- luminiscencia y precipitado con color



# Resultados de un inmunoblot



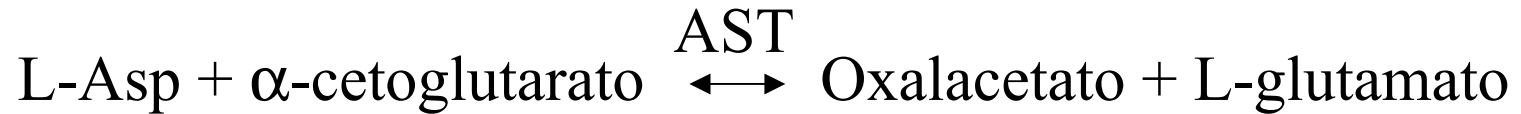
# Enzimas en suero útiles en diagnóstico clínico

Enzima	Fuente principal	Aplicación clínica
<b>Alanina transaminasa (ALT)</b>	Hígado >> Riñón	Daño o enfermedad hepática
<b>Aspartato transaminasa (AST)</b>	Corazón, Hígado, músculo, riñón	Infarto Miocardio, hígado, músculo
<b>Fosfatasa alcalina*</b>	Hígado, hueso	Remodelación hueso
<b>Amilasa*</b>	Glandulas salivares, PANCREAS	Enfermedades pancreáticas
<b>Creatina Kinasa* (CK)</b>	Corazón, Músculo y cerebro	Infarto Miocardio, músculo
<b>LDH</b>	Varios tejidos	Muy inespecífica
<b><math>\gamma</math>-glutamyltranspeptidasa</b>	Hígado y Riñón	Enfermedad hepatobiliar
<b>Prostate specific antigen (PSA)</b>	Prostata	carcinoma de prostata

\* isozimas específicas de tejido

# Transaminasas

(GOT)

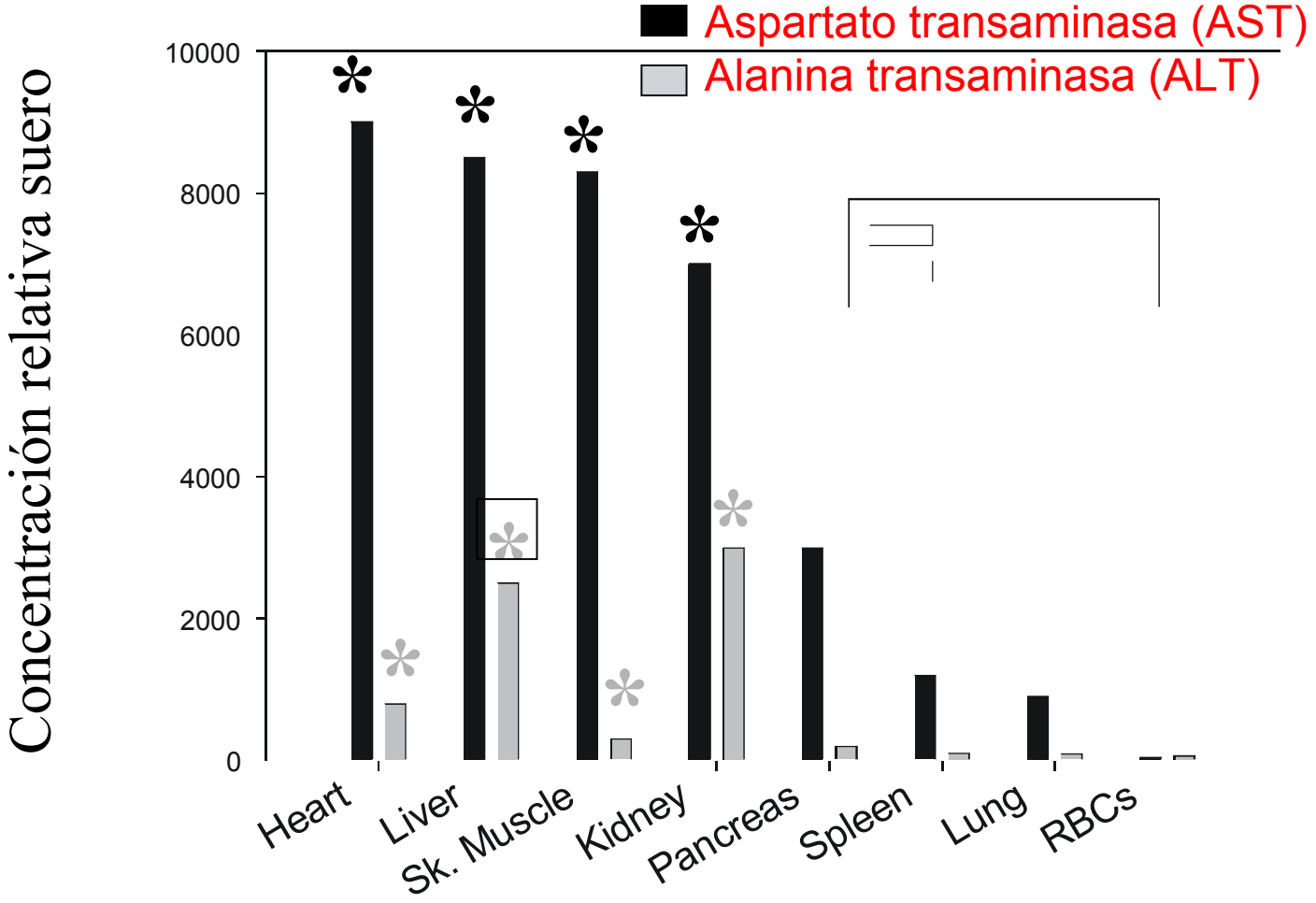


Cofactor: Piridoxal fosfato



(GPT)

# Especificidad de tejidos de AST y ALT





# Transaminasas

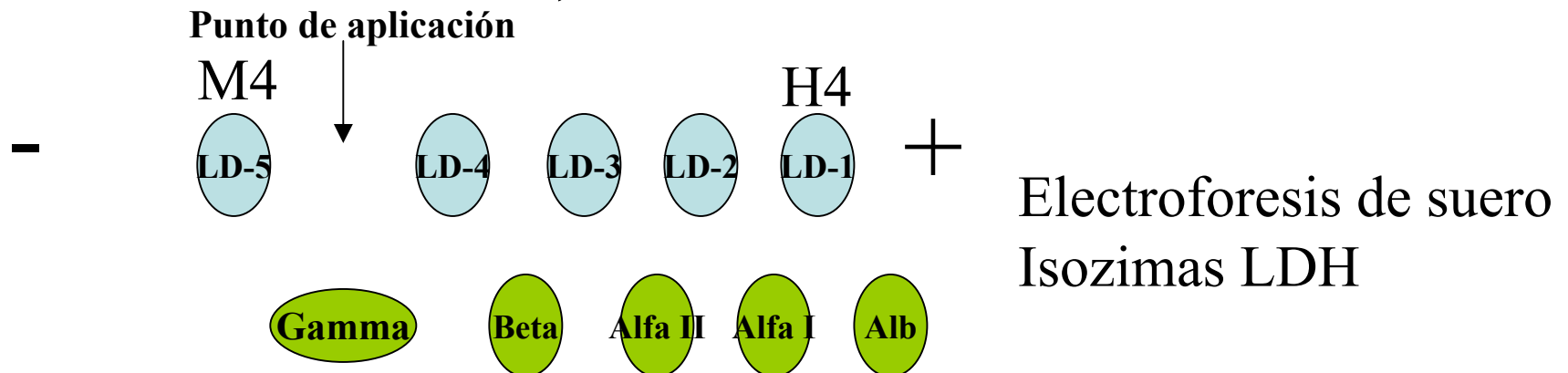
AST sube en suero: <b>10 a 100 X</b>	Infarto de miocardio Hepatitis viral Necrosis hepática Shock, hipoxia	ALT sube en suero Afectación hepática en paralelo a AST
AST sube en suero: <b>Moderado 2 X- 5X</b>	Cirrosis hepática Ictericia colestásica Metastásis hepática Enf. Musculoesqueléticas	

# LDH: lactato deshidrogenasa



Elevación en suero es muy inespecífica. Sube: Infarto miocardio. Insuficiencia cardíaca. Anemia Megaloblastica. Hepatitis. Cáncer metastasis. Traumatismos musculares. Distrofias musculares

Varias isozimas: H Heart, M Muscle. LDH X: testículo

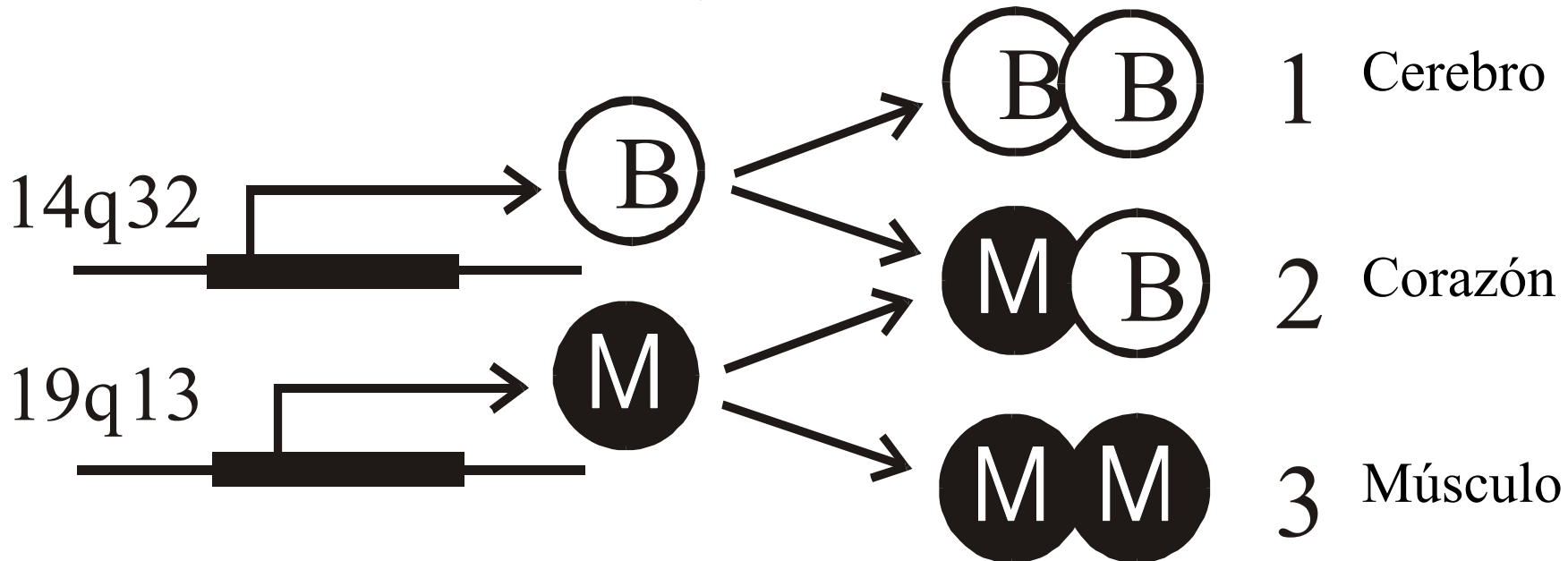


# Creatina Kinasa: Creatina (FosFo)Kinasa



Muy abundante en músculo esquelético y cardíaco, cerebro, estómago  
Poco abundante en hígado

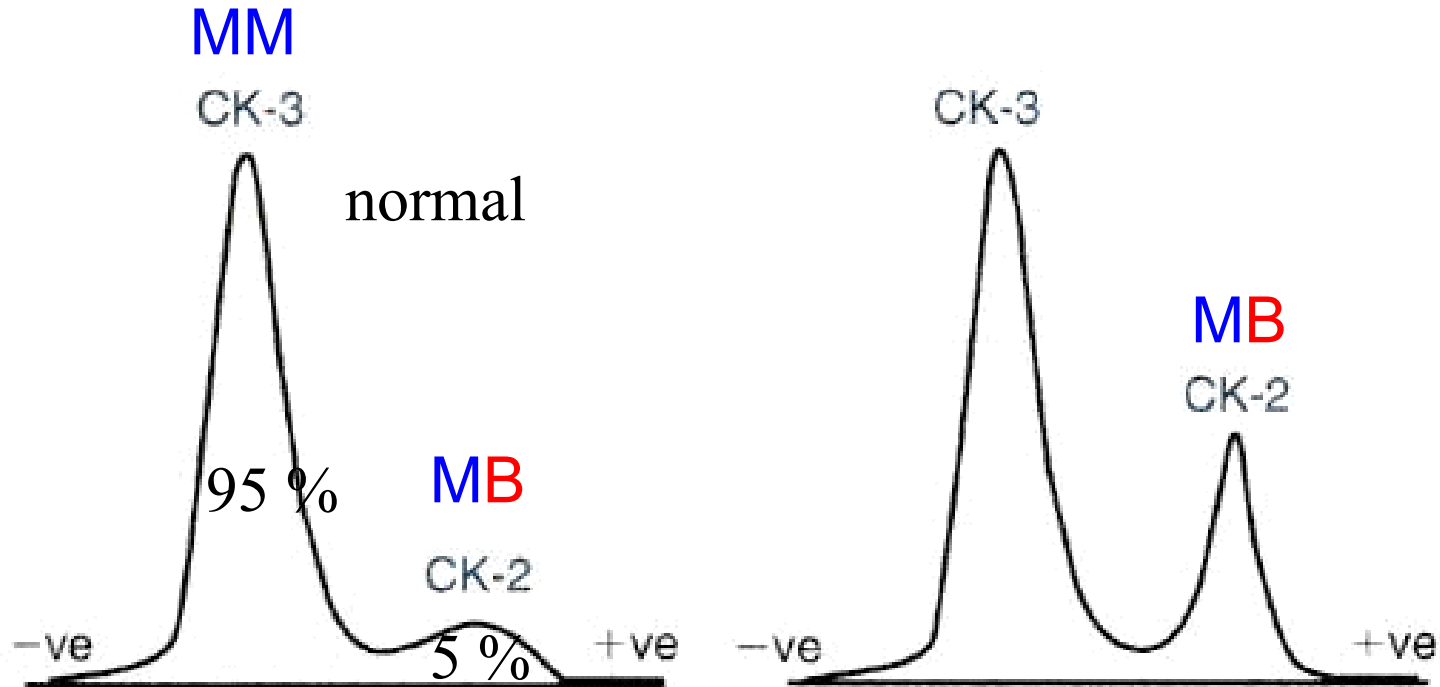
Isozimas: es un dímero de B y M. Combinaciones



# CK isozimas actividades en diversas patologías

Condición clínica	Creatina Kinasa Actividad (Units/L)			% CK-2
	Actividad Total	CK-3 (MM)	CK-2 (MB)	
Pacientes hospital no cardíacos	131	124	5.9	2.3
Pacientes inyección intramuscular	347	345 (2.7x -temp)	2	0.3
Infarto miocardio hasta 24h	1556	1338 (11x)	178 (30x -temp)	11
Distrofia muscular de Duchenne (varón)	1725	1052	673	39
Duchenne portador (hembra)	986	971 (7.8X-crónico)	15	1.5

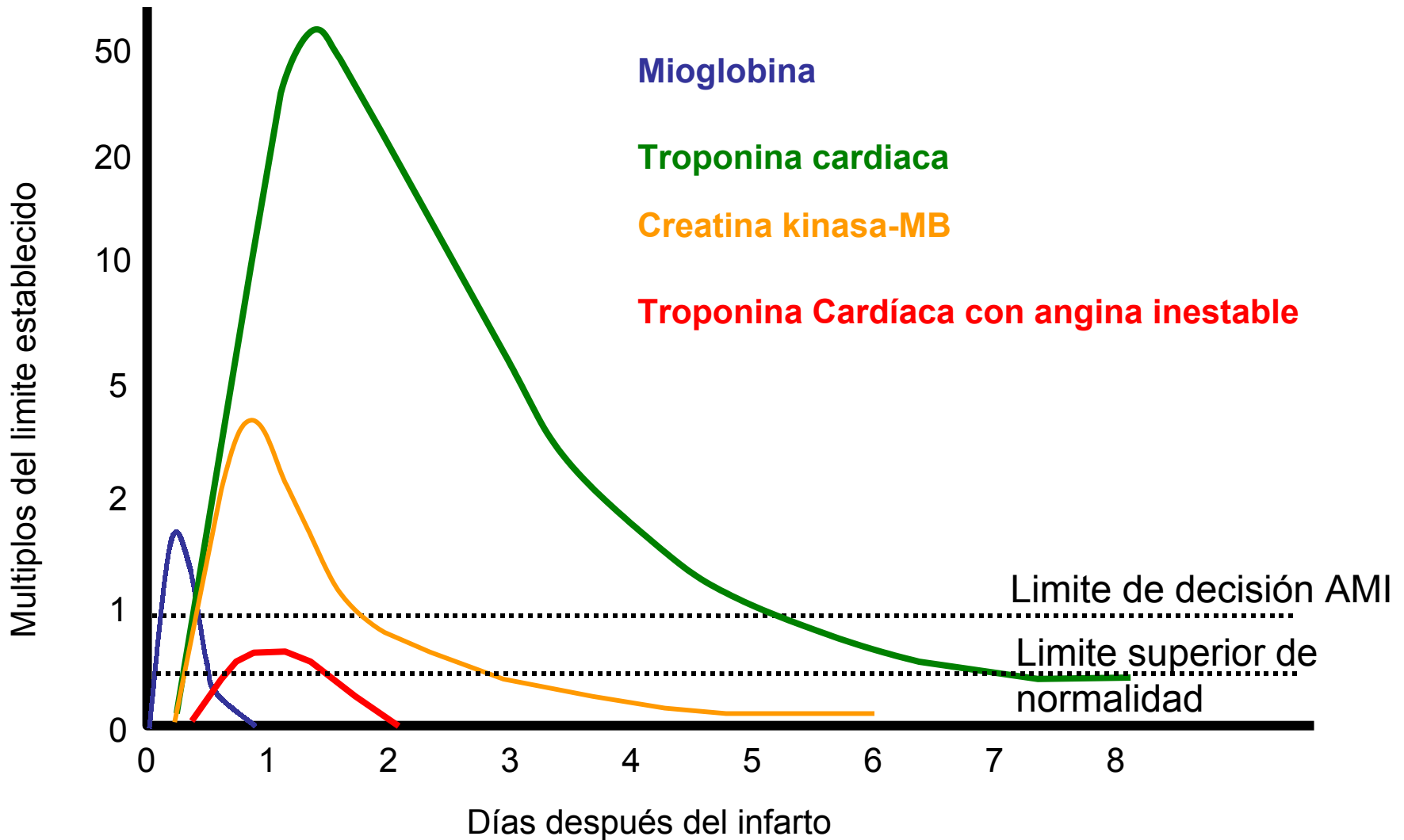
# Creatina kinasa isozimas en el Infarto de Miocardio



- CKMM CKMB CKBB +

Gamma Beta Alfa II Alfa I Alb

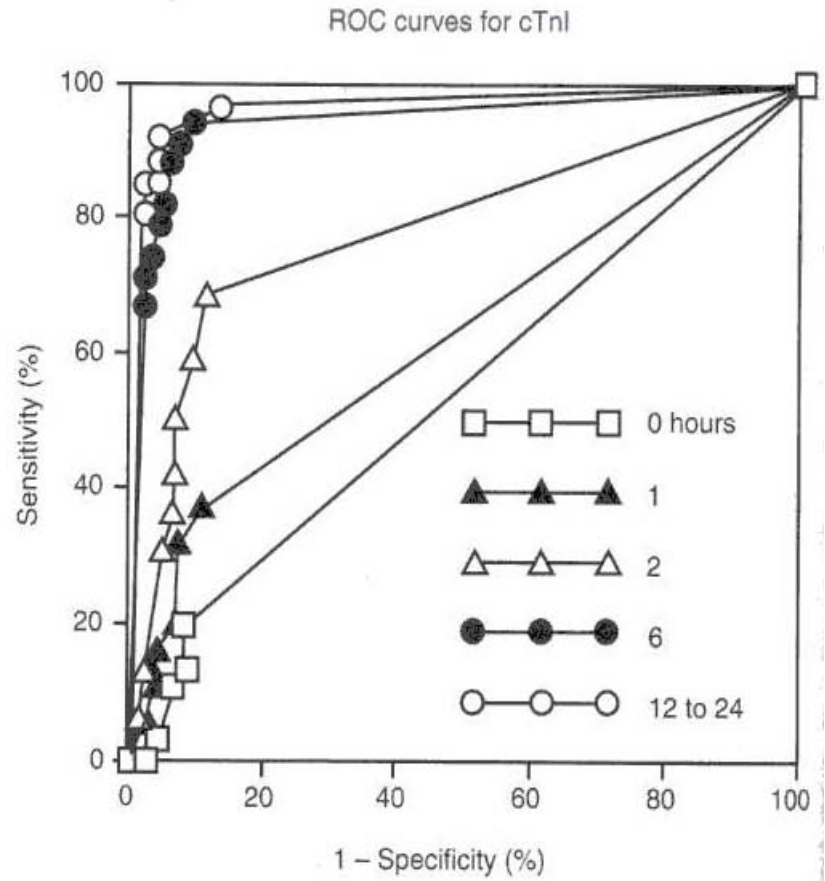
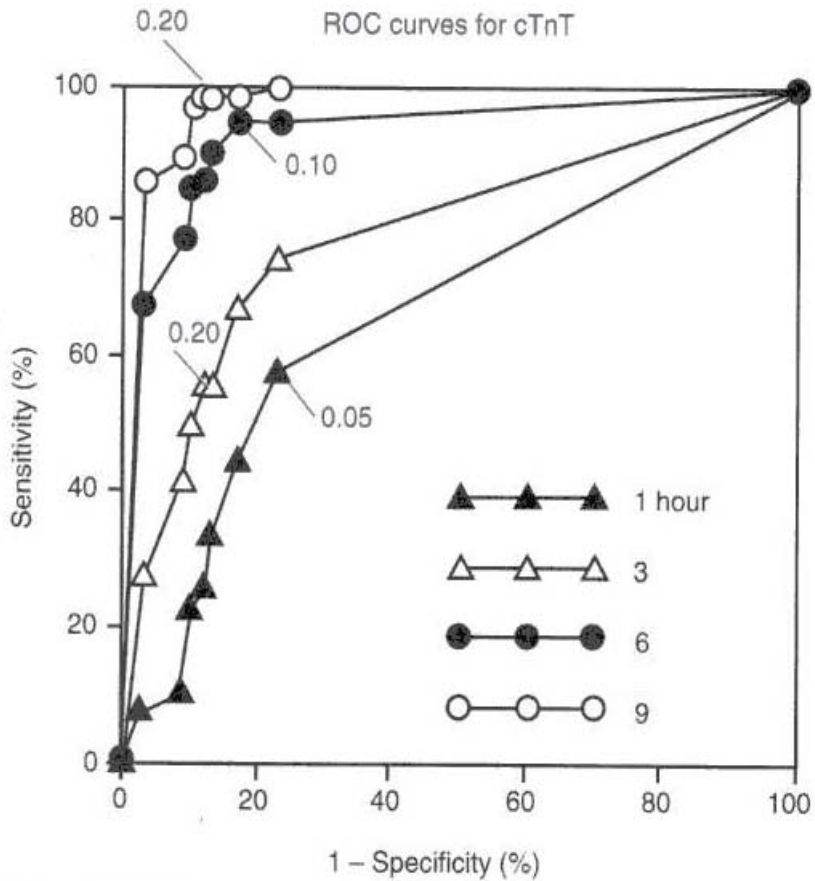
# Cambios en suero: Infarto de Miocardio



# Troponinas cardíacas

- **Troponinas T e I** son parte de la unidad motora del músculo y regulan la interacción de actina con miosina.
- Hay isozimas de Troponina T e I específicas cardíacas que pueden detectarse con técnicas inmunológicas muy sensibles.

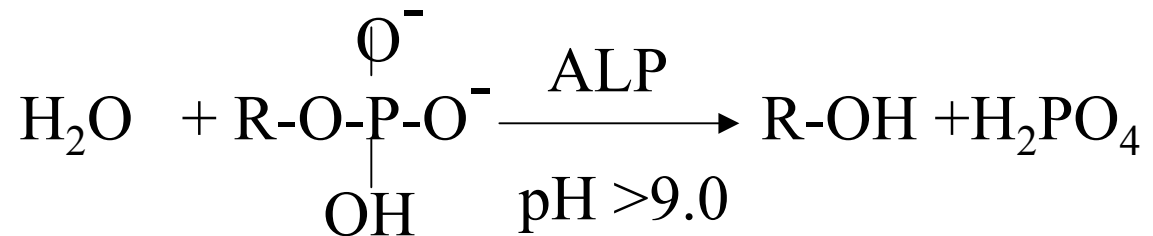
# Curvas ROC para TnT y TnI en el diagnóstico de Infarto de Miocardio





# Fosfatasa alcalina ALP (FA)

Es una glicoproteína de 74-92 kDa



Función ¿? Aumento absorción y excreción

Tejidos:            Hígado: Hepatocitos y Canalículos biliares  
                          Hueso: Osteoblastos (calcificación)  
                          Intestino, riñón: Membrana plasmática  
                          Placenta

# Fosfatasa alcalina: Isozimas



Normal	5	3 2	
Normal		3 2	
Niños		3 2	
Embarazo	4	3 2	
Colestasis	5	3 2	1

Isozimas ALP

1: Biliar o renal

2: Hepática

3: Osea

4: Placentaria

5: Intestinal

# La fosfatasa alcalina por ser una proteína secretada está glicosilada



Las proteínas del suero y extracelulares están **glicosiladas** con **ácido siálico (ácido N-acetilneuramínico)** como unidad terminal. Las proteínas intracelulares no están glicosiladas

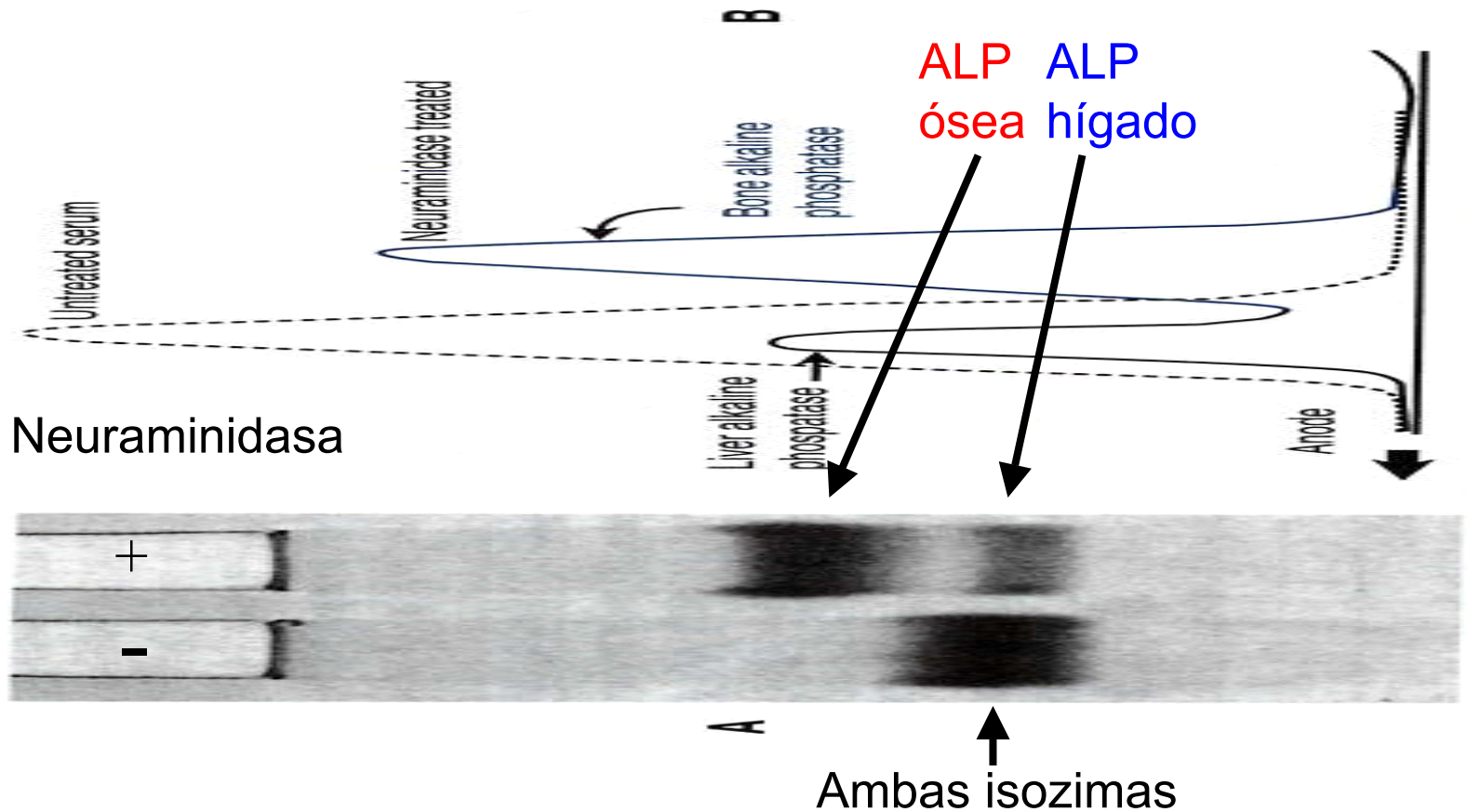
**Asialoglicoproteínas** son reconocidas por receptores de **asialoglicoproteínas y eliminadas por la bilis hepática**

influye en la vida media:

ALP intestinal minutos

ALP hepática 7 días

# El tratamiento de suero con neuroaminidasa (elimina ácido sialico) y permite diferenciar isoformas de ALP.



# Fosfatasa alcalina en Clínica

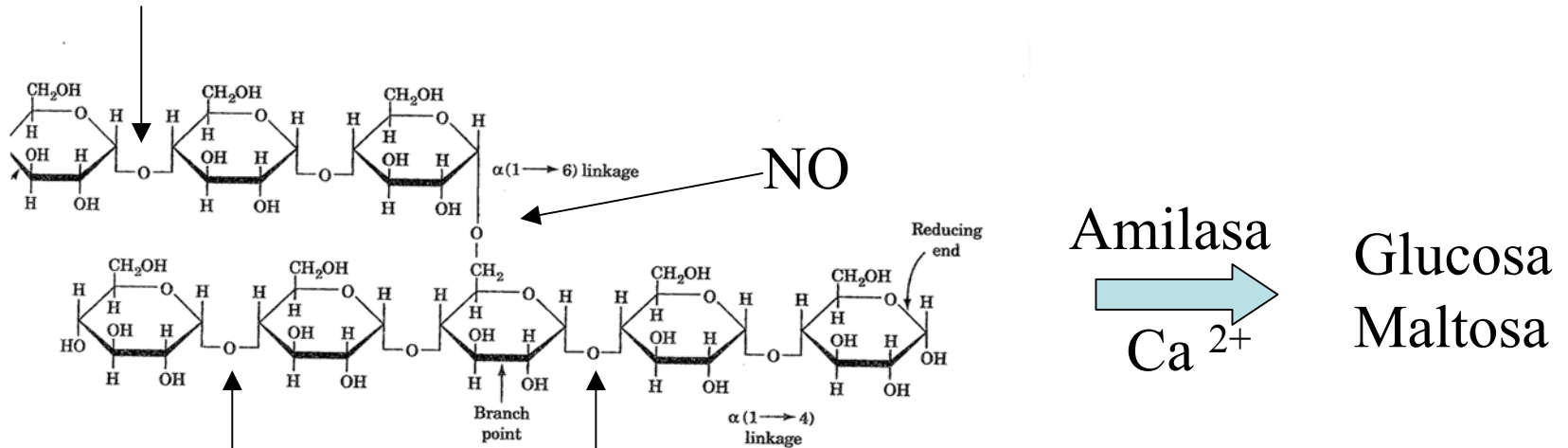
- Aumento de Actividad Total en suero:
  - Enfermedades óseas: Hiperparatiroidismo (con déficit de Calcio), Enfermedad de Paget, Tumores óseos, Osteomalacia y Raquitismo, Fracturas óseas
  - Enfermedades hepáticas: Ictericia obstructiva extrahepática. Cáncer o tumor hepático. Colestasis intrahepática. Hepatitis infecciosa. Cirrosis alcohólica
  - Adolescentes y niños: está elevada 2 a 3 veces. Crecimiento óseo

# Fosfatasa alcalina en Clínica

- Aumento de ALP por isozimas
  - **Isozima óseo**: Enfermedades óseas antes mencionadas. Infarto Pulmonar. Insuficiencia renal crónica.
  - **Isozima placentario**: Embarazo durante el tercer trimestre
  - **Isozima intestinal**: Alteraciones del Intestino delgado. Individuos con grupo sanguíneo B u O
  - **Isozima hepático**: las antes mencionadas. Pancreatitis aguda o crónica. Insuficiencia cardíaca congestiva. Cirrosis
  - **Isozimas no identificadas** (Regan o Nagao): en diversos tumores: cancer pulmonar, mama, ovario y colon

# Alfa-Amilasa

Hidroliza enlaces glicosídicos alfa 1-4 de almidón, glucógeno y otros polisacáridos. No hidroliza celulosa (beta 1-4), ni ramificaciones alfa 1-6. Dando lugar a glucosa, maltosa etc



Tejidos e isozimas: glándulas salivares: **isozima S (S1, S2, S3)**.  
Está también presente en: pulmón, hueso, ovario y tiroides  
páncreas: **isozima P (P1, P2, P3 muy poco)**  
cuello uterino y trompas, epitelio intestinal yeyuno

# Alfa-Amilasa. Significado clínico

Se eleva en suero especialmente en la **pancreatitis aguda**

Otras causas de elevación en suero:

úlcera perforada

oclusión intestinal

apendicitis aguda

Rotura de Embarazo ectópico

Adenocarcinoma pulmonar, ovario o páncreas

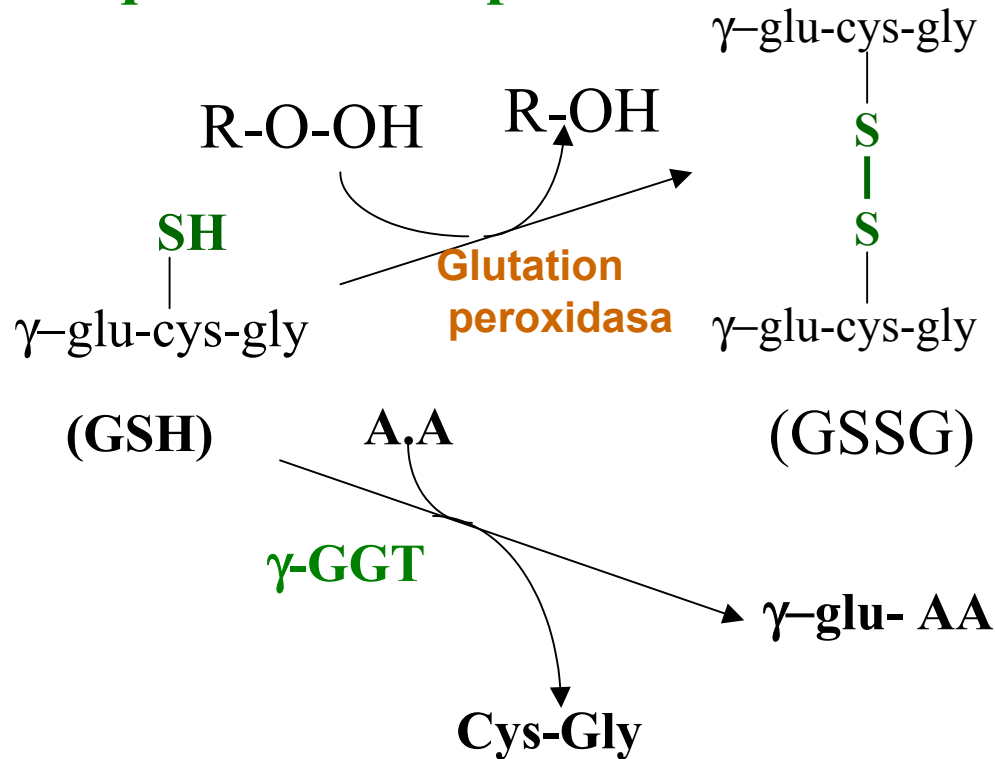
Hay una **hiperamilasemia no patológica** en el 1-2% de los individuos. Se debe a la unión de amilasa a IgG o IgA circulantes. Este complejo es demasiado grande para ser filtrado por el riñón y por eso se da la hiperamilasemia. No tiene significado patológico



# GGT: $\gamma$ -Glutamyltransferasa ( $\gamma$ -Glutamyltranspeptidasa)

$\gamma$ -glutamylcysteinylglycine ( $\gamma$ -glu-cys-gly) **Glutation**

$\gamma$ -GGT transfiere el  $\gamma$ -glutamilo a otro aminoácido. Es un enzima microsomal que se induce por consumo de alcohol, fenobarbital, etc



El enzima del suero es de origen hepático fundamentalmente

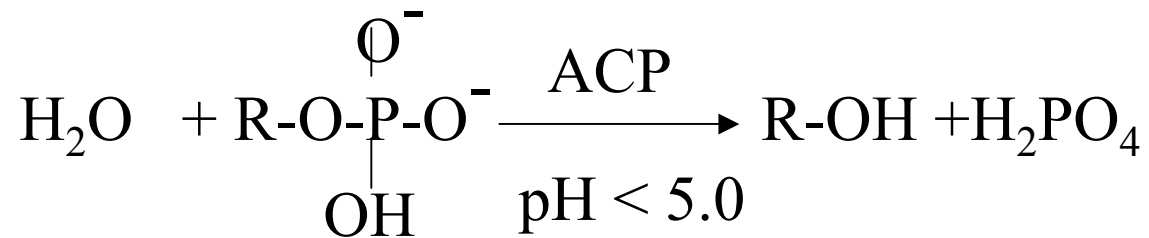
# GGT: $\gamma$ -Glutamyltransferasa

## Isozimas



	Gamma	Beta	Alfa II	Alfa I	Alb	
Normal			4	2		Elevación de $\gamma$ -GGT en suero:
Normal			4	3	2	Cancer hepático primario X 10-20
Hepatitis alcohólica			4	3	2	Metástasis hepática X10-15
Colestasis por drogas	5		4	2		Cirrosis biliar primaria X10-15
Cáncer hepático	5		4	2	1	Hepatitis crónica activa X 7
						<b>Colestasis intrahepática</b> X6
						<b>Colestasis extrahepática</b> X 5
						Hepatitis alcohólica X4
						Vigilancia del consumo de alcohol

# Fosfatasa ácida ACP



Función ¿?

Tejidos: Prostata 1000 veces superior a resto tejidos  
Hígado: Hepatocitos y Canalículos biliares  
Hueso: Osteoclastos (descalcificación)  
Riñón  
Plaquetas

**ACP.** Elevada en el **cáncer de próstata. Muy inespecífica.**  
**En la actualidad no se utiliza**

# PSA (Prostate Specific Antigen)

- **PSA** es una proteasa similar a la quimiotripsina (familia de la Kalikreína) producido por el epitelio prostático, y muy abundante en el fluido seminal. PSA se detecta en la mayor parte de los pacientes con cáncer de próstata. En el suero se encuentra formando un complejo con el inhibidor de proteasas alfa-1-antiquimiotripsina (ACT). En el cáncer de próstata un alto porcentaje de PSA se encuentra unido a ACT, más que en la hiperplasia prostática. Se determina por técnicas inmunológicas con anticuerpos específicos. Sus niveles disminuyen con la desaparición del cáncer de próstata, se utiliza para el seguimiento del tratamiento.

**Rango de PSA normales** varían con la edad: ng/ml

40 - 49	0.0 - 2.5
50 - 59	0.0 - 3.5
60 - 69	0.0 - 4.5
70 - 79	0.0 - 6.5