

DETERMINACION ENZIMATICA DE MAGNESIO EN MUESTRAS DE SUERO SANGUINEO

M. Borrajero, C. Pascual y A. C. Rodríguez.

Centro Nacional de Investigaciones Científicas, Avenida 25 y 158, Playa, Ciudad de La Habana, Cuba.

Recibido: 23 de junio de 1992.

RESUMEN. Se describe un método enzimático para la determinación de magnesio en muestras de suero sanguíneo, basado en el empleo de un extracto de células permeabilizadas de levadura como fuente de enzimas dependientes de magnesio. Se comprobó que la actividad enzimática medida correlaciona con la cantidad de magnesio procedente de la muestra ($r = 0,99$). Se realizaron estudios para la optimización de la determinación, rango de linealidad (0-3 mmol/L), reproducibilidad (4,1%), evaluación de interferencias, etcétera. El método propuesto muestra buenos parámetros de calidad, no requiere de equipamiento costoso y es fácilmente automatizable.

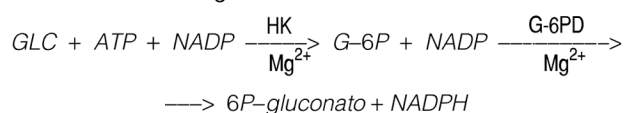
ABSTRACT. An enzymatic method for magnesium determination in serum samples is described, based on the employment of permeabilized yeast cell extract as a source of magnesium-dependent enzymes. The measured enzyme activity strongly correlated ($r = 0,99$) with Mg present in the sample. Studies of optimization, interferences, linearity (0-3 mmol/L) and reproducibility (4,1%) were performed. The proposed method has good analytical qualities. It doesn't require expensive equipment and can be easily automated.

INTRODUCCION

La medición del contenido de magnesio en el organismo resulta de mucha utilidad para el diagnóstico, prevención y tratamiento de gran número de patologías.¹⁻⁴ Aunque sólo el 0,3 % del magnesio total, se encuentra en el plasma sanguíneo (rango normal de concentración entre 0,65 y 1,05 mmol/L), su determinación se realiza mayormente en este fluido^{5,6}, observándose muy buena correlación con respecto a su contenido total.⁷

La espectrometría de absorción atómica es la técnica más ampliamente usada para las determinaciones de magnesio en muestras biológicas^{8,9} y constituye el método de referencia para un gran número de nuevos métodos que se encuentran en fase de desarrollo (colorimétricos, enzimáticos, fluorimétricos, etc.¹⁰⁻¹³).

En este trabajo se reporta el empleo de un extracto de células permeabilizadas de levadura como fuente de enzimas dependientes de magnesio (hexoquinasa y glucosa 6-fosfato deshidrogenasa) las cuales en presencia de ATP, glucosa y NADP reaccionan según:



La aparición de NADPH se registra espectrofotométricamente y constituye el resultado del acoplamiento de ambas actividades, asimismo, correlaciona con la cantidad de magnesio presente, permitiendo la determinación de su concentración en muestras de suero sanguíneo.

MATERIALES Y METODOS

Obtención del extracto de células

Una cantidad de células de levadura, *Saccharomyces Cerevisiae* 196-2 (150mg, peso húmedo) provenientes de un cultivo en medio líquido se permeabilizaron con dimetilsulfóxido 40%.¹⁴ Después de ser lavadas con agua destilada y resuspendidas en amortiguador Tris-HCL pH 8,4, se produjo

su ruptura con el empleo de esferas de vidrio (diámetro 0,45 mm, 1 g/mL) en agitador de tubos durante 3 min. La suspensión de células obtenida fue centrifugada a 14 000 r/min durante 30s en equipo Eppendorf y el sobrenadante claro conservado a 4 °C en H_4SO_4 3 mol/L.

Para la realización de los ensayos, la actividad del extracto se ajustó a 0,3-0,4 $\Delta A/(\text{min} \cdot \mu\text{mol})$ de magnesio, siendo medida a 340nm en Spekol 220 (Karl Zeiss/Jena).

Determinación enzimática

A 1,05 mL de la mezcla de reacción [amortiguador Tris-HCL 90 mmol/L, pH 8,4; acetato de magnesio 30 $\mu\text{mol/L}$; NADP 0,30 mmol/L; ATP 0,5 mmol/L y glucosa 8 mmol/L (concentraciones finales)] se le adicionaron 20 μL de suero sanguíneo y 50 μL del extracto de células. Continuada la reacción, se registró el incremento de absorbancia, a 340nm, entre los 5 a 10m en posteriores. Con vistas a lograr la optimización de las condiciones de la reacción, algunas determinaciones se realizaron en ausencia de suero sanguíneo, empleando acetato de magnesio 60 $\mu\text{mol/L}$ en la mezcla.

En el estudio de las posibles interferencias, se emplearon sales de hierro, zinc, calcio, manganeso, cobalto y aluminio (cloruros), cobre y litio (sulfatos), así como fluoruro de sodio, hemoglobina, ácido ascórbico y bilirrubina, suministrados por BDH.

La adición de bilirrubina se realizó según recomienda Kaplan¹⁵ para la preparación de un estándar de bilirrubina en suero.

Se prepararon muestras artificiales mediante la adición de acetato de magnesio en cantidades conocidas a un pool de suero normal humano. Esta preparación fue dividida en alícuotas y congelada a -20 °C. A todas las muestras (reales o artificiales), se les determinó la concentración de magnesio por espectrometría de absorción atómica.

RESULTADOS Y DISCUSION

Una vez obtenido el cultivo de células de levadura y conservado a 4 °C en condiciones de esterilidad para otros gér-

menes, constituye una fuente prácticamente inagotable de reactivo enzimático en óptimas condiciones.

La preparación del extracto enzimático es asimismo, un procedimiento sencillo y su actividad permanece inalterada en las condiciones de conservación descritas.

El paso de permeabilización previo al de ruptura celular permitió obtener un extracto libre de magnesio intracelular que de no haber sido eliminado hubiera interferido en la determinación.

No se observaron diferencias entre la actividad enzimática medida con muestras reales de suero y concentraciones equivalentes obtenidas por adición del catión.

Este comportamiento es congruente con las observaciones hechas por otros autores¹⁶ en relación con el desplazamiento del magnesio desde su unión a las proteínas plasmáticas hacia la formación del complejo con ATP.

El incremento de la absorbancia con respecto al tiempo (Fig. 1), no mostró una dependencia lineal en el intervalo de tiempo que se muestra, comportamiento que es habitual en sistemas de reacciones acopladas.

Sin embargo, entre los 5 y 10 min posteriores a la adición del extracto de células, se observó un incremento casi constante, cuya magnitud correlacionó con la concentración de Mg en las muestras.

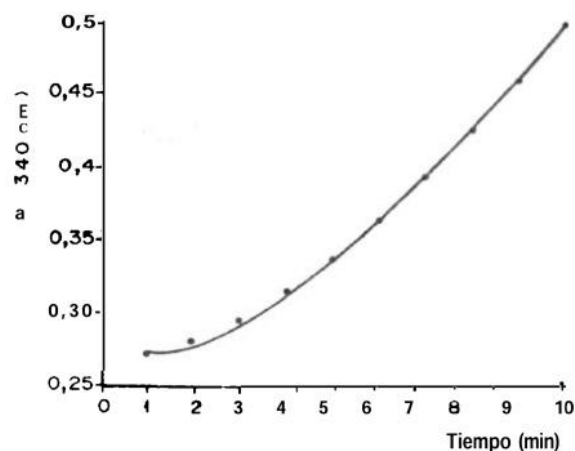
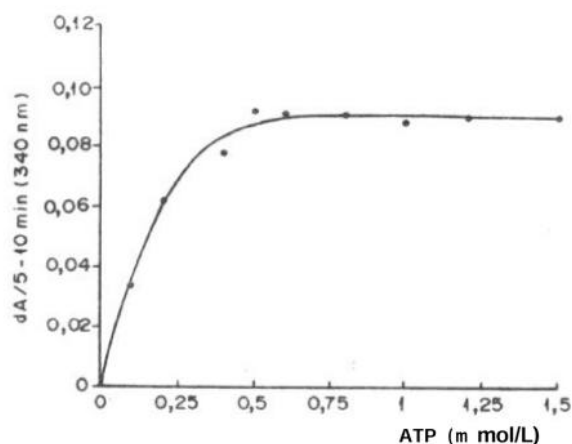
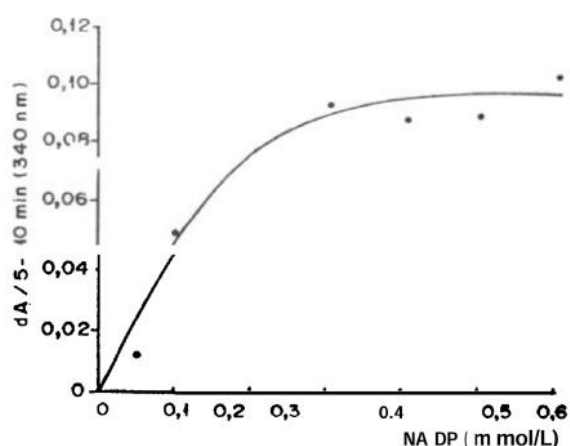


Fig. 1. Absorbancia de la mezcla de reacción (Mg^{2+} 60 μ mol/L; ATP 0,5 mmol/L; NADP 0,3 mmol/L; Gic 8 mmol/L, en amortiguador Tris 90 mmol/L, pH 8,4) en el tiempo a partir de la adición del extracto de células permeabilizadas de levadura.

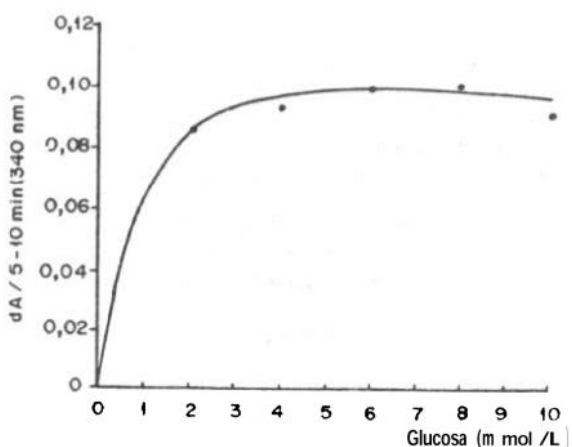
El pH y la concentración de los metabolitos reaccionantes se determinaron mediante el estudio de su efecto sobre la reacción (Fig. 2), encontrándose óptimas las concentraciones de ATP 0,5 mmol/L, NADP 0,33 mmol/L, Gic 8 mmol/L y el pH 8,4. Por encima de 0,5 mmol/L de ATP, se produce inhibición de la hexoquinasa si las concentraciones de Mg resultan bajas, hecho que ha sido también descrito por otros autores.¹⁷



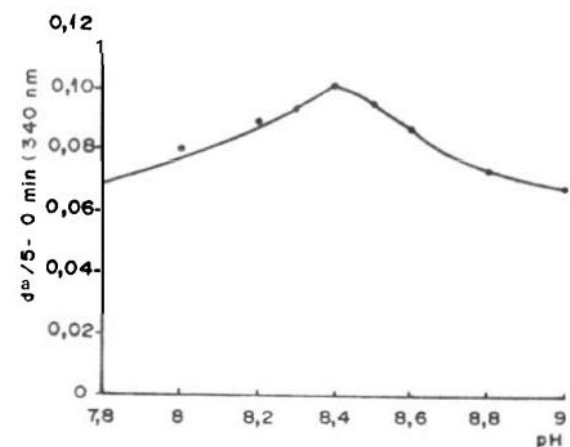
(a)



(b)



(c)



(d)

Fig. 2. Dependencia entre el cambio de absorbancia entre 5 y 10 min de reacción y algunos de los parámetros de la reacción. La concentración de los reaccionantes, excepto indicación explícita, es NADP 0,3 mmol/L; ATP 0,5 mmol/L; Gic 8 mmol/L; Mg^{2+} 60 μ mol/L; en amortiguador Tris 90 mmol/L, pH 8,4.

El incremento de la temperatura de la reacción provocó un aumento de la actividad enzimática del extracto (Tabla I).

TABLA I
Actividad enzimática del extracto enzimático a distintas temperaturas de incubación de la mezcla de reacción

Temperatura (°C)	Actividad [mol/(min.mL de extracto)]
25	118
30	133
37	147

Sobre esta base se pueden fijar condiciones de trabajo dentro del rango de temperaturas más frecuentemente utilizado en las determinaciones enzimáticas. La incubación previa de la muestra con el ATP -con quien el Mg forma un complejo que constituye el sustrato de la hexoquinasa- no produjo un incremento de actividad.

La dependencia entre el cambio de absorbancia registrado entre 5 y 10 min de reacción correlacionó con la concentración de magnesio presente en las muestras ($r = 0,99$) (Fig. 3). A partir de los parámetros de la recta correspondiente se determinó la concentración de magnesio en muestras reales (Fig. 4).

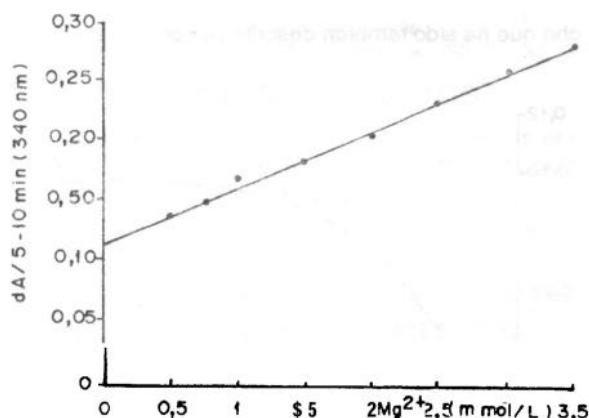


Fig. 3. Dependencia entre el cambio de absorbancia entre 5 y 10 min de reacción y la concentración de Mg en muestras de plasma sanguíneo.

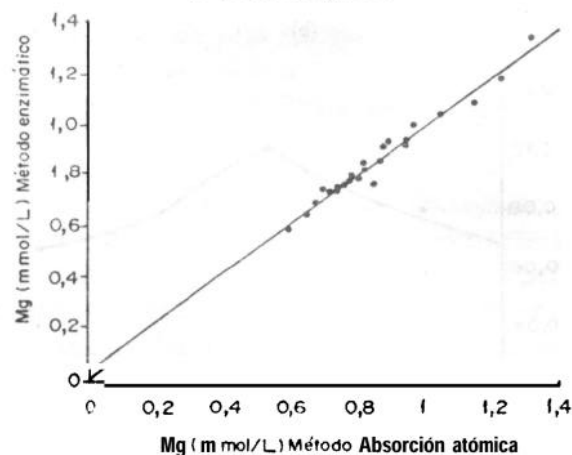


Fig. 4. Correlación entre las concentraciones de Mg halladas por el método enzimático propuesto y por espectrometría de absorción atómica. ($n = 25$).

La correlación con el método de absorción atómica fue de 0,99 y la pendiente de la recta determinada por las parejas de valores de concentración halladas por ambos métodos, fue igual a 1.

No se observaron interferencias de los compuestos evaluados a las concentraciones que se muestran (Tabla II).

TABLA II
Relación de compuestos evaluados como interferentes

Especie interferente	Concentración (mmol/L)	
	Normal ¹	Añadida ²
Cu ²⁺	0,024	0,5
Fe ³⁺	0,03	0,5
Mn ²⁺	0,013.10 ¹³	0,5
Ca ²⁺	2,8	1,0
Zn ²⁺	0,02	0,2
Al ³⁺	no se reporta)	0,5
Co ²⁺	no se reporta)	0,5
Li ²⁺	no se reporta)	0,5
Ascorbato	0,11	2,0
Bilirubina	0,02	0,4
NaF		1 mg/mL
Heparina		25 UI/mL
Hemoglobina		1,0

¹Límite superior en suero. ²No Interferente.

La repetibilidad del método se estudió en un pool de suero de 0,99 mmol/L de Mg. Para 10 repeticiones el coeficiente de variación (CV) hallado fue de 3,2 %. La reproducibilidad fue evaluada a 0,99 mmol/L de Mg (CV = 4,1 %) y 1,99 mmol/L (CV = 3,43 %) en 15 determinaciones respectivamente.

El método propuesto muestra buenos parámetros de calidad desde el punto de vista analítico, no requiere de un equipamiento costoso y resulta fácilmente automatizable.

BIBLIOGRAFIA

1. Abraham A.S., Rosenmann D., Kramer M., Balkin J., Zion MM and Farbstien H.. *Arch. Inbrn. Med.*, **147**, 753, 1987.
2. Anast C.S., Mohs J.M., Kaplan S.L. and Bums T.W. *Science*, **177**, 606, 1972.
3. Sjogren A., Floren CH. and Nilsson A. *Scand. J. Gastroenterol.*, **23**, 555, 1988.
4. Shetwood R.A., Roks B.F., Stewart A. and Saxton R.S. *Ann. Clin. Blochem.*, **23**, 667, 1986.
5. Hosseini J.M. and Elin R.J. *Clin. Chem.*, **37**, 85, 1991.
6. Sachs CH., Ritter C., Puaud A.C., Ghahramani M., Kinderman C. and Marsoner H. *Clin. Chem.*, **37**, 945, 1991.
7. Fischer P.W.F. and Giroux A. *Clin. Blochem.*, **24**, 215, 1991.
8. Hosseini J.M., Ying S. and Elin R.J. *Clin. Chem.*, **35**, 1404, 1989.
9. Gunther T. and Vormann J. *FEBS Lett.*, **250**, 633, 1989.
10. Wimmer M.C., Artiss J.D. and Zak B. *Clin. Chem.*, **32**, 629, 1986.
11. Caddell J.L., Erickson M. and Byrne P.A. *Clin. Chim. Acta*, **50**, 0, 1974.
12. Suzuki K., Mayamori Y. and Katayama Y. *Clin. Blochem.*, **24**, 249, 1991.
13. Fossati P., Sirtoll M., Tarengi G., Giachetti M. and Berti G. *Clin. Chem.*, **35**, 2212, 1989.
14. Adams B.J. *Anal. Blochem.*, **358**, 363, 1972.
15. Kaplan L.A. and Pesce A.J., (Ed.). *Clinical Chemistry. Theory, Analysis and Correlation*. St. Louis, MO, CV Mosby Co., 1240, 1984.
16. Tabata M., Kido T., Totani M. and Murachi T. *Clin. Chem.*, **31**, 703, 1985.
17. Grossbard L. and Schimke R.T. *J. Biol. Chem.*, **241**, 35, 1966.