

Fig. 3 Secuencia de aminoácidos. GR de levadura.

Mediante electroforesis con elevado voltaje, la glutathione reductase de los hematíes humanos normales se ha separado en dos isoenzimas (GRI y GR II), representando la banda I un 65% de actividad y la banda II un 35%, observándose en algunos casos de déficit parcial de la enzima, una ausencia de la zona de GR II (187,188).

DETERMINACION DE LA ENZIMA Y PROPIEDADES CATALITICAS

Muchos autores utilizan el procedimiento espectrofotométrico, introducido por MANSO y WROBLEWSKI (68) para la determinación de la actividad GR. Con este método, el suero (o un hemolizado) es preincubado en tampon fosfato de PH 7.5 con NADPH y la reacción se inicia con glutathione oxidado. El consumo de coenzima, que representa el grado de actividad de la enzima, se evalúa observando la disminución de absorción a 340 nm. (69,71,78).

Se han utilizado también procedimientos colorimétricos que se basan en la determinación de la formación de glutathione reducido por titulación iodométrica o a través de la reacción de color con nitroprusiato (84,189,190,191), pero se prefiere el método espectrofotométrico, utilizándose este segundo procedimiento de forma auxiliar, en los casos en que no es posible la medición de la absorción a 340 nm (173,192).

Utilizando el procedimiento espectrofotométrico, una unidad de actividad de la enzima se define como la cantidad de GR que cataliza la oxidación de un micromol de NADPH o NADH por minuto (173).

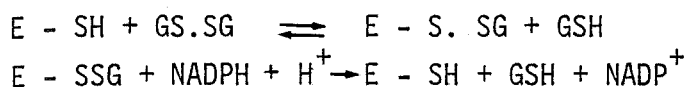
La enzima de la levadura es muy específica para el NADPH como sustrato, pero la enzima eritrocitaria humana es un 20% más activa con el NADH que con el NADPH en condiciones standard (173). Aunque se acepta que virtualmente no existe reactividad cruzada de la enzima con otros sustratos (163) de enzimas pertenecientes al mismo -

grupo, algunos autores insisten en que puede catalizar la reducción de varios disulfuros mixtos a condición de que el glutatión o la γ -glutamyl-cisteína forme parte de la mitad de los mismos (173, 176, 177).

El estudio repetido de los parámetros cinéticos de la glutatión reductasa eritrocitaria con preparados de alta actividad (193), confirman los patrones de inhibición del producto de la reacción y el efecto de distintas sales observado en anteriores estudios (172). La inhibición del producto por el NADP se ha visto que es competitivo con el NADPH y no competitivo frente al glutatión oxidado. Se ha demostrado además (172, 193) que existe inhibición del sustrato con niveles elevados de GSSG; con niveles altos de NADPH si la concentración de GSSG es baja, y que dicha inhibición es más pronunciada con bajas concentraciones iónicas. La K_m para el GSSG y la V_{max} se afectan por la concentración iónica: con fosfato 0.3M, la V_{max} es de 14,300 mols de NADPH por minuto por FAD, la K_m (NADPH) es de 13 microM y la K_m (GSSG) de 125 microM; con fosfato 0.03 M, la V_{max} es de 7,700, la K_m (NADPH) es de 9.5 microM y la K_m (GSSG) de 19 microM. Las concentraciones iónicas elevadas afectan sólo a concentraciones de GSSG superiores a 100 microM (193). Los parámetros cinéticos con el NADH (172, 193) y con el lipoato (172) también han sido investigados, demostrándose una menor especificidad de la enzima eritrocitaria en comparación con la alta especificidad de la enzima de levadura.

El PH óptimo es amplio y centrado en 6.8 (172, 173). La reacción catalizada por la GR es esencialmente irreversible, excepto con un PH elevado y con buena eliminación del producto (163).

La GR es inhibida por los iones Hg^{2+} y Cu^{2+} y por otros reactivos tiólicos. MIZE y cols. (66) han sugerido que el centro activo de la enzima contiene un grupo tiol que separa la molécula del sustrato del siguiente modo (E representa el resto de la molécula de la enzima):



Otros autores han demostrado que la GR de la levadura y de *E. Coli* contiene 4 y 5 grupos tiólicos por FAD, respectivamente, además del centro disulfuro activo (163).

VALORES NORMALES DE ACTIVIDAD GR.

En los primeros trabajos de MANSO Y WROBLEWSKY (68), los valores normales hallados en sueros de adultos sanos oscilan entre las 10 y 70 unidades por ml., con un valor medio ($\bar{X} \pm \text{DSM}$) de 40 ± 15 . No se observaron diferencias con respecto a la edad, sexo o color ni ante las determinaciones en ayunas o después de ingesta. Otros autores encuentran valores semejantes en adultos (69,78) pero con diferencias respecto a la edad (78) siendo los valores más altos en niños y jóvenes entre los 4 meses y 18 años con una media de 60 ± 16 unidades/ml. El embarazo tampoco parece influenciar los valores de actividad de la enzima (69).

El suero y el plasma heparinizado presentan actividad GR similar, sin observarse influencias significativas sobre los valores encontrados en situaciones con discretos grados de hemólisis, aunque en preparados de eritrocitos lisados se encuentra actividad hasta cinco veces superior a la del plasma (68). Las Tablas XII y XIII resumen los valores de actividad GR en suero y lisado de eritrocitos encontrados por los distintos autores, y los diversos valores obtenidos en plasma y lisado de eritrocitos investigados en 10 especies de animales. Anteriormente se refirió en la Tabla IX, los valores de actividad de la enzima en los distintos extractos de tejido en los que ha sido estudiado.

TABLA XII

Valores normales de actividad GR en suero y eritrocitos lisados humanos.

PROCEDENCIA	ACTIVIDAD GR	Nº CASOS	REF.
- SUERO			
. Adultos	40 $\pm$ 15 U*	98	68
	32 $\pm$ 14 U	70	69
	43 $\pm$ 16 U	60	78
	52 $\pm$ 12 U	-	21,22,23
. Niños	60 $\pm$ 16 U	64	78
- ERITROCITOS LISADOS	200 U/ml/min/Gm tejido -		68

* Una unidad GR se define como igual al cambio en la densidad optica de 0.001 por ml por minuto a 340 nm y 37° C.

TABLA XIII

Valores de actividad GR en plasma heparinizado y eritrocitos lisados en 10 especies de animales (68).

ESPECIE	ACTIVIDAD GR	
	PLASMA (U/ml/min)	ERITROCITOS LISADOS (U/ml cels/min)
Hamster	70	200
Conejo	40	600
Cobayo	27	100
Mono	26	300
Cabra	16	60
Ratón	16	50
Pollo	8	200
Cerdo	4	800
Rata	4	80

GLUTATION REDUCTASA EN PATOLOGIA HUMANA

1 - HEMOPATIAS

a - ANEMIAS.

Algunos autores han encontrado valores de actividad GR elevados en el suero de pacientes afectados de anemia megaloblástica (78), alcanzando porcentajes de elevación de hasta el 100%. Estos datos no concuerdan con los referidos por otros autores que obtienen valores normales en todos los casos (69), aunque ambas series son muy limitadas.

En algunos pacientes con anemia de células falciformes se describen también valores de actividad elevados en suero (69), mientras que en todos los casos de anemia ferropénica en los que se ha estudiado la actividad de la enzima sérica, ésta se encuentra entre los valores normales (68,69,78).

La actividad de la glutatión reductasa eritrocitaria se ha encontrado elevada en pacientes con déficit de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (84), en tanto que otros autores encuentran valores inferiores a los normales en otros pacientes con anemia hemolítica no esferocítica congénita (70,71,72,73,74,75), en los que existe un déficit de la enzima eritrocitaria transmitido probablemente de forma recesiva (70, 72,194,195,196). Los casos mas severos, en pacientes homocigóticos, presentan una forma de anemia hemolítica crónica -- acompañada frecuentemente de leucopenia y trombopenia, con actividad GR y valores de GSH inferiores a los de los hematies normales. Existe una vida media eritrocitaria disminuida, con mayor sensibilidad de la célula a la oxidación. En los casos de déficit moderado de la

enzima se cree que se trata de heterocigotos y no presentan otra alteración que una sensibilidad especial eritrocitaria a diversos agentes tóxicos (195).

El mecanismo de la hemólisis se explica por los niveles bajos - de glutatión reducido en el hematíe, sustancia que protege y mantiene en la forma reducida a distintos compuestos sulfidrilo por medio de interacciones de oxidación-reducción (197,198). Al no poder mantenerse los grupos -SH en las membranas de los hematíes, se produce hemólisis in vitro (198) o in vivo (199).

Finalmente, cabe señalar que se ha descrito un déficit adquirido y severo de la actividad GR eritrocitaria en algunos pacientes tratados con BCNU (1,3-bis (2cloroetil)-1-nitrosurea), efecto no observado con otros citostáticos (77). En estos pacientes, la inhibición de la GR por el fármaco puede reproducirse in vitro y es dependiente de la dosis, sin acompañarse de alteraciones en la actividad de otros 19 enzimas eritrocitarios determinados, incluyendo la NADH-matahemoglobina-diaforasa que es también una flavoproteína. El efecto del fármaco no es específico para el hombre ni para los hematíes, ya que se ha observado también en la enzima purificada de la levadura, en las enzimas de los leucocitos y plaquetas humanas y en todos los órganos estudiados en el ratón (77).

b - ENFERMEDADES HEMATOLOGICAS MALIGNAS Y LINFOPROLIFERATICAS.

En la amplia serie de pacientes con enfermedades diversas estudiados por WEST y cols (78), encuentran elevaciones de la actividad GR en el suero del 64% de pacientes con leucemia. Los enfermos con leucosis aguda o mieloide crónica no tratadas, presentaban elevaciones significativas, mientras los que tenían estos dos tipos de leucosis en remisión y los pacientes con leucemia linfocítica crónica presentaban valores normales. Es de destacar que en este grupo de pacientes, éstos autores, observaron los valores más elevados de la actividad de la enzima junto con los pacientes con carcinomas y algún paciente con hepatitis vírica.

En los pacientes con linfomas de distintos tipos, se encuentran valores elevados en un reducido número de casos (69,78) que en algunas series alcanza el 13% (78). No obstante, otros autores (68) presentan resultados discordantes con valores normales tanto en éste -- grupo de enfermedades como en pacientes con leucosis.

2 - GR EN NEOPLASIAS EPITELIALES.

En este grupo de pacientes, los valores de actividad GR en suero encontrados por los distintos autores son discordantes. Mientras en la primera serie de pacientes descrita por MANSO Y WROBLEWSKI en 1958 (68) sin diferenciar el tipo de neoplasia, ni la localización ni extensión, obtienen valores de actividad sérica superiores a los normales en el 80% de los pacientes, otros autores (69) encuentran elevaciones de hasta el 66% en los pacientes con neoplasias de distintos orígenes que presentan metástasis, con valores normales en el -- grupo de pacientes sin metástasis conocidas. En esta serie, los valores más elevados correspondieron a dos pacientes con neoplasia diseminada.

Aunque en ambos casos, el grupo de enfermos estudiados era reducido (38 y 22 pacientes respectivamente), en la larga serie de 292 - pacientes con carcinomas de distinto origen estudiada por WEST y --- cols (78), encuentran valores de actividad GR sérica elevados de forma moderada en el 37% de sus pacientes sin metástasis y en el 47% - de las que tenían metástasis supuestas o comprobadas histologicamente. En este grupo, los pacientes con metástasis hepáticas u óseas -- presentaban la mayor incidencia de valores elevados, especialmente - cuando se afecta el hueso, aunque se observaron también valores anormales en enfermos con carcinoma metastásico sin evidencia de afectación ósea o hepática. La Tabla XIV resume los valores encontrados según el lugar de las metástasis. Estos autores, en pacientes con tumores benignos (leiomiofibromas uterinos, fibroadenomas de mama, -- adenomas pulmonares etc) no encuentran valores de actividad GR elevados en el suero.

TABLA XIV

Relación entre los valores elevados de actividad GR sérica y el lugar de la metástasis (78).

LOCALIZACION METASTASIS	Nº PACIENTES	Nº ELEVACIONES	%
Ninguna	54	12	22
Higado	22	10	45
Hueso	25	16	64
Higado y hueso	13	8	61
Otros (pulmón,pleura ganglios linfáticos etc)	98	33	33

Otros autores (79) en un grupo heterogéneo de pacientes y utilizando un método optimado para la determinación de la actividad sérica de la enzima, encuentran valores anormales en el 58% de los casos, en general entre los pacientes con los estadios mas evanzados de la enfermedad.

En los distintos casos en los que se ha estudiado la actividad sérica de la enzima en relación al tipo de neoplasia, los valores encontrados son similares (19,21,22,23,25,).

En el grupo de pacientes con neoplasia de mama estudiados por ROSE y cols (19), un 38% de casos presentaban valores elevados en el suero, si bien en la mitad de los pacientes estas elevaciones -- eran muy discretas y en la mayoria de los casos con valores francamente alterados existian metástasis óseas o hepáticas, sin una correlación clara con dichos valores.

SCHWARTZ y cols, (21), en pacientes con carcinoma gastrointestinal obtienen valores de actividad de la enzima superiores a los normales en un 30% de casos, sin correlación entre los enfermos que presentaban metástasis hepáticas y los que los presentaban en lugares distintos al higado. No obstante, el análisis de los valores individuales demostró que los niveles más altos correspondian a los pacientes con afectación hepática. No se observó efecto alguno sobre el nivel de actividad GR en el suero y la presencia o no de ictericia obstructiva, mientras que dichos niveles de actividad se correlacionaban bien con los valores de las transaminasas obtenidos.

WEST y cols (23) en un estudio efectuado con 126 pacientes afectados de carcinoma pulmonar, encuentran valores de actividad de la enzima normales en el suero de practicamente todos los pacientes con neoplasias localizadas, sin metástasis a distancia. En los casos con carcinoma diseminado el porcentaje de elevación alcanza el 44%, con valores parecidos independientemente del lugar de la metástasis. Los valores más elevados se observaron en aquellos pacientes con los niveles más altos de transaminasas y enzimas glicolíticos, aunque para

la GR el grado relativo de elevación fue menor que en los otros - dos grupos de enzimas citados.

Unicamente en el 15% de los casos estudiados con neoplasias de cabeza, cuello, parotida y esófago (22), se observaron valores elevados de la actividad GR sérica. Estos resultados concuerdan -- con los obtenidos con la glucosa fosfato isomerasa y otras enzimas estudiadas en este tipo de pacientes (TABLA VIII), generalmente -- atribuido al reducido tamaño que alcanzan este tipo de tumores.

TAN y cols (25), estudiando el comportamiento de diversas enzimas en el suero de un numeroso grupo de pacientes con carcinomas metastásicos en el hígado, encuentran valores elevados de actividad GR en el 47% de los casos, muchos de ellos con grados de elevación discretos. En el grupo de pacientes con carcinomas de páncreas y de vías biliares) y en los pacientes con neoplasia primitiva de - localización distinta a pulmón, mama y tracto gastrointestinal, no fué posible comparar los resultados con los obtenidos en otros grupos de pacientes debido a su limitado número. En todos los casos, - los niveles enzimáticos encontrados tenían una buena correlación con el peso del hígado encontrado en necropsias..

3 - GR EN HEPATOPATIAS Y ENFERMEDADES DE LAS VIAS BILIARES.

En el estudio inicial de MANSO Y WROBLEWSKI (68) en un reducido número de pacientes con enfermedades hepáticas agudas y crónicas se observó un aumento de la actividad sérica de GR en todos los casos de hepatitis vírica aguda y en la mayoría de pacientes con hepatitis tóxica por salicilatos, con valores normales en los casos - de cirrosis hepática estudiados. En los casos de hepatitis en que - se efectuaron determinaciones seriadas, los niveles de actividad de la enzima seguían un curso paralelo al de las transaminasas y la bilirrubina, normalizándose después de la primera semana de enfermedad pocos días antes de que las transaminasas alcanzaran el valor normal (Fig. 4). Estos datos coinciden con los obtenidos por KERPPOLA y -- cols (69) en su serie, también limitada, de pacientes con enfermedade

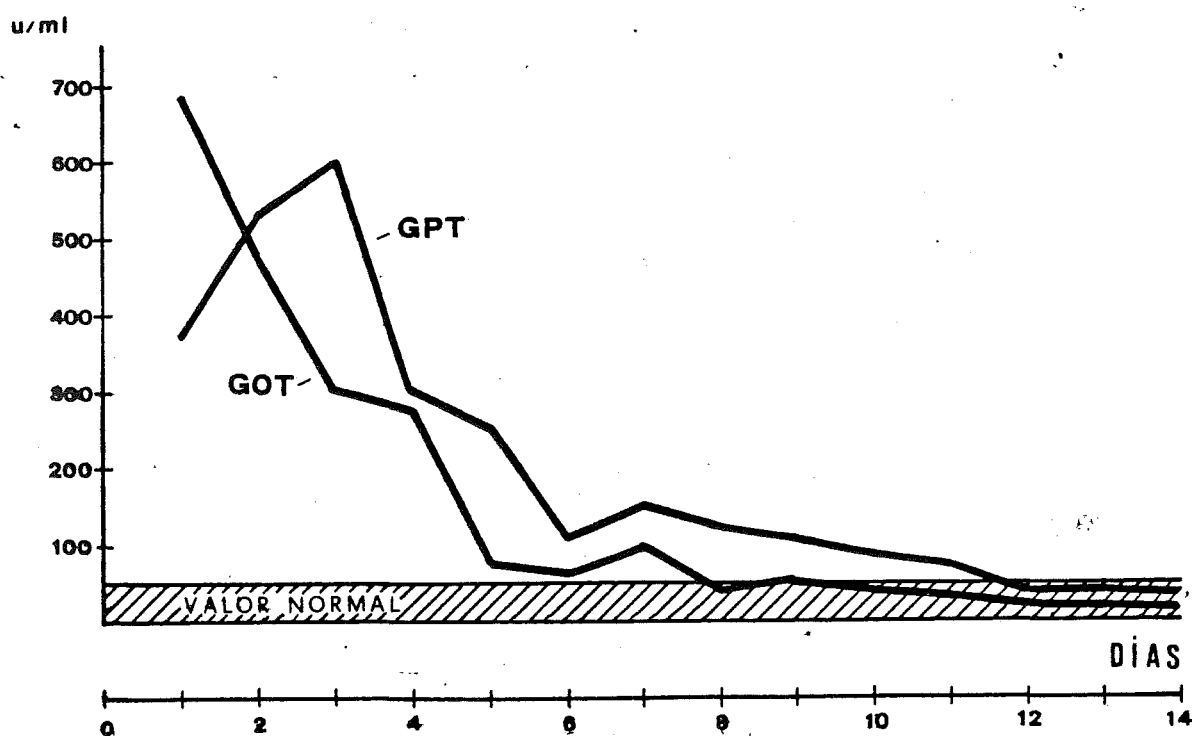
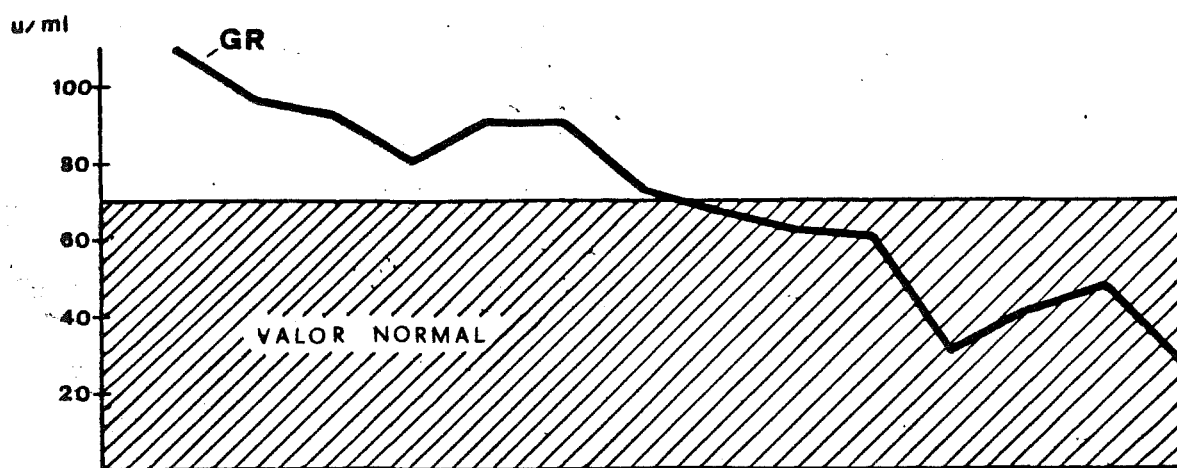


Fig. -4 . Determinaciones seriadas de GR y transaminasas en un paciente con hepatitis virica aguda (68).

des hepato-biliares, observando valores elevados en la mayoría de - pacientes con hepatitis aguda coincidiendo con la fase de aumento de la ictericia y normalizándose rápidamente (en el plazo de una semana) después de que la bilirrubina alcanzara el pico más alto. Estos autores, en cerca de la mitad de pacientes con cirrosis hepática - encuentran valores anormales, en general en aquellos casos caracteri- zados por ictericia importante y con alteraciones inflamatorias en - el hígado (biopsia con aguja), que ellos califican de cirrosis en - fase activa. En todos los casos de colecistitis aguda o crónica y co- ledocolitiasis con ictericia obstructiva o no, los valores de activi- dad sérica de GR se encontraron dentro de los límites normales.

WEST y cols, (78) en un grupo más amplio (67 pacientes con hepa- titis aguda, cirrosis hepática y enfermedades de las vías biliares - extrahepáticas), obtienen un porcentaje de elevaciones de la activi- dad sérica de la enzima del 71% en el grupo de pacientes con hepati- tis vírica, normalmente durante la primera semana de enfermedad. Mu- chos pacientes presentaban valores normales o discretamente eleva- dos cuando la cifra de transaminasas era de 60 veces el valor nor- mal. En un paciente con hepatitis granulomatosa, los valores de GR fueron también elevados. En el grupo de enfermos con cirrosis hepa- tica, el 38% presentaba valores moderadamente elevados de actividad GR, que no se relacionaban con la presencia o no de ictericia, asciti- tis o coma hepático. Los pacientes con enfermedades de las vías bi- liares extrahepáticas (colecistitis aguda y obstrucción del conduc- to biliar común) presentaban valores normales en su mayoría, con un 30% de determinaciones por encima del valor normal.

Estos mismos autores, en un grupo de pacientes con mononucleo- sis infecciosa y con alteración de las transaminadas como evidencia de afectación hepática, encuentran valores de actividad GR elevados en el 54% de los casos.

4 - GR EN OTRAS ENFERMEDADES

Algunos autores han encontrado valores de actividad GR elevados

en el suero de pacientes con infarto agudo de miocardio (78,83) especialmente durante las primeras 48 horas de evolución, sin observarse valores anormales después de los dos días. El porcentaje máximo de elevación fue del 20% y en algunos pacientes los niveles anormales se encontraron al segundo día, con valores durante las primeras 24 horas (78). En este estudio se observaron también valores altos en el 18% de pacientes con insuficiencia coronaria sintomática pero sin evidencia de infarto de miocardio; insuficiencia cardíaca congestiva o hipotensión. Otros autores, en series más limitadas (68,69) encuentran valores normales de actividad de la enzima tanto en la insuficiencia coronaria como en el infarto de miocardio.

En los casos de insuficiencia cardíaca en los que se ha efectuado la determinación sérica de la GR (68,69,78) los valores hallados se encuentran entre los límites normales en prácticamente todos los pacientes.

De forma ocasional se han descrito actividades elevadas de la GR sérica en pacientes con sarcoidosis pulmonar (69,78) en todos los casos en los que se ha determinado, y en algunos pacientes con neumonía (78) aunque en este último caso los datos obtenidos en otras series (69) no muestran alteraciones en la actividad de esta enzima en el suero.

En los eritrocitos de pacientes con diabetes mellitus se han encontrado valores de actividad GR elevados en algunos casos (86) mientras que en todo aquellos pacientes en los que determinó la actividad de la enzima en el suero, los valores obtenidos fueron normales (68, 69,78) al igual que en la mayoría de pacientes estudiados con enfermedades endocrinas, neurológicas, renales, gastrointestinales y pulmonares crónicas.

Cabe destacar que en un estudio efectuado en un grupo de pacientes con fibrosis quística (85), se observaron valores de actividad sérica de GR superiores a los encontrados en el grupo control. La

misma alteracion se ha observado en la GR eritrocitaria de éste tipo de enfermos (200), habiendose especulado sobre la posibilidad de que esta actividad anormal de la enzima estuviera relacionada con la patogenia de la enfermedad.

5 - GR EN OTROS FLUIDOS ORGANICOS.

La actividad de la enzima se ha determinado, aunque en limitados casos, en el líquido cefalorraquideo de pacientes con varias -- enfermedades cerebroespinales (68), encontrándose actividades apreciables únicamente en los casos con meningitis bacterianas.

Tambien en los líquidos serosos de las cavidad pleurales, pericárdica y peritoneal, se han obtenido valores elevados de actividad GR en aquellos casos en los que la alteracion era producida por un proceso neoplásico, normalmente un carcinoma metastásico, con valores mucho mas elevados que los obtenidos en el suero de los mismos pacientes. Cuando el líquido pleuro-pericárdico y/o peritoneal era producido por una alteración inflamatoria o hemodinámica, los valores de actividad de la enzima fueron normales (68).

PROPOSITO DE LA TESIS

Es conocido el valor de la determinación de la actividad sérica de glutatión reductasa y glucosa fosfato isomerasa en ciertas enfermedades, especialmente neoplasias localizadas y metastásicas y en algunas hemopatías. No obstante, la valoración de estas enzimas en distintas hepatopatías y otras enfermedades con afectación hepática se ha efectuado de forma parcial, en grupos reducidos de pacientes y con ambas enzimas por separado. El objeto de esta tesis es analizar el comportamiento de la actividad sérica de GR y GPI por separado y conjuntamente en distintas enfermedades hepáticas y en aquellas otras entidades en que puede existir afectación de ésta víscera. Para ello, se ha procedido de la siguiente forma:

. Estableciendo los valores de actividad sérica de GR y GPI en la población normal.

. Estudiando el comportamiento de ambas enzimas en hepatopatías agudas y crónicas y en colostasis intra y extrahepáticas benignas y malignas; en pacientes portadores de distintos tipos de neoplasias con y sin metástasis hepáticas, y pacientes con enfermedades infecciosas que pueden presentar afectación del hígado de forma diversa.

El estudio ha sido ampliado con un grupo de pacientes portadores de enfermedades distintas a las mencionadas para conocer el comportamiento de ambas enzimas en las mismas.

. Por último, con la intención de evaluar el interés de la determinación de las dos enzimas estudiadas en los distintos grupos de enfermedades y su valor diagnóstico frente a las demás enzimas de utilidad reconocida en cada enfermedad, se han comparado los valores de actividad sérica de GR y GPI con los obtenidos con el resto de enzimas determinados en cada grupo de pacientes.

MÉTODOS Y PACIENTES

A. OBTENCION DE MUESTRAS.

La sangre se extrajo en ayunas por punción venosa con jeringa de plástico desechable. Después de una hora de retracción del coágulo y centrifugación posterior a 3000 rpm se obtuvo el suero. Las determinaciones se practicaron después de la extracción o en sueros congelados a -20°C hasta un máximo de 48 horas.

B. MÉTODOS ANALÍTICOS

I. Los parámetros hematológicos y bioquímicos de rutina se han determinado con el Coulter Hematology y Coulter Chemistry respectivamente, por los métodos habituales.

II. DETERMINACION DE AMINOTRANSFERASAS, FOSFATASA ALCALINA y GAMMA GLUTAMIL TRANSPEPTIDASA.

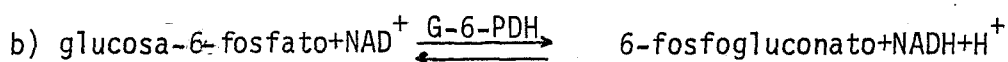
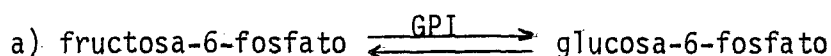
La actividad de aspartato amino transferasa (ASAT, GOT) alanina amino transferasa (ALAT, GPT) y fosfatasa alcalina (FAL) se determinó de acuerdo con las recomendaciones de la Sociedad Alemana de Química Clínica (201, 202, 203). La actividad de gamma glutamil transpeptidasa (GGT) se valoró siguiendo el método de SZASZ y cols. (204) modificado por PERSIJN (205) (sustrato l-gamma-glutamyl-3-carboxy-4-nitroanilida, cosustrato glicil-glicina).

Todas estas determinaciones se han realizado en un autoanalizador centrífugo (CENTRIFICHEM 400) utilizando reactivos ROCHE para ASAT y ALAT, y BOEHRINGER MANNHEIM para FAL y GGT.

III - DETERMINACION DE GLUCOSA FOSFATO ISOMERASA.

1 - PRINCIPIO.

Para la determinacion de GPI hemos utilizado el método de BUE-DING Y MACKINNON (94) modificado por SCHWARTZ (45) y comercializado por WORTHINGTON DIAGNOSTICS, cuyo principio esquematizamos a continuación:



En la primera reacción, la GPI cataliza la isomerización de la fructosa-6-fosfato a glucosa-6-fosfato. En la segunda reacción, la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G-6-PDH) oxida la glucosa-6-fosfato producida en la primera reacción y reduce al dinucleótido de nicotina - mida-adenina (NAD). El NADH producido en la segunda reacción es directamente proporcional a la glucosa-6-fosfato producida en la primera reacción y, por tanto, a la actividad GPI.

2 - REACTIVOS.

Los reactivos contienen los siguientes componentes:

. fructosa-6-fosfato	2.27 microMol/ml
. NAD	0.72 microMol/ml
. G-6-PDH	0.69 U/ml
. Tampón fosfatos a pH	8.5 $\pm$ 0.1

En la TABLA XV pueden apreciarse los reactivos empleados, concentración del reactivo reconstituido y concentración final de la mezcla reaccional.

TABLA XV - Determinación GPI : Reactivos empleados, concentración del reactivo reconstituido y concentración final de la mezcla reaccional.

COMPONENTES	Concentración del Reactivo Reconstituido	Concentración final de la mezcla reaccional .
Fructosa-6-fosfato	2.27 $\mu\text{mol/ml}$	2.2 mM/l
NAD	0.720 $\mu\text{mol/ml}$	0.7 mM/l
G-6-PDH	0.69 U/ml	0.67 U/ml
Tampon fosfatos, pH 8.5 $\pm$ 0.1		

3 - CONDICIONES DE MEDIDA.

El volumen de la muestra es de 0.10 ml; el volumen del reactivo de 3.000 ml, y el volumen reaccional de 3.1 ml .

La formacion de NADH se ha moritorizado a 340 nm de longitud - de onda en un espectrofotómetro VITATRON MPS, termostatado a 25° C.

4 - CALCULO DE LA ACTIVIDAD.

La actividad GPI en la muestra problema se ha calculado según - la siguiente fórmula:

$$U/L = \frac{\Delta E/t \times VF \times 1000}{E \times d \times VM} \times Tf \times \frac{1}{t}$$

en donde:

$\Delta E/t$ = Diferencia de extinción en la absorción por unidad de tiempo.

VF = Volumen final de la muestra reaccional (3.1 ml).

E = Coeficiente de extinción milimolar del NADH a 340 nanómetros de longitud de onda ($6.22 \times 10^3 \text{ cm}^2/\text{mMol.}$)

d = diámetro de la cubeta de lectura (1 cm).

VM = Volumen de la muestra problema (0.1 ml).

Tf = Factor de conversión de temperatura (para 25°C = 1).

t = Tiempo en minutos.

Una Unidad Internacional (U/L) es la reducción de un micro_l mol de NAD por minuto a 25, °C.

5 - SENSITIVIDAD.

La sensibilidad de medida, basada en una discriminación del espectrofotómetro de 0.001 de densidad óptica durante un periodo de - medida de 3 minutos, es de 1.6 U/L. La actividad máxima que puede -

ser determinada antes de diluir el suero es de 498 U/L.

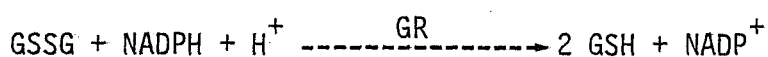
6 - PRECISION

Sobre una media de valores de 180 U/L, la desviación estandar media es de 5.1 y el coeficiente de variación medio de 2.8%.

IV. DETERMINACION DE GLUTATION REDUCTASA.

1 - PRINCIPIO.

La actividad de GR se ha valorado según el método descrito por DELIDES y cols (79), basado en la reducción del glutatión oxidado - por el NADPH en presencia de la enzima:



El medio de reacción contiene además EDTA disódico, con lo que se obtienen actividades enzimáticas más altas y el pH óptimo se sitúa próximo a la neutralidad, minimizándose la hidrólisis espontánea - del NADPH (79). Este efecto activador del EDTA es debido a que actúa como quelante de metales pesados inhibidores de la enzima, como el Ni^{++} , Cu^{++} y Zn^{++} (66).

2 - REACTIVOS.

Los reactivos utilizados así como la concentración del reactivo reconstituido son los siguientes:

- . Tampon fosfatos, 0.15 mol/L, pH 7.2
- . EDTA Na_2 , 15 mMol/L (CARLO ERBA).
- . GSSG, 65 mMol/L (BOEHRINGER MANNHEIM).
- . NADPH Na_4 , grado II, 10 mMol/L (BOEHRINGER MANNHEIM).

Los dos últimos reactivos se preparan diariamente.

3 - ESTUDIO DEL pH OPTIMO.

Se valoró la actividad GR de una muestra a diferentes pH, desde 6.2 a 8, en presencia o ausencia de EDTA en el medio de reacción. En

la figura 5, puede observarse que el pH óptimo se sitúa alrededor de 7.2 con EDTA en la reacción. Todas las determinaciones se efectuaron a este pH.

4 - ESTUDIO DE LA CONCENTRACION OPTIMA DE SUSTRATO.

Manteniendo la concentración de NADPH constante (0.175 mMols/L), se ha valorado la actividad GR de una muestra a concentraciones crecientes de GSSG que oscilaban entre 0.025 mMols/L y 0.80 mMols/L. En la figura 6, se aprecia que la velocidad de reacción es independiente de la concentración de glutatión oxidado a partir de 0.40 mMols/L.

5 - ESTUDIO DE LA CONCENTRACION OPTIMA DE COSUSTRATO.

Se ha estudiado la actividad GR de una muestra a concentraciones crecientes de NADPH que oscilaban entre 0.025 y 0.350 mMols/L, manteniendo constante la concentración de glutatión oxidado (2.28 mMols/L). En la figura 7, se observa que la velocidad de reacción es independiente de la concentración de NADPH a partir de 0.125 mMols/L.

6 - CONCENTRACION FINAL DE LOS REACTIVOS EN EL ENSAYO.

. Tampon fosfatos	0.105 mols/L.
. EDTA Na ₂	0.526 mMols/L.
. GSSG	2.280 mMols/L
. NADPH Na ₄	0.175 mMols/L

La tabla XVI resume los reactivos empleados, concentración del reactivo reconstituido y concentración final de la mezcla reaccional.

7 - PROCEDIMIENTO.

. Tampón fosfatos	2.00 ml
. EDTA	0.10 ml
. H ₂ O	0.50 ml.
. NADPH	0.05 ml
. Suero problema	0.10 ml

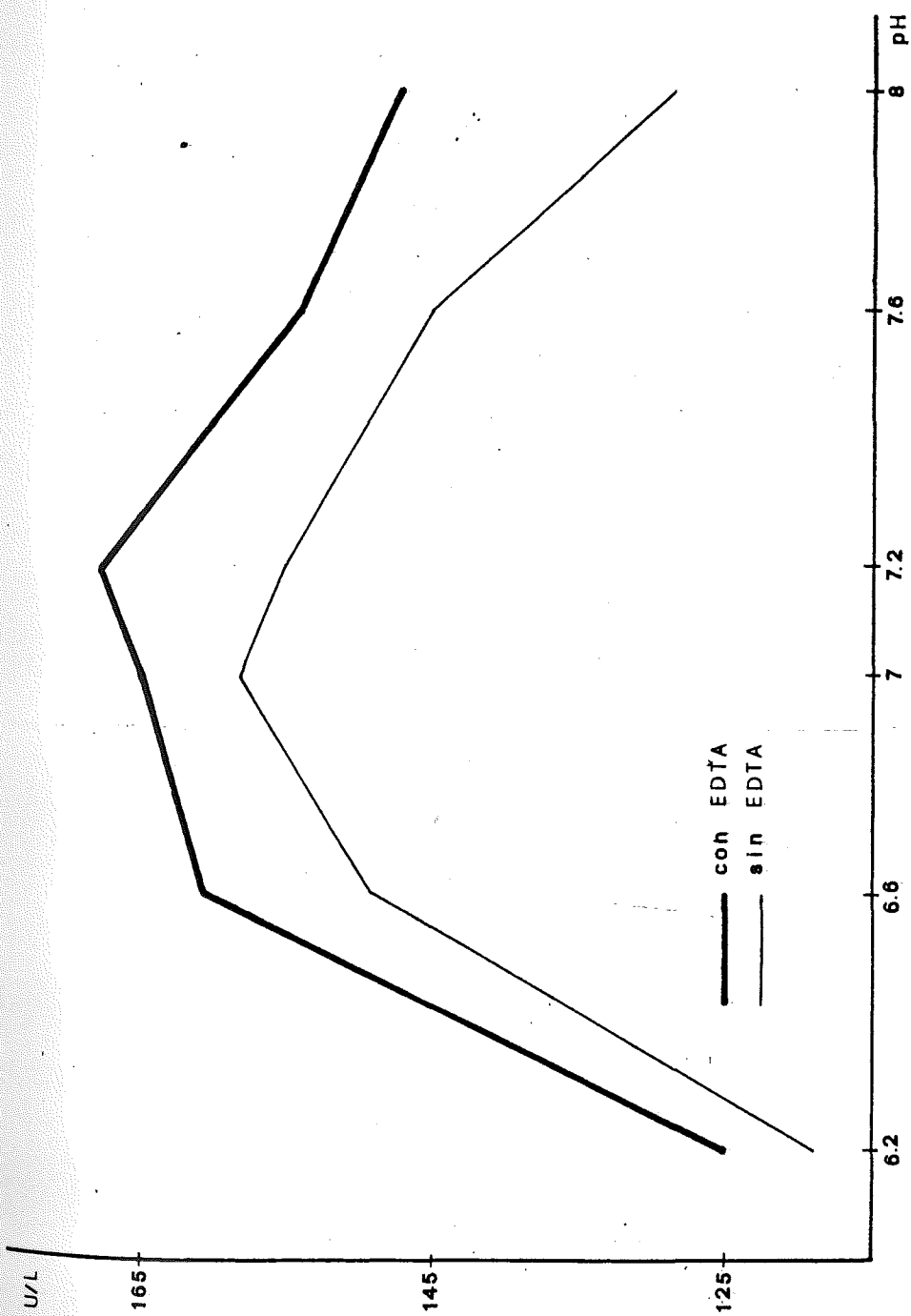


Fig. 5 Estudio del pH óptimo de la reacción en presencia a ausencia de EDTA.

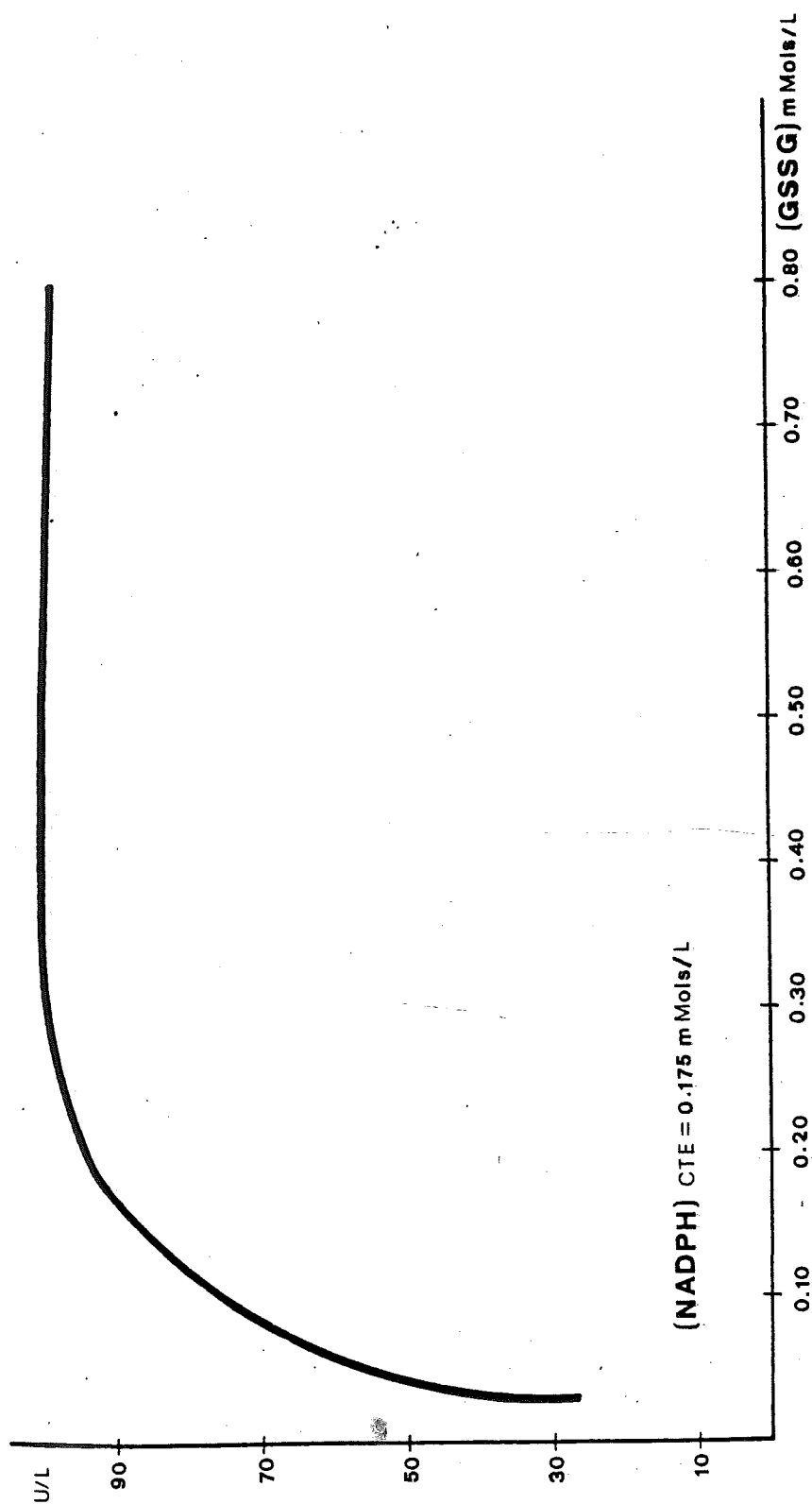


Fig. 6 .- Estudio de la concentración óptima de sustrato con concentración de NADPH constante.

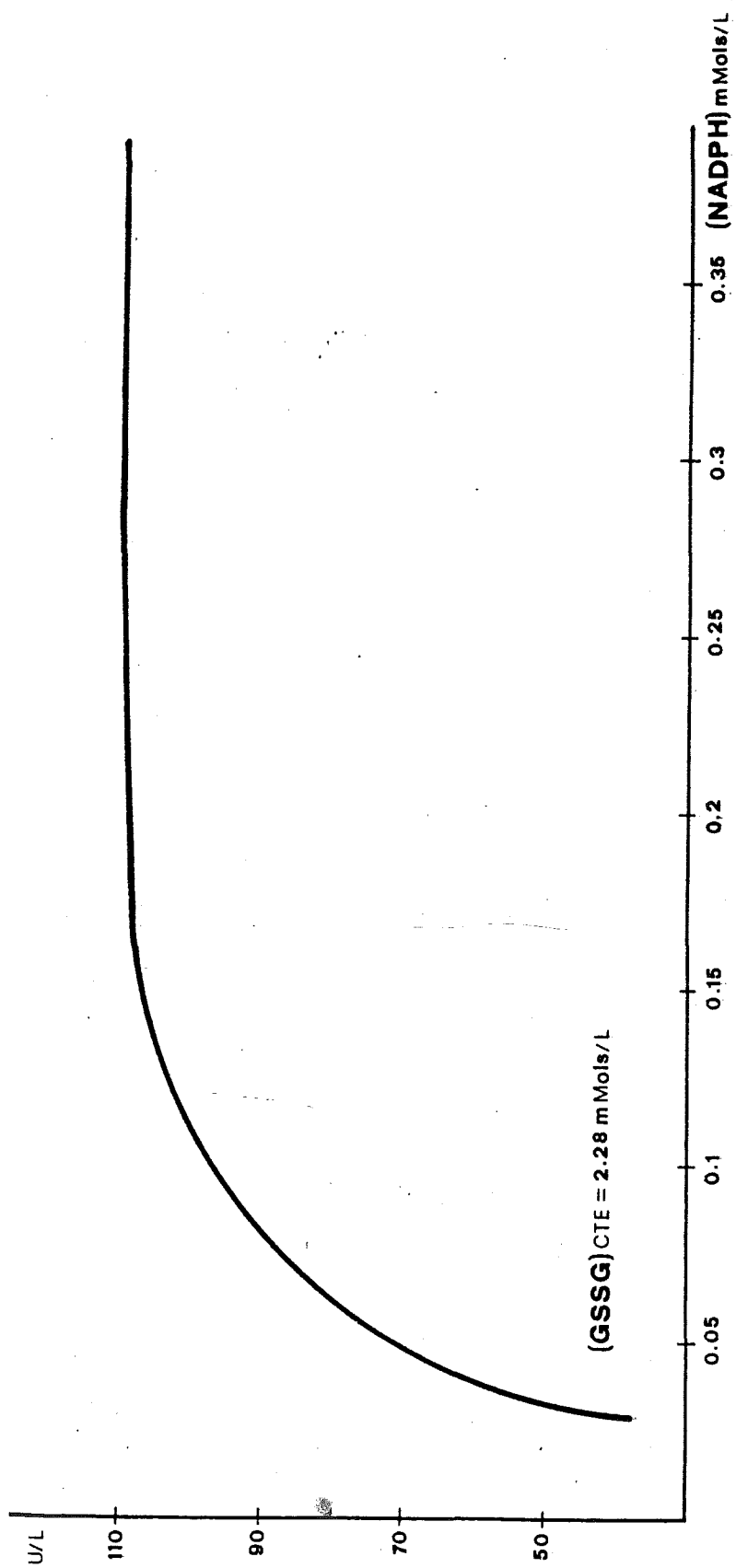


Fig. 7.- Estudio de la concentración óptima de cosustrato, con concentración de GSSG constante.

TABLA XVI

Determinación GR: reactivos empleados, concentración del reactivo reconstituido y concentración final de la mezcla reaccional.

COMPONENTES	Concentración del Reactivo Reconstituido	Concentración final de la mezcla reaccional.
Tampon fosfatos	0.15 mol/l	0.105 mol/l
EDTA Na ₂	15 mMol/l	0.526 mMol/l
GSSG	65 mMol/l	2.28 mMol/l
NADPH Na ₄	10 mMol/l	0.175 mMol/l

Se desencadena la reacción tras la adición de 0.10 ml de GSSG.

La desaparición de NADPH se ha monitorizado a 340 nm de longitud de onda en un espectrofotómetro VITATRON MPS, termostato a 25° C.

8 - CALCULO DE ACTIVIDAD

Al igual que con la GPI, la actividad de GR en la muestra problema se ha determinado según la formula:

$$U/L = \frac{\Delta E/t \times VF \times 1000}{E \times d \times VM} \times Tf \times \frac{1}{t}$$

en donde:

E = Coeficiente de extinción milimolar del NADPH a 340 nm --
(6.29×10^3).

VM = 0.100 ml.

VF = 2.850 ml.

Una Unidad Internacional (U/L) es igual a los micromoles de --
NADPH transformados por minuto a 25 ° C.

9 - INFLUENCIA DEL PERIODO DE INCUBACION

En la técnica original de DELIDES y cols (79), la reacción se desencadena con GSSG previa incubación del suero problema y del resto de reactivos a 37° C durante 10 minutos. En la TABLA XVI se resumen los resultados del estudio de la influencia de este periodo de preincubación en la actividad GR. No encontramos diferencias estadísticamente significativas entre las muestras ensayadas después de preincubación durante 10 minutos y sin preincubación.

10 - ESTABILIDAD

Hemos estudiado la estabilidad de la GR en suero a 25° C, 4° C y a -20°C. En la figura 8, se puede observar como los valores de actividad encontrados son similares.

TABLA XVI Influencia del periodo de preincubación del suero problema y del resto de reactivos entre la actividad GR.

CASO	SIN PREINCUBACION	PREINCUBACION - 10 Min.
1	20,81	19,22
2	48,85	49,22
3	78,71	81,12
4	35,73	36,68
5	31,66	31,66
6	52,93	51,75
7	32,79	31,40
8	28,81	27,90
9	134,58	132,67
Nº Casos 9		
$\bar{X}$	51,65	51,29
D.S.	35,53	NS 35,50

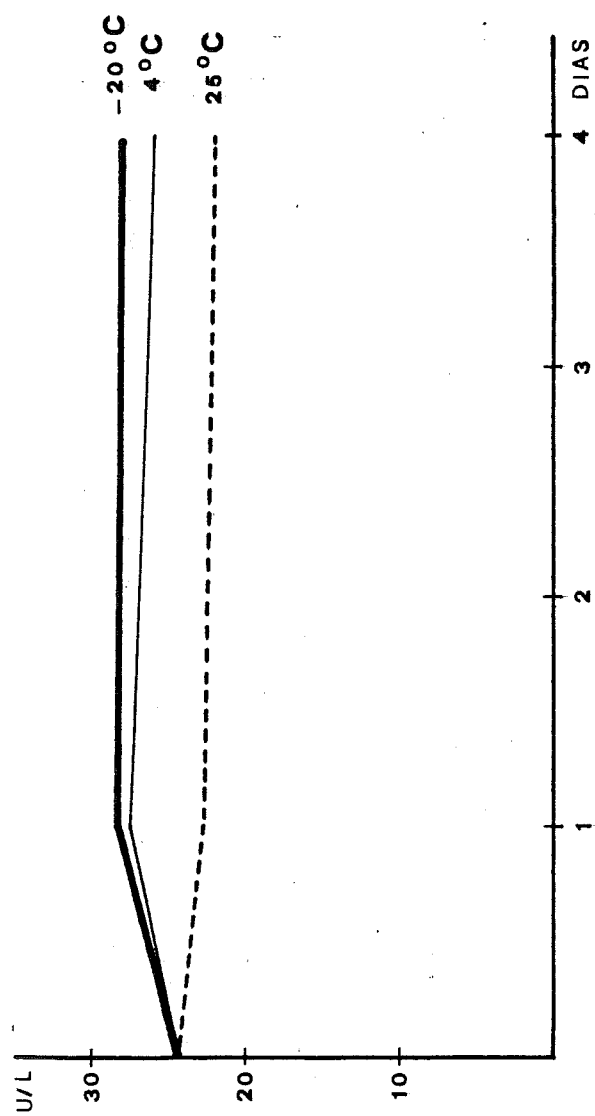


Fig. 8 Actividad GR en suero a distintas temperaturas

11 - PRECISION.

Se valoró la misma muestra en 11 ocasiones distintas, observando que para un valor medio encontrado ($\bar{X} \pm \text{DSM}$) de 44.3 ± 2.3 U/L, el coeficiente de variación (CV) fué de 5.2 %.

C. PACIENTES ESTUDIADOS

Se han efectuado extracciones de sangre en 743 pacientes, en ayunas y en el momento de su ingreso o a la mañana siguiente, siguiendo la rutina normal de extracción y procesamiento de sueros para nuestro laboratorio.

Fueron descartados del estudio estadístico 140 pacientes por diversas causas que se expondrán a continuación, y en los casos en los que se obtuvo más de una muestra sólo se ha tenido en cuenta para el tratamiento estadístico aquella en la que la actividad sérica de las enzimas estudiadas era más elevada.

El grupo final de pacientes incluidos en el estudio ha sido de 603 individuos distribuidos de la siguiente forma:

I. GRUPO CONTROL.

Formado por 53 adultos sanos, donantes voluntarios de sangre, 26 mujeres y 27 hombres entre los 19 y 64 años de edad y media ($\bar{X} \pm \text{DSM}$) de $36,0 \pm 12,8$, sin datos clínicos ni biológicos de alteración hepática.

II. ENFERMEDADES HEPATICAS

Este grupo lo forman 238 pacientes distribuidos de la forma siguiente:

1 - CIRROSIS HEPATICA Y HEPATOPATIAS CRONICAS.

Compuesto por 128 pacientes, 52 mujeres y 76 hombres con edades comprendidas entre los 7 y 85 años y media de $56,2 \pm 13,7$ años. El diagnóstico se estableció por punción biopsia hepática en 53 casos y por los datos de evolución clínica de la enfermedad, alteración de las pruebas de laboratorio (especialmente del tiempo de protrombina, enzimas hepáticas e hipoalbuminemia con hipergammaglobulinemia), gammagrafía hepática y la existencia de hipertensión portal (esplenomegalia, ascitis, varices esofágicas, etc) en el resto de los casos,

cuando no fué posible o necesaria la práctica de biopsia hepática.

Etiologicamente, la enfermedad se atribuyó al alcohol en 76 ca sos; postnecrótica en 17 pacientes, 13 de los cuales presentaban el antígeno de superficie de la hepatitis B (HBsAg); hemocromatosis en 4 casos; déficit de alfa 1 antitripsina en 1 caso, que corresponde al paciente más joven observado; en 8 pacientes pudo relacionarse la enfermedad con alteraciones del sistema inmunológico, y en los 22 - restantes el diagnóstico etiológico no pudo aclararse.

Fueron excluidos del estudio aquellos pacientes con hepatopatía crónica que además eran portadores de neoplasias, sepsis de dis tinto origen (urinario, infección del líquido ascítico, neumonía, -- endocarditis bacteriana etc), enfermedades inflamatorias crónicas - (artritis reumatoide etc), anemia hemolítica comprobada, litiasis - biliar y otras enfermedades.

2 - HIGADO DE ESTASIS

Forman parte de este grupo 10 pacientes afectados de insuficiencia cardíaca congestiva de distinto origen, 8 hombres y 2 mujeres - con edad media de 65.5 - 12.6 años y límites entre los 43 y 79 años.

El diagnóstico se estableció por punción biopsia-hepática en - cuatro casos y en los restantes por la historia clínica y semiología compatibles, ausencia de otros factores etiológicos de hepatopatía crónica, y especialmente por la mejoría clínica y biológica de la - función hepática después del tratamiento diurético y/o cardiotónico.

3 - HEPATITIS

Los 74 pacientes integrantes de este grupo se distribuyen del siguiente modo:

a. HEPATITIS AGUDA.

Treinta y tres pacientes, 16 mujeres y 17 hombres de edades en tre los 10 y 71 años y edad media de 26.7 ± 18.8 . En todos ellos

el diagnóstico se estableció siguiendo los criterios clínicos habituales y por los datos de laboratorio. En los casos dudosos el diagnóstico fué documentado con el estudio histológico tras punción biopsia-hepática (10 pacientes). En 5 casos el HBsAg fué positivo y en 1 paciente la lesión hepática fué atribuida al efecto tóxico de un fármaco (amitriptilina). En el resto de los pacientes el diagnóstico fué de hepatitis vírica aguda de tipo no B.

b. HEPATITIS CRONICA

Este grupo lo forman 15 pacientes, 4 mujeres y 11 hombres de edad media de 53.6 ± 3.4 años y límites entre 35 y 84 años.

El diagnóstico se estableció después del estudio histológico de las muestras obtenidas por punción-biopsia hepática, correspondiendo a hepatitis crónica persistente en 1 caso y hepatitis crónica activa en los 14 restantes. Fueron excluidos de este grupo aquellos pacientes que presentaban bandas de fibrosis evidentes con nodulos de regeneración en la muestra histológica. En dos pacientes con hepatitis crónica activa, el HBsAg fué positivo y en un paciente dicha alteración histológica fué atribuible al alcohol.

c. HEPATITIS GRANULOMATOSA

Se estudiaron 9 pacientes diagnosticados tras punción-biopsia hepática, 2 mujeres y 7 hombres con edad media de 38.8 ± 5.7 años y límites entre 20 y 70 años.

En cinco casos, la enfermedad de base fué una tuberculosis miliar y en otro una fiebre tifoidea, documentados microbiológicamente. De los tres pacientes diagnosticados de hepatitis granulomatosa inespecífica, uno presentaba un cuadro de hipersensibilidad a contrastes yodados y en los dos restantes no pudo establecerse el diagnóstico etiológico. Uno de estos pacientes era portador del HBsAg.

d. HEPATITIS ALCOHOLICA AGUDA.

Grupo formado por 10 pacientes, 5 hombres y 5 mujeres con eda-

des comprendidas entre los 31 y 51 años y media de 37.9 ± 2 años.

El diagnóstico se efectuó en todos los casos por la historia clínica y el estudio histológico tras punción-biopsia hepática. Fueron excluidos de este grupo aquellos pacientes en los que la histología hepática mostraba signos de cronicidad y los que con clínica compatible no se dispuso de estudio histológico.

4 - QUISTES HIDATIDICOS Y ABSCESO HEPATICO.

Se estudiaron 8 pacientes, 4 mujeres y 4 hombres con edades comprendidas entre los 29 y 69 años y media de 49.4 ± 14.7

En 7 pacientes, el diagnóstico de quiste hidatídico se estableció tras laparotomía, siendo excluidos del estudio aquellos casos que con una gammagrafía hepática y estudio serológico compatibles, no tenían confirmación anatomopatológica. Del mismo modo, fueron excluidos los pacientes que presentaban simultáneamente otro tipo de patología hepática (cirrosis etc) . Se incluye en este grupo de lesiones ocupantes de espacio no neoplásicas, 1 paciente con el diagnóstico de absceso hepático de origen biliar confirmado por necropsia.

5 - CARCINOMA HEPATICO PRIMITIVO

Fueron estudiados 25 pacientes con edades comprendidas entre los 32 y 78 años y de edad media de 63.5 ± 9 años. 6 mujeres y 19 hombres.

El diagnóstico se estableció histologicamente en 15 casos (biopsia percutánea, quirúrgica o necropsia). En el resto de pacientes - que por distintas causas no se obtuvo confirmación anatomopatológica, el diagnóstico se sustentó en la historia y evolución del paciente, gammagrafía y/o angiografía hepática compatibles y niveles elevados en el suero de alfa-feto proteína (alfaFP) determinados por radioinmuno análisis y hemaglutinación pasiva, con valores medios superiores a los 2000ng/ml.

En tres pacientes el tumor asentaba sobre hígado sano y en 21 sobre hígado previamente cirrótico. Un paciente era portador de una profiria cutánea tarda y hepatitis crónica agresiva. En ningún caso se encontró el HBsAg positivo.

Dos pacientes presentaban metástasis a distancia, óseas y pulmonares respectivamente.

III - ENFERMEDADES DE LA VESICULA, VIAS BILIARES Y PANCREAS.

Los 85 pacientes integrantes de este grupo de enfermedades se distribuyen del siguiente modo:

1 - BENIGNAS

a. LITIASIS VESICULAR, COLECISTITIS Y COLECISTOPANCREATITIS CON VIA BILIAR EXTRAHEPATICA NORMAL.

Se estudiaron 34 pacientes con edades comprendidas entre los 25 y 87 años y media de 57 ± 3 años. 28 mujeres y 6 hombres.

El diagnóstico se estableció por la historia y evolución clínica, datos anlíticos, estudio radiológico (colecistografia oral o endovenosa y/o colangiografia transduodenal), y ecografia del árbol biliar. Confirmado por laparotomia en aquellos casos que requirieron tratamiento quirúrgico en el momento de este estudio (21 pacientes), recibiendo los 13 restantes tratamiento médico.

Fueron excluidos del estudio todos aquellos pacientes que tras la práctica de uno de los procedimientos diagnósticos mencionados, se documentó la presencia de obstrucción y/o dilatación de la via biliar extrahepática. Asimismo, no se incluyeron aquellos pacientes que presentaban otras enfermedades hepáticas sobreañadidas (cirrosis hepática, absceso hepático, etc):

b. OBSTRUCCION BENIGNA DE LAS VIAS BILIARES EXTRAHEPATICAS.

Se incluyen en este grupo 35 pacientes, 19 mujeres y 16 hombres

con edad media de 64.4 ± 15.9 años y límites entre los 26 y 86 años.

El diagnóstico de coledocolitiasis se estableció en todos aquellos casos con clínica, bioquímica, radiología y ecografía compatibles, confirmándose por laparotomía en 32 pacientes, no siendo intervenidos dos pacientes en el momento de este estudio por resolución espontánea del cuadro. Un enfermo presentaba una estenosis del colédoco intrapancreático por inflamación crónica de la cabeza pancreática, confirmada anatomopatologicamente.

Fueron excluidos del estudio los pacientes que presentaban simultáneamente una hepatopatía crónica u otras enfermedades.

2 - ENFERMEDADES MALIGNAS DE LAS VIAS BILIARES Y PANCREAS SIN METASTASIS HEPATICAS.

Se estudian 16 pacientes de los que 9 son mujeres y 7 hombres, con edad media de 66.1 ± 13.1 años y límites entre los 42 y 84 años.

El diagnóstico se realizó por los procedimientos clínicos habituales y fué confirmado en todos los casos tras una laparotomía, correspondiendo a neoplasias de la cabeza del páncreas en 11 casos y en el resto de los pacientes a neoplasias del cístico (2), colédoco terminal (2) y hepático común (1).

Fueron excluidos del estudio aquellos pacientes que presentaban metástasis hepáticas comprobadas así como un caso de ampuloma al que se practicó la determinación enzimática después de una intervención de derivación biliar.

En la TABLA XVII se resumen los distintos pacientes estudiados en patología hepática, de vías biliares y páncreas.

IV. NEOPLASIAS DE OTRO ORIGEN

Se incluyen en este grupo 90 pacientes distribuidos de la forma siguiente:

TABLA XVII: Número de pacientes estudiados en patología hepática, de vías biliares y páncreas.

PATOLOGIA	n° PACIENTES	n° con comprobación histológica
I - ENFERMEDADES HEPATICAS		
. Cirrosis Hepatica	128	53
. Higado de estasis	10	4
. Hepatitis		
a) aguda	33	10
b) crónica	15	15
c) granulomatosa	9	9
d) Alcohólica	10	10
. Quistes hidatidicos y abscesos hepaticos	8	8
. Carcinoma hepatico primario	25	15*
II- ENFERMEDADES DE LA VESICULA, VIAS BILIARES Y PANCREAS		
. Colecistitis, colecistopancreatitis y litiasis Vesicular con Via Biliar extrahepatica normal	34	21
. Obstruccion benigna via biliar extrahepatica	35	33
. Carcinoma Vias Biliares y Pancreas.	16	16
TOTAL	323	194

* Los casos sin confirmación histológica presentaban clínica, evolución, gammagrafía y/o angiografía compatibles, con α ,FP positiva en todos los casos y valores medios superiores a los 2000 ng/ml.

1 - NEOPLASIAS SIN AFECTACION HEPATICA

De los 57 pacientes estudiados, 28 son mujeres y 30 hombres con edades comprendidas entre los 19 y 88 años una media de edad de 61.9 ± 14.4 años.

En todos los casos, la neoplasia fue documentada histologicamente en pacientes que no presentaban alteraciones biológicas de la función hepática y la gammagrafia era normal. Estos datos sugieren la ausencia de invasión hepática como se comprobó quirúrgicamente en los pacientes con tumores del tubo digestivo y ovario a los que se practicó una laparotomía (25 casos). En 4 casos aislados en los que existía una discreta alteración de los parámetros bioquímicos de funcionalismo hepático, la punción-biopsia hepática y la evolución de los pacientes descartaron la presencia de metástasis hepáticas.

Los pacientes han sido agrupados en : neoplasias digestivas, 21 casos (8 gástricas, 8 de colon-ciego, 4 de recto-sigma y 1 de esófago); hematológicas y linfoproliferativas en 12 casos (6 mielomas, 5 linfomas de los que 4 son no Hodgkinianos, y 1 leucosis linfocítica aguda); 6 neoplasias de pulmón y pleura (5 y 1 pacientes respectivamente); 5 neoplasias de mama; 5 urológicas (4 carcinomas transicionales de vejiga y uno de próstata); 4 carcinomas de ovario; 3 neoplasias de piel (1 melanoma y 2 epitelomas), y un tumor retroperitoneal, que resultó ser de cuerpo de páncreas.

En un paciente con carcinoma gástrico y en un caso con cáncer de mama se observó la presencia de metástasis óseas, mientras que en dos pacientes con carcinoma de ovario existían metástasis peritoneales.

2 - NEOPLASIAS CON METASTASIS HEPATICAS

Pertenecen a este grupo 33 pacientes, 11 mujeres y 22 hombres con edades comprendidas entre los 44 y 82 años y media de 61.1 ± 9.2 años.

En todos los casos el diagnóstico se ha comprobado histológicamente por punción-biopsia hepática, biopsia quirúrgica o necropsia.

En 11 pacientes el tumor primitivo no fué localizado. En 10 casos las metástasis procedían del aparato gastrointestinal (4 de páncreas, 3 gástricas, 2 de recto-sigma y 1 de colon); 6 pacientes presentaban la neoplasia primitiva en el pulmón; 2 en la glándula mamaria; 2 en la vejiga y vías urinarias; una paciente era portadora de un carcinoma de cervix, y en un caso de origen de la neoplasia metastásica fué un melanoma del cuero cabelludo.

La TABLA XVIII resume las distintas patologías estudiadas en este grupo de pacientes con neoplasias, incluidas las hepáticas, de vías biliares y páncreas.

V - ENFERMEDADES INFECCIOSAS.

Se han incluido en el estudio 85 pacientes portadores de distintas enfermedades infecciosas distribuidos de la siguiente forma:

1 - ENFERMEDADES INFECCIOSAS CON AFECTACION HEPATICA HABITUAL.

En total de 34 pacientes, 15 mujeres y 19 hombres con edades comprendidas entre los 7 y 57 años y media de 25.7 ± 2.2 .

El diagnóstico se confirmó en todos los casos tras hemocultivo y/o estudios serológicos, correspondiendo a fiebres tifoideas y paratifoideas en 16 casos, brucelosis en 9 pacientes, 4 fiebres botanosas, 4 mononucleosis infecciosas y 1 paciente con leptospirosis. Todos los pacientes, a excepción de un caso de brucelosis crónica, fueron observados durante las dos primeras semanas de evolución y sin haber recibido tratamiento específico para su enfermedad. Se excluyeron aquellos pacientes que eran portadores de otro tipo de enfermedades además de la estudiada.

2 - NEUMONIAS Y BRONCONEUMONIAS.

Se incluyen en este grupo 29 pacientes portadores de una infección pulmonar aguda, observada en un tiempo no superior a las dos semanas de evolución y que se resolvió con tratamiento antibiótico ha

TABLA XVIII - Pacientes estudiados en patología neoplásica.

PATOLOGIA	Nº pacientes*
I - NEOPLASIAS SIN METASTASIS HEPATICAS	
. N. Digestivas	21
. Hemopatias y N. Linfoproliferativas	12
. N. Pleuro-pulmonares	6
. N. Mama	5
. N. vejiga-prostata	5
. N Ovario	4
. Otras	4
II -NEOPLASIAS CON METASTASIS HEPATICAS	
. N. de origen desconocido	11
. N. Digestivas	10
. N. Pulmón	6
. N. Mama	2
. N. Vias urinarias	2
. N. Cervix	1
. Melanoma	1
III-CARCINOMA HEPATICO PRIMITIVO	25
IV -NEOPLASIAS DE VIAS BILIARES Y PANCREAS	16
Total	131

* En todos los pacientes a excepción de 10 casos de hepatocarcinoma, el diagnostico fué confirmado histologicamente.