

VNIVERSITAS —SCIENTIARUM—

Volumen 2 N° 2 julio - diciembre 1995

REVISTA DE LA FACULTAD
DE CIENCIAS



PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA

QUÍMICA

EFECTO DE LAS CONCENTRACIONES DE GLUCOSA SANGUÍNEA EN LA ACTIVIDAD DE LA GLUTAMATO DESHIDROGENASA SÉRICA, EN UN GRUPO DE ESTUDIANTES UNIVERSITARIOS

EDGAR L. MARTÍNEZ O.

Carrera 76 A N° 39 A 22 Sur, Santa Fe de Bogotá.

ERNESTO PACHÓN M.

Facultad de Ciencias, Departamento de Bioquímica, Pontificia Universidad Javeriana,
Carrera 7 N° 40-62, Santa Fe de Bogotá.

Resumen

Se determinó el efecto que tiene un aumento de glucosa sobre la actividad de la glutamato deshidrogenasa sérica, en un grupo de 10 estudiantes universitarios, cuyas edades oscilan entre los 18 y 28 años y que no tienen antecedentes de diabetes ni de enfermedades que conlleven a una disminución o aumento de la glutamato deshidrogenasa sanguínea.

A los pacientes se les practicó una determinación basal de glutamato deshidrogenasa y glucosa séricas. Luego, se les suministró una dosis oral de 75 gramos de glucosa disueltos en agua. Después, cada 30 minutos y durante 2 horas, se les determinó los niveles circulantes de la enzima y del azúcar.

De los resultados analizados mediante la prueba del "CHI CUADRADO" (χ^2), se aprecia que un aumento en la concentración de glucosa produce una variación en la actividad de la glutamato deshidrogenasa en proporción inversa, es decir, al aumentar la concentración de glucosa en sangre, disminuye la actividad de la enzima. El máximo de pérdida de la actividad de la enzima ocurrió en 2 pacientes a los 30 minutos, en otros 2 a los 60 minutos, en 1 a los 90 minutos y en 5 a los 120 minutos.

Palabras clave: Glucosa, Glutamato deshidrogenasa (GLDH), Enzima.

Abstract

It was determined the effect of having an increase on the activity of glutamate dehydrogenase in serum over a group of 10 university students, who don't have back ground neither diabetes nor diseases that carrying to a decrease or an increase of the blood glutamate dehydrogenase.

The students group ranges about 18 and 28 years old.

It was applied a basal determination of glutamate dehydrogenase and glucose in serum to the patients. Then, an oral dose of 75 g. of glucose dissolved in water was provided to them. Finally, during 2 hours and intervals of 30 minutes it was determined the circulating levels of the enzyme and sugar.

From the analyzed results through the "CHI CUADRADO" (χ^2) test, estimated an increase in the concentration of glucose produces a variation in the activity of the glutamate dehydrogenase in opposite proportion, that is, by increasing the concentration of glucose in the blood decreases the enzyme activity. The maximum of loss of the enzyme activity happened as follows: 2 patients, after 30 minutes; 2 patients, after 60 minutes; 1 patient, after 90 minutes and 5 patients, after 120 minutes.

Key words: Glucose, glutamate dehydrogenase (GLDH), enzyme

INTRODUCCIÓN

La glutamato deshidrogenasa es una enzima que está constituida por cadenas polipeptídicas cuyo peso molecular está entre 50.000 y 60.000 Daltons que no presentan actividad catalítica; se encuentran unidos formando un hexámero de 300.000 Daltons, quien presenta la actividad catalítica (PLAITAKIS *et.al*, 1983).

La GLDH es una enzima de la cresta mitocondrial, abundante en tejidos con mitocondrias ricas en matriz (GUDER *et.al*, 1975). Existen altos contenidos de GLDH en órganos como el hígado, seguido del páncreas, cerebro y mucosa intestinal (SCHMIDT & SCHMIDT, 1988). En las células hepáticas, la concentración de GLDH es en promedio 5-6 mg/dl. (BENGSTON *et.al*, 1981).

La cantidad de GLDH presente en las mitocondrias de células hepáticas puede ser vertida en el suero del organismo correspondiente, lo que origina aumento en la concentración de la enzima en el suero. Sin embargo, el aumento de la concentración de la enzima puede ser debido además, a algún factor, el cual puede producir un incremento en la actividad enzimática mitocondrial hepática (WEILL *et.al*, 1989).

A pesar de que existen actividades altas de GLDH en pacientes que padecen enfermedades como falla cardiaca aguda, hepatitis viral aguda y shock hipovolémico, según COUEÉ & TIPTÓN (1989) y FAHIEN

et.al. (1990), existen sustancias que son inhibitoras de la enzima y otras que son activadoras. Entre las sustancias activadoras están ADP, Leucina, y exceso de alcohol; y entre las inhibitoras están la Fosfatidilserina, Cardiolipina y algunas drogas. Los compuestos mencionados, son reportes sobre activación e inhibición de la GLDH sin que aún se conozcan datos sobre inhibición o activación de la enzima por acción de monosacáridos.

Dentro de las funciones de la GLDH están, participar en el metabolismo nitrogenado y actuar como fuente intracelular de NADPH necesario para el anabolismo. También la enzima está asociada a procesos de oxidoreducción llevados a cabo por el NAD y el NADP durante la conversión del α -ceto-glutarato en glutamato o viceversa.

La GLDH puede inducir un aumento en la formación de glutamato para que éste pueda dar origen a aminoácidos específicos como la prolina e hidroxiprolina, en caso que el abastecimiento de ellos sea insuficiente en el organismo. Un papel de la GLDH en la generación de amoniaco para el ciclo de la úrea es implícito por el hecho de la desaminación del glutamato produciendo amoniaco.

A pesar de conocer algunas funciones ejercidas por la GLDH, O'CONNOR *et.al*. (1989), considera que aún falta por conocer mecanismos que son regulados por esta enzima.

MATERIALES Y METODOS

Existen varios métodos mediante los cuales se busca determinar las condiciones óptimas para el ensayo cinético de la glutamato deshidrogenasa en el suero humano, pero para cada uno de ellos se han establecido los intervalos de referencia para saber cuáles son los valores normales de GLDH en el suero del hombre, basándose siempre en los límites de referencia superior.

Para estudiar la actividad de la glutamato deshidrogenasa, se estableció el tamaño de la muestra teniendo en cuenta los valores de referencia según (ELLIS & GOLDBERG, 1972), siendo de 0 - 4 U.I./L. El tamaño de la muestra se estima mediante la aplicación de la fórmula sugerida por COCHRAN (1977):

$$N = \frac{Z^2 S^2}{r^2 M^2}$$

En donde: Z, representa la abscisa de la curva normal que tomada a lado y lado del promedio, cubre el porcentaje de área deseado; S, es la desviación estándar (estimada a partir de los rangos de referencia para GLDH); r, es el error máximo permitido y M, es la media aritmética (estimada a partir de los rangos de referencia para GLDH). El tamaño de la muestra fue de 10.

Como no se espera que los valores de la actividad de la GLDH sigan una distribución normal, se utiliza una prueba no paramétrica y que corresponde a "CHI CUADRADO" (χ^2).

Para el tamaño de la muestra, existe una distribución de (X^2) con 10 (n-1; 10-1) grados de libertad y una zona crítica, en donde, $X^2 > 3,325$.

Para el cálculo de X^2 , los valores esperados fueron los valores basales (tiempo cero) y los observados, los obtenidos a los 30, 60, 90 y 120 minutos.

El estudio de la actividad de la GLDH se realizó en un grupo de 10 voluntarios, quie-

nes son estudiantes universitarios con edades comprendidas entre 18 y 28 años, los cuales no presentaron antecedentes de diabetes ni de enfermedades que conlleven a una disminución o aumento de glutamato deshidrogenasa en sangre.

A los pacientes se les practicó una determinación basal de glucosa y GLDH séricas. Después, se les suministró una dosis oral de 75 g. de glucosa disueltos en agua. Luego, cada 30 minutos y durante 2 horas, se hizo la medición de las concentraciones de la enzima y del azucar.

Todas las mediciones se efectuaron en un espectrofotómetro SHIMADZU UV -VIS 140-02.

La determinación de GLDH se efectuó por el método de Ellis y Goldberg, que utiliza NADH y a-cetoglutarato como cosubstratos. La determinación de glucosa se llevó a cabo por el método de Wore y Morboch, que utiliza glucosa oxidasa.

RESULTADOS

La TABLA N° 1 muestra los valores de glicemia en los pacientes, a diferentes tiempos, luego de que cada uno de ellos recibió 75 gramos de glucosa disueltos en agua, por vía oral.

La TABLA N° 2 muestra los valores de la GLDH en los pacientes, a diferentes tiempos, luego de la ingestión de glucosa.

La TABLA N° 3 muestra la variación porcentual en los valores de glicemia a los 30, 60, 90 y 120 minutos luego de la ingestión de glucosa.

La TABLA N° 4 muestra la variación porcentual en los valores de la GLDH a los 30, 60, 90 y 120 minutos, luego de la ingestión de glucosa.

En la TABLA N° 5 se encuentran los valores de X^2 estimados al comparar los obtenidos a los 30, 60, 90 y 120 minutos, con el valor basal.

TABLA N° 1. Valores de glicemia (mg/dL) en el estado basal y a diferentes tiempos, después de consumir glucosa.

BASAL	30 MINUTOS	60 MINUTOS	90 MINUTOS	120 MINUTOS
104.7	159.5	107.1	116.6	63
102.3	142.8	128.5	114.2	107.1
111.9	180.9	119	116.6	134.5
92.8	157.1	132.1	146.4	119
102.3	158.3	132.1	154.7	114.2
109.5	242.8	136.9	192.8	145.2
99.9	165.4	147.6	146.4	111.9
102.3	153.5	151.1	140.4	115.4
107.1	352.3	126.1	85.7	145.2
97.6	119	85.7	76.1	111.9

TABLA N° 2. Valores de glutamato deshidrogenasa (U.I./L), en el estado basal y a diferentes tiempos, después de consumir glucosa.

BASAL	30 MINUTOS	60 MINUTOS	90 MINUTOS	120 MINUTOS
188.9	158.7	160.8	152.7	180.9
140.7	140.7	138.6	142.7	120.6
104.5	100.5	106.5	102.5	98.4
108.5	86.4	100.5	108.5	86.4
140.7	118.5	122.6	128.6	112.5
80.4	70.3	74.3	82.4	64.3
80.4	72.3	76.3	78.3	68.3
88.4	74.3	72.3	86.4	76.3
96.4	68.3	48.2	80.4	56.2
76.3	60.3	72.3	96.4	60.3

TABLA Nº 3. Variación en porcentaje en los valores de glicemia a los 30, 60, 90 y 120 minutos, luego de haber consumido glucosa.

30 MINUTOS	60 MINUTOS	90 MINUTOS	120 MINUTOS
52.3	2.2	11.3	-39.8
39.5	25.6	11.6	4.6
61.6	6.3	4.2	20.1
69.2	42.3	57.7	28.2
54.7	29.1	51.2	11.6
121.7	25.0	76.0	32.6
65.5	47.7	46.5	12.0
50.0	47.7	37.2	12.8
228.9	17.7	-19.9	35.5
21.9	-12.1	-2.2	14.6

TABLA Nº 4. Variación en porcentaje en los valores de glutamato deshidrogenasa a los 30, 60, 90 y 120 minutos, luego de haber consumido glucosa.

30 MINUTOS	60 MINUTOS	90 MINUTOS	120 MINUTOS
-15.9	-14.8	-19.1	-4.2
0.0	-1.4	1.4	-14.2
-3.8	1.9	-1.9	-5.8
-20.3	-7.3	0.0	-20.3
-15.7	-12.8	-8.5	-20.0
-12.5	-7.5	2.4	-20.0
-10.0	-5.0	-2.6	-15.0
-15.9	-18.2	-2.2	-13.6
-29.1	-50.0	-16.5	-41.7
-20.9	-5.2	26.3	-20.9

TABLA N° 5. Valores de X^2 para las diferencias entre el valor basal de la glutamato deshidrogenasa y los valores obtenidos a los 30, 60, 90 y 120 minutos, luego de haber consumido glucosa.

COMPARACIÓN	CL	X^2	SIGNIFICANCIA
BASAL VS. 30 MINUTOS	9	28.5	ALTAMENTE SIGNIFICATIVO
BASAL VS. 60 MINUTOS	9	34.9	ALTAMENTE SIGNIFICATIVO
BASAL VS. 90 MINUTOS	9	15.8	ALTAMENTE SIGNIFICATIVO
BASAL VS. 120 MINUTOS	9	40.1	ALTAMENTE SIGNIFICATIVO

Para el análisis estadístico, el valor basal se toma como valor esperado y los valores obtenidos en los diferentes tiempos se toman como valores observados.

Según estos resultados, se encuentran diferencias estadísticamente significativas, luego de comparar los valores basales con los obtenidos en los diferentes tiempos.

La FIGURA N° 1 muestra las variaciones en en porcentaje para la glicemia.

La FIGURA N° 2 muestra las variaciones en porcentaje para la GLDH en todos los pacientes.

La FIGURA N° 3 muestra los valores de X^2 , para las diferencias entre el valor basal de la GLDH en pacientes que consumieron glucosa y los valores obtenidos a los 30, 60, 90 y 120 minutos.

DISCUSIÓN

Al observar los resultados registrados en las TABLAS 3 y 4, se puede apreciar que la

variación de la concentración de glucosa sanguínea, produce una variación en la actividad de la GLDH, en una proporción inversa, es decir, al aumentar la concentración de glucosa en sangre, se disminuye la actividad de la enzima.

La prueba de X^2 se efectuó con los resultados obtenidos experimentalmente y consignados en la TABLA 2. Los valores basales obtenidos en los pacientes son diferentes de los valores obtenidos a distintos tiempos.

A 30 minutos, de los pacientes 9 mostraron disminución en la actividad de la GLDH, mientras que el paciente 2, mantuvo valores constantes para la actividad de la enzima.

De los individuos que mostraron disminución en la actividad de la enzima, el paciente 10 tuvo el menor incremento en su glicemia, cuyo valor fue de 21.9% y otro que tuvo el mayor incremento (paciente 9), y que fue de 228.9%.

A los 60 minutos ocurrió disminución de la actividad enzimática en 9 pacientes; y el que

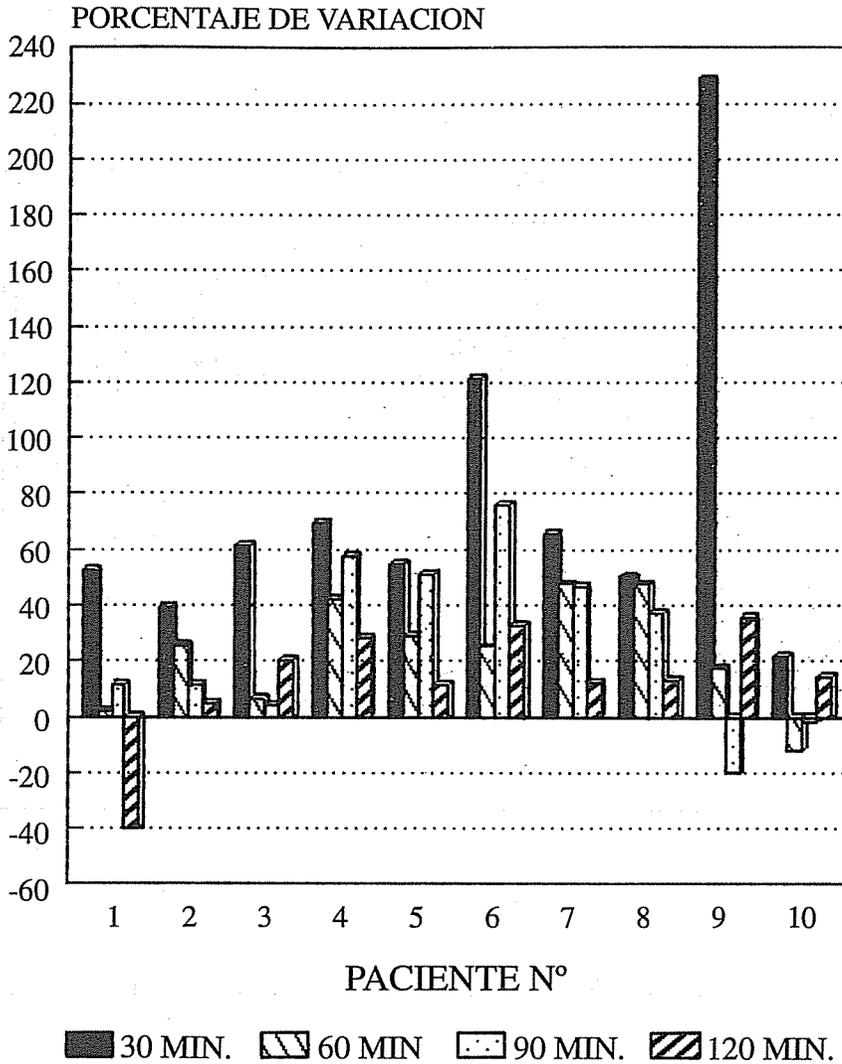


FIGURA N° 1. Variación en porcentaje en los valores de glicemia a los 30, 60, 90 y 120 minutos, luego de haber consumido glucosa.

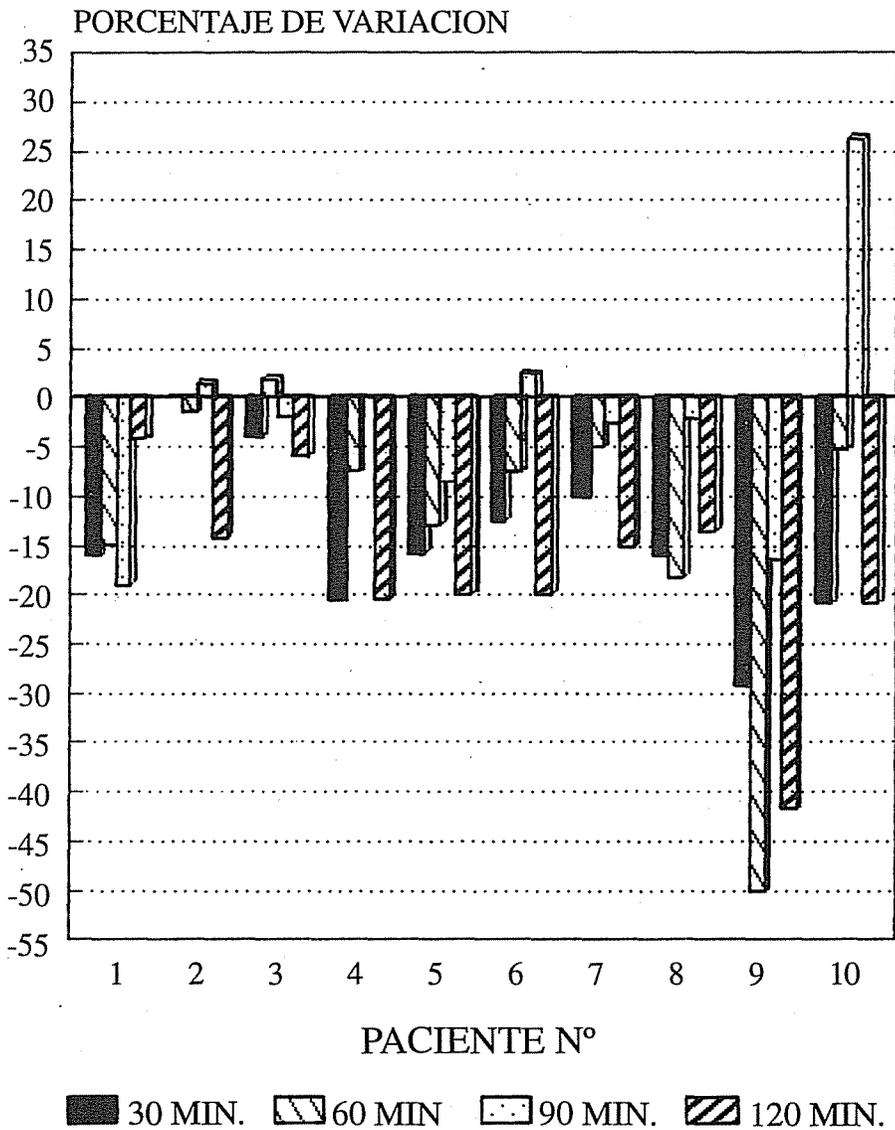


FIGURA N° 2. Variación en porcentaje en los valores de glutamato deshidrogenasa a los 30, 60, 90 y 120 minutos, luego de haber consumido glucosa.

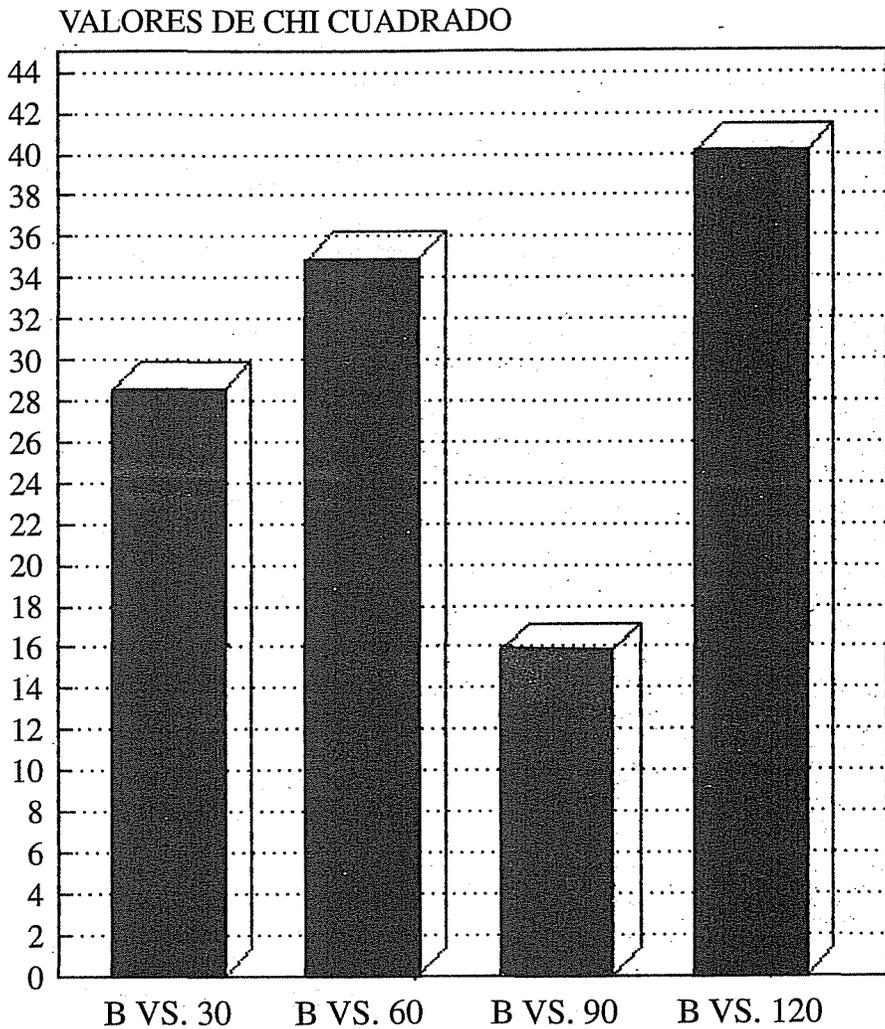


FIGURA N° 3. Valores de X^2 para las diferencias entre el valor basal de la glutamato deshidrogenasa en pacientes que consumieron glucosa y los valores obtenidos a los 30, 60, 90 y 120 minutos.

no mostró disminución de la actividad (paciente 3), tenía un incremento en su glicemia de 6.3% respecto al valor basal.

A los 90 minutos, 6 pacientes tuvieron disminución de la actividad de la enzima. De los 4 que no mostraron disminución de la actividad enzimática, uno (paciente 4), presentó valores iguales al basal, a pesar de que tenía incrementada su glicemia en un 42%; y de los otros 3 (pacientes 2, 6 y 10), 2 (pacientes 2 y 6), mostraron valores de la actividad enzimática que estaban por encima de los basales, teniendo en cuenta que sus glicemias estaban incrementadas en un 11.6% y 76% respectivamente. El paciente 10 presentó un incremento en su actividad enzimática, a pesar de que su glicemia estaba por debajo del valor que registró en el estado basal.

A los 120 minutos, los 10 pacientes registraron valores de la actividad enzimática, que están por debajo de los valores basales. De la totalidad de los pacientes, el máximo de pérdida de la actividad de la actividad de la glutamato deshidrogenasa a los 30 minutos fue para 2 de ellos (pacientes 4 y 10).

A los 60 minutos, el máximo de pérdida fue para 2 también (pacientes 8 y 9); a los 90 minutos solamente para 1 (paciente 1); y a los 120 min. el máximo de pérdida fue para 5 (pacientes 2, 3, 5, 6 y 7).

Aparentemente hay una tendencia a regresar a los niveles basales entre los minutos 60 y 90 en algunos de los pacientes. Se asume que la variación de la actividad de la GLDH causada por la ingestión de la glucosa, se debe a una inhibición competitiva de tipo reversible entre la enzima y el azúcar; o también puede ser debido al fenómeno de glicosilación causado por el azúcar sobre la enzima.

CONCLUSIONES

Es evidente que el aumento de las concentraciones de glucosa sanguínea, produce una disminución en la actividad de la glutamato deshidrogenasa.

Cuando hay ingestión de glucosa, hay pérdida de la actividad de la GLDH y el máximo de esta pérdida ocurre a los 120 minutos.

En algunos de los pacientes sólo se observa un aparente retorno a los niveles basales entre los minutos 60 y 90, luego de la ingestión del azúcar.

Son muy significativos los valores de X^2 de las diferencias entre el valor basal de la glutamato deshidrogenasa y los valores obtenidos en los diferentes tiempos, luego del consumo de glucosa por parte de los pacientes.

LITERATURA CITADA

BENGSTON, G., KIESSLING, K. H., SMITH-KIELLAND, A., MORLAND, J. 1981. Partial separation and biochemical characteristics of periportal and perivenous hepatocytes from rat liver. *Eur. J. Biochem.* 118:591-597.

COCHRAN, W. G., 1977. Sampling techniques, 3rd.ed., Wiley, New York.

COUEE, I., TIPTON, K. F., 1989. Activation of glutamate dehydrogenase by L-leucine. *Biochem. Biophys. Acta.* 995:97-102.

COUEE, I., TIPTON, K. F. 1989. The effects of phospholipids on the activation of glutamate dehydrogenase by L-leucine. *Biochem. J.* 261:921-925.

ELLIS, G. GOLDBERG, D. M. 1972. Optimal conditions for the kinetic assay of serum glutamate dehydrogenase activity at 37°C. *Clinical chemistry.* 18:523-527.

FAHIEN, L. A., TELLER, J. K., MacDONALD, M. J., FAHIEN, C. M. 1990. Regulation of glutamate

dehydrogenase by Mg+2 and magnification of leucine activation by Mg+2. *Molecular pharmacology*. 37: 943-949.

GUDER, W. G., HABICHT, A., KLEISSL, J., SCHMIDT, U., WIELAND, O. H. 1975. The diagnostic significance of liver cell in homogeneity: Serum enzymes in patients with central liver necrosis and the distribution of glutamate dehydrogenase in normal human liver. *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 13:311-318.

O'CONNOR, K. C., SCHUTZ, H., BAILEY, J. E. 1989. Alteration of substrate regulation patterns in glutamate dehydrogenase by enzyme in mobilization. *Biotechnology and Bioengineering*. 33:896-905.

PLAITAKIS, A., BERL, S., YAHR, M. D. 1983. The treatment of GDH-deficient olivopontocerebellar atrophy with branched chain aminoacid. *Neurology*. 33:78-87.

RECOMMENDATIONS OF THE GERMAN SOCIETY FOR CLINICAL CHEMISTRY. 1970. Standardisation of methods for the estimation of the enzyme activities in biological fluids. *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 8:659-660.

RECOMMENDATIONS OF THE GERMAN SOCIETY FOR CLINICAL CHEMISTRY. 1972.

Standardisation of methods for the estimation of the enzyme activities in biological fluids. *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 10:281-291.

RECOMMENDATIONS OF THE GERMAN SOCIETY FOR CLINICAL CHEMISTRY. 1974. Standardisation of methods for the estimation of the enzyme activities in biological fluids. Standard method for determination of glutamate dehydrogenase (GLDH) activity. *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 8:659-660.

SCHMIDT, E. S., SCHMIDT, F. W. 1988. Glutamate dehydrogenase: Biochemical and clinical aspects of an interesting enzyme. *Clinica Chimica Acta*. 173:43-56.

SCHMIDT, E., et.al. 1990. Proposal for standard methods for the determination of enzyme catalytic concentrations in serum and plasma at 37°C. *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 28: 805-808.

SMITH, E. L., AUSTEN, B. M., BLUMENTHAL, K. M., NYC, J. F. 1971. Glutamate dehydrogenase. In: Boyer, P.D., ed. *The enzymes*, Vol. XI New York: Academic Press., 293-367.

WEILL, J., SCHELLENBERG., LE GOFF, A. M. 1989. Kinetics of serum glutamate dehydrogenase during short-term alcohol withdrawal. *Clinica Chimica Acta*. 179:323-326.