

## ENZIMOLOGÍA URINARIA EN PERROS SANOS

**Palacio Liesa J.; Gascón Pérez F. M. y Liste Burillo F.**

Departamento de Patología Animal. Unidad de Patología General y Médica. Facultad de Veterinaria.  
C/ Miguel Servet, 177. 50013-ZARAGOZA (Spain).

Recibido: 5 Noviembre 1993

Aceptado: 27 Mayo 1994

### RESUMEN

Se ha determinado la actividad urinaria de la alanina aminopeptidasa (AAP; EC 3.4.11.2.), fosfatasa alcalina (ALP; EC 3.1.3.1.) y de la g-glutamyltransferasa (GGT; EC 2.3.2.2.) como enzimas presentes en la membrana en cepillo del túbulo contorneado proximal y de la N-acetil-β-D-glucosaminidasa (NAG; EC 3.2.1.30.) y β-D-glucuronidasa (β-Gluc.; EC 3.2.1.31) como enzimas lisosomales, en la orina de ocho perros Beagle sanos.

Las actividades enzimáticas urinarias, expresadas en relación a la concentración de creatinina urinaria para corregir las variaciones producidas por el volumen de orina, mostraron los siguientes valores medios: 12,9±4,8 U/g. para la GGT, 15,1±13,2 U/g. para la ALP, 1,3±0,2 U/g. para la AAP, 6,4±1,8 U/g. para el NAG y 5,3±2,6 U/g. para la β-Gluc.

*Palabras clave:* Perro, enzimas urinarios, alanina aminopeptidasa, fosfatasa alcalina, gámma-glutamyltransferasa, N-acetil-β-D-glucosaminidasa, β-glucuronidasa.

### SUMMARY

Activities of urinary enzymes alanine aminopeptidase (AAP; EC 3.4.11.2.), alkaline phosphatase (ALP; EC 3.1.3.1.) and g-glutamyltransferase (GGT; EC 2.3.2.2.) as brush border enzymes of the proximal tubuli as well as N-acetyl-β-D-glucosaminidase (NAG; EC 3.2.1.30.) and β-D-glucuronidase (β-Gluc.; EC 3.2.1.31) as lysosomal enzymes, was measured in the urine in eight healthy dogs.

Urinary enzyme concentrations were related to urinary creatinine concentration in order to correct for variations in urinary volume.

In our study, mean values from GGT, ALP, AAP, NAG and β-Gluc. were 12.9±4.8; 15.1±13.2; 1.3±0.2; 6.4±1.8 and 5.3±2.6 U/g. respectively.

*Keywords:* Dog, urinary enzymes, alanine aminopeptidase, alkaline phosphatase, gamma-glutamyltransferase, N-acetyl-β-D-glucosaminidase, β-glucuronidase.

## INTRODUCCIÓN

La valoración de las actividades enzimáticas por métodos estandarizados de química clínica ha mejorado las posibilidades diagnósticas de la medicina clínica. En la actualidad tales determinaciones en el suero resultan ser la principal forma de diagnosticar y de controlar evolutivamente las enfermedades más comunes.

Desafortunadamente, no existen enzimas específicos marcadores de lesión renal en el suero, si exceptuamos al infarto renal (Raab, 1972). Por otra parte, la presencia de actividad enzimática no solamente se ha descrito en el suero, sino en otros fluidos, como la orina, que presenta también dicha actividad. Aunque la existencia de actividad enzimática en la orina es conocida desde hace más de 160 años, su determinación en relación con los estados de salud y enfermedad ha provocado impacto en la medicina experimental y clínica en las últimas décadas.

La introducción de la determinación de la actividad enzimática en la orina con fines diagnósticos se realizó en 1959 por Rosalki y Wilkinson al descubrir aumento de la actividad glutámico oxalacética y lactatodeshidrogenasa en pacientes con enfermedad renal.

En los últimos años se han determinado más de 40 enzimas urinarios con fines diagnósticos. Del conjunto de los enzimas urinarios, Raab (1972) sólo considera unos pocos realmente importantes con fines diagnósticos.

No obstante, las determinaciones enzimáticas en la orina no son de realización tan fácil como las séricas, hoy día en su mayoría automatizadas. La orina es un medio muy inestable y menos homogéneo que el suero. Los factores que influyen en las determinaciones enzimáticas así como los detalles prácticos a observar en la recogida, conservación y análisis de las muestras han sido descritos anteriormente (Gascón et al., 1995).

En medicina veterinaria, los métodos utilizados en el diagnóstico diferencial de las distin-

tas enfermedades renales en el perro, son hasta la actualidad limitados y no permiten poner en evidencia etapas tempranas de las enfermedades renales crónicas o incluso lesiones leves de carácter agudo provocadas por ejemplo por sustancias nefrotóxicas (Hofmann y Guder, 1989). Según Kunin et al. (1978) la prueba renal ideal sería aquella que indicara la existencia de lesión en las células de los túbulos renales antes de que hubiera alteraciones en la función renal; por ello, las aplicaciones más frecuentes de esta técnica en nuestras especies domésticas han sido los estudios experimentales de nefrotoxicidad inducida, llevados a cabo en caballos (Brobst et al., 1986), ovejas (Garry et al., 1990a; Garry et al., 1990b), terneros (Crowell et al., 1981), gatos (Hardy et al., 1985) y perros (Ellis y Price, 1973; Ellis et al., 1973a; Ellis et al., 1973b; Greco et al., 1985). Sin embargo, es difícil encontrar valores de referencia para los distintos enzimas en la bibliografía veterinaria; al contrario de lo que ocurre en medicina humana, donde a pesar de todo los estudios son muy limitados.

En nuestro trabajo hemos escogido un perfil enzimático compuesto por cinco enzimas, de distinta localización celular, de utilidad diagnóstica contrastada en medicina humana y de los más empleados actualmente: AAP, GGT y ALP como enzimas presentes en la membrana en cepillo del túbulo contorneado proximal y el NAG y  $\beta$ -Gluc. como enzimas lisosomales, con una metodología de trabajo puesta a punto a raíz de las revisiones bibliográficas realizadas.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### • Animales

Para realizar el presente trabajo se utilizó orina y sangre de 8 perros (6 hembras y 2 machos), clínicamente sanos, de raza Beagle y con 2 años de edad todos ellos.

El examen físico y los perfiles hematológicos y bioquímicos, no revelaron ningún signo de enfermedad.

### • Recogida de la orina

Una media de 15 a 25 ml. de orina se tomaron por cistocentesis entre las 8:30 y 10:00 h. de cada perro.

### • Preparación de la orina

Una primera valoración semicuantitativa de la orina se realizó mediante las tiras reactivas de inmersión Combur-9-Test® (Boehringer Mannheim) con resultados normales.

El pH urinario se comprobó con un pHmetro digital marca Beckman, modelo 3500 y la densidad urinaria mediante un urodensoímetro y a 20° C.

El examen del sedimento urinario se realizó tras una centrifugación a 1500 r.p.m. durante 5 minutos en una centrífuga refrigerada Hermle 7k365.

Una vez realizadas estas determinaciones previas, la orina fue centrifugada de nuevo a 3000 r.p.m. durante 10 minutos y a 4° C para la total eliminación de los elementos formes de la misma. Una parte del sobrenadante se destinó al análisis de la creatinina y proteínas urinarias, mientras que otra cantidad (2,5 ml.) fue destinada al análisis enzimático previa filtración en gel.

La cromatografía de filtración en gel se realizó en columnas preparadas para su uso inmediato, Sephadex G25M (Pharmacia LKB, Uppsala, Sweden) según el método descrito por Grötsch y Mattenheimer (1983) y equilibrando el gel con 20 ml. de una solución de cloruro sódico 0,15 mol/l.

Las orinas filtradas y sin adición de ningún conservante se almacenaron a -20° C hasta la fecha del análisis enzimático.

### • Procedimientos analíticos

#### \* *Determinación cuantitativa de las proteínas urinarias y cociente UP/C*

Se realizó mediante el método Bradford

(1976) empleando el Coomassie Brilliant Blue G (Sigma Chemical) como colorante y midiendo la absorbancia a 595 nm. en un espectrofotómetro Perkin-Elmer, modelo Lambda 5. Se calculó la razón UP/C mediante el cociente de las proteínas urinarias con la creatinina urinaria.

#### \* *Determinación de la creatinina urinaria*

Se determinó con el test de color Test-Combination Creatinina nº 124192 (Boehringer Mannheim GmbH) basado en el método Jaffé con desproteinización.

#### \* *Determinaciones enzimáticas urinarias*

a) Determinación de la GGT urinaria (EC 2.3.2.2.).

La actividad se mide con el Kit «Monotest»® g-GT nuevo, nº 1087584 (Boehringer Mannheim GmbH).

b) Determinación de la ALP urinaria (EC 3.1.3.1.).

Se sigue un método standard con el Kit «Monotest»® ALP opt., nº 1087517 (Boehringer Mannheim GmbH).

c) Determinación de la AAP (EC 3.4.11.2.).

La actividad de la AAP se mide con el método descrito por Reusch (1991) que modifica parcialmente el método descrito por Mattenheimer (1988). El incremento de absorbancia se midió a 405 nm. durante 5 minutos y a 25° C.

d) Determinación del NAG (EC 3.2.1.30).

Se ha seguido la técnica colorimétrica de Maruhn (1976) con las modificaciones hechas en el tiempo de incubación por Aulesa (1981) a una temperatura de incubación de 37° C y 405 nm.

e) Determinación de la  $\beta$ -Gluc. (EC 3.2.1.31.).

Aunque Golbarg et al. (1959) ya propuso un método para la determinación de este enzima en orina, se sigue el método actualizado descrito por Stahl y Fishman (1983). La incubación de la mezcla se realiza a 37° C durante 4 horas valorando la variación de absorbancia a 540 nm.

El resultado es expresado en unidades Fishman (factor de corrección=318).

Todas las actividades enzimáticas urinarias se expresaron en Unidades de actividad enzimática por gramo de creatinina urinaria excretada (U/g.).

## RESULTADOS

El examen del sedimento urinario no mostró la presencia de cilindros, cristales o células anormales; tan sólo 2 animales contaban con la presencia de eritrocitos en número aproximado a 3 por campo de elevada potencia (cep), sin significación patológica y compatible con la práctica de la cistocentesis.

La densidad osciló en un rango de 1010-1045 y el pH entre 5,6-6,9.

Las proteínas urinarias presentaron valores normales con una media de 28,22 mg/dl. El cociente UP/C mantuvo unos valores similares en todos los animales y dentro de la normalidad ( $0,14 \pm 0,05$ ).

El estudio de la enzimología urinaria (véase figura) reveló unos valores de  $12,9 \pm 4,8$  U/g. para la GGT,  $15,1 \pm 13,2$  U/g. para la ALP y  $1,3 \pm 0,2$  para la AAP. Como enzimas lisosomales, la actividad enzimática del NAG fue de  $6,4 \pm 1,8$  U/g. y de  $5,3 \pm 2,6$  U/g. para la  $\beta$ -Gluc.

## DISCUSIÓN

Comparando la orina con el suero, ésta posee un número considerable de desventajas a la hora de ser utilizada en las mediciones cuantitativas enzimáticas, resultando difícil la distinción entre valores fisiológicos y patológicos (Grötsch y Mattenheimer, 1983).

En la bibliografía consultada, Reusch et al. (1991) establece por primera vez valores medios en la especie canina, también provisionales (10 animales), con una media similar a la de nuestro trabajo en cuanto a los valores obtenidos en la AAP (3,7 U/g.) considerando que la determinaban a 37° C y una media inferior pero también cercana a la de nuestro estudio para los valores del NAG (1,7 U/g.).

Heiene et al. (1991) determinó también valores medios para la GGT y ALP caninas utilizando otros procedimientos, con lo que no podemos comparar los resultados con los de nuestro estudio.

Los resultados de  $\beta$ -Gluc. obtenidos en nuestro estudio pueden considerarse como de referencia, pues en la bibliografía consultada no se han encontrado valores medios en la especie canina.

No obstante, resulta imprescindible estandarizar las condiciones de trabajo (recogida, pro-

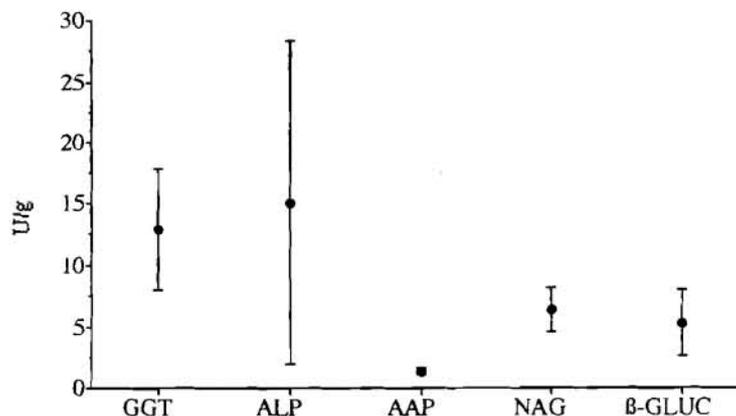


FIGURA. Valores medios y sus desviaciones típicas para los distintos enzimas urinarios.

cesado y análisis de las muestras), a fin de valorar la fluctuación enzimática en condiciones fisiológicas.

En la recogida de la orina, la cistocentesis es la técnica de elección reduciendo el riesgo de contaminaciones de la muestra a través de la uretra o del tracto genital, y siendo bien tolerada por la mayoría de los perros. Por otra parte, la práctica común en nefrología humana de recoger la orina en 24 h. reduce la variabilidad en la liberación de ciertas sustancias, producidas por los ritmos diurnos; pero ésta no es recomendada para la determinación de enzimas urinarios, porque períodos prolongados de recogida pueden conducir a la inactivación de los enzimas (Maruhn et al., 1977). Además, es de considerar su difícil aplicación en la especie canina, pues supone el trabajar en jaulas metabólicas con un riesgo adicional de contaminación de la muestra por heces, pelos, etc. Por este motivo, la cistocentesis cobra mayor fuerza como método a elegir en la extracción de la orina.

En las muestras recogidas de este modo, es necesario un ajuste de la actividad enzimática determinada, en relación a otros parámetros, para reducir la variación en la concentración del enzima analizado debido a la inconstante dilución/concentración de las muestras de orina. Se han utilizado tanto el peso específico, como la osmolaridad y la creatinina urinaria, siendo ésta última la que más reduce la variabilidad en la excreción enzimática urinaria (Werner et al., 1970; Jung et al., 1987; Jung, 1991) y la utilizada en nuestro trabajo.

Mattenheimer (1977) y Maruhn et al. (1977) describen variaciones diurnas en la excreción urinaria de muchos enzimas. Maruhn propone el uso de muestras obtenidas durante o cerca del máximo pico de liberación del enzima. Así pues, para evitar este factor de variación la toma de muestras se efectuó en todos los animales en períodos de tiempo comprendidos entre las 8:30 y 10 h., período en el que enzimas como la  $\beta$ -Gluc. tienen un pico de excreción mayor (Maruhn et al., 1977).

Por otra parte, es bien conocida la presencia de inhibidores-activadores enzimáticos en la orina, sustancias que interfieren como la urea, drogas y metabolitos de éstas, aminoácidos, etc. y que aceleran la inactivación enzimática y que deben ser eliminados antes de proceder al análisis (Werner et al., 1969; Astley y Reid, 1992). La filtración en gel es hasta hoy el método más efectivo y utilizado para la eliminación de los inhibidores enzimáticos presentes en la orina. Las elevaciones descritas para algunas actividades enzimáticas como la alanina-aminopeptidasa en el perro tras la filtración en gel, ponen de manifiesto la presencia de inhibidores en la orina para este enzima (Reusch et al., 1991).

En cuanto a las posibles variaciones debidas al sexo de los animales, en medicina humana se han encontrado actividades enzimáticas superiores, en condiciones normales, en los hombres para enzimas como la GGT (Mattenheimer, 1977). En nuestro estudio, el escaso número de animales disponible (2 machos y 6 hembras) no permitió encontrar diferencias entre sexos. En la especie canina, no hay todavía resultados concluyentes, si bien Reusch et al. (1991) encontró niveles medios superiores de AAP y NAG en perros machos, atribuyéndolo al alto contenido enzimático de los espermatozoides (Raab, 1972); no obstante, en su trabajo el número de muestras fue también reducido para obtener conclusiones definitivas.

La edad es un factor que no influye directamente en la excreción enzimática cuando la actividad se expresa en relación a un volumen (U/l). Sin embargo, cuando el resultado se expresa en relación a la cantidad de creatinina excretada en orina (U/g., U/mmol) induce variación (Jung et al., 1990). Por tanto, a la hora de publicar valores de referencia, es importante establecer y fijar la edad en todos los animales a estudio. En nuestro trabajo, todos los animales tenían 2 años de edad, eran de la misma raza y se encontraban en idénticas condiciones de manejo, alimentación y sanitarias.

Los criterios para la elección de los enzimas

urinarios que van a componer nuestro perfil fueron establecidos por Gonicket et al. (1973) y reafirmado por distintos autores posteriormente (Cuxart, 1981; Flandrois et al., 1986). Siempre es interesante escoger enzimas de distinta localización celular. Los enzimas con una mayor aplicación clínica han sido los presentes en los túbulos contorneados proximales, tanto en la membrana en cepillo de las células (GGT, ALP, AAP) como a nivel lisosomal (NAG y  $\beta$ -Gluc.).

La enzimología urinaria ha demostrado ser en muchos trabajos una técnica laboratorial muy sensible y precoz en la detección de lesiones a nivel renal, incluso más que otras pruebas tradicionalmente utilizadas para el diagnóstico de estas alteraciones. Por tanto, y en medicina veterinaria, su continuo estudio, tanto experimental como clínico, puede contribuir a la mejora de los diagnósticos y pronósticos de las enfermedades renales.

## BIBLIOGRAFÍA

- ASTLEY, N. & REID, A. 1992. Urine enzyme analysis: analytical considerations. *Animal clinical chemistry association*, March.
- AULESA, C.; SEGURA, R. M.; PASCUAL, C. y SCHWARTZ, S. 1981. Determinación de N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminidasa en orina. *Rev. Diag. Biol.*, 30: 249-254.
- BRADFORD, M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72: 248-254.
- BROBST, D. F.; CARROLL, R. J. & BAYLY, W. M. 1986. Urinary enzyme concentrations in healthy horses. *Cornell Vet.*, 76: 299-305.
- CROWELL, W. A.; DIVERS, T.J.; BYARS, T. D.; MARSHALL, A. E.; NUSBANM, K. E.; LARSEN, L. 1981. Neomycin toxicosis in calves. *Am. J. Vet. Res.*, 42, 1: 29-34.
- CUXART, A. 1981. Utilidad diagnóstica de las enzimas urinarias. *Med. Clin.*, 77:175-177.
- ELLIS, B. G.; PRICE, R. G. 1973. Urinary enzymes and the detection of kidney damage in the dog. *Biochem. Soc. Trans.*, 1: 995-997.
- ELLIS, B. G.; PRICE, R. G. & TOPHAM, J. C. 1973a. The effect of tubular damage by mercuric chloride on kidney function and some urinary enzymes in the dog. *Chem.-Biol. Interac.*, 7: 101-113.
- ELLIS, B. G.; PRICE, R. G. & TOPHAM, J. C. 1973b. The effect of papillary damage by ethyleneimine on kidney function and some urinary enzymes in the dog. *Chem.-Biol. Interac.*, 7:131-142.
- FLANDROIS, C.; GRAVAGNA, B.; MAIRE, I.; MATHIEU, M. 1986. Enzymurie. *Ann. Biol. clin.*, 44: 486-490.
- GARRY, F.; CHEW, D. J.; RINGS, D. M.; TARR, M. J.; HOFFSIS, G. F. 1990a. Renal excretion of creatinine, electrolytes, protein and enzymes in healthy sheep. *Am. J. Vet. Res.*, 51, 3: 414-419.
- GARRY, F.; CHEW, D. J.; HOFFSIS, G. F. 1990b. Enzymuria as an index of renal damage in sheep with induced aminoglycoside nephrotoxicosis. *Am. J. Vet. Res.*, 51, 3: 428-432.
- GASCON, F. M.; PALACIO, J.; LISTE, F. & ACEÑA, M. C. 1995. Los enzimas urinarios: origen, significado y utilidad diagnóstica en medicina veterinaria. *Friskies Internacional*, 7 (1): 3-8.
- GOLDBARG, J. A.; PINEDA, P. E., BANKS, B. M.; RUTENBURG, A. M. 1959. A method for the colorimetric determination of  $\beta$ -glucuronidase in urine, serum and tissue; assay of enzymatic activity in health and disease. Vol. 36, 2: 193-201.
- GONICK, H. C.; KRAMER, H. J.; SHAPIRO, A. E. 1973. Urinary  $\beta$ -glucuronidase activity in renal disease. *Arch. Intern. Med.*, 132: 63-69.
- GRECO, D. S.; TURNWALD, G. H.; ADAMS, R.; GOSSET, K. A.; KEARNEY, M.; CASEY, H. 1985. Urinary GGT activity in dogs with gentamicin-induced nephrotoxicity. *Am. J. Vet. Res.*, 46, 11: 2332-2335.
- GRÖTSCH, H. & MATTENHEIMER, H. 1983. Urine: the origin of enzymes in urine. *Bergmeyer*, 3<sup>a</sup> Ed. Tomo III, 42-49.
- HARDY, M. L.; HSU, R-C & SHORT, C. R. 1985. The nephrotoxic potential of gentamicin in the cat: enzymuria and alterations in urine concentrating capability. *J. vet. Pharmacol. Therap.* 8: 382-392.
- HEIENE, R.; BIEWENGA, W. J. & KOEMAN, J. P. 1991. Urinary phosphatase alkaline and gamma-glutamyltransferase as indicators of acute renal

- damage in dogs. *J. Small Anim. Pract.*, 32: 521-524.
- HOFMANN, W. & GUDER, G. 1989. a diagnostic programme for quantitative analysis of proteinuria. *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 27: 589-600.
- JUNG, K.; SCHULZE, B. & SYDOW, K. 1987. Diagnostic significance of different urinary enzymes in patients suffering from chronic renal diseases. *Clin. Chim. Acta*, 168: 287-295.
- JUNG, K., HEMPEL, A., GRÜTZMANN, K., HEMPEL, R., SCHREIBER, G. 1990. Age dependent excretion of alanine aminopeptidase, alkaline phosphatase, g-glutamyltransferase and N-Acetyl- $\beta$ -D-glucosaminidase in human urine. *Enzyme*, 43: 10-16.
- JUNG, K. 1991. Enzyme activities in urine: How should we express their excretion? A critical literature review. *Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem.*, 29: 725-729.
- KUNIN, C. M.; CHESNEY, R. W.; CRAIG, W. A.; ENGLAND, A. C. & DEANGELIS, C. 1978. Enzymuria as a marker of renal injury and disease: studies of N-acetyl- $\beta$ -glucosaminidase in the general population and in patients with renal disease. *Pediatrics*, 62, 5: 751-760.
- MARUHN, D. 1976 Rapid colorimetric of  $\beta$ -Gal and NAG in human urine. *Clin. Chim. Acta.*, 73: 453-461.
- MARUHN, D.; STROZYK, K.; GIELOW, L. & BOCK, K.D. 1977. Diurnal variations of urinary enzyme excretion. *Clin. Chim. Acta*, 75: 427-433.
- MATTENHEIMER, H.; 1977. Enzymes in renal diseases. *Ann. Clin. Lab. Sci.*, 7; 5: 422-432.
- MATTENHEIMER, H.; GRÖTSCH, H.; MARUHN, D.; FRÖLKE, W. & SIMANE, Z. 1988. Recommendation for the measurement of AAP in urine. *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.*, 26, 10: 635-644.
- RAAB, W.P. 1972. Diagnostic value of urinary enzyme determinations. *Clin. Chem.*, 18; 1: 5-25.
- REUSCH, C.; VACHEZER, R. & WESCHTA, E. 1991. Enzyme activities of urinary alanine-aminopeptidase and N-acetyl- $\beta$ -D-glucosaminidase in healthy dogs. *J. Vet. Med.*, 38: 90-98.
- ROSALKI, S. B. & WILKINSON, J. H. 1959. Urinary lactic dehydrogenase in renal disease. *Lancet*, 2: 327.
- STAHL, P. D. & FISHMAN, W. H. 1983.  $\beta$ -D-Glucuronidase. *Bergmeyer*, 3<sup>a</sup> Ed.: 246-256.
- WERNER, M.; MARUHN, D. & ATOBA, M. 1969. Use of gel filtration in the assay of urinary enzymes. *J. Chromatog.*, 40: 254-263.
- WERNER, M.; HEILBRON, D. C.; MARUHN, D. & MUDASIRU, A. 1970. Patterns of urinary enzyme excretion in healthy subjects. *Clin. Chim. Acta*, 29: 437-449.