

ISOENZIMAS

Ricardo José García Jiménez*

Silvia Villalobos Bastos**

SINTESIS HISTORICA:

En 1956 Boman y Westland purifican y separan fosfatasa del suero por cromatografía en columna Dowex — 2. Mos - Reis - Seelich - Erlich - Gomuka - Anagnostopocilos, se encuentran entre los primeros investigadores en reconocer a la placenta humana como una fuente rica de Fosfatasa Alcalina, logrando además la purificación de la misma. En la purificación y cristalización de dicha enzima en placenta, se encontraron dos variantes: Variante A (de rápido movimiento electroforético) y la variante B (electroforéticamente de movimiento lento). Sin embargo recientemente estudios sugieren que esta última variedad está constituida por moléculas agregadas de la forma A. En 1961 Boyer observa un patrón similar de F.A. en suero de embarazadas y en placenta. Con respecto a la placenta humana sus trabajos han indicado variaciones genéticas cuando la electroforesis en Gel de almidón se realiza a diferentes (PHa), PH: 8, 6 y 6,0.

La combinación de técnicas inmunoquímicas y electroforéticas en Gel de almidón para la investigación de isoenzimas, fue utilizada también por Boyer. En 1962 Moss et al purifican fosfatasa alcalina de hígado, riñón, intestino y hueso, por medio de electroforesis en Gel de almidón. Este mismo año demuestra la existencia de 4 variantes diferentes de la fosfatasa alcalina hepática. Moss y King separaron posteriormente diferentes zonas de fosfatasa alcalina humana por electroforesis en Gel de almidón y determinaron sus Km. Más recientemente Moss et al reportan la sensibilidad a la neuraminidasa de la F.A. de hígado y riñón humano. Luego Robinson y Pierce establecen que las isoenzimas de F.A. sensibles a la L — fenilalanina de origen intestinal, son resistentes a la neuraminidasa. En 1968 Fishman et al observan por primera vez la

isoenzima Regan en un cáncer broncogénico. En 1970 Nagayama et al determinaron la isoenzima de F.A. denominada Nagao en un caso de carcinomatosis pleural. En 1974 Usateguir, Gómez et al demuestran la presencia de isoenzima Regan en individuos normales.

ISOENZIMAS DE LA F.A. EN SUERO NORMAL EXAMINADO POR ELECTROFORESIS EN GEL DE ALMIDON Y ACRILAMIDA USANDO INHIBIDORES EN ORGANOS ESPECIFICOS

La L - fenilalanina es un inhibidor estereoespecífico de la actividad de F.A. de origen intestinal y placentario. De manera que la actividad de F.A. de un suero tratado previamente con una solución 5 mMolar de L⁻ fenilalanina, será la correspondiente a la F.A. de origen Hepatobiliar y óseo. A este tipo de F.A. se le conoce como F.A. no sensible a la fenilalanina (no L.P.S.A.P.). La F.A. de hígado y hueso difieren en su inactividad al calor, de manera que a 55 grados centígrados por 16 minutos, un 90 - 95% de la F.A. ósea es destruida y entre el 50 - 60% de la F.A. hepática, la F.A. placentaria tiene la propiedad de ser muy termoresistente, de manera que su presencia puede ser fácilmente determinada, calentando la muestra a 65 grados centígrados por cinco minutos y midiendo la actividad de F.A. a PH 10.7, en una solución 72. mMolar de fenilfosfato como sustrato. Para una determinación precisa y para saber la cantidad de cada una de la isoenzima de F.A. en una muestra, como por ejemplo suero sanguíneo, es necesario la electroforesis. La electroforesis en Gel de almidón es útil para aislar la banda intestinal pero fracasa para separar las isoenzimas de hígado y hueso. Las bandas hepáticas y ósea pueden ser determinadas por electroforesis en Gel de poliacrilamida, técnica poco satisfactoria para el aislamiento de la isoenzima intestinal. La detección de F.A. de origen placentario puede ser realizada, combi-

* Laboratorio Clínica Palmar Sur, M.Q.C.

** Laboratorio Hospital Tomás Cusús Casajús M.Q.C.

nando un proceso inmunológico con una electroforesis en Gel de almidón. Se corre la muestra tratada previamente con un suero anti F.A. placentaria, y otra corrida sin el tratamiento inmunológico, de manera que la ausencia de la banda placentaria en el gel, en la muestra tratada con anti-suero, es evidencia confirmatoria de la isoenzima placentaria. Un método para demostrar la presencia de la isoenzima intestinal consiste en una corrida electroforética en presencia de una solución 25 mMolar de L = homoarginina inhibidor estereoespecífico de las isoenzimas de hueso o hígado, de tal forma que la banda intestinal se puede ver intensamente, este método revela la isoenzima placentaria. El mismo método puede emplearse para poner de manifiesto las isoenzimas hepática y ósea pero empleando L - fenilalanina en solución 25 mMolar.

ESQUEMA No. 1

SEPARACION ELECTROFORETICA (EN AGAROSA GEL) DE LAS ISOENZIMAS DE LA FOSFATASA ALCALINA:



- a = enzima hepática
- b = enzima de hueso
- c = enzima placentaria
- d = enzima intestinal
- e = enzima asociada a la placentaria
- f = enzima de bilis

TABLA No. 1

PRINCIPALES CARACTERISTICAS RESPECTO A INHIBIDORES DE LAS ISOENZIMAS DE LA FOSFATASA ALCALINA

	Inhibición por la L-fenilalanina	Inhibición por homoargina	Estabilidad al calor
Fosfatasa alcalina Placentaria	+	-	Termostable a 56°C/10 min.
Fosfatasa alcalina Hepática	-	+	
Fosfatasa alcalina Ósea	-	+	
Fosfatasa alcalina Intestinal	+	menos sensible que la hepática.	

FOSFATASA ALCALINA HEPATICA:

Es sintetizada por el hepatócito. En la electroforesis presenta una banda de movimiento rápido (L - 1), la cual aparece en forma angosta y discreta. No es inhibida por la L = fenilalanina, pero si por la L - homoarginina. Es menos termolábil que la ósea. Presenta otra banda conocida como L - 2, con las mismas características respecto a los inhibidores que la L - 1 pero es más lábil al calor y de movimiento electroforético más lento. El incremento en la actividad de F.A. hepática en un paciente con tumor maligno puede deberse a varias razones: 1. Aumento de fosfatasa alcalina en cuanto a producción, por el tumor. 2. Metastasis a Hígado. 3. Producción de una nueva especie de F.A. por el tumor. 4. Respuesta paraneoplástica del hígado. O sea presencia de un patrón isoenzimático que indica disfunción severa del hígado pero que al extirpar el tumor, el cual no ha dado metástasis a hígado, ese patrón isoenzimático alterado desaparece. Una isoenzima que se asemeja, estrechamente a la F.A. L - 1 hepática, que se da también en pacientes con obstrucción biliar, ha sido encontrada en sangre de un alto porcentaje de pacientes con cáncer, sobre todo hombre con cáncer pulmonar, de colon y de pecho, en diabéticos, en

casos de hepatitis y en pacientes con problemas renales.

Esta isoenzima se asemeja también a la F.A. banda A coriónica sensible a la L — fenilalanina, L — homoarginina, e inactivable al calor.

La alta frecuencia de ocurrencia de esta isoenzima denominada F.H.A.P. en una amplia variedad de cánceres, incluyendo leucemias, y su baja incidencia en pacientes que han sido curados del cáncer, sugieren su utilidad en la estimación de la cantidad de tumor presente durante el curso de la terapia.

La sensibilidad de la F.H.A.P. como marcador de cáncer es menor comparado con el antígeno carcinoembrionario y con la gonadotropina coriónica. Sin embargo puede ser de utilidad, en combinación con otros marcadores, en la detección de cáncer en poblaciones con alta prevalencia.

FOSFATASA ALCALINA OSEA

Es sintetizada en el osteoblasto. Electroforéticamente presenta una banda difusa muy lábil al calor. Es inhibida por la L—homoarginina, pero no por L—fenilalanina.

Elevaciones en la actividad de esta isoenzima, es frecuente en pacientes con metástasis a hueso, sobre todo en pacientes con cáncer de próstata, aunque fracasa para detectar el 23% de los casos con metástasis ósea.

FOSFATASA ALCALINA INTESTINAL

Es producida en las células de la mucosa intestinal. En electroforesis (membranas de acetato de celulosa) encontramos las bandas I₁ e I₂. Ambas son inhibidas por la L—fenilalanina, pero son poco sensibles a la L—homoarginina, y tienen las mismas propiedades termolábiles que la L—1 hepática.

Debido a que variantes de la isoenzima intestinal, se pueden encontrar en la posición de las isoenzimas hepáticas y óseas en la electroforesis en gel de almidón, es que algunos autores sugieren que el intestino es la fuente principal de F.A. sanguínea, y que esta es transformada durante el transporte y metabolismo, hasta las formas hepáticas. Se sugiere que tal transformación es controlada por factores genéticos, tales como el grupo sanguíneo y el estado secretor. De esta forma se podrían explicar, las contribuciones anormales de isoenzima intestinal, en ciertos casos de personas con cirrosis.

FOSFATASA ALCALINA PANCRÁTICA (P.a)

Se ha reportado la presencia de una isoenzima de F.A. en pacientes con cáncer de páncreas y en hemocromatosis. Las características bioquímicas más importantes de esta isoenzima son las siguientes: Es más lábil al calor que la isoenzima hepática. Su comportamiento respecto a los inhibidores L — fenilalanina) y (L — Homoarginina) es muy similar a la L—1. El suero que contiene la banda P.a muestra una banda difusa en la región donde migra la isoenzima intestinal, sin embargo, la I₁ y la I₂, en el suero que contiene P.a, aparecen diferentes que cuando no están acompañados por la P.a; cuando la P.a está presente, la isoenzima intestinal no solo fracasa en separarse claramente hasta I₁ e I₂, sino que varían también sus propiedades, de manera que la banda intestinal es también más lábil al calor, menos sensible a la L — fenilalanina y más sensible a la L — homoarginina. Esta isoenzima también se puede presentar en pacientes con enfermedades malignas y benignas del sistema hepatobiliar y de otros órganos. El significado y el origen celular de la banda P.a, no se ha establecido de manera que está por determinarse si es un producto directo de las células pancreáticas normales o malignas o si es de otro tejido, teniendo sus propiedades electroforéticas alteradas, debido a cambios patológicos del páncreas o del sistema hepatobiliar.

TABLA No. 2
PROPIEDADES DE LA FOSFATASA
ALCALINA DE HIGADO, HUESO,
INTESTINO Y PLACENTA

	Fosfatasa Alcalina de:			
	Higado	Hueso	Intestino	Placenta
Inhibición por L-fenilalanina (%)	0-10	0-10	75	75
Inhibición por homoarginina (%)	78	78	5	5
Inactividad con calor	50-70	90-100	50-60	0
Efecto del pretratamiento con neuraminidasa	+	+	0	+
Reacción con antisuero diluido para isoenzima placentaria	0	0	0	+
Reacción con antisuero diluido para isoenzima hepática	+	+	0	0
Reacción con antisuero diluido para isoenzima intestinal	0	0	+	0

ISOENZIMA DE FOSFATASA ALCALINA EN ENFERMEDAD LINFOPROLIFERATIVA

Se ha reportado una nueva isoenzima de F.A., presente en sueros de hombres con enfermedad linfoproliferativa. Esta se caracteriza por su incapacidad para hidrolizar el fosfato - s de cisteamina. A esta isoenzima se le ha denominado N - fosfatasa. Sin embargo Dulis B. y Neilson, luego de un estudio realizado en Colorado, U.S.A., llegan a la conclusión de que la N - fosfatasa no se presenta como una forma dominante de F.A. en el suero de pacientes con enfermedad linfoproliferativa, y crean además, aparentemente dudosa la existencia de esta isoenzima.

FOSFATASA ALCALINA LEUCOCITARIA

En el citoplasma de los granulocitos maduros normales, se demuestra actividad de F.A. la cuál aumenta durante infección y otros estímulos. En cambio en el granulocito leucémico maduro de la leucemia granulocítica crónica, hay escasa o nula actividad de F.A., aunque alguna célula aislada se colora intensamente, lo que hace suponer la existencia de dos poblaciones celulares. En el caso de los trastornos mieloproliferativos, la actividad de fosfatasa alcalina de los leucocitos se halla incrementada, excepto en algunos pacientes con mielofibrosis y metaplasia mieloide. En mieloma múltiple, Brook F. y Drusback P.B reportan en una investigación que de 62 pacientes estudiados, con la enfermedad, 60 presentaron niveles altos de F.A., mientras que en el grupo control, de 26 adultos sanos, estos niveles fueron bajos. Ellos sugieren que el aumento de F.A. leucocitaria (L.A.H.A.) en mieloma múltiple, se puede deber a la aparición de un clon de células mieloides, las cuales persisten sin cambios durante la enfermedad, ni con tratamiento, infección, regresión o progresión de la enfermedad. Valores bajos de L.A.P.L. se dan en leucemia granulocítica crónica, anemia de células falciformes, H.P.N. Valores elevados se dan en policitemia vera rubra, metaplasia mieloide, preñez y Hodgking.

FOSFATASA ALCALINA PLACENTARIA

Es sintetizada en el trofoblasto. Es genéticamente polimorfia con 6 fenotipos electroforéticos, determinados por tres alelos comunes en el locus de F.A. Es un dímero con peso molecular

de 120.000. La enzima entra en la circulación materna como resultado de un intercambio metabólico, pudiendo ser detectada en el suero de la madre, pero no en suero fetal. Es inhibida por la fenilalanina, pero no por la L-homoarginina y es completamente termostable a 56 grados centígrados por 10 minutos. Las isoenzimas aberrantes que más se han encontrado en tumores, son muy similares a la F.A. placentaria. Se encuentran en el 8/25^o/o del suero de individuos con cáncer. Cabe destacar entre ellas las isoenzimas Regan, Nagao, N-fosfatasa, etc. Se ha encontrado en un alto porcentaje de tumores malignos, de origen diverso y en algunos tumores benignos, una isoenzima aberrante de la F.A., a la cual se le llama frecuentemente isoenzima Regan. Se le denomina así, porque fue encontrada por primera vez en un individuo que padecía de carcinoma broncogénico, el cual se apedillaba Regan. Se ha sugerido que la síntesis de F.A. placentaria, por células malignas de origen no trofoblástico, puede representar una disrupción del locus estructural para F.A. placentaria en estas células. La isoenzima Regan es indistinguible de la isoenzima placentaria en muchos aspectos. Dentro de estos podemos mencionar: estabilidad al calor, inhibición por la L- fenilalanina, Ph óptimo, reacción inmunológica (reacciones específicas con antisuero de conejo contra F.A. placentaria), acción de la neuraminidasa y otras propiedades. Se ha identificado la isoenzima Regan en una alta incidencia de pacientes con seminoma, carcinoma de ovario y carcinoma pancreático, seguidos de los que presentan cáncer gástrico, de pecho, pulmón y sarcomas. En contraste su incidencia es muy baja en melanoma, cáncer de esófago y hepatoma. También se han descubierto niveles elevados en poliposis familiar del colon y en colitis ulcerativa, enfermedades que se sabe presentan una gran predisposición al cáncer. Se pueden detectar en varias enfermedades relacionadas al sistema vascular, la incidencia de R.I. en pacientes con enfermedad benigna, es pequeña, y el nivel cuantitativo de la enzima es bajo, comparado con el de pacientes con neoplasias. Se ha observado que la isoenzima R.I. disminuye después del tratamiento con agentes quimioterapéuticos efectivos, tales como el 5-fluoracil, velban y mitomicina. En estudios recientes se ha encontrado otras formas de fosfatasa alcalina aberrante, similares a la F.A. placentaria, una es la llamada isoenzima Nagao, la cual se diferencia de la isoenzima placentaria por su sensibilidad a la inhibición por la L-leucina y por su más lenta mo-

bilidad electroforética en gel de almidón. La otra variante ha sido hasta ahora únicamente encontrada en hepatomas primarios, tiene un comportamiento similar a la F.A. placentaria en cuanto a inhibición por la L-fenilalanina y en reacción cruzada con suero antifosfatasa alcalina placentaria. Difiere sin embargo, de la F.A. placentaria y de otras F.A. conocidas, en su mayor movilidad electroforética y estabilidad al calor. Esta isoenzima no ha sido detectada en tejido fetal o placentario. Esta variante puede presentarse aún en ausencia de la alfa-fetoproteína. Esta variante puede presentarse aún en ausencia de la alfa-fetoproteína, en suero y en tejido de hepatoma, de manera que la detección de estas isoenzimas puede ser de algún valor diagnóstico en hepatoma. Es interesante indicar que la isoenzima de R.I. o de Nagao, no se ha reportado en carcinoma hepatocelular. La F.A. tumoral puede estar determinada por una rara variante de alelos en el locus de la fosfatasa alcalina, o alternativamente, las moléculas de la enzima pueden estar sujetas a una modificación estructural.

RESUMEN:

El presente trabajo intenta dar una pequeña visión sobre un tema de tanta actualidad como lo es la utilidad diagnóstica de las isoenzimas de la fosfatasa alcalina en el cáncer, además de su utilidad en el seguimiento evaluativo del tratamiento en los procesos cancerosos. Hemos de indicar que falta mucho por aclarar y por investigar en este campo, pero que de hecho el análisis izoenzimático de la fosfatasa alcalina, junto con la determinación de otros marcadores que son librados en la sangre en un proceso neoplástico, tales como el antígeno carcinoembriogénico, las alfafetoproteínas, el lactógeno placentario y la gonadotropina coriónica, brindan una valiosa ayuda en la detección precoz del cáncer. "Las isoenzimas son proteínas catalíticamente activas, con la misma especificidad por un determinado sustrato, las cuales son diferentes bioquímicamente y pueden ocupar diferentes zonas en una corrida electroforética. En otras palabras las isoenzimas son formas moleculares múltiples de una misma enzima. En la investigación de isoenzimas, debe de indicarse el sustrato sobre el cual actúa determinada enzima, así como el órgano o

tejido del cual se obtuvo ella, dejando de esta forma la posibilidad de que enzimas que actúan igual, pueden tener diferencias propias (formas izoenzimáticas), dependiendo del tejido en que fueron aisladas. Si una izoenzima produce más de una banda sobre la electroforesis, a estas bandas se les denomina variantes electroforéticas, y si la separación se establece por métodos cromatográficos, se llamarán variantes cromatográficas. Existen diferentes formas moleculares de la fosfatasa alcalina (F.A) y estas son en algún grado órgano o tejido específicos. Con esto nos referimos lógicamente a las isoenzimas, las cuales son distinguibles en consideración a su movilidad electroforética, estabilidad al calor, actividad catalítica, especificidad inmunoquímica, etc. La fosfatasa alcalina principalmente es sintetizada en hígado, hueso, intestino y placenta, aunque también puede ser producida en riñón, pulmón, bazo, etc.

BIBLIOGRAFIA:

- 1.- Benham F. J. Pover y Harria H., *Clinical Chemical Acta*. 1978. 86 (2). (201-215).
- 2.- Brook F., Drusback P. B. "The Journal of Laboratory and Clinical Medicina". 1977.
- 3.- Chung C. J. M., Mastrofrancisco B., Shuy-ma, Cha and Randall M. T. *Clinical Chemical*. 1975; 21(8) (1067-1071).
- 4.- Dulis B. and Wilson T. B., *Cancer Research*. 1978; 38 (8) (2519 -2522).
- 5.- Ehrmeyers S. L., Joiner B. L., Kaham-L. et al., *Cancer Research* 1978; 38 (3) (599 - 601).
- 6.- Hegashimo K., Ohtani R., Kudo S. et al. "Annals of Internal Medicine". 1975; 83 (1) (74 - 78).
- 7.- Henderson A. R. and Grace D. M. *Clinical Pathology*. 1976; 29 (3) (237-240).
- 8.- Nathanson Larry, Fishman Williams. *Cancer Research*. 1971.