

24. 78

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE CIENCIAS

**REVISION BIBLIOGRAFICA CON RELACION A LA
ISOENZIMA DE LA FOSFATASA ALCALINA DE TIPO
PLACENTARIO EN ALGUNOS CASOS DE CANCER**

T. E. S. I. S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
B I O L O G O
P R E S E N T A

ANA ELVIRA LOIS COLORADO

México, D. F.

1981



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.

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

INDICE:

- I.- Resumen.
- II.- Implicaciones de la isoenzima de la fosfatasa alcalina en la investigación clínica y terapia futura (justificación del trabajo).
- III.- Introducción general.
- IV.- Clasificación de las enzimas.
- V.- Isoenzimas de la fosfatasa alcalina en general.
- VI.- Isoenzimas de la fosfatasa alcalina de tipo placentario.
- VII.- Fosfatasa alcalina de tipo placentario y el cancer.
- VIII.- Métodos usados para la investigación de la fosfatasa alcalina.
- IX.- Discusión.
- X.- Bibliografía.

I.- Resumen:

La fosfatasa alcalina es una enzima que se encuentra en varios tejidos normales como son: La mucosa intestinal, el epitelio de los túbulos renales, los epitelios respiratorios, los vasos sanguíneos de determinado calibre, placenta, hígado, huesos, bazo, leucocitos y en la leche humana.

Existen tres variedades isoenzimáticas de la fosfatasa alcalina:

- a) Placentar.
- b) Intestinal.
- c) De hígado, hueso, riñón y bazo.

El criterio seguido para esta clasificación se basa en su estabilidad al calor, el uso de inhibidores específicos, reacciones inmunológicas y criterios electroforéticos.

En los últimos diez años se ha venido investigando la presencia de esta enzima en neoplasias derivadas de diferentes tejidos, y se ha informado que varias neoplasias malignas contienen fosfatasa alcalina, hasta la fecha no se tienen informes precisos del comportamiento biológico de esta enzima presente en diferentes tejidos.

La isoenzima placentaria es de gran interés porque en condiciones normales se encuentra en la placenta humana y aparece en el suero de mujeres que están en el último trimestre de embarazo, pero es relevante el hecho de que en algunos tipos de cáncer las células son capaces de sintetizar la fosfatasa alcalina que en condiciones normales aparece en la placenta a término.

La presencia de esta enzima en neoplasias malignas señala un posible mecanismo de desrepresión de un genoma embrionario y el diagnóstico de esta isoenzima permitiría detectar en algunos casos la existencia de cánceres ocultos.

II.- Implicaciones de las isoenzimas de la fosfatasa alcalina en la investigación clínica y terapia futura(justificación del trabajo).

En este capítulo se exponen las opiniones directas de varios autores acerca de la utilidad de la fosfatasa alcalina en la evaluación del cáncer y las perspectivas de la enzima para investigaciones posteriores.

El descubrimiento de la fosfatasa alcalina en el suero de pacientes con cáncer y en células cancerígenas ha sido de gran relevancia -- para la biología del cáncer y la oncología clínica(13).

Desde el punto de vista clínico, la fosfatasa alcalina tumoral -- puede explicar ciertas hiperfosfatemias en el problema de diagnóstico.

La perspectiva biológica de la enzima es estudiada como un ejemplo de activación de genes embrionarios en el cáncer.

En el campo clínico son de gran interés los tumores como orígenes independientes de fosfatasa alcalina placentaria y no placentaria.

Se puede pensar que al encontrar la fosfatasa alcalina en un tejido podrían observarse células destinadas a ser neoplásicas genéticamente.

Es muy usado clínicamente el medir los niveles de la fosfatasa alcalina como un monitor para detectar la progresión o regresión de tumores y efusiones malignas, la presencia de la isoenzima en el suero --- cuando es provocado por células tumorales tiene implicaciones para la diagnóstico del cáncer y la medida de respuesta a la terapia usada, los cambios en los niveles de fosfatasa alcalina en el suero sirven para e valuar varias formas de terapia (32).

La actividad de la fosfatasa alcalina en el suero es determinada - clínicamente con el propósito de diagnosticar algunas enfermedades de hígado, de hueso, que a menudo está asociado con padecimientos de tipo

canceroso(17).

Las isoenzimas de la fosfatasa alcalina han sido estudiadas con marcadores específicos de tejidos usados como monitores de la enfermedad y los cambios durante el desarrollo de la misma (7).

La fosfatasa alcalina presente en la placenta a término, se considera un marcador de la transformación maligna, porque aparece frecuentemente en tumores humanos no trofoblásticos y se considera característica de las neoplasias, la presencia de esta isoenzima puede ser un marcador potencial de las neoplasias(28).

La cantidad de fosfatasa alcalina en la sangre se correlaciona positivamente con la probabilidad de la presencia de algún tejido neoplásico. La fosfatasa alcalina se ha detectado en pacientes que se consideraban "curados" , de cáncer por lo que se utiliza para ver la efectividad real de las terapias usadas. La sensibilidad de la fosfatasa alcalina al calor y a inhibidores específicos es usada como un marcador para el diagnóstico del cáncer (9).

Las hormonas placentales elaboradas por los tejidos neoplásicos, son particularmente utilizadas para llevar el control del tratamiento a partir de las hormonas que normalmente serían indetectables en pacientes sin tumores; en un número de tumores sólidos, se ha observado la producción de gonadotropina coriónica y otras hormonas placentales que clínicamente el potencial de utilidad de la producción de hormona ectópica es una gran ventaja para el diagnóstico temprano en la detección de tumores y las medidas de la hormona permitirían la evaluación de la terapia.

El descubrimiento de la elevación de los niveles de fosfatasa alcalina en el suero asociado con la aparición de tumores, ha sido el único marcador químico relacionado con el nivel de la enfermedad. Por

lo tanto, el potencial de utilización de la producción de la hormona - ectópica en esta enfermedad, sería muy importante (4).

La estabilidad al calor de la fosfatasa alcalina es muy usada como un marcador bioquímico de malignidad en el cáncer humano (31)

Las isoenzimas de la fosfatasa alcalina han sido muy utilizadas - en la detección y evaluación de cáncer de pecho con muy buenos resultados (11).

III.- Introducción general:

Las enzimas son las moléculas de origen protéico más abundantes y -- especializadas producidas por los organismos vivos y en los sistemas biológicos, constituyen la base de las reacciones que caracterizan los fenómenos vitales y permiten aprovechar los alimentos con fines energéticos o estructurales, como las funciones del metabolismo, la división celular, - la expresión de la acción genética, la reproducción, fermentación, etc. - (18, 20).

Las reacciones químicas en los tejidos vivos se realizan mediante una energía de activación (energía de activación es la cantidad de calorías necesarias para llevar todas las moléculas de un mol de una sustancia, a un estado activado, desde una temperatura dada), muy elevada así que las enzimas actúan como catalizadores acelerando las reacciones químicas que a una temperatura normal no podrían mantener el proceso vital por realizarse muy lentamente. Las enzimas son un sustituto de la agitación térmica, y actúan disminuyendo la energía de activación al combinarse con las moléculas que van a reaccionar (20, 33). La naturaleza protéica de las enzimas es esencial para su capacidad de acelerar reacciones, ya que son moléculas grandes con varias configuraciones morfológicas en su superficie y dependiendo de esta configuración, las moléculas del sustrato tienen que ser específicas en su forma para acoplarse con la enzima mediante un sistema ---- "llave-cerradura"; actúan como moldes que atrapan moléculas y al capturar-- las ponen en contacto a las moléculas que van a reaccionar de una forma más eficaz de lo que lo hacen las colisiones térmicas, por lo cual activan las reacciones (33).

Se dice que los catalizadores aceleran las reacciones porque disminuyen la energía libre de activación uniéndose con los sustratos y logran un

estado de transición de la reacción no catalizada (20).

Las moléculas que se acoplan a la enzima reciben el nombre de sustra--to, una vez que se unen se forma el complejo enzima-sustrato, al final de - la reacción las moléculas enzimáticas no sufren ningún cambio y quedan li--bres para combinarse con otro sustrato, no son afectadas por la reacción -- que aceleran. Son catalizadores bidireccionales porque pueden actuar en - ambos sentidos dentro de las reacciones que intervienen.

La conformación superficial de una enzima, tiene cierta flexibilidad y la superficie de un sustrato, puede inducir a que la enzima se modele so--bre la forma del sustrato, esto se logra mediante la ayuda de un cofactor, como son algunos iones metálicos o algunas moléculas orgánicas complejas -- con las coenzimas; dicho de otra manera ciertas moléculas dependen de su es tructura para su actividad y otras necesitan de cofactores o coenzimas (33, 20).

El complejo enzima-cofactor, recibe el nombre de holoenzima y cuando - el cofactor se separa de la proteína restante que es activa, se llama apoen zima.

Las coenzimas actúan como transportadores intermediarios de electrones o grupos funcionales. Cuando las coenzimas están muy unidas a la enzima, reciben el nombre de grupos prostéticos (20).

La conformación superficial de las enzimas hace que solo determinadas moléculas se acoplen a ellas en sus sitios activos lo cual da una especificidad enzimática conjuntamente con el pH, temperatura y ciertas concentra--ciones de sales a las que actúan.

Los sistemas enzimáticos se caracterizan por componerse de la siguien--te manera(18):

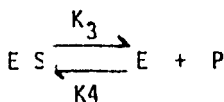
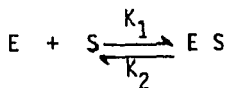
- 1.- Enzima de naturaleza proteica o apoenzima.

2.- Sustrato.

3.- Grupo prostético.

4.- Sustancia activadora.

Las reacciones catalizadas enzimáticamente presentan el fenómeno de saturación, o sea, que la concentración de sustrato influye en la velocidad de reacción; a bajas concentraciones de sustrato, la velocidad de reacción es proporcional a la concentración de éste, pero al aumentar la concentración de sustrato la velocidad de reacción disminuye y deja de ser proporcional a la concentración del sustrato. Esto puede explicarse porque la enzima está saturada con relación al sustrato, cada enzima posee una concentración de sustrato característica para su debida actividad, conocida como la constante de Michaelis-Menten (K_m), y la relación entre la velocidad máxima de una enzima y la concentración de sustrato la da la ecuación de Michaelis-Menten:



E= Enzima.

S= Sustrato.

ES= Complejo enzima-sustrato.

P= Producto.

K_1 a K_4 = Son constantes de velocidad específicas.

IV.- Clasificación general de las enzimas;

El sistema de clasificación de las enzimas se basa en la reacción química catalizada, que es la propiedad específica característica de cada enzima y se designa usando el nombre del sustrato o sustratos que participan en la reacción seguido por el sufijo asa.

Las enzimas se han dividido en seis grupos de acuerdo con el tipo de reacción en la que participen (18,20).

1.- Oxidorreductasas: Son enzimas relacionadas con las oxidaciones y reducciones biológicas que intervienen principalmente en la respiración y fermentación. Actúan sobre los grupos: $-\overset{\cdot}{\text{C}}\text{-OH}$, $-\overset{\cdot}{\text{C}}=\text{O}$, $-\text{CH}=\text{CH}-$, $-\overset{\cdot}{\text{C}}\text{-NH}_2$, $-\overset{\cdot}{\text{C}}\text{-NH}-$, NADP, NADPH.

2.- Transferasas: Catalizan el traspaso de grupos químicos funcionales entre dos sustratos a excepción del hidrógeno como son los grupos de un átomo de carbono, aldehídicos, cetónicos, acilos, glucosilos, fosfatos y los que contienen azufre.

3.- Hidrolasas: Introducen los elementos del agua H y OH en el sustrato produciendo una hidrólisis y actúan sobre ésteres, enlaces glucosídicos, enlaces peptídicos, enlaces C-N, anhídridos de ácido.

4.- Liasas: Catalizan la partición reversible de grupos químicos que son desprendidos de un sustrato por mecanismos diferentes a la hidrólisis. Presentan adición a los dobles enlaces: $-\overset{\cdot}{\text{C}}=\overset{\cdot}{\text{C}}-$, $-\overset{\cdot}{\text{C}}=\text{O}$, $-\overset{\cdot}{\text{C}}=\text{N}-$.

5.- Isomerasas: Catalizan isomerizaciones ópticas y geométricas como las isomerasas.

6.- Ligasas: Son las enzimas que permiten la unión de dos moléculas usando la energía que resulta de la degradación del ATP, o sea provocan la formación de enlaces con la ruptura del ATP como son los enlaces: C-O, C-S, C-N y C-C.

V.- Isoenzimas de la fosfatasa alcalina en general:

Las fosfatasas son un grupo de enzimas que se han clasificado de la siguiente manera:

Fosfatasas no específicas.

Fosfatasa alcalina.

Fosfatasa ácida.

Fosfatasa específica.

5-Nucleotidasa.

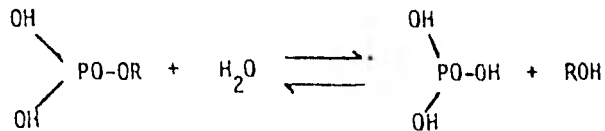
Adenosintrifosfatasa.

Glucosa-6-fosfatasa.

Las isoenzimas de la fosfatasa alcalina pertenecen al grupo de las hidrolasas, ya que actúan catalizando la reacción hidrolítica de los ésteres fosfóricos y se dividen en cuatro grupos:

- a) Fosfomonoesterasas.
- b) Fosfodiesterasas.
- c) Pirofosfatasas.
- d) Fosfoamidasas.

Las isoenzimas de la fosfatasa alcalina que ocupan la atención durante el curso de este trabajo, pertenecen al grupo de las fosfomonoesterasas, que catalizan la reacción de los monoésteres en ácido fosfórico y alcohol o fenol (6, 20, 21).



El concepto de isoenzima se refiere a que cierto número de enzimas existen en múltiples formas moleculares dentro de la misma célula,

se dice que las isoenzimas son secuencias de aminoácidos que pueden mostrar diferentes formas entre ellas, pero presentan la misma actividad catalítica (11, 20).

Existen dos tipos de reacciones que pueden ser catalizadas por la fosfatasa alcalina, en una actúa como hidrolasas rompiendo la unión P-O en la otra actúa como una fosfotransferasas, donde el grupo fosforil es transferido a una molécula aceptora sin la aparición de un fosfato inorgánico. Su mecanismo de acción ha sido muy revisado y la reacción se realiza en dos fases:

1) Después de la formación del complejo ES, la hidrólisis del sustrato genera el producto "plus" enzima-fosforil.

2) Enzima-fosforil da origen a la enzima "plus" fosfato inorgánico (11, 20).

Los grupos esenciales que son el centro activo de la enzima en un modelo enzima-sustrato, se mostraría de la siguiente manera: El grupo NH_2 de la lisina, el grupo SH de la cisteína y un grupo metal son esenciales para la actividad de la enzima, el grupo NH_2 está involucrado solo en la ligadura con el sustrato y el grupo SH y el metal, están involucrados con la reacción catalítica.

El Zinc es un componente de la fosfatasa alcalina esencial en la acción enzimática, actúa dando a la enzima una conformación propia y puede figurar como cofactor en la reasociación de subunidades o para participar en el enlace con el sustrato. Existen cuatro átomos de zinc por molécula de la enzima; dos son usados para la actividad catalítica y dos tienen un papel estructural.

La constante de Michaelis para la fosfatasa alcalina humana de varios orígenes con diferentes sustratos tienen distintos valores de Km.

Las isoenzimas de la fosfatasa alcalina se clasifican en tres grupos en base a reacciones inmunológicas por el uso de antisueros específicos (ya que existen tres tipos de antisuero para la fosfatasa alcalina humana), por inhibidores específicos como los L-aminoácidos, por estabilidad al calor y por criterios electroforéticos.

a) Isoenzima placentaria.

b) Isoenzima intestinal.

c) Isoenzima de hígado, hueso, pulmón, riñón y bazo.

Es una glucoproteína presente en la parte más externa de la doble membrana en la porción correspondiente al glicocalix que es una cubierta celular, compuesta de mucopolisacáridos, aunque también existen pequeñas cantidades en el núcleo, retículo endoplásmico, aparato de Golgi y fracciones ribosomales (11, 16). Se encuentra en varios tejidos y tiene múltiples formas moleculares, su papel desde el punto de vista biológico no ha sido definido. El pH óptimo se ve afectado por el tipo y concentración del sustrato, los buffers usados y la presencia de inhibidores o activadores; pero se ha estimado en un rango de 8.2 a 10.7 y tiene un peso molecular entre los 20,000 y 240,000 daltons (3, 11, 17). Exhibe una distribución específica en los tejidos, es producida por los osteoblastos, hepatocitos, células del riñón, células de la mucosa intestinal y células de la placenta (3, 17). También se ha purificado a partir de la leche humana y se detecta en el tejido mamario en la luz de los túbulos en la zona epitelial (15).

Su especificidad no es alta ya que utiliza varios ésteres fosfóricos como sustrato. Durante el desarrollo aparecen nuevas formas de fosfatasa alcalina paralelamente a la actividad hormonal, se da a diferentes tiempos dependiendo del tipo de tejido, hasta ahora se ha visto

que la actividad de esta enzima es controlada por un mecanismo a nivel de la hipófisis ya que la extracción de esta glándula en ratones induce el incremento de la fosfatasa alcalina y se ha encontrado que los glucocorticoides y las hormonas adrenocorticotrópicas disminuyen la actividad de la fosfatasa alcalina (11).

Se creó que las isoenzimas de hígado, intestino y placenta pudieran estar relacionadas con la médula ósea y tienen una contribución importante al suero, también se ha observado que la enzima aumenta cuando se eleva el nivel de osteoblastos por ejemplo, en la niñez o en enfermedades óseas como el raquitismo, osteomalasia y enfermedades hepatobiliares, se eleva la actividad de la fosfatasa alcalina total ya que hay un surgimiento de ésta en forma específica del tejido. Hasta ahora se ha pensado que el hígado genera la mayor cantidad de enzima al suero, así la fosfatasa alcalina en el suero humano se deriva principalmente del sistema hepatobiliar, hueso, intestino y placenta (11, 13, 22).

La actividad de la fosfatasa alcalina en el suero normal representa un estado dinámico en el flujo sanguíneo que resulta del suministro de la enzima desde el tejido de origen, su activación y excreción con un control homeostático. Se cree que el ATP es usado como sustrato (11).

Se ha detectado la presencia de fosfatasa alcalina en leucocitos polimorfonucleares pero su función específica intracelular no ha sido detectada (22).

El papel de la fosfatasa alcalina en la absorción de grasas, funciones placentarias, su relación con factores genéticos y su papel en la membrana ya han sido postulados; los procesos fisiológicos de la fosfatasa alcalina no son conocidos sin embargo su localización en la membrana la involucra en las funciones biológicas de ésta, hay bases mole-

culares por las cuales las enzimas de la membrana como la fosfatasa alcalina, pueden actuar en la fisiología básica membranar. Por ejemplo la acción de las hidrolasas sobre los ésteres fosfóricos de la membrana pueden "abrir" a dicha membrana para proveer sitios por la elongación - de cadenas de polímeros catalizado por la sintetasa específica y dar -- por resultado la biosíntesis de membrana. Este proceso en el cual se "abre" una membrana podría ser seguido por la entrada y salida de moléculas grandes (endocitosis y exocitosis). Este postulado provee una hipótesis para definir la función biológica de la fosfatasa alcalina a nivel molecular.

Hasta ahora se ha comprendido que hay factores genéticos que controlan la actividad de la fosfatasa alcalina en varios tejidos. La -- desrepresión de un genoma puede producir en una célula normal proteínas especializadas para células tumorales, dado que todas las células - somáticas llevan los mismos complementos genéticos en varios estados de represión (29).

Algunos autores reportan una correlación entre las variaciones cromosómicas y los niveles de fosfatasa alcalina activa por ejemplo en los mongólicos (trisomía 21), los niveles activos de fosfatasa alcalina se incrementan y hay evidencias de que el cromosoma 21 lleva el locus para la actividad de la fosfatasa alcalina (11).

En los diferentes órganos actúan distintos inhibidores que son no - competitivos y específicos, existe inhibición por 1-fenilalanina, 1-leucina, 1-homoarginina, 1-triptofano, levamisole e imidasole. Se sugiere que el mecanismo de inhibición es por la formación de un complejo enzima- inhibidor-sustrato, y dependiendo de la concentración del sustrato y del inhibidor, que una posible saturación se lleve a cabo donde el in

hibidor está en una posición entre el metal de la molécula de la enzima del grupo fosfato del sustrato.

La especificidad del órgano para la inhibición se sugiere que sea debido a la presencia de un sitio hidrofóbico localizado cerca del sitio activo de la enzima el cual se une al sitio hidrofóbico del inhibidor. Los sitios hidrofóbicos de diferentes enzimas de la fosfatasa al calina son diferentes uno de otro, lo cual proporciona la especificidad de la enzima con el inhibidor (2, 8, 11, 13, 15, 31, 32).

VI.- Isoenzimas de la fosfatasa alcalina de tipo placentario:

La fosfatasa alcalina de tipo placentario tiene gran importancia ya que se ha detectado en tejidos tumorales y en el suero de pacientes con cáncer.

En condiciones normales se encuentra en el suero de mujeres preñadas y aumenta sus niveles durante el tercer trimestre de embarazo, su actividad específica aún no ha sido determinada pero se está tratando de hacerlo siguiendo métodos histoquímicos cada vez más especializados (11, 25).

En la placenta humana la actividad de la fosfatasa alcalina, se encuentra en la membrana plasmática, en las microvellosidades, en la vesícula del sincitiotrofoblasto y a lo largo de la vesícula basal de éste. Esta isoenzima tiene un peso molecular de 13,000 daltons compuesta por dos subunidades de 6,500 daltons y es considerada una glicoproteína con un punto isoeléctrico de 4.5. También se ha reportado como un dímero de 116,000 daltons con dos monómeros de 58,000 daltons, la explicación de estas variaciones se encuentra en la inseguridad de los cálculos de volumen específico y el tamaño molecular (11, 17).

Harkness (11), purificó esta enzima y obtuvo hidrólisis con 26 sustratos encontrando 11 Km. diferentes, también encontró que aumenta la concentración del zinc en la enzima al aumentar su actividad; contiene un 50 % de aminoácidos no polares usa el fenilfosfato como sustrato, -- tiene una alta estabilidad al calor, requiere un pH alto y una elevada concentración de sustrato. También se ha detectado la actividad de la fosfatasa alcalina placentaria en porcinos, ovinos, ratas y otras especies y se ha llegado a la conclusión de que es distinta bioquímica y genéticamente de la fosfatasa alcalina presente en otros tejidos como el

hígado, hueso, riñón e intestino (2, 11, 17).

Se cree que la fosfatasa alcalina placentaria tiene un papel en la transferencia de carbohidratos y lípidos a través de la barrera placentaria y surge la hipótesis de que remueve el fosfato de las nucleoproteínas responsables de las declinaciones en la ribonucleoproteína del sincitium (25).

A medida que avanza el embarazo se incrementa la actividad de la fosfatasa alcalina placentaria, en el tercer trimestre se encuentra en la circulación en el suero materno y es muy estable al calor. Se han hecho comparaciones de la fosfatasa alcalina detectada en el primer trimestre con la del tercero y se encontró lo siguiente (28):

Existen tres formas placentarias durante el primer trimestre, la I, de 16,500 daltons, la IIa de 115,000 daltons y la IIb de 240,000 daltons y sus cantidades relativas son de 35 %, 39 % y 26 % respectivamente, la I y IIa son dímeros y la IIb es un tetrámero compuesta de dos dímeros de I o IIa, la fosfatasa alcalina I es indistinguible de la presente en el hígado de acuerdo al peso molecular, inhibidores y la labilidad al calor. La IIa es indistinguible de la fosfatasa alcalina presente en la placenta a término de acuerdo con patrones electroforéticos, inhibición por 1-aminoácidos y su gran estabilidad al calor; esto demuestra la existencia de dos fosfatasas alcalinas distintas donde la I, es específica para la placenta del primer trimestre y la IIa ocurre en la placenta del primer trimestre y la placenta a término (11, 28).

Se ha hecho análisis en cuanto a la composición química de la fosfatasa alcalina placentaria y se ha reportado lo siguiente (17):

TABLA X

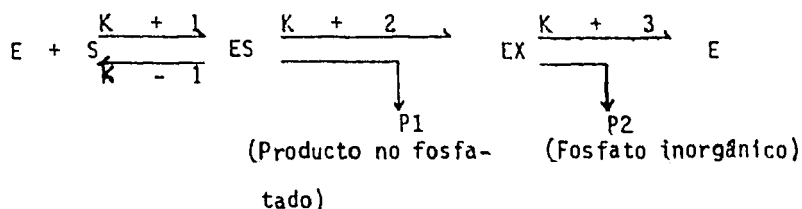
Composición química de la fosfatasa alcalina.

AMINOACIDOS Y AMINOAZUCARES	20 HORAS DE HIDROLISIS	48 HORAS DE HIDROLISIS
Trp	29	26
Lys	47	50
His	26	29
Arg	71	73
Asp	113	111
Thr	79	79
Ser	68	64
Glu	118	117
Tro	74	72
Gly	104	103
Ala	121	121
Cys	6	6
Val	50	59
Met	27	26
Ileu	26	33
Leu	87	88
Tyr	40	39
Phe	38	38
Glucosamina	33	27
Galactosamina	5	5

Cuantificación de monosacáridos:

RESIDUO DE CARBOHIDRATOS	MOL/MG	MOL/100,000 MG
Glucosa	0.009	1.2
Galactosa	0.292	38.0
Mannosa	0.102	13.3
Sucrosa	0.022	2.9
Acido siálico	0.217	28.2

La l-fenilalanina es un inhibidor efectivo de la isoenzima placentaria, aunque también se ve inhibida con menosseveridad por l-triptofano, y l-leucina; se dice que la estabilidad al calor de la isoenzima en la placenta a término es inhibida por l-fenilalanina pero no por l-homarginina, la l-leucina inhibe la isoenzima de la placenta a término solo durante el tercer trimestre (11, 31). La l-fenilalanina inactiva de forma no competitiva a la fosfatasa alcalina placentaria, se sugiere que es un complejo inactivo ESI formado por la combinación estereoespecífica de la l-fenilalanina con el complejo ES y en este caso -- el l-aminoácido tiene un efecto pequeño sobre la reactividad de ES, -- previene el trastorno del enlace fosforil-enzima intermediario EX formado más tarde en la secuencia hidrolítica (10).



Esta isoenzima como la de otros tejidos es genéticamente polimórfica con seis fenotipos electroforéticamente determinados con tres alelos comunes en el locus fosfatasa alcalina placentaria con un número considerable de variantes alélicas (2).

La genética de la fosfatasa alcalina placentaria indica que hay variaciones estudiadas sistemáticamente en la fosfatasa alcalina placentaria de varios grupos étnicos de los que se determinaron seis fenotipos estandar. Se sabe que esta isoenzima es controlada por el genotipo del bebé y está correlacionada con el grupo sanguíneo del mismo, pero no se encontró ninguna evidencia concluyente entre la enzima y los

grupos ABO y Rh, en relación con el polimorfismo de la enzima -- placentaria; el fenotipo placentar depende del genotipo del feto (11).

Por el conocimiento del origen placentar de la fosfatasa alcalina en el suero de mujeres preñadas y la disponibilidad de métodos para - su medida se puede resolver el problema de interpretación cuando se - presenta una elevación en el nivel de la enzima en pacientes con pro- blemas médicos que complicaran su embarazo. La cantidad de fosfata- sa alcalina placentaria durante el embarazo normal presenta un creci- miento exponencial y se ha observado que en dos de tres embarazadas - durante el parto declina el nivel de la enzima y desaparece entre los tres y cuatro días posparto. No existe ninguna correlación con el - sexo o peso del bebé, tipo sanguíneo de la madre o del bebé, edad de la madre y número de parto con la cantidad de isoenzima en la placen- ta. El intervalo en el cual la enzima puede ser visible en la circu- lación materna en embarazos normales es de cinco a seis semanas, sien- do más corto en madres de tipo sanguíneo O, que en madres de tipo A, en madres diabéticas es de 8 a 10 semanas.

Durante el curso de la gestación se incrementa progresivamente la - estabilidad al calor tanto en la placenta como en el suero materno, -- dos de tres casos de mujeres embarazadas declinan el nivel de la enzi- ma y es más agudo en mujeres nulíparas, se dice que el nivel de la iso- enzima en el suero está relacionado con la madurez de las microvellosi- dades placentarias (11, 31).

VII.- La fosfatasa alcalina placentaria y el cáncer:

Existen formas placentarias de la fosfatasa alcalina en el tejido de tumores, efusiones de éstos y en el suero de algunos pacientes con cáncer; hasta ahora se ha atribuido a la expresión de genes embrionarios, lo cual da idea de expresión de genes anormales en el cáncer, la gran cantidad de genes activados en células cancerosas son típicamente genes normales. Desde este punto de vista, el cáncer puede considerarse como una enfermedad en la que se desordena el control de la expresión de los genes. El estado de benignidad o malignidad tiene relación con el equilibrio en la activación del gene embrionario vs el gene no embrionario (2, 3, 11).

La isoenzima placentaria presente en los tumores se cree que es determinada por una variante rara de alelos en el locus fosfatasa alcalina placentaria o alternativamente las moléculas de la fosfatasa alcalina pueden estar sujetas a modificaciones estructurales. Para el locus fosfatasa alcalina placentaria se han descrito dos alelos raros, lo que implica que el locus pueda sufrir una desrepresión frecuente en células tumorales, la desrepresión de la fosfatasa alcalina en los tumores puede estar sujeta a una translocación que modificará el medio ambiente celular de la enzima (2).

El mecanismo por el cual una desrepresión del genoma embrionario controle la producción de la enzima placentaria en células tumorales no ha sido elucidado aún, por lo tanto hay posibilidades de que la producción de fosfatasa alcalina placentaria por células tumorales esté relacionado con la acción de un virus dentro de una célula cancerosa y es posible que la desrepresión del genoma se de en otras enfermedades distintas del cáncer (32).

La desrepresión de un genoma puede hacer que la célula produzca -- proteínas especializadas para células tumorales, si este fuera el me-- canismo las proteínas del tumor tendrían la posibilidad de mostrar pro-- teínas similares a las que normalmente son producidas en forma fisioló-- gica por el tejido (29).

El cambio que ocurre durante la gestación entre los estadios tem-- prano y tardío a la isoenzima de la fosfatasa alcalina placentaria en cuanto a su estabilidad al calor, envuelve un proceso cierre-apertura en determinados genes que implica modificaciones enzimáticas y da una similitud con la aparición de fosfatasa alcalina estable al calor en - ciertos cánceres malignos (31).

Se ha reportado que en siete de diez y ocho tumores de diferentes orígenes tienen fosfatasa alcalina muy similar a la fosfatasa alcali-- na de tipo placentario, hay varias pruebas que demuestran una eleva-- ción del 25 % en los niveles de la fosfatasa alcalina en el suero pro-- cedente de pacientes con cáncer de diferentes orígenes, se presenta -- del 14 a 35 % en pacientes con cánceres urogenitales y existen repor-- tes donde se han detectado niveles muy bajos de fosfatasa alcalina en el suero de pacientes sanos. La presencia de fosfatasa alcalina pla-- centaria ocurre más frecuentemente en tumores malignos que en benignos (2, 11, 31).

En un estudio en el que fue examinado histoquímicamente el tejido de tumores gástricos, 8 de 23 presentaban fosfatasa alcalina placentaria y aunque la síntesis ectópica de dicha isoenzima con tumores malignos se detectaron dos tumores benignos de lo que se concluye la presen-- cia de la variedad placentaria de la fosfatasa alcalina en tumores apa-- rentemente benignos, puede dar instancia de cambio o sea estado preneo

plásico (2).

La alteración de la membrana celular en los tumores puede estar a sociada con caracteres malignos como crecimiento, invasibilidad, inhibición por contacto, etc. Los intentos para dilucidar el papel de la superficie celular en transformaciones neoplásicas involucra la actividad de la fosfatasa alcalina como una enzima marcadora de la membrana plasmática y el comportamiento diferencial de la membrana y la isoenzima puede proveer un monitor para indicar el comportamiento biológico de las células tumorales .

Los niveles de la fosfatasa alcalina son más bajos en tumores no metastásicos que en metastásicos(19).

Existen tumores con la fosfatasa alcalina placentaria y no placentaria en circulación. De la presencia de tejidos neoplásicos resulta una posible relación de proteínas asociadas con tumores dentro de la sangre como el antígeno carcinoembrionario, alfa-fetoproteína, lactógeno placentar, gonadotropina coriónica y fosfatasa alcalina placentaria. Dado que la isoenzima placentaria está asociada con neoplasias porque se encuentra en alto porcentaje en la sangre de pacientes cancerosos se ha sugerido la siguiente teoría(9):

a) La fosfatasa alcalina placentaria es más común en pacientes -- con padecimientos de cáncer, diabetes, hepatitis y renales, que en otros pacientes .

b) Entre los pacientes cancerosos, la fosfatasa alcalina se presenta con más frecuencia en aquellos que presentan tumores que en aquellos que han sido liberados de tejidos neoplásicos mediante técnicas quirúrgicas.

c) La cantidad de fosfatasa alcalina en la sangre se correlaciona

con la probabilidad de la presencia de tejidos neoplásicos (9).

La actividad de la fosfatasa alcalina es incrementada en enfermedades del sistema retículoendotelial, en pacientes con tumores de hígado, y en pacientes con cánceros malignos a nivel ginecológico (22).

Se ha reportado una baja en el nivel de fosfatasa alcalina placentaria observada en leucocitos procedentes de pacientes con leucemia (11).

La fosfatasa alcalina es inducible en una variedad de diferentes líneas celulares procedentes de tumores humanos (16). Varias de las características que presenta la fosfatasa alcalina placentaria observada en coriocarcinoma humano han sido estudiadas a través de líneas celulares como las líneas Bewo y Jar, que contienen fosfatasa alcalina - muy similar a la que se presenta en la placenta a término, la actividad de la fosfatasa alcalina presente en las células Bewo se puede estimular con metotrexato y actinomicina D. Cada una de estas dos líneas celulares tiene cuando menos dos tipos de fosfatasa alcalina; el primer tipo es estable al calor y presenta características muy similares a la fosfatasa alcalina de la placenta a término y el segundo tipo de fosfatasa alcalina es lábil al calor y bastante similar a la fosfatasa alcalina que se presenta en el hígado y en el intestino.

Se ha encontrado que la estabilidad al calor de las células Jar y Bewo es inhibida por l-fenilalanina y l-leucina (31).

El crecimiento de las células de coriocarcinoma en presencia de 5-bromo-2'-deoxiuridina hace que se incremente la actividad de la fosfatasa alcalina de 30 a 40 veces, esto se explica porque la presencia de dicho compuesto en el medio de crecimiento de las células hace que se incorpore el DNA celular y se desplaza a la timidina (5).

Las células HeLa, también presentan fosfatasa alcalina muy similar a la de tipo placentario en cuanto a su estabilidad al calor y sensibilidad a la l-fenilalanina y podrían ser un ejemplo de células cancerosas relacionadas con la placenta que puede ser usada en experimentos futuros para investigaciones de esa enzima (13, 14).

Las células LM procedentes del osteosarcoma humano poseen dos tipos diferentes de fosfatasa alcalina, una de ellas es muy similar a la fosfatasa alcalina de origen óseo en cuanto a su labilidad al calor, - patrón electroforético y su inhibición, el otro tipo es termoestable y bastante similar a la fosfatasa alcalina placentaria humana.

La isoenzima de Regan fué encontrada por primera vez en un paciente con cáncer broncogénico (Mr. Regan) y es una fosfatasa alcalina muy semejante a la placentaria en cuanto a su estabilidad al calor, a que presenta una marcada sensibilidad a la l-fenilalanina y porque al combinarse con un anticuerpo de fosfatasa alcalina placentaria forma un complejo antígeno-anticuerpo que no emigra electroforéticamente (31).

Esta isoenzima de Regan se ha detectado en el suero de pacientes cancerosos encontrándose una gran variedad de órganos que actúan como sitios primarios, se presenta una síntesis ectópica de la proteína enzimática en los tumores (13, 32).

Cuando se presenta la isoenzima de Regan, se detecta un incremento de la fosfatasa alcalina presente en el suero de los pacientes cancerosos, pero permanecen constantes los niveles de SGOT (Transaminasa glutámica oxaloacética), SGPT (Transaminasa glutámica pirúvica) y la bilirrubina, este tipo enzimático se ve inhibido a más de 56 °C y la fosfatasa alcalina placentaria es estable a esa temperatura (11, 13, 14, 32).

La significancia fundamental de la existencia de fenotipos placentales normales en la isoenzima de Regan procedente de tumores y suero extraído de pacientes cancerosos da indicios de que el tumor y la fosfatasa alcalina placentaria y tumoral presentan los mismos compuestos genéticos (14).

Se han encontrado semejanzas en una comparación estructural de la fosfatasa alcalina placentaria y tumoral en cuanto a su grupo NH_2 terminal, mapa peptídico, peso molecular y punto isoeléctrico (13, 14, -- 32).

La elevación de la isoenzima de Regan en el suero de pacientes -- con cáncer ha sido interpretada como indicio de una metástasis. En isoenzima de Regan procedente de tumores cancerosos existen fenotipos placentales normales.

La isoenzima de Nagao se encontró en un paciente con cáncer pulmonar y la variante D es un fenotipo raro de la fosfatasa alcalina placentaria. La isoenzima de Nagao y la variante D son clasificadas como fenotipos distintos de la isoenzima placentaria normal aunque son semejantes en su inhibición por l-leucina (8, 11).

La isoenzima de Nagao y la variante D están muy cercanas en cuanto a sus patrones electroforéticos y la variante D también se inhibe con ácido etilendiaminotetracético (8, 29).

La isoenzima placentaria, la variante D y la isoenzima de Nagao son indistinguibles electroforéticamente (8).

VIII.- Métodos usados para la investigación de las isoenzimas de la --
fosfatasa alcalina:

La histoquímica ha sido un arma muy poderosa para lograr la localización ultraestructural de la fosfatasa alcalina para su estudio.

El fin principal de la histoquímica es poder observar las reacciones químicas en los cortes histológicos de forma tal que la alteración sufrida por el tejido durante las técnicas sea mínimo y se preserve al máximo la fisiología celular.

La histoquímica se divide en dos partes:

1.- Histoquímica no enzimática: Es la que identifica la función de carbohidratos, lípidos, ácidos nucleicos, pigmentos, proteínas y metales.

2.- Histoquímica enzimática: Es aquella que identifica las enzimas que intervienen en la formación de carbohidratos, lípidos, ácidos nucleicos y proteínas.

La fosfatasa alcalina actúa a un pH mayor de 8 en la mayoría de los tejidos.

Las condiciones para hacer histoquímica son las siguientes:

1.- Preservación morfológica, preservación de reacciones y preservación de sitios.

2.- Identificación de reacciones específicas.

3.- Localización precisa de las reacciones.

4.- Poder de resolución.

5.- Estabilidad del producto final (para poder apreciar resultados) ya sea por contraste, fluorescencia o electrodensidad.

En la histoquímica enzimática no se pueden dejar fijadores porque alteran las proteínas, matan a las células en un estado y cada uno --

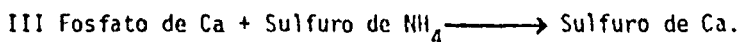
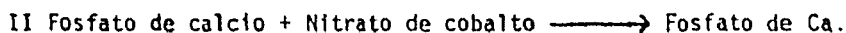
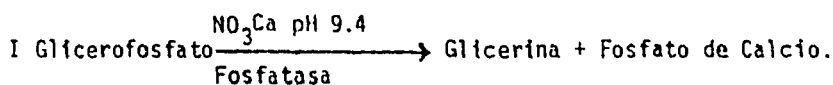
tiene diferentes propiedades.

Los aldehídos no permiten el ataque de bacterias o alguna alteración por lisis, lo que justifica su uso.

En la histoquímica hay que preservar la función celular y no se puede usar ningún preservador, entonces a lo que se recurre es a bajar al máximo el metabolismo celular para preservar la función y se usa ya sea el frío con crioprotectores o en su defecto el dimetilsulfóxido -- que sustituye a las moléculas de agua y es permeable, se usa diluido en un buffer neutro 1:10. El 2-dimetilbutano o isopentano también es usado con este fin ya que permite graduar la temperatura deseada en el tejido y no permite la formación de cristales (6, 11, 21, 24).

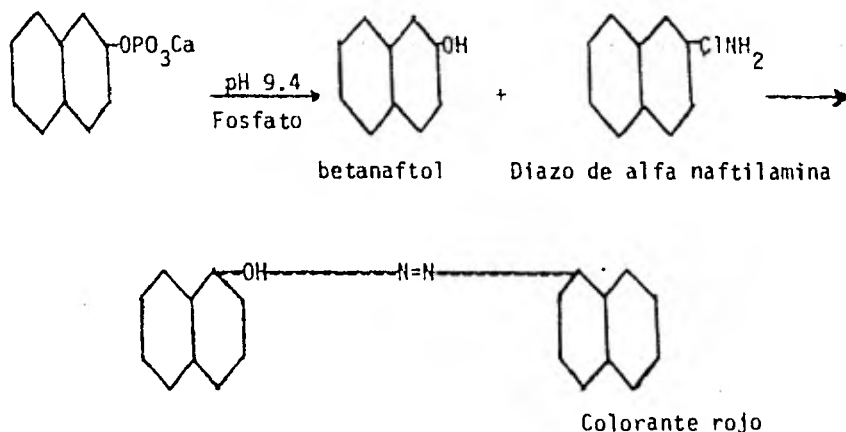
Los métodos fundamentales para la sustitución de fosfatasa alcalina en preparaciones biológicas son dos:

1.- El método del glicerofosfato de sodio, que captura iones de calcio. Este método fue seguido por Gomori en 1939, utiliza la captura del ion fosfato por el ion calcio al momento de ser liberado por la enzima, el fosfato liberado se precipita en forma de fosfato de calcio de la siguiente manera:



2.- El método de colorante azóico en el que el beta-naftilfosfato captura iones de diazo alfa-naftilamidaso (colorante azóico) fue hecha

por Menten, esta técnica que usa como sustrato el fenilfosfato o el beta naftilfosfato de calcio. El naftol o fenol liberado por la acción de la enzima es visualizado al agregar la sal de diazonio que actúa como colorante:



El éster fosfórico usado como sustrato es el naftol AS-MX, que -- fue introducido por Burstone en 1958 y su solubilidad es mínima (6, 21).

El método más usado actualmente es éste último y se expone más adelante mediante técnica A.

La electroforesis es un método muy empleado para identificar la fosfatasa alcalina porque permite distinguir las proteínas originales de la isoenzima en el suero.

El método electroforético consiste en que las partículas cargadas eléctricamente, como las proteínas son aceleradas al someterlas a un campo eléctrico, esta fuerza eléctrica es balanceada rápidamente por la fuerza de fricción del medio en el que se colocaron las partículas que generalmente es un gel donde éstas se mueven a una velocidad cons-

tante proporcional a su carga.

La carga eléctrica de las moléculas se origina de una disociación mediante una forma selectiva de adsorción.

Para polielectrolitos como las proteínas, la disociación en grupos COOH y NH_3 es el origen principal del proceso electroforético y depende altamente del pH que tenga el medio, por lo tanto es importante el buffer que se use.

La adsorción selectiva es importante y depende de la constitución química del medio, así las partículas cargadas eléctricamente se suspenden en un medio conductivo electroforéticamente que atrae iones de signo opuesto y repele a los de carga similar, por un lado se tienen las cargas que llevan las partículas que obligan a éstas a unirse en la superficie y por otro lado se tiene el contenido circundante a las partículas como una nube en su recorrido.

La corriente eléctrica es determinada por el voltaje aplicado para los fines de la huella o del rastro que dejan las partículas durante la electroforesis y se distribuye de acuerdo con la resistencia del medio, también influye otro factor durante la electroforesis que es el movimiento del líquido al paso de las partículas.

La progresión molecular depende de los poros del gel, las moléculas muy grandes retardan su progresión.

Las enzimas hidrolíticas tienen un comportamiento variado dependiendo del tipo de inhibidores usados.

Los dos tipos de electroforesis más usados para la fosfatasa alcalina son:

a) La electroforesis de zona o electroforesis continua que consiste en colocar la muestra sobre un gel o matriz sólida (según sean los

requerimientos para el tipo de muestra) se aplica un campo eléctrico a temperatura constante y en ausencia de vibraciones, así las proteínas migran sobre el gel de acuerdo con las características antes mencionadas hasta que las proteínas se separen en forma individual, después de someterlas al campo eléctrico el tiempo necesario, se obtiene una placa corrida en forma horizontal con bandas coloreadas de diferente intensidad y se procede a hacer la identificación de las proteínas presentes mediante una técnica óptica basada en el índice de refracción de la luz que poseen las bandas obtenidas y por medio del electrofotómetro que integra electrónicamente la lectura por el paso de un rayo luminoso, se detecta el índice de refracción de las proteínas y con base al contenido proteico marca picos de diferente longitud que comparados con un diagrama patrón, dan a conocer el tipo de proteínas presentes en la muestra dependiendo en las zonas que estén localizadas: alfa 1 alfa 2, beta, etc. (fig. 1)

La técnica de electroforesis continua para fosfatasa alcalina placentaria se expone en la técnica B posteriormente.

b) La electroforesis discontinua o de disco es una perfección de la técnica anterior donde las proteínas se hayan sujetas en un gradiente de pH dentro de un gel de poliacrilamida, a diferencia de la técnica anterior los geles corren en forma vertical y las proteínas en vez de separarse en forma de banda como en el caso anterior se separan en forma de discos o anillos, para esta técnica se necesita una cantidad muy pequeña de muestra, lo cual representa una pequeña ventaja para la obtención del material de estudio.

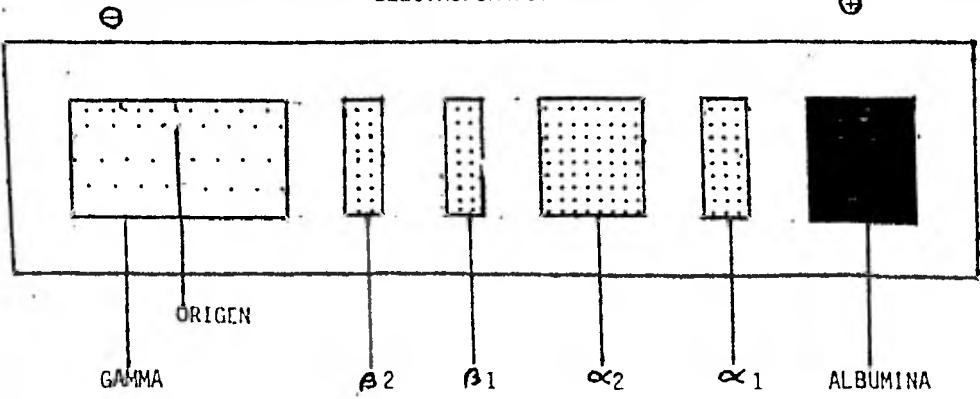
Una vez obtenidos los anillos se procede a detectar las proteínas presentes en la muestra en base a patrones establecidos que muestran -

la localización precisa de cada especie protéica.

La técnica para detectar la fosfatasa alcalina por medio de electroforesis discontinua se muestra más adelante mediante la técnica C.

También se usa la inmunoelectroforesis que consiste en tener un gel agar como medio de soporte con antígenos determinados y al colocar la muestra se detecta una precipitación con los anticuerpos presentes en la muestra al efectuarse la reacción antígeno-anticuerpo obteniéndose manchas redondas en el gel y depende de la medida radial de las -- manchas el que se pueda conocer el contenido de la muestra (1, 2, 3, 4, 6, 7, 11, 15, 19, 20, 21, 23, 24, 27).

ELECTROFORESIS



ELECTROFORETOGRAMA

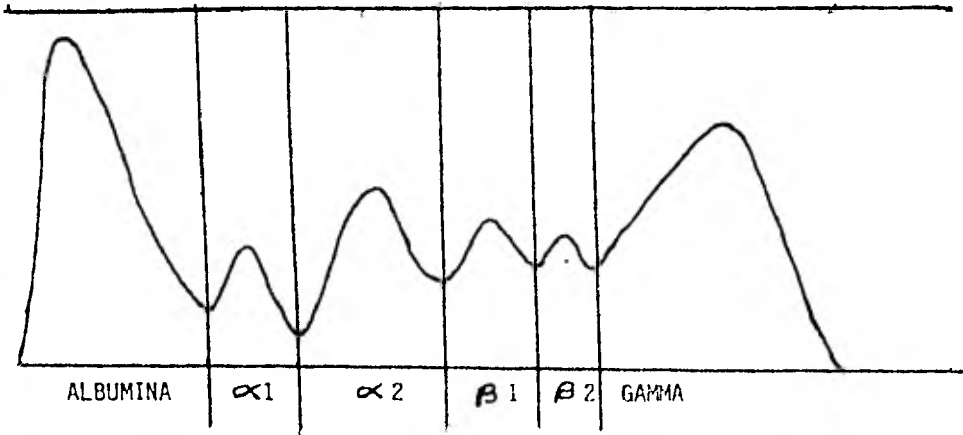


FIGURA 1

Técnica A;

Esta técnica es usada para la detección de la fosfatasa alcalina placentaria en preparaciones histológicas y se realiza de la siguiente manera:

1.- Se consigue un pedazo de aproximadamente 10 cm. de diámetro - del tejido en el cual se quiere detectar la enzima.

2.- Se hacen cortes de aproximadamente 1 cm^2 .

3.- Se congelan mediante el método nitrógeno-isopentano, que consiste en colocar acrílico líquido como medio de sostén para el tejido, o goma de tragacanto, etc.

En una platina para criostato colocar el bloque de tejido encima, previamente se gradua la temperatura del isopentano sumergiendo el recipiente que lo contiene en nitrógeno líquido hasta lograr una temperatura entre -125 y -130 °C, inmediatamente después de lograr esta temperatura, se sumerge la platina con el tejido colocado sobre el medio de sostén durante 10 segundos.

4.- Se hacen cortes en criostato de cuatro a seis micras.

5.- Se fijan en acetona al 100 % durante 10 minutos.

6.- Enjuagar los cortes con agua corriente.

7.- Secarlos al aire.

8.- Colocar sobre el corte el medio de incubación que se prepara de la siguiente manera:

Naftol AS-MX	1 mg.
N-N' Dimetilformamida	0.05 ml.
Buffer beronal acetato 0.1 M, pH 9.0:	5 ml.
Fast red TR, FR ó ITR	1 mg/ml.
Preparación del buffer beronal acetato 0.1 M, pH 9.0:	

Solución A:

Acetato de sodio	1.17 gr.
Barbiturato de sodio	2.94 gr.
Agua destilada	100 ml.

Solución B; HCl 0.1 N

Preparación final:

Solución A	20 ml.
Solución B	1 ml.
Agua destilada	71 ml.

El naftol se disuelve en dimetilformamida, posteriormente se agrega el buffer de la siguiente manera: Se toma un mililitro del buffer y se le agrega un miligramo de la sal de diazonio o Fast red.

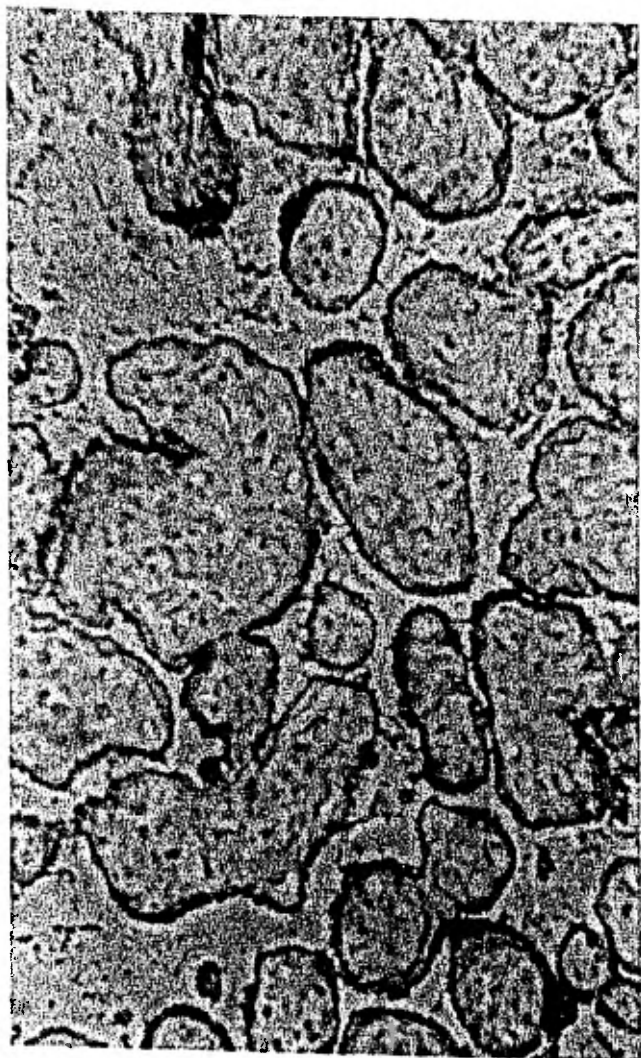
9.- Vigilar en el microscopio que se efectúe la reacción y enjuagar con agua corriente.

10.- Contrastar unos segundos con hematoxilina de Harris.

11.- Virar con agua caliente.

12.- Montar con glicerol-gelatina.

Resultado: Actividad enzimática en color rojo, principalmente en membrana celular.



Preparación histológica de placenta a término siguiendo la técnica A,
actividad enzimática en color rojo.

Técnica B:

Esta técnica consiste en hacer una electroforesis continua para detectar la fosfatasa alcalina placentaria en un gel de agarosa.

Se disuelven en baño maría 375 mg. de agarosa en 37.5 ml. de buffer stock para agarosa, se prepara usando el buffer B-2 de Beckman pH 8.6 con relación iónica de 0.075, disolviendo el contenido de un sobre para 1,000 ml. de agua destilada.

Una vez disuelta la agarosa y teniendo la mesa de electroforesis previamente nivelada, se colocan los marcos y se aseguran, cada marco contiene dos hileras donde se colocan tres portaobjetos perfectamente limpios en cada hilera.

Posteriormente se sirven 11 ml. de agarosa en cada hilera de tres portaobjetos, tratando de repartirla uniformemente de extremo a extremo del marco.

Se deja solidificar de 10 a 15 minutos y posteriormente se endurece a 5 °C durante una hora.

A continuación se aplica la muestra en la tercera parte de cada portaobjetos o sea tres muestras en cada hilera, la forma en la que se adicionan las muestras es colocando con un capilar la muestra a lo ancho de un extremo de una navaja común para afeitarse sujeta firmemente a un portaobjetos con tela adhesiva y se inserta la navaja contentiendo la muestra en forma uniforme sobre el gel.

Para obtener la muestra:

a) Se obtiene un pedazo de tejido en el cual se quiere detectar la enzima.

b) Se hacen cortes pequeños de tejido.

c) Se pesa un gramo del tejido y se agregan 2.5 ml. de agua destilada y 2.5 ml. de buffer stock para agarosa.

d) Se homogeniza y se decanta.

e) Se centrifuga a 2,000 R.P.M. durante 30 minutos.

f) Se toma el sobrenadante con el capilar para colocarlo en la -- placa de agarosa.

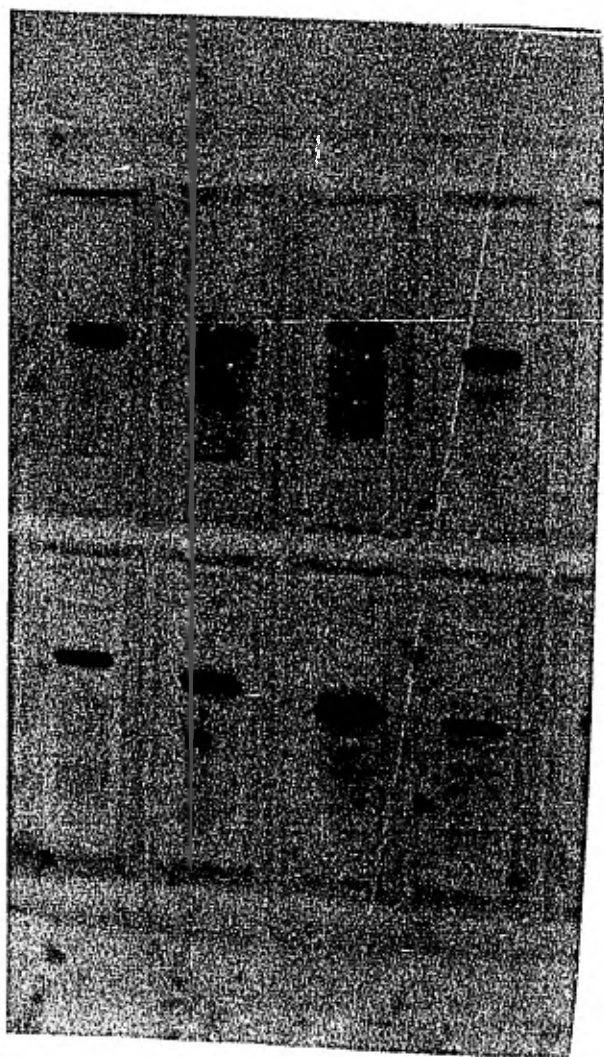
Posteriormente se corre la electroforesis durante 75 minutos a -- 350 volts. Una vez corrida la prueba, se pone el medio de incubación sobre las placas de agarosa principalmente en la zona donde se colocaron las muestras durante 30 minutos.

El medio de incubación se prepara de la siguiente manera:

Naftol AS-MX en solución	2 ml.
Buffer beronal acetato 0.1 M, pH 9.0	5 ml.
Cloruro de Magnesio	0.1 ml.
Fast red	7 mg.

Después de colocar el medio de incubación se fijan las placas de agarosa en formol al 100 % durante 15 minutos, posteriormente se enjuagan con agua corriente cuidando de que no se cuartee el gel, se cubren las placas con tiras de papel especial para electroforesis y se deja reposar durante 24 horas.

A continuación se colocan los portaobjetos con la emulsión hacia abajo en contacto con el electrofotómetro para que al paso del rayo luminoso se haga la integración, se obtengan los picos durante la lectura y se interpreten los resultados comparando las curvas obtenidas con los patrones correspondientes a los diferentes tipos de proteínas.



Ejemplo de electroforesis continua.

Técnica C;

Esta técnica es usada para la detección de fosfatasa alcalina -- placentaria mediante la electroforesis discontinua.

Solución A: pH 8.9

HCl 0.1 N	48 ml.
Tris	36.6 gr.
Temed	0.23 ml.

Se ajusta el pH con HCl y se afora con agua destilada a 100 ml.

Solución B: pH 6.7

HCl 0.1 N	48 ml.
Tris	5.98 gr.
Temed	0.46 ml.

Se ajusta el pH con HCl y se afora con agua destilada a 100 ml.

Solución C:

Acrilamida	28 gr.
Bisacrilamida	0.735 gr.
Agua destilada	100 ml.

Solución D:

Acrilamida	10 gr.
Bisacrilamida	2.5 gr.
Agua destilada	100 ml.

Solución E:

Riboflavina	4 mg.
Agua destilada	100 ml.

Solución F:

Sacarosa	40 gr.
Agua destilada	100 ml.

Solución G:

Persulfato de amonio 0.14 gr.

Agua destilada 100 ml.

Solución buffer pH 8.3:

Diluir 1:10

Tris 6 gr.

Lisina 28.8 gr.

Agua destilada 1,000 ml.

Ajustar el pH con HCl o NaOH.

Las soluciones A, B, C, D, E, y F se filtran con papel filtro del número 42.

Gel de trabajo de poro grande:

Solución B 0.6 ml.

Solución D 1.2 ml.

Solución E 0.6 ml.

Solución F 2.4 ml.

Gel de trabajo de poro pequeño:

Solución A 3.4 ml.

Agua destilada 3.2 ml.

Solución G 12.8 ml.

Solución decolorante:

Acido acético 5 ml.

Agua destilada 100 ml.

Solución de Silicón:

Silicón 1 ml.

Agua destilada 100 ml.

1.- Obtener 12 tubos de vidrio de 6 mm. de diámetro y 12 cm. de -

largo (se pueden conseguir a partir de una varilla hueca de vidrio -- cortando 12 tramos de 12 cm.).

2.- Sumergir los tubos en la solución de silicón durante 10 segundos.

3.- Sellar con papel parafilm un extremo de cada tubo y colocarlos en la gradilla de nivel con el extremo sellado hacia abajo.

4.- Agregar 1.9 ml. de la solución de poro pequeño en cada tubo y colocar una gota de agua destilada en cada uno de ellos, dejándolos reposar durante 30 minutos.

5.- Escurrir el agua por inmersión.

6.- Agregar 0.15 ml. de la solución de poro grande y colocar nuevamente una gota de agua destilada en cada tubo.

7.- Someter por 20 minutos los geles bajo una lámpara de fluorescencia (fotopolimerización).

8.- Eliminar el agua por inmersión y agregar 0.1 ml. de la muestra en cada tubo.

9.- Agregar 0.15 ml. de la solución de poro grande.

10.- Agregar una gota de agua destilada a cada tubo.

11.- Fotopolimerizar durante 20 minutos.

Nota: La muestra se obtiene de igual forma que para la prueba de electroforesis continua (técnica B).

Corrida de los geles:

1.- Se preparan 1,000 ml. de buffer tris-6- lisina pH 8.3, diluir 1:10.

2.- Se colocan los geles del 1 al 12 en los hoyos numerados en la cámara para electroforesis discontinua, con la muestra hacia arriba, se quita el papel parafilm y se coloca una gota del buffer en cada uno

de los extremos del tubo.

3.- Se reparten 500 ml. del buffer en la parte superior de la cámara y se agregan 1.5 ml. de azul de bromofenol como indicador.

4.- Se colocan 500 ml. del buffer en la parte inferior de la cámara.

5.- Se coloca la tapa con los electrodos y se regula el sistema.

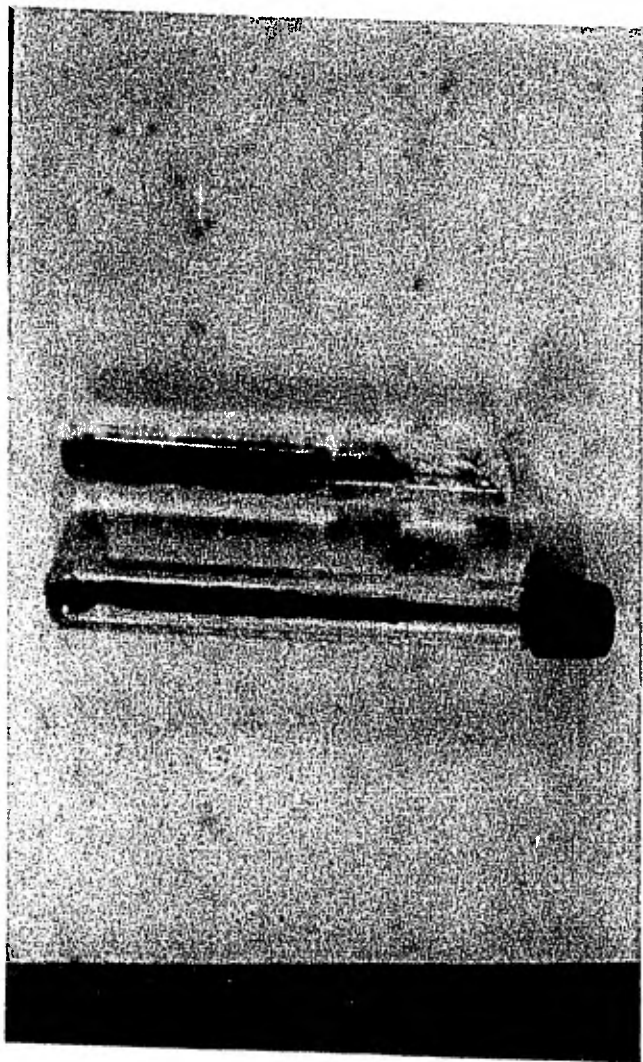
6.- Se conecta el voltímetro y se aplica un voltaje inicial de 24 miliampers durante 2 minutos subiéndose posteriormente a 60 miliampers durante 90 minutos vigilando que el azul de bromofenol mengüe a medio centímetro aproximadamente del extremo inferior del tubo y se manifiesta en forma de anillos azules.

7.- Los geles se sacan de los tubos con una aguja del N° 28 inyectando agua destilada entre el gel y el tubo, teniendo mucho cuidado de no causar ningún daño al gel se gira el tubo y el gel sale por el extremo opuesto al que se inyecta y se recibe en un recipiente con agua destilada.

8.- Los geles se pasan a tubos con tapa previamente numerados -- del 1 al 12 en los cuales hay solución fijadora y se dejan en ella durante 20 minutos.

9.- Se pasan los geles a 12 tubos numerados que contienen el colorante o medio de incubación y se dejan ahí durante 30 minutos.

10.- Apreciar resultados: Con esta técnica la fosfatasa alcalina placentaria se revela como dos anillos rojos específicos para ésta en base a patrones de referencia establecidos.



Ejemplo de electroforesis discontinua.

IX.- Discusión:

En base a lo anteriormente establecido (capítulo II) por los diferentes autores citados se pueden unir los diferentes criterios y sacar algunas conclusiones:

El descubrimiento de la elevación en el nivel de la fosfatasa alcalina en el suero de algunos pacientes, conjuntamente con la aparición de algunos tumores ha sido el único marcador químico relacionado con el nivel de la enfermedad y dado que en algunos tipos de cáncer como el carcinoma prostático primario, se ha detectado la elaboración de gonadotropina coriónica humana, lo cual establece una incidencia de proteínas placentales en este tipo de enfermedad. Por lo tanto, la utilidad de la producción de hormona ectópica sería muy interesante para el futuro de la investigación. Las hormonas placentales elaboradas por una neoplasia son particularmente utilizadas para llevar el control del tratamiento a partir de las hormonas que serían indetectables en pacientes sin tumores.

La actividad de la fosfatasa alcalina en el suero es determinada químicamente con el propósito de diagnóstico de algún posible neoplasma esto se logra mediante la detección de la isoenzima de Regan o de la isoenzima de Nagao, que son termoestables.

La isoenzima de Regan también se ha detectado en el tejido de tumores malignos y efusiones de éstos, la medida de esta isoenzima se usa para detectar la progresión o regresión de tumores ya que por su detección se ha identificado el origen de la elevación de la fosfatasa alcalina y la detección de efusiones malignas ocultas.

La presencia de la isoenzima en el suero debido a células tumorales tiene implicaciones para la diagnosis del cáncer y para la medida

de respuesta a una terapia determinada. Así los cambios detectados - en los niveles del suero se usan en algunos hospitales, como un índice de evaluación de respuesta a las diferentes terapias utilizadas. Los niveles de la isoenzima marcados en la membrana plásmática se con sidera que son indicadores de una metástasis potencial, se está inves tigando a este respecto el cáncer de mama humano.

Las isoenzimas de la fosfatasa alcalina han sido estudiadas como marcadores específicos de tejidos usados como monitores de enfermedad. La presencia de una isoenzima específica de un tumor en el suero tiene implicaciones claras, por ejemplo: Una simple determinación de - fosfatasa alcalina total en el suero puede dejar sospechas de metásta sis.

La fosfatasa alcalina placentaria presente en el tercer trimes-- tre de embarazo se considera un marcador efectivo de la transforma--- ción entre benignidad y malignidad, si se detecta inducción de isoenzima placentaria se tiene un cuadro característico de neoplasia.

La aparición de la isoenzima termoestable en algunos tumores, in dica un cambio radical en el mecanismo de control para la síntesis de esas proteínas, al surgir la posible transformación hacia la malignidad de un tumor; dicho de otra manera, la presencia de la fosfatasa - alcalina característica de la placenta a término puede proveer un mar cador potencial de la neoplasia.

El carcinoma cervicouterino ha sido estudiado extensivamente con respecto a su contenido enzimático, como lo han sido otros cánceres, - sin embargo aunque se han estudiado una gran variedad de casos, hasta la fecha no se ha informado dentro de la literatura en forma precisa si el carcinoma cervicouterino contiene isoenzima de la fosfatasa alca

lina, por lo tanto sería interesante saber si las neoplasias que contienen fosfatasa alcalina tienen una evolución biológica semejante o diferente a aquellas que no contienen fosfatasa alcalina y conocer la respuesta al tratamiento radiológico en cánceres con fosfatasa alcalina y sin ella.

No se sabe si las posibles elevaciones de la fosfatasa alcalina se deban a la fracción llamada Regan o si esta elevación se deba a la producción de la enzima por células neoplásicas malignas.

Por otra parte se tienen noticias de que las células exfoliadas de la vagina en pacientes con cáncer cérvicouterino si contienen fosfatasa alcalina con intensa actividad.

Sería interesante saber si el mecanismo de activación de genes embrionarios está involucrado en células destinadas a ser neoplásicas.

Quedan muchas incógnitas a investigar a cerca del conocimiento -- que se tiene actualmente de la fosfatasa alcalina como serían las siguientes:

¿El pirofosfato aparece en cantidades significativas en la orina de pacientes con hiperfosfatemia?

¿La composición subunitaria de la enzima puede ser la responsable de su distribución específica en los diferentes órganos?

¿Existen híbridos de la isoenzima in vivo?

¿Es posible producirla in vitro?

¿Cabe la posibilidad de que todas las isoenzimas de la fosfatasa alcalina humana tengan la misma secuencia de aminoácidos, pero difieran en la naturaleza de sus cadenas de carbohidratos?

¿Cuál es el secreto de la especificidad orgánica?

¿La fosfatasa alcalina es un agregado o un complejo multienzimático?

co originado de la superficie de las membranas celulares?

¿La fosfatasa alcalina es un componente estructural del sistema - de membranas especializadas?

¿La inhibición específica de la enzima en la membrana tiene conse cuencias en el transporte de iones o en el metabolismos de grasas?

Al igual que estas preguntas pueden surgir cientos más por lo tan to es útil tener al alcance las técnicas existentes para la detección de esta enzima, el conocimiento completo de la fosfatasa alcalina es - un campo bastante amplio para la investigación futura y es muy inqui-- tante si tomamos en cuenta el alto porcentaje de personas que mueren - actualmente en todo el mundo víctimas del cáncer. Esta isoenzima pro veé una esperanza para el posible control de esta enfermedad.

X.- Bibliografía:

- 1.- Allen, J.M. y Hyncik, G. (1963). Localization of alkaline phosphatase in gel matrices following electrophoresis. Jour. Histochem. and Cytochem. 11 (2): 169-175.
- 2.- Benham, F.J., Povey, M.S. y Harris, H. (1978). Placental-like alkaline phosphatase in malignant and benign ovarian tumors. Clin. Chim. Acta. 86 (2): 201-215.
- 3.- Bodansky, O. (1976). Hidatiform mole, choriocarcinoma and neoplasms of the uterus. Biochemistry of human cancer New York Academic Press. 592-635 pp.
- 4.- Broder, L.E., Weintraub, B.D., Rosen, S.W., Cohen, M.H. y Tejada, F. (1977). Placental proteins and their subunits as tumor makers in prostatic carcinoma. Cancer. 40 (1): 211-216.
- 5.- Chou, J.Y. y Robinson, J.C. (1977). Induction of placental alkaline phosphatase in choriocarcinoma cells by 5-bromo-2'-deoxyuridine. In Vitro. 13 (7): 450-460.
- 6.- Deane, H.W. y Barnett, R.J. (1960). Histochemical methods for demonstration of enzymatic activity. Gustav-Fischer-Verlag-Stuttgart, Alemania. 202 pp.
- 7.- Doellgast, G.J. (1977). Immunoquantitation of human placental alkaline phosphatase using radial immunodiffusion. Analytical Biochem. 82 (1): 278-288.
- 8.- Doellgast, G.J. y Fishman W.H. (1977). Inhibition on human placental-type alkaline phosphatase variants by peptides containing L-leucine. Clin. Chim. Acta. 75 (1): 449-454.

- 9.- Ehrmeyer, S.L., Joiner, B.L., Kahan, L., Larson, F.C. y - Metzemberg, R.L. (1978). A cancer associated fast -- homoarginine-sensitive electrophoretic form of serum alkaline phosphatase. *Cancer Res.* 38 (1): 599-601.
- 10.- Fernley, H.N. y Walker, I.G. (1969). Inhibition of alkaline phosphatase by 2-phenylalanine. *Biochem. J.* 116 (1): 543-544.
- 11.- Fishman, H.W. (1974). Perspectives on alkaline phosphatase isoenzymes. *Journal of Medicine.* 56 (1): 617-650.
- 12.- Fishman, W.H. y Green, S. (1967). Automated differential isoenzyme analysis, L-phenylalanine-sensitive isoenzymes of human serum alkaline phosphatase. *Enzymologia.* 33 (1): 88-99.
- 13.- Fishman, W. H., Inglis, N.R., Green, S., Anstiss, C.L., Gosh, N.K., Reif, A.E., Rustigian, R. y Krant, M.J. (1968). Immunology and biochemistry of Regan isoenzyme of alkaline phosphatase human cancer. *Nature.* 219 (1): 697-699.
- 14.- Fishman, W.H., Inglis, N.R., Stolbach, L. y Krant, M.J. (1968). A serum alkaline phosphatase isoenzyme of human neoplastic cell origin. *Cancer Res.* 28 (1): 150-154.
- 15.- Hamilton, T.A., Gornocki, S.Z. y Sussman, H.H. (1979). Alkaline phosphatases from human milk. Comparison with isoenzymes from placenta and liver. *Biochem. J.* 177 (1): 197-201.
- 16.- Hamilton, T.A., Tin, A.W. y Sussman, H.H. (1979). Regula

tion of alkaline phosphatase expression in human choriocarcinoma cell lines. Proc. Natl. Acad. Sci. 76 - (1): 323-327.

- 17.- Hirano, K., Sugiura, M., Iino, S., Suzuki, H. y Oda, T. (1977). Characterization of tissue-specific isoenzyme of alkaline phosphatase from human placenta and intestine. Chem. Pharm. Bull. (Tokio). 25 (10): 2524-2529.
- 18.- Laguna, J. (1971). Bioquímica. Prensa Médica Mexicana. - México, D.F. 676 pp.
- 19.- Larner, E.H. y Rutherford, Ch.L. (1977). A Microchemical analysis of alkaline phosphatase in human malignant and benign breast tumors. J. Cancer. 20 (1): 909-917.
- 20.- Lehninger, A.L. (1972). Bioquímica. Editorial Omega. Barcelona, España. 887 pp.
- 21.- Lison, L. (1960). Histochemie et cytochimie animales --- principes et méthodes. Sauthier-Villars. Paris, --- Francia. 842 pp.
- 22.- Lokich, J.J. (1977). Leucocyte alkaline phosphatase activity in patients with malignant disease. Cancer. 40 (1): 1202-1205.
- 23.- Malkin, A., Kellen, J.A. y Caplan, B. (1978). The presence of placenta-like alkaline phosphatase in normal uterine cervix and endometrium. Carcino-embryonic proteins held in Marburg/Lahn. W. Germany. 17-21 pp.
- 24.- Pearse, E.A. (1972). Histochemistry theoretical and applied.

Churchil-Livingstone. 3a. Edición. London, England.
1518.

- 25.- Quigley, G.J., Richards, R.T. y Shier, K.J. (1970). Heat Stable alkaline phosphatase. Amer. J. Obstet. Gynec. 106 (3): 340-351.
- 26.- Rochman. H. (1978). Tumor associated markers in clinical diagnosis. Ann. Clin. Lab. Sci. 8 (3): 167-175.
- 27.- Romei, W.C., La Maeusa, S.J. y Dufrene, J.K. (1967). Detection of serum alkaline phosphatase isoenzymes -- with phenoptalein monophosphate following cellulose acetate electrophoresis. Clin. Chem. 14 (1): 47-57.
- 28.- Sakiyama, T., Robinson, J.G. y Chou, J.Y. (1979). Characterization of alkaline phosphatase from human first trimester placenta. J. Biol. Chem. 254 (3): 935-938
- 29.- Sing, I., Tsang, K.Y. y Blakemore, W.S. (1978). Placenta like alkaline phosphatase from human osteosarcoma - cells. Cancer Res. 38 (1): 193-198.
- 30.- Simpson, E., McAllister, E. J. y Hainsworth, I.R. (1977) The quality control of alkaline phosphatase determinations with placental phosphatase. Clin. Chim. Acta. 77 (3): 415-422.
- 31.- Speeg, K.V., Azizkhan, J.C. y Stromberg, K. (1977). Characteristics of alkaline phosphatase from two continuous lines of human choriocarcinoma cells. Exp. Cell. Res. 105 (1): 199-205.
- 32.- Stolbach, L.L., Krant, M.J. y Fishman, W.H. (1969). Ectopic production of an alkaline phosphatase isoenzyme

in patients with cancer. Journal of Medicine. 281 -
(14): 757-762.

33.- Weisz, P.B. (1974). La Ciencia de la Zoología. Editorial
Omega, 2a. Edición. Barcelona, España. 933 pp.

34.- Wiene, R.J. (1965) Agar gel electrophoresis. Elsevier Pu
blishing Company. New York, U.S.A. 432 pp.