

Estudio enzimático en suero y orina de animales pancreatetectomizados

R. Muñoz-Calvo, T. Unzaga-Marco y J. Lucas-Gallego

Cátedra de Fisiología Animal. Facultad de Farmacia. Sección de Fisiología Química
Departamento de Bioquímica del Instituto Español de Fisiología y Bioquímica
Madrid (España)
(Prof. J. Lucas Gallego)

(Recibido el 2 de diciembre de 1970)

R. MUÑOZ-CALVO, T. UNZAGA-MARCO and J. LUCAS-GALLEGO. *Enzymatic Study in Serum and Urine in Pancreatectomized Animals*. R. esp. Fisiol., 27, 149-154. 1971.

The pancreatic enzymes in pancreatectomized animals are studied during intervals of 24, 48, 72 and 96 hours. The determinations have been made in serum and urine.

The level of lipase in serum rises to a significant degree after 48 hours and in urine after 72 hours.

The level of amylase in serum and urine decreases to a notable extent during the first 24 hours, becoming stability after this period.

In serum trypsin and chymotrypsin present an activity paralleling that of both enzymes with values ascending during the first 24 hours, becoming stabilized after this period. In urine, the results obtained varied.

The values for leucin-amino-peptidase varied very little during the entire experiment.

In total pancreatectomy significant variations in lipase and, to a lesser degree, in amylase are found while the proteolytiques maintain their normal rates.

Las enfermedades del páncreas exocrino podrían manifestarse bioquímicamente de tres formas (18): Por el desequilibrio fermentativo (diagnóstico enzimático en suero y orina); por la disminución de la secreción exocrina, y por la curva diabética de la tolerancia a la glucosa.

En la pancreatitis aguda o en la obstrucción aguda del sistema de conductos o en una pancreatetectomía total o parcial se conduciría a un derrame masivo de enzimas en el intersticio circundante en la sangre y sistema linfático y con ello al ascenso de las concentraciones de distintas enzimas y concretamente amilasa y lipasa en suero y orina.

Nuestros estudios sobre este particular empezaron haciendo un estudio de lipasas en hígado, grasa y sangre (5). Más tarde

se ha llevado a cabo en otros tejidos de perros normales y pancreatetectomizados (14, 15) con objeto de ver si las distintas lipasas encontradas tienen alguna relación con las pancreáticas, ya que la complejidad de los substratos hace pensar en la existencia de varios enzimas relacionados o bien que sea la lipasa pancreática la única y que por mecanismos nerviosos en el páncreas se produzcan reflejos.

En este trabajo se hace un estudio de la función ecobólica (producción de fermentos) del páncreas.

Se estudia la lipasa por poseer la ventaja de su mayor especificidad de órgano. Se compara la actividad lipásica del suero y la lipasa urinaria.

La lipasa del suero tiene como principal fuente la pancreática, pero también se pro-

duce en los demás tejidos. Esta lipasa ha sido estudiada desde el punto de vista médico comparándola a la amilasa, aunque con alguna diferencia, así en la pancreatitis aguda, los índices elevados de lipasa disminuyen más gradualmente y persisten a veces hasta catorce días mientras que los de amilasa suelen normalizarse en uno a tres días (21). La lipasa es eliminada por los riñones y puede demostrarse en orina.

La *amilasa* es un enzima de tipo amilolítico, cuyo valor práctico es una prueba funcional para el diagnóstico de las pancreopatías inflamatorias; ahora bien, el nivel de amilasa sérica puede influirse por factores extrapancreáticos.

Junto a estas enzimas se estudian las de tipo proteolítico del jugo pancreático cuya insuficiencia provoca graves trastornos. El escape y liberación de las enzimas pancreáticas induce a la autodigestión del órgano debida a los de tipo proteolíticos, que activados prematuramente desencadenan luego una autoactivación en cadena. Se hidrolizan y destruyen las membranas celulares, con lo que intervienen ya las lipasas sobre los líquidos intracelulares y la autodigestión se completa.

Se estudian *tripsina* y *quimotripsina*, mezclas de enzimas protidolíticos y peptidolíticos, actuantes en la digestión de los prótidos, basándose en el hecho de que la hidrólisis de la α -benzoil-L-argininamida no se realiza por otro enzima más que por la tripsina (1, 16, 19).

Se observa también la *leucina-amino-peptidasa* que se encuentra en concentraciones relativamente altas en distintos órganos, entre ellos células hepáticas, mucosa intestinal, riñón y páncreas (24).

Material y métodos

Se emplean perros de talla mediana de peso comprendido entre 7 y 12 kilos a los que se les tenía en ayuno durante las 24 horas precedentes.

La pancreatectomía ha sido hecha si-

guiendo la técnica de PLAY (17). Se han utilizado 6 perros para cada determinación.

Las pruebas en suero y orina han sido realizadas a las 24, 48, 72 y 96 horas después de practicada la pancreatectomía total.

Las tomas de suero y orina se realizaron de manera aséptica en jeringas y recipientes bien lavados y secados a base de estufa estéril hasta el momento de la toma.

Para la determinación de lipasas se ha seguido el método de VOGEL-ZIEVE (23) que fotométricamente determina la disminución de la turbidez de una emulsión muy diluida de aceite de olivas. Esta disminución es proporcional a la concentración de lipasa existente.

La determinación de amilasa se ha hecho por el método de WOHLGEMUNTH (26) que mide la cantidad de azúcares reductores formados. Para la de tripsina y quimotripsina se ha seguido el método fotocolorimétrico de WILLIG y KORBER (25) cuyo fundamento es oponer al enzima una solución del éster etílico de la *n*-benzoil-L-arginina para la tripsina y el éster etílico de la L-acetil-tirosina para la quimotripsina en medios tamponados a $pH = 8$. Los ésteres son hidrolizados y la reacción provoca un aumento de la densidad óptica a $405 \mu n$.

La determinación de la leucin-amino-peptidasa se hizo siguiendo el método fotocolorimétrico de GOLDBERG y RUTENBURG (7) por el cual la actividad LAP se traduce por la cantidad de betanaftilamina liberada en la hidrólisis enzimática de la L-benzil-betanaftilamina.

Resultados

La actividad enzimática se ha estudiado en suero y orina. En la tabla I se dan los resultados expresados en valores medios, en unidades internacionales. Las actividades enzimáticas de perros normales aparecen como tiempo cero. Las que se encuentran en los perros pancreatectomiza-

Tabla I. Valores medios de las actividades enzimáticas (en U.I.) en perros normales y pancreoprivos.

Enzimas	Normal		Horas después de la extirpación							
	0		24		48		72		96	
	S	O	S	O	S	O	S	O	S	O
Lipasa	2,32	2,42	2,15	6,79	1,96	0,98	4,13	2,09	8,57	19,07
Amilasa	8,00	16,0	2,00	8,00	2,00	8,00	2,00	8,00	2,00	4,00
Tripsina	4,6	8,2	8,6	19,4	2,8	4,1	1,7	42,2	6,7	0,0
Quimotripsina	2,8	0,0	5,5	16,2	3,2	21,5	2,2	37,2	3,0	49,0
Leucinaminopeptidasa	10,2	9,2	11,3	5,0	9,0	6,1	9,6	14,0	9,8	10,7

S = suero y O = orina.

dos se han agrupado según las distintas horas transcurridas desde la extirpación.

En las figuras 1, 2 y 3 se observan los valores correspondientes a lipasas, amilasas y proteolíticos, respectivamente.

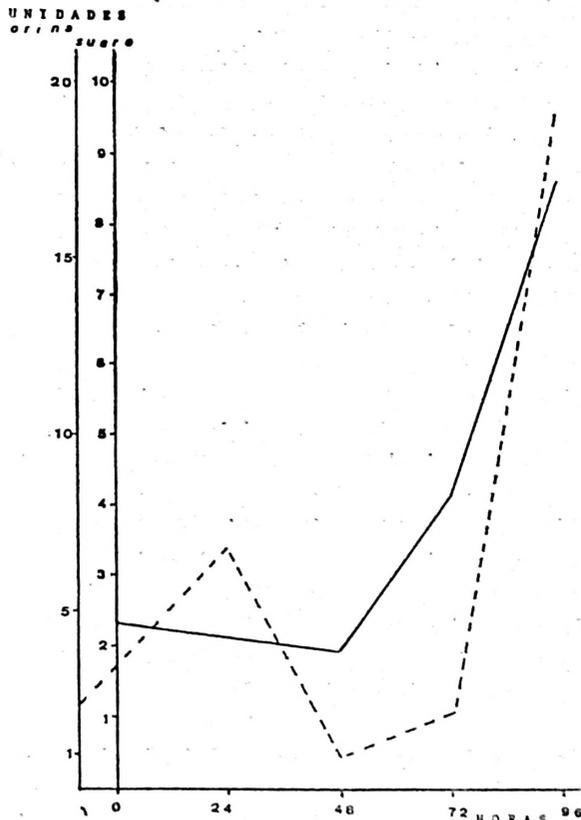


Fig. 1. Efecto de la pancreatectomía sobre la actividad lipásica (en U.I.). Suero (—); orina (---).

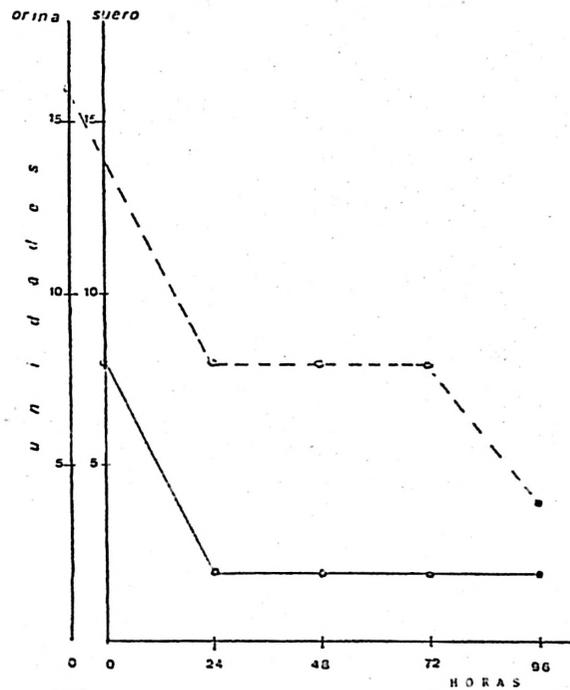


Fig. 2. Efecto de la pancreatectomía sobre la actividad amilolítica (en U.I.). Suero (—); orina (---).

Discusión

En nuestro trabajo se ha realizado la pancreatectomía total. Las pruebas funcionales pancreáticas están basadas en la valoración de la actividad enzimática en sangre, orina y contenido intestinal. En este trabajo se han estudiado valoraciones enzimáticas en suero y orina.

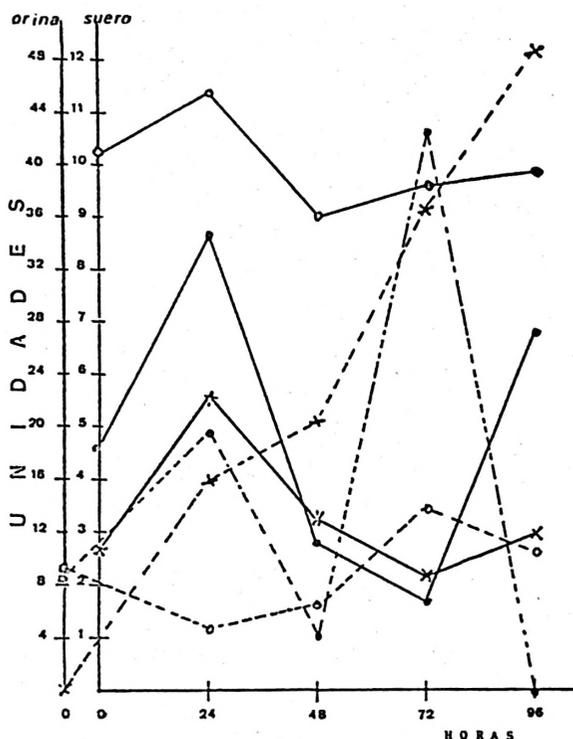


Fig. 3. Efecto de la pancreatectomía sobre la actividad proteolítica (en U.I.).

Tripsina: suero (●—●); orina (●--●). Quimotripsina: suero (X—X); orina (X--X). Leucino-amino-peptidasa: suero (○—○); orina (○--○).

Los sueros obtenidos en las distintas horas eran normales, mientras que las orinas a las 24 horas eran transparentes y claras, pero a partir de las 48 horas aparecían con un pequeño enturbiamiento. Ello coincide con autores como MILLER (13) que hicieron distintos análisis cualitativos en orinas turbias, de uratos, fosfatos, carbonatos y oxalatos dando todos ellos resultados negativos, lo que hacía pensar fuese debido a alguna eliminación anormal enzimática.

BERNARD (2) habla del reflejo pancreático renal producido por la proteólisis tripsica, abocando en una glomerulonefritis. Las concentraciones de lipasa del suero pueden ser normales en afecciones pancreáticas avanzadas si queda tejido

pancreático actuante. Se ha encontrado aumentada en la pancreatitis hemorrágica y en algunos casos de alteración renal. También ocurre una actividad lipásica elevada en la pancreatitis aguda (9, 23). La falta de lipasa pancreática debería traducirse por la presencia de una cantidad excesiva de grasa sin desdoblar o una disminución en suero. En la práctica puede encontrarse esta anomalía en cualquier enfermedad pancreática; una observación de este tipo permite sacar conclusiones junto con la presencia de enzimas proteolíticas, ya que la falta de tripsina tiene valor diagnóstico (4).

En el suero de animales con pancreatectomía total se ha encontrado, a partir de las 48 horas, un aumento muy significativo que llega hasta las 96 horas después de un descenso ligero encontrado a las 24 horas, resultados que coinciden con GUTH (9) y VOGEL (23).

Las unidades enzimáticas aumentaron de 2,32 en animales normales a 8,57 en animales pancreatectomizados de 96 horas.

La orina presenta una actividad lipásica normal de 2,42 y a las 96 horas alcanza cifras de 19,07 unidades. Se presentan dos máximos a las 24 y a las 96 horas (figura 1).

A la vista de la figura 1, hay que pensar que tanto en suero como en orina hay lipasas procedentes de los demás tejidos y no solamente la pancreática.

Las variaciones de amilasa en suero son muy variables según autores como HOWAT (10). La elevación de la tasa en suero implica una obstrucción del sistema excretor o una necrosis pancreática con ingreso directo de la amilasa en la corriente sanguínea, unido a un funcionamiento anormal de los acinis. Es de suponer que los trastornos pancreáticos crónicos con destrucción total de los acinis darán niveles bajos de amilasa en suero (6).

En nuestro trabajo con pancreatectomía total, al igual que DREILING (6), se ha encontrado un descenso notable de la amilasa en suero a las 24 horas por la des-

trucción acinosa manteniéndose hasta las 96 horas, final de la experiencia, de forma constante. Los valores encontrados no descendieron por debajo de cifras normales. Se encontró una media normal de 8 unidades y al final de la experiencia 2 unidades.

La excreción urinaria es reflejo de la tasa sanguínea y está en función del flujo urinario. La excreción urinaria de amilasa puede alterarse en los casos de insuficiencia renal por lo que en la actualidad la prueba en orina ha sido reemplazada por la valoración en suero. En orina encontramos el mismo proceso que en suero, hay un descenso a las 24 horas que se mantiene hasta las 72 horas, a partir de las cuales comienza una disminución. Los valores normales son de 16 unidades y a las 96 horas es de 4 unidades.

La amilasa se forma principalmente en los acinos pancreáticos, pero la que existe en el suero es en parte extrapancreática, ya que tras la extirpación del páncreas apenas o nada desciende su nivel sérico. El fenómeno de secreción urinaria ocurre de forma similar. La elevación de la presión desarrollada dentro de los conductos excita el escape de amilasa del páncreas hacia la sangre; cuando el páncreas secreta en contra de alguna obstrucción, los pequeños conductos se rompen, el líquido que contiene amilasa se escapa a través de la cápsula y la amilasa es transportada por la linfa hacia el plasma. La estimulación del plasma eleva la concentración de amilasa del plasma, entonces aparece la enzima también en la orina donde su cantidad es paralela a la concentración de plasma. Durante las lesiones intensas del páncreas, la glándula sufre autólisis, entonces la amilasa del plasma se eleva de 15 a 40 veces sobre las cifras normales y la amilasa urinaria puede elevarse hasta 110 veces. La cifra del plasma desciende nuevamente al presentarse la recuperación o cuando el tejido fibroso reemplaza a las células acinosas. La lipasa es también liberada al

plasma y su concentración es paralela a la de la amilasa. La lipasa activada dentro de la glándula o liberada a la cavidad peritoneal produce necrosis adiposa (11).

Los niveles séricos de lipasa y amilasa en todas las alteraciones pancreáticas manifiestan un paralelismo evidente y así las limitaciones del ensayo de amilasa en suero se dan también en la valoración de la lipasa sérica (8, 20).

Los enzimas proteolíticos, tripsina y quimotripsina, responsables de la actividad protelítica del suero, ya han sido estudiados por TROLL *et al.* (22) y BROWN (3), considerando como valor máximo normal 100 unidades de tripsina/100 ml de suero.

En los animales pancreateoprivos hemos encontrado una actividad paralela de ambas enzimas en suero, con valores ascendentes a las 24 horas que descienden paulatinamente a las 48 y 72 horas para elevarse nuevamente a las 96 horas.

Las unidades de tripsina en animales normales son de 4,6 que alcanzan a las 96 horas 6,7 unidades. La quimotripsina en estado normal es de 2,8 unidades, pasando a 3 unidades al término de las 96 horas de realizada la pancreatectomía.

En orina no se presenta esta actividad paralela de ambas enzimas. En el caso de la tripsina se observan valores variables entre las 24 y 96 horas encontrándose el máximo de 42,2 unidades a las 72 horas y actividad nula a las 96 horas. Los de quimotripsina sufren un aumento creciente partiendo de valores 0.

En la pancreatectomía total se obtienen valores normales en suero. Por el contrario, en orina se encuentran actividades, posiblemente debido a origen bacteriano.

El estudio del enzima proteolítico Leucin Amino Peptidasa (LAP) fue introducido en el diagnóstico enzimático de las alteraciones pancreáticas (7) aunque en la actualidad se le haya restado importancia en este aspecto debido a la observación de aumento de dicho enzima en el suero de afecciones hepáticas y renales (24). En los animales pancreatectomizados encon-

tramos en suero pequeña elevación a las 24 horas y un descenso a las 48 horas para elevarse a las 72 y 96 horas casi a las cifras normales.

En la orina de estos animales se encuentra a las 24 horas un pequeño descenso que se supera a las 48, 72 y 96 horas llegando a valores normales. Nosotros pensamos que este enzima no es propio del páncreas, sino más bien de origen hepático o renal.

Autores como LAGERLÖF (12) encontraron que en los trastornos de tipo pancreático, precoces y reversibles, había una disminución de la excreción de amilasa, conservándose dentro de los límites normales la tripsina y la lipasa.

Nosotros encontramos en la pancreatometomía total variaciones significativas en la lipasa y en menor grado en la amilasa, mientras que los proteolíticos se mantienen en tasas normales.

Resumen

Se estudian las enzimas propias del páncreas en animales pancreoprivos a las 24, 48, 72 y 96 horas. Las determinaciones se han hecho en suero y orina.

El nivel de lipasas en suero experimenta un aumento significativo a partir de las 48 horas y en orina a partir de las 72 horas.

La amilasa en suero y orina experimenta un descenso notable a las 24 horas, a partir de las cuales se estabiliza.

En el suero, la tripsina y la quimotripsina presentan una actividad paralela de ambas enzimas con valores ascendentes a las 24 horas, que después descienden. En orina, los resultados obtenidos fueron variables.

Los valores de leucin-amino-peptidasa fueron poco variables a lo largo de la experiencia.

En la pancreatometomía total se encuentran variaciones significativas en la lipasa y en menor grado en la amilasa, mientras que los proteolíticos se mantienen en tasas normales.

Bibliografía

- BERGMANN, M., FRUTON, J. y POLLOK, H.: *J. Biol. Chem.*, **127**, 643, 1939.
- BERNARD, A.: *Presse Med.*, **67**, 1207, 1959.
- BROWN, J. R., GREENSHIELDS, R. N., YAMASAKI, M. y NEURATH, H.: *Biochem.*, **2**, 867, 1963.
- CANTAROW, A. y SCHEPARTZ, B.: *Bioquímica*, Edit. Interamericana. Méjico, 1965, p. 432.
- COSIN, R., MUÑOZ-CALVO, R. y LUCAS-GALLEGO, J.: *R. esp. Fisiol.*, **21**, 37, 1965.
- DREILING, D. A., JANOWITZ, H. y RICHMAN, A.: *Arch. Inter. Med.*, **94**, 197, 1954.
- GOLDBARG, J. A. y RUTEMBURG, A. M.: *Cancer*, **11**, 283, 1958.
- GRENIER, J. F., GILLET, M., HATANO, M. y WEISS, A. G.: *Arch. Mal. App. Dig.*, **5**, 773, 1967.
- GUTH, P. H., KOMAROV, S. H., SHAY, H. y STYLE, C. Z.: *Am. J. Physiol.*, **192**, 1, 1958.
- HOWAT, H. T. y SCHOFIELD, B.: *J. Physiol.*, **123**, 1, 1954.
- JANOWITZ, H. D. y DREILING, D. A.: *Am. J. Med.*, **27**, 924, 1959.
- LAGERLÖF, H.: *Acta Med. Scand.*, Supp. **128**, 1942.
- MILLER, A. L. y WORSLEY, L.: *Brit. Med. J.*, **2**, 1419, 1960.
- MUÑOZ-CALVO, R., LUCAS-GALLEGO, J. y NAVARRO, A.: *XI Reun. Soc. esp. C. Fisiol.*, Madrid, 1968.
- MUÑOZ-CALVO, R., LUCAS-GALLEGO, J. y NOVO, J.: *R. esp. Fisiol.*, **25**, 191, 1969.
- NARDI, G. L.: *J. Lab. Clin. Med.*, **52**, 66, 1958.
- PLAY, A.: *Technique opératoire physiologique*, Masson, París, 1912, p. 100.
- SCHWEIZERISCHE, J.: *Med. Wochenschr.*, **99**, 15, 1969.
- SCHWERT, G., WITAKENAK, Y.: *Biochem. Biophys. Acta*, **16**, 570, 1955.
- THOMPSON, R. H. y KING, E. J.: *Trastornos bioquímicos en la clínica humana*, Aguilar, Madrid, 1961, p. 49.
- TIETZ, N. W., BORDEN, T. y STEPLETON, J. D.: *Am. J. Clin. Path.*, **31**, 148, 1959.
- TROLL, W., SHERRY, S. y WACHMAN, J.: *J. Biol. Chem.*, **208**, 85, 1954.
- VOGEL, W. C. y ZIEVE, L.: *Clin. Chem.*, **9**, 168, 1963.
- WEBER, H.: *Med. Welt.*, **3**, 1, 1970.
- WILLIG, F. y KORBER, W.: *Gastroenterol.*, **1**, 5, 1967.
- WOHIGEMUTH, J.: *Biochem. Z.*, **9**, 1, 1908.