

Sección de Fisioparasitología
Instituto «López-Neyra» de Parasitología (C.S.I.C.)
Cátedra de Medicina Legal
Facultad de Medicina de Granada

Estudio sobre las fosfatasa ácidas de la glándula prostática. — I. Aislamiento y purificación; cinética enzimática

por

J. López-Gorgé y E. Villanueva *

(Recibido para publicar el 18 de octubre de 1967)

Se ha descrito la existencia de una fosfatasa ácida, la llamada según normas oficiales ortofosfórico monoéster fosfohidrolasa y número de código 3.1.3.2, en una gran cantidad de materiales biológicos: germen de trigo (11), tubérculo de patata (61, 62), levaduras y almendras dulces (46), entre los vegetales; en *Escherichia coli* (67), entre los microorganismos; en *Tribolium confusum* (25) y *Aedes aegypti* (83), entre los insectos; y en plaquetas de conejo (27), caballo (125) y terneros (92), en riñón de rata (112) y en leucocitos, ganglios y medula ósea de cobaya (27), entre los animales superiores.

En la especie humana la presencia de este enzima ha sido, como es natural, aún más exhaustivamente estudiada. Se detectó con actividades variables en las glándulas adrenales, bazo, páncreas, hígado y riñón (2), en plaquetas y leucocitos (109), en glóbulos rojos (79, 119), en el suero sanguíneo (16, 77), en orina (23, 45) y en el semen (126).

Sin embargo, el hallazgo fundamental fue hecho por KUTSCHER y WOLBERGS

(80), que fueron los primeros que dieron la noticia de la existencia en el tejido prostático humano de un enzima con fuerte actividad fosfatásica ácida, ya que a partir de entonces resultó fácil demostrar que el enzima presente en el suero procedía, al menos en parte, de la próstata. Efectivamente, basta con un pequeño masaje prostático (29, 39), e incluso con una simple palpación rectal (66), para que el nivel de enzima sérico se haga mucho mayor.

Un descubrimiento muy interesante fue el realizado por GUTMAN y GUTMAN (58) de que en los casos de carcinoma prostático con metástasis apareciera muy elevado el nivel sérico de este enzima. Estudios posteriores muy exhaustivos corroboraron este hecho (47, 48, 52, 57, 117), e incluso se puntualizó que un fenómeno análogo, si bien no tan acentuado, se daba en los casos de hipertrofia benigna de esta glándula (128).

* Con una Beca de Iniciación a la Investigación.

A partir de estos hechos empezó a usarse la determinación del nivel sérico de fosfatasa ácida como un método diagnóstico del adenoma prostático, desarrollándose para ello una serie no pequeña de técnicas analíticas que diferían, fundamentalmente, en el uso de uno u otro sustrato fosforado. Como tales se han usado y usan el beta-glicerofosfato (16), el fenilfosfato (13, 51, 76, 77, 116), el p-nitro-fenil-fosfato (7, 69, 115), el alfa-naftil-fosfato (9), el fenolftaleín-monofosfato (8) y el fenolftaleín-difosfato (71).

No obstante, se observaron valores altos de fosfatasa ácida sérica en individuos sin ninguna afección prostática y con alteraciones sanguíneas, con la consiguiente probabilidad de diagnósticos falsos. Efectivamente, existe una fosfatasa ácida originada en los hematíes (59, 79, 119), otra en los leucocitos (10, 12, 103, 109) y, sobre todo, otra en las plaquetas (131), responsables fundamentalmente del nivel sérico normal de enzima, y que en determinadas circunstancias pueden pasar masivamente al suero (122). Según JACOBSON (72), ZUCKER y BORRELLI (131, 132) y ZUCKER y WOODARD (133), el 50 por ciento del enzima inhibido por el tartrato del suero normal procede de las plaquetas. Ello ha conducido al estudio de técnicas analíticas que permitieran determinar selectivamente el nivel sérico de la fosfatasa ácida de origen prostático, con exclusión de las de otra naturaleza. Al conseguir esto se empezaron a realizar estudios sobre la estabilidad de los enzimas de una y otra procedencia frente a una serie de factores fisico-químicos.

El hallazgo del diferente comportamiento del enzima prostático frente a varios agentes químicos ha solucionado, al menos parcialmente, el problema. El ácido 1-tartárico se ha mostrado como un potente inhibidor de la fosfatasa ácida de próstata y basadas en su uso se han desarrollado numerosas técnicas de determinación específica de este enzima en el suero (1, 19, 91, 102). También han sido

utilizados el etanol, que destruye a los enzimas prostático y eritrocítico, y no a los de otro origen, y el formaldehído, que no afecta a la fosfatasa de próstata e inactiva a los enzimas procedentes de los elementos formes de la sangre (2, 14, 33).

Simultáneamente se han ido haciendo estudios sobre las características fisico-químicas del enzima prostático, especialmente orientados hacia su comportamiento frente a las variaciones de temperatura y pH (28, 30, 64, 129, 130), y que han constituido una continuación de los primitivos trabajos de KUTSCHER y WORNER (81) en tal sentido. Una revisión de estos factores ha sido hecha por WALKER y colaboradores (127).

De todos estos hallazgos se ha llegado al convencimiento de que una elevación del enzima sérico inhibido por el tartrato y la existencia de un carcinoma de próstata son dos fenómenos que se encuentran íntimamente ligados (22, 35, 49, 65). No obstante, algunos trabajos ya hace tiempo que empezaron a indicar que otros factores ajenos a la neoplasia podían afectar al nivel de la fracción ácida sérica de origen prostático (18, 63), lo que en sí constituía ya un indicio de la posible existencia de más de un enzima con dicha actividad originado en esta glándula.

Hace ya años que se hicieron los primeros intentos de demostrar la existencia en la próstata de más de un enzima con actividad de fosfatasa ácida, especialmente alentados por los descubrimientos cada vez más frecuentes de la presencia de isoenzimas en un mismo órgano (105). A tal fin se han efectuado numerosas experiencias de fraccionamiento analítico, en las que las técnicas de electroforesis en papel (73) en gel de almidón (108) y en gel de poliacrilamida (54), efectuadas principalmente sobre suero, han tenido especial importancia.

Más recientes son los intentos de obtención de preparados enzimáticos purificados con vistas a conseguir una separación de posibles isoenzimas. TSUBOI y

HUDSON (120) han conseguido purificar a un alto grado la fosfatasa ácida de eritrocitos humanos. LUNIXQUIST y col. (90) en el enzima del plasma seminal humano, y HOFSTEN y PORATH (67) han conseguido separar varios componentes con actividad fosfatásica ácida de extractos acelulares de *Escherichia coli*, utilizando para ello una técnica de filtración molecular por Sephadex G-75, seguida de electroforesis en columna a $pH = 8,2$. Por lo demás, otros investigadores han conseguido obtener preparados purificados de este enzima, con más o menos éxito, utilizando otros materiales biológicos de partida, y algunos de estos intentos serán discutidos posteriormente.

Por lo que respecta a la glándula prostática, también han sido abundantes los intentos de obtención de preparados enzimáticos de fosfatasa ácida de alto grado de pureza. KERR y CHERNIGOV (74) consiguen obtener un preparado de este enzima, exento de actividad ribonucleásica, por precipitación de un extracto prostático con sulfato amónico entre el 40 y el 60 % de saturación. DAVIDSON y FISHMAN (31), HUDSON y LONDON (70), BOMAN (17) y otros más, han conseguido la preparación de muestras enzimáticas cada vez más purificadas, intentos todos que han llevado finalmente a la obtención a partir de la glándula prostática de fosfatasa ácida de diferente comportamiento físico-químico.

En este trabajo se expone un procedimiento de fraccionamiento del primitivo enzima prostático en dos preparados distintos, estudiándose las características físicas, químicas y cinéticas de ambas fosfatasa ácidas, que vienen a poner de manifiesto su diferente naturaleza.

Material y métodos

Próstatas humanas fueron obtenidas de individuos que presentaban hipertrofia de dicha glándula, con o sin diagnóstico previo de adenoma prostático, y que se sometieron a intervención quirúrgica. Los ór-

ganos recién extirpados se lavaron cuidadosamente con solución salina fisiológica en orden a eliminar residuos sanguíneos, y se diseccionaron desechando restos de tejido no prostático; finalmente, se pesaron como control del grado de hipertrofia.

Todas las próstatas utilizadas fueron tratadas separadamente. Una previa dislaceración tisular con un escalpelo fue seguida de una trituración en un homogenizador refrigerado con un peso análogo de solución salina fisiológica. El homogenado obtenido se dejó en maceración durante 12 horas a 4 grados, obteniéndose un extracto prostático bruto por centrifugación a 4.000 g durante 20 minutos en centrifuga refrigerada. El extracto se sometió a diálisis en saco de celofán durante 48 horas a 4 grados frente a agua destilada renovada dos veces; durante el proceso de diálisis había formación de precipitado, el cual se separó por centrifugación análoga. Este extracto prostático era el que se utilizó en la purificación subsiguiente.

1. **FRACCIONAMIENTO Y PURIFICACIÓN DEL ENZIMA.** Todo el proceso de purificación se basa en el empleo de la DEAE-celulosa como cambiador. En una primera fase del fraccionamiento se obtuvieron dos preparados enzimáticos con actividad fosfatásica ácida, altamente purificados, en especial uno de ellos. Una mayor purificación del otro se consiguió con dos nuevos fraccionamientos sobre el mismo cambiador. Todos estos pasos se efectuaron en cámara refrigerada a 4 grados.

a) *Fraccionamiento de base.* Se emplearon columnas ($25 \times 2,5$ centímetros) de DEAE-celulosa D-50 (W. & R. Balston, Ltd.), equilibradas con tampón veronal-maleato M/100 de $pH = 8,52$. El proceso completo constaba de dos y, a veces, tres fases sucesivas. En una primera se establecía un sistema gradiente continuo, descendente en valores de pH y ascendente en fuerza iónica, mediante un sistema de mezcla (87) de soluciones tampón veronal-maleato M/100 $pH = 8,52$ (150 ml) y maleico-maleato M/50, M/10 en ClNa,

$pH = 4,46$ (250 ml). En la segunda se continuaba el desarrollo cromatográfico con solución tampón maleico-maleato M/10 $pH = 4,40$ (volumen variable entre 200 y 70 ml, según el peso de la glándula tratada); cuando de esta forma el proceso de elución proteica no quedaba completado, se terminaba mediante una tercera fase con solución tampón maleico-maleato M/10, M/10 en ClNa, $pH = 4,40$ (200 ml y más, si era necesario).

A lo largo de todo el proceso se mantuvo una tasa de goteo de 0,5 ml por minuto, recogiendo fracciones de 10 ml en un colector automático. Se obtuvieron en total un número de fracciones que oscilaban de unas muestras a otras entre 80 y 130, sobre las cuales se determinaron proteínas totales según LOWRY (88) y actividad fosfatásica ácida según BESSEY-LOWRY (15) con p-nitro-fenil-fosfato como sustrato.

Según los casos, aparecían una o dos zonas con actividad de fosfatasa ácida. Las fracciones activas correspondientes a cada zona fueron reunidas y dializadas en saco de celofán durante 48 horas a 4 grados frente a agua destilada renovada dos veces, liofilizándose después. Estos preparados enzimáticos liofilizados fueron utilizados directamente en aquellas experiencias en que no se requería enzima con un alto grado de pureza (curvas de pH , resistencia térmica, etc.); no obstante, la fracción fosfatásica ácida de elución más tardía se mostró extremadamente pura, y fue usada como tal, sin manipulación posterior, en ensayos que reclamaban material muy purificado (composición en aminoácidos de las proteínas enzimáticas, etc.).

b) *Purificación de la fracción enzimática de elución temprana.* Se utilizó como material de partida el preparado liofilizado obtenido en el fraccionado anterior, que se disuelve en solución tampón veronal-maleato M/50 $pH = 8,6$.

En un primer paso se empleó una pequeña columna (10×1 cm) de DEAE-celulosa D-50 equilibrada con el mismo tampón en que se disuelve el liofilizado.

Se establece un gradiente de elución discontinuo descendente de pH , desde el valor 8,6 hasta el 4,4 con variaciones de 0,2 unidades de uno a otro, mediante soluciones tampón veronal-maleato M/50 entre los extremos 8,6 y 7,0, y maleico-maleato M/50 entre los 6,8 y 4,4. De cada solución se emplearon 10 ml, determinándose en cada caso proteínas y actividad fosfatásica ácida.

Las fracciones con fuerte actividad enzimática se reunieron, dializaron en las condiciones antes indicadas y finalmente se liofilizaron. El material liofilizado se volvió a disolver en solución tampón veronal-maleato M/100 $pH = 8,6$, repitiéndose el fraccionado en una columna análoga, equilibrada con el tampón indicado. Se establece un gradiente discontinuo de pH , idéntico en todo al anterior, pero con soluciones tampón M/100. Al igual que antes se determinaron proteínas y actividad enzimática en cada una de las fracciones, reuniéndose las de mayor actividad, se dializan y liofilizan.

2. CRITERIOS DE PUREZA. A lo largo de todo el proceso de purificación se controló la actividad enzimática de cada uno de los preparados obtenidos mediante el cálculo de la actividad específica, definida como moles de P liberados por mg de proteína, después de incubación a 37 grados durante 30 minutos a $pH = 4,8$ de tampón cítrico-citrato M/20, frente a una concentración de sustrato en la mezcla de incubación de $1,14 \times 10^{-3}$ M.

Otras veces se expresó en miliunidades/ml (munid/ml), viniendo definida una unidad como la cantidad de enzima que transforma 1 micromol de sustrato al cabo de 1 minuto de incubación a 37 grados, en solución $pH = 4,8$ de tampón cítrico-citrato M/20, frente a una concentración de sustrato en la mezcla de incubación de $1,14 \times 10^{-3}$ M. Este valor viene referido a 1 ml de solución enzimática.

La existencia de posible actividad fosfatásica alcalina fue investigada a lo largo de todo el fraccionado de base, efectuan-

do incubaciones análogas en solución tampón de glicina M/20 $pH = 10,5$ en presencia de Cl_2Mg 5×10^{-4} M; en este caso la unidad de actividad enzimática (unidad/ml) quedaba definida de forma análoga en las condiciones nuevas de pH . Por otro lado, fueron comparados los resultados de actividad fosfatásica ácida hallados operando directamente sobre las diversas fracciones, con los encontrados después de llevar el pH de todas ellas al valor 4,8 de la solución tampón de incubación, por adición gota a gota de ácido acético al 20 %.

Como criterio de pureza se usó, además, el desarrollo electroforético de los distintos preparados enzimáticos obtenidos. Se efectuaron electroforesis en papel Whatman n.º 1 a $pH = 8,6$ en tampón veronal-veronal sódico f.i. = 0,1 con tiempos de desarrollo de 16 horas a 110 voltios, usando cubeta «en tejado» tipo Durrum. El revelado de las bandas se efectuó habitualmente con negro de amido (56), localizándose la posición de emigración electroforética por comparación con un suero humano standard. Otras veces el revelado se efectuó por detección de la actividad enzimática sobre el papel, pulverizándolo una vez terminado el desarrollo con la misma solución tamponada de p-nitro-fenil-fosfato usada en la determinación de actividad en tubo de ensayo, incubando la tira en cámara húmeda a 37 grados durante 60 minutos, y pulverizando finalmente solución N/20 de NaOH; las zonas de papel que contienen fosfatasa ácida aparecen teñidas de amarillo.

3. INFLUENCIA DEL pH . Se determinó para los dos preparados enzimáticos aislados (el de elución temprana en el fraccionado de base, que llamaremos fosfatasa ácida I, y el de elución tardía, que llamaremos fosfatasa ácida II) frente a tres sustratos: p-nitro-fenil-fosfato, fenil-fosfato y tetracolumín-fenoltaleín-difosfato. Los sustratos se emplearon a concentración final en la mezcla de incuba-

ción $1,14 \times 10^{-3}$ M, disueltos en una gama de tampones cítrico-citrato M/20 de pH comprendidos entre los valores 3,00 y 6,20 con variaciones aproximadas de 0,2 unidades entre uno y otro. Las soluciones enzimáticas fueron preparadas por disolución de los liofilizados en agua destilada, determinándose el contenido proteico de las mismas según LOWRY.

Las mezclas de incubación contenían: sustratos $1,37 \times 10^{-3}$ M en tampón cítrico-citrato M/20 de los pH indicados (1 ml) y solución enzimática (0,2 ml); los tiempos de incubación fueron de 30 minutos a 37 grados, deteniéndose las reacciones al cabo de los mismos mediante los reactivos usados para medir la intensidad de la reacción hidrolítica enzimática. En los casos en que se usa el p-nitro-fenil-fosfato como sustrato, el grado de hidrólisis del mismo se mide dosificando el p-nitro-fenol liberado, por lectura colorimétrica en medio alcalino; cuando se usa el fenil-fosfato y el tetracolumín-fenoltaleín-difosfato, por dosificación del fosfato inorgánico que queda en libertad, según FISKE y col. (53). En todos los casos se prepararon blancos análogos que llevaban en lugar de solución enzimática un volumen análogo de agua destilada.

4. INFLUENCIA DEL TIEMPO DE INCUBACIÓN, DE LA CONCENTRACIÓN DE SUSTRATO Y DE LA CONCENTRACIÓN DE ENZIMA; CONSTANTE DE MICHAELIS. Se empleó como sustrato el p-nitro-fenil-fosfato en solución tampón de cítrico-citrato M/20 $pH = 4,8$ a las siguientes concentraciones finales en las mezclas de incubación: $0,14 \times 10^{-3}$ M; $0,28 \times 10^{-3}$ M; $0,57 \times 10^{-3}$ M; $1,14 \times 10^{-3}$ M; $2,29 \times 10^{-3}$ M; $4,58 \times 10^{-3}$ M, y $9,16 \times 10^{-3}$ M. Los tiempos de reacción fueron para cada concentración de sustrato y enzima: 2, 4, 6, 8, 10, 15, 20, 25 y 30 minutos, determinándose al final de los mismos el grado de hidrólisis por medida del p-nitro-fenol liberado. Se prepararon también los correspondientes blancos sin solución enzimática.

Las mezclas de incubación estaban

constituidas por: sustrato a las concentraciones $0,17 \times 10^{-3}$ M; $0,34 \times 10^{-3}$ M; $0,68 \times 10^{-3}$ M; $1,37 \times 10^{-3}$ M; $2,75 \times 10^{-3}$ M; $5,50 \times 10^{-3}$ M, y $11,00 \times 10^{-3}$ M en tampón cítrico-citrato M/20 pH = 4,8 (1 ml) y solución enzimática (0,2 ml), con incubaciones a 37 grados durante los tiempos mencionados arriba.

Con los resultados así obtenidos se calcularon los valores de K_m según LINEWEAVER-BURK (85).

5. pH ISOELÉCTRICO Y MOVILIDAD ELECTROFORÉTICA. El pH isoeléctrico de ambos enzimas fue calculado según LAMPSON y TYTELL (84), fijando el preparado enzimático sobre una pequeña columna de DEAE-celulosa D-50 (3×1 cm) estabilizada con una solución tampón de pH y fuerza iónica adecuados, y efectuando una elución discontinua mediante soluciones tampón de pH progresivamente decreciente respecto al de estabilización de la columna, y de fuerza iónica análoga.

Para la fosfatasa ácida I se estabilizó la columna con una solución tampón de veronal-maleato pH = 8,6 y f.i. = 0,01; las eluciones se llevaron a cabo con volúmenes de 7 ml de soluciones tampón veronal-maleato f.i. = 0,01 entre los pH 8,6 y 7,0, y maleico-maleato f.i. = 0,01 entre los valores 6,8 y 4,0, con intervalos de 0,2 unidades de pH entre una y otra. Todos los tampones se prepararon a una molaridad M/100, agregándoles la cantidad calculada de cloruro sódico, en los casos necesarios, para conseguir la fuerza iónica indicada. En el caso de la fosfatasa ácida II la estabilización y elución se llevó a cabo con soluciones análogas, pero de fuerza iónica superior; en este caso los tampones se prepararon a una molaridad M/10, llevándolos en los casos necesarios a la f.i. = 0,10 por adición de cloruro sódico.

En los eluidos se determinaron proteínas y actividad fosfatásica ácida según BESSEY-LOWRY, localizándose así fácilmente el pH de elución del enzima.

De acuerdo con DREVON (37), utilizan-

do su ábaco de movilidades standard relativas para las distintas fracciones proteicas séricas, y las absolutas de 6,48 cm para la albúmina y de 1,27 cm para la gammaglobulina, se calculan las movilidades relativas de las fracciones enzimáticas detectadas en un desarrollo electroforético en papel, en las condiciones mencionadas anteriormente en el epígrafe 2.

Resultados

Han sido manipuladas en total 18 próstatas humanas, cuyo peso ha oscilado entre los 15 y los 200 gramos. Si bien no se ha seguido un control anatómico-patológico en los órganos extirpados, las características de tamaño, peso, dureza, existencia o no de varios lóbulos, y el carácter recidivante en algunos pacientes, permitió disponer de un criterio suficientemente sólido sobre el grado de hipertrofia y la existencia o no de adenoma en las glándulas estudiadas.

1. a) Todos los órganos han sido sometidos al fraccionamiento de base antes indicado, habiéndose en unos casos puesto de manifiesto una sola, y en otros dos, fracciones con actividad fosfatásica ácida. Siempre se ha observado un completo paralelismo entre este hecho y el grado de hipertrofia de la glándula considerado en función del peso, de tal forma que mientras era constante la presencia de la fracción enzimática de elución tardía, la de elución temprana era tanto más evidente cuanto mayor fuera el grado de hipertrofia, llegando a anularse en las próstatas estudiadas de más bajo peso. Por otro lado, la localización de ambas fracciones enzimáticas a lo largo del fraccionado era siempre la misma. El enzima de elución tardía empezaba a fluir al comenzar la tercera fase del fraccionado de base, mientras que el de elución temprana lo hacía siempre al comienzo de la primera fase del fraccionado.

Las figuras 1 y 2 constituyen sendos ejemplos de fraccionados de extractos

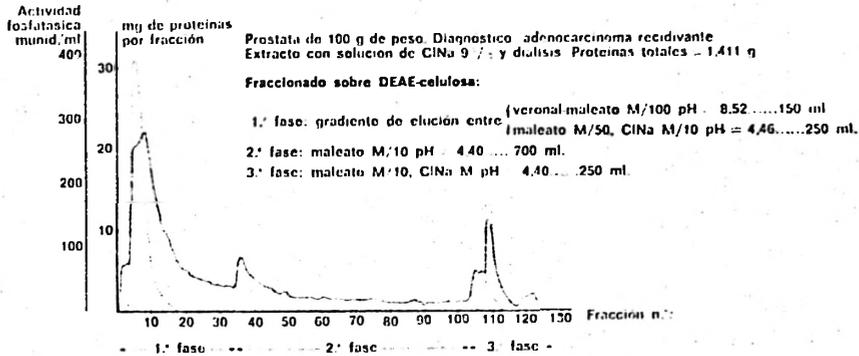


FIG. 1. Fraccionado de base de una próstata hipertrófica (100 g de peso). Línea llena = cantidad de proteínas; línea puntillada = actividad enzimática.

prostáticos procedentes de una glándula fuertemente hipertrofiada (100 g de peso en un caso de adenocarcinoma recidivante), y de una glándula de hipertrofia nula (15 g de peso), respectivamente.

ferior de la figura esquematiza esta última fase.

2. La evolución del proceso de purificación seguido con las glándulas prostáticas queda esquematizado en la tabla I, en donde se exponen los valores de actividad específica encontrados en las diversas fa-

Próstata de 15 g de peso. Pequeño grado de hipertrofia. Extracto con solución de ClNa 9‰ y diálisis. Proteínas totales = 0.096 g.

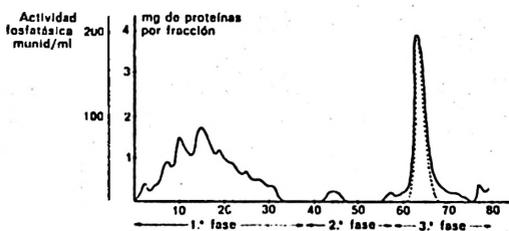


FIG. 2. Fraccionado de base de una próstata normal (15 g de peso). Línea llena = cantidad de proteínas; línea puntillada = actividad enzimática.

b) La figura 3 representa el proceso de purificación ulterior de la fosfatasa ácida de elución temprana, aislada en el fraccionamiento de base esquematizado en la figura 1. En éste fueron reunidas las fracciones 4 a 15 y cromatografiadas según se describe; la parte superior de la figura muestra el desarrollo del fraccionado. Reunidas de nuevo las fracciones 1 a 6 del mismo, se recromatografiaron nuevamente en las condiciones indicadas; la parte in-

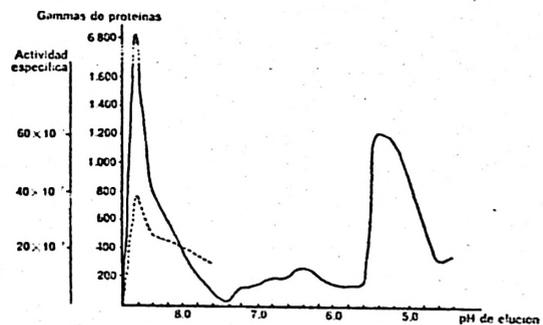


FIG. 3. Purificación de la fosfatasa ácida I de próstata; condiciones en el texto. Línea llena = cantidad de proteínas; línea puntillada = actividad enzimática.

TABLA I

Evolución de la purificación de las fosfatasas ácidas en una próstata hipertrófica (100 g) y en una próstata normal (15 g). Valores expresados en actividades específicas (moles de P liberados por miligramo de proteína durante 30 minutos de incubación a 37°, a partir de p-NO₂-fenilfosfato 1,14 × 10⁻³ M en tampón citrato pH = 4,8); se indica también el número de veces que se ha purificado respecto al material de partida.

| Fracción | Próstata 100 g de peso | | Próstata 15 g de peso | |
|---------------------|-----------------------------------|---------------------------------|-------------------------|----------------------------------|
| | Fosfatasa I | Fosfatasa II | Fosfatasa I | Fosfatasa II |
| Extracto crudo | 7 × 10 ⁻⁸ M | | 30 × 10 ⁻⁸ M | |
| Fraccionado de base | 15 × 10 ⁻⁷ M (21 v.) | 55 × 10 ⁻⁷ M (78 v.) | — | 118 × 10 ⁻⁷ M (39 v.) |
| Segundo fraccionado | 23 × 10 ⁻⁷ M (34 v.) | — | — | — |
| Tercer fraccionado | 344 × 10 ⁻⁷ M (491 v.) | — | — | — |

TABLA II

Zonas con actividad fosfatásica ácida en el fraccionado sobre DEAE-celulosa de un extracto crudo de próstata hipertrófica (80 g). Actividades de fosfatasa ácida (A. F. ácida) (a pH sin corregir y corregido al valor 4,8) y de fosfatasa alcalina (A. F. alcalina). Valores expresados en munid/ml (1 unidad = cantidad de enzima que transforma 1 micromol de sustrato al cabo de 1 minuto de incubación a 37°, a una concentración de p-NO₂-fenilfosfato 1,14 × 10⁻³ M en tampón citrato pH = 4,8 para la fosfatasa ácida, y en tampón de glicina pH = 10,5 para la fosfatasa alcalina).

| Fracción núm. | A F ácida (munid/ml) | | A. F. alcalina (munid/ml) |
|---------------|----------------------|--------------|---------------------------|
| | pH sin corregir | pH corregido | |
| Fosfatasa I | | | |
| 10 | 29 | 18 | 26 |
| 11 | 138 | 134 | 25 |
| 12 | 530 | 345 | 24 |
| 13 | 540 | 470 | 17 |
| 14 | 220 | 165 | 13 |
| 15 | 28 | 34 | 8 |
| 16 | 17 | 15 | 4 |
| Fosfatasa II | | | |
| 40 | 450 | 415 | 11 |

ses de purificación de ambas fosfatasas ácidas de la próstata de 100 g de peso, así como de la fosfatasa ácida II de la prós-

tata de 15 g de peso, antes mencionadas. También se indica entre paréntesis el grado de purificación conseguido en cada uno de los pasos respecto al preparado original, expresado en número de veces.

En la tabla II se exponen los valores de actividad enzimática encontrados para las fracciones activas del fraccionado de base de una próstata hipertrofiada de 80 gramos de peso. Las actividades fosfatásicas ácidas han sido calculadas directamente sobre los eluidos, y sobre los eluidos cuyo pH ha sido llevado previamente al valor 4,8. Paralelamente se han calculado las actividades de fosfatasa alcalina.

El control electroforético de las diversas preparaciones enzimáticas ha sido seguido como criterio complementario de pureza en todos los fraccionados de glándulas prostáticas. Como ejemplo se muestra en la figura 4 el desarrollo electroforético correspondiente a los preparados de fosfatasa ácida I y II, obtenidos a partir de la próstata hipertrófica de 100 g de peso cuyas actividades específicas se reseñaban en la tabla I.

3. En la figura 5 aparece claramente expuesta la evolución de la actividad enzimática correspondiente a las fosfatasas ácidas I y II frente al p-nitro-fenil-fosfato, el fenil-fosfato y el tetracolumín-fenolf-taleín-difosfato, a una gama de pH comprendida entre 3,00 y 6,20.

4. La influencia del tiempo de incuba-

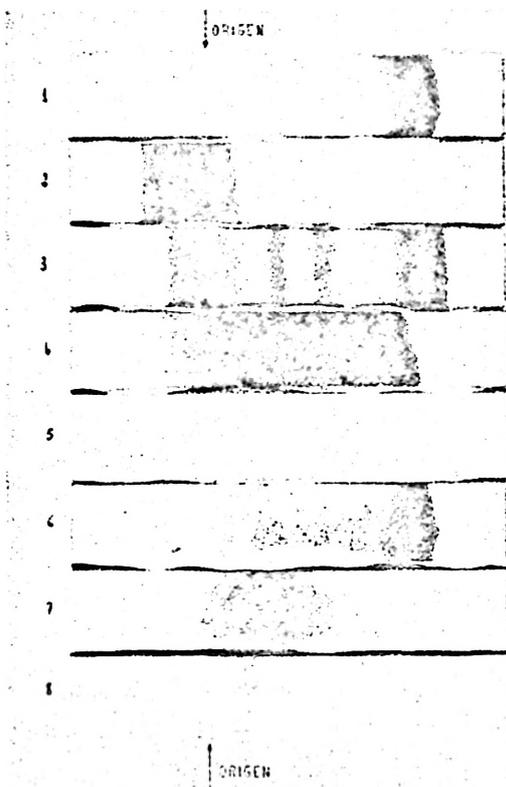


FIG. 4. Control electroforético de preparados enzimáticos de una próstata hipertrófica (100 gramos de peso) en diferentes estadios de purificación; condiciones en el texto. 1, seroalbúmina; 2, gamma-globulina; 3, suero humano normal; 4, extracto crudo de la glándula; 6, preparado de fosfatasa II (fraccionado de base); 7, preparado de fosfatasa I (fraccionado de base); 8, preparado de fosfatasa I (fraccionado 3.º); tinción con negro de amido. 5, extracto crudo de la glándula; revelado enzimático.

ción sobre la actividad enzimática viene indicada en las figuras 6 y 7, correspondientes a los preparados enzimáticos de fosfatasa ácida I y II, respectivamente. La experiencia se ha montado a diferentes concentraciones de sustrato.

En las figuras 8 y 9 aparece más claramente cómo interviene la concentración de sustrato en la actividad enzimática. En realidad el factor fundamental es la relación concentración de sustrato/concentración de enzima, y en este sentido vienen también indicadas las actividades en función de la concentración de sustrato por unidad de peso de proteína en el preparado enzimático.

A partir de toda esta serie de datos se han calculado los valores de la constante de Michaelis para las fosfatasas I y II frente al p-nitro-fenil-fosfato como sustrato. Se ha seguido el procedimiento de Lineweaver-Burk, con representación de $1/v$ frente a $1/S$, y cálculo del valor de K_m en el sistema coordinado correspondiente. Las figuras 10 y 11 nos muestran esto para los dos enzimas.

5. El desarrollo del proceso de elución de la pequeña columna de DEAE-celulosa en función del pH de las soluciones eluyentes, viene expuesto en la tabla III. Resulta fácil ver el momento en que tiene lugar la elución de ambos enzimas, a $pH = 5.4$ y $pH = 4.6$ para las fosfatasas ácidas I y II, respectivamente. En dicha tabla se indican, además de las actividades especí-

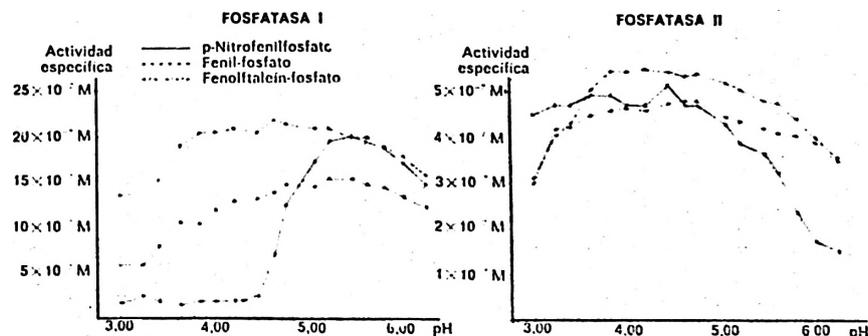


FIG. 5. Influencia del pH de incubación sobre la actividad enzimática; condiciones en el texto.

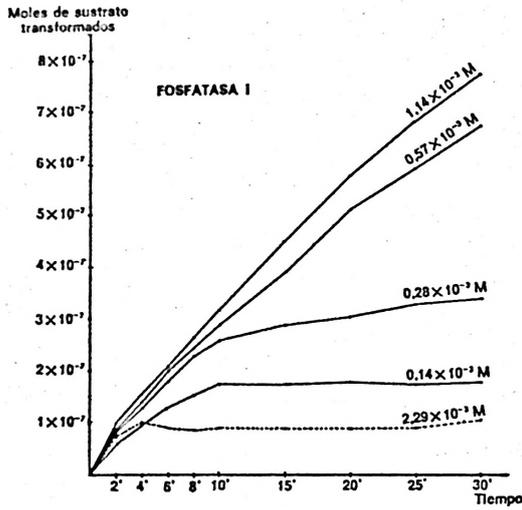


FIG. 6. Influencia del tiempo de incubación sobre la actividad enzimática (fosfatasa ácida I); condiciones en el texto.

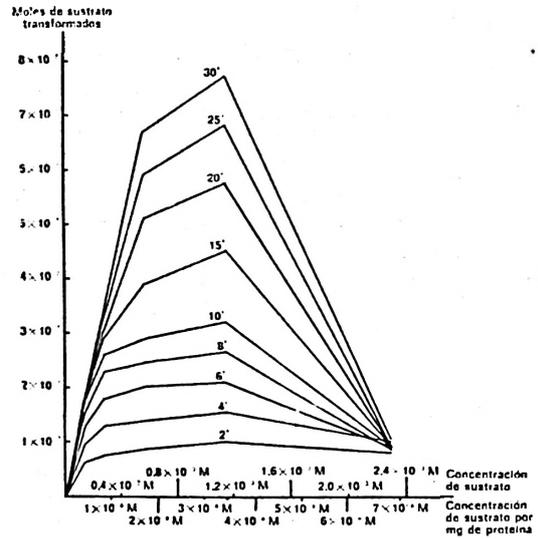


FIG. 8. Influencia de la concentración de sustrato y enzima sobre la actividad enzimática (fosfatasa ácida I); condiciones en el texto.

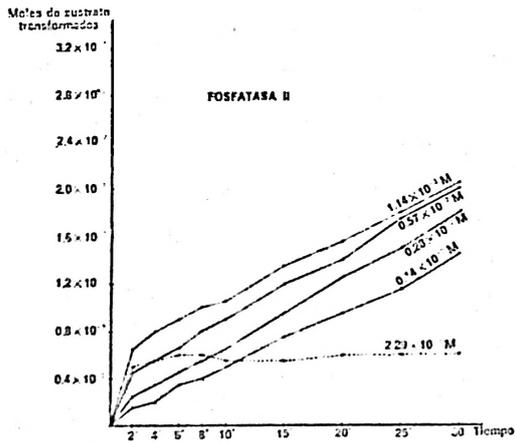


FIG. 7. Influencia del tiempo de incubación sobre la actividad enzimática (fosfatasa ácida II); condiciones en el texto.

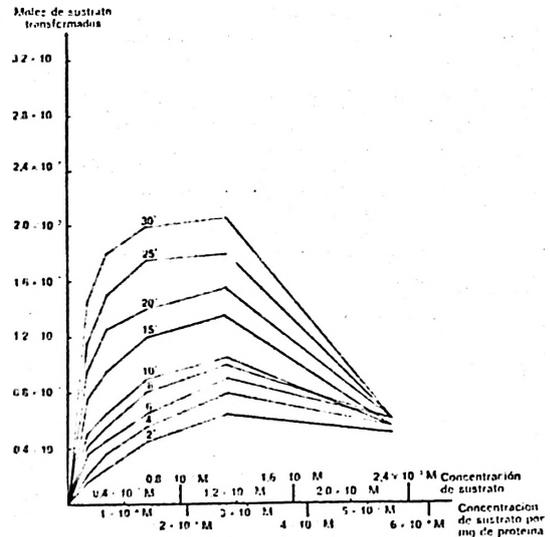


FIG. 9. Influencia de la concentración de sustrato y enzima sobre la actividad enzimática (fosfatasa ácida II); condiciones en el texto.

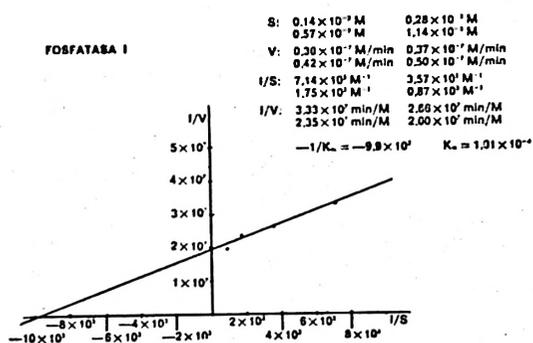


FIG. 10. Cálculo de K_m según Lineweaver-Burk (fosfatasa ácida I).

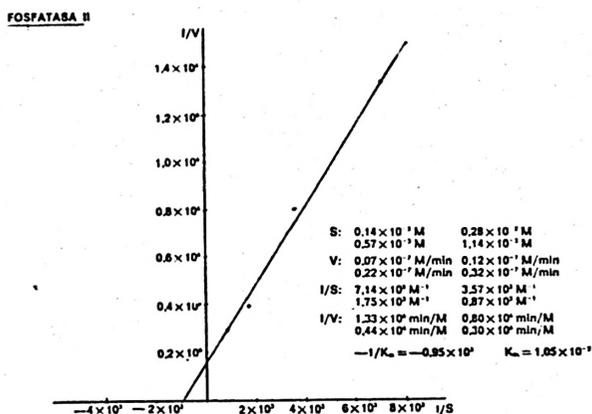


FIG. 11. Cálculo de K_m según Lineweaver-Burk (fosfatasa ácida II).

cas, la cantidad de proteínas que eluyen a cada valor de pH.

Comparados los desarrollos electroforéticos de los dos preparados enzimáticos con el ábaco de Drevon, se obtuvo para la fosfatasa I una movilidad de 2,57, intermedia entre las de la albúmina y la alfa₁-globulina séricas, y para la fosfatasa II una de 5,96, entre las de las globulinas-beta y globulinas-gamma.

TABLA III

Proceso de elución de las fracciones enzimáticas I y II de una pequeña columna (3 por 1 cm) de DEAE-celulosa. Soluciones tampón de veronal-maleato (entre los pH 8,6 y 7,0) y de maleico-maleato (entre los pH 6,8 y 4,0), de f. i. = 0,01 para la fracción I y f. i. = 0,1 para la fracción II. Valores expresados en gammas de proteínas por tubo, y en actividades específicas (A. E.) (moles de P liberados por miligramo de proteína durante 30 minutos de incubación a 37°, a partir de p-NO₂-fenilfosfato 1,14 x 10⁻³ M en tampón citrato pH = 4,8).

| pH solución | Fosfatasa I | | Fosfatasa II | |
|------------------------|-------------|--------------------------|--------------|--------------------------|
| | Prot. µg | A. E. x 10 ⁻¹ | Prot. µg | A. E. x 10 ⁻¹ |
| Veronal-maleato | | | | |
| 8,6 | 225 | — | 105 | — |
| 8,4 | 105 | — | 50 | — |
| 8,2 | 50 | — | 21 | — |
| 8,0 | 53 | — | 21 | — |
| 7,8 | 70 | — | — | — |
| 7,6 | 210 | — | 8 | — |
| 7,4 | 329 | — | 10 | — |
| 7,2 | 420 | — | 8 | — |
| 7,0 | 385 | — | 8 | — |
| Maleico-maleato | | | | |
| 6,8 | 224 | — | — | — |
| 6,6 | 245 | — | 8 | — |
| 6,4 | 35 | — | 3 | — |
| 6,2 | 33 | — | 5 | — |
| 6,0 | 70 | — | 10 | — |
| 5,8 | 33 | — | — | — |
| 5,6 | 70 | — | — | — |
| 5,4 | 105 | 32 | — | — |
| 5,2 | 21 | 210 | 3 | — |
| 5,0 | 16 | 157 | — | — |
| 4,8 | 52 | 33 | — | — |
| 4,6 | 34 | — | 595 | 50 |
| 4,4 | 16 | — | 945 | 42 |
| 4,2 | 16 | — | 819 | 43 |
| 4,0 | 10 | — | 200 | 1 |

Discusión

Los primeros intentos serios efectuados para obtener fosfatasa ácida purificada se llevaron a cabo en tubérculo de patata (61, 62, 104, 110). Este mismo material ha sido utilizado más recientemente por ANDREU y col. (4), habiendo conseguido preparados enzimáticos unas 1.500 veces más puros que los extractos crudos. No obstante, los métodos de purificación utilizados (precipitaciones fraccionadas con acetona y etanol) no creemos sean idóneos para este caso, pues es muy probable el que tenga lugar una parcial desnaturalización, con la consiguiente dificultad de obtención de resultados repetitivos.

Mucho más inocuos, y de una mayor capacidad resolutive, son los procedimientos de fraccionado sobre cambiadores iónicos de celulosas modificadas y filtración molecular sobre columnas de Sephadex, que de hecho se usan de una forma general en la actualidad en los procesos de purificación proteica. La primera descripción de una separación de isoenzimas de fosfatasa ácida es la conseguida por HOFSTEN y PORATH (67) en extractos de *Escherichia coli*, que aislaron dos fracciones activas utilizando la filtración molecular por columnas de Sephadex G-75, seguido de electroforesis en columna a $pH = 8,2$ de la fracción activa primeramente obtenida. Estos mismos autores (68) lograron posteriormente obtener tres fracciones activas acoplando a esos dos procesos un fraccionado previo sobre DEAE-Sephadex y SE-Sephadex.

El proceso de purificación de la fosfatasa ácida de eritrocitos mediante el uso de columnas de Sephadex G-200 condujo también a ESTBORN (42) a la separación de dos isoenzimas.

La primera aplicación de los cambiadores iónicos a la purificación del enzima prostático ha sido hecha por OSTROWSKI y colaboradores (36, 99, 101), los cuales empleando grandes columnas de DEAE-celulosa consiguieron obtener un prepa-

rado de fuerte actividad, a partir de un extracto de numerosas glándulas prostáticas homogeneizadas juntamente. Posteriormente, OSTROWSKI y RYBARSKA (100) han logrado separar dos enzimas con actividad fosfatásica ácida, utilizando para ello una columna de CM-celulosa equilibrada a $pH = 4$ con tampón Mc Ilvaine M/100, y estableciendo un gradiente continuo de pH de 4 a 5, y de M/100 a M/50 con dicho tampón.

Indudablemente estas dos fracciones son las mismas que las obtenidas por nosotros, si bien el orden de elución de la columna es inverso por tratarse de un cambiador catiónico. Efectivamente, los autores indican que la primera fracción, la mayoritaria por representar el 70 % del enzima total, eluye entre pH 4,5 y 4,8, mientras que la segunda lo hace entre valores de 4,8 y 5,0. Esto quiere decir que la fracción mayoritaria se corresponde con la llamada por nosotros fosfatasa ácida II, la de presencia constante en todas las próstatas; ahora bien, dado que en las próstatas muy hipertrofiadas el contenido enzimático en dicha fosfatasa es evidentemente menor que en la fosfatasa ácida I, resulta forzoso pensar que OSTROWSKI y RYBARSKA han debido operar con un extracto bruto procedente de una mezcla de glándulas, en las que un porcentaje apreciable serán no hipertróficas o, al menos, no adenomatosas.

Algo similar se deduce de los resultados hallados por VERNON y col. (124), los cuales parten de un extracto prostático obtenido a partir de un lote de 13 glándulas. En este caso los autores efectúan una previa purificación del extracto por precipitación fraccionada con sulfato amónico, seguido de una adsorción sencilla sobre DEAE-celulosa y filtración por columna de Sephadex G-100. El fraccionado propiamente dicho es efectuado sobre DEAE-celulosa mediante gradiente continuo entre M/50 y M/5 con solución tampón acetato de $pH = 5,2$. Aparecen dos fracciones, una primera minoritaria, y una se-

gunda que representa aproximadamente el 65 % de la actividad total.

Desde luego no resulta posible establecer comparaciones, entre estos dos casos citados y tal como lo hemos conseguido nosotros, referentes a las condiciones de pH y fuerza iónica que reinan en el cambiador en el momento de elución de ambas enzimas, toda vez que las condiciones del fraccionado difieren en muchos aspectos. No obstante, los valores extremos entre los que tiene lugar el gradiente permite suponer que el proceso es, en general, substancialmente el mismo, pudiéndose asimilar las dos fracciones enzimáticas obtenidas por los dos grupos de trabajo mencionados con las obtenidas por nosotros.

OSTROWSKI y RYBARKA (100) comprueban la homogeneidad del componente enzimático mayoritario por electroforesis libre a pH diferentes, pero no indican nada respecto a su movilidad y carácter; análogamente hacen VERNON y col. (124) por electroforesis en gel de almidón con las dos fracciones aisladas. En realidad la presencia de dos fracciones con actividad de fosfatasa ácida en los extractos prostáticos humanos ya había sido indicada en el terreno analítico por SUR y col. (118) utilizando la electroforesis en gel de almidón, y por SHULAM y col. (113) mediante técnicas inmunolectroforéticas, pero en ningún caso se indican las características proteicas y movilidades de ambas enzimas. Nosotros hemos podido demostrar el carácter de globulina-alfa, de la fosfatasa ácida de elución tardía, la mayoritaria de OSTROWSKI y de VERNON, y el carácter de globulina-beta lenta del enzima de elución temprana.

El procedimiento de fraccionado y purificación propuesto por nosotros se muestra de sencilla ejecución, suministra directamente un preparado de fosfatasa ácida II de fuerte actividad específica y un preparado de fosfatasa I que llega a alcanzar, previo dos nuevos fraccionados simples posteriores, un grado de purifica-

ción del orden de 500 veces el del extracto crudo. Sin embargo, su mayor ventaja radica en que ambas enzimas eluyen de la columna en zonas muy separadas, sin posibilidad de superposición, ya que si bien el enzima II se acumula en pocas fracciones, la fosfatasa I llega a tener una banda de elución muy ancha en los casos de próstatas adenomatosas, fuertemente hipertrofiadas. La reproductibilidad del método es completa y permite, a la vista de los resultados obtenidos con las 18 glándulas estudiadas, establecer que la fosfatasa II se encuentra presente en todos los casos, y a un nivel independiente del grado de hipertrofia del órgano. Por lo que respecta a la fosfatasa I se ha observado en todos los casos un paralelismo completo entre grado de hipertrofia y nivel enzimático, con desaparición de dicha fracción en los casos de nula hipertrofia.

Este hecho, cuya conveniencia de investigar ya había sido señalada por VERNON y colaboradores (124), aparece sumamente interesante en orden al conocimiento de la bioquímica y metabolismo de la próstata cancerosa. En tal sentido hemos efectuado un estudio de las características físico-químicas y cinéticas de ambas enzimas. Pero, además, encierra una gran importancia clínica para un posible diagnóstico del adenoma de próstata. Ya hemos señalado anteriormente las diferentes fuentes de fosfatasa ácida sérica y el escaso valor diagnóstico que tiene el cálculo de este nivel enzimático en forma global. Por otro lado, y aún admitiendo una inhibición total y completamente específica del enzima prostático por el l-tartrato, también dejamos indicado que varios trabajos (18, 63) han señalado que el nivel de la fracción fosfatásica ácida sérica de origen prostático puede venir afectado por otros factores ajenos a la neoplasia. Todo ello hace necesario, con vistas a un diagnóstico más específico y preciso, efectuar las determinaciones clínicas sobre la entidad química enzimática ligada a la hipertrofia prostática en relación causa-efecto,

lo más purificada posible o, al menos, individualizada de cualquier otra entidad de acción enzimática análoga.

Como es natural, las determinaciones sobre el material prostático sólo podrán tener una utilidad de confirmación pronóstica «a posteriori». Con fines diagnósticos será necesario recurrir a fluidos o secreciones orgánicas de fácil e inocuo acceso, en las cuales haya una reproducción de las alteraciones enzimáticas específicas que tienen lugar en la próstata, es decir, un aumento del nivel de la fosfatasa ácida I. Los más directamente relacionados con la secreción prostática son la orina y el semen y, finalmente, el suero sanguíneo.

Las referencias bibliográficas referentes a determinaciones de actividad fosfatásica ácida en orina son muy escasas (23, 45), y a la existencia de un bajo nivel enzimático se une la de una fácil y rápida inactivación del enzima en dicho medio. Más abundantes son las referencias a dicha actividad enzimática en el semen humano, fundamento por otro lado de una técnica de investigación de manchas de esperma (126). Usando una técnica de electroforesis en papel, NYLANDER (98) localiza una fracción fosfatásica ácida en el semen, con movilidad de globulina-alfa; por otro lado, ESTBORN y SWEDIN (43) efectúan un estudio electroforético en gel de almidón del esperma humano, y encuentran que la primera porción del eyaculado, que se admite corresponde fundamentalmente a la secreción prostática, presenta una fracción con actividad de fosfatasa ácida con una movilidad ligeramente inferior a la de la albúmina, muy próxima a la globulina-alfa.

Estos resultados, perfectamente concordantes entre sí, lo son también con los obtenidos por nosotros, que hemos encontrado que la fracción fosfatásica ácida II de próstata tiene una movilidad electroforética de globulina-alfa. La no existencia de la fracción I, a la que calculamos una movilidad de beta-globulina, en los desa-

arrollos electroforéticos del esperma, puede ser debida al hecho ya mencionado de que esta fracción está ausente en los individuos sin afección prostática adenomatosa, y por tanto también lo estaría en su esperma. Por el contrario, VERNON y col. (124) aplican su técnica de fraccionado sobre DEAE-celulosa al plasma seminal humano, y encuentran dos fracciones con actividad de fosfatasa ácida en un individuo normal; no obstante, los autores puntualizan que ambas fracciones eluyen en posiciones diferentes a los enzimas de próstata, y presentan un peso molecular mucho más bajo, de lo que deducen que no puede tratarse de los mismos enzimas, al menos sin haber sufrido alguna modificación en su estructura molecular. Este hecho, junto con la falta de ensayos análogos efectuados en esperma de individuos afectados de adenoma de próstata, disminuye notablemente la utilidad de la secreción espermática a efectos diagnósticos de este tipo.

Los estudios efectuados hasta ahora sobre la actividad fosfatásica ácida en el suero, muestran resultados muy contradictorios. Utilizando una técnica de electroforesis en papel y empleando sueros de elevada actividad enzimática, DELCOURT y DELCOURT (32), localizan una fracción enzimática de movilidad de globulina-beta; por el contrario, y utilizando la misma técnica, EISFELD y KOCH (40) localizan el enzima prostático como una globulina-alfa. Ciertamente estos resultados, con ser contradictorios, admiten poca correspondencia con los encontrados por nosotros en los desarrollos electroforéticos de los enzimas prostáticos, resultando aventurado establecer similitudes entre estas fracciones séricas y las prostáticas.

Más concordantes son los resultados obtenidos en la electroforesis en gel de almidón. ESTBORN (41) y de GOUCHY (55) obtienen con esta técnica, y utilizando sueros de individuos con cáncer de próstata, una fracción enzimática localizada en la región post-albuminoidea, en una zona muy

próxima a la de la globulina-alfa₂ rápida. Análogamente ROSENBERG (108), usando la electroforesis en bloque de almidón y un suero de un individuo con carcinoma prostático metastatizado, detecta una fracción con actividad de fosfatasa ácida entre las globulinas-alfa₁ y las globulinas-alfa₂. Y GOLDBERG y col. (54), empleando la técnica de electroforesis sobre gel de poliacrilamida, encuentra en sueros normales tanto de hombres como de mujeres una sola banda con dicha actividad enzimática, localizándose en una zona similar, la misma que aparece en sueros de individuos con carcinoma de próstata, si bien menos intensa. Es posible, pues, pensar que esta fracción enzimática post-albuminoidea tan reiteradamente descrita sea la fosfatasa ácida II aislada por nosotros del tejido prostático.

En este caso habría que pensar que, o bien el enzima I de próstata no pasa al suero, o se inactiva fácilmente en él, o adquiere unas nuevas características físico-químicas que le imponen una movilidad análoga a la del enzima II.

Sin embargo, hay también descritos numerosos casos de detección de varias fracciones de fosfatasa ácida. DUBLES e HILBURN (38) hallan tres fracciones isoenzimáticas en sueros de individuos normales; NAIMAN y OSKI (95) demuestran la presencia de isoenzimas en sueros de personas con carcinoma prostático; y CZITOWER y colaboradores (24) localizan tres fracciones activas en sueros de individuos normales, y cuatro en los de individuos con carcinoma prostático. En todos estos casos se utilizó la técnica de electroforesis en gel de almidón.

De cualquier forma es evidente la necesidad de comparar estos resultados con los obtenidos en desarrollos electroforéticos análogos de sueros normales y, sobre todo, aplicando la técnica de fraccionado sobre DEAE-celulosa a sueros de individuos normales y con adenoma de próstata. Con referencia a esto último sólo hemos encontrado el trabajo de FAHEY y

colaboradores (44), que utilizando suero de un individuo con carcinoma metastatizado de próstata, y un sistema gradiente de elución sobre DEAE-celulosa, encuentra una sola fracción con actividad de fosfatasa ácida en la zona de elución de las albúminas. Las experiencias que por nuestra parte hemos hecho en tal sentido, han sido insuficientes para obtener resultados convincentes.

Existe una amplia bibliografía referente a la influencia del pH del medio sobre la estabilidad y sobre la actividad de las fosfatasas ácidas aisladas en diferentes materiales biológicos. La sensibilidad de estas enzimas a los cambios de pH es muy manifiesta, dependiendo incluso de este factor el que los efectos debidos a otras causas, fundamentalmente la temperatura, sean más o menos acentuadas (64); además, este efecto del pH sobre la actividad del enzima es generalmente irreversible, en especial en las zonas de pH desviadas hacia el lado alcalino del óptimo, siendo según KING y col. (78) ésta la causa de la pérdida de actividad que experimentan los sueros con el tiempo.

Por otro lado, constituye según NEUMANN (96) el pH el factor fundamental del control intracelular de la actividad fosfatásica y, por tanto, del contenido celular en metabolitos fosforilados, gracias a los alejamientos o acercamientos al valor de pH óptimo motivados por un control endocrino de la concentración de H⁺ en la célula.

Intimamente ligado a la influencia del pH sobre el enzima se encuentra el problema de la naturaleza del sistema tampón. En efecto, operando con el enzima aislado de próstata, LONDON y col. (86) encontraron que con un sistema tampón de acético-acetato se obtenían, a igualdad de pH, valores de actividad mucho menores que operando con otros sistemas; y análogamente, DOE y col. (34) observaron que, mientras con tampón citrato se obtenían actividades más altas de fosfatasa ácida prostática en el suero que cuando

se usaban otros, sucedía lo contrario con la fosfatasa ácida no prostática del mismo. Incluso el valor de *pH* óptimo de actividad puede quedar afectado según el tampón empleado, como se puede ver en la tabla IV con los resultados obtenidos por NIGAM y col. (97) con un preparado altamente purificado de fosfatasa ácida de próstata, cuyo *pH* óptimo calculan frente a tres sustratos diferentes y usando tres distintos sistemas tampones. Estos autores opinan que estas diferencias bien pueden deberse a la posibilidad de coexistencia de reacciones de transfosforilización cuando se usen tampones hidroxilados (50). Por el contrario, LUNDQUIST (89) opina que ello se debe al distinto poder quelante que tienen unos y otros tampones sobre trazas de metales pesados, habitualmente procedentes de los recipientes, y que actúan como inhibidores enzimáticos.

Se ha calculado el *pH* óptimo de fosfatasa de muy diverso origen, frente a diferentes sustratos y utilizando preparados enzimáticos más o menos purificados. En relación con esto último es conveniente anotar que las diferencias, tanto en lo que respecta a la influencia del *pH* como a los cálculos de cinética enzimática, no son muy patentes aun cuando se comparen los resultados obtenidos con extractos brutos y con preparados de alta purificación (121). En la tabla IV recogemos los valores que hemos hallado en la bibliografía, junto con los obtenidos por nosotros con las dos fracciones enzimáticas aisladas de próstata, frente a los tres sustratos ensayados.

A la vista de estos valores llama rápidamente la atención el hecho, ya señalado por numerosos investigadores (94), de la influencia que la naturaleza del sustrato ejerce sobre el valor del *pH* óptimo, y que llevó a MORTON (93) al extremo de decir que los sustratos naturales presentaban unos *pH* óptimos más altos que los de síntesis, por ser más próximos a los valores fisiológicos. Es éste un extremo difícil de comprobar en los resultados expuestos,

quizás por la falta de una gama amplia de sustratos naturales; si consideramos como tal al beta-glicerofosfato, sí que se cumple esa regla en los resultados encontrados por NIGAM y col. (97).

Considerando los valores encontrados por nosotros, salta a la vista en primer lugar que la fracción enzimática I tiene una zona óptima de *pH* más elevada que la fracción II, lo que avala el criterio de que se trata de dos enzimas distintos. Para la fosfatasa ácida I ese valor aparece muy marcado como 5,4 frente a un sustrato de p-nitro-fenil-fosfato, con una disminución brusca en actividad enzimática hacia uno y otro lado del mismo; y un valor similar, aunque menos conciso, aparece frente al fenil-fosfato. Para la fosfatasa ácida II se obtienen con ambos sustratos valores muy similares, alrededor de 4,5, pero con una delimitación mucho menos clara por existir una caída gradual en la actividad hacia las zonas tanto ácida como alcalina de la óptima.

Y tanto con uno como con otro enzima se obtienen resultados muy poco concretos, con mantenimiento de altas actividades en zonas de *pH* muy amplias, cuando es el tetracolamín-fenolftaleín-disfosfato el sustrato usado; este hecho debe estar relacionado con las afirmaciones de RJEKHINA (106) y PAUWELS, que indican lo poco adecuado que resulta el empleo del fenolftaleín-difosfato como sustrato para el estudio de la cinética de fosfatasa, por tener lugar su hidrólisis en dos fases sucesivas que transcurren a velocidades diferentes.

Si comparamos estos valores 5,4 y 4,5 de ambas fosfatasa, con el óptimo 5,0-5,2 encontrado por ABUL-FADL y KING (3), y con los 5,0 y 4,7 hallados por NIGAM y colaboradores (97) con tampón citrato, que es el usado por nosotros, frente al fenil-fosfato y al p-nitro-fenil-fosfato, respectivamente, vemos que nuestros dos valores encierran entre ellos a todos los demás. Esto tiene una fácil explicación si consideramos que tanto los estudios de

TABLA IV

Valores de pH óptimos de actividad y de K_{in} para fosfatasa ácida de diferente origen, frente a sustratos diversos.

| Material biológico | Sustrato | pH óptimo | K_{in} |
|--|----------------------------------|------------------|-------------------------|
| Tubérculo de patata (4)* | beta-glicerofosfato | 5,6 | $3,16 \times 10^{-3}$ M |
| <i>Tribolium confusum</i> (insecto) (26)* | fenil-fosfato | 6,4 | $6,34 \times 10^{-3}$ M |
| <i>Aedes aegypti</i> (insecto) (82) | beta-glicerofosfato | 4,4-5,4 | $8,57 \times 10^{-3}$ M |
| <i>Stomoxys calcitrans</i> (insecto) (5) | p-NO ₂ -fenil-fosfato | 4,4-5,4 | $1,74 \times 10^{-3}$ M |
| <i>Oncopeltus fasciatus</i> (insecto) (6) | p-NO ₂ -fenil-fosfato | 4,4-5,4 | $9,77 \times 10^{-4}$ M |
| Levaduras (21) | — | 6,5 | — |
| Plaquetas de conejo (27) | alfa y beta-glicerofosfato | 5,0-5,5 | — |
| Hígado de pollo (114) | — | 6,0-6,5 | — |
| Eritrocitos (hombre) (123) | p-NO ₂ -fenil-fosfato | 5,25-5,7 | — |
| Eritrocitos (buey y rata) (107): | | | |
| fracción primera. | — | 4,6-4,8 | — |
| fracción segunda | — | 5,0-5,5 | — |
| Eritrocitos (hombre, buey, conejo, oveja, cerdo y rata) (3): | | | |
| fracción primera. | fenil-fosfato | 4,3-4,8 | — |
| fracción segunda | fenil-fosfato | 5,0-5,7 | — |
| Suero sanguíneo (hombre), frac. prostática (72) | p-NO ₂ -fenil-fosfato | 5,0-6,0 | — |
| Suero sanguíneo (hombre), frac. prostática (111) | alfa-naftil-fosfato | 5,2 | — |
| | fenil-fosfato | 4,9 | — |
| Orina (humana) (23) | — | 5,2 | — |
| Próstata (hombre) (3) | fenil-fosfato | 5,0-5,2 | — |
| Próstata (hombre) (121) | fenil-fosfato | — | $1,5 \times 10^{-4}$ M |
| | beta-glicerofosfato | — | $2,4 \times 10^{-3}$ M |
| Próstata (hombre) (89) | fenil-fosfato | — | $1,0 \times 10^{-3}$ M |
| | beta-glicerofosfato | — | $1,3 \times 10^{-2}$ M |
| Próstata (hombre) (75) | beta-glicerofosfato | — | $1,1 \times 10^{-3}$ M |
| | 3-adenilato | — | $6,8 \times 10^{-3}$ M |
| | 2-adenilato | — | $2,8 \times 10^{-4}$ M |
| | p-NO ₂ -fenil-fosfato | — | $3,4 \times 10^{-5}$ M |
| | acetil-fosfato | — | $1,7 \times 10^{-4}$ M |
| Próstata (hombre) (97) | fenil-fosfato | 4,9 (t. acetato) | $7,5 \times 10^{-4}$ M |
| | | 5,0 (t. citrato) | $9,1 \times 10^{-5}$ M |
| | | 5,0 (t. tris) | — |
| | p-NO ₂ -fenil-fosfato | 4,9 (t. acetato) | $8,1 \times 10^{-4}$ M |
| | | 4,7 (t. citrato) | $3,1 \times 10^{-4}$ M |
| | | 5,5 (t. tris) | — |
| | beta-glicerofosfato | 5,5 (t. acetato) | $4,0 \times 10^{-3}$ M |
| | | 5,7 (t. citrato) | $2,0 \times 10^{-3}$ M |
| | | 5,5 (t. tris) | — |
| Próstata (hombre) (**): | | | |
| fracción primera. | p-NO ₂ -fenil-fosfato | 5,4 | $1,01 \times 10^{-4}$ M |
| | fenil-fosfato | 5,2-5,5 | — |
| | tetracol.-fenolftal.-difosf. | 4,2-5,3 | — |
| fracción segunda | p-NO ₂ -fenil-fosfato | 4,2-4,6 | $1,05 \times 10^{-3}$ M |
| | fenil-fosfato | 4,4-4,8 | — |
| | tetracol.-fenolftal.-difosf. | 3,8-4,8 | — |

* Entre paréntesis, cita bibliográfica.

** Ver figuras 5, 10 y 11.

ABUD-FADL y KING como los de NIGAM y colaboradores están hechos sobre preparados de próstatas humanas hipertróficas, no fraccionadas, y que, por tanto, contendrán los dos enzimas aislados por nosotros. En consecuencia, al superponerse parcialmente las curvas de actividad de ambos enzimas a consecuencia de la proximidad de sus pH óptimos, se obtiene una curva aditiva de ambas, con una zona intermedia de actividad óptima. Este hecho ha sido señalado también por ABUL-FADL y KING (3) cuando puntualizan que las dos fosfatasa ácidas de eritrocitos son detectables separadamente al construir una curva de pH sólo en algunas especies animales (hombre, buey, conejo y oveja), mientras que no lo son en otras (cerdo y rata), lo que depende de la mayor o menor proximidad de sus valores óptimos de pH .

Los estudios de cinética enzimática que hemos efectuado nos vienen a demostrar que, en primera aproximación, existe una relación lineal entre actividad enzimática y tiempo de incubación, ya que sólo empieza a notarse un decaimiento en la velocidad de reacción cuando el sustrato se encuentra cerca de su agotamiento, hecho que indefectiblemente llega a ocurrir con el tiempo (fig. 6 y 7). Efectivamente, a concentraciones de p-nitro-fenil-fosfato de $0,14 \times 10^{-3}$ M y $0,28 \times 10^{-3}$ M, el sustrato queda hidrolizado íntegramente a los 10 y 25 minutos, respectivamente; a concentración de $0,57 \times 10^{-3}$ M se consigue una hidrólisis del 90 % a los 30 minutos, y una destrucción del 55 % al cabo de ese tiempo cuando la concentración es de $1,14 \times 10^{-3}$ M. Eso por lo que respecta a la fosfatasa ácida I; en cuanto a la fosfatasa II el uso de un preparado enzimático menos concentrado no ha permitido llegar a estas situaciones límites, pero se observa un hecho análogo hasta el punto estudiado.

De igual forma, una relación lineal actividad enzimática-tiempo ha sido encontrada por CHAUDHARY y col. (26) en el

enzima del insecto *Tribolium confusum*, por VALENTINE y col. (123) con el de eritrocitos humanos, por SEAL y col. (111) con el enzima sérico de procedencia prostática, y por NIGAM y col. (97) con el enzima de próstata humana. Este último encuentra que la velocidad de reacción se mantiene constante, a igualdad de concentración, durante un tiempo más o menos largo, según la naturaleza del sustrato, siendo máximo para el fenil-fosfato, algo menor para el p-nitro-fenil-fosfato, y sólo la tercera parte para el beta-glicerofosfato. Nosotros no hemos podido corroborar este resultado por haber efectuado esta experiencia sólo con p-nitro-fenil-fosfato.

Este mismo autor encuentra que existe también una relación lineal entre actividad enzimática y concentración de sustrato con el fenil-fosfato y el p-nitro-fenil-fosfato, mientras que con el beta-glicerofosfato la función que define dicha dualidad es ligeramente curva. Una relación lineal encuentran también VALENTINE y col. (123) con p-nitro-fenil-fosfato, CHAUDHARY y col. (26) con fenil-fosfato, y SEAL y colaboradores con alfa-naftil-fosfato (111). Nosotros, tanto con la fosfatasa I como con la II, no hemos encontrado dicha relación con el p-nitro-fenil-fosfato. Es evidente que hay un aumento de la velocidad de reacción, a igualdad de tiempo, a medida que aumenta la concentración de sustrato (fig. 8 y 9), pero no en función lineal, sino que la tasa de aumento va decreciendo con dicha concentración.

Sin embargo, hemos observado con ambos enzimas que a partir de una determinada concentración de p-nitro-fenil-fosfato la velocidad de reacción decae, hasta casi anularse (fig. 6, 7, 8 y 9). Este fenómeno ha aparecido en ambos casos a partir de la concentración $2,29 \times 10^{-3}$ M de sustrato, a la cual sólo llegaba a hidrolizarse aproximadamente el 3 % de la cantidad total de sustrato; y como quiera que la velocidad de reacción máxima aparecía a una concentración $1,14 \times 10^{-3}$ M, se deduce que entre ambos valores debe en-

contrarse el punto crítico para el que la concentración de p-nitro-fenil-fosfato representa el valor óptimo.

Este efecto inhibitor del sustrato a partir de una determinada concentración sobre la fosfatasa ácida de próstata ya había sido observado por TSUBOI y HUDSON (121), si bien estos autores trabajaron con beta-glicero-fosfato. Encuentran que sólo existe una relación lineal entre $1/S$ y $1/v$ para las concentraciones bajas de sustrato, achacando el efecto de inhibición que ejercen las concentraciones altas, a los elevados valores de fuerza iónica que adquieren las mezclas de incubación. Por el contrario, CHAUDHARY y col. (26) no encuentran inhibición de la fosfatasa ácida del insecto *Tribolium confusum* ni aun a concentraciones de fenil-fosfato de 6×10^{-3} M. Ni tampoco encuentran inhibición alguna sobre el enzima de próstata NIGAM y colaboradores (97), a concentraciones de fenil-fosfato y p-nitro-fenil-fosfato comprendidas entre $1,7 \times 10^{-3}$ M y $57,0 \times 10^{-3}$ M.

Todo ello sólo puede explicarse teniendo en cuenta que el efecto inhibitor que puede ejercer el sustrato sobre el enzima depende en realidad de la relación entre las concentraciones de ambos en la mezcla incubante, y que dichos autores han debido utilizar preparados enzimáticos muy concentrados, que toleraban entonces altas concentraciones de sustrato. Hemos calculado dicha relación para el valor $1,14 \times 10^{-3}$ M de concentración de p-nitro-fenil-fosfato, con el que obtuvimos actividades máximas, en función de la concentración proteica usada en los incubados, y hemos hallado que para las fosfatasa ácidas I y II las relaciones óptimas son de $3,4 \times 10^{-6}$ y $2,8 \times 10^{-6}$ moles de sustrato por mg de proteína enzimática (figuras 8 y 9).

Todos estos resultados se encuentran avalados por la teoría de HALDANE (60), que admite la posibilidad de formación de un complejo inactivo de una molécula de

enzima con dos de sustrato; éste sólo podría originarse cuando la relación entre las concentraciones de sustrato y enzima fuese grande, por la mayor afinidad del enzima hacia la primera molécula de sustrato para formar el complejo activo enzima-sustrato. Admitiendo, como en cierto modo es lógico, que las dos moléculas de sustrato se unen al enzima por grupos de distinta naturaleza y, por tanto, con diferente pK, hubiéramos podido comprobar la hipótesis viendo si la inhibición se mantenía o no al mismo nivel a diferentes pH de incubación.

Comparando los valores de K_m obtenidos con el uso del p-nitro-fenil-fosfato (tabla IV), nos encontramos con que los máximos valores corresponden a los enzimas de insectos, mientras que con el enzima prostático KILSHEIMER y AXELROD (75) obtienen los valores más inferiores descritos por la bibliografía. Si comparamos los valores que hemos obtenido nosotros para las fosfatasa ácidas I y II con los encontrados por NIGAM y col. (97) en la fosfatasa prostática total, nos encontramos con un fenómeno análogo al indicado antes al hablar de los pH óptimos, consistente en que los encontrados por nosotros, $1,01 \times 10^{-4}$ M y $10,5 \times 10^{-4}$ M, engloban a los de los autores mencionados, $8,1 \times 10^{-4}$ M y $3,1 \times 10^{-4}$ M.

Con fenil-fosfato como sustrato continúan siendo los más altos los valores del enzima de insectos, llamando también la atención por lo elevado el 10×10^{-4} M encontrado por LUNDQUIST (161) para la fosfatasa de próstata, en comparación con los calculados por otros autores. Sin embargo, los máximos valores de K_m se encuentran con beta-glicerofosfato como sustrato, como consecuencia de una menor actividad del enzima frente a él. Continúan siendo muy altos para la fosfatasa ácida de insectos, pero aquí ese valor es superado por el altísimo 130×10^{-4} M obtenido por LUNDQUIST (161) para el enzima de próstata.

Resumen

Empleando una técnica de fraccionado en columnas de DEAE-celulosa, se ha aislado una fracción con actividad fosfatásica ácida en próstatas humanas normales, mientras que las glándulas que presentan hipertrofia ponen de manifiesto dos de dichas fracciones. De éstas, una de ellas se manifiesta cuantitativamente con muy pocas oscilaciones, y presenta las mismas características que el componente enzimático de la próstata normal, mientras que la segunda presenta un comportamiento distinto en el proceso de fraccionado y se manifiesta cuantitativamente a una tasa que guarda una relación directa con el grado de hipertrofia.

Se han obtenido preparados altamente purificados de la fosfatasa ácida ligada al grado de hipertrofia glandular (fracción I), lo que ha permitido estudiar sus características físico-químicas y compararlas con las de la fracción enzimática normal (fracción II).

Hemos encontrado unos valores de *pH* isoelectrico de 5,4 y 4,6 para las fracciones I y II, respectivamente, con una movilidad electroforética correspondiente a la zona entre las albúminas y globulinas-alfa, séricas, para la segunda, y entre las globulinas-beta y las globulinas-gamma, para la primera.

Para la fracción I hemos hallado un *pH* óptimo de actividad de 5,4 frente al *p*-nitro-fenil-fosfato, y de 5,2-5,5 frente al fenil-fosfato. Para la fracción II estos valores son, respectivamente, de 4,2-4,6 y de 4,4-4,8. Frente al tetracolumín-fenolftaleín-difosfato la zona óptima de actividad está muy poco marcada.

Los estudios de cinética enzimática nos indican que el *p*-nitro-fenil-fosfato ejerce una acción inhibitoria a concentraciones altas. El uso de concentraciones menores ha permitido calcular las constantes de Michaelis: $1,01 \times 10^{-4}$ M para la fracción I, y $1,05 \times 10^{-3}$ M para la fracción II.

A la vista de los resultados indicados en 1 se recalca la importancia que tendría, a fines diagnósticos del adenoma de próstata, el medir la actividad enzimática debida a la fracción I. Dicha medida efectuada sobre la glándula extirpada, según la técnica descrita, presenta un interés diagnóstico *a posteriori*; su aplicación en suero, con fines diagnósticos *a priori*, se encuentra en estudio en la actualidad.

Summary

Study of the acid phosphatases of the prostate gland. — I. Isolation and purifying; enzymatic kinetic

By employing a fractionation method in columns of DEAE-cellulose, a fraction has been isolated with acid phosphatase activity in normal human prostates, while the glands which present hypertrophy show two of these fractions. Of these, one is shown quantitatively with very few variations, and presents the same characteristics as the enzymatic component of the normal prostate; while the second presents a different behaviour in the fractionation process and is shown quantitatively to a value which keeps a direct relation to the degree of hypertrophy.

Highly purified preparations have been obtained of acid phosphatase tied to the degree of glandular hypertrophy (fraction I), which has permitted the study of its physical-chemical characteristics and their comparison with those of the normal enzymatic fraction (fraction II).

We have found the isoelectric *pH* values of 5.4 and 4.6 for fractions I and II respectively, with an electrophoretic mobility corresponding to the zone between the albumins and seric alpha-globulins for the second, and between the beta-globulins and gamma-globulins for the first.

For fraction I we have found an optimum activity *pH* of 5.4 with *p*-nitro-phenyl-phosphate, and of 5.2-5.5 with phenyl-phosphate. For fraction II these values are, respectively, of 4.2-4.6 and 4.4-4.8. With tetracolumin-phenolphthalein-disphosphate the optimum zone is very little marked.

The studies of enzymatic kinetic indicate that *p*-nitro-phenyl-phosphate has an inhibiting action at high concentrations. The use of lower concentrations has allowed the calculation of the Michaelis's constants: 1.01×10^{-4} M for fraction I, and 1.05×10^{-3} M for fraction II.

Bibliografía

1. ABUL-FADL, M. A., y KING, E. J.: *Biochem. J.*, **42**, xxviii, 1948.
2. ABUL-FADL, M. A., y KING, E. J.: *J. Clin. Path.*, **1**, 80, 1948.
3. ABUL-FADL, M. A., y KING, E. J.: *Biochem. J.*, **45**, 51, 1949.
4. ANDREU, M., FERNÁNDEZ-ALVAREZ, E., y LORA-TAMAYO, M.: *An. R. Soc. Esp. Fis. Quím.*, **56B**, 67, 1960.
5. ASHRAFI, S. H.: *Pakistan J. Sci. Ind. Res.*, **4**, 70, 1961.
6. ASHRAFI, S. H., y FISK, F. W.: *Pakistan J. Sci. Ind. Res.*, **5**, 24, 1962.
7. BABSON, A. L.: *Am. J. Med. Tech.*, **28**, 227, 1962.
8. BABSON, A. L.: *Clin. Chem.*, **11**, 789, 1965.
9. BABSON, A. L., y READ, P. A.: *Am. J. Clin. Path.*, **32**, 88, 1959.
10. BASES, R.: *New England. J. Med.*, **266**, 538, 1962.
11. BECK, F.: *Yb. Carnegie Instn.*, **63**, 561, 1964.
12. BECK, W. S., y VALENTINE, W. N.: *J. Lab. Clin. Med.*, **38**, 245, 1951.
13. BENOTTI, J., ROSENBERG, L., y DEWEY, B.: *J. Lab. Clin. Med.*, **31**, 357, 1946.
14. BENSLEY, E. H., WOOD, P., y LANG, D.: *Am. J. Clin. Path.*, **18**, 742, 1948.
15. BESSEY, O. A., LOWRY, O. H., y BROCK, M. J.: *J. Biol. Chem.*, **164**, 321, 1946.
16. BODANSKY, A.: *J. Biol. Chem.*, **101**, 93, 1933.
17. BOMAN, H. G.: *Arkiv f. Kem.*, **12**, 453, 1958.
18. BONNER, C. D., HOMBURGER, F., y FISHMAN, W. H.: *Surg. Gynec. Obst.*, **99**, 190, 1964.
19. BONNER, C. D., HOMBURGER, F., SMITHY, G. B., y BORGES, P. R.: *J.A.M.A.*, **164**, 1070, 1957.
20. BORST-PAUWELS, G. W.: *Nature*, **202**, 190, 1964.
21. BOULANGER, P., POLONOVSKI, J.: *Traité de biochimie générale*. tomo II, pág. 368. Masson, París, 1964.
22. COOK, W. B., FISHMAN, W. H., y CLARKE, B. G.: *J. Urol.*, **88**, 281, 1962.
23. COURTOIS, J. E., y BIGET, P. L.: *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **25**, 203, 1943.
24. CZITOBER, H., GRUNDIG, E., y SCHOBEL, B.: *Klin. Wochem.*, **42**, 1179, 1964.
25. CHAUDHARY, K. D., y LEMONDE, A.: *Experientia*, **20**, 86, 1964.
26. CHAUDHARY, K. D., MOORJANI, S., y LEMONDE, A.: *Can. J. Biochem.*, **42**, 1769, 1964.
27. CHEVILLARD, L.: *C. R. Soc. Biol.*, **139**, 249, 1945.
28. DANIEL, O.: *Brit. J. Urol.*, **26**, 153, 1954.
29. DANIEL, O., y VAN ZYL, J. J.: *Lancet*, **1**, 998, 1952.
30. DAVIDSON, H. M.: *Am. J. Clin. Path.*, **23**, 411, 1953.
31. DAVIDSON, H. M., y FISHMAN, W. H.: *J. Biol. Chem.*, **234**, 526, 1959.
32. DELCOURT, A., y DELCOURT, R.: *C. R. Soc. Biol.*, **147**, 1104, 1953.
33. DELORY, G. E., SWEETSER, T. H., y WHITE, T. A.: *J. Urol.*, **66**, 724, 1951.
34. DOE, R. P., MELLINGER, G. T., y SEAL, U. S.: *Clin. Chem.*, **11**, 943, 1965.
35. DOE, R. P., y SEAL, U. S.: *Surg. Clin. North Am.*, **45**, 1455, 1965.
36. DOMANSKI, J., KONIECZNY, L., y OSTROWSKI, W.: *Biochim. Biophys. Acta*, **92**, 405, 1964.
37. DREVON, B.: *C. R. Soc. Biol.*, **147**, 1416, 1953.
38. DUBBS, C. A., y HILBURN, J. M.: *Science*, **131**, 1529, 1960.
39. DYBKAER, R., y JENSEN, G.: *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, **10**, 349, 1958.
40. EISFELD, G., y KOCH, E.: *Z. ges. inn. Med.*, **9**, 514, 1954.
41. ESTBORN, B.: *Clin. Chim. Acta*, **6**, 22, 1961.
42. ESTBORN, B.: *Z. klin. Chem.*, **2**, 53, 1964.
43. ESTBORN, B., y SWEDIN, B.: *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, **11**, 235, 1959.
44. FAHYE, J. L., Mc COY, P. F., y GOULIAN, M.: *J. Clin. Invest.*, **37**, 272, 1958.
45. FERNÁNDEZ, R., SEAL, U. S., MELLINGER, G. T., y DOE, R. P.: *Invest. Urol.*, **2**, 328, 1965.
46. FERNÁNDEZ-ALVAREZ, E., y PANEÁ, M.: *An. R. Soc. Esp. Fis. Quím.*, **53B**, 723, 1957.
47. FISCHMANN, J., CHAMBERLIN, H. A., CUBILES, R., y SCHMIDT, G.: *J. Urol.*, **59**, 1194, 1948.
48. FISHMAN, W. H., BONNER, C. D., y HOMBURGER, F.: *New Engl. J. Med.*, **255**, 925, 1956.
49. FISHMAN, W. H., DART, R. M., BONNER, C. D., LEADBETTER, W. F., LERNER, F.,

- y HOMBURGER, F.: *J. Clin. Invest.*, **32**, 1034, 1953.
50. FISHMAN, W. H., y DAVIDSON, H. M.: *Meth. Biochem. Anal.*, **4**, 257, 1957.
51. FISHMAN, W. H., y LERNER, F.: *J. Biol. Chem.*, **200**, 89, 1953.
52. FISHMAN, W. H., LERNER, F., y HOMBURGER, F.: *Proc. Am. Ass. Cancer Res.*, **1**, 17, 1953.
53. FISKE, C. H., y SUBBAROW, Y.: *J. Biol. Chem.*, **66**, 375, 1925.
54. GOLDBERG, A. F., TAKAKURA, K., y ROSENTHAL, R. L.: *Nature*, **211**, 41, 1966.
55. DE GOUCHY, J.: *Rev. Franc. Etudes Clin. Biol.*, **3**, 881, 1958.
56. GRASSMAN, W., y HANNIG, K.: *Hoppe-Seylers Z. f. Physiol. Chemie*, **290**, 1, 1952.
57. GUTMAN, A. B.: *J.A.M.A.*, **120**, 1112, 1942.
58. GUTMAN, A. B., y GUTMAN, E. B.: *J. Clin. Invest.*, **17**, 473, 1938.
59. GUTMAN, E. B., y GUTMAN, A. B.: *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.*, **47**, 513, 1941.
60. HALDANE, J. B. S.: *Enzymes*. Longmans, Green and Co., Londres, 1930.
61. HELFERICH, B., y STETTER, H.: *Ann.*, **558**, 234, 1947.
62. HELFERICH, B., y STETTER, H.: *Ann.*, **560**, 191, 1948.
63. HERBERT, F. K.: *Biochem. J.*, **38**, XXIII, 1944.
64. HERBERC, F. K.: *Quart. J. Med.*, **15**, 221, 1946.
65. HILL, J. H.: *Am. J. Clin. Path.*, **26**, 120, 1956.
66. HOCK, E., y TESSIER, R. N.: *J. Urol.*, **62**, 488, 1949.
67. HOFSTEN, B., y PORATH, J.: *Acta Chem. Scand.*, **15**, 1791, 1961.
68. HOFSTEN, B., y PORATH, J.: *Biochim. Biophys. Acta*, **64**, 1, 1962.
69. HUDSON, P. B., BRENDLER, H., y SCOTT, W. W.: *J. Urol.*, **58**, 89, 1947.
70. HUDSON, P. B., y LONDON, M.: *Arch. Biochem. Biophys.*, **46**, 141, 1953.
71. HUGGINS, C., y TALALAY, P.: *J. Biol. Chem.*, **159**, 399, 1945.
72. JACOBSON, K.: *Scand. J. Clin. Invest.*, **12**, 367, 1960.
73. KASCHNITZ, R.: *Z. klin. Chem.*, **5**, 126, 1967.
74. KERR, S. E., y CHERNIGOY, F.: *J. Biol. Chem.*, **228**, 495, 1957.
75. KILSHEIMER, G. S., y AXELROD, B.: *J. Biol. Chem.*, **227**, 879, 1957.
76. KIND, P. R. N., y KING, E. J.: *J. Clin. Path.*, **7**, 322, 1954.
77. KING, E. J., y ARMSTRONG, A. R.: *Canad. M. A. J.*, **31**, 376, 1934.
78. KING, E. J., y JEGATHEESAN, K. A.: *J. Clin. Path.*, **12**, 85, 1959.
79. KING, E. J., WOOD, E. J., y DELEROY, G. E.: *Biochem. J.*, **39**, 24, 1945.
80. KUTSCHER, W., y WOLBERGS, H.: *Z. Physiol. Chem.*, **236**, 237, 1935.
81. KUTSCHER, W., y WORNER, A.: *Z. Physiol. Chem.*, **239**, 109, 1936.
82. LAMBREMONT, E. N.: *J. Insect. Physiol.*, **3**, 325, 1959.
83. LAMBREMONT, E. N.: *Ann. Ent. Soc. Amer.*, **53**, 87, 1960.
84. LAMPSON, G. P., y TYTELL, A. A.: *Anal. Biochem.*, **11**, 374, 1965.
85. LINEWEAVER, H., y BURK, D.: *J. Am. Chem. Soc.*, **56**, 658, 1934.
86. LONDON, M., WIGLER, P., y HUDSON, P. B.: *Arch. Biochem. Biophys.*, **52**, 236, 1954.
87. LÓPEZ-GORGÉ, J., y MONTEOLIVA, M.: *R. Esp. Fisiol.*, **22**, 127, 1966.
88. LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, N. J., FARR, A. L., y RANDALL, R. J.: *J. Biol. Chem.*, **193**, 265, 1951.
89. LUNDQUIST, F.: *Acta Physiol. Scand.*, **14**, 263, 1947.
90. LUNDQUIST, F., THORSTEINSSON, TH., y BUUS, O.: *BIOCHEM. J.*, **59**, 69, 1955.
91. MATHES, G., RICHMOND, S. G., y SPRUNT, D. H.: *J. Urol.*, **75**, 143, 1956.
92. MIZUNO, N. S., SAUTTER, J. H., y SCHULTZE, M. O.: *Proc. Soc. Exp. Biol.*, **98**, 42, 1958.
93. MORTON, R. K.: *Biochem. J.*, **65**, 674, 1957.
94. MOTZOK, I., y BRANION, H. D.: *Biochem. J.*, **72**, 177, 1959.
95. NAIMAN, J. L., y OSKI, F. A.: *Clin. Res.*, **12**, 461, 1964.
96. NEUMANN, H.: *Biochim. Biophys. Acta*, **3**, 177, 1949.
97. NIGAM, V. N., DAVIDSON, H. M., y FISHMAN, W.: *J. Biol. Chem.*, **234**, 1550, 1959.
98. NYLANDER, G.: *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, **7**, 254, 1955.
99. OSTROWSKI, W.: *Bull. Acad. Polon. Sci.*, Cl. VI, **11**, 271, 1963.

100. OSTROWSKI, W., y RYBARSKA, J.: *Biochim. Biophys. Acta*, **105**, 196, 1965.
101. OSTROWSKI, W., y TSUGITA, A.: *Arch. Biochem. Biophys.*, **94**, 68, 1961.
102. OZAR, M. B., ISAAC, C. A., y VALK, W. L.: *J. Urol.*, **74**, 150, 1955.
103. PAL-YU, B., KUMMEROW, F. A., y NISHIDA, T.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **122**, 1043, 1966.
104. PFANKUCH, E.: *Z. Physiol. Chem.*, **241**, 34, 1936.
105. RAMAKRISHNAN, T.: *J. Sci. Indus. Res.*, **21**, 177, 1962.
106. RJEKHINA, N. I.: *Biokymiya*, **27**, 359, 1962.
107. ROCHE, J., VAN THOAI, N., y BAUDOIN, J.: *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **24**, 247, 1942.
108. ROSENBERG, I. N.: *J. Clin. Invest.*, **38**, 630, 1959.
109. SALVIDIO, E.: *Acta Haemat.*, **11**, 301, 1954.
110. SCHRAMM, G., y FLAMMERSFELD, H.: *Naturwissen.*, **34**, 216, 1947.
111. SEAL, U. S., MELLINGER, G. T., y DOE, R. P.: *Clin. Chem.*, **12**, 620, 1966.
112. SHIBKO, S., y TAPPEL, A. L.: *Biochem. J.*, **95**, 731, 1965.
113. SHULAM, S., MAMROD, L., GONDER, M. J., y SOANES, W. A.: *J. Immun.*, **93**, 474, 1964.
114. SMITH, S. W., WEISS, S. B., y KENNEDY, E. P.: *J. Biol. Chem.*, **288**, 915, 1957.
115. SOMMER, A. J.: *M. Bull. St. Louis Univ.*, **4**, 165, 1952.
116. STOLBACH, L. L., NISSELBAUM, J. S., y FISHMAN, W. H.: *Am. J. Clin. Path.*, **29**, 379, 1958.
117. SULLIVAN, T. J., GUTMAN, E. B., y GUTMAN, A. B.: *J. Urol.*, **48**, 426, 1942.
118. SUR, B. K., MOSS, D. W., y KING, E. J.: *Biochem. J.*, **84**, 55P, 1962.
119. TSUBOI, K. K., y HUDSON, P. B.: *Arch. Biochem. Biophys.*, **43**, 339, 1953.
120. TSUBOI, K. K., y HUDSON, P. B.: *Arch. Biochem.*, **53**, 341, 1954.
121. TSUBOI, K. K., y HUDSON, P. B.: *Arch. Biochem. Biophys.*, **55**, 191, 1955.
122. VALENTINE, W. N., y BECK, W. S.: *J. Lab. Clin. Med.*, **38**, 39, 1951.
123. VALENTINE, W. N., TANAKA, K. R., y FREDERICKS, R. E.: *J. Am. Clin. Path.*, **36**, 328, 1961.
124. VERNON, C. A., GAULDIE, J., HANSON, J. M., HUMPHREYS, J. M., SMITH, P. E., LAWRENCE, A. J., y BANKS, B. E. C.: *Nature*, **208**, 382, 1965.
125. WAGNER, R., y YOURKE, A.: *Arch. Biochem.*, **54**, 174, 1955.
126. WALKER, J. T.: *New Engl. J. Med.*, **242**, 110, 1950.
127. WALKER, B. S., LEMON, H. M., DAVIDSON, H. M., y SCHWARTZ, M. K.: *Am. J. Clin. Path.*, **24**, 807, 1954.
128. WHITMORE, W. F., BODANSKY, O., SCHWARTZ, M. K., YING, S. H., y DAY, E.: *Cancer*, **9**, 228, 1956.
129. WOODARD, H. Q.: *J. Urol.*, **65**, 688, 1951.
130. WOODARD, H. Q.: *Am. J. Med.*, **27**, 902, 1959.
131. ZUCKER, M. B., y BORRELLI, J.: *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **75**, 203, 1958.
132. ZUCKER, M. B., y BORRELLI, J.: *J. Clin. Invest.*, **38**, 148, 1959.
133. ZUCKER, M. B., y WOODARD, H. Q.: *J. Lab. Clin. Med.*, **59**, 760, 1962.

