

VARIACIONES ENZIMÁTICAS EN INDIVIDUOS UROLITIÁSICOS Y CONTROLES

ENZYMATIC VARIATIONS IN UROLITHIASIC AND CONTROL INDIVIDUALS

WILLIAM VELÁSQUEZ, MARIO BELMAR, ANTONIO ESPÍN Y AMÉRICA VARGAS.

Departamento de Bioanálisis, Universidad de Oriente, Núcleo de Sucre.

RESUMEN

La urolitiasis es una patología renal producida por la precipitación de cristales en el tracto urinario debido a anomalías anatómicas y alteraciones fisicoquímicas en la orina que conllevan a situaciones de sobresaturación que permiten la instalación y persistencia de los cálculos en las vías urinarias. El objetivo de este estudio es evaluar las diferencias en los niveles enzimáticos medidos en individuos urolitiásicos y controles. Para tal fin se estudiaron 30 individuos sanos de ambos sexos con edades comprendidas entre 17 y 48 años y 30 pacientes urolitiásicos de ambos sexos con edades entre 9 y 64 años provenientes del Hospital Universitario "Antonio Patricio de Alcalá" de la ciudad Cumaná, a los cuales se les tomaron muestras sanguíneas sin anticoagulantes para la obtención de sueros en los que se realizaron las determinaciones de las enzimas creatina quinasa, fosfatasa alcalina, lactato deshidrogenasa, gamma glutamil transferasa, alanina aminotransferasa y aspartato aminotransferasa por métodos cinéticos colorimétricos. Los resultados obtenidos, al aplicar la prueba estadística t-Student, fueron: la enzima creatina quinasa mostró diferencias muy significativas ($t=2,83; p<0,01$) y la alanina aminotransferasa arrojó diferencias significativas ($t=2,67; p<0,05$), mientras que los niveles enzimáticos de gamma glutamil transferasa, aspartato aminotransferasa, fosfatasa alcalina y lactato deshidrogenasa no mostraron diferencias significativas. Estos resultados permiten inferir que en estos individuos urolitiásicos existen disfunciones enzimáticas producidas por los daños estructurales que ocasionan los cálculos sobre el tejido renal.

PALABRAS CLAVES: Urolitiasis, Enzimas, Colorimetría.

ABSTRACT

Urolithiasis is a renal pathology produced by a crystal precipitation in the urinary tract due to anatomical anomalies and physicochemical alterations in the urine, leading to oversaturation which allow the formation and persistence of calculi in urinary tract. The purpose of this research is to evaluate the differences at the enzymatic level measured in both urolithiasic and control individuals. For this, 30 healthy individuals from both sexes, with ages ranging from 17 to 48, and 30 urolithiasic patients from both sexes, with ages ranging from 9 to 64, treated in the "Antonio Patricio Alcalá" University Hospital in Cumaná, Venezuela. Blood samples without anticoagulants were taken, to obtain serum samples in which we determined, by kinetic colorimetric methods, the following enzymes: creatine kinase, alkaline phosphatase, lactate dehydrogenase, gamma glutamil transferase, alanine aminotransferase and aspartate aminotransferase. The results, obtained by means of the t-Student statistical test, were the following: creatine kinase showed very significant differences ($t=2,83; p<0,01$), and alanine aminotransferase displayed meaningful differences ($t=2,67; p<0,05$), while the enzymatic levels of gamma glutamil transferase, aspartate aminotransferase, alkaline phosphatase and lactate dehydrogenase did not show any statistical differences. These results allow us to infer that in these urolithiasic individuals there are enzymatic dysfunctions produced by the structural damages generated by calculi on the renal tissue.

KEY WORDS: Urolithiasis, Enzymes, Colorimetry.

INTRODUCCIÓN

La urolitiasis viene dada por la precipitación de cristales en las vías urinarias, debido a procesos de sobresaturación de los componentes de la orina final que se van alojando a lo largo de este sistema de excreción, provocando en algunos casos la obstrucción de las vías de eliminación y la retención de los productos de excre-

ción a nivel sanguíneo. El síntoma propio de esta anomalía es el cólico nefrítico el cual, según su intensidad y duración, se complica con infecciones que pueden autoperpetuarlo o dar lugar a situaciones muy graves como la sepsis de origen urinario. La obstrucción del flujo urinario, si es bilateral, puede originar una situación de fracaso renal agudo que, aunado al proceso infeccioso producen, a largo plazo, un deterioro crónico de la función renal que en cierto número de casos conduce al paciente a un programa de diálisis crónico (Castrillo 1988).

Recibido: noviembre de 2000. Aprobado: julio 2001
Versión final: septiembre 2001.

Las investigaciones que estudian el rol del lupeol en la urolitiasis experimental de oxalato de calcio en ratas a las cuales se le suministra una solución al 2% de oxalato de amonio, muestran excreción urinaria de oxalato aumentada, asociada con disminuciones en el citrato y los glucosaminoglucanos. Las enzimas urinarias que indican daño renal, tales como lactato deshidrogenasa, pirofosfatasa inorgánica, fosfatasa alcalina, gamma glutamil transferasa y beta glucuronidasa se encuentran elevadas. La administración de lupeol redujo significativamente la excreción renal de oxalato evidenciando daño tubular indicado por una disminución en los niveles de las enzimas urinarias. De igual forma, esta sustancia reduce la deposición de los compuestos litogénicos en el riñón, con el cual provee un efecto antilítico (Malini *et al.* 1995).

Estudios realizados en ratas, a las cuales se les indujo experimentalmente urolitiasis y en ratas controles. Se encontró niveles séricos elevados de oxalato, calcio, fósforo, lactato deshidrogenasa, sodio, potasio y calcio ATPasas, pirofosfatasa inorgánica y leucina aminopeptidasa. El compuesto polisulfato pentosan sódico disminuye la actividad de la sodio-potasio ATPasa, pirofosfatasa inorgánica, eleva la actividad de la leucina aminopeptidasa, tiene muy poco efecto sobre la actividad de la lactato deshidrogenasa y reduce el oxalato renal, con lo que se constituye en un medicamento útil contra la urolitiasis (Subha *et al.* 1992).

Los niveles urinarios de L-gamma glutamil transferasa, fosfatasa alcalina, L-leucina arilamidasa, lactato deshidrogenasa, N-acetil-beta-D-glucosa aminidasa, pseudocolina esterasa y L-glucosidasa se estudiaron en pacientes con urolitiasis. Las actividades de estas enzimas se encontraron elevadas y esto puede ser debido a la disfunción del sistema tubular. El contenido de la L-leucina arilamidasa, N-acetil-beta-D-glucosa aminidasa y L-glucosidasa provee la más completa información diagnóstica comparada con otros ensayos enzimáticos (Neimark *et al.* 1997).

Inyecciones interperitoneales de 3,7 ó 10 mg de oxalato de sodio por 100 g del peso del cuerpo de la rata fueron suministradas a ratas macho Sprague-Dawley. A las muestras de orina se les determinó oxalato y las enzimas urinarias fosfatasa alcalina, leucina aminopeptidasa, gamma glutamil transferasa y N-acetil-beta-D-glucosaminidasa. La administración de oxalato resultó en un incremento en el oxalato urinario y en la formación de cristales de oxalato de calcio en los riñones. La cantidad y duración de la excreción urinaria de los excesos de oxalato y la retención de cristales en los riñones; se correlacionó con la dosis de oxalato de sodio administrada. La retención de cristales se asoció con el aumento de la excreción de las enzimas uri-

narias indicando daño del epitelio tubular renal (Khan *et al.* 1992).

Las ratas urolitiásicas, diabéticas y no diabéticas, tratadas con sulfato de venadil no mostraron cambios significativos en los contenidos plasmáticos de las enzimas aspartato aminotransferasa y alanina aminotransferasa. Este compuesto reduce la incidencia de cálculos urinarios en las ratas no diabéticas. En los animales diabéticos, el tratamiento con venadil reduce significativamente la mortalidad y previene los aumentos séricos de la enzima alanina aminotransferasa (Day *et al.* 1994).

La litiasis urinaria se caracteriza por ser una enfermedad renal de etiología multifactorial, razón por la cual en ocasiones resulta difícil dilucidar la causa de esta patología. Comúnmente se utilizan medicamentos farmacéuticos o productos naturales en infusiones con la finalidad de aumentar la diuresis en estos pacientes, convirtiéndose esto en un tratamiento paleativo, por que es posible que de esta forma se expulse un cálculo pequeño, que se pueda estar movilizándolo por las vías urinarias causando un cólico nefrítico. Pero la verdadera esencia del problema no se ataca; por esta razón se creyó necesario la realización de un estudio que contemple el análisis enzimático en estos individuos, para conocer mejor los aspectos del metabolismo de los urolitiásicos y poder tener una idea más clara y más actualizada sobre las posibles causas que estén produciendo la precipitación de cristales en las vías urinarias.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras:

Para la realización del presente estudio se analizaron 30 individuos urolitiásicos de ambos sexos, con edades comprendidas entre 9 y 64 años provenientes de la Unidad de Nefrología y Diálisis del Hospital Universitario "Antonio Patricio de Alcalá". Además, fueron analizados 30 individuos, como grupo control, aparentemente sanos de ambos sexos, con edades comprendidas entre 17 y 48 años, sin antecedentes de calculosis urinaria.

Procesamiento de las muestras:

A cada uno de los individuos empleados en esta investigación se les extrajo una muestra de 12 ml de sangre completa por punción venosa, que posteriormente fue colocada en un tubo de ensayo estéril sin anticoagulante. Luego de 5 minutos, tiempo suficiente para la retracción del coágulo, se procedió a la centrifugación de las muestras con la finalidad de obtener los sueros para la determinación inmediata de las enzimas lactato deshidrogenasa, fosfatasa alcalina, creatina quinasa, alanina aminotransferasa, aspartato aminotransferasa y gamma

glutamil transferasa. En todos los casos, se tomaron las medidas correspondientes para no realizar las determinaciones en sueros hemolizados ni hiperlipémicos que pudieran dar resultados alterados en las cuantificaciones enzimáticas.

TÉCNICAS EMPLEADAS:

Lactato deshidrogenasa.

Esta enzima fue determinada por el método cinético colorimétrico basado en la reacción del piruvato, el NADH y el hidrógeno, en presencia de la enzima lactato deshidrogenasa para formar lactato y NAD^+ . La formación de NAD^+ es directamente proporcional a la actividad de la enzima lactato deshidrogenasa (Howell *et al.* 1979).

Fosfatasa alcalina.

Se determinó por metodología cinético-colorimétrica en la cual el compuesto P-nitrofenil-fosfato reacciona con el agua en presencia de la enzima fosfatasa alcalina para formar P-nitrofenil y fosfato inorgánico. La intensidad de coloración amarilla producida por P-nitrofenil es directamente proporcional a la enzima fosfatasa alcalina (Bower y Mc Comb 1975).

Gamma glutamil transferasa.

El principio de esta técnica está basado en la reacción del compuesto L-gamma glutamil-3-carboxi-4-nitroanilida con la glicilglicina en presencia de la enzima gamma glutamil transferasa para producir L-gamma glutamil glicilglicina y 5-amino-2-nitrobenzoato cuya intensidad de color es directamente proporcional a la concentración de la enzima gamma glutamil transferasa (Theodorsen y Stromme 1976).

Alanina aminotransferasa.

El procedimiento descrito en este método está basado en la reacción de la L-alanina con el alfa cetoglutarato, en presencia de la enzima alanina aminotransferasa para formar L-glutamato y piruvato, el cual se combina con NADH e iones hidrógeno, en presencia de la enzima lactato deshidrogenasa, para producir L-lactato, NAD^+ y agua. La disminución de la absorbancia a 340 nm es directamente proporcional a la actividad de la enzima alanina aminotransferasa (Miller *et al.* 1981).

Aspartato aminotransferasa.

El principio del método para la cuantificación de esta enzima viene dado por la reacción del compuesto L-aspartato con el alfa cetoglutarato, en presencia de la enzima aspartato aminotransferasa, para formar oxalacetato y L-glutamato. El oxalacetato reacciona con NADH e iones de hidrógeno, siendo la reacción catalizada por la enzima malato deshidrogenasa para originar L-malato, NAD^+ y

agua. El NADH se oxida a NAD^+ y la disminución de la absorbancia es directamente proporcional a la actividad de la aspartato aminotransferasa (Rej *et al.* 1981).

Creatina quinasa.

La valoración de esta enzima se realizó por el método colorimétrico basado en la producción de difosfato de adenosina para luego reaccionar con el fosfoenolpiruvato, en presencia de la enzima piruvato quinasa para formar ATP y piruvato. Este último reacciona con el dinucleótido de nicotina y adenina reducido. La reducción de la densidad óptica, medida a 340 nm, es directamente proporcional a la concentración de la enzima (Tanzer y Gilvarg 1959).

Análisis estadístico:

Los resultados obtenidos en esta investigación fueron sometidos al análisis estadístico t-Student, a un nivel de significancia del 95%, con la finalidad de conocer si existían diferencias significativas entre los valores medios de las determinaciones enzimáticas entre los individuos controles y urolitiásicos (Sokal y Rolhf 1969).

Resultados

En la tabla 1 se muestran los resúmenes estadísticos de la prueba t-Student aplicada a las concentraciones séricas de las enzimas creatina quinasa, lactato deshidrogenasa, gamma glutamil transferasa, alanina aminotransferasa, aspartato aminotransferasa, fosfatasa alcalina y al colesterol en individuos urolitiásicos y controles.

DISCUSIÓN

En la urolitiasis se han encontrado trastornos metabólicos relacionados con la actividad de algunas enzimas como lactato deshidrogenasa, fosfatasa alcalina, gamma glutamil transferasa y beta glucuronidasa (Price 1982; Malini *et al.*, 1995).

Los resultados obtenidos en el presente estudio al aplicarle el análisis estadístico t-Student a los valores medios de la enzima creatina quinasa, en los individuos urolitiásicos y controles, muestran diferencias muy significativas con valores aumentados para los individuos del grupo experimental. La posible explicación a este hallazgo viene dada por el hecho de que la creatina quinasa se encuentra distribuida ampliamente en los tejidos, favoreciendo la regeneración del ATP, especialmente en los sistemas contráctiles (Bais y Edwards 1982), por esta razón se cree que esta enzima puede estar aumentada en el tejido renal de los urolitiásicos debido a que la presencia de cálculos puede originar contracciones tanto en el riñón como en los uréteres y en la vejiga, promoviendo la movilización de los cálculos pequeños para su expulsión por la uretra.

Otra posible explicación a los valores aumentados de la enzima creatina quinasa puede estar relacionada con una comorbilidad de origen cardíaco, que puede estar presente en individuos con calculosis urinaria, ya que los valores del colesterol evaluado en los individuos calculosos, mostraron diferencias altamente significativas.

Los estudios relacionados con la incidencia de infartos al miocardio en los individuos urolitiásicos, muestran niveles de colesterol sérico ligeramente aumentados. Por otra parte, el cigarrillo, la presión sanguínea, el peso y la estatura no mostraron asociación significativa con la urolitiasis, pero la incidencia de la urolitiasis si disminuyó con la edad de los pacientes (Westlund 1973).

Los resultados obtenidos en la prueba t-Student al evaluar los valores promedios de la enzima lactato deshidrogenasa en individuos urolitiásicos y controles, no

Tabla 1. Resumen estadístico de la prueba t-Student aplicada a los valores medios de las enzimas determinadas en individuos urolitiásicos y controles.

Variables	Grupos	\bar{x}	Intervalo	S	P
Creatina Quinasa	Basal	90,97	52-136	26,67	2,83**
	Litiásicos	116,60	55-279	41,75	
Colesterol	Basal	171,92	115-213	23,59	4,95***
	Litiásicos	231,96	158-394	55,93	
Lactato Deshidrogenasa	Basal	164,23	88-195	34,89	1,10 ns
	Litiásicos	177,13	91-288	53,74	
Gamma Glutamil Transferasa	Basal	25,30	8,60-57,90	16,27	1,32 ns
	Litiásicos	41,90	10,00-67,00	67,20	
Alanina Aminotransferasa	Basal	18,54	8,50-34,10	6,73	2,67*
	Litiásicos	30,84	10,00-118,00	24,35	
Aspartato Aminotransferasa	Basal	20,01	11,60-42,10	5,93	1,94 ns
	Litiásicos	23,99	11,00-51,00	9,53	
Fosfatasa Alcalina	Basal	71,97	47,00-94,00	13,23	1,11 ns
	Litiásicos	81,50	35,00-279,00	45,32	

\bar{x} : valores promedio; S: desviación estándar; P: prueba t-Student.
 *: diferencias significativas
 **: diferencias muy significativas
 ***: diferencias altamente significativas
 ns: diferencias no significativas

arrojaron diferencias significativas. Pero a pesar de esto, se puede apreciar un valor promedio de esta enzima en los individuos del grupo experimental por encima del valor medio en el grupo control, que probablemente se debe a casos aislados de pacientes litiásicos con obstrucciones en las vías urinarias, ya que esta enzima se encuentra aumentada en situaciones de ruptura de la musculatura y en lesiones agudas del riñón, como ocurre en la litiasis urinaria (Murray *et al.* 1992).

La evaluación de la enzima gamma glutamil transferasa no mostró diferencias significativas en los dos grupos de individuos analizados, aunque el valor medio se encuentra aumentado en los pacientes urolitiásicos en comparación con los del grupo control. Este hallazgo puede deberse al hecho de que la gamma glutamil transferasa se eleva a nivel renal cuando existe una lesión en la estructura de este órgano (Henry 1993). Además, estudios realizados por Baggio *et al.* (1983), muestran niveles elevados de esta enzima a nivel sérico y urinario en individuos que experimentan retención de oxalato de calcio. Finalmente, Padmaja y Varalakshmi (1989) encontraron niveles aumentados de este compuesto en ratas calculogénicas.

Las diferencias significativas arrojadas en el análisis de la enzima alanina aminotransferasa en los urolitiásicos, pueden deberse a las lesiones que se producen a nivel renal en las situaciones de litogénesis, que se van acentuando en la medida que el cálculo va ocupando más espacio dentro de la pelvis o los cálices renales, o cuando se produce la movilización. Esta situación, en la que se manifiesta lesión del tejido renal, ocasiona el aumento de la enzima alanina aminotransferasa en los individuos con litiasis urinaria (Guth 1968).

Esta misma explicación, resulta válida para explicar los aumentos de los valores medios observados en la valoración de la enzima aspartato aminotransferasa en los individuos con litiasis urinaria.

La fosfatasa alcalina se encuentra aumentada en los individuos con enfermedades obstructivas. Además, la retención de cristales de oxalato de calcio puede resultar en valores aumentados, en sangre y orina de esta enzima. Estos incrementos de la fosfatasa alcalina han sido demostrados en pacientes con cálculos urinarios (Baggio *et al.* 1983), como ocurre en los individuos analizados en la presente investigación, donde el valor promedio de esta enzima en los pacientes litiásicos es superior al de los individuos sanos.

CONCLUSIONES

Los desequilibrios enzimáticos indican que los causales de la urolitiasis pueden estar relacionados con alteraciones en las rutas metabólicas.

Los niveles séricos de las enzimas gamma glutamil transferasa, lactato deshidrogenasa y fosfatasa alcalina, constituyen hallazgos bioquímicos de interés para orientar el diagnóstico hacia la urolitiasis.

Los daños encontrados en la estructura renal de los individuos urolitiásicos, se acompañan con alteraciones en las concentraciones enzimáticas debido a la instalación de cristales y a la formación, movilización u obstrucción de los cálculos en las vías urinarias.

AGRADECIMIENTO

Los autores expresan su agradecimiento al Laboratorio Clínico Universitario del Departamento de Bioanálisis de la Universidad de Oriente, Núcleo de Sucre, por la gran colaboración prestada para llevar a cabo la parte experimental de esta investigación.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BAGGIO B., GAMBARO G., OSSI E., FAVARO S. & BOSALTI A. 1983. Increased urinary excretion of renal enzymes in idiopathic calcium oxalate nephrolithiasis. *J. Urol.* 129: 1161.
- BAIS R. & EDWARDS J. 1982. Creatine kinase. *CRC. Rev. Clin. Lab. Sci.* 16: 291-335.
- BOWER G. & MC COMB R. 1975. Measurement of total alkaline phosphatase activity in human serum. *Clin. Chem.* 21: 1988-1995.
- CASTRILLO J. 1988. Litiasis renal. *A v. Nefrol. e Infec. Urin.* 4: 82-93.
- Day S., Thompson K., Vera E. & Mc Neill J. 1994. Toxicity studies on one-year treatment of non-diabetic and streptozotocin-diabetic rats with venadyl sulfate. *Pharmacol. Toxicol.* 75 (5): 265-273.
- GUTH L. 1968. Tropic influences of nerve on muscle. *Physiol. Rev.* 48: 645-687.
- Henry J. 1993. Diagnóstico y tratamiento clínico por el laboratorio, Ediciones Científicas y Técnicas, S.A., México, pp. 1509.
- HOWELL B., MC CLURE S. & SCHAFER R. 1979. Lactate-to pyruvate or pyruvate-to-lactate dehydrogenase: re-examination. *Clin. Chem.* 25: 269-272.
- KHAN S., SHEVOCK P. & HACKETT R. 1992. Acute hyperoxaluria renal injury and calcium oxalate urolithiasis. *J. Urol.* 147(1): 226-230.
- MALINI M., BASKAR R. & VARALAKSHMI P. 1995. Effect of lupeol, a pentacyclic triterpene on urinary enzymes in hyperoxaluric rats. *Jpn. J. Med. Biol.* 48(5-6): 211-220.
- MILLER D., GLIK M. & OEI T. 1981. Results compared for plasma aminotransferase activity with and without pyridoxal phosphate activation in infants and children. *Clin. Chem.* 27: 1035.
- MURRAY R., GRANNER D., MAYES P. & RODWELL V. 1992. *Bioquímica de Harper*, Editorial El Manual Moderno, S.A., México, pp. 140.
- Neimark A., Fidirkin A. & Zhukov. 1997. The diagnostic significance of enzymuria in assessing kidney function in patients with urolithiasis. *Urol. Nefrol. Mosk.* 1: 5-7.
- PADMAJA T. & VARALAKSHMI P. 1989. Urinary enzymes in experimental calcium oxalate lithiasis and effect of L(+)-tartrate. *Med. Sci. Res.* 17: 589-590.
- PRICE R. 1982. Urinary enzymes, nephrotoxicity and renal disease. *Toxicology.* 23: 99-134.
- REJ R., BRETANDIER J. & GRAFFUNDER B. 1981. Measurement of aspartate aminotransferase isoenzymes: six procedures compared. *Clin. Chem.* 27: 235-542.
- SOKAL R. & ROHLF J. 1969. *Biometría. Principios y métodos estadísticos en la investigación biológica*, Editorial W. Freeman & co, San Francisco, pp. 776.
- SUBHA K., BASKAR R. & VARALAKSHMI P. 1992. Biochemical changes in kidney of normal stone forming rats with sodium pentosan polysulphate. *Biochem. Int.* 26 (2): 357-365.
- TANZER M. & GILVARG C. 1959. Creatine and creatine kinase measurement. *J. Biol. Chem.* 234: 3201-3204.
- THEODORSEN L. & STROMME J. 1976. Gamma-glutamyl-3-carboxy-4-nitroanilide: the substrate of choice for routine determinations of gamma glutamyl-transferase activity in serum. *Clin. Chem. Acta.* 72: 205-210.
- WESTLUND K. 1973. Urolithiasis and coronary heart disease a note on association. *Am. J. Epidemiol.* 97(3): 167-172.