



Universidad Nacional Autónoma de México
FACULTAD DE QUIMICA

Estudio Sobre la Purificación Características Cinéticas y
Propiedades Antigénicas de la Fosfatasa Ácida de
Origen Prostático del Plasma Seminal Humano.

407

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
(BIOQUIMICO MICROBIOLOGO)
P R E S E N T A
Milagros Guadalupe de los Angeles
Salazar Preciado
1 9 7 6



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

CLAS. Tesis
ADQ. 1976
FECHA
PROC. M.F.

~~385~~ 385



QUIMICA

JURADO ASIGNADO ORIGINALMENTE SEGUN EL TEMA:

Presidente: Profesora Magdalena Acosta Segura

Vocal: Profesor Ramón Guevara Estrada

Secretario: Profesor Homero Hernández Montes

1er. Suplente: Profesora Ma. Elena Bustamante Calvillo

2do. Suplente: Profesora Andrea Gabayet de Polch

El presente trabajo se realizó en la División de Biología de la Reproducción, Departamento de Investigación en Medicina Experimental, Subjefatura de Investigación Científica del Instituto Mexicano del Seguro Social.



MILAGROS GUADALUPE DE LOS ANGELES
SALAZAR PRECIADO
(Sustentante)



DOCTOR HOMERO HERNANDEZ MONTES
(Asesor del Tema)

Esta tesis fue elaborada gracias a la beca otorgada por la Oficina de Adiestramiento del Departamento de Investigación en Medicina Experimental de la Subjefatura de Investigación Científica del I.M.S.S.

Agradezco en forma muy especial y con todo
respeto, la valiosa asesoría del doctor
Homero Hernández Montes.

A mis compañeros y amigos:

Rosa Elena Bush

Edgar Barahona

Carlos Rivera

Enrique Rivera

Jovita Bafuelos

Rosa María Soberanes

con cariño y agradecimiento.

A mis padres,

A mis abuelos,

A mis hermanos,

Con todo mi amor.

INDICE

ABREVIATURAS	Pág.
INTRODUCCION	
CAPITULO I. GENERALIDADES.....	1
CAPITULO II. MATERIAL Y METODOS.....	7
CAPITULO III. RESULTADOS.....	28
CAPITULO IV. DISCUSION.....	34
CAPITULO V. RESUMEN.....	41
CAPITULO VI. CONCLUSIONES.....	42
TABLAS Y FIGURAS	
BIBLIOGRAFIA	

ABREVIATURAS

- Bis-Acrilamida.- N N'Metilen-bis-acrilamida
- F.A.P.- Fosfatasa ácida prostática
- P C A.- Acido Perclórico
- P A G E.- Electroforesis en gel de poliacrilamida
- S.S.I.- Solución Salina Isotónica.- Na Cl 0.154 M
- TEMED.- NNN'N'-Tetrametil etilendiamina
- Tris.- (Hidroximetil) amino metano
- T-C.- Tris-Citrato (0.014-0.048 M)
- T-G.- Tris-Glicina (0.049-0.383 M)
- T C A.- Acido tricloroacético
- F.Alcalina.- Fosfatasa alcalina

INTRODUCCION

La fosfatasa ácida prostática (F.A.P.) ha mostrado ser uno de los parámetros bioquímicos que son influenciados por el metabolismo de la próstata, razón por la cual, los niveles de esta enzima han sido empleados con fines diagnósticos. Ya que la fosfatasa ácida es una enzima electroforéticamente heterogénea, en la actualidad se carece de un método clínico para determinarla específicamente, por lo cual ha sido de gran interés, investigar algunas propiedades de la enzima, que permitan establecer las condiciones para determinarla en forma muy específica.

En el presente trabajo, se procedió al aislamiento de la F.A.P. a partir de plasma seminal humano, para obtener una enzima homogénea, que permita la producción de anticuerpos específicos, con la finalidad de emplearlos en estudios de inmunodifusión, para determinar tanto la capacidad de los anticuerpos obtenidos, como la antigenicidad de la proteína aislada.

La figura 20 resume el esquema metodológico, llevado a cabo en este trabajo.

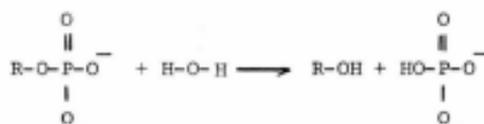
CAPITULO I

GENERALIDADES

GENERALIDADES

La fosfatasa ácida, también conocida como fosfomonoester-hidrolasa ácida, es una enzima hidrolítica que actúa sobre los enlaces monoéster del ácido ortofosfórico a pH ácido y su clasificación según la Comisión de Enzimas es: EC.3.1.3.2 (2).

La fosfatasa ácida junto con la fosfatasa alcalina, la 5' nucleotidasa y la glucosa-6-fosfatasa, forman un grupo de enzimas hidrolíticas clínicamente importantes. Las fosfatasa ácida y alcalina se caracterizan por su baja especificidad para hidrolizar el enlace éster de una gran variedad de ortofosfatos, tanto orgánicos como inorgánicos, con la formación de un alcohol y un ion fosfato:



El alcohol esterificado por el ácido ortofosfórico puede ser alifático simple, polihidroxilado o aromático (2,3).

Las fosfatasas (inespecíficas) han sido diferenciadas atendiendo al pH óptimo, al cual actúan, a su localización, a su

comportamiento catalítico frente a determinados sustratos y a su sensibilidad a diferentes compuestos inhibidores y activadores. En la tabla I se muestran ciertas características de algunas fosfatasa.

La fosfatasa ácida presente en próstata (P.A.P.) fue descrita por primera vez en 1935 por Kutscher y col., en un estudio en extractos de próstata y de semen humanos (7,11).

Posteriormente, Gutman y Gutman demostraron que esta enzima es secretada al fluido seminal y que su concentración en semen está siempre en el mismo rango que el encontrado en la próstata(13,14). Asimismo, describieron un aumento en los niveles de la fosfatasa ácida del suero sanguíneo, asociando este aumento con un carcinoma prostático metastásico y proponiendo en base a este estudio, que la fosfatasa ácida circulante era de origen prostático(12).

Woodard menciona que la próstata humana normal adulta, contiene mil veces mas actividad de fosfatasa ácida que otros tejidos, pero que esta actividad aparece hasta la pubertad (15).

La próstata del hombre y del mono Rhesus, contiene antes de la pubertad, cantidades despreciables de fosfatasa ácida,

observándose posteriormente por el efecto de las hormonas androgénicas, un aumento en dicha actividad enzimática. La administración de testosterona a monos Rhesus jóvenes, da por resultado un aumento en la concentración de la fosfatasa ácida en la próstata inmadura (15). En contraste, en otras especies como el perro, el toro, el carnero y la rata, la próstata madura contiene cantidades pequeñas de esta enzima (14).

Por otra parte, se ha visto que la castración o el tratamiento estrogénico en humanos adultos, da por resultado una disminución en la actividad de la fosfatasa ácida prostática a los tres días y dos semanas, respectivamente, por lo cual esta enzima ha sido usada para seguir el curso de terapias endócrinas (16).

Estos efectos muestran claramente la respuesta de la próstata al estímulo hormonal y su relación con la actividad de fosfatasa ácida.

Fishman y col. estudiaron la fracción de la fosfatasa ácida de próstata presente en el suero sanguíneo y demostraron un aumento de dicha fracción, inhibible por L-tartrato, en individuos con carcinoma de próstata y en sujetos normales

después de masaje prostático. Los niveles de fosfatasa ácida total permanecieron en ambos casos, dentro de los valores normales (18).

Estos autores consideraron que las elevaciones de la fracción prostática sérica, indicaban la presencia de cáncer prostático, aún cuando no fuera detectado clínicamente (19).

Brandes y Bourner encontraron que la distribución subcelular de la fosfatasa ácida era diferente en próstatas normales y en próstatas con carcinomas (20). Estos datos muestran porqué la F.A.P. ha sido empleada clínicamente, como uno de los parámetros en el diagnóstico del funcionamiento prostático. Sin embargo, la fracción inhibible por L-tartrato o prostática, puede encontrarse aumentada en el suero de mujeres y en hombres sin cáncer prostático (15).

Además, en hombres clínicamente normales, puede presentarse un aumento temporal en la fracción prostática (21).

Como se indicó anteriormente, se ha descrito que los niveles de la fosfatasa ácida en el suero, pueden estar relacionados con los estados normal o patológico de algunos órganos, sin embargo, ya que la fosfatasa ácida es una mezcla de isoenzimas

que tienen diferentes orígenes, las variaciones en su concentración pueden tener diversas causas.

Por ejemplo, una característica para diferenciar la fracción prostática de la fosfatasa ácida de otras fracciones de origen no prostático, es la de ser inhibible por L-tartrato (5), sin embargo, ahora sabemos que existen otras fracciones de origen no prostático y que son susceptibles al mismo inhibidor (22).

Por todo lo anterior, parece necesario investigar algunas características y propiedades de la enzima de próstata, que permitan desarrollar métodos analíticos para poder diferenciar esta enzima en forma muy específica, en una mezcla de todas las fosfatasas ácidas presentes en el suero sanguíneo y poder encontrar las condiciones en las que las fluctuaciones en su concentración pueden correlacionarse a los diferentes estadios de la próstata, lo cual, podría ser de un método clínico que permitiera, ya sea, detectar en forma precoz algunas disfunciones de la próstata, o bien, seguir la ontogenia de esa glándula.

En el presente trabajo se llevó a cabo un estudio de las características cinéticas y propiedades antigénicas de la

fosfatasa ácida de próstata, contenida en el plasma seminal humano, que es la fracción mas útil en el diagnóstico, por ser ésta la única isoenzima que es secretada por la próstata de las cinco fosfatasas sintetizadas en esa glándula (23).

CAPITULO II

MATERIAL Y METODOS

DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA DE LA FOSFATASA ACIDA

METODO CUALITATIVO

Estas determinaciones se hicieron usando el equipo de Phosphatabs-acid de los laboratorios Warner Chilcott (USA).

REACTIVOS

Tabletas de sustrato.- alfa-naftil fosfato de sodio.

Tabletas de desarrollo de color.- Ortofianisidina tetrazoada.

METODO

Alicuotas de las muestras que contenían la enzima fueron llevadas a un volumen de 200 μ l con agua bidestilada. A estas mezclas se les añadió la tableta de sustrato (alfa naftil fosfato de sodio), después de disolver la tableta, las mezclas se dejaron a temperatura ambiente durante 17 minutos, de acuerdo con las instrucciones del equipo. Pasado este tiempo, se disolvió la tableta del desarrollo de color (orto-dianisidina tetrazoada) y se dejaron transcurrir tres minutos antes de comparar el color obtenido en la mezcla con el patrón de colores del instructivo. Junto con las muestras problema, se corrieron siempre sus "blancos" correspondientes. La actividad de la enzima se reportó en CRUCES.

METODO CUANTITATIVO

La actividad de fosfatasa ácida fue determinada por una modificación del método descrito por Bessey y col. (24).

El fundamento del método es que por la acción hidrolítica de la fosfatasa ácida sobre el p-nitrofenilfosfato, se libera p-nitrofenol, el cual, en un medio alcalino, da un color amarillo que puede ser determinado a 410 nm.

REACTIVOS

Amortiguador T-C pH 4.9.- Tris-citrato (0.014 M - 0.048 M)

Solución de sustrato.- p-nitrofenilfosfato 0.1 M

Solución de ácido perclórico 0.5 M.

Solución reveladora de Glicina/NaOH 1.0 M pH 10.05.

Solución patrón de p-nitrofenol 1.62 mM.

METODO

Cada muestra conteniendo enzima fue llevada hasta un volumen de 400 μ l, con una solución amortiguadora de Tris-Citrato (0.014M-0.048M) pH 4.9 y fue incubada a 37°C durante 10 minutos.

Pasado ese tiempo, se añadieron 50 μ l de una solución 0.1M de p-nitrofenil fosfato en Tris-Citrato pH 4.9, incubando nuevamente la mezcla de reacción a 37°C durante 30 minutos.

Al finalizar la incubación, se adicionaron 100 μ l de PCA 0.5M para terminar la reacción.

Alicuotas de 250 μ l de cada mezcla fueron adicionadas con 1.25 ml de una solución amortiguadora de Glicina/NaOH 1M pH 10.05.

Los tubos "blanco" que contenían solamente 400 μ l de Tris-Citrato pH 4.9, fueron tratados en la misma forma que los tubos problema.

La curva de calibración se hizo a partir de una solución de 1.62 mM de p-nitrofenol, tomando las alícuotas necesarias para tener concentraciones de 10 a 100 nmoles en cada sistema, cuyo volumen final era de 1.5 ml. Figura 1.

La densidad óptica de cada mezcla fue determinada a 410 nm en un espectrofotómetro ultravioleta UNICAM SP 800 B.

Empleando las condiciones antes mencionadas, los siguientes parámetros fueron determinados en la fracción más purificada (F.A.P. purificada por electroforesis): temperatura y tiempo óptimos, pH óptimo, efecto de la concentración de sustrato, efecto de compuestos inhibidores y activadores.

Las Unidades de actividad enzimática específica para la fosfatasa ácida prostática (U. de P.A.P.) se reportaron como: µmoles de p-nitrofenol/hora/mg de proteína .

CUANTIFICACION DE PROTEINAS

El método empleado fue el de Lowry y col. (25).

REACTIVOS

Solución 1.- Tartrato de Sodio .2H₂O al 2%

Solución 2.- Sulfato de Cobre .5H₂O al 1%

Solución 3.- Carbonato de Sodio al 20% en NaOH 0.1M

Reactivo A.- Se prepara mezclando 0.5 ml de la solución 1, 0.5 ml de la solución 2 y 50 ml de la solución 3

Reactivo B.- Reactivo de Folin-Ciocalteus diluido 1:2

La solución patrón de albúmina sérica humana contenía 1 mg de la proteína por mililitro.

METODO

Alicuotas de las muestras, se llevaron a un volumen de 400 µl con agua bidestilada y se les adicionaron 2 ml del reactivo A. Las mezclas fueron agitadas inmediatamente, dejándolas en reposo durante 10 minutos a temperatura ambiente.

Pasado este tiempo, se añadieron 0.2 ml del reactivo B, se agitaron las mezclas y se dejaron en reposo durante 30 minutos a temperatura ambiente.

La densidad óptica desarrollada fue determinada a 750 nm, en un espectrofotómetro Colleman 44 (Perkin-Elmer).

En cada ocasión se corrió una curva tipo de 10 a 100 µg. de albúmina y sus blancos correspondientes, los cuales no incluyen proteína. Figura 2.

METODO DE PURIFICACION DE LA FOSFATASA ACIDA PROSTATICA A PARTIR DE PLASMA SEMINAL HUMANO

El método seguido para la purificación de la fosfatasa ácida prostática del plasma seminal humano, se basó en la técnica descrita por Davidson y Fishman (26).

REACTIVOS

Sulfato de amonio al 65% de saturación o 2.5 M.

Sulfato de amonio al 45% de saturación o 1.75 M.

Solución amortiguadora T-C pH 4.9 y pH 3.9.- Tris-citrato (0.014 M - 0.048 M)

Solución de hidróxido de sodio 1 N.

MATERIAL

Plasma seminal humano 100 ml.

METODO

El semen humano fue obtenido de donadores voluntarios adultos sanos. Las muestras de semen licuadas fueron centrifugadas a 2260x g durante 30 minutos, para separar los espermatozoides del plasma seminal.

El plasma seminal así obtenido, se congeló hasta tener una cantidad suficiente para iniciar la purificación.

A 100 ml de plasma seminal se les ajustó el pH a 7.5 con NaOH 1N y se centrifugó a 17,300 x g durante 40 minutos a 4°C en una centrifuga Sorvall SS-3 refrigerada.

El precipitado (P-1), que fue descartado, mostró al microscopio pequeñas cantidades de células epiteliales y algunos fragmentos de espermatozoides.

Del sobrenadante (S-1) se tomó una alícuota de 2 ml y a los restantes 98 ml se les adicionó poco a poco y con agitación continua, sulfato de amonio hasta lograr una concentración de 65% de saturación. Después de adicionado el sulfato de amonio, se agitó durante 40 minutos a 4°C evitando la formación de espuma.

La mezcla fue centrifugada a la misma velocidad y tiempo que las descritas anteriormente.

Al sobrenadante (S2-65) se le tomó una alícuota de 2 ml y los restantes 96 ml fueron dializados durante 18 horas contra un amortiguador de Tris-Citrato (0.014M-0.048M) de pH 4.9, con cinco cambios de 4 litros cada 3 horas. Al dializado se le tomó una alícuota de 3 ml y el resto se almacenó congelado en fracciones de 20 ml.

El precipitado (P-2) se disolvió en 100 ml de amortiguador Tris-Citrato (0.014M-0.048M) de pH 3.9 y se le agregó sulfato de amonio cristalino hasta lograr una saturación del 45%. Después de la adición del sulfato de amonio, se mezcló durante 40 minutos mas a 4°C, evitando la formación de espuma.

La mezcla fue centrifugada en las condiciones descritas anteriormente y el sobrenadante (S3-45), del cual se conservó una alícuota de 3 ml, fue procesado en la misma forma que el sobrenadante (S2-65).

El precipitado (P-3) se disolvió en 100 ml de amortiguador Tris-Citrato de pH 3.9, repitiéndose la precipitación con sulfato de amonio al 45% de saturación. Se agitó durante 40 minutos a 4°C y se centrifugó en las condiciones antes mencionadas.

El sobrenadante (S4-45) se procesó en la misma forma que los sobrenadantes anteriores y separándose previamente una alícuota de 3 ml.

El precipitado (P-4) fue descartado.

A cada una de las alícuotas tomadas durante el fraccionamiento salino, se les determinó su concentración de proteínas, su actividad de fosfatasa ácida y su movilidad electroforética en gel de acrilamida a pH de 8.3.

La figura 3, muestra la purificación de la fosfatasa ácida prostática.

CROMATOGRAFIA EN COLUMNA DE FILTRACION

Para lograr una mayor purificación de la fracción S3-45 se preparó una columna de Biogel P-200.

REACTIVOS

Biogel P-200 (Pharmacia Fine Chemicals).

Amortiguador T-C pH 3.9.- Tris-citrato (0.014 M- 0.048 M)

Enzima.- Sobrenadante S3-45 conteniendo 9.6 mg de proteína/ml.

METODO

a) Preparación de la resina

6 gramos de Biogel P-200 fueron suspendidos en 200 ml de agua bidestilada, dejándolos 12 horas con agitación continua.

Transcurrido ese tiempo, se decantó la resina mas ligera y la columna fue empacada (2 x 25 cm) con la resina perfectamente hidratada.

Antes de colocar la muestra, la columna se equilibró durante 12 horas, con el amortiguador Tris-Citrato (0.014M-0.048M) a pH 3.9.

b) Adición de la muestra

5 ml de la fracción S3-45 fueron añadidos lentamente dentro de la columna, una vez terminada la adición se dejó gotear el amortiguador sobre la columna y ésta fue conectada al colector de fracciones (Ultrarak, LKB Produkter). La velocidad de salida se ajustó a 1.6 ml cada 35 minutos.

Se colectaron 60 fracciones de 1.5 ml cada una. A cada fracción se le determinó su concentración de proteína y actividad de fosfatasa ácida.

ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA

Se siguió el método descrito por Davies y col. (27), con el fin de determinar el patrón de las proteínas durante las diferentes etapas de purificación.

REACTIVOS

Para la formación del gel separador, se prepararon las siguientes soluciones:

Solución 1.- TEMED al 0.23%, TRIS 3.02 M, HCl 0.48 N (pH 8.9)

Solución 2.- Acrilamida al 30% y Bis-acrilamida al 0.8%

Solución 3.- Persulfato de amonio al 0.14%

Estas soluciones se mezclaron en el orden y proporciones siguientes:

1 parte de la solución 1, 2 partes de la solución 2, 1 parte de agua bidestilada y 4 partes de la solución 4.

Para la formación del gel espaciador, se prepararon las siguientes soluciones:

Solución 4.- TEMED al 0.46%, TRIS 0.493 M, HCl 0.48 N (pH 6.7)

Solución 5.- Acrilamida al 10% y Bis-acrilamida al 2.5%

Solución 6.- Riboflavina al 4.0%

Solución 7.- Sacarosa al 40%

Estas soluciones se mezclaron en el siguiente orden y proporciones:

1 parte de la solución 4, 2 partes de la solución 5, 1 parte de la solución 6 y 4 partes de la solución 7.

METODO

Preparación de los geles en tubos

Un extremo de los tubos de vidrio (5 mm x 10 cm) fue sellado temporalmente con Parafilm y colocado verticalmente. A cada tubo se añadió 1.5 ml de la mezcla del gel separador estratificándolo con agua la parte superior de la mezcla, para evitar la formación del menisco. El tiempo de gelificación fue de 15 minutos.

Pasado este tiempo se añadió a cada tubo 100 μ l de la mezcla del gel espaciador, estratificando nuevamente con agua, esperando 20 minutos para que se llevara a cabo la fotopolimerización bajo una lámpara de luz fluorescente. Las muestras por analizar que contenían un máximo de 200 μ g de proteína, en un volumen máximo de 200 μ l por gel, fueron colocadas en la parte superior del gel espaciador.

Posteriormente, se añadieron 100 μ l del gel espaciador sobre la muestra, estratificando la parte superior de la mezcla

con agua y dejando que la fotopolimerización del gel espaciador-muestra se llevara a cabo (25-30 minutos).

Una vez transcurridas todas las manipulaciones, se retiró el Parafilm y los tubos fueron colocados en la cámara de electroforesis con el gel conteniendo la muestra hacia el cátodo (cámara superior).

La figura 4, muestra la figura de la cámara usada en este trabajo, para llevar a cabo la electroforesis.

La solución amortiguadora de Tris-Glicina (0.0049M-0.038M) pH 8.3, fue colocada en ambas cámaras y al amortiguador de la cámara superior se le añadieron 3 gotas de Azul de Bromo fenol a 0.001% en etanol al 90%; este colorante fue el indicador del frente iónico.

El tiempo de corrida de la electroforesis fue de 75 minutos, aplicando 5 mA por tubo, la temperatura después de la electroforesis fue de 4°C en la cámara inferior y de 7°C en la superior.

Los geles fueron sacados de los tubos haciendo correr agua entre la pared del tubo y la superficie del gel, con una

jeringa y una aguja larga. A los tubos recién sacados, se les midió la longitud total y la distancia del origen al frente iónico.

Tratamiento de los geles para medir actividad enzimática

Después de la medición de los geles, éstos fueron cortados en secciones de aproximadamente 1.2 mm de grueso, las cuales fueron colocadas en 100 ml de T-C pH 4.9 y se dejaron durante 12 horas en este amortiguador, para lograr la difusión de las proteínas.

Tratamiento de tinción para los geles

Después de la medición de los geles, éstos fueron pasados a tubos que contenían TCA al 10% durante una hora, con el objeto de fijar las proteínas al gel. Después de este tiempo se lavaron los geles 3 veces con agua bidestilada y se colocaron en tubos con una solución de Negro de Amido al 0.1%, para llevar a cabo su tinción. El tiempo de tinción fue de dos horas, después de lo cual se hicieron los lavados necesarios con ácido acético al 7% hasta lograr la decoloración del fondo del gel.

Determinación del Rf de la F.A.P.

Con la finalidad de encontrar la movilidad relativa (Rf)

De la banda de proteína con actividad enzimática de fosfatasa ácida se corrieron paralelamente electroforesis de la misma muestra, unas para medir la actividad enzimática y otra para determinar por tinción el patrón de proteínas.

La concentración de proteína empleada en cada caso se indica a continuación:

MUESTRAS	PROTEINAS ($\mu\text{g/gel}$)	
	PARA TINCION	PARA MEDIR ACTIVIDAD DE F.A.P.
Plasma seminal humano	212.0	53.0
Fracción (S-1)	196.0	49.0
Fracción (S2-65)	200.0	8.0
Fracción (S3-45)	192.0	9.6
Fracción (S4-45)	150.0	10.2

Con el objeto de obtener una fracción muy purificada de la enzima, para hacer los estudios cinéticos, se llevaron a cabo varias electroforesis para aislar suficiente concentración de proteína con actividad de fosfatasa ácida. Para ello, se corrieron 128 geles, conteniendo cada uno 192 μg de proteína de la fracción S3-45, la cual representaba una actividad enzimática específica

de 625 Unidades de F.A.P. Dieciséis geles fueron corridos en forma paralela como controles para comprobar el Rf de la banda con actividad enzimática.

Una vez localizada la zona del Rf en cada uno de los 128 geles, se rebanó dicha zona y se dejó eluir en 200 μ l del amortiguador Tris-Citrato pH 4.9 (0.014M-0.048M) durante 12 horas a 4°C.

Después de ese tiempo, el eluido de todas las zonas fue filtrado, determinándose en ésta, concentración de proteínas y actividad enzimática. El filtrado de la F.A.P. purificada por electroforesis fue almacenado a 4°C y posteriormente empleado para la determinación de la cinética enzimática.

ELECTROENFOQUE EN GEL DE POLIACRILAMIDA

Con el fin de determinar la pureza de la fracción F.A.P. purificada por PAGE y para determinar el punto isoeléctrico de la fosfatasa ácida prostática purificada, se siguió el método del electroenfoque descrito por Wrigley (28) modificado.

REACTIVOS

Para la formación del gel, se prepararon las siguientes soluciones:

Solución 1.- Acrilamida al 30% y Bis-Acrilamida al 0.8%

Solución 2.- TEMED al 1%

Solución 3.- Persulfato de amonio 1 mg/ml

Solución 4.- Persulfato de amonio 1.5 mg/ml

La mezcla de trabajo estaba constituida por 0.8 partes de la solución 2, 3.0 partes de la solución 1 y 0.8 partes de la solución de anfolitos al 40% pH 3-10 (LKB Produkter).

METODO

Preparación de los geles en los tubos

Los tubos usados en la electroforesis, fueron sellados temporalmente con Parafilm en su parte inferior y fueron colocados verticalmente. Se añadió a cada tubo 0.5 ml de la mezcla de trabajo, 1.5 ml de la solución 3 y 10 μ l de azul de bromofenol al 0.4%, usando este indicador como medidor de la formación del gradiente de pH.

Los tubos que llevaban la muestra de 500 μ l de la P.A.P. purificada por PAGE (150 μ g proteína/gel), contenían además de la enzima, 0.5 ml de la mezcla de trabajo y 1 ml de la solución 4. Las soluciones fueron mezcladas dentro de los tubos, estratificando agua en la parte superior de la mezcla. El tiempo de gelificación fue de 30 minutos.

Una vez llevada a cabo la gelificación, los tubos fueron colocados en la misma cámara usada para electroforesis. Ver figura 4.

Una solución de ácido fosfórico al 1% se colocó en la cámara superior, la cual correspondía al ánodo y una solución de hidróxido de sodio al 1% fue colocada en la cámara inferior (cátodo).

El tiempo para lograr el electroenfoque de la proteína fue de 140 minutos. La corriente fue de 1.0 mA por tubo. La temperatura terminada el electroenfoque fue de 4°C en la cámara inferior y de 10°C en la cámara superior.

Después de llevado a cabo el electroenfoque, los geles se sacaron de los tubos y se les midió la longitud de cada gel.

Los geles fueron rebanados para medir el pH de cada rebanada con un electrodo único en un potenciómetro Beckman modelo 3550, para lo cual cada rebanada se eluyó en un volumen de 500 µl de agua bidestilada.

Tinción de los geles en electroenfoque

Después de medidos los geles, se pasaron a tubos con TCA

al 10%, con el objeto de fijar la proteína y permitir la difusión de los anfolitos. Se hicieron, por lo menos, 10 cambios de la solución de TCA al 10%, después de lo cual se llevó a cabo la tinción de los geles, con una solución de Azul de Coomasie al 0.25% en TCA al 10% durante 4 horas.

Para lograr la decoloración del fondo de los geles, se hicieron 3 cambios de ácido acético al 7% en intervalos de 2 horas.

INDUCCION Y OBTENCION DE ANTICUERPOS CONTRA F.A.P.

Con el fin de obtener anticuerpos contra la fosfatasa ácida prostática, se inoculó la fracción S3-45 como antígeno, en cuyos.

MATERIAL

2 Cuyos hembra de 400 g de peso inicial cada una.

REACTIVOS

Dosis del Antígeno: 0.27 mg de proteína del sobrenadante S3-45 en 0.5 ml de S.S.I. y 0.5 ml de adyuvante de Freund completo (DIFCO).

Azida de sodio 1%.

Solución salina isotónica S.S.I.

Eter etílico y etanol al 90%

METODO

Una dosis del antígeno fue administrada a cada animal por vía subcutánea cada 10 días durante dos meses. La última dosis fue preparada a la misma concentración de proteína pero sin adyuvante.

Diez días después de la última inyección del antígeno, los animales fueron anestesiados con éter etílico y posteriormente, sangrados por la aorta abdominal.

Después de obtenida la sangre, ésta se incubó a 37°C durante 30 minutos, dejándose posteriormente en reposo a 4°C durante 12 horas para lograr la retracción del coágulo. La sangre se centrifugó a 2260 xg durante 15 minutos a 4°C, en una centrifuga Universal modelo UV, para separar el coágulo. Una alícuota de 3 ml del suero fue utilizada para cuantificar proteínas y al volumen restante se le añadió 1 ml de azida de sodio al 1% por cada 10 ml de suero.

El suero así tratado se dividió en alícuotas de 5 ml y se congeló.

Los anticuerpos 1 y 2 fueron obtenidos de dos animales diferentes, los cuales recibieron las mismas dosis de antígeno, el mismo día y a la misma hora.

Todo el material y reactivos empleados en esta técnica fueron previamente esterilizados.

La figura 5 muestra la inducción y la obtención de los anticuerpos contra F.A.P.

INMUNODIFUSION O DOBLE DIFUSION DE OUCHTERLONY

Se llevó a cabo la técnica descrita por Ouchterlony (29), modificada para determinar la antigenicidad de la fosfatasa ácida prostática, así como la capacidad de los anticuerpos obtenidos, de reaccionar con las diferentes fracciones de la purificación.

REACTIVOS

Agarosa al 1%. T-G pH 8.3 diluido 1:10.

Azida de sodio al 1%.

METODO

Preparación de las cajas

10 ml de una solución estéril de agarosa al 1% en Tris-glicina (0.0049M-0.038M) de pH 8.3 fueron vaciados en cajas de Petri, colocando el perforador hasta que el agar solidificó. Una vez que el agar solidificó, se sacó el perforador y se selló el fondo de cada pozo adicionando 10 μ l de agarosa 1% a 60°C.

En las cajas de Petri se colocó un papel filtro con 0.5 ml de azida de sodio al 1%, para evitar el crecimiento bacteriano. Las cajas se cerraron con Parafilm y se dejaron 24 horas en reposo a temperatura ambiente.

El orden en el cual las muestras fueron colocadas en cada caja fue el siguiente:

A) PERFORACION	MUESTRA	µg de proteína/perforación
1	Plasma seminal humano	8960
2	Fracción S2-65	3180
3	Fracción S3-45	300
4	S3-45 purificada por PAGE	360
5	Fracción S4-45	600
6	S.S.I.	0

La perforación CENTRAL contenía 8960 µg de proteína del Anticuerpo 1 o 8700 µg de proteína del Anticuerpo 2.

B) PERFORACION	MUESTRA	µg de proteína/perforación
Central	Anticuerpo 1	6400
1	S3-45 purificada por PAGE	300
2-4	S.S.I.	0
5	Homogeneizado de próstata	1320
6	Plasma seminal humano	2650

CAPITULO III

RESULTADOS

RESULTADOS

En la tabla II se resumen los resultados de la cuantificación de proteínas y la actividad enzimática de la F.A.P. en cada una de las fracciones obtenidas durante la purificación de la enzima con sulfato de amonio.

En el sobrenadante S3-45, que mostró la mayor actividad específica con 625.0 U de F.A.P., se tenía el 76.3% de la actividad inicial de la enzima.

En las figuras 6 y 7, se puede ver la actividad de la F.A.P. contenida en cada rebanada de los geles de poliacrilamida, después de llevar a cabo la electroforesis del plasma seminal y de los sobrenadantes S1, S2-65, S3-45 y S4-45. En todas las fracciones, la máxima actividad enzimática la mostró la región entre la rebanada 20 y la 25.

La tabla III muestra la "movilidad relativa" de la banda de proteína con actividad de F.A.P. contenida en las diferentes rebanadas de gel y la movilidad promedio que fue obtenida, basándose en los valores de las movilidades relativas superior e inferior.

Un valor promedio de todas las movilidades relativas medias dió un Rf de 0.385 ± 0.063 .

Con este valor de Rf para la banda con actividad enzimática, se localizó una banda en los geles teñidos, que pudiera corresponder a la proteína con actividad de F.A.P.

La figura 8 muestra la fotografía de la electroforesis de cada fracción y el Rf de la banda teñida en la zona de la proteína con actividad de F.A.P.

El número total de bandas teñidas para el plasma seminal y para el sobrenadante S1 fue de 11; para el sobrenadante S2-65 fue de 8; para el sobrenadante S3-45 fue de 6 y para el S4-45 fue de 4.

Con el fin de separar la zona de actividad enzimática de las electroforesis no teñidas, se usó también el valor de Rf de 0.385 ± 0.063 .

Una fracción eluida de 64 geles de la electroforesis en la forma antes mencionada y que contenía 0.3 mg de proteína/ml en un volumen de 13.6 ml y con una actividad específica de 533.3 U de F.A.P., fue empleada para los estudios de cinética enzimática.

La otra fracción, eluida de 24 geles que contenía 0.28 mg de proteína/ml en un volumen de 12.5 ml, con una actividad específica de 514.2 U de F.A.P., fue utilizada para las inmunodifusiones.

El contenido proteico de la fracción con actividad enzimática eluida de cada gel, representó el 31.25% de la proteína adicionada. El rendimiento de la actividad de F.A.P. en la electroforesis fue de 27.3%.

El perfil obtenido de la cromatografía en Biogel P-200 del sobrenadante S3-45, se muestra en la figura 9, en la cual se observa una zona única con actividad enzimática comprendida del tubo 12 al 24, mientras que el perfil de la concentración de proteínas medidas por D.O. y por el método de Lowry, muestra dos picos en esta misma zona. La gráfica muestra que esta fracción contenía, cuando menos, dos picos mas que representan la mayor concentración de la proteína total, adicionada a la columna.

La zona de actividad enzimática representa el 25% de la proteína añadida a la columna y el 4.43% de la actividad de F.A.P., puesta inicialmente en la columna.

En la figura 10 se muestra la zona con actividad de P.A.P. obtenida en los geles analizados por electroenfoque y empleando como muestra la fracción eluida de la electroforesis de la fracción S3-45. Los valores de pH isoeléctrico (pI) obtenidos en los diferentes experimentos realizados, fueron los siguientes: 4.75, 4.47, 4.60, 4.32, 4.75 y 4.70. El valor promedio del pI obtenido a partir de esos valores fue de 4.53 ± 0.1793 y está representado por la línea discontinua en la misma figura. Asimismo, puede verse la fotografía del electroenfoque, en el cual solo se localiza una zona de actividad de P.A.P., que corresponde a una sola banda de proteína teñida. El rendimiento de la actividad enzimática fue del 19.8%.

A continuación se dan algunas características de la actividad de la fosfatasa ácida prostática, obtenida de la electroforesis en gel de acrilamida de la fracción S3-45.

Temperatura óptima.- La figura 11 muestra que al variar la temperatura desde cero hasta 60°C, la enzima mostró su mayor actividad enzimática a 37°C.

Curva de tiempo.- La figura 12 muestra la secuencia en la formación del producto por la fosfatasa ácida durante 60 minutos.

pH óptimo.- La figura 13 muestra la curva de pH obtenida con diferentes soluciones amortiguadoras desde 2 hasta 11 unidades de pH. Se encontró una zona de máxima actividad enzimática entre 4.5 y 5.5.

La figura 14 muestra el efecto de la concentración de sustrato sobre la enzima, encontrándose que para una concentración de enzima igual a 6.0 µg de proteína, se requirieron mas de 1.11 mM del sustrato para saturarla.

Cuando estos valores fueron graficados según Lineweaver-Burk (figura 15), el valor de la constante de Michaelis-Menten (K_m) y velocidad máxima (V_{max}) respectivos, fueron: 4.7×10^{-4} M/L y 34.6 µmoles de p-nitrofenol/hora/mg de proteína.

Los resultados obtenidos al incubar la F.A.P. con posibles inhibidores y activadores, se muestra en la figura 16.

Los compuestos, tales como calcio, magnesio, zinc y cisteína, no mostraron ningún efecto significativo sobre la actividad enzimática.

La presencia de L-tartrato en el sistema, inhibió en un 80% la actividad de F.A.P., desde una concentración de 15 hasta 60 mM.

En las figuras 17 y 18 se muestran las fotografías de las inmunodifusiones obtenidas con el anticuerpo 1 y 2, respectivamente.

En la figura 17 pueden verse dos líneas de precipitación del plasma seminal, de la fracción S2-65 y S3-45 con el anticuerpo 1, mientras que las fracciones S4-45 y S3-45 purificado por electroforesis (F.A.P. purificada por PAGE) muestran una sola banda de precipitación.

En la figura 18 el plasma seminal da dos bandas de precipitación con el anticuerpo 1, mientras que las demás fracciones dan una sola banda.

La figura 19 muestra las dos bandas de precipitación, tanto del plasma seminal como del homogeneizado de próstata con el anticuerpo 1; la fracción S3-45 purificada por electroforesis, muestra una sola línea de precipitación con este mismo anticuerpo.

CAPITULO IV

DISCUSION

DISCUSION

En base a que casi todos los métodos de purificación de la fosfatasa ácida prostática involucran una manipulación excesiva de la enzima (23,24), en el presente estudio se seleccionó una técnica, por medio de la cual se han logrado bugnas preparaciones de la enzima activa (26), a partir del tejido prostático y el cual consiste en el fraccionamiento salino con sulfato de amonio, en el cual se aprovecha la característica de la fosfatasa ácida prostática de ser insoluble en una solución de sulfato de amonio al 65% de saturación en pH cercanos a 8 y de ser soluble en sulfato de amonio al 40% de saturación en pH cercano a 4.0.

Por medio de este método se logró obtener una fracción del plasma seminal humano (S3-45), que tenía el 76% de la actividad enzimática inicial y el 25.3% de la proteína; lo cual representó un aumento de tres veces la actividad específica inicial, en forma similar a como lo describieron Davidson y Fishman (26).

Se analizó la fracción S3-45 tanto en cromatografía en Biogel P-200 como en electroforesis en gel de poliacrilamida.

Se encontró que la proteína que contenía toda la actividad enzimática representaba del 25 al 30% de la proteína añadida a las columnas. Este porcentaje representa del 7.5 al 7.9% de la proteína inicial contenida en el plasma seminal humano.

Por el hecho de haber obtenido ocho veces más actividad enzimática por medio de la electroforesis que por la cromatografía en Biogel P-200, se eligió a la primera para separar a la F.A.P. de las proteínas que la contaminan en la fracción S3-45.

La zona de la banda correspondiente a F.A.P., estaba situada al final de la región de las alfa₂-globulinas, según el patrón electroforético para plasma seminal, descrito por Quinlivan(30).

Los resultados de la electroforesis junto con los del electroenfoque, donde se tiene una sola banda de proteína, indican que aún cuando se tiene una disminución de la actividad enzimática por las manipulaciones del método electroforético, se logra obtener una proteína homogénea, en cantidad y calidad suficientes para llevar a cabo los estudios de los parámetros cinéticos y las pruebas de inmunodifusión.

Durante este estudio se observó que la actividad de F.A.P. del plasma seminal es fuertemente afectada por el almacenamiento a temperaturas bajas. Siendo esta sensibilidad mayor, cuando se eliminaban proteínas durante los diferentes pasos de purificación.

Dentro de los parámetros obtenidos en este estudio, podemos mencionar un pH óptimo para la F.A.P. de 5.0. Otros tipos de fosfatasa ácida como los presentes en lisosomas, tienen un pH óptimo entre 3.0 - 3.5 (23). Lam y col (23) proponen que el rango de pH al cual la F.A.P. actúa, y que es mayor al encontrado en las enzimas lisosomales, puede deberse a su acción extracelular, ya que este pH está más cercano al pH fisiológico del fluido seminal.

Otra observación con respecto al pH óptimo para esta enzima, es que entre más ácido es el sustrato empleado, el pH óptimo para determinar la actividad enzimática es más bajo (3).

La Km de esta enzima aislada del plasma seminal humano, tuvo un valor de 4.7×10^{-4} M/L a pH 5.0 y usando p-nitrofenil fosfato como sustrato. La Km de la isoenzima extraída de próstata por Lam y col (23) y presumiblemente la

que es excretada por la próstata al fluido seminal, tiene un valor reportado por estos autores de 4.5×10^{-5} M/L para el mismo sustrato. Esta diferencia de valores en la Km de la F.A.P. para el mismo sustrato, ha sido reportada también con respecto al beta-glicero fosfato por Seraidarian (31) y Ohlmeyer (32), los cuales dan un Km de 2.1×10^{-3} y de 4.7×10^{-3} , en tanto que Lam y col, para ese mismo sustrato, dan un valor de Km de la F.A.P. de 1.0×10^{-2} M/L. Estas diferencias posiblemente se deban a las distintas fuentes de obtención de la enzima, o bien, a los diferentes métodos de aislamiento, los cuales pueden afectar a los grupos prostáticos de la enzima y con ello afectar la actividad enzimática (15,33,34,35,36).

Otra característica de la F.A.P. es la de ser inhibible en un 90% por L-tartrato en concentraciones de 40 mM (5,6). En el presente estudio se obtuvo una inhibición del 80%, aún a una concentración de 15 mM del inhibidor.

Con el fin de eliminar la posibilidad de estar trabajando con una fosfatasa alcalina con capacidad catalítica a pH cercano de 5.0 pero inhibible por 10 mM de cisteína, como la descrita por Abul-Padl (4), se adicionó a las mezclas

de incubación, cisteína en varias concentraciones, resultando que la enzima aislada del semen no fue afectada por este com puesto (figura 16).

Por otra parte, las concentraciones de los cationes magnesio, calcio y zinc, fueron probados en concentraciones cercanas a la concentración reportada para el plasma seminal (37,38). A estas concentraciones, ninguno de los compuestos mostró efecto sobre la actividad de la F.A.P.

El punto isoelectrónico (pI) de la F.A.P. obtenido en este estudio, fue de 4.53 ± 0.17 , que concuerda con el reportado por Kutscher y Pany (39) de 4.4 para la misma enzima.

Después de llevar a cabo el electroenfoque, se recuperó únicamente el 19.8% de la actividad enzimática inicial, por lo cual este método no es recomendado para hacer purificaciones de la F.A.P., ya que esta enzima pierde la mayor parte de su actividad cuando se le somete a un pH cercano a su pI (43).

Pudo mostrarse, con los resultados obtenidos por la inm nodifusión, que se logró obtener anticuerpos contra la F.A.P. aislada del plasma seminal y que estos anticuerpos

fueron capaces de reaccionar con el plasma seminal, con el homogeneizado de próstata y con las fracciones S1, S2-65, S3-45, S4-45 y con la F.A.P. purificada por electroforesis. Esto indica que, aparentemente, los métodos de purificación y aislamiento utilizados, no alteran los determinantes antigénicos de la F.A.P. y por otro lado, que la enzima no cambia, antigénicamente hablando, dentro y fuera de la próstata.

El método de obtención de anticuerpos contra la F.A.P., resultó mejor al reportado por otros autores como Mukherjee y col (40), los cuales obtuvieron anticuerpos contra fluido seminal que daban hasta 6 líneas de precipitación con el antígeno. En este trabajo se logró tener una sola línea de precipitación con el antígeno puro y dos con el plasma seminal.

Otros autores han demostrado que los anticuerpos contra F.A.P., usando como antígeno fluido seminal, reaccionan solamente con la enzima de próstata (41) y además, que la reacción antígeno-anticuerpo, no afecta los sitios catalíticos de la F.A.P. (40).

Cooper y Foti (42) han llevado a cabo estudios preliminares,

aplicando un radioinmunoanálisis para la cuantificación específica de la F.A.P. Sin embargo, los problemas con el protocolo de inmunización y la automatización de la técnica, han detenido un poco esta investigación.

Otra posibilidad es la de estandarizar cuantitativamente el sistema de inmunodifusión, ya que se tiene a la mano el antígeno puro y se puede obtener suero inmune monovalente y éstos se emplearían en técnicas de localización específicas, marcando los anticuerpos con fluoresceína (inmunofluorescencia).

CAPITULO V

RESUMEN

RESUMEN

En este estudio se aisló fosfatasa ácida de origen prostático (F.A.P.), a partir de plasma seminal humano. A través de la purificación se logró tener una proteína con actividad de fosfatasa ácida, la cual tuvo un valor de Km de 4.7×10^{-4} M/L y un pI de 4.53. La fracción mas purificada mostró una sola banda proteica en el análisis por electroenfoque. Los anticuerpos obtenidos dieron reacción contra el homogeneizado de próstata, contra el plasma seminal y contra cada una de las fracciones del proceso de purificación. Así, se puede concluir que se obtuvo una proteína pura y homogénea, que esta proteína tiene capacidad antigénica y que con estas propiedades, se tiene la posibilidad de obtener un suero inmune monovalente contra F.A.P., para intentar la estandarización de métodos que permitan la cuantificación y localización específica de la F.A.P., como por ejemplo, radioinmunoanálisis, inmunodifusión cuantitativa o la inmunofluorescencia.

CAPITULO VI

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

Por medio de un fraccionamiento del plasma seminal humano con sulfato de amonio, se lograron obtener varios extractos ricos en actividad de fosfatasa ácida prostática, cuya concentración en proteínas, permitió su empleo adecuado como antígeno en cuyos, para lograr una buena respuesta de anticuerpos. Sin embargo, este método de purificación no puede considerarse como el mas adecuado para lograr una preparación con alta o elevada actividad específica.

Basados en los estudios de las propiedades cinéticas, en el punto isoeléctrico en la presencia de una sola banda de proteína con actividad de F.A.P. en el electroenfoque, podemos concluir que en este trabajo se obtuvo una enzima pura y homogénea, después de aplicar la electroforesis a la fracción S3-45.

Los anticuerpos obtenidos en este trabajo contra la F.A.P. aislada del plasma seminal, son un medio útil para la identificación de la enzima, ya sea en la próstata o en el plasma seminal humano.

El método de purificación empleado en este trabajo, no altera, aparentemente, los sitios antigénicos de la F.A.P.

TABLAS Y FIGURAS

TABLA I

TIPO DE FOSFATASA	LOCALIZACION	PH OPTIMO	INHIBIDORES	CONCENTRACION	ACTIVADORE	CONCENTRACION	
Alcalina	Higado	9.9-10.0	Zinc	0.001 M (3)	Magnesio	0.001 M (3)	
	Hueso		Berilio (2)		Manganeso(3)		
	Intestino		Cianuro (2)				
	Suero sanguíneo		Arseniato (2)				
			Cisteína		0.01 M (4)		
	Hueso, higado	6.5	Cisteína	0.01 M (4)			
Acida	Próstata	4.8-5.0	L-tartrato	0.02 M(5, 6, 17)			
			Etanol 40% (36)				
			Fluoruro		0.01 M (7)		
			Oxalato (2)				
			Zinc		0.005 M (8)		
		6.0-6.5	L-tartrato	0.002 M (5, 6)			
			Fluoruro	0.001 M (7)	Zinc	0.005 M (8)	
					Magnesio	0.15 M (8)	
		Eritrocito	4.5-5.0	Iones cúpricos(9)			
				Formaldehido 0.5%(5,10)			
			Fluoruro (7)				

TABLA II

CUANTIFICACION DE PROTEINAS Y ACTIVIDAD ESPECIFICA EN CADA FRACCION
OBTENIDA DURANTE LA PURIFICACION CON SULFATO DE AMONIO

Fracción	Proteína (mg/ml)	Actividad Especifica (U de F.A.P.)	Volumen (ml)	Rendimiento			
				Proteínas (mg)	%	U totales	%
Plasma seminal	53.0	207.5	100	5300		1,097,100	
S1	49.0	244.8	100	4900	92.0	1,195,520	109.0
S2-65	8.0	300.0	171	1368	25.8	410,400	37.3
S3-4	9.6	625.0	140	1344	25.3	840,000	76.3
S4-45	3.4	111.7	136	462	8.7	51,605	4.7

TABLA III

MOVILIDAD RELATIVA DE LA BANDA CON ACTIVIDAD
DE F.A.P. EN LAS DIFERENTES FRACCIONES

Fracción	Movilidad Relativa		Promedio
	Inferior	Superior	
Plasma seminal	0.377	0.48	0.43
S1	0.321	0.431	0.38
S2-65	.372	.452	0.41
S3-45	.305	.420	0.36
S4-45	.321	.390	0.35
			$\bar{x} = 0.385 \pm 0.003$

La movilidad relativa fue calculada con respecto a la movilidad del azul de bromofenol ($R_f = 1$)

Figura 1

CURVA PATRON DE p-NITROFENOL

Solución Patrón: p-nitrofenol 1.62 mM

$\lambda = 410 \text{ nm}$

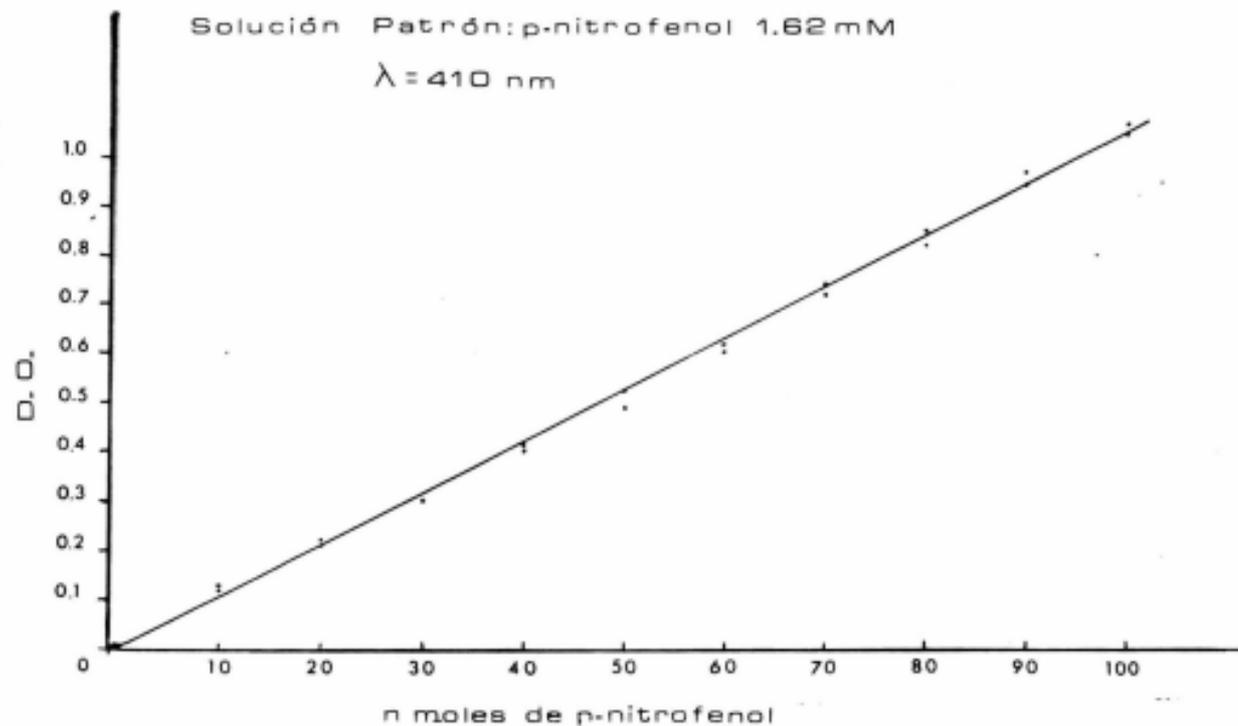


Figura 2

CURVA PATRON DE PROTEINA

Método de Lowry

Solución Patrón: Albúmina Sérica Humana 1.0mg/ml

$\lambda = 750 \text{ nm}$

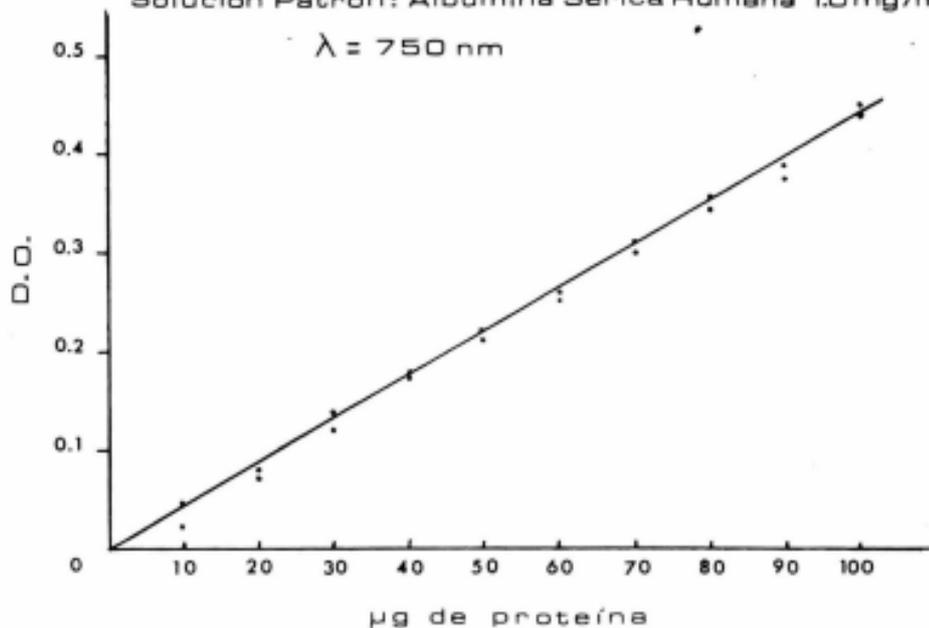
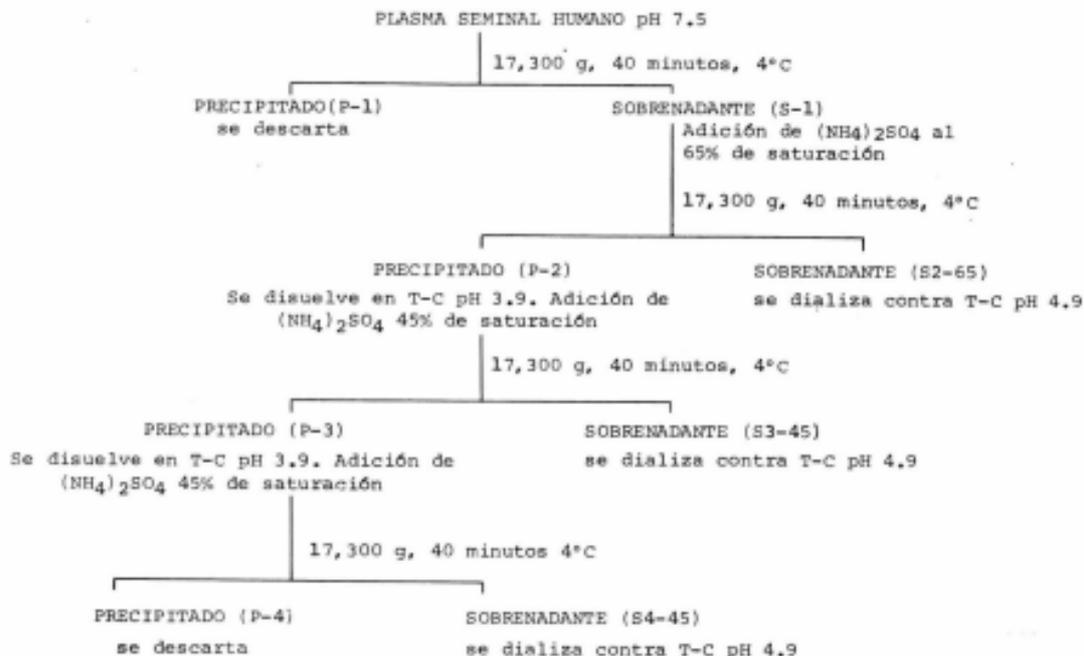


FIGURA 3 PURIFICACION DE LA F.A.P. POR PRECIPITACION CON SULFATO DE AMONIO



Se tomaron alícuotas de cada fracción para cuantificar proteínas, actividad de fosfatasa ácida y para determinar movilidad electroforética.

Figura 4
CAMARA DE ELECTROFORESIS
Y ELECTROENFOQUE

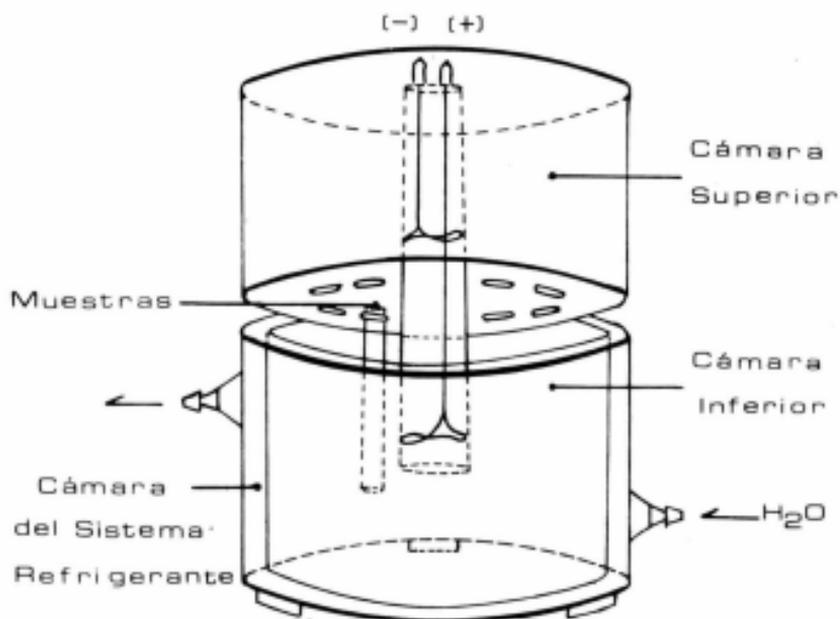


FIGURA 5

INDUCCION Y OBTENCION DE ANTICUERPOS

CONTRA F.A.P.

DOSIS DEL ANTIGENO.- 0.27 mg de proteína de la fracción S3-45

0.5 ml de Solución Salina Isotónica

0.5 ml de Adyuvante de Freund completo



INOCULACION EN CUYOS HEMBRAS.- 1 dosis subcutánea cada 10 días X 5

La sexta dosis sin adyuvante



SANGRADO DE LOS ANIMALES.- 10 días después de la última dosis

se obtuvo el suero sanguíneo de los
animales inoculados



PRUEBAS CON LOS ANTICUERPOS DE F.A.P.



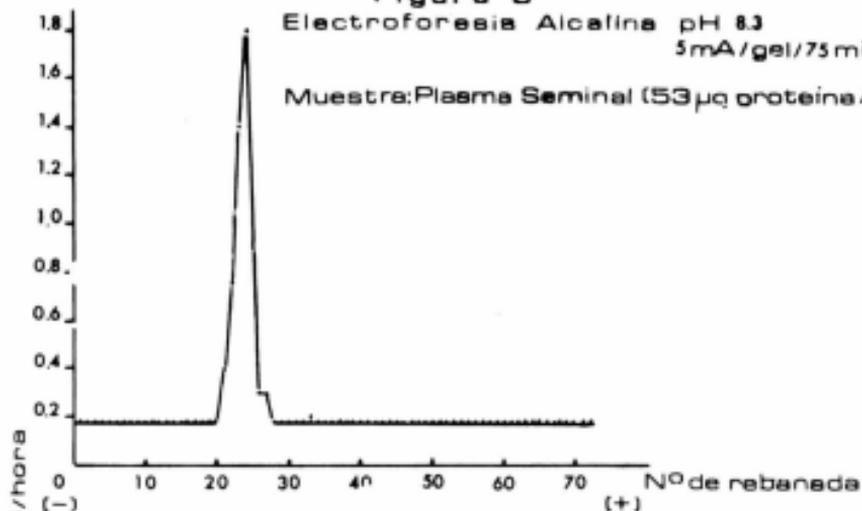
CUANTIFICACION DE PROTEINAS

IMMUNODIFUSION EN AGAR

Figura 8

Electroforesis Alcalina pH 8.3
5mA/gel/75 min.

Muestra: Plasma Seminal (53 μ g proteina/gel)



Electroforesis Alcalina pH 8.3
5mA/gel/75 min.

Muestra: Sobrenadante S-1
49 μ g proteina/gel

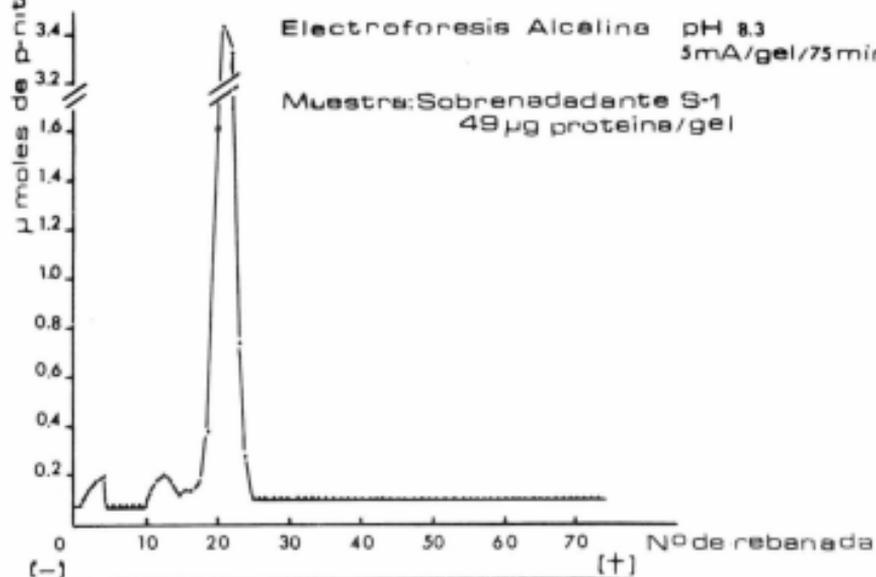


Figura 7

Electroforesis Alcalina

pH 8,3

5mA/gel/75min

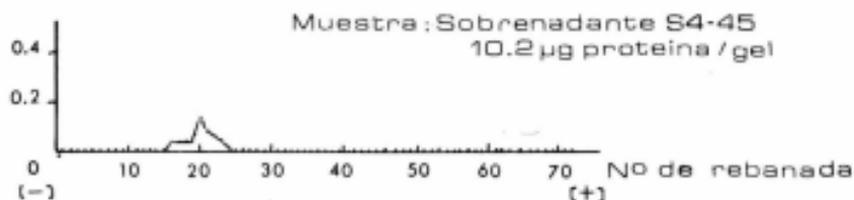
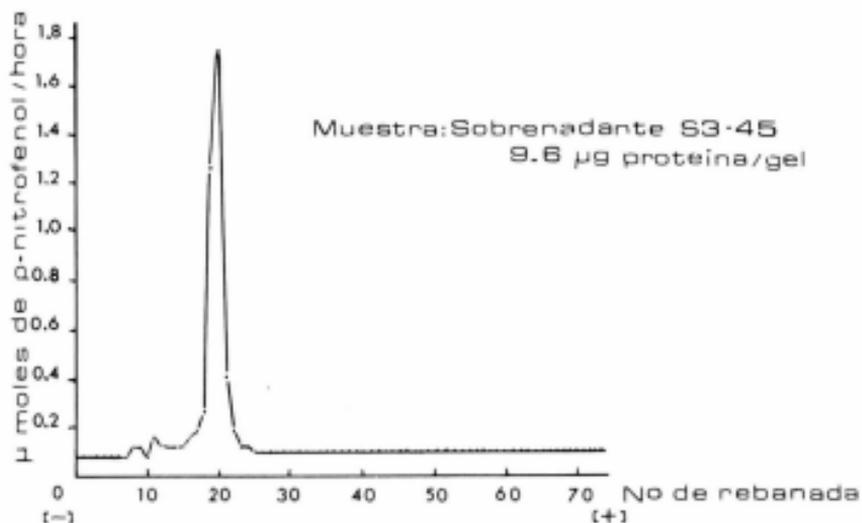
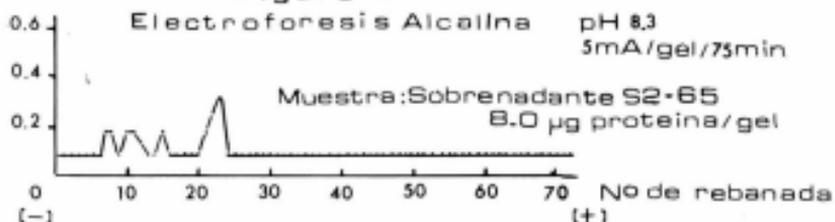
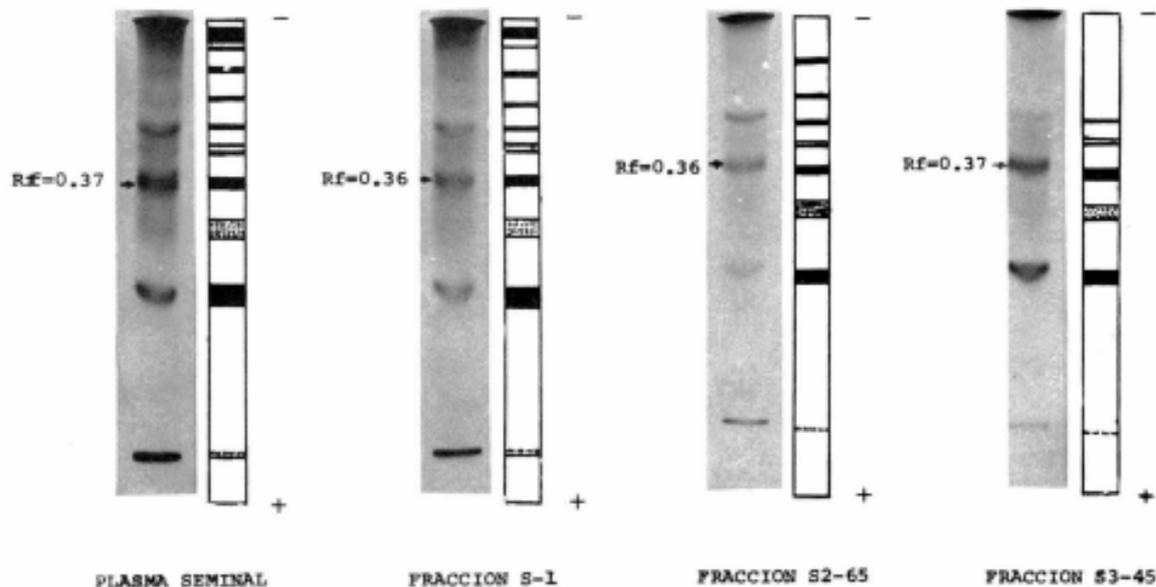


FIGURA 8

FOTOGRAFÍAS Y DIBUJOS DE LAS ELECTROFORESIS
EN LAS DIFERENTES FRACCIONES OBTENIDAS



CADA UNO DE LOS GELES CONTENIA 200 μ g DE PROTEINA APROXIMADAMENTE. LA LINEA PUNTEADA FUE EL FRENTE IONICO

Figura 9

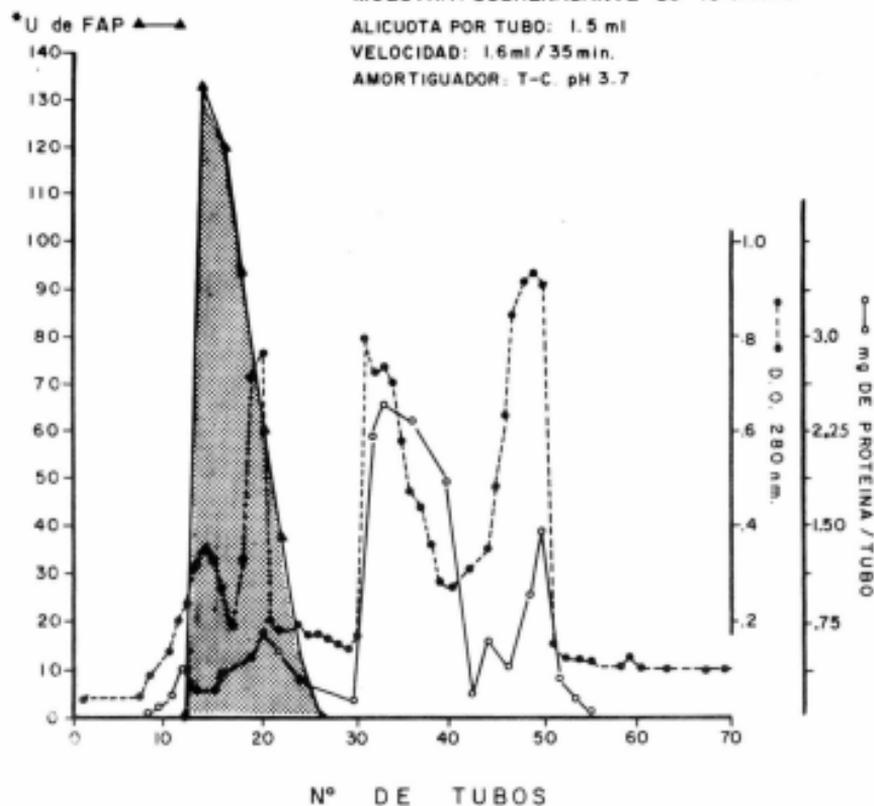
CROMATOGRAFIA EN COLUMNA DE BIOGEL P-200

MUESTRA: SOBRENADANTE S3-45 (5ml)

ALICUOTA POR TUBO: 1.5 ml

VELOCIDAD: 1.6 ml / 35 min.

AMORTIGUADOR: T-C. pH 3.7

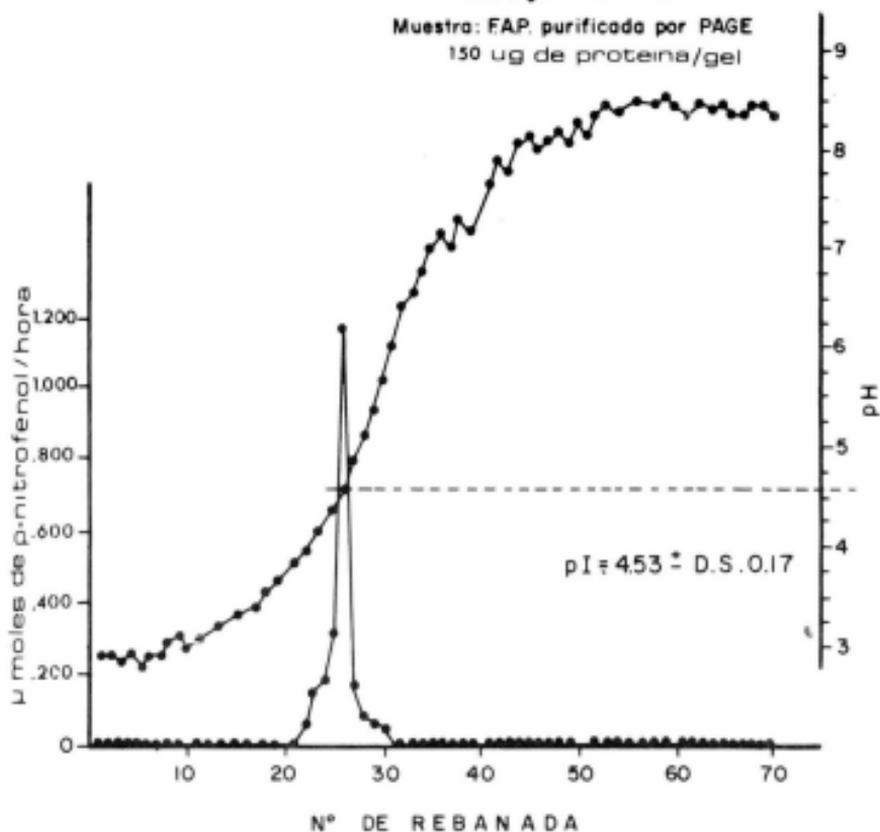


*U de FAP = μ moles p-nitrofenol/hora /mg de proteina

Figura 10
ELECTROENFOQUE de Fosfatasa Acida Prostatica

1mA/gel/135 minutos

Muestra: FAP purificada por PAGE
150 ug de proteina/gel



(+)

(-)



Figura 11 CURVA DE TEMPERATURA DE LA F.A.P.
Muestra: FAP purificada por PAGE

(6,0 μ g. de Proteína)

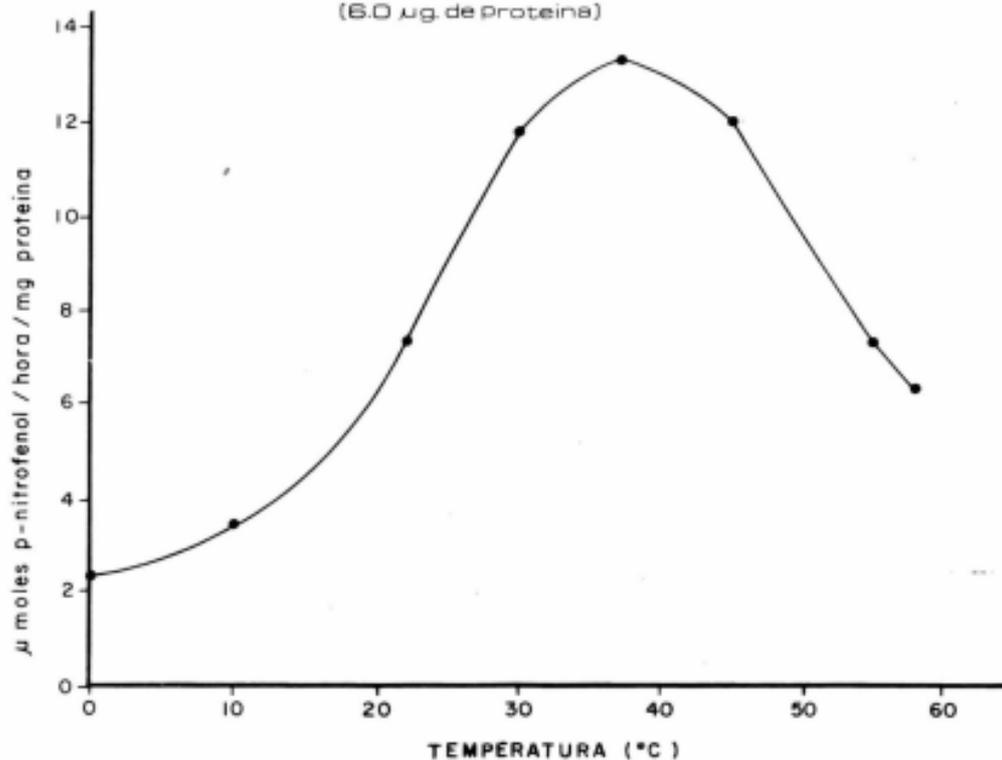
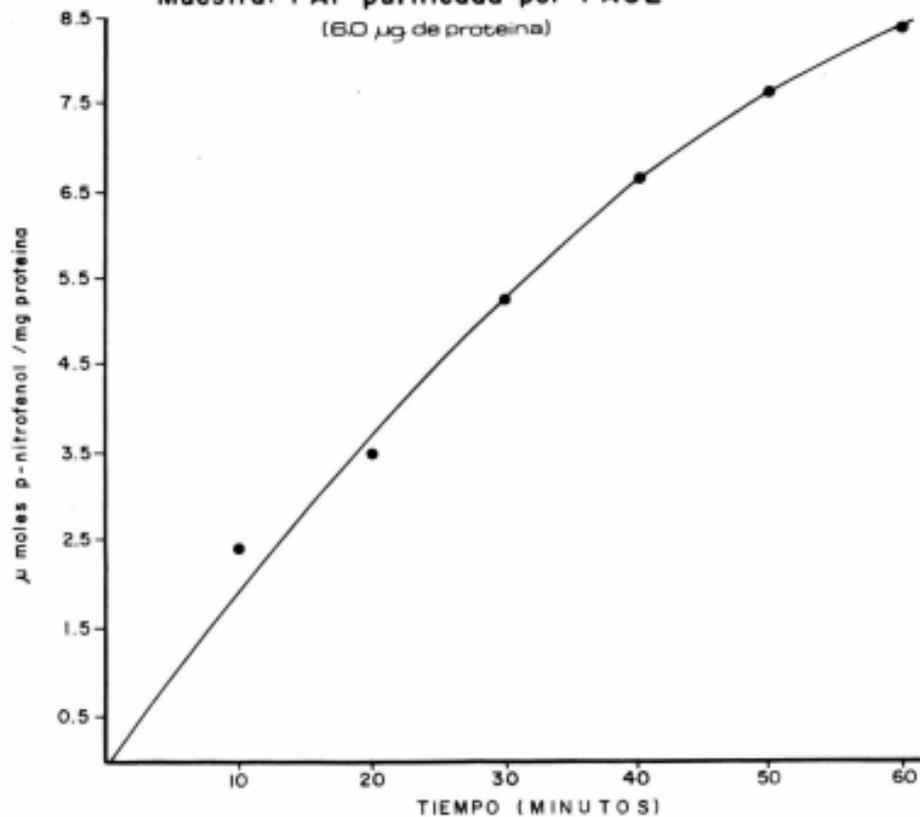


Figura 12 CURVA DE TIEMPO DE LA F.A.P.
Muestra: FAP purificada por PAGE
(60 μ g de proteína)



CURVA DE pH DE LA F.A.P.
Muestra: FAP purificada por PAGE
(60 μ g de proteína)

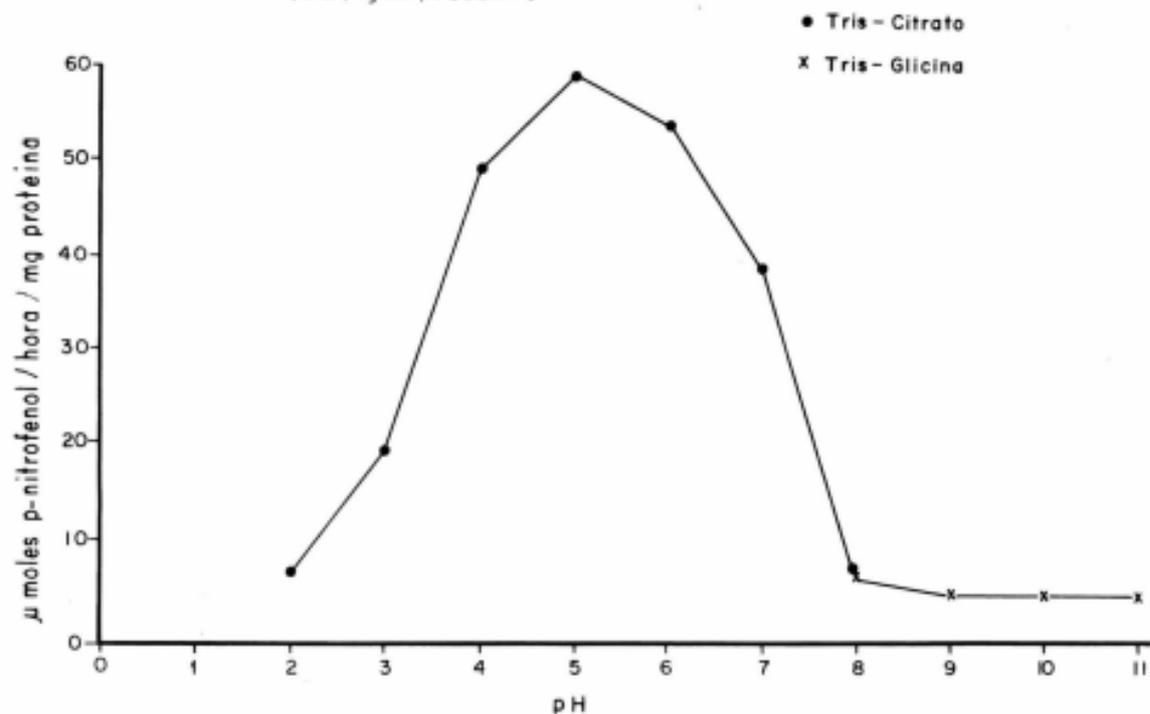


Figura 13

Figura 14
CURVA DE CONCENTRACION DE SUSTRATO
DE LA F.A.P.

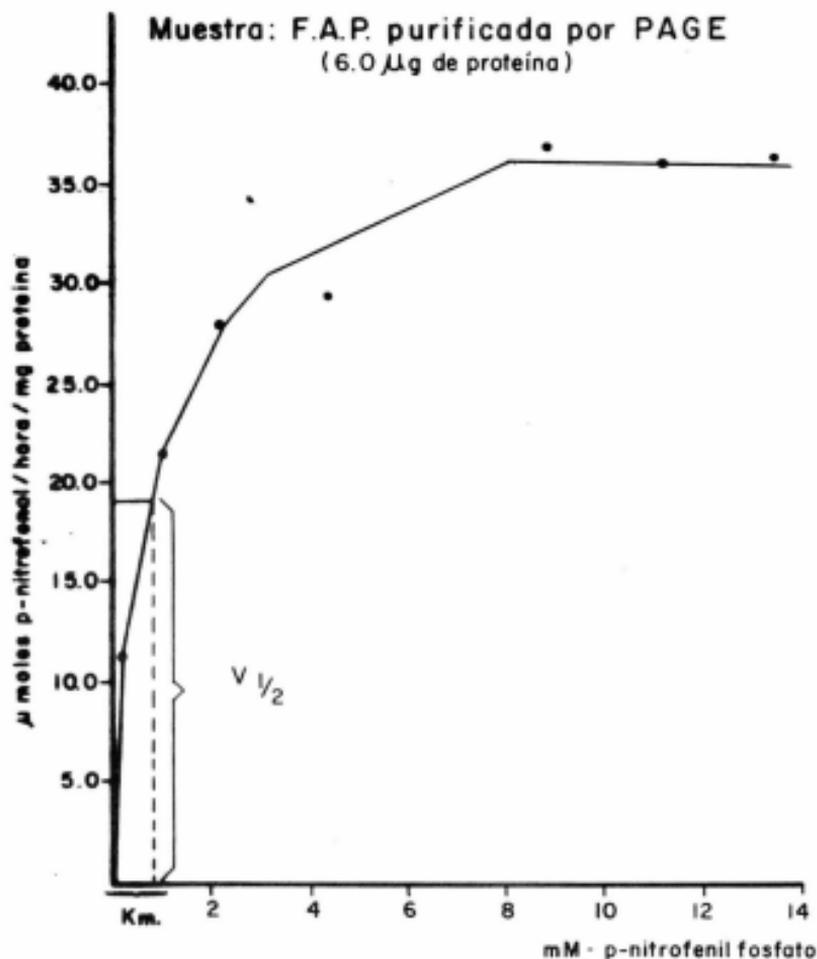


Figura 15

GRAFICA DE LINEWEAVER-BURK DE
LA F.A.P.

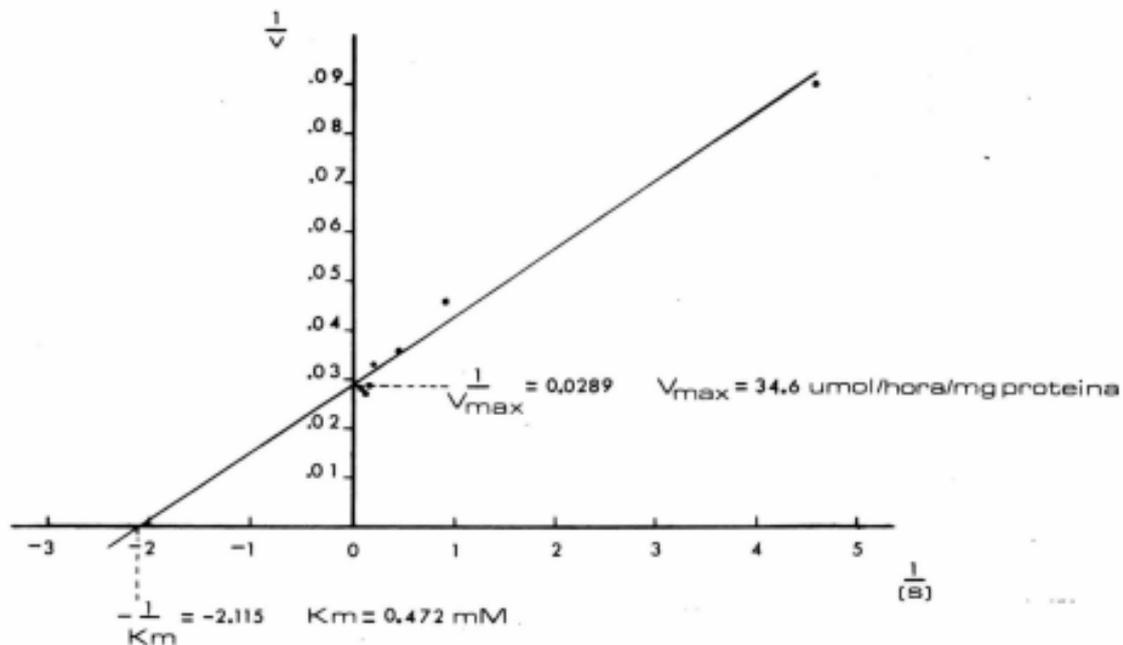
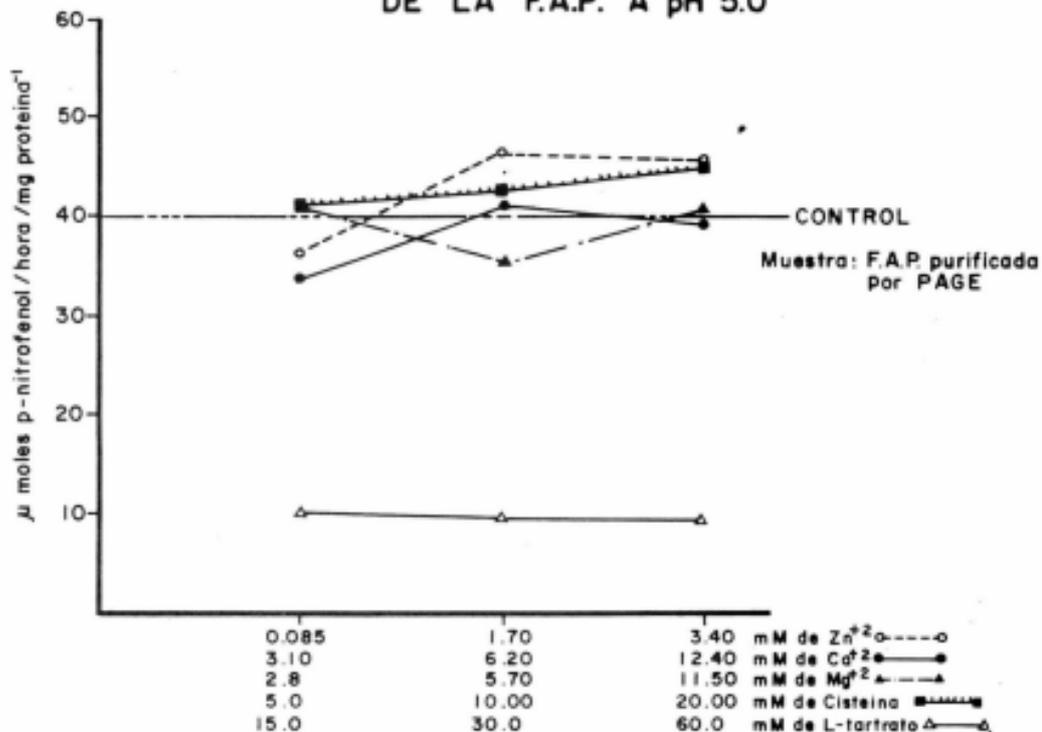


Figura 16
 GRAFICA DE COMPUESTOS INHIBIDORES ACTIVADORES
 DE LA F.A.P. A pH 5.0



INMUNODIFUSION DE LOS ANTICUERPOS DE CUYO CONTRA F.A.P. PURIFICADA DE
PLASMA SEMINAL

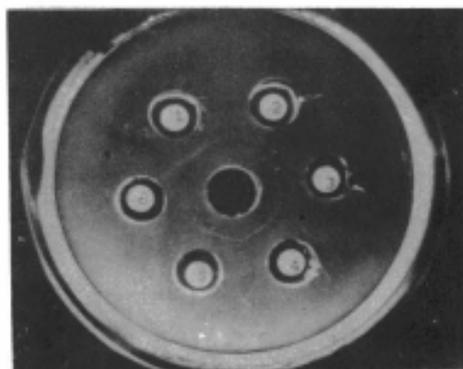


Figura 17

CUYO 1

<u>PERFORACION</u>	<u>MUESTRA</u>
CENTRAL	ANTICUERPOS 1
1	Plasma seminal
2	S2-65
3	S3-45
4	S3-45 purificada por PAGE
5	S4-45
6	Solución salina

CUYO 2

<u>PERFORACION</u>	<u>MUESTRA</u>
CENTRAL	ANTICUERPOS 2
1	Plasma seminal
2	S2-65
3	S3-45
4	S3-45 purificada por PAGE
5	S4 45
6	Solución salina

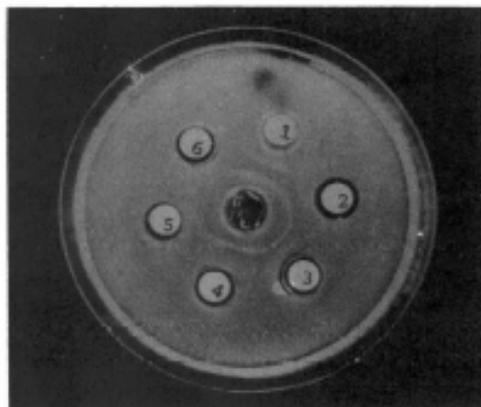
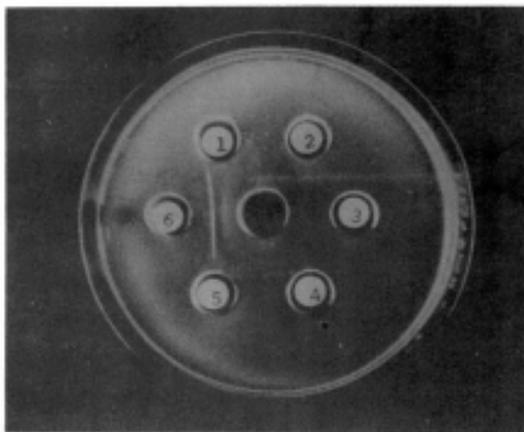


Figura 18

IMMUNODIFUSION DE LOS ANTICUERPOS DE CUYO CONTRA F.A.P. PURIFICADA
DE PLASMA SEMINAL

Figura 19



PERFORACION

CENTRAL

1

2

3

4

5

6

MUESTRA

ANTICUERPOS 1

S3-45 purificada por PAGE

Solución salina isotónica

Solución salina

Solución salina

Homogeneizado de próstata

Plasma seminal

ESQUEMA GENERAL DE LA OBTENCION DE FOSFATASA ACIDA PROSTATICA (F.A.P.) PARA LOS ESTUDIOS DE LAS CARACTERISTICAS CINETICAS Y LAS PROPIEDADES ANTIGENICAS, A PARTIR DEL PLASMA SEMINAL HUMANO

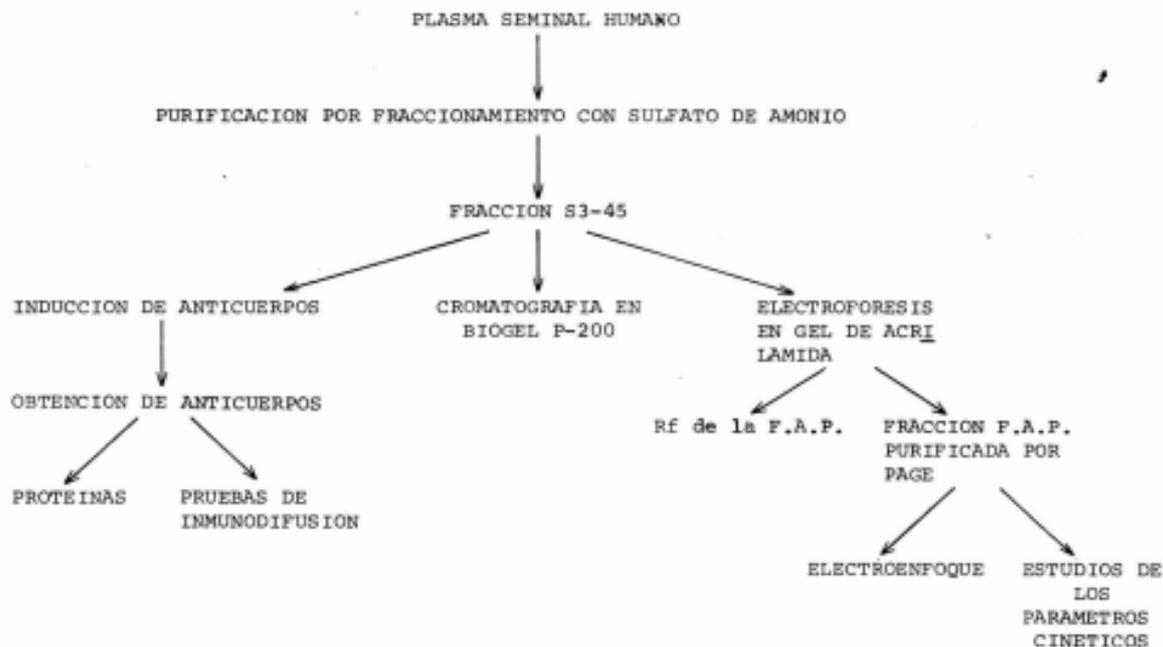


Figura 20

BIBLIOGRAFIA

1. Mahler, H.R., Cordes, E.H. "Química Biológica"; 2a. edición, Ediciones Omega, Barcelona (1971). Pág. 298.
2. Wilkinson, J.H. "An introduction to diagnostic enzymology" 1a. edición. Edward Arnold L.T.D., London (1962). Pág. 96.
3. Tietz, N.W. "Química Clínica Moderna". 2a. edición. Interamericana, México, D.F. (1972). Pág. 403.
4. Abul-Padl, M.A.M. and King, E.J. "Properties of the acid phosphatase of erythrocytes and of the human prostate gland". *Biochem.J.* 45:51 (1949).
5. Fishman, W.H. and Lerner, F. "A method for estimating serum acid phosphatase of prostatic origin". *J. Biol. Chem.* 200:89 (1953).
6. Delory, G.E. and Hetherington. "The acid phosphatase of human urine". *Canad. J. M. Sc.* 30:4 (1952).
7. Kutscher, W., Wörner. "Prostatic phosphatase II". *Ztscher. f. physiol. chem.* 239:109 (1936).
8. Wilkstrom, C., Lindahl, P.E. "The effects of inhibitors and activators on the activity of acid phosphatase in seminal fluid of rabbits in the range 5.1-6.5". *Acta Chem. Scand.* 25:443 (1971).
9. Reynolds, M.D., Lemon, H.M., Byrnes, W.W. "Cooper-resistant serum acid phosphatase I. Method and values in health and disease". *Cancer Res.* 16:943 (1956).
10. Delory, G.E., Sweetser, T.H., White, T.A. "The use of formalin and alcohol in the estimation of prostatic phosphatase". *J. Urol.* 66:724 (1951).
11. Kutscher, W., Wolbergs, H. "Prostatic phosphatase" *Ztschr. f. physiol. chem.* 236:237 (1935).
12. Gutman, E.B., Sproul, E.E. and Gutman, A.B. "The significance of increased phosphatase activity of bone at the site of osteoplastic metastases secondary to carcinoma of the prostate". *Am. J. Cancer* 28:485 (1936).

13. Gutman, A.B., Gutman, E.B. "Acid phosphatase occurring in the serum of patients with metastasizing carcinoma of the prostate gland". *J.Clin.Invest.* 17:473 (1938).
14. Gutman, A.B. and Gutman, E.B. "Acid phosphatase activity of the serum of normal human subjects". *Proc.Soc.Exper. Biol. and Med.* 41:277 (1939).
15. Woodard, H.Q. "The clinical significance of serum acid phosphatase". *Am.J.Med.* 902-910 (December 1959).
16. Huggins, C., Hodges, C.V. "Studies on prostatic cancer I. The effect of castration, of estrogen and of androgen injections on serum phosphatase in metastatic carcinoma of the prostate". *Cancer Res.* 1:293 (1941).
17. Fishman, W.H., Dart, R.M., Bonner, C.D., Leadbetter, W.F., Lerner, P. and Homburger, F.A. "A new method for estimating serum acid phosphatase of prostatic origin applied to the clinical investigation of cancer of the prostate". *J.Clin.Invest.* 32:1034 (1953).
18. Fishman, W.H., Bonner, C.D. and Homburger, F. "Some factors which influence the level of the serum prostatic acid phosphatase". *Proc.Am.A.Cancer Res.* 1:14 (1954).
19. Fishman, W.H., Bonner, C.D. and Homburger, F. "Studies on prostatic acid phosphatase and cancer of the prostate". *New England J.Med.* 225/20:925 (1956).
20. Brandes, D., Bourne, G.H. "Histochemistry of the human prostate normal and neoplastic". *J.Path.Bact.* IXI:33 (1956).
21. Day, E., Ying, S.S., Schwartz, M.K. and Bodansky, O. "Serum prostatic acid phosphatase levels in male patients of a cancer prevention clinic". *Cancer* 9:222 (1956).
22. Li, C.Y., Yam, L.T., Lam, K.W. "Studies of acid phosphatase isoenzymes in human leukocytes". *J.Histochem.Cytochem.* 18/2:901 (1970).
23. Lam, K.W., Olivia Li, Li, C.Y. and Yam, L.T. "Biochemical properties of human prostatic acid phosphatase". *Clin. Chem.* 19/5:483 (1973).

24. Bessey, O.A., Lowry, O.H. and Brock, M.J. "A method for rapid determination of alkaline phosphatase with five cubic millimeters of serum". *J. Biol. Chem.* 164:321 (1946).
25. Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L., Randal, R.J. "Protein measurement with the folin phenol reagent". *J. Biol. Chem.* 193:265 (1951).
26. Davidson, H.M. and Fishman, W.H. "A simplified purification procedure for human prostatic acid phosphatase based on pH and amonio sulfate fractionation". *J. Biol. Chem.* 234/3: 526 (1959).
27. Davies, C.W. in "Methods in Immunology and Immunochemistry" pag.94-104. W.A. Benjamin Inc., New York (1970).
28. Wrigley, C.W. in "Methods in Biochemical Analysis". Vol.19, pag.82-85. Interscience Publishers (1971).
29. Ouchterlony, O. "Antigen-antibody reactions in gels". *Acta Path. Microb. Scand.* 26:507 (1949).
30. Quinlivan, W.L.G. "Analysis of the proteins in human seminal plasma". *Arch. Biochem. Biophys.* 127:680 (1968).
31. Seraidarian, M. in "Methods in enzymology". Vol. II, pag.527. Academic Press, Inc., New York (1955).
32. Ohlmeyer, P. in "Methods in enzymology". Vol. II, pag.527. Academic Press, Inc., New York (1955).
33. Smith, J.K. and Witby, L.G. "The heterogeneity of prostatic acid phosphate". *Biochem. Biophys. Acta* 151:607 (1968).
34. Veron, M.P., Mangold, A.W., Mahonery, S.A. "Fractionation and purification of prostatic acid phosphatase". *Invest. Urol.* 12/1:13 (1974).
35. Ostrowski, W., Wasyl, Z., Weber, M., Guminska, M. and Luchter, E. "The role of neuroaminic acid in the heterogeneity of acid phosphomonoesterase from the human prostate gland". *Biochem. Biophys. Acta* 221/2:297 (1970).

36. Derechin, M., Ostrowski, W., Galka, M. and Barnard, E.A. "Acid phosphomonoesterase of human prostate, molecular weight, dissociation and chemical composition". *Biochem. Biophys. Acta* 250:143 (1971).
37. Mann, T. "Biochemistry of semen and human reproductive tract". Methuen & Co., Ltd., London, John Wiley & Sons, Inc., New York, (1964). Págs. 189.
38. Huacuja, L., Sosa, A., Delgado, N.M., Rosado, A. "A kinetic study of the participation of zinc in human spermatozoa metabolism". *Life Sciences* 13:1383 (1973).
39. Kutscher, W., Pany, J. "Prostatic phosphatase III". *Ztschr.f.physiol.chem.* 255:169 (1938).
40. Mukherjee, A.C., Ghosh, B.N. "Studies on antigenic and catalytic sites of the semen acid phosphatase". *Enzymologia* 38:120 (1970).
41. Shulman, S., Mamrod, L., Gonder, M.J., Soanes, W.A. "The detection of prostatic acid phosphatase by antibody reactions in gel diffusion". *J.Immunol.* 93: 474 (1964).
42. Cooper, J.F., Poti, A. "A radioimmunoassay for prostatic acid phosphatase". *Invest.Urol.* 12/2:98 (1974).
43. Schmidt, G. in "Methods in enzymology". Vol. II, pag. 523-530. Academic Press, Inc. New York (1955).