

La energía de activación como marcador de heterogeneidad enzimática: Utilidad en bioquímica clínica

José Carlos Tutor*

Laboratorio Central, Hospital Clínico Universitario.
Instituto de Investigación Sanitaria (IDIS). Santiago de Compostela.
Recibido el 15 de diciembre de 2010.

RESUMEN

La energía de activación (E_a) puede proporcionar datos de interés en estudios de caracterización de la heterogeneidad enzimática, tanto para sistemas enzimáticos presentando verdaderas isoenzimas como formas moleculares de origen post-traduccional. En el presente artículo se hace una revisión bibliográfica de los datos previamente publicados para distintas enzimas de utilidad diagnóstica, como creatina kinasa, α -amilasa, lactato deshidrogenasa, aspartato-amino-transferasa, fosfatasa alcalina, γ -glutamilttransferasa, 5'-nucleotidasa, alanino aminopeptidasa y β -N-acetilhexosaminidasa. Asimismo, se sugieren posibles líneas de investigación, en las que esta variable termodinámica podría proporcionar datos interesantes para otras enzimas con aplicación clínica.

Palabras clave: Energía de activación; heterogeneidad enzimática; creatina kinasa; α -amilasa; lactato deshidrogenasa; aspartato aminotransferasa; fosfatasa alcalina; γ -glutamilttransferasa; 5'-nucleotidasa; alanino aminopeptidasa; β -N-acetilhexosaminidasa.

ABSTRACT

The activation energy as a marker of enzyme heterogeneity: Usefulness in clinical biochemistry

The energy of activation (E_a) may provide interesting data in the studies of enzyme heterogeneity characterization, both for enzyme systems having true isoenzymes or molecular forms with a post-transcriptional source. In this article a bibliographical review is carried out on the previously published results for several enzymes with diagnostic usefulness, as the creatine kinase, α -amylase, lactate dehydrogenase, aspartate aminotransferase, alkaline phosphatase, γ -glutamyltransferase, 5'-nucleotidase, alanine aminopeptidase, and β -N-acetylhexosaminidase. Likewise, possible investigation lines are suggested, in which this thermodynamic variable would to give interesting data for other enzymes with clinical usefulness.

Keywords: Activation energy; enzyme heterogeneity; creatine-kinase; α -amylase; lactate-dehydrogenase; aspartate-aminotransferase; alkaline phosphatase; γ -glutamyltransferase; 5'-nucleotidase; alanine-aminopeptidase; β -N-acetylhexosaminidase.

1. INTRODUCCIÓN

La magnitud termodinámica que determina si una reacción química tiene lugar espontáneamente es el cambio de *energía libre de Gibbs* (G), que expresa la capacidad del sistema para realizar trabajo. Para que pueda tener lugar de forma espontánea la transformación química de un substrato S en un producto P , el ΔG ($GP-GS$) ha de ser negativo, es decir la energía libre asociada a P (GP) debe ser menor que la asociada a S (GS), determinando su magnitud las concentraciones relativas de S y P en el estado de equilibrio.

Según la teoría del estado de transición, la transformación de S en P tiene lugar a través de un estado intermedio de transición (S^*), en equilibrio con S y presentando una energía libre mayor. A la diferencia entre la energía libre de S^* y S , se denomina *energía de activación* (E_a), y constituye una barrera energética para el transcurso de la reacción entre S y P . Solo las moléculas de S que posean un exceso de

energía suficiente para salvar la barrera energética y llegar a S^* , pueden transformarse en P . Evidentemente, la proporción de moléculas de S capaces de cumplir este requerimiento es tanto mayor cuanto menor sea la Ea de la reacción.

Como cualquier catalizador, las enzimas aceleran las reacciones químicas disminuyendo la Ea asociada al estado de transición, lo que conduce a la existencia de un mayor número de moléculas de S con una energía suficiente para salvar la barrera energética de S^* . La determinación de la Ea aparente se basa en la dependencia de la actividad enzimática con la temperatura de acuerdo con la ecuación de Arrhenius (1):

$$\ln (U/L) = -Ea/RT + \ln A$$

siendo Ea la energía de activación aparente (kJ/mol), R la constante universal de los gases ($8,3143 \times 10^{-3}$ kJ/mol x grado), T la temperatura absoluta (°K) y A el factor de colisión que se asume 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 Ea aparente a partir de la pendiente (b) de la ecuación determinada por regresión lineal:

$$-Ea/RT = b/T; Ea = -8,3143 \times 10^{-3} \times b \text{ (kJ/mol)}$$

La Ea es la barrera energética que debe ser superada para que la reacción tenga lugar, y consecuentemente una elevada Ea equivale a una baja actividad catalítica específica de la enzima (actividad por unidad de masa de proteína enzimática) (2).

Hace algunos años se concedió gran interés al estudio de la Ea de distintas reacciones enzimáticas con vistas a su posible relación con la adaptación bioquímica de las especies a las condiciones de temperatura del medio. Las enzimas de los animales de sangre fría son más eficientes para reducir la barrera energética (menor Ea), que los sistemas enzimáticos homólogos de aves y mamíferos (3). En este sentido, para distintas especies de peces se ha descrito una correlación positiva significativa de la Ea de una ATPasa miofibrilar con la temperatura del medio en que habitan (4).

El estudio de la *Ea* ha proporcionado datos de interés, tanto desde un punto de vista académico como práctico, para distintas enzimas de utilidad diagnóstica y ampliamente utilizadas en la práctica clínica. A continuación se hace una revisión de los datos publicados al respecto.

2. CREATINA QUINASA (CK, EC 2.7.3.2)

La CK presenta localización mayoritariamente citosólica, con una estructura dimérica compuesta por subunidades polipeptídicas B (cerebro) y M (músculo). Se han 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 conducen a una mayor heterogeneidad enzimática, con tres isoformas de la CKMM y dos de la CKMB. Las formas tisulares CKMM3 y CKMB2 son transformadas después de su cesión al plasma por la N-carboxipeptidasa circulante con formación de las isoformas CKMM2, CKMM1 y CKMB1.

Los estudios de Hagelauer y cols. (2, 5) pusieron de manifiesto una *Ea* creciente para las isoenzimas de la CK en orden CKMM (49 kJ/mol), CKMB (58 kJ/mol) y CKBB (62 kJ/mol), coincidente con su termolabilidad (2). En mezclas de isoenzimas CKMM y CKBB se encontró una adecuada concordancia entre los valores experimentales y los calculados para la *Ea* aparente (2), lo que permitiría estimar la proporción relativa de ambas isoenzimas en función de la *Ea*; sin embargo, el asunto se complica al considerar la posible presencia de la isoenzima CKMB con *Ea* de valor intermedio.

El envejecimiento *in vitro* en condiciones fisiológicas de pH durante 72 h a 37 °C de las isoenzimas CKMM y CKMB, condujo a una disminución de su actividad catalítica (inactivación) acompañada de un aumento gradual de sus *Ea*, sin que se produjesen cambios significativos para la concentración estimada de ambas isoenzimas (2). Consecuentemente, esta inactivación podría deberse a una disminución de la actividad catalítica específica resultado de la formación de una mezcla de formas enzimáticas más o menos inactivadas, y no de acuerdo con un proceso de inactivación del todo o nada (2).

En pacientes con infarto de miocardio la concentración estimada de CK total aumentó inicialmente en paralelo con la actividad catalítica, alcanzando el máximo aproximadamente 24 h más tarde, y disminuyendo después más lentamente (5). Así mismo, 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 más tarde (5, 6), con un perfil coincidente con el obtenido en el estudio de inactivación por envejecimiento *in vitro* (5). El posible efecto de distintas proporciones de isoenzima CKMB con respecto a la CK total sobre la E_a aparente sería despreciable, debido a su pequeña actividad catalítica en relación a la isoenzima CKMM, por lo que el aumento de E_a se debería a modificaciones de la subunidad M (6). La CKMM cedida al plasma sería la forma nativa CKMM3 (49,8 kJ/mol), con una consiguiente transformación en CKMM2 (60.3 kJ/mol) y CKMM1 (67.5 kJ/mol) (6). La evolución de la actividad sérica de la CK en pacientes con infarto miocárdico, es el resultado de dos procesos: escape de la enzima al medio extracelular y su consiguiente inactivación, existiendo una correlación entre la concentración enzimática y la actividad catalítica únicamente en la fase inicial post-infarto (5).

Delanghe y cols. (7), encontraron que en las 4-72 h 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 compatible con la desnaturalización de esta isoenzima después de su cesión al plasma; sin embargo, la disminución de la actividad específica es menor que la esperable en función del aumento de E_a observado, y posiblemente debido a cambios conformacionales en la molécula CKMB (7).

La CK contiene restos de manosa, galactosa, N-acetil-glucosamina, y ácido siálico. Como demostraron Langlois y cols. (8), las formas glucosiladas de la CK sérica presentan una E_a significativamente mayor que las formas no glucosiladas (105.6 kJ/mol vs 58.1 kJ/mol). Asimismo, la glucosilación de la CK cardiaca y muscular se asocia con un aumento de E_a , 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 E_a (8). La presencia de restos ácido siálico y sulfato contribuyen a la estabilidad de la molécula 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* (8). 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 post-infarto miocárdico o trauma muscular, debido 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 la enzima circulante, de acuerdo con el concepto general de desnaturalización de enzimas tisulares después de su cesión al medio extracelular (2, 5).

Con el término “macroenzimas” se denomina a formas enzimáticas séricas presentando una masa molecular mucho mayor que la correspondiente enzima normalmente encontrada en condiciones fisiológicas o fisiopatológicas (9, 10). Estas formas macromoleculares pueden formarse por asociación de la enzima con inmunoglobulinas, generalmente IgG o IgA y solo ocasionalmente IgM (macroenzimas tipo 1), o por asociación con otros componentes séricos (lipoproteínas, fragmentos membranas celulares...) o incluso polimerización de la propia molécula enzimática (macroenzimas tipo 2). Como estas formas macromoleculares son aclaradas mucho más lentamente que las correspondientes enzimas, se acumulan en plasma y la aumentada actividad catalítica puede conducir a una interpretación diagnóstica errónea. Este hecho concede gran interés a la detección y caracterización de macroenzimas en el laboratorio clínico.

Se ha descrito la posible formación de macroenzimas tanto de tipo 1 como de tipo 2 para la CK. La macro-CK tipo 1 es un complejo con inmunoglobulinas, mientras que la más infrecuente macro-CK tipo 2 es probablemente la forma oligomérica de la enzima mitocondrial, detectada en el suero de pacientes con intensa degradación tisular de origen tumoral (11). La prevalencia de elevada actividad CK debida a macro-CK tipo 1 es de aproximadamente el 2%, habiéndose recomendado para su detección sistemática la precipitación con polietilén-glicol relativamente específica para complejos de enzimas con inmunoglobulinas (11).

Ambos tipos de macro-CK pueden ser reconocidos 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 (12). Para la macro-CK tipo 1 (CKBB-IgG) encontraron una $E_a = 53$ kJ/mol, semejante a la CKBB ($E_a = 58$ kJ/mol). Para la macro-CK tipo 2 encontraron una $E_a = 142$ kJ/mol, semejante a los valores obtenidos para la CK mitocondrial de corazón (142 kJ/mol) y 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 la obtención por inactivación térmica (20 min a 45 °C) de 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 (12).

3. α -AMILASA (AMIL, EC 3.2.1.1)

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

Hafkenscheid y Hessels encontraron una considerable variación para la E_a aparente de la AMIL sérica al utilizar distintos sustratos, y sugirieron que a esta variabilidad podría contribuir la distinta proporción relativa de isoenzimas (13). 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 (13). Las E_a obtenidas para las isoenzimas séricas son análogas a las de las formas tisulares purificadas AMILP (45.0 kJ/mol) y AMILS (40.1 kJ/mol) (14). El hecho de que no se encontrase una diferencia significativa entre las E_a de las isoenzimas séricas y las formas tisulares 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 permitiría la evaluación termodinámica de la proporción relativa de ambas isoenzimas en suero.

4. LACTATO DESHIDROGENASA (LDH, EC 1.1.1.27)

La LDH es una oxidorreductasa localizada en la fracción citosólica de prácticamente todos los tejidos del organismo. La molécula 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. (15) evidencian una distinta *Ea* para las isoenzimas LDH1 y LDH5, sin embargo, al menos en nuestro conocimiento, este hecho no ha sido aún utilizado como marcador de la heterogeneidad enzimática de la LDH sérica en condiciones clínicas en que interese discriminar el predominio del homotetrámero HHHH o del MMMM.

5. ASPARTATO AMINOTRANSFERASA (AST, ED 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 corazón. Presenta dos isoenzimas, una de localización citosólica (ASTcit) que es mayoritaria en suero, y otra mitocondrial (ASTmit), cuyo aumento en suero indica un daño parenquimatoso severo.

Rej y Vanderlinde (16) pusieron de manifiesto que las isoenzimas tisulares humanas purificadas ASTcit y ASTmit presentan igual *Ea* (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 total o sus isoenzimas purificadas. Estos resultados imposibilitan la utilización de la *Ea* para el estudio de la composición isoenzimática de la AST. Se ha descrito la presencia en suero de complejos macromoleculares de la AST con inmunoglobulinas; sin embargo, no parece probable que la determinación de la *Ea* tenga un interés práctico para la detección de macro-AST circulante.

6. FOSFATASA ALCALINA (FAL, EC 3.1.3.1)

La FAL, como la γ -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 diferentes modificaciones post-traduccionales que conducen a una gran variedad de isoformas. Las formas de origen intestinal y placentario son verdaderas isoenzimas, mientras la FAL de origen hepático, biliar, óseo y renal son isoformas derivadas de una sola isoenzima.

Copeland y cols. (17) 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. (18), en un estudio sobre la heterogeneidad post-traduccionales 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. Así mismo, 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 1 h, 2 h y 3 h de incubación respectivamente (18). 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 menor actividad enzimática específica y mayor *Ea*.

7. γ -GLUTARILTRANSFERASA (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 mayo-

ritariamente de origen hepático. Aunque no se han caracterizado verdaderas isoenzimas genéticamente determinadas, esta enzima presenta una gran heterogeneidad 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 (19, 20). Delanghe y cols. (19, 20) 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. El tratamiento de muestras patológicas con neuraminidasa para eliminar los restos terminales de ácido siálico de la molécula GGT, condujo a una disminución significativa de la *Ea*. Así mismo, las formas enzimáticas ricas en ácido siálico, separadas por cromatografía de afinidad, presentaron una *Ea* significativamente mayor que las formas pobres en ácido siálico (19).

8. 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 sérica resulta de la unión de la enzima a lipoproteínas y a fragmentos de membranas plasmáticas, y a la variabilidad de su porción glucídica, pero no presenta verdaderas isoenzimas.

Utilizando distintos sustratos se obtuvieron diferentes valores para la *Ea* de la 5'NU (21), de modo análogo a lo señalado para otras enzimas (13, 17). En enfermedades hepatobiliares 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 hepato-

citarios (21). 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 significativa de la *Ea* de la 5'-NU en el grupo de pacientes hasta 63.6 kJ/mol ($p < 0.001$), pero no en los controles sanos (56.7 kJ/mol) (21). Estos resultados confirman un aumento del grado de sialilación de la molécula de 5'NU en pacientes con enfermedad hepática.

9. ALANINO AMINOPEPTIDASA (AAP, EC 3.4.11.2)

La AAP es una enzima ligada a membranas con una amplia especificidad de sustrato, y frecuentemente denominada leucina aminopeptidasa que es realmente otra aminopeptidasa de localización citosólica (LAP, 3.4.11.1). Como se indicó anteriormente, FAL, GGT, 5'NU y AAP, constituyen un grupo de enzimas membranarias (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 celulares.

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) (22). El tratamiento de las muestras con neuraminidasa o triton 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 afecta a la *Ea* de la AAP (22). Así mismo, la incubación durante 9 días en condiciones fisiológicas de pH y temperatura de un pool de sueros de pacientes con distintas enfermedades hepatobiliares, no produjo una variación significativa de la actividad enzimática o la *Ea* de la AAP (22). Estos resultados demuestran la buena estabilidad de esta enzima en el

medio extracelular; y descartan que el aumento de *Ea* en la enfermedad hepatobiliar sea debido a que un aclaramiento disminuido conduzca al envejecimiento de las isoformas circulantes AAP.

La eliminación con papaína de la parte hidrofóbica de la molécula anfifílica nativa de la AAP, conduce a una forma enzimática solubilizada de 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 muestras de estos pacientes condujo a una progresiva disminución de la *Ea* de AAP, alcanzando al cabo de 8 horas de incubación valores análogos a los encontrados en individuos sanos (22). 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 un grupo los pacientes con enfermedad hepática (n = 30) se obtuvieron elevados coeficientes de correlación entre las actividades séricas de FAL (previa exclusión de la isoforma ósea), GGT, 5'NU y AAP ($p < 0.001$). Así mismo, se encontraron correlaciones significativas entre las *Ea* de FAL y GGT ($r = 0.472$, $p < 0.005$), y de GGT y 5'NU ($r = 0.613$, $p < 0.001$) (22). 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. 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 *Ea* de GGT y 5'NU, a pesar de sus semejanzas bioquímico-estructurales y de localización subcelular.

10. β -N-ACETIL-HEXOSAMINIDASA (HEX, EC 3.2.1.52)

La Hex es una enzima lisosómica compuesta de dos tipos de cadenas polipeptídicas, denominadas subunidades α y β , y 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 generalmente presenta muy limitada actividad catalítica. Otras formas enzimáticas puestas de manifiesto cromatográficamente, como la Hex P, cuya actividad sérica aumenta en el embarazo y en la enfermedad hepática, así como las denominadas formas intermedias (Hex I), derivarían de la isoenzima Hex B por modificaciones post-traduccionales.

En la Figura 1 se indican los resultados obtenidos en el fraccionamiento cromatográfico en DEAE-celulosa de las isoformas de la Hex en un lisado de fibroblastos, utilizando el derivado neutro de la metil-umbeliferona que es hidrolizado por las isoenzimas Hex A y Hex B, y el derivado sulfatado (negativo), específico de la subunidad α y por tanto hidrolizado únicamente por Hex A. La termolabilidad de la isoenzima Hex A es significativamente mayor que la de Hex B, hecho ampliamente utilizado en la evaluación no separativa de la composición isoenzimática de la Hex.

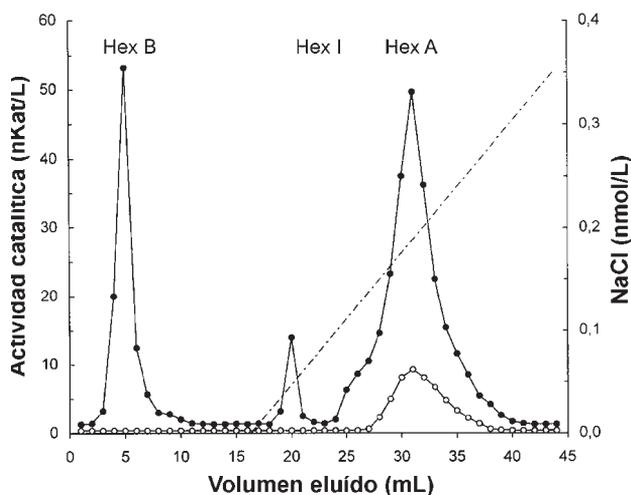


Figura 1. Fraccionamiento cromatográfico en DEAE-celulosa de las isoformas de la β -N-acetilhexosaminidasa (Hex) en un lisado de fibroblastos utilizando los substratos 4-metilumbeliferil-2-acetamido-2-deoxi- β -D-glucopiranosido (●) y 4-metilumbeliferil-2-acetamido-2-deoxi- β -D-glucopiranosido-6-sulfato (○).

El estudio de la *Ea* aparente de la Hex sérica utilizando el substrato cromogénico 3,3'-diclorofenolsulfoftaleinil-N-acetil- β -D-glucosamínido, puso en evidencia una correlación altamente significativa de esta variable termodinámica con la proporción relativa de isoenzima Hex B ($r = 0.957$, $p < 0.001$), con una ecuación de regresión $Hex\ B\ (\%) = 3.0\ Ea - 125.3$. Asignando al porcentaje de Hex B los valores extremos 0 y 100 se obtuvo un valor estimado para la *Ea* de Hex A de 41.8 kJ/mol y de Hex B de 75.1 kJ/mol, con una diferencia altamente significativa ($p < 0.001$) entre ambos valores (23). Esta *Ea* estimada para la isoenzima Hex B es análoga a la obtenida para la forma Hex P purificada de placenta humana, cuya desialilación con neuraminidasa no produjo un cambio significativo de *Ea* o actividad catalítica. Así mismo, en distintos sueros de pacientes en que se había inactivado térmicamente la isoenzima Hex A, se obtuvo un valor medio para la *Ea* aparente de 75.2 kJ/mol (análoga a la de isoenzima Hex B), sin que el tratamiento con neuraminidasa produjese un cambio significativo de esta variable. Sin embargo, para la isoenzima Hex A purificada de placenta humana se obtuvo una *Ea* de 54.4 kJ/mol, significativamente mayor que el valor previamente estimado para esta isoenzima (41.8 kJ/mol). Este hecho podría explicarse teniendo en cuenta la conversión parcial de la Hex A tisular purificada en Hex B por reordenamiento de las subunidades α y β , un hecho bien documentado en la bibliografía, y que en este caso fue confirmado electroforéticamente (23).

El hecho de que la *Ea* de Hex B sea mucho mayor que la de Hex A, debido a la presencia en esta isoenzima de la subunidad α , posibilita la determinación termodinámica de la composición isoenzimática de la Hex en distintos medios biológicos, tales como suero/plasma, orina, y lisados celulares. La única diferencia entre la isoenzima Hex B y la forma Hex P es que esta tiene un mayor contenido de restos de ácido siálico en su molécula, presentando ambas formas igual *Ea*. Las denominadas formas intermedias (Hex I), presentando distintos grados de sialilación, tendrían *Ea* análogas a la isoenzima de que deriven (mayoritariamente Hex B). El cálculo de la *Ea* de la Hex permite 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 de la Hex A, o utilizando los substratos fluorogénicos derivados de la 4-metil-umbe-

liferona neutro (actividad enzimática total) y sulfatado (actividad isoenzima Hex A) (23).

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 obliga a una eliminación previa de estos metabolitos utilizando membranas de permeabilidad selectiva para la aplicación del método termodinámico a la determinación de las isoenzimas de la Hex en muestras de orina (23). En un estudio posterior se caracterizó a la urea como el metabolito urinario capaz de interferir en la determinación de la Ea de la Hex (24).

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), puso de manifiesto un incremento lineal en paralelo de la Ea aparente de la Hex y la concentración de urea adicionada de acuerdo con ecuaciones de regresión de tipo: $Ea = bU + Ea_o$, en donde U es la concentración de urea y Ea_o corresponde a la Ea aparente en ausencia de urea. A medida que Ea_o (y por tanto la proporción relativa de Hex B) aumenta, las pendientes (b) de las ecuaciones de regresión disminuyen gradualmente (24), existiendo una correlación negativa altamente significativa entre ambas variables ($r = -0.960$, $p < 0.001$). A partir de estos resultados, fue posible deducir una expresión matemática que permite el cálculo de la Ea en ausencia de urea (Ea_o) en función de la Ea aparente obtenida para una muestra particular de orina presentando una concentración U de urea: $Ea_o = Ea - (78.0 - Ea/100.0 - U)U$. Este valor estimado de Ea_o puede ser utilizado para la determinación de la proporción relativa de isoenzima Hex B sin necesidad de la eliminación previa de urea en las muestras de orina (24).

Las gangliosidosis GM2 son enfermedades neurodegenerativas de carácter autosómico recesivo, caracterizadas por una incapacidad para metabolizar el gangliósido GM2, que en condiciones fisiológicas normales es hidrolizado por la isoenzima Hex A. Se pueden diferenciar tres tipos de gangliosidosis GM2 en las que están implicadas distintas mutaciones del gen que codifica la subunidad α y asociadas a una deficiencia de isoenzima Hex A (variante B) conocida como enfermedad de Tay-Sachs, o mutaciones del gen que codifica la subuni-

dad β asociadas a una deficiencia de isoenzimas Hex A y Hex B (variante 0) conocida como enfermedad de Sandhoff, o mutaciones del gen que codifica el activador proteico GM2 necesario para la degradación del gangliósido GM2 y presentando actividades normales de las isoenzimas Hex A y Hex B (variante AB).

Los análisis enzimáticos son ampliamente utilizados para el diagnóstico bioquímico de pacientes homocigotos y la detección de portadores heterocigotos de las variantes A y 0 de gangliosidosis GM2, siendo más difícil el diagnóstico bioquímico de la variante AB. La determinación de la *Ea* aparente permite la evaluación simple y precisa de la heterogeneidad isoenzimática de la Hex en lisados de plaquetas, leucocitos totales, y poblaciones de leucocitos mononucleares y polimorfonucleares (25, 26), constituyendo una alternativa válida a los métodos clásicos de inactivación térmica de la Hex A, la utilización conjunta de los sustratos florogénicos neutro y sulfatado (específico para Hex A), e incluso a las técnicas separativas electroforéticas o cromatográficas. El uso de lisados de leucocitos totales no parece introducir un aumento significativo de la variabilidad interindividual de la proporción relativa de isoenzima Hex A, con respecto a la obtenida en lisados de poblaciones celulares homogéneas (plaquetas, leucocitos mononucleares, o leucocitos polimorfonucleares), siendo esta variable la más utilizada para el diagnóstico bioquímico de pacientes homocigotos y detección de portadores heterocigotos para la enfermedad de Tay-Sachs (26).

La enfermedad de Tay-Sachs presenta dos variantes enzimológicamente diferentes, la variante B clásica con ausencia de isoenzima Hex A, y la variante B1 con presencia de una isoenzima Hex A *mutada* inactiva frente al gangliósido GM2 y sustratos artificiales con carga negativa, debido a una disfuncionalidad catalítica del centro activo de la subunidad α . Sin embargo esta isoenzima Hex A *mutada* es aparentemente normal frente a sustratos artificiales neutros convencionales, lo que imposibilita la utilización de métodos de inactivación térmica para el diagnóstico bioquímico de la variante B1 (27).

La isoenzima Hex A *mutada* separada por cromatografía en DEAE-celulosa del plasma de un paciente homocigoto de gangliosidosis GM2 variante B1 para la mutación R178H (G533→A, Arg→178His), generalmente referida como "DN-alelo", presenta una *Ea* (71.5 kJ/mol) sig-

nificativamente mayor que la obtenida para isoenzima Hex A *normal* (41.3 kJ/mol) de controles sanos (28). Para la isoenzima Hex A *mutada*, la actividad catalítica sobre el sustrato cromogénico utilizado dependería exclusivamente del centro activo de la subunidad β , presentando una *Ea* análoga a la encontrada para la isoenzima Hex B (73.8 kJ/mol). Los padres del paciente presentaron un valor medio para la *Ea* de la isoenzima Hex A de 55.4 kJ/mol (28), sugiriendo la presencia de una mezcla equimolecular de isoenzimas Hex A *mutada* y *normal* en el plasma de los portadores heterocigotos para la mutación R178H. Estos resultados permitieron la puesta a punto de un protocolo para la identificación bioquímica de pacientes homocigotos y portadores heterocigotos para la variante B1 de gangliosidosis GM2 mediante la estimación de la proporción relativa de isoenzima Hex A en poblaciones leucocitarias (29).

Los estudios de Sá Miranda y cols. han puesto de manifiesto la elevada prevalencia de la mutación R178H en Portugal (30-32), y los resultados obtenidos en Galicia, una región con particulares lazos históricos con Portugal, apuntan asimismo a una alta prevalencia de esta mutación (27, 29, 33). En estudios posteriores se han descrito varios casos de pacientes homocigotos para la mutación R178H en Brasil (34) e Italia (35). Estos datos confieren un especial interés al estudio de esta enzimopatía en América Latina.

De forma análoga a otras enzimas lisosómicas, la Hex es sintetizada en forma de precursores de alta masa molecular ($M_r \approx 150$ kDa) catalíticamente activos, que sufren una serie de procesos proteolíticos y de glucosilación antes de ser internalizadas en los lisosomas donde se encuentran como formas maduras con menor masa molecular ($M_r \approx 120$ kDa); sin embargo, una pequeña proporción de formas enzimáticas precursoras (5-20%) es secretada al medio extracelular. La proteólisis parcial con papaína de la Hex plasmática (formas precursoras) condujo a un aumento de la *Ea* aparente, debido a un incremento de la *Ea* de aproximadamente 3.0 kJ/mol para la isoenzima Hex A, sin que se modifique el valor de la *Ea* de Hex B (36). Por otra parte, la digestión con papaína no modificó de forma significativa la *Ea* aparente de la Hex en muestras de orina o lisados de leucocitos y plaquetas (formas enzimáticas maduras). Estos resultados *in vitro* no permiten concluir que se incremente la *Ea* de Hex A durante los procesos de maduración e internalización en los lisosomas. En pacientes con

distintas nefropatías, presentando normo, micro y macroalbuminuria, no se encontraron incrementos significativos para la *Ea* de Hex urinaria durante la incubación con papaína. Estos resultados confirman la hipótesis de que, incluso en pacientes con proteinuria, no pasarían a la orina formas enzimáticas de origen plasmático, siendo la actividad Hex urinaria exclusivamente de origen renal (36).

Los resultados obtenidos por Hultberg y cols. en modelos experimentales demuestran que los cationes NH_4^+ producen una inhibición en la maduración de los precursores de alta masa molecular de la Hex, interfiriendo en su transporte a los lisosomas, lo que conduce a una aumentada de la secreción al medio extracelular de formas enzimáticas recientemente sintetizadas (37, 38). Consecuentemente estos autores especulan sobre el posible efecto del aumento de amonio en la enfermedad hepática sobre la secreción de Hex al plasma, al tiempo que una mayor inactivación de la Hex A circulante podría explicar la aumentada proporción en suero/plasma de Hex B en pacientes con hepatopatías (37, 38).

En un grupo de pacientes con cirrosis hepática, el estudio de la composición isoenzimática de la Hex plasmática mediante la determinación de la *Ea* aparente, demostró una elevada correlación de la actividad catalítica y la proporción relativa de isoenzima Hex B con la concentración de amonio (39). La incubación de muestras de plasma durante 50 horas en condiciones fisiológicas de pH y temperatura, condujo a una inactivación gradual de la Hex sin modificación significativa de la *Ea* aparente en las primeras 7 horas de incubación, indicando que las isoenzimas Hex A y Hex B sufren una inactivación análoga durante este periodo de tiempo (39). Para tiempos de incubación mayores de 7 horas, se produjo un significativo aumento de la *Ea* aparente debido a una mayor inactivación de Hex A, sin embargo la actividad residual de las isoenzimas Hex A y Hex B nunca presentó una diferencia mayor del 20% (39). Esta diferencia de estabilidad de las isoenzimas Hex A y Hex B es menor que la descrita en estudios realizados en cultivos celulares (37, 38). En todos los casos, las proporciones relativas de las isoenzimas Hex A y Hex B calculadas a partir de la *Ea* aparente fueron muy concordantes con las obtenidas por un método de inactivación térmica de la Hex A. Estos resultados sugieren que la inactivación por envejecimiento de la Hex plasmática no puede ser explicada en función de la formación de moléculas en-

zimáticas parcialmente inactivadas con mayores E_a y menores actividades catalíticas específicas. La inactivación de la Hex plasmática parece ser un proceso de todo o nada, en el que moléculas catalíticamente activas coexisten con moléculas totalmente inactivadas. Como la vida plasmática media de la Hex humana tras ser infundida en la circulación del ratón es aproximadamente de 2-4 horas (40), y aunque estos datos no puedan ser totalmente extrapolados a los pacientes humanos, no parece que la aumentada proporción de isoenzima Hex B plasmática en la enfermedad hepática se deba a una mayor inactivación de la Hex A circulante. En cultivos celulares las subunidades α y β son sintetizadas en cantidades similares, pero la asociación $\beta\beta$ (Hex B) se realiza a mayor velocidad (41), cuya secreción al plasma en este caso sería favorecida por las aumentadas concentraciones de amonio.

En la Tabla 1 se hace una síntesis de los datos antes indicados sobre la heterogeneidad de las distintas enzimas consideradas, así como del interés alto medio o bajo del correspondiente estudio de su E_a aparente.

A modo de conclusión podría señalarse que los estudios termodinámicos de heterogeneidad enzimática constituyen una línea de investigación que de ningún modo puede considerarse agotada, y capaz de proporcionar futuros resultados de interés bioquímico clínico. Como ejemplo podría sugerirse dos casos concretos de posible aplicabilidad de este tipo de estudios:

La colinesterasa plasmática (pseudocolinesterasa, EC 3.1.1.8) presenta amplia heterogeneidad enzimática, con 7-12 fracciones electroforéticas que difieren en su masa molecular y que parecen ser agregados moleculares de una misma unidad básica. De mayor interés son variantes atípicas (aleloenzimas), caracterizadas por una disminuida actividad catalítica y afinidad por distintos sustratos. El estudio de la E_a podría contribuir a una mejor caracterización de estas variantes de enzimáticas.

La actividad oxidásica de la ceruloplasmina (ferroxidasa I, EC 1.16.3.1) deriva de la reducción de los átomos de cobre localizados en el centro activo de su molécula. La disminución de las reservas de cobre conduce a un aumento de la proporción relativa de *apoceruloplasmina* desprovista de actividad enzimática, así como otras formas em-

Tabla 1. **Tipo heterogeneidad enzimática e interés estudio energía de activación**

Enzima	Heterogeneidad	Interés <i>Ea</i>
Creatina quinasa	3 isoenzimas (BB, MB, MM), distintas isoformas, macroenzimas tipo 1 y 2	Alto
α -Amilasa	2 isoenzimas (tipo salivar y pancreático), distintas isoformas, macroenzimas tipo 1	Bajo*
Lactato deshidrogenasa	4 isoenzimas (HHHH, HHHM, HHMM, HMMM, MMMM)	¿
Aspartato aminotransferasa	2 isoenzimas (mitocondrial y citosólica), macroenzimas tipo 1	Bajo*
Fosfatasa alcalina	3 isoenzimas (intestinal, placentaria y hepática/biliar/ósea/renal), distintas isoformas, macroenzimas tipo 2	Medio
γ -Glutamil transferasa	distintas isoformas, macroenzimas tipo 1 y 2	Medio
5'-Nucleotidasa	distintas isoformas, macroenzimas tipo 2	Medio
Alanino aminopeptidasa	distintas isoformas, macroenzimas tipo 2	Medio
β -N-acetil-hexosaminidasa	3 isoenzimas ($\alpha\alpha$, $\alpha\beta$, $\beta\beta$), distintas isoformas	Alto

* En nuestro conocimiento aún no se ha estudiado la posible caracterización de macroenzimas mediante la determinación de su *Ea* aparente.

pobrecidas en cobre y disminuida actividad oxidásica específica en relación a la *holoceruloplasmina*. La actividad oxidásica específica de la ceruloplasmina no es influenciada en adultos por la edad, sexo, anticonceptivos orales o procesos inflamatorios, y se ha propuesto como un indicador sensible del status de cobre (42). La *Ea* aparente de reacciones de oxidación de Fe^{2+} o distintas aminas aromáticas catalizadas por la ceruloplasmina, podría presentar una relación inversa con la actividad oxidásica específica de la ceruloplasmina circulante, constituyendo un posible marcador de deficiencia de cobre.

11. BIBLIOGRAFÍA

1. Arrhenius, S. (1974) Über die reaktionsgeschwindigkeit bei der inversion von rohrzucker durch säuren. *Z. Phys. Chem.* 27: 913-15.
2. Hagelauer, U. & Faust, U. (1982) The catalytic activity and activation energy of creatine kinase isoenzymes. *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 20: 633-38.
3. Low, P. S., Bada, J. L. & Somero, G. N. (1973) Temperature adaptation of enzymes: roles of the free energy, the enthalphy, and entropy of activation. *Proc. Nat. Acad.* 70: 430-32.
4. Cornish-Bowden, A. (2002) Enthalpy-entropy compensation: a phantom phenomena. *J. Biosci.* 27: 121-26.
5. Hagelauer, U., Faust, U., Trendelenburg, C., Kruse-Jarres, J., Rudolph, T. & Both, A. (1983) Determination of activation energy of creatine kinase isoenzymes. *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 21: 874-76.
6. Wevers, R. A., Hagelauer, U., Stein, W. *et al.* (1985) Indices for the age of the creatine kinase M-chain in the blood. *Clin. Chim. Acta.* 148: 197-210.
7. Delanghe, J. R., De Mol, A. M., De Buyzere, M. L., De Scheerder, I. K. & Wie-me, R. J. (1990) Mass concentration and activity concentration of creatine kinase isoenzyme MB compared in serum after acute myocardial infarction. *Clin. Chem.* 36: 149-53.
8. Langlois, M. R., Delanghe, J. R., De Buyzere, M. L. & Leroux-Roels, G. G. (1992) Glycation of human tissue and serum creatine kinase. *Clin. Chim. Acta.* 211: 83-92.
9. Remaley, A. T. & Wilding, P. (1989) Macroenzymes: biochemical characterization, clinical significance, and laboratory detection. *Clin. Chem.* 35: 2261-70.
10. Turecky, L. (2004) Macroenzymes and their clinical significance. *Bratisl. Lek. Listy.* 105: 260-63.
11. Fahie-Wilson, M. N., Burrows, S., Lawson, G. J., Gordon, T., Wong, W. & Das-gupta, B. (2007) Prevalence of increased serum creatine kinase activity due to macro-creatine kinase and experience of screening programmes in district general hospitals. *Ann. Clin. Biochem.* 44: 377-83.
12. Stein, W., Bohner, J., Steinhart, R. & Eggstein, M. (1982) Macro creatine kinase: determination and determination of two types by their activation energies. *Clin. Chem.* 26: 19-24.
13. Hafkenschied, J. C. M. & Hessels, M. (1988) Some thermodynamic parameters and temperature-conversion factors for determining α -amylase concentration in serum. *Clin. Chem.* 34: 2016-18.
14. Hafkenschied, J. C. M. & Hessels, M. (1989) Some thermodynamic parameters of pancreatic and salivary α -amylase in serum. *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 27: 173-74.
15. Buhl, S. N., Jackson, K. Y., Lubinski, R. & Vanderlinde, R. E. (1977) Optimal conditions for assaying human lactate dehydrogenase by the lactate-to-pyruvate: Arrhenius relationships for lactate dehydrogenase isoenzymes 1 and 5. *Clin. Chem.* 23: 1289-1295.
16. Rej, R. & Vanderlinde, R. E. (1981) Effects of temperature on the steady-state kinetics and measurement of aspartate aminotransferases. *Clin. Chem.* 27: 213-19.

17. Copeland, W. H., Nealon, D. A. & Rej, R. (1985) Effects of temperature on measurement of alkaline phosphatase activity. *Clin. Chem.* 31: 185-90.
18. Langlois, M. R., Delanghe, J. R., Kaufman, J. M., De Buyzere, M. L., Van Hoecke, M. J. & Leroux-Roels, G. G. (1994) Posttranslational heterogeneity of bone alkaline phosphatase in metabolic disease. *Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 675-80.
19. Delanghe, J., De Buyzere, M., de Scheerder, I. & Wieme, R. (1988) Measurement of activation energy of gamma-glutamyltransferase as a marker for enzyme heterogeneity. *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 26: 271-76.
20. Delanghe, J. R., de Buyzere, M. L., de Scheerder, I. K., Faust, U. & Wieme, R. J. (1989) Activation energy and lectin affinity chromatography of gamma-glutamyltransferase as a marker for enzyme heterogeneity. *Clin. Biochem.* 22: 115-19.
21. Sogo, T., Gigirey, M. D. & Tutor, J. C. (1994) Activation energy of serum 5'-nucleotidase as marker for enzyme heterogeneity. *Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 32: 905-908.
22. Perez, L. F., Gigirey, D., Torío, S. & Tutor, J. C. (1998) Activation energy of serum alanyl aminopeptidase as a marker for enzyme heterogeneity in hepatobiliary diseases. *Clin. Chem. Enzymol. Commun.* 8: 91-101.
23. Perez, L. F. & Tutor, J. C. (1998) Assay of β -N-acetylhexosaminidase isoenzymes in different biological specimens by means of determination of their activation energies. *Clin. Chem.* 44: 226-31.
24. Perez, L. F. & Tutor, J. C. (1998) 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.* 277: 39-49.
25. Casal, J. A., Chabás, A. & Tutor, J. C. (2003) Thermodynamic determination of β -hexosaminidase isoenzymes in mononuclear and polymorphonuclear leukocyte populations. *Am. J. Med. Gent.* 116A: 229-33.
26. Casal, J. A., Cano, E. & Tutor, J. C. (2005) β -hexosaminidase isoenzymes profiles in serum, plasma, platelets, and mononuclear, polymorphonuclear and unfractionated total leukocytes. *Clin. Biochem.* 38: 938-42.
27. Tutor, J. C. (2004) Biochemical characterization of the GM2 gangliosidosis B1 variant. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 37: 777-83.
28. Pérez, L. F., Ribeiro, H. M., Casal, J. A., Pinto, R. A., Sá Miranda, M. C. & Tutor, J. C. (1999) Thermodynamic characterisation of the mutated isoenzyme A of β -N-acetylhexosaminidase in GM2 gangliosidosis B1 variant. *Clin. Chim. Acta.* 285: 45-51.
29. Casal, J. A., Pérez, L. F. & Tutor, J. C. (2003) Thermodynamic determination of plasma and leukocyte β -hexosaminidase isoenzymes in homozygote and heterozygote carriers for the GM2 gangliosidosis B1 variant. *Am. J. Clin. Pathol.* 119: 684-88.
30. Teixeira, C. A., Sena-Esreves, M., Lopes, L., Sá Miranda, M. C. & Ribeiro, M. G. (2001) Retrovirus-mediated transfer and expresión of β -hexosaminidase α -chain cDNA in human fibroblasts from GM2-gangliosidosis B1 variant. *Hum. Gen. Ther.* 12: 1771-83.
31. Dos Santos, M. R., Tanaka, T., Sá Miranda, M. C., Ribeiro, M. G., Maia, M. & Suzuki, K. (1991) GM2-gangliosidosis B1 variant: analysis of β -hexosaminida-

- se α -gene mutations in 11 patients from a defined region in Portugal. *Am. J. Hum. Genet.* 49: 886-90.
32. Pinto, R., Caseiro, C., Lemos, M. *et al.* (2004) Prevalence of lysosomal storage diseases in Portugal. *Eur. J. Hum. Genet.* 12: 87-92.
 33. Eiris, J., Chabás, A., Coll, M. J. & Castro-Gago, M. (1999) Fenotipo infantil tardío y juvenil de la variante B1 de gangliosidosis GM2. *Rev. Neurol.* 29: 435-38.
 34. Rozenberg, R., Kok, F., Burin, M. G. *et al.* (2006) Diagnosis and molecular characterization of non-classic forms of Tay-Sachs disease in Brazil. *J. Child. Neurol.* 21: 540-44.
 35. Montalvo, A. L. E., Filocamo, M., Vlahovicek, K. *et al.* (2005) Molecular analysis of the HEXA gene in Italian patients with infantile and late onset Tay-Sachs disease: detection of fourteen novel alleles. *Hum. Mut.* 26: 282.
 36. Hermida, J., Casal, J. A. & Tutor, J. C. (2003) Effect of partial proteolysis on the activation energy of β -N-acetylhexosaminidase precursor and mature forms. *Clin. Chem. Lab. Med.* 41: 302-5.
 37. Hultberg, B., Isaksson, A., Nordström, M. & Kjellström, T. (1993) Release of β -hexosaminidase isoenzymes in cultured human fibroblasts. *Clin. Chim. Acta.* 216: 73-79.
 38. Hultberg, B., Floren, C. H., Isaksson, A. & Bruge, M. (1995) Liver disease and serum hexosaminidase levels. Studies in human hepatoma cell-line (HepG2 cells). *Liver.* 15: 99-103.
 39. Pérez, L. F., Casal, J. A., Rojas, P. & Tutor, J. C. (2000) Relationship between plasma ammonia concentration and β -N-acetylhexosaminidase isoenzyme activities in liver cirrhosis. *Clin. Chem. Lab. Med.* 38: 1237-41.
 40. Isaksson, A., Hultberg, B. & Jonung, T. (1992) Rat plasma clearance rate and organ distribution of β -hexosaminidase isoenzymes from human serum. *Clin. Chem.* 38: 1893-98.
 41. Neufeld, E. F. (1989) Natural history and inherited disorders of a lysosomal enzyme β -hexosaminidase. *J. Biol. Chem.* 264: 10927-30.
 42. Milne, D. B. (2001) Trace elements. En: "Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry" (Burtis, C. A. & Ashwood, E. R. ed.), Fifth Edition. W.B. Saunders Company, Philadelphia; 568-83.

***Información de Contacto:**

Dr. José Carlos Tutor.

Laboratorio Central, Hospital Clínico Universitario.

Instituto de Investigación Sanitaria (IDIS).

15786. Santiago de Compostela.

e-mail: josecarlostutor@redfarma.org