

**UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS Fundada en 1551**

FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA

UNIDAD DE POST GRADO

**Actividad esterásica eritrocitaria frente al ácido acetilsalicílico en niños de dos pisos altitudinales de la provincia de huamanga a 2,746 y 3,550 msnm. Ayacucho**

TESIS para optar el Grado Académico de: **MAGÍSTER EN FARMACOLOGÍA CON MENCIÓN EN FARMACOLOGÍA EXPERIMENTAL**

**AUTOR**

**JOSÉ MANUEL DIEZ MACAVILCA**

**LIMA – PERÚ 2003**



..	1
<b>AGRADECIMIENTOS .</b>	<b>3</b>
<b>RESUMEN .</b>	<b>5</b>
<b>SUMMARY . .</b>	<b>7</b>
<b>I. INTRODUCCIÓN . .</b>	<b>9</b>
<b>II. GENERALIDADES .</b>	<b>11</b>
<b>III. MATERIALES Y MÉTODOS . .</b>	<b>15</b>
<b>1.0 Muestras .</b>	<b>15</b>
<b>1.1 De los Materiales de Vidrio .</b>	<b>16</b>
<b>1.2 Preparación de Soluciones Reactivo .</b>	<b>16</b>
<b>1.3 Lavado y Preparación del Hemolizado .</b>	<b>16</b>
<b>2.0 Determinación del Grupo Sanguíneo ABO . .</b>	<b>17</b>
<b>2.1 Determinación del Factor Rh . .</b>	<b>17</b>
<b>3.0 Determinación de Hemoglobina y de Hematocrito .</b>	<b>17</b>
<b>4.0 Determinación de Proteínas Plasmáticas. Método de Gornall, Bardawill y Davild.</b>	<b>17</b>
..	
<b>5.0 Pruebas Cinéticas . .</b>	<b>18</b>
<b>5.1. Curva Estándar de Calibración para la Determinación de Salicilatos . .</b>	<b>18</b>
<b>5.2 Determinación del Orden de Reacción, Constante de Velocidad, Tiempo de Vida Media y Actividad Enzimática Esterásica Eritrocitaria. . .</b>	<b>18</b>
<b>5.3 Determinación del efecto del pH en la actividad enzimática. . .</b>	<b>19</b>
<b>5.4 Determinación de la Constante de Michaelis-Menten y de la Velocidad Máxima . .</b>	<b>19</b>
<b>6.0 Cálculos . .</b>	<b>19</b>
<b>7.0 Análisis Estadístico .</b>	<b>21</b>
<b>IV. RESULTADOS .</b>	<b>23</b>
<b>V. DISCUSIÓN . .</b>	<b>41</b>
<b>CONCLUSIONES . .</b>	<b>47</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA .</b>	<b>49</b>

<b>ANEXOS .</b>	<b>53</b>
ANEXO N° 01 .	53
ANEXO N° 02 .	54
ANEXO N° 03 .	56

---

*A Dios y a la Santísima Virgen, por haberme permitido inmensas alegrías y estudiar esta maestría, anhelo muy preciado de mi vida. A mi esposa y a mis queridos hijos, por su gran amor, comprensión y apoyo incondicional.*



## AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, por las facilidades brindadas para la realización del presente trabajo en los laboratorios de Bioquímica de la Facultad de Ciencias Biológicas.

A los profesores: E. Ramírez Roca, E. Aguilar Felices, M. López Sierralta, M. Araujo Farro, quines me apoyaron en mi labor académica mientras duró mis estudios de maestría.

Al MB J. Yarlequé Mujica y al Dr. P. Cotillo Zegarra, por su desinteresado apoyo y sabios consejos.

A los profesores M. Aronés Jara y E. Cárdenas Landeo, por el apoyo profesional en todas las facetas del trabajo.

A la Dra. Elizabeth Gonzáles Loayza por su invaluable ayuda.



## RESUMEN

Se ha estudiado la cinética de la hidrólisis del ácido acetilsalicílico por actividad esterásica eritrocitaria frente al ácido acetilsalicílico *in vitro*, en niños de dos pisos altitudinales de la provincia de Huamanga a 2,746 y 3,550 msnm, siguiendo la metodología de Trinder. Se ha encontrado que el tipo de cinética para esta hidrólisis catalizada corresponde a una de pseudo primer orden, rastreándose la reacción en un tiempo comprendido entre 0 y 55 minutos, a pH 7,4 y 37°C en buffer fosfato salino 0,1 M, se halló para la población total un valor promedio para la constante de velocidad de reacción, (k), de  $6,16 \times 10^{-3} \pm 0,00043 \text{ min}^{-1}$  y un tiempo de vida media, ( $t_{1/2}$ ), de  $117,26 \pm 5,142 \text{ min}$ . La media de la actividad enzimática reportada en umol de ASA consumidos/mg de eritrocitos lisados /min fue de  $1,129 \times 10^{-4} \pm 0,0035$ . La correlación más importante se observó entre el tiempo de vida media y los niveles de hematocrito para ambos pisos altitudinales ( $p < 0,05$ ), siendo para la población de 3,550 msnm -0,421 y -0,286 para 2,746 msnm, lo que ratifica la presencia de la(s) esterasa(s) en el paquete globular. De otro lado, la cinética enzimática de la hidrólisis del ácido acetilsalicílico, fue de tipo michaeliana; siendo el valor de Km de 1,6 mM y la  $V_{\text{máx}}$  de  $0,662 \text{ umol} \times \text{L}^{-1} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$ . Se concluye que no existe diferencia estadística significativa de la actividad de esta(s) hidrolasa(s) eritrocitaria(s) frente al ácido acetilsalicílico en niños de ambos pisos altitudinales para una ( $p < 0,05$ ).

**Palabras claves:** esterasas eritrocitaria, ácido acetilsalicílico, altitudes.



---

## SUMMARY

The kinetics of the hydrolysis of the acetylsalicylic acid, has been studied by activity esterase of the lysate erythrocyte in front of the acetylsalicylic acid in vitro, in children of two floors altitudinals of the province of Huamanga to 2,746 and 3,550 msnm; following the methodology of Trinder. It has been that the kinetics type for this catalyzed hydrolysis corresponds one of pseudo first order, being raked the reaction at one time understood between 0 and 55 minutes, to pH 7,4 and 37°C in buffer saline phosphate 0,1 M, it was for the total population a value average for the constant of reaction velocity, (k), of  $6,16 \times 10^{-3} \pm 0,00043 \text{ min}^{-1}$  and a time of half life, ( $t_{1/2}$ ), of  $117,26 \pm 5,142 \text{ min}$ . The value average of the enzymatic activity reported in umol of ASA consumed /mg of lysate erythrocytes/min was of  $1,129 \times 10^{-4} \pm 0,0035$ . The most important correlation was observed between the time of half life and the hematocrit levels for both floors altitudinals ( $p < 0,05$ ), being for the population of 3,550 msnm -0,421 and -0,286 for 2,746 msnm, what ratifies the presences esterase(s) in the globular package. Of another side, the enzymatic kinetics of the hydrolysis of the acetylsalicylic acid, was of type michaeliana; being the value of Km of 1,6 mM and the  $V_{\text{máx}}$  of  $0,662 \text{ umol} \times \text{L}^{-1} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$ . not existing significant statistical differences ( $p < 0,05$ ) for both kinetic parameters in the two floors altitudinals. It is concluded, that does not exist difference significant statistic of the esterase activity of lysate erythrocyte in front of the acetylsalicylic acid in children of both floors altitudinal for a ( $p < 0,05$ ).

**Key words:** esterase activity, acetylsalicylic acid, altitudinal.



# I. INTRODUCCIÓN

La sensibilización de los receptores de dolor es el común denominador de cuadros de dolor inflamatorio de diversa etiología. El mecanismo de acción de los analgésicos antiinflamatorios involucra inhibición de los procesos mediados por las prostaglandinas. La ciclooxigenasa de los ácidos grasos, COX, convierte el ácido araquidónico en endoperóxidos y prostaglandinas productos intermedios en la biosíntesis de varias prostaglandinas y tromboxanos. Desde 1971 se conoce que la inhibición de esta enzima constituye el principal mecanismo de acción de los antiinflamatorios no esteroideos, AINES<sup>(1,2)</sup>

Precisamente el ácido acetilsalicílico reúne las condiciones de un AINE calma el dolor ligero de dolencias simples, artritis inflamatoria crónica de tipo reumatoideo, espondilitis anquilosante, osteoartritis, etc.<sup>(3,4)</sup>

El ácido acetilsalicílico en este contexto es un analgésico no narcótico estándar con una función éster. El ácido acético esterifica el hidroxilo ortofenólico<sup>4</sup>, se menciona que la velocidad de deacetilación de la aspirina a salicilato, SA, "in vivo" influye en la biodisponibilidad de la molécula intacta para ciertas reacciones de transacetilación, con finalidad terapéutica<sup>4</sup>. Después de ser absorbidos los salicilatos en forma rápida en el estómago y el primer tramo del intestino delgado, el ácido acetilsalicílico es hidrolizado en acetato y salicilato por la esterases de la sangre y los tejidos<sup>4</sup>. Es imprescindible que el ácido acetilsalicílico mantenga su integridad molecular para sus acciones y efectos farmacológicos<sup>(5)</sup>.

Como vemos, el ácido acetilsalicílico o aspirina en el organismo está sujeto a la

acción hidrolítica de esterases inespecíficas de la sangre y diversos tejidos. La sangre posee una gran maquinaria enzimática; esterases inespecíficas en plasma, leucocitos y eritrocitos, y poco se sabe acerca de las formas múltiples o isoformas de enzimas implicadas en biotransformación de fármacos especialmente en altura <sup>(6)</sup>. Nos interesa estudiar la actividad metabólica considerando la actividad enzimática a nivel eritrocitario.

En el presente trabajo de investigación se estudia la degradación hidrolítica del ácido acetilsalicílico in - vitro, teniendo presente los siguientes objetivos: 1) Determinar la actividad esterásica eritrocitaria in vitro frente al ácido acetilsalicílico en niños de pisos altitudinales, vale decir; 2,746 y 3,550 msnm; 2) Precisar mediante estudios cinéticos la constante de velocidad K, el tiempo de vida media,  $t_{1/2}$ , de la reacción hidrolítica del ácido acetilsalicílico para las condiciones experimentales propuestas: pH, concentración del buffer, temperatura, tiempo, etc., para cada muestra; así como evaluar la actividad enzimática, AE, y establecer además los valores Km y  $V_{máx}$ ; 3) Relacionar el grado de actividad hidrolítica, es decir k y  $t_{1/2}$ , y otros parámetros como valores de Hemoglobina, Hematocrito, peso, talla, sexo, índice de masa corporal, principalmente.

---

## II. GENERALIDADES

El ácido acetilsalicílico (ASA) y un grupo de sustancias exhiben diversas propiedades, como el alivio del dolor, fiebre y las molestas inflamaciones, inhiben la influencia de las prostaglandinas en todos estos procesos patológicos. Similarmente el ácido acetilsalicílico comparte efectos colaterales con los antiinflamatorios no esteroideos, AINES, como la toxicidad gastrointestinal, incluyendo úlceras y perforaciones <sup>(1,7)</sup>

Existe información importante de los AINES sobre aspectos farmacodinámicos y farmacocinéticos relacionados a su aplicación y selección racional. Las características fisicoquímicas de los AINES determinan su comportamiento cinético y las variaciones en la actividad terapéutica <sup>(8)</sup>.

Los AINES se diferencian por sus propiedades farmacocinéticas. Se absorben casi completamente en el tracto gastrointestinal, tiene baja depuración hepática e igualmente metabolismo de primer paso, casi todos ellos se fijan en las proteínas plasmáticas y presentan pequeño volumen de distribución. Para el ácido acetilsalicílico la vida media plasmática de eliminación con un valor de 0.25 h. La concentración máxima se alcanza entre 0.5 y 1.0 h. <sup>(8)</sup>

Haciendo una revisión cronológica acerca de la farmacología de los salicilatos tenemos algunos trabajos importantes <sup>(9)</sup>, mediante un método colorimétrico se determinó salicilatos libres in vivo, ácido salicílico y salicilatos totales. La mayor parte de salicilatos en el plasma humano esta unido a componentes no difusibles <sup>(9)</sup>, probablemente proteínas plasmáticas y que aún a altas concentraciones de salicilato muy poco están en los eritrocitos. Se señala que los salicilatos se excretan en parte como

salicilato libre, parcialmente como ácido salicílico y parcialmente como glucurónido de ácido salicílico <sup>(9)</sup>.

Continuando con esta revisión encontramos los reportes sobre la farmacocinética del ácido acetilsalicílico (ASA) y ácido salicílico, (SA). Estos resultados nos demuestran que el organismo humano se comporta como un sistema abierto bicompartimental con respecto a este fármaco. El área bajo la curva de concentración plasmática de ASA-versus tiempo fue proporcional a la dosis administrada. El producto de hidrólisis el ácido salicílico, SA, mostró ser un metabolito exclusivo de ASA <sup>(10)</sup>, este trabajo es uno de los pioneros en el estudio de la farmacocinética de la aspirina.

Otros enfoques farmacocinéticos <sup>(11)</sup>, resaltan la variación de la concentración sérica y vida media de salicilatos en pacientes con artritis reumatoidea, precisando que a diferencia de muchos fármacos la vida media de los salicilatos en el suero humano aumenta cuando se incrementan las dosificaciones de aspirina. Afirmación similar a la de otros trabajos <sup>(12)</sup>.

En cuanto a la cinética de absorción de la aspirina en el hombre, se reporta que la absorción procede aparentemente según una cinética de primer orden con un rango de vida media de 4.5 a 16.0 min <sup>(10)</sup>. La comparación de las áreas bajo la curva de concentración plasmática-tiempo después de seguir una ruta de administración intravenosa y oral indica que solamente el 68% de la dosis alcanza intacta la circulación periférica <sup>(10)</sup>. Además, en el tracto gastrointestinal invertido de conejo las tasas de hidrólisis de aspirina en una hora, oscilan para el estómago en un 11%, duodeno 39%, íleo medio 38%, íleo bajo 29%, colon ascendente 4% <sup>(10)</sup>.

Estudios con pacientes reumatoideos precisan que no hay ninguna relación estadística significativa entre concentraciones plasmáticas no ligadas o totales, y la medida de la eficacia clínica <sup>(13)</sup>. Un dato importante que se destaca es que los rangos terapéuticos que han sido encontrados fluctúan entre los 1500 a 2500 umoles/L (200 a 350 ug/mL, 1umol/L = 0.138 ug/mL de ácido salicílico). <sup>(13)</sup>

Ahora bien, dentro de los estudios estrictamente referidos a la cinética in vitro, en estrecha relación con nuestro trabajo se estudia la hidrólisis del ácido acetilsalicílico en sangre humana, y plasma, in vitro, a niveles terapéuticos significativos por debajo de 15 ug/mL por un método espectrofluorométrico indicándose que a baja concentración de aspirina y concentración de enzima fija la reacción es de pseudo primer orden, y la vida media de la hidrólisis de la aspirina a 37 °C en una concentración de sangre humana y plasma al 90% en volumen, con una concentración inicial de sustrato de 13 ug/mL, es de  $32.0 \pm 0.91$  minutos y en plasma  $65.9 \pm 1.98$  minutos <sup>(14)</sup>. Justamente esta fina observación, de que la hidrólisis del ácido acetilsalicílico en sangre completa es casi el doble de rápida que en plasma permite que se propongan la presencia de altas concentraciones de alguna enzima(s) hidrolizante(s) inclusive enzimas adicionales en los glóbulos rojos para este sustrato <sup>(14)</sup>. Otros investigadores comprueban esta afirmación al aislar y tipificar posteriormente la aspirina esterasa, la principal enzima responsable de la degradación del ácido acetilsalicílico en sangre humana <sup>(15)</sup>. En sangre normal humana completa in vitro la fuente de la enzima que controla la hidrólisis de la aspirina (ASA) se localizó en los eritrocitos. La enzima no se encuentra unida a la membrana. La velocidades medias de la hidrólisis de la aspirina en concentraciones comparable a las

halladas en los glóbulos rojos intactos fue mucho mas rápida,  $1.61 \pm 0.2$  umol/L/minuto,  $n = 12$ , que aquella medida en las membranas de glóbulos rojos intactos ( $0.23 \pm 0.08$  umol/L/minuto,  $n = 6$ ,  $p = <0.0001$ )<sup>(15)</sup>.

En estudios detallados se mostraron que la ASA esterasa de los glóbulos rojos esta localizada intracelularmente. La ASA esterasa del lisado crudo fue purificada 900 veces por medio de cromatografía en DEAE sephacel. La electroforesis en gel de poliacrilamida sin SDS a pH 8.3 y 9.0 origina una banda mayor y una o más bandas menores de proteínas. La actividad esterásica se corresponde con la principal banda que es la de una proteína de peso molecular aproximado de 95.000. La enzima purificada tiene una media para el Km de  $66.6 \pm 3.5$  en uM y una media para  $V_{m\acute{a}x}$  de  $4.0 \pm 0.9$  umol/L/minuto/mg. La enzima es dependiente de un grupo sulfhidrilo, no requiere cationes divalentes y es diferente de las estererasas "no especificas" tipo D de los glóbulos rojos<sup>(15)</sup>.

Los roles de las hidrolasas de los eritrocitos y de otros tejidos en el control de la integridad de la aspirina in vivo son estudiadas a profundidad. In vitro la velocidad de hidrólisis fue relativamente lenta en plasma de humanos y de perros. La velocidad de hidrólisis fue significativamente más rápida en sangre completa de perros, conejos y humanos<sup>16</sup>. En sangre completa de humanos y perros, la velocidad de hidrólisis se correlaciona positivamente con el hematocrito<sup>(16)</sup>.

Se encuentra asimismo en la literatura el estudio de la cinética del ácido acetilsalicílico por un método fluorométrico, en el cuál se presenta la distribución tisular de la actividad de aspirin estererasas I y II en ratones y ratas<sup>(17)</sup>. El autor reporta que la aspirin esterasa I de hígado y riñón de ratón tiene más baja actividad que de la rata y que la actividad de la aspirina esterasa II de estos mismos órganos en el ratón fue mayor que en los órganos de las ratas<sup>(17)</sup>. La cinética enzimática del hígado y la distribución tisular fueron similares al compararse con un método espectrofotométrico. Para el suero de rata, se reporta valores de actividades de aspirina esterasa I de  $0.84 \pm 0.06$  y para aspirina esterasa II  $1.03 \pm 0.13$  y para el plasma de ratas una actividad de aspirina esterasa II de  $0.78 \pm 0.03$  expresadas en nmol de ácido salicílico formado por mg de proteína y por min-1. Para al aspirina esterasa I, el autor trabaja con buffer acetato 0.2 M a pH 5.5 y para la aspirina esterasa II con buffer tris-HCl 0.2 M a pH 7.4. Al parecer la diferencia entre las actividades de ambas enzimas es por el valor del pH<sup>(17)</sup>.

Por otro lado, es justo considerar también la variabilidad de las proteínas enzimáticas (18). Por ejemplo, es conocido el polimorfismo de N-acetilación de carácter genético que se conoce desde hace tiempo y que afecta a la enzima N-acetil transferasa que cataliza las acetilaciones. Los países europeos cuentan con un 50-70% de acetiladores lentos (18).

Las isoenzimas de los eritrocitos son más interesantes para los estudios antropológicos, se define a las isoenzimas como variantes moleculares de cada enzima que tienen diferentes propiedades en su movilidad electroforética pero que catalizan la misma reacción bioquímica y que todas estas variantes están controladas genéticamente (19). Se dice que las frecuencias fenotípicas para cada una de las variantes son distintas en los diversos grupos humanos<sup>(19)</sup>. Algunas isoenzimas son útiles en antropología, así la glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa, G-6-PD tiene dos variantes, la fosfatasa ácida eritrocitaria 5 variantes, la 6 fosfogluconato deshidrogenasa, (6-GPD) tres variantes

fenotípicas todas con diferente movilidad electroforética y lo más interesante con diferente actividad enzimática <sup>(19)</sup>. Para las esterases eritrocitarias probablemente habría polimorfismo.

Y para cerrar estas observaciones, es importante precisar que los cambios en la fisiología de las personas que viven a grandes altitudes pueden causar alteraciones de la disposición de fármacos y consecuentemente en la farmacodinamia <sup>(6)</sup>.

## III. MATERIALES Y MÉTODOS

### 1.0 Muestras

Se tuvo 62 muestras de sangre total, 40 fueron tomadas de alumnos de los Planteles de Aplicación Guamán Poma de Ayala de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga (UNSCH) de la ciudad de Ayacucho, 2,746 msnm; latitud 13°09' S; longitud 74°14' O, que corresponde a una zona de vida de estepa espinosa Montano Bajo Sub-Tropical ee-MBS, de la región natural quechua; completando con 22 muestras de alumnos de los Centros Educativos Estatales N° 38986-2 de Yaruca y 38940 de Rumichaka ubicados a 3,550 y 3,850 msnm respectivamente, ambos de la comprensión de Occollo, latitud 13°20' S; y longitud 74°31' O en la ribera derecha del río Apacheta; al borde de la vía Libertadores y a una distancia de 70,5 Km. desde la ciudad de Ayacucho; que corresponde a una zona de vida de páramo pluvial, Sub Alpino Sub Tropical pp-SaS, de la región natural Suni. Todos los niños son aparentemente sanos, de edades comprendidas entre los 07 a 11 años. Procesándose las muestras en el laboratorio de Bioquímica de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UNSCH.

Se tomó una cantidad de 2,0 mL de sangre venosa de la flexura del brazo, usándose viales con anticoagulante heparina; entre los meses de junio a agosto del 2003; los datos personales y las medidas antropométricas se registraron en una ficha personal (ANEXO

N° 01)

## 1.1 De los Materiales de Vidrio

Los materiales de vidrio fueron lavados con detergente y enjuagados con abundante agua destilada y secados en estufa.

## 1.2 Preparación de Soluciones Reactivo

- Solución buffer fosfato salino 0.1 M, pH 7.4. Se disolvió 27.22 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 8.98 g de KOH y 10.8 g de KCl, luego se enrasó a 1 litro, y ajustó el pH, con un pHmetro Orión

- Solución stock de salicilatos, Riedel de Haen. Se disolvió exactamente pesados 500 mg de ácido salicílico desecado en  $\pm 40$  mL de agua destilada, se añadió exactamente medidos 36 mL de NaOH 0.1 N. Se adicionó gotas de cloroformo, se mezcló y enrasó a 100 mL con agua destilada. La concentración de esta solución es de 500 mg/100 mL. Permanece estable por 6 meses.

- Solución estándar de salicilatos. De la solución stock de salicilatos se diluyó respectivamente 2, 4, 6, y 8 mL hasta un volumen de 100 mL con agua destilada. Alcanzándose concentraciones de 10, 20, 30 y 40 mg%.

- Reactivo de Trinder. Se disolvió 40 g de cloruro de mercurio,  $\text{HgCl}_2$  en 850 mL de agua destilada, adicionar 120 mL de HCl 1 N, 40 g de  $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$  y se completó a volumen de 1 litro con agua destilada. Esta solución es estable por tiempo indefinido.

- Sustrato bufferado. Se disolvió 500 mg o 250 mg de ácido acetilsalicílico Sigma en 100 mL de buffer fosfato salino 0.1 M. pH 7.4 para obtener una solución de 5 mg/mL. o 2.5 mg/mL

- Heparina al 2500 UI/mL, dos gotas para 5 mL de sangre. <sup>(20)</sup>

- Reactivo de DRABKIN. Se disolvió 1.0 g de bicarbonato de sodio, 0.05 g de cianuro de potasio y 0.2 g de ferricianuro de potasio, agua destilada cantidad suficiente para un litro. <sup>(20)</sup>

- Reactivo de GORNALL. Se disolvió 1.50 g de sulfato de cobre pentahidratado; 6 g de tartrato de sodio y potasio tetrahidratado en casi 500 mL de agua destilada; se agrego 300 mL de hidróxido de sodio al 10%. Se enfrió y se completo a 1 litro con agua destilada. El reactivo se conserva por tiempo prolongado. <sup>(20)</sup>

## 1.3 Lavado y Preparación del Hemolizado

La sangre heparinizada se centrifugó a 3000 rpm durante 5 minutos, el plasma se separó usando jeringas. Se lavó los eritrocitos con solución de cloruro de sodio al 0.85%, centrifugándose cada vez por 5 minutos.

El paquete de células rojas se pesó y resuspendió con igual peso de agua destilada en un frasco vial. Se congeló y descongeló por 3 veces manteniendo el vial en forma inclinada. El hemolizado es estable por 24 horas a temperatura ambiental, y por 2 ó 3 días en refrigeración, alcanzando una densidad de 1.068 g/mL. <sup>(21)</sup>

## 2.0 Determinación del Grupo Sanguíneo ABO

Para la determinación de los grupos sanguíneos se usaron sueros comerciales Anti-A y Anti-B. Siguiendo el método de Lee-Vicent, o método del portaobjeto, utilizando sangre total; que frente a los sueros presentan la correspondiente aglutinación. <sup>(22)</sup>

## 2.1 Determinación del Factor Rh

Para esta determinación se uso suero comercial Anti-D, siguiendo el método de Diamond-Abelson o técnica rápida de portaobjetos. La formación de aglutinación observable a simple vista indica que el factor Rh es positivo. <sup>(22)</sup>

## 3.0 Determinación de Hemoglobina y de Hematocrito

Se uso el método espectrofotométrico de la Cianometahemoglobina trabajándose con el reactivo de Drabkin. El ferricianuro de potasio convierte el hierro ferroso de la hemoglobina en hierro férrico formando metahemoglobina, que a su vez se combina con el cianuro de potasio y produce un pigmento estable que se puede determinar espectrofotométricamente <sup>(20)</sup>. Se determinó la absorbancia a 540 nm en el espectrofotómetro Spectronic 20D<sup>+</sup>, contra un blanco del reactivo, usándose el factor 29,5.

La determinación del hematocrito se realizó siguiendo el método de micro hematocrito, haciendo uso de capilares de 7 cm x 1 mm, en el que se centrifuga la sangre a 10 000 rpm x 5 min.; luego se midió la altura correspondiente al paquete eritrocitario. <sup>(22)</sup>

## 4.0 Determinación de Proteínas Plasmáticas. Método

## de Gornall, Bardawill y Davild.

Se basa en la reacción de Biuret. Leyéndose a 540 nm contra el blanco de reactivos, usándose el factor 29,7.<sup>(20)</sup>

## 5.0 Pruebas Cinéticas

### 5.1. Curva Estándar de Calibración para la Determinación de Salicilatos

Para la construcción de la curva de calibración se usó el método de TRINDER<sup>(23)</sup>, se procedió a preparar en 5 tubos de prueba, a los cuales se les adicionó 1 mL de solución estándar de salicilatos de 10, 20, 30 y 40 mg%, luego se adicionó 2 mL de solución buffer fosfato salino 0,1 M, pH 7.4 a cada uno de ellos. Paralelamente se confeccionó un blanco de reactivos.

A todos los se adicionó seguidamente 4 mL del reactivo de TRINDER, se mezcló por inversión, luego se procedió a leer en el espectrofotómetro Spectronic 20D<sup>+</sup> a 540 nm. El producto posee una coloración violeta.

### 5.2 Determinación del Orden de Reacción, Constante de Velocidad, Tiempo de Vida Media y Actividad Enzimática Esterásica Eritrocitaria.

Para estos ensayos se utilizó el método colorimétrico de TRINDER, luego de la hidrólisis del ácido acetilsalicílico con producción de ácido salicílico por acción de las esterasas eritrocitarias en presencia de las sales de  $Fe^{+3}$ , se origina una coloración violeta, cuya intensidad es directamente proporcional a la concentración de salicilatos presentes.

Se procedió de la siguiente manera:

Preincubar por 5 min. A 37 °C por separado: La solución salina tamponada, los eritrocitos lisados y el sustrato de ácido acetilsalicílico (5mg/mL).

Luego se colocó en el tubo reactor 1 mL de eritrocitos lisados, 0,5 mL de solución buffer fosfato salino 0,1M pH 7.4 y 0,25 mL de sustrato; se mezcló e incubó en baño maría a 37 °C, extrayéndose alícuotas de 0,25 mL de la mezcla reactiva a los 10, 25, 40 y 55 min.; se añadió a las alícuotas 0,5 mL de agua destilada y 1 mL del reactivo de

TRINDER, se mezcló y centrifugó por 5 min. a 3,500 RPM, se trasvasó el sobrenadante a las cubetas de 1 mL de capacidad y se procedió a leer la absorbancia a 540 nm.

### 5.3 Determinación del efecto del pH en la actividad enzimática.

Se observa la actividad enzimática considerando los valores de pH 7,0; 7,2; 7,4; 7,6 y 7,8 empleando buffer fosfato salino.

### 5.4 Determinación de la Constante de Michaelis-Menten y de la Velocidad Máxima

Para este ensayo se utilizó soluciones de ASA de 250mg/100 mL, en buffer fosfato salino 0,1 M de pH 7,2, colocándose en cada tubo el sustrato previamente temperado en la cantidad de 0,05; 0,1; 0,15; 0,2; 0,25 lo que equivale a concentraciones en el tubo reactor de 14,36; 28,73; 43,10; 57,47 y 71,83 mg% y de buffer fosfato salino pH 7,2, 0,1M las siguientes cantidades: 0,32; 0,27; 0,22; 0,17; 0,12 mL respectivamente. A cada uno de los tubos se añadió 0,5 mL de eritrocitos lisados, temperados y se dejó transcurrir 25 min de reacción enzimática. De estas soluciones se tomó alícuotas de 0,25 mL, se adicionó 0,5 mL de agua y 1 mL del reactivo de Trinder; se centrifugó a 3,500 rpm y se trasvasó el sobrenadante a las cubetas y se procedió a leer la absorbancia a 540 nm.

## 6.0 Cálculos

La concentración de hemoglobina se corrigió para la altura, empleando las fórmulas:

$$\text{altura} = \frac{(\text{msnm})(3.3)}{1000}$$

$$\text{ajuste por altura} = 0,022(\text{altura})^2 - 0,032(\text{altura})$$

$$\text{nivel de ajuste} = \text{nivel observado} - \text{ajuste por altura}$$

y de esta manera poder hacer las comparaciones con los valores a nivel del mar. (24)

El retardo en el crecimiento y los grados de desnutrición y sobrepeso, se observaron en proyecciones de las gráficas talla-edad y peso-edad. (25)

La clasificación del estado nutricional de los niños se realizó según el índice de masa corporal, considerando peso (Kg.)/Altura (m<sup>2</sup>).<sup>(26)</sup>

Las cantidades de salicilatos producidos en el curso de los ensayos enzimáticos en mg% se calcularon utilizando el factor de calibración promedio de salicilatos. F = 65,47.

La proporción de aspirina hidrolizada se obtuvo en forma indirecta por cálculo estequiométrico a partir del salicilato encontrado, utilizándose el factor 1,304.

La cantidad de aspirina no hidrolizada o residual se obtuvo por diferencia de la concentración inicial puesta en el tubo reactor; 71,42 mg%; empleando la fórmula:

$$\text{(ASA residual en mg\%)} = 71,42 - (\text{A} \times \text{F} \times 1.304)$$

Donde: A es la absorbancia de cada tubo y F es el factor de calibración.

El tiempo de vida media  $t_e$ , fue hallado del ploteo semilogarítmico de la concentración de ácido acetilsalicílico residual en mg% versus el tiempo en minutos de incubación, la pendiente de la recta hallada corresponde en cifras absolutas a la constante de la velocidad de reacción, (k), según la ecuación<sup>(27)</sup>:

$$k = \frac{\ln \frac{[\text{ASA}]}{[\text{ASA}]_i}}{T}$$

Y el tiempo de vida media según la ecuación<sup>(27)</sup>.

$$t_{1/2} = \frac{0,693}{K}$$

La actividad enzimática se calculó para un peso de lisado de eritrocitos de 76,28 expresado en mg y para un tiempo de 25 minutos.

$$\text{Act. Enz.} = \text{A} \times \text{F} \times 1.304 \times 1/0,180 \times 1/76,28 \times 0,25/100 \times 1/25.$$

El factor 1/0.180 es para convertir a umol de ASA%, el factor 1/76,28 es para expresar por mg de lisado de eritrocitos; 0,25/100 para expresar umol en el volumen analizado a partir del tubo reactor y el factor 1/25 para expresar los resultados por minuto.

Act. Enz. = A x 0.000621  $\mu$ mol de ASA consumidos/mg de eritrocitos lisados/minuto, es decir:

$$\text{Act. Enz.} = \text{A} \times 6,21 \times 10^{-4}$$

La  $K_m$  y  $V_{m\max}$  se determinó mediante el gráfico de las dobles recíprocas o de Lineweaver-Burk.<sup>(28)</sup>

El cálculo de la  $V_{m\max}$ , para expresarla en umol/L/min/mg de eritrocitos lisados, se realizó según la siguiente fórmula:

$$V_{m\max} = \text{mg\% ASA producidos} \times 1/180 \times 10^6 \times 1/25 \times 1/76,72$$

## 7.0 Análisis Estadístico

Los datos obtenidos fueron analizados mediante las pruebas estadísticas descriptivas: Se uso el análisis de varianza, para conocer las diferencias en los promedios de cada grupo de niños según los pisos altitudinales, es decir 2,746 y 3,550 msnm y frente a las variables estudiadas (hemoglobina, hematocrito, constante de velocidad de reacción, tiempo de vida media, actividad enzimática y estado nutricional)

Análisis de tendencia: regresión y correlación entre las variables estudiadas, constante de velocidad de reacción, K, tiempo de vida media,  $t_{1/2}$  y actividad enzimática frente Hemoglobina y Hematocrito.



---

## IV. RESULTADOS

Se estudió la actividad esterásica eritrocitaria frente al ácido acetilsalicílico en niños de dos pisos altitudinales de la provincia de Huamanga a 2,746 y 3,550 msnm en Ayacucho. Para el efecto, se utilizó el método de Trinder. La curva espectral para este método presenta un pico de máxima absorción a 530 nm empleando el espectrofotómetro Spectronic 20D<sup>+</sup> para una concentración de 20 mg% de salicilatos (Gráfico N° 01). La curva de calibración para concentraciones de salicilatos de 10 a 40 mg%, mantiene la correspondiente linealidad y arroja un factor de calibración de 65,47 (Gráfico N° 02).

El efecto del pH sobre la actividad enzimática para 25 minutos y a 37°C (Gráfico N° 03) arroja altas actividades para valores de pH diferentes 7,4. En este pH, que es fisiológico, se nota una mínima actividad enzimática eritrocitaria.

Se probó el efecto de la concentración del sustrato para 25 minutos y a 37°C (Gráfico N° 04) a un valor de pH de 7,2 y a concentraciones crecientes de ácido acetilsalicílico, observándose la correspondiente hipérbola rectangular de la cinética michaeliana. En el ploteo de las dobles recíprocas (Gráfico N° 05) se nota una recta. La intersección en el eje x arroja un valor de Km de 0,29mg/mL, es decir una concentración molar de 0,0016. Para V<sub>máx</sub> se encontró que la intersección en el eje y, un valor de 0,23 mg/mL, que corresponde a 0,662  $\mu\text{mol}\times\text{L}^{-1}\times\text{min}^{-1}\times\text{mg}^{-1}$ . Todo lo cual nos indica la actividad esterásica eritrocitaria debido a la presencia de la(s) hidrolasa(s) correspondientes.

La actividad esterásica eritrocitaria se estudió en 62 niños de ambos sexos 28 niños (45,2 %) y 34 niñas (54,8 %), de 2 pisos altitudinales, a 2,746 msnm 19 niños (47,5 %) y 21 niñas (52,5%). A 3,550 msnm, se estudió 9 niños (40,9%) y 13 niñas (59,1%).

La población en estudio presenta las siguientes características: La media de la edad para la población total fue  $9,25 \pm 0,247$  años. Para la población de 2,746 msnm fue de  $9,15 \pm 0,23$  años y para 3,550 msnm  $9,45 \pm 0,54$  años; el análisis de varianza no muestra diferencia estadística significativa ( $p < 0,05$ ). La media del peso correspondió a  $29,14 \pm 1,33$  Kg.; la media para la población de 2 746 msnm fue de  $30,62 \pm 1,35$  Kg. y para 3,550 msnm  $26,45 \pm 2,39$  Kg.; existiendo una diferencia estadística significativa ( $p < 0,05$ ) entre ambos grupos. La media de la talla fue  $125,90 \pm 2$  cm.; para la población de 2,746 msnm fue de  $127,25 \pm 1,66$  cm. y para 3,550 msnm  $123,45 \pm 4,14$  cm; el análisis estadístico si muestra diferencia significativa entre ambos grupos ( $p < 0,05$ ).

Según las proyecciones de los gráficos de peso – edad, en ninguno de los dos pisos altitudinales se encuentra desnutrición. A 2,746 msnm, se encontró 07 casos (17,5%) un sobrepeso ligeramente por encima de las dos desviaciones estándar (D.S.) de los valores normales y según los gráficos talla – edad a 2,746 msnm se encontraron 02 casos (5%) de retardo en el crecimiento por debajo de las dos D.S. A 3,550 msnm se encuentran 10 casos (45,4%) de retardo en el crecimiento por debajo de las dos D.S.

Evaluando el índice de masa corporal (IMC), para precisar el estado nutricional de la población, para 2,746 msnm se encuentra 08 casos (20%) de hiponutridos con grado 1, 10 casos (25%) de hiponutridos con grado 2, 16 casos (40%) de delgados y 6 casos (15%) de normales. Para 3 550 msnm encontramos 8 casos (36,4%) de hiponutridos con grado 1 y 7 casos (31,8%) de hiponutridos con grado 2; asimismo 5 casos (22,7%) de delgados y 2 casos (9,1%) de normales. En ambas poblaciones no se encuentran gordos ni obesos. La media del IMC de la población total fue  $17,74 \pm 0,557$ ; la media para la población a 2,746 msnm fue  $18,044 \pm 0,69$  y para 3,550 msnm fue de  $17,19 \pm 0,84$ ; no se encontró diferencia estadística significativa para los dos pisos altitudinales ( $p < 0,05$ )

Por otro lado, la media de los niveles de hemoglobina, hematocrito y proteínas plasmáticas para la población total fue de  $12,84 \pm 0,267$  g%,  $43,75 \pm 0,632$  % y  $7,18 \pm 0,15$  g% respectivamente; para 2,746 msnm la media fue de  $13,21 \pm 0,23$  g%  $\pm$ ,  $43,00 \pm 0,595$  % y  $7,15 \pm 0,147$ % respectivamente y para 3 550 msnm resultó  $12,16 \pm 0,51$  g%  $\pm$ ,  $45,13 \pm 1,19$  % y  $7,23 \pm 0,358$ g% respectivamente (Gráfico N° 06). Existen diferencias estadísticas significativas ( $p < 0,05$ ) para los niveles de hemoglobina y hematocrito en ambos grupos de estudio. Asimismo, se determinó los porcentajes de los grupos sanguíneos del sistema ABO, encontrándose que la gran mayoría pertenece al grupo O; 77,5 % y 81,8 % son del grupo mencionado para 2,746 y 3,550 msnm respectivamente, los otros grupos representan porcentajes de menor cuantía, no existiendo el grupo AB a 3,550 msnm (Gráfico N° 07)

Ahora bien, en relación a los aspectos cinéticos estudiados de la hidrólisis del ácido acetilsalicílico por actividad esterásica eritrocitaria evaluados hasta los 55 minutos, a pH 7,4 y 37 °C en buffer fosfato salino 0,1 M; se encontró que la media de la constante de la velocidad de reacción, k, para la población en general fue  $6,16 \times 10^{-3} \pm 0,00043 \text{ min}^{-1}$ ; para el grupo de 2,746 msnm fue de  $6,19 \times 10^{-3} \pm 0,0006 \text{ min}^{-1}$ ; y para el grupo de 3,550 msnm  $6,09 \times 10^{-3} \pm 0,0005 \text{ min}^{-1}$  (Gráfico N° 08); del análisis de varianza se determinó que no existe diferencia estadística significativa entre los dos grupos altitudinales ( $p < 0,05$ ). Estrechamente relacionado a la variable estudiada, se encontró que el tiempo de vida media de desintegración del ácido acetilsalicílico de la población total,  $t_{1/2}$ , fue de 117, 26

$\pm 5,142$  min; hallándose  $117,40 \pm 5,71$  y  $117,59 \pm 9,59$  min para los grupos de 2,746 y 3,550 msnm respectivamente (Gráfico N° 09); sin diferencia estadística significativa entre grupos ( $p < 0,05$ ). La evaluación de la actividad enzimática, AE, considerando 25 minutos de reacción enzimática a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  a pH 7,4 reportó un valor de  $1,129 \times 10^{-4} \pm 0,035$  para la población total; desagregándose en los siguientes valores,  $1,177 \times 10^{-4} \pm 0,036$  y  $1,041 \times 10^{-4} \pm 0,05$  para 2,746 y 3,550 msnm respectivamente, expresándose en  $\mu\text{mol}$  de ASA consumidos/mg de eritrocitos lisados/minuto (Gráfico N° 10); encontrándose diferencia estadística altamente significativa entre los dos grupos de estudio ( $p < 0,05$ ). La distribución de frecuencias para los valores de la constante de velocidad de reacción, tiempo de vida media y actividad enzimática para las poblaciones de ambos pisos altitudinales, se observan en los gráficos N° 11 al 16.

Justamente, de los estudios cinéticos efectuados, se ha observado que estos aspectos hidrolíticos que cursan bajo la acción de la(s) esterasa (s) eritrocitarias bajo las condiciones de laboratorio planteadas responden a una cinética de pseudo primer orden para ambos grupos poblacionales en las altitudes mencionadas (Gráfico N° 17). En efecto, del ploteo semilogarítmico resultan las correspondientes rectas con pendientes negativas, cuyo valor en cifras absolutas corresponden a la constante de la velocidad de reacción, k. (Gráfico N° 18).

Se estudió las correlaciones correspondientes entre hemoglobina y tiempo de vida media ( $t_{1/2}$ ) de la desintegración del ácido acetilsalicílico por actividad esterásica eritrocitaria, encontrándose correlación significativa de  $-0,369$  ( $p < 0,05$ ) para el grupo población de 3,550 msnm (Gráfico N° 19). Asimismo, la correlación hematocrito y tiempo de vida media ( $t_{1/2}$ ) es significativa en ambos grupos altitudinales ( $p < 0,05$ ) siendo esta correlación mayor a 3,550 msnm,  $-0,421$ , comparativamente con el valor  $-0,286$  para 2,746 msnm (Gráficos N° 20 y 21). Además, se estudió las correlaciones correspondientes entre hemoglobina y actividad enzimática de la desintegración del ácido acetilsalicílico por actividad esterásica eritrocitaria, encontrándose correlación significativa ( $p < 0,05$ ) para el grupo población de 2,746 msnm (Gráfico N° 22), es decir  $0,347$ . Finalmente, la correlación hematocrito y actividad enzimática, solamente es significativa ( $p < 0,05$ ) para la población de 2,746 msnm, correspondiendo a  $0,420$  (Gráficos N° 23)

Los resultados generales se representan en la Tabla N° 01.

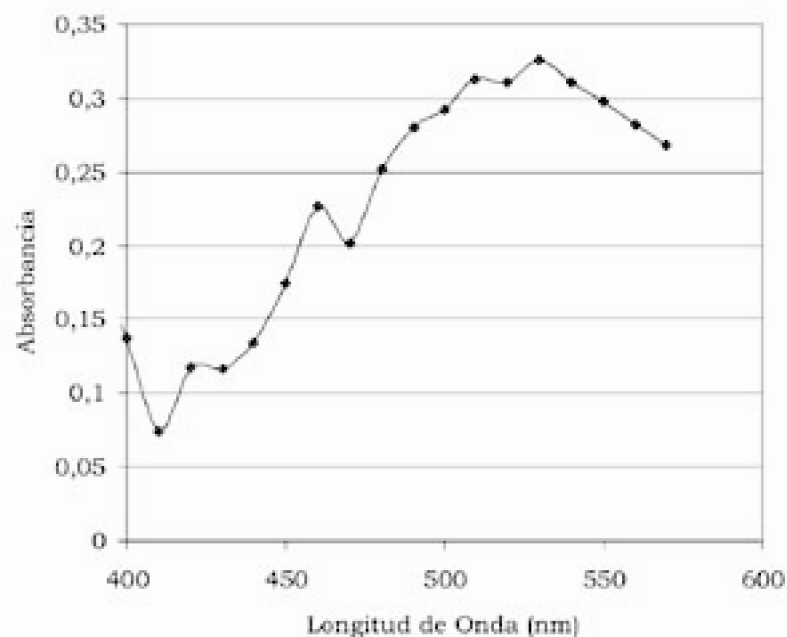


GRÁFICO N° 01: CURVA ESPECTRAL DE SALICILATOS (20 mg%). AYACUCHO 2003

Espectrofotómetro: SPECTRONIC 20 D<sup>+</sup>

Cubetas: 1 cm de paso

Pico de máxima absorción: 530 nm

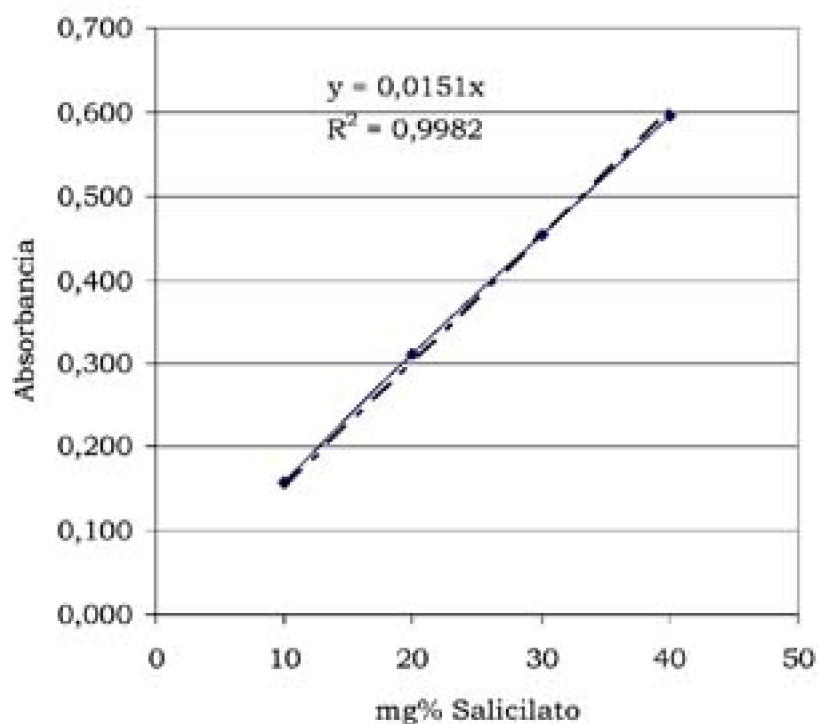


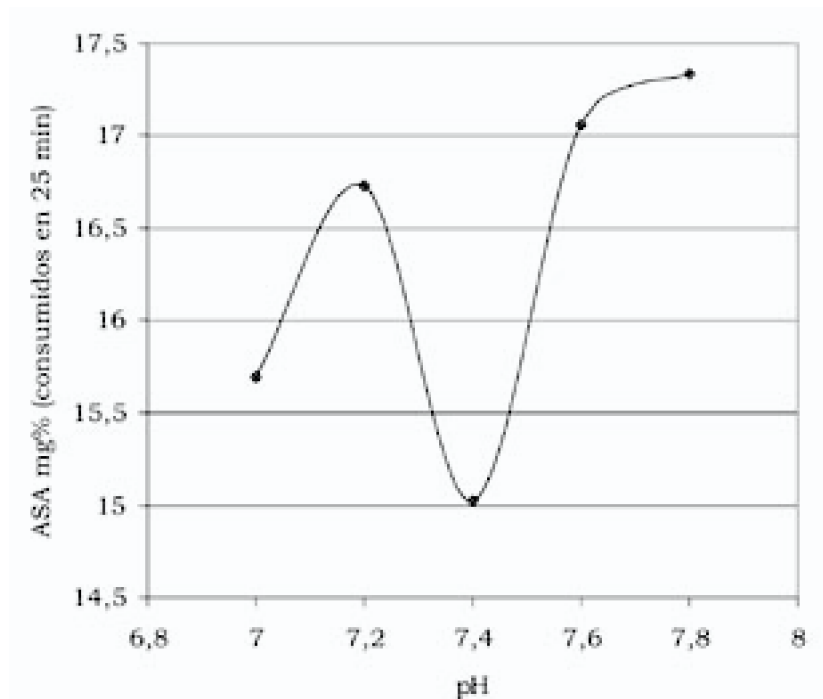
GRÁFICO N° 02: CURVA DE CALIBRACIÓN PARA SALICILATOS. AYACUCHO 2003

Espectrofotómetro: SPECTRONIC 20 D<sup>+</sup>

Cubetas: 1 cm de paso

Longitud de Onda: 540 nm

Factor de Calibración: 65,47



*GRÁFICO N° 03: EFECTO DEL pH SOBRE LA ACTIVIDAD ESTERÁSICA ERITROCITARIA FRENTE AL ÁCIDO ACETILSALICÍLICO. AYACUCHO 2003*

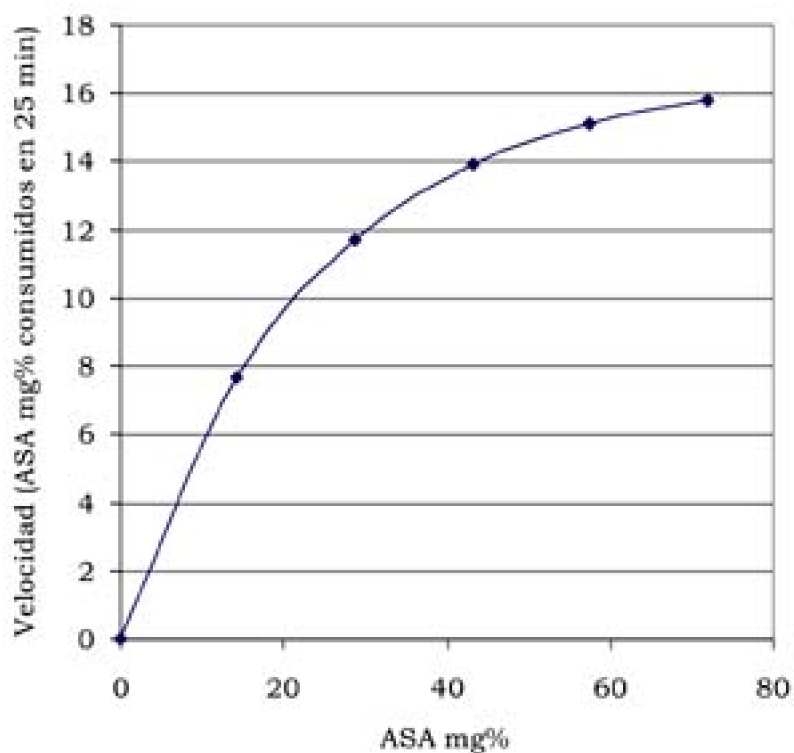
Espectrofotómetro: SPECTRONIC 20 D<sup>+</sup>

Cubetas: 1 cm de paso

Longitud de onda: 540 nm

Temperatura: 37 °C

Buffers de fosfatos salinos



*GRÁFICO N° 04: EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DEL SUSTRATO, ÁCIDO ACETILSALICÍLICO SOBRE LA ACTIVIDAD ESTERÁSICA ERITROCITARIA. AYACUCHO 2003*

Cinética: Michaeliana

Espectrofotómetro: SPECTRONIC 20 D<sup>+</sup>

Cubetas: 1 cm de paso

Longitud de onda: 540 nm

Temperatura: 37 °C

Buffer fosfato salino 0,1 M

pH: 7,2

Tiempo de reacción: 25 minutos

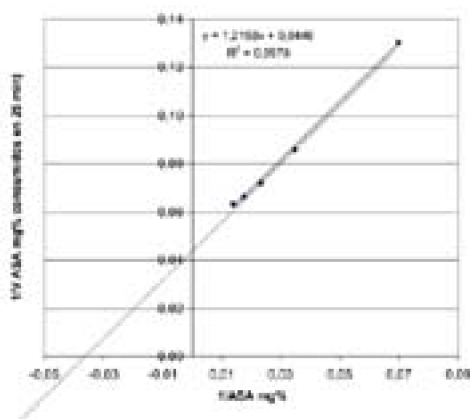


GRÁFICO N° 05: DOBLES RECÍPROCAS PARA LA ACTIVIDAD ESTERÁSICA ERITROCITARIA FRENTE AL ÁCIDO ACETILSALICÍLICO. AYACUCHO 2003

Ecuación de la recta: Lineweaver-Burk

$K_m = 29 \text{ mg\% (0.0016 M)}$

$V_{\text{máx}} = 23 \text{ mg\% (0.00127 M)}$ , en 25 minutos para 0.5 mL de eritrocitos lisados

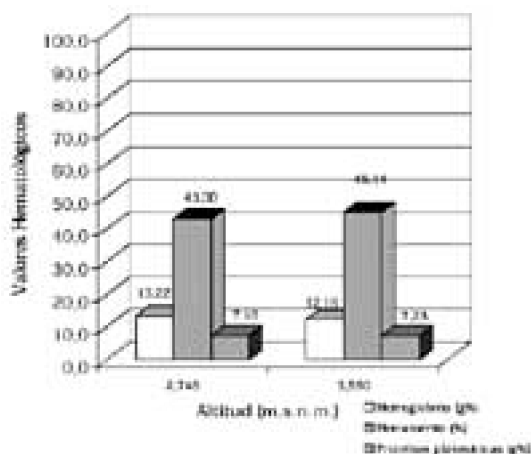


GRÁFICO N° 06: VALORES HEMATOLÓGICOS PARA NIÑOS DE DOS PISOS ALTITUDINALES AYACUCHO 2003

Espectrofotómetro: SPECTRONIC 20 D<sup>+</sup>

Cubetas: 1 cm de paso

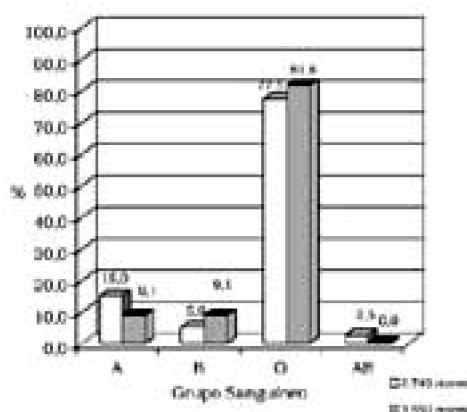
Longitud de onda: 540 nm

Hemoglobina: Método de Drabkin

Hematocrito: Método de los capilares

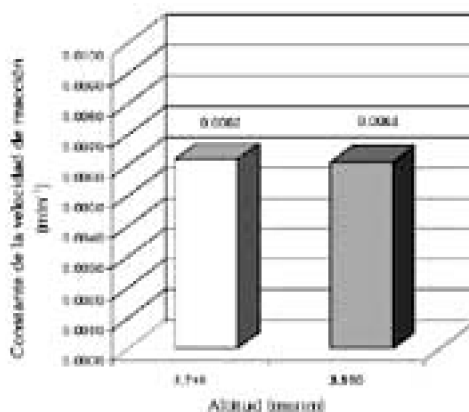
Proteínas: Método de Gornall, Bardawill, Davild

**Actividad esterásica eritrocitaria frente al ácido acetilsalicílico en niños de dos pisos altitudinales de la provincia de huamanga a 2,746 y 3,550 msnm. Ayacucho**



**GRÁFICO N° 07: PORCENTAJES DE GRUPOS SANGUÍNEOS DEL SISTEMA ABO EN NIÑOS DE DOS PISOS ALTITUDINALES. AYACUCHO 2003**

Método: Aglutinación en portaobjetos



**GRÁFICO N° 08: CONSTANTE DE VELOCIDAD DE REACCIÓN DE LA HIDRÓLISIS DEL ÁCIDO ACETILSALICÍLICO POR ACTIVIDAD ESTERÁSICA ERITROCITARIA EN NIÑOS DE DOS PISOS ALTITUDINALES. AYACUCHO 2003**

Espectrofotómetro: SPECTRONIC 20 D<sup>+</sup>

Cubetas: 1 cm de paso

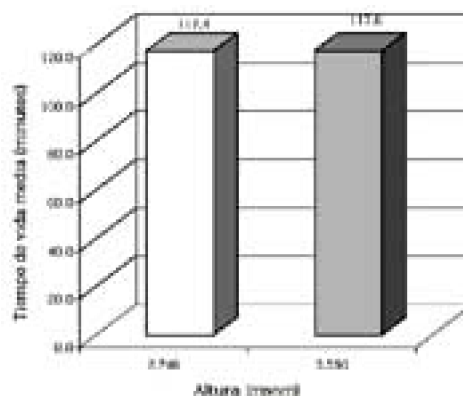
Longitud de onda: 540 nm

Temperatura: 37 °C

Buffer fosfatos salino 0,1 M

pH: 7,4

Tiempo de reacción: 0 - 55 minutos



**GRÁFICO N° 09: TIEMPO DE VIDA MEDIA DE LA HIDRÓLISIS DEL ÁCIDO ACETILSALICÍLICO POR ACTIVIDAD ESTERÁSICA ERITROCITARIA EN NIÑOS DE DOS PISOS ALTITUDINALES. AYACUCHO 2003**

Espectrofotómetro: SPECTRONIC 20 D<sup>+</sup>

Cubetas: 1 cm de paso

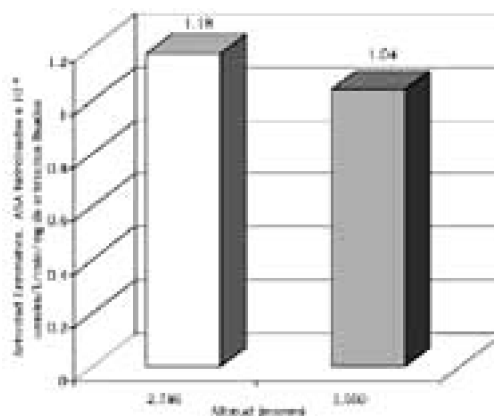
Longitud de onda: 540 nm

Temperatura: 37 °C

Buffer fosfatos salino 0,1 M

pH: 7,4

Tiempo de reacción: 0 - 55 minutos



**GRÁFICO N° 10: ACTIVIDAD ENZIMÁTICA PARA LA HIDRÓLISIS DEL ÁCIDO ACETILSALICÍLICO POR ACTIVIDAD ESTERÁSICA ERITROCITARIA EN NIÑOS DE DOS PISOS ALTITUDINALES. AYACUCHO 2003**

Espectrofotómetro: SPECTRONIC 20 D<sup>+</sup>

Cubetas: 1 cm de paso

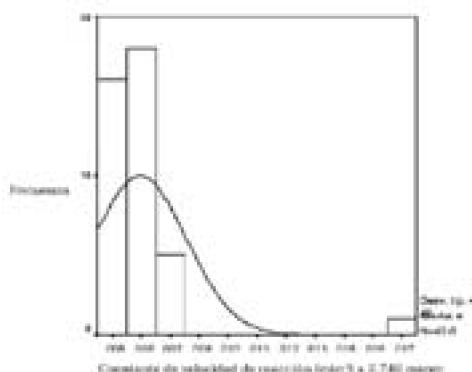
Longitud de onda: 540 nm

Temperatura: 37 °C

Buffer fosfato salino 0,1 M

pH: 7,4

Tiempo de reacción: 25 minutos



**GRÁFICO N° 11: DISTRIBUCIÓN DE FRECUENCIA DE LA CONSTANTE DE VELOCIDAD DE REACCIÓN PARA LA HIDRÓLISIS DEL ÁCIDO ACETILSALICÍLICO POR ACTIVIDAD ESTERÁSICA ERITROCITARIA EN NIÑOS DEL PISO ALTITUDINAL DE 2,746 msnm. AYACUCHO 2003**

Espectrofotómetro: SPECTRONIC 20 D<sup>+</sup>

Cubetas: 1 cm de paso

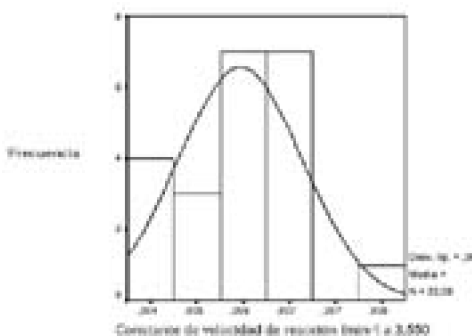
Longitud de onda: 540 nm

Temperatura: 37 °C

Buffer fosfatos salino 0,1 M

pH: 7,4

Tiempo de reacción: 0 - 55 minutos



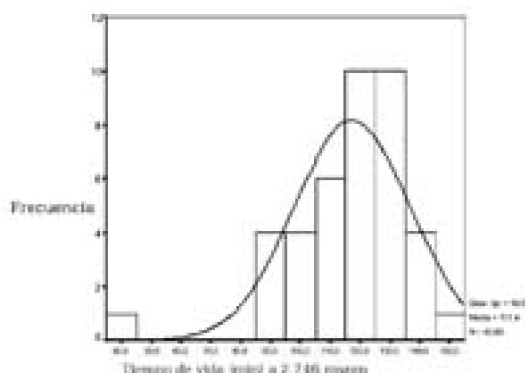
**GRÁFICO N° 12: DISTRIBUCIÓN DE FRECUENCIA DE LA CONSTANTE DE VELOCIDAD DE REACCIÓN PARA LA HIDRÓLISIS DEL ÁCIDO ACETILSALICÍLICO POR ACTIVIDAD ESTERÁSICA ERITROCITARIA EN NIÑOS DEL PISO ALTITUDINAL DE 3,550 msnm. AYACUCHO 2003**

Espectrofotómetro: SPECTRONIC 20 D<sup>+</sup>

Cubetas: 1 cm de paso

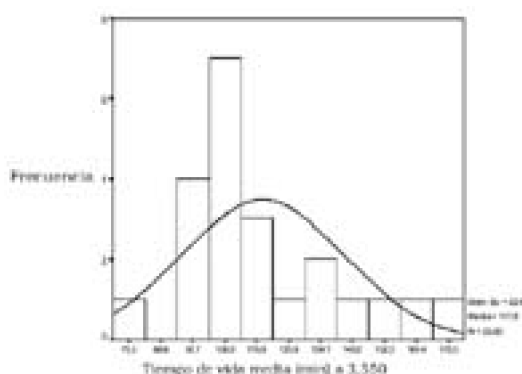
Longitud de onda: 540 nm

Temperatura: 37 °C  
 Buffer fosfatos salino 0,1 M  
 pH: 7,4  
 Tiempo de reacción: 0 - 55 minutos



**GRÁFICO N° 13: DISTRIBUCIÓN DE FRECUENCIA DEL TIEMPO DE VIDA MEDIA PARA LA HIDRÓLISIS DEL ÁCIDO ACETILSALICÍLICO POR ACTIVIDAD ESTERÁSICA ERITROCITARIA EN NIÑOS DEL PISO ALTITUDINAL DE 2,746 msnm. AYACUCHO 2003**

Espectrofotómetro: SPECTRONIC 20 D<sup>+</sup>  
 Cubetas: 1 cm de paso  
 Longitud de onda: 540 nm  
 Temperatura: 37 °C  
 Buffer fosfatos salino 0,1 M  
 pH: 7,4  
 Tiempo de reacción: 0 - 55 minutos

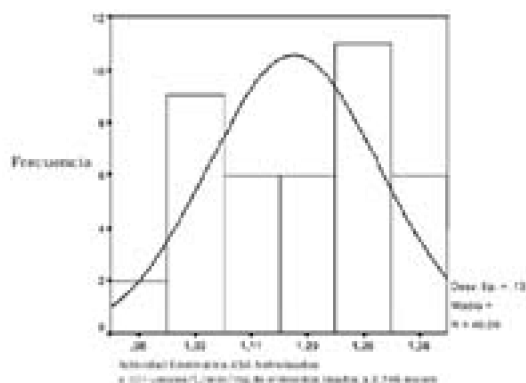


**GRÁFICO N° 14: DISTRIBUCIÓN DE FRECUENCIA DEL TIEMPO DE VIDA MEDIA PARA LA HIDRÓLISIS DEL ÁCIDO ACETILSALICÍLICO POR ACTIVIDAD ESTERÁSICA ERITROCITARIA EN NIÑOS DEL PISO ALTITUDINAL DE 3,550 msnm. AYACUCHO 2003**

Espectrofotómetro: SPECTRONIC 20 D<sup>+</sup>

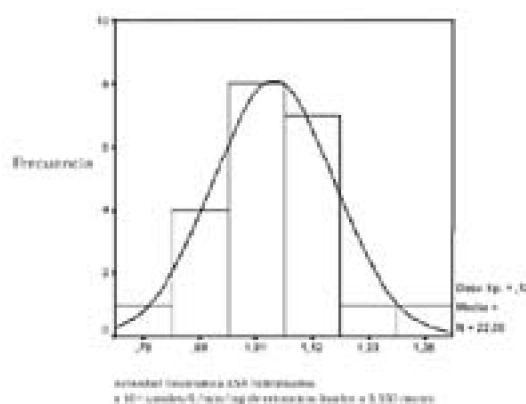
**Actividad esterásica eritrocitaria frente al ácido acetilsalicílico en niños de dos pisos altitudinales de la provincia de huamanga a 2,746 y 3,550 msnm. Ayacucho**

Cubetas: 1 cm de paso  
Longitud de onda: 540 nm  
Temperatura: 37 °C  
Buffer fosfatos salino 0,1 M  
pH: 7,4  
Tiempo de reacción: 0 - 55 minutos



**GRÁFICO N° 15: DISTRIBUCIÓN DE FRECUENCIA DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA PARA LA HIDRÓLISIS DEL ÁCIDO ACETILSALICÍLICO POR ACTIVIDAD ESTERÁSICA ERITROCITARIA EN NIÑOS DEL PISO ALTITUDINAL DE 2,746 msnm. AYACUCHO 2003**

Espectrofotómetro: SPECTRONIC 20 D<sup>+</sup>  
Cubetas: 1 cm de paso  
Longitud de onda: 540 nm  
Temperatura: 37 °C  
Buffer fosfatos salino 0,1 M  
pH: 7,4  
Tiempo de reacción: 25 minutos



**GRÁFICO N° 16: DISTRIBUCIÓN DE FRECUENCIA DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA PARA LA HIDRÓLISIS DEL ÁCIDO ACETILSALICÍLICO POR ACTIVIDAD ESTERÁSICA ERITROCITARIA EN NIÑOS DEL PISO ALTITUDINAL DE 3,550 msnm. AYACUCHO 2003**

*ERITROCITARIA EN NIÑOS DEL PISO ALTITUDINAL DE 3,550 msnm. AYACUCHO  
2003*

Espectrofotómetro: SPECTRONIC 20 D<sup>+</sup>

Cubetas: 1 cm de paso

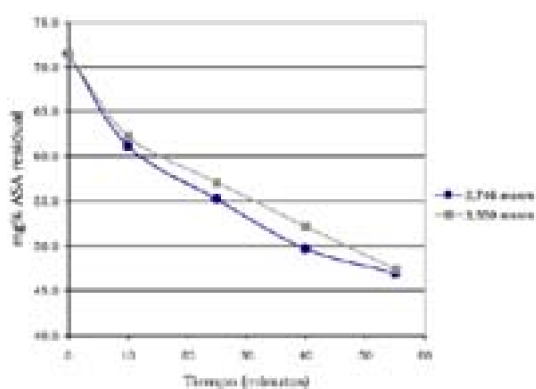
Longitud de onda: 540 nm

Temperatura: 37 °C

Buffer fosfatos salino 0,1 M

pH: 7,4

Tiempo de reacción: 25 minutos



**GRÁFICO N° 17: CINÉTICA DE LA HIDRÓLISIS DEL ÁCIDO ACETILSALICÍLICO POR ACTIVIDAD ESTERÁSICA ERITROCITARIA EN NIÑOS DE DOS PISOS ALTITUDINALES. AYACUCHO 2003**

Espectrofotómetro: SPECTRONIC 20 D<sup>+</sup>

Cubetas: 1 cm de paso

Longitud de onda: 540 nm

Temperatura: 37 °C

Buffer fosfatos salino 0,1 M

pH: 7,4

Tiempo de reacción: 0 - 55 minutos

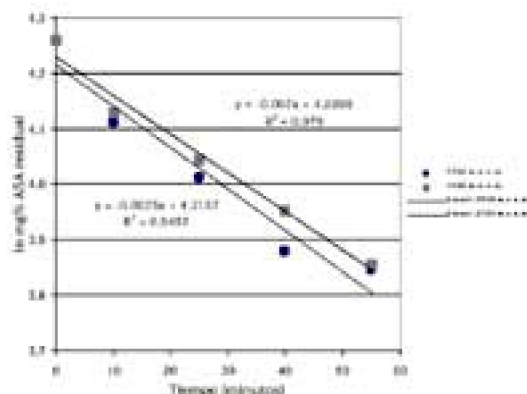


GRÁFICO N° 18: PLOTEO SEMILOGARÍTMICO PARA LA HIDRÓLISIS DEL ÁCIDO ACETILSALICÍLICO POR ACTIVIDAD ESTERÁSICA ERITROCITARIA EN NIÑOS DE DOS PISOS ALTITUDINALES. AYACUCHO 2003

Espectrofotómetro: SPECTRONIC 20 D<sup>+</sup>

Cubetas: 1 cm de paso

Longitud de onda: 540 nm

Temperatura: 37 °C

Buffer fosfatos salino 0,1 M

pH: 7,4

Tiempo de reacción: 0 - 55 minutos

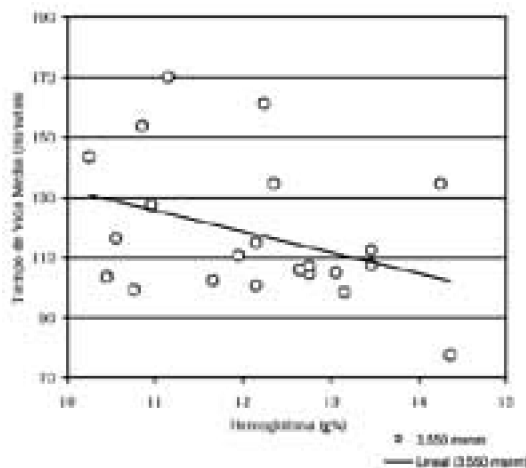
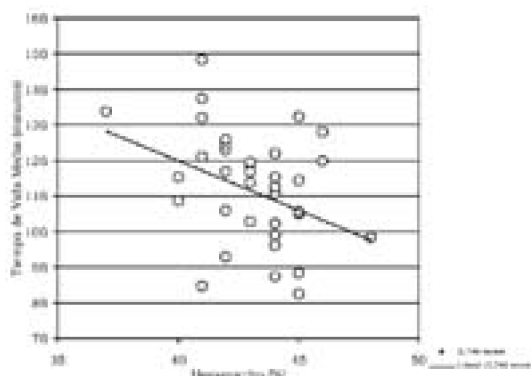


GRÁFICO N° 19: CORRELACIÓN ENTRE EL NIVEL DE HEMOGLOBINA Y EL TIEMPO DE VIDA MEDIA PARA LA HIDRÓLISIS DEL ÁCIDO ACETILSALICÍLICO POR ACTIVIDAD ESTERÁSICA ERITROCITARIA EN EL GRUPO ALTITUDINAL DE 3,550 msnm. AYACUCHO 2003

Correlación de Pearson: -0,369

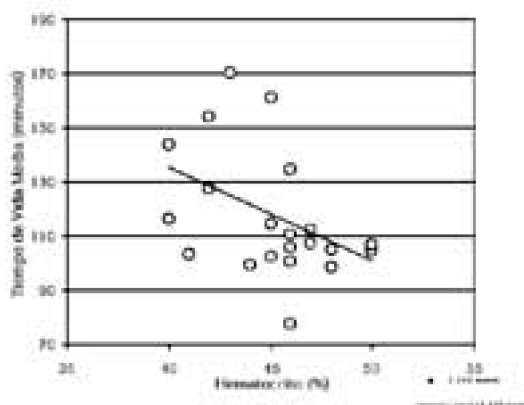
Significancia: 0,046



**GRÁFICO N° 20: CORRELACIÓN ENTRE EL NIVEL DE HEMATOCRITO Y EL TIEMPO DE VIDA MEDIA PARA LA HIDRÓLISIS DEL ÁCIDO ACETILSALICÍLICO POR ACTIVIDAD ESTERÁSICA ERITROCITARIA EN EL GRUPO ALTITUDINAL DE 2,746 msnm. AYACUCHO 2003**

Correlación de Pearson: -0,286

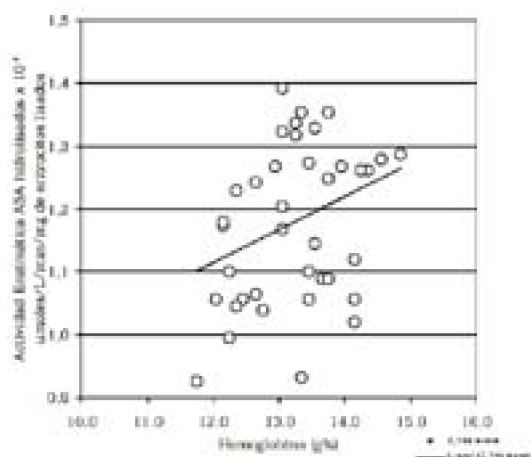
Significancia: 0,037



**GRÁFICO N° 21: CORRELACIÓN ENTRE EL NIVEL DE HEMATOCRITO Y EL TIEMPO DE VIDA MEDIA PARA LA HIDRÓLISIS DEL ÁCIDO ACETILSALICÍLICO POR ACTIVIDAD ESTERÁSICA ERITROCITARIA EN EL GRUPO ALTITUDINAL DE 3,550 msnm. AYACUCHO 2003**

Correlación de Pearson: -0,421

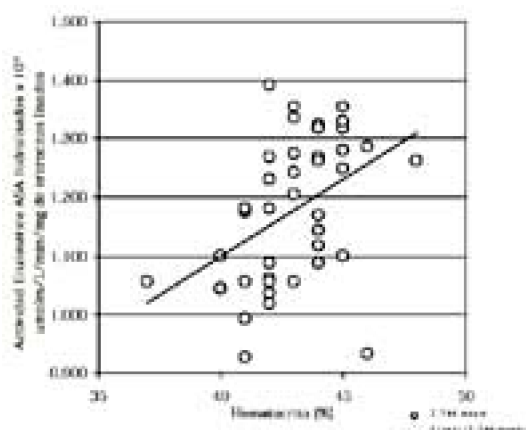
Significancia: 0,026



**GRÁFICO N° 22: CORRELACIÓN ENTRE EL NIVEL DE HEMOGLOBINA Y LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA PARA LA HIDRÓLISIS DEL ÁCIDO ACETILSALICÍLICO POR ACTIVIDAD ESTERÁSICA ERITROCITARIA EN EL GRUPO ALTITUDINAL DE 2,746 msnm. AYACUCHO 2003**

Correlación de Pearson: 0,327

Significancia: 0,020



**GRÁFICO N° 23: CORRELACIÓN ENTRE EL NIVEL DE HEMATOCRITO Y LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA PARA LA HIDRÓLISIS DEL ÁCIDO ACETILSALICÍLICO POR ACTIVIDAD ESTERÁSICA ERITROCITARIA EN EL GRUPO ALTITUDINAL DE 3,550 msnm. AYACUCHO 2003**

Correlación de Pearson: 0,420

Significancia: 0,003

**TABLA N° 01: MEDIAS DE LAS VARIABLES Y DE LOS PARÁMETROS CINÉTICOS DE LA ACTIVIDAD ESTERÁSICA ERITROCITARIA FRENTE AL ÁCIDO ACETILSALICÍLICO EN NIÑOS DE DOS PISOS ALTITUDINALES**

VARIABLES	PROMEDIO	2 746 m.s.n.m.	3 550 m.s.n.m
Edad (años)	9,25±0,247	9,15±0,23	9,45±0,54
Peso (Kg)	29,14±1,33	30,62±1,35	26,45±2,39
Talla (cm)	125,90±2,0	127,25±1,66	123,45±4,14
IMC	17,74±0,557	18,044±0,69	17,19±0,84
Hb (g%)	12,84±0,267	13,21±0,23	12,16±0,51
Hto (%)	43,74±0,602	42,00±0,595	45,13±1,19
Prot. Plasm (g%)	7,18±0,15	7,15±0,147	7,23±0,358
k (min <sup>-1</sup> )	6,16x10 <sup>-3</sup>	6,19x10 <sup>-3</sup>	6,09x10 <sup>-3</sup>
	±0,00043	±0,0006	±0,0005
t <sub>1/2</sub> (min)	117,26±5,142	117,40±5,71	117,59±9,59
AE umolASA/mg	1,129x10 <sup>-4</sup>	1,177x10 <sup>-4</sup>	1,041x10 <sup>-4</sup>
eritrocitos/min	±0,035	±0,036	±0,050

Km	0,0016 M
V <sub>máx</sub>	0,662 umol/L/min/mg



---

## V. DISCUSIÓN

El metabolismo de fármacos implica una serie de procesos por los cuales estas sustancias son modificadas en el organismo. Fundamentalmente, por reacciones enzimáticas entre ellas: oxidación, reducción, conjugación e hidrólisis <sup>(29)</sup>. Estas biotransformaciones están dirigidas a la formación de metabolitos más hidrosolubles por desenmascaramiento o introducción de grupos polares como COOH, OH y NH<sub>2</sub> <sup>(29)</sup>. Estos procesos se completan con la formación de conjugados con ácido sulfúrico, glucurónico o aminoácidos <sup>(29,30)</sup>. Los metabolitos resultan ser sustancias diferentes del fármaco administrado, menos activos y de algunas maneras más polares, como expresamos anteriormente; que difunden con menor facilidad a través de las membranas celulares; permanecen menor tiempo en el organismo por su resorción tubular renal disminuida, este último factor limita su actividad farmacológica. Algunos se convierten en metabolitos más activos o tóxicos <sup>(3,30)</sup>. En este contexto las enzimas encargadas de los cambios químico - estructurales son factores importantes en la evaluación de la acción de sustancias medicamentosas.

Todos los tejidos y fluidos biológicos contienen enzimas hidrolíticas y la duración de la actividad farmacológica depende en mucho de los casos de la hidrólisis enzimática <sup>(4)</sup>. El plasma y los eritrocitos contienen una variedad de enzimas hidrolíticas, entre ellas esterasas y amidasas <sup>(29)</sup>. El hombre así como las especies muestran diferencias en cuanto al metabolismo de los fármacos. Las diferencias observadas probablemente reflejen diferencias cuantitativas en las enzimas que metabolizan fármacos <sup>(3,30)</sup>.

Se han observado diferencias del metabolismo que dependen del desarrollo. Así las

enzimas fármaco - metabolizadoras del retículo endoplásmico comienzan a sintetizarse en cantidades útiles después del nacimiento, de ahí la sensibilidad de los niños recién nacidos y lactantes a ciertos medicamentos. Las enzimas de algunos tejidos como las microsómicas pueden sufrir inducción o inhibición e influir en los ritmos metabólicos (3,30).

Los niños frente a los adultos y ancianos manifiestan diferencias al metabolizar fármacos. Los niños tienen un tránsito intestinal más rápido. Un mayor contenido de agua en el cuerpo. Una superficie corporal relativamente mayor. Diferencias en la distribución tisular de los medicamentos, filtración glomerular y flujo plasmático renal relativamente menores, proteínas plasmáticas que no ligan fármacos en forma apropiada y problemas con la ingestión de los productos, a esto se suma la presencia de ciertos trastornos metabólicos hereditarios que hacen a las células más vulnerables a los efectos adversos (3,30).

En el presente trabajo se ha examinado in vitro la capacidad hidrolítica de los eritrocitos frente al ácido acetilsalicílico, teniendo como población a niños de dos pisos altitudinales, 2,746 y 3,550 msnm; de la región natural Quechua y Suni respectivamente, todos ellos escolares aparentemente sanos. En estas altitudes, es decir entre 2,500 y 3,000 msnm viven el 11,34% de la población y entre 3,500 y 4,000 msnm viven el 7,76% de la población de la república; más allá de 4,000 msnm el porcentaje se reduce a 1,15%. (31) Casi toda la población de la sierra se distribuye entre los 2,000 y 4,000 msnm, esto significa que la distribución de la población en la sierra es heterogénea por razones históricas, intereses socio económicos, en buena cuenta razones biogeográficas donde resaltan interrelaciones hombre – medio que se traducen en íteradaptaciones (31). En cuanto a aspectos demográficos, en 1990, UNICEF juntamente con el INEI (32,33), destacan sobre el desarrollo educativo de la niñez en Ayacucho (departamento ubicado en la sierra centro sur), que 182 500 son niños menores de 12 años y representan el 35,2% de la población total del departamento (32,33).

La edad de los dos grupos en estudio, corresponde a un segmento de la población poco estudiado, la edad está bastante puntualizada en nuestro trabajo ( $9,25 \pm 0,247$  años), de tal manera que no existen diferencias estadísticas significativas entre ambos grupos de los pisos altitudinales mencionados. Nuestra población corresponde a la segunda infancia o intermedia, niños antes de la edad puberal, donde la velocidad de crecimiento se mantiene constante (25). Desde el punto de vista del desarrollo se producen en esta edad cambios muy importantes en la motilidad fina y adquisición de conocimientos que posibilitan una integración a una educación formal (25).

Ahora bien, siguiendo las observaciones, el grupo poblacional de 3,550 msnm presentan menos peso y menos talla frente al grupo de 2,746 msnm, posiblemente debida a una nutrición inadecuada fruto de la pobreza de estas zonas altitudinales, desgarradas hasta hoy por la violencia que se arrastra desde los años 1980 y 1990. UNICEF en 1990, relatando el estado mundial de la infancia menciona que la pobreza, desnutrición infantil y la mala salud, envuelven a este segmento de la población (32). Aunque ambos grupos estudiados en general, según tablas, no muestran desnutrición. Comparativamente los niños de la ciudad, a 2,746 msnm presentan inclusive ligero sobrepeso.

El índice de masa corporal de la población estudiada de ambos pisos altitudinales no muestra diferencias significativas, no obstante el desagregado muestra distintos porcentajes de hiponutridos en ambos pisos. Teniendo como referencia las cifras de Beers<sup>(26)</sup>.

Los niveles de hemoglobina corregidos fueron ligeramente más altos para el grupo de 2,746 msnm; en cambio el grupo de 3,350 msnm presentó un hematocrito ligeramente más alto, diferencias que se notan estadísticamente. Pero en términos generales se ajustan a lo reportado por varios autores<sup>(34)</sup>; que señala como valores normales para niños de 6 – 10 años niveles de hemoglobina de 12,0 g%, niveles de hematocrito superiores a 37,5% y para las proteínas plasmáticas niveles comprendidos entre 6 – 8 g%. En otras citas<sup>(6)</sup>, se señala para varones de 18 a 20 años el valor de hematocrito a nivel del mar como  $43.33 \pm 1,61$  y para gran altitud, es decir 4,360 msnm el valor de  $53,42 \pm 4,03$ , parámetro bioquímico que siempre se eleva con la altura. Las referencias bibliográficas precisan que la altura influye en los niveles de hemoglobina, así para personas de la localidad de Morococha a 4,500 msnm, es decir en la región natural puna, estos niveles se encuentran en  $16,0 \pm 1,10$  g%, para Arequipa que está a 2,300 msnm reportan  $15,4 \pm 1,4$  g%<sup>(24)</sup>, aunque seguidamente reportan para niños de 10 – 12 años valores de 11,5 a 14,8 g%; y en un estudio piloto señalan como media 11,075 g% para el método Drabkin Coleman y 11,12 g% para sangre capilar; sin evidencia suficiente para señalar diferencias entre estas dos pruebas<sup>(24)</sup>.

La gran mayoría de la población, 75,5 y 81,8%, para 2,746 y 3,550 msnm pertenecen al grupo sanguíneo "O".

Por otro lado, los aspectos cinéticos estudiados para la hidrólisis del ácido acetilsalicílico por actividad esterásica eritrocitaria, rindió una media para la constante de velocidad de reacción, k, de  $6,13 \times 10^{-3} \pm 0,00043 \text{ min}^{-1}$  sin mayor diferencia estadística entre ambos grupos altitudinales. Otros autores<sup>(35)</sup>, reportan valores promedios para "k" de  $14,28 \times 10^{-3} \pm 3,65 \text{ min}^{-1}$  muy cercanos al nuestro, cuando estudia la actividad esterásica eritrocitaria en función de los grupos sanguíneos en personas adultas. Asimismo; en la literatura se encuentra<sup>(16)</sup> un valor "k" para la hidrólisis del ácido acetilsalicílico en el hombre de  $14,7 \pm 4,6 \times 10^{-3}$  en plasma, y en sangre total  $30,9 \pm 5,1 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$  comparativamente nuestro trabajo está a un nivel 5 veces menor al señalado, tal vez debido al tipo de técnica empleada con mayor sensibilidad. Aplicando el método de Trinder para una mezcla de suero se encuentra una cinética de pseudo - primer orden y valores para "k" de  $9,7 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$  para varones y  $8,71 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$  para mujeres<sup>(27)</sup>. Otro reporte<sup>(36)</sup>, presenta en forma desagregada para el sexo masculino un valor de "k", de  $2,985 \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$  y para el sexo femenino  $1,861 \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$ . Cuando se estudia la cinética de la hidrólisis solvolítica del ácido acetilsalicílico, es decir estrictamente en agua y buffer fosfato 0,1 M entre 30 y 420 minutos a una concentración de 200 mg de ASA a pH 7,4 y 37° se encuentra una constante "k" para la velocidad de reacción, de  $9,9 \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$ , pero lógicamente esta reacción no está catalizada enzimáticamente<sup>(37)</sup>.

El tiempo de vida media para la hidrólisis del ácido acetilsalicílico in vitro por actividad esterásica eritrocitaria para la población estudiada, fue de  $117,26 \pm 5,142$  min no encontrándose diferencia estadística significativa entre los dos pisos altitudinales, para una ( $p < 0.05$ ). Para 2,746 msnm el tiempo de vida media va desde los 90 a 150 min. y

para 3,550 msnm el tiempo de vida media se extiende desde 79,15 min hasta 170,5 min, como se observa en la distribución de frecuencias. Otros investigadores, trabajando con adultos de ambos sexos, encontraron un tiempo de vida media de  $50,62 \pm 13,37$  min<sup>(35)</sup>. Aún más, se señala un tiempo de vida media de 27,37 min para varones y 44,46 min. para mujeres trabajando con una dilución de eritrocitos hemolizados al 31,25% y a 2,750 msnm<sup>(36)</sup>. Estudiando la literatura internacional sobre la hidrólisis del ácido acetilsalicílico en sangre humana y plasma<sup>(14)</sup>, in vitro, a niveles terapéuticos significativos por un método espectrofluorométrico precisan que la reacción es de pseudoprimer orden, trabajando a 37°C para una concentración inicial de ácido acetilsalicílico de 13 ug/mL reportándose un tiempo de vida media de  $32,02 \pm 0,91$  min. en sangre y en plasma  $65,9 \pm 1,98$ . Los datos para el tiempo de vida media<sup>(14)</sup> de estos autores extranjeros están muy cercanos a lo reportado para los trabajos en suero<sup>(27)</sup>, donde la vida media fue de 71,2 min. para varones y 79,6 min. para mujeres. En otros trabajos<sup>(38)</sup>, cuando reportan la persistencia de la aspirina en sangre humana se inclinan a pensar que la concentración de los eritrocitos modulan el parámetro tiempo de vida media, mencionando que para un aumento del hematocrito de 20 a 45%, el  $t_{1/2}$  disminuye desde 78 a 32 minutos<sup>(38)</sup>. Igualmente si los glóbulos rojos se lavan y se mantienen a una concentración de 40% y aumenta la albúmina de 0 a 3,3 y 6,6 g%, el  $t_{1/2}$  se incrementa a 18 a 24 y 33 minutos respectivamente, al parecer la albúmina secuestra al ASA e impide la degradación enzimática eritrocitaria<sup>(38)</sup>. Después del lavado de los glóbulos rojos y haciendo pruebas con el inhibidor diisopropil fluorofosfato observan que no se afecta mayormente el  $t_{1/2}$ , señalando un  $t_{1/2}$  de 23 minutos para sangre completa con un hematocrito del 42% y para células rojas lavadas, un  $t_{1/2}$  de 20 minutos<sup>(38)</sup>. En un estudio de la hidrólisis del ASA con una dilución de suero y sangre 33 veces mayor y a una concentración de  $2,4 \times 10^{-2}$  M de ASA (433 ug/mL), reportan una constante de velocidad media a 25°C de  $4,74 \times 10^{-2} \text{ h}^{-1}$  y un  $t_{1/2}$  de 14 horas y para sangre una "k" de  $11,7 \times 10^{-2} \text{ h}^{-1}$  y  $t_{1/2}$  5,9 horas<sup>(14)</sup>. Además, se señala que a 37 °C la velocidad de reacción es cerca del doble del ensayo a 25 °C<sup>(14)</sup>. En el trabajo de hidrólisis solvolítica para el ácido acetilsalicílico en buffer de fosfatos a pH 7,4 y 37°C se encontró una cinética de orden cero y se reportó un tiempo de vida media de 16,2 h<sup>(37)</sup>; coincidentemente en otra investigación extranjera se señala un tiempo de vida media de 17 h para la hidrólisis espontánea del ácido acetilsalicílico a pH 7,4 en un medio Krebs-Ringer tamponado con bicarbonato a 37°C<sup>(10)</sup>, estos tiempos de vida media, un tanto extensos, se deben a la hidrólisis espontánea del ácido acetilsalicílico. Colateralmente, debemos precisar que el estudio de la velocidad de degradación del ácido acetilsalicílico en función del pH da un perfil del subtipo ABCDE con un máximo de estabilidad a pH 2<sup>(37)</sup>, coincidiendo con otras investigaciones<sup>(39,40)</sup>, lo que avala la bondad del método de TRINDER en estos casos.

En cuanto a la constante de velocidad de reacción y el tiempo de vida media para la reacción catalizada enzimáticamente por el lisado de eritrocitos de nuestro trabajo, debemos indicar que confrontado con los datos de otros autores están un tanto cercanos, lo que nos da confianza en las cifras que presentamos.

La actividad enzimática, AE, reportada en umol de ASA consumidos/mg de eritrocitos lisados/minuto, cuando se tomaron los datos a los 25 minutos de reacción fueron

$1,177 \times 10^{-4} \pm 0,036$  y  $1,04 \times 10^{-4} \pm 0,05$  para 2,746 y 3,550 msnm respectivamente mostrando diferencia estadística altamente significativa. Esta diferencia no es de extrañar por cuanto emanan de un solo tiempo de muestreo y no del total de los cuatro tiempos considerados para observar la cinética de la hidrólisis del ácido acetilsalicílico, los valores de la constante de velocidad de reacción,  $k$ , y tiempo de vida media,  $t_{1/2}$ , son en suma mucho más representativos del estudio de la actividad esterásica eritrocitaria.

Ahora bien, tal como se observa en la literatura; el contenido eritrocitario posee una(s) esterasa(s) que desdobra(n) el ácido acetilsalicílico <sup>(15,38)</sup>, en efecto nosotros hemos estudiado la cinética enzimática de la hidrólisis de este sustrato y vemos que responde a una clásica cinética michaeliana (Gráfico N° 04). Precisamos que el valor de  $V_{\text{máx}}$  fue de 23 mg% de ASA (0,00127 M) consumidos en 25 minutos, empleando en el tubo reactor 0,5 mL de lisados de eritrocitos, en otras palabras 0,662  $\mu\text{mol/L/min/mg}$  de tejido. Así como una  $K_m$  de 29 mg% de ASA (0.0016 M ó 1,6 mM). En la literatura <sup>(15)</sup>, se reportan para la enzima purificada un valor de  $V_{\text{máx}}$  de  $4,0 \pm 0,9 \mu\text{mol/L/min/mg}$ , lo encontrado por nosotros está cuatro veces por debajo de este valor considerando las condiciones de nuestros ensayos que corresponden a un lisado crudo de eritrocitos y donde probablemente se encuentren algunos inhibidores. Estos autores <sup>(15)</sup>, prueban la inhibición de la enzima con DTNB reportando un valor de 1,5  $\mu\text{mol/L/min/mg}$ , un poco más del doble que nuestras cifras. Asimismo, señalan la cifra de  $66,6 \pm 3,5 \mu\text{M}$  para el parámetro  $K_m$  <sup>(15)</sup>. Continuando con la revisión literaria tenemos otra investigación <sup>(17)</sup>, donde se reporta para la esterasa I y II un  $K_m$  de  $1,33 \pm 0,14$  y  $8,85 \pm 0,6 \text{ mM}$  respectivamente y para la  $V_{\text{máx}}$  valores de  $53,91 \pm 8,64$  y  $80,40 \pm 9,38 \text{ nMoles}$  de ácido salicílico formado por miligramos de proteína y por minuto. El valor  $K_m$  de nuestro trabajo se acerca al valor  $K_m$  de la esterasa I de este reporte.

Por otro lado, el tipo de cinética u orden de reacción de la hidrólisis del ácido acetilsalicílico que sigue esta reacción catalizada bajo la acción de las esterases de los eritrocitos es de pseudo primer orden (Gráfico N° 17), para un tiempo de 0 a 55 minutos, con una concentración inicial de 71,42 mg% de ASA y demás condiciones señaladas en la metodología, es decir, buffer fosfato salino de pH 7,4, 0.1 M, 37 °C.

Entendemos que, las correlaciones más importantes que hemos encontrado se refieren al estudio del hematocrito contra el tiempo de vida media para ambos pisos altitudinales. Llama la atención, la correlación a 3,550 msnm, que presenta un valor de -0,421 y el coeficiente de determinación,  $R^2$  es 0,177, lo que nos indica sólo un 17,7% de asociación entre variables. En la literatura internacional <sup>(38)</sup>, se encuentra una correlación parecida pero con un valor  $r = -0,96$  ( $p < 0,001$ ), fuertemente negativa entre el tiempo de vida media del ácido acetilsalicílico y el hematocrito, por el tamaño de muestra y el tipo de metodología analítica. Pero en términos generales, esta correlación resulta lógica, por cuanto la(s) enzima(s) está asociada a los glóbulos rojos, en otras palabras al paquete globular.

De la presente investigación, podemos adelantar que no existe diferencia estadística significativa cuando se compara la actividad esterásica eritrocitaria en niños de los dos pisos altitudinales, considerando los parámetros cinéticos, constante de velocidad de reacción,  $k$  y el tiempo de vida media para la hidrólisis del ácido acetilsalicílico; pese a que la altura conlleva a modificaciones fisiológicas, que podrían influir como en algunos

casos en pérdida de la respuesta clínica en grandes altitudes <sup>(6)</sup>, ya que por ejemplo, a 3,600 msnm la presión de oxígeno,  $PO_2$ , del aire seco es de 102 torr frente a 159 torr del nivel del mar, manifestándose la hipoxia, acúmulo de fluidos en las membranas de los alvéolos, incremento del flujo sanguíneo al cerebro, disminución de los niveles de dióxido de carbono por el incremento de la ventilación, lo que eleva los valores del pH sanguíneo, forzando a los riñones a eliminar bicarbonato, a lo que se suma fallas en la bomba de sodio con pérdidas de cantidades excesivas de potasio, afectando el balance electrolítico (6).

---

## CONCLUSIONES

De acuerdo a los objetivos planteados, para la cinética de la hidrólisis del ácido acetilsalicílico por actividad esterásica eritrocitaria frente al ácido acetilsalicílico en niños de dos pisos altitudinales de la provincia de Huamanga a 2,746 y 3,550 msnm, arribamos a las siguientes conclusiones:

1.El tipo de cinética para esta hidrólisis catalizada corresponde a una de pseudo primer orden, rastreándose la reacción en un tiempo comprendido entre 0 y 55 minutos, empleando el método de Trinder, a pH 7,4 y 37°C en buffer fosfato salino 0,1 M, encontrándose un valor de  $6,16 \times 10^{-3} \pm 0,00043 \text{ min}^{-1}$  para la constante de velocidad de reacción, k, para población total y un tiempo de vida media,  $t_{1/2}$ , de  $117,26 \pm 5,142 \text{ min}$ . para la población total; no existiendo diferencias estadísticas significativas ( $p < 0,05$ ) para ambos parámetros en los dos pisos altitudinales estudiados.

2. La media de la actividad enzimática reportada en umol de ASA consumidos/mg de eritrocitos lisados/min fue de  $1,129 \times 10^{-4} \pm 0,0035$ , manifestando diferencia estadística significativa ( $p < 0,05$ ). La cinética enzimática de la hidrólisis es de tipo michaeliana, siendo el valor de Km de 1,6 mM y la  $V_{\text{máx}}$  fue de  $0,662 \text{ umol} \times \text{L}^{-1} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$

3.La correlación más importante se observó entre el tiempo de vida media y los niveles de hematocrito para ambos pisos altitudinales ( $p < 0,05$ ), siendo para la población de 3,550 msnm -0,421 y -0,286 para 2,746 msnm, lo que ratifica la presencia de la(s) esterasa(s) en el paquete globular.



---

# BIBLIOGRAFÍA

- SANDLER, M. "Enzyme Inhibitors As Drugs". The MacMillan Press LTD. Londres - Great Britain. 1980; 249 - 258.
- PESKAR B.A.; MUHS A; SALINGER A; BERTRAM L; MEYER ZUM GOTTESBERGE A; ATKINS D y PALLAPIES D. "Prostaglandinas y Compuestos Relacionados. El papel de las prostaglandinas en el dolor". Resúmenes de la 1.era Conferencia Internacional Sobre Dolor. Buenos Aires – Argentina. 1994; 6
- BEVAN J.A. et al. "Fundamentos de Farmacología. Introducción los principios de acción de los fármacos". 2da Edic. Harper y Row Latinoamericano. México. 1994; 25, 39, 43, 55, 69, 87, 291
- MEYERS F., JAWETZ, E., GOLDFIEN, A. "Farmacología Clínica" Editorial El Manual Moderno. México. 1974; 296, 297, 298 y 299.
- ROSKOSKI R. "Bioquímica". Mc Graw-Hill interamericana México. 1998; 217
- RITSCHER, W. "Alterations of drug disposition in high altitude" Ciencia e Investigación. UNMSM. 1998; 1 (2): 87 - 96
- BALBACHAN, O. "Uso de antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) y riesgos de lesiones gastrointestinales". Resúmenes del Primer Congreso de Reumatología del Mercosur – Mar del Plata. Argentina. 1998; 3 – 8
- PEREZ - TORRES, H. "AINE: Importancia de la Farmacodinamia y de la Farmacocinética en su Selección Racional ". Tribuna Médica. 1996; 62 (1): 21-26, 12.

- SMITH P., GLEASON H., STOLL C., y OGORZALEK. "Studies on the Pharmacology of Salicylates". J. of Pharmacol. Exp. Therap. 1946; 87: 237-255.
- ROWLAND, M., RIEGELMAN, S., HARRIS, P., SHOLKOFF, S. "Absorption kinetics of Aspirin in Man Followin Oral Administration of an Aqueous Solution". J. of Pharmaceutical Sciences. 1972; 61 (3): 379-385.
- PAULUS H., SIEGEL M., MONGAN E., OKUN R., CALABRO J. "Variation of Serum Concentration and Half-life of Salicylate in Patient With Rheumatoid Arthritis". Arthritis and Rheumatism. 1971; 14 (4): 527-531.
- LEVY G., TSUCHIYA, T. "Salicylate Accumulation kinetics in man". The New Englande Journal of Medicine. 1972; 31: 430 – 432.
- EKSTRAND R., ALVAN D., BORGA O. " Concentration Dependent Plasma Protein Binding of Salicylate in Rheumatoid Patient". Clinical Pharmacokinetics. 1979; 4: 137 – 143
- HARRIS P.A. RIEGELMAN S. "Acetylsalicylic Acid Hydrolysis in Human Blood and Plasma ". J. of Pharmaceutical Sciences. 1967; 56 (6): 713-716.
- COSTELLO, P., GREEN, F. "Identification and Partial Purification of the Major Aspirin Hydrolyzing Enzyme in Human Blood". Arthritis and Rheumatisms. 1983; 26 (4): 541-546.
- COSTELLO, P., CARUANA, J., GREEN, F. "The Relative Roles of Hydrolases of the Erythrocyte and other Tissues in Controlling Aspirin Survival in vivo ". Arthritis and Rheumatism. 1984; 27 (4): 422-425.
- BENEDITO M.A.C. "Fluorometric Determination of Tissue Distribution and Differences Between the Activity of Aspirin Esterasa I and II in Mice and Rats ". J. Pharm and Pharmacol. 1997; 49: 273, 276.
- RAAFLAUB, J. "Farmacocinética". Edit. Roche. Suiza. 1985.
- VALLS, A. "Introducción a la antropología. Fundamentos de la Evolución y Variabilidad Biológica del Hombre". Edit. Labor S.A. 2da Edición. España. 1985; 125
- IOVINE, E., SELVA, A. "El Laboratorio en la Clínica ". Edit. Médica Panamericana. 3era Edición. Buenos Aires – Argentina. 1985; 76, 77, 234, 235.
- CHIRINOS, E. "Actividad de la Transcetolasa Eritrocítica y Efecto de la Tiamina Pirofosfato Como Evaluadores de Tiamina Eritrocítica en Personas Aparentemente Normales de la Localidad de Ayacucho, 2,750 msnm" Tesis UNSCH. Ayacucho – Perú. 1984.
- GUERCI, A. "Laboratorio: Métodos de Análisis Clínicos y su Interpretación". 4ta. Edic. Edit. El Ateneo. Buenos Aires. Argentina. 1988; 136 – 140, 185, 186, 224.
- FONSECA DE MORAES R.L., BANDKLAJDER R. "Determinacao da salicilemia pelo Método Colorimétrico de Trinder e Espectrofluorométrico de Baselt ". Rev. Farm. Bioquim. Univ. Sao Paulo. 1987; 23 (2): 159-169
- MINISTERIO DE SALUD-INS. "Manual de procedimientos para el diagnóstico de anemia por hemoglobinómetro". Edit. MINSA-INS. Lima. 1997; 28,30,31,52,54.
- CUSMINSKY, M; LEJARRAGA, H; MERCER, R; MARTELL, M Y FESCINA, R. "Manual del crecimiento y desarrollo del niño" Editorial Organización Panamericana de la Salud. Washington DC – E.U.A. 1986; 31,32,33.

- BEERS M.H.; BERKOW R. "El Manual Merck". Edición Centenario. Editorial Harcourt. Madrid. 1999; 26
- DIEZ, J. "Actividad Esterásica Sérica I". Rev. de Inv. de Bioquímica. Univ. Nac. San Cristóbal de Huamanga. 1990; 1 (1): 13-32.
- SEGEL, I. "Cálculos de Bioquímica". Edit. Acribia 2da. Edición. España. 1982.
- AVENDAÑO, C. "Introducción a la Química Farmacéutica". Edit. Interamericana Mc Graw-Hill. España. 1996; 165, 166, 182, 229, 232.
- HARMAN J., LIMBIRD L., MOLINOFF P., RUDDON R., GOODMAN GILMAN A., "Goodman y Gilman Las bases farmacológicas de la terapéutica". Mc Graw Hill Interamericana. México. 1996.
- BEMEX, N. "Los Andes, espacio y educación". Ed. Escuela, ecología y Comunidad Campesina. Lima. 1990; 37,38.
- FONDO DE LAS NACIONES UNIDAS PARA LA INFANCIA – UNICEF/INEI. Estado Mundial de la Infancia. España. 1990; 1-6.
- FONDO DE LAS NACIONES UNIDAS PARA LA INFANCIA – UNICEF/INEI. El desarrollo educativo de la niñez y la adolescencia. Lima. 1996; 28-29.
- HOUSSAY, B. "Fisiología Humana". Edit. El Ateneo. 5ta Edición. Buenos Aires – Argentina. 1980; 26 – 27.
- RIVEROS, E. "Cinética de la hidrólisis del ácido acetilsalicílico por actividad esterásica eritrocitaria y su relación con los grupos sanguíneos en pobladores de la ciudad de Ayacucho – 1,999" Tesis para optar el Título de Químico Farmacéutico – UNSCH. Ayacucho. 2000.
- MELGAR, M. "Actividad Esterásica Eritrocitaria en Personas Aparentemente Sanas de la Localidad de Ayacucho 2 750 msnm". Tesis UNSCH. Ayacucho - Perú. 2000.
- DIEZ, J., ANAYA, B. "Estudio Cinético de la Hidrólisis del Ácido Acetilsalicílico". Informe de Investigación - UNSCH. 1999.
- COSTELLO, P., GREEN, F. "Aspirin Survival in Human Blood Modulated by the Concentration of Erythrocytes". Arthritis and Rheumatism. 1982; 25 (5): 550-554.
- CARSTENSEN J.T. "Drug Stability" Principles and Practices 2º edición. Ed. Marcel Dekker. USA. 1995; 97-99.
- HELMAN, J. "Farmacotecnia Teórica y Práctica" Tomo VII. Cia. Edit. Continental S.A. México. 1984; 2458
- AMIEL, J. "Metodología de la Investigación Científica". Edit. CONCYTEC. Lima. 1993.
- BARNETT, R. "Estadística en el Laboratorio Clínico". Edit. Reverte. España. 1983; 4, 6, 40.
- COSTELLO, P., GREEN, F. "Patterns of in vitro Aspirin Hydrolysis Rates in Rheumatoid Arthritis and Systemic Lupus Erythematosus". J. Rheumatol. 1986; 13: 882, 886.
- COSTELLO, P., GREEN, F. "The extracellular control of intracellular aspirin hydrolysis". Arthritis and Rhaumatism. 1987; 30 (4): 412 -417.
- DAY, R. "Cómo Escribir y Publicar Trabajos Científicos". Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana USA. 1990; 109 (2): 152
- ROWLAND, M., RIEGELMAN, S. "Pharmacokinetics of Acetylsalicylic and Salicylic Acid

After Intravenous Administration in Man". J. of Pharmaceutical Sciences. 1968; 457 (8): 1313 - 1319

VANE, J.R. "Nature New Biology". 1971; 231, 232.

VILLAVICENCIO, M. "Bioquímica ". Tomo I CONCYTEC Lima. 1996: 103.

---

# ANEXOS

## ANEXO N° 01

### FICHA DE DATOS PERSONALES

N°:.....

Altitud: ..... mnsn

Nombre:.....

Grupo sanguíneo:..... Factor Rh: .....

Edad:..... (años). Peso:..... (kg). Talla:..... (m). Sexo: ( M ) ( F )

Índice de masa corporal: .....

Hemoglobina:..... (g%)

Proteínas Plasmáticas:..... (g%)

Hematocrito:..... (%)

Constante de velocidad de reacción, k:..... ( $\text{min}^{-1}$ )

Tiempo de vida media,  $T_{1/2}$ :.....(min)

Actividad enzimática, AE:..... ( $\mu\text{mol}$  de ASA consumidos/mg de eritrocitos)

lisados/min.)

## **ANEXO N° 02**

**Datos de la población de niños a 2,746 msnm. Ayacucho – Perú**

n	Edad	Sexo	talla	peso	Hemoglobina	Grupo	Hematocrito	Proteínas	Absorbancia		
					Ajustada			Sanguíneo	Plasmáticas	Tiempo (minutos)	
									10	25	4
1	9	2	122	27,5	13,26	3	45	7	0,123	0,212	0
2	9	2	136	32,0	12,66	3	43	7,6	0,106	0,200	0
3	8	2	130	32,0	13,06	2	44	7,2	0,111	0,213	0
4	8	2	133	32,5	12,16	2	41	6,5	0,114	0,189	0
5	8	2	137	33,0	13,06	3	44	6,3	0,095	0,188	0
6	8	2	133	29,0	13,26	3	44	8	0,107	0,212	0
7	9	1	135	32,5	12,96	3	42	7,1	0,125	0,204	0
8	9	2	130	30,0	14,36	3	48	6,6	0,128	0,203	0
9	8	2	126	29,5	13,56	3	45	7,9	0,130	0,214	0
10	9	1	123	28,0	14,56	3	45	6,5	0,098	0,206	0
11	9	1	142	30,0	13,36	1	45	6,4	0,120	0,218	0
12	9	1	135	39,0	13,06	3	42	7,2	0,128	0,224	0
13	9	1	130	28,0	13,46	3	43	7	0,149	0,205	0
14	9	1	123	26,0	14,86	3	46	6,5	0,147	0,207	0
15	9	1	131	31,0	13,76	3	43	7,8	0,124	0,218	0
16	9	1	130	30,5	13,76	3	45	7,5	0,152	0,201	0
17	10	2	135	35,0	13,26	3	43	7,2	0,150	0,215	0
18	9	1	135	39,0	12,36	4	42	7	0,127	0,198	0
19	10	1	128	29,5	13,96	3	44	7,7	0,130	0,204	0
20	9	2	125	34,0	12,16	1	42	7	0,114	0,190	0
21	10	2	135	26,0	13,36	1	46	7,2	0,105	0,150	0
22	10	1	125	23,0	11,76	3	41	6,8	0,102	0,149	0
23	9	2	135	38,0	13,66	3	44	8,6	0,110	0,175	0
24	10	2	134	27,5	12,46	3	41	6,9	0,092	0,170	0
25	10	1	129	38,0	14,16	3	42	7,1	0,121	0,164	0
26	10	2	130	32,5	12,26	3	41	7,2	0,109	0,160	0
27	10	1	135	35,0	12,66	1	42	7,5	0,107	0,171	0
28	9	1	137	35,0	13,46	3	43	7,5	0,112	0,170	0
29	10	2	130	30,0	13,46	3	45	7,5	0,105	0,177	0
30	10	1	125	29,0	12,26	1	40	7,1	0,118	0,177	0
31	10	2	140	31,0	14,16	3	44	7,5	0,110	0,180	0
32	10	1	126	30,0	13,56	1	44	7	0,123	0,184	0
33	10	1	132	34,0	13,06	3	43	7,6	0,179	0,194	0
34	10	2	132	33,5	14,16	3	42	7,2	0,108	0,170	0
35	8	1	120	34,0	12,36	3	40	6,4	0,127	0,168	0
36	10	1	134	31,5	14,26	3	44	7,1	0,145	0,203	0
37	9	2	123	25,5	12,76	3	42	7,2	0,129	0,167	0
38	8	2	124	22,0	13,76	3	42	6,7	0,118	0,175	0
39	8	2	122	20,0	12,06	3	37	6,5	0,124	0,170	0
40	8	2	120	21,5	12,16	3	41	7,6	0,133	0,190	0

## ANEXO N° 03

### Datos de la población de niños a 3,550 msnm. Ayacucho - Perú

n	Edad	Sexo	Talla	Peso	Hemoglobina	Grupo	Hematocrito	Proteínas	Absorbancia			
									Tiempo (minutos)			
					Ajustada	Sanguíneo			10	25	40	55
1	8	2	106,0	18,000	14,36	3,000	46,00	6,90	0,090	0,218	0,289	0,3
2	9	2	117,0	20,000	12,36	2,000	46,00	7,10	0,065	0,125	0,184	0,2
3	11	1	137,0	29,000	12,76	3,000	50,00	7,70	0,066	0,177	0,22	0,2
4	9	2	124,0	24,000	12,66	3,000	46,00	7,60	0,098	0,152	0,212	0,2
5	11	2	132,0	27,000	12,76	3,000	50,00	7,80	0,10	0,166	0,237	0,2
6	11	1	134,0	33,000	13,16	3,000	48,00	7,30	0,110	0,152	0,243	0,3
7	10	1	143,0	34,000	12,16	3,000	45,00	7,30	0,082	0,162	0,226	0,2
8	11	2	132,0	32,000	13,46	3,000	47,00	7,40	0,105	0,163	0,247	0,2
9	9	1	131,0	28,000	13,46	3,000	47,00	8,00	0,118	0,167	0,233	0,2
10	11	2	130,0	28,000	13,06	3,000	48,00	7,80	0,095	0,166	0,266	0,2
11	9	2	119,0	20,000	14,26	1,000	46,00	7,20	0,10	0,162	0,224	0,2
12	9	2	117,0	24,000	10,56	3,000	40,00	5,60	0,124	0,164	0,22	0,2
13	10	2	123,0	29,000	12,26	3,000	45,00	7,10	0,15	0,184	0,207	0,2
14	11	2	130,0	38,000	11,96	3,000	46,00	7,20	0,126	0,173	0,235	0,3
15	9	1	119,0	22,000	11,66	2,000	45,00	7,40	0,133	0,18	0,23	0,3
16	10	2	124,0	28,000	11,16	3,000	43,00	7,50	0,134	0,155	0,198	0,2
17	11	2	133,0	37,000	12,16	3,000	46,00	8,90	0,114	0,181	0,244	0,3
18	8	1	116,0	25,000	10,76	3,000	44,00	7,30	0,134	0,184	0,251	0,3
19	7	1	114,0	20,000	10,46	3,000	41,00	8,10	0,117	0,2	0,211	0,3
20	8	1	112,0	22,000	10,86	1,000	42,00	6,40	0,132	0,143	0,193	0,2
21	8	1	114,0	23,000	10,26	3,000	40,00	6,80	0,088	0,143	0,19	0,2
22	8	2	109,0	21,000	10,96	3,000	42,00	4,70	0,109	0,172	0,215	0,2

Datos de la población de niños a 3,550 msnm. Ayacucho – Perú

Sexo: 1= Masculino; 2 = Femenino

Grupo sanguíneo: 1 = A; 2 = B; 3 = AB; 4 = O