An. Real Acad. Farm. 1980, 46: 69-76

La 5'-nucleotidasa en la discriminación de los aumentos de gammaglutamiltransferasa serica por indución enzimática o por alteraciones hepatobiliares (*)

por

J. C. TUTOR, M.ª P. FERNANDEZ y J. M. PAZ
Laboratorio Central del Hospital General de Galicia
Universidad de Santiago de Compostela
España

SUMMARY

Urinary D-glucaric acid (GLUA), gamma-glutamyltransferase (GGT), 5'-nucleotidase (5'-NU), alkaline phosphatase (ALP) and its residual activity at 56° C, have been estimated in 27 adult epileptic patients taking anticonvulsant drugs. GLUA was elevated in 96 %, GGT in 70 % and ALP in 41 % of the patients, however the 5'-NU was only slightly elevated in one patient. There was no correlation between GGT activity and urinary levels of GLUA. The simultaneous determination of GGT and 5'-NU could have interest in the evaluation of the hepatic enzyme induction by drugs, letting us know the detection of false positives.

INTRODUCCIÓN

La inducción enzimática hepatocitaria por fármacos, es un fenómeno que comporta numerosas implicaciones clínicas (1) (2). Si bien existen métodos directos, son los métodos indirectos los más utilizados para la evaluación de la inducción enzimática en farmacología clínica. La determinación de la vida media de la antipirina, 6 β hidroxicortisol, ácido D-glucárico y la actividad de la gamma-glutamiltransferasa (GGT) han sido utilizadas en este sentido por distintos autores.

La GGT, un enzima localizado en la fracción microsomal del hepatocito, ha mostrado ser inducible (3), encontrándose su actividad sérica aumentada en pacientes tratados con fármacos inductores (4)

(*) Comunicación presentada en el III Congreso Nacional y I Hispano-Francés de Biofarmacia y Farmacocinética, Barcelona 1979.

(5) (6) (7). Su elevación no implicaría un auténtico daño hepático, sino que sería debida al propio proceso de inducción enzimática (5) (6). Naturalmente, en estos casos, ha de excluirse toda afectación hepatobiliar. Asimismo, los posibles cambios en la actividad sérica de la GGT como resultado de la inducción, introduce un factor de complicación en la utilización de este enzima para la investigación de la función hepática (8).

En un grupo de epilépticos con tratamiento anticonvulsivante, se determinaron la GGT, fosfatasa alcalina (FAL) y 5'-nucleotidasa (5'-NU). Los resultados encontrados sugieren que la 5'-NU puede tener interés en la discriminación de los aumentos de la GGT en procesos de inducción enzimática por fármacos, o por alteraciones hepatobiliares.

Material y métodos

El ácido D-glucárico urinario se determinó por el método de Simmons y cols. (9), expresándose los resultados en µmol/g creatinina, dada la buena correlación que existe con la excreción referida a 24 horas (10). La creatinina se determinó por la clásica reacción de Jaffé en un analizador Coulter Chemistry haciendo la conveniente dilución de las muestras con un pool de sueros de concentración conocida. El límite superior en individuos sanos, que no recibían medicación alguna, se estableció en 58 µmol/g creatinina.

La GGT sérica se determinó a 37° C usando glutamil-p-nitroanilina como sustrato. Se utilizaron reactivos Smith Kline Instruments y las medidas se hicieron en un analizador Abbott ABA 100 programado según instrucciones del fabricante. Los límites superiores de normalidad se establecieron en 45 U/1 para hombres y 35 U/1 para mujeres.

La 5'-NU se determinó a 37° C, usando adenosín 5' monofosfato como sustrato. Se utilizaron reactivos bioMerieux y el límite superior normal se estableció en 17 U/1.

La FAL se determinó a 37° C, usando fosfato de timolftaleína como sustrato, en un analizador Coulter Chemistry. El límite superior de normalidad se estableció en 40 U/1. El isoenzima predominante se investigó mediante la determinación de la actividad residual (fracción termoestable), para ello se siguió el procedimiento de inactivación a 56° C descrito por Fitzgerald y cols. (11), cuyos estudios de correlación clínica son los más prometedores (12). Con esta metódica, una actividad residual menor del 25 por 100 indicaría un predominio del isoenzima óseo y mayor del 35 por 100 un predominio del isoenzima hepático.

El grupo de epilépticos estudiado estaba compuesto por 27 pacientes adultos de ambos sexos, que recibían desde hacía varios años un

tratamiento a base de fenobarbital y difenilhidantoína, generalmente asociados. Las muestras de sangre y orina fueron tomadas en ayunas.

En los estudios de correlación se aplicó el test de Pearson, ya que todas las distribuciones satisfacían el test de normalidad de Smirnov-Kolmogorov. Sin embargo, la mejor normalización en la distribución del ácido glucárico y GGT se consiguió previa transformación logarítmica.

Resultados

El 96 por 100 de los pacientes estudiados presentaban una alta excreción de ácido D-glucárico urinario (valor medio 707 µmol/g creatinina). Solamente en uno se encontró una cifra ligeramente inferior al límite superior de normalidad, siendo asimismo los niveles de GGT y FAL normales.

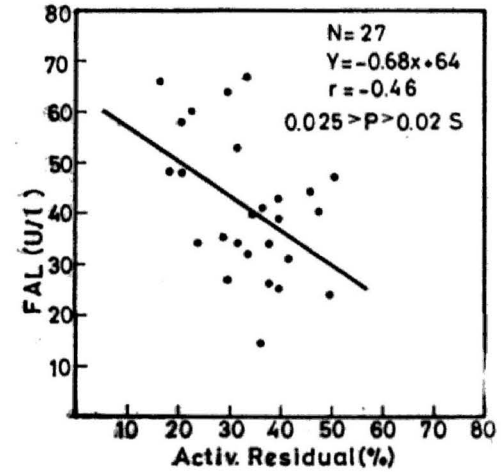

Fig. 1.—Correlación entre la actividad total de la fosfatasa alcalina (FAL) y el tanto por ciento de actividad residual (fracción termoestable).

La actividad de la GGT sérica estaba elevada en el 70 por 100 de los pacientes estudiados (valor medio 127 U/1). No se encontró una correlación estadísticamente significativa entre los niveles de ácido D-glucárico urinario y GGT sérica ($r = 0{,}15$, $0{,}5 > p > 0{,}4$). La transformación logarítmica de ambos parámetros condujo asimismo a una correlación no significativa ($r = 0{,}278$, $0{,}2 > p > 0{,}1$).

La actividad de la FAL se encontraba discretamente aumentada en el 41 por 100 de los pacientes estudiados, existiendo una correlación negativa, estadísticamente significativa ($r = -0{,}46$, $0{,}025 > p > 0{,}02$), entre la actividad total y el porcentaje de actividad residual como se indica en la figura 1.

La actividad de la 5'-NU estaba comprendida en el rango de normalidad en todos los casos, salvo en uno que se observó un discreto aumento (26 U/1), con una actividad residual de la FAL del 34 por 100.

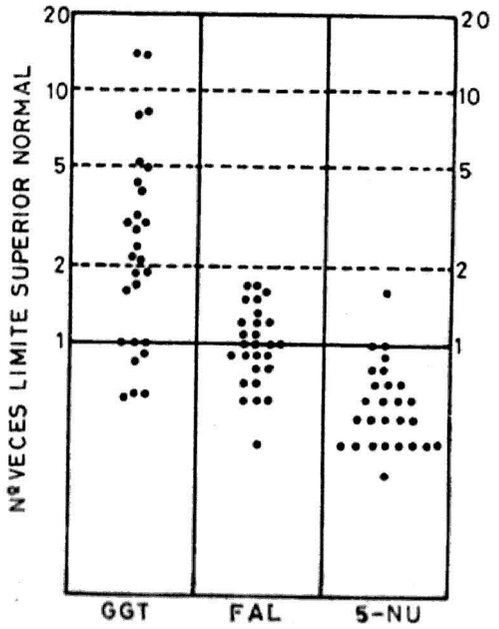

Fig. 2.—Comportamiento de la gamma-glutamiltransferasa (GGT), fosfatasa alcalina (FAL) y 5'-nucleotidasa (5'-NU) en 27 pacientes tratados con fármacos anticonvulsivantes.

Los resultados encontrados para los distintos enzimas se indican en la figura 2, expresándose sus actividades en forma de múltiplo del límite superior de normalidad para hacerlas comparables.

Discusión

La elevada excreción de ácido D-glucárico urinario encontrada en los pacientes estudiados, apunta la existencia de una intensa inducción enzimática hepatocitaria en estos individuos (13). Algunos autores, encuentran una correlación estadísticamente significativa entre los niveles séricos de GGT y el ácido D-glucárico urinario (6) (14) (15), sin embargo para otros esta correlación no existe (16) (17). Nuestros resultados van también en este sentido.

Con respecto a los límites de normalidad, los incrementos de ácido D-glucárico son proporcionalmente mayores que los de GGT. Esto podría indicar que los sistemas enzimáticos que intervienen en la biosíntesis del ácido D-glucárico, son más sensibles a la inducción que la GGT hepática. Pero además, ha de tenerse en cuenta que en estos casos podría establecerse una competición entre la aumentada síntesis hepática de GGT y la aumentada excreción biliar del enzima (18), lo cual ampliaría la variabilidad de su comportamiento en los distintos individuos.

Para Goldberg y Martin (19), dada la facilidad técnica de su medida y su sensibilidad como indicador en los procesos de inducción enzimática, la determinación de GGT sérica sería en estos casos preferible a la de otros parámetros utilizados, como el ácido D-glucárico o el 6 β hidroxicortisol. No obstante, Whitfield y cols. (8) indican que la GGT no puede ser siempre usada como índice de los cambios en la actividad de los enzimas microsomales hepáticos implicados en la biotransformación de fármacos, pudiendo obtenerse tanto falsos positivos como falsos negativos. Davidson y cols. (15), sugieren que el estudio de los isoenzimas de la GGT podría ser de utilidad aumentando la sensibilidad y especificidad del test, pero recientemente Kok y cols. (20) indican que la separación electroforética de la GGT sérica no aporta información adicional alguna. Sobre este aspecto trabajamos actualmente en nuestro laboratorio, y resultados preliminares indican que efectivamente la electroforesis no parece ayudar en la discriminación de una elevada actividad sérica de GGT debida a inducción enzimática por fármacos o por lesión del parenquima hepático.

Distintos autores han encontrado con frecuencia una elevada actividad total de la FAL en pacientes con tratamiento antiepiléptico, pero en el momento de señalar el isoenzima responsable, los resultados son contradictorios (21). Estas disparidades, posiblemente sean el reflejo de la dificultad técnica de identificación del patrón isoenzimático en muestras con actividad total normal o discretamente aumentada. En los pacientes estudiados, la correlación negativa encontrada entre la actividad total y la actividad residual. sugiere que los incrementos de FAL se producen principalmente a expensas del

isoenzima óseo, lo cual estaría de acuerdo con los resultados obtenidos para la 5'-NU.

En los procesos de inducción enzimática, la relación GGT/bilirrubina aumenta al hacerlo la actividad de la GGT y disminuir la bilirrubina sérica, posiblemente debido a la inducción de la UDP-glucuroniltransferasa. El equipo de Siest (22) (23) propone la representación bidimensional bilirrubina: GGT como test de inducción. Podrían separarse así, según estos autores, sin falsos positivos las poblaciones de referencia y bajo tratamiento con fármacos inductores. En las distintas hepatopatías existe una estrecha correlación entre la GGT y la 5'-NU (24) (25), no obstante en estos casos de inducción, los notables aumentos de GGT sérica se acompañan de actividades de 5'-NU comprendidas en el rango de normalidad. La determinación de ambos enzimas, e incluso la relación GGT/5'-NU, parece tener interés en la evaluación de la inducción enzimática provocada por fármacos, permitiendo la detección de falsos positivos.

BIBLIOGRAFÍA

(1) RICHENS, A. (1975). «Br. J. Clin. Pharmacol.», 1, 185.

(2) JAVOR, T. (1974). En *Symposium on drug-induced metabolic changes* (Knoll J. ed.), pág. 53, «Akadémiai Kiadó».

(3) IDEO, G., DE FRANCHIS, R., DEL NINNO, E. and DIOGUARDI, N. (1971). «Lancet», ii, 825.

(4) ROSALKI, S. B. and RAU, D. (1974). En *Colloque International γ-GT*. Pág. 139. Boehringer Mannheim France.

(5) ROSALKI, S. B. (1976). En *Anticonvulsant drugs and enzyme induction* (Richens, A. and Woodford, F. P. eds.), pág. 27. Asociated Scientific Publishers.

(6) BARTELS, H., HAUCK, E. W., PETERSEN, C., PUTCKI, H. and SCHULZE, W. (1975). «Neuropädiatrie», 6, 77.

(7) STRAUSS, B., LIPOVAC, K., CEPELAK, I., ZANIC, T. et STANKOVIC, S. (1978). «Ann. Biol. Clin.», 36, 220.

(8) WHITFIELD, J. B., MOSS, D. W., NEALE, G., ORME, M. and BRECKENRIDGE, A. (1973). «Br. Med. J.», 1 316

(9) SIMMONS, G. J., DAVIS, M., DORDONI, B. and WILLIANS, R. (1974). «Clin. Chim. Acta», 51, 47.

(10) HERZBERG, M., TENENBAUM, E., FISHEL, B. and WIENER, M. H. (1977). «Clin. Chem.», 23, 596.

(11) FITZGERAL, M. X. M., FENNELLY, J. and MC GEENEY, K. (1969) «Am. J. Clin. Pathol.», 51, 194.

(12) (1977). En *The Bio-Science Handbook*, pág. 95. Bio-Science Laboratories.

(13) CHARBONNIER, A. (1974). «Vie Med.», 55, 1117.

(14) STAMP, T. C. B., ROUND, J M., DUPRE, P., FLANAGAN, R. J. and TWIGG, C. A. (1976). En *Anticonvulsant drugs and enzyme induction* (Richens, A. and Woodford, F. P. eds.), pág. 87. Associated Scientific Publishers.

(15) DAVIDSON, D. C., MC INTOSH, W. B. and FORD, J. A. (1974). «Clin. Sc. Molec. Med.», 47, 279.

(16) SMITH, S. E. and RAWLINS, M. D. (1974). «Eur. J. Clin. Pharmacol.», 7, 71.

(17) HERZBERG, M., FISHEL, B. and WIENER. M. H. (1977). «Isr. J. Med. Sc.», 13, 471.

(18) TUTOR, J. C., FERNÁNDEZ, M. P., PAZ, J. M. y DEL RÍO, R. (1978). *Evaluación de la inducción enzimática hepatocitaria en el laboratorio de bioquímica clínica*. En *I Congreso Nacional de la Sociedad Española de Química Clínica*. Barcelona.

(19) GOLDBERG, D. M. and MARTIN, J. V. (1975). «Digestion», 12, 232.

(20) KOK, P. J. M. J., SEIDEL, B., HOLTKAMP, H. C. and HUISMAN, J. (1978). «Clin. Chim. Acta», 90, 209.

(21) SKILLEN, A. W. and PIERIDES, A. M. (1976). «Clin. Chim. Acta», 72, 245.

(22) SIEST, G., LE PERRON, B., CAPOLAGHI, B., BATT, A. M., GALTEAU, M. M., LAHRICHI, M. et KHODJET EL KHIL, R. (1976). En *Journées Nationales de Biologie*. Pág. 40, Simep Editions.

(23) BATT, A. M., SIEST, G., KHODJET EL KHIL, R., LE PERRON, B., WEBER, M. and TRIDON, P. (1976). En *Drug interference and drug measurement in clinical chemistry* (Siest, G. and Young, D. S. eds.), pág. 40. S. Karger, A. G.

(24) SUNDERMAN, F. W. and HORAK, E. (1976). En *Seminar on clinical enzymology* (Sunderman, F. W. ed.), pág. 82. Institute for Clinical Science Inc.

(25) PLAQUET, R., BAILLET, J., ROGEZ, J. C. et HENNON, G. (1975). «Nouv. Press Med.», 4, 2340.