

LESION HEPATICA EXPERIMENTAL

METABOLISMO DEL ESCAPE ENZIMATICO DE ARGINASA, CATALASA Y
ESTERASAS EN LA INTOXICACION POR TETRACLORURO DE CARBONO
Y RADIACIONES IONIZANTES EN DISTINTOS ANIMALES

DR. JESÚS KUMATE

DESDE hace 5 años los estudios de lesión hepática han recibido un nuevo impulso con la orientación dada por el descubrimiento de que en los casos de lesión necrótica hay salida de compuestos intracelulares a la circulación sistémica, de efímera duración pero que aportan un elemento menos inespecífico de diagnóstico en comparación con los medios diagnósticos tradicionales.

Hasta ahora se han explorado muchas posibilidades siguiendo esa orientación aunque la mayoría se han referido a sistemas enzimáticos en donde se tiene la ventaja de poder efectuar determinaciones muy precisas y de una gran sensibilidad. Después de los primeros estudios de Bruns^{1, 2} en relación a sistemas glicolíticos (aldolasa y oxoisomerasa), se han sucedido un gran número de investigaciones que han reportado resultados similares para: transaminasas³; deshidrodeshidrogenasa láctica;⁴ desoxiribonucleasa;⁵ catalasa;⁶ arginasa,^{7, 8} deshidrogenasas del ácido isocítrico,⁹ del ácido málico,¹⁰ y del sorbitol¹¹; leucínaminopeptidasa¹² y ornitiltranscarbamilasa,^{13, 14} entre otras.

El gran número de sistemas estudiados nos indica que los resultados obtenidos no han dado respuesta categórica a las preguntas planteadas; en efecto, la distribución imbricada de muchos de los sistemas mencionados hace que la indicación de origen de la enzima elevada en suero no sea todo lo precisa que se esperaba lo cual ha planteado la necesidad de estudiar actividades múltiples (con distribución distinta) para discriminar la aportación múltiple —si existe— o para eliminar fuentes espurias que desorientaran el diagnóstico en el caso de lesión orgánica única. Son muy prometedoras en este renglón, las elevaciones de ornitiltranscarbamilasa en hígado; de leucínaminopeptidasa para páncreas y de la desoxiribonucleasa en bazo.

* Leído en la sesión ordinaria del 24 de junio de 1959.

La valoración crítica de los niveles séricos de esas enzimas en prácticamente todos los casos de patología humana, ha asentado un número de ellas como armas útiles, no elementos específicos que orientan en forma categórica el diagnóstico de lesión orgánica, sino como un medio adicional (más específico que los antiguos) que ha venido a enriquecer el arsenal diagnóstico médico-quirúrgico. El criterio utilitario con que se han manejado todos esos conocimientos ha hecho que muchos aspectos del metabolismo de esos escapes enzimáticos hayan sido descuidados y que desconozcamos gran parte de su determinismo al nivel celular e interrelaciones orgánicas mediatas.

Nuestro interés personal en estos problemas ha sido orientado en la búsqueda de enzimas más específicas; hacia el conocimiento de la historia natural de la fuga enzimática; al efecto de diferentes agentes hepatotóxicos; a la posible acción de esteroides anti-inflamatorios cuya utilidad clínica es discutida y hacia las variaciones animales que se presentan en estos cuadros de intoxicación experimental del hígado. Escogimos arginasa por su distribución preferentemente hepática y su íntima relación con el metabolismo de las proteínas; a la catalasa por la riqueza del hepatocito y su aparente falta de relación con ciclos metabólicos conocidos de manera que actuase a guisa de indicador inespecífico y a las estererasas para contar con un representante del metabolismo de los lípidos que no habían sido explorados hasta la fecha .

MATERIAL Y METODOS

Se utilizaron muchos de: ratas albinas de cepa uniforme, conejos y perros mestizos, en condiciones de normalidad, alimentados ad libitum y que antes de su estudio final fueron sometidos a un ayuno total de 24 horas.

El material mediato de estudio fue: *a*) suero obtenido de sangre extraída por punción venosa con jeringa simple, retracción del coágulo a temperatura ambiente por 15-30 minutos, centrifugación a 2,000 g y congelación inmediata de la muestra cuando no se practicó la determinación en ese mismo momento, *b*) plasma recogido después de centrifugar a 2,000 g una muestra de sangre citratada, *c*) hígado que fue obtenido por hepatectomía parcial (150 a 250 mg en ratas) o de la viscera total en los casos que fueron sacrificados; homogenización en cloruro de potasio isotónico frío en un aparato del modelo Potter-Elvehjem y congelación inmediata, *d*) orina recogida por cateterismo vesical o por punción de vejiga en los animales sacrificados.

Los agentes hepatotóxicos manejados fueron: 1. Tetracloruro de carbono a dosis de 1.0 c.c./kg de peso en ratas y perros y 0.75 c.c./kg. de peso en conejos. La vía de administración fue intraperitoneal para rata y conejo y mediante sonda duodenal en el perro. En los casos de administración parenteral se diluyó el tóxico con aceite de parafina 1:3 v/v. 2. Radiaciones ionizantes: rayos X de

un aparato Westinghouse, a 160 kv, 15 ma, filtros de Cu 0.5 mm y Al 1 mm, exposición total y única a 25 cm de distancia durante 7 minutos.

La arginasa fue determinada en suero según las indicaciones de Van Slyke y Archibald;¹⁵ para hígado se empleó la técnica de Liener y Schultze¹⁶; catalasa plasmática según una modificación a la original de Yamagata;¹⁷ esterases (acetil y butiril-esterasa) según Noda y Johnson;¹⁸ bilirrubinas por el método de Ducci y Watson;¹⁹ transaminasa glutámico-pirúvica (GP) según Wróblewski y Cabaud²⁰ y las proteínas en hígado según la modificación al biuret de Weichselbaum²¹ con calibración de seroalbúmina humana.

La unidad de actividad arginásica se definió como aquella que produce 1 mg de urea después de 15 minutos de incubación a 37 C de un sustrato 0.377 M de arginina a pH 9.5; en hígado representó la misma capacidad (expresada como actividad específica) previa activación con $MnCl_2$ 0.1 M.

Una unidad de catalasa equivale a la actividad que destruye 1 mg de agua oxigenada en 5 minutos de incubación a 23 C, pH 7.0 y molaridad aniónica de 0.05.

Una unidad de esterasa se define como la actividad necesaria para producir 1×10^{-4} Eq. de ácido por alícuota de ml. después de 1 hora de incubación a 37 C de sustrato 0.1 M de acetato de etilo o 0.05 M de butirato de etilo a pH 7.4 y usando como indicador fenoltaleína, verde de malaquita y rojo de metilo.

La cortisona se utilizó en forma de acetato suspendida en suero fisiológico o en Tris trihidroximetilaminometano a la dosis de 10 mg. intraperitoneales 3 días antes de la intoxicación y durante el tiempo posterior a la misma (máximo: 4 días).

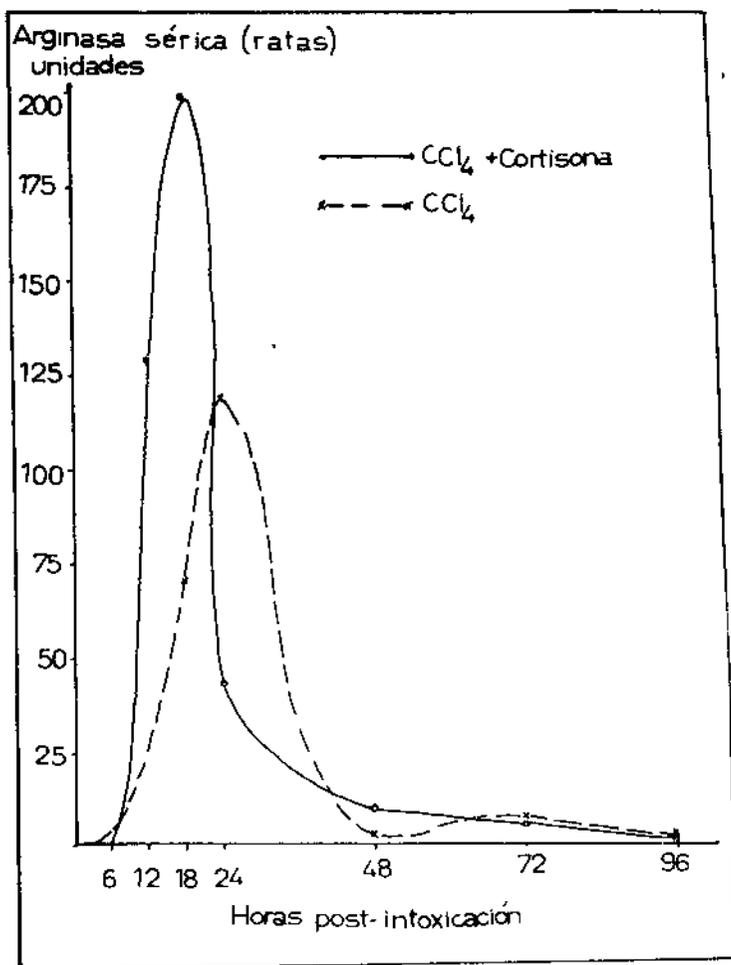
El tratamiento estadístico de los datos fue indicado por Croxton²² y Daniels.²³

RESULTADOS

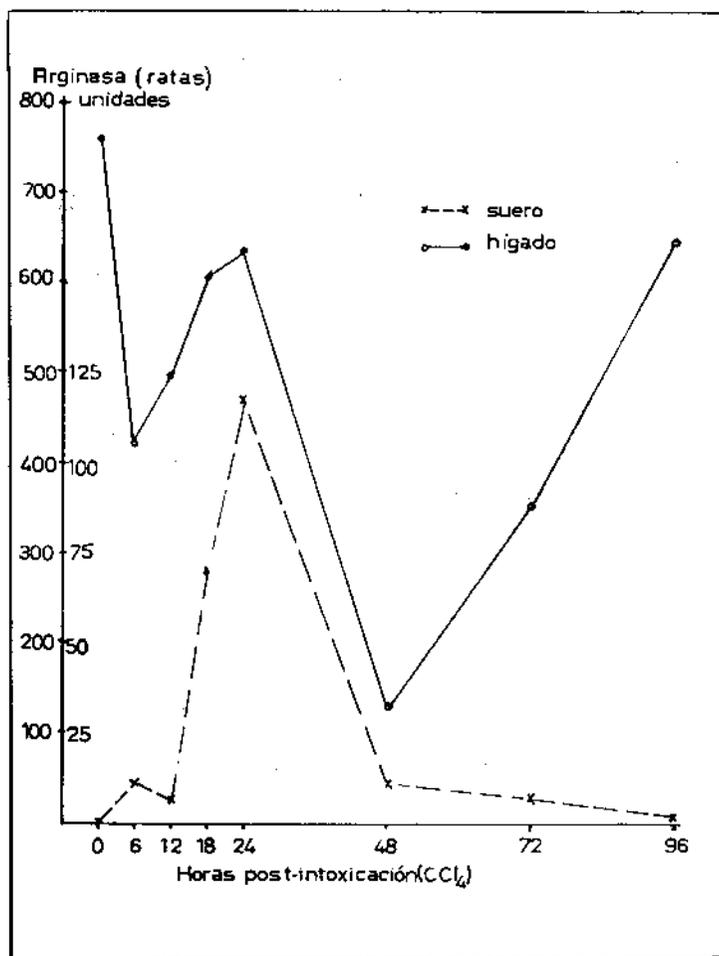
Los resultados obtenidos en suero e hígado de ratas intoxicadas con CCl_4 y su comparación con las tratadas previamente con acetato de cortisona intraperitoneal se presentan en la Tabla I y en las gráficas I y II.

TABLA I

Horas post-intoxicación	CCl_4 solo:	Actividad arginásica:	
		Suero (unidades/100 ml): CCl_4 + cortisona:	Hígado (unidades/g. de tejido seco)
Normales	0.31		762
6	11.10	0.98	421
12	7.00	129.03	496
18	70.11	198.97	611
24	118.73	42.76	638
48	11.00	9.25	127
72	7.24	5.30	353
96	1.73	1.24	648



GRÁFICA I. Evolución comparativa de la actividad arginásica sérica en ratas intoxicadas con CCl₄ (x—-x) y tratadas previamente con acetato de cortisona intraperitoneal (0—-0). CCl₄ intraperitoneal 0.1 cc./100 g. de peso.



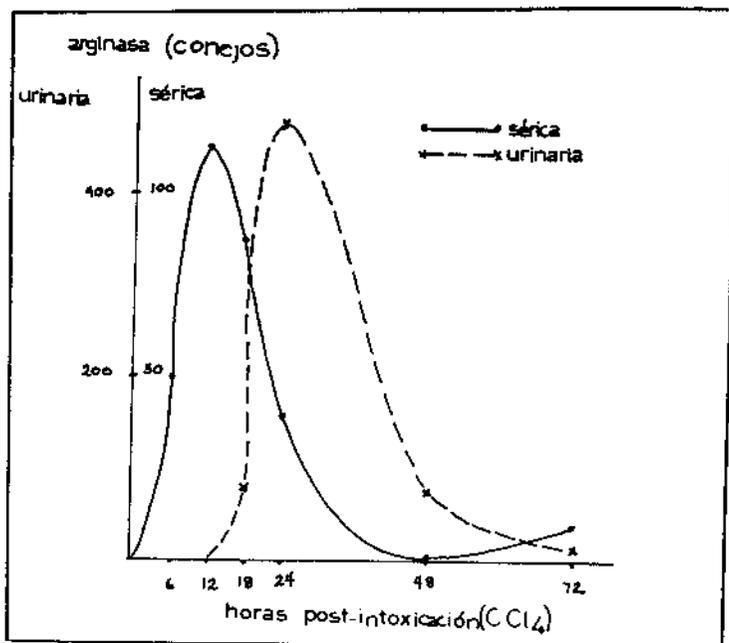
GRÁFICA II. Niveles de arginasa sérica y hepática en ratas intoxicadas con CCl₄ intraperitoneal (0.1 c.c./100 g. de peso).

El estudio simultáneo de orina y suero en conejos intoxicados con CCl_4 , se presenta en la Tabla 2 y en la gráfica III.

TABLA 2

Horas post-intoxicación:	Actividad arginásica:	
	Suero (unidades/100 ml):	Orina (unidades/100 ml):
Normales	0.42	0.0
6	49.10	0.0
12	111.30	0.0
18	87.00	77.0
24	38.49	475.0
48	0.83	75.0
72	6.67	14.0

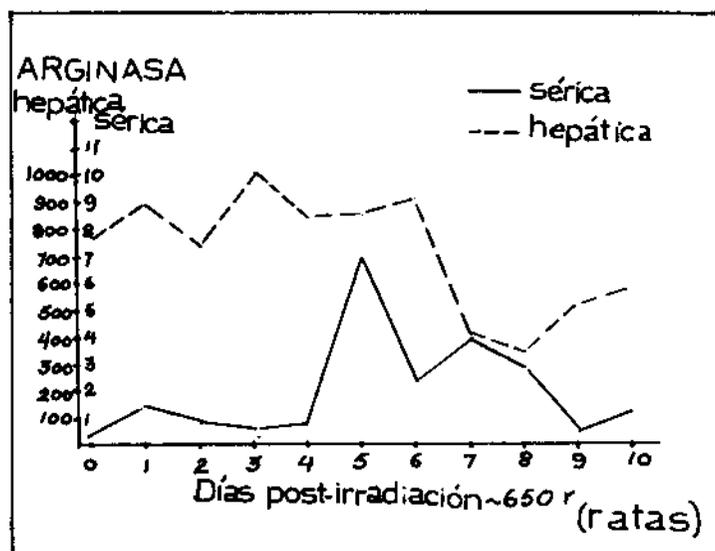
Los resultados obtenidos en la actividad de arginasa sérica y hepática y las variaciones del peso total del hígado se presentan en la Tabla 3 y en las gráficas IV y V. (Ratas que recibieron 650 r).



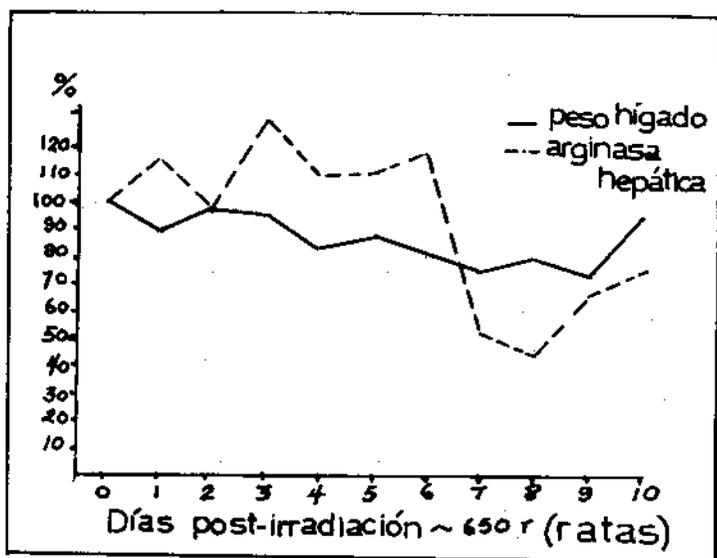
GRÁFICA III. Excreción urinaria de arginasa y niveles séricos en conejos intoxicados con CCl_4 (0.075/100 g. de peso intraperitoneal).

TABLA 3

Días post-irradiación:	Suero: (u/100 ml):	Actividad arginásica:			Peso del hígado:	
		%:	Hígado: (u/g seco):	%:	g:	%:
Normales	0.31	100	762	100	4.81	100
1	1.44	467	881	116	4.25	88
2	0.97	313	736	96	4.65	97
3	0.59	191	1002	132	4.63	96
4	0.78	252	843	111	4.02	84
5	6.91	2244	851	112	4.22	88
6	2.04	661	914	120	—	—
7	3.86	1252	405	53	3.62	75
8	2.90	943	345	45	3.87	80
9	0.35	113	508	67	3.58	74
10	1.27	411	579	76	4.61	96



GRÁFICA IV. Efectos de las radiaciones ionizantes (rayos X) sobre la actividad arginásica en suero e hígado de ratas.

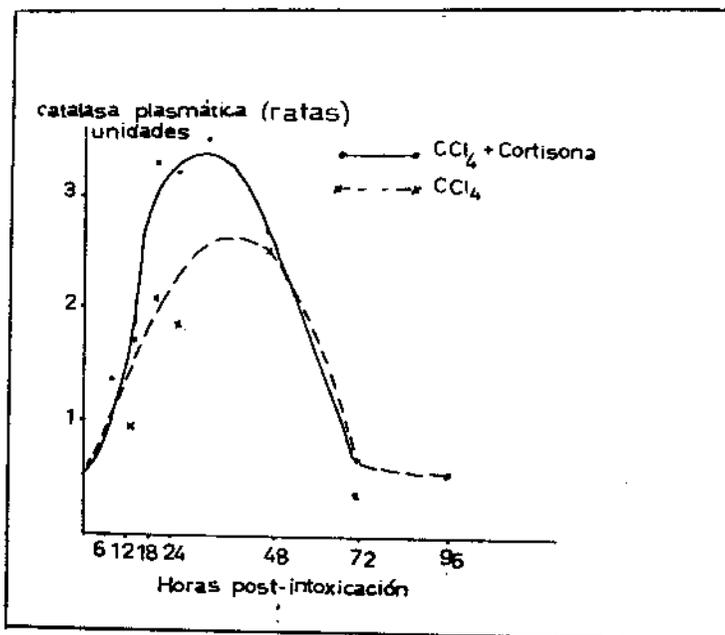


GRÁFICA V. Evolución comparada de la actividad arginásica de hígado y el peso hepático en ratas sometidas a 650 r de rayos X.

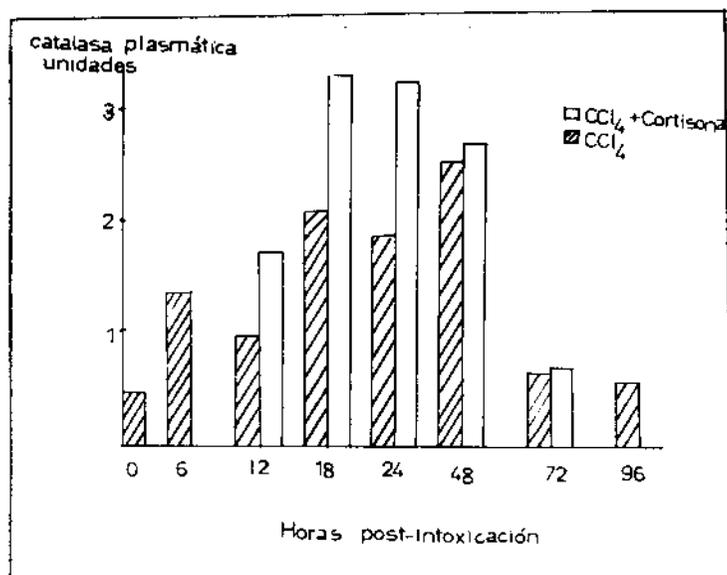
El efecto de la cortisona sobre la actividad catalásica de ratas intoxicadas con CCl_4 puede verse en la Tabla 4 y en las gráficas VI y VII.

TABLA 4

Horas post-intoxicación	Actividad CCl_4 solo:	Catalásica: (unidades) CCl_4 + cortisona:
Normales	0.467 \pm 0.155	—
6	1.367 \pm 0.697	—
12	0.952 \pm 0.142	1.711 \pm 0.032
18	2.096 \pm 0.973	3.284 \pm 0.074
24	1.862 \pm 0.718	3.224 \pm 0.036
48	2.536 \pm 0.919	2.696 \pm 0.613
72	0.641 \pm 0.328	0.668 \pm 0.588
96	0.573 \pm 0.310	—



GRÁFICA VI. Niveles plasmáticos de catalasa en ratas intoxicadas con CCl₄ (0.1 c.c./100 g. de peso) intraperitoneal (x—x) y tratadas previamente con acetato de cortisona (0—0).



GRÁFICA VII. Evolución comparativa de los niveles plasmáticos de catalasa en ratas intoxicadas con CCl₄ con y sin cortisona.

Los resultados en el grupo de ratas intoxicadas y sus controles previos respecto a la actividad esterásica hacia el acetato de etilo se muestran en las gráficas VIII y IX así como en la Tabla 5 que incluye la actividad sérica y hepática; los correspondientes a conejos que se sometieron al mismo procedimiento y en los que se realizó la esterasa hacia el butirato de etilo amén de la acetilesterasa, transaminasa glutámico-pirúvica y bilirrubinas, se encuentran en las gráficas X y XI y en la Tabla 6.

TABLA 5

Tiempo post-intoxicación: horas:	No. casos:	Actividad esterásica (acetato de etilo):			
		Suero (unidades):		Higado: (actividad específica)	
Normales	61	1.46 ± 0.48	38	0.386 ± 0.154	
6	10	1.88 ± 0.51	10	0.214 ± 0.081	
13	5	1.43 ± 0.24	5	0.228 ± 0.034	
18	11	1.91 ± 1.82	11	0.145 ± 0.077	
24	20	2.22 ± 1.22	22	0.180 ± 0.121	
48	9	1.08 ± 0.22	7	0.155 ± 0.026	
72	5	1.68 ± 0.98	5	0.133 ± 0.050	
96	5	1.45 ± 0.58	5	0.166 ± 0.037	

TABLA 6

Horas post-intoxicación:	Esterasa sérica:		Transaminasa GP (u/ml):	Bilirrubina directa (mg/100 ml):
	AE (unidades):	BE (unidades):		
Normales	1.05	1.17	124	0.09
6	2.36			
24	4.19	15.78	522	0.16
48	2.69	11.28	322	0.30
72	0.76	1.37	422	0.17
120	0.76	1.09	308	0.04

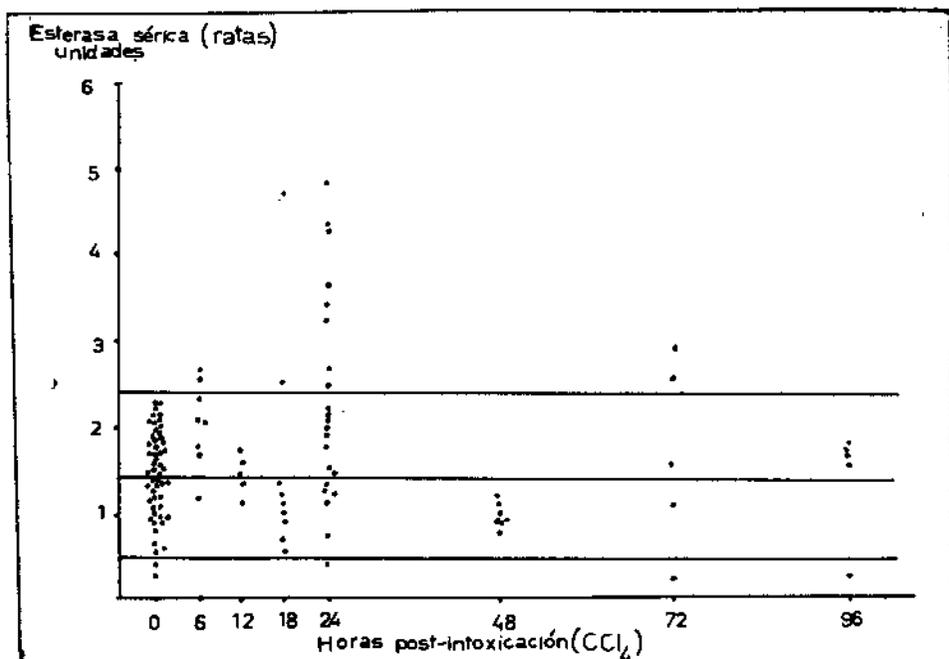
AE: Actividad esterásica hacia acetato de etilo.

BE: Actividad esterásica hacia butirato de etilo.

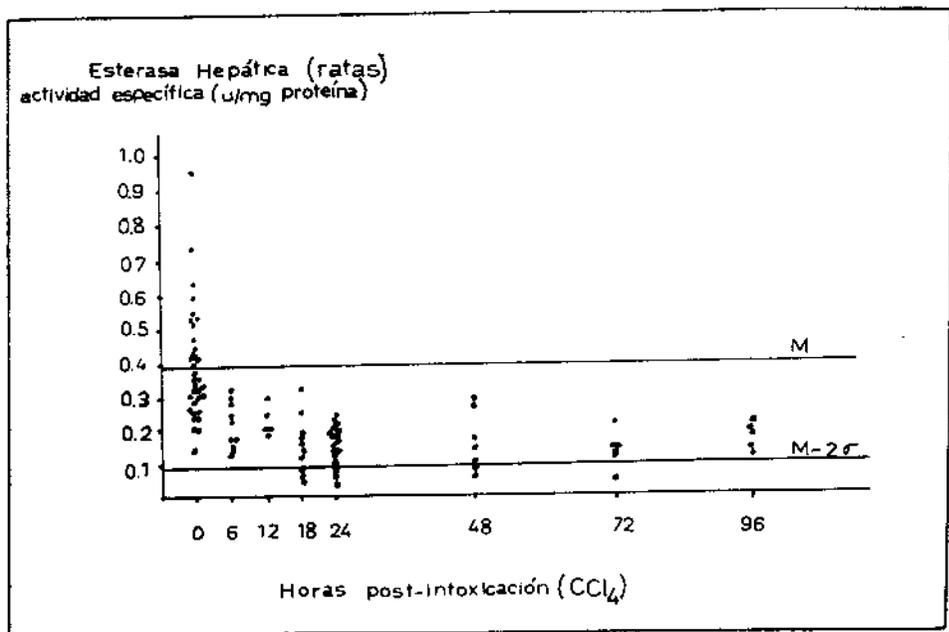
Transaminasa GP: actividad de transaminasa glutámico-pirúvica.

DISCUSIÓN

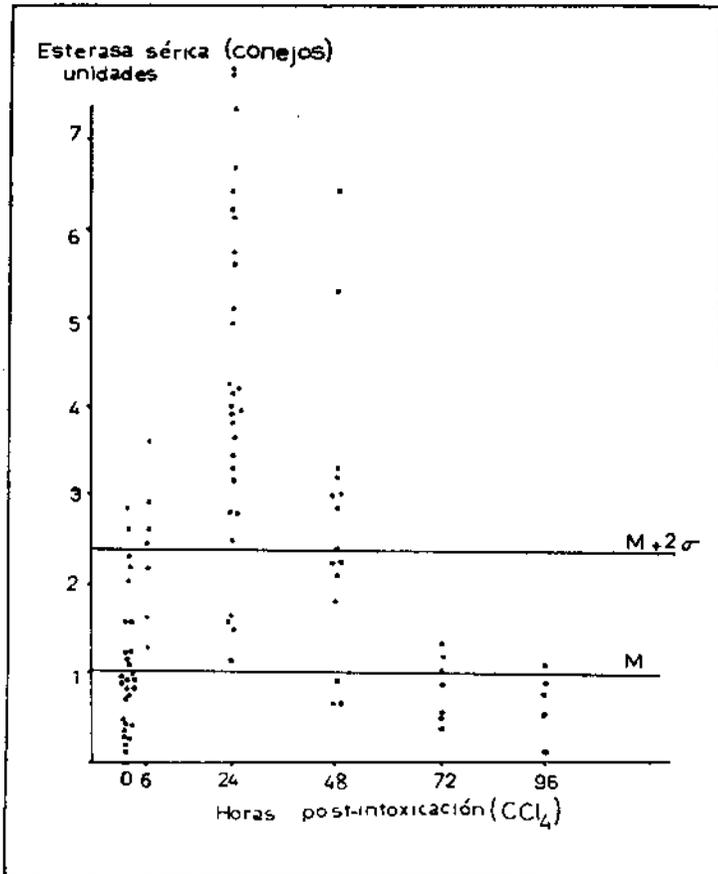
Los resultados reportados para los 3 sistemas enzimáticos estudiados muestran un patrón uniforme de variación cuando se emplea el tetracloruro de carbono, i.e., un aumento muy rápido —desde las primeras 6 horas— para alcanzar el máximo a las 18-24 horas y a partir de ese momento un descenso menos pronunciado que el ascenso hasta llegar a niveles normales alrededor de las 96-120 horas post-intoxicación. La variación dentro de la misma especie fue muy grande, tal como ha sido reportada por otros investigadores²⁴ y la tendencia general fue la observada para otras enzimas en los mismos animales. Su inter-



GRÁFICA VIII. Actividad acetilesterásica en suero de ratas intoxicadas con CCl_4 (0.1 cc./100 g. de peso).



GRÁFICA IX. Actividad acetilesterásica en hígado de ratas intoxicadas con CCl_4 (0.1 cc./100 g. de peso).

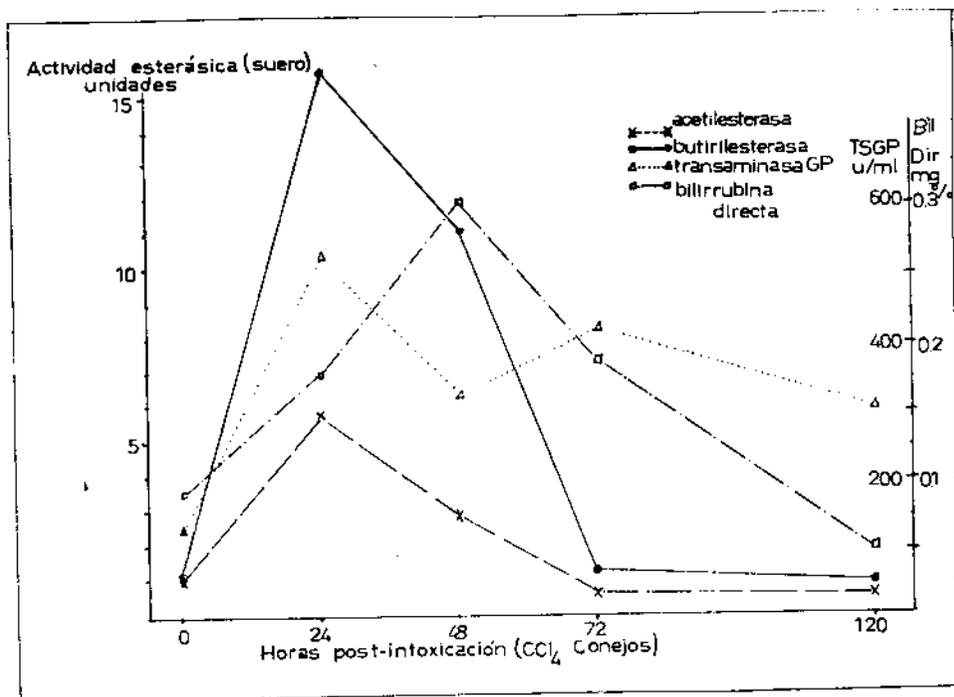


GRÁFICA X. Actividad acetilcolinesterásica en conejos intoxicados con CCl_4 (0.075 c.c./100 g. peso) intraperitoneal.

pretación, en unión de los hallazgos histológicos reportados en condiciones similares²⁵ es la siguiente: la acción de CCl_4 se traduce, entre otras lesiones, por necrosis del parénquima hepático, sin distribución especial, que alcanza su máximo a las 24 horas con regeneración ad integrum al cabo de 4-5 días; por tanto, es fácil correlacionar la existencia de lesiones necróticas con fugas del contenido celular hacia la circulación, cuyos componentes persistirían en la circulación el tiempo suficiente para su excreción o reaprovechamiento con lo que terminaría el episodio patológico. Las 3 enzimas mostraron un patrón muy similar y las diferencias cuantitativas observadas: aumentos mucho mayores de arginasa en relación a catalasa y esterasas, son explicables en base a la mayor riqueza en arginasa, a su distribución intracelular (preferentemente mitocondrial) así como

al reaprovechamiento de parte de la molécula de la catalasa (hierro) lo que plantea condiciones favorables para una rápida eliminación.

En el caso de la irradiación, el patrón sérico fue muy diferente, en la enzima estudiada; arginasa, se obtuvieron elevaciones muy discretas (comparadas con las registradas después del CCl_4 y el tiempo de máximo aumento fue tardío (5º día); lo reportado está de acuerdo con el mecanismo de acción de las radiaciones ionizantes y de su rapidez de acción a la dosis empleada (~ 650 r) y



GRÁFICA XI. Evoluciones en suero comparadas de: acetilesterasa (x—x); butirilesterasa (0—0); transaminasa glutámico-pirúvica (Δ...Δ) y bilirrubina "directa" (—).

aunque se obtienen aumentos desde el 1er. día después de la exposición, el máximo coincide con el tiempo en que se registran muertes de animales sometidos a esa dosis de radiación.

Los resultados de las determinaciones hepáticas fueron muy ilustrativos: se encontró una relación inversa que afirma el origen hepático de las enzimas circulantes en el plasma; así, el máximo de actividad enzimática en suero y plasma coincide con disminución en el homogenado hepático ya se trate de una intoxicación por CCl_4 o de una radiación y es independiente de la clase de enzima. El grado de disminución en parénquima hepático es muy similar (pueden bajar hasta a un 20%) aunque las elevaciones en suero difieran bastante; mayores en

el caso de arginasa, lo que informa de un metabolismo diferente después de su escape, fenómeno independiente de la lesión hepática en sí y que plantea la posibilidad de un criterio adicional en la elección de los sistemas indicadores para juzgar de lesión orgánica; i.e., anormalidad mayor a igualdad de agresión o de lesión histológica.

Una de las vías lógicas de eliminación de esas enzimas - en situación anormal es la renal; Kowlessar²⁶ la ha descrito para DNAsas esplénicas y en nuestro estudio la hemos confirmado en el caso de arginasa pero no para esterases, es muy probable que amén de las vías metabólicas de aprovechamiento, intervengan factores tales como magnitud molecular e interrelaciones hormonales que gobiernan su catabolismo (por lo menos en el caso de la arginasa) o bien umbrales renales como parece suceder en el caso de arginasa ya que hay una secuencia similar en la excreción de orina con los niveles séricos en donde la diferencia estriba en la secuencia cronológica (12 horas de retraso en el caso de la actividad urinaria).

En el caso de la cortisona, su efecto sobre los índices de magnitud necrótica fueron claramente en el sentido de un aumento; los niveles alcanzados tanto por arginasa como por catalasa fueron definitivamente más elevados que en el caso de una simple intoxicación por CCl₄. Los reportes histológicos acerca de un retardo en la reacción infiltrativa que se supone va a ser la responsable de la reabsorción del parénquima necrosado²⁷ pueden explicar los niveles más elevados de ambas enzimas sin necesidad de recurrir a la explicación de una reacción necrótica más extensa. No podemos hacer ninguna inferencia con los datos obtenidos en relación a la justificación clínica para su empleo en episodios graves de lesión hepática²⁸⁻²⁹; resultados similares se han reportado muy recientemente por Manso y Wróblewski³⁰ en la hepatitis de ratones tratados con 17-hidroxicorticosterona. Llama la atención la disminución en la dispersión de los valores encontrados en el caso de la catalasa ya que en todos los casos tratados con ese esteroide, la variación se redujo extraordinariamente como si hubiera habido un efecto que se tradujera por una mayor uniformidad metabólica. Cuando se analizó la normalización de los niveles de arginasa en los 2 grupos, se pudo observar que, a pesar de que los niveles máximos fueron diferentes, las líneas de ajuste para señalar la disminución de la actividad arginásica fueron paralelas lo que indica similitud en su desaparición del plasma, es decir, mecanismos de catabolismo independientes de la lesión hepática, y que, si hay retardo en la reacción infiltrativa del parénquima hepático, ésta no debe ser muy tardía ya que la normalización se efectúa en el mismo tiempo en ambos grupos.

Los resultados en el capítulo de esterases son similares del todo a los discutidos en arginasa y catalasa; llama la atención la variación entre las especies animales empleadas: niveles muy elevados en conejos, moderados en ratas y nulos en perros, a pesar de que en las 3 especies mencionadas se acepta una sensibilidad parecida para el hepatotóxico empleado. En esta serie se hizo un estudio simultáneo de transaminasa glutámico-pirúvica y bilirrubinas, encontrán-

dose que las alteraciones son paralelas y que se tienen solamente indicaciones en otro departamento metabólico del mismo fenómeno: necrosis celular hepática. Las diferencias encontradas según las especies animales utilizadas no pueden explicarse en función de las enzimas de tipo esterásico que existen normalmente en hígado³¹ ya que en tanto que las ratas tienen los 3 tipos de esterazas, en el conejo la esteraza tipo B es una propionilesterasa y en el perro no se encuentra la tipo B.

Parece que se ha llegado al límite de utilización de sistemas enzimáticos como arma diagnóstica para discriminar lesión orgánica ya que los estudios de distribución enzimática han sido prácticamente agotados y no parece que exista algún otro sistema (como no sea adaptativo) que haya escapado a la acuciosa investigación realizada en los últimos años. Las diferencias que indudablemente debe haber entre sistemas enzimáticos que derivan de diferentes órganos del mismo individuo deben ser estudiados desde el punto de vista inmunológico y ya se han hecho reportes³² siguiendo esa orientación en la que descansan las esperanzas actuales para disponer de un medio que permita un diagnóstico específico de lesión orgánica en base a exploraciones de gabinete.

RESUMEN Y CONCLUSIONES

Se estudiaron las variaciones de 3 enzimas hepáticas: arginasa, catalasa y esterazas cuando animales diferentes (ratas, conejos y perros) fueron sometidos a intoxicaciones con CCl_4 a dosis hepatotóxica. Se analizaron los niveles de suero, hígado y en algunos casos orina. Los resultados fueron muy uniformes, en las 3 especies animales y con las 3 enzimas estudiadas, habiéndose encontrado aumentos progresivos en suero desde las 6 horas post-intoxicación que alcanzaron un máximo alrededor de las 20 horas para descender posteriormente y normalizarse al cabo de 96 - 120 horas. La magnitud de esas elevaciones fue muy variable, en el caso de la arginasa más de 100 veces los valores normales; 15 veces en el caso de esterazas y menos de 8 con la catalasa plasmática. Cuando se emplearon rayos X como agente agresor, las elevaciones fueron menos marcadas encontrándose que, arginasa (la enzima estudiada) aumentó hasta 22 veces su valor original y que dicha elevación se presentó hasta el 5º día post-irradiación.

Los niveles enzimáticos de hígado disminuyeron en el curso de la 1ª fase de intoxicación y mostraron una relación inversa con los valores en suero; en la fase de recuperación histológica (después del 2º día) las enzimas hepáticas mostraron tendencia a la recuperación en el caso de arginasa y permanecieron deprimidas en el caso de acetilesterasa.

La cortisona administrada en ratas a la dosis de 10 mg/100 g de peso, 3 días antes de la intoxicación y durante el período de estudio, se reflejó en valores séricos o plasmáticos más elevados de la enzima con disminución y normalización

de los mismos en tiempo similar al requerido por el control (intoxicación simple de CCl_4).

El estudio de las vías de excreción señala que algunas enzimas vgr. arginasa, pueden eliminarse por orina y explicar así su desaparición del torrento sanguíneo; los datos obtenidos sugieren cierto mecanismo de umbral para la eliminación. En el caso de acetilesterasa no hay excreción urinaria.

Las esterases estudiadas (acetil- y butilesterasas) mostraron cualitativamente el mismo patrón pero grandes diferencias según las especies utilizadas, hecho que no puede explicarse satisfactoriamente atendiendo sólo a la distribución especial de los animales empleados. La actividad hacia butirato de etilo fue siempre más marcada que la correspondiente para acetato de etilo a pesar de las limitaciones que impuso en la concentración del sustrato la solubilidad del 1er. éster.

REFERENCIAS

1. Bruns, F., y Puls, W. *Die Aktivität der Serumaldolase bei Erkrankungen der Leber: ein neuer enzymatischer Test.* Klin. Wschr. 32:656-660, 1954.
2. Bruns, F., y Jacob, W. *Studien über Serumenzyme bei Erkrankungen der Leber. Die Aktivität der Phosphohexoseisomerase, Aldolase und alkalischen Phosphatase.* Klin. Wschr. 32:1041-1044, 1954.
3. La Due, J. S., Wróblewski, F., y Karmen, A. *Serum glutamic oxaloacetic transaminase activity in human acute transmural myocardial infarction.* Science. 120:497-499, 1954.
4. Wróblewski, F., Rueggsegger, P., y La Due, J. S. *Serum lactic dehydrogenase activity in acute transmural myocardial infarction.* Science. 123:1122-1123, 1956.
5. Kowlessar, O. D., Altman, K. I., y Hempelmann, L. H. *The effect of ionizing radiation on deoxyribonuclease activities of body fluids. II. The plasma DNases after total body irradiation.* Arch. Biochem. & Biophys. 54:355-358, 1955.
6. Yamagata, S., y Scino, S. *Studies on blood and plasma catalase. 6th. Report. Influence of the liver upon the blood and plasma catalase content.* Tohoku J. Exp. Med. 57:249-257, 1953.
7. Manning, R. T., y Grisolia, S. *Serum arginase activity.* Proc. Soc. Exp. Biol. & Med. 95:225-226, 1957.
8. Kumate, J., Benavides, L., Carrillo, J., Santos, M., y Rangel, L. *Pathological physiology of salmonellosis. V. Serum arginase and glutamic-oxaloacetic transaminase in children with typhoid fever.* J. Infect. Dis. 103:25-32, 1958.
9. Wolfson, S. K., Spencer, J. A., Sterkel, R. L., y Williams-Ashman, H. G. *Clinical and experimental studies on serum pyridine nucleotide-linked dehydrogenases in liver damage.* Ann. New York Acad. Sc. 75:260-269, 1958.
10. Hess, B. *DPN-dependent enzymes in serum.* Ann. New York Acad. Sc. 75:292-303, 1958.
11. Gerlach, U. *Pathologischer Uebertritt von Sorbitoldehydrogenase ins Blut bei Lebererkrankungen.* Klin. Wschr. 35:1144-1145, 1957.
12. Fleisher, G. A., Butt, H. R., y Huizenga, K. A. *Enzymatic hydrolysis of L-leucylglycine in serum in hepatic disease.* Proc. Staff Meet. Mayo Clin. 32:410-424, 1957.
13. Reichard, H., y Reichard, P. *Determination of ornithine carbamyl transferase in serum.* J. Lab. & Clin. Med. 52:709-717, 1958.
14. Brown, R. W., y Grisolia, S. *Estimation of ornithine transcarbamylase activity in serum.* J. Lab. & Clin. Med. 52:799-800, 1958.
15. Van Slyke, D. D., y Archibald, R. M. *Gasometric and photometric measurement of arginase activity.* J. Biol. Chem. 163:293-309, 1946.
16. Liener, I. E., y Schultze, M. O. *Liver arginase activity as related to blood urea in acute uraemia of new-born rats.* J. Biol. Chem. 187:743-750, 1950.
17. Yamagata, S., Seino, S., y Nakao, T. *Studies on blood and plasma catalase. 1st. Report. A new micromethod of estimation of blood and plasma catalase.* Tohoku J. Exp. Med. 57:85-89, 1952.

18. Noda, L. H., y Johnson, M. *Enzymes' course*. Madison, Wis., 1956.
19. Ducci, H., y Watson, C. J. *The quantitative determination of the serum bilirubin with special reference to the prompt reacting and the chloroform soluble types*. J. Lab. & Clin. Med. 30:293-300, 1945.
20. Wróblewski, F., y Cabaud, P. *Colorimetric measurement of serum glutamic pyruvic transaminase*. Am. J. Clin. Path. 27:235-239, 1957.
21. Weichselbaum, T. E. *An accurate and rapid method for the determination of proteins in small amounts of blood serum and plasma*. Am. J. Clin. Path. 16:40-46, 1946.
22. Croxton, F. E. *"Elementary statistics with applications in Medicine"*. Nueva York, Prentice-Hall Inc., 1953.
23. Daniels, F. *"Mathematical preparation for Physical Chemistry"* Nueva York, McGraw-Hill Book Co., Inc., 1928.
24. Bruns, F., y Neuhaus, J. *Glycolytic serum and liver enzyme activities in experimental liver damage*. Arch. Biochem. & Biophys. 55:588-591, 1955.
25. Hoffman, J., Heines, M. B., Lapan, S., Razki, R., y Post, J. *Effects of acute CCl₄ poisoning*. Arch. Path. 59:429-438, 1955.
26. Kowlessar, O. D., Altman, K. I., y Hempelmann, L. H. *The effects of ionizing radiation on desoxyribonuclease activities of body fluids. I. The effect of total body exposure on the urinary excretion of desoxyribonucleases*. Arch. Biochem. & Biophys. 52:362-372, 1954.
27. Hoffman, J., Heines, M. B., y Post, S. *Effects of cortisone upon acute CCl₄ poisoning*. Arch. Path. 60:10-18, 1955.
28. Ducci, H., y Katz, R. *Cortisone, ACTH and antibiotics in fulminant hepatitis*. Gastroenterology. 21:357-374, 1952.
29. Spellberg, M. A. *Observations on the treatment of hepatic coma: The favorable effect of corticotropin and corticoids and the responsiveness of adrenal cortex to corticotropin during hepatic coma*. Gastroenterology. 32:600-618, 1957.
30. Manso, C., Friend, C., y Wróblewski, F. *The influence of 17-hydroxycorticosterone on viral hepatitis in mice*. J. Lab. & Clin. Med. 53:729-736, 1959.
31. Augustinsson, K. B. *Electrophoretic separation and classification of blood plasma esterase*. Nature. 181:1786-1789, 1958.
32. Nisselbaum, J. S., y Bodansky, O. *Reactions of lactic dehydrogenase from various rabbit organs and serum with anti-rabbit muscle lactic dehydrogenase*. Fed. Proc. 18:294, 1959.

Aggradecimientos:

A las señoritas Q. F. B. Delfina Arrieta A., María Elena Viñals y María A. Flores Bustamante por la colaboración en el curso del trabajo. A la Casa Syntex, S. A. de México por su generoso donativo de acetato de cortisona.

LESION HEPATICA EXPERIMENTAL*

COMENTARIO AL TRABAJO DEL DR. KUMATE

DR. ROBERTO LLAMAS

EL TETRACLORURO de carbono es uno de los agentes hepatotóxicos mejor conocidos y más ampliamente utilizados en los trabajos experimentales. Las alteraciones histológicas del hígado, producidas por esta substancia, han sido frecuentemente señaladas. Myren, en 1956, hizo una minuciosa descripción de las mismas y afirma que lo dominante no son las lesiones centro-lobulillares como generalmente se acepta, sino las medio-lobulillares y es sobre todo importante el hecho de que tales lesiones hepáticas parecen debidas a factores vasculares; en efecto, inmediatamente después de la inyección intraesplénica del tóxico, aparecen en la superficie del hígado trastornos circulatorios focales fácilmente visibles, con producción de hemorragias algunas veces. En las regiones centro y medio-lobulillares se observa tumefacción celular, hipocolorabilidad citoplásmica, desintegración nuclear y los sinusoides se ven irregulares y parcialmente alterados. Posteriormente aparece una corona medio-lobulillar de grandes células tumefactas, muy claras, con núcleos atróficos, lo que se considera característico de esta intoxicación, pero la región centro-lobulillar permanece normal hasta 24 horas después de administrada la substancia. Desde el punto de vista histoquímico se ven lípidos sudanófilos en la región medio-lobulillar desde antes de las dos horas y la actividad de la deshidrogenasa succínica se reduce en las zonas afectadas.

El efecto del tetracloruro de carbono es constante en el hombre y en la mayor parte de las especies animales y había sido señalado, por Lake, que el mono es resistente a este tóxico; de los estudios de Aterman se deduce que el mono reacciona en forma igual y que se provocan las mismas modificaciones hepáticas, consistentes fundamentalmente en infiltración grasa y en alteraciones de las pruebas funcionales de esta glándula.

* Leído en la sesión ordinaria del 24 de junio de 1959.

Los procesos de desintegración celular en el hígado, provocados por el tetracloruro de carbono, son capaces de liberar enzimas que habrán de pasar a la circulación, como ha sido señalado en el trabajo del Dr. Kumate, cuyo comentario tengo el gusto de hacer en estos momentos, al mismo tiempo que la correspondiente actividad enzimática en este órgano no se deprime. Así por ejemplo, la deshidrogenasa succínica y la succino oxidasa se muestran menos activas en el tejido hepático de las ratas tratadas con tetracloruro de carbono inyectado por vía intraperitoneal, como ha sido demostrado por Zoelner y Raisich. Otro tanto acontece con las esterasas, cuya reacción prácticamente desaparece en el hígado de animales intoxicados con esta substancia, según señalan Verne y Col.

Si bien la salida de sistemas enzimáticos a la circulación aparece como un fenómeno casi constante, debe señalarse que los estudios de Brauer y de Root demuestran que la capacidad del suero de ratas intoxicadas con tetracloruro de carbono, para hidrolizar la acetil-colina, disminuye notablemente. Lamotta y Col., recuerdan que la colino esterasa, responsable de esta hidrólisis, es una alfa globulina sintetizada en el hígado y encuentran que la actividad enzimática en el suero se deprime en sujetos con lesión hepática extensa, lo que establece una interesante analogía entre la intoxicación por tetracloruro de carbono y las lesiones hepáticas producidas en el curso de la hepatitis. Por lo que se refiere al estudio comparativo entre el valor diagnóstico de las determinaciones de transaminasas y de aldolasa séricas, nos parece interesante el trabajo de Schwarzmann, en el que se asienta que la actividad transaminásica aumenta considerablemente en las hepatitis, pero que también aumenta, aunque en menor grado, en las ictericias mecánicas con daño hepatocelular, en la cirrosis con insuficiencia hepática y en algunos cánceres del hígado, lo que hace que su valor diagnóstico sea limitado; por lo contrario, la aldolasa aumenta solamente en la hepatitis, por lo cual su determinación parece más valiosa en lo que se refiere al diagnóstico.

En opinión de Molander y Col., las afecciones hepáticas, no importa cuál sea su naturaleza, pero siempre que se necrosen o ataquen zonas importantes, provocan elevación de las transaminasas séricas. Cuando las células se regeneran, los valores vuelven a la normalidad. Según estos autores, no existe correlación constante entre estos cambios en la actividad enzimática y las modificaciones de otras pruebas del funcionamiento hepático.

De acuerdo con lo encontrado por Sterkel y Col., por otra parte, parece llegarse a la conclusión de que la determinación en el suero de otra enzima hepática, o sea la deshidrogenasa isocítrica, es valiosa también para establecer el diagnóstico diferencial entre padecimientos hepáticos, ya que su aumento se produce sobre todo en la hepatitis aguda.

En el trabajo del Dr. Kumate se introduce una variante que consideramos de importancia: la cortisona; probablemente la razón que lo indujo a experimentar con esta hormona cortical es la afirmación de que el esteroide mejora los cuadros clínicos de hepatitis y de coma hepático, mediante mecanismos aún poco conoci-

dos y que también parece influir, en forma semejante, sobre el daño hepático producido por el tetracloruro de carbono.

Con respecto al valor terapéutico de la cortisona en los padecimientos hepáticos como la hepatitis, el coma hepático y la cirrosis, nuestra impresión personal es negativa; con su empleo se logra frecuentemente que la ictericia disminuya, aparece euforia, el apetito mejora y se llegan a elevar las cifras de proteínas plasmáticas; pero la influencia que tiene sobre las pruebas de funcionamiento hepático y sobre la marcha general del padecimiento, es prácticamente nula. En el trabajo de Zoekler se llega a conclusiones semejantes a las que hemos expresado; al ser tratado un grupo de cirróticos con cortisona, se encontró que esta substancia ejerce efecto benéfico sobre las proteínas del plasma pero que carece de efectos específicos sobre las pruebas de funcionamiento hepático.

Webster y Davidson mencionan que siete cirróticos en precoma hepático recibieron cortisona o hidrocortisona a dosis elevadas, cuatro mejoraron temporalmente, pero fallecieron al igual que los otros tres pacientes que no experimentaron esta dudosa mejoría. Spellberg trató diez pacientes en coma hepático, de éstos, tres se recuperaron, aunque no sabemos exactamente cuál fue su futuro mediato. Duci relata el hecho de que dos pacientes en coma hepático con hepatitis, tratados con cortisona, curaron con normalización de las pruebas de funcionamiento hepático y de la imagen histológica. Es posible, afirma, que la cortisona inhiba la reacción inflamatoria en el hígado permitiendo el proceso de reparación.

Según el Dr. Kumate, la cortisona eleva aún más la actividad, en el suero, de las enzimas arginasa, catalasa y esterasa, de los animales intoxicados con tetracloruro de carbono. Si se establece como analogía que el aumento de la actividad enzimática en el suero representa escapes originados por la desorganización y el daño celular provocados en el hígado por el tóxico empleado, o por factores virales en las hepatitis, o por las alteraciones anatómicas producidas por el alcohol y por las carencias proteínicas en la cirrosis alcoholo nutricionales, cabría esperar, a priori, que algunas substancias con características anti-inflamatorias como la cortisona fuese capaz, en teoría, de favorecer los procesos de reparación celular, inhibiendo este escape enzimático cuya magnitud puede considerarse paralela a la magnitud del daño hepático, llámesele reacción inflamatoria o necrosis. Tengo la impresión de que el Dr. Kumate esperaba este resultado por ser el que parece lógico a primera vista. El resultado fue opuesto. ¿No sucederá lo mismo en los casos de hepatitis, de coma hepático o de cirrosis? ¿No será este hecho la expresión de la ineficacia de la cortisona o quizá de algún efecto perjudicial?

Después de formularme estas preguntas me enteré del trabajo de Manso y Col., quienes estudiaron el efecto producido por la hidrocortisona, en ratones normales y en ratones con hepatitis experimental, sobre la actividad enzimática en el plasma, de las transaminasas glutámico pirúvica y glutámico oxalacética deshidrogenasa láctica y glutatión reductasa.

En los animales normales la actividad no se modifica al inyectarse hidrocortisona.

tisona, pero en ratones con hepatitis se produjo aumento importante. Según estos autores, si la actividad enzimática del suero es índice de la gravedad del padecimiento viral, se deduce que la hidrocortisona puede ejercer efectos perjudiciales sobre la marcha natural de esta infección producida experimentalmente.

La investigación de la fuga enzimática de arginasa, catalasa y esterases deberá hacerse también en enfermos con hepatitis y cirrosis; hay muchos antecedentes al respecto en lo que se refiere a otras enzimas; deberá investigarse también el efecto de la cortisona sobre dicho escape, relacionándolo con datos de orden clínico y con las pruebas de función hepática.

En lo que se refiere al efecto de la cortisona sobre la intoxicación con tetracloruro de carbono, diversas investigaciones señalan que ejerce acción protectora. Vorhaus y Col., encuentran que esta hormona protege ligeramente al hígado, a juzgar por el resultado de estudios histológicos. Hoffman y Col., ya mencionados por Kumate en su trabajo, encuentran también que la cortisona tiene marcado efecto sobre la regeneración de las lesiones hepáticas, reduce el número de mitosis, disminuye la síntesis de ácidos nucleicos y disminuye el grado de los fenómenos inflamatorios. Estos hechos parecen contradictorios, porque habría que esperar, a priori, que la cortisona, agregada al tetracloruro de carbono, disminuyera la fuga enzimática, como expresión de los efectos anti-inflamatorios de la hormona. No pretendemos discutir en este momento las explicaciones posibles de este fenómeno, pero sí consideramos que reviste importancia.

En el trabajo de Post y Col., se estudia el efecto de otra hormona, o sea de la hormona de crecimiento, sobre la intoxicación aguda por tetracloruro de carbono; se produce, con su empleo, aumento notable de las reacciones inflamatorias, mayor infiltración celular y mayor respuesta regenerativa, medida ésta por el aumento en el número de mitosis y por el aumento en la síntesis de ácidos nucleicos. Estos efectos parecen contrarios a los obtenidos con la cortisona, y sería deseable investigar las modificaciones del escape enzimático en animales intoxicados con tetracloruro de carbono a los que se les administre hormona somatotrófica.

El efecto de las radiaciones sobre la actividad enzimática del suero ha sido estudiado y en lo que se refiere a la transaminasa glutámico oxalacética. Kessler y Col., encuentran aumento en el conejo a las cinco horas de aplicada la irradiación y normalización al cabo de 49 horas. El Dr. Kumate relata hallazgos semejantes en el caso de la arginasa, con la diferencia de que el aumento de actividad se produjo mucho más tardíamente, es decir, hasta el 5º día después de la irradiación.

Como conclusión, nos es grato afirmar que el trabajo del Dr. Kumate revela la madurez que ha alcanzado en este difícil campo de la investigación y estamos seguros de que no tardarán mucho en aparecer otras contribuciones importantes suyas, particularmente en el terreno de la inmunoquímica a la que él se dedica.

Tan sólo nos resta felicitarlo y darle la más cordial bienvenida como miembro de esta ilustre corporación.

REFERENCIAS

- Myren, J.: *Injury of liver tissue in mice after single injections of carbone tetrachloride*. Acta Path. and Microb. Scand. Supl. Vol. 116, 1956.
- Aterman, J.: *The effect of carbon tetrachloride on the structure and function on the liver of the rhesus monkey*. Gastroenterology. Vol. 33, Pág. 794. 1957.
- Zoelner, N., Raisich, E.: *Beobachtungen über der zeitlichen ablauf der leberschädigung durch tetrachlorkohlenstoff bei der ratte*. Ztschr. ges. exper. Med. Vol. 128, Pág. 140. 1956.
- Verne, J., Ceccaldi, P. F., Herbert, S., Roux.: *Recherches sur la stéatose hépatique au cours des intoxications par des composés organiques volatils*. Path. et Biol. Vol. 6, Pág. 9. 1958.
- Brauer, R. W., Root, M. A.: *Effect of carbon tetrachloride induced liver injury upon acetylcholine hydrolizing activity of blood plasma of rats*. J. Pharmacol. and Exper. Therap. Vol. 8, Pág. 109. 1946.
- Lamotta, R., Williams, H. M., Wetstone, H. T.: *Studies of cholinesterase activity. II Serum cholinesterase in hepatitis and cirrhosis*. Gastroenterology. Vol. 33, Pág. 50. 1957.
- Zchwarzmann, M. V.: *Modifications des transaminases et de l'aldolase sériques au cours des maladies du foie*. Arch. Mal. App. Dig. Vol. 46, Pág. 11. 1957.
- Molander, D. W., Sheppard, E., Payne, M. A.: *Serum transaminase in liver disease*. J. A. M. A. Vol. 163, Pág. 1461. 1957.
- Sterkel, R. L., Spencer, J. A., Wolfson, S. K., Williams-Ashman, H. G.: *Serum isocitric dehydrogenase activity in liver disease*. Gastroenterology. Vol. 34, Pág. 1044. 1958.
- Zocckler, S. J.: *Cortisone in portal cirrhosis A controled study*. Gastroenterology. Vol. 26, Pág. 878. 1954.
- Webster, I. T., Davidson, Ch. S.: *The effect of cortisone and hydrocortisone on hepatic coma*. Gastroenterology. Vol. 33, Pág. 225. 1957.
- Spellberg, M. A.: *Observations on the treatment of hepatic coma: the favorable effect of corticotropin and corticoids on the responsiveness of adrenal cortex to corticotropin during hepatic coma*. Gastroenterology. Vol. 32, Pág. 600. 1957.
- Lucci, H. Katz, R.: *Cortisone, ACTH and antibiotics in fulminant hepatitis*. Gastroenterology. Vol. 21, Pág. 357. 1952.
- Manso, C., Friend, C. H., Wroblewski, F.: *The influence of 17 hydroxy-corticosterone on Mice*. J. Lab. and Clin. Med. Vol. 53, Pág. 729. 1959.
- Vorhaus E. F., Vorhaus, L. J.: *Protective effects on pretreatment with cortisone, aureomycin and folic acid in carbon tetrachloride induced hepatic injury*. Gastroenterology. Vol. 26, Pág. 887. 1954.
- Hoffman, J., Himes, M. B., Lapan, S., Post, J.: *Responses of liver to injury. Effects of cortisone upon acute carbon tetrachloride poisoning*. Arch. Path. Vol. 60, Pág. 10. 1955.
- Post, J. H., Klein, A., Hoffman, J.: *Responses of the liver to injury effects of growth upon acute carbon tetrachloride poisoning*. A. M. A. Arch. Path. Vol. 54, Pág. 278. 1957.
- Kessler, G., Hermel, M. B., Gershon-Cohen, J.: *Serum glutamic oxalouctic transaminase activity after whole body irradiation*. Proc. Soc. Exp. Biol. and Med. Vol. 98, Pág. 201. 1958.