

Isoenzimas de la α -amilasa en el suero de pacientes hiperamilasémicos con carcinoma pulmonar

M.^aR. Sánchez Navarro, S. Blanco Martín, C. Samaniego

Resumen

Objetivo: Estudiar la utilidad clínica de la determinación sérica de las isoenzimas de la α -amilasa en pacientes hiperamilasémicos con carcinoma pulmonar.

Material y Métodos: Se determinaron las isoenzimas de la α -amilasa en un grupo de 20 pacientes con carcinoma pulmonar, atendidos y tratados desde su diagnóstico en nuestro centro, comparándose los resultados con los de una población de 44 adultos sanos. Las isoenzimas tipo pancreático (P) y salival (S) se separaron por electroforesis sobre gel de agarosa y se cuantificaron por densitometría, calculándose el cociente P/S.

Resultados: Se encontró una disminución significativa de la isoenzima pancreática P2 y del cociente isoenzimático P/S ($P < 0,001$), un aumento significativo de las isoenzimas tipo salival ($P < 0,001$) y la presencia de fracciones salivales S4, S5 y S6, normalmente ausentes en el sujeto sano.

Conclusiones: En todos los casos estudiados la hiperamilasemia fue causada por el aumento de isoenzimas salivales. La presencia de fracciones inusuales podría ser debida a la producción ectópica por parte de las células tumorales. La determinación de isoenzimas de la α -amilasa podría ser de utilidad para descartar una patología pancreática asociada.

Palabras clave: Hiperamilasemia; Isoenzimas de la α -amilasa tipo-P; Isoenzimas de la α -amilasa tipo-S, Carcinoma pulmonar.

Summary. α -amylase isoenzymes in serum of hyperamylasemic patients with pulmonary carcinoma

Objective: to study the usefulness of the analysis of serum amylase isoenzymes from hyperamylasemic patients with pulmonary carcinoma.

Material and Methods: serum levels of α -amylase isoenzymes were determined in a group of 20 patients with lung cancer, treated from the diagnosis in our hospital, the results being compared to a group of 44 healthy adults. Isoenzymes, pancreatic and salivary, were separated by electrophoresis on agarose gel and quantified with a densitometer calculating the P/S ratio.

Results: we found a significant decrease of pancreatic isoenzyme P2 and isoenzymatic ratio P/S ($P < 0,001$), a significant increase in the salivary-type isoenzyme ($P < 0,001$), and the presence of salivary fractions S4, S5 and S6, normally absent in healthy subjects.

Conclusions: in all the cases studied, hyperamylasemia is caused by an increase of salivary isoenzymes. The presence of unusual fractions could have its origin in the ectopic production by the tumor cells. Determination of α -amylase isoenzymes could be effective in ruling out an associated pancreatic pathology.

Key words: Hyperamylasemia; α -amylase isoenzymes type-P; α -amylase isoenzymes type-S, Lung carcinoma

INTRODUCCIÓN

La α -amilasa (1,4- α -D-glucano glucanohidrolasa, EC 3.2.1.1), es una enzima presente en el suero bajo diferentes formas moleculares, que parecen ser verdaderas isoenzimas codificadas cada una por un gen distinto y que pueden separarse por electroforesis sobre la base de su diferente carga superficial (1-4). Las isoenzimas de la α -amilasa se clasifican en dos grupos principales: las isoenzimas tipo-P (P2, P3, P4, P5 y P6), específicas del páncreas, que representan el 35-45% de la actividad plasmática total de la α -amilasa y las isoenzimas tipo-S (S2, S3, S4, S5 y S6), de origen extrapancreático, producidas principalmente por las glándulas salivales pero también por otros tejidos como el ovario, pulmón, próstata, hígado, intestino delgado, riñón, etc.(5-7). Las isoenzimas salivales son la forma sérica predominante, lo que condiciona que una parte importante de las hiperamilasemias tengan un origen no pancreático y sean debidas a procesos patológicos que afecten a

los órganos productores de las isoenzimas de la α -amilasa tipo-S (8-11).

La hiperamilasemia asociada al cáncer de pulmón ha sido descrita por muchos autores (12-15). En coincidencia nosotros hemos observado, en nuestro medio, la frecuencia con la que el carcinoma pulmonar se acompaña de un incremento de la actividad de la enzima.

El objetivo de nuestro estudio ha sido identificar el tipo de isoenzima de la α -amilasa responsable de la hiperamilasemia presentada por un grupo de pacientes con carcinoma pulmonar atendidos y tratados desde su diagnóstico en nuestro centro, utilizando un método de electroforesis sobre gel de agarosa que permite, de una forma asequible, rápida y eficaz la separación y cuantificación de las diferentes isoenzimas de la α -amilasa.

MATERIAL Y MÉTODOS

Pacientes

Se estudiaron un total de 20 pacientes (8 mujeres y 12 hombres; edad media de 58 años (intervalo 46-70) diagnosticados,

sobre la base de parámetros clínicos y valoración objetiva de la enfermedad mediante pruebas radiológicas e histológicas adecuadas, de carcinoma pulmonar. Todos los pacientes presentaron un incremento de la actividad plasmática total de la α -amilasa de causa dudosa. Los perfiles isoenzimáticos obtenidos se compararon con los presentados por un grupo control formado por 44 adultos (24 mujeres y 20 varones; edad media de 41 años; intervalo 18-65) aparentemente sanos.

Muestras

Jugo pancreático. Procedente del drenaje de una fístula pancreática, con una actividad de α -amilasa >100.000 UI/L aproximadamente, un patrón electroforético conocido (formado exclusivamente por las isoenzimas pancreáticas P2, P3, P4, P5 y P6), homogeneizado, centrifugado, diluido con un suero normal inactivado previamente al calor durante 1 hora a 56 °C y conservado en alícuotas a -20 °C.

Saliva. Saliva fresca humana, con un contenido de α -amilasa de 16.000 UI/L aproximadamente y un patrón electroforético formado por las isoenzimas salivales S2, S3 y S4, centrifugada, diluida con agua destilada y conservada en alícuotas a -20 °C.

Las muestras de jugo pancreático y de saliva se utilizaron como controles en la separación electroforética de las isoenzimas de la α -amilasa.

Muestras de sangre. Se utilizaron muestras de suero que se obtuvieron siguiendo el proceso habitual del laboratorio. Cuando fue posible se procesaron inmediatamente y cuando no, se mantuvieron entre 2° y 4 °C durante un período máximo de tres días.

Métodos analíticos

Concentración catalítica. La concentración catalítica de la α -amilasa se determinó a 37°C, en un Autoanalizador Hitachi 917 con los reactivos de Boehringer Mannheim (*Automated Analysis for BM/Hitachi 917; Mannheim, F.R.G.*).

Isoenzimas de la α -amilasa. La separación de las isoenzimas se realizó con el método Paragon/Beckman, utilizando el equipo de reactivos Isoamyl (Analis, Namur, Belgium). Se utilizó un gel de agarosa tamponado en tampón Tris/Borato, pH 6,95. La electroforesis tuvo lugar a 150 voltios durante 30 minutos y una vez terminada se incubaron los geles con el substrato específico para la enzima. La cantidad relativa de las bandas se cuantificó a 600 nanómetros en un densitómetro Appraise de Beckman (Beckman Instruments, Inc) y la cantidad de cada isoenzima se calculó como el porcentaje de la concentración catalítica total.

Análisis estadístico

Las variables cuantitativas se expresaron en función de su media y desviación típica ($\bar{x} \pm s$). Se utilizó la distribución de Student para la comparación de muestras, estableciéndose el nivel de significación en un valor de $P < 0,05$. Los datos se procesaron con el paquete estadístico Sigma para PC (16).

RESULTADOS

El jugo pancreático y saliva humana son utilizados de forma habitual en nuestro laboratorio como controles en todas las electroforesis de las isoenzimas de la α -amilasa. En jugo pancreático se encontró una actividad de la α -amilasa plasmática total superior a 100.000 UI/L y un perfil electroforético formado por las isoenzimas pancreáticas P2=15,5%, P3=36,2%, P4=33,3%, P5=13,5% y P6=1,4%.

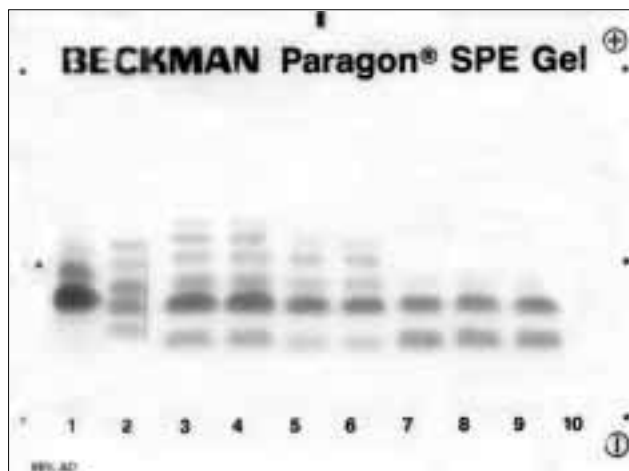


Figura 1 Separación electroforética de las isoenzimas de la α -amilasa sobre gel de agarosa. 1: control salival (S2, S3, S4). 2: control pancreático (P2, P3, P4, P5, P6). 3-6: muestras de dos pacientes con carcinoma pulmonar. 7-9: muestras de pacientes sanos.

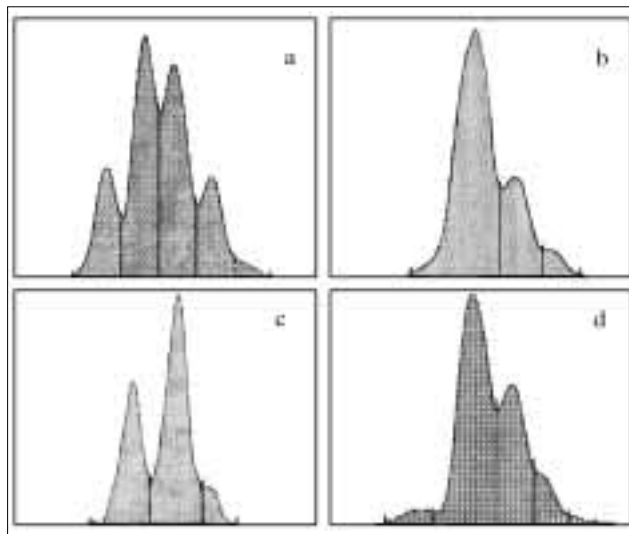


Figura 2 Perfiles electroforéticos. a: jugo pancreático (P2, P3, P4, P5, P6). b: saliva (S2, S3, S4). c: suero de paciente sano (P2, S2, S3). d: paciente con carcinoma pulmonar (P2, S2, S3, S4, S5, S6)

En la saliva se encontró una actividad total de la α -amilasa plasmática superior a 16.000 UI/L y un perfil formado por las isoenzimas salivales S2=74%, S3= 22,3% y S4=3,7%. En las figuras 1 y 2 se muestran los perfiles electroforéticos de las diferentes muestras utilizadas en el estudio.

En el grupo control, la actividad total de la α -amilasa plasmática fue de 117 ± 26 UI/L. En el grupo patológico los valores oscilaron entre un mínimo y un máximo de 375 - 2.870 UI/L. Se calculó el valor de las fracciones pancreáticas (P) y salivales (S) de ambos grupos y se estudió la relación entre ellas calculando el cociente P/S, considerando como valor de referencia un cociente $< 0,8$. Los valores porcentuales medios de las isoenzimas de la α -amilasa, así como el cociente P/S presentados por los grupos normal y patológico, están representados en la tabla I.

En la comparación de los resultados encontramos, en los pacientes con carcinoma pulmonar, un aumento significativo de las isoenzimas de tipo salival ($P < 0,001$), una disminución

Tabla I. Actividad sérica de las isoenzimas de la α -amilasa en los grupos estudiados ($\bar{x} \pm s$)

	n	Isoenzimas de la α -amilasa						Cociente P/S
		P2	S2	S3	S4	S5	S6	
Control	44	37,7 \pm 8,1	57,6 \pm 8,5	4,7 \pm 2,8	–	–	–	0,62 \pm 0,19
Pacientes	20	17,7 \pm 6,1*	58,4 \pm 5,6	14,7 \pm 5,8*	5,5 \pm 2,7*	2,4 \pm 0,9*	1,2 \pm 0,8*	0,22 \pm 0,1*

^a Expresadas como porcentaje de la actividad total de la α -amilasa. * $P < 0,001$

de la isoenzima pancreática P2 y del cociente isoenzimático P/S ($P < 0,001$), y la presencia de fracciones salivales S4, S5 y S6, normalmente ausentes en el adulto sano.

DISCUSIÓN

Aunque la determinación sérica de la α -amilasa se usa, de forma generalizada, como marcador selectivo de pancreatitis en el paciente con dolor abdominal agudo, la hiperamilasemia no es específica de la enfermedad pancreática y son muchos los procesos patológicos que pueden condicionar un aumento de la actividad plasmática de la enzima ya que se encuentra distribuida en muchos órganos (17-18) y puede tener su origen en determinados tumores, como el de pulmón, esófago, mama, ovario, etc.

Las isoenzimas de la α -amilasa han sido evaluadas por varios autores, que atribuyen el origen de las hiperamilasemias de tipo S presentes en pacientes con tumores de pulmón a una producción ectópica por parte de las células tumorales. Así Flood *et al*, en 1978, mediante electroforesis en acetato de celulosa para la separación de isoenzimas, encuentran una α -amilasa con una actividad electroforética similar a las isoenzimas de tipo S, en el suero de un paciente con carcinoma pulmonar, sin que la necropsia posterior evidenciara una causa pancreática o salival (19). Katayama en 1981, separando las isoenzimas por cromatografía, aporta un caso de un tumor de pulmón productor de α -amilasa y realiza una revisión de la literatura (20). En 1982 Maeda *et al*, utilizando un gel de acrilamida, encuentran una isoenzima tipo S en extractos de tumor primario de pulmón, sugiriendo que la isoenzima tipo S se encuentra fisiológicamente en el tejido pulmonar sano. Los valores altos encontrados en el suero son debidos al flujo continuo de la α -amilasa del pulmón a la circulación sanguínea, a través de la membrana alveolo-pulmonar comprometida por determinados procesos patológicos como la inflamación, la formación tumoral, etc. (21).

Recientemente, estudios con microscopía electrónica sugieren que la mayoría de los tumores de pulmón asociados con hiperamilasemia son adenocarcinomas (22,23). En 1992 Tsukawaki *et al*, encuentran hiperamilasemia en el suero de un paciente con tumor de «células pequeñas» y los estudios inmunquímicos y de microscopía electrónica encuentran la α -amilasa tipo S localizada en el citoplasma de las células tumorales (24).

Otros autores han realizado estudios enzimáticos de las isoenzimas de la α -amilasa en derrames pleurales de enfermos con patología pulmonar cancerosa o inflamatoria encontrando incrementos de la isoenzima tipo S (25,26).

En nuestro estudio hemos utilizado un método de separación electroforética sobre gel de agarosa, para medir la concentración catalítica de las diferentes isoenzimas y de la α -

amilasa en el suero de pacientes ingresados en nuestro centro diagnosticados de carcinoma pulmonar, que presentaban una hiperamilasemia de difícil justificación.

El cáncer de pulmón es una posible fuente de elevación de la concentración catalítica de la α -amilasa en la que no suele pensarse y hemos querido identificar, utilizando un método habitual en nuestro laboratorio, la isoenzima responsable de la hiperamilasemia presentada por los pacientes de nuestra serie. Hemos comprobado que, en todos los casos estudiados, el incremento sérico de la α -amilasa es causado por el aumento de las isoenzimas tipo S, siendo un dato a destacar la aparición de las fracciones salivales S4, S5 y S6, inusuales en el suero de los sujetos sanos. No conocemos el significado de su presencia en el paciente con cáncer de pulmón pero, el hecho de que estas isoenzimas S4, S5 y S6 estén presentes en todos los pacientes objeto de nuestro estudio nos sugiere la posible producción ectópica por parte de las células tumorales.

No hemos podido establecer si el factor, extensión y el tipo histológico de tumor, desempeñan un papel importante en el aumento plasmático de la α -amilasa o en la aparición de bandas enzimáticas inusuales. La determinación de las isoenzimas en pacientes con otras patologías pulmonares, y en el caso concreto del carcinoma pulmonar, el estudio de un grupo más numeroso de enfermos y homogéneo desde el punto de vista histológico juntamente con la determinación del estadio del tumor deberá evaluarse en un futuro en orden a establecer el interés clínico de nuestros resultados.

Concluimos que los procesos patológicos que afectan a los órganos productores de α -amilasa pueden dar lugar a la aparición de fracciones procedentes de estos órganos, así como a modificaciones en los porcentajes de las fracciones salivales y pancreáticas. Por consiguiente, el estudio de los perfiles electroforéticos siempre puede aportar información diagnóstica más específica que la simple medición de la concentración catalítica total. En el caso particular del carcinoma pulmonar, la determinación de las isoenzimas de la α -amilasa podría ser de utilidad, por un lado, para descartar o confirmar una patología pancreática asociada y, por otro, si se confirmara la producción ectópica por parte de las células tumorales el estudio de los perfiles isoenzimáticos sería de utilidad tanto desde el punto de vista de la evolución de la enfermedad como de respuesta al tratamiento.

Correspondencia
M^a Rosa Sánchez Navarro
Dpto. de Bioquímica. Facultad de Medicina
Av. de Madrid
18012-GRANADA
Tel.: 958 023871
e-mail: rsanchez@hsc.sas.junta-andalucia.es

BIBLIOGRAFÍA

1. Warshaw AL. Serum amylase isoenzymes profiles as a differential index in disease. *J Lab Clin Med* 1977; 90: 1-3.
2. Royse VL, Jensen DM. Development of an agarose gel electrophoresis technique for determining alpha-amylase isoenzymes. *Clin Chem* 1984; 30: 387-90.
3. Tietz NW, Huang WY, Rauh DF, Shuey DF. Laboratory tests in the differential diagnosis of hyperamylasemia. *Clin Chem* 1986; 32: 301-7.
4. Jensen DM, Royse VL, Bonello JN, Schaffner J. Use of amylase isoenzymes in laboratory evaluation of hyperamylasemia. *Dig Dis Sci* 1987; 32: 561-8.
5. Warshaw AL, Lee KH. Characteristic alterations of serum isoenzymes of amylase in diseases of liver, pancreas, salivary gland, lung and genitalia. *J Surg Res* 1977; 22: 362-9.
6. Levitt MD, Ellis CJK, Meier PB. Extrapancreatic origin of chronic unexplained hyperamylasemia. *N Engl J Med* 1980; 302: 670-1.
7. Apple F, Benson P, Preese L. Lipase and pancreatic amylase activities in tissues and patients with hyperamylasemia. *Am J Pathol* 1991; 96: 610-4.
8. Collen MJ, Ansher AF, Chapman AB. Serum amylase determinations in patients with renal insufficiency and renal failure. *Am J Gastroenterol* 1990; 85: 1.377-80.
9. Terada T, Nakanuma Y. An immunohistochemical survey of amylase isoenzymes in cholangiocarcinoma and hepatocellular carcinoma. *Arch Pathol Lab Med* 1993; 117: 160-2.
10. Tsianos EV, Dardamanis MA, Elisaf M, Vasakos S, Siamopoulos KC. The value of alpha-amylase and isoamylase determination in chronic renal failure patients. *Int J Pancreatol* 1994; 15: 105-11.
11. Sanchez-Navarro MR, Fernandez-Conde E, Samaniego C. Isoamylases and isolipases values in the serum from patients with renal insufficiency. *An Med Interna* 2001; 18: 455-8.
12. Otsuki M, Yuu H, Maeda M, Saeki S, Yamasaki T. Amylase in lung. *Cancer* 1977; 39: 1.656-63.
13. Zakrzewska I, Korcz A, Gajda R. Changes of alpha-amylase activity in serum and urine of patents with various histological types of lung cancer. *Pneumonol Alergol Pol* 1992; 60: 42-7.
14. Yokoyama M, Natsuzaka T, Ishii Y, Ohshima S, Kasagi A. Amylase-producing lung cancer: ultrastructural and biochemical studies. *Cancer* 1977; 40: 766-72.
15. Lenler-Petersen P, Grove A, Brock A, Jelnes R. Alpha-amylase in resectable lung cancer. *Eur Respir J* 1994; 7: 941-5.
16. Moreu L, Molineri LM, Fernández E. RSIGMA. Base de datos. Bioestadística. Madrid: Horus Hardware S.A.; 1990.
17. Skude G, Mårdh PA, Weström L. Amylases of the genital tract I. Isoamylases of genital tract tissue homogenates and peritoneal fluid. *Am J Obstet Gynecol* 1976; 126: 652-60.
18. Seyama K, Nukiwa T, Takahashi H, Kira S. Amylase mRNA transcripts in normal tissues and neoplasms: the implication of different expressions of amylase isogenes. *J Cancer Res Clin Oncol* 1994; 120: 213-20.
19. Flood JG, Schuerch C, Dorazio RC, Bowers GN. Marked hyperamylasemia associated with carcinoma of the lung. *Clin Chem* 1978; 24: 1.207-12.
20. Katayama S, Ikeuchi M, Kanazawa Y, Akanuma Y, Kosaka K, Takeuchi T *et al.* Amylase-producing lung cancer: case report and review of the literature. *Cancer* 1981; 48: 499-502.
21. Maeda M, Otsuki M, Yuu H, Saeki S, Yamasaki T, Baba S. Salivary type hyperamylasemia in primary lung cancer: observation of a possible precursor of the salivary-type isoamylase. *Eur J Cancer Clin Oncol* 1982; 18: 123-8.
22. Martin PC, Sarma DP. Amylase-producing lung cancer. *J Surg Oncol* 1982; 21: 30-2.
23. Grove A. Amylase in lung carcinomas. An ultrastructural and immunohistological study of two adenocarcinomas, and review of the literature. *APMIS* 1994; 102:135-44.
24. Tsukawaki M, Izawa M, Yoshida M, Raki N, Hashiba Y, Nakagawa H. A case of amylase-producing lung cancer. *Intern Med* 1992; 31:60-3.
25. Joseph J, Viney S, Beck P, Sttange C, Sahn S. A prospective study of amylase-rich pleural effusion with special reference to amylase isoenzyme analysis. *Chest* 1992; 102:1455-9.
26. Villena V, Pérez V, Poza F, López-Encuentra A, *et al.* Amylase levels in pleural effusions: a consecutive unselected series of 841 patients. *Chest* 2002; 121:470-4.