

## Monitorización enzimática en el trasplante renal

J. A. Rodríguez, C. Pascual, A. Aulesa, L. Capdevila, R. M. Segura, J. Bonal, A. Brulles, L. Piera •

### Enzymatic monitorization in renal transplantation

In an effort to detect markers that guide us in the diagnosis of the rejection crisis (CA) the behavior of four enzymes has been investigated: N-acetyl-beta-D-glucosaminidase (NAG), Gamma-glutamyltransferase (GGT), Alkaline Phosphatase (F. Al.) and Leucil-arlamidase (LAP),

The results of 816 specimens of recently voided urine, collected daily post-operatively from 15 transplanted patients, getting correlation between their elevation and the presence of CR diagnosing by clinical and/or isotopic procedure with the following results:

**NAG:** Significant rises are shown in 93.8 % of the CR with a precocity of 2 days in 70 % of the cases. In the same way elevations are noted in 100 % of the cases in which the patients are treated with gentamicin and in 70 % after exploration with radiologic contrasts. After the instauration of the anti-rejection treatment the values descended significantly in the first 24 hours in 57 % of the cases.

**F. Al.:** Significant rises were noted in 66.6 % of the CA, demonstrating a parallel pattern to that of the NAG.

Both GGT and LAP show significant rises only in 33.3 % of the CR.

From our studies we come to the conclusion that the serialised determination of the NAG is very useful in the diagnosis of the CR, both for its precocity and its high positive incidence, acting even as a therapeutic response value.

### Monitorisation enzymatique dans la transplantation rénale

Dans la tentative de détecter des marques qui nous fournissent une garantie de diagnostic de la crise de rejet (CR), on fait des recherches sur le comportement de 4 enzymes: N-acétyl-beta-D-glucosaminidase (NAG), Gamma-glutamyltransférase (GGT), Phosphatase Alcaline (F. Al.) et Leucil-arlamidase (LAP).

On analyse les résultats de 816 échantillons d'urine récente, émise chaque jour du post-opératoire de 15 patients transplantés; on obtient des corrélations entre leurs élévations et la présence de CR diagnostiqué par des procédés cliniques ou/et isotopiques avec les résultats suivants:

**NAG:** On constate des élévations significatives dans 93,8 % de CR avec une précocité de deux jours dans 70 % des cas. De même on constate des élévations dans 100 % des cas chez les patients traités avec de la gentamicine et dans 70 % après explorations radiologiques. Après la mise en place du traitement anti-rejet les valeurs descendent

de façon significative dans les premières 24 heures dans 57 % des cas.

**F. Al.:** On constate des élévations significatives dans 66,6 % des CA, démontrant un comportement parallèle à celui de la NAG.

Aussi bien la GGT que la LAP démontrent seulement des élévations significatives dans 33,3 % des CR.

A partir de nos travaux nous concluons que la détermination sériée de la NAG est d'une grande utilité dans le diagnostic de la CR, aussi bien pour sa précocité, que pour son indice élevé de positivité, se comportant y compris comme valeur de réponse thérapeutique.

### Introducción

El diagnóstico precoz de la crisis de rechazo (CR) es de suma importancia en el cuidado del paciente que ha recibido un trasplante renal, ya que, para prevenir el deterioro de la función, se ha de instaurar rápidamente un tratamiento específico.

El alto grado de componentes enzimáticos que posee el túbulo renal (1), unido al dato conocido de que en la CR se producen precozmente fenómenos isquémicos que provocan la liberación de enzimas tubulares (2), ha promovido el estudio de diferentes actividades enzimáticas en orina con la intención de encontrar marcadores precisos de la crisis de rechazo. Wellwood ha propuesto la determinación de la N-acetil-beta-D-glucosaminidasa (NAG) en orina como indicador de la CR (3). No obstante, el carácter precoz de la elevación de esta enzima ha sido debatido por algunos autores (4).

En el presente estudio, nos proponemos un doble objetivo:

1) Analizar el comportamiento durante la CR de cuatro enzimas: una lisosomal: NAG, y tres del «brush-border»: gamma-glutamyltransferasa (GGT), fosfatasa alcalina (F. Al.) y leucil-arlamidasa (LAP).

2) Delimitar las causas de elevación de estas enzimas en el curso del trasplante renal.

\* Servicio de Nefrología y de Bioquímica. Ciudad Sanitaria «Francisco Franco». Barcelona.

## Pacientes

Hemos estudiado el comportamiento de la actividad enzimática en 816 muestras de orina, pertenecientes a 15 enfermos que habían recibido un trasplante renal. De ellos, en 14 ocasiones se trataba de un riñón de cadáver y en una de un riñón de vivo emparentado.

El diagnóstico de CR se ha realizado por los facultativos de la unidad de trasplante, sin conocimiento previo de los valores de las actividades enzimáticas, mediante criterios clínicos, de funcionalismo renal, radiológicos e isotópicos.

## Métodos

Las muestras se recogieron diariamente, desde el día del trasplante, entre 8 y 10 de la mañana durante el periodo de estancia en el hospital y posteriormente en los controles periódicos.

En cada una de las muestras estudiadas, se ha determinado la creatinina en un autoanalizador Coulter Chemistry (método: picrato alcalino). Las actividades enzimáticas se han analizado en diluciones 1/4 del sobrenadante de la orina obtenido por centrifugación a 1.500 rpm.

La determinación de las actividades GGT, F. Al. Y LAP se han efectuado en un autoanalizador Gilford 3.500, adaptando los siguientes métodos: GGT, método de Szasz (5). Sustrato: t-glutamyl-L-carboxi-q-nitroanilida, Cosustrato: glicilglicina. F. Al., método recomendado por la Sociedad Alemana de Química Clínica (6). Sustrato: p-nitrofenil-fosfato. LAP, método de Nagel (7). Sustrato: L-leucina-p-nitroanilida. Para la determinación de la NAG, se ha seguido el método de Mahrun (8) modificado (9). Hidrólisis de p-nitrofenil-N-acetil-beta-D-glucosaminido a pH 4,17 Tampón: cítrico-fosfato. Incubación: 10 minutos. Interrupción de la hidrólisis por alcalinización del medio con tampón AMP (2-aminometil-panal).

## Controles

Los valores de referencia se obtuvieron tras el estudio de muestras de orina pertenecientes a 61 individuos con función renal normal, recogidas en periodos de tiempo variable. Los resultados se expresan en Unidades/g de creatinina.

## Criterios de elevación

Se consideró que una enzima aumentaba significativamente cuando cumplía uno de los dos criterios siguientes:

1) Si el valor anterior se encontraba dentro de la normalidad, la elevación debía exceder, por lo menos, en un 50 % dicho límite.

2) Si se partía de un valor patológico, el aumento debía representar un incremento del 50 % respecto a la determinación anterior.

## Resultados

*Comportamiento de las enzimas en la crisis de rechazo.* En los 15 pacientes estudiados se han detectado un total de 16 crisis de rechazo, siguiendo los criterios expresados. Uno de los pacientes no presentó CR, en 2 pacientes se observaron dos episodios y en los restantes, uno.

La NAG (tabla 1), con una incidencia del 93,8 %, es la enzima que se elevó con más frecuencia, al apreciar aumento de su actividad en 15 de las 16 CR. La F. Al. se apreció aumentada en el 66,6 % de los episodios en que se estudió, y la GGT y LAP en el 33,3 %.

TABLA I

### Elevaciones enzimáticas en orina

NAG	15/16	(93,8 %)
F. Al.	6/9	(66,6 %)
GGT	3/9	(33,3 %)
LAP	3/9	(33,3 %)

Los aumentos de la NAG en la CR fueron generalmente claros (tabla II), con elevaciones entre 1,7 y 12,5 su valor normal, lo que da un promedio de elevación de 5,30 veces su valor. Al expresar los aumentos en %, éstos variaron entre 63 % y 733 % para las 11 ocasiones en que se disponía de muestra previa.

TABLA II

### Elevaciones de la NAG en la crisis de rechazo

Paciente	% elevación	VN x	Precocidad
N.º 1	153	9,5	NE
N.º 2	370	2,3	72 horas
N.º 3	400	2,0	48 horas
N.º 4	81	3,9	48 horas
N.º 5		10,0	NE
N.º 6		4,4	NE
N.º 7	70	4,2	72 horas
N.º 8	134	3,7	48 horas
N.º 9	80	1,8	24 horas
N.º 10		4,3	NE
N.º 11		3,5	NE
N.º 12	65	1,7	NP
N.º 13	63	8,9	48 horas
N.º 14	733	12,5	NP
N.º 15	206	6,9	NP

VN x: número de veces el valor normal. NE: no evaluable. NP: no precoz.

En 10 ocasiones, se ha podido evaluar el grado de precocidad con que se registran aumentos de la NAG en relación al diagnóstico de la CR (tabla II), observando que en 7 de los casos la actividad enzimática se encontraba aumentada entre 1 y 3 días previos a la confirmación clínica. En los tres restantes, el aumento coincidió con el día del rechazo.

En 11 episodios, hemos podido estudiar el comportamiento de la NAG tras la instauración del tratamiento con prednisona y hemos apreciado que existe una relación directa entre la respuesta clínica y el descenso de la actividad enzimática (fig. 1). En los 7 casos en que se obtuvo una recuperación rápida de la función, tras el inicio del tratamiento, los valores de la NAG descendieron un promedio del 57 % en las primeras 24 horas. En los 4 casos restantes, la crisis fue prolongada, apreciándose descensos lentos de la actividad enzimática.

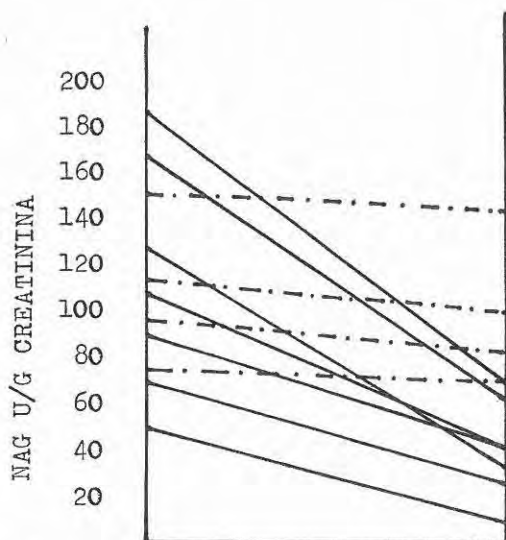


Fig. 1. Descensos de la NAG a las 24 h del tratamiento con prednisona. En trazo continuo, las CR de resolución rápida; y en discontinuo, las lentas.

*Elevaciones enzimáticas tras exploraciones radiológicas.* Al analizar el comportamiento de las 4 enzimas tras 10 exploraciones con contrastes iodados (8 urografías y 2 arteriografías), observamos asimismo diversas elevaciones de las actividades enzimáticas.

La NAG mostró aumento de su actividad en todas las ocasiones, si bien en 3 casos el aumento no llegó a sobrepasar el 50 % sobre el valor previo, fijado como significativo. La LAP aumentó tras 8 exploraciones, permaneciendo normal en las otras dos. La GGT y las F. Al. se elevaron tan solo en tres y dos de los estudios, respectivamente.

*Pacientes sometidos a medicación antimicrobiana.* Tras el tratamiento de 26 episodios infecciosos diversos con diferentes drogas anti-

microbianas, hemos comprobado que la NAG se elevó de forma significativa, y siempre, solamente en los 9 procesos en que se utilizó gentamicina.

## Discusión

La comprobación de que en nefropatías humanas se producen aumentos de diferentes actividades enzimáticas en orina (10, 11) sugirió que su estudio sistemático podría ser valioso en el diagnóstico de la crisis de rechazo (12).

Nuestros resultados coinciden con los de otros grupos (13, 14) en cuanto a la fiabilidad de la NAG como marcador preciso de la CR, apreciando, al igual que Wellwood, su elevación en el 93,8 % de los episodios (15). Pero además de este alto índice de positivos, la monitorización de la NAG en el trasplante de riñón reviste un doble interés adicional. En nuestra experiencia, en el 70 % de los episodios, comprobamos elevaciones significativas, en ausencia de signos clínicos que permitan sospechar la CR, con una precocidad promedio de 2 días. En segundo lugar, hemos podido demostrar su valor como índice terapéutico, ya que la rapidez de su descenso, tras el tratamiento anti-rechazo, es directamente proporcional a la respuesta clínica.

Asimismo, de nuestras observaciones se desprende que la NAG experimenta elevaciones frente a la asociación de agentes potencialmente nefrotóxicos. Los pacientes sometidos a tratamiento con gentamicina o a exploraciones con contrastes radiológicos, muestran un alto índice de elevaciones significativas, lo que es necesario tener en cuenta, ya que ambas situaciones pueden ser coincidentes con la crisis de rechazo.

El estudio de las otras tres enzimas no nos parece de interés. En todo caso, la LAP dada su frecuente elevación en las exploraciones con contrastes radiológicos (80 %) pensamos puede ser de utilidad, pues su aumento en la CR es escasa (33,3 %). Sin embargo, en estas situaciones es preciso recurrir a otros procedimientos de confirmación diagnóstica, ya que el estudio enzimático entendemos que sólo tendría valor orientativo.

Si bien la monitorización de la CR basada en investigaciones urinarias ofrece la dificultad de frecuentes situaciones de oligoanuria, la cantidad de orina requerida para el estudio de actividades enzimáticas es escasa. La precisión de sus valores, ya que la expresión de resultados en U/g de creatinina elimina el error por variaciones de flujo urinario, permite procesar cualquier tipo de muestra (16). Por otro lado, la ausencia de complejidad técnica favorece el conocimiento de los datos en pocas horas.

Consideramos, por último, que nuestros estudios pueden contribuir, en parte, al esclareci-

miento de los falsos positivos de la NAG en el trasplante renal, ya que en los diferentes trabajos publicados no hemos encontrado observaciones acerca del aumento de la NAG tras exploraciones con contrastes radiológicos.

## Resumen

En un intento de detectar marcadores que nos afiancen en el diagnóstico de la crisis de rechazo (CR), se ha investigado el comportamiento de 4 enzimas: N-acetil-beta-o-glucosaminidasa (NAG), Gamma-glutamyltransferasa (GGT), Fosfatasa Alcalina (F. Al.) Y Leucil-aril-amidasa (LAP).

Se analizan los resultados en 816 muestras de orina reciente, recogida diariamente en el postoperatorio de 15 pacientes trasplantados, obteniendo correlaciones entre sus elevaciones y la presencia de CR diagnosticado por procedimientos clínicos y/o isotópicos con los siguientes resultados:

**NAG:** Se demuestran elevaciones significativas en el 93,8 % de las CR, con una precocidad de 2 días en el 70 % de los casos. Asimismo, se constatan elevaciones en el 100 % de los casos en que los pacientes son tratados con gentamicina y en el 70 % tras exploraciones con contrastes radiológicos. Después de la instauración del tratamiento anti-rechazo, los valores descienden significativamente en las primeras 24 horas en el 57 % de los casos.

**F. Al.:** Se demuestran elevaciones significativas en el 66,6 % de las CR, mostrando un comportamiento paralelo al de la NAG.

Tanto la GGT como la LAP, muestran tan sólo elevaciones significativas en el 33,3 % de las crisis de rechazo.

De nuestros estudios, concluimos que la determinación seriada de la NAG es de gran utilidad en el diagnóstico de la CR, tanto por su precocidad, como por su alto índice de positividades, comportándose incluso como valor de respuesta terapéutica.

## Bibliografía

1. **Mattenheimer, H.:** *Methods of Enzymatic Analysis*, pág. 62. Ed. Bergmeyer, H. V. Verlag Clinic Academic Press. New York, 1974.
2. Ward, J. P.: *Ann. R. Coll. Surg. Engl.*, 57, 248, 1975.
3. Wellwood, J. M.; Ellis, B. G.; Hall, J. N.; Robinson, D. R.; Thornson, A. E.: *Brit. Med. J.*, 2, 261, 1973.
4. Keyser, J. W.; Watkins, G. L.; Salarnan, J. R.: *Clin. Chern.*, 22, 925, 1976.
5. Szasz, G.: *Z. Klin. Chem. Klin. Biochem.*, 12, 228 1974.
6. **Recomendaciones del Comité de Expertos en Enzimas de la Sociedad Alemana de Química Clínica.** *Z. Klin. Chern. Klin. Biochem.*, 8, 658, 1970.
7. Nagel, W.: *Klin. Wochenschr.*, 42, 447, 1964.
8. Mahrun, D.: *Clin. Chirn. Acta*, 73, 453, 1976.
9. Aulesa, C.; Mesalles, E.; Segura, R. M.; Planas, M.; **Pascual, C.; Salvador, J.; Schwartz, S.:** **Enzimas en orina: Ritmo de eliminación, valores de referencia, interferencia por antibióticos.** **XXVII Congreso de la Sociedad de Biopatología Clínica. Jerez (España), 1980.**
10. Price, R. G.; Dance, N.; Richards, B.; Catell, W. R.: *Clin. Chirn. Acta*, 27, 65, 1970.
11. Dance, N.; Price, R. G.; Castell, W. R.; Landsell, J.; Richards, B.: *Clin. Chirn. Acta*, 27, 87, 1970.
12. **Robinson, D.:** **Séptimo Congreso Internacional de Quirnicología Clínica.** Pág. 42. Edit. Karger. Basilea, 1970.
13. García, B.; Thompson, A. E.; Tucker, S. M.; Wing, A. J.: *Proceedings of EDT. Vol. 7*, pág. 311, 1975.
14. **Sandeman, R.; Margules, R. M.; Kountz, S. L.:** *Clin. Chirn. Acta*, 45, 349, 1973.
15. Wellwood, S. M.; Davles, D.; Leighton, M.; Thompson A. E.: *Transplantation*, 26, 396, 1978.
16. Tucker, S. M.; Boyd, P. J. R.; Thompson, A. E.; Price, R. G.: *Clin. Chirn. Acta*, 62, 333, 1975.