

090584

UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA

UNIDAD IZTAPALAPA.

DIVISION DE CIENCIAS BIOLOGICAS Y DE LA SALUD.

ESTIMACION DE LAS ACTIVIDADES PROTEOLITICA
Y ANTIPROTEOLITICA DURANTE EL DESARROLLO
DEL CANCER EXPERIMENTAL DE LA MAMA EN LA
RATA CON DIMETILBENZ(a)ANTRACENO (DMBA).

Tesis que presenta la Q.F.B. GUADALUPE PARTI
DA HERNANDEZ, para obtener el grado de MAES-
TRA en BIOLOGIA EXPERIMENTAL.

MEXICO, D.F.

1989

ESTE TRABAJO SE REALIZO EN LA UNIDAD DE INVESTIGACION CLINICA EN ENFERMEDADES ONCOLOGICAS DEL CENTRO MEDICO NACIONAL DEL INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL, HOSPITAL DE ONCOLOGIA.

FUE DIRIGIDO POR EL SEÑOR:

DOCTOR LUIS BENITEZ BRIBIESCA.

Jefe de la Unidad de Investigación Clínica en Enfermedades Oncológicas.
Centro Médico Nacional del I.M.S.S.

Y COMO ASESORES, LOS SEÑORES:

DOCTOR RUBEN DARIO MARTINEZ PEREZ.

Profesor Titular de la Subdivisión de Medicina Experimental, Facultad de Medicina, U.N.A.M.

DOCTOR GUILLERMO ROMERO VILLASEÑOR.

Profesor Investigador del Departamento de Ecología, Facultad de Medicina, U.N.A.M.

A MIS PADRES:

Q.F. SALVADOR PARTIDA VILLEGAS.

PROFRA. LUZ HERNANDEZ CORNEJO.

A MI ESPOSO:

INVEST. BIOMEDICO JOSE FRANCISCO ARREOLA ORTIZ.

A MIS HERMANOS,
SOBRINOS Y
FAMILIARES.

AL PERSONAL DEL DEPARTAMENTO DE HISTOQUIMICA
DE LA UNIDAD DE INVESTIGACION CLINICA EN EN-
FERMEDADES ONCOLOGICAS DEL CENTRO MEDICO NA-
CIONAL DEL I.M.S.S.

Q.F.B. LETICIA PASTRANA FLORES.

TEC. EN M.E. HECTOR OROPEZA HERRERA.

Q.B.P. REBECA GUEVARA SILVA.

Q.B.P. RAFAEL FREYRE HORTA.

ESTIMACION DE LAS ACTIVIDADES PROTEOLITICA Y ANTIPROTEOLITICA DURANTE EL DESARROLLO DEL CANCER EXPERIMENTAL DE LA MAMA EN LA RATA CON DIMETILBENZ(a)ANTRACENO (DMBA).

Las células malignas tienen gran capacidad invasora y ésta se ha atribuido a factores numerosos. Entre ellos el que mejor explica esta propiedad biológica es la secreción y activación de enzimas hidrolíticas. Dichas enzimas han sido estudiadas, siendo algunas serinoproteasas activadores del plasminógeno (AP) así como tiolproteinasas del grupo de la catepsina B (CB) las que en la literatura nos muestran que existe una correlación directa entre la progresión de una neoplasia maligna y la elevación de estas enzimas en los niveles séricos y tisulares. Asimismo, se ha observado que en respuesta al estímulo proteolítico de la neoplasia, existe un aumento paralelo de la síntesis de proteínas inhibitorias como el inhibidor de alfa-1-proteinasa (I.A.P.) y este fenómeno ocurre más tardíamente en la evolución de la neoplasia.

El propósito de este trabajo fué investigar la presencia y variaciones de serinoproteasas (AP), tiolproteinasas (enzima semejante a catepsina B y la CB) y de la actividad antiproteolítica en el suero y citosol de tejido durante el proceso de carcinogénesis mamaria inducida en la rata con Dimetilbenz(a)antraceno (DMBA).

Empleamos 25 animales como testigo a los que se les administró directamente en el estómago un mililitro de aceite de ajonjolí por una sola ocasión y para los grupos experimentales usamos 70 ratas de la cepa Sprague-Dawley de 80 días de nacidas con 200-230 g de peso corporal. Para la inducción del cáncer de mama se siguió el método de Huggins mediante la administración de una dosis única de 20 mg/ml de DMBA. Después de 8 a 10 semanas desarrollaron neoplasias mamarias.

Se hicieron determinaciones para serinoproteasas con el sustrato CBZ-Gli-Gli-Arg-4-MeO-NA; para tiolproteinasas utilizamos dos sustratos artificiales el BANA para la determinación de enzima semejante a catepsina B y CBZ-Ala-Arg-Arg-4-MeO-NA para la CB específicamente. También se practicó electroforesis de proteínas séricas y determinó la Capacidad Inhibitoria de la Tripsina (C.I.T.) así como el cálculo del Índice de actividad antiproteolítica. Determinaciones realizadas en el suero y citosol de homogenados provenientes de tumores mamarios.

Practicamos autopsias, estudios histológicos con microscopía de luz así como observaciones ultraestructurales de la neoplasia. Dichos estudios demuestran que se produjeron cánceres adenocarcinomas del tipo ductal bien diferenciados, no infiltrantes ni metastatizantes.

El análisis de resultados se realizó entre testigo y grupos experimentales (DMBA sin cáncer y DMBA con cáncer). Se establecieron también correlaciones entre las concentraciones enzimáticas obtenidas de los citosoles de tumores mamarios y las obtenidas en el suero de cada una de esas ratas.

En los citosoles de los homogenados provenientes de las neoplasias obtenidas de los mismos animales encontramos que las tiolproteinasas (CB) se elevaron francamente no así las serinoproteasas (AP). Observamos que en los niveles sanguíneos existe aumento leve de la concentración de proteasas y que sus valores son similares entre sí. La determinación de tiolproteínasa con el sustrato artificial BANA, no mostró correlación con el desarrollo del cáncer; nosotros consideramos que esta técnica no es la más adecuada para su medición. Asimismo creemos que la tendencia a la disminución del inhibidor de alfa-1-proteínasa y la actividad antiproteolítica escasa en suero, son reflejos significativos de que en las ratas que desarrollaron los tumores mamarios por efecto del DMBA en su circulación sanguínea existían cantidades insuficientes tanto de serinoproteasas (AP) como de tiolproteinasas (CB) por lo que no se pudo generar una respuesta a ello.

Con los resultados obtenidos en nuestro modelo constatamos que fué una neoplasia que no invadió ni dió metástasis.

C O N T E N I D O :	PAGINA:
ABREVIATURAS.	2
<u>OBJETIVO.</u>	3
<u>ANTECEDENTES.</u>	4
a). Planteamiento del problema.	8
b). Hipótesis.	9
<u>GENERALIDADES.</u>	10
PROTEASAS:	11
SERINOPROTEASAS. Activador de plasminógeno.	13
TIOLPROTEINASAS. Catepsina B.	16
Inhibidor de alfa-1-proteinasa.	20
Alfa-2-macroglobulina.	21
<u>MATERIAL Y METODOS.</u>	24
CANCER EXPERIMENTAL. Método de Huggins.	25
ESTUDIOS HISTOLOGICOS.	26
ULTRAESTRUCTURA.	26
OBTENCION DE CITOSOL.	27
DETERMINACION DE PROTEINASAS:	
SERINOPROTEASAS:	
a). Activador de plasminógeno.	27
TIOLPROTEINASAS:	28
a). Enzima semejante a catepsina B,	
b). Catepsina B.	
DETERMINACION DE PROTEINAS TOTALES.	29
ELECTROFORESIS DE PROTEINAS SERICAS.	29
CAPACIDAD INHIBITORIA DE TRIPSINA.	30
CALCULO DEL INDICE DE ACTIVIDAD ANTIPROTEOLITICA.	31
ANALISIS ESTADISTICO.	32
<u>RESULTADOS.</u>	33
<u>DISCUSION.</u>	57
<u>CONCLUSIONES.</u>	66
<u>BIBLIOGRAFIA.</u>	68
TOTAL DE HOJAS:	<u>79</u>

A B R E V I A T U R A S.

A ₂ MG	Alfa-2-macroglobulina.
AP	Activador de plasminógeno.
BAEE	N-alfa-Benzoil-L-Arginil-Etil-Ester.
BANA	N-alfa-Benzoil-DL-Arginil-beta-naftil <u>amida</u> .
CB	Catepsina B.
CBZ-Ala-Arg-Arg-4-MeOβNA.	N-Benciloxycarbonilo-L-Alanil-Arginil-Arginil-4-metoxi-beta-naftilamida.
CBZ-Gli-Gli-Arg-4-MeOβNA.	N-Benciloxycarbonilo-L-Glicil-Glicil-Arginil-4-metoxi-beta-naftilamida.
C.I.T.	Capacidad Inhibitoria de la tripsina.
DMBA	7,12-Dimetilbenz(a)antraceno.
I.A.P.	Inhibidor de alfa-1-proteinasa.
4-MeOβNA.	4-Metoxi-beta-naftilamina.
βNA.	Beta-naftilamina.

OBJETIVO:

Investigar la presencia y variaciones de serinoproteasas (activador de plasminógeno), tiolproteinasas (enzima semejante a catepsina B y la catepsina B) y de la actividad antiproteolítica en el suero y citosol de tejido durante el proceso de carcinogénesis mamaria inducida en la rata con Dimetilbenz(a)antraceno (DMBA).

ANTECEDENTES.

Una de las características sobresalientes de las neoplasias malignas es su capacidad invasora. Existen dos patrones fundamentales de invasión; el primero es el que caracteriza a las neoplasias sólidas tales como el adenocarcinoma y el carcinoma epidermoide y se caracteriza por un frente de penetración irregular pero una estructura coherente; el tejido conectivo en contacto con el límite del cáncer presenta disolución de sus fibras lo que se piensa es debido a una acción lítica. El segundo es el que tiene lugar en neoplasias mesenquimatosas donde las células progresan en forma más o menos disociada. En este último la acción lítica no es tan aparente y probablemente la invasión celular se deba a varios factores combinados como son, la lisis, la reproducción celular y la locomoción (1).

La destrucción de la membrana basal precede a la penetración de muchas neoplasias epiteliales hacia el mesénquima adyacente. Para que este fenómeno ocurra debe invocarse la acción de enzimas hidrolíticas que disuelvan la colágena, glucoproteínas y proteoglicanos que forman parte de la membrana basal del estroma y por donde debe atravesar la célula maligna (2).

Existen numerosos datos en la literatura que indican que el proceso fundamental por el cual invaden las células cancerosas es la proteólisis extracelular (1,3,4) y las investigaciones recientes parecen confirmar la presencia de niveles elevados de proteinasas en las neoplasias tanto in vivo como in vitro. Se sabe que la inyección de proteinasas en el sitio de una neoplasia animal facilita su desarrollo y que su adición al cultivo de células benignas induce mitosis y alteración de la inhibición por contacto (4,5,6,7,8), fenómenos semejantes a los que muestran las células cancerosas en cultivo.

Se han investigado enzimas proteolíticas numerosas en las neoplasias (9) pero hasta el momento se desconoce cuáles son secretadas activamente por las células malignas y cuáles son las que participan en la destrucción del estroma conjuntivo. Se ha podido constatar que las células malignas son capaces de digerir sustratos diversos in vitro y que su crecimiento se detiene con sustancias antiproteolíticas (10,11,12).

La mayoría de los autores en la actualidad piensan que las proteinasas responsables son serinoproteasas que actúan sobre el plasminógeno convirtiéndolo en plasmina y por esta razón se les llama activadores del plasminógeno (AP) (3,13,14). La plasmina, además de lizar a la fibrina, actúa como una proteinasa general hidrolizando multitud de sustratos, excepto la colágena y la elastina. Sin embargo, se sabe que la plasmina puede activar a las procólagenasas y en esa forma promover indirectamente la lisis de esas dos proteínas del tejido conjuntivo.

Recientemente se está investigando la acción de algunas tiolproteinasas en la invasión neoplásica y de éstas la que ha despertado mayor interés es la catepsina B (CB) (16). Estas enzimas se han estudiado en tipos diversos de cáncer y se sabe que pueden degradar la colágena, los proteoglicanos y las proteínas contráctiles del músculo. En particular se ha demostrado que la CB es capaz de desprender células neoplásicas del tejido y así favorecer sus metástasis (17).

En cultivo de células neoplásicas de carcinoma mamario humano se ha observado un claro incremento de la CB y de la catepsina D en relación con sus contrapartes normales. De estas dos enzimas la que muestra un incremento más constante y significativo es una tiolproteínasa semejante a la catepsina B (9,16).

Es probable que la acción proteolítica extracelular que se observa en el cáncer no se deba a una sola enzima sino a la secreción de varias proteinasas (3). Las más importantes serían

las serinoproteasas AP (14,17), algunas tiolproteinasas como la CB, aunque se han invocado también a otras catepsinas y a la colagenasa (3,16,18,19). Es de interés señalar que la mayoría de estos estudios han sido realizados en homogenados de tejido y en cultivo de células malignas por lo que existe escasa información de lo que ocurre en el sujeto con cáncer. El grupo de Pietras y colaboradores (20), informó de estudios realizados en pacientes donde constatan elevación selectiva de la actividad de CB, en enfermas con carcinoma de cérvix y en displasias del mismo órgano. Benítez y colaboradores (21) realizaron un estudio donde se comprueba la elevación de esta tiolproteinasas y la elevación de antiproteasas en el carcinoma de cérvix.

Se sabe, por otra parte, que la acción de las proteinasas extracelulares es modulada por proteínas inhibitorias como la alfa-1 antitripsina (actualmente denominada inhibidor de alfa-1-proteinasas, I.A.P.) y la alfa-2-macroglobulina (A_2 MG) del plasma. En condiciones normales debe existir un balance proteasas/antiproteasas que permita una acción regulada de la actividad proteolítica, tal como ocurre en la ruptura del folículo, en la implantación del huevo en el endometrio, en la fecundación y en otros procesos menos estudiados (15,22).

En la mayoría de los pacientes con cáncer los niveles séricos de I.A.P. están elevados (23,24,25,26,27,31) aunque en algunos de ellos se ha descrito un déficit de esta globulina (28,29). Sería válido pensar que el paciente con cáncer, responda al incremento de proteinasas producidas por la neoplasia con un aumento de proteínas antiproteolíticas.

De acuerdo a estudios previos (21,30) y a los publicados por el grupo de Pietras (20), parece que la tiolproteinasas, similar a la CB se eleva en el suero del sujeto con cáncer y es en proporción directa al avance de la enfermedad.

Los estudios de los grupos de Benítez y Pietras (20,21,30) confirman que, aún en la etapa temprana de carcinoma in situ ya se

observan elevaciones significativas de la enzima, tanto en el suero como en el líquido vaginal. Por otra parte, Poole (9,16, 17) ha demostrado que esta enzima es secretada por células de cáncer mamario humano puestas en cultivo y que su secreción es tá en relación con su viabilidad y crecimiento. Contrariamente el I.A.P. se eleva en forma más tardía y su incremento, parece obedecer a una respuesta del huésped al estímulo proteolítico de la neoplasia.

Desconocemos hasta el momento de estudios en carcinogénesis ex perimental encaminados a estudiar en forma progresiva las variaciones de serinoproteasas, tiolproteinasas y actividad anti-proteolítica durante el proceso del desarrollo del cáncer. Exis ten modelos numerosos para producir cáncer de la mama en ratas con una sola dosis de hidrocarburos polinucleares en un tiempo relativamente corto. Pensamos que con ellos pueda llevarse al cabo el estudio paralelo de proteólisis-antiproteólisis durante la oncogénesis.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA:

Se sabe que el tejido neoplásico maligno secreta serinoproteasas y tiolproteinasas, que la magnitud de su secreción parece estar en relación directa con el crecimiento tumoral (21,30).

El huésped produce I.A.P. como respuesta al incremento de proteinasas y este fenómeno ocurre más tardíamente en la evolución de la neoplasia (21,22). No sabemos en qué momento de la oncogénesis aparece la secreción de proteinasas y cuándo ocurre la respuesta del huésped con antiproteasas.

Sería de gran utilidad para comprobar los estudios realizados en pacientes previamente, estudiar acuciosamente las variaciones de proteinasas y antiproteasas durante el proceso de oncogénesis en un modelo experimental, para saber qué relación existe entre la aparición de cambios histológicos malignos, desarrollo del cáncer y de los aumentos de serinoproteasas, tiolproteina-

sas y antiproteasas.

HIPOTESIS:

- a). Si la secreción de CB proviene de las células neoplásicas y su concentración en el tejido y suero están en relación con la cantidad de tejido neoplásico vivo y activo, esta tiolproteínasa puede ser un indicador temprano y sensible de la transformación oncogénica.
- b). Parece que la elevación de antiproteasas depende de una respuesta del huésped al incremento de proteinasas en la sangre, por lo que su cuantificación podría ser índice de invasión neoplásica y sólo ocurriría en etapas avanzadas. Ambos fenómenos podrían estudiarse paralelamente en un modelo experimental de carcinogénesis mamaria.

GENERALIDADES.

Proteasas. Las enzimas proteolíticas denominadas "proteinasas" hidrolizan uniones peptídicas. Su historia se remonta el siglo XVIII, cuando Reaumur investigó la digestión en aves. No son únicas del reino animal, se han encontrado en plantas e identificado en microorganismos, en hongos y en bacterias (32,48).

El estudio de estas enzimas en células y tejidos de mamíferos surgió en el año de 1890, en los laboratorios alemanes de química fisiológica, cuando investigaban los cambios y la composición química producidos durante el almacenamiento de tejidos después de la muerte. Ese mismo año Salkowski, descubrió los cambios químicos que presentaron los tejidos: hígado, músculo y glándula suprarrenal, cuando éstos se incubaban a 37 °C y por tiempos prolongados, sugirió que fueron debidos a la "diferente actividad enzimática".

Metchnikoff en 1901, en su Tratado sobre Inmunidad, menciona que observó en protozoarios la solubilización de partículas alimenticias en sus vacuolas digestivas y que su interior era ácido, este proceso análogo al observado en la digestión de bacterias por leucocitos polimorfonucleares y de elementos celulares por macrófagos. Probablemente las "citasas" de Metchnikoff fueran "enzimas proteolíticas" (32).

Hedin y Rowlan también en 1901, del Instituto Lister en Inglaterra, describieron la actividad proteolítica ácida del bazo y la compararon con otras actividades al emplear hígado, riñón, músculo esquelético, nódulos linfáticos y corazón de especies como perro, caballo, borrego y becerro.

Es más, en los trabajos de Opie en 1906, mostraron la existencia de distintas proteinasas que actuaban bajo condiciones ácidas o alcalinas, existiendo diferencias en las actividades enzimáticas dependiendo del pH utilizado.

En cuanto a la nomenclatura de las proteinasas, ésta es más difícil que cualquier otro grupo de enzimas, debido a que la especificidad de la mayoría de ellas es muy compleja.

"Proteinasa" y "proteasa" son sinónimos. Proteasa es el término más antiguo, en tanto que el término "proteínasa" fué adoptado por la Nomenclatura de enzimas en 1972.

"Proteasa", "proteínasa" y "enzima proteolítica" se usaron indistintamente para exopeptidasas como endopeptidasas. Sin embargo, sabemos que las endopeptidasas rompen uniones distantes a los extremos de las cadenas polipeptídicas (pero también uniones cercanas a ellos) mientras que, las exopeptidasas rompen únicamente uniones cercanas a dichos extremos (uno o dos residuos desde los extremos).

La clasificación de Hidrolasas Peptídicas se hizo en: exopeptidasas y endopeptidasas.

En el grupo de endopeptidasas tenemos que desde 1960, Hartley separó por grupo catalítico esencial en cuatro: "serino", "tiol", "carboxil" y "metalo" proteinasas con las categorías: 3.4.21; 3.4.22; 3.4.23; 3.4.24, respectivamente. (32)

Sydenham demostró la presencia de proteinasas neutras en las células cancerosas. Este hallazgo sugirió un mecanismo enzimático particular que adquirió gran relevancia pues anteriormente se sabía que los cánceres necróticos, podían liberar enzimas hidrolíticas ácidas lisosomales pero que esto ocurría precisamente durante el proceso de necrosis que sufren los cánceres voluminosos y de crecimiento rápido. Las hidrolasas ácidas como la fosfatasa ácida, las esterases y otras no contribuyen a la diseminación de las células vivas porque se liberan por efecto de la muerte de las células y, por tanto, son indicadores más bien de un proceso autolítico que de un proceso activo de infiltración que requiere células viables. Las proteinasas neutras, por lo contrario, son secretadas aparentemente por células neoplásicas vivas y en cantidad y proporción mucho mayores que las células normales de otros tejidos, y son capaces de digerir las fibras de colágena del tejido conectivo y de las membranas basales del aparato vascular (6,33,34).

En la actualidad se conocen dos tipos de proteinasas que parecen tener gran importancia como mediadoras del proceso de invasión de las células malignas; en el primer grupo están las serinoproteasas al que corresponden los activadores del plasminógeno y el segundo grupo es el de tiolproteinasas que corresponde al grupo de enzimas a la que pertenece la CB(3,13).

Serinoproteasas.-Activador de plasminógeno.

Las serinoproteasas comprenden un grupo de enzimas que se caracterizan por la reactividad de un residuo de serina en su sitio activo. Una prueba común para estas enzimas es la inhibición de su actividad de hidrolasa por la reacción de este residuo de serina con diisopropilfosforofluoridato (Dip-F) (35).

Ejemplos de estas enzimas son la trombina y la plasmina involucradas en la formación y disolución de coágulos.

En los vertebrados es posible encontrar a las proteasas en la glándula o en el jugo exocrino pancreático como precursores inactivos, o zimógenos, los cuales deben ser activados. Todos los zimógenos conocidos de serinoproteasas se convierten en enzimas activas por la acción de la tripsina. Usualmente la ruptura de una unión peptídica específica es suficiente para su activación.

El primer AP fué estudiado por Tillet y Garner en 1933, se le conoció como "fibrinolisis estreptocócica o estreptoquinasa". Posteriormente en 1945, Kaplan y Christensen, mostraron su mecanismo de acción, ya que el plasma contiene una enzima inactiva, plasminógeno, el cual puede ser convertido a una proteinasa activa, plasmina por este factor mencionado y que además la plasmina es responsable de la degradación de la fibrina.

Loa AP son proteínas cuya función es convertir por lo tanto el zimógeno del plasma, plasminógeno, a la serinoproteasa, plasmina. Tal activación se presenta como resultado de la ruptura de la unión peptídica Arg₅₆₀-Val₅₆₁ en la cadena sencilla del plasminógeno, conformándose así una cadena doble (por el enlace disulfuro), la plasmina. (36)

Existen varias clases de ellos: AP circulantes (de la sangre, con peso molecular de 98000 a 165000); AP urinario (del tipo uroquinasa, con peso molecular de 55000); AP tisulares (con peso molecular de 25000 a 50000) y los AP procedentes de cultivo de tejidos (peso molecular de 48000 a 50000). (37,38)

Su presencia ha sido demostrada en la mayoría de los fluidos del cuerpo, incluyendo en la orina, en casi todos los tejidos, en el endotelio vascular y en el suero (39).

Se sabe que, las concentraciones de AP en fuentes naturales son bajas, en tanto que las de plasminógeno en el plasma de humanos es aproximadamente de 0.1 mg/ml, lo que podríamos considerar elevadas. (35)

En 1973 y 1974, hubieron una serie de reportes de un grupo de investigadores que trabajaban con Reich en la Rockefeller University (40), llamando la atención de estos trabajos en los parámetros celulares de la oncogénesis y producción de AP.

Los experimentos de Unkeless y colaboradores, así como los desarrollados por Ossowski y su grupo, demostraron que en cultivos primarios de fibroblastos de pollo, las células no producían AP detectable pero que podría inducirse la formación de esta enzima por transformación con un virus oncogénico (40,41,42).

Existen diferencias grandes en la cantidad de AP producido por: líneas celulares derivadas de diferentes tejidos del mismo animal, por células del mismo tipo histológico derivadas de especies diferentes, o por líneas de células derivadas de un tipo singular independientemente transformadas con los mismos agentes oncogénicos (8,43).

Frecuentemente los métodos inmunológicos han sido útiles para distinguir entre proteínas que muestran propiedades físicas similares. La capacidad de los anticuerpos para inhibir las propiedades catalíticas de las enzimas también se hace muy útil en la determinación de la identidad química de una actividad enzimática presente en extractos crudos o parcialmente purificados.

Varios autores han obtenido anticuerpos de AP y probado su inhibición. Con estos estudios ha sido posible concluir que los AP obtenidos de tejidos diferentes en las mismas especies pueden ser distinguidos inmunológicamente. Estos hallazgos conducen a la posibilidad de que la producción de anticuerpos contra AP pueda ser utilizada en la práctica para la identificación del agente transformante o del origen del tejido de una variedad de tumores (44,45,46).

Sustratos: Parece que el plasminógeno es el sustrato natural para los AP del plasma y de los producidos por las células del endotelio vascular, por los macrófagos y por células del riñón. Sin embargo, es incierto que el plasminógeno sea sustrato natural para otros tejidos (35).

Se han estudiado las velocidades relativas producidas por la hidrólisis de sustratos sintéticos diferentes. El fundamento se basa en que solamente se rompa una unión por molécula. En años anteriores se utilizaban los ésteres de L-aminoácidos bloqueados en su nitrógeno terminal con grupos aromáticos (del tipo p-nitroanilina), éstos al ser escindidos por la enzima podían ser detectados con métodos espectrofotométricos, ya que la velocidad de cambio en la absorción a una longitud de onda seleccionada era proporcional a la velocidad de hidrólisis.

Actualmente se utilizan oligopéptidos artificiales (cadenas que pueden tener de uno a cuatro aminoácidos), cuyos grupos bloqueantes pueden ser: CBZ (Benciloxycarbonilo); BZ (Benzoilo) y como grupos detectores tenemos: 4-MeOPNA (4-metoxi-beta-naftilamida); 2-NA (2-beta-naftilamida); AFC (7-amino-4-trifluorometilcumarina) y MCA (7-amino-4-metilcumarina), que por el efecto deamidante de las enzimas éstos se separan como aminas, pudiendo ser cuantificadas por métodos fluorométricos.

Huseby y Smith (47,48) utilizan el sustrato CBZ-Gli-Gli-Arg-4-MeOPNA para cuantificar al AP de manera específica (EC 3.4.21.31)

Tiolproteinasas. Catepsina B.

Esta enzima es una proteinasa lisosomal clasificada como tiol endopeptidasa.

El término "catepsina" fué introducido desde 1929 por Willsta-
tter y Bamann, término que sirvió para describir una forma de
pepsina que encontraron al extraer proteinasas de la mucosa
gástrica de animales como el perro y el cerdo. El nombre fué
derivado del griego que significa "para digerir". Estos mis-
mos autores reconocieron que la actividad enzimática se presen-
taba en muchas células y tejidos de mamíferos y que requería
de pH ácido a diferencia de la pepsina.

La CB recibió este nombre desde 1972 y se le ha reconocido tam-
bién como: catepsina II (Fruton y colaboradores, 1941); catep-
sina B (Tallan y colaboradores, 1952); catepsina B' (Otto y
Bhakdi, 1969); catepsina B₁ (Barrett y Dingle, 1971). (32)

La década 1923-1933 en Alemania tuvo gran significancia al estu-
diarse la naturaleza de la "activación" de un sistema catéptico
por agentes reductores, especialmente compuestos tiol (trabajos
de Walschmidt y Leitz, 1929).

Tallan en 1952; Greenbaum y Fruton en 1957, definieron a la CB
como la enzima obtenida del bazo de bovino, con acción deamidante
contra la amida benzoilarginina (sustrato sintético para la
tripsina), siempre y cuando se det^erminase en presencia de cis-
teína.

Sin embargo, la revisión de Otto en 1971, demuestra que más de
una enzima es responsable de esta actividad. Primero se descu-
brió que un factor concentrado extraído de la fracción de liso-
somas obtenidos de hígado de rata, era capaz de inactivar a tres
enzimas del metabolismo de carbohidratos: la glucoquinasa, la
quinasa de piruvato y la aldolasa de bifosfato fructosa, espe-
cialmente cuando se empleaba un pH ácido débil en presencia de
mercaptoetanol. La cromatografía en columna de sephadex G-100

separó del extracto de lisosomas del hígado de rata, dos picos con actividad de CB (ya que ambos hidrolizaron a la amida benzoilarginina). Las dos fracciones obtenidas tuvieron pesos moleculares de 52000 y 25000 respectivamente. La segunda resultó ser el factor inactivante de las tres enzimas del metabolismo de carbohidratos. Se obtuvieron resultados semejantes cuando se utilizó como material al bazo de bovino y a la enzima del primer pico se le llamó catepsina B "nueva" (más tarde como catepsina B2); mientras que, la forma activa del segundo pico con peso molecular de 25000 se le denominó catepsina "B" (más tarde como catepsina B1).(32)

En la lista para nomenclatura de enzimas, la CB tiene la clave (EC 3.4.22.1).

Después de su purificación puede ser almacenada por meses a -20 °C sin pérdida apreciables de su actividad, también se puede conservar en su derivado mercurial (49).

De Lumen y Tappel en 1972, demostraron que esta naftilamidasa de benzoilarginina se localiza en la fracción lisosomal de manera específica.

La CB está compuesta de una cadena polipeptídica sencilla, su composición en humanos es de 242 aminoácidos y es rica en glicina. En su análisis no se detectó la presencia de hexosamina, lo cual significa probablemente que no es una glicoproteína, a diferencia de otras enzimas lisosomales ya caracterizadas (16).

Todas las tiolproteinasas extraídas de vegetales son estables a los álcalis (soportan hasta pH 10) mientras que, la CB es inestable por encima de pH 6.5 (32)

Sustratos: La CB puede degradar sustratos naturales como la hemoglobina, azo caseína y azo hemoglobina, proteoglicanos de cartílago, inmunoglobulina G y proteínas de la pared celular de bacterias (50).

El sustrato sintético utilizado inicialmente para CB fué BZ-Arg-NH₂, pero éste también es susceptible a la acción de carboxipeptidasa B lisosomal (32).

Sustratos artificiales fueron introducidos por Otto en 1971, como BZ-DL-Arg-4-nitroanilida (BAA) y BZ-DL-Arg-2-naftilamida (BANA). El primero es menos sensible como sustrato, pero ha sido utilizado porque da directamente el producto colorido (la 4-nitroanilina), además puede ser extraído con solventes orgánicos o ensayada más sensiblemente por diazotación y acoplamiento con "fast garnet" por ejemplo (51). Del segundo sustrato de bajo peso molecular, se libera 2-naftilamina la cual puede también ser sensibilizada y detectada específicamente por diazotación y acoplamiento con colorantes. Sin embargo, en la actualidad se ha visto que puede hidrolizar a serinoproteasas por lo que se considera menos específico.

Se sabe que por algún tiempo las naftilaminas pueden dar un color adecuado de la reacción con sales de diazonio, pero la reacción se bloquea completamente por los reactivos tiol necesario para activar la CB. La fase inicial del método es el uso de un reactivo acoplante especial que contenga mercurio para eliminar el tiol al empezar la reacción de acoplamiento.

Smith y Van Frank en 1975, en la síntesis de sustratos artificiales para hidrolasas de péptidos, han utilizado la 2-naftilamina y la 4-metoxi-beta-naftilamina. Los compuestos metilados tienen una fluorescencia pronunciada leve y reaccionan más rápido con sales de diazonio para dar productos coloreados intensamente. Aunque las 4-metoxinaftilamidas pueden ser marginadas pues hidrolizan menos rápidamente las enzimas que sus análogos de naftilamida, tienen otras ventajas ya que son atractivas en ensayos espectrofotométricos y para citoquímica en microscopía de luz y electrónica (52).

Otra ventaja en los métodos posibles para ensayar a la CB viene del descubrimiento de la alta sensibilidad de los sustratos que

contienen un par de residuos básicos. El primero de estos sus
tratos fué BZ-Ala-Arg-Arg-2(4-metoxi)-naftilamida empleada
por Smith y colaboradores desde 1972.

Mc Donald y Ellis en 1975, recomendaban para ensayos fluorom
étricos el uso de BZ-Arg-Arg-2-naftilamida. La alta solubilii
dad en agua de los sustratos que contienen diargininas hace
fácil la saturación de la enzima en los ensayos. Los sustrat
os diarginilados tambien han sido aplicados para la localizaci
ción de CB en microscopía electrónica. El pH óptimo para su
acción con sustratos artificiales es cercano a 6.0 (53,54).

Inhibición: Como tiolproteínasa la CB se inhibe en cantidades
estequiométricas con agentes que bloquean grupos tiol. La inhib
ición con mercurio y 4-cloromercuribenzoato son reversibles
por exceso de reactivo tiol, mientras que la alquilación como
se produce al añadir monoiodoacetato es irreversible.

Las clorometilcetonas son fuertes reactivos electrofílicos sim
ilares al iodoacetato y reaccionan grandemente con los grupos
tiol, según los estudios de Whitaker (51).

La inhibición de CB humana, puede lograrse completamente con
1 μ M de leupeptina, un inhibidor aislado de varias especies de
actinomicetos (54,56) esta molécula posee un grupo aldehído, el
cual reacciona covalentemente con el grupo esencial de la enzim
a, para formar así un análogo estable "tiohemiacetal", el cual
se postula como un intermedio tetraédrico de la catálisis. Adem
más este inhibidor se recomienda para experimentos fisiológicos
dad su toxicidad baja (49).

La administración oral de leupeptina inhibe la tumorigénesis
química en la piel de ratones. Inhibe la metástasis vascular de
hepatoma hacia los pulmones de rata (56).

La CB ha sido estudiada en enfermedades como la distrofia muscul
ar (55,56); inflamación reumatoide (57) y enfisema (58) entre
otras, pero principalmente en cánceres diversos y dado que el
proceso de metástasis de células tumorales requiere del movimient

to de estas células a través de matrices extracelulares que contienen colágena, glicoproteínas y proteoglicanos es posible que la presencia de CB en la superficie de la membrana celular de estas células tumorales facilite la disolución local de la matriz extracelular y así emprendan sus movimientos hacia los sitios de producción de metástasis (21,59,60,61,62,63,64).

Inhibidor de alfa-1-proteinasa o alfa-1-antitripsina.

La actividad tripsínica del suero responsable en gran parte de la actividad proteolítica es controlada por algunas proteínas como la alfa-1-globulina y la alfa-2-macroglobulina así como una fracción de las beta globulinas.

La alfa-1-antitripsina o I.A.P. es una glicoproteína que migra en la electroforesis junto con la alfa-1-globulina; es responsable del 90 % de la actividad antitripsínica del suero, mientras que el 10 % restante se encuentra en las otras fracciones (65); su peso molecular es de 45000 y contiene 12.4 % de carbohidratos. Su concentración sérica en humanos oscila entre 150 y 300 mg/ 100 ml (66,67,68). Se sabe que posee una actividad antibiótica ligera como lo demostró Mirsky en estudios realizados in vitro y que su actividad inhibitoria es polivalente ya que puede actuar sobre otras enzimas como la quimotripsina, collagenasa, elastasa (69,70) y algunas proteasas leucocitarias (71,72). Dicha capacidad ha sido demostrada en el calostro, en la leche materna durante los primeros días de la lactancia (73) y en la orina (74).

También se le ha atribuido como un factor potente en la regulación de la coagulación y la fibrinólisis (75) además modula la actividad proteolítica en los tejidos y en muchas ocasiones forma complejos inactivos (76).

Se sabe que las alteraciones en la concentración de I.A.P pueden ocurrir en circunstancias numerosas (77). Dicha concentración fluctúa en multitud de procesos por ejemplo: en los nive-

les plasmáticos se elevan durante el tercer trimestre del embarazo (68,78) y se inducen en las mujeres que reciben anti-conceptivos (79); durante la administración de esteroides (80); también aumentan en condiciones patológicas como en infecciones (73), en cirrosis alcohólica (68), en algunas neoplasias (21,23,53,81,82,83,84).

Existen variaciones cíclicas de su concentración en el moco cervical de mujeres (80,85). La deficiencia de esta proteína se asocia a algunos padecimientos como enfisema pulmonar (69,70,86,87) en humanos; en el reproducido experimentalmente en animales de laboratorio (88); también en cirrosis infantil (89); en cirrosis hepática adulta (90); en el pénfigo (91); en artritis reumatoide (92) y en algunos cánceres se ha reportado que se acompaña de esta deficiencia (29,93,94).

Ha sido posible probar en animales, un mecanismo del balance proteasa/antiproteasa, que modula la actividad espermática facilitando su función fecundante al disminuir su concentración ya que el uso de antiproteasas en el aparato genital, impide la fertilización (95).

Se ha dicho que el I.A.P se sintetiza en el hígado (89), aunque otros sugieren que su origen sea las células cebadas las cuales forman parte constitutiva del tejido conjuntivo (96).

Esta antiproteasa se ha cuantificado por métodos bioquímicos como electroforesis (65) e inmunodifusión radial (66,73) en humanos y su localización en cortes de tejido intactos (98) y en leucitos polimorfonucleares (72) se ha encontrado por técnicas de inmunofluorescencia.

Alfa-2-macroglobulina. Es una glicoproteína del plasma que contiene de 8 a 11 % de carbohidratos, incluyendo ácido siálico.

Su peso molecular es elevado y se le conoce como inhibidor de varias serinoproteasas. Su concentración total se puede determinar por inmunodifusión radial y su actividad puede ensayarse por unión a tripsina (99, 100).

La A_2MG se inactiva muy fácilmente por reacción directa con las proteinasas del plasma o por la manipulación física requerida en la purificación de proteínas, por lo que se recomienda utilizar material siliconizado, así como tubos de ensayo que contengan anticoagulante. En su purificación es conveniente quitar la beta lipoproteína y el fibrinógeno por precipitación. La pureza de las preparaciones de esta proteína ha sido probada inmunológicamente por difusión en gel o por inmunoelectroforesis desarrollada con un antisuero polivalente directo contra proteína del plasma (99).

La determinación del peso molecular por ultracentrifugación realizada por Jones y colaboradores en 1972, fué de 72500 (53).

Ha sido posible observar por microscopía electrónica que la A_2MG se muestra unida a proteinasas dando con ello diferentes apariencias en su forma. Estas tienen composiciones similares de aminoácidos, pero sus puntos isoeléctricos se elevan; el contenido de ácido siálico disminuye y la proporción manosa/galactosa aumenta. En electroforesis la A_2MG humana presenta microheterogeneidad, Gallego y Castillo en 1974 atribuyen que las diferencias en movilidad en electroforesis en gel de agar, es debido al polimorfismo genético (99).

La A_2MG se sintetiza en el hígado, pero otras células del cuerpo pueden sintetizarla, Tunstall Y James, proporcionan la evidencia de la síntesis de esta proteína por linfocitos humanos in vitro. La concentración normal en el plasma humano es de 2 mg/ ml y existen algunas diferencias entre sexos y edades diferentes. Los incrementos ocurren en síndrome nefrótico (50) debido a la disminución del volumen del plasma con una pérdida selectiva de proteínas de peso molecular menor (99). La estabilidad de los niveles de A_2MG en pacientes con quemaduras graves resulta de la síntesis rápida de la proteína balanceada por la pérdida rápida también del exudado. En el hombre en circunstancias normales aproximadamente el 10 % de la A_2MG circulante se

cataboliza diariamente. Existen grandes indicadores de que la A_2MG puede tambien contribuir a las defensas del cuerpo contra patógenos invasivos y parásitos los cuales a menudo penetran al cuerpo con ayuda de actividad proteolítica (99). Ha sido identificada en tejidos malignos de humanos (82).

MATERIAL Y METODOS.

Para este estudio empleamos ratas de la cepa Sprague-Dawley, del sexo femenino, que tenían 80 días de edad en vez de los cincuenta días requeridos en el modelo de Huggins (101).

Para los grupos experimentales usamos 70 animales para la inducción del cáncer mamario.

Empleamos 25 animales testigo, a los que se les administró un mililitro de aceite de ajonjolí por una sola ocasión y colocado directamente en el estómago.

Todos los animales tanto los testigo como los grupos experimentales fueron puestos en jaulas previamente clasificados (sistema de horadación de orejas, tres días antes de que se sometieran al estudio, para observar cicatrización y desinfección adecuadas); alimentados con una dieta balanceada (Purina rodent5001 Laboratory Chow-Brand), agua ad libitum; fueron mantenidos en bioterio con una temperatura de 23 °C, humedad controlada, fotoperíodo de 12x12 horas luz-oscuridad.

Cáncer Experimental. Utilizamos el método de Huggins (101) que consistió en la administración de 20 mg/ml de 7,12-Dimetilbenz(a)antraceno (DMBA) (Sigma Chemical), disuelto en aceite de ajonjolí por calentamiento a baño maría, en dosis única e instalada en el estómago con ayuda de una sonda gástrica metálica de doce centímetros de longitud. Las ratas fueron examinadas cada tercer día hasta palpar los tumores en las zonas mamarias.

A un grupo de 20 animales que habían desarrollado neoplasia mamaria macroscópicamente visible, se les separó en jaulas individuales y se permitió el crecimiento tumoral, para observar su progresión, invasividad y posibles metástasis.

El sacrificio de todas las ratas fué por exanguinación, previa anestesia leve con éter, extrayendo la sangre por punción directa de la aorta abdominal para las determinaciones bioquímicas en suero.

En todos los animales se practicó la autopsia y se obtuvieron fragmentos de los siguientes órganos: pulmón, hígado, riñón, intestino delgado, corazón bazo y esófago para estudio histológico y de la neoplasia cuando ésta ya se había formado.

Se sacrificaron tres de los animales testigo y en grupos de cinco los tratados con DMBA sin neoplasia, cada dos semanas hasta completar catorce semanas y el grupo que desarrolló neoplasias al cumplir diez semanas después de la detección de los tumores.

Estudios histológicos. Todos los cortes obtenidos durante las autopsias, tanto de los órganos como de los tumores experimentales fueron fijados 24 horas en formol al 10 % a pH 7.0

Se procesaron con deshidratación en alcoholes e inclusión en parafina. Se hicieron cortes en microtomo rotatorio a 4 micras de espesor y se realizaron tinciones de hematoxilina eosina, ácido peryódico de Schiff y azul de toluidina ácida para células cebadas (102). Las observaciones se realizaron en un microscopio de luz marca Reichert con óptica planacromática.

Ultraestructura. De los tumores experimentales se obtuvieron cortes pequeños de aproximadamente un milímetro cúbico, que fueron fijados en 100 μ l de gluteraldehído al 2 % en amortiguador de cacodilatos 0.1 M a pH 7.0; a 4 °C durante seis horas. Después fueron deshidratados en alcoholes e incluidos en araldita. Se obtuvieron cortes semifinos en un microtomo Reichert OMU-3, para coloración con azul de toluidina y localización de campos. Después se obtuvieron cortes finos (plateados) que se colocaron en rejillas de cobre y se tiñeron con la técnica de Reynolds. La observación se llevó a cabo en un microscopio electrónico Zeiss EM-10.

Obtención de citosol. Se resecaron los tumores durante la autopsia y después de tomar los fragmentos para la histología, éstos se pesaron y se cortaron aún más para proceder a la homogeneización. Esta se llevó a cabo por medio de un homogeneizador de vidrio Potter-Enjelhem en diversos sistemas amortiguadores según la enzima que se iba a determinar.

El homogeneizado se centrifugó empleando el rotor Ti-75, en una ultracentrífuga Beckman clase H, modelo L5-75 a 105000 g durante una hora, dos veces, utilizando el sobrenadante de la segunda para determinaciones enzimáticas.

DETERMINACION DE PROTEINASAS. Estas determinaciones se hicieron en el suero de los animales testigo y en el de los grupos experimentales, así como en el citosol procedente del homogenado de las mamas de las ratas testigo y en cada uno de los citosoles obtenidos de los homogenados del grupo de animales con cáncer.

Serino proteasas. Para la determinación de AP (EC 3.4.21.31) se utilizó el sustrato artificial CBZ-Gli-Gli-Arg-4-MeO β NA (Sigma Chemical), siguiendo la metodología de Huseby (47,48). Las determinaciones se realizaron por triplicado, 200 microlitros de la muestra en el sistema amortiguador fosfato monobásico de sodio/ fosfato dibásico de sodio 40 mM a pH 7.0 y 500 micromolas del sustrato artificial en un volumen total de 2 ml. La incubación se llevó a cabo durante treinta minutos en un baño maría a 37 °C, con agitación constante. Se detuvo la reacción por la adición de 0.5 ml de ácido clorhídrico 1.0 N

La fluorescencia del producto de la reacción de hidrólisis se midió contra el blanco, en un espectrofotofluorómetro Aminco Bowman a 340 nm de excitación y 425 nm de emisión. La curva modelo se hizo con p-toluénsulfonato de 4-metoxi-beta-naftilamina (Sigma Chemical). Los valores se expresaron en nanomolas de sustrato hidrolizado por minuto y por miligramo de proteína .

Tiolproteinasas. Para la determinación de enzima semejante a catepsina B, se utilizó el sustrato artificial BANA (Sigma Chemical) siguiendo la metodología de De Lumen y Tappel (103), la cual consiste en disolver 20 mg del sustrato en 0.3 ml de sulfóxido de dimetilo y se añadió con agitación constante 10 ml de agua destilada y deionizada, calentada a 37 °C. Se adicionó cuidadosamente el sistema amortiguador (fosfato monobásico de potasio/ fosfato dibásico de potasio 0.05 M a pH 7.0) hasta completar el volumen total a 20 ml. Las concentraciones finales de los componentes fueron 2.3 mM de BANA, 1.5% de sulfóxido de dimetilo y 0.05 M del sistema amortiguador.

El compartimiento del espectrofotofluorómetro Aminco Bowman se calentó a 37 °C durante cinco minutos para cada determinación. Las muestras se trabajaron por triplicado. En el compartimiento se efectuó la mezcla de 25 microlitros de muestra con 100 microlitros de 0.1 M de ditioeritritol (Sigma Chemical) y hasta entonces se adicionó con agitación constante 1 ml del sustrato previamente calentado a 37 °C; se tomaron lecturas hasta completar dos minutos. Se obtuvo la velocidad inicial por la gráfica, cuando se trazó una línea a través del cero y la tangente de la curva de reacción.

El producto de la reacción se midió en un espectrofotofluorómetro Aminco Bowman a 345 nm de excitación y 405 nm de emisión. La curva modelo se hizo con una solución acuosa de beta-naftilamina (Sigma Chemical) (100 ng/ ml) almacenada a 4°C en frasco color ámbar.

Los valores se expresaron en nanomolas de sustrato hidrolizado por minuto y por miligramo de proteína .

Catepsina B.- (EC 3.4.22.1) Para esta determinación se utilizó la metodología de Szego y Recklies (61,104,105), que consistió en emplear como sistema amortiguador una mezcla, a una concentración 40 mM de ácido cítrico/ fosfato dibásico de sodio, a pH 5.4 en presencia de 20 mM de ditiotreitól (Sigma Chemical) y 0.17 milimolas del sustrato artificial CBZ-Ala-Arg-Arg-4-MeO β NA (Sigma Chemical)

en un volumen total de 2 ml con doscientos microlitros de muestra. La incubación se llevó a cabo durante treinta minutos a 37 °C y con agitación constante. Se detuvo la reacción por la adición de 0.5 ml de ácido clorhídrico 1.0 N

Se verificó que no se requería clarificación por centrifugación aún cuando se enturbiara la muestra.

El producto de la reacción se midió contra el blanco, en un espectrofotofluorómetro Aminco Bowman a 292 nm de excitación y 410 de emisión. Las muestras se trabajaron por triplicado.

La curva modelo se hizo con p-toluénsulfonato de 4-metoxi-beta naftilamina (Sigma Chemical).

Los valores se expresaron en nanomolas de sustrato hidrolizado por minuto y por miligramo de proteína .

DETERMINACION DE PROTEINAS TOTALES. Se determinaron por refractometría en el suero de los animales testigo y en el de los grupos experimentales, así como en el citosol procedente del homogenado de las mamas de las ratas testigo y en los citosoles de los homogenados de los grupos experimentales.

Utilizamos un refractómetro American Optical, modelo SL-10400 y los valores se expresaron en miligramos por mililitro de muestra (106).

ELECTROFORESIS DE PROTEINAS SERICAS. Estas determinaciones se hicieron en el suero de los animales testigo y en el de los grupos experimentales.

La separación de proteínas séricas se realizó a través de un gel de agarosa (107).

Preparación de las placas de agarosa: se disolvieron en baño maría 250 mg de agarosa en 50 ml del sistema amortiguador barbital/veronal (ácido 5,5-Dietilbarbitúrico/ 5,5-Dietilbarbiturato de sodio, Beckman) a pH 8.6, de fuerza iónica 0.05 miliohmios, con una gota del indicador bromofenol al 2 %. Una vez que se disol-

vió la agarosa, se sirvieron once mililitros sobre los portaobj_etos que desacansaban en marcos especiales, los cuales a su vez se encontraban en una mesa nivelada; se dejaron fraguar a temperatura ambiente durante diez a quince minutos y posteriormente endurecieron cuando se colocaron en cámara húmeda a 5 °C durante una hora.

Cuando las placas de agarosa fraguaron, se pudo aplicar cinco microlitros de cada muestra. Así aplicada, se procedió a poner en el marco que contenía seis placas con muestras sobre el soporte de la cámara para electroforesis; se dejó pasar corriente a 400 voltios y 25 miliamperios durante setenta y cinco minutos a 5 °C.

Una vez que se terminó el tiempo necesario, se separaron los marcos cuidadosamente y se tiñeron con Ponceau a pH menor de 10, para posteriormente decolorar en una solución de ácido acético al 5 %.

Se estableció la curva densitométrica para el cálculo de las proteínas séricas, para lo cual empleamos un densitómetro Kipp-Zonen Skalar, modelo KS-3; acoplado a un graficador modelo BD-8 de la misma marca.

Los valores se expresaron en miligramos por ciento del suero.

CAPACIDAD INHIBITORIA DE LA TRIPSINA. (C.I.T.) La actividad antiproteolítica se midió como capacidad inhibitoria de la tripsina con el método espectrofotométrico de Lieberman (87), se determinó tanto en el suero de los animales testigo, como en el de los grupos experimentales así como en el citosol procedente de las mamas de las ratas testigo y en el de los citosoles obtenidos de los homogenados correspondientes a los grupos experimentales.

Se preparó una solución acuosa de 15 mg de tripsina (Sigma Chemical, 1000 U, de páncreas de bovino, enzima tipo III) en 5 ml de agua destilada y deionizada, esta solución se diluyó 1:2 y poste-

riormente se llevó 1:4. En esta solución final se midió la concentración de proteína absoluta de la tripsina en mg/ 100 ml, al determinarse su absorbencia a 280 nm en un espectrofotómetro UV-Vis 139 Hitachi Perkin-Elmer; la lectura se multiplicó por el factor 0.585

Para obtener la línea recta en la gráfica de cada uno de los animales en estudio, se necesitó hacer una serie de diluciones; por lo que se mezcló una cantidad constante de la solución de tripsina (0.3 ml) con cantidades variables (0.2, 0.3, 0.4, 0.6, 0.8) de una dilución 1:5 ya sea del suero o muestra de citosol cuando éstos se aforaron con un sistema amortiguador de fosfato monobásico de sodio/ fosfato dibásico de sodio 0.1 M a pH 7.0 a un volumen final de 0.7 ml

En una cubeta a 30 °C se colocó la alícuota (0.2 ml) de mezcla suero-tripsina o bien citosol-tripsina y se añadieron rápidamente a 3 ml del sustrato artificial BAEE 0.5 mM en el mismo sistema amortiguador mencionado anteriormente. Así, se leyeron cada una de las diluciones contra el blanco, en el espectrofotómetro a 253 nm, cada treinta segundos hasta completar tres minutos.

La actividad de tripsina (cambio en la absorbencia por minuto) de la mezcla no inhibida y de la serie de mezclas inhibidas se graficó contra la cantidad de suero total adicionado.

La porción de la línea recta de la gráfica se extendió hasta la abscisa (volumen de suero) donde se calculó la tripsina que podría ser inhibida totalmente.

Los valores se expresaron como miligramos de tripsina inhibida por mililitro de muestra .

CALCULO DEL INDICE DE ACTIVIDAD ANTIPROTEOLITICA.

En cada caso tanto en el grupo testigo como en el grupo DMBA con cáncer, se determinó el Índice de actividad antiproteolítica, como el cociente de la relación del valor obtenido como la Capacidad Inhibitoria de la Tripsina (C.I.T.) en el suero problema con

el promedio del valor de C.I.T. obtenido en el grupo testigo multiplicado por cien, todo ello como NUMERADOR y como DENOMINADOR la relación del valor obtenido para la concentración del inhibidor de alfa-1-proteinasa (I.A.P.) determinada por análisis electroforético del suero problema con el promedio de los valores I.A.P. del grupo testigo multiplicado por cien. (31,108).

FORMULA:

$$\frac{\text{Valor C.I.T. problema} / \bar{X} \text{ C.I.T. testigo} \times 100}{\text{Valor I.A.P. problema} / \bar{X} \text{ I.A.P. testigo} \times 100} = \text{INDICE}$$

METODOS ESTADISTICOS.

Todos los resultados se analizaron estadísticamente calculando promedios ($\bar{X}$), desviación estándar (D.E.) y probabilidad (Prueba de "t") (109).

En las figuras se expresó el error estándar.

También se determinó el coeficiente de correlación y se estableció la probabilidad correspondiente (110).

RESULTADOS.

Producción de cánceres de la mama. Debemos señalar que la mortalidad inmediata, posterior a la administración del DMBA fué del 12 %. Atribuimos esta mortalidad a la toxicidad de la propia sustancia; los animales fueron repuestos para completar los grupos. De acuerdo a lo señalado por Huggins en su artículo original (101), las neoplasias aparecen aproximadamente entre 6 y 8 semanas en el 100 % de los animales tratados. En nuestro caso las neoplasias comenzaron a palparse en el sitio de las líneas mamarias ocho semanas después de la administración de la dosis de DMBA. Esto ocurrió sin embargo, en un número reducido de animales experimentales, pues en la mayoría las neoplasias aparecieron después de la décima semana. Nosotros consideramos que esto se debió a que nuestros animales en experimentación ya eran adultos cuando se les administró el DMBA.

Todos los tumores observados se encontraron asociados directamente a alguna de las mamas del animal, generalmente en la parte superior del tronco. Aquellos animales a los cuales se les permitió continuar viviendo para observar el crecimiento de la tumoración, desarrollaron tumores muy grandes, que llegaron a medir 4.5 cm de diámetro y en dos casos se observó ulceración de la piel y necrosis superficial de la tumoración.

Necropsias. En los animales autopsiados antes de las ocho semanas o aquéllos que macroscópicamente no tenían neoplasia, no se comprobó ninguna alteración macroscópica en las mamas disecadas ni en los órganos internos del animal. En aquellos animales que mostraron tumor palpable o macroscópicamente visible, se pudo constatar la presencia de uno o más tumores en las zonas mamarias de la parte superior del animal. En todos los casos los tumores estaban bien delimitados, vascularizados por las arterias mamarias, ligeramente adheridos al músculo cutáneo pero nunca infiltrando los tejidos.

dos subyacentes ni periféricos. En los tumores de mayor tamaño era posible enuclear el tumor digitalmente sin que hubieran adherencias grandes ni a la piel ni a los tejidos subyacentes. Al corte todos los tumores mostraron una consistencia renitente, tenían un color amarillento grisáceo y eran multilobulados. En los tumores de mayor tamaño se observaron áreas extensas de hemorragia y de necrosis. En ninguno de los exámenes macroscópicos de todos los órganos de la rata con tumor mamario se reveló alteraciones de importancia ni se mostraron siembras metastásicas.

Estudios histológicos. En los cortes de hematoxilina y eosina de las tumoraciones se pudo observar que estaban constituidas por tejido neoplásico de tipo epitelial. Este formaba en general conductos y cordones de células tipo epitelial distribuidos en masas irregulares y rodeadas por bandas finas de tejido conectivo. Las células epiteliales neoplásicas eran de tipo cuboideo con núcleo único y nucleolos aparentes. En donde se formaban estructuras de tipo glandular se pudo observar con frecuencia la presencia de secreción proteinasa en su luz. Existía anaplasia moderada y actividad mitótica muy abundante con algunas figuras de mitosis anormales. En las bandas de tejido conectivo que rodeaban a las masas tumorales, se observó infiltrado inflamatorio abundante constituido por células linfoides, células plasmáticas, eosinófilos y polimorfonucleares numerosos. En los bordes de la neoplasia no se pudo observar invasión al estroma, más que en casos avanzados en los cuales existía infiltración de la neoplasia al tejido muscular subyacente (músculo cutáneo) y al tejido conectivo y adiposo periférico. Cabe señalar que esta invasión no rebasaba 1.0 milímetro de espesor y no destruía las fibras musculares adyacentes. Con este estudio se pudo constatar que se trataba de adenocarcinoma de tipo ductal bien diferenciado, poco infiltrante y sin invasión vascular sanguínea

ni linfática. En las tinciones de ácido peryódico de Schiff (PAS) se observó cantidad abundante de material PAS positivo, sensible a diastasa, por lo que deducimos que se trataba de glucógeno intracitoplasmático. Con las tinciones de azul de toluidina ácida para metacromasia se observaron células cebadas abundantes tanto en las bandas del estroma conectivo como entre las propias células neoplásicas de adenocarcinoma. La distribución de estas células era muy peculiar pues parecían estar alineadas y adosadas a los límites entre neoplasia y tejido conectivo.

Ultraestructura. En los estudios de cortes finos al microscopio electrónico, se pudo constatar que el cáncer experimental estuvo constituido por células de tipo epitelial, que mostró en ocasiones desmosomas abundantes y que formaban canalículos o conductos con microvellosidades discretas hacia la luz. El citoplasma de la célula presentaba retículo endoplásmico liso, se observaron mitocondrias abundantes, algunas de las cuales eran de aspecto normal, pues también encontramos megamitocondrias y mitocondrias alargadas y filiformes con crestas irregulares. Cerca de las zonas de necrosis se encontraron lisosomas abundantes en las células en proceso de lisis, así como autofagosomas abundantes. También se observaron, en campos de zonas sin necrosis, polimorfonucleares numerosos, adosados a células neoplásicas viables, con pseudópodos pegados a la membrana de las células cancerosas, con polarización de sus gránulos lisosomales hacia los pseudópodos que adosaban a estas células. La ultraestructura reveló la diferenciación buena de esta neoplasia a pesar de las alteraciones ultraestructurales discretas de las mitocondrias y retículo endoplásmico. Nos llamó la atención la frecuencia de adosamientos de células fagocíticas a las células neoplásicas y también la abundancia de células cebadas.

Es de interés señalar que en cortes numerosos no fué posible observar áreas de lisis de la colágena en las zonas de contacto de las células neoplásicas con el estroma circundante, como ha sido descrito en otras neoplasias invasoras y altamente malignas.

DETERMINACION DE PROTEINASAS. Aunque la determinación de las proteinasas en el suero se hizo periódicamente en grupos de cinco animales y tres testigo, con el objeto de constatar si en algún momento del proceso se producía algún cambio, al recolectar los datos se vió que, en el tiempo que duró la observación de los animales no hubieron variaciones significativas ni progresivas, por ello, se decidió finalmente para recopilar los resultados expresarlos como promedios y desviaciones estándares, concentrarlos en tablas y hacer sólo tres grupos que son: grupo testigo, grupo de animales tratados con DMBA pero que todavía no habían desarrollado cáncer y grupo de animales tratados con DMBA que ya habían desarrollado cáncer.

Los resultados de proteinasas en suero de estas ratas se encuentran resumidos en la tabla 1.

Serinoproteasas. Estas enzimas se determinaron por el método de Huseby y Smith (47,48) utilizamos el sustrato CBZ-Gli-Gli-Arg-4-MeO PNA, según los autores es el péptido artificial para cuantificar AP (EC 3.4.21.31).

Se pueden ver en la tabla 1 y en la figura 1, que se obtuvo un valor de 3.12 nanomolas de sustrato hidrolizado/ minuto/mg de proteína, con una desviación estándar de 0.41 para el grupo testigo; en el grupo tratado con DMBA sin cáncer el valor fué 3.85, con una desviación estándar de 0.46 y en el grupo tratado con DMBA con cáncer de la mama el valor fué 4.85 con una desviación estándar de 1.09 . Los estudios estadísticos mostraron diferencias significativas entre grupos ($p < 0.001$).

Tiolproteinasas. En los métodos utilizados hace años, se empleaba fundamentalmente el sustrato BANA, por la metodología de De Lumen y Tappel (103), pero en estas fechas se ha demostrado que dicho sustrato puede ser hidrolizado por serinoproteasas; por lo que decidimos utilizarlo, señalándose como "enzima semejante a catepsina B" (111,112).

Podemos observar en la tabla 1 y en la figura 2, el valor del grupo testigo fué de 4.02, con una desviación estándar de 0.57; el grupo de DMBA sin cáncer obtuvo 4.80, con una desviación estándar de 0.83 y el grupo DMBA con cáncer mamario tuvo un valor de 5.59, con una desviación estándar de 1.29 de nanomolas de sustrato hidrolizado/ minuto/ mg de proteína. Los estudios estadísticos mostraron diferencias significativas entre: Testigo vs DMBA sin cáncer ($p < 0.001$); DMBA sin cáncer vs DMBA con cáncer ($p < 0.025$) y Testigo vs DMBA con cáncer ($p < 0.001$).

Para el caso de la determinación de CB (EC 3.4.22.1) por la metodología de Szego y Recklies (61,104,105) utilizamos el sustrato CBZ-Ala-Arg-Arg-4-MeO β NA, que es uno de los péptidos artificiales más específico para esta tiolproteínasa.

Podemos ver en la tabla 1 y la figura 3, el valor del grupo testigo fué de 3.94 nanomolas de sustrato hidrolizado/ minuto/ mg de proteína, con una desviación estándar de 0.68; el grupo DMBA sin cáncer obtuvo un valor de 4.42, con una desviación estándar de 0.51 y el grupo DMBA con cáncer de la mama obtuvo un valor de 5.27, con una desviación estándar de 1.19. Los estudios estadísticos mostraron diferencias significativas entre grupos: Testigo vs DMBA sin cáncer ($p < 0.005$), DMBA sin cáncer vs DMBA con cáncer ($p < 0.003$) y Testigo vs DMBA con cáncer ($p < 0.001$).

PROTEINASAS EN CITOSOL. Tuvimos mucha dificultad para obtener tejido mamario y separación de citosoles de los homogenados de las ratas sin tumor; dado que éstas aunque adultas, no habían amamantado a su prole, si se hubiera realizado esta acción, el tejido glandular mamario probablemente se habría desarrollado y de esta manera hubiéramos obtenido la cantidad suficiente de cada ejemplar. Por lo que decidimos reunir en una poza común, los fragmentos obtenidos de diez ratas y así hacer las determinaciones enzimáticas como testigo. Esta muestra se trabajó por duplicado y corresponde a ratas no tratadas con DMBA.

Serinoproteasas. Utilizamos nuevamente el sustrato específico para cuantificar AP (EC 3.4.21.31) CBZ-Gli-Gli-Arg-4-MeO β NA del método de Huseby y Smith (47,48).

Podemos ver en la tabla 2, el valor obtenido de 0.642 nanomolas de sustrato hidrolizado/ minuto/ mg de proteína para nuestro testigo y como promedio de los valores obtenidos de los citosoles provenientes de los homogenados de cada uno de los tumores mamarios de once ratas tratadas con DMBA, un valor de 0.748, con una desviación estándar de 0.098

Tiolproteinasas. Utilizamos el sustrato BANA para la determinación de la "enzima semejante a cathepsina B", según la metodología de De Lumen y Tappel (103) como ya mencionamos anteriormente en el caso de los sueros.

Para nuestro testigo hicimos el mismo procedimiento que para cuantificar las serinoproteasas en el citosol.

Vemos en la tabla 3, el valor obtenido de 4.08 nanomolas de sustrato hidrolizado/ minuto/ mg de proteína para nuestro testigo en citosol; concentración semejante a la obtenida en los sueros de los grupos experimentales. En tanto como promedio de las determinaciones en los citosoles provenientes de homogenados de tumores mamarios de once ratas tratadas con DMBA, tuvimos un valor de 25.98 nanomolas de sustrato hidrolizado/ minuto/ mg de proteína, con una desviación estándar de 3.37

En la determinación de CB (EC 3.4.22.1) por la metodología de Szego y Recklies (61,104,105) utilizamos nuevamente el sustrato CBZ-Ala-Arg-Arg-4-MeO β NA, como en los sueros.

Para nuestro testigo hicimos el mismo procedimiento que para cuantificar las serinoproteasas en el citosol.

Podemos ver en la tabla 3, que no fué posible detectar la concentración por las condiciones del método empleado en la determinación de CB en el citosol testigo. En tanto que, como promedio de las determinaciones en los citosoles provenientes de homogenados de tumores mamarios de las once ratas tratadas con DMBA, obtuvimos un valor de 22.40 nanomolas de sustrato

hidrolizado/ minuto/ mg de proteína, con una desviación estándar de 2.3

Proteínas Séricas. Los resultados obtenidos por el análisis electroforético en gel de agarosa, se encuentran resumidos en la tabla 4.

Albúmina.- Para el grupo testigo obtuvimos un valor de 3326 mg % de suero, con una desviación estándar de 440; para el grupo DMBA sin cáncer se tuvo un valor de 3455, con una desviación estándar de 138 y el grupo DMBA con cáncer tuvo un valor de 3554, con una desviación estándar de 599. No hubieron diferencias significativas entre grupos, por estudios estadísticos.

Inhibidor de alfa-1-proteinasa. Para el grupo testigo obtuvimos un valor de 302 mg % de suero, con una desviación estándar de 86; para el grupo DMBA sin cáncer tuvo un valor de 256, con una desviación estándar de 40 y para el grupo DMBA con cáncer obtuvimos un valor de 240, con una desviación estándar de 36. Como podemos observar en las tablas 4, 5 y en la figura 4, los estudios estadísticos nos dieron las siguientes diferencias:

Testigo vs DMBA sin cáncer ($p < 0.015$), DMBA sin cáncer vs DMBA con cáncer ($p > 0.300$), Testigo vs DMBA con cáncer ($p < 0.025$).

Alfa-2-macroglobulina. Para el grupo testigo obtuvimos un valor de 356 mg % de suero, con una desviación estándar de 93; para el grupo DMBA sin cáncer tuvo un valor de 337, con una desviación estándar de 74 y el grupo DMBA con cáncer obtuvo un valor de 330 con una desviación estándar de 54. No hubieron diferencias significativas entre grupos al realizar los estudios estadísticos.

Beta. Para el grupo testigo obtuvimos un valor de 879 mg % de suero, con una desviación estándar de 220; para el grupo DMBA sin cáncer obtuvimos un valor de 725, con una desviación estándar de 57 y para el grupo DMBA con cáncer se obtuvo un valor de 1268, con una desviación estándar de 119. Los estudios estadísticos nos dieron las diferencias significativas siguientes:

entre grupos testigo vs DMBA sin cáncer; DMBA sin cáncer vs DMBA con cáncer y testigo vs DMBA con cáncer ($p < 0.001$).

Gamma. Para el grupo testigo obtuvimos un valor de 862 mg % de suero, con una desviación estándar de 280; para el grupo DMBA sin cáncer obtuvimos un valor de 917, con una desviación estándar de 90 y para el grupo DMBA con cáncer se tuvo un valor de 1396, con una desviación estándar de 255. Los estudios estadísticos nos dieron las siguientes diferencias para: testigo vs DMBA sin cáncer ($p > 0.400$), DMBA sin cáncer vs DMBA con cáncer ($p < 0.001$) y testigo vs DMBA con cáncer ($p < 0.001$).

Capacidad Inhibitoria de Tripsina. C.I.T. La determinamos por el método de Lieberman (87), los resultados se encuentran resumidos en la tabla 5, corresponden al promedio de los valores obtenidos en suero, puesto que en las condiciones usadas no fué posible cuantificarla en los citosoles de homogenados tanto de la muestra testigo como de los provenientes de tumores mamarios de las ratas.

Así observamos que para el grupo testigo se obtuvo un valor de C.I.T. en suero de 1.1253 mg de tripsina inhibida/ ml, con una desviación estándar de 0.38; para el grupo DMBA sin cáncer un valor de 0.930, con una desviación estándar de 0.14 . Los estudios estadísticos muestran que entre grupos tenemos: testigo vs DMBA sin cáncer ($p < 0.010$), DMBA sin cáncer vs DMBA con cáncer ($p > 0.300$) y para testigo vs DMBA con cáncer ($p > 0.5$) Sólo hubo diferencia significativa entre los grupos testigo y DMBA sin cáncer. (Figura 5).

Indice de actividad antiproteolítica. Aún cuando la concentración del inhibidor de alfa-1-proteinasa (I.A.P.) presenta una tendencia a la disminución en los sueros de los grupos experimentales, decidimos investigar su actividad antiproteolítica a través del Indice según la fórmula señalada en Material y Métodos (pág. 32).

El cálculo de este Índice se realizó únicamente entre los grupos testigo y DMBA con cáncer.

Podemos observar estos resultados en la tabla 6, en donde para el grupo testigo obtuvimos un Índice de 1.1345 con una desviación estándar de 0.145 y para el grupo DMBA con cáncer obtuvimos un valor de 1.100, con una desviación estándar de 0.123 en los sueros de las ratas tratadas con DMBA. Los estudios no mostraron diferencias estadísticamente significativas.

Hubo correlación positiva entre las concentraciones de serino-proteasas en ratas que desarrollaron tumores mamarios por efecto de la administración del DMBA, comparamos los valores obtenidos en cada uno de los citosoles de tumores contra los obtenidos como concentraciones séricas de esas mismas ratas. El coeficiente de correlación fué de 0.95 ($p < 0.001$). (Figura 6).

Con respecto a las tiolproteinasas diremos que, no hubo correlación entre las concentraciones de la enzima semejante a la catepsina B de los citosoles provenientes de los homogenados de tumores mamarios de rata y las obtenidas de los sueros de esas mismas ratas.

Se tuvo una correlación positiva en las concentraciones de CB, al comparar las obtenidas en cada uno de los citosoles de homogenados de tumor contra las concentraciones séricas cuantificadas para esa tiolproteinasas en esas mismas ratas. El coeficiente de correlación fué de 0.95 ($p < 0.001$). (Figura 7).

Existe correlación positiva entre las concentraciones del inhibidor de alfa-1-proteinasas determinadas por análisis electroforético contra la Capacidad Inhibitoria de Tripsina cuantificada por el método de Lieberman, en los sueros de las ratas que desarrollaron neoplasias mamarias. El coeficiente de correlación fué de 0.80 ($p < 0.010$). (Figura 8).

TABLA 1

Valores promedio ($\bar{x}$) y desviaciones estándar (D.E.) de Activador de Plasminógeno, enzima semejante a catepsina B y la catepsina B (en nanomolas de sustrato hidrolizado/ minuto/ mg de proteínas) en sueros de rata: Testigo, DMBA sin cáncer y DMBA con cáncer.

La significancia se expresó en valores de p, en la parte inferior de la tabla.

SERINOPROTEASAS			TIOLPROTEINASAS	
Activador de Plasminógeno.			Enzima semejante a catepsina B.	Catepsina B
TESTIGO	n	25	25	25
	$\bar{x}$	3.12	4.02	3.94
	D.E.+ ₋	0.41	0.57	0.68
DMBA sin cáncer.	n	35	35	35
	$\bar{x}$	3.85	4.80	4.42
	D.E.+ ₋	0.46	0.83	0.51
DMBA con cáncer	n	11	11	11
	$\bar{x}$	4.85	5.59	5.27
	D.E.+ ₋	1.09	1.29	1.19

SIGNIFICANCIA

TESTIGO VS DMBA sin cáncer.	p < 0.001	p < 0.001	p < 0.005
DMBA sin cáncer. VS DMBA con cáncer.	p < 0.001	p < 0.025	p < 0.003
TESTIGO VS DMBA con cáncer.	p < 0.001	p < 0.001	p < 0.001

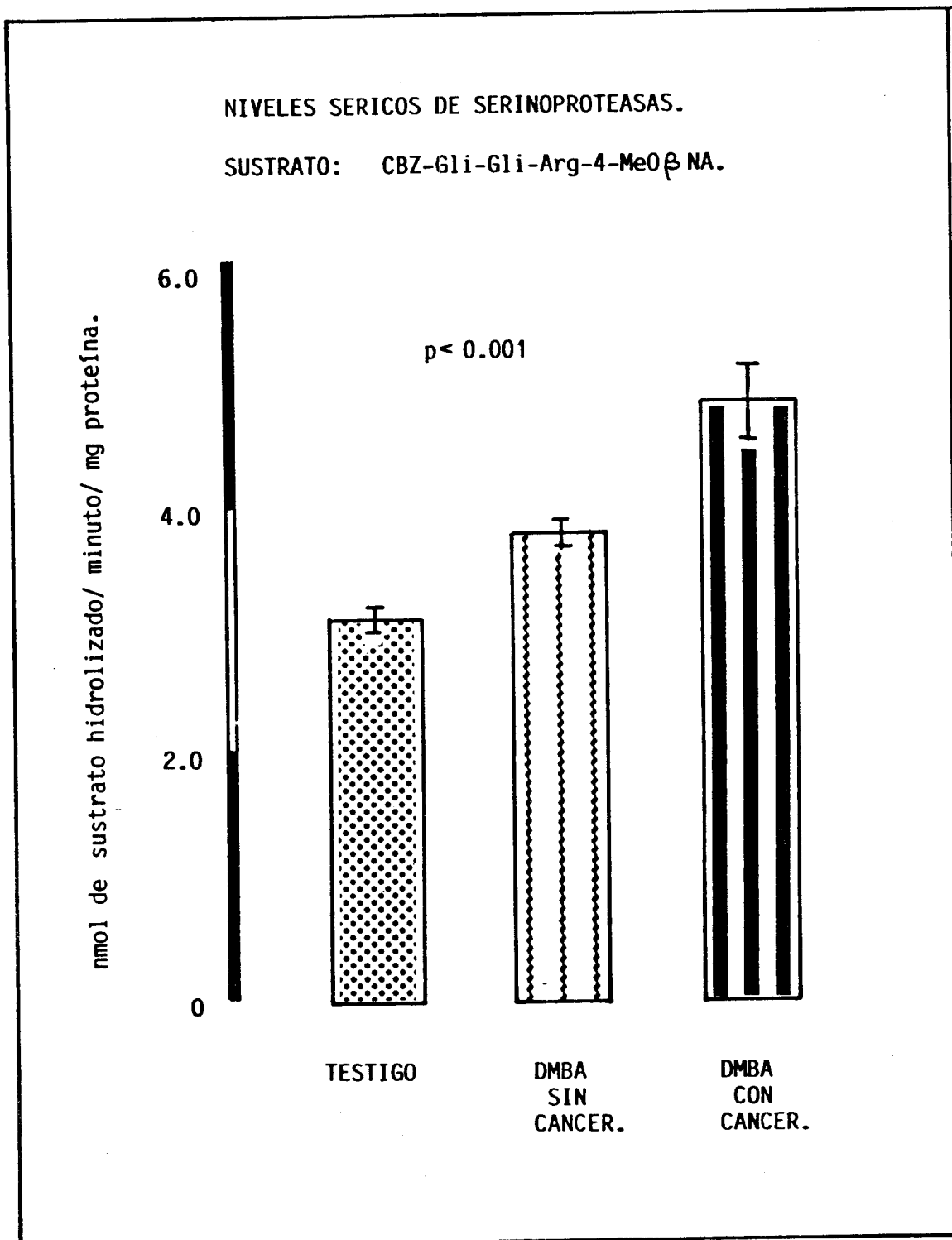


Figura No. 1

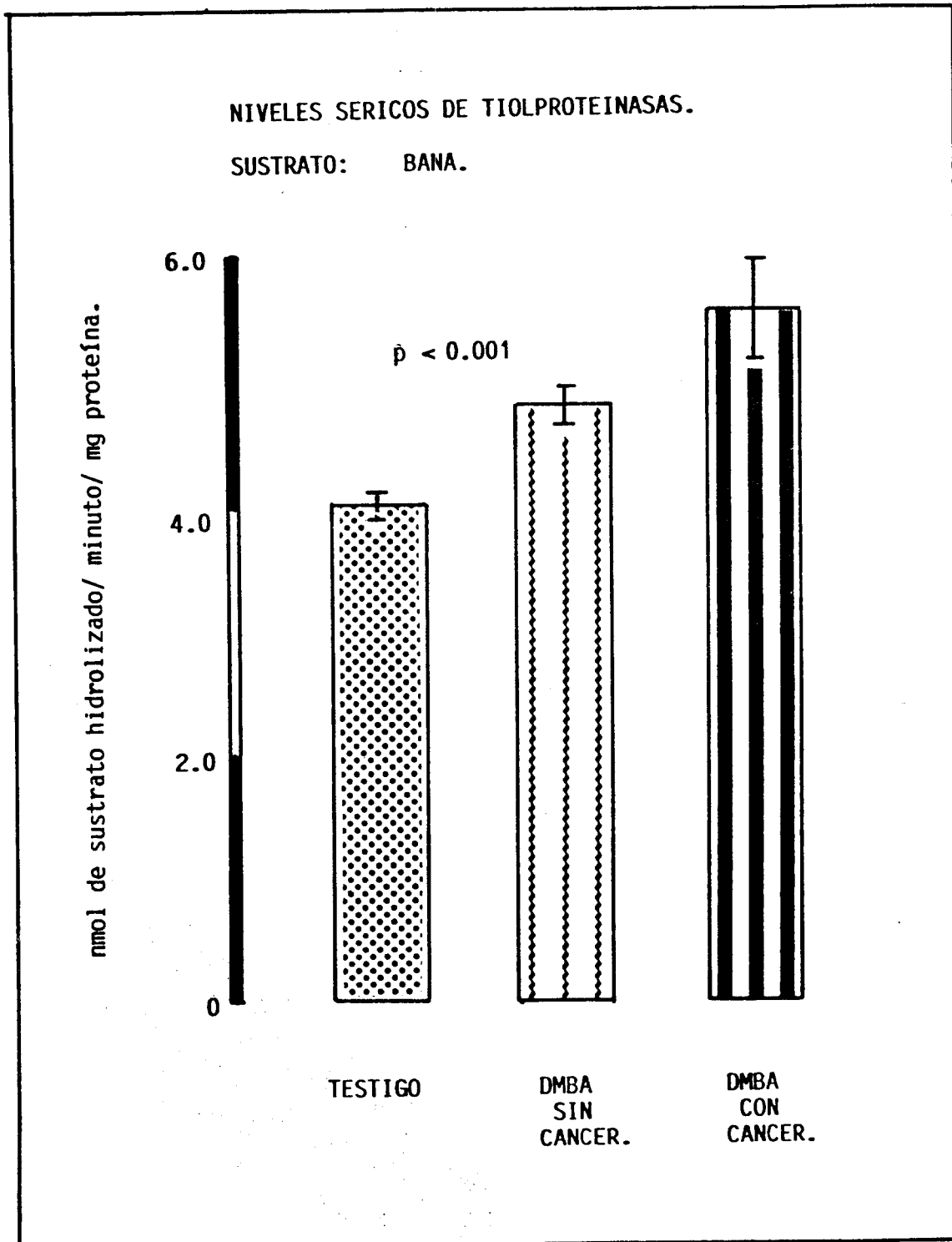


Figura No. 2

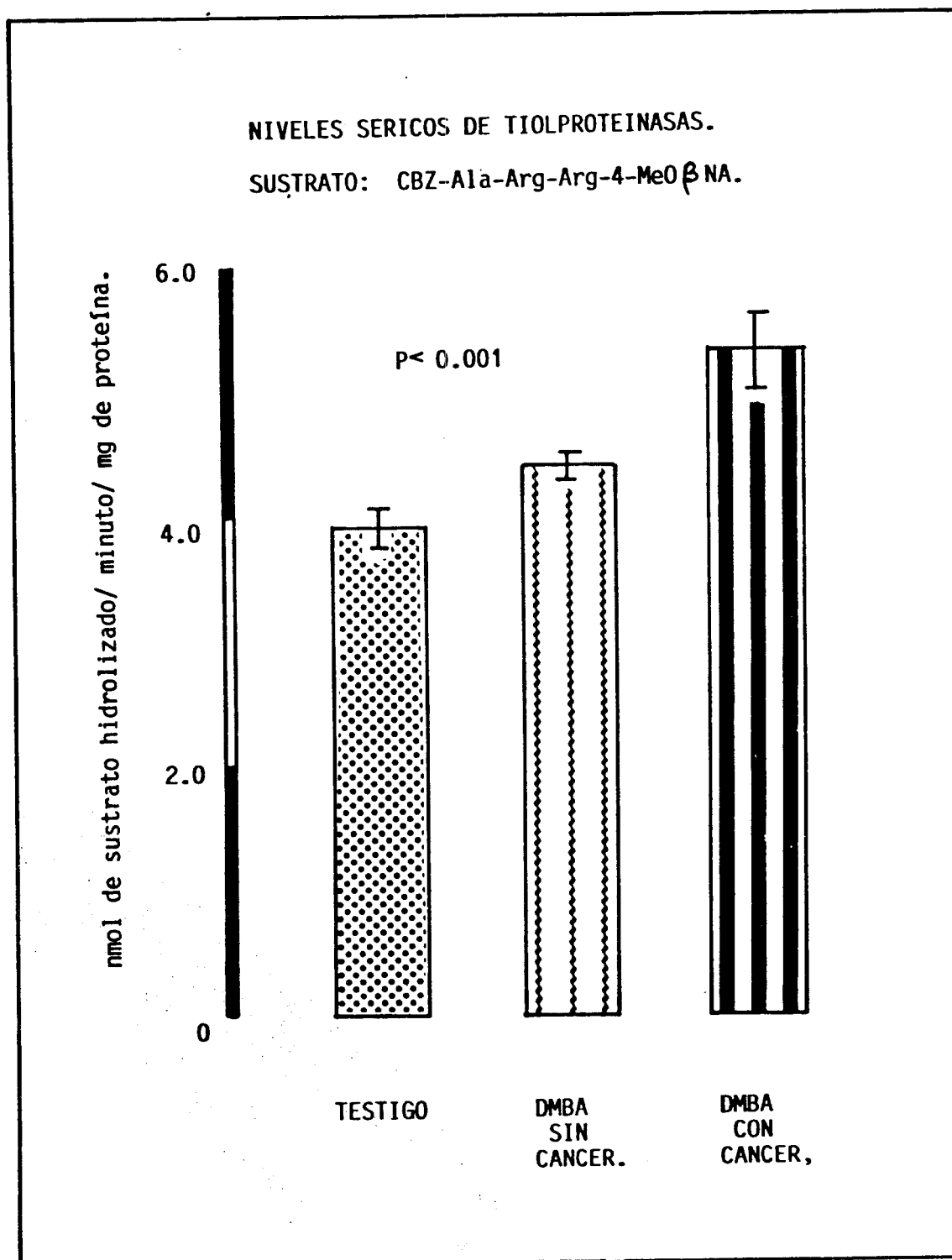


Figura No. 3

TABLA 2

Valor promedio ($\bar{x}$) y desviación estándar (D.E.) de Serino proteasas: activador de plasminógeno (en nanomolas de sustrato hidrolizado / minuto/ mg de proteína)de citosoles provenientes de homogenados de tumores mamarios en ratas inducidas con DMBA.

El valor para testigo es duplicado del citosol obtenido de un homogenado de tejido mamario proveniente de diez ratas tratadas únicamente con la administración gástrica de aceite de ajonjolí.

SUSTRATO:	TESTIGO	DMBA con cáncer.
CBZ-Gli-Gli-Arg- 4-MeO β NA.	0.642	n = 11 $\bar{x}$ = 0.748 D.E. = $\pm$ 0.098

TABLA 3

Valores promedio ($\bar{X}$) y desviaciones estándar (D.E.) de tiol proteinasas: enzima semejante a catepsina B y la catepsina B (en nanomolas de sustrato hidrolizado/ minuto/ mg de proteína) de citosoles provenientes de homogenados de tumores mamarios en ratas con DMBA.

El valor para testigo es duplicado del citosol obtenido de un homogenado de tejido mamario proveniente de diez ratas tratadas únicamente con la administración gástrica de aceite de a-jonjolí.

TIOLPROTEINASAS.	SUSTRATO:	TESTIGO	DMBA con cáncer.
			n = 11
Enzima semejante a catepsina B.	BANA	4.08	$\bar{X} = 25.98$ D.E. = ± 3.37
Catepsina B.	CBZ-Ala-Arg-Arg- 4-MeO β NA.	0.000	n = 11 $\bar{X} = 22.40$ D.E. = ± 2.3

TABLA 4

Valores promedio ($\bar{x}$) y desviaciones estándar (D.E.) de las concentraciones de proteínas séricas (mg % de suero), determinadas por análisis electroforético en ratas.

	TESTIGO n = 25	DMBA SIN CANCER. n = 35		DMBA CON CANCER. n = 11	
ALBUMINA.	$\bar{x} = 3326$ D.E. = ± 440	$\bar{x} = 3455$ D.E. = ± 138	$\bar{x} = 3554$ D.E. = ± 599		
Inhibidor de alfa-1-proteínasa. (I.A.P.)	$\bar{x} = 302$ D.E. = ± 86	$\bar{x} = 256$ D.E. = ± 40	$\bar{x} = 240$ D.E. = ± 36		
Alfa-2-macroglo- bulina. (A_2MG).	$\bar{x} = 356$ D.E. = ± 93	$\bar{x} = 337$ D.E. = ± 74	$\bar{x} = 330$ D.E. = ± 54		
Beta.	$\bar{x} = 879$ D.E. = ± 220	$\bar{x} = 725$ D.E. = ± 57	$\bar{x} = 1268$ D.E. = ± 119		
Gama.	$\bar{x} = 862$ D.E. = ± 280	$\bar{x} = 917$ D.E. = ± 90	$\bar{x} = 1396$ D.E. = ± 255		

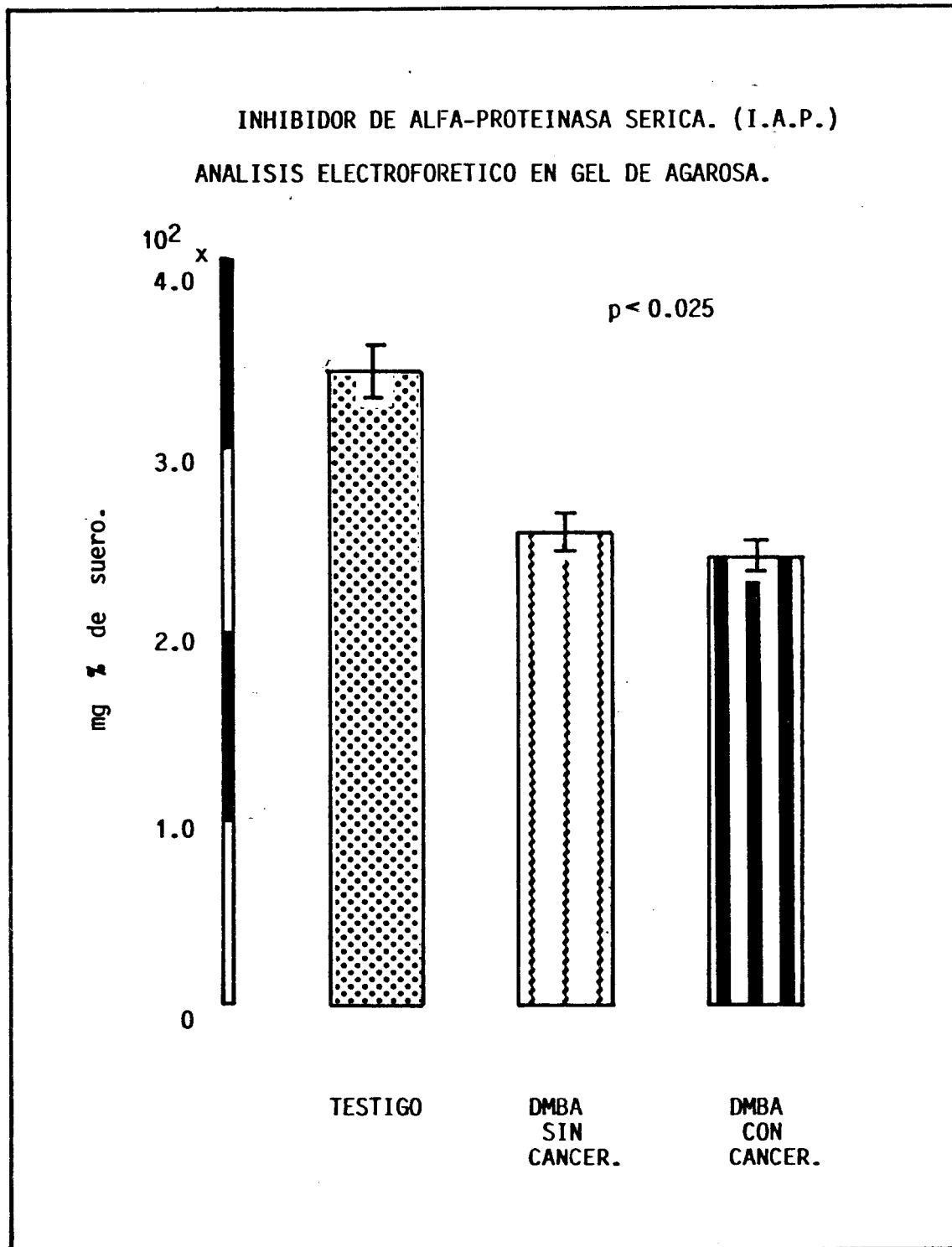


Figura No. 4

TABLA 5

Valores promedio ($\bar{X}$) y desviaciones estándar (D.E.) de C.I.T. (mg de tripsina inhibida/ ml de suero) e I.A.P. (mg % de suero) en ratas: Testigo, DMBA sin cáncer y DMBA con cáncer. (La significancia se expresó como valores de p en la parte inferior de la tabla).

		C.I.T.	I.A.P.
TESTIGO	n	25	25
	$\bar{X}$	1.1253	302
	D.E. $\pm$	0.38	86
DMBA sin cáncer.	n	35	35
	$\bar{X}$	0.930	256
	D.E. $\pm$	0.19	40
DMBA con cáncer	n	11	11
	$\bar{X}$	0.9890	240
	D.E. $\pm$	0.14	36

S I G N I F I C A N C I A .

TESTIGO VS DMBA sin cáncer.	$p < 0.010$	$p < 0.015$
DMBA sin cáncer. VS DMBA con cáncer.	$p > 0.300$	$p > 0.300$
TESTIGO VS DMBA con cáncer.	$p > 0.500$	$p < 0.025$

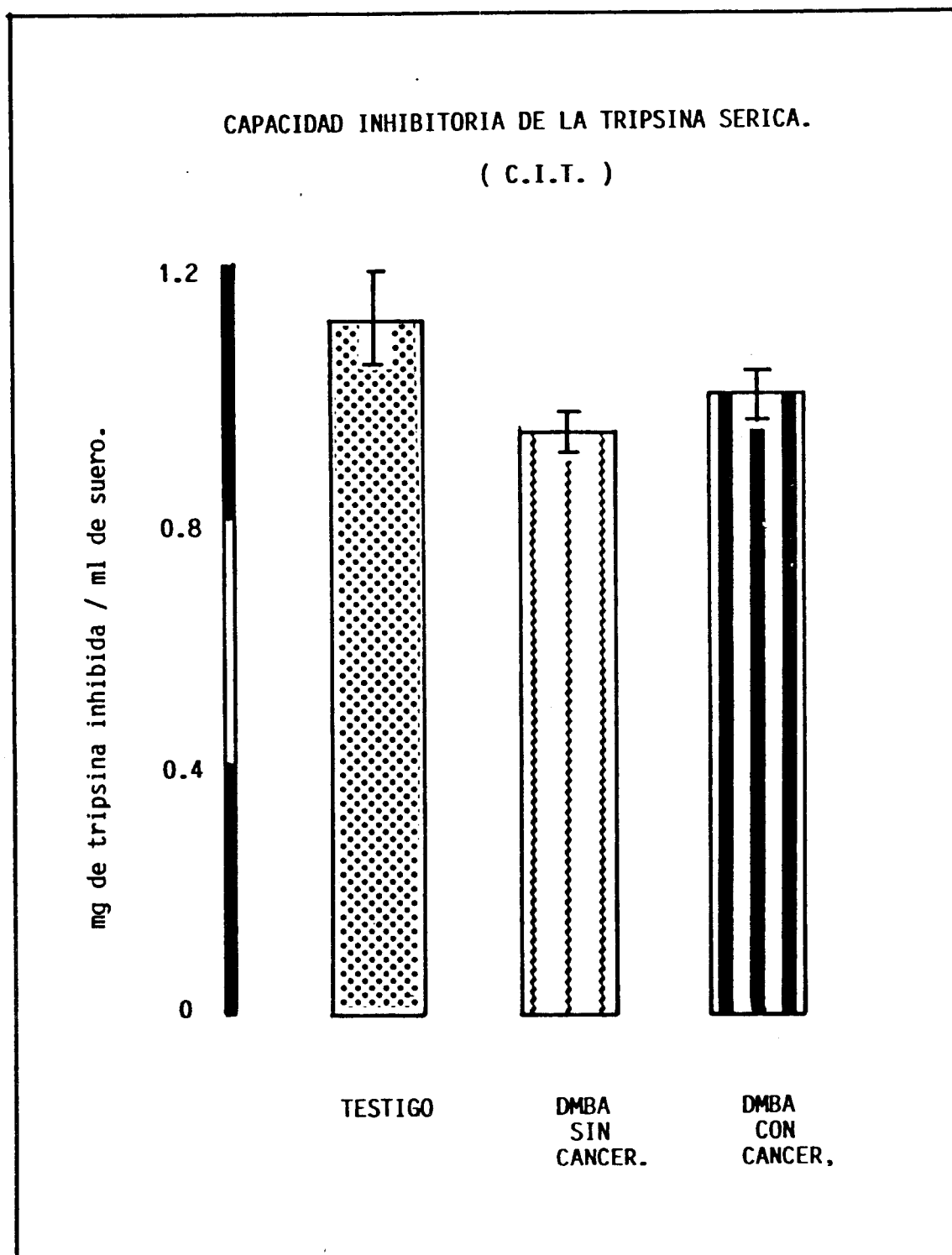


Figura No. 5

TABLA 6

Valores promedio ($\bar{x}$) y desviaciones estándar (D.E.) de C.I.T. (mg de tripsina inhibida/ml de suero), I.A.P. (mg % de suero) e Índice de actividad antiproteolítica C.I.T./I.A.P. (La significancia se expresó en valores de p en la parte inferior de la tabla):

		C.I.T. del suero.	I.A.P. sérico.	I N D I C E de actividad an tiproteolítica.
TESTIGO	n	25	25	25
	$\bar{x}$	1.1253	302	1.1345
	D.E. $\pm$	0.380	86	0.145
DMBA con cáncer.	n	11	11	11
	$\bar{x}$	0.9890	240	1.100
	D.E. $\pm$	0.14	36	0.123

S I G N I F I C A N C I A .

TESTIGO VS DMBA con cáncer.	$p > 0.500$	$p < 0.025$	$p > 0.500$
--------------------------------------	-------------	-------------	-------------

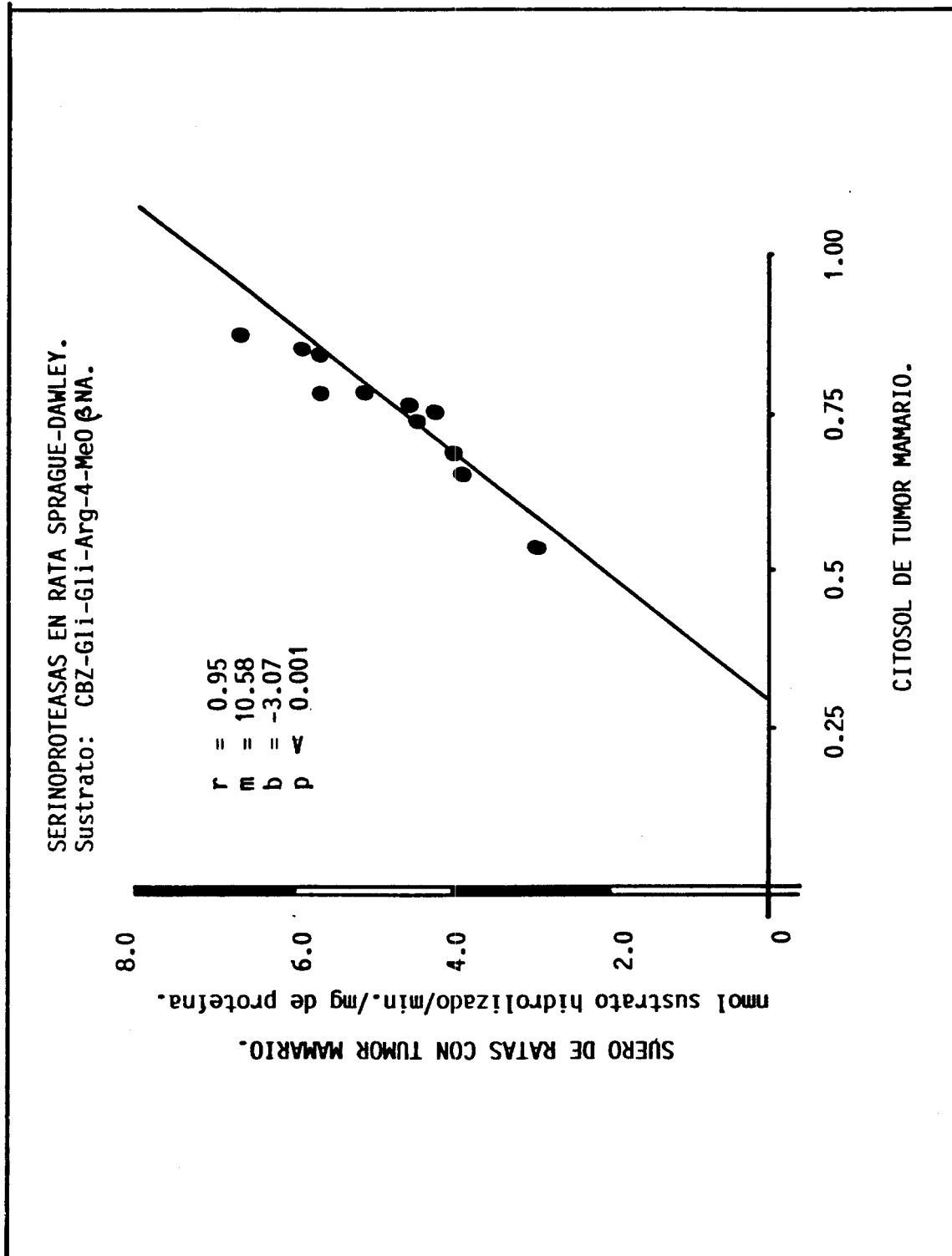


Figura No. 6

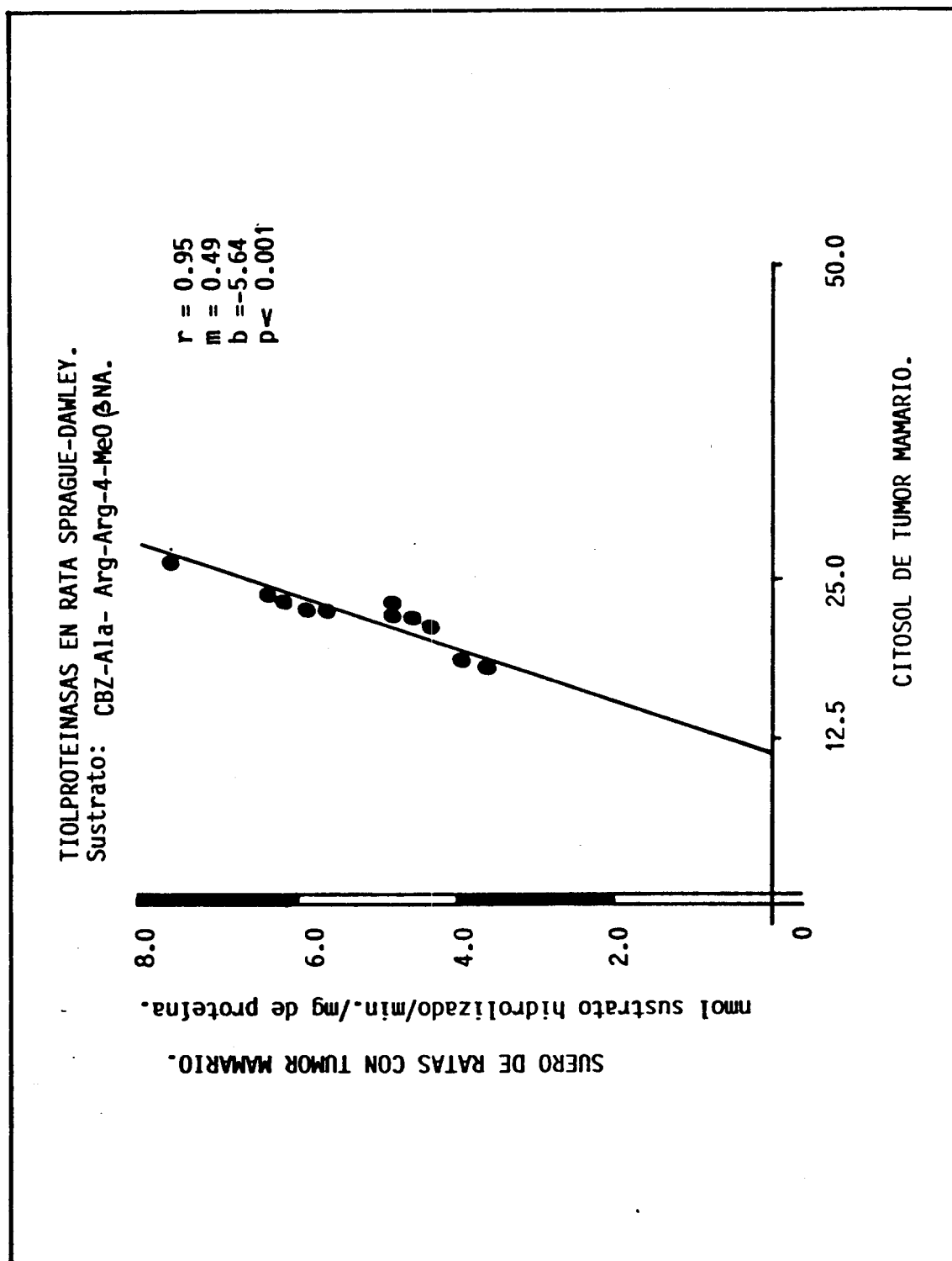


Figura No. 7

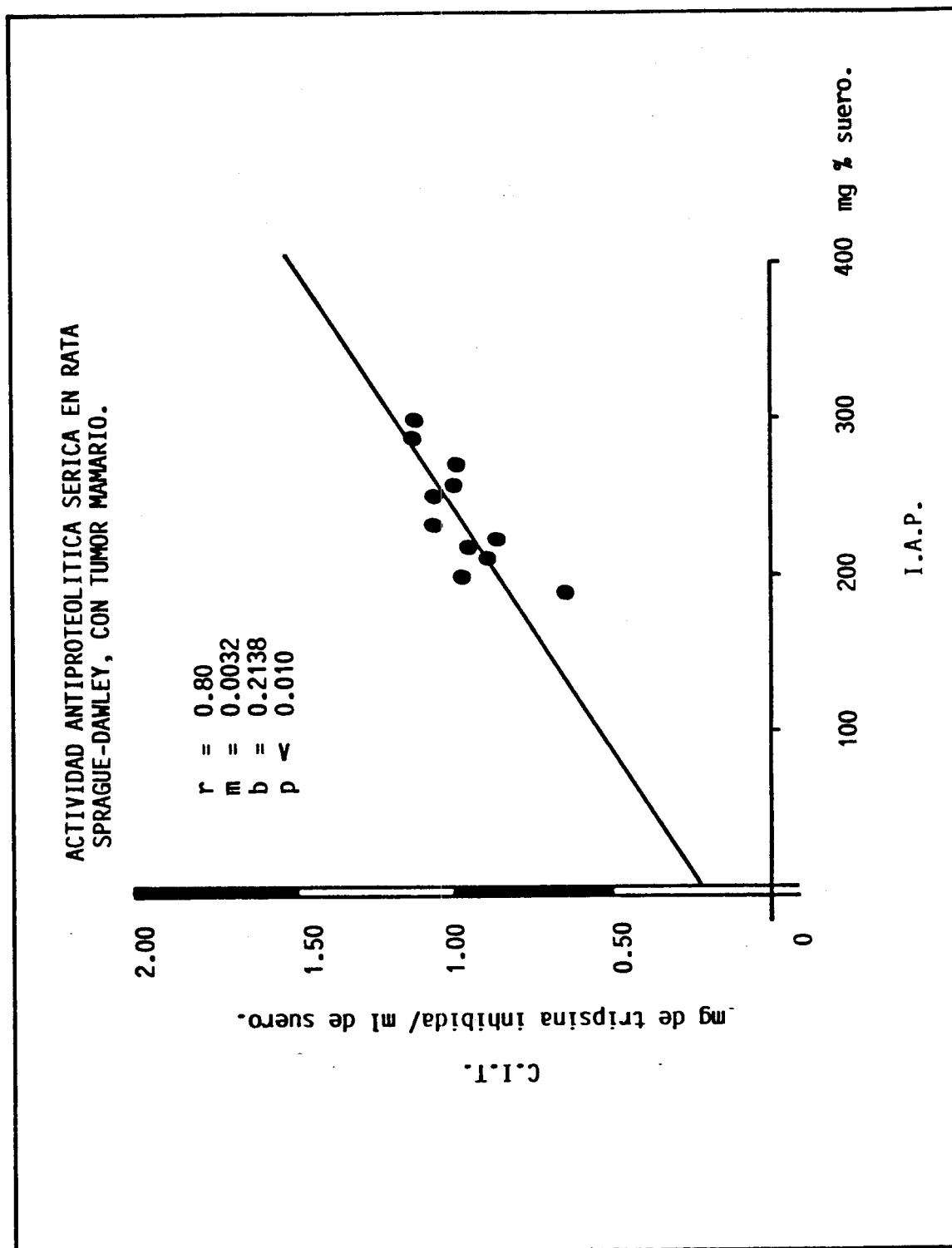


Figura No. 8

DISCUSSION.

Cáncer Experimental. En la publicación original de Huggins (101), se señala que la administración de una sola dosis de DMBA es suficiente para causar cánceres de la mama en un 100 % de los animales, en tanto se les administre a los 50 días de nacidos y se dejen evolucionar hasta la pubertad y madurez.

En este experimento se pudieron repetir estas observaciones desde los estudios piloto que se realizaron; sin embargo se nos indicó que estos cánceres aparecen entre las seis y las ocho semanas, en los grupos que se informan en este trabajo, los tumores empezaron a aparecer en algunos animales a las ocho semanas, pero en la mayor parte de ellos se presentaron después de la décima semana de administrada la sustancia cancerígena; la diferencia probablemente estriba en la edad de las camadas, ya que fué de ochenta días, así al no proporcionar la dosis de DMBA de manera indicada se evitó que el co-carcinógeno endógeno actuara por lo que resultó en un cáncer menos agresivo lo que nos permitió estudiar un tumor maligno en fase preinvasora y no metastatizante.

También en la literatura respectiva se señala que es frecuente que existan varios focos de cáncer mamario que afectan dos o tres de las mamas del animal en experimentación, pero en esta serie apareció por lo regular una sola neoplasia y en las mamas superiores. En el grupo de animales a los que se les permitió continuar viviendo para observar el crecimiento del tumor, se pudo constatar que el crecimiento fué rápido y alcanzó proporciones que dificultaban los movimientos del animal. A pesar de ello, no se observó infiltración directa de los tejidos de la caja torácica ni aparecieron metástasis visible en ninguna parte de la rata. También fué notable que, a pesar de los problemas que el animal presentaba para moverse o inclusive a veces para obtener su alimento, no hubo ningún estado de deterioro físico, de desnutrición o de infección en estos animales.

Estudios anatomopatológicos. Las autopsias de los animales experimentales revelaron tanto macroscópica como microscópicamente que la neoplasia no invadía, ni hacía metástasis, a excepción de áreas pequeñas de infiltración hacia músculo cutáneo y tejidos conectivo y adiposo periférico en los tumores de mayor evolución que no rebasaron 1 mm de distancia del borde neoplásico. El examen microscópico exhaustivo de los órganos donde frecuentemente se encuentran metástasis, ya sean hematógenas o linfáticas, como pulmones, hígado, riñón, bazo y ganglios linfáticos tampoco reveló la presencia de células neoplásicas. Aunque existan descripciones de esta neoplasia experimental (101, 113) ellas coinciden en señalar que se trata de una neoplasia maligna del tipo similar a la que se observa en el adenocarcinoma mamario humano; no se encontraron estudios histológicos detallados para confirmar su grado de diferenciación, anaplasia y potencial invasor. Se sabe que es una neoplasia hormonodependiente como ocurre en muchos cánceres mamarios humanos, y que después de la castración quirúrgica del animal, es posible que la mayor parte de estas neoplasias involucionen y desaparezcan totalmente, pero ninguna de las descripciones que se consultaron menciona si las neoplasias desarrolladas, evolucionan de manera espontánea y que sean capaces de invadir y dar metástasis. (113, 114).

Nuestras observaciones confirman que se trata de un adenocarcinoma bien diferenciado, que reúne todas las características histológicas y citológicas para llamarlo neoplasia maligna: la presencia de anaplasia moderada, actividad mitótica abundante y mitosis anormales, la desorganización de la estructura tisular y el comportamiento de crecimiento exponencial rápido.

Estudios ultraestructurales. En la literatura no se encontraron estudios al microscopio electrónico, y en relación con el tumor de Huggins no se encontraron estudios previos. Con esta metodología se puede confirmar la diferenciación de este tumor con abundantes desmosomas y una

estructura celular bien preservada, se confirma la naturaleza maligna y la anomalía en algunas mitocondrias.

Por todos estos datos es posible concluir con seguridad que las neoplasias mamarias inducidas por el DMBA en las ratas, corresponden a adenocarcinoma bien diferenciado.

Otro hallazgo de importancia particular y que no se ha encontrado referido en la literatura, es la presencia de células cebadas abundantes en el estroma que rodean y se adosan directamente a los bordes de las mamas de células neoplásicas. Parecería que estas células cebadas se disponen en una línea defensiva o una barrera especial que detiene el crecimiento o la infiltración de las células cancerosas. Recordemos que las células cebadas contienen en sus gránulos sustancias numerosas, entre las cuales se encuentran la heparina y la alfa-1-antitripsina, las que probablemente forman complejos con proteasas neutras intracelulares (96). En estudios recientes se ha podido determinar que la heparina, en acción sinérgica con algunos esteroides es capaz de inhibir la neoformación de vasos inducida por la secreción del factor angiígeno que se produce en las neoplasias malignas (115, 116). Como se sabe, la secreción de este factor angiígeno es de lo que depende en un momento dado el crecimiento exponencial de una neoplasia maligna y lo que facilita también el acceso de las células neoplásicas al torrente circulatorio para producir metástasis (116). Podría suponerse que en este modelo experimental las células cebadas en abundancia al desgranularse, secretarían cantidades grandes de heparina, ésta podría combinarse con esteroides endógenos presentes en la neoplasia maligna por ser esta última hormonodependiente, y así inhibir al factor angiígeno y limitar el proceso de infiltración de células neoplásicas. Por otra parte, si se considera que en estas células se han encontrado cantidades importantes del inhibidor proteolítico natural, es lícito suponer que durante el proceso de desgranulación este inhibidor se libera de su complejo proteasa-antiproteasa y pueda actuar independientemente para frenar la acción de las enzimas proteolíticas producidas por el cáncer y, así impedir la invasión del estroma.

Enzimas proteolíticas. La selección de los dos tipos de enzimas estudiadas en esta investigación se basó en la literatura tan numerosa que existe al respecto con relación al cáncer (1,8,13,14,21,30,36,45,59,60,61,62,64,105,112,120). Los activadores del plasminógeno se han implicado en muchos aspectos del comportamiento maligno, y existe una cantidad considerable de material experimental in vitro que apoya la conexión entre la presencia de estas enzimas y algunos aspectos de la transformación maligna (3,117,118). Se sabe también que los promotores tumorales como los forboles, inducen la formación de activadores del plasminógeno o serinoproteasas (119). Por otra parte, se ha demostrado que las catepsinas se encuentran en la mayor parte de los tumores estudiados tanto in vivo como in vitro, así como en el suero y el líquido vaginal de personas con cánceres iniciales y avanzados (21, 60). Poole, Pietras y Benítez, han reportado la elevación de la actividad de la catepsina B que parece caracterizar el crecimiento maligno y se sabe que hay correlación directa entre los niveles séricos de la CB y la progresión y el crecimiento de la neoplasia (14, 16, 20, 21, 120).

Los métodos usados para la determinación de estos dos grupos de enzimas han sido variados, su especificidad depende fundamentalmente de los sustratos empleados. Es por eso que en este caso, seleccionamos sustratos que, según la literatura respectiva, tienen un grado alto de especificidad. Para los activadores del plasminógeno se escogió el sustrato CBZ-Gli-Gli-Arg-4-MeO β NA, dado que Huseby y colaboradores (47, 48) han señalado que es un oligopéptido sintético con alta especificidad para AP. Este método es reproducible aún dentro de una variedad de concentraciones de esta enzima y es más preciso que la técnica de lisis o del coágulo.

Respecto a la determinación de tiolproteinasas, existen ciertas discusiones acerca de la especificidad de los sustratos.

De Lumen y Tappel (103) publicaron su método para determinación de enzima semejante a catepsina B, usando como sustrato BANA, este oligopéptido es uno de los más antiguos y actualmente sabemos que es de especificidad baja ya que también puede ser hidrolizado por serinoproteasas, aunque ellos añaden para esta determinación ditioeritritol como donador de grupos sulhidrilos. Smith y Poole (48, 60) han propuesto un sustrato que pudiera ser más específico para la catepsina B reciente

y que corresponde a CBZ-Ala-Arg-Arg-4-MeO β NA, añadiendo ditioneitol como donador de grupos sulfhidrilo, es por eso que utilizamos los dos métodos para la determinación de tiolproteinasas.

Los resultados indican que los métodos son comparables y que en este estudio ambas enzimas, tanto las serinoproteasas como las tiolproteinasas aumentaron en el suero durante el proceso de carcinogénesis mamaria en la rata, sin embargo, su incremento no fué mayor de tres nanomolas de sustrato hidrolizado/minuto/ mg de proteína con respecto al grupo testigo. Esto puede deberse a los factores siguientes: que el tumor posea una síntesis y secreción tan baja de sus enzimas proteolíticas que no altera los niveles en sangre del animal en experimentación o bien que su secreción tumoral sea abundante pero que su actividad de proteasa se encuentre inhibida en el torrente circulatorio.

Benítez y colaboradores (30) encontraron que en humanos, las concentraciones de serinoproteasas y catepsina B en suero son menores a 2 nanomolas de sustrato hidrolizado/ minuto/ mg de proteína y que por ejemplo en diferentes etapas clínicas avanzadas de carcinoma cérvico uterino, la catepsina B aumentó alrededor de 100 veces más sus valores sanguíneos, por lo que se constata entonces que existe progresión y correlación entre el grado de invasividad y el aumento de esta enzima, pero como en nuestro modelo experimental de rata no tuvieron invasión y metástasis, resulta lógico que no haya tal aumento de estas proteasas.

Algunos autores reportan que la secreción de tiolproteinasas es variable, pues tanto en citosol de un solo tumor mamario humano como en series de tumores obtenidos de regiones distintas en la mama, transplantados y cultivados, presentan diferencias en su concentración y lo han explicado a través de que en esos tumores se tienen diversos grados de diferenciación epitelial y por ende varía su producción enzimática (9, 16, 105). Sin embargo, estos estudios se refieren a tiolproteinasas aisladas y purificadas a las cuales se les comprobó su actividad proteolítica al emplear inhibidores específicos y este no fué nuestro caso.

A diferencia de la actividad de tiolproteínasa determinada con el sustrato BANA, dadas las condiciones empleadas en su determinación, no fué posible detectar cantidad alguna en el mismo citosol testigo para la CB.

La actividad proteolítica determinada con estos dos sustratos en los citosoles de homogenados de tumores fué hasta cinco veces mayor que la obtenida en los niveles séricos en cada caso. Esto podría interpretarse como que las tiolproteinasas son indicadoras del desarrollo del cáncer en general. Sin embargo,, y por los resultados en que no hubo correlación entre las actividades hidrolíticas con BANA de los citosoles contra las obtenidas en los sueros de esas mismas ratas y de que sabemos que este sustrato es menos específico, nos atrevemos a concluir que el resultado corresponde al producto que por hidrólisis de otras enzimas se produjo y que la catepsina B cuantificada con su sustrato específico (anteriormente señalado) es la responsable de la actividad de tiolproteínasa determinada.

Los estudios anatómicos, histológicos y ultraestructurales demostraron que el cáncer mamario inducido por DMBA en la rata de ochenta días de edad, tiene una capacidad baja de invasión y actividad metastatizante nula. Esta característica biológica parece coincidir con el ligero aumento de serino-proteasas y tiolproteinasas en el suero del animal en experimentación, hecho que es de gran interés pues representa la contraprueba de que las neoplasias invasoras y metastatizantes cursan por lo general con incrementos séricos muy notables de estas proteinasas (21,59). Es posible que la invasividad baja de esta neoplasia se deba precisamente a que sintetiza pocos AP, necesarios para la invasión, que el incremento de las tiolproteína-sas no sea suficiente para conferirle su potencial invasor y que quizá se requiere la acción sinérgica de ambas enzimas.

Cabe sin embargo, mencionar la posibilidad basada en la presencia de células cebadas abundantes y otras células inflamatorias en este tumor. Como se sabe estas células contienen alfa-1-antitripsina o inhibidor de alfa-1-pro-teínasa en su citoplasma, un inhibidor natural de varias proteasas (72,96). Es factible proponer la hipótesis de que la cantidad de proteasas liberadas

localmente por estas células cebadas y fagocíticas pudo ser suficiente para inactivar a las serinoproteasas y, por ello imposibilitar su titulación por incapacidad de unirse con el sustrato específico. En el caso de las tiolproteinasas sabemos que éstas no forman complejos con el inhibidor de alfa-1-proteinasa más bien son inhibidas por la alfa-2-macroglobulina.

Es factible que, si la neoplasia produce grandes cantidades de proteinasas, un huésped con reacciones homeostáticas buenas podría tratar de inhibir localmente esas enzimas con sus moléculas antiproteolíticas naturales en un intento por conservar el equilibrio de proteasas y antiproteasas. Este fenómeno se ha estudiado ya experimentalmente tanto en animales como en cultivos de células, y se sabe que la adición de sustancias antiproteolíticas naturales o artificiales pueden detener el crecimiento de los tumores malignos e impedir la invasión y, sobretudo la producción de metástasis (10, 121) si bien en esos experimentos se han utilizado dosis altas administradas exógenamente.

En nuestro modelo encontramos una tendencia a la baja en cuanto a la concentración de inhibidor de alfa-1-proteinasa por lo que analizamos su actividad antiproteolítica. Sabemos por reportes ya numerosos en pacientes con tumores invasivos que, pueden presentar elevación de la concentración de alfa-1-proteinasa y sin embargo su actividad antiproteolítica no se incrementa en el suero de estos individuos (31). Esta paradoja aparente no ha sido confirmada del todo en gran número de casos de una malignidad en diferentes etapas clínicas.

La determinación de la Capacidad Inhibitoria de la Tripsina en el suero no mostró elevaciones significativas con respecto al grupo testigo. Por lo que al obtener el Índice C.I.T. / I.A.P. pretendimos establecer la actividad antiproteolítica en suero y esto fué debido a que no tuvimos muestras suficientes de citosol para realizar las determinaciones de ellas por electroforesis para I.A.P. y para el método de Lieberman (87) para el C.I.T. No hubieron diferencias significativas por los estudios estadísticos entre los índices obtenidos por el grupo testigo y el grupo DMBA con cáncer.

Determinamos que existe una correlación positiva entre las concentraciones del inhibidor de alfa-1-proteinasa y los miligramos de tripsina inhibida por mililitro en los sueros de las ratas con neoplasias mamarias.

Por estos datos podemos concluir que la actividad antiproteolítica en suero de los animales en experimentación fué un reflejo de la acción de las proteasas escasas en la circulación sanguínea de las ratas con cánceres mamarios inducidos con el DMBA.

CONCLUSIONES.

1. En los citosoles de los tumores mamarios obtenidos de ratas tratadas con DMBA, encontramos que las tiolproteinasas se e levaron francamente, no así las serinoproteasas (AP).
2. Existe aumento leve de la concentración de proteasas en el suero de ratas durante la carcinogénesis experimental inducida con el DMBA.
3. En este modelo encontramos que los valores de las concentraciones de serinoproteasas (AP) y tiolproteinasas (CB) en los sueros de las ratas empleadas para producir los cánceres de las mamas, son similares entre sí.
4. La determinación de tiolproteinasas con el sustrato BANA no mostró correlación con el desarrollo del tumor mamario en este modelo experimental, lo cual indica que esta técnica no es la más adecuada para su medición.
5. La tendencia a la disminución del I.A.P. y la actividad antiproteolítica escasa, son reflejos significativos de que en los niveles sanguíneos de las ratas desarrollaron tumores mamarios por efecto del DMBA se tenían cantidades insuficientes de proteasas para generar una respuesta.
6. Con estas conclusiones constatamos que las neoplasias de las mamas de las ratas inducidas con DMBA con el método de Huggins son adenocarcinomas del tipo ductal bien diferenciados, pero, en nuestro modelo no fueron infiltrantes ni metastatizantes por la edad de las ratas utilizadas.

BIBLIOGRAFIA.

REFERENCIAS:

1. Strauli, P.: A concept of tumor invasion in: Strauli, P., Barret, A.J. and Baici, A.: *Proteinases and Tumor invasion*. Raven Press New York, 1980, pp 1-15.
2. Baici, A. : Structure and breakdown of Proteoglycans, Collagen and Elastin in: Strauli, P., Barret, A.J. and Baici, A. : *Proteinases and Tumor invasion*. Raven Press, New York, 1980, pp 17-47.
3. Moscatelli, D., Rifkin, D.B., Rivkan Isserof, R. and Jaffe, E.A.: Plasminogen activator, plasmin and collagenase interactions in: Strauli, P., Barret, A.J. and Baici, A. : *Proteinases and Tumor invasion*. Raven Press, New York, 1980, pp 143-155.
4. Sinha, B.K. and Goldenberg, J.: The effect of trypsin and neuraminidase on the circulation and organ distribution of tumor cells. *Cancer* 34: 1956-1961, 1974.
5. Seelich, F.: Sind Lysosomale Enzyme and der Regulation der Zellvermehrung Beteligt. *Ost. Z. Onkol.* 2: 31-37, 1975.
6. Verloes, R. and Kanarek, L.: Proteolytic activity associated with tumor Growth and Metastasis. Influence of Trypsin inhibitor (Soya bean) on Erlich Ascitis Tumor Growth. *Arch. Int. Physiol. and Biochim.* 84: 1119-1120, 1976.
7. Sefton, B.M. and Rubin, H.: Release from Density dependent Growth inhibition by proteolytic enzymes. *Science* 227: 843-845, 1970.
8. Burger, M.M.: Proteolytic enzymes initiating cell division and escape from contact inhibition of growth. *Nature* 227: 170, 1970.
9. Poole, A.R., Recklies, A.D. and Mort, J.S.: Secretion of proteinase from human breast tumors: Excessive release from carcinoma of a thiol-proteinase in: Strauli, P., Barret, A.J. and Baici, A. *Proteinases and Tumor invasion*. Raven Press, New York, 1980 pp 81-95.
10. Latner, A.L., Longstaff, E., Pradhan, K.: Inhibition of malignant cell invasion in vitro by a proteinase inhibitor. *Br. J. Cancer* 27: 460, 1973.

11. Evans, I., Bosmann, H.B.: Bromodeoxyuridine (BUDR) treatment of melanoma cells decreases cellular proteolytic activity. *Exp. Cell. Res.* 108: 151, 1977.
12. Goetz, I.E., Weinstein, C., Roberts, E.: Effects of protease inhibitors on growth of hamster tumors cells in culture. *Cancer Res.* 32: 2496, 1972.
13. Robbin, R.: Plasminogen activator production as a possible biological marker for human neoplasia: Some fundamental questions. in: Ruddon, W.R.: *Biological markers of neoplasia: Basic and Applied Aspects*. Ed. Elsevier, New York, 1978, pp 421-448.
14. Ossowski, L. and Vassali, J.: Plasminogen activator in normal and malignant cells: A comparison of Enzyme Levels and of hormonal responses in: Ruddon, W.R.: *Biological markers of neoplasia: Basic and Applied Aspects*. Ed. Elsevier, New York, 1978, pp 473-489.
15. Reich, E.: Activation Plasminogen. A widespread mechanism for generating localized extracellular proteolysis. in: Ruddon, W.R.: *Biological markers of neoplasia: Basic and Applied Aspects*. Ed. Elsevier, New York, 1978, pp 491-500.
16. Recklies, A.D., Tiltman, J.K., Stoker, H.A. and Poole, R.A.: Secretion of Proteinases from malignant and non malignant human breast tissue. *Cancer Res.* 40: 550-556, 1979.
17. Barret, A.J.: The cellular Proteinases a broad view in: Strauli, P., Barret, A.J. and Baici, A.: *Proteinases and Tumor invasion*. Raven Press, New York, 1980, pp 59-67.
18. Woolley, D.E., Tetlow, L.C., Mooney, C.J. and Evanson, J.M.: Human Collagenase and its Extracellular inhibitors in relation to Tumor Invasiveness. In Strauli, P., Barret, A.J. and Baici, A.: *Proteinases and Tumor invasion*. Raven Press, New York, 1980. pp 97-115.
19. Werb, Z., Aggeler, J.: Proteases induce secretion of collagenase and plasminogen activator by fibroblasts. *Cell Biol.* 75: 1839-1843, 1978.
20. Pietras, R.J., Szego, C.M., Mangan, C.E., Seller, B.J. and Burnett, M.M.: Elevated serum cathepsin B₁-like activity in women with neoplastic disease. *Gynec. Oncol.* 7: 1-17, 1979.

21. Benítez, B.L., Freyre, R., Gallegos, V.G.: Concentración de proteasas y antiproteasas en el suero y líquido vaginal de pacientes con carcinoma cervicouterino. Arch. Inv. Med. (Mex.) 11: 523-545, 1980.
22. Baugh, R.J., Schenebli, H.P.: Role and potential therapeutic value of proteinase inhibitors in tissue destruction. in Strauli, P., Barret, A.J. and Baici, A.: Proteinases and Tumor invasion. Raven Press, New York, 1980, pp 157-180.
23. Latner, A.L., Turner, G.A., Jamin, M.M.: Plasma alpha-1-antitrypsin levels in early and late carcinoma of cervix. 33: 12, 1976.
24. Kidess, E., Herschlein, H.J., Hunz, S.: Untersuchungen über die fibrinolytische aktivität und das alpha-1-antitrypsin des menschlichen Ovars und des Ovarialkarzinoms sowies bei Blasenmolen. Med. Welt 24: 1406, 1973.
25. Harris, C.C., Cohen, M.H., Connor, R., Premach, A., Saccomano, G., Talamo, R.C. : Serum Alpha-1-Antitrypsin in patients with lung cancer or abnormal sputum cytology. Cancer 38: 1655, 1976.
26. Harris, C.C., Premach, A., Cohen, J.H. : Elevated alpha-1-antitrypsin serum levels in lung cancer patients. Cancer 34: 280, 1974.
27. Chawia, R.K. and Wadsworth, A.D., Rudman, D. : Antitryptic property of cancer related glycoprotein EDC-1. Cancer Res. 38: 452, 1978.
28. Rawlings, W.J., Moss, J., Cooper, H.S., Hamilton, S.R.: Hepatocellular carcinoma and partial deficiency of alpha-1-antitrypsin (MZ). Ann. Int. Med. 81: 771-773, 1974.
29. Schleussner, L.A., Cohen, A.H.: Alpha-1-antitrypsin deficiency and hepatic carcinoma. Amer. Rev. of Resp. Disease 111: 863, 1975.
30. Benítez, B.L., Villanueva, C., Freyre, R., Amezcua, J., De la Huerta, R., Luévano, E., Pastrana, L. : Niveles de proteinasas séricas y alteraciones funcionales y morfológicas de las plaquetas en pacientes con carcinoma cervicouterino. Correlación con el grado de progresión de la neoplasia. Arch. Invest. Méd. (Mex.) 17: 211-242, 1987.
31. Benítez, B.L., Freyre, H.R., Villalobos, R.M., Pastrana, L.: Actividad del inhibidor de la proteinasa en sueros de pacientes con carcinoma del cuello uterino. Arch. Invest. Méd. (Mex.) 18: 187-192, 1987.

32. Barret, A.J. in Barret, A.J. (ed.) Proteinases in mammalian cells and tissues. Elsevier, North Holland Biomedical Press 1977, pp 16- 208.
33. Sylven, B., Malgren, H.: The histological distribution of proteinase and peptidase activity in solid tumor transplants. *Acta Radiol. Supp.* 154:1, 1957.
34. Sylven, B., Bois-Svensson, I.: On the chemical pathology of interstitial fluid. I. Proteolytic activities in transplanted mouse tumors. *Cancer Res.* 25: 458, 1965.
35. Kenneth, S.G.: Proteinases and eukaryotic cell growth. *Comp. Biochem. Physiol.* vol. 87B: 1-10, 1987.
36. Scott, M.F., Sator de Serrano, V., Castellino, J.F.: Appearance of plasminogen activator activity during a synchronous cycle of a rat adenocarcinoma cell line PA-III. *Exp. Cell Res.* 169: 39-46, 1987.
37. Casslén, B., Andersson, A., Nilsson, I.M., Astedt, B.: Hormonal regulation of the release of plasminogen activators and of a specific activator inhibitor from endometrial tissue in culture. *Proc. of the Soc. for Exp. Biol. and Med.* 182: 419-42, 1986.
38. Pecorino, T.L., Rickles, J.R., Strickland, S. ; Anti-sense inhibition of tissue plasminogen activator production in differentiated F-9 teratocarcinoma cells. *Develop. Biol.* 129: 408-416, 1988.
39. Sprenger, E.D., Kluft, C. : Plasminogen activator inhibitors. *Blood*, vol. 69 (2): 381-387, 1987.
40. Unkeless, J.C., Tobia, A., Ossowski, L., Quigley, J.P., Rifkin, D.B., Reich, E. : An enzymatic function associated with transformation of fibroblasts by oncogenic viruses. *J. Exp. Med.* 137: 85- 111, 1973.
41. Ossowski, L., Quigley, J.P., Reich, E.: Plasminogen, a necessary factor for cell migration in vitro. In *Proteases and Biological Control*. (edited by Reich E., Rifkin, D.B. and Shaw E.) 1975, pp 901-913.
42. Unkeless, J.C., Danos, K., Kellerman, G.M.: Fibrinolysis associated with oncogenic transformation. *J. Biol. Chem.* 249: 4295, 1974.
43. Martin, O., Arias, F.: Plasminogen activator production by trophoblast cells in vitro : Effect of steroid hormones and protein synthesis inhibitors. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 142: 402-409, 1982.

44. Ossowski, L., Reich, E.: Antibodies to plasminogen activator inhibit human tumor metastasis. *Cell* 35: 611-619, 1983.
45. Gabor, M., Camiolo, M.S., Shin, K., Madeja, M.J., Mittelman, A.: Plasminogen activator secretion of human tumors in short-term organ culture, including a comparison of primary and metastatic colon tumors. *Cancer Res.* 43: 5517-5525, 1983.
46. Schleef, R.R., Wagner, V.N., Sinha, M., Loskutoff, J.D.: A monoclonal antibody that does not recognize tissue-type plasminogen activator bound to its naturally occurring inhibitor. *Thomb. and Haemostasis* 56 (3): 328-332, 1986.
47. Huseby, R.M., Clavin, S.A., Smith, R.E., Hult, R.N., Smithwick, E. Jr.: Studies on tissue culture plasminogen activator. II. The detection and assay of urokinase and plasminogen activator from LLL CPK₁ cultures (porcine) by the synthetic substrate N-alpha-benzyloxycarbonyl-Glycyl-Glycyl-Arginyl-4-methoxy-2-naphthylamide. *Thromb. Res.* 10: 679-687, 1977.
48. Huseby, R.M., Smith, R.E.: Synthetic oligopeptide substrates: Their diagnostic application in blood coagulation, fibrinolysis, and other pathologic states. In *Seminars in thrombosis and hemostasis*. vol. VI, E.F. (ed.) Thieme Stratton Inc. New York, 1980.
49. Rich, H.D., Brown, A.M., Barret, A.J.: Purification of cathepsin B by a new form of affinity chromatography. *Biochem. J.* 235: 731-734, 1986.
50. Wanner, Ch., Schollmeyer, P., Horl, H.W.: Urinary proteinase activity in patients with multiple traumatic injuries, sepsis, or acute renal failure. *J. Lab. Clin. Med.* 108: 224-229, 1986.
51. Bradley, D.J., Whitaker, N.J.: Isolation and characterization of cathepsin B from bovine brain. *Neurochem. Res.* 11 (6): 851-867, 1986.
52. Smith, R.E.: Identification of protease isoenzyme after analytical isoelectric focusin using fluorogenic substrates impregnated into cellulose membranes. *J. of Histochemistry and Cytochemistry*, 32 (12): 1256-1274, 1984.
53. Mort, S.J., Recklies, D.A.: Interrelationship of active and latent secreted human cathepsin B precursors. *Biochem. J.* 233: 57-63, 1986.
54. Willenbrock, F., Brocklehurst, K.: Chemical evidence for the pH-dependent control of ion-pair geometry in cathepsin B. *Biochem. J.* 238: 103-107, 1986.

55. Stracher, A., Mc Gowan, E.B., Shafig, S.A.: Muscular dystrophy: INhibition of degeneration in vivo with protease inhibitors. *Science* 200: 50-51, 1978.
56. Sher, J.H., Stracher, A., Shafig, S.A., Hardy-Sthasin, J.: Successful treatments of murine muscular dystrophy with the proteinase inhibitor leupeptin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79 (12): 7742-7744, 1981.
57. Ostensen, M., Morland, B., Huseby, G., Reknig, O.P.: A serum antibody in patients with rheumatoid arthritis stimulates cathepsin B activity in peritoneal mouse macrophages. *Clin. Exp. Immunol.* 54: 396-404, 1983.
58. Burnett, D., Crocker, J., Stockley, R.A.: Cathpesin B-like cysteine proteinase activity in sputum and immunohistological identification of cathepsin B in alveolar macrophages. *Am. Rev. Resp. Dis.* 128: 915-919, 1983.
59. Sloane, B.F., Dunn, J.R., Honn, K.V.: Lysosomal cathepsin B: correlation with metastatic potential. *Science* 212: 1151, 1981.
60. Poole, A.R., Tiltman, K.J., Recklies, A.D., Stoker, T.A.M.: Differences in secretion of the proteinase cathepsin B at the edges of human breast carcinomas and fibroadenomas. *Nature (London)* 273: 545-547, 1978.
61. Recklies, A.D., Tiltman, K.J., Stoker, T.A.M., Poole, A.R.: Secretion of proteinases from malignant and nonalignant human breast tissue. *Cancer Res.* 30: 640-659, 1980.
62. Benítez, B.L., Freyre, H.R., Gallegos, V., De la Huerta, R., Alfaro, L. : Catepsina B y antiproteasas en enfermas con carcinoma cervico_uterino. *Arch. Inv. Med. (Mex.)* 12: 517, 1981.
63. Honn, K.V., Cavanaugh, P., Evens, C., Taylor, J.D., Sloane, B.F.: Tumor cell-platelet aggregation: Induced by cathepsin B-like proteinase and inhibited by prostacyclin. *Science* 217: 540- 542, 1982.
64. Sloane, B.F., Rozhin, J., Johnson, K., Taylor, H., Crissman, J.V., Honn, K.V.: Cathepsin B: Association with plasma membrane in metastatic tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 2483-2487, 1986.
65. Laurell, C.B. : Electrophoretic microhetetogenicity of serum alpha-1-antitrypsin. *Scand. J. Clin. and Lab. Inv.* 15: 488, 1963.

66. Storiko, K. : Normal values for 23 human plasma proteins determined by single radial immunodiffusion. *BLUT* 16 (1): 200, 1968.
67. Litmin, S.D.: Alpha-1-antitrypsin deficiency. *Amer. Rev. Respir. Dis.* 100: 886, 1969.
68. Benítez-Bribiesca, L. Freyre-Horta, R., Lagarriga-Attías, J.: Alpha-1-antitrypsin in alcoholic cirrhosis. *Patología* 15: 247, 1977.
69. Talamo, R.C., Glennerhassett, J.B., Austen, K.F.: Familial emphysema and alpha-1-antitrypsin deficiency. *New England J. Med.* 275: 1301, 1966.
70. Turino, M.G., Senior, R.M., Carga, B.D., Keller, S., Levi, M.M., Mandl, I. : Serum elastase inhibitor deficiency and alpha-1-antitrypsin deficiency in patients with obstructive emphysema. *Science* 165: 709, 1969.
71. Hermann, G., Miescher, P.A.: Differentiation of leucocytic fibrinolytic enzymes from plasmin by use of plasmatric proteolytic inhibitors. *Int. Arch. Allergy* 27: 346, 1965.
72. Benítez-Bribiesca, L., Freyre-Horta, R. : Immunofluorescent localization of alpha-1-antitrypsin in human polymorphonuclear leukocytes. *Life Science* 22: 99, 1978.
73. Homer, G.M., Zipf, R.E., Hieber, T.E., Katchman, B.J.: The trypsin inhibitor capacity of serum in normal and diseases states. *Am. J. Clin. Path.* 34: 99, 1960.
74. Talamo, R.C. : The alpha-1-antitrypsin in man. *J. Allergy Clin. Immunol.* 48: 240, 1971.
75. Werle, E., Zickgraf-Rudel, G.: Natural proteinase inhibitors distribution, specificity, mode of action and physiological significance. *Cli. Biochem.* 10: 139, 1972.
76. Eisen, A.Z., Baner, E.A., Jeffrey, J.J.: Human skin collagenase. The role of serum alpha globulins in the control of activity in vivo and in vitro . *Proc. Nat. Acad. Sci.* 68: 248, 1971.
77. Rennert, O.M. : Glycoproteins in disease. *Ann. Clin. Lab. Sci.* 8: 176, 1978.
78. Faarvang, H.J., Lauritsen, O.S.: Increase of trypsin inhibitor in serum during pregnancy. *Nature* 199: 290, 1963.

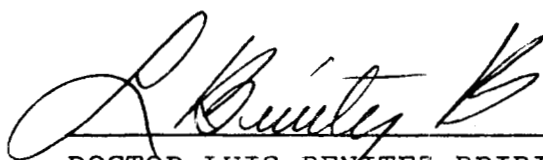
79. Mendenhall, H.W. : Serum alpha-1-acid-glycoprotein concentration in pregnancy and with oral contraception. *Amer. J. Obstet. Gynecol.* 110: 924, 1971.
80. Faarvang, H.J., Lauritsen, O.S.: Relationship between serum concentration and urinary output of trypsin inhibitor after cortisone administration. *Scan. J. Clin. Lab. Inv.* 15: 483, 1963.
81. Harris, C.S., Primack, A., Cohen, J.H.: Elevated alpha-1-antitrypsin serum levels in lung cancer patients. *Cancer Res.* 34: 280, 1974.
82. Twing, S.S., Brecher, A.S.: Identification of alpha-1-acid-glycoprotein, alpha-2-macroglobulin and antitrombin III as components of normal and malignant human tissues. *Clin. Chim. Acta* 75: 143, 1977.
83. Bacchus, H.: Serum glycoproteins and malignant neoplastic disorders. *Cr. Rev. Clin. Lab. Sci.* 8: 332, 1977.
84. Steven, F.S., Podrasky, V., Itzhaki, S.: Evidence of the presence of a trypsin inhibitor within rabbit and mouse tumor cell. *Biochim. Biophys. Acta* 483: 211, 1977.
85. Schumacher, G.F., Pearl, M.J.: Alpha-1-antitrypsin in cervical mucus. *Fertil and Steril* 19: 91, 1968.
86. Pierce, J.A., Eisen, E.A., Dhingra, H.K.: Pathogenesis of emphysema in antitrypsin deficiency. *Clin. Res.* 17: 477, 1969.
87. Lieberman, J. : Heterozygous and homozygous alpha-1-antitrypsin deficiency in patients with pulmonary emphysema. *New England J. Med.* 281: 279-284, 1969.
88. Blackwood, C.E.: Alpha-1-antitrypsin concentration in serum of laboratory animals changes following proteolytic enzyme injection. *J. Lab. Clin. Med.* 84: 813, 1974.
89. Johnson, A.M., Alper, C.A.: Deficiency of alpha-1-antitrypsin in childhood liver disease. *Pediatr.* 46: 921, 1970.
90. Ishak, K.G.: Cirrhosis of the liver associated with alpha-1-antitrypsin deficiency. *Arch. Path.* 94: 445, 1972.
91. Benítez-Bribiesca, L., De la Vega, G.: Pemphigus vulgaris associated with alpha-1-antitrypsin deficiency. *Patología* 10: 41, 1972.

92. Cox, D.W., Huber, O.: Rheumatoid arthritis and alpha-1-antitrypsin
Lancet: 1216, 1976.
93. Rawlings, W., Moss, J., Cooper, H.S., Hamilton, S.R.: Hepatocellular carcinoma and partial deficiency of alpha-1-antitrypsin (M.Z.) Ann. Int. Med. 81: 771, 1974.
94. Scheleissner, L.A., Cohen, A.H.: Alpha-1-antitrypsin deficiency and hepatic carcinoma. Amer. Rev. Resp. Dis. 111: 863, 1975.
95. Kirchner, C., Hirschauser, C., Kionks, M.: Protease activity in rabbit uterine secretion 24 hours before implantation. J. Reprod. Fert. 27: 259, 1971.
96. Benítez-Bribiesca, L., De la Vega, G., Freyre-Horta, R.: Alpha-1-antitrypsin in human mast cells immunofluorescent localization. Life Science 13: 631, 1973.
97. Nerenberg, S.T.: Electrophoresis. A practical Laboratory Manual. F.A. Davis Co., 1966.
98. Benítez-Bribiesca, L., Freyre-Horta, R., De la Vega, G., Alpizar, S.: Localización histoquímica de alfa-1-antitripsina en el cérvix uterino. Patología 14: 253, 1976.
99. Starkey, P.M., Barret, A.J.: Alpha-2-macroglobulin a physiological regulator of proteinase activity. In Barret, A.J. (ed.) Proteinases in mammalian cells and tissues. Elsevier, North Holland Biomedical Press 1977 pp 663.
100. Hiroshi, M., Yasuhiro, M., Akhteruzzaman, M.: Antitumor activity of some bacterial proteases: erradication of solid tumors in mice by intratumor injection. Cancer Res. 47: 563-566, 1987.
101. Huggins, Ch., Grand, C.L., Brillantes, F.P.: Mammary cancer induced by a single feeding of polynuclear hydrocarbons and its supression. Nature 189; 204-207, 1961.
102. Luna, L.: Manual of histologic staining of the Armed Forces Institute of Pathology, 1968.
103. De Lumen, B.O. and Tappel, A.L.: Continuous fluorometric assay for cathepsin B-like activity in lysosomes. Ann. Biochem. 48: 378-385, 1972.

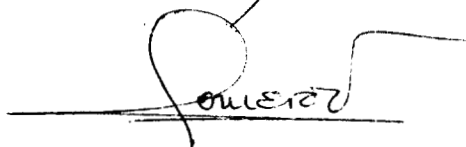
104. Szego, M.C., Seeler, J.B. and Smith, R.E.: Lysosomal cathepsin B₁: Partial characterization in rat preputial gland and recombination in response to estradiol-17-beta. *Eur. J. Biochem.* 69: 463-474, 1976.
105. Recklies, D.A., Mort, S.J. and Poole, R.A.: Secretion of a thiol proteinase from mouse mammary carcinomas and its characterization. *Cancer Res.* 42: 1026-1032, 1982.
106. Altman, L.P.: Blood and other body fluids. *Biological Handbooks Fed. of American Societies for Experimental Biology Analysis and Compilation* by. 1961 pp 59-61.
107. Henry, R.J., Cannon, D.C., Winkelman, J.W. (ed.) *Clinical Chemistry Principles and Techniques* Harper and Row, Hagerstown 1974 pp 437.
108. Sarma, P.R., Lawson, D.H., Prother, J.R., Chawla, R.K.: Functionally inactive serum alpha-1-antitrypsin (AAT) in cancer. *Proc. ASCO* 5: 21, 1986.
109. Almaraz-Ugalde, A.: Curso elemental de Método Estadístico (colección de material didáctico). I.M.S.S.-Subdirección General Médica. Depto. de Investigación Científica, México 1969 pp 72,81.
110. Goldstein, A. : *Biostatistics: An introduction text*. Editorial Mac Millan, New York 1964 pp 129-146, 242.
111. Barret, A.J.: A new assay for cathepsin B1 and other thiolproteinases. *Anal. Biochem.* 47: 280-293, 1972.
112. Olstein, D.A., Liener, E.I.: Comparative studies of mouse liver cathepsin B and analogous tumor thiol proteinase. *The J. of Biol. Chem.* 258 (18): 11049-11056, 1983.
113. Huggins, Ch., Lorraine, C., Grand, C.L. AND Brillantes, F.P.: Critical significance of breast structure in the induction of mammary cancer in the rat. *Proc. N.A.S.* vol. 45: 1294-1300, 1959.
114. Meranze, D.R., Gruenstein, M., Shimkin, M.B.: Effect of age and sex on the development of neoplasms in Wistar rats receiving a single intragastric instillation of 7,12-Dimethylbenz(a)anthracene. *Int. J. Cancer* 4: 480, 1969.
115. Langer, R., Brem, H., Falterman, K.: Isolation of a cartilage factor that inhibits tumor neovascularization. *Science*, 193: 70, 1976.

116. Folkman, J., Langer, R., Linhardt, R.J.: Angiogenesis inhibition and tumor regression caused by heparin or a heparin fragment in the presence of cortisone. *Science* 221: 719, 1983.
117. Mc Loughlin, G.A., Wang, B.S., Mannick, J.A.: Correlation of plasminogen activator production with tumor metastasis. *Fed. Proc.* 38: 1269, 1979.
118. Liotta, L.A., Goldfarb, R.H., Brundage, R.: Effect of plasminogen activator (urokinase), plasmin and thrombin on glycoprotein and collagenous components of basement membrane. *Cancer Res.* 41: 4629, 1981.
119. Moscatelli, F., Jaffe, E., Rifkin, D.B.: Tetradecanoylphorbol acetate stimulates latent collagenase production by cultured human endothelial cells. *Cell (Camb.)* 20: 343, 1980.
120. Pietras, P.J., Szego, M.C., Mangan, C.E.: Elevated serum cathepsin B₁ and vaginal pathology after prenatal DES exposure. *Obst. Gynecol.* 52: 321, 1978.
121. Giralardi, T., Kopitar, M., Sava, G. : Antimetastatic effect of a leukocyte intracellular inhibitor of neutral proteases. *Cancer Res.* 37: 3834, 1977.

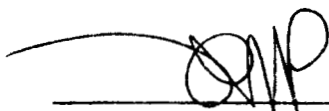
El Jurado designado por el Comité Asesor de la
MAESTRIA en BIOLOGIA EXPERIMENTAL de la División
de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad
Autónoma Metropolitana de la Unidad Iztapalapa,
APROBO esta Tesis el día 23 del mes AGOSTO del
año de 1989.



DOCTOR LUIS BENITEZ BRIBIESCA.



DOCTOR GUILLERMO ROMERO VILLASEÑOR.



DOCTOR RUBEN DARIO MARTINEZ PEREZ.

MEXICO, D.F.