

Tesis de Posgrado

Fosfatasa ácida en cáncer de mama

Filmus, Jorge Eduardo

1983

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Químicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Filmus, Jorge Eduardo. (1983). Fosfatasa ácida en cáncer de mama. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1778_Filmus.pdf

Cita tipo Chicago:

Filmus, Jorge Eduardo. "Fosfatasa ácida en cáncer de mama". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1983.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1778_Filmus.pdf

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

"FOSFATASAS ACIDAS EN CANCER DE MAMA"

Autor: Jorge Eduardo Filmus

Director: Dr. José Mordoh

Lugar de trabajo: Hospital Mariano R. Castex

TESIS PRESENTADA PARA OPTAR AL TITULO DE DOCTOR EN CIENCIAS
QUIMICAS ORIENTACION QUIMICA BIOLOGICA.

1983

*Tesis
1778.
y. 3.*

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi agradecimiento:

Al Dr. José Mordoh, director de Tesis.

A Osvaldo Podhajcer, compañero de trabajo.

A la Dra. Silvia Moreno, Consejera de Estudios.

INDICE

	<u>Página</u>
<u>ABREVIATURAS</u>	1
<u>INTRODUCCION</u>	3
1. Enzimas y cáncer	3
2. Enzimas y cáncer de mama primario	7
3. Fosfatasas ácidas humanas, sus características	12
4. Utilidad clínica de las fosfatasas ácidas	22
5. Fosfatasas ácidas y cáncer de mama, antecedentes y objetivos de la investigación	29
<u>MATERIALES Y METODOS</u>	35
1. Obtención, preparación y clasificación de muestras	35
1.1. Preparación de muestras tisulares	35
1.2. Clasificación de los pacientes estudiados para la detección de metástasis óseas	36
1.3. Obtención de las muestras de leche humana y sepa- ración de la crema	36
2. Métodos experimentales	37
2.1. Electroforesis en gel de poliacrilamida	37
2.2. Contrainmunolectroforesis	38
2.3. Medición de la actividad de las FAC	39
2.4. Separación de la FAC tipo 4 de carcinoma mamario	41
2.5. Aislamiento del C-FAC	41
2.6. Incubación del C-FAC con detergentes	42

2.7. Extracción con butanol	42
2.8. Filtración por gel en presencia de urea o SDS	42
2.9. Purificación del C-FAC	43
2.10. Purificación de la FAC tipo 3	44
2.11. Estudio de la termoestabilidad de la FAC tipo 3	45
2.12. Determinación del pH óptimo	45
2.13. Aislamiento de la "FAC tipo 2" de la leche	45
2.14. Medición de proteínas	46
2.15. Medición de DNA	46
2.16. Medición de FALC	46
<u>RESULTADOS</u>	47
1. Análisis cuantitativo y cualitativo de las FAC no eritrocitarias en carcinoma primario, fibroadenoma y tejido normal de mama	47
1.1. Medición de la actividad total de FAC no eritrocitarias en sobrenadantes de 28.000 x g	47
1.2. Perfiles electroforéticos de FAC en geles de poliacrilamida	49
1.3. Reacción entre la FAC tipo 4 de carcinoma mamario y antisuero anti-FACP	51
2. Análisis de un complejo de alto peso molecular con actividad de FAC (C-FAC)	55
2.1. Columnas de Sepharose 6B	55
2.2. Estudios acerca de la posible asociación con lípidos	59

2.3. Estudios en torno a una posible agregación o polimerización proteica	60
2.4. Purificación del C-FAC	62
2.5. Presencia del C-FAC en otros tejidos	66
3. Aislamiento y estudio de diversas propiedades de la FAC tipo 3 de carcinoma y tejido normal mamario	68
3.1. Aislamiento de FAC tipo 3 de carcinoma y tejido normal mamario	69
3.2. Medición del PM de la FAC tipo 3 de carcinoma mamario	77
3.3. Especificidad de sustrato	77
3.4. Efecto de distintos compuestos sobre la capacidad de ambas FAC tipo 3 para hidrolizar PNFF	79
3.5. Afinidad respecto de PNFF, α -NF y β -GF	79
3.6. Termoestabilidad a 50°C y 60°C	82
3.7. Determinación del pH óptimo	82
4. Presencia de "FAC tipo 2" en la leche humana	86
4.1. Electroforesis en gel de poliacrilamida de la leche descremada	88
4.2. Separación de las FAC de la leche descremada	88
4.3. Algunas características de la "FAC tipo 2" encontrada en la leche descremada	91
5. Utilidad del dosaje de la FACTR en la detección de metástasis óseas	96

<u>DISCUSION</u>	102
1. Análisis cuantitativo y cualitativo de las FAC no eritrocitarias en carcinoma primario, fibro- adenoma y tejido normal mamario	102
2. Análisis del C-FAC	106
3. Estudio de diversas propiedades de las FAC tipo 3 aisladas de carcinoma y tejido normal mamario	108
4. Presencia de "FAC tipo 2" en la leche humana	113
5. Utilidad del dosaje de la FACTR en la detección de metástasis óseas	114
6. Conclusiones	118
<u>BIBLIOGRAFIA</u>	120

ABREVIATURAS

ALD	aldolasa
PK	piruvato quinasa
LDH	láctico deshidrogenasa
HK	hexoquinasa
FACP	fosfatasa ácida prostática
G6PD	glucosa-6-fosfato deshidrogenasa
DMBA	dimetilbencilantraceno
PFK	fosfofructoquinasa
GPI	glucosafosfato isomerasa
FAC	fosfatasa ácida
PM	peso molecular
PNFF	p-nitrofenilfosfato
α -NF	α -naftilfosfato
β -NF	β -naftilfosfato
β -GF	β -glicerofosfato
TFF	timolftaleinfosfato
AMP	adenosina-3'-monofosfato
ASBI-F	naftol-ASBI fosfato
ADP	adenosina difosfato
ATP	adenosina trifosfato
PPi	pirofosfato inorgánico
G1F	glucosa-1-fosfato
G6F	glucosa-6-fosfato

CF	colina fosfato
RIE	radioinmunoensayo
LRE	leucemia retículoendotelial
FF	fenil fosfato
FACTR	fosfatasa ácida tartrato resistente
FALC	fosfatasa alcalina
SDS	dodecil sulfato de sodio
ASB	albúmina sérica bovina
BTS	buffer Tris-sulfato
CIE	contrainmunolectroforesis
C-FAC	complejo de alto peso molecular con actividad de fosfatasa ácida
Vo	volumen muerto
TTP	timidina trifosfato

INTRODUCCION

1. Enzimas y Cáncer

Desde hace ya muchos años numerosos investigadores están estudiando la enzimología de los tumores malignos. Dichos investigadores han adecuado el enfoque y la metodología empleada de acuerdo con los distintos objetivos que han estimulado el estudio de las enzimas en el cáncer.

Además de los trabajos de carácter básico, que han apuntado a conocer mejor la maquinaria bioquímica y el metabolismo de la célula maligna, la mayoría de las investigaciones se han orientado fundamentalmente hacia:

a) Encontrar las enzimas "clave" del metabolismo de la célula tumoral de forma tal de ubicar a los principales "blancos" que debería tener un tratamiento quimioterápico para ser efectivo.

b) Detectar la aparición de cambios cualitativos y/o cuantitativos en la maquinaria enzimática de la célula maligna respecto de la célula normal correspondiente que puedan ser útiles para el desarrollo de técnicas de diagnóstico y seguimiento de los pacientes con cáncer. Estos estudios involucran, por lo tanto, no sólo el análisis de las enzimas en el tejido tumoral sino también en los fluidos orgánicos de los pacientes.

c) Utilización de los cambios cualitativos y/o cuantitativos señalados en b) para el desarrollo de factores pronóstico en pacientes con distintos tipos de cáncer.

d) Comparación de la maquinaria bioquímica de los tumores primarios y sus respectivas metástasis. Esto tiene gran importancia tanto en el estudio del origen clonal de las metástasis como en el análisis de los mecanismos de resistencia al tratamiento con quimioterápicos.

Si bien han sido ingentes los esfuerzos desplegados en estas investigaciones y hoy contamos con una enorme masa de datos, existe todavía poca claridad en torno a los conceptos básicos de la enzimología del cáncer (Weinhouse, 1982). Esto se debe en parte a que por lo general es muy difícil conseguir muestras adecuadas en cantidad suficiente, sobre todo en lo que respecta a ciertos tejidos normales con los que se compara a los tumorales. Por otro lado, la mayoría de las muestras obtenidas de los tumores primarios son heterogéneas, incluyendo las mismas, además de células tumorales, células normales, material necrótico, grasa, etc. (Shonk y Boxer, 1967).

La utilización de tumores experimentales en animales de laboratorio ha sido cuestionada ya que, si bien muchos de ellos no presentan los problemas descriptos para los tumores humanos, está claramente demostrado que la mayoría de los tumores experimentales difieren netamente desde el punto de vista metabólico respecto de los tumores humanos. Sólo en algunos casos se han

encontrado semejanzas en diversos aspectos (Hilf, 1971).

Distintas teorías y esquemas han sido elaborados por diferentes autores para dar un ordenamiento a los cambios cuantitativos observados en las enzimas del tejido maligno respecto del normal. Los trabajos que más claridad han traído en ese sentido han sido los de G. Weber (1977a; 1977b). Este autor estudió las enzimas participantes en el metabolismo de los nucleótidos y los hidratos de carbono denominando enzimas "clave" a aquellas que determinan la intensidad de un camino metabólico dado. Sus estudios se desarrollaron fundamentalmente en hepatoma Novikoff de ratón pero luego su validez se extendió al hepatoma humano y al carcinoma renal humano. Weber encontró, por un lado, una clara correlación entre el aumento de la actividad de las enzimas "clave" del anabolismo de los nucleótidos, el descenso de las del catabolismo de los mismos y la velocidad del crecimiento del tumor. Por otro lado, también encontró una buena correlación entre el aumento de la actividad de las enzimas "clave" de la glicólisis, el descenso de las de la gluconeogénesis y la velocidad del crecimiento del tumor.

Weber propuso que este desbalance enzimático es consecuencia de la reprogramación de la expresión genética en la célula maligna y verificó que los cambios producidos en las células hepáticas tumorales definen un perfil enzimático global distinto al de la célula hepática fetal o de hígado en regeneración.

En lo que respecta a los cambios cualitativos en la maquinaria enzimática de la célula maligna, diversos autores han detectado el resurgimiento de formas enzimáticas (y más en general, de proteínas) fetales. La reaparición de dichas formas enzimáticas se produce en forma simultánea a la desaparición de las respectivas isoenzimas características de los tejidos diferenciados (Weinhouse, 1982). Este tipo de alteración cualitativa de las enzimas de la célula tumoral se ha verificado con aldolasa (ALD), piruvato kinasa (PK), láctico deshidrogenasa (LDH), β -hexosaminidasa, hexoquinasa (HK) y otras enzimas menos estudiadas hasta el momento (Ibsen y Fishman, 1979; Shapira, 1981; Weinhouse, 1982).

Por ahora se cree que en el fenómeno de la reaparición de las isoenzimas fetales están involucrados mecanismos de regulación de la transcripción y también modificaciones post-transcripcionales (Shapira, 1981).

Respecto del dosaje de enzimas en los fluidos orgánicos de pacientes con cáncer los resultados obtenidos hasta el presente indican que algunas enzimas pueden ser útiles fundamentalmente para el seguimiento de la enfermedad, es decir, para la detección de recidivas, metástasis o respuesta a un determinado tratamiento. Uno de los ejemplos más claros en este sentido es el de la fosfatasa ácida prostática (FACP). En lo que hace a la utilidad del dosaje de enzimas para la detección precoz de la presencia de tumores, los resultados hasta el momento no han sido alentadores. Esto es explicable, ya que no basta con que una dada en

zima cambie cualitativa o cuantitativamente en la célula tumoral sino que es necesario que esa enzima se vuelque a la circulación en cantidades suficientes como para ser detectable. Parece ser que por lo general esto ocurre cuando el tumor ha alcanzado un tamaño que lo hace clínicamente diagnosticable. De todos modos el desarrollo de técnicas inmunoquímicas, con mucha mayor sensibilidad y especificidad para el dosaje de enzimas que las técnicas tradicionales, sigue estimulando nuevas investigaciones. Uno de los aspectos que se tiene particularmente en cuenta al respecto es que la eventual utilidad de alguna enzima o isoenzima como marcador tumoral está notoriamente incrementada si los cambios cualitativos y/o cuantitativos que se detectan son específicos de un determinado tipo de tumor, es decir que dichos cambios no se presentan en otras patologías o en otro tipo de tumor.

2. Enzimas y cáncer de mama primario

Los problemas reseñados en torno a las muestras de tejido maligno y normal humano respecto del análisis y comparación de sus respectivos perfiles enzimáticos están presentes, con sus propias peculiaridades, en el análisis del tejido mamario. En particular es muy importante el problema de la heterogeneidad de la muestra por lo que se recomienda tomar todas las precauciones posibles para reducir dicha heterogeneidad al mímo (Hilf, 1973).

Tomando estas precauciones Hilf y col. (1970) fraccionaron una muestra de carcinoma mamario en 8 porciones y midieron en cada una glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PD), PK y DNA. La variabilidad obtenida entre las distintas mediciones fue aceptable dado que en ningún caso la desviación standard superó el 10% del valor promedio respectivo. La variabilidad en el tejido normal resultó algo mayor, fruto tal vez de las bajas concentraciones presentes.

Dado que el tejido normal mamario puede presentar en ciertos casos menor celularidad que el tejido maligno, conteniendo en cambio mayor cantidad de grasa, diversos autores han discutido en torno a cómo expresar con fines comparativos las actividades enzimáticas medidas en ambos tipos de tejido. Si bien lo más frecuente es encontrar a dichas actividades expresadas por mg de proteína, R. Hilf (1973) ha propuesto que lo que más se aproxima a una medición normalizada respecto al número de células (que es lo deseable cuando uno quiere comparar a la célula maligna con la normal) es la expresión de las actividades enzimáticas por mg de DNA. Si bien el autor admite que la poliploidía de las células tumorales puede introducir un factor de error, estima que este error es menor que el que se produce utilizando otras formas de expresión.

De todos modos, con numerosas enzimas es posible confirmar los resultados obtenidos con métodos bioquímicos a partir de los homogenatos tisulares, utilizando técnicas histoquímicas. Dichas técnicas, si bien son semicuantitativas, permiten

observar directamente sobre el tejido el grado de actividad enzimática en cada célula, lo cual hace posible no sólo la comparación entre célula maligna y célula normal sino que permite también tener información sobre la homogeneidad en la distribución de la actividad enzimática.

Con respecto a la utilidad de los estudios en tumores mamarios inducidos en roedores se puede decir que se han encontrado notorias diferencias entre los perfiles enzimáticos de éstos y los de los carcinomas mamarios humanos. De todos modos se han podido demostrar ciertas similitudes metabólicas entre el carcinoma inducido con dimetilbencilantraceno (DMBA) en roedores y el carcinoma humano mamario (Hilf, 1971).

Hasta el presente se han publicado varios trabajos acerca de la medición de diversas enzimas en el tejido maligno humano y su comparación con los niveles de actividad que se han encontrado tanto en el tejido normal mamario como en el tumor benigno mamario.

Si bien se han empleado técnicas diferentes que incluyen distintas formas de dosaje bioquímico e histoquímico, hay coincidencia generalizada respecto del incremento en el tejido maligno de diversas enzimas que intervienen en el aprovechamiento de los hidratos de carbono. Dentro de las enzimas en las que se verificó incremento respecto del tejido normal se incluyen las denominadas enzimas "clave" de Weber: G6PD, PK, fosfofructoquinasa (PFK) y hexoquinasa (HK) (Deshpande y col., 1977; Hilf y col., 1973; Hilf y col., 1970; Dutu y col., 1979; Livni y

Laufer, 1975; Larner y Rutherford, 1978; Hilf, 1973; Joplin y Jegatheesan, 1962). La única enzima vinculada al aprovechamiento de los hidratos de carbono que mostró una disminución significativa de su actividad en el tejido maligno fue la α -glicerofosfato deshidrogenasa (Deshpande y col., 1977; Hilf y col, 1973).

Por otro lado, las técnicas histoquímicas revelaron que no todas las células malignas presentan el mismo grado de tinción indicando, tal vez, distintos niveles de diferenciación o de actividad metabólica (Dutu y col, 1979). Cambios similares a los observados en el carcinoma primario se observaron también en metástasis ganglionares (Szutowicz y col., 1979).

Respecto de los niveles enzimáticos en tumores benignos como la enfermedad fibroquística y el fibroadenoma, si bien ciertos autores han encontrado en algunas enzimas niveles intermedios entre el tejido normal y el carcinoma (Deshpande y col., 1977; Szutowicz y col., 1979), predominan los resultados que no muestran diferencias significativas entre el tejido normal y los tumores benignos (Hilf y col, 1973; Hilf, 1973; Livni y Laufer, 1975).

Además de las enzimas vinculadas al metabolismo de los hidratos de carbono y de diversas enzimas hidrolíticas (sobre las que se hablará en la próxima sección) también se han comparado los niveles de glicosil transferasas y de enzimas involucradas en diversos procesos anabólicos. En particular, se han encontrado significativos incrementos en el tejido maligno respecto del normal de la actividad de sialiltransferasa (Bosmann

y Hall, 1974), aspartatoamino-transferasa (Hilf y col., 1977) y NADPH reductasa (Koudstaal y col., 1975a; Dutu y col, 1979).

Diversos autores han tratado de establecer si diferentes características del tumor o del paciente tienen influencia sobre los cambios detectados en el perfil enzimático tumoral. En ese sentido, no se ha encontrado correlación con el tipo histológico del tumor ni con la edad del paciente (Hilf y col., 1973). Tampoco parece haber una correlación clara entre el contenido de receptores estrogénicos y los niveles enzimáticos (Hilf y col., 1973).

Por otro lado, resultados preliminares (Savlov y col., 1981) mostraron recientemente que pacientes que no responden a tratamientos poliquimioterápicos presentaban en el tumor actividades más bajas de LDH, G6PD y glucosafosfato isomerasa (GPI) que las encontradas en tumores de pacientes que respondían a tratamientos similares.

Es poco lo que se conoce respecto a la reaparición de enzimas fetales en el carcinoma mamario humano. Goldman y col. (1964) encontraron aumentos de la LDH tipo M en tumores malignos respecto de los tumores benignos, aunque no está claro si se trata de la reaparición de una enzima fetal. En tumores mamarios de rata, por otro lado, se ha informado de la reaparición de glutaminasa tipo K, carbamilsfosfato sintetasa tipo II y HK tipo III (Ibsen y Fishman, 1979).

Hasta el momento no se ha encontrado ninguna enzima cuya presencia en la sangre pueda ser útil para el diagnóstico del

cáncer primario de mama. Incluso enzimas que están aumentadas en el tejido tumoral mamario como la sialiltransferasa presentan niveles séricos en los pacientes que no son significativamente más altos que en los normales (Ip y Thomas, 1978; Lee y col., 1980).

3. Fosfatasas ácidas humanas, sus características

Con el nombre de fosfatasas ácidas (FAC) (EC 3.1.3.2.) se designa a un conjunto de enzimas que se caracterizan por hidrolizar una gran variedad de ésteres fosfóricos a pH ácido.

Si bien se han publicado una gran cantidad de trabajos acerca de los distintos tipos de FAC, hasta el momento no existe una clasificación de las mismas que cuente con un consenso generalizado. Esto se puede deber, en parte, a que por lo general no se conocen los sustratos fisiológicos sobre los que actúan dichas enzimas, y a que, por otro lado, se sabe poco acerca de la estructura de las mismas así como de los locus genéticos de los cuales provienen.

A falta de criterios mejores Sensabaugh (1975) propuso una clasificación de las FAC humanas en base a los pesos moleculares (PM). En función de los mismos dividió a las FAC en 4 grupos. En el primer grupo incluyó a las de PM mayor que 200.000, en el segundo a las de PM entre 80.000 y 180.000, en el tercero a las de PM entre 30.000 y 60.000 y en el cuarto a las de PM entre 13.000 y 18.000.

Las FAC que tienen mayor importancia desde el punto de vista clínico están ubicadas en el segundo y tercer grupo.

Li y col. (1970a) desarrollaron un sistema que, utilizando electroforesis en geles de poliacrilamida a pH ácido, permite clasificar a las FAC del segundo y tercer grupo en 5 tipos, denominados de acuerdo con su movilidad creciente hacia el cátodo como tipo 1, 2, 3, 4 y 5. Para el desarrollo de este trabajo se ha utilizado básicamente este sistema ya que se ha verificado que es el más adecuado para estudios orientados hacia la utilidad clínica de las FAC. Corresponde también señalar que este sistema funciona en forma similar si en lugar de geles de poliacrilamida se usan geles de acetato de celulosa (Lafuente y col., 1979).

Las FAC tipo 1, 2, 3 y 4 corresponden al segundo grupo de la clasificación de Sensabaugh y la tipo 5 corresponde al tercer grupo.

La FAC tipo 2, más conocida como FACP, es la que ha sido más ampliamente estudiada dada su utilidad para el diagnóstico y seguimiento de pacientes con cáncer prostático.

Se encuentra fundamentalmente en próstata y plasma seminal, aunque también está presente en pequeñas cantidades en neutrófilos (Li y col., 1970a; Li y col. 1970b), monocitos (Li y col., 1973), páncreas y bazo (Lam y col., 1973). Se ha verificado que se trata de una glicoproteína con una cantidad variable de grupos de ácido siálico. Esto se manifiesta en que presenta una banda ancha en corridas electroforéticas y en que, al

someterla a isoelectroenfoque, se separa en varias bandas las cuales desaparecen si se preincuba a la enzima con neuraminidasa (Ostrowski y col., 1970). Su PM está entre 87.000 y 100.000 D según distintos autores, correspondiendo aproximadamente el 8% del mismo a hidratos de carbono (Li y col., 1970b; Derechin y col., 1971; Lam y col., 1973). Se ha comprobado además que está compuesta por 2 subunidades iguales (Derechin y col., 1971).

Esta enzima posee poca especificidad respecto del sustrato ya que hidroliza una gran variedad de ésteres monofosfóricos: p-nitrofenilfosfato, (PNFF), α -naftilfosfato (α -NF), β -naftilfosfato (β -NF), β -glicerofosfato (β -GF), timolftaleínfosfato (TFF), adenosina-3'-monofosfato (AMP) y naftol ASBI-fosfato (ASBI-F). Por otro lado la FACP no hidroliza o hidroliza muy poco pirofosfatos como adenosina difosfato (ADP), adenosina trifosfato (ATP) y pirofosfato inorgánico (PPi) y azúcares fosfato como glucosa-1-fosfato (G1F), glucosa-6-fosfato (G6F) y fructosa-1, 2-difosfato (Kilsheimer y Axelrod, 1957; Smith y Whitby, 1968; Li y col., 1970b; Lam y col., 1973; Saini y Van Etten, 1978a). Un aspecto que parece diferenciar a este tipo de FAC de los otros es que hidroliza colina fosfato (CF) (Seligman y col., 1975; Saini y Van Etten, 1978a), compuesto que abunda en el plasma seminal (Lundquist, 1947).

Se ha observado también que esta enzima es fuertemente inhibida por (+) tartrato, fluoruro, fosfato, arsenato, vanadato y molibdato en tanto que es poco afectada por formaldehído 1%

(Smith y Whitby, 1968; Li y col., 1970b; Lam y col., 1973).

Derechín y col., (1971) verificaron, por otra parte, que la FACP tiende a disociarse y agregarse simultáneamente a pH muy ácidos o muy básicos observándose que es mayor la tendencia a la agregación al aumentar la fuerza iónica.

Otra característica de la FACP consiste en ser constantemente secretada desde las células de la próstata hacia el fluido prostático, cosa que se evidencia a través de la presencia en dichas células de numerosas vacuolas secretorias con gran cantidad de FACP. Este proceso secretorio estaría regulado por andrógenos (Hoffman y Dipietro, 1972; Choe y col., 1980).

La FAC tipo 4 fue encontrada en próstata (aunque en mucho menor proporción que la 2), neutrófilos, monocitos, bazo, hueso y piel (Li y col., 1970a; Li y col. 1970b; Heyden y col., 1977; Lam y col., 1982a). Su PM es de 90.000 D (Axline, 1968) y no posee grupos glicosídicos en su molécula, presentando una banda bien definida en electroforesis en gel de policrilamida (Lam y col., 1980b).

Existen escasos conocimientos acerca de las propiedades enzimáticas de la FAC tipo 4. Se sabe que hidroliza bien PNFF, α -NF, y TFF y que es inhibida por (+) tartrato (Li y col. 1970b; Lam y col., 1973). Por otro lado se ha verificado que es antigénicamente similar a la FAC tipo 2 ya que reacciona con antisueros preparados contra la misma. Esto se ha observado tanto mediante radioinmunoensayo (RIE) (Lam y col., 1979) como inmunodi-

fusión (Lam y col., 1980b). Además, cuando se trata a la FAC tipo 2 con neuraminidasa y se la somete a electroforesis en gel de poliacrilamida la movilidad de la enzima se acerca a la de la FAC tipo 4 aunque no llega a alcanzarla. Corresponde aclarar que con la neuraminidasa no se logra eliminar a todos los grupos glicosídicos, cosa que se comprueba al presentar todavía la FAC tratada con neuraminidasa tinción positiva para grupos glicosídicos. Por todo lo descrito se ha sugerido que la FAC tipo 2 sería el resultado de la glicosilación de la FAC tipo 4 (Lam y col., 1980b).

La FAC tipo 3 se encuentra en casi todos los tejidos, es la FAC típicamente lisosomal (Lam y col., 1973; Lam y col., 1982a).

Entre las células de la sangre, los linfocitos y las plaquetas son especialmente abundantes en esta enzima, en cambio los neutrófilos y los monocitos casi no la poseen (Li y col., 1970b).

Distintos autores han asignado a la FAC tipo 3 un PM que oscila entre 93.000 y 105.000 D, presentando 2 subunidades iguales de PM entre 50.000 y 52.000 D (Dipietro y Zengerle, 1967; Li y col., 1970b; Saini y Van Etten, 1978b).

En general su comportamiento respecto a los distintos sustratos es similar al de la FAC tipo 2 y lo mismo ocurre respecto del efecto inhibitorio de diferentes compuestos. La diferencia más notable con respecto a la FAC tipo 2 es la incapacidad de la 3 para hidrolizar CF (Saini y Van Etten, 1978b). Por otro lado, parece tener mayor cantidad de grupos glicosídicos que aquélla

(Saini y Van Etten, 1978a). Un aspecto importante para destacar es que la FAC tipo 3 es antigénicamente distinta a la tipo 2 dado que no reacciona contra antisueros preparados contra dicha enzima (Lam y col., 1979; Choe y col., 1980; Shaw y col., 1982).

Acerca de la FAC tipo 1 se han hecho pocos estudios aunque parece estar presente en la mayoría de los tejidos (Lam y col., 1973). Se la ha descrito unida a membranas microsomales y lisosomales (Tunis y col., 1973; Lam y col., 1976; Lam y col., 1982a) y sólo aparece en el citosol si previo a la centrifugación del homogenato tisular se trata al mismo con alta concentración de detergente (el Tritón X-100 parece ser el más efectivo) (Lillehoj y col., 1982; Lam y col., 1982a). Su PM se estimó en 180.000 D estando compuesta por 2 subunidades de 67.000 y 111.000 D, ambas unidas a cadenas glicosílicas (Tunis y col., 1973). Las propiedades enzimáticas que se han estudiado de la FAC tipo 1 nos muestran un comportamiento similar al de la FAC tipo 3 (Li y col., 1970b; Robinson y Glew, 1980b).

La FAC tipo 5 tiene propiedades notoriamente distintas a las 4 primeras. Su PM ha sido estimado en 30.000 D por distintos autores (Lam y col., 1981; Robinson y Glew, 1980a). Se la ha encontrado en osteoclastos, en células "vellosas" de leucemia retículoendotelial (LRE) y en bazo de pacientes con enfermedad de Gaucher (Li y col., 1970b; Anderson y Toverud, 1979; Vaes, 1968; Lam y col., 1982a). También está presente en suero y más adelante analizaremos las circunstancias que pueden determinar un incre

mento de esta forma de FAC en el mismo.

Intracelularmente parece ubicarse tanto en los lisosomas como en el retículo endoplasmático (Katayama y col., 1972; Vreven y col., 1973; Lam y col., 1976).

Una de las características de esta FAC que la diferencia de las del 2º grupo de Sensabaugh es su resistencia a la inhibición con (+) tartrato (Li y col 1970b; Sensabaugh, 1975). Por otro lado, al igual que las FAC de dicho grupo, la tipo 5 es inhibible por fluoruro y molibdato y es resistente al formaldehído 1% (Li col., 1970b; Lam y Yam, 1977).

Otro aspecto que distingue a esta enzima de las del 2º grupo es que no hidroliza ésteres de alcoholes alifáticos como el β -GF y si lo hace en cambio con nucleósidos difosfatos y nucleósidos trifosfatos y ciertas fosfoproteínas (Lam y col., 1977; Lam y Yam, 1977). En este sentido se parecería a otras pirofosfatasas aisladas de E. Coli y levaduras, aunque se diferencia de las mismas por otras propiedades (Lam y Yam, 1977). Esta enzima, además, es activa respecto de PNFF, TFF, fenilfosfato (PF), α -NF y β -NF y es inactiva respecto de AMP (Hoffman y Dipietro, 1972; Lam y col., 1977; Lam y col., 1980a).

Desde el punto de vista antigénico la FAC tipo 5 es distinta a la tipo 2, y antisueros de ambas enzimas no reaccionan en forma cruzada con la otra (Lam y col., 1980b; Shaw y col., 1982).

La FAC tipo 5 se ha podido separar mediante electrofore-

sis en geles de poliacrilamida en 2 subtipos denominados 5a y 5b (Lam y col., 1978b). El subtipo b es el que está en osteoclastos y en células "vellosas" de LRE (Lam y col., 1982a) en tanto que el subtipo a es el que predomina en el bazo de pacientes con enfermedad de Gaucher (Lam y col., 1981). Se ha verificado que ambas enzimas tienen PM parecido y que son antigénicamente similares dado que reaccionan en forma cruzada con sus respectivos antisueros (Lam y col., 1980a). También poseen, con algunas pocas excepciones, propiedades bioquímicas similares. Al tratar a la 5a con neuraminidasa ésta pasa a tener la misma electromovilidad que la 5b. En cambio la 5b no altera su electromovilidad al ser tratada con neuraminidasa. Esto ha llevado a proponer que la FAC 5a sería producto de la glicosilación de la 5b (Lam y col., 1981).

Las FAC incluidas en el 4º grupo de la clasificación de Sensabaugh (PM entre 13.000 y 18.000 D) fueron conocidas en un principio como FAC eritrocitarias aunque luego se demostró la presencia en otros tejidos humanos de FAC con propiedades similares a las eritrocitarias (Sensabaugh, 1975).

Estas FAC, que son fundamentalmente citoplasmáticas (Avila y Convit, 1973; Sensabaugh, 1975), tienen una mayor especificidad de sustrato que las otras. No hidrolizan α -NF, β -GF, CF y TFF entre otros y hasta el momento el único sustrato fisiológico respecto del cual se demostró que son activas es el flavín mononucleótido (Sensabaugh, 1975). En placenta se vio que hidrolizan

estradiol fosfato (Dipietro, 1968; Dipietro, 1971) aunque no se ha demostrado la existencia de tal sustrato en dicho tejido. Estas FAC hidrolizan también otros sustratos no naturales como PNEF, β -NF y FF (Avila y Convit, 1973; Taga y Van Etten, 1982). No son inhibibles por (+) tartrato, fluoruro, molibdato y etanol 10% mientras que son fuertemente afectadas por formaldehído 1% y compuestos que se caracterizan por reaccionar con grupos sulfhidrúlicos (p-cloromercuribenzoato, iones de metales pesados, N-etilmaleimida, iodoacetato, etc.) (Dipietro, 1971; Sensabaugh, 1975; Avila y Convit, 1973; Taga y Van Etten, 1982). Por otro lado, son estimuladas por 6-metiladenina y otras purinas (Dipietro, 1971; Sensabaugh, 1975).

En eritrocitos se ha verificado que estas FAC presentan polimorfismo genéticamente determinado (Swallow y col., 1973).

Desde el punto de vista antigénico es importante mencionar que no presentan reacción cruzada contra antisueros anti-FACP (Shaw y col., 1982).

Acerca de las FAC del 1º grupo (PM mayor que 200.000 D) se conoce muy poco. Se las ha encontrado en diversos tejidos humanos (Dipietro y Zengerle, 1967; Rehkop y Van Etten, 1975; Sensabaugh, 1975) pero todavía no está claramente establecido si se trata de agregados de FAC de PM menores. La que se encontró en placenta, sin embargo, es inhibida sólo un 50% por concentraciones de (+) tartrato y fluoruro que inhiben casi un 100% a las FAC del 2º y 3º grupo. Por otro lado, su afinidad por distintos

sustratos parece ser similar a las de las FAC de dichos grupos (Dipietro y Zengerle, 1967).

Investigaciones efectuadas con las FAC tipo 2 (de próstata) y tipo 3 (de hígado) han indicado un mecanismo de acción similar para ambas enzimas. De acuerdo con el mecanismo propuesto, el fosfato del sustrato se uniría a un residuo histidínico de la enzima formando un enlace covalente y provocando así la separación del fosfato de la molécula del sustrato. La posterior etapa de la reacción sería la desfosforilación de la fosforil enzima intermediaria (Hickey y Van Etten, 1972; Van Etten y col., 1974; Mc Tigue y Van Etten, 1978; Van Etten, 1982). Teniendo en cuenta este mecanismo se ha sugerido que compuestos como (+) tartrato, molibdato y vanadato actuarían como inhibidores competitivos de estas enzimas porque forman estructuras análogas a las del estado de transición (fosforil enzima) (Van Etten y col., 1974; Van Etten, 1982).

Las denominadas FAC eritrocitarias parecen tener, en cambio, un mecanismo de acción distinto aunque se conoce poco al respecto. Por lo pronto es un grupo cisteínico de la enzima, y no histidínico, el que juega un rol fundamental en el mecanismo de acción (Anderson y Toverud, 1979; Laidler y col., 1982). Esto explicaría por qué esta enzima no es sensible a la inhibición con (+) tartrato o molibdato y es inhibible en cambio por compuestos que reaccionan con grupos tiólicos (Anderson y Toverud, 1979).

Con respecto al origen genético de las FAC hay que señalar que por ahora se han identificado dos locus: uno, ubicado en el cromosoma 2, codifica para las FAC eritrocitarias (Swallow y col., 1973), el otro, ubicado en el cromosoma 11 codifica para las FAC lisosomales (Shows y col., 1976). Hasta el momento no se ha logrado identificar al locus correspondiente a la FACP. Si bien algunos autores han sugerido que esta enzima podría provenir del mismo locus que las FAC lisosomales, los estudios antigénicos sugieren que la FACP es el producto de un gen estructural distinto (Choe y col., 1980). Sobre las otras FAC no se posee hasta ahora ningún dato sobre los respectivos locus genéticos.

Finalmente, corresponde señalar que, de acuerdo con la información disponible, no se han presentado en la literatura hasta el presente datos acerca de la existencia en algún tejido humano de FAC típicas del desarrollo fetal. Por el contrario, en un estudio se ha demostrado que próstatas fetales humanas poseen el mismo perfil electroforético que las próstatas del adulto (Reif y col., 1973).

4. Utilidad clínica de las fosfatasas ácidas

Desde hace ya mucho tiempo se conoce que distintas patologías pueden producir un incremento en la FAC total sérica o plasmática. Sin embargo, fue a partir del descubrimiento de que

a distintas patologías correspondían aumentos de distintos tipos de FAC que se pudo aprovechar mucho más a dicha enzima con fines clínicos.

Mediante el sistema electroforético de Li y col. (1970a) se ha verificado que el plasma normal posee FAC tipo 5 y que en el suero normal suele haber además FAC tipo 3, la cual se libera de las plaquetas al producirse el coágulo. Si bien mediante RIE se han detectado pequeñísimas cantidades de FAC tipo 2 en el suero normal, a los fines prácticos dicho hallazgo carece de relevancia (Griffiths, 1980).

Sin lugar a dudas la mayor importancia clínica de las FAC ha estado vinculada con su utilidad para el diagnóstico y seguimiento de los pacientes con cáncer prostático. Desde que Gutman y col. en 1938 encontraron una elevación de la FAC total en el suero de pacientes con cáncer de próstata avanzado se efectuaron numerosos estudios que han llevado a que hoy el dosaje sérico de la FACP sea un ensayo de rutina en los laboratorios de análisis clínicos.

Si bien, como hemos señalado, las FAC están ampliamente distribuidas en los tejidos humanos, la próstata se caracteriza no sólo por ser 1.000 veces más rica en FAC que cualquier otro órgano (Reiner y col., 1957; Yam, 1974) sino también por tener como FAC más abundante a la denominada FACP (o FAC tipo 2 según la clasificación de Li), la cual está ausente en la mayoría de los otros tejidos.

Esta FACP es normalmente secretada desde la próstata hacia el plasma seminal, el cual es, por lo tanto, una excelente fuente para la obtención de dicha enzima.

A partir del descubrimiento de Gutman se planteó la búsqueda de métodos que permitiesen diferenciar a la FACP de las otras FAC que por distintos motivos también podrían estar presentes en la sangre. Abul-Fadl y King (1949) fueron los primeros en observar que la FACP y las FAC de eritrocitos diferían en su sensibilidad a distintos inhibidores así como en su afinidad por diversos sustratos. En 1953 Fishman y Lerner propusieron utilizar la inhibición con (+) tartrato para medir en forma específica la FACP cosa que fue universalmente aceptada y aún actualmente este método, con pequeñas variaciones, es el que más se usa en la rutina.

Sin embargo, tal como hemos señalado más arriba, el (+) tartrato no sólo inhibe a la FACP sino que también lo hace con las FAC tipo 1, 3 y 4, las que están presentes en numerosos tejidos además de la próstata. Esto podría dar lugar, en caso de otras patologías que provoquen el incremento de dichas FAC en el suero, a falsos positivos en el diagnóstico y seguimiento de los pacientes con cáncer prostático. Si bien este problema no se plantea cuando se trata de pacientes con cáncer avanzado, donde el incremento de la FACP es por lo general muy grande, en casos de enfermedad poco avanzada, donde la elevación de la FACP sérica es menor, pueden producirse dichos falsos positivos. Es-

to ha hecho que numerosos investigadores buscaran algún sustrato específico para la FACP que fuera útil para los ensayos clínicos, cosa que hasta el momento no se ha conseguido (recién se está empezando a efectuar los primeros ensayos clínicos empleado CF) (Shaw y col., 1982).

El descubrimiento de que la FACP es antigénicamente distinta a las otras FAC que también pueden aparecer en el suero (FAC tipo 3, tipo 5 y FAC eritrocitarias) abrió las posibilidades para el desarrollo de métodos inmunoquímicos que son por lo general más sensibles y específicos (Shulman y col., 1964). El problema de la sensibilidad tiene especial importancia para el dosaje de marcadores tumorales como la FACP, dado que es bien conocida la relevancia que tiene para el éxito terapéutico en el cáncer su diagnóstico precoz.

En 1977 Foti y col. desarrollaron por primera vez un RIE para el dosaje de FACP y posteriormente se produjeron una gama diversa de inmunoensayos (Chu y col., 1978; Bruce y col., 1979; Lee y col., 1978; Shaw y col., 1981).

Con estos métodos se ha alcanzado últimamente casi el 100% de especificidad (Shaw y col., 1982). Los poquísimos casos de falsos positivos pueden ocurrir en pacientes con leucemias granulocíticas u otras granulocitosis en las cuales también hay un incremento de la FAC tipo 2 en el suero (como ya hemos dicho los granulocitos son ricos en dicho tipo de FAC) (Li y col., 1973; Yam y col., 1981). De todos modos, estos casos son fácilmente

diferenciables de las patologías prostáticas.

Respecto de los falsos negativos, si bien todavía hay resultados contradictorios en torno al porcentaje de detección en los estadios tempranos de cáncer de próstata (es decir, cuando todavía no salió de la cápsula) en general se estima que los métodos inmunoquímicos detectan un mayor porcentaje de casos precoces (no palpables) que los métodos tradicionales (Foti y col., 1977; Chu y col., 1978; Bruce y col., 1979; Bruce y Mahan, 1982).

En cuanto a los estadios más avanzados, los distintos autores informan que no se ha podido eliminar alrededor de un 15 a un 20% de falsos negativos, aún en tumores diseminados (Chu y col., 1978; Shaw y col., 1982; Griffiths, 1982).

Es importante destacar también que los pacientes con hipertrofia prostática benigna también presentan un gran porcentaje de casos con niveles elevados de FACP en el suero, aunque los valores no son tan altos como cuando existen carcinomas extracapsulares (Shaw y col., 1982; Bruce y Mahan, 1982).

Los antisueros anti-FACP también se usaron para desarrollar métodos inmunohistoquímicos. En general todos los tumores ya sea primarios o metastásicos dan tinción positiva con estos métodos (Nadji y col., 1980; Shaw y col., 1982). Es importante destacar, sin embargo, que los tumores más diferenciados presentan una tinción mucho mayor que los indiferenciados, los cuales manifiestan una actividad atenuada e irregularmente distribuída

(Li y col., 1980). Esto coincide con observaciones hechas a lo largo del desarrollo fetal: a mayor grado de diferenciación hay un aumento de la expresión de las FAC en la próstata (aunque siempre se mantiene el mismo perfil isoenzimático, es decir, predomina la FACP) (Reif y col., 1973).

En función de estas observaciones se ha sugerido que el 15-20% de pacientes con cáncer de próstata diseminado y valores normales de FACP en suero tendría tumores poco diferenciados, aunque esto debe ser todavía confirmado.

Aplicando los métodos inmunohistoquímicos algunos autores han informado que, además de los tejidos prostáticos normales y tumorales, también dan tinción para FACP otros tejidos. En particular se describieron reacciones positivas (aunque no tan fuertes como en próstatas) en carcinoma de páncreas (Choe y col., 1978) y en carcinoma de mama (Li y col., 1980).

Recientemente se han desarrollado anticuerpos monoclonales contra FACP (Lillehoj y col., 1982). Aunque los resultados son preliminares se espera que esta técnica permita verificar la certeza de los resultados obtenidos con anticuerpos heteroclonales (Nadji y Morales, 1982).

Finalmente hay que señalar que estudios sobre el dosaje sérico de la FACP con técnicas inmunoquímicas ha permitido verificar que este método es particularmente útil para el seguimiento del paciente con cáncer prostático, tanto en la detección de recidivas como en la evaluación de la respuesta a un tratamiento

dado (Killian y col., 1982).

La LRE es otra de las patologías en que la FAC ha adquirido aplicación clínica. Esta enfermedad se caracteriza entre otras cosas por la aparición de las denominadas células reticulares (o también células "vellosas") en el bazo, la médula ósea y la sangre del enfermo. Frecuentemente esta malignidad es erróneamente diagnosticada como leucemia linfocítica crónica. Sin embargo, las células reticulares se diferencian de las células características de otras leucemias con respecto al tipo de FAC que poseen ya que se ha verificado que dichas células reticulares presentan la denominada FAC tipo 5 que, como ya se ha dicho, es resistente al (+) tartrato (Li y col., 1970a; Li y col., 1970b).

Como la detección de fosfatasa ácida tartrato resistente (FACTR) puede efectuarse mediante técnicas histoquímicas, se ha propuesto la utilización de dicha detección como marcador para el diagnóstico de la LRE (Yam y col., 1971). Aunque el lugar en donde se pueden encontrar más células reticulares es en el bazo del paciente, se ha verificado que el simple hallazgo de 1 ó 2 células no eritrocíticas con FACTR en un extendido sanguíneo es suficiente como para efectuar el diagnóstico de LRE (Mover y col., 1972). También se ha verificado que la presencia de FAC tipo 5 en el perfil electroforético de homogenatos leucocíticos de pacientes con LRE se correlaciona con la tinción positiva para FACTR en los extendidos sanguíneos del paciente

(Yam y col., 1972), aunque se recomienda usar por su mayor simpleza el método histoquímico (Mover y col., 1972).

Existen también otras patologías para las cuales distintos autores han sugerido que es útil la evaluación de las FAC, aunque todavía no existe un consenso general.

En patologías en las cuales se estimula la actividad osteoclástica como las enfermedades de Gaucher, Paget y fiebre Dengue se ha descrito un incremento de la FAC tipo 5 en el suero que podría ser utilizado para el diagnóstico y seguimiento de los pacientes (Li y col., 1973; Lam y col., 1981; Lam y col., 1982b). Por otro lado, diversos autores han sugerido que la FAC puede ser un marcador útil para diferenciar a la leucemia linfoblástica aguda tipo T de la tipo B ya que la primera presenta más del 90% de las células blásticas con fuerte tinción para FAC mientras que la segunda a lo sumo presenta un 30% de los blastos con dicha tinción (Catovsky y col., 1978; Wehinger y Mobius, 1976).

5. Fosfatasas ácidas y cáncer de mama, antecedentes y objetivos de la investigación

Distintos investigadores han informado acerca de que un alto porcentaje de pacientes con cáncer de mama diseminado presenta valores séricos de FAC elevados.

En 1956 Reynolds y col. mostraron en una serie de 70 pa

cientes que el 74% presentaba niveles séricos de FAC por encima de los normales. En el mismo trabajo se encontraron también porcentajes similares de elevación de la FAC en pacientes con cáncer de próstata diseminado, pero mujeres con cáncer metastásico no mamario presentaron en cambio sólo un 31% de casos con niveles séricos de FAC aumentados.

Estos autores, teniendo en cuenta sus propios resultados y trabajos anteriores (Reiner y col., 1955; Lemon y Wisseman, 1949) que informaban acerca de mayores niveles de FAC en tejido tumoral primario de mama respecto del tejido normal mamario, sugirieron que el origen del incremento de la FAC sérica sería el propio tumor primario (Reynolds y col., 1956).

En 1957 Reiner y col. examinando 14 carcinomas mamarios no diseminados con técnicas histoquímicas y usando 2-benzoíl β -NP como sustrato confirmaron la elevación de las FAC respecto del tejido normal mamario adyacente.

En 1974 Bosmann y Hall obtuvieron conclusiones similares con homogenatos tisulares mamarios utilizando métodos bioquímicos y PNFF como sustrato. Es interesante destacar que en tumores benignos (fibroadenomas) encontraron valores intermedios y que al efectuar estudios similares en cáncer de colon observaron que la actividad de la FAC no estaba aumentada en el carcinoma respecto del tejido normal adyacente (Bosmann y Hall, 1974).

Por otro lado Koudstaal y col. (1975b) al estudiar una serie de 130 pacientes con métodos histoquímicos y utilizando

β -GF como sustrato observaron que otras enzimas hidrolíticas, a diferencia de la FAC, estaban disminuídas en el carcinoma mamario y confirmaron con técnicas similares que en carcinoma de colon la FAC no se incrementa respecto del tejido normal adyacente.

Resultados parecidos respecto de la FAC y el tumor primario de mama fueron obtenidos posteriormente por otros autores utilizando tanto técnicas bioquímicas como histoquímicas. Es importante destacar que el incremento de la FAC en carcinoma mamario se evidenció incluso cuando se utilizaron sustratos que no son hidrolizados por las FAC eritrocitarias, indicando que las FAC no eritrocitarias eran, por lo menos en parte, las responsables del incremento descrito (Dutu y col., 1979; Bosmann y Hall, 1974; Larner y Rutherford, 1978).

Machinami (1976) al aplicar técnicas de histoquímica y microscopía electrónica encontró en el carcinoma mamario un incremento de FAC y β -glucuronidasa. Sin embargo, sus observaciones no pudieron confirmar la vinculación, sugerida por otros autores, entre el aumento de estas enzimas lisosomales y la capacidad invasiva y metastásica del carcinoma mamario (Bosmann y Hall, 1974; Murad, 1971; Sylven, 1968; Tunis y col., 1973).

En otros trabajos, en cambio, que utilizaron tumores mamaros hormonodependientes inducidos en rata, se confirmó que existe un incremento notorio de las distintas FAC cuando dichos tumores entran en regresión, lo que ratificaría el rol de enzima degradativa que juega la FAC en estos casos (Lanzerotti y Gullino,

1972; Nicholson y Davies, 1974).

En 1962 Jegatheesan y Joplin presentaron resultados que contradecían la sugerencia de Reynolds y col. acerca de que el origen de la FAC incrementada en el suero del paciente con cáncer de mama metastásico era el tumor primario. En sus trabajos encontraron que la FAC sérica total estaba fundamentalmente elevada en los casos en que las metástasis eran óseas siendo en cambio normal en los casos en que las metástasis eran de otro origen (Jegatheesan y Joplin, 1962; Joplin y Jegatheesan, 1962). A partir de estos resultados los autores propusieron que el origen de la FAC incrementada en el suero sería óseo.

Por otro lado, diversos trabajos efectuados a partir de huesos de animales de laboratorio han demostrado que, así como los osteoblastos se caracterizan por tener un alto contenido de fosfatasa alcalina (FALC), los osteoclastos poseen elevada actividad de FAC (Burstone, 1959; Hammarstrom y col., 1971). Asimismo en cultivos de células derivadas de dichos huesos se verificó, al estimular la actividad osteoclástica, un incremento de los niveles de la FAC (Susi y col., 1966; Vaes, 1968. Al estudiar las características de la FAC incrementada se determinó, entre otras cosas, que era resistente al tartrato (Vaes, 1968).

En humanos, posteriormente, se observó que los niños presentan niveles séricos de FACTR superiores a los de los adultos. Se vinculó esto al proceso de crecimiento óseo característico del desarrollo infantil que involucra tanto actividad osteoblástica

como osteoclástica (Lam y col., 1978b). Al caracterizar a la FACTR aumentada mediante electroforesis en geles de poliacrilamida se constató que se trata de la denominada FAC tipo 5b (Chen y col., 1979).

Todo este conjunto de datos refuerza la propuesta de Jegatheesan y Joplin acerca del origen óseo de la FAC incrementada en el suero de los pacientes con cáncer de mama con metástasis óseas. Sin embargo, para descartar en forma absoluta la posibilidad de que también esa FAC pueda originarse en el tejido mamario hace falta estudiar qué tipo de FAC se encuentra en el tumor mamario primario. Esto es particularmente importante si tenemos en cuenta las referencias descriptas acerca del incremento de la FAC total en el tumor primario de mama.

En este trabajo nos proponemos estudiar el perfil isoenzimático de las FAC no eritrocitarias en el carcinoma primario de mama comparándolo con el del fibroadenoma y el tejido normal mamario. Esto nos permitirá, por un lado, conocer si el aumento de la FAC en el tumor mamario se debe a la aparición de algún nuevo tipo de FAC o si, por el contrario, se trata de un incremento en las FAC ya descriptas en otros tejidos. A la vez, podremos verificar la presencia o ausencia de la FAC tipo 5b en el tejido mamario. Si nuestros resultados refuerzan las sugerencias previas acerca del origen óseo, y no mamario, de la FAC elevada en el suero de los pacientes metastásicos, se intentará estudiar la utilidad del dosaje de la FAC tipo 5 sérica pa

ra la detección de la presencia de metástasis óseas. Esto puede ser de particular importancia ya que más del 50% de los pacientes que fueron operados de tumor primario de mama muere por enfermedad metastásica (Seidman, 1969; Brinkley y Haybittle, 1968) y precisamente la mayoría de las metástasis en este tipo de tumor ocurren en el esqueleto (Gielen y col., 1976).

Por otro lado, trataremos de caracterizar bioquímicamente a la FAC predominante en el tumor mamario. Finalmente, y dada la dificultad para la obtención de muestras de tejido normal mamario, se estudiará cuáles son las FAC predominantes en la leche humana dado que la misma puede ser una excelente fuente para la obtención de enzimas originadas en el epitelio mamario (Hamilton y col., 1979) y esto posibilitaría, por lo tanto, un estudio más profundo de las FAC presentes en el tejido mamario y en otros tejidos normales o tumorales que presenten el mismo tipo de FAC que la leche humana.

Parte de los resultados que aparecen en esta tesis han sido publicados (Filmus y col., 1982; Filmus y col., 1983).

MATERIALES Y METODOS

1. Obtención, preparación y clasificación de muestras

1.1. Preparación de muestras tisulares

Las muestras de tejido tumoral fueron obtenidas mediante cirugía o biopsia. El tejido normal provino de zonas de la mama distantes al tumor (esto sólo fue posible en los casos en que se efectuó mastectomía). Inmediatamente después de extraídos, los tejidos fueron clasificados por un médico patólogo. Todos los tumores malignos utilizados fueron carcinomas ductales infiltrantes y los tumores benignos fueron fibroadenomas. Los tejidos, en caso de no utilizarse en forma inmediata, fueron conservados en N_2 líquido aunque nunca se usaron muestras con más de 2 semanas de extraídas.

Para la preparación de los homogenatos los tejidos fueron limpiados lo más posible de grasa y partes necróticas. Luego se los cortó en pequeños trozos, se los congeló con N_2 líquido y se los pulverizó con un pulverizador de tejidos Theřmovac. Dichos pulverizados tisulares fueron resuspendidos en el buffer correspondiente y se los homogeneizó usando un desintegrador de tejidos Polytron PT-10 a intensidad 8 durante 30 segundos, 3 veces con intervalos de un minuto.

Una vez obtenidos, los homogenatos tisulares fueron centrifugados a 28.000 x g durante 20 minutos o a 108.000 x g durante 60 minutos según se indica en cada caso. Para la extracción de la FAC tipo 1 se trataron los homogenatos antes de la centrifugación durante 30 minutos con Tritón x-100 a una concentración final del 5%. Todos estos procedimientos se efectuaron manteniendo al material tisular a 0°C.

1.2. Clasificación de los pacientes estudiados para la detección de metástasis óseas

Se estudiaron 38 pacientes con metástasis óseas (24 con tumor primario en mama, 4 en próstata, 4 en colon, 3 en pulmón y 3 en estómago) y 36 sin metástasis óseas. La presencia de dichas metástasis se verificó mediante la utilización de uno o más de los siguientes procedimientos: centellografía, rayos X y biopsia. Se consideró sin metástasis óseas a aquellos pacientes con centellografía negativa y cuyos datos clínicos no presentaban ninguna señal que indicara la presencia de dichas metástasis.

1.3. Obtención de las muestras de leche humana y separación de la crema

Las muestras de leche, de 50 ml aproximadamente, se ob-

tuvieron a partir de madres lactantes entre las 6 y las 12 semanas después del parto y se mantuvieron congeladas a -20°C hasta su uso. Para separar la crema, la leche fue centrifugada 2 veces a $1.500 \times g$ durante 30 minutos a 4°C , luego se lavó 2 veces con buffer Tris-sulfato 20 mM pH 6,9.

2. Métodos experimentales

2.1. Electroforesis en gel de poliacrilamida

Se llevó a cabo utilizando el sistema de Li y col. (1970a). Estos autores modificaron un método de electroforesis a pH ácido desarrollado por otros investigadores (Reisfeld y col., 1962; Axline, 1968) resultando un sistema especialmente útil para el análisis de FAC no eritrocitarias. La concentración de acrilamida utilizada fue del 7,5% o 3% según se indica en cada experimento. El buffer de corrida estuvo compuesto por β -alanina 70 mM y ácido acético 14 mM con un pH final de 4,2. Muestras conteniendo de 100 a 200 μg de proteína, 0,5% de Tritón x-100 y 30% de sacarosa se sembraron por encima del gel de poro grueso. Las corridas se efectuaron a 4°C durante 180 minutos. Para visualizar las bandas de FAC se utilizó el método de Barka (1961) que emplea α -NF como sustrato y Fast-Garnet GBC para el desarrollo del color. Cuando se quiso estudiar el efecto de distintos inhibidores se los agregó en las concentraciones indicadas a la solución de tinción. Para la tinción de proteínas, se incubaron los geles 24 horas con Azul de Comassie

al 0,025% y para la tinción de glicoproteínas se utilizó la técnica de Zacharius y Zell (1969).

La electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS) se efectuó de acuerdo con el método de Weber y Osborn (1969) que emplea acrilamida al 5%, incubándose previamente a las muestras 2 horas a 37°C con 2% de SDS y 1% de β -mercaptoetanol. Cuando se utilizaron condiciones no desnaturizantes se trató a las muestras con 0,1% de SDS y sin agentes reductores de acuerdo con Neville (1971). Como marcadores se utilizaron: albúmina sérica bovina (ASB) (PM: 68.000 D), peroxidasa (PM:44.000 D) y citocromo C (PM: 11.700 D). Para la tinción de FAC y proteínas se aplicaron los mismos métodos que para los geles sin SDS.

2.2. Contrainmunolectroforesis

Se efectuó de acuerdo con el método de Chu y col. (1978). Se utilizaron placas de plástico (13 x 18 cm) cubiertas con 0,75% de agarosa en buffer fosfato 0,05 M pH 6,5 (para la corrida se empleó el mismo buffer). Luego de efectuar orificios de 4 mm de diámetro alineados de a pares y separados por 5 mm de distancia, se sembró 10 μ l de cada muestra en el orificio catódico y 10 μ l de antisuero anti-FACP en el anódico. Se corrió durante 90 minutos aplicándose una corriente constante de 40 mA por placa. Luego de la corrida se tiñó para FAC utilizando α NF como

sustrato y Fast Red TR como colorante. Finalmente las placas fueron fijadas con formaldehído 10% y secadas a temperatura ambiente. La intensidad de la coloración fue medida mediante un espectrofluorómetro al que se le adosó un "Scanner" de capa delgada. Los antisueros anti-FACP, obtenidos como ya fuera descrito (Chu y col., 1978), fueron gentilmente suministrados por el Dr. T.M. Chu (Roswell Park Memorial Institute, Buffalo, E.E.U.U.)

2.3. Medición de la actividad de las FAC

En la cuantificación de las FAC no eritrocitarias de tejido mamario y en las columnas cromatográficas utilizadas para la posterior separación de las FAC tipo 4 se utilizó el método de Babson y Phillips (1966) con pequeñas modificaciones. Se incubaron de 30 a 60 minutos a 37°C alícuotas variables de sobrenadantes tisulares o de las fracciones de columnas cromatográficas en una mezcla de reacción que contenía α -NF 3 mM en buffer citrato 0,1 M pH 5,6. Luego de finalizada la reacción mediante el agregado de Fast Red B e HONa 0,1 N se leyó la absorbancia a 588 nm.

Para el dosaje de la FACTR en suero se utilizó el mismo método incluyendo en el medio de incubación (+) tartrato 0,025 M.

Para dosar la FAC durante el análisis del complejo de alto PM con actividad de FAC (C-FAC) se utilizó como sustrato

PNFF. Se agregó de 50 a 100 μ l de muestra a buffer acetato 0,1 M pH 5,0 conteniendo PNFF 10 mM (volumen final: 1 ml). Luego de incubar 30 minutos a 37°C, la reacción se terminó agregando 2 ml de HONa 0,2 N y se leyó la absorbancia a 405 nm. En las condiciones descriptas la reacción mostró linealidad durante por lo menos una hora.

Para el dosaje de la FAC en los estudios efectuados en leche se utilizó también el método descrito con PNFF. En los casos en que hubo interferencia en la lectura de la absorbancia por presencia de lípidos se centrifugaron los tubos a 3.000 RPM durante 10 minutos. En los casos en que la interferencia se debió a la presencia de restos de caseína se la eliminó precipitándola con ácido tricloracético 2%.

En determinados experimentos se utilizó CF 20 mM como sustrato reemplazando al PNFF. El fósforo liberado fue medido de acuerdo al método descrito por Saini y Van Etten (1978a).

Para el aislamiento y estudio de la FAC tipo 3 se utilizó también el método descrito con PNFF salvo en los casos en que explícitamente se indica que se usaron otros sustratos. En todos los casos la actividad se evaluó midiendo luego de la incubación el fósforo liberado utilizando el ya mencionado método de Saini y Van Etten.

Para medir el efecto de distintos compuestos sobre la capacidad de las FAC tipo 3 para hidrolizar PNFF se los agregó en las concentraciones indicadas al medio de incubación que se

utilizó para desarrollar la actividad enzimática.

Una unidad de enzima se define como la cantidad de enzima que hidroliza un μ mol de sustrato por minuto bajo las condiciones descritas.

2.4. Separación de la FAC tipo 4 de carcinoma mamario

El tumor fue pulverizado y homogeneizado tal como ya se describió utilizando buffer Tris-sulfato 10 mM pH 7,4 (BTS). Luego de centrifugar a 28.000 x g durante 20 minutos se tomaron 6 ml del sobrenadante, se absorbieron en una columna de Sephadex G-200 y se eluyeron con 300 ml de BTS. El volumen muerto (V_0) se midió con Blue Dextran 2000. Las fracciones eluidas de esta columna que contenían las FAC tipo 3 y 4 fueron mezcladas y sembradas en una columna de DEAE-Sephadex. Luego de lavar con 50 ml de BTS que contenía 50 mM de ClNa se eluyó con 200 ml de un gradiente lineal de ClNa en el mismo buffer. El gradiente fue luego medido con un conductímetro Radiometer (de la misma forma se midieron los gradientes en columnas posteriores).

2.5. Aislamiento del C-FAC

El tejido fue pulverizado y homogeneizado tal como ya se describió utilizando BTS 10 mM pH 7,4. Luego de centrifugar a 108.000 x g durante 60 minutos, se sembraron 6 ml de sobrena-

dante en una columna de Sepharose 6B eluyéndose con el mismo buffer. El V_0 se midió con un glucógeno de alto peso molecular ($>10^7$ D) (Mordoh y col., 1966).

2.6. Incubación del C-FAC con detergentes

Muestras del C-FAC obtenidas de la columna de Sepharose 6B fueron incubadas con Lubrol PX al 0,05% y con Lubrol WX a la misma concentración durante 2 horas a 4°C bajo agitación constante.

2.7. Extracción con butanol

Se agregaron 4 partes del C-FAC eluído de la columna de Sepharose 6B a una parte de n-butanol incubándose durante 30 minutos a 4°C bajo agitación constante. Luego se separó la fase orgánica de la acuosa mediante centrifugación.

2.8. Filtración por gel en presencia de urea o SDS

Se utilizó un método previamente descrito (Harvey y col. 1982) con pequeñas modificaciones. Se mezclaron las fracciones eluídas de la columna de Sepharose 6B que contenían el C-FAC y se las concentró mediante diálisis contra Ficoll sólido. Luego se agregó a las muestras concentradas urea 8 M o SDS al 2%, se

incubó 60 minutos a 4°C y se corrió a dichas muestras por columnas de Sepharose CL-4B usando como buffer de elución BTS al cual se agregó urea 4 M o SDS 2% de acuerdo con el tratamiento previo. El Vo se midió con el glucógeno de alto peso molecular.

2.9. Purificación del C-FAC

Se mezclaron las fracciones que contenían el C-FAC eluídas de 5 columnas de Sepharose 6B y se las llevó a pH 5,0 con ácido cítrico sólido. Luego de dejar 15 minutos en hielo se removió el material insoluble mediante centrifugación. Al sobrenadante se le agregó cuidadosamente sulfato de amonio bajo agitación constante hasta alcanzar un 35 % de saturación. Luego de dejar 1 hora en hielo se centrifugó a 14.000 x g durante 30 minutos y el sobrenadante fue llevado a 45% de saturación de sulfato de amonio. Luego de centrifugar, el precipitado fue resuspendido en un volumen mínimo de BTS y se dializó durante toda la noche contra dicho buffer.

La muestra dializada se sembró sobre una columna de DEAE-celulosa (1 x 12 cm), la cual luego de ser lavada con 50 ml de BTS fue eluída con 200 ml de un gradiente lineal de 0 a 500 mM de ClNa en el mismo buffer. Para la estimación del PM del C-FAC purificado se mezclaron los tubos con actividad de FAC, se concentraron contra Ficoll 5 veces y se corrieron en una columna de Sepharose Cl-4B eluyendo con BTS. Como marcadores se utilizaron

glucógeno de alto peso molecular, tiroglobulina (PM: 670.000 D), ferritina (PM: 440.000 D), catalasa (PM: 240.000D) y ASB (PM: 68.000 D).

2.10. Purificación de la FAC tipo 3

Se prepararon homogenatos de tejido mamario tal como se describió, utilizando buffer acetato 50 mM pH 5,0. Luego se centrifugó a 28.000 x g durante 20 minutos. Se le agregó al sobrenadante sulfato de amonio sólido bajo agitación constante hasta alcanzar el 55% de saturación, se dejó 1 hora en hielo y se centrifugó a 14.000 x g durante 30 minutos. Al sobrenadante se le agregó sulfato de amonio hasta alcanzar el 75% de saturación y se volvió a centrifugar a 14.000 x g durante 30 minutos resuspendiéndose el precipitado en buffer BTS. Luego se analizó cada una de las fracciones mediante electroforesis en gel de poliacrilamida. La fracción que contenía la FAC tipo 3 fue sembrada en una columna de Sephadex G-200 y se la eluyó con buffer BTS. El siguiente paso consistió en una columna de DEAE-celulosa, la cual luego de sembrada fue lavada con 120 ml de buffer BTS y eluída con un gradiente lineal de ClNa desde 0 a 150 mM en el mismo buffer. Las fracciones que contenían la FAC tipo 3 fueron recromatografiadas en una columna de DEAE mediante un procedimiento similar.

Fue necesario repetir 5 veces todas las etapas cromato-

gráficas para poder purificar todo el material proveniente de 80 g de tejido mamario maligno.

Para la purificación de la FAC tipo 3 proveniente de tejido mamario normal se repitieron todos los procedimientos descriptos para el carcinoma. También se necesitó repetir 5 veces las etapas cromatográficas para poder procesar todo el material.

2.11. Estudio de la termoestabilidad de la FAC tipo 3

La enzima fue preincubada a las temperaturas indicadas. A distintos tiempos se tomaron alícuotas de enzima y se ensayaron tal como se describió.

2.12. Determinación del pH óptimo

La actividad de la enzima se midió tal como ya fue descrito. Para pH mayores que 5,5 se utilizó en lugar de buffer acetato, buffer acetato-cacodilato.

2.13. Aislamiento de la "FAC tipo 2" de la leche

110 ml de leche descremada fueron llevados a pH 6,9 mediante el agregado de Tris 2 M. La muestra fue dializada luego durante toda la noche contra buffer Tris-sulfato 20 mM pH 6,9 y

se la concentró unas 10 veces dializando contra Ficoll sólido. Finalmente se sembró la muestra en una columna de DEAE-celulosa, se lavó con 2 volúmenes de buffer y se eluyó con 400 ml de un gradiente lineal de ClNa (de 0 a 500 mM). La segunda columna de DEAE-celulosa se efectuó de la misma manera pero se le agregó al buffer Tritón X-100 al 0,5% y al eluir se partió de una concentración inicial de ClNa de 50 mM.

2.14. Medición de proteínas

Se efectuó de acuerdo al método de Lowry y col. (1951), empleando ASB cristalina como standard. Cuando había Tritón X-100 en el medio se utilizó el método de Bramhall y col. (1969).

2.15. Medición de DNA

Se utilizaron métodos ya descriptos para la extracción e hidrólisis del DNA (Schneider, 1945) y la medición de la cantidad total de deoxiribosa (Keek, 1956).

2.16. Medición de FALC

Se empleó el método de Bessey y col. (1946) que utiliza PNFF como sustrato.

RESULTADOS

1. Análisis cuantitativo y cualitativo de las FAC no eritrocitarias en carcinoma primario, fibroadenoma y tejido normal de mama

1.1. Medición de la actividad total de FAC no eritrocitarias en sobrenadantes de 28.000 x g

Antes de encarar los estudios cualitativos se procedió a verificar si los niveles de FAC no eritrocitarias de carcinoma mamario se presentan significativamente elevados respecto de los del tejido mamario no maligno tanto cuando se expresa la actividad por mg de DNA como cuando se la expresa por mg de proteína.

En la Tabla 1 se puede observar que las FAC no eritrocitarias en el carcinoma muestran un incremento significativo respecto del fibroadenoma y del tejido normal mamario tanto cuando se expresa la actividad por mg de DNA como cuando se la expresa por mg de proteína. También se encontraron aumentos significativos en el fibroadenoma respecto del tejido normal con ambas formas de expresión. Las diferencias entre los niveles de FAC en los 3 tipos de tejido son menores cuando la actividad enzimática es expresada por mg de DNA. De acuerdo con los resultados es evidente que la disminución de las diferencias se debe a que

el contenido proteico es similar para los 3 tipos de tejido mientras que el carcinoma mamario presenta mayor cantidad de DNA por gramo de tejido que el fibroadenoma y éste a su vez posee más DNA que el tejido normal mamario (Tabla 1).

Tabla 1: Niveles de DNA, proteínas y FAC en carcinoma, fibroadenoma y tejido normal mamario

	Carcinoma (n=6)	Fibroadenoma (n=8)	Normal (n = 5)
DNA (μ g/mg tejido)	6,1 \pm 0,5 ⁽¹⁾	4,8 \pm 0,2	3,9 \pm 0,2
Proteínas (mg/100 mg tejido)	3,2 \pm 0,2	3,3 \pm 0,3	2,8 \pm 0,4
FAC (nmoles/mg proteína.hr)	358 \pm 42 ^(2,3)	216 \pm 30 ⁽²⁾	96 \pm 45
FAC (nmoles/mg DNA.hr)	1858 \pm 234 ^(2,3)	1227 \pm 140 ⁽²⁾	696 \pm 345

(1) Promedio \pm error standard

(2) Significativamente distinto al normal ($P < 0,02$, test de Student)

(3) Significativamente distinto al fibroadenoma ($P < 0,05$, test de Student)

1.2. Perfiles electroforéticos de FAC en geles de poliacrilamida

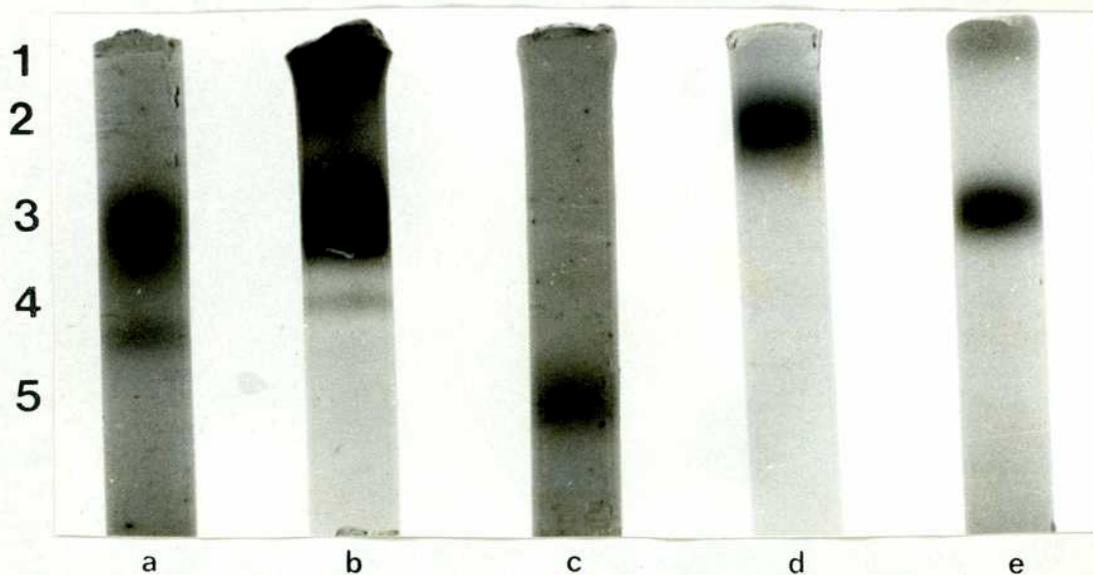
Al utilizar el sistema electroforético de Li y col. los 3 tipos de tejido mamario estudiados presentaron las mismas bandas de FAC aunque el carcinoma presentó en todas las bandas una evidente mayor intensidad de tinción que los tejidos no malignos.

En la Figura 1.a) se presenta una corrida típica de una muestra de sobrenadante de 28.000 x g de carcinoma mamario. La banda más intensa corresponde a la FAC tipo 3 y la de menor intensidad a la FAC tipo 4. En el gel de poro grueso (no aparece en la foto) se observó también la presencia de una banda que no logró penetrar el gel de poro fino. Dicha banda, que se manifestó también en los tejidos no malignos, será analizada posteriormente. Cuando se trató al homogenato tisular con Tritón X-100 antes de la centrifugación también apareció en el sobrenadante de 28.000 x g una banda correspondiente a la FAC tipo 1, tal como se puede observar en la Figura 1.b). Con el objetivo de identificar a las distintas bandas de FAC del tejido mamario se corrieron en forma paralela muestras de: plasma con FAC tipo 5 (Figura 1.c)), FACP purificada (Figura 1.d)) y sobrenadante de 28.000 x g de hígado humano que contiene FAC tipos 1 y 3 (Figura 1.e)).

La identidad de las bandas de FAC encontradas en el te-

jido mamario fue confirmada al incorporar a la solución de tinción distintos inhibidores. Tal como señalamos anteriormente, sólo la FAC tipo 5 y las denominadas FAC eritrocitarias son resistentes a la inhibición con (+) tartrato. Como se esperaba, el (+) tartrato inhibió a todas las bandas de FAC que se habían detectado en los 3 tipos de tejido mamario. Las mismas, en cambio, no fueron afectadas por Cu^{++} y formol, compuestos que se caracterizan por inhibir fuertemente sólo a las FAC eritrocitarias.

Figura 1: Perfiles electroforéticos de FAC en geles de poliacrilamida



a) Carcinoma mamario; b) carcinoma mamario tratado con Tritón X-100 al 5%; c) plasma; d) FACP purificada; e) hígado normal tratado con Tritón X-100. Todos los geles fueron teñidos para FAC.

1.3. Reacción entre la FAC tipo 4 de carcinoma mamario y antisuero anti-FACP

En la Introducción hemos citado trabajos en los cuales se demuestra que las FAC tipo 4 de próstata y leucocitos reaccionan en forma cruzada contra un antisuero preparado contra FACP altamente purificada. Dado que mediante electroforesis hemos identificado en el tejido mamario la presencia de FAC tipo 4, se decidió estudiar si la misma reaccionaba contra anti-FACP. Para ello se trató de separar dicha FAC de las demás. Con ese fin un sobrenadante de 28.000 x g de carcinoma mamario obtenido de acuerdo con lo descrito en Métodos (sin tratamiento con Tritón X-100) fue corrido a través de una columna de Sephadex G-200. Luego de la elución se identificaron 2 picos con máxima actividad de FAC en las fracciones 16 y 28 (Figura 2). La enzima eluída en el primer pico será analizada posteriormente dado que no penetró un gel de poliacrilamida al 7,5%. Cuando se corrió en un gel similar una muestra correspondiente al segundo pico se observó que la misma contenía las FAC tipo 3 y 4 (Figura 4.a). Para separar ambas enzimas se efectuó entonces una columna de DEAE-Sephadex, eluyéndose la misma con un gradiente lineal de ClNa (Figura 3). El perfil de elución presentó 2 picos de actividad de FAC claramente separados. El primer pico, el cual poseía la mayor parte de la actividad, fue identificado mediante electroforesis como el que contenía la FAC tipo 3 (Figura 4.b)),

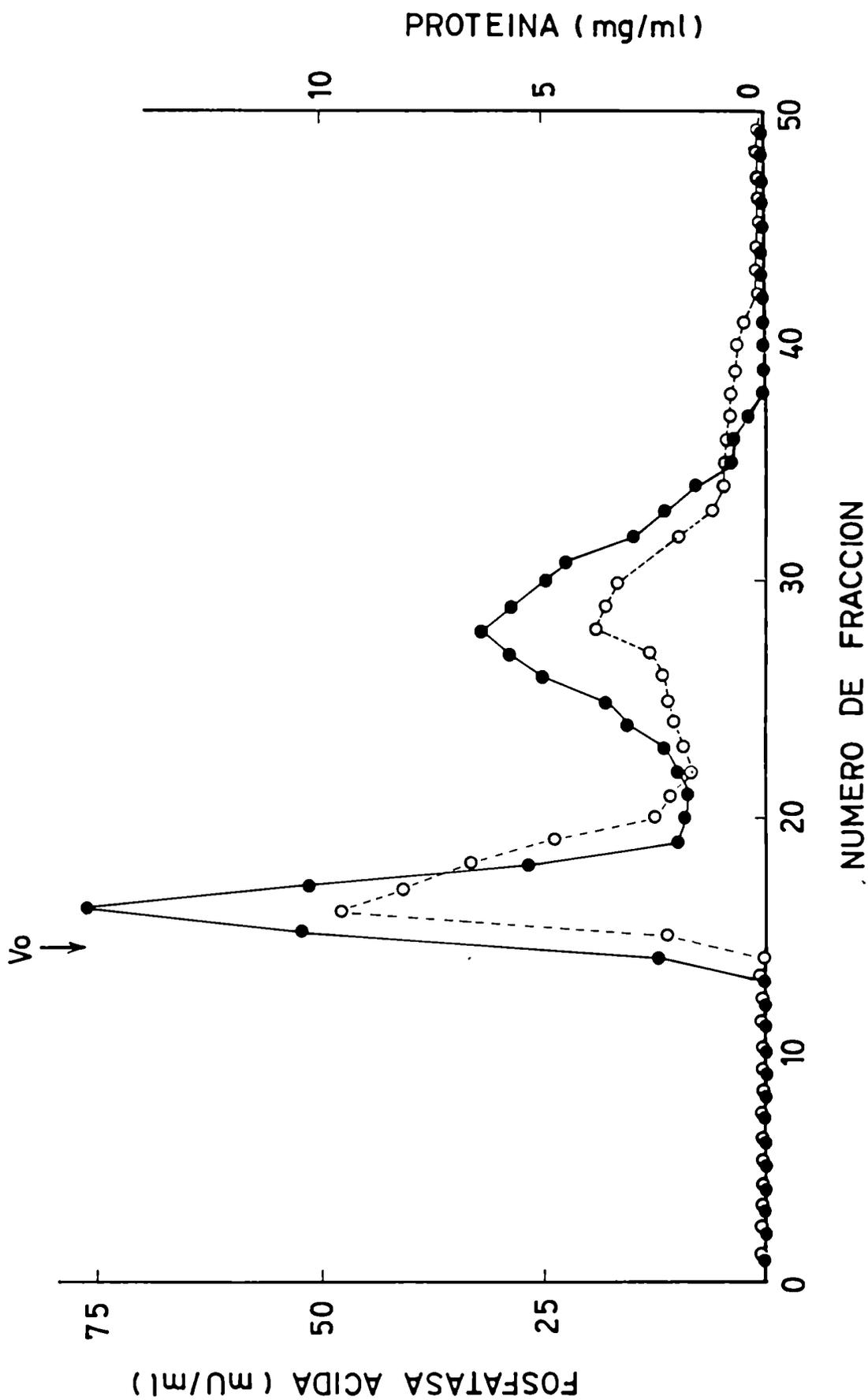
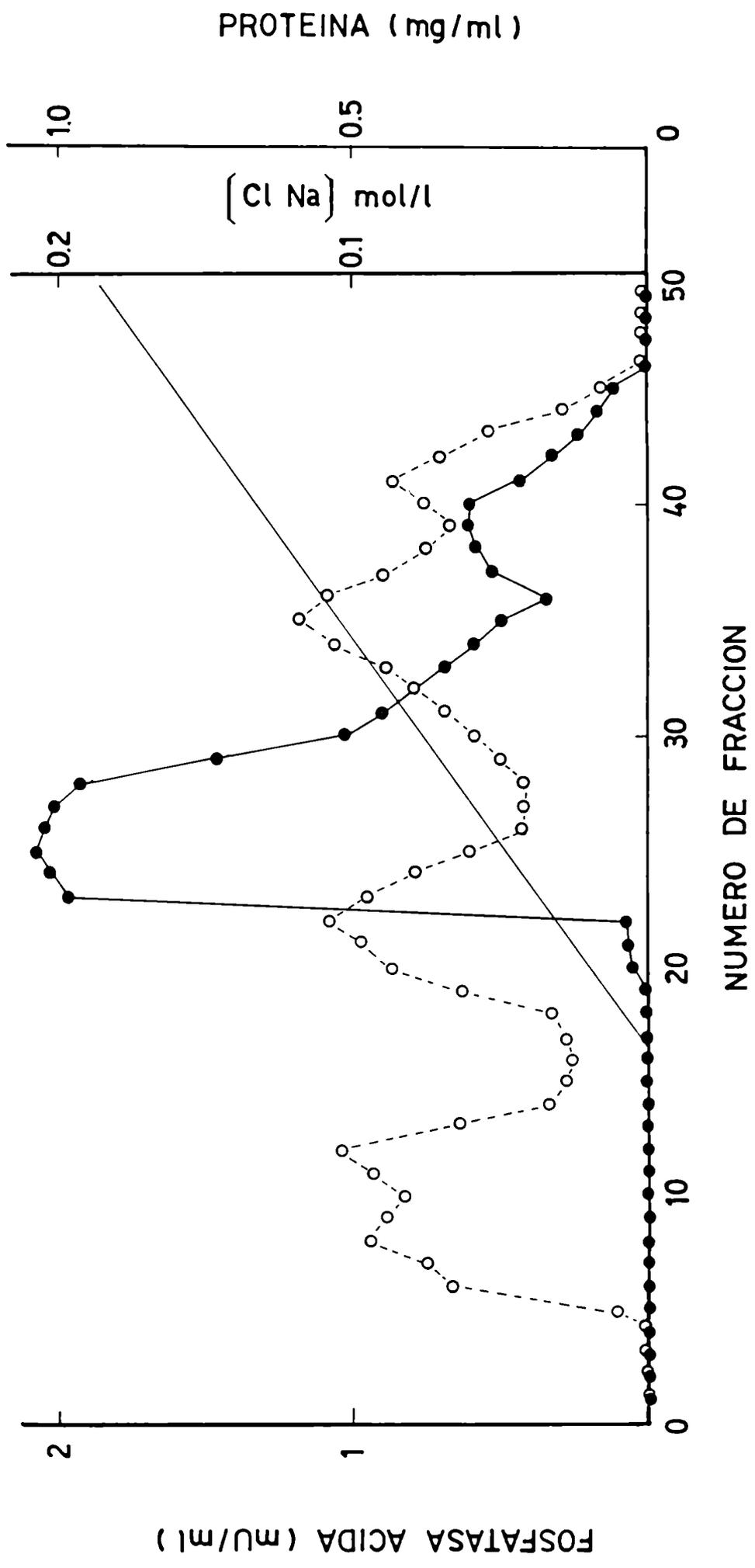
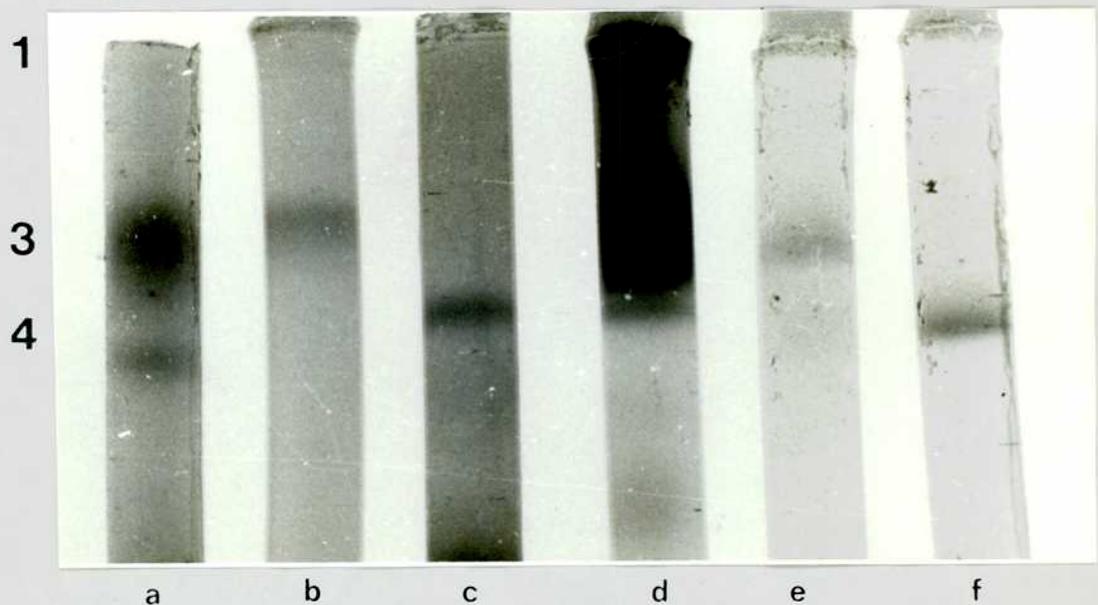


Figura 2: Elución de un sobrenadante de 28.000 x g de carcinoma mamario a través de una columna de Sephadex G-200.
 La columna (36 x 2,7 cm) fue eluída a una velocidad de 10 ml/hora. El volumen de cada fracción fue de 4 ml. ●----- actividad enzimática; ○-----o protefna.



mientras que en el segundo pico se encontró la FAC tipo 4 (Figura 4.c)). Se corrieron además en geles paralelos muestras de los 2 picos de esta columna y se efectuó una coloración para proteína. Ninguno de los 2 picos mostró la presencia de cantidades detectables de otras proteínas además de las FAC ya identificadas (Figuras 4.e) y 4.f)).

Figura 4: Perfiles electroforéticos de fracciones eluidas de las columnas de Sephadex G-200 y DEAE-Sephadex



a) fracción 28 de la columna de Sephadex G-200; b) y e) fracción 26 de la columna de DEAE-Sephadex; c) y f) fracción 39 de la columna de DEAE-Sephadex; d) sobrenadante de 28.000 x g de carcinoma mamario. a), b), c) y d) fueron teñidos para actividad enzimática; e) y f) fueron teñidos para proteínas.

Contando ya con las FAC en forma separada se estudió la reacción de las mismas contra el antisuero anti-FACP mediante una contraelectroforesis (CIE). Para ello se mezclaron las fracciones correspondientes al 2º pico de la columna de DEAE-Sephadex y se las concentró unas 10 veces contra Ficoll sólido hasta alcanzar una concentración de FAC similar a la del 1º pico, el cual a su vez fue concentrado 2 veces. Cuando se efectuó la CIE se observó que sólo la muestra que contenía la FAC tipo 4 reaccionaba en forma cruzada con el antisuero anti-FACP reteniendo su actividad enzimática (Figura 5). Resultados similares se obtuvieron cuando se usó un antisuero de cabra en lugar del antisuero preparado en conejo.

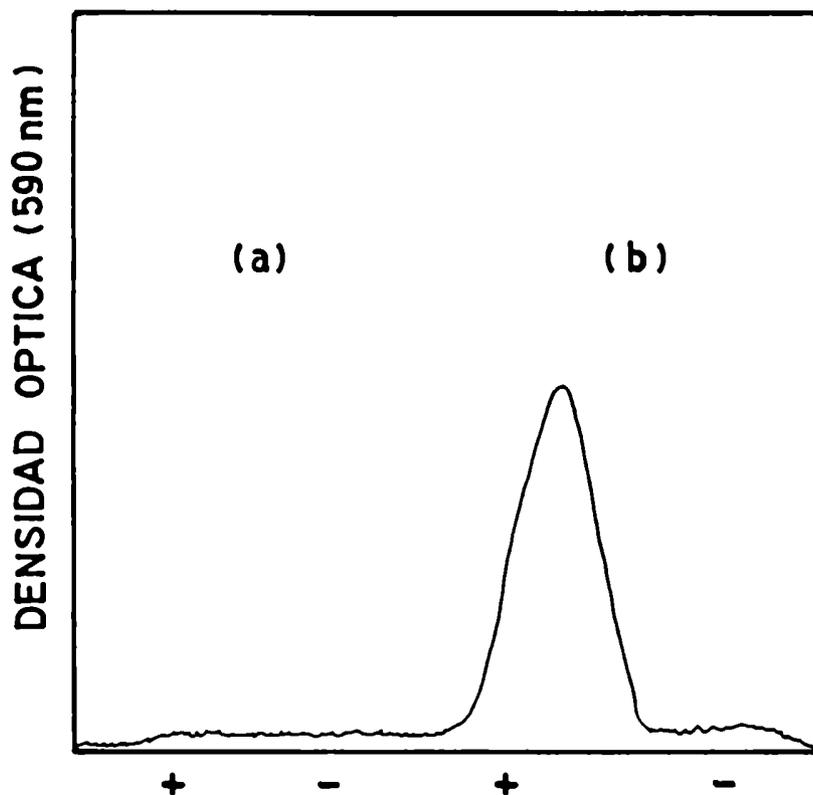
2. Análisis de un complejo de alto peso molecular con actividad de FAC (C-FAC)

2.1. Columnas de Sepharose 6B

En la primer parte de los Resultados se ha mostrado que, cuando un sobrenadante de 28.000 x g proveniente de carcinoma mamario es corrido a través de una columna de Sephadex G-200 aparece, además de un pico con las FAC tipo 3 y 4, un pico con actividad de FAC que es excluido de la columna, lo que sugiere un PM elevado (200.000 D) o su unión a una fracción particulada.

Para descartar la unión de la FAC a la fracción particu-

Figura 5: Reactividad de las FAC tipo 3 y tipo 4 eluídas de la columna de DEAE-Sephadex contra antisuero anti-FACP.



a) FAC tipo 3 y b) FAC tipo 4 fueron sometidas a una CIE colocando en el orificio anódico antisuero anti-FACP (+) o suero normal de conejo (-).

lada se corrió un sobrenadante de 108.000 x g, preparado a partir de carcinoma mamario tal como se describió en Métodos, a través de una columna de Sepharose 6B. En la Figura 6 se puede apreciar que al eluir con buffer BTS aparecieron 2 picos con actividad de FAC, el primero de los cuales apareció inmediatamente

inmediatamente después del V_0 . Cuando se analizó mediante electroforesis en gel de acrilamida al 7,5% el contenido de los picos, se comprobó que el primer pico presentaba una banda de FAC que no penetraba el gel de poro fino (Figura 7.a)) mientras que el segundo pico contenía las FAC tipo 3 y tipo 4 (Figura 7.d)).

Cuando una muestra del primer pico fue corrida a través de un gel con menor concentración de acrilamida (3%), se observó que aparecía una banda de FAC en el gel de poro fino mientras que no se detectó actividad remanente en el gel de poro grueso (Figura 7.e)).

Los resultados obtenidos en la corrida de la columna de Sepharose 6B y en la electroforesis indicaron que estábamos en presencia de un C-FAC. La estabilidad de este C-FAC se pudo verificar al recromatografiar el primer pico de la columna de Sepharose 6B a través de otra columna similar ya que nuevamente eluyó como único pico de actividad inmediatamente después del V_0 .

Cuando se repitió el procedimiento de homogeneización y cromatografía a través de Sepharose 6B utilizando un buffer de pH ácido (buffer acetato pH 5,0) en lugar del buffer Tris-sulfato, se obtuvo otra comprobación de la estabilidad del complejo ya que el perfil de elución de la columna fue similar al obtenido con buffer BTS.

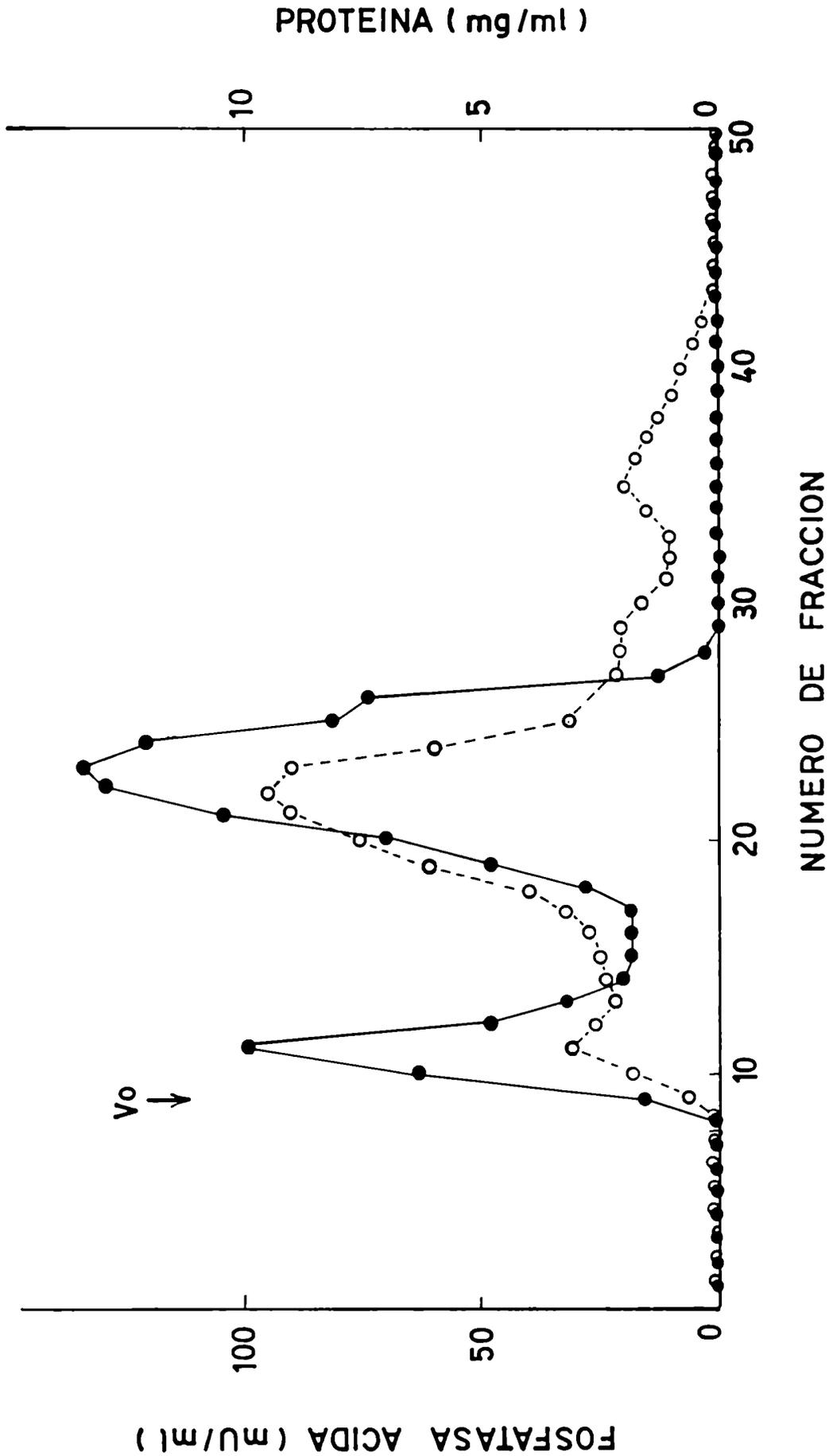
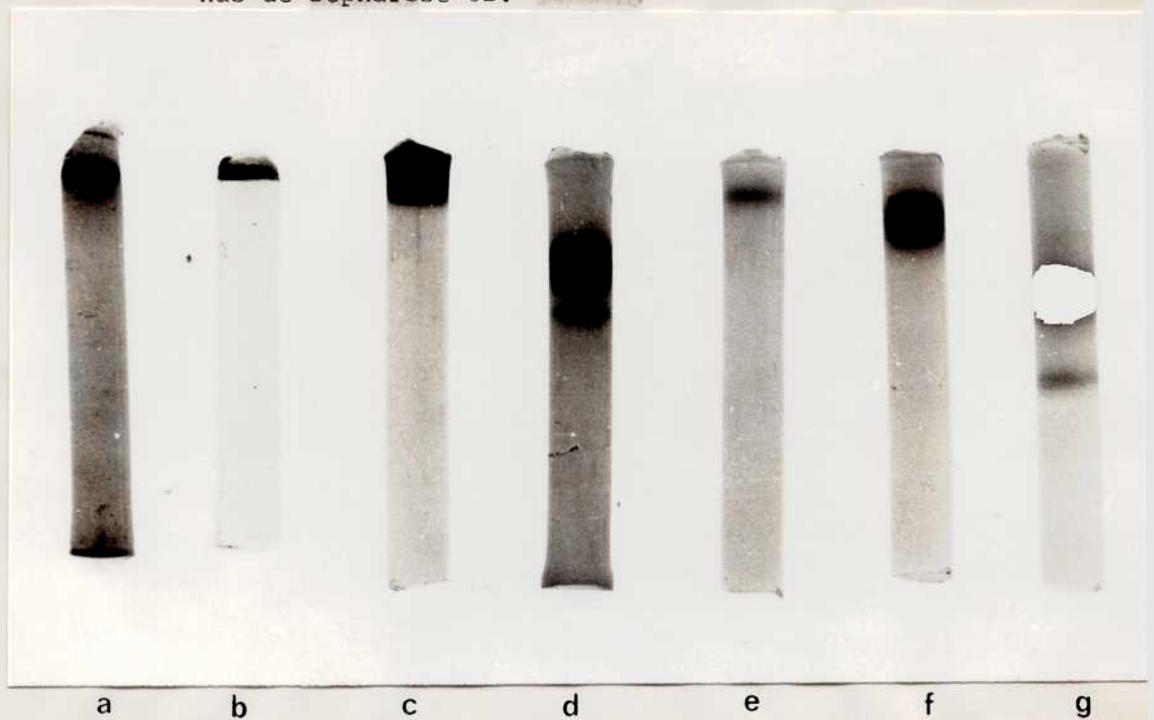


Figura 6: Elución de un citosol de carcinoma mamario a través de una columna de Sepharose 6B. La columna (36 x 2,7 cm) fue eluída a una velocidad de 10 ml/hora. El volumen de cada fracción fue de 3,8 ml. ● actividad enzimática; ○-----○ proteína.

Figura 7: Perfiles electroforéticos de fracciones eluidas de las columnas de Sepharose 6B.



a), b) y e) fracción 11 de la Figura 6; c) y f) fracción 24 de la Figura 8; d) y g) fracción 23 de la Figura 6. Todos los geles fueron teñidos para actividad enzimática excepto el b) que fue teñido para glicoproteína; e), f) y g) son geles con 3% de acrilamida, el resto de los geles tienen 7,5%.

2.2. Estudio acerca de la posible asociación con lípidos

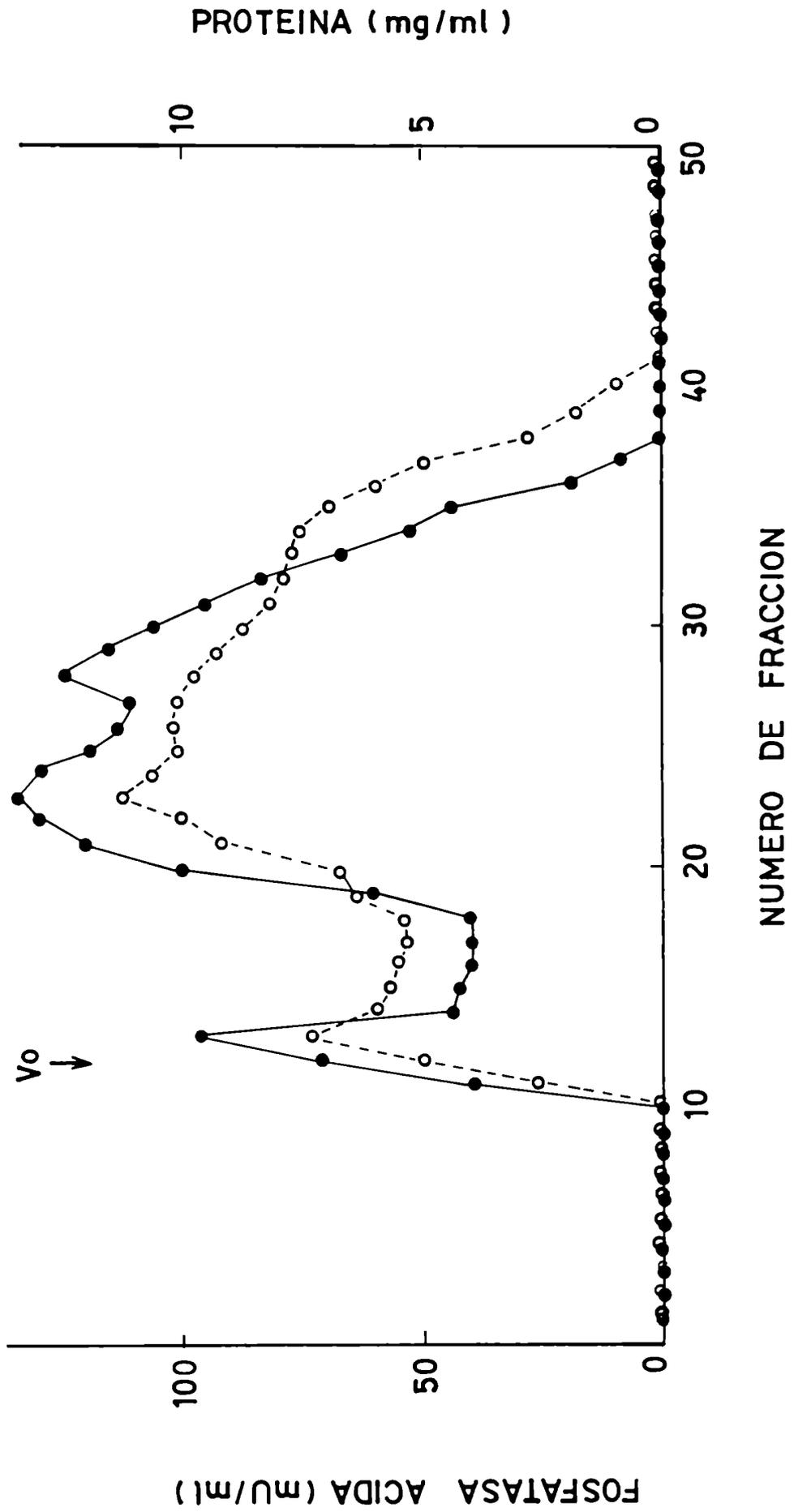
Se trató de investigar, entonces, si la existencia de este C-FAC puede ser resultado de una asociación con lípidos. Para ello se trataron homogenatos de carcinoma mamario con Tritón X-10.0 a una concentración final del 5% durante 30 minu-

tos. Luego de obtener el sobrenadante de 108.000 x g se lo sembró en una columna de Sepharose 6B pero agregando al buffer de elución (BTS) Tritón X-100 al 5%. En estas condiciones se obtuvieron 3 tipos con actividad de FAC (Figura 8). El primer pico, que eluyó inmediatamente después del Vo, mostró en electroforesis en geles de acrilamida al 7,5% una banda de FAC que no penetró el gel de poro fino. El segundo pico presentó una banda con la FAC tipo 1 (Figura 7.c)) y el último pico contenía, al igual que el segundo pico de Sepharose 6B eluída sin Tritón, las FAC tipo 3 y 4.

Por otro lado se incubaron muestras de C-FAC en presencia de Lubrol PX y Lubrol WX, detergentes que ya fueron utilizados para separar FALC asociada con lípidos (Crofton y Smith, 1981). Ninguno de los 2 tratamientos alteró la movilidad electroforética del C-FAC en geles de 7,5 o 3% de acrilamida. Asimismo cuando otra muestra de C-FAC fue tratada con n-butanol, tal como se describió en Métodos, toda la actividad de FAC se recuperó en la fase acuosa y no se detectaron cambios en la movilidad electroforética luego del tratamiento.

2.3. Estudios en torno a una posible agregación o polimerización proteica

En primer lugar se verificó que este C-FAC también aparece cuando se agrega al buffer de homogeneización y corrida un



compuesto como el ditiotreitól 1,5 mM que estabiliza los grupos sulfhidrúlicos.

Para estudiar la presencia de agregados proteicos se concentraron muestras de C-FAC eluidas de Sepharose 6B, se las trató con urea 8 M o SDS al 2% y se las corrió por columnas de Sepharose CL-4B tal como se describió en Métodos.

Como se puede observar en las Figuras 9 y 10 ni la urea ni el SDS respectivamente lograron reducir en forma significativa el PM del C-FAC. Por el contrario, se puede apreciar que el único pico con actividad de FAC aparece cercano al V_0 y muy lejos de la zona que corresponde a los PM de las FAC humanas bien caracterizadas.

2.4. Purificación del C-FAC

Se trató de purificar más al C-FAC luego de su elución de la columna de Sepharose 6B. En la Tabla 2 se resumen los sucesivos pasos efectuados tal como se describió en Métodos. Hay que tener en cuenta que la purificación real alcanzada debe haber sido varias veces mayor a lo indicado en la Tabla, ya que, al medir la actividad de FAC en el sobrenadante del cual se partió se incluyó también a otras FAC además del C-FAC. Luego del último paso, una muestra del C-FAC fue tratada con SDS 2% en condiciones no reductivas y se efectuó una electroforesis con SDS de acuerdo a lo señalado en Métodos. Al teñir para FAC se observó una única

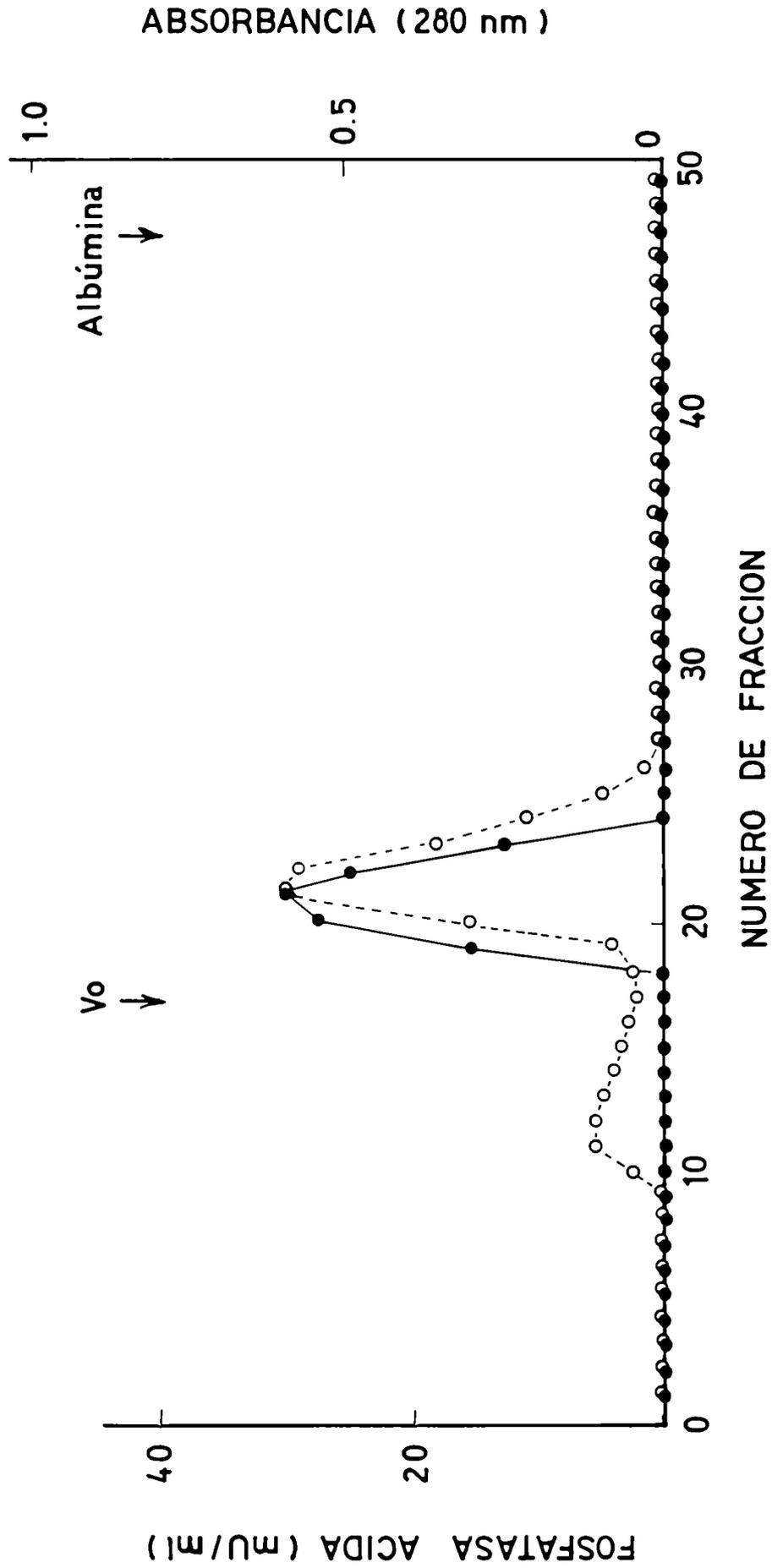


Figura 9: Filtración por gel en presencia de urea. La columna (68 x 1 cm) de Sepharose CL-4B fue eluída a una velocidad de 10 ml/hora. El volumen de cada fracción fue de 1 ml. ● actividad enzimática; ○ absorbancia.

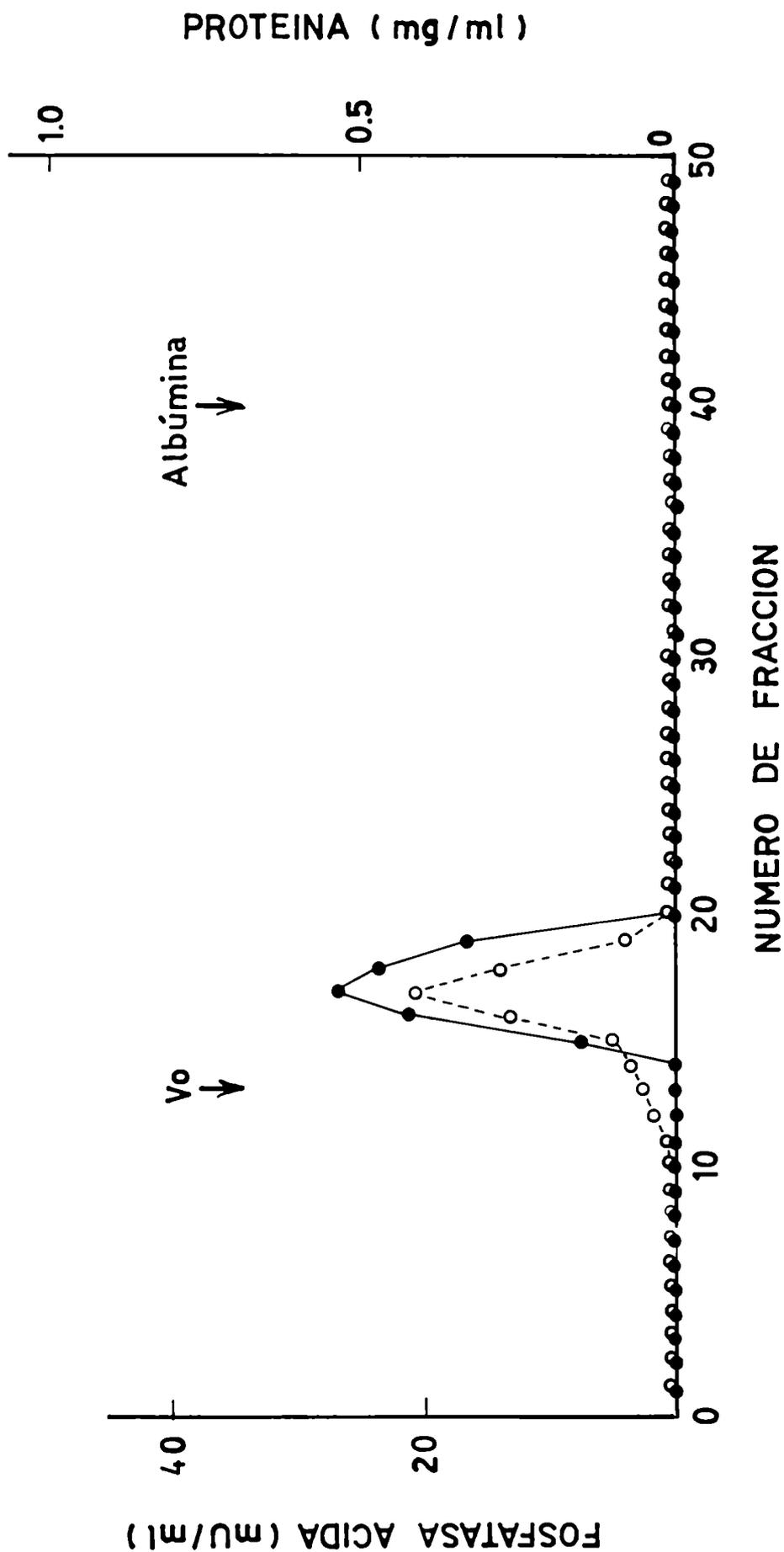


Figura 10: Filtración por gel en presencia de SDS.

La columna (51 x 1 cm) de Sepharose CL-4B fue eluída a una velocidad de 10 ml/hora. El volumen de cada fracción fue de 0,7 ml. ●—● actividad enzimática; o-----o proteína.

Tabla 2: Purificación del C-FAC de carcinoma mamario

Procedimiento	Actividad Total (mU)	Proteína Total (mg)	Actividad Específica (mU/mg)	Recuperación (%)	Purificación
Sobrenadante de 108.000 x g	1470	392	3,8	100	1
Columna de Sepharose 6B	633	30	21,1	43	6
Sulfato de Amonio (35-45%) luego de llevar a pH ácido	417	3	139,0	28	37
Columna de DEAE Celulosa	181	0,7	258,6	13	71

banda de actividad que apenas penetró en el gel de poro fino y que coincidió con la única banda observable cuando se coloró para proteína (datos no mostrados).

Cuando una muestra concentrada del C-FAC purificado se corrió a través de una columna de Sepharose CL-4B eluyendo con buffer BTS se obtuvo un único pico con actividad enzimática que presentó, de acuerdo con la calibración de la columna, un peso molecular aparente de aproximadamente 10^6 D (Figura 11).

Para estudiar la presencia de residuos glicosídicos se efectuó una electroforesis en gel de acrilamida al 7,5% con una muestra purificada. Luego de tefir para hidratos de carbono, tal como se describió en Métodos, se observó una única banda muy intensa que no penetró el gel de poro fino (Figura 10.b)). La tinción para hidratos de carbono no se efectuó en un gel de 3% de acrilamida porque éste no resistía el proceso de coloración.

2.5. Presencia del C-FAC en otros tejidos

Se trató de ver si este C-FAC está presente en hígado y placenta humanos, tejidos en los cuales se había descrito la presencia de una FAC de más de 200.000 D (Dipietro y Zengerle, 1967; Rehkop y Van Etten, 1975). Sin embargo, cuando se corrieron sobrenadantes (preparados de igual forma que de carcinoma mamario) a través de columnas de Sepharose 6B no se detectaron picos con actividad de FAC excluidos de la columna en ninguno de

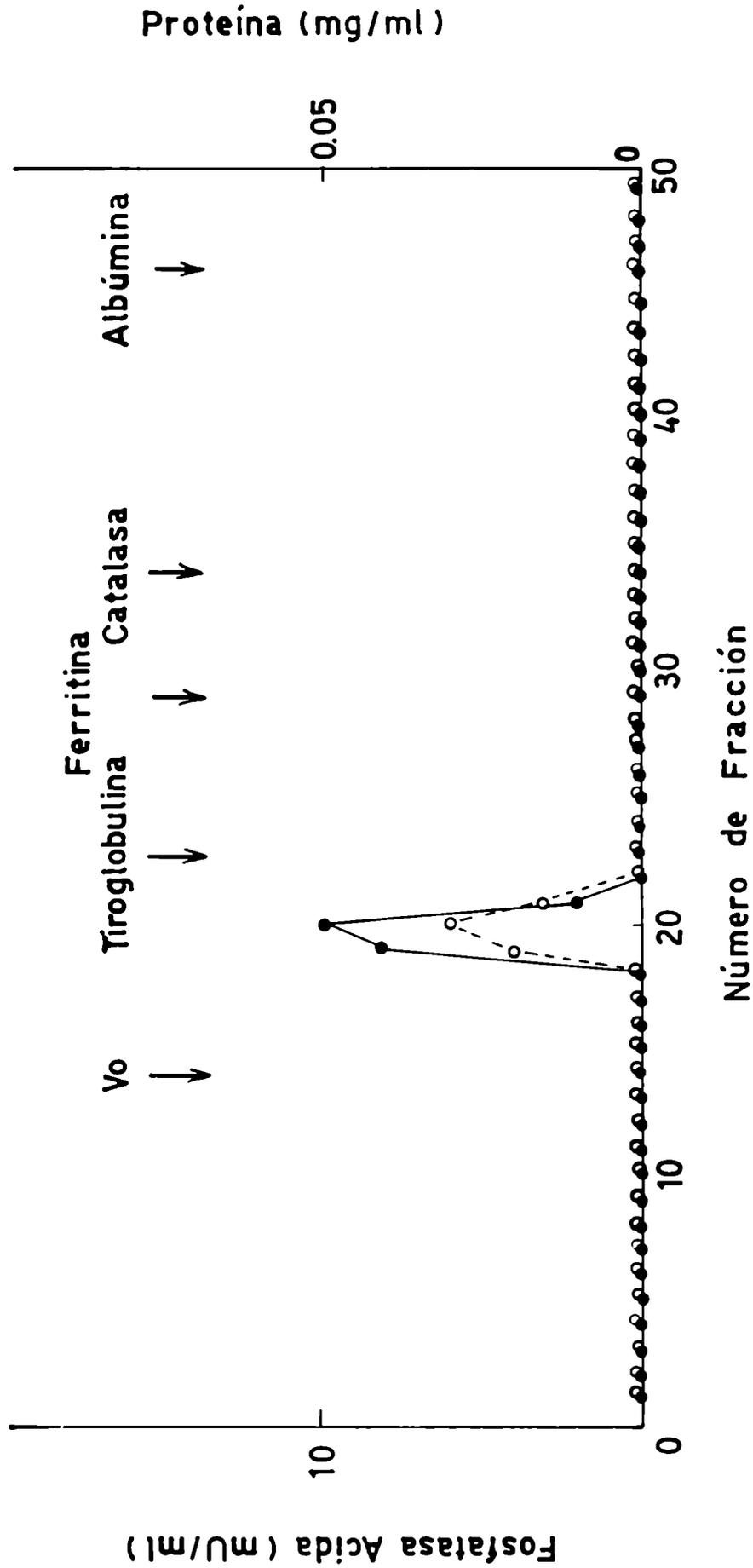


Figura 11: Elución del C-FAC purificado a través de una columna de Sepharose CL-4B. La columna (64' x 1 cm) fue eluída a una velocidad de 10 ml/h. El volumen de cada fracción fue de 1 ml. ●—● actividad enzimática; ○----○ proteína.

los dos tejidos. Por otro lado, cuando se corrió el sobrenadante de tejido normal mamario, se observó un pico con actividad de FAC que apareció inmediatamente después del Vo, en forma similar a lo descrito para carcinoma mamario. Ya se ha señalado que cuando se corrió sobrenadante de tejido normal mamario en geles de acrilamida al 7,5% se pudo apreciar una banda de FAC que no penetraba el gel de poro fino.

3. Aislamiento y estudio de diversas propiedades de la FAC tipo 3 de carcinoma y tejido normal mamario

Los resultados obtenidos al estudiar las FAC no eritrocitarias en el carcinoma y en el tejido normal mamario nos han indicado que existe un incremento notorio de las mismas en el carcinoma y que este incremento no parece deberse a la aparición de alguna FAC ausente en el tejido normal mamario. A la vez, los perfiles electroforéticos y distintas columnas efectuadas han indicado con claridad que la FAC tipo 3 es la que presenta mayor actividad tanto en carcinoma, como en el tejido normal mamario.

Dado que la FAC tipo 3 no ha sido estudiada en detalle en tejidos tumorales ni en tejidos mamaros, se decidió analizar sus propiedades en el carcinoma mamario. A la vez, y en la medida de las posibilidades que brindó la escasa disponibi-

dad de muestras de tejido normal mamario, se compararon dichas propiedades con las de la FAC tipo 3, obtenida a partir del tejido normal. Dicha comparación se efectuó con la intención básica de conocer si el aumento de la actividad de FAC tipo 3 en el carcinoma va acompañada de algún cambio en alguna de sus propiedades que no se ve reflejado en la movilidad electroforética.

3.1. Aislamiento de FAC tipo 3 de carcinoma y tejido normal mamario

Para aislar la FAC de carcinoma se partió de 80 g de tejido. Se lo homogeneizó en buffer acetato 50 mM pH 5,0 de acuerdo a lo descrito en Métodos. Luego de la homogeneización, los homogenatos fueron centrifugados a 28.000 x g durante 30 minutos descartándose el precipitado. Luego se efectuó el fraccionamiento con sulfato de amonio. Cuando se analizó cada fracción mediante geles de poliacrilamida se verificó que el precipitado entre el 55% y el 75% de saturación contenía las FAC tipo 3 y 4 casi en su totalidad. Se resuspendió dicha fracción y se la corrió a través de una columna de Sephadex G-200 tal como se describió en Métodos. Al medir la actividad de FAC en las fracciones eluidas se detectó un solo pico (Figura 12). Cuando se analizó dicho pico mediante electroforesis se verificó que el mismo contenía a las FAC tipo 3 y 4 (Figura 13.a)). Se mezclaron en-

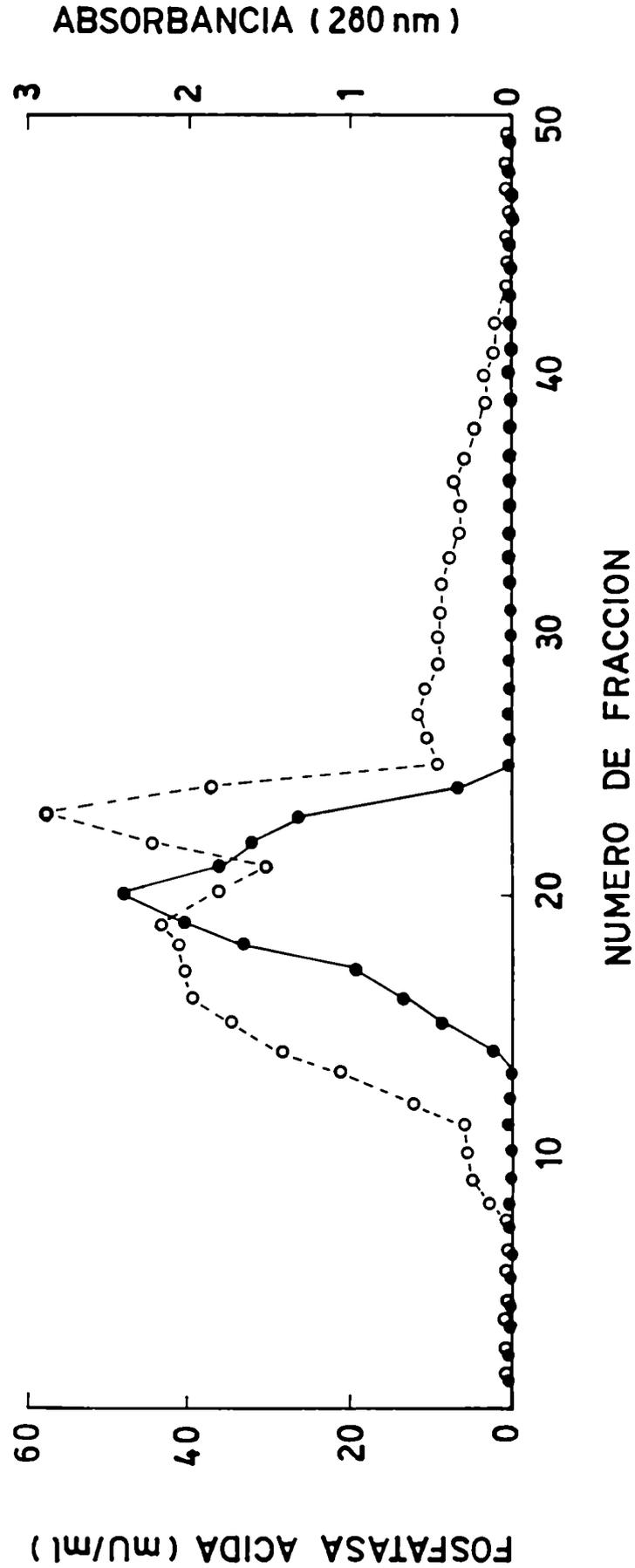


Figura 12: Purificación de la FAC tipo 3. Elución de una columna de Sephadex G-200. La columna (40 x 2,7 cm) fue eluída a una velocidad de 10 ml/hora. El volumen de cada fracción fue de 4,8 ml. ●—● actividad enzimática; o-----o absorbancia.

tonces las fracciones que contenían las FAC y se las sembró en una columna de DEAE-Celulosa eluyéndose la misma con un gradiente lineal de ClNa. Cuando se midió la actividad de FAC en las fracciones eluídas se obtuvo el perfil que se puede observar en la Figura 14. Al analizar mediante electroforesis el contenido de las distintas fracciones con actividad de FAC se comprobó que los tubos 21 a 26 contenían FAC tipo 3 (Figura 13.b)) mientras que los tubos 34 a 40 contenían FAC tipo 4 (Figura 13.c)).

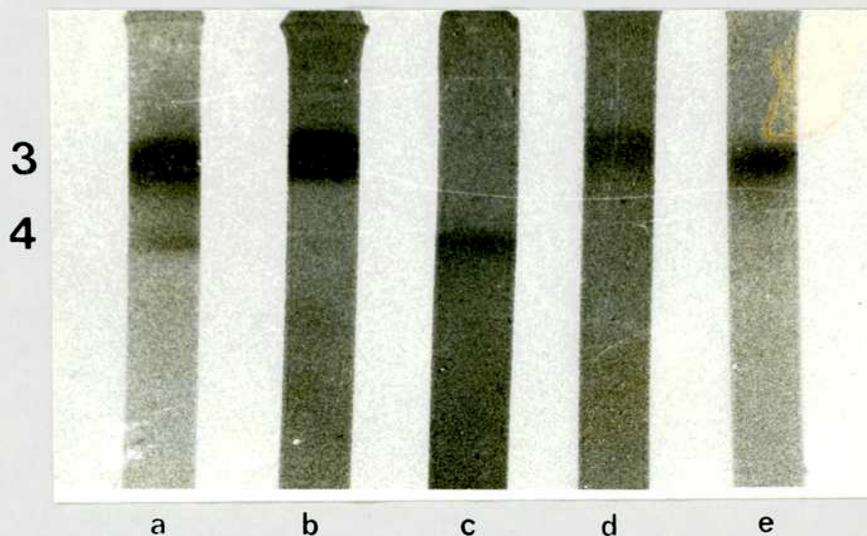
Finalmente, se tomaron las fracciones con la FAC tipo 3 y se las sembró en otra columna de DEAE-Celulosa eluyendo nuevamente con un gradiente lineal de ClNa. Esta vez se obtuvo un único pico de FAC (Figura 15) que fue identificado por su movilidad electroforética en un gel de poliacrilamida como el correspondiente a la FAC tipo 3 (Figura 13.d)). Al correr en un gel paralelo otra muestra del pico de actividad de la última columna de DEAE-Celulosa se observó que al teñir para proteína sólo se detectaba una banda, la cual aparecía a la misma distancia del origen que la banda de FAC tipo 3 (Figura 13.e)).

Para el aislamiento de la FAC tipo 3 a partir de 80 g de tejido mamario normal se efectuaron exactamente los mismos pasos que cuando se partió del tejido maligno.

En las Tablas 3 y 4 están reseñados todos los pasos seguidos tanto para el carcinoma como para el tejido normal. Se puede observar que la enzima tumoral fue purificada cerca de 500 veces y que la normal lo fue alrededor de 350 veces. Sin embar-

go debemos destacar que el grado de purificación real logrado es por lo menos el doble del indicado dado que en el sobrenadante tisular donde se midió la actividad de FAC inicial estaban presentes, además de la FAC tipo 3, otras FAC que luego fueron eliminadas en los sucesivos pasos.

Figura 13: Perfiles electroforéticos de las fracciones con actividad de FAC eluidas de las columnas efectuadas durante la purificación de la FAC tipo 3.



a) Fracción 20 de la Figura 12; b) Fracción 23 de la Figura 14; c) Fracción 37 de la Figura 14; d) Fracción 22 de la Figura 15; e) Fracción 22 de la Figura 15. Los geles a), b), c) y d) fueron teñidos para FAC mientras que el gel e) fue teñido para proteína.

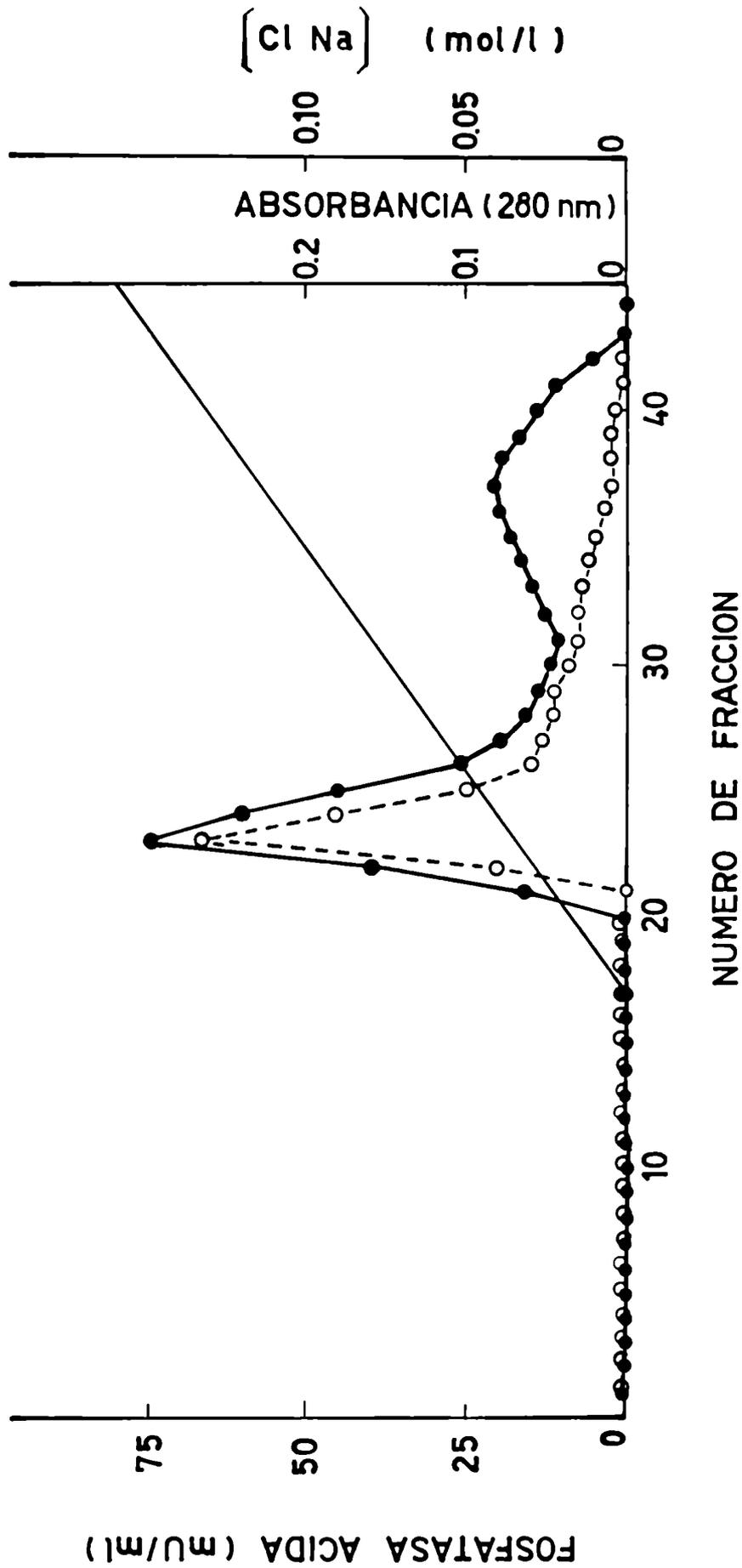


Figura 14: Purificación de la FAC tipo 3. Elución de la primer columna de DEAE-Celulosa. La columna (24 x 1,8 cm) fue eluída a una velocidad de 20 ml/hora. El volumen de cada fracción fue de 4,8 ml. ● actividad enzimática; ○ absorbancia; — ClNa.

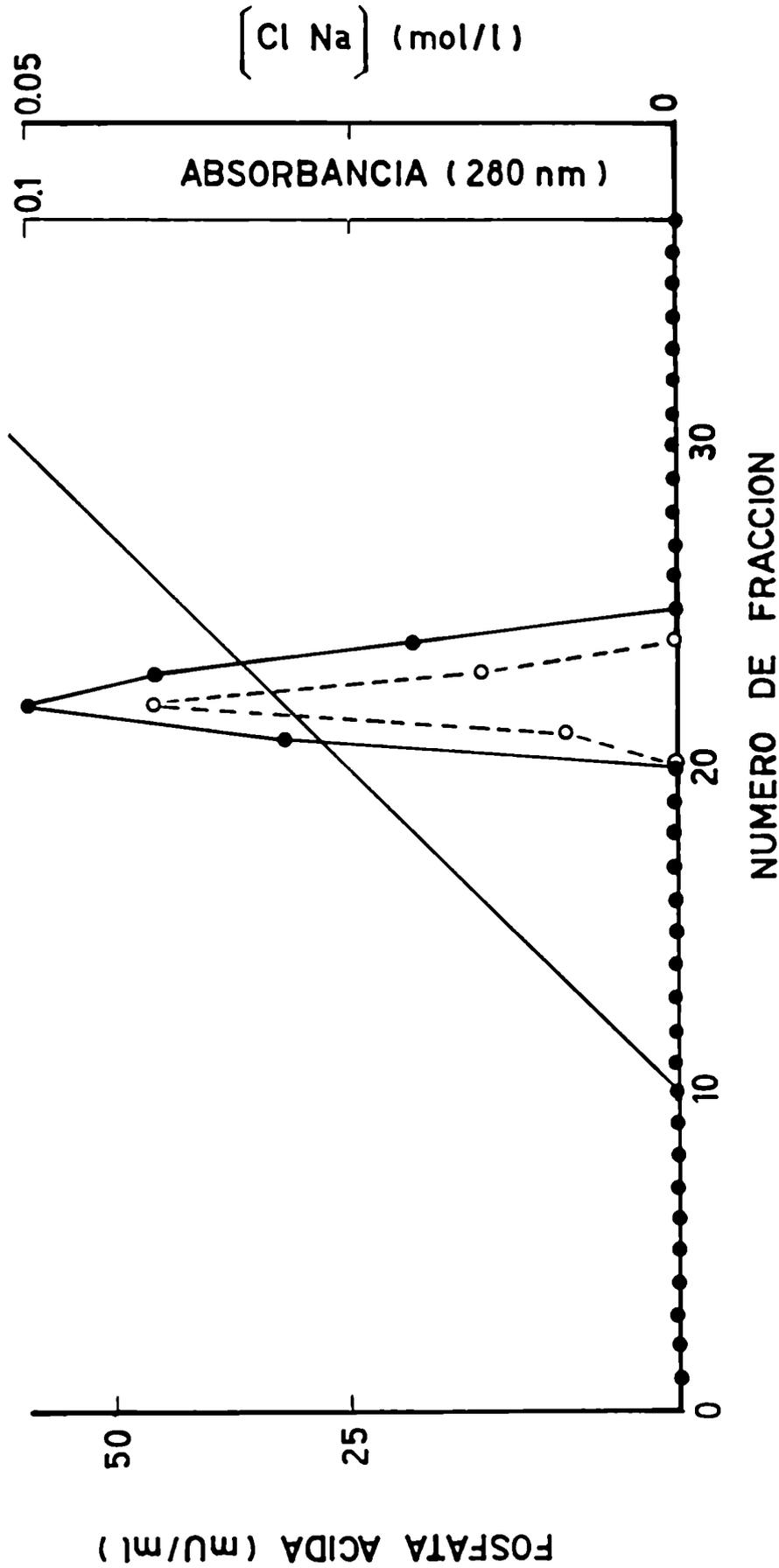


Figura 15: Purificación de la FAC tipo 3. Elución de la segunda columna de DEAE-Celulosa. La columna (12 x 1 cm) fue eluída a una velocidad de 20 ml/hora. El volumen de cada fracción fue de 2 ml. ● actividad enzimática; ○ absorbancia; — ClNa

Tabla 3: Purificación de la FAC tipo 3 de carcinoma mamario

Procedimiento	Actividad Total (mU)	Proteína Total (mg)	Actividad Específica (mU/mg)	Recuperación (%)	Purificación
Sobrenadante de 28.000 x g	2208	1512	1,5	100	1
Sulfato de Amonio (55-75%)	1230	134	9,2	56	6
Columna de Sephadex G-200	1190	34	35,0	54	24
1ª columna de DEAE-Celulosa	864	2,5	339	39	232
2ª columna de DEAE-Celulosa	750	1,0	750	34	512

Tabla 4: Purificación de la FAC tipo 3 de tejido normal mamario

Procedimiento	Actividad Total (mU)	Proteína Total (mg)	Actividad Específica (mU/mg)	Recuperación (%)	Purificación
Sobrenadante de 28.000 x g	637	1050	0,6	100	1
Sulfato de Amonio (55-75%)	510	105	4,9	80	8
Columna de Sephadex G-200	480	65	7,4	75	12
1º columna de DEAE-Celulosa	189	1,3	142	30	237
2º columna de DEAE-Celulosa	153	0,7	218	24	357

3.2. Medición del PM de la FAC tipo 3 de carcinoma mamario

Una vez que se contó con la enzima purificada se midió el PM utilizando electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS en condiciones no desnaturizantes, tal como se describió en Métodos. En la Figura 16 se puede apreciar que la FAC tipo 3, manteniendo su actividad enzimática, presentó con esta técnica un PM aparente de 103.500 D.

Por falta de enzima suficiente no se pudo determinar mediante electroforesis el PM de la FAC tipo 3 proveniente de tejido normal. Sin embargo, al efectuar la columna de Sephadex G-200 durante la purificación, el pico que contenía dicha enzima apareció en la misma posición con que eluyó la FAC tipo 3 proveniente de tejido tumoral. Por lo tanto, se puede suponer que el PM de la enzima proveniente del tejido normal debe ser próximo o similar al de la proveniente del tejido tumoral.

También se corrió la enzima purificada de tumor maligno después de tratarla en condiciones desnaturizantes. Al teñir para proteína se observó una única banda a la que le correspondió un PM de 54.000 (Figura 16).

3.3. Especificidad de sustrato

Tal como hemos señalado en la Introducción, las distintas FAC suelen diferenciarse por su diferente capacidad para hi

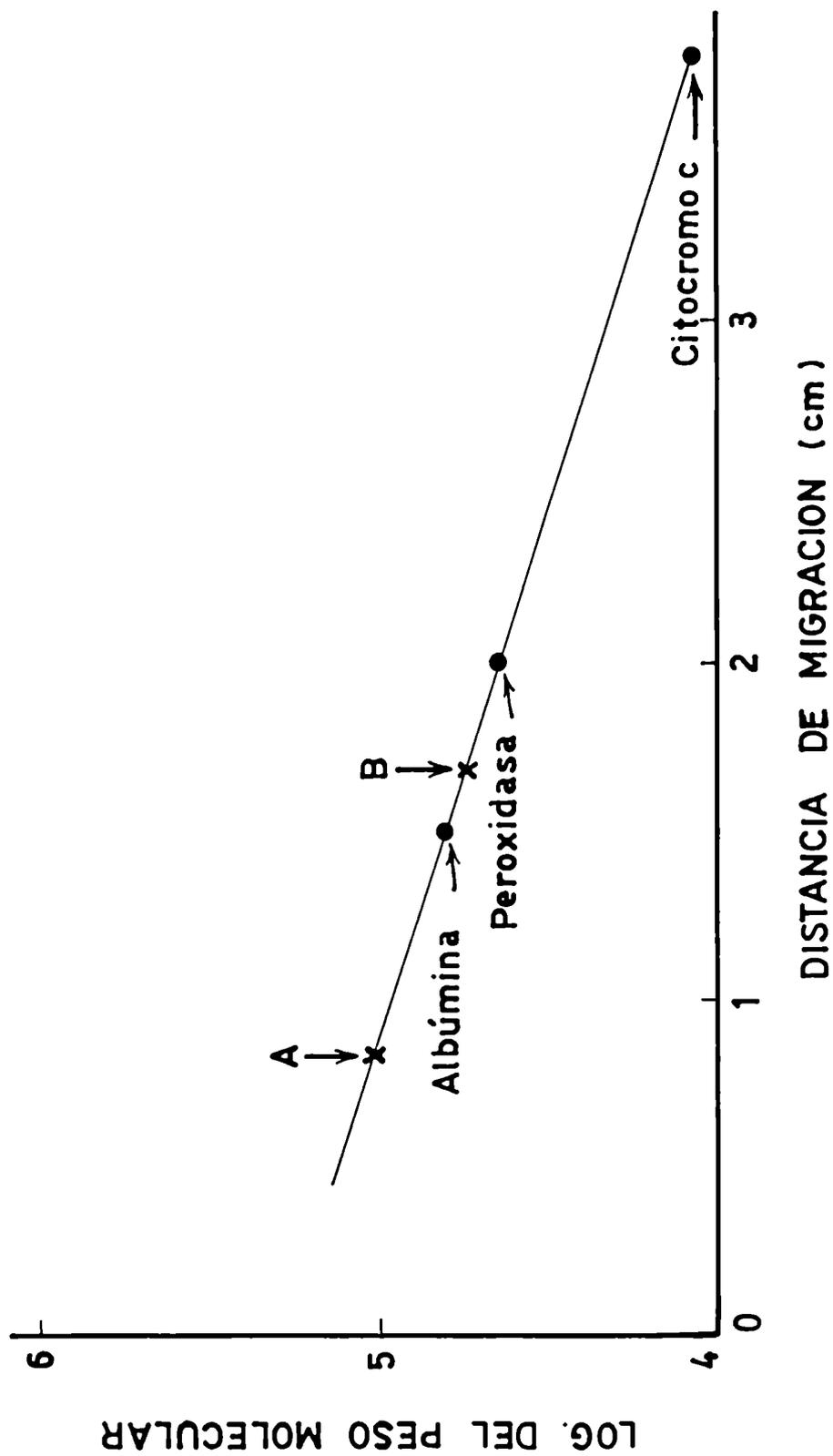


Figura 16: Medición de peso molecular de la FAC tipo 3 por electroforesis con SDS en gel de poli-acrilamida.

Se corrió a la FAC tipo 3 purificada de carcinoma mamario en condiciones desnaturalizantes (A) y no desnaturalizantes (B). Se tiñó para FAC y para proteínas.

hidrolizar diversos sustratos. Por lo tanto, se decidió estudiar en este aspecto a las FAC tipo 3 aisladas del tejido mamario. En la Tabla 5 se puede observar, en primer lugar, que ambas enzimas presentan resultados muy parecidos: hidrolizan muy bien PNFF, α -NF, en forma moderada β -GF, ASBI-F y AMP y muy poco G6F, G1F, ATP, ADP, timidina trifosfato (TTP) y PPI. Es decir que parecen no tener capacidad de hidrolizar pirofosfatos ni azúcares-fosfato. También, como era de esperar, ninguna de las enzimas fue capaz de hidrolizar CF.

3.4. Efecto de distintos compuestos sobre la capacidad de ambas FAC tipo 3 para hidrolizar PNFF

También se ha indicado en la Introducción que otro elemento muy importante en la caracterización de las distintas FAC es el efecto de distintos compuestos sobre su capacidad de hidrólisis. En la Tabla 6 se puede observar que el comportamiento de las 2 FAC aisladas del tejido mamario frente a las distintas sustancias estudiadas es prácticamente similar. Es importante destacar que tanto (+) tartrato como fluoruro inhiben notoriamente a ambas enzimas.

3.5. Afinidad respecto de PNFF, α -NF y β -GF

Se midió el Km de la FAC tumoral respecto de los 3 sus-

Tabla 5: Especificidad de sustrato de las FAC tipo 3 de carcinoma y tejido normal mamario

Sustrato	% respecto de PNFF	
	Carcinoma	Tejido normal
PNFF	100	100
β -GF	36	36
α -NF	72	67
G6F	6	7
G1F	19	17
ASBI-F	34	33
AMP	41	38
ATP	15	13
ADP	12	10
TTP	12	NM
PPi	12	7
CF	2	1

Cada determinación se efectuó por duplicado y se calculó el promedio. La actividad respecto del PNFF fue fijada arbitrariamente como 100.

NM: no medido.

Tabla 6: Efecto de distintos compuestos sobre la capacidad de las FAC tipo 3 de carcinoma y tejido normal mamario de hidrolizar PNFF

Compuesto	% del control	
	Carcinoma	Tejido normal
(+) tartrato (20 mM)	13	12
Ditiotreitol (1mM)	102	100
Mercaptoetanol (1mM)	94	102
EDTA (5mM)	83	80
Cisteína (1mM)	94	95
Cl ₂ Zn (1mM)	91	95
Molibdato de NH ₄ (1mM)	66	66
ClNa (5mM)	95	93
Cl ₂ Mg (5mM)	92	87
FNa (10mM)	13	18
Alloxano (50mM)	100	102

El control se midió de la misma forma que el resto de las determinaciones, pero no se le agregó ningún compuesto a la mezcla de incubación. Cada determinación se efectuó por duplicado y se calculó el promedio.

tratos que mejor hidroliza entre los estudiados: PNFF, α -NF Y β -GF.

A partir de los resultados presentados en la Figura 17 se calculó un Km respecto del PNFF de 0,66 mM. En la misma Figura se presentan, además, las curvas de inhibición por (+) tartrato. De acuerdo con las mismas se calculó un Ki de 0,028 mM.

Con respecto a la enzima proveniente del tejido normal, de acuerdo con la curva de la Figura 18 se calculó un Km respecto del PNFF de 0,63 mM.

Los Km respecto de β -GF y α -NF se pudieron calcular sólo para la enzima tumoral, obteniéndose como resultados 3,57 mM y 1,06 mM, respectivamente.

3.6. Termoestabilidad a 50°C y 60°C

Al estudiar la termoestabilidad de la FAC proveniente de carcinoma a 50°C y 60°C durante 60 minutos se obtuvieron las curvas que se muestran en la Figura 19 y que indican que la enzima es bastante estable a 50°C ya que conserva un 74% de actividad luego de 60 minutos. En cambio, a 60°C sólo conserva un 5% de actividad luego de dicho lapso.

3.7. Determinación del pH óptimo

Finalmente, se determinó de acuerdo a lo descrito en

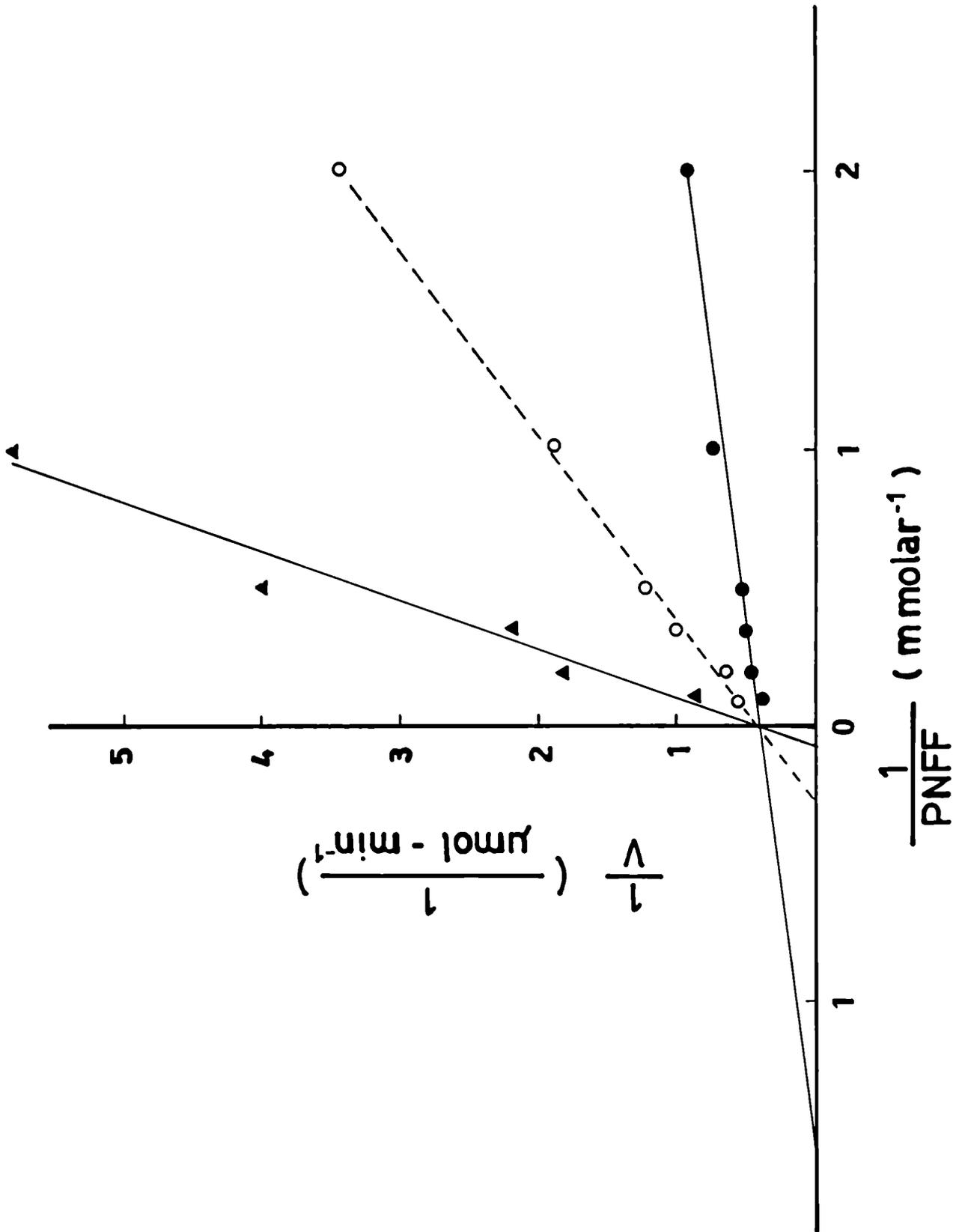
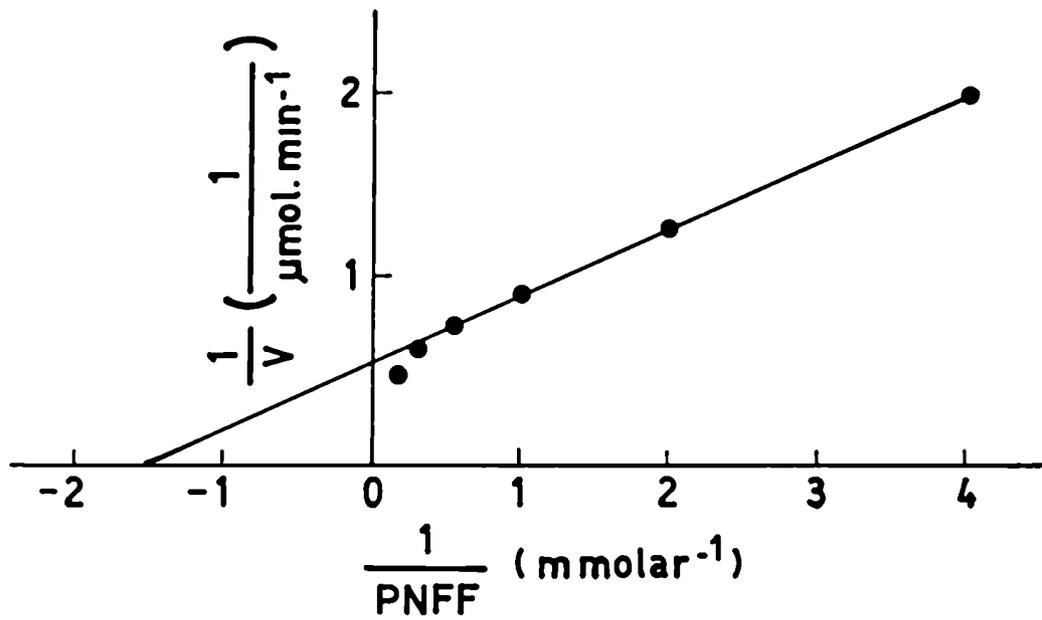


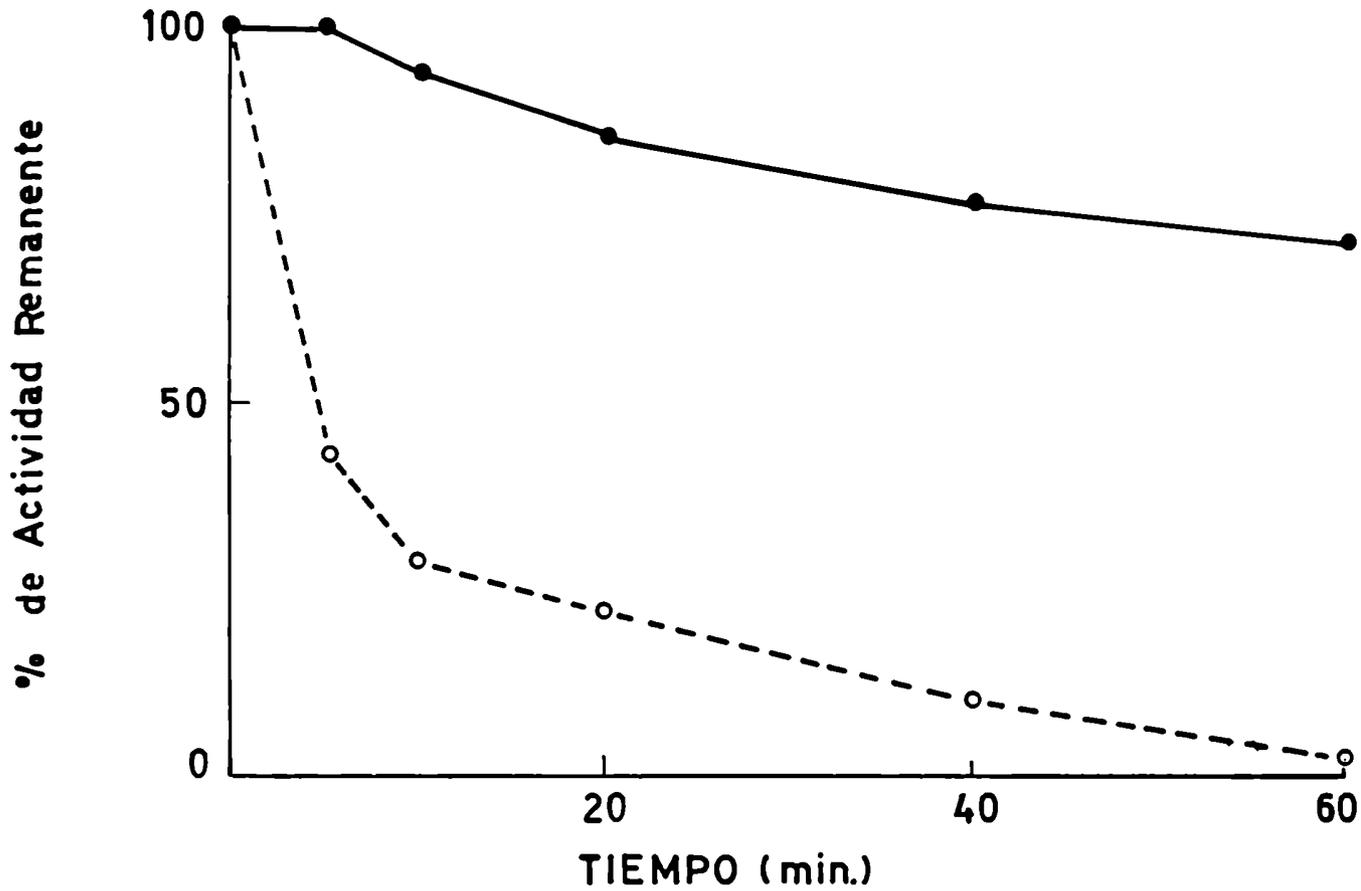
Figura 17: Determinación de K_m y de K_i ($(+)$ tartrato) de la FAC tipo 3 de carcinoma respecto de PNFF. Cada punto se determinó por duplicado y se calculó el promedio. \bullet — \bullet control; o—o + tartrato 0,125 mM; \blacktriangle — \blacktriangle + tartrato 0,5 mM (las 2 concentraciones estudiadas dieron el mismo K_i).

Figura 18: Determinación de K_m de la FAC tipo 3 de tejido normal respecto de PNFF



Cada punto se determinó por duplicado y se calculó el promedio.

Figura 19: Termoestabilidad de la FAC tipo 3 tumoral a 50°C y 60°C



Cada punto se determinó por duplicado y se calculó el promedio.

●—● 50°C; o----o 60°C.

Métodos el pH óptimo de la FAC tipo 3 de carcinoma mamario utilizando como sustratos PNFF y β -GF. De acuerdo con lo que se puede observar en la Figura 20 esta enzima presenta un pH óptimo de 3,5 a 4,0 para PNFF y de 5,0 para β -GF. Cuando se estudió el pH óptimo de la FAC proveniente de tejido normal utilizando como sustrato PNFF se obtuvo una curva muy parecida a la obtenida con la enzima de tumor. En este caso la máxima actividad se ubicó en un intervalo de pH de 3,5 a 4,0.

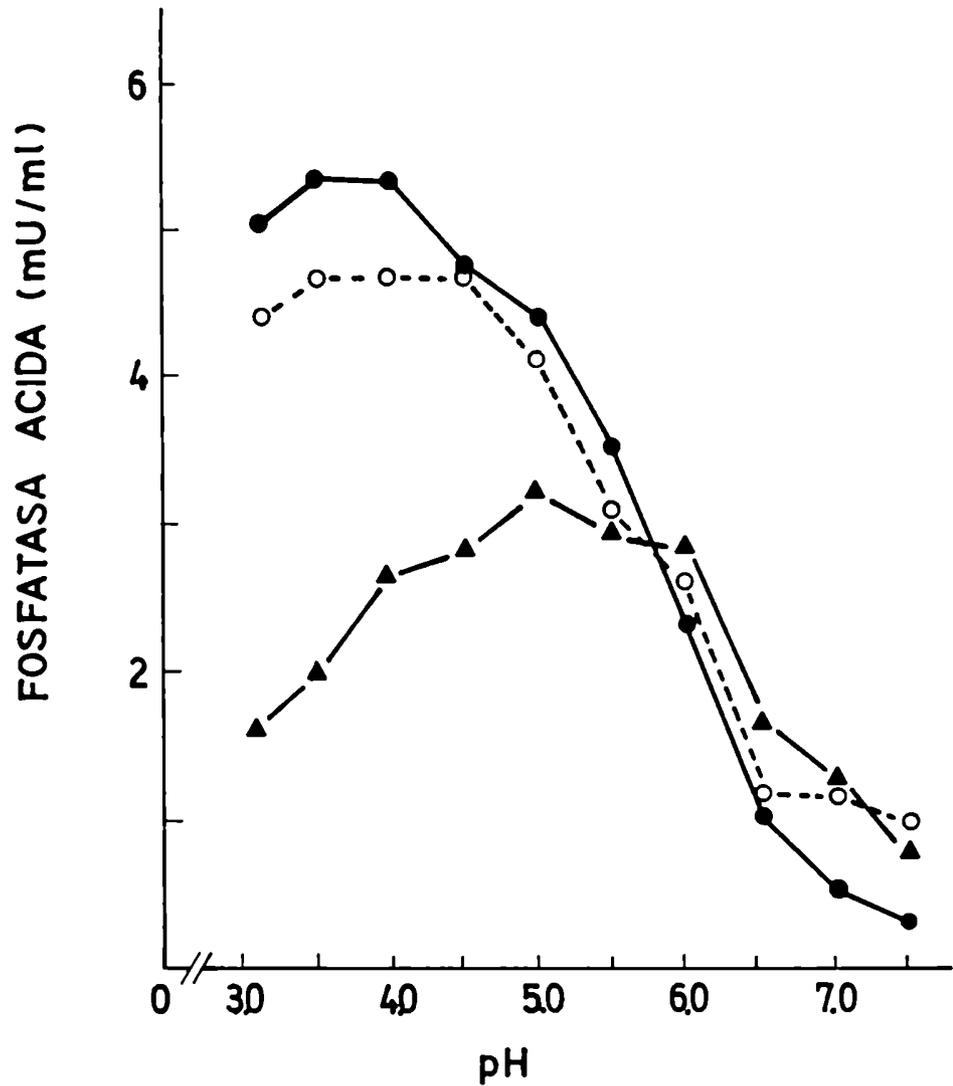
4. Presencia de "FAC tipo 2" en la leche humana

En la Introducción se ha señalado la intención de estudiar qué tipo de FAC está presente en la leche humana ya que ésta puede ser una excelente fuente para la obtención de FAC originadas en el epitelio mamario.

4.1. Electroforesis en gel de poliacrilamida de la leche descremada

Primeramente se separó la crema tal como se describió en Métodos. Cuando se midió la actividad de FAC total en la crema y en la leche descremada proveniente de distintas muestras se verificó que casi toda la actividad (alrededor del 95%) se encontraba en la leche descremada. Por lo tanto, los poste-

Figura 20: Determinación de pH óptimo respecto de PNFF y β -GF para la FAC tipo 3 de carcinoma y respecto de PNFF para la FAC tipo 3 de tejido normal mamario



Cada punto se determinó por duplicado y se calculó el promedio.

●—● PNFF, FAC de carcinoma; o----o PNFF, FAC de tejido normal;
 ▲—▲ β -GF, FAC de carcinoma.

riores estudios se efectuaron en dicha fracción.

Al desarrollar, para el análisis de las FAC, el sistema electroforético de Li y col. se encontró que todas las muestras de leche descremada que se analizaron poseían no sólo FAC tipo 3 y tipo 4 (ambas están presentes en el epitelio mamario) sino que también contaban con una banda de FAC con similar movilidad electroforética que una muestra de FACP purificada (FAC tipo 2) que se corrió en otro gel en forma paralela (Figura 21).

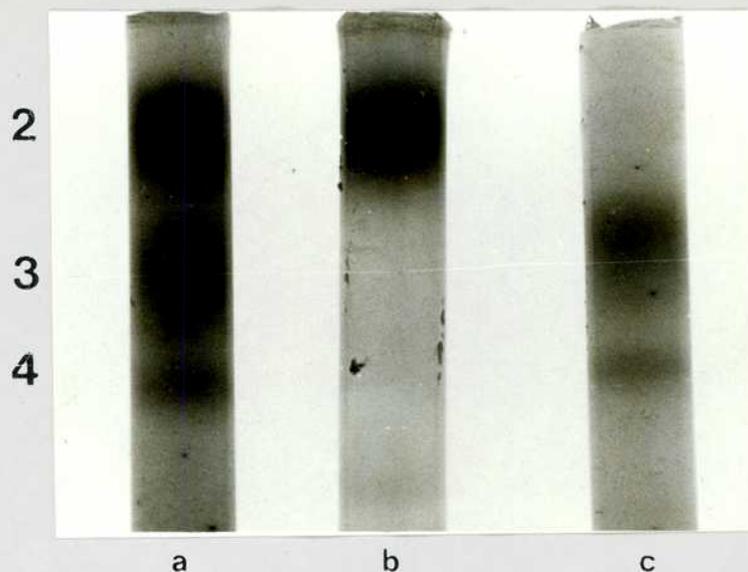
Esta observación resultó un tanto inesperada ya que, tal como se señaló en la Introducción, la FAC tipo 2 se encontró hasta el momento fundamentalmente en próstata y, en pequeñas cantidades, en páncreas, bazo, neutrófilos y monocitos. Además, en nuestros estudios efectuados en tejido mamario no se encontraron cantidades detectables de dicha enzima.

4.2. Separación de las FAC de la leche descremada

Se decidió, por lo tanto, tratar de verificar si la FAC de la leche que presenta similar movilidad electroforética que la FACP poseía también otras propiedades que caracterizan a esta enzima. Para ello fue necesario separar la FAC en cuestión de las otras FAC presentes en la leche descremada.

Con este objetivo se corrió una muestra de la misma a través de una columna de DEAE-Celulosa de acuerdo con lo descrito en Métodos. Al eluir con un gradiente lineal de ClNa se

Figura 21: Perfiles electroforéticos de FAC en geles de poli-
acrilamida



a) leche descremada; b) FACP purificada; c) FAC tipos 3 y 4 de carcinoma mamario. Todos los geles fueron teñidos para FAC.

observó que toda la actividad de FAC aparecía en un solo pico (Figura 22). Cuando se analizó dicho pico mediante electroforesis se comprobó que en el mismo estaban presentes las mismas bandas que había en la leche descremada original (Figura 24.a)).

Pensando en algún tipo de asociación o agregación entre las distintas FAC se decidió recromatografiar el pico de FAC eluído de la columna de DEAE-Celulosa a través de una segunda columna pero tratando previamente la muestra con Tritón X-100. Para ello se mezclaron las fracciones 29 a 34 de la primer columna, se las concentró 5 veces contra Ficoll sólido y se agre-

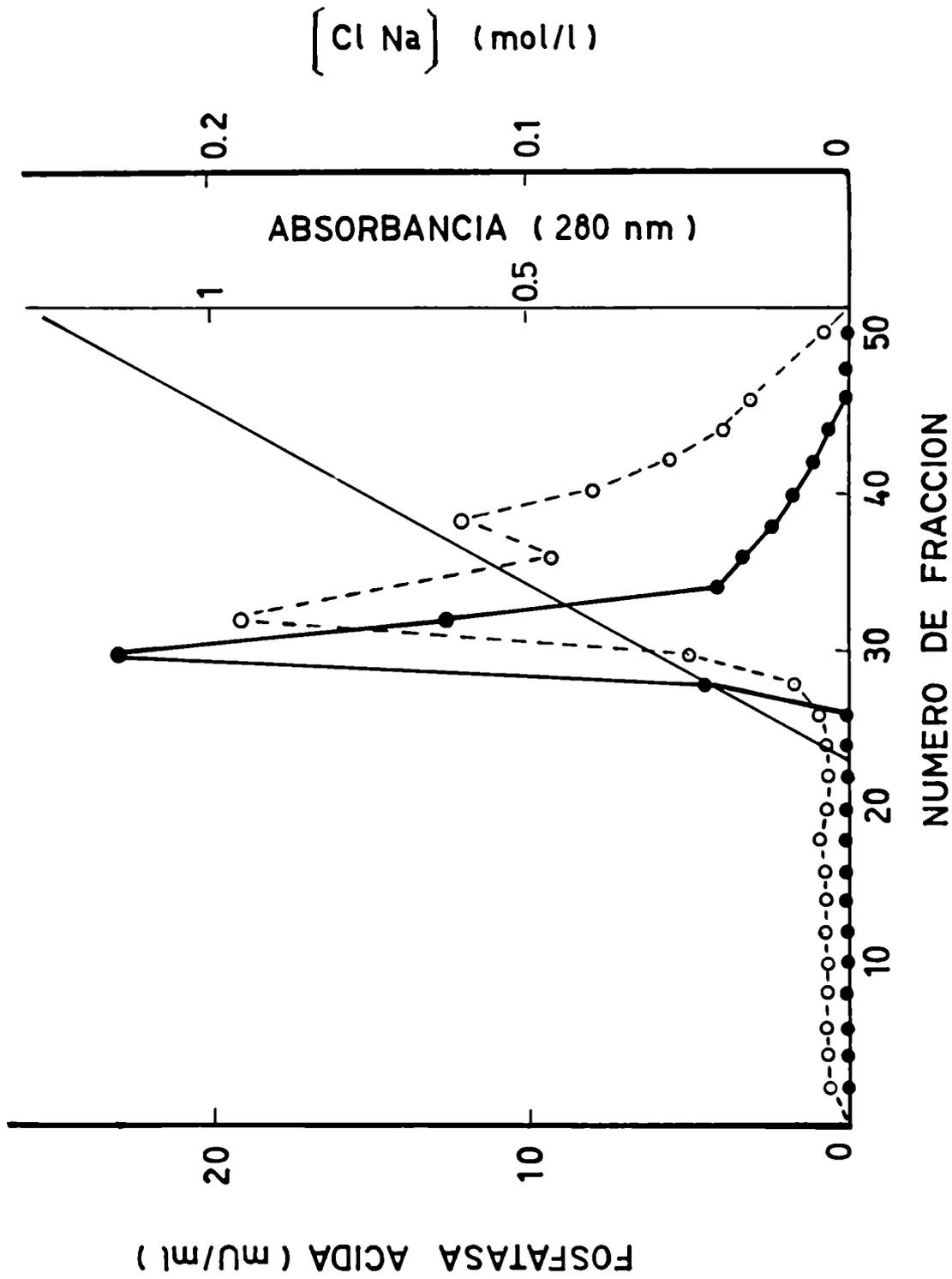


Figura 22: Elución de una muestra de leche descremada por una columna de DEAE-Celulosa sin Tritón X-100. La columna (27 x 1,8 cm) fue eluída a una velocidad de 25 ml/hora. El volumen de cada fracción fue de 4,8 ml. ●—● actividad enzimática; ○—○ absorbancia; — ClNa.

gó Tritón X-100 a una concentración final del 0,5%. Al eluir esta muestra por la segunda columna de DEAE-Celulosa se obtuvieron 3 picos de actividad, el primero de los cuales fue eluido cuando se lavó la columna con ClNa 50 mM (Figura 23). Al analizar mediante electroforesis las FAC presentes en cada pico se pudo verificar que el primer pico contenía la FAC tipo 3, el segundo pico la tipo 4 y el tercer pico la FAC que presenta similar movilidad electroforética que la FACP (Figura 24).

4.3. Algunas características de la "FAC tipo 2" encontrada en la leche descremada.

En primera instancia, se verificó tanto en gel de poliacrilamida como en solución que esta FAC es casi totalmente inhibida por (+) tartrato, cosa que también ocurre con la FACP. Sin embargo, esta propiedad, así como otras características bioquímicas de la FAC tipo 2, es también compartida por otras FAC. Por el contrario, y tal como se señaló en la introducción, la única propiedad bioquímica que hasta el momento ha diferenciado a la FACP de las otras FAC en forma neta ha sido su capacidad para hidrolizar CF.

Se decidió, por lo tanto, estudiar la actividad de la "FAC tipo 2" aislada de la leche descremada respecto de dicho sustrato. Para ello se comparó la actividad de las 3 FAC separadas respecto de PNFF y CF. También se hizo lo mismo con una muestra

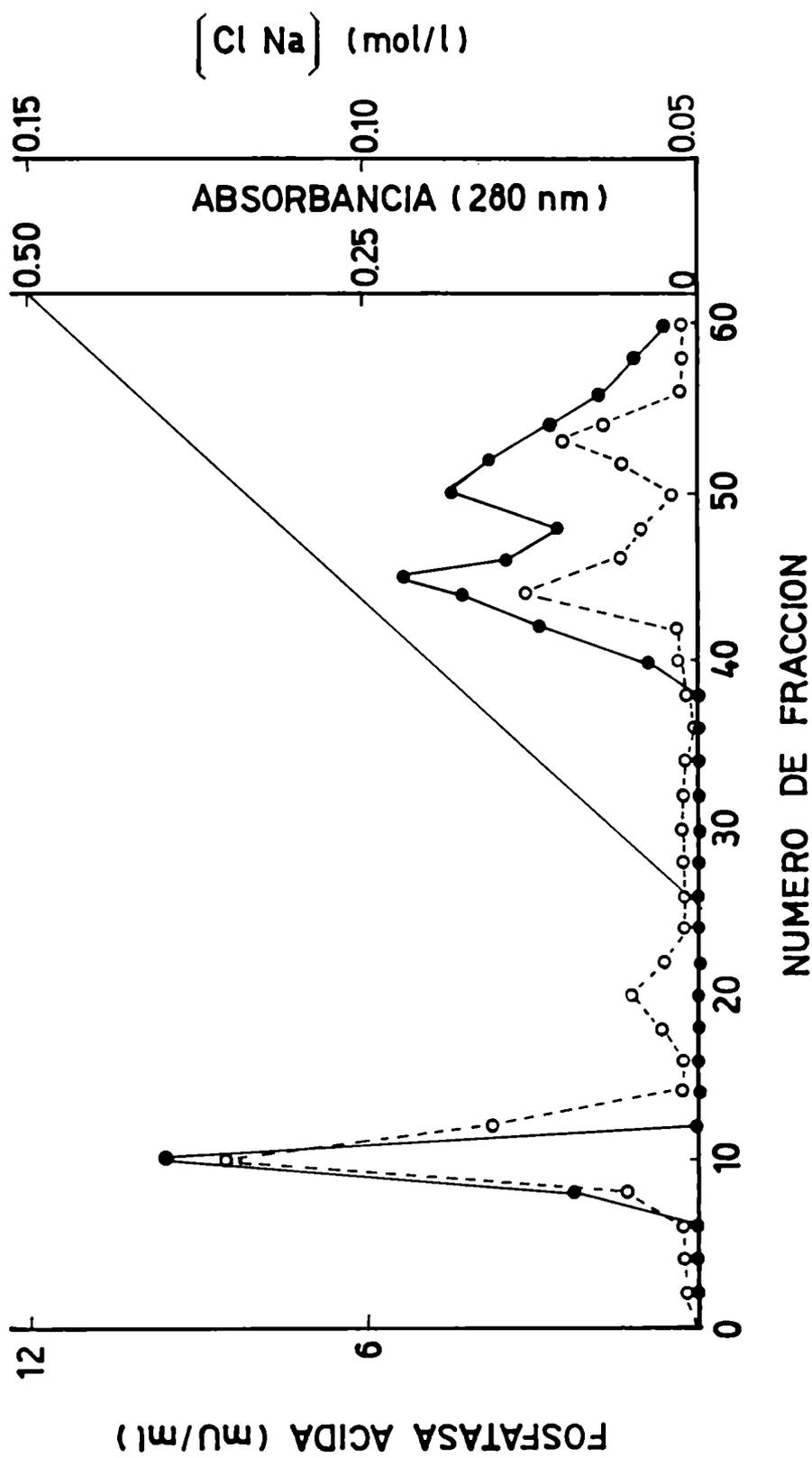
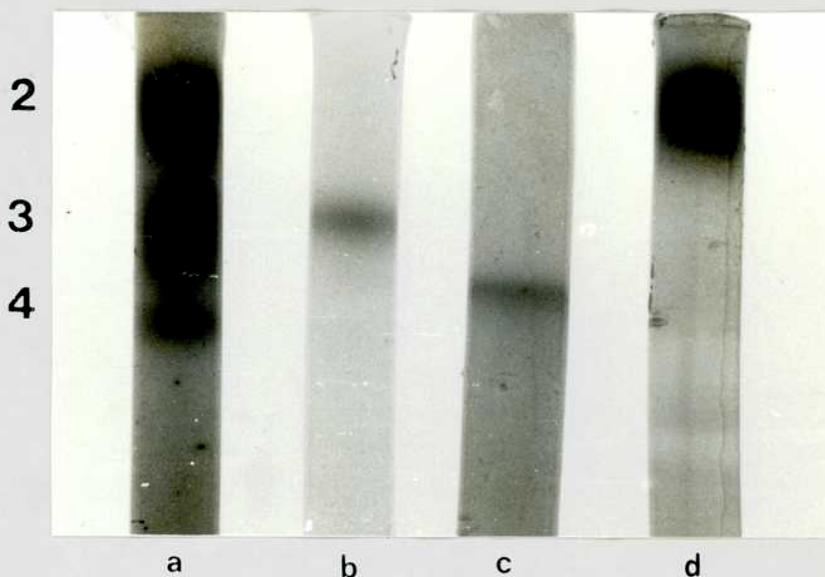


Figura 23: Elución de la columna de DEAE-Celulosa con el agregado de Tritón X-100. La columna (20 x 1,8 cm) fue eluída a una velocidad de 25 ml/hora. El volumen de cada fracción fue de 4,8 ml. ● actividad enzimática; ○ absorbancia; — ClNa.

Figura 24: Perfiles electroforéticos de los picos eluidos de las columnas de DEAE-Celulosa.



a) Único pico de la primer columna; b) 1º pico de la segunda columna; c) 2º pico de la segunda columna; d) 3º pico de la segunda columna. Todos los geles fueron teñidos para FAC.

de FACP purificada. En la Tabla 7 se puede apreciar que la "FAC tipo 2" aislada de la leche descremada hidroliza muy bien CF, cosa que no ocurre con las otras FAC de similar origen.

Finalmente se decidió verificar si la "FAC tipo 2" de la leche reaccionaba contra un antisuero anti-FACP. Para ello se efectuó una CIE sembrándose muestras de las 3 FAC separadas por cromatografía. Tal como se puede observar en la Fi-

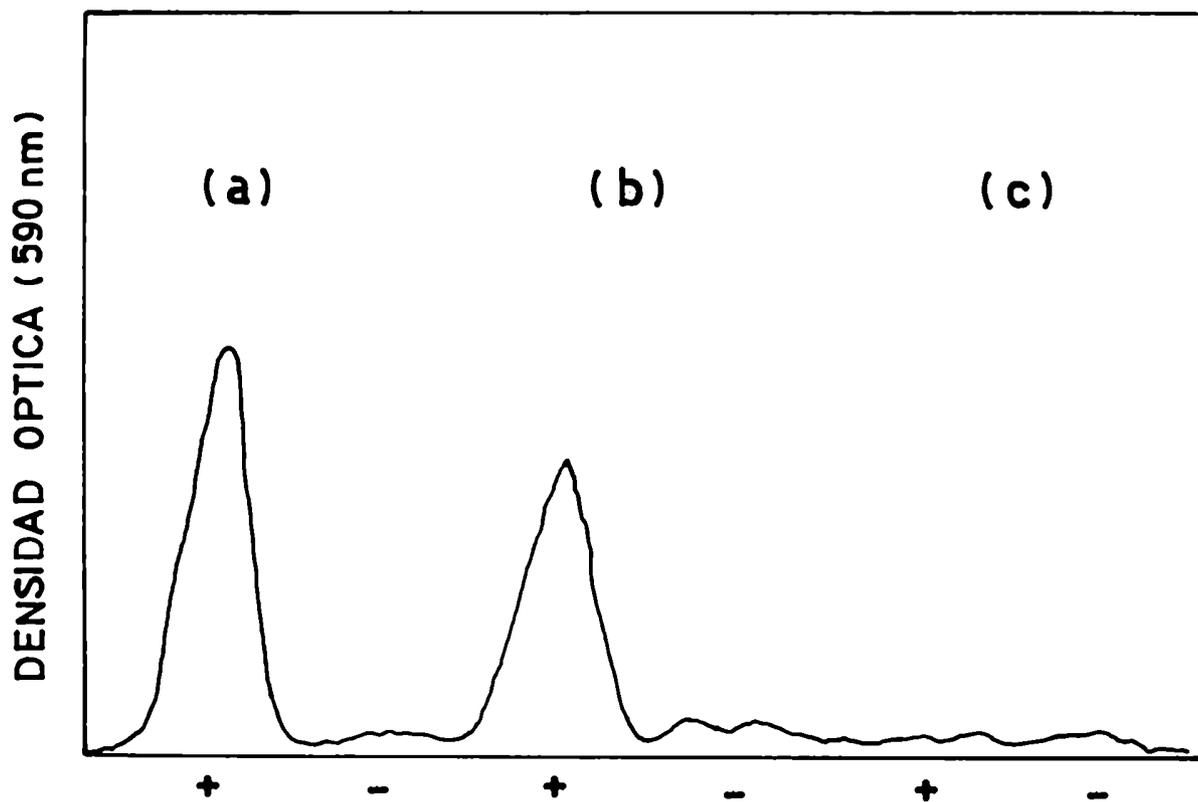
Tabla 7: Actividad de las FAC separadas por la segunda columna de DEAE-Celulosa respecto de PNFF y CP

Enzima	PNFF ($\mu\text{mol}/30 \text{ min}$)	CF ($\mu\text{mol}/30 \text{ min}$)	CF/PNFF
FACP	0,11	0,045	0,39
1º pico (FAC tipo 3)	0,17	0,005	0,03
2º pico (FAC tipo 4)	0,15	0,004	0,03
3º pico ("FAC tipo 2")	0,11	0,057	0,52

Se tomaron muestras de cada pico o de enzima purificada y se las ensayó de acuerdo a lo descrito en métodos. Cada determinación se efectuó por duplicado y se calculó el promedio.

gura 25 la "FAC tipo 2", al igual que la tipo 4, presenta reacción positiva con el antisuero, cosa que no ocurrió con la FAC tipo 3.

Figura 25: Reacción de las FAC separadas por la segunda columna de DEAE-Celulosa contra un antisuero anti-FACP



Se tomaron muestras concentradas cinco veces de los picos y se efectuó una CIE. a) 3º pico; b) 2º pico; c) primer pico. En el ánodo se sembró antisuero anti-FACP (+) o suero normal de conejo (-)

5. Utilidad del dosaje de la FACTR en la detección de metástasis óseas.

Tal como se ha señalado en la introducción, resultados obtenidos por distintos autores sugieren que una FACTR (la FAC tipo 5b) sería la responsable del incremento de la FAC sérica total descrito en pacientes con cáncer de mama metastásico. Incluso se llegó a proponer que el origen de dicha FAC incrementada sería óseo ya que el hueso es muy rico en la mencionada FAC tipo 5b.

Los resultados que se han presentado en la primer parte de este trabajo refuerzan netamente esta propuesta, ya que se ha demostrado que el carcinoma mamario no posee FAC tipo 5b y por lo tanto no puede ser el origen del incremento de la misma en el suero. Por otro lado es bien conocido que numerosos procesos metastásicos en hueso involucran resorción ósea, para lo cual se requiere actividad osteoclástica. En diversos trabajos se ha demostrado que durante los procesos osteoclásticos se produce la liberación de FACTR (Minkin, 1982; Hammarstrom y col, 1971)

En función de todo esto se decidió estudiar en un conjunto de 72 pacientes la utilidad del dosaje de FACTR en el suero para la detección de metástasis óseas.

Dado que hasta el momento el dosaje de la FALC es uno de los métodos bioquímicos que mejor ha reflejado la presencia de

dichas metástasis (Gielen y col., 1976), también se estimaron los niveles de FALC en nuestra serie de pacientes.

En el estudio se incluyeron pacientes con cáncer de mama primario y con metástasis óseas. Además se analizaron sueros de pacientes con metástasis óseas pero con otros tipos de tumor primario, ya que también se ha sugerido que hay actividad osteoclástica en procesos metastásicos originados por otros tumores además de los mamarios.

En la figura 26 se puede observar que 29 pacientes (76%) de los 38 con metástasis óseas presentaron valores de FACTR por encima de los normales, mientras que ningún paciente sin metástasis óseas presentó niveles elevados. Cabe agregar además que en estos pacientes metastásicos no se encontró ninguna correlación entre el tipo de tumor primario y los niveles de actividad enzimática, aunque para sacar conclusiones válidas en este sentido será necesario analizar un mayor número de casos.

Al hacer un análisis estadístico acerca de la capacidad del dosaje de la FACTR para discriminar, en nuestra serie de pacientes, aquellos que tenían metástasis óseas, se obtuvieron los siguientes resultados:

Pacientes con metástasis: $\bar{x} = 5,2 \pm 1,0$
Pacientes sin metástasis: $\bar{x} = 2,1 \pm 0,1$

entre ambas subpoblaciones se encontraron diferencias significativas ($p < 0,005$).

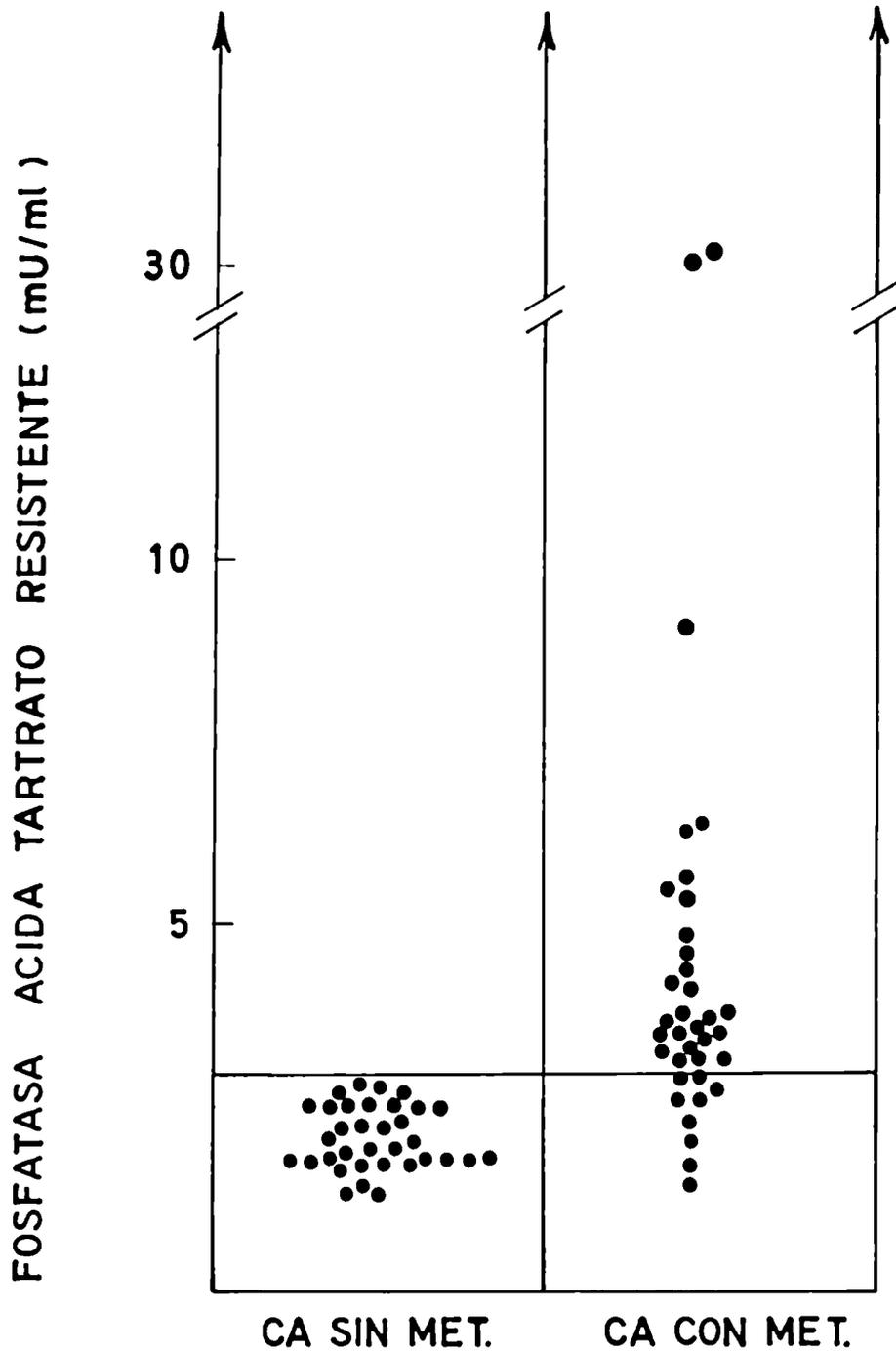


Figura 26: Niveles séricos de FACTR en pacientes de cáncer sin y con metástasis óseas.

La línea horizontal representa el límite superior de FACTR de da_dores normales adultos, el cual se determinó sumando 2 desviacio_nes standard al valor promedio hallado en el laboratorio.

En la Figura 27 se observa que 25 pacientes (66%) de los 38 con metástasis óseas presentaron valores de FALC por encima de los normales mientras que 4 pacientes (12%) sin metástasis óseas presentaron también niveles elevados.

Es importante destacar que no todos los pacientes con metástasis óseas que presentaron niveles normales de FACTR tuvieron niveles de FALC normales. En la Figura 28 se puede observar que 34 de los 38 pacientes (89%) con metástasis óseas presentaron FACTR y/o FALC elevadas.

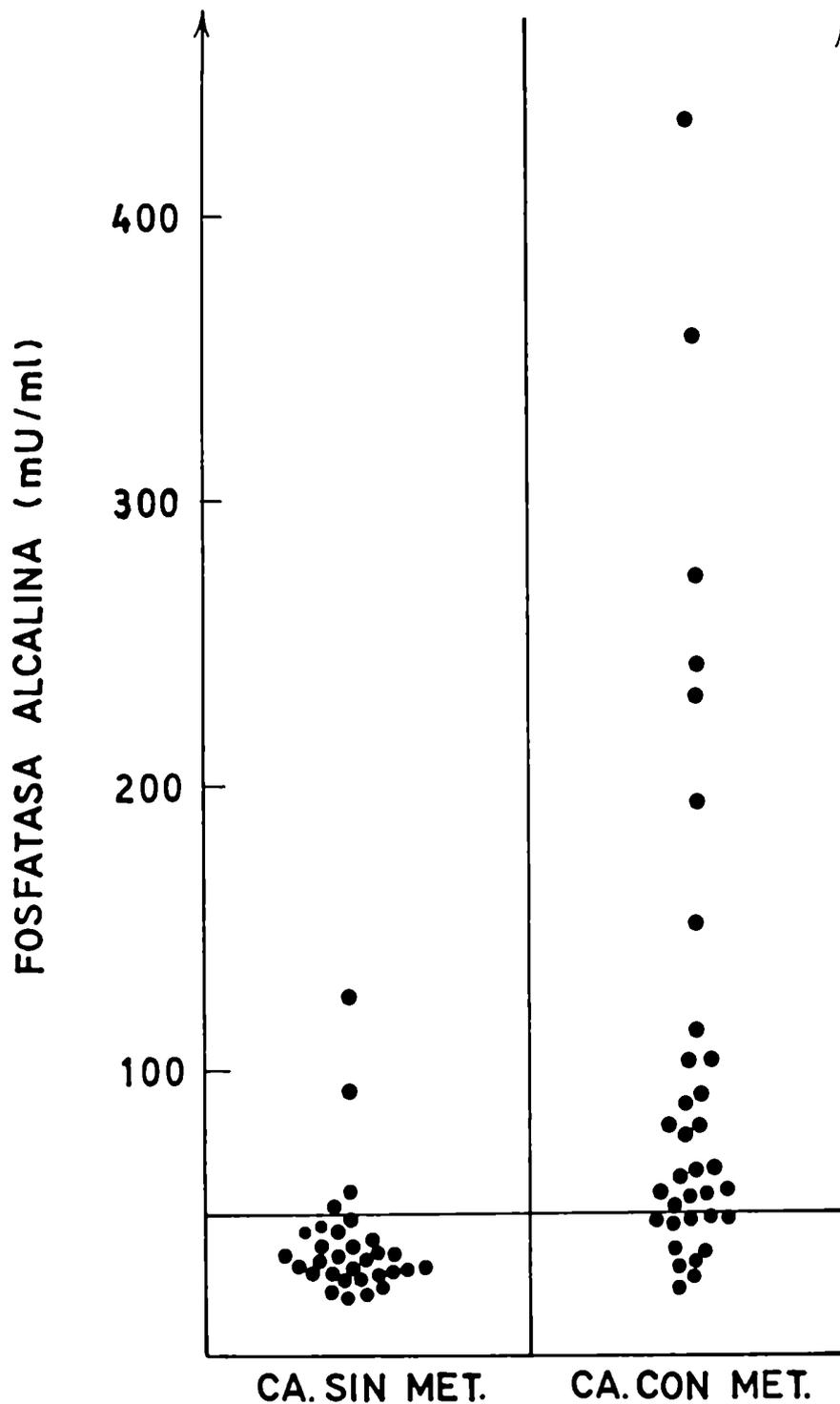
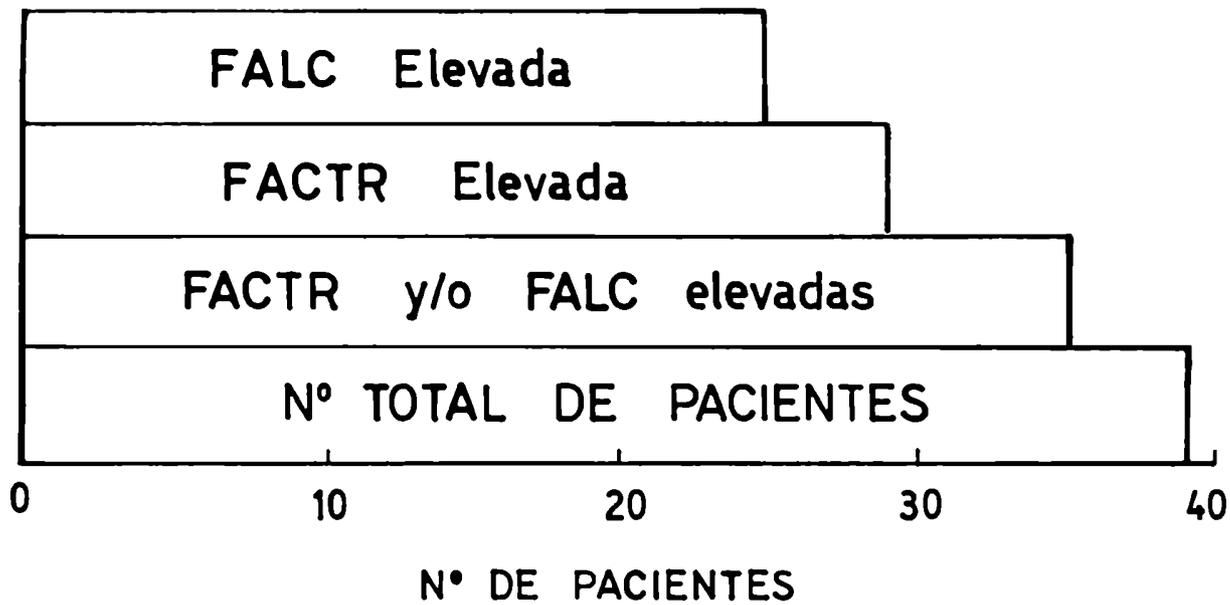


Figura 27: Niveles séricos de FALC en pacientes de cáncer sin y con metástasis óseas.

La línea horizontal representa el límite superior de FALC de dadores normales adultos, el cual se determinó sumando 2 desviaciounes standard al valor promedio hallado en el laboratorio.

Figura 28: Elevación de FACTR y FALC en pacientes con metástasis óseas



DISCUSION1. Análisis cuantitativo y cualitativo de las FAC no eritrocitarias en carcinoma primario, fibroadenoma y tejido normal de mama

Los estudios cuantitativos en torno a las FAC no eritrocitarias de carcinoma y tejidos no malignos efectuados en esta tesis confirman resultados previos mencionados en la introducción. En particular, es importante destacar que la confirmación del incremento de las FAC no eritrocitarias en el carcinoma mamario también se ha verificado en este trabajo cuando se expresó la actividad enzimática por mg de DNA.

Dado que no se conoce con precisión el rol fisiológico de las FAC es difícil asignarle un significado específico al incremento de dicha enzima en el carcinoma mamario. Algunos trabajos efectuados en tumores mamarios hormonodependientes inducidos en ratón han mostrado un incremento notorio de las FAC cuando se induce la regresión del tumor. Esto ha llevado a proponer que el incremento de las FAC estaría vinculado con el importante rol que juegan estas enzimas en el catabolismo de macromoléculas de ocurre durante la regresión tumoral (Nicholson y Davies, 1974; Ball y col., 1982; Al-Jurf y col., 1982). Este criterio, sin embargo, no parece aplicable a este trabajo dado que ninguno de los

tumores presentaban señales evidentes de estar en regresión.

Por otro lado la propuesta surgida de investigaciones efectuadas con tumores experimentales, acerca de la vinculación entre los niveles de FAC y la invasividad de un tumor (Sylvén, 1968; Tunis y col., 1973) requiere mayores estudios para poder ser tomada en cuenta en el caso de los carcinomas mamarios humanos. Asimismo, el hecho de que los fibroadenomas presenten también un incremento (aunque menor) del nivel de las FAC no eritrocitarias pareciera indicar que dicho incremento no estaría vinculado a la malignidad del proceso.

Al estudiar los perfiles electroforéticos de FAC en los 3 tipos de tejido mamario analizados no se encontró ninguna banda en el carcinoma distinta a las presentes en el tejido mamario normal o en el fibroadenoma. A la vez, las bandas detectadas, que corresponden a las FAC tipo 1, 3 y 4, están presentes en muchos otros tejidos humanos. En particular los perfiles electroforéticos de riñón, hueso y adrenal son similares al descrito aquí para el tejido mamario (Lam y col., 1973).

En forma simultánea a estos estudios se publicó un trabajo en el que también se analizó el perfil electroforético de las FAC no eritrocitarias en el carcinoma mamario (Tavassoli y col., 1981). Los resultados expuestos en dicho trabajo no coinciden en parte con los aquí presentados dado que los autores sólo encontraron FAC tipo 3 en el carcinoma de mama. La ausencia de FAC tipo 1 no es sorprendente ya que dichos autores no trataron

los homogenatos tisulares con Tritón X-100. Por otro lado, el no hallazgo de la FAC tipo 4 puede deberse a que para realizar el trabajo en cuestión se emplearon alícuotas de citosoles preparados varios años antes del momento en que se hicieron los estudios. Se ha observado en nuestro laboratorio que la FAC tipo 4 pierde actividad, aún congelada, si se la conserva por largos pe ríodos o si se la somete a procesos sucesivos de congelamiento y descongelamiento.

La posibilidad de que en este trabajo se haya detectado la FAC tipo 4 en los sobrenadantes de 28.000 x g debido a la unión de la misma a fracciones membranales no precipitadas debe descartarse dado que cuando se cromatografiaron dichos sobrenadan tes por columnas de Sephadex G-200 la FAC tipo 4 no fue excluida.

No parece probable, a la vez, que dicha FAC haya sido pro ducida por células inflamatorias infiltradas en el tejido mamario, ya que, por un lado, la FAC tipo 4 ha sido también detectada en el fibroadenoma y en el tejido normal, los que no poseen infiltrados inflamatorios. Por otro lado, los neutrófilos y macrófagos poseen FAC tipo 2 en niveles similares a los de FAC tipo 4 (Yam, 1974; Lafuente y col., 1979; Yam y col., 1981) y no hemos detectado en los sobrenadantes tisulares la banda correspondiente a la FAC tipo 2.

Las FAC tipo 3 y 4 fueron separadas mediante 2 cromatografías sucesivas por columna. Intentos preliminares para separar ambas enzimas efectuando directamente una cromatografía de inter

cambio iónico no fueron efectivos ya que se producía una gran pérdida de actividad enzimática, en particular de la FAC tipo 3. Empleando una columna de Sephadex G-200 antes de la columna de intercambio iónico se logró separar las FAC manteniendo la relación original de actividades entre ambas.

La reacción cruzada contra el antisuero anti-FACP de la FAC tipo 4 aislada del carcinoma mamario confirma observaciones previas efectuadas con FAC tipo 4 aislada a partir de neutrófilos (Yam y col, 1981).

En trabajos recientes (Li y col., 1980; Lam y col., 1978b) diversos autores, aplicando un método inmunohistoquímico para el diagnóstico de metástasis de cáncer prostático, encontraron que un alto porcentaje de tumores mamarios presenta reacción positiva frente al anticuerpo anti-FACP, mientras que tumores de intestino y pulmón no presentan en ningún caso reacción positiva. Dado que estos 2 tumores no contienen FAC tipo 4, y que en este trabajo se ha demostrado la presencia de esta enzima en el tumor mamario, es lógico suponer que las reacciones positivas de dicho tumor con el anticuerpo anti-FACP se deben a la presencia en el mismo de FAC tipo 4 en cantidades detectables con el método inmunohistoquímico. Dado que este método está siendo recomendado para la identificación de metástasis de origen prostático, habría que tener en cuenta la posibilidad de que metástasis provenientes de tumores primarios distintos al de próstata, pero que poseen FAC tipo 4 (como el de riñón por ej. (Li y col., 1973)),

den reacción positiva con anti-FACP, dando lugar así a un diagnóstico falso.

2. Análisis del C-FAC

En este trabajo se demuestra la existencia de un C-FAC en el carcinoma mamario humano no descrito hasta el momento en otros tejidos.

Los resultados que se presentan parecen descartar la posibilidad de que el C-FAC encontrado en el tumor mamario sea el resultado de una agregación debido a las condiciones en las que fue extraído. Por un lado, dicho complejo apareció tanto cuando se procesó el tejido a pH 5,0 como a pH 7,4. Por otro lado, también la presencia de ditiotreitol en el buffer de preparación afectó su aparición. Finalmente, cuando se procesaron placenta e hígado normales utilizando exactamente las mismas condiciones que se emplearon al procesar el tumor mamario, no apareció ningún tipo de FAC de tan alto PM.

Precisamente estos resultados obtenidos con placenta e hígado indicarían que las FAC de PM mayor que 200.000 D descritas por otros autores en dichos tejidos son entidades distintas al complejo detectado en este trabajo en el carcinoma mamario.

Se efectuaron también diversos ensayos para tratar de verificar si el C-FAC podría ser la consecuencia de una asociación con lípidos o fragmentos de membranas. Los resultados obtenidos

con Tritón X-100, Lubrol PX, Lubrol WX y n-butanol no nos permiten afirmar por el momento que tal asociación exista aunque se deberán efectuar otros estudios para descartarla por completo.

Los experimentos efectuados con urea y SDS, reactivos muy poderosos para la desagregación de agregados de diverso tipo, sugieren fuertemente que las uniones involucradas en el C-FAC son básicamente de naturaleza covalente. Es interesante destacar que recientemente Harvey y col. (1982) utilizando métodos similares comprobaron la existencia de activadores de plasminógeno de 2.10^6 y 1.10^6 D en una línea de cáncer de pulmón humano.

Evidentemente existe cierta incertidumbre en la determinación del PM del C-FAC. Por un lado se carece de marcadores adecuados para el rango de 1.10^6 D. Por otro lado el grado de asimetría del C-FAC, que presentó una fuerte tinción para hidratos de carbono, debe ser seguramente distinto al de las proteínas utilizadas para la calibración de las columnas.

No parece haber dudas, sin embargo, que estamos frente a un complejo de alto PM ya que tanto los resultados obtenidos mediante electroforesis como mediante filtración por gel así lo indican.

El hecho de que en sobrenadante de tejido mamario normal se haya encontrado una banda de FAC que no penetra un gel de acrilamida al 7,5% y que además, al efectuar una columna de Sepharose 6B aparezca un pico con actividad de FAC eluído inmediatamente después del V_0 parecería indicar que el C-FAC encon-

trado en el carcinoma mamario también está presente en el tejido normal de mama. Sin embargo, para confirmar esto se deberán efec
tuar estudios en el tejido normal similares a los que se efectu
aron en el carcinoma, cosa que no se ha podido efectuar en este trabajo por falta de tejido suficiente.

Si bien la intensa coloración obtenida cuando se efectuó tinción para hidratos de carbono en geles de poliacrilamida podría indicar unión con polisacáridos, se tendrán que hacer otros ensayos para conocer la estructura interna del C-FAC así como la posible presencia en el mismo de determinados polisacáridos u otras macromoléculas. También será importante estudiar las propiedades enzimáticas del complejo. En ese sentido, resultados preliminares (no mostrados) parecen adjudicar al C-FAC propiedades diferentes que las descritas hasta el momento para otras FAC.

3. Estudio de diversas propiedades de las FAC tipo 3 aisladas de carcinoma y tejido normal mamario

En esta tesis se presenta por primera vez la purificación y el estudio de una FAC de carcinoma y de tejido normal mamario.

De acuerdo con los estudios efectuados se puede afirmar que las características de la FAC del carcinoma mamario coinciden en líneas generales con las características de la FAC tipo 3 des
criptas en la introducción.

Por otro lado, las propiedades de la FAC tipo 3 del tejido normal mamario que se han podido estudiar sugieren fuertemente que, aún cuando dicha FAC está incrementada en el carcinoma, conserva en éste sus características originales. Si bien para ser categóricos en cuanto a la identidad de las FAC en ambos tipos de tejido habría que hacer un análisis de la composición aminoacídica, está claro por los resultados obtenidos que las propiedades funcionales de ambas FAC son similares.

De acuerdo con la información disponible, hasta el momento la única FAC tipo 3 aislada de tejidos humanos que ha sido purificada y estudiada en profundidad es la de hígado normal (Saini y Van Etten, 1978b) aunque también se conocen algunas propiedades de las FAC tipo 3 parcialmente purificadas de placenta (Di pietro y Zengerle, 1967) y leucocitos humanos (Li y col., 1970b).

Los PM estimados para las FAC de hígado, placenta y leucocitos son de 93.000, 105.000 y 96.400 D respectivamente. Es evidente, por lo tanto, que el PM obtenido aquí para la FAC del carcinoma mamario, 103.500, está dentro del rango de las FAC tipo 3 de los otros tejidos. Es importante tener en cuenta además que los PM en dichos tejidos han sido medidos por diferentes métodos, lo que de por sí puede originar variaciones en el resultado.

El dato obtenido al efectuar la electroforesis luego de tratar la muestra en condiciones reductoras sugiere que la FAC tipo 3 de tumor mamario está compuesta por dos subunidades de

similar PM. Tal como se señaló en la Introducción, estudios efectuados sobre FAC tipo 3 de otros tejidos humanos han indicado también la presencia de 2 subunidades iguales con PM parecidos al encontrado en este trabajo para la FAC tipo 3 de tumor mamario.

Se ha demostrado que la FAC tipo 3 mamaria hidroliza muy bien PNFF, α -NF y β -GF y es muy poco activa respecto de pirofosfatos, cosa que también se ha visto con las FAC tipo 3 de hígado y placenta (Saini y Van Etten, 1978b; Dipietro y Zengerle, 1967).

Asimismo la especificidad de sustrato de la enzima mamaria presenta similitudes con respecto a la FAC tipo 3 de leucocitos ya que se ha observado que ésta hidroliza muy bien PNFF y -NF y en forma moderada ASBI-F (Yam, 1974). Por otro lado la incapacidad de hidrolizar azúcares-fosfato observada aquí para la FAC mamaria también ha sido verificada con la FAC tipo 3 de placenta (Dipietro y Zengerle, 1967).

Cuando se estudió el efecto de distintos compuestos sobre la capacidad de hidrolizar PNFF por parte de las 2 FAC purificadas se observó que ambas fueron notoriamente inhibidas por (+) tartrato 20 mM y fluoruro 10 mM. Inhibiciones similares han sido verificadas en FAC tipo 3 humanas de otros tejidos (Li y col., 1970b; Dipietro y Zengerle, 1967).

Van Etten y col. (1974) han propuesto que iones como el molibdato y el tungstato inhiben las FAC a través de la propiedad que tienen de formar con el sitio activo de la enzima, de manera rápida y reversible, quelatos que se parecen a la forma que ad-

quiere el estado de transición durante la hidrólisis del éster fosfato. En nuestro caso, utilizando molibdato 1 mM hemos obtenido tanto para la enzima del carcinoma como del tejido normal mamario una inhibición del 34%. Utilizando una concentración similar de molibdato, Dipietro y Zengerle obtuvieron una inhibición del 47% en FAC de placenta humana.

Es importante destacar también que ninguna de las dos FAC mamarias fueron afectadas en forma significativa por altas concentraciones de sales y por diversos reactivos sulfhidrúlicos. La falta de inhibición por estos últimos se ha observado también en otras FAC tipo 3 y en la FAC tipo 2 y es uno de los elementos que llevó a proponer un mecanismo de acción similar para ambos tipos de FAC, tal como se señaló en la Introducción.

Los resultados obtenidos al medir el K_m respecto de PNFF de las FAC de tumor y tejido normal muestran también una notoria similitud ya que los valores hallados fueron 0,66 mM y 0,63 mM respectivamente. Estos valores difieren de los K_m obtenidos para hígado (Saini y Van Etten, 1978b) y leucocitos (Li y col., 1970b): 0,14 y 3,6 mM respectivamente, pero hay que tener en cuenta que en estos dos casos la medición se efectuó en condiciones de pH y fuerza iónica diferentes a las utilizadas en esta tesis. También hay diferencias entre el valor del K_i respecto del tartrato calculado para la FAC de tumor mamario ($2,8 \cdot 10^{-2}$ mM) y para la de hígado normal ($4,3 \cdot 10^{-4}$ mM).

La similitud entre las dos FAC mamarias purificadas tam-

bién se verificó en lo que respecta a la influencia del pH del medio sobre la actividad de las mismas respecto del PNFF. Por otro lado, es notorio el parecido que presenta la curva de actividad enzimática en función del pH de la FAC de hígado normal con las curvas aquí presentadas para las FAC mamarias (Rehkop y Van Etten, 1975). También es similar la curva de pH obtenida con la FAC de placenta, aunque en este caso la actividad decae notoriamente a pH 3 (Dipietro y Zengerle, 1967).

Nicholson y Davies (1974) describieron algunas propiedades de una FAC lisosomal de PM 120.000 D que está presente en el tumor mamario de rata inducido con DMBA. Dado que, tal como se señaló en la Introducción, este tumor presenta desde el punto de vista metabólico muchas similitudes con el carcinoma mamario humano es interesante observar que dichas similitudes también se manifiestan en el caso de las FAC. La FAC del tumor inducido en rata es fuertemente inhibida por tartrato y fluoruro pero no por reactivos sulfhidrúlicos. La única diferencia notoria respecto a los inhibidores se manifiesta en el caso del molibdato, ya que éste inhibe en mayor proporción (84%) a la FAC del tumor mamario de rata. Las curvas de termoestabilidad de esta enzima coinciden notoriamente con las curvas presentadas en esta tesis para la FAC del carcinoma mamario. No ocurre lo mismo, en cambio, con la curva de actividad en función del pH ya que la FAC del tumor de rata presenta una brusca caída de la actividad por encima de pH 4,5.

4. Presencia de "FAC tipo 2" en la leche humana

Al observar el perfil electroforético de las FAC de la leche descremada se pudo verificar, por un lado, la presencia de las bandas correspondientes a las FAC tipo 3 y 4 y de las cuales la leche podría ser, por lo tanto, una fuente para su obtención y estudio.

Sin embargo, lo que llamó poderosamente la atención en esta parte del trabajo fue la detección en el perfil electroforético de una banda que presentó una movilidad similar a la de la FAC tipo 2 purificada de próstata.

Los estudios bioquímicos y antigénicos efectuados posteriormente sobre dicha "FAC tipo 2" de la leche mostraron con claridad que la misma posee propiedades similares a las de la FAC tipo 2 purificada a partir de próstata o plasma seminal.

Si bien, de acuerdo con la información disponible, no se ha estudiado hasta el momento las FAC de la leche humana, el hallazgo de "FAC tipo 2" en la misma fue inesperado dado que, de acuerdo con los resultados expuestos en la primera parte de esta tesis, no se pudo detectar dicha enzima en el tejido normal mamario. Un posible origen de la "FAC tipo 2" de la leche podría ser, sin embargo, la FAC tipo 4 que, tal como se mostró, está presente en el tejido mamario. Como ya se informó en la Introducción se ha propuesto que la FAC tipo 4 al glicosilarse puede dar origen a la FAC tipo 2. Un proceso de glicosilación previo

a la secreción en cantidades apreciables de FAC ya ha sido descrito en levaduras (Mizunaga y Noguchi, 1982). Este proceso de glicosilación y secreción podría, tal vez, ocurrir también con la FAC tipo 4 en el tejido mamario bajo la influencia de los cambios hormonales que ocurren durante la lactancia.

Otro aspecto interesante de este estudio es que la "FAC tipo 2" de la leche descremada apareció asociada junto con la FAC tipo 3 y 4. Dado que dicha asociación fue eliminada empleando Tritón X-100 parecería posible que estas FAC estén unidas de alguna forma a la fracción membranal de la leche descremada. En la leche vacuna se ha verificado que dicha fracción membranal difiere en su composición de las membranas de la crema, conteniendo las primeras una mayor actividad específica de la mayoría de las enzimas estudiadas (Kitchen, 1974).

Finalmente, es difícil especular en torno al significado de la secreción de esta "FAC tipo 2" por parte de las células de los alvéolos mamarios ya que no se conocen con precisión cuál es el sustrato fisiológico de dicha enzima.

5. Utilidad del dosaje de la FACTR en la detección de metástasis óseas

De acuerdo con los resultados aquí presentados se concluye que el dosaje de la FACTR sérica puede ser un buen método pa-

ra la detección de metástasis óseas no sólo en cáncer mamario sino también en otros tipos de cáncer.

Tanto el porcentaje de falsos negativos (24% para la FACTR y 34% para la FALC) como el porcentaje de falsos positivos (0% para la FACTR y 12% para la FALC) han sido menores en el dosaje de la FACTR. El hecho de no haber tenido falsos positivos con la FACTR es explicable dado que su incremento por causas distintas a la presencia de metástasis óseas es poco frecuente (se lo ha descrito fundamentalmente en las enfermedades de Gaucher, Paget y fiebre Dengue (Li y col., 1973; Mercer y col., 1977; Robinson y Glew, 1980b; Sun y col., 1981; Lam y col., 1981; Lam y col., 1982b)). La FALC, en cambio, suele presentar incrementos en el suero en patologías hepáticas muy difundidas incluyendo las metástasis en hígado, las cuales pueden estar también presentes cuando hay metástasis óseas (Coombes y col., 1977). Por otro lado, no existen hasta el presente métodos directos para dosar por separado las FALC de origen óseo y hepático (Kaplan y Rogers, 1969; Gorman y Statland, 1977; Farley y col., 1981).

En un trabajo publicado mientras se estaba realizando esta parte de la tesis se midió la FAC total sérica en pacientes con metástasis óseas de cáncer de mama y de otros tipos de cáncer, excepto próstata (Tavassoli y col., 1980). Los porcentajes de falsos positivos y falsos negativos encontrados en dicho trabajo fueron similares a los aquí presentados. Es conveniente destacar que el dosaje de la FAC total utilizado en el trabajo

citado no es útil para la detección de metástasis óseas si el tumor primario es de próstata, ya que la propia próstata tumoral libera FAC al flujo sanguíneo. Tal como se ha señalado, la FAC de próstata no es dosada si se coloca en el medio de incubación (+) tartrato 0,025 M, cosa que se ha hecho en este trabajo.

El porcentaje de falsos negativos que hemos obtenido en el dosaje de la FACTR podría indicar que, o bien no todos los procesos de metástasis óseas involucran actividad osteoclástica permanente, o bien que el método empleado para el dosaje es insuficientemente sensible. Otros autores han sugerido, también, la existencia de factores inhibitorios de la FAC tipo 5b en el suero, ya que encontraron que si se agrega una cantidad dada de dicha enzima a una solución, la actividad de la misma disminuye al aumentar el porcentaje de suero (Lam y col., 1978b).

Recientemente, Lam y col., (1982c) aprovechando que la FACTR de los osteoclastos, es decir la FAC tipo 5b, es antigénicamente distinta a las otras FAC, han desarrollado un enzimoimmunoensayo para su dosaje. Si bien todavía no se han efectuado estudios clínicos, este método podría brindar la posibilidad de aumentar la sensibilidad del dosaje y disminuir, tal vez, el porcentaje de falsos negativos.

De acuerdo con lo que se aprecia en las imágenes radiológicas, los procesos metastásicos en huesos parecen involucrar a lo largo de su desarrollo actividad osteoblástica y osteoclástica, aunque no se ha establecido con precisión en qué momento pre

domina una u otra. Dado que la FALC abunda en los osteoblastos (Chen y col., 1979) y la FAC tipo 5b en osteoclastos, el dosaje de ambas enzimas a la vez debería reducir el porcentaje de falsos negativos que se obtiene cuando se dosa una sola de dichas enzimas. Esto se verifica en la figura 28 en donde se observa que por lo menos una de las dos enzimas está elevada en el 89% de los pacientes con metástasis óseas.

El otro método bioquímico que ha sido mencionado como útil para la detección de metástasis óseas ha sido el dosaje de hidroxiprolina urinaria (Guzzo y col., 1969; Cuschieri, 1973; Powles y col., 1975). Sin embargo, se trata de un ensayo bastante más complejo que el dosaje de la FACTR o de FALC y además hay trabajos que lo comparan desfavorablemente respecto a la FALC en cuanto a la correlación que presenta con la presencia de metástasis óseas (Gielen y col., 1976; Rowse y col., 1982).

Parece ser conveniente, entonces, que el dosaje de la FACTR o, mejor aún de la FAC tipo 5, sea utilizado en la rutina del laboratorio para la detección de metástasis óseas. Parece conveniente también complementar este dosaje con el de la FALC. La importancia de estas determinaciones se ve realizada si se tiene en cuenta que el método no bioquímico que mejores resultados ha dado para la detección de metástasis óseas, la centellografía (Galasko, 1971; Cowan y Young, 1973), es un método caro y que también presenta a veces resultados dudosos o falsos (Lee, 1981).

De ahora en más será necesario estudiar la eficacia del

dosaje de la FAC tipo 5 en la detección precoz de las metástasis así como en el seguimiento del paciente metastásico. Así se podrá tener una idea más completa acerca de la utilidad de esta enzima como marcador biológico de las metástasis óseas.

6. Conclusiones

En esta tesis se efectúan diversos aportes, tanto en el aspecto básico como en el aplicado al estudio de las FAC y su relación con el cáncer de mama.

Desde un punto de vista práctico los resultados que aquí se presentan tienen implicancias importantes respecto de la utilidad de la FAC como marcador biológico en pacientes con cáncer de mama avanzado ya que se ha demostrado la utilidad del dosaje de la FACTR para la detección de metástasis óseas.

Desde un punto de vista más básico también se efectúan en esta tesis los siguientes aportes: a) Se ha verificado la presencia de las FAC tipo 1, 3 y 4 en carcinoma, fibroadenoma y tejido normal mamario. b) Se ha identificado un C-FAC no descrito hasta el momento en otros tejidos. c) Se ha purificado FAC tipo 3 de carcinoma y de tejido normal mamario y se han estudiado varias propiedades de las mismas comprobándose una similitud entre ambas. d) Se ha estudiado el perfil electroforético de las FAC no eritrocitarias en la leche descremada humana y se ha encontrado una FAC que presenta propiedades bioquímicas y antigénicas si

milares a las de FACP.

A handwritten scribble consisting of several overlapping, curved lines that do not form a recognizable word or symbol.A handwritten signature that appears to read "J. Smith" written above a horizontal line. Below the line, there is a vertical stroke that extends downwards.

BIBLIOGRAFIA

- Abul-Fadl, M.A. y King, E.J. (1949) *Biochem J*, 45, 51.
- Al-Jurf, A. S., Suleiman, S.A. y Erenberg, A.P. (1982) *J Surg Oncol*, 20, 21.
- Anderson, T.R. y Toverud, S.U. (1979) *Calcif Tiss Intl*, 27, 219.
- Avila, J.L. y Convit, J. (1973) *Clin Chim Acta*, 44, 21.
- Axline, S.G. (1968) *J Exp Med*, 128, 1031.
- Babson, A.L. y Phillips, G.E. (1966) *Clin Chim Acta*, 13, 264.
- Ball, A., Barratt, G.M. y Wills, E.D. (1982) *Eur J Cancer Clin Oncol*, 18, 489.
- Barka, T. (1961) *J Histochem Cytochem*, 9, 542.
- Bessey, O., Lowry, O. y Brock, M. (1946) *J Biol Chem*, 164, 1946.
- Bosmann, H.B. y Hall, T.C. (1974) *Proc Nat Acad Sci USA*, 71, 1833.
- Bramhall, S., Noack, N., Wu, M. y Loewenberg, J.R. (1969) *Anal Biochem*, 31, 146.
- Brinkley, D. y Haybittle, J.L. (1968) *Br J Radiol*, 41, 215.
- Bruce, A. W. y Mahan, D.E. (1982) *Ann NY Acad Sci*, 390, 110.
- Bruce, A.W., Mahan, D.E., Morales, A., Clark, A.F. y Belville, W.D. (1979) *Br J Urol*, 51, 213.
- Burstone, M.S. (1959) *J Histochem Cytochem*, 7, 39.
- Catovsky, D., Greaves, M.F., Pain, C., Cherchi, M., Janossy, G. y Kay, H.E. (1978) *Lancet*, 749.
- Chen, J., Yam, L.T., Janckila, A.J., Li, C.Y. y Lam, K.W. (1979) *Clin Chem*, 25, 719.

- Choe, B.K., Pontes, J.E., Lillehoj, H.S. y Rose, N.R. (1980) *The Prostate*, 1, 383.
- Choe, B.K., Pontes, J.E., Rose, N.R. y Henderson, M.D. (1978) *Invest Urol*, 15, 312.
- Chu, T.M., Wang, M.C., Scott, W.W., Gibbons, R.P. Johnson, D.E., Schmidt, J.D., Loening, S.A., Froust, G.R. y Murphy, G.P. (1978) *Invest Urol*, 15, 319.
- Coombes, R.C., Gazet, J.C., Seoane, J.P., Powles, T.J., Ford, H.T., Laurence, D.J. y Neville, A.M. (1977) *Lancet*, 132.
- Cowan, R.J. y Young, K.A. (1973) *Cancer*, 32, 887.
- Crofton, P.M. y Smith, A.F. (1981) *Clin Chem*, 27, 867.
- Cuschieri, A. (1973) *Brit J Surg*, 60, 800.
- Derechin, M., Ostrowski, W., Galke, M. y Barnard, E.A. (1971) *Biochim Biophys Acta*, 250, 143.
- Deshpande, N., Mitchell, I. y Millis, R. (1977) *Europ J Cancer*, 13, 1261.
- Dipietro, D.L. (1968) *J Biol Chem*, 243, 1303.
- Dipietro, D.L. (1971) *Biochim Biophys Acta*, 235, 458.
- Dipietro, D.L. y Zengerle, F.S. (1967) *J Biol Chem*, 242, 3331.
- Dutu, R., Nedelea, M., Veluda, G. y Nicolaescu, V. (1979) *Acta Histochem*, 64, 129.
- Farley, J.R., Chesnut, C.H. y Baylink, D.J. (1981) *Clin Chem*, 27, 2002.
- Filmus, J., Podhajcer, O.L., Mareso, E., Guman, N. y Mordoh, J. (1983) *Cancer*, en prensa.
- Filmus, J., Podhajcer, O.L., Mordoh, J., Roca, E., Cedaro, L. y Chacón, R. D. (1982) *Medicina*, 42, 655.

- Fishman, W.H. y Lerner, F. (1953) J Biol Chem, 200, 89.
- Foti, A.G., Cooper, J.F., Herschman, H. y Malvarez, R. (1977) N Engl J Med, 297, 1357.
- Galasko, C.S. (1971) Surg Gynecol Obst, 127, 1019.
- Gielen, F., Dequeker, J., Drochmans, A., Wildiers, J. y Merlevede, M. (1976) Br J Cancer, 34, 279.
- Goldman, R.D., Kaplan, N.O. y Hall, Z.C. (1964) Cancer Res, 24, 389.
- Gorman, L. y Statland, B.E. (1977) Clin Biochem, 10, 171.
- Griffiths, J.C. (1980) Clin Chem, 26, 433.
- Griffiths, J. (1982) Ann NY Acad Sci, 390, 100.
- Gutman, A.B. y Gutman, E.B. (1938) J Clin Invest, 17, 473.
- Guzzo, C.E., Pachas, W.N., Pinals, R.S. y Krant, M.J. (1969) Cancer, 21, 382.
- Hamilton, T.A., Gornicki, S.Z., y Sussman, H.H. (1979) Biochem J, 177, 197.
- Hammarstrom, L.E., Fankner, J.S. y Toverud, S.U. (1971) Clin Orthop, 78, 151.
- Harvey, S., Minowada, J., Takita, H., Kover, L. y Markus, G. (1982) J Biol Chem, 257, 5645.
- Heyden, H.W., Weber, R., Werke, O., Scal, J.G. y Stein, W. (1977) Blut, 35, 295.
- Hickey, M.E. y Van Etten, R.L. (1972) Arch Biochem Biophys, 153, 423.
- Hilf, R., Goldemberg, H., Michel, I., Orlando, R.A. y Archer, F.L. (1970) Cancer Res, 30, 1874.
- Hilf, R. (1971) Natl Cancer Inst Monograph, 34, 43.
- Hilf, R. (1973) en "Methods in Cancer Research" (H. Bush, ed) Vol 7, pag 55-114 Academic Press, New York.

- Hilf, R., Wittliff, J.L., Rector, W.D., Savlov, E.D., Hall, T.C. y Orlando, R.A. (1973) *Cancer Res*, 33, 2054.
- Hoffman, L.H. y Dipietro, D.L. (1972) *Am J Obstet Gynecol*, 114, 1087.
- Ibsen, K.H. y Fishman, W.H. (1979) *Biochim Biophys Acta*, 560, 243.
- Ip, C. y Thomas, D. (1978) *Cancer Res*, 38, 723.
- Jegatheesan, K.A. y Joplin, G.F. (1962) *Br Med J*, 831.
- Joplin, G.F. y Jegatheesan, K.A. (1962) *Br Med J*, 827.
- Kaplan, M.M. y Rogers, L. (1969) *Lancet*, 1029.
- Katayama, I., Li, C.Y. y Yam, L.T. (1972) *Am J Pathol*, 62, 471.
- Keek, K. (1956) *Arch Biochem Biophys*, 63, 446.
- Killian, C.S., Vargas, F.P., Slack, N.H., Murphy, G.P. y Chu, T.M. (1982) *Ann NY Acad Sci*, 390, 122.
- Kilsheimer, G.S. y Axelrod, B. (1957) *J Biol Chem*, 227, 873.
- Kitchen, B. J. (1974) *Biochim Biophys Acta*, 356, 257.
- Koudstaal, J., Makkink, B. y Overdiep, S. (1975a) *Europ J Cancer*, 11, 111.
- Koudstaal, J., Makkink, B. y Overdiep, S.H. (1975b) *Europ J Cancer*, 11, 105.
- Lafuente, R., Woessner, S. y Sans-Sabrafen, J. (1979) *Scand J Haematol*, 23, 146.
- Laidler, P.M., Taga, E.M. y Van Etten, R.L. (1982) *Arch Biochem Biophys*, 216, 512.
- Lam, K.W., Burke, C.S., Siemens, M., Cipperly, V., Li, C.Y. y Yam, L.T. (1982b) *Clin Chem*, 28, 2296.
- Lam, K.W., Dekker, P.T., Castleman, J. y Yam, L.T. (1976) *Clin Chim Acta*, 70, 289.
- Lam, K.W., Eastlund, T., Li, C.Y., y Yam, L.T. (1978b) *Clin Chem*, 24, 1105.

- Lam, K.W., Lai, L.C., Burkart, P.T. y Yam, L.T. (1977) J Biol Chem, 252, 3371.
- Lam, K.W., Lai, L.C. y Yam, L.T. (1978a) Clin Chem, 24, 309.
- Lam, K.W., Lee, P., Eastlund, T. y Yam, L.T. (1980b) Invest Urol, 18, 209.
- Lam, K.W., Lee, P., Li, C.Y. y Yam, L.T. (1980a) Clin Chem, 26, 420.
- Lam, K.W., Li, O., Li, C.Y. y Yam, L.T. (1973) Clin Chem, 19, 483.
- Lam, K.W., Li, C.Y., Yam, L.T. y Desnick, R.J. (1981) Clin Biochem, 14, 177.
- Lam, K.W., Li, C.Y., Yam, L.T., Smith, R.S. y Hacker, B. (1982a) Ann NY Acad Sci, 390, 1.
- Lam, K.W., Siemens, M., Sun, T., Li, C.Y., y Yam, L.T. (1982c) Clin Chem, 28, 467.
- Lam, K.W. y Yam, L.T. (1977) Clin Chem, 23, 89.
- Lam, K.W., Yam, L.T., Wilbur, H.J., Taft, E. y Li, C.Y. (1979) Clin Chem, 25, 1285.
- Lanzerotti, R.H. y Gullino, P.M. (1972) Cancer Res, 32, 2679.
- Larner, E. y Rutherford, C. (1978) Cancer, 41, 1863.
- Lee, Y.T. (1981) Cancer, 47, 486.
- Lee, J.N., Tokes, Z.A. y Csipke, C.P. (1980) J Surg Oncol, 14, 153.
- Lee, C.L., Wang, M.C., Murphy, G.P. y Chu, T.M. (1978) Cancer Res, 38, 2871.
- Lemon, H.M. y Wisseman, C. L. (1949) Science, 109, 233.
- Li, C.Y., Chuda, R.A. y Lam, K.W. (1973) J Lab Clin Med, 82, 446.
- Li, C.Y., Lam, K.W. y Yam, L.T. (1980) Cancer, 46, 706.
- Li, C.Y., Yam, L.T. y Lam, K.W. (1970a) J Histochem Cytochem, 18, 473.
- Li, C.Y., Yam, L.T. y Lam, K.W. (1970b) J Histochem Cytochem, 18, 901.
- Lillehoj, H.S., Choe, B.K. y Rose, N.R. (1982) Proc Natl Acad Sci USA, 79, 5061.

- Livni, N. y Laufer, A. (1975) Path Microbiol, 42, 159.
- Lowry, O., Rosebrough, N., Farr, A. y Randall, R. (1951) J Biol Chem, 193, 265.
- Lundquist, F. (1947) Acta Physiol Scand, 13, 322.
- Machinani, R. (1976) Gann, 67, 11.
- Mc Tighe, J.J. y Van Etten, R.L. (1978) Biochim Biophys Acta, 523, 407.
- Mercer, D.W., Peters, S.P., Glew, R.H., Lee, R.E. y Wenger, D.M. (1977) Clin Chem, 23, 631.
- Minkin, C. (1982) Calcif Tissue Int, 34, 285.
- Mizunaga, T. y Noguchi, T. (1982) J Biochem, 91, 191.
- Mordoh, J. Krisman, C.R. y Leloir, L.F. (1966) Arch Biochem Biophys, 43, 265.
- Mover, S., Li, C.Y. y Yam, L.T. (1972) J Lab Clin Med, 80, 711.
- Murad, T.M. (1971) Cancer, 27, 288.
- Nadji, M. y Morales, A.R. (1982) Ann NY Acad Sci, 390, 133.
- Nadji, M. , Tabei, S.Z., Castro, A., Chu, T.M. y Morales, A.R. (1980) Am J Clin Pathol, 73, 735.
- Neville, D.M. (1971) J Biol Chem, 246, 6328.
- Nicholson, R.I. y Davies, M. (1974) Eur J Biochem, 44, 25.
- Ostrowski, W., Wasyl, Z., Guminska, M. y Luchter, E. (1970) Biochim Biophys Acta, 221, 297.
- Powles, T.J., Leese, C.L. y Bondy, P.K. (1975) Br Med J, 164.
- Rehkop, D. y Van Etten, R.L. (1975) Hoppe Seyler's Z Physiol Chem, 356, 1775.
- Reif, A.E., Schlesinger, R.M., Charles, A.F. y Robinson, C.M. (1973) Cancer,

- 31, 689.
- Reiner, L., Rutenberg, A.M. y Seligman, A.M. (1955) J Histochem Cytochem, 3, 395.
- Reiner, L., Rutenberg, A.M. y Seligman, A.M. (1957) Cancer, 10, 563.
- Reisfeld, R.A., Lewis, U.J. y Williams, D.E. (1962) Nature, 195, 281.
- Reynolds, M.D., Lemon, H.M. y Byrnes, W.W. (1956) Cancer Res, 16, 943.
- Robinson, D.B. y Glew, R.H. (1980a) J Biol Chem, 295, 5864.
- Robinson, D.B. y Glew, R.H. (1980b) Clin Chem, 26, 371.
- Rowse, A.D., Morrison, M.J., Scott, P.H., Banks, A.J. y Roginski, C. (1982) Oncology, 39, 287.
- Saini, M.S. y Van Etten, R.L. (1978a) Biochim Biophys Acta, 526, 468.
- Saini, M.S. y Van Etten, R.L. (1978b) Arch Biochem Biophys, 191, 613.
- Savlov, E.O., Hilf, R., Gibson, S.L. y Feldstein, M. (1981) Cancer, 47, 2214.
- Schneider, W.C. (1945) J Biol Chem, 161, 293.
- Seidman, H. (1969) Cancer, 24, 1355.
- Seligman, A.M., Stemberger, N.J., Buddha, P.D., Friedman, A.E., Shannon, W.A., Wasserkrug, H.L., Plapinger, R.E. y Lynn, D. (1975) Cancer Chem Rep, 59, 233.
- Sensabaugh, G.F. (1975) en "Isozymes" (C. Markert ed) Vol 1, pag 367-380.
- Shapira, F. (1981) Isozymes: Current Topics in Biological and Medical Research, 5, 27.
- Shaw, L.M., Yang, N., Brooks, J.J., Neat, M., Marsh, E. y Seamonds, B. (1981) Clin Chem, 27, 1505.
- Shaw, L.M., Yang, N., Neat, M. y Croop, W. (1982) Ann NY Acad Sci, 390, 73.

- Shonk, C.E. y Boxer, G.E. (1967) en "Methods in Cancer Research" (H. Bush, ed) Vol 2, pag 579-661, Academic Press, New York.
- Shows, T.B., Lalley, P.A. y Brown, J.A. (1976) J Cell Biol, 70, 98a.
- Shulman, S., Mamrod, L., Gonder, M.J. y Soanes, W.A. (1964) J Immunol, 93, 474.
- Smith, L.K. y Whitby, L.G. (1968) Biochim Biophys Acta, 151, 607.
- Sun, T., Lam, K.W. y Narukar, L. (1981) Clin Chem, 27, 1742.
- Susi, F.R., Goldhaber, P. y Jennings, J.M. (1966) Am J Physiol, 211, 959.
- Swallow, D.M., Povey, S. y Harris, H. (1973) Ann Hum Genet, 37, 31.
- Syven, B. (1968) Europ J Cancer, 4, 463.
- Szutowicz, A., Kwiatkowski, J. y Angielski, S. (1979) Br J Cancer, 39, 681.
- Taga, E.M. y Van Etten, R.L. (1982) Arch Biochem Biophys, 214, 505.
- Tavassoli, M., Rizo, M. y Yam, L.T. (1980) Cancer, 45, 2400.
- Tavassoli, M., Rizo, M. y Johnson, R.B. (1981) Cancer, 47, 895.
- Tunis, M., Kim, U. y Carruthers, C. (1973) Proc Am Assoc Cancer Res, 14, 80.
- Vaes, G. (1968) J Cell Biol, 39, 676.
- Van Etten, R.L., Waymack, P.P. y Rehkop, D.M. (1974) J Am Chem Soc, 96, 6782.
- Van Etten, R.L. (1982) Ann NY Acad Sci, 390, 27.
- Vreven, J., Lieberherr, M. y Vaes, G. (1973) Biochim Biophys Acta, 293, 170.
- Waalkes, T.P., Abeloff, M.D., Ettinger, D.S., Kwang, B.W., Gehrke, C.W. y Mrochek, J.E. (1981) J Surg Onc, 18, 9.
- Weber, G. (1977a) N Engl J Med, 296, 486.
- Weber, G. (1977b) N Engl J Med, 296, 541.
- Weber, K. y Osborn, M. (1969) J Biol Chem, 244, 4406.
- Weinhouse, S. (1982) JNCI, 68, 343.

Wergedal, J.E. (1970) Proc Soc Exp Biol Med, 134, 244.

Yam, L.T. (1974) Am J Med, 56, 604.

Yam, L.T., Janckila, A.J., Li, C.Y. y Lam, K.W. (1981) Invest Urol, 19, 34.

Yam, L.T., Li, C.Y. y Finkel, H.E. (1972) Arch Intern Med, 130, 248.

Yam, L.T., Li, C.Y. y Lam, K.W. (1971) N Engl J Med, 284, 357.

Yam, L.T., Winkler, C.F., Janckila, A.J., Li, C.Y. y Lam, K.W. (1983) Cancer, 51, 283.

Zacharius, R.M. y Zell, T.E. (1969) Anal Biochem, 30, 148.