

# ESTUDO DA ACTIVIDADE DA $\beta$ -N-ACETILGLUCOSAMINIDASE NA DOENÇA HEPÁTICA CRÔNICA ALCOÓLICA

C. PINTO, A. GALVÃO-TELES, ESTELA MONTEIRO, C. MARQUES, M. AZEVEDO, C. MANSO

Centro de Metabolismo e Endocrinologia. Instituto de Química Fisiológica. Faculdade de Medicina. Serviço de Medicina II. Hospital de Santa Maria. Lisboa.

## RESUMO

A actividade da  $\beta$ -N-acetilglucosaminidase (NAG) foi determinada no soro de um grupo de 23 doentes com cirrose hepática alcoólica: quinze descompensados e oito com doença hepática crónica compensada. Este grupo foi comparado com um grupo controlo de 76 indivíduos normais. Os resultados evidenciaram actividades da NAG significativamente elevadas no grupo de doentes descompensados — média de 931,67 unidades vs. 637,71 unidades para o grupo controlo ( $p < 0,001$ ). Os valores não foram significativamente diferentes para os doentes compensados. Não se verificaram correlações significativas entre os valores da NAG e os das provas funcionais hepáticas. A evolução para a compensação em 13 doentes descompensados acompanhou-se da normalização da actividade da NAG. Nos 7 casos em que não houve compensação verificou-se uma subida da actividade da NAG em relação ao valor inicial, sendo esta elevação mais acentuada nos 5 doentes com encefalopatia porto-sistémica do que nos doentes descompensados por outras intercorrências.

## SUMMARY

**Study of the activity of  $\beta$ -N-acetylglucosaminidase in chronic alcoholic hepatic disease**

Serum N-acetyl-B-glucosaminidase (NAG) activity was determined in a control group of 76 normal people and in 23 patients with hepatic cirrhosis: 15 non-compensated patients and 8 with compensated chronic liver fibrosis. NAG is significantly increased in the non-compensated group — mean value of 931.67 units vs 637.71 units for the controls ( $p < 0.001$ ). There is no significant elevation regarding the compensated group. No significant correlations were observed between NAG activity and hepatic functional tests. In the follow-up of the non-compensated group, NAG activity returned to normal with the clinical improvement; in 7 cases where this goal was not achieved there was elevation of NAG activity, with higher values in porto-systemic encephalopathy.

## INTRODUÇÃO

A N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminidase (2-acetamido-2-desoxi- $\beta$ -D-glucosido acetamido desoxiglucosidase EC 3.2.1.30 — NAG) é uma hidrolase ácida, ou seja, um enzima lisosómico implicado no catabolismo das glucoproteínas, glucolípidos, proteoglicanos e mucopolissacáridos. As alterações na actividade enzimática das hidrolases ácidas foram inicialmente referidas nas doenças metabólicas congénitas<sup>1</sup>.

A NAG é uma exoglicosidase que hidroliza ligações glicosídicas em que o resíduo N-acetil-glucosamina se encontra na extremidade não redutora dos oligossacáridos.

Aronson e col.<sup>2</sup> demonstraram que a hialuronidase, uma endomucopolissacaridase, se encontra presente nos lisosomas do fígado do rato, existindo a possibilidade de uma acção combinada deste enzima com a NAG, com implicações biológicas na degradação dos mucopolissacáridos ácidos.

Demonstrou-se a libertação das hidrolases ácidas do tecido hepático isquémico do rato e que os lisosomas hepáticos degradavam mucopolissacáridos altamente polimerizados estando a actividade da mucopolissacaridase ácida relacionada com a velocidade do *turn-over* dos mucopolissacáridos hepáticos e com a formação da fibrose na cirrose hepática<sup>3</sup>. Koizumi e col.<sup>4</sup> referiram a elevação da actividade da NAG no soro de doentes com lesão hepática, concomitantemente com a alteração dos mucopolissacáridos ácidos.

Desconhece-se ainda qual o papel da NAG bem como o de outros enzimas lisosómicos em patologia.

Na lesão hepática aguda a elevação dos enzimas lisosómicos, tanto no soro como na fracção sobrenadante, parece constituir uma indicação da destruição celular<sup>5</sup>, enquanto que na lesão hepática crónica se observa uma anormal distribuição intracelular destes enzimas. Estas alterações tornam-se mais pronunciadas nos estádios mais graves da lesão hepática.

O mecanismo bioquímico e patológico da fibrose hepática é só parcialmente compreendido. A acumulação do colágeno no fígado com lesão crónica resulta provavelmente do aumento da sua síntese<sup>6</sup>. O excesso da deposição intercelular dos proteoglicanos, particularmente do sulfato de dermatan e condroitino sulfato<sup>7</sup>, podem ser o resultado de uma síntese estimulada, de um reduzido catabolismo ou de um aumento da acumulação passiva no fígado dos glicosaminoglicanos sintetizados nos tecidos extrahepáticos e transportados para o fígado via circulação sistémica: qualquer que seja o mecanismo primário, o catabolismo dos glicosaminoglicanos deve ser reduzido em relação à síntese ou deposição passiva a fim de se dar a acumulação no parênquima.

Reglero e col.<sup>8</sup> referiram na cirrose hepática uma elevação significativa das actividades de diversos enzimas lisosómicos, evidenciando a NAG e a  $\alpha$ -L-fucosidase os aumentos mais significativos.

Pelo contrário, Gressner e col.<sup>9</sup> verificaram que os valores preditivos da NAG para a cirrose hepática eram baixos.

mesmo quando referenciados a uma população de indivíduos saudáveis. Os valores obtidos, segundo estes Autores, não se revestiam de importância diagnóstica para este enzima na cirrose/fibrose hepática.

A finalidade deste estudo foi investigar o comportamento da NAG nos doentes com cirrose hepática, compensados e descompensados do ponto de vista clínico e bioquímico, procurando-se avaliar nestes a actividade sequencial da NAG na evolução, quer para a compensação quer durante a manutenção e agravamento, por encefalopatia porto-sistémica ou por intercorrências de outro tipo.

Foram excluídos deste estudo os indivíduos com patologia associada como a diabetes, a tuberculose, as pancreatites, a anemia hemolítica, a hidatidose hepática, hepatites e lesões inflamatórias gastrointestinais, bem como as doenças do foro osteoarticular ou oncológico.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram estudados 23 doentes com cirrose hepática alcoólica do Serviço de Med. II do Hospital de Santa Maria, sendo 6 do sexo feminino e 17 do sexo masculino, com idades compreendidas entre os 37 e os 73 anos (idade média 53 anos). Como controlos foram efectuadas determinações em 76 indivíduos normais de ambos os sexos, escolhidos entre dadores de sangue (Serviço de Imuno-hemoterapia do Hospital de Santa Maria) e pessoal do nosso Laboratório (41 homens e 35 mulheres, com idades compreendidas entre os 18 e os 65 anos).

O diagnóstico de cirrose hepática foi em todos os casos suspeitado pela clínica e laboratório e confirmado pela biópsia hepática. Todos os doentes apresentavam hábitos alcoólicos superiores a 160 g/dia, durante um período de 10 a 20 anos.

	Casos estudados			Idade média (variação) anos
	Total	♂	♀	
Cirróticos Descompensados	15	10	5	50 (≥28-≤60)
Cirróticos Compensados	8	7	1	51 (≥35-≤66)
Cirróticos (total)	23	17	6	53 (≥33-≤65)
Controlos	76	41	35	45 (≥30-≤60)

Constituíram critérios de descompensação da cirrose o agravamento de sintomas e sinais clínicos, nomeadamente: adinamia, astenia, ascite, edemas maleolares, icterícia, *fetor hepaticus*, sinais de fragilidade vascular, alterações de comportamento, que se complementaram com a avaliação de exames laboratoriais — transaminases glutâmico oxalacética e glutâmico pirúvica, bilirrubinémias, fosfatase alcalina, gamaglutamil transpeptidase, tempo de protrombina, proteinograma, amoniémia, colesterolémia, ionograma sérico e urinário, urobilinogénio urinário. A evolução para o estado de compensação baseou-se na melhoria clínica e laboratorial dos parâmetros acima referidos.

Foram as seguintes as causas do internamento dos 23 doentes com cirrose alcoólica, expressos em percentagens do número total de doentes (n=23):

Ascite	70%
Icterícia	40%
Quebra do estado geral	39%
Anasarca	33%

Queixas dispépticas	18%
Hemorragia digestiva	17%
Anemia	15%
Insuficiência respiratória	13%
Coma ou pré-coma	8%

**Cirróticos descompensados** — Nos casos em que foi possível estudar a evolução (total = 13) efectuaram-se 3 determinações da NAG, no 1.º dia do internamento e os subsequentes intervalados de 10 dias. Em 2 casos foi possível a determinação de um único doseamento da NAG por morte do doente em encefalopatia porto-sistémica num caso e exigência de alta em outro caso.

**Cirróticos compensados** — Executou-se uma única determinação da actividade da NAG na 3.ª semana do internamento.

A **Encefalopatia porto-sistémica** foi avaliada segundo a classificação de Scherlock 1981 em graus: 1, 2, 3, 4 e 5.

As amostras de sangue foram colhidas em tubos secos por punção venosa e o soro separado do sangue coagulado por centrifugação (centrífuga refrigerada), a 1500 g, dividindo-se o sobrenadante em 3 partes alíquotas (para a eventualidade de posteriores determinações), tendo-se procedido imediatamente ao doseamento da NAG ou congelando-se os soros a -20°C.

A NAG sérica foi determinada fluorimetricamente em 50 µl de soro, em duplicado, pelo método de Leaback e Walker<sup>10</sup>, utilizando-se como substrato fluorogénico 4-metil-umbeliferil glucosaminido, sendo a 4-metil-umbeliferona (4-MU) libertada na reacção convertida para a sua forma aniónica, altamente fluorescente, pela adição de tampão alcalino glicina-NaOH e doseada fluorimetricamente.

A actividade enzimática é expressa em nmoles de 4-MU/h/ml de soro.

A análise estatística dos dados incluiu o cálculo das médias, desvio padrão e variâncias; baseado nas variâncias observadas foi utilizado o teste de Student para determinar os níveis da significância.

## RESULTADOS

No Quadro 1 evidencia-se uma significância de  $p < 0,001$  para a NAG sérica nos cirróticos descompensados quando comparada com os valores dos controlos. Os cirróticos compensados apresentam valores ligeiramente inferiores aos controlos embora não significativos.

Quando comparamos actividades da NAG nos indivíduos do sexo masculino e feminino (Quadro não apresentado), não se encontraram diferenças significativas quer nos doentes cirróticos, quer nos controlos, como já tinha sido verificado em trabalhos anteriores<sup>11</sup>.

No Quadro 2 verifica-se a não existência de correlações significativas entre os valores da NAG e algumas das provas

QUADRO 1 — Actividade sérica da NAG expressa em nmoles 4MU/h/ml em doentes com cirrose hepática descompensada e compensada comparada com indivíduos normais

	N.º	NAG	DP
Cirróticos descompensados I	15	931,67	206,69
Cirróticos compensados II	8	606,25	68,17
Controlos III	76	636,71	141,67
Test de Student	I vs III	T=6,692	$p < 0,001$
	II vs III	T=0,594	$p = n.s$
	I vs II	T=4,134	$p < 0,001$

QUADRO 2 — Correlação da actividade sérica da NAG expressa em nmoles/ml/h com as provas funcionais hepáticas

	NAG	Albuminémia	$\gamma$ globulina	TGO	TGP	GT	FA	TP
Valores normais	495,04/ 778,38 nm/ml	3,5 — 5,5 g/100 ml	0,7 — 1,7 g/100 ml	6 — 18 IU	3 — 26 IU	<35	21 — 91 IU	75 — 120%
Valores limites patológicos	$\geq$ 703,00 $\leq$ 1434	$\geq$ 1,4 $\leq$ 3,57	$\geq$ 1,87 $\leq$ 3,53	$\geq$ 15 $\leq$ 161	$\geq$ 10 $\leq$ 280	$\geq$ 23 $\leq$ 282	$\geq$ 65 $\leq$ 386	$\geq$ 45 $\leq$ 70
Correlações e Test de Student		r=0,096 T=0,348 p=n.s.	r=0,538 T=2,732 p=n.s.	r=0,017 T=0,067 p=n.s.	r=0,064 T=0,231 p=n.s.	r=0,092 T=0,335 p=n.s.	r=0,208 T=0,785 p=n.s.	r=0,325 T=1,309 p=n.s.

Coeficiente de correlação (r), número (n), valores de Test de Student (T) e grau de significância (p) das determinações efectuadas nos doentes descompensados

funcionais utilizadas, nomeadamente a Albuminémia,  $\gamma$  globulinémia, Transaminases glutâmico oxalacéticas (TGO); Transaminases glutâmico pirúvicas (TGP), gama-glutamil-transpeptidase ( $\gamma$ GT), fosfatase alcalina (FA) e tempo de protrombina (TP), ao contrário do que foi demonstrado na lesão hepática aguda para algumas provas<sup>12</sup>.

A actividade da NAG nos cirróticos descompensados apresenta-se mais elevada nos doentes com encefalopatia porto-sistémica (total de 6 casos) com valores de NAG máxima de 1434 nmoles/ml do que nos 3 doentes descompensados por intercorrências de outro tipo (infecção respiratória, insuficiência renal): valores de NAG máxima de 1002 nmoles/ml.

Em dois casos, com insuficiência respiratória e EPS (n.º 7 e 9) só foi possível uma única determinação.

Doseando-se sequencialmente a actividade da NAG em cirróticos descompensados com posterior normalização do seu estado clínico (total de 6 casos) verifica-se que os valores da NAG acompanham a evolução para a melhoria (Quadro 4).

## DISCUSSÃO

Tem sido demonstrado que a NAG é preferencialmente captada pelas células hepáticas não parenquimatosas dos ratos e que a captação destes enzimas é mediada por ligação a receptores da superfície celular, que reconhecem resíduos manose e N-acetilglucosamina<sup>13,14</sup>.

Sabe-se que as células não parenquimatosas designadas até há pouco tempo por células de Kupffer constituem na realidade uma população heterogénea que pode agora subdividir-se em células de Kupffer (34% do volume), células endoteliais (44%), lipocitos (22%) e as *pit-cells* (volume desconhecido)<sup>15</sup>.

Os lisosomas das células hepáticas não parenquimatosas são responsáveis por 42,9% dos lisosomas hepáticos totais<sup>16</sup>.

As células de Kupffer evidenciam um enriquecimento específico em lipase ácida,  $\beta$ -glucuronidase, catepsina D e amino peptidase B, enquanto as actividades específicas da fosfatase ácida, DNAase ácida, NAG e arilsulfatase B são superiores nas células endoteliais comparadas com as células de Kupffer<sup>17</sup>.

No que diz respeito ao elevado nível de glicosidases lisosómicas nas células sinusoides é possível que sejam parcialmente de origem extracelular. As células sinusoidais são capazes de reduzir as actividades da  $\beta$ -glucuronidase e NAG no soro<sup>18</sup>.

Dado que os enzimas lisosómicos endocitados não sofrem um catabolismo rápido<sup>19</sup>, parece lícito concluir que a actividade destes enzimas nas células de Kupffer e células endoteliais podem resultar em parte de moléculas enzimáticas adquiridas do plasma. Todavia desconhece-se até hoje a

QUADRO 3 — Actividade sérica da NAG expressa em nmoles/ml/h cirróticos descompensados com manutenção deste estado ao longo do estudo

Doentes doente/sexo	Determinações sequenciais (NAG nm/ml)			Intercorrências
	Dia 1	Dia 10	Dia 21	
1 M	955	1190 EPS II	1117 EPS II	Hem.Digestiva e EPS
2 M	855	943	802	Insuficiência renal
3 M	1300 EPS II-III	1283 EPS II-III	950 EPS II	EPS
4 M	803 EPS I	807 EPS I	1134 EPS II	EPS
5 F	1434 EPS III	1302 EPS III	1341 EPS III	EPS
6 F	855	1002	814	Insuf. respiratória
7 M	931 EPS II			
8 F	1003 EPS II	990 EPS I-II	870	EPS
9 M	859			Infecção respiratória

extensão da possível contribuição destas moléculas extracelulares para a actividade enzimática endógena.

Assim, no presente trabalho, a elevação dos níveis séricos da NAG obtidos na disfunção hepática poderia ser explicável pelo compromisso do mecanismo de depuração descrito, atendendo a que nestes casos ocorre frequentemente uma descompensação hepática com aumento do catabolismo celular.

Estão descritas alterações dos mucopolissacáridos ácidos durante a fibrogénese hepática<sup>20,21</sup>. Tem sido sugerido que estas alterações resultam de um aumento na síntese dos mucopolissacáridos sendo presumível que esteja também afectada a degradação destas macromoléculas<sup>22</sup>.

Nakamura e col.<sup>23</sup> referiram uma elevação da hialuronidase tanto no homogeneizado como no soro de doentes hepáticos crónicos, excepto numa fase avançada, sugerindo que o metabolismo dos mucopolissacáridos seria mais inactivo no estágio irreversível da lesão hepática.

Um aumento dos mucopolissacáridos urinários foi descrito por Koizumi e col.<sup>24</sup> em ratos com lesão hepática experimental e em doentes com cirrose e fibrose hepática, evidenciando-se uma boa correlação entre os níveis séricos da NAG e a quantidade dos mucopolissacáridos hepáticos. À semelhança dos resultados explicitados, estes Autores não observaram nos doentes estudados correlação entre a actividade sérica ou hepática da NAG e as provas funcionais hepáticas.

QUADRO 4 — Actividade sérica da NAG expressa em nmoles/ml/h em cirróticos descompensados com normalização do seu estado clínico

Doentes	Determinações sequenciais		
	1.º Dia	10.º Dia	21.º Dia
1 M	773	707	550
2 M	763	619	549
3 F	1023	919	750
4 F	802	778	630
5 M	790	608	
6 M	1035	878	764

Em estudos posteriores<sup>25</sup> os mesmos Autores verificaram um aumento da actividade enzimática sérica que se acentuava com a progressão de lesão hepática. Estes factos parecem indicar que existem factores comuns às alterações dos mucopolissacáridos hepáticos e elevação sérica da NAG no processo fibrótico. Dado que os resultados histológicos nos casos considerados no presente estudo revelaram fibrose em actividade (dados não apresentados), o aumento da NAG poderá reflectir a actividade da fibrose hepática.

A encefalopatia porto-sistémica (EPS) é proveniente da hipertensão portal avançada. A ela estão ligadas todas as perturbações psíquicas e neurológicas de que sofrem os doentes hepáticos. Parece ser provocada por metabolitos proteicos tóxicos que insuficientemente destoxificados pelo fígado do cirrótico acabam por chegar ao cérebro.

A importância do *shunt* é acentuada pelo facto de que um *by-pass* da ordem dos 5% pode levar a um aumento de 100% na fracção que escapa a extracção hepática<sup>26</sup>. A elevação dos níveis da NAG obtidos no presente trabalho na EPS poderia ser o resultado da sua não metabolização a nível hepático, visto existir o desvio porta sistémico citado.

Tem sido induzido nos macrófagos com agentes do tipo das endotoxinas o aumento do conteúdo intracelular e a libertação das hidrolases ácidas<sup>27</sup>. Assim, o aumento da NAG observado em doentes internados com hemorragia digestiva (HD), embora constituindo uma minoria, podia dever-se a uma maior libertação dos macrófagos secundária à endotoxémia proveniente do metabolismo bacteriano intestinal como consequência das HD, uma das causas desencadeantes da EPS.

Falando nos parâmetros bioquímicos inerentes a EPS, a alcalose cursando com hipocaliémia, aumenta a permeabilidade das membranas à difusão não iónica conduzindo a modificações ultra-estruturais, levando a uma libertação dos enzimas lisosómicos que poderia explicar a marcada elevação da actividade da NAG na EPS.

Entre os agentes que afectam a função do SNC temos ainda a considerar as amins biogénicas (octopamina e outras) que podem funcionar como falsos neurotransmissores.

Fisher et col.<sup>28</sup> sugeriram recentemente um modelo geral para o transporte dos enzimas lisosómicos em que os receptores fosfomanosil actuariam como veículos no transporte intracelular dos enzimas lisosómicos, verificando que as amins lisosomotrópicas, do tipo acima referido, alteram a reciclagem dos receptores, bloqueando a captação enzimática.

A luz deste conceito uma outra hipótese explicativa surgiria para o acentuado aumento observado na actividade da NAG na EPS.

Embora não havendo correlação da NAG com as clássicas provas de função hepática, este estudo sugere que os níveis da NAG em doseamentos sequenciais permitem seguir a evolução clínica da EPS. Serão necessários estudos mais com-

pletos com ensaios simultâneos de outras hidrolases lisosómicas para se avaliar da importância deste enzima como parâmetro válido no prognóstico da EPS e noutras intercorrências da doença hepática crónica.

## BIBLIOGRAFIA

- CAJIDOS A.: Enzymopathies (Cajidos, A., ed, 1971; vol 4: 107-212, Masson & Cie Paris).
- ARONSON N.N., DAVIDSON E.A.: Lysosomal Hyluronidase from Rat Liver. *J. Biol. Chem.* 1967; 242: 441-444.
- HULTERER F.: Degradation of Mucopolysaccharides by hepatic lysosomes. *Biochim Biophys Acta*, 1966; 115: 312-319.
- KOIZUMI T., NAKAMURA N., ABE H.: Changes in acid mucopolysaccharide in the liver in hepatic fibrosis. *Biochim et Biophys Acta*, 1967; 148: 749-756.
- KOIZUMI T., TOSHIBIKO S., NAMIO I., HIROSHI A.: Changes in N-acetyl- $\beta$ -glucosaminidase Activity in Hepatic Damage. *Biochim Biophys Acta*, 1968; 151: 628-636.
- ROJKIND M., DUNN A.: Hepatic Fibrosis. *Gastrent.* 1979; 76: 849-863.
- KOJIMA J., NAKAMURA N., KANATANI M., OHMORI K.: The glycosaminoglycans in human hepatic cancer. *Cancer Res.* 1975; 35: 542-547.
- REGLERO A., CARRETERO M.J., CABEZAS J.: Increased serum  $\alpha$ -L-Fucosidase and  $\beta$ -N-acetyl glucosaminidase activities in diabetic, cirrhotic and gastric cancer patients. *Clin Chim Acta*, 1980; 103: 155-158.
- GRESSNER A., ROEBRUCK: Predictive values of serum N-acetyl- $\beta$ -D-glucosaminidase for fibrotic liver disorders — Correlation with monoamine oxidase activity. *Clin Chim Acta*, 1982; 124: 315-326.
- LEABACK D.H., WALKER P.G.: Studies on glucosaminidase — the fluorimetric assay of N-acetyl- $\beta$ -glucosaminidase. *Biochim J.* 1961; 78: 151-156.
- PINTO M.C., MARQUES C., SILVA A.P., FERNANDES F., AZEVEDO M., LISBOA P., MANSO C.: Actividade da N-acetyl- $\beta$ -glucosaminidase (NAG) sérica na diabetes mellitus. *Acta Médica Portuguesa*, 1984; 5: 175-178.
- PINTO M.C., MARQUES C., SILVA L.P., ESTRADA A., ESPINOSA L., AZEVEDO M.S., MANSO C.: Estudo da actividade da  $\beta$ -N-acetilglucosaminidase sérica na hepatite viral aguda, 1984. *Revista Portuguesa de Gastrenterologia*, 1985; VIII-10: 187-195.
- HULTBERG B., ISAKSSON A., SJOBLAD S., OCKERMAN J.A.: Acid hidrolases in serum from patients with lysosomal disorders. *Clin Chim Acta*, 1979; 100: 33-38.
- ULLRICH K., GIESELMANN V., MERSMANN G., VonFIGURA K.: Endocytosis of Lysosomal Enzymes by Non-Parenchymal Rat Liver Cells. *Biochem J.* 1979; 182: 329-335.
- BLOUIN A., BOLENDER R.P., WEIBER E.R.: Distribution of organelles and membranes between hepatocytes and nonhepatocytes in the rat liver parenchyma. *J Cell Biol.* 1977; 72: 442-455.
- BERKEL T.J.C.: The role of non-parenchymal cells in liver metabolism. *TIBS Sep.* 1974; 202-205.
- KNOOR D.L., SLEYSER E.Ch.: Isolated Parenchymal Kupfer and Endothelial Rat Liver Cells Characterized by their Lysosomal Enzyme Content. *Biochim Biophys Res Commun*, 1980; 96: 250-57.
- STEER C., KUSIAK J., BRADY R.: Selective hepatic uptake of human  $\beta$ -hexosaminidase A by specific glycoprotein recognition system on sinusoidal cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1979; 76: 2774-2778.
- SCHLESINGER P., DOEBBER T., MANDELL B.: Plasma clearance of glycoproteins with terminal mannose and N-acetylglucosamine by liver non-parenchymal cells. *Biochem J.* 1978; 176: 103-109.
- KOIZUMI T., NAKAMURA N., ABE H.: Changes in acid mucopolysaccharide in the liver in hepatic fibrosis. *Biochim Biophys Acta*, 1967; 148: 749-756.
- KOIZUMI T., SUEMATSU T.: Synthesis and degradation of active sulfate in liver. *Biochim Biophys Acta*, 1969; 184: 106-113.
- PUGH D., WALKER P.G.: The localization of N-acetyl- $\beta$ -glucosaminidase in tissues. *J Histochemistry and Cytochemistry*, 1961; 9: 242-250.

23. NAKAMURA N., IWABORI N., KOIZUMI T.: Serum hyaluronidase activity in chronic liver damage. *Clin Chim Acta*, 1970; 27: 47-52.
24. KOIZUMI T., MITSUTANI N., KAWATA H., WADA M., YOSHIDA I.: N-acetyl- $\beta$ -glucosaminidase Activity in Hepatic Fibrosis. *Laboratory Investigation*, 1964; 13: 752-756.
25. KOIZUMI T., TOSHIHIKO S., IWABORI N., HIROSHI A.: Changes in N-acetyl- $\beta$ -glucosaminidase Activity in Hepatic Damage. *Biochim Biophys Acta*, 1968; 151: 628-636.
26. GILMORE I.T., HOFMANN A.F.: Altered drug metabolism and elevated serum bile acids in liver disease: a unified pharmacological explanation (editorial). *Gastroenterology*, 1980; 76: 177-179.
26. GILMORE I.T., HOFMANN A.F.: Altered drug metabolism and elevated serum bile acids in liver disease: a unified pharmacological explanation (editorial). *Gastroenterology*, 1980; 76: 177-179.
28. FISHER D., GONZALEZ-NORIEGA A., SLY W.: Phosphomanosyl-Enzyme Receptors in Rat Liver. *The Journal of Biol Chem*, 1980; 255: 9608-9615.

Pedido de Separatas:  
 Cristina Pinto  
 Instituto de Química Fisiológica  
 Faculdade de Medicina de Lisboa  
 1600 Lisboa