

ESTUDIO BIOQUIMICO DE LA ACTIVIDAD AMINOPEPTIDASA EN CANCER DE COLON Y RECTO

Memoria que presenta el Licenciado en Medicina y Cirugia D. José Manuel
Llorente Gutierrez para la obtención del Grado de Doctor

Facultad de Medicina
Universidad de Granada
Julio 1990

UNIVERSIDAD DE GRANADA

ACTA DEL GRADO DE DOCTOR EN MEDICINA

Curso de 19 77 a 19 80

Folio 93 ^{ota}

Número 187

Reunido en el día de la fecha el Tribunal nombrado para el Grado de Doctor de D. Don Manuel
Alcántara Pulido, el aspirante leyó un discurso sobre el siguiente
tema, que libremente había elegido: "Estudio bioquímico de la actividad
aminopépticas en células de color y retina"

Terminada la lectura y contestadas la objeciones formuladas por los Jueces del Tribunal, este
le calificó de apto con laudis por unanimidad

Granada 12 de Julio de 19 79

EL PRESIDENTE,

El Secretario del Tribunal,

[Signature]

[Signature]

Fdo.: [Signature]

Fdo.: Juan M. García Sol

EL VOCAL.

[Signature]

Fdo.: Miguel Ansel

EL VOCAL.

[Signature]

Fdo.: CARLOS OSORIO

EL VOCAL.

[Signature]

Fdo.: Antonio Juárez García

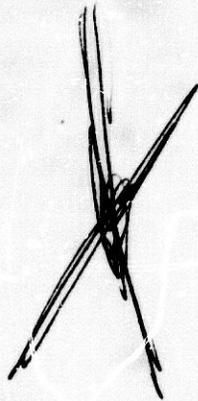
FIRMA DEL GRADUANDO.

[Signature]

DON JOSE ANTONIO GOMEZ CAPILLA, Catedrático de Bioquímica y Biología Molecular, y DON FRANCISCO ALBA ARAGÜEZ, Profesor Titular de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Medicina de Granada

CERTIFICAN: Que la Tesis Doctoral que presentan al superior juicio del Tribunal que designe la Universidad de Granada sobre el tema "ESTUDIO BIOQUIMICO DE LA ACTIVIDAD AMINOPEPTIDASA EN CANCER DE COLON Y RECTO", ha sido realizada bajo nuestra dirección durante los cursos académicos 1987-88, 1988-89 y 1989-90, siendo expresión de la capacidad técnica e interpretativa de su autor, en condiciones tan aventajadas que le hacen acreedor al Título de Doctor, siempre que así lo considere el citado tribunal.

Granada a cuatro de junio de mil novecientos noventa

A handwritten signature consisting of several overlapping, dark ink strokes, appearing somewhat abstract and stylized.A handwritten signature in dark ink, featuring a large, rounded initial 'F' followed by several vertical and curved strokes.

A la memoria de mis padres

A May

Quiero hacer mención especial a la memoria
de mi querido maestro el Profesor Dr. D.
Manuel Sastre Gallego que tanto me enseñó
y tanta ilusión le hubiese hecho ver
realizada esta Tesis.

A todos mis compañeros del Departamento de Patología Quirúrgica, que de una u otra manera me estimularon en la realización de este trabajo, así como a todos los compañeros de los Departamentos de Bioquímica y Medicina Legal, y al resto del personal del laboratorio por la ayuda de ellos recibida.

Finalmente y de forma especial quiero hacer mención al Profesor D. Carlos Osorio Pelaez, Catedrático de Bioquímica y Bioquímica Molecular, que con su labor y dedicación a lo largo de 25 años, ha creado las condiciones instrumentales técnicas y humanas que me han dado la oportunidad de realizar el presente trabajo.

INDICE

I. INTRODUCCION	9
estudio general de los tumores malignos de colon y recto	10
Anatomía Patológica	20
Pronóstico del cancer de colon	24
Mecanismos de diseminación del cancer de colon	29
Diagnóstico del cancer colo-rectal	31
Tratamiento	47
Enzimas proteolíticas	61
Clasificación de las exopeptidasas	62
Nomenclatura de las exopeptidasas	64
Exopeptidasas de mamíferos. Generalidades	70
Exopeptidasas del citosol	72
Exopeptidasas unidas a membrana	74
Exopeptidasas de origen lisosomal	75
Omega peptidasas	81
Modificaciones de las exopeptidasas en distintos procesos patológicos	83
Procesos no neoplásicos	83
Procesos neoplásicos	86
Neoplasias de colon y recto	91
II. RESUMEN Y PLANTEAMIENTO	95
III. MATERIAL Y METODOS	99
Material biológico	100
Material químico	105
Extracción de las fracciones soluble y de membrana	108
Determinación de la actividad aminopeptidasa	109
Determinación de proteínas	111
Método estadístico	112

IV. RESULTADOS	113
V. DISCUSION	140
VI. CONCLUSIONES	157
VII. REFERENCIAS	159

INTRODUCCION

ESTUDIO GENERAL DE LOS TUMORES MALIGNOS DE COLON Y RECTO

El cáncer colo-rectal ha incrementado su frecuencia en los últimos años, sobre todo coincidiendo con el aumento del nivel socio-económico constituyendo, según afirma Einhorn, 1984, la segunda causa de muerte por cáncer.

Existe gran porcentaje de pacientes que llegan a la mesa de operaciones en estadios avanzados de invasión lo que supone un obstáculo para el tratamiento curativo del paciente (Nilsson, F. et al, 1984).

Junto a esto, está el problema de la avanzada edad de los pacientes, la agresividad de la cirugía oncológica y los problemas de calidad de vida que suponen las secuelas, no sólo de dicha cirugía, sino en muchos casos de la propia evolución de la enfermedad.

Además y dentro del intestino grueso, el colon presenta la dificultad adicional, en cuanto a su diagnóstico, de presentar una sintomatología a veces larvada en comparación con el recto, que es mas accesible al diagnóstico directo. Así Goligher et al, 1979, dice que: "en cualquier alteración del ritmo intestinal en una persona de más de cuarenta años, requiere una investigación a fondo de su posible origen maligno en intestino grueso".

Antes de comenzar el estudio de los distintos factores que pueden influenciar el posible origen, evolución y pronóstico de los tumores malignos colo-rectales así como una visión general de sus problemas clínicos, diagnósticos y terapéuticos estableceremos un cuadro general de las posibles tumoraciones que pueden tener asiento en el segmento colo-rectal del intestino humano.

NEOPLASIAS DE COLON Y RECTO BENIGNAS

- A. EPITELIALES-POLIPOS
- B. NO EPITELIALES
- C. QUISTICAS.

A.- EPITELIALES-POLIPOS:

1. NO NEOPLASICAS

Pólipos juveniles | Hamartomas
 Síndrome de Peutz-Jeghers | ~~Hamartomas~~
 Poliposis hiperplásica o metaplásica
 Pólipo linfoide benigno
 Pólipos inflamatorios: Colitis ulcerosa, Enf. Crohn,
 Diverticulitis
 Neumatosis Cystoides intestinalis

2. NEOPLASICAS (Polipos neoplásicos)

Adenoma tubular
 Adenoma mixto (túbulo-veloso)
 Papiloma-veloso
 Poliposis múltiple familiar
 Síndrome de Gardner (poliposis asociada a osteomas, quistes dermoides, tumores desmoides)
 Síndrome de Turcot (poliposis más tumores nerviosos S.N. Central)
 Síndrome de Cronkhite-Canada (mujeres, pólipos, diarrea, hiperpigmentación, alopecia, edema)

B. NO EPITELIALES

1. Linfoma
2. Lipoma
3. Leiomioma
4. Hemangioma
5. Linfangioma
6. Mesotelioma
7. Mieloblastoma de células granulosas
8. Fibroma
9. Neurofibroma
10. Ganglioneuroma
11. Teratoma

12. Endometriosis colónica

C. QUISTES DE ORIGEN EPITELIAL

1. Neumatosis quística intestinalis
2. Quistes de implantación
3. Quistes dermoides

NEOPLASIAS MALIGNAS

A. EPITELIAL

B. NO EPITELIAL

A. EPITELIAL:

Adenocarcinoma: Polipóide, exofítico, en coliflor
Ulcerativo escirroso (ulcero-infiltrante
Anular estenosante)
Difusamente infiltrante ó linítis plástica de colon ó recto
Cáncer colóide
Carcinomas múltiples

I. Muy diferenciados; II: Moderadamente diferenciados; III: Pobremente diferenciados. IV: Poco diferenciados. a) Coloides (mucoides). b) Anaplásicos

B. NO EPITELIAL:

- Carcinoide
- Linfosarcoma
- Leiomioma
- Rabdomioma
- Hemangiopericitoma
- Plasmocitoma
- Endotelio
- Melanoma maligno

CARCINOMA DEL CANAL ANAL Y PERIANALES

1. Carcinoma Epidermoide (Espinocelular)

- De células escamosas
 - Basaloide no queratinizante
 - Baso-escamoso
 - Cloacógeno ó de transición
 - Mucó-epidermoide
 - Escamoso no queratinizante
 - Enfermedad de Bowen (intraepidérmico)
 - Enfermedad de Paget perianal (glándulas apocrinas)

2. Carcinoma basocelular ó úlcus rodens

3. Adenocarcinoma primario del canal anal y tejidos perianales

4. Melanoma maligno

5. Adenocarcinoma del recto, descendente al canal anal

Como en todos los cánceres, la etiopatogenia del cáncer de colon es desconocida pero existen una serie de factores que han permitido un conocimiento más profundo de su génesis y en consecuencia de las posibles causas predisponentes de dicha enfermedad. Hoy día conocemos que la incidencia es mayor en países con un elevado nivel de vida, habiéndose comprobado que se debe a factores ambientales y no raciales. También se han descrito factores hereditarios en la génesis de algunos calcinomas de colon.

Entre los factores de riesgo que pueden dar lugar a un cáncer de colon se encuentran:

- Trabajadores del asbesto (existiendo fibras de este material en mucosa colo-rectal).
- Dermatomiositis.
- Enfermos inmunodeprimidos, por distintas razones.
- Irritación de la pared colónica: uretero-sigmoidostomía (Sheldon, Ca et al, 1983), diverticulitis, etc.
- Enfermedades inflamatorias intestinales: colitis ulcerosa o granulomatosa.
- Edad: máxima incidencia entre la sexta y séptima década de la vida.
- Sexo: al contrario que en el cáncer de recto existe una clara incidencia preferencial por el sexo femenino en el cáncer de colon.
- Herencia: existen unas pocas "familias de cancerosos", que solo explican un pequeño número de cánceres de colon.
- Trabajadores de la industria: calzado, cocineros, alquitran y madera, sin que esto se haya confirmado.

Otras situaciones que más parecen coexistir casualmente que causalmente como: acantosis nigricans, disenteria amebiana, apendicectomizados, proctitis por radiación...

De los factores más importantes en la genesis del cáncer de colon son los "hábitos dietéticos".

La importancia de este factor ha sido destacada por múltiples autores, habiéndose observado que son factores de riesgo el uso de hábitos alimenticios con dietas:

- * De gran contenido proteico.
- * De gran contenido graso.
- * De gran contenido hidrocarbonado refinado.
- * Pobres en fibras vegetales.

Para dichos autores el factor más importante es el volumen de las heces, el cual disminuye a medida que nos trasladamos desde los países del tercer mundo hacia los occidentales, al mismo tiempo y simultáneamente que aumenta la incidencia del cáncer de colon.

Si las deposiciones son de gran volumen y escasa consistencia, la incidencia será baja; en cambio cuando las deposiciones sean de pequeño tamaño y de gran consistencia, la incidencia será elevada.

Por otra parte la incidencia de cáncer de colon está directamente relacionada con el tiempo que tarda el alimento en pasar por el tubo

digestivo. En Inglaterra o EEUU el alimento suele tardar unos tres días en atravesar todo el intestino, llegando incluso a dos semanas a las personas de edad avanzada. En cambio en comunidades donde el cáncer de colon es raro, este tiempo de tránsito suele estar alrededor de treinta horas.

Las probabilidades de padecer cáncer de colon están directamente relacionadas con el pH de las heces y se comprueba que en poblaciones de mayor incidencia este pH es elevado. Esto se puede demostrar experimentalmente haciendo un cultivo de bacterias fecales junto con colesterol observando que con pH alcalino se produce una mayor elaboración de derivados carcinogénicos del colesterol y de los ácidos biliares.

La fibra vegetal del pan integral, por ejemplo, aumenta ocho veces más que el pan refinado la masa de las heces disminuyendo el pH de las mismas; siendo por lo tanto un factor protector del carcinoma colorectal.

Además la fibra vegetal es rica en lignina y pectina que inhiben la acción de algunos carcinógenos captando las sales biliares o las sustancias inhibidoras de las proteasas presentes en las semillas de soja.

Los alimentos de gran contenido proteico y graso favorecen el desarrollo de flora anaerobia especialmente clostridio y bacteroides y menos lactobacilo, capaces de producir ácido desoxicólico, litocólico y metabolitos del colesterol que actúan como productos carcinógenos, del tipo del azoximetano y de la nitrosoguanidina.

Ultimamente se ha venido dando mas importancia al papel jugado por los ácidos biliares en el desarrollo y crecimiento del cáncer colo rectal. En un reciente estudio de Summerton (1983) se postula la existencia de receptores específicos para los ácidos biliares.

El receptor parece ser de carácter protéico. La naturaleza de estas proteínas no está determinada aún. Es posible que los ácidos biliares interaccionen con dichas proteínas y que este proceso ocurra por medio de difusión iónica y no iónica. También se cree que la presencia de dichos receptores indicaría la potencial malignidad del adenoma que los presentase.

Se han implicado "factores inmunológicos" en el desarrollo del cáncer de colon, al igual que en otros tipos de cánceres, ya que es conocido el papel que juega el sistema inmunológico en la formación y crecimiento de los tumores. Así se conoce que personas con deficiencia inmunitaria o las que reciben terapeutica inmunosupresora crónica están sujetas a un riesgo incrementado de cáncer colo-rectal.

Así se puede decir que aunque no se conozca la secuencia exacta de los hechos en el cáncer de colon, han sido demostrados numerosos factores capaces de jugar un papel etiológico y patogénico importante en este proceso, siendo esto fundamental para intentar una posible actuación profiláctica, ya sea con medidas higiénicas, alimenticias o de otro tipo.

ENFERMEDADES PREMALIGNAS

Existen una serie de enfermedades que frecuentemente se asocian al cáncer de colon. Es importante identificar a los pacientes y realizar un tratamiento adecuado para prevenir la aparición de neoplasias en **estos** pacientes que poseen un "alto riesgo" de padecer cáncer de colon.

1. POLIPOS COLONICOS AISLADOS.

No hay certeza de que los pólipos de intestino grueso sean lesiones premalignas o simplemente esten asociados al cáncer. Se defiende la secuencia "adenoma-carcinoma" desde un punto de vista clínico, histológico, epidemiológico y experimental. En favor de esto está la evidencia de que los pólipos y el cáncer tienen una distribución anatómica, geográfica y unos factores epidemiológicos similares.

Habitualmente los pólipos metaplásicos, inflamatorios y los hamartomatosos no tienen potencial maligno, sin embargo los pólipos adenomatosos (neoplásicos) tienen posibilidad de malignizarse.

Los factores que hacen que un pólipo tenga posibilidades de malignizarse son según Morson:

a.- Tamaño del pólipo: El riesgo de malignización es creciente a mayor tamaño del pólipo. En 1479 pólipos de menos de 1 cm. el número de cánceres fué del 1.3%. En 430 pólipos mayores de 2 cm. el porcentaje de cánceres fue del 46%.

b.- Tipo histológico: Dentro de los pólipos adenomatosos podemos distinguir: adenoma tubular; adenoma tubulo-velloso (mixto) y adenoma velloso.

J.M. Llorente

Existe un acuerdo general en que los adenomas vellosos tienen un potencial maligno muy alto (40%), 43,4% en la serie de González Martínez (1982), al contrario del adenoma tubular (5%).

c.- Atipia celular: El potencial maligno aumenta cuanto mayor es ésta (leve, moderada o grave) estando a la vez relacionada con el tamaño del pólipo.

2. SINDROMES DE POLIPOSIS COLONICA FAMILIAR

Es muy importante su diagnóstico precoz, ya que si no se tratan, desarrollan un cáncer hasta en el 100% de los casos existiendo acuerdo general sobre su naturaleza premaligna (Fernández Velazquez et al, 1982; Rozen, P and Baratz, M., 1982).

a.- Síndrome de Gardner: Caracterizado por presencia de poliposis colónica y osteomas en mandíbula, maxilar o cráneo, dentición anormal y tumores desmoides.

b.- Síndrome de Turcot: Se asocian tumores cerebrales a poliposis colónica.

3. SINDROMES HEREDITARIOS DE CANCER DE COLON NO ASOCIADOS A POLIPOSIS

a.- Carcinoma gástrico hereditario.

b.- Carcinoma de colon hereditario: Trasmisión familiar en la herencia de las neoplasias de colon sin que existan poliposis.

c.- Síndrome de Muir: Múltiples tumores cutáneos y al mismo tiempo tumoraciones benignas y malignas que afectan a cualquier área del tracto intestinal (estómago, intestino delgado y colon), tracto génito-urinario y en otros casos afectación tumoral de diversos órganos, tales como: esófago, laringe, vulva, útero y mama.

d.- Adenocarcinomatosis hereditaria: Aparece de manera hereditaria cáncer de colon y útero, aunque pueden aparecer tumores localizados en ovario, mama y otras áreas.

Estas enfermedades se transmiten en forma autosómica dominante, aparecen en edades precoces, en varias visceras, siendo su localización mas frecuente el colon derecho. Tienen alto riesgo de padecer cáncer de colon (suponen del 12-26% de los cánceres de colon frente al 1% de las neoplasias por poliposis colónicas).

4. COLITIS ULCEROSA

Está aceptado el papel de riesgo que juega esta enfermedad en la posible malignización de la misma (Castro Fernández, M. et al, 1984).

Existen una serie de factores que aumentan el riesgo de que aparezca la neoplasia:

1. Cuanto más precoz es la aparición, más peligro existe.
2. A mayor extensión de las lesiones, mayor peligro.
3. Tiempo de evolución. Más peligrosa con muchos años de evolución. A partir de los diez años existe aumento progresivo de la incidencia de malignización.
4. Presencia de displasia en la mucosa colónica.

Los cánceres en la colitis ulcerosa suelen aparecer en personas jóvenes, ser proximales, ser infiltrativos y seguir un curso muy virulento.

LA ENFERMEDAD DE CROHN no es considerada como premaigna.

ANATOMIA PATOLOGICA

La localización de los cánceres de colon parece estar cambiando; hace diez años dos terceras partes de los cánceres de colon tenían lugar en los 25 cm. distales del recto-sigma; mientras que en la actualidad esta proporción está en el 50%. Son más frecuentes los cánceres de colon derecho en los casos de incidencia familiar y en los de pacientes con enteropatías inflamatorias (Stearns, J.R. et al, 1978).

En un estudio realizado por Falterman, 1974, en el Hospital Charity de Nueva Orleans la localización más frecuente es la del recto con 38,03%, seguida por el colon sigmoides, 24,33% y ciego 10,38%.

CARACTERISTICAS MACROSCOPICAS

Macroscopicamente la forma más frecuente es la de crecimiento anular alrededor del colon, que origina una marcada estenosis; de forma menos frecuente se presenta como una masa polipoide y fungosa.

En general, los cánceres del colon izquierdo suelen adoptar la primera de las formas, mientras que los del derecho adoptan la segunda.

Al principio se presenta como una masa poco elevada que se extiende ocupando toda la pared. Cuando el carcinoma se origina en el seno de un pólipo adenomatoso aparece una infiltración del pedúnculo y de la base de implantación, de tal manera que el tumor aparece como un botón fijado a la pared intestinal; más adelante la porción central se desintegra, dejando una úlcera necrótica de bordes elevados. La base queda fija a la capa muscular, la cual es alcanzada por la ulceración progresiva en un estadio posterior.

La diseminación a través de los linfáticos de la sub-mucosa y de la sub-serosa también tiene lugar, de manera que el tumor rodea de forma gradual la pared intestinal. Se considera que se necesitan de uno a dos años para que la rodee totalmente.

En un reciente estudio de Bolin, 1983, realizado sobre 27 carcinomas de colon y recto, se llegó a las siguientes conclusiones: la media lineal de incremento de la masa tumoral es de 0,083 mm./día; el tiempo medio de doblar el diámetro del tumor es de 130 días. También se puede afirmar que

existe una estrecha relación entre la rapidez de crecimiento y la pobre diferenciación de las células tumorales.

Existe una fuerte evidencia que la mayoría de los carcinomas se desarrollan a partir de adenomas. Esta secuencia "Adenoma-carcinoma" lleva un tiempo largo; probablemente más de 5 años y algún adenoma no se transforma en maligno nunca.

CARACTERÍSTICAS MICROSCÓPICAS

En los enfermos con adenomas y carcinomas de colon hay unas alteraciones de la mucosa bien definidas. En los sujetos normales, la zona de síntesis de DNA y proliferación celular en los sujetos normales se encuentra en la base de las criptas colónicas, mientras que en los enfermos que presentan adenomas o carcinomas las células de la mucosa siguen proliferando hasta el vértice de las criptas. Esta anomalía de la proliferación y maduración celular se presenta también en los enfermos pertenecientes a familias con alta incidencia de cáncer de colon.

La mayoría de los cánceres de colon (95%) son adenocarcinomas; el resto de los tumores malignos corresponden a sarcomas como: leiomiomas, fibrosarcomas, hemangiosarcomas, linfosarcomas, melanomas... (García Fidalgo, G. et al, 1982).

Los linfomas son sobre todo de tipo histiocítico difuso. Se presentan habitualmente en la región cecal o rectal y si son polipoideos, a veces resulta imposible distinguirlos, a simple vista de los adenocarcinomas.

También pueden infiltrar difusamente dando lugar a una pared intestinal engrosada, nodular y ulcerada.

Los sarcomas, aunque son menos frecuentes, también pueden presentarse en el colon, pareciéndose en sus manifestaciones a los del estómago e intestino delgado.

En cuanto a los criterios de Broders de diferenciación histológica del tumor, la forma más frecuente es la del adenocarcinoma bien diferenciado secretor de una escasa cantidad de mucina; en un 10-15% de los casos pueden producir grandes cantidades, originando un carcinoma mucoide y de forma infrecuente se trata de carcinomas indiferenciados.

Las formas coloides se pueden presentar como una variedad bien diferenciada, con células que contienen gran cantidad de mucina o una forma constituida en su mayor parte por células en anillo de sello; forma que tiene una gran malignidad, presentándose en zonas de baja incidencia de cáncer de colon o en personas jóvenes.

El término de carcinoma indiferenciado se utiliza para aquellas formas que no se diferencian para formar túbulos. Estos tumores se diferencian de los anaplásicos por la falta de pleomorfismo y de figuras de mitosis

J.M. Llorente

atípicas. No suelen secretar mucha mucina y pueden presentar algunas células argirófilas.

PRONOSTICO DEL CANCER DE COLON

El pronóstico del cáncer de colon está íntimamente relacionado con los hallazgos patológicos. Existe una cierta correlación entre localización y pronóstico; así los tumores localizados en el ciego, suelen ser de una capacidad invasiva menor, así como una capacidad de producir metástasis ganglionares también menor.

En general, cuanto mayor es el tamaño de un tumor, peor es su pronóstico; salvo en las formas microscópicas muy indiferenciadas, que poseen una gran capacidad de propagación. Aunque en general, el grado de diferenciación histológica en otros tumores tiene una importancia relativa, en el cáncer de colon existe una buena correlación entre el grado de diferenciación histológica y el pronóstico. Estos crecimientos se clasifican en tres grados de malignidad: alta, media y baja, según su diferenciación histológica. El porcentaje de supervivencia a los cinco años es del 70-80% en los de baja malignidad; del 50-60% en los de grado medio y del 20-25% los de alta malignidad (Nilson, E. et al, 1984).

El grado de infiltración de la pared es uno de los factores más importantes para definir el pronóstico. El hecho de que no existan linfáticos en la mucosa del colon por encima de la muscularis-mucosae, hace que cualquier tipo de crecimiento localizado en la lámina propia, por anaplásico que sea,

no tenga capacidad de metastatizar y por tanto su extirpación conduce a la curación.

La clasificación de DUKES, introducida por este autor en 1928, es actualmente aceptada universalmente para definir la extensión de la infiltración del cáncer de colon.

Propuso tres estadios:

ESTADIO A: El tumor está limitado a la pared del colon, sin extensión extracólica ni metástasis linfática. Con un tratamiento adecuado la supervivencia de estos enfermos es superior al 95% a los cinco años.

ESTADIO B: Además de estar infiltrada toda la pared, está infiltrada la grasa pericólica, pero sin metástasis linfáticas. La supervivencia a los cinco años es del 78%.

ESTADIO C: Existen metástasis ganglionares y la supervivencia a los cinco años es del 32%.

Desgraciadamente más de la mitad de los enfermos se encuentran en el Estadio C cuando son operados (Nilson, 1984; Lopez Bejarano, M.C. et al, 1982).

La invasión vascular y perineural son signo de enfermedad muy avanzada. Las venas intramurales infiltradas tienen poca importancia para el

pronóstico, pero la invasión venosa extramural reduce el índice de supervivencia al 25% aproximadamente.

El pronóstico varía según el número de ganglios infiltrados. Si hay un ganglio invadido, el pronóstico es del 60%; si hay entre dos y cinco ganglios, es del 35%; si hay 6 o más ganglios, sólo un 20% de los pacientes vivirá a los cinco años.

Esta clasificación, que en un principio fué admitida para el cáncer de recto se aplicó después para el cáncer de colon y se realizaron varias modificaciones.

En 1949, KIRKLIN et al modificó la clasificación de Dukes, distinguiendo dos sub-grupos en el estadio B:

ESTADIO B₁: Cuando afectaba la muscularis-mucosae pero sin alcanzar la muscular propia y

ESTADIO B₂: Cuando el tumor afecta a toda la muscular propia de la pared cólica.

Posteriormente Astler y Collier, 1954, añadieron dos sub-grupos al Estadio C:

ESTADIO C₁: Afección de la muscular, pero sin sobrepasarla, con metástasis ganglionares regionales y

ESTADIO C₂: Cuando además de la afectación ganglionar regional, estaba afectada toda la pared muscular del colon o recto por el tumor.

En 1967 Turnbull et al añadió otra categoría: El ESTADIO D: incluyendo los casos con gran invasión de órganos vecinos, diseminación peritoneal del tumor y metástasis a distancia.

Existe otra clasificación menos utilizada clínicamente que es la propuesta por la Unión Internacional Central del Cáncer (U.I.C.C.) creada por Denoix; es la clasificación T.N.M.

T = Tumor Primario

T₀ = Tumor no demostrable clínicamente.

T_{is} = Cáncer in situ.

T₁ = Confinado a mucosa o submucosa.

T₂ = Incluye a la pared muscular o a la serosa, pero no más allá.

T₃ = Extensión a estructuras y/o órganos adyacentes, no presenta fistulas.

T₄ = Presenta fístula y solo afecta a lo anterior.

T₅ = T₃ ó T₄ con extensión más allá de los órganos adyacentes.

T_x = Profundidad de penetración no especificada

N = Gánglios invadidos

N₀ = No hay gánglios invadidos.

N₁ = Gánglios invadidos.

N_x = Invasión ganglionar no especificada.

M = Metástasis a distancia

M_0 ⇒ No se conocen metástasis a distancia.

M_1 = Presencia de metástasis a distancia.

M_x = No es especificada.

Mediante esta clasificación se pueden establecer una serie de estadios en el cáncer colo-rectal:

ESTADIO 0 = T_{1s} , N:0, M:0.

ESTADIO I

ESTADIO I_A: T_1 , N: 0-X, M: 0

ESTADIO I_B: T_2 , N: 0-X, M: 0

ESTADIO II: T: 3-5, N: 0-X, M: 0

ESTADIO III: Cualquier T, N: 1, M: 0

ESTADIO IV: Cualquier T, cualquier N, M: 1.

CARACTERISTICAS ANATOMOPATOLOGICAS

Los tumores de crecimiento lento tienden de manera especial a rodear el intestino, teniendo un crecimiento en forma de servilletero y produciendo estrechez u obstrucción completa del intestino.

El segmento intestinal proximal a la obstrucción experimenta una gran dilatación, en ocasiones enorme y su pared se vuelve hipertrófica. El aumento de la presión intraluminal puede producir un compromiso de la circulación de la mucosa, pudiendo producirse, en algunos casos, una

enterocolitis isquémica en la zona mas cercana al tumor, presentándose a veces como una formación pseudomembranosa.

En otros casos aparece una franca ulceración, en especial en el ciego, la denominada ulceración estercorácea, que puede producir perforación y peritonitis.

Los cánceres fungosos forman una gran masa que se proyecta y ulcera, produciéndose casi siempre obstrucción. Existe evidencia que el tamaño del tumor no influye en el pronóstico ni en la frecuencia de las metástasis. Además la extensión intramural del tumor a nivel microscópico suele ser menor de 2 cm. y muy infrecuentemente mayor de 4 cm; por esto el margen de colon extirpado desde la línea de resección distal hasta el tumor debe ser de unos 4-5 cm. La invasión linfática regional empeora el pronóstico, pero además el número de gánglios afectados, como ya dijimos.

Otro factor importante es la posible existencia de metástasis ovárica; así hay autores que, en mujeres post-menopausicas, recomiendan ooforectomía bilateral sistemática.

MECANISMOS DE DISEMINACION DEL CANCER DE COLON

Las vias de diseminación del cáncer de colon son:

- Diseminación linfática.- La invasión tumoral de los gánglios linfáticos suele realizarse progresivamente según un orden anatómico ascendente en los gánglios que acompañan a los vasos cólicos. La invasión

caudal ganglionar puede ocurrir si existen gánglios bloqueados. La afectación ganglionar suele presentarse en el 50% de los casos en el momento de la operación.

- Diseminación sanguínea.- La invasión microscópica de los vasos sanguíneos en la pared colónica por el tumor, tiene un mal pronóstico y se correlaciona bien con la invasión linfática. El drenaje venoso del colon derecho e izquierdo se realiza por vía portal, por lo cual el hígado es un órgano muy frecuente de metástasis.

- Diseminación por contigüidad directa a otros órganos.- Esta forma de diseminación es relativamente frecuente y puede provocar fístulas del tumor con órganos vecinos como: asas intestinales, vejiga, vagina, etc. Esta forma de diseminación puede hacer que el tumor sea irreseccable y empeora notablemente el pronóstico del mismo.

- Siembra peritoneal.- En ocasiones, hay una siembra múltiple de nódulos tumorales por todo el peritoneo, que hace que el tumor sea incurable, apareciendo frecuentemente ascitis.

- Diseminación a través de la luz intestinal.- Mediante la implantación de células tumorales en otras zonas del intestino.

METASTASIS EN EL CANCER COLO-RECTAL

En primer lugar hay que decir que las metastasis locales o a distancia unicas, son infrecuentes en comparación con la enfermedad generalizada.

Los tumores del colon derecho tienen metástasis locales y a distancia en el 90% de los pacientes y metástasis a distancia solamente en el 10% de los casos.

Welch, J.P. et al, 1979, han recogido su experiencia y la de otros autores en enfermos con cáncer de colon y recto a los que se les había practicado la autopsia. Las localizaciones más frecuentes de metástasis fueron: hígado (40-80%), ganglios linfáticos (30-60%), pelvis (25-38%), peritoneo (20-35%), suprarrenales (5-20%), hueso, tiroides, páncreas y ovario (3-18%) y cerebro (1-8%)

DIAGNOSTICO

En cuanto al diagnóstico clínico, la historia clínica puede ser sugestiva o no del proceso. En el primer caso hay dos síntomas capitales que deben hacer pensar en el cáncer de colon: cualquier cambio en los hábitos intestinales de toda persona mayor de cuarenta años, mantenido durante cierto tiempo y no explicable por otras causas y la expulsión de sangre y moco por el recto. Además existen una serie de síntomas y otra serie de trastornos dispépticos nada orientativos, pero que si se presentan en una edad media o avanzada de la vida y especialmente si se acompañan de anemia y afectación

general debe plantearse la posibilidad de este diagnóstico, dada la elevada incidencia de este proceso.

La exploración física de estos pacientes, tanto general como abdominal, puede ser normal o patológica, dependiendo del estadio evolutivo y su grado de malignidad histológica. A veces, pacientes sintomáticos mucho tiempo presentan una exploración anodina, en tanto que otros con una historia corta presentan deterioro general importante y signos clínicos de propagación carcinomatosa ganglionar, hepática o peritoneal. La palpación de una masa abdominal suele presentarse en las neoplasias de colon derecho, ya que alcanzan un mayor tamaño. Mayores problemas presenta la palpación de los tumores del colon izquierdo, ya que son acintados y pueden confundirse con una cuerda cólica, así mismo la palpación de una masa a ese nivel puede sólo corresponder a acúmulos de escibalos por encima del tumor.

Toda exploración cuidadosa de cualquier paciente debe incluir el tacto rectal; con más razón aquí, siendo una exploración obligada en estos enfermos. Hay que tener en cuenta que el 75% de los cánceres rectales o sea, el 35% de todos los cánceres colo-rectales se encuentran al alcance del dedo explorador.

Además nos servirá para determinar el grado de posible invasión y fijación de los órganos. Es también importante la evaluación del estado cardio-vascular, respiratorio, renal y neurológico para la posible intervención, dado que son enfermos con una edad avanzada, la mayoría de las veces.

DIAGNOSTICO INMUNOLOGICO: MARCADORES TUMORALES

Uno de los intentos más ambiciosos de los últimos 15 años, ha sido el de diagnosticar neoplasias de los distintos órganos por medio de la detección de antígenos oncofetales que pudieran ser específicos de cada órgano. Estos marcadores inmunológicos estarían ligados a la síntesis y secreción aumentadas de proteínas fetales por el tejido neoplásico, estando en cambio inhibida en el tejido adulto normal.

Una de estas sustancias sería el ANTIGENO CARCINO EMBRIONARIO (CEA) que fue descubierto por Gold y Freedman en 1965, en tejido canceroso de colon humano y estudios clínicos iniciales, sugirieron que la valoración cuantitativa del CEA por métodos de radio-inmuno-ensayo o inmuno-enzimático, podría tener la especificidad y sensibilidad suficiente para el diagnóstico e incluso la determinación precoz de este tipo de tumor.

Estos marcadores tumorales, que determinados mediante tests simples, permiten revelar la presencia de cáncer mucho antes que lo hagan los signos clínicos de la enfermedad; pueden ser de dos tipos:

- Producidos por la célula o el estroma tumoral
- Producidos por otros tejidos en respuesta a la presencia del tumor.

Un marcador tumoral ideal tendría que tener las siguientes condiciones:

- Ser distinto de un órgano o tejido, o de la presencia de un tumor concreto.

- Circular en la sangre en niveles más altos, solo en pacientes con cáncer.
- Que su título refleje la actividad de la enfermedad.

Así desde un punto de vista teórico, al menos, las determinaciones seriadas de un marcador que reúna estas condiciones, deben ser útiles para establecer un sistema de monitorización bioquímica de la enfermedad que permita:

- Establecer un pronóstico.
- Determinar la totalidad o no, de la resección quirúrgica.
- Detectar una recidiva.
- Monitorizar el tratamiento adyuvante.

Si hacemos un repaso a la lista de los antígenos más importantes que se describieron relacionados de alguna manera con el cáncer colo-rectal y analizamos cual ha sido su utilidad, vemos que la experiencia de los inmunógenos es que la especificidad del antígeno, disminuye a medida que aumentamos la sensibilidad del test de detección y hasta ahora, excepto el CEA, ninguno de los demás antígenos ha mostrado ser lo suficientemente eficaz como para ser utilizado como control de una monitorización clínica. Recientemente se especula con otros dos antígenos onco fetales: el Tennessee y el TPA, sin embargo el primero aún no está comercializado y el segundo no ha sido ensayado suficientemente. El marcador más estudiado en la actualidad es el CEA, el cual es una glico proteína de membrana periférica, no una proteína de membrana integral, localizada en el glicocalix y que es liberada

muy fácilmente en los fluidos tisulares vecinos y en la circulación, donde puede determinarse por radio-inmuno-ensayo.

Es, por lo tanto, una sustancia indígena de la célula tumoral y su caída a niveles indetectables a los pocos días de ser extirpado el tumor productor de CEA, sugiere que su catabolismo es rápido, siendo el hígado, quizás, el lugar más importante de este proceso.

Analizando los hechos más importantes relacionados con este antígeno y el cáncer colo-rectal vemos que:

- El CEA está elevado en alrededor del 70-80% de todos los pacientes con carcinoma colo-rectal (Lagarriga, D. et al, 1982). Estando relacionado este hecho con la extensión de la enfermedad, así: un valor marcadamente elevado, está frecuentemente asociado a metástasis, sobre todo en el hígado,

- Se sabe que valores preoperatorios altos de CEA están asociados con un mayor riesgo de recidiva en pacientes a los que aparentemente se les realizó una resección curativa.

- Otra cuestión es, si los tumores con un título alto de CEA son histológicamente diferentes de los que tienen un título bajo. En general puede afirmarse, que los valores del CEA se correlacionan más con la profundidad de la penetración de la enfermedad que con el grado de diferenciación, aunque parece ser que los tumores coloides muestran tendencia a tener valores de CEA inferiores al resto.

- Parece seguro que no existe correlación entre el CEA y el sexo, la edad, el tiempo transcurrido hasta el diagnóstico, el aspecto macroscópico del tumor, las inmunoglobulinas y el número de linfocitos en sangre periférica. En relación con esto, todavía no se ha comprobado que el CEA sea inmunógeno en humanos, sin embargo se ha comprobado que existen receptores linfocitarios para el CEA y que existe, al menos, uno de los factores con actividad inmunosupresora en el suero de los pacientes con carcinomas colo-rectales avanzados, pudiéndose especular que interfiere con un receptor antígeno de las células T (González Calvin, et al, 1982).

En cuanto a la utilidad de la determinación seriada del CEA para utilizarlo como control de la enfermedad, se ha demostrado que una caída incompleta de sus valores, tras la resección, significa un mal pronóstico.

Así se puede afirmar, que una elevación rápida y con valores altos en el post-operatorio proporciona una certeza de recidiva metastásica superior al 90%, pero solo una tercera parte de los enfermos que se reoperan por un nivel alto de CEA, tienen tumor reseccable. Además tiene un valor relativo en la detección de la recidiva local, ya que solo un 50% de los pacientes que la presentan, tienen títulos elevados, siendo este grupo de pacientes los que más se beneficiarían de un diagnóstico precoz.

Respecto al mejor método de seguimiento en enfermos operados de cáncer colo-rectal, en cuanto al tiempo de las determinaciones del CEA, el más idóneo parece ser:

- Mensual: durante los dos primeros años.

- Cada dos meses: en los tres años siguientes.
- Cada seis meses: en los dos años siguientes.
- Una vez al año: indefinidamente.

Pero esto sería excesivamente costoso en tiempo y dinero para ser realizado en forma indiscriminada, en todos los pacientes intervenidos de carcinoma colo-rectal; por ello hay que limitarlo a los pacientes con mayores probabilidades de recidiva.

La radio-inmunodetección de los focos tumorales con anticuerpo anti-CEA es una técnica que puede tener un gran valor, aunque se necesitan estudios más amplios para establecer definitivamente su utilidad. En este sentido están las investigaciones de Kim, 1980, Koprowski, 1981 y Chatal, 1983, con respecto a la utilización de anticuerpos monoclonales para la detección escintigráfica de cánceres colo-rectales humanos.

Utilizando dos anticuerpos monoclonales: el 17-1A y el 19-9 específicos de cánceres gástro intestinales que son marcados con yodo 131. Con los dos anticuerpos se han obtenido imágenes escintigráficas, siendo las más contrastadas las que se obtuvieron 4 ó 5 días después de la inyección. El estudio mediante esta técnica resultó positivo en el 60% de 27 cánceres colo-rectales demostrados por colonoscopia. Además en un caso, solo la escintigrafía pudo demostrar la existencia de una recurrencia de un cáncer rectal.

Este interés clínico debe ser demostrado por estudios posteriores y los aportados por otras técnicas; para que en un futuro, la escintigrafía pueda ser incluida en la rutina clínica.

Antes hemos mencionado a un grupo de marcadores tumorales producidos por el huésped en respuesta a la presencia del tumor. Este es el caso de las "proteínas reactantes de fase aguda" (P.R.F.A.) que Synder y Ashwell, a principios de los 60, demostraron que se encontraban elevadas en pacientes con cáncer; después han sido muchos los estudios que han confirmado este hecho.

Las P.R.F.A. (transferrina, alfa-1-glicoproteína ácida y alfa-1-antitripsina) son sintetizadas por el hígado y cambian sus niveles en respuesta al trauma: infecciones agudas y crónicas, enfermedades degenerativas y cáncer. Consideradas individualmente, como mediciones esporádicas, no tienen valor diagnóstico ni pronóstico, dado el carácter inespecífico de la respuesta. Sin embargo cuando se determinan varias simultáneamente y se examina su perfil, los patrones de respuesta tienden a compensar esa falta de especificidad.

En amplios estudios realizados sobre las alfa-1 y alfa-2 globulinas en varias fases de la evolución de cáncer colo-rectal, se llegó a la conclusión que los niveles medios totales de las globulinas estaban elevadas en todos los grupos, pero las máximas alteraciones se presentaron en los pacientes con mayor diseminación y especialmente si esta afectaba al hígado.

Existen también otras proteínas, como la alfa-1 glicoproteína ácida, la alfa-1 antitripsina y la transferrina, que también se alteran en pacientes con carcinoma colo-rectal, estando así mismo relacionadas con la invasión del tumor, el grado de alteración de sus niveles.

Otros posibles marcadores tumorales son los enzimas, ya que estos son un fiel reflejo del metabolismo del organismo. En un paciente con cáncer, cabe pensar que el tejido tumoral, al igual que el tejido normal, están contribuyendo al "pool" de enzimas plasmáticos, por lo que sería de gran importancia el distinguir los isoenzimas plasmáticos de los que no lo son.

Aunque en el momento actual no existe un patrón enzimático anormal específico de las metástasis hepáticas, en estudios longitudinales, se encontró que, en la evolución de las mismas, generalmente la GGT es la primera que se eleva, seguida de la 5'nucleotidasa, fosfatasa alcalina, láctico deshidrogenasa, leucil aminopeptidasa y las transaminasas (Cárda Abellá, 1982).

En amplios estudios se ha comprobado en fin que, aunque valores normales de estos enzimas, no excluye la existencia de metástasis hepáticas o pulmonares, la alteración franca de uno de ellos o simplemente de más de uno, es claramente sugestivo que pueda existir una enfermedad diseminada. El crecimiento tumoral en otros sitios diferentes al hígado: como el peritoneo, órganos pélvicos o pulmón, lejos de ofrecer un patrón enzimático característico, produce alteraciones menos llamativas que las metástasis hepáticas.

Finalmente se ha tratado de demostrar si la reactividad inmune estaba intrínsecamente relacionada con el riesgo de recidiva. Se ha podido demostrar (Wanebo, J, et al, 1980) que ésta puede estar deprimida, incluso en pacientes en estadio A de Dukes, existiendo una depresión lineal a medida que aumenta el grado de extensión de la enfermedad, pero solo los pacientes con enfermedad avanzada mostraron correlación de la respuesta inmune con la supervivencia.

Así mismo se ha comprobado que los valores de IgA se encuentran disminuidos y los de IgM elevados en algunos pacientes, implicando este hecho un peor pronóstico y quizás es peor si ambas alteraciones se encuentran en un mismo enfermo simultáneamente. De cualquier forma, la relación entre el título de anticuerpos y la inmunovigilancia en los enfermos con cáncer, todavía no ha sido plenamente esclarecida.

Mientras no se disponga de un marcador específico, la forma más apropiada de valorar la extensión y masa tumorales y diferenciar los estadios de evolución, es la aplicación de métodos estadísticos multivariados. Fue Aronsen, 1970, quien sugirió que un análisis discriminante multifactorial basado en la determinación de la GGT, FA, ALAT y bilirrubina, puede alcanzar un diagnóstico correcto de metástasis hepática en el 93% de los casos. Desde entonces se han realizado varios estudios de este tipo, que de una manera casi constante, incluyen el CEA con algunas enzimas plasmáticas; reflejo de la actividad hepática, pulmonar y ósea y algunas de las PRFA, de las que la alfa-

1 antitripsina, la alfa-1 GP ácida y la haptoglobina son posiblemente las de más valor.

Si con estas combinaciones se lograra conocer la presencia de metástasis o la existencia de recidiva loco-regional, supondría un gran paso, ya que como señaló Dukes en 1936 nos permitiría conocer:

- Cual es la forma más adecuada del primer tratamiento.
- Cuales son las probabilidades de recidiva.

De esta manera podríamos:

- Individualizar el tratamiento.
- Diferenciar aquellas personas que probablemente tienen la enfermedad, de las que probablemente no la tienen.
- Establecer la frecuencia de las recidivas de una manera lógica y de acuerdo con un riesgo individual de recidiva.
- Nos permitiría comparar el perfil pre-operatorio con el post-operatorio de un mismo paciente, lo que nos daría la posibilidad de monitorizar a cada paciente de manera individual, estableciendo las bases de una actuación precoz en cada momento.
- Finalmente nos permitiría reducir el número de exploraciones, haciendo uso de todos los medios diagnósticos, cuando algunas de estas señales de alarma bioquímica nos alerte.

Se ha ensayado también el diagnóstico del cáncer coló-rectal, determinando la inhibición de la adherencia leucocitaria. Se encuentra un

aumento del índice de no-adherencia (NAI). Este índice se obtiene mediante la fórmula: $NAI = A-B/B \times 100$.

Donde A es el número de células con falta de adherencia en un cultivo de células con cáncer de colon. B es el cultivo de células control obtenidas de cáncer de pulmón.

Se demuestra un aumento del índice de no-adherencia en los casos de adenomas colónicos, pero aún más en el caso de cáncer de colon.

DIAGNOSTICO PRECOZ

Las técnicas más empleadas para la detección de neoplasia de colon de una manera precoz, deben tener una serie de características para que su empleo sea rentable desde el punto de vista clínico: ser de aplicación sencilla, barato, con la menor cantidad de falsos negativos como positivos y aplicarlo a enfermos considerados como de "riesgo".

10. Detección de sangre oculta en heces.-

Puede determinarse mediante métodos cualitativos y cuantitativos:

a.- Cuantitativos.- Se realiza mediante hematies marcados con Cr-51. Se inyecta por vía IV al paciente y posteriormente se determina la radioactividad en las heces. Es una prueba muy sensible, pero engorrosa y utilizable sólo en centros especiales, no como Screening en grandes masas de población.

b.- Cualitativos.- Se basan en la reacción de per-oxidación; el peróxido de hidrógeno o de bario, en presencia de peroxidasa hemoglobínica, mioglobini-

ca o vegetal libera O_2 , que induce un cambio en la coloración (azul) en presencia de reactivos tipo bencidina, orto-toluidina o guayacos (Hemocult, fecal-test...).

Los reactivos difieren en su sensibilidad, de modo que la toluidina es 10 a 1000 veces más sensible que el guayaco. El exceso de sensibilidad ha inducido muchos falsos positivos, por lo que en la actualidad se utiliza el test del guayaco modificado, con una sensibilidad adecuada.

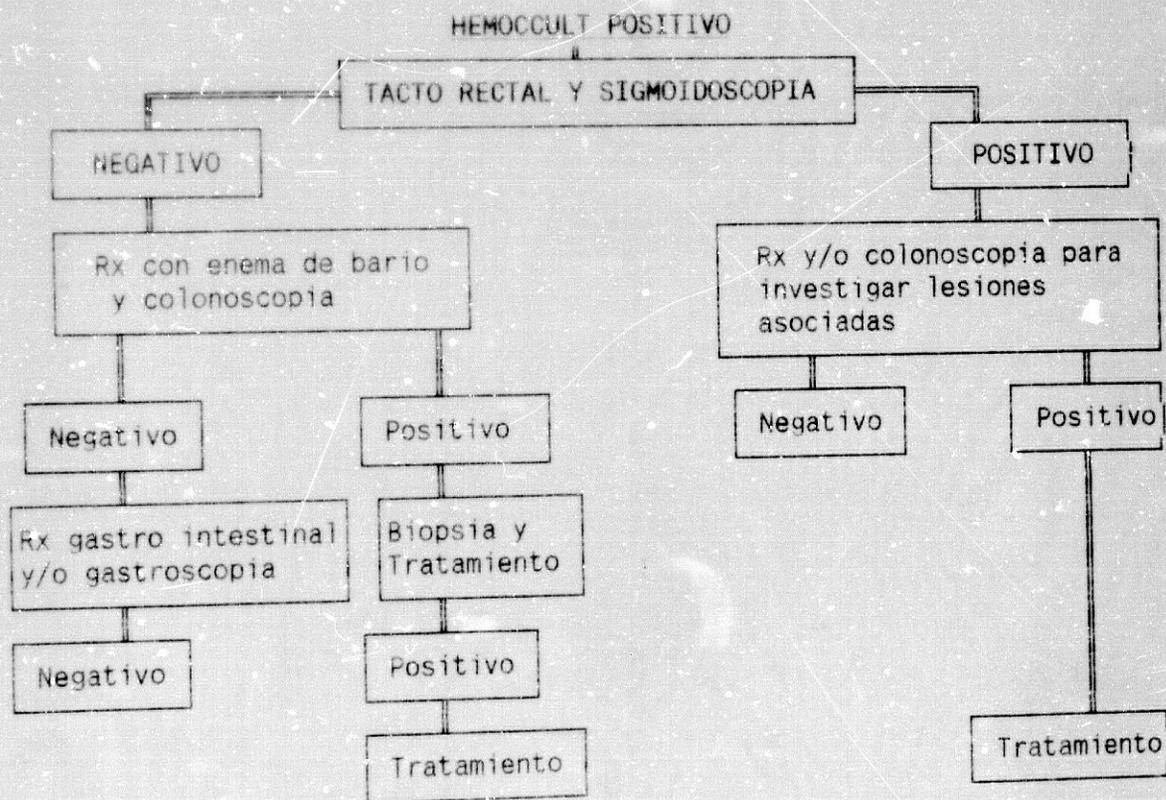
Los falsos positivos son inferiores al 10% y suelen deberse a lesiones fuera del colon, por lo que excluida la lesión colónica, deben investigarse tramos digestivos altos, en busca de lesiones potencialmente sangrantes. Se han comunicado falsos negativos en proporciones variables (8-20%) (De Teresa, 1984); que podrían explicarse por la insensibilidad del test o por que la lesiones no eran sangrantes.

No obstante, casi todas las lesiones se situaban en el recto y cabe pensar que las heces tuviesen poco contacto con el área sangrante. Por ello, algunos autores propugnan complementar el hemocult con el tacto rectal sistemático.

En un estudio de Hardcastle, J.D., 1983, en un total de 20.525 pacientes de los que se completaron el análisis 3.613, se observó un resultado positivo en 77 individuos, el 50% de los cuales eran portadores de enfermedad neoplásica: 12 tenían carcinomas invasivos (9 en estadio A de Dukes, 2 en el estadio B y 1 en el C) y 27 presentaban adenomas.

Si se realiza el test correctamente y las poblaciones de alto riesgo con chequeadas dos veces al año, se consigue una rentabilidad del 90% en la detección del cáncer de colon y de un 60% en los pólipos benignos sangrantes.

La conducta a seguir ante un resultado positivo del test se recoge en el esquema siguiente.



29. Rectosigmoidoscopia.

Aproximadamente el 55% de los enfermos con cáncer de colon aparece dentro de los 25 cm. que abarca el sigmoidoscopio clásico. La falta de aceptación por parte de la población general de este método¹ de despistaje

limita su uso. La sigmoidoscopia fibroptica tiene un gran potencial de futuro, siendo más aceptada por el paciente y siendo un método más eficaz en cuanto al alcance del mismo. Sobre todo se ha demostrado eficaz en el seguimiento de adenomas y pacientes con enfermedades inflamatorias del intestino. Además permite lavado para citología y un gran número de biopsias para determinar la existencia de Displasia.

39. Enema de Bario.

Puede poseer gran valor en grupos de enfermos de alto riesgo, cuando se realiza conjuntamente con la colonoscopia, siendo sobre todo útil en las neoplasias del colon ascendente en aquellos pacientes en los que no se ha podido visualizar con el colonoscopio.

40. Colonoscopia.

Los pacientes con un riesgo alto, no pueden ser considerados completamente estudiados hasta que no hayan sido explorados con el colonoscopia largo. Esta técnica es también útil para el seguimiento de los enfermos, vigilancia de las anastomosis, mediante biopsias y cepillado, de los pacientes con una resección reciente por cáncer.

59. Citología del Colon.

Es sobre todo útil como técnica que aumenta la eficacia de la colonoscopia. Se suele preferir los frotis realizados con raspado, a los de lavado.

69. Biopsia.

Se puede utilizar para la detección de una posible displasia en pacientes con colitis ulcerosa. Tiene además utilidad para la determinación de la naturaleza histológica de las lesiones sospechosas. Pólipos que parecen benignos deberían ser sometidos a excisión en vez de ser biopsiados, ya que las biopsias son a veces desconcertantes y pasarse por alto lesiones que en apariencia no son invasivas.

70. Marcadores tumorales.

Como ya hemos indicado, la búsqueda de un marcador idóneo para el diagnóstico del cáncer de colon ha sido decepcionante hasta ahora. Por lo tanto se puede concluir que el CEA no sirve como método de Screening para el diagnóstico precoz del cáncer de colon.

Se pueden distinguir varios grupos de pacientes en cuanto a la posible actuación encaminada al diagnóstico precoz:

A. Pacientes sintomáticos.-

En estos casos hay que utilizar todas las técnicas a nuestro alcance para llegar a un diagnóstico preciso, incluyendo: sigmoidoscopia, enema de bario con contraste de aire y la colonoscopia con biopsia y citología.

B. Pacientes asintomáticos con riesgo estándar.-

Un examen anual para el descubrimiento de sangre oculta en heces, tras una dieta adecuada, unido a una sigmoidoscopia cada 3 ó 5 años puede dar

los mejores resultados a menor costo, para un despistaje selectivo en esta población.

C. Pacientes asintomáticos con alto riesgo.

Incluye aquellos con una enfermedad de base, tal como la colitis ulcerosa de larga evolución o poliposis familiar, pacientes con una historia familiar de cáncer de colon, etc. En general todos estos pacientes deben ser examinados con el colonoscopio anualmente, además de exámenes periódicos con enema de bario, lavados para citología e incluso biopsia en el caso de que alguna lesión nos haga dudar de su benignidad. En los pacientes con poliposis familiar se debe hacer cirugía lo antes posible, ya que en este caso particular, debido a su gran malignidad, es la actitud más sensata.

TRATAMIENTO

TRATAMIENTO QUIRURGICO

El tratamiento quirúrgico constituye la única posibilidad de curación en los enfermos que padecen un carcinoma colo-rectal. El éxito de la intervención ha ido en aumento coincidiendo con una mejor preparación colónica y la selección adecuada de la técnica operatoria. Las mejores técnicas instrumentales, el mejor conocimiento de las lesiones pre-malignas y el uso de cuidados multidisciplinarios en el tratamiento, abren un futuro esperanzador para el incremento de las curaciones.

Los principios generales para el tratamiento quirúrgico electivo son:

1. La supervivencia está directamente relacionada con el estadio de la enfermedad en el momento de la intervención.
2. La diseminación a los linfáticos mesentéricos o mesocólicos adyacentes se corresponde regionalmente con los troncos arteriales del segmento intestinal afectado, por lo que la resección curativa incluirá tales vías de diseminación regional y la longitud de intestino correspondiente a la linfadenectomía y ligadura vascular realizadas.
3. Otros factores de indudable influencia en la supervivencia a largo plazo sólo pueden ser apreciados en la pieza operatoria y no clínicamente.
4. En la elección de la técnica adecuada se debe tener en cuenta la existencia de lesiones pre-malignas.
5. La tasa de resecabilidad está, según las diferentes estadísticas, entre un 80-90% (López Bejarano, 1982).

Las principales intervenciones que normalmente se realizan según las distintas localizaciones del cáncer en el colon o recto son:

A.- Hemicolectomía derecha. Para tumores situados en el ciego y colon ascendente.

B.- Hemicolectomía derecha ampliada a colon transverso para tumores situados en el ángulo hepático del colon o en el tercio derecho del colon transverso.

C.- Hemicolectomía izquierda amplia para un tumor situado en ángulo esplénico del colon.

D.- Sigmoidectomía (Hemicolectomía izquierda). Tumor situado en sigma.

E.- Hemicolectomía izquierda amplia para un tumor situado en colon descendente. Incluye unión recto-sigmoidea y tercio izquierdo del colon transversal.

F.- Resección anterior de recto para tumores situados en tercio superior y medio de recto.

G.- Amputación abdominoperineal para tumores situados en ano y tercio inferior de recto.

H.- Colectomía Total. La colectomía total simple o ampliada al recto está indicada, sobre todo, en tres situaciones:

- Cáncer multitópico.
- Cáncer con una poliposis recto-cólica.
- Colitis ulcerosa.

Ultimamente se aconseja la colectomía total profiláctica en los casos de poliposis familiar, aún sin la asociación de cáncer, dada la frecuencia de malignización de dicha enfermedad.

TRATAMIENTO ADYUVANTE DE LA CIRUGIA

Cuando se habla de tratamiento adyuvante a la cirugía en el cáncer de colon, sólo podemos considerar dos métodos: la radioterapia y la quimioterapia.

La radioterapia ha sido utilizada con la esperanza de que fuera tan eficaz como en otros tipos de tumores, como el tumor de Wilms, rabdomiosarcoma infantil, tumores óseos, cáncer de mama, etc.

Manejando cifras aproximadas, tenemos que con cirugía sola, curamos el 50% de los pacientes, de este 50% que no quedan curados, 30% van a hacer una recidiva y 20% una metástasis a distancia.

Con la radioterapia no vamos a mejorar al 50% que cura con cirugía, ni al 20% que presentan metástasis a distancia: quedan sólo el 30% de pacientes que podrán mejorar gracias a la radioterapia.

La mayoría de tratados con radioterapia se encuentran en los estadios B y C principalmente.

Existe discusión sobre el momento más indicado para someter al paciente a tratamiento radioterápico. Algunos autores prefieren el pre-operatorio para realizarlo; otros proponen hacerlo durante el post-operatorio.

Las razones para uno u otro método serían:

- Radioterapia pre-operatoria:

- * Mejor eficacia radio-biológica.
- * Reducción del volumen tumoral.
- * Aumento de la resecabilidad.

- Radioterapia post-operatoria:

* Permite una mejor selección de los casos, dado que pueden utilizarse criterios patológicos para decidir si la radioterapia está indicada o no.

* Es aplicable en el colon extraperitoneal y en el recto.

* Desde el punto de vista del radioterapeuta, existe una mejor definición del campo de radiación.

* Permite excluir aquellos pacientes que presentan metástasis hepáticas y aquellos que no muestran propagación a través de la pared intestinal y tienen ganglios normales.

Es importante tener en cuenta varios hechos en el tratamiento radioterápico, ya que si los resultados de las diferentes series parecen distar mucho entre sí, no varían tanto si nos atenemos a los resultados biológicos. Así no sólo es importante el factor dosis, sino también el tiempo que se administra dicha dosis; otro además, sería el volumen de la zona irradiada, sobre el cual existe un principio: a grandes volúmenes pequeñas dosis de radiación y viceversa.

En la historia del tratamiento radioterápico, primero se empezó tratando los casos de extensos cánceres inoperables, haciendo que, en algunos casos, se hicieran operables cánceres que no lo eran.

La radiación preoperatoria se intentó después aplicar como medida adyuvante a la cirugía. Así en las primeras series se administraron dosis de radiación moderadas (2.000 a 2.500 rads) como en la realizada por la Veterans Administration que efectuó un estudio entre muchos centros hospitalarios. En un principio se demostró un aumento de la supervivencia a los cinco años y una disminución de la tasa de fracasos locales.

Estas esperanzas se vieron después frustradas por sucesivos estudios. Se comunicaron buenos resultados por primera vez cuando en la Universidad de Oregon se aplicaron unas dosis de radiación energética de 5.000 a 6.000 rads preoperatoriamente. Se vio que reducía considerablemente las tasas de fracasos locales, sugiriéndose que era capaz de reducir la implantación de células tumorales viables.

Sin embargo, para que el tratamiento produjera un efecto máximo, era preciso instaurar un plazo de espera de un mes a seis semanas antes de realizar el tratamiento quirúrgico. Esto constituía un peligro de aparición de metástasis hepáticas imprevistas. Aparte, la irradiación preoperatoria hacía peligrosa la anastomosis por la deficiente cicatrización de la misma.

Una de las razones que se expone para recomendar la radioterapia post-operatoria, consiste en que se puede realizar un detenido examen de la

pieza extraída por el cirujano. Se sabe que los pacientes sujetos a mayor riesgo son aquellos que presentan metástasis ganglionares o una perforación en la pared cólica.

En estudios realizados en la Veterans Administration la recidivas locales oscilaban entre el 15 y el 45% en función del estudio microscópico:

	Recidiva Local
-T ₃ (Microscópico) NO	15%
-T ₃ (Macroscópico) NO	29%
-T ₃ (Microscópico) N-1	20%
-T ₃ (Macroscópico) N-1	45%

T₃ = Invasión de la pared.

NO = Ausencia de metástasis ganglionares.

N-1 = Presencia de metástasis ganglionares.

Se puede establecer entonces estas posibilidades de recidivas y el estado general del paciente, para establecer un posible tratamiento radioterápico.

Otra de las ventajas de la radioterapia pre-operatoria es que se le puede proporcionar un campo más apropiado al radioterapeuta en el caso que el tumor se encuentre alojado en la pelvis; manteniendo el intestino delgado en una porción alta mediante el empleo de una bolsa de Mickulicz grande, que se retira a los pocos días, una vez que el intestino se adhiera a un nivel

alto. Esto es importante, ya que el intestino delgado no puede resistir la cantidad de radiación que resiste el recto u otros segmentos del colon o la vejiga urinaria.

Una ventaja teórica de la radioterapia pre-operatoria es la posibilidad de reducir la implantación de células neoplásicas viables en el campo operatorio. No obstante, aún no se ha podido establecer la dosis necesaria para eliminar este riesgo.

En base a este último hecho, muchos autores utilizan dosis de radiación moderada para conseguir este fin.

Se ha investigado así la combinación de técnicas pre y post-operatorias con el nombre de técnicas "Sandwich". Esta consiste en la aplicación de una dosis de 500 rads una o dos veces antes de la intervención. A continuación se le aplica radiación post-operatoria dependiendo de las características de la pieza, como ya se ha expuesto.

Existe una forma de radioterapia que está aún en estado experimental: la Radioterapia Intraoperatoria. Si bien podría emplearse con grandes beneficios, al menos potencialmente, existen problemas logísticos considerables. Se ha empleado esta técnica en el tratamiento del cáncer redivante. Se realiza mediante un cono que se sitúa directamente sobre el lecho tumoral. No existen resultados a largo plazo con este sistema, aunque probablemente no serán muy favorables dado que se aplica a pacientes con cáncer recto-cólico avanzado.

En cuanto a la quimioterapia, los resultados hasta ahora no son nada alentadores. A la hora de revisar la literatura, hay que tener en cuenta que la gran mayoría de los estudios no están randomizados y por lo tanto no existía un grupo control. Sólo se utilizaron controles históricos, cuya interpretación es altamente subjetiva y puede inducir a error.

El primer estudio debidamente randomizado y estratificado fue realizado por el Grupo Oncológico y Quirúrgico de la Veterans Administration, utilizando Floxuridina, el cual fue administrado en el momento de la intervención quirúrgica y en el post-operatorio en un grupo de 548 enfermos, no demostrándose eficaz para aumentar la supervivencia a los cinco años.

Después se ha ensayado el Fluoracilo (F.U.) en dosis mielosupresivas en los estadios C de Dukes, no siendo tampoco significativo el beneficio y con un aumento notable de la toxicidad.

También se ha ensayado la asociación de BCG al F.U., demostrándose un aumento de la supervivencia, pero en estos estudios solo se utilizaron controles históricos.

Se han publicado estudios randomizados en los que se compara la combinación de 5-F.U., ciclofosfamida y metotrexate con una combinación similar (F.C.-C.C.N.U.) en la cual C.C.N.U. es reemplazado por metotrexate.

Se hizo sobre 54 pacientes con carcinoma metastásico de colon. La toxicidad resultó similar en ambos grupos. La respuesta parcial también fue similar, ya que respuesta total no se encontró. Comparando estos resultados con la administración de asociaciones con 5-F.U., no resultan mejores que los resultados obtenidos con la administración de 5-F.U. sólo. Este fármaco ha resultado también eficaz en la prevención de la adenomatosis y carcinogénesis en animales expuestos a la acción de un cancerígeno.

Se ha empleado D.T.I.C. más Mitomicina C (en enfermos que habían fracasado con F.U.) habiéndose obtenido unos resultados muy buenos y con un índice de respuestas del 50% de las que en un 19% eran respuestas completas.

Hay que esperar la confirmación de estos resultados con estudios más amplios y a largo plazo.

Se ha estudiado el efecto del Interferon como posible tratamiento del cáncer colo-rectal.

En un trabajo de Market, 1984, se emplea Interferon parcialmente purificado, en ratas con tumor colónico inducido por 1,2 dimetil-hidracina. Esta sustancia produce en el colon ascendente un adenocarcinoma moderadamente diferenciado después de 6 semanas de administración de la misma.

Se produce una significativa reducción del crecimiento tumoral, así como un retardo en el desarrollo de metástasis pulmonares artificialmente inducidas por la inyección intravenosa de 5×10^5 células tumorales colónicas.

En otro estudio, Einhorn, 1984, utiliza sobre 18 pacientes con cáncer colo-rectal diseminado, el alfa-2 interferon. Administrándolo de manera continuada o intermitente; estudia los diferentes parámetros inmunológicos de la sangre: linfocitos, células K, proporción de linfocitos T, etc.

En general se encuentran elevaciones de estos parámetros y aunque es pronto para establecer conclusiones, parece ser que el Interferon es un regulador de la función inmunológica que pudiera tener su sitio en el tratamiento de las neoplasias.

QUIMIOTERAPIA INTRA-ARTERIAL DEL CANCER DE COLON

Las metástasis hepáticas se presentan en más del 50% de los pacientes con cáncer colónico y por ello se pensó que una buena modalidad de tratamiento sería la administración de agentes quimioterápicos via arteria hepática, ya que se ha demostrado en animales, que la mayor parte de las metástasis se nutren de ella.

Por otra parte el F.U. se metaboliza en el hígado, dando lugar a metabolitos mucho menos tóxicos, por lo que se puede administrar a dosis mayores que por via sistémica.

El grupo COG randomiza a los enfermos en dos grupos: uno recibiría F.U. intraarterial y otro F.U. intravenosa. En el primer grupo obtuvo un 34%

de respuestas y en el segundo un 23%, pero sin embargo, la duración de la respuesta fue la misma para las dos ramas del tratamiento.

Otros grupos de investigación han utilizado una combinación de F.U.D.R. y Mitomicina C, obteniendo un 83% de respuestas, pero estos resultados no estaban randomizados ni existía un grupo control.

Por lo tanto, puede concluirse que la quimioterapia intraarterial en los enfermos de cáncer colónico avanzado con metástasis hepáticas es una buena vía para investigación clínica, que necesitará estudios posteriores para su posible utilización rutinaria.

SEGUIMIENTO DEL OPERADO

Los objetivos perseguidos con una vigilancia post-operatoria del paciente serían:

- En principio, se trataría de hacer un diagnóstico precoz de la recidiva loco-regional, porque sabemos que los que se encuentran en esta situación podrían ser controlados por la cirugía o la irradiación.

- Diagnóstico de cáncer metacrónico. Ya que existen estudios que encuentran otro cáncer de colon en los pacientes operados, en porcentajes variables (5-30%).

Primero hay que considerar el estadio en el que se encontró el tumor, ya que unos estadios presentan mayor tendencia a recurrir.

Para los estadios A y B de Dukes se efectúan una serie de exploraciones encaminadas de detectar la recidiva regional o la metástasis, pero quizás sea más importante efectuar estudios encaminados a detectar el cáncer metacrónico, para lo cual se realizan enemas de doble contraste y fibrocolonoscopia, realizando polipectomías si es necesario.

En los estadios B₂, C₁ y C₂ de Dukes, en los cuales las posibilidades de recidiva y metástasis son más elevadas, estas exploraciones serían las mismas, pero realizadas con más frecuencia.

A continuación se explican las técnicas de seguimiento aconsejadas para cada estadio evolutivo:

Estadios A y B₁:

Cada 6 meses durante los cinco primeros años:

- Exploración física completa.
- Exploración ginecológica.
- Tacto rectal.
- Cuidados del ano contra natura y morbilidad de la operación.
- Radiografía de torax. Ap y L.
- Hematología y bioquímica estándar.

Durante el primer año y cada dos años después:

- Enema opaco de doble contraste y fibrocolonoscopia.

Estadios B₂, C₁ y C₂:

Cada cuatro meses los tres primeros años y cada seis meses hasta

el quinto año:

- Exploración física completa.
- Exploración ginecológica.
- Tacto rectal.
- Cuidados del ano contra natura y morbilidad de la operación.
- Radiografía de torax Ap y L.
- Hematología y bioquímica estándar.

Durante el primer año y cada dos años después:

- Enema opaco de doble contraste y fibrocolonoscopia.

ENZIMAS PROTEOLITICOS

Los enzimas proteolíticos son enzimas que catalizan la hidrólisis de los enlaces peptídicos. El término es básicamente sinónimo a los de "proteasas", "proteinasas" y "peptidasas", si bien este último se refiere preferentemente a aquellos enzimas que utilizan péptidos como sustrato, mientras que los sustratos de los primeros son proteínas de mayor peso molecular. Las "proteasas" se han dividido tradicionalmente en: "endopeptidasas" y "exopeptidasas". Las endopeptidasas hidrolizan enlaces peptídicos distantes de los terminales amino y carboxilo de la cadena polipeptídica, mientras que las exopeptidasas rompen enlaces cercanos (1 ó 2 residuos) a los aminoácidos terminales.

Esta división de las proteasas en exopeptidasas y endopeptidasas sigue siendo todavía útil, aunque hoy se reconoce que de alguna manera, esta división representa una pobre simplificación del problema, ya que recientemente se ha observado que muchas exopeptidasas tienen también una ligera actividad endopeptidasa. La observación de este fenómeno planteó la cuestión si podría tratarse de una contaminación de la exopeptidasa con una endopeptidasa, sin embargo cuidadosos experimentos han excluido virtualmente esta posibilidad.

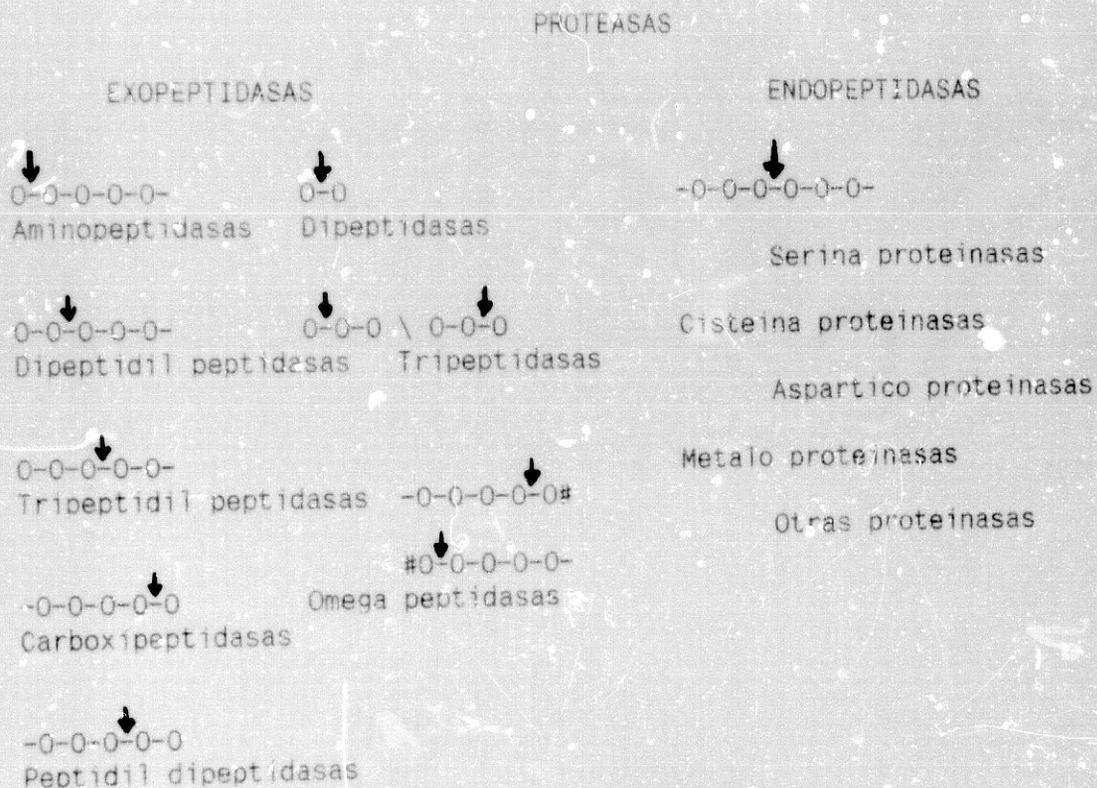
La nomenclatura de las proteasas plantea además diversos problemas de sistematización entre los que se incluyen:

- La especificidad de la mayoría de estas enzimas es demasiado compleja para que pueda constituir la base de un sistema de denominación.
- Los términos claves usados para designarlos tienen diferentes significados para diferentes autores, así el término "catepsina" ha tenido diferentes significados a lo largo del tiempo y no constituyen en la actualidad un grupo definido de enzimas proteolíticos con características comunes.
- Determinados enzimas, tales como las aminopeptidasas resultan de difícil clasificación dada la ambivalencia de su capacidad funcional.
- Muchos de estos enzimas han sido nombrados y catalogados en función de criterios diferentes, tales como el substrato artificial utilizado para su determinación, su capacidad de afectación por determinados inhibidores o la naturaleza de su grupo catalítico artificial.

CLASIFICACION DE LAS EXOPEPTIDASAS

Durante mucho tiempo la clasificación de las exopeptidasas no se ha clarificado, siendo esto reflejo, en alto grado de la visión cambiante e incompleta en relación a la identidad y especificidad de las exopeptidasas. Sin embargo, en los últimos años se ha incrementado ostensiblemente el conocimiento sobre este grupo diverso de proteasas; lo que ha sentado una base sobre la cual realizar una clasificación y nomenclatura basada en un conocimiento más preciso y completo de las propiedades y especificidades de las exopeptidasas.

En este trabajo usaremos la clasificación realizada por Mac Donald and Barret (1986):



En contraste con las endopeptidasas, que se clasifican de acuerdo con su mecanismo catalítico (serina, cisteina, aspártico y metaloproteasas), las exopeptidasas se clasifican de acuerdo con su especificidad de sustrato, recibiendo un nombre trivial que indica el sitio de ataque y el tamaño del fragmento liberado.

Las distintas clases de exopeptidasas incluyen:

1. (Aminoacil) Aminopeptidasas (alfa-aminoacil péptido hidrolasas, EC 3.4.11)
2. Dipeptidil peptidasas (Dipeptidil peptidohidrolasas, EC 3.4.14)

3. Tripeptidil peptidasas (Tripeptidil peptidohidrolasas EC 3.4.-)
4. Carboxipeptidasas (Peptidil aminoacidohidrolasas, EC 3.4.16)
5. Peptidil dipeptidasas (Peptidil dipeptidohidrolasas, EC 3.4.15)
6. Dipeptidasas (Dipeptido aminopeptidasas, EC 3.4.13)
7. Tripeptidasas (Tripeptido aminopeptidasas, EC 3.4.11)
8. Omegapeptidasas (EC 3.4.19)

NOMENCLATURA DE LA EXOPEPTIDASAS

A.- En función de la especificidad de sustrato.

Siguiendo los criterios establecidos por Mc Donald y Barret (1986) consideraremos en este trabajo el término proteasa como un término general equivalente a peptido-hidrolasa, que se aplica igualmente a las exopeptidasas y las endopeptidasas. Por otra parte el término "proteínasa" se aplica solamente a las proteasas que tienen una actividad endopeptidasa, reservándose el término peptidasa a aquellas proteasas que solo tienen actividad exopeptidasa sobre péptidos pequeños.

El término omegapeptidasa se usa para designar una nueva clase de exopeptidasa cuya especificidad no se ajusta a la definición clásica dada para las aminopeptidasas y carboxipeptidasas.

El comité para la nomenclatura de los enzimas ha adoptado recientemente el término omegapeptidasa como una nueva clase (3.4.19) de exopeptidasas capaces de eliminar residuos terminales que:

a. carecen de un grupo libre alfa-amino o alfa-carboxilo (por ejemplo los grupos piroglutamil y aminoacilamida).

b. Están unidos a través de un enlace escindible relacionado con un grupo carboxilo o amino que no está unido a un carbono (por ejemplo el grupo omega-carboxilo del ácido aspártico o glutámico o el grupo epsilon-amino de la lisina). Tales enlaces se refieren generalmente como enlaces isopéptidos.

Por comparación, las exopeptidasas clásicas quedan restringidas a los enzimas que hidrolizan uniones alfa-péptidos, liberando aminoácidos, dipéptidos o tripéptidos de terminales amino o carboxilos no sustituidos.

Los nombres dados a muchas de las aminopeptidasas se basan en la preferencia o requerimiento que estos enzimas tienen para un particular aminoácido N-terminal. Sin embargo, debido a los pocos datos cinéticos que existen de estos enzimas, su nomenclatura no puede basarse en la actualidad en valores de V_{max} o K_m . Así, un nombre que refleje la preferencia del enzima para un aminoácido terminal particular se basa generalmente en la proporción relativa de hidrólisis determinada bajo condiciones óptimas, usando una concentración de sustrato muy por encima de los valores de K_m . Por ejemplo un enzima que muestra su máxima proporción de hidrólisis en un enlace alanil N-terminal se nombra como alanil aminopeptidasa (no alanina aminopeptidasa) y de forma abreviada se nombra como AAP. Se ha aceptado para nombrar las aminopeptidasas abreviadas el código de una sola letra para evitar confusiones. Se usa la segunda letra para designar un aminoácido cuya primera

Las dos exopeptidasas representadas en la figura tienen mecanismos de acción muy diferentes. Se cree que las dipeptidil peptidasas forman un intermediario dipeptidil-enzima activo que media la transferencia del grupo dipeptidilo. De hecho la DPPI tiene una considerable actividad dipeptidil transferasa, pudiendo actuar como aceptor sustancias distintas del agua entre las que se incluyen la hidroxilamina y otros grupos aminos no protonizables.

Este mecanismo de reacción es distinto al de la peptidil dipeptidasa A (PDP A enzima convertidor de la angiotensina) siendo esta la razón por la que no fue nunca apropiado el nombre de este enzima "dipeptidil carboxipeptidasa".

B. En función de la localización subcelular.

Debido a que algunas exopeptidasas tienen una especificidad idéntica o similar se ha mostrado útil darles nombres que las distinguen en función de su localización subcelular.

De esta manera algunas exopeptidasas se las nombra incluyendo prefijos tales como: "soluble", "lisosomal" o "microsomal".

Estos términos sirven para designar la fracción subcelular que se obtiene por centrifugación diferencial. Por ejemplo la microsomal alanil aminopeptidasa (MAAP) se encuentra en fracciones de membrana de vesículas que sedimentan por ultracentrifugación. Estos hallazgos suministran solamente una evidencia indirecta de una localización unida a la membrana en la célula

intacta. Por otra parte la soluble alanil aminopeptidasa (sAAP) se entiende que es un enzima libremente soluble en el citosol de la célula sobre la base de su presencia en el sobrenadante obtenido durante la centrifugación diferencial.

La evidencia de la localización lisosomal de algunas exopeptidasas se deriva también de estudios de sedimentación, aunque en muchos casos se ha confirmado la localización lisosomal por estudios citoquímicos.

C. En función de la distribución tisular

La distribución de las exopeptidasas en los distintos tejidos se usa también como criterio para su nomenclatura. Así, por ejemplo se han identificado tres clases diferentes de carboxipeptidasas con especificidad tipo B que se localizan respectivamente en páncreas, sangre y en los lisosomas de la mayoría de las células.

El enzima pancreático se ha nombrado durante muchos años simplemente como carboxipeptidasa B y de forma abreviada CPB. Recientemente se ha encontrado en otros tejidos distintos del páncreas un enzima con idénticas propiedades al enzima pancreático y consecuentemente este enzima se nombra como carboxipeptidasa B tisular, abreviadamente t CPB.

Los dos enzimas restantes se nombran como carboxipeptidasa B plasmática (p CPB) y carboxipeptidasa B lisosomal (l CPB).

EXOPEPTIDASAS DE MAMIFEROS. GENERALIDADES

La mayoría de las exopeptidasas parecen ser metaloproteínas con altos valores de M_r , alcanzando a menudo valores de 300,000. Se encuentran generalmente como glicoproteínas teniendo una compleja estructura, difiriendo así de las endopeptidasas que normalmente tienen una estructura molecular más simple. De acuerdo con esto las exopeptidasas son más difíciles de preparar y manejar.

La especificidad de las exopeptidasas a menudo comparte un alto grado de sinergismo con las endopeptidasas. Parece ser que la especificidad se ha desarrollado como parte de un mecanismo proteolítico para una eficiente recuperación de aminoácidos esenciales (tales como lisina, arginina, leucina y los aminoácidos aromáticos) de las proteínas de la dieta y de las proteínas intracelulares que se degradan como parte de un proceso dinámico del recambio de proteínas.

Las exopeptidasas fueron de las primeras proteasas que se descubrieron en tejidos de mamíferos (Waloschmidt-Leitz, 1931; Mc Donald and Schwabe, 1977).

En 1926 Josephson and von Euler detectaron en extractos de mucosa intestinal de cerdo una actividad dipeptidasa. Estos extractos, que fueron referidos como una preparación intestinal de "erepsina" fueron la fuente original de muchas exopeptidasas probándose que estas preparaciones contenían

una mezcla compleja de enzimas de diferentes especificidades (Smith and Bergmann, 1944).

En el año 1929, esto es, tres años después de publicarse los trabajos de Josephson and von Euler, se reconoció que la actividad dipeptidasa de los extractos intestinales era atribuible a más de un enzima (Linderstrom-Lang, 1929; Waldschmidt-Leitz et al, 1929). Linderstrom-Lang descubrió una exopeptidasa que fue distinta de la dipeptidasa y de la amino polipeptidasa descrita por Waldschmidt-Leitz. Este enzima, que el primer autor denominó como leucil peptidasa fue posteriormente conocida como aminopeptidasa, el primer ejemplo de una exopeptidasa N-terminal (Smith and Bergmann, 1944).

En 1929 Waldschmidt-Leitz and Furr descubrieron en el páncreas de buey una proteasa que rompía los aminoácidos C-terminales de péptidos acetilados, llamando a este enzima carboxi-polipeptidasa para distinguirlo de la amino polipeptidasa de origen intestinal. Ocho años mas tarde (Anson, 1937) cristalizó el enzima carboxi peptidasa siendo esta la primera proteasa que se obtuvo en forma cristalina, siendo nombrada durante mucho tiempo como el enzima de Anson. Mas tarde (Waldschmidt-Leitz et al, 1931) describieron la existencia de otra proteasa de origen pancreática que liberaba arginina de varias protaminas acetiladas pero no de ésteres de protamina.

Veinticinco años mas tarde (Folk, 1956) mostró que la actividad protaminasa era atribuible a una segunda carboxipeptidasa que nombró como "carboxipeptidasa básica", debido a su especificidad casi absoluta para liberar los aminoácidos básicos glicina y arginina. A esta proteasa se le

denominó carboxipeptidasa-B (Folk and Gladner, 1958) nombrándose a la clásica carboxipeptidasa de Waidschmidt-Leitz, carboxipeptidasa-A. Ambas carboxipeptidasas se secretan como pro-carboxipeptidasas activables por tripsina.

Sobre los años 50 se incrementó el estudio de otros tejidos distintos a los del tracto gastrointestinal, en los que se investigó la presencia de nuevas exopeptidasas, estableciéndose su localización intracelular que describiremos en este apartado como: "exopeptidasas del citosol", "unidas a membrana", "lisosomales" y "omegapeptidasas".

EXOPEPTIDASAS DEL CITOSOL

La primera aminopeptidasa citosólica que se caracterizó fue la leucina aminopeptidasa de Linderstrom-Lang (leucil aminopeptidasa), localizándose mas tarde como una fuente importante de la actividad de este enzima el riñón de cerdo (Spackman et al, 1955), en el cristalino de buey (Hanson et al, 1965) y en la pulpa dental (Schwabe, 1969).

En 1964 se descubrió en extractos de hígado de rata (Hopsu et al, 1964) una aminopeptidasa que se denominó aminopeptidasa B a causa de su especificidad, liberando residuos N-terminales de arginina y lisina pareciendo que actúa como la contrapartida N-terminal de la carboxipeptidasa B. En 1966 Behal et al, describieron una alanina aminopeptidasa (alanil aminopeptidasa soluble) en hígado humano, siendo este enzima dependiente de cobalto y sensible a la puromicina. Aunque la alanina es el residuo que preferentemente libera este enzima, sin embargo puede liberar otros muchos residuos N-

terminales. En contraste con la especificidad de este enzima se ha identificado una exopeptidasa dependiente del manganeso (Cheung and Cushman, 1971) en riñón de perros, que tienen una alta especificidad para los residuos N-terminales aspártico y glutámico; debido a que la proporción de la ruptura del ácido aspártico es aproximadamente tres veces mayor que la del glutámico el enzima se nombró como aspartato aminopeptidasa (aspartil aminopeptidasa).

Ellis and Nuenke, 1967, caracterizaron una dipeptidil-amilamidasa obtenida de extractos de pituitaria de buey que mas tarde se nombró como dipeptidil aminopeptidasa III (dipeptidil peptidasa III) (Mc Donald et al, 1971).

El primer ejemplo de una tripeptidil aminopeptidasa (tripeptidil peptidasa II) de origen citosólico se publicó en 1983 por Balow et al, el enzima purificado de hígado de rata cataliza la liberación consecutiva de tripéptidos del extremo N-terminal, de oligopéptidos derivados del enzima piruvato quinasa.

Se ha purificado una exopeptidasa conocida como tripeptidasa (tripéptido aminopeptidasa) (Chenoweth et al, 1973) que actúa solamente sobre tripéptidos que contienen sin modificar los extremos amino y carboxilo-terminales. Los tripéptidos que contienen en la posición central prolina o hidroxiprolina no se atacan por el enzima.

Igualmente se ha publicado la existencia de un enzima prolina iminopeptidasa (prolil aminopeptidasa) aislada del riñón de cerdo que elimina

de forma específica residuos de prolina del extremo N-terminal (Nordwig and Mayer, 1973).

Respecto a las carboxipeptidasas de origen citosólico no se han encontrado ejemplos, aunque en contraste con esta situación algunas de las dipeptidasas mejor conocidas tienen este origen, tales como la prolil dipeptidasa (Grassmann et al, 1932), prolina dipeptidasa (Bergmann and Fruton, 1937), glicil-glicina dipeptidasa (Josephson and von Euler, 1926; Smith, 1948_a), glicil-leucina dipeptidasa (Smith, 1948_b) β -alanil-histidina dipeptidasa (Hanson and Smith, 1949) -homoalanil histidina dipeptidasa (Lenny et al, 1977), cisteinil-glicina dipeptidasa (Binkly and Nakamura, 1948).

EXOPEPTIDASAS UNIDAS A MEMBRANA

Se han encontrado exopeptidasas unidas a membrana de prácticamente todas las clases, apareciendo normalmente en la fracción microsomal habiéndose descubierto durante los últimos treinta años cuatro exopeptidasas unidas a membrana obtenidas de extractos de riñón.

La aminopeptidasa A (glutamil aminopeptidasa) (Glenner et al, 1962) que se activa por Ca^{++} y que es relativamente específica en la liberación de aminoácidos dicarboxílicos N-terminales. La aminopeptidasa M (microsomal alanil aminopeptidasa) (Pfleiderer and Celliers, 1963) que libera aminoácidos neutros del extremo N-terminal, siendo una metaloproteína que contiene Zn^{++} .

En 1966 Hopsu-Havu and Glenner descubrieron otro enzima renal capaz de liberar restos glicina-prolina y que por este motivo se denominó dipeptidil aminopeptidasa IV (dipeptidil peptidasa IV). Más tarde (Dehm and Nordwig, 1970) se estableció la existencia de una exopeptidasa renal (prolina aminopeptidasa) capaz de catalizar la ruptura de un enlace entre un aminoácido N-terminal con el penúltimo aminoácido prolina.

La única dipeptidasa unida a membrana que ha sido bien caracterizada fue descubierta por Robinson et al, 1953 (microsomal dipeptidasa) que cataliza la ruptura alanina-glicina más rápidamente que el dipéptido glicina-glicina; en contraste con la glicil-glicina dipeptidasa de origen citosólico, que como ya hemos mencionado, era activada por Co^{++} y solamente hidroliza el enlace glicina-glicina, la dipeptidasa unida a membrana es activada por Zn^{++} .

Se conocen dos peptidasas C-terminal unidas a membrana habiendo sido ambas bien caracterizadas. La primera de ellas en ser descubierta fue el enzima "convertidor de la angiotensina" (peptidil dipeptidasa A) (Skeggs et al, 1956), reconociéndose hoy día que la especificidad de esta Zn^{++} -metalo carboxipeptidasa es mas amplia de lo que en principio se supuso.

El segundo enzima fue carboxipeptidasa B (microsomal-prolil carboxipeptidasa). Este enzima fue aislado por primera vez en riñon de cerdo (Dehm and Nordwig, 1970) y cataliza la liberación de aminoácidos neutros de la posición C-terminal, siendo activada por Mn^{++} .

EXOPEPTIDASAS DE ORIGEN LISOSOMAL

Hace más de 60 años se sabía (Willstätter and Bamann, 1929) que extractos acuosos obtenidos de tejidos animales eran capaces de digerir las proteínas a un pH ácido denominándose al enzima responsable de este fenómeno "catepsina" (del griego: digerir).

Años más tarde (Fruton et al, 1941) detectaron al menos cuatro actividades distintas en la preparación de la catepsina. En 1952 se revisó la nomenclatura de la catepsina, Tallan et al, conociéndose como Catepsina A, B y C a la contrapartida intracelular de la pepsina, tripsina y quimotripsina respectivamente. Debido a que las catepsinas, por definición comprenden proteasas de origen celular que exhiben una actividad óptima a pH ácido, no fue sorprendente que todos estos enzimas se encontraran eventualmente localizados en los lisosomas, orgánulos intracelulares donde se demostró por primera vez (de Duve et al, 1955) que contenían el grueso de las hidrolasas ácidas de la célula.

Más recientemente se ha demostrado que algunas de las catepsinas son exopeptidasas y no endopeptidasas. Mc Donald et al, 1966, identificaron una exopeptidasa en extractos de pituitaria de buey que catalizaba a pH ácido la liberación de serina-tirosina de su conjugado 2-naftilamida. Se nombró como dipeptidil-arilamidasa I, siendo más tarde nombrada como dipeptidil aminopeptidasa I a causa de su extensa especificidad sobre un rango de polipéptidos (Mc Donald et al, 1971) representando la primera en ser descubierta de una nueva clase de exopeptidasas hoy conocidas como dipeptidil-péptido hidrolasas. La demostración que la catepsina C de bazo de buey

manifiesta un requerimiento de cloruro similar al del enzima anteriormente descrito condujo a la demostración que la actividad de la catepsina C (Mc Donald et al, 1969_a) y del enzima degradador del glucagon (Mc Donald et al, 1969_b) era atribuible a una exopeptidasa N-terminal, hoy designada como dipeptidil peptidasa I.

En el transcurso de las investigaciones realizadas con la dipeptidil peptidasa I se descubrió otra clase de dipeptidil peptidasa, también de origen lisosomal, de la pituitaria de buey (Mc Donald et al, 1968) aunque su especificidad fue muy diferente y de alguna manera complementaria a la de la dipeptidil peptidasa I. La dipeptidil peptidasa II no requiere activador, habiéndose demostrado recientemente que rompe enlaces de prolina, siendo un ejemplo relativamente raro de una serin-proteasa lisosomal (Mc Donald and Schwabe, 1980).

En 1978 Doebber et al. descubrieron una proteasa en la pituitaria de buey que liberaba tripéptidos del extremo N-terminal de la hormona de crecimiento de buey. Esta tripeptidil aminopeptidasa (tripeptidil peptidasa I) o un enzima con propiedades similares fue localizada más tarde en ovario de cerdo (Mc Donald et al, 1985).

A pH 5 esta serin-proteasa lisosomal cataliza la depolimerización de la cadena del colágeno poli-glicina-prolina-alanina.

Durante mucho tiempo se tuvieron pocas evidencias de la existencias de una amino-acil aminopeptidasa lisosomal. En 1941 se describió

la existencia de una actividad peptidasa dependiente de grupos sulfidrilos obtenida del bazo de buey que hidrolizaba a pH 5 leucina-NH₂ y leucina-glicina-glicina, pero no Z-leucina-glicina-glicina (Fruton et al, 1941). Este enzima que se denominó catepsina III fue virtualmente olvidado durante los años siguientes. En 1968, Sylven and Snellman emplearon leucina-2-naftilamida como substrato de la catepsina B, aunque Mc Donald et al, 1970, mostraron que las actividades en las preparaciones de catepsina B que hidrolizan leucina-2-naftilamida y lisina-2-naftilamida eran distintas, pudiendo separarse en una columna de DEAE-celulosa. En 1977, Kirschke et al usaron una técnica similar para separar tales actividades de una preparación de catepsina B de lisosomas de hígado de rata, mostrando que el enzima purificado denominado catepsina H era una cisteína-proteínasa que hidroliza tanto proteínas como amino-acil arilamida, siendo por esta razón descrita como una endoaminopeptidasa. Por lo tanto parece que la catepsina H es la proteasa lisosomal responsable de las primeras actividades encontradas de una aminopeptidasa lisosomal sulfidril dependiente y cuya actividad se midió usando leucina-2-naftilamida.

La catepsina A es otro enzima lisosomal detectado originalmente en bazo de buey (Fruton and Bergmann, 1939) sobre la base de su capacidad para hidrolizar a pH ácido Z-glutámico-tirosina. El enzima no requiere activador, pensándose que tenía una actividad tipo pepsina.

Años más tarde (Iodice, 1967) se publicó que una catepsina A altamente purificada de bazo de buey mostraba actividad carboxipeptidasa solo con el glucagon: su especificidad ahora se conoce que es parecida a la

carboxipeptidasa A y por esta razón se ha sugerido que la catepsina A sea nombrada como carboxipeptidasa A lisosomal (Mc Donald and Schwabe, 1977).

Se ha detectado en bazo de buey una segunda actividad carboxipeptidasa (Fruton and Bergmann, 1939) que hidroliza también a pH 5,5 Z-glutámico-tirosina, pero que se distingue de la catepsina A por sus requerimientos de grupos sulfidrilos (Fruton et al, 1941). A causa de que representó el cuarto componente proteolítico del complejo catepsina se nombró como catepsina IV.

En 1962 Greenbaum and Sherman publicaron que la mejor preparación disponible de catepsina B de buey contenía una "cateptic carboxipeptidasa" activada por grupos sulfidrilos que era activa tanto sobre B₂-glicina-arginina como Z-glutámico-tirosina a pH 4. Años más tarde cuando Mc Donald et al, 1970, usando una preparación de bazo de buey para obtener catepsina B' (B1) y B (B2) de acuerdo con el procedimiento de Otto, 1967, se observó que en la catepsina B2 existía una actividad carboxipeptidasa sulfidril dependiente ensayable sobre B₂-glicina-arginina a pH 5. No tuvieron éxito los intentos para separar las actividades B₂-arginina-NH₂ y B₂-glicina-arginina (Mc Donald and Schwabe, 1977) y por lo tanto se concluyó que estas actividades eran atribuibles a un solo enzima denominado carboxipeptidasa B lisosomal. Una preparación purificada de bazo de buey de carboxipeptidasa B lisosomal (que contienen ambas actividades) fue usada por Mc Donald and Ellis, 1975, para caracterizar su especificidad carboxipeptidasa.

Una preparación de catepsina B2 purificada de lisosomas de hígado de rata (Ninjoor et al, 1974) mostró que contenía una actividad carboxipeptidasa que los autores creyeron era responsable de la actividad histona hidrolasa que previamente habían encontrado en sus preparaciones de catepsina B2 (Delumen and Tappel, 1973).

Puesto que no ha sido posible demostrar una actividad endopeptidasa de la catepsina B2 (Mc Donald and Ellis, 1975; Ninjoor et al, 1974) no pareció apropiado clasificar a este enzima como catepsina. El uso del término catepsina B2 dejó paso a favor del término carboxipeptidasa B lisosomal y el término catepsina B1 solo necesita ser referido como catepsina B.

Una tercera carboxipeptidasa lisosomal muy diferente a las hasta ahora descritas se descubrió en riñón de cerdo en el año 1968 por Yang et al. El enzima se denominó angiotensinasa C (en sangre se han descrito previamente dos aminopeptidasas: angiotensinasa A y B). Un enzima similar se ha descrito, obtenido de riñón de rata (Matsunaga, 1971) denominándose como angiotensinasa lisosomal, aunque mas tarde Mc Donald et al, 1974, demostraron que la dipeptidil peptidasa I era responsable de la mayor parte de la actividad angiotensinasa del hígado de rata. Yang and Erdos, 1971, renombraron más tarde el enzima prolil carboxipeptidasa para reflejar mejor su capacidad más general de romper enlaces prolina en penúltima posición, liberando aminoácidos del extremo C-terminal.

Mc Donald et al, 1972, caracterizaron una exopeptidasa similar que había sido detectada en preparaciones de dipeptidil peptidasa I obtenida de

hígado de rata, como una carboxipeptidasa sensible a diisopropil fluorofosfato. El enzima se nombró como "carboxipeptidasa C catéptica".

Sin embargo ambas actividades fueron atribuidas al mismo enzima y por lo tanto se refieren como prolil carboxipeptidasa lisosomal.

Como ya se ha hecho notar, la mayoría de las dipeptidasas se presentan en el citosol y son activas a un pH alcalino. Sin embargo una dipeptidasa metal dependiente se detectó en lisosomas de hígado de rata (Mc Donald et al, 1972) siendo capaz de romper un amplio rango de dipeptidos a pH 5,5, requiriendo que los extremos N y C terminales esten libres. El enzima se denominó provisionalmente "serina-metionina-dipeptidasa" y mas tarde fue renombrada como dipeptidasa I lisosomal (Mc Donald and Schwabe, 1977).

OMEGA PEPTIDASAS

El último grupo de exopeptidasas que consideraremos son las omega peptidasas, enzimas que se encuentran en las tres localizaciones celulares.

La gamma-glutamil transpeptidasa es una omega peptidasa unida a membrana que ha sido ampliamente estudiada, habiendo sido descubierta y nominada por Hanes et al en 1952, que cataliza tanto la hidrólisis, como la transferencia de residuos gamma-glutamil N-terminal. El glutation sirve como sustrato de este enzima, aunque mucho mas conveniente fue el sustrato cromogénico (gamma-glutamil-p-nitroanilida) desarrollado al mismo tiempo que

se purificó el enzima obtenido de riñón de cerdo por Orłowski and Meister, 1965.

Otro enzima omega peptidasa bien conocido, cuya acción en el aminoácido terminal no requiere grupos α -amino libres es el enzima "pirorolidona-carboxil peptidasa" (piroglutamil peptidasa).

El enzima fue descubierto primeramente en "pseudomonas fluorescens" (Doolittle and Armentrout, 1968) siendo mas tarde encontrado en hígado de rata (Armentrout, 1969).

Esta peptidasa requiere una activación sulfidrílica y es capaz de liberar residuos de piroglutámico del extremo N-terminal de polipéptidos a pH 7,5.

Una omega peptidasa que libera residuos de gamma-glutámico del extremo C-terminal se encuentra presente en la mucosa intestinal. Durante mucho tiempo se conoció como "folato conjugasa" reconociéndose que era responsable de la liberación de formas no conjugadas de folato de los piroglutamatos de la dieta.

Se ha mostrado (Heifbrand and Peters, 1969) que el enzima que estos autores nombraron como gamma-glutamil carboxipeptidasa (nombre que continua siendo apropiado) se concentra en los lisosomas de la mucosa intestinal del cobaya, actuando a un pH óptimo de 4,6, conociéndose hoy día

que se distribuye ampliamente en diferentes especies y tejidos siendo de origen lisosomal en hígado de rata (Silink and Rowe, 1975).

Se ha aislado otra omega peptidasa del hígado de rata que cataliza la liberación de acil aminoácidos del extremo N-terminal de péptidos y proteínas, siendo la actividad de este enzima (acil-amino acil peptidasa) mayor a pH 7,2 y dependiendo de la naturaleza del grupo acilo N-terminal (Tsunasawa et al, 1975).

Una omega peptidasa presente en tejidos de mamíferos se identificó originalmente en vejiga de sapo por Campbell et al, 1965. Esta carboxamido peptidasa (peptidil aminoacil amidasa) libera aminoácidos sustituidos en el extremo C-terminal y fue reconocida por su capacidad de catalizar la liberación a pH neutro de glicina-NH₂ C-terminal de la vasopresina.

La última omega peptidasa que incluimos en este grupo y de la cual se tiene una limitada información, es la β-aspartil peptidasa, que libera ácido aspártico N-terminal de péptidos unidos en β-conexión (Haley, 1970).

MODIFICACIONES DE LAS EXOPEPTIDASAS EN DISTINTOS PROCESOS PATOLOGICOS

A. PROCESOS NO NEOPLASICOS

Desde hace aproximadamente veinte años, ha aparecido en la literatura numerosos trabajos que demuestran la existencia de alteraciones de diversas exopeptidasas, tanto a nivel tisular como plasmático u otros fluidos

J.M. Llorente

orgánicos, en diversos procesos patológicos; fundamentalmente en aquellos que cursan con destrucción celular.

Dentro de estos procesos, ha merecido una atención especial, los estudios referentes a las modificaciones de las proteasas en los tumorales, de los que haremos una referencia en capítulo aparte.

Con independencia de los datos hoy existentes, a cerca de la α peptidasa, gamma-glutamil transpeptidasa (gamma-GTP), que claramente muestran la existencia de una elevación plasmática de los niveles de este enzima en los procesos tumorales con afectación hepática; existen una gran variedad de situaciones patológicas en las que, entre otras manifestaciones, se producen cambios o alteraciones de los niveles y/o actividad de diversas exopeptidasas, de los que a modo de ejemplo, expondremos los siguientes:

Uno de los primeros trabajos referente a alteraciones de exopeptidasas en patología humana, fué publicado en 1967 por Perry, en donde se refiere la aparición de un descenso de los niveles plasmáticos de la β -alanilhistidina dipeptidasa en la carnosinemia, enfermedad que se asocia con un retardo mental y desórdenes neurológicos

Respecto a la carboxipeptidasa B, se conoce que existe un descenso plasmático en la cirrosis hepática (Oshima et al, 1975) y en el síndrome de hiperbradiquinismo familiar (Streeten et al, 1972) y un aumento en la enfermedad de Hodgkin, mientras que no se han encontrado alteraciones significativas en enfermedades pancreáticas (Oshima et al, 1975).

El enzima leucil aminopeptidasa se encuentra elevado en el suero de enfermos con hepatitis infecciosa (Plaquet et al, 1973). Igualmente, se encuentra elevado el enzima dipeptidil peptidasa I, en la distrofia muscular y polimiositis (Kar and Pearson, 1978) y la dipeptidil peptidasa IV en enfermedades hepato-biliares, habiéndose encontrado igualmente, un descenso en los niveles plasmáticos de este enzima, en cáncer gástrico (Hino et al, 1975), leucemias (Fujita et al, 1977), artritis reumatoide y lupus eritematoso diseminado (Fujita et al, 1978).

Valores plasmáticos anormalmente elevados, del enzima peptidil dipeptidasa A se han encontrado en sarcoidosis pulmonar (Lieberman et al, 1979), diabetes mellitus con retinopatía severa y en la enfermedad de Gaucher (Lieberman and Sastre, 1980).

Se ha detectado una excreción urinaria elevada del enzima prolina dipeptidasa en la hiperimido dipeptiduria, síndrome similar al latirismo, sugerente de un defecto del colágeno (Isemura et al, 1979). En cerebro, se ha observado la existencia de una deficiencia del enzima gamma-homoalanilhistidina dipeptidasa, en la homocarnosinosis (Sjaastad et al, 1977).

Se ha demostrado la existencia de una actividad arginina aminopeptidasa cloruro dependiente, en exudados de varios procesos inflamatorios (Knuutti et al, 1978). En 1980 Makinen et al., mostraron que en la artritis reumatoide, no se afectan los niveles plasmáticos de este enzima; sin embargo, la enfermedad se asoció con niveles elevados del enzima

en el líquido y en la membrana sinovial, lo que confirma la relación de este enzima con los procesos inflamatorios.

En la esclerosis múltiple, se ha encontrado una elevada actividad proteasa en la mielina, sugiriendo que este enzima pueda estar relacionado en la patogénesis de las enfermedades que cursan con desmielinización (Sato et al, 1984).

Usando inhibidores de aminopeptidasas, se ha demostrado la participación de las mismas en la patogénesis de ciertas enfermedades; así: el tratamiento con bestatina, un inhibidor de aminopeptidasas, produjo una supresión significativa del desarrollo de hipertensión arterial en ratas espontáneamente hipertensas (Aoyagi et al, 1986), produciendo igualmente, la curación de, al menos la mitad de las ratas tratadas con este inhibidor y que padecían distrofia muscular genética (Tsuji and Matsushita, 1986).

Finalmente relatar que: existen datos, que muestran la existencia de niveles elevados de alanina aminopeptidasa, en pacientes con retinopatía diabética (Shimojo et al, 1987).

B. PROCESOS NEOPLASICOS

Las bases sobre la existencia de una relación entre la actividad aminopeptidasa y procesos neoplásicos, empezaron a establecerse de forma clara, a partir de los años cincuenta. Usando técnicas histoquímicas, Burstone en el año 1956, demostró la existencia de una actividad aminopeptidasa

comparativamente mayor en el estroma adyacente a una serie de tumores, tales como: Carcinoma epidermoide, adenocarcinoma de hígado, recto y paratiroides, que en tejidos normales. Tres años mas tarde, (Willighagen and Planteydt, 1959) se confirmó la existencia de una mayor actividad aminopeptidasa en nódulos linfáticos metastásicos y en carcinomas gástricos y de vías biliares.

Con el desarrollo de nuevas tecnologías, que permitieron medir más precisamente la actividad de las proteasas, se ha incrementado recientemente el número de publicaciones en relación con esta problemática.

En el cáncer de mama humano, se ha encontrado que se secreta un enzima, que puede ser el precursor de la catepsina B lisosomal (Recklies et al, 1982) y en macrófagos metastásicos de tumores mamarios de ratón se encuentran niveles elevados de leucina aminopeptidasa (Mahoney et al, 1985).

Diferentes enzimas protelíticos, se han implicado en la invasión y metástasis tumorales, habiendo cobrado particular interés el enzima catepsina B, ya que su actividad se ha correlacionado claramente con la malignidad y el potencial metastásico de tumores humanos y animales (Sloane and Honn, 1984).

La catepsina B es considerada normalmente como una cisteína proteinasa lisosomal; sin embargo, se ha medido y detectado una actividad similar a la catepsina B en células tumorales (Sloane et al, 1982), en el líquido ascítico de mujeres con carcinoma de ovario (Mort et al, 1981) y en extensiones de glándula mamaria (Recklies et al, 1985). Se ha publicado que

en células tumorales, tanto de origen humano como animal, la actividad catepsina B se encuentra asociada con la membrana plasmática (Sloane et al, 1985).

Los enzimas lisosomales se procesan y se transportan a los lisosomas via receptor dependiente de la manosa-6-fosfato (Sly and Fischer, 1982). Este proceso intracelular se ha estudiado ampliamente en fibroblastos, para diversos enzimas lisosomales que no incluyen la catepsina B. Se han detectado defectos en este sistema de transporte de fibroblastos en pacientes con enfermedades lisosomales (Reitman et al, 1981) y en algunas líneas celulares de tumores murina (Mainferme et al, 1985).

En tres melanomas murina se ha encontrado una asociación de la catepsina B y de la β -hexosaminidasa con la membrana plasmática, correlacionándose con el incremento del potencial metastásico (Sloane et al, 1986), lo que sugiere que estos enzimas pueden participar en la disolución de la matriz extracelular durante el estado invasivo de la cascada metastásica.

Estos dos enzimas trabajando concertadamente, pueden conducir a una disolución similar a la que se ha observado por digestión con tripsina de la membrana basal de la aorta, subsecuente a un tratamiento con β -hexosaminidasa (Jensen and Ledet, 1986).

Recientemente se han realizado estudios encaminados a determinar la distribución subcelular de la catepsina B, β -hexosaminidasa, así como otras hidrolasas lisosomales en diferentes variantes metastásicos del melanoma

murina B 16, habiéndose demostrado la presencia de una proteinasa tipo cisteína, catepsina B, en la superficie de las células tumorales metastásicas, en una forma que mantiene su actividad a pH fisiológico y en presencia de inhibidores extracelulares de proteinasas, lo que puede contribuir a la disolución focal de la matriz extracelular observada en los sitios de contacto con la célula tumoral invasora.

No obstante, existen datos contradictorios que indican que la catepsina B, posiblemente no juegue un papel en la colonización del pulmón de ratón por el melanoma amelanótico B 16, aunque de estos trabajos no se puede eliminar el papel que la catepsina B, tipo cisteína, pueda tener en los pasos iniciales del proceso metastásico (Ostrowski et al, 1986).

La acción citotóxica del factor de necrosis tumoral, parece que está relacionada con la actividad de una proteasa (Ruggiero et al, 1987). Diferentes líneas celulares de ratón C3H 10T1/2 infectadas con H-ras, que varían en su potencial metastásico espontáneo y experimental, se han estudiado los niveles de expresión de las cisteína proteinasa, catepsina L, encontrándose que existe una correlación positiva entre la extensión de la expresión ras, el potencial metastásico y la cantidad secretada de proteasa. Igualmente se observó que existía un incremento del mRNA de esta proteína en las células que manifestaban un incremento de la expresión ras, sugiriendo que este gen está bajo control ras (Denhardt et al, 1987).

Durante los últimos años se han aplicado diversas técnicas para el diagnóstico y clasificación de las leucemias, entre las que hoy, hay que

incluir las basadas en el examen de la actividad de las aminopeptidasas (Nemoto and Ohnishi, 1983).

Ciertas proteasas se han involucrado también en la carcinogénesis hepática, proporcionando nuevos conocimientos sobre el mecanismo celular de este proceso. Así, se ha demostrado que en la transformación experimental de hepatocitos en hepatomas, se produce un descenso drástico en la membrana plasmática del enzima dipeptidil peptidasa IV, simultáneamente con un incremento de la actividad de este enzima en el suero, sugiriendo este hecho la posibilidad de que el enzima se transfiera desde la membrana al suero, como resultado de ciertas alteraciones estructurales (Hanski et al, 1986). Recientemente (Enomoto et al, 1987) se ha detectado una nueva proteasa dependiente de Ca^{++} , cuya actividad es significativamente más alta en nódulos hiperplásicos y carcinoma hepatocelular inducidos por el método de Solt and Farber, 1976.

Medidas de la actividad y concentración del enzima N-acetilalanina aminopeptidasa en diferentes células tumorales, especialmente de carcinoma pulmonar, mostraron que existían unos altos niveles de actividad de este enzima en las células tumorales, no encontrándose actividad alguna de este enzima en plasma humano (Schoenberger et al, 1986).

Los datos, hasta ahora recogidos en este apartado, solo sirven a modo de ejemplo que ilustra sobre los conocimientos que hoy día se tienen sobre la relación de aminopeptidasas y procesos neoplásicos, ya que existe un número elevado de publicaciones que documentan este fenómeno; así por ejemplo,

hoy se conoce que en los homogenados de carcinoma gástrico existe un incremento de la actividad de colagenasa, catipsina B, catepsina (B + L), catepsina H y catepsina D (Vasishta et al, 1985).

C. NEOPLASIAS DE COLON Y RECTO

La caquexia que se produce en el cáncer, se caracteriza por una pérdida masiva de peso corporal a menudo, aunque no siempre, acompañada de anorexia (Costa, 1963). Muchos pacientes manifiestan una pérdida de peso significativa, como primer síntoma de una neoplasia (Robbins, 1974) cuando el tumor es aún tan pequeño como el 0.01% del peso corporal total (Nathanson and Hall, 1974). Es, por lo tanto, improbable que el tumor simplemente compita con los nutrientes disponibles.

Se ha propuesto (Theologides, 1976) que ciertos péptidos, oligonucleótidos u otros metabolitos producidos por las células cancerosas, sean responsables de las alteraciones metabólicas del organismo. Existen ciertas evidencias que asignan un papel a ciertos factores circulatorios en la etiología del cáncer/anorexia/caquexia. Una preparación obtenida de un sarcoma de rata, del cual no hubo evidencias de metástasis ni función endocrina, suministró pruebas de la existencia de la transmisión humoral de un factor que inducía anorexia/caquexia (Norton et al, 1985). Se ha aislado, tanto de extractos tumorales como de fluidos humorales de pacientes y animales con tumores, una sustancia capaz de movilizar lípidos (Toxohormona-L) (Masuno et al, 1981).

Inyecciones de toxohormona L en el ventrículo lateral de ratas, producen una significativa supresión de la ingesta de agua y alimentos (Masuno et al, 1984). Se han encontrado más evidencias de la existencia de este factor movilizador de la grasa, al detectarse en el suero de ratones portadores de tumores (Kitada et al, 1980), aunque este factor no se ha caracterizado.

En células de melanoma B 16 se produce una sustancia que tiene una reacción inmunoquímica cruzada con la insulina y que se correlaciona con el descenso producido en la concentración de glucosa plasmática y con una elevada concentración de hormona del crecimiento (Vuk-Pavlovic et al, 1986).

Recientemente se ha sugerido, que una sustancia producida en macrófagos, la caquectina, que inhibe la actividad lipoproteilipasa en tejidos periféricos, está relacionada con los complejos cambios metabólicos que conducen a la caquexia (Beutler et al, 1985).

Transplantes de adenocarcinoma de colon MAC 16 en ratones NMR 1, produjeron una gran pérdida de peso corporal para tamaños del tumor del 1% del peso corporal, indicando que sea improbable que la pérdida de peso se produzca simplemente por una competición con el tumor, de los nutrientes disponibles (Bibby et al, 1987).

Recientemente se ha estudiado la posibilidad que la producción de factores catabólicos por el tumor, sea la responsable de esta caquexia experimental, habiéndose encontrado que el tumor produce factores lipolíticos

y proteolíticos solo en los casos en los que asociado con el tumor, se presenta una pérdida de peso corporal.

El factor lipolítico no es dializable y se destruye por el calor y el medio ácido. La insulina y el 3-hidroxi-butilato suprimen la actividad lipolítica del extracto tumoral. El tumor MAC 15 también contiene una serin proteasa, cuya actividad se inhibe completamente por la insulina y el 3-hidroxi-butilato (Beck and Tisdale, 1987).

Recientemente se ha aislado y caracterizado parcialmente, un inhibidor de proteinasas en adenocarcinomas colo-rectal. Aunque sus funciones no son conocidas, si es que tiene alguna, la existencia de este inhibidor en cáncer colo-rectal y no en la mucosa normal, hace pensar que pueda contribuir a la aparentemente menor actividad fibrinolítica, comparado con los tejidos normales (Cheung and Lau, 1986).

Se ha demostrado la existencia de un incremento de la actividad colagenasa en tumores colo-rectales (Tighe et al, 1981). La colagenolisis en condiciones normales, es un proceso que se realiza en dos etapas: ruptura inicial por enzimas extracelulares, seguida por fagocitosis de los fragmentos y digestión lisosomal intracelular.

Con estos antecedentes, se ha medido la actividad de dos peptidasas extracelulares: la colagenasa, la colagenasa tipo peptidasa, y dos enzimas intracelulares lisosomales: la catepsina H y la catepsina B, en tejidos normales y tumorales de recto y colon, habiéndose demostrado un

J.M. Lorenzo

Incremento significativo de la actividad de la catepsina B, colagenasa tipo peptidasa y colagenasa en tejido tumoral, comparada con lo observado en tejido sano del mismo paciente. La actividad de la catepsina B parece que se relaciona con la invasión local del tumor (Durdey et al, 1985).

RESUMEN Y PLANTEAMIENTO

Coincidiendo con el aumento del nivel socio-económico, se ha incrementado recientemente la frecuencia del cáncer colo-rectal constituyendo la segunda causa de muerte por cáncer.

Además de la diseminación linfática, sanguínea y a través de la luz intestinal, el cáncer colo-rectal presenta una diseminación por contigüidad directa a través de la propia pared intestinal y con órganos vecinos, tales como asas intestinales, vejiga, vagina, etc. Esta forma de diseminación es relativamente frecuente, haciendo que el tumor sea irreseccable y consecuentemente empeorando el pronóstico.

Por otra parte, se conoce que ciertos enzimas proteolíticos juegan un importante papel en diversos aspectos del crecimiento tumoral y de la formación de metástasis.

En las fases iniciales de la invasión, las células tumorales se separan del tumor primitivo y comienzan a emigrar hacia los tejidos adyacentes, presumiblemente guiadas por factores quimiotácticos.

En la mayoría de los casos, las células invasoras alcanzan los vasos linfáticos y sanguíneos desde donde se difunden a través del cuerpo, se extravasan y se inicia la metástasis.

Desde un punto de vista clínico, el proceso metastásico es el aspecto más serio del cáncer, ya que es la causa principal de fatalidad en los

pacientes cancerosos. Los métodos clínicos para la detección precoz de las metástasis son aún limitadas, por lo que resulta un foco prioritario de actuación en la investigación sobre el cáncer, establecer los mecanismos moleculares que subyacen a este fenómeno.

El proceso de metástasis es un fenómeno extremadamente complejo formado por una variedad de acontecimientos, uno de los cuales es la destrucción de la matriz extracelular que permita la expansión de la célula tumoral.

Hoy día se conoce que la destrucción de la matriz extracelular, durante la invasión tumoral, ocurre mediada por la intervención de una variedad de enzimas degradativos producidos por la célula tumoral, poniendo en evidencia la importancia que estos enzimas tienen en éste proceso.

Hasta la actualidad, se ha estudiado en cáncer colo-rectal la actividad de enzimas como la catepsina B y H, que son carboxipeptidasas, así como la actividad colagenasa.

Por otra parte, se ha considerado la mucosa adyacente al cáncer como una zona de alto riesgo de malignización. Ésta hipótesis "pre maligna", viene apoyada por hallazgos relativos a cambios en mucinas no sulfatadas, determinadas por técnicas histoquímicas. Trabajos muy recientes, basados en los cambios de actividad enzimática de esta zona (ornitina decarboxilasa, timidina quinasa, fosfatasa alcalina y láctico deshidrogenasa) así como por estudios histológicos, sugieren que aún existiendo cambios morfométricos de

eficiente

esta zona, sin embargo no existen evidencias bioquímicas para poder sugerir que la mucosa adyacente al cáncer colónico soporte un gran riesgo de cambios malignos.

Los datos existentes hasta la actualidad en relación con los fundamentos bioquímicos de la invasión tumoral en el cáncer colo-rectal, hacen referencia casi exclusivamente a los cambios producidos en la actividad de colagenasas y carboxipeptidasas.

Puesto que todos estos enzimas pueden formar parte de una cascada proteolítica metastásica, no puede excluirse la participación de muchos otros enzimas igualmente con capacidad de destrucción de la matriz extracelular.

Por todo esto, nos proponemos en el presente trabajo estudiar los posibles cambios de la actividad aminopeptidasa, medida con trece substratos diferentes, tanto en la fracción soluble como en la fracción de membrana, obtenida de homogenizados de tejido tumoral y su comparación con los resultados obtenidos en tejido intestinal sano, procedente de la porción distal al tumor del mismo paciente.

Debido a la importancia que la mucosa adyacente al tumor puede tener en relación con la capacidad de malignizarse, realizaremos igualmente un estudio de la actividad enzimática presente en la fracción soluble y de membrana obtenida de homogenizados de tejido intestinal tomado a dos centímetros del borde macroscópico del tumor.

MATERIAL Y MÉTODOS

MATERIAL BIOLÓGICO

Se han obtenido treinta y tres muestras procedentes de once pacientes intervenidos de adenocarcinoma de colon o recto. A cada paciente se le practicó una intervención radical con vaciamiento ganglionar, consistente en: hemicolectomía derecha, hemicolectomía izquierda o resección anterior de recto, según la localización de dicha tumoración fuese: colon ascendente, colon descendente o sigma y recto. Todos los tumores se trataron de adenocarcinomas de moderado grado de diferenciación y pertenecientes al estadio C de Dukes, 1932.

Los detalles patológicos de cada paciente se detallarán en la historia clínica de cada uno de ellos.

Inmediatamente después de la resección, se tomaron muestras del tumor (Tejido tumoral), de la mucosa colónica o rectal distante 2 cm. del borde macroscópico del tumor (Tejido periférico) y mucosa colónica o rectal distante 10 cm. del borde macroscópico del tumor (Tejido sano). Las muestras se lavaron en solución salina normal, procediéndose a la determinación de la actividad aminopeptidasa.

Ninguno de los pacientes manifestó objeción alguna para el uso de las muestras de tejido en este trabajo.

Las distintas muestras de tejido intestinal se han distribuido, para este trabajo, enumeradas en once casos.

CASO Nº 1

E.R.P.

Sexo: Varón

Edad: 58 años

Patología/intervención: Tumorción estenosante de recto situada a trece centímetros del ano. Resección anterior de recto.

Diagnóstico anatomopatológico: Adenocarcinoma moderadamente diferenciado, que infiltra la serosa y ocasiona perforación intestinal con formación de plastrón perirectal (reacción granulomatosa de cuerpo extraño).

Gánglios linfáticos: Linfadenitis reactiva en las adenopatías aisladas.

CASO Nº 2

E.V.A.

Sexo: Hembra

Edad: 82 años

Patología/intervención: Tumorción estenosante en servilletero, en colon sigmoideo a diez y ocho centímetros del ano. Hemicolectomía izquierda.

Diagnóstico anatomopatológico: Adenocarcinoma bien diferenciado que infiltra serosa.

Gánglios linfáticos: Se afecta por el tumor una de las diez y ocho adenopatías aisladas.

J.M. Llorente

CASO Nº 3

E.M.N.

Sexo: Varón

Edad: 37 años

Patología/intervención: Tumoración vegetante colon ascendente. Hemicolectomía derecha.

Diagnóstico anatomopatológico: Adenocarcinoma mucosecretor moderadamente diferenciado.

Gánglios linfáticos: Se encuentran metástasis en seis de las veintiuna adenopatías aisladas.

CASO Nº 4

F.A.S.

Sexo: Varón

Edad: 59 años

Patología/intervención: Tumoración en sigma a treinta centímetros del anc. Hemicolectomía izquierda.

Diagnóstico anatomopatológico: Adenocarcinoma bien diferenciado.

Ganglios linfáticos: Se encuentran afectadas tres de las veintitres adenopatías aisladas.

CASO Nº 5

J.S.T.

Sexo: Varón

Edad: 66 años.

Patología/intervención: Tumoración vegetante a diez y nueve centímetros del ano. Hemicolectomía izquierda.

Diagnóstico anatomopatológico: Adenocarcinoma bien diferenciado.

Ganglios linfáticos: Linfadenitis crónica reactiva en las venticuatro adenopatías aisladas.

CASO Nº 6

C.C.R.

Sexo: Varón

Edad: 61 años

Patología/intervención: Tumoración estenosante en sigma a treinta y cinco centímetros del ano. Hemicolectomía izquierda.

Diagnóstico anatomopatológico: Adenocarcinoma bien diferenciado.

Ganglios linfáticos: Metástasis en dos de las siete adenopatías aisladas.

CASO Nº 7

A.R.P.

Sexo: Varón

Edad: 72 años

J.M. Lorente

Patología/intervención: Neoformación vegetante en sigma a treinta y cinco centímetros del ano que ocluye la luz intestinal con efecto de válvula. Hemicolectomía izquierda.

Diagnóstico anatomopatológico: Adenocarcinoma moderadamente diferenciado.
Ganglios linfáticos: Metástasis en tres de las siete adenopatías aisladas.

CASO Nº 8

E.C.O.

Sexo: Varón

Edad: 59 años

Patología/intervención: Neoformación ocluyente en sigma a treinta y dos centímetros de ano que provoca obstrucción intestinal. Hemicolectomía izquierda.

Diagnóstico anatomopatológico: Adenocarcinoma bien diferenciado.
Ganglios linfáticos: Metástasis en doce de las veinte adenopatías aisladas.
Hígado: Metástasis de adenocarcinoma bien diferenciado.

CASO Nº 9

A.R.R.

Sexo: Hembra

Edad: 48 años

Patología/intervención: Tumorción estenosante colon transversal en proximidad a ángulo esplénico. Hemicolectomía izquierda ampliada con extirpación de colon derecho, transversal y descendente hasta sigma, con ileosigmoidostomía.

Diagnóstico anatomopatológico: Adenocarcinoma bien diferenciado.

Ganglios linfáticos: Linfadenitis crónica en las treinta y unas adenopatías aisladas.

CASO Nº 10

R.F.L.

Sexo: Hembra

Edad: 50 años

Patología/intervención: Neoformación estenosante de colon sigmoideo a treinta centímetros del ano. Hemicolectomía izquierda.

Diagnóstico anatomopatológico: Adenocarcinoma moderadamente diferenciado.

Ganglios linfáticos: Linfadenitis crónica en todos los ganglios aislados

CASO Nº 11

D.J.V.

Sexo: Hembra

Edad: 42 años

Patología/intervención: Tumorción estenosante de colon izquierdo a treinta y tres centímetros del ano. Hemicolectomía izquierda.

Diagnóstico anatomopatológico: Adenocarcinoma bien diferenciado.

Ganglios linfáticos: Metástasis de adenocarcinomas en una de las nueve adenopatías aisladas.

APARATOS

J.M. Florente

- Espectrofotómetro: "Spectronic 710" (Bausch and Lomb).
- Espectrofluorímetro. Kontron. SFM 25.
- Baño de incubación.
- Balanza August Sauter KG. Ebingen tipo 414.
- Balanza de precisión (Metteler ME 30).
- pHmetro (Crison).
- Ultracentrifuga: "TGA-65 ultracentrifuge" (Kontron).
- Homogenizador sorvall.

PRODUCTOS QUIMICOS

- Acetato Sódico (Merck).
- Acido Acético glacial (Merck).
- Acido orto-fosfórico 85% (Merck).
- Albumina bovina. Fracción V (Sigma Chem. Comp.).
- Cloruro Sódico (Merck).
- Coomassie Brilliant Blue G-250 (Sigma Chem. Comp.).
- DL-Dithiothreitol (DTT) (Sigma Chem. Comp.).
- Etanol absoluto (Merck).
- Fosfato Sódico monobásico (Merck).
- Fosfato Sódico dibásico (Merck).
- Propilen-Glicol (Panreac).
- Sulfato de Magnesio (Merck).
- Suero salino fisiológico 9 g. - 1000 ml. (Ibys).
- Tris ClH "Trizma Base" (Sigma Chem. Comp.).

- TRITON X-100 (Sigma Chem. Comp.).
- Desoxicolato Sódico (bioMerieux).
- Bio-Beads SM-2 (Copolímero Esférico Macroreticular de Estireno-Divinil benzeno) 20-50 mesh (Bio-Rad).
- B-Naftilamina (Sigma Chem. Comp.).
- L-Leucil-B-Naftilamida (Sigma Chem. Comp.).
- L-Arginil-B-Naftilamida (Sigma Chem. Comp.).
- L-Alanil-B-Naftilamida (Sigma Chem. Comp.).
- L-Cistinil-B-Naftilamida (Sigma Chem. Comp.).
- L-Prolil-B-Naftilamida (Sigma Chem. Comp.).
- L-Piroglutamil-B-Naftilamida (Sigma Chem. Comp.).
- L-Aspartil-B-Naftilamida (Sigma Chem. Comp.).
- L-gamma-Glutamil-B-Naftilamida (Sigma Chem. Comp.).
- L-Glicil-Arginil-B-Naftilamida (Sigma Chem. Comp.).
- L-Lisil-Alanil-B-Naftilamida (Sigma Chem. Comp.).
- L-Arginil-Arginil-B-Naftilamida (Sigma Chem. Comp.).
- L-Glicil-Prolil-B-Naftilamida (Sigma Chem. Comp.).
- L- α -Glutamil-B-Naftilamida (Sigma Chem. Comp.).

SOLUCIONES AMORTIGUADORAS

- Tris ClH, 0.2 M. pH 7.4

Para la preparación de 1000 ml., se toman 24,22 g. de TRIZMA BASE (Tris [hidroximetil] aminometano), disolviéndolos en agua destilada, ajustando el pH deseado con ClH y añadiendo agua destilada hasta volumen. Esta solución

J.M. Lorente

La utilizábamos como "solución madre" para obtener Tris ClH, 10 mM, pH 7.4, diluyendo 20 veces (a 1 ml. de solución madre le añadimos 19 ml. de agua).

- Buffer Fosfato, 0.1 M. pH 7.4

- Solución A: 0.2 M de Fosfato Sódico monobásico (27.6 g. de $\text{PO}_4 \text{H}_2 \text{Na}$. H_2O en 1000 ml. de H_2O).

- Solución B: 0.2 M de Fosfato Sódico dibásico (71.7 g. de $\text{PO}_4 \text{H Na}_2$. 12 H_2O en 1000 ml. de agua).

Para 200 ml. se toman 19 ml. de solución A y 81 ml. de solución B, llevándose a volumen con agua destilada.

- Buffer Acetato, 0.1 M. pH 4.2.

- Solución 1: 11.55 ml. de Acido Acético se llevan a 1000 ml. con agua destilada.

- Solución 2: 16.4 g. de Acetato Sódico se disuelven en 1000 ml. de agua destilada.

Para 1 litro se toman 368 ml. de solución 1 y 132 ml. de la solución 2, llevándose a volumen con agua destilada.

Extracción de la fracción soluble y de membrana

Las muestras de tejido (de 3 a 5 g.), después de lavarse con suero fisiológico, se lavan con buffer fosfato 0.1 M, pH 7.4.

El tejido se homogeniza con 10 volúmenes de tris ClH, 10 mM, pH 7.4, que contiene DTT. Se homogeniza hasta que no queden partículas en

suspensión y se ultracentrifuga a 100.000 g. durante 35 minutos a una temperatura de 4°C.

Del sobrenadante se toma la muestra necesaria para la determinación de las aminopeptidasas y de las proteínas solubles.

Para la determinación de aminopeptidasas unidas a membrana, el precipitado se volvió a homogeneizar en 10 volúmenes de la disolución de homogeneización, a los que se añade 0.1 ml. de disolución de Triton X-100 por cada mililitro de homogeneizado.

A continuación, se mezcla por inversión mecánica durante 30 minutos y se ultracentrifuga a las mismas condiciones que las expuestas anteriormente. Se toma 1 ml. de sobrenadante y se le agregan 0.1 g. de Bio-Beads y se mantienen durante 120 minutos en inversión mecánica, con objeto de extraer el Tritón X-100. Finalizada esta operación, se toman las muestras necesarias para la determinación de la actividad aminopeptidasa unida a membrana, así como para la determinación de proteínas.

Determinación de la actividad aminopeptidasa

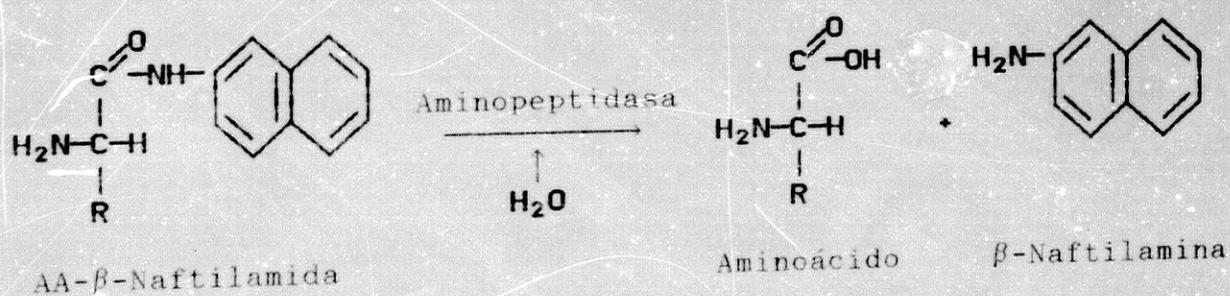
La actividad aminopeptidasa se midió frente a trece substratos: L-Leucil- β -Naftilamida, L-Arginil- β -Naftilamida, L-Alanil- β -Naftilamida, L-Cistinil- β -Naftilamida, L-Protil- β -Naftilamida, L-Piroglutamil- β -Naftilamida, L-Aspartil- β -Naftilamida, L-gamma-Glutamil- β -Naftilamida, L-Glicil-Arginil-

J.M. Llorente

β -Naftilamida, L-Lisil-Alanil- β -Naftilamida, L-Arginil-Arginil- β -Naftilamida, L-Glicil-Protil- β -Naftilamida, L- α -Glutamil- β -Naftilamida.

Todos los substratos estan a una concentración 50 μ M en una disolución de buffer fosfato 50 mM, pH 7.4, conteniendo albúmina bovina al 10% (p/v) y Ditiotreitól (DTT) al 10% (p/v).

A 1 ml. de esta disolución se le agregan 10 μ l de cada una de las muestras correspondientes, para determinar la actividad aminopeptidasa frente a los cuatro primeros substratos, previamente descritos. Para la determinación de la actividad aminopeptidasa del resto de los substratos, se usa 50 μ l de la muestra. A continuación se incuban a 37 $^{\circ}$ C durante un tiempo de 60 minutos para los cuatro primeros substratos y 900 minutos para el resto. Al cabo de este tiempo se detiene la reacción enzimática añadiendo 1 ml. de buffer acetato 0.1 M, pH 4.2.



La β -Naftilamina enzimáticamente liberada se mide espectrofluorimetricamente a 335 nm de excitación y 410 nm de emisión.

Una disolución de sustrato, al que no se le agrega muestra, se usa como blanco. Cada muestra se midió por triplicado.

Los valores de fluorescencia obtenidos, se transforman en picomoles de Naftilamina liberada por comparación con una recta patrón obtenida con 10 concentraciones diferentes de β -Naftilamina.

DETERMINACION DE PROTEINAS

El método de determinación de proteínas utilizado en nuestros experimentos se atiene al descrito en 1976 por Bradford, basado en la afinidad de un colorante, Coomasie azul brillante G-250, por las proteínas. La unión del colorante a las proteínas produce un cambio en la longitud de onda de máxima absorción del colorante desde 465 nm a 595 nm. Es precisamente este incremento de absorción el parámetro medido, puesto que resulta directamente proporcional a la concentración de proteínas, siempre que haya exceso de colorante. El método es capaz de medir μg . de proteínas, por lo que lo consideramos ideal para nuestros experimentos.

En nuestro caso, utilizábamos 10 μl de muestra y 2 ml. de una disolución acuosa que contenía Coomasie azul brillante al 0.01%, etanol al 4.7% y ácido fosfórico al 8.5%. El blanco de la prueba consistía en 2 ml. de esta solución en ausencia de muestra. Los valores de absorbancia, leídos a 595 nm, se transformaban en mg. de proteínas por ml., utilizando una curva

standard, obtenida tras medir por el mismo procedimiento concentraciones crecientes de una solución de albúmina bovina.

Cada muestra se midió por triplicado.

MÉTODO ESTADÍSTICO

Los resultados obtenidos de la actividad aminopeptidasa se tabularon y analizaron usando un programa estadístico "ABSTAT" en un ordenador OLIVETTI M-250.

Se han aplicado los siguientes tests:

- Media, desviación estándar y error estándar de la media.
- Test de rechazo de muestras extremas.
- Análisis de la varianza (ANOVA) de una vía.
- Test "t" para datos apareados. Para la comparación de medias se aplicó: cuando no existieron diferencias entre las varianzas, el test "t" de Student; en caso contrario, se aplicó el test de Welch.
- Análisis de correlación lineal simple de Pearson. Para la comparación de los coeficientes de correlación, se aplicó el test de transformación de la "r" de Pearson en la "z" de Fisher.

El nivel de significación admitido fue de $p < 0.05$ (Martin et al, 1986; Sokal and Rohlf, 1979).

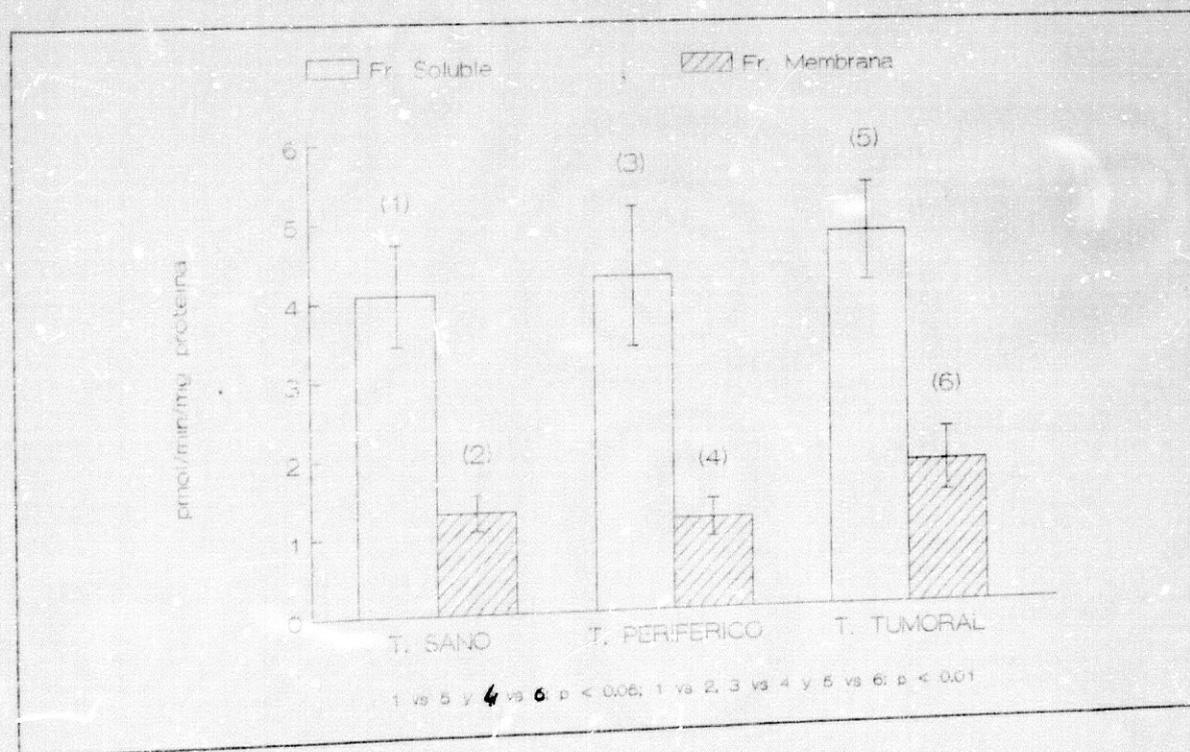
RESULTADOS

Valores individuales (tabla I) y representación gráfica (figura 1) de la actividad leucil aminopeptidasa medida en la fracción soluble y de membrana y su comparación estadística (test "t" de Student para comparación de muestras apareadas) en tejido sano, periférico y tumoral.

Tabla I

Caso Nº	Tejido Sano		Tejido Periférico		Tejido Tumoral	
	F. Soluble	F. Membrana	F. Soluble	F. Membrana	F. Soluble	F. Membrana
1	1.92	0.75	1.57	0.81	4.56	1.36
2	5.28	0.33	4.70	0.41	7.28	1.04
3	1.54	2.31	0.34	2.04	2.99	5.38
4	3.52	2.23	3.02	1.05	4.20	1.41
5	4.26	1.66	7.38	3.06	5.87	2.58
6	2.88	0.52	1.85	0.49	3.74	1.41
7	6.51	1.25	6.80	1.17	6.00	1.41
8	5.24	2.25	3.96	0.81	5.25	1.72
9	3.54	1.11	10.56	0.75	8.63	1.33
10	2.73	1.61	3.73	1.65	2.76	2.25
11	2.56	0.33	3.13	0.55	1.53	0.32
\bar{X}	4.08	1.30	4.28	1.16	4.20	1.84
SEM	0.64	0.23	0.89	0.24	0.63	0.40

Figura 1

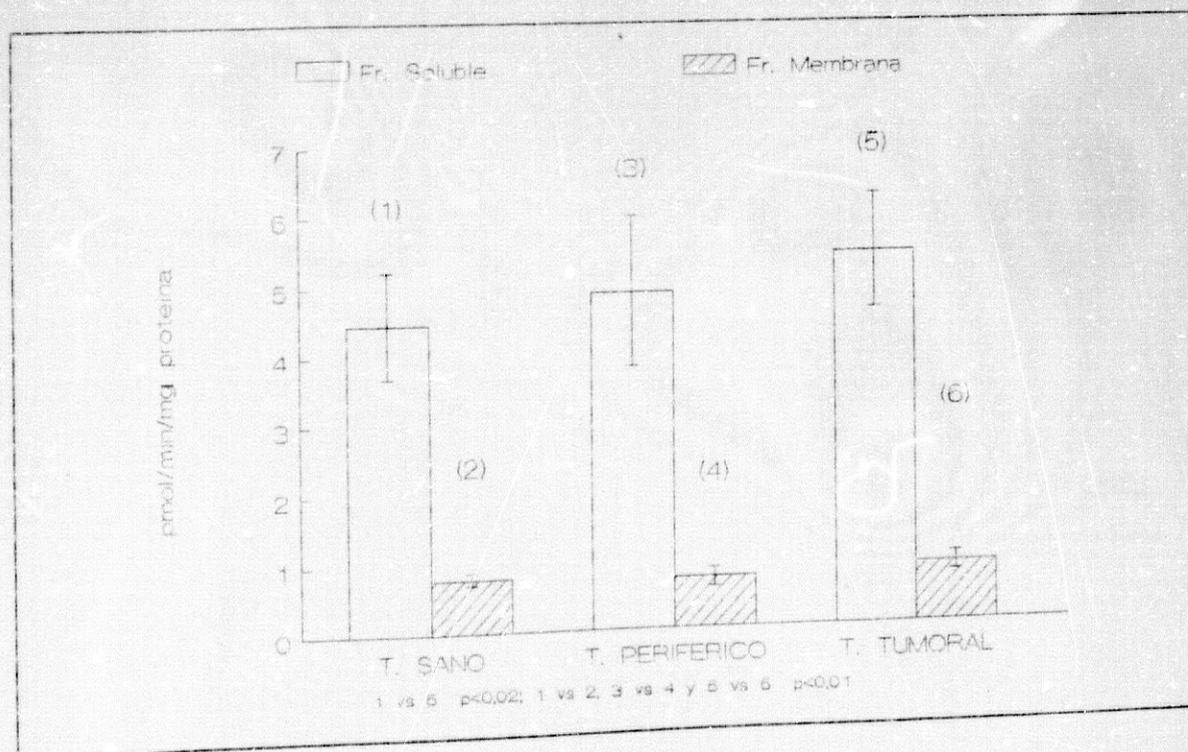


Valores individuales (tabla II) y representación gráfica (figura 2) de la actividad arginil aminopeptidasa medida en la fracción soluble y de membrana y su comparación estadística (test "t" de Student para comparación de muestras apareadas) en tejido sano, periférico y tumoral.

Tabla II

Caso	Tejido Sano		Tejido Periférico		Tejido Tumoral	
	F. Soluble	F. Membrana	F. Soluble	F. Membrana	F. Soluble	F. Membrana
1	1.94	0.60	1.55	0.49	5.00	0.67
2	6.21	0.66	5.73	0.16	8.15	0.20
3	0.86	0.72	0.43	0.43	1.80	1.50
4	3.52	1.35	3.14	0.97	4.46	0.72
5	5.37	0.80	9.05	1.87	6.53	1.50
6	2.76	0.46	1.60	0.40	3.74	0.97
7	5.81	0.42	6.67	0.45	5.90	0.48
8	5.59	0.83	4.14	0.47	5.42	0.85
9	10.21	1.22	12.80	0.88	10.71	1.10
10	2.61	0.93	3.66	0.83	2.52	1.25
11	4.12	0.63	5.06	0.95	2.00	0.25
X	4.45	0.78	4.89	0.72	5.42	0.86
SEM	0.78	0.087	1.09	0.14	0.83	0.14

Figura 2

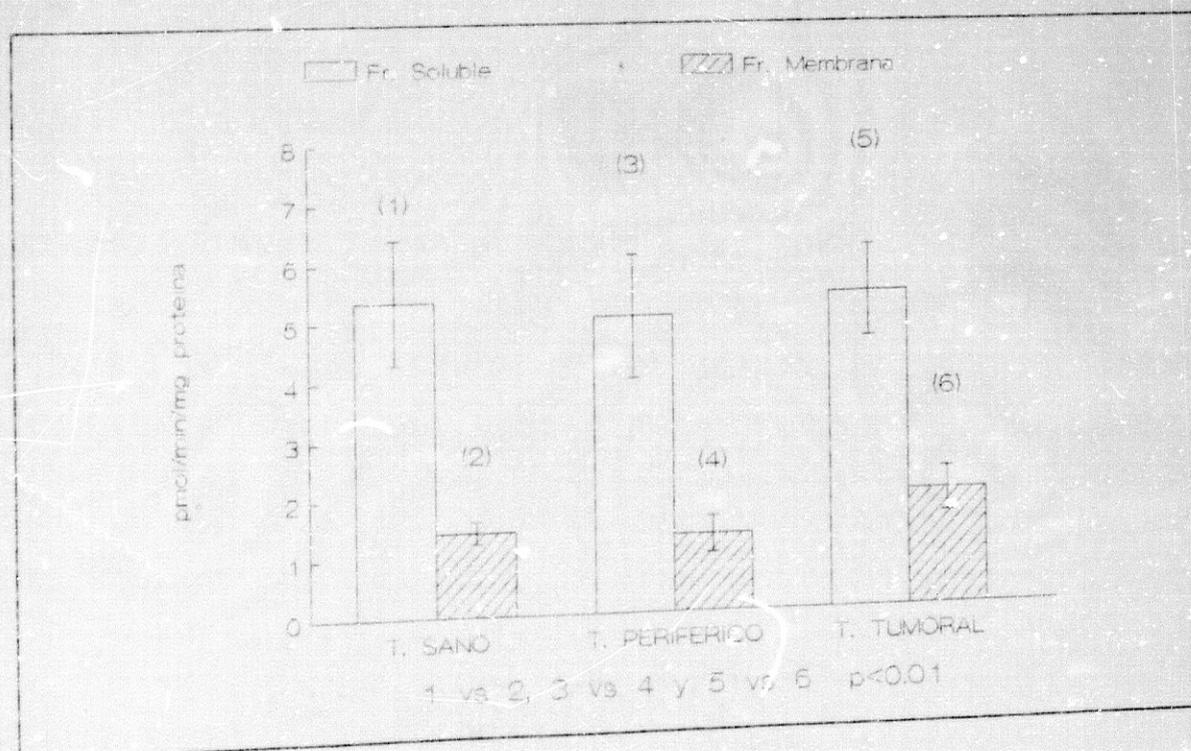


Valores individuales (tabla III) y representación gráfica (figura 3) de la actividad alanil aminopeptidasa medida en la fracción soluble y de membrana y su comparación estadística (test "t" de Student para comparación de muestras apareadas) en tejido sano, periférico y tumoral.

Tabla III

Caso	Tejido Sano		Tejido Periférico		Tejido Tumoral	
	F. Soluble	F. Membrana	F. Soluble	F. Membrana	F. Soluble	F. Membrana
1	2.37	0.89	2.19	1.28	5.96	2.54
2	4.00	0.57	3.50	0.18	4.94	0.16
3	0.45	0.99	0.32	0.88	2.16	3.89
4	2.41	1.72	2.13	0.43	3.16	0.72
5	6.11	1.83	8.57	3.83	6.66	3.36
6	5.77	0.91	3.15	0.67	6.44	2.36
7	10.81	1.61	6.67	1.67	5.90	1.63
8	7.14	2.14	5.40	0.81	7.00	2.07
9	10.21	1.25	12.80	0.79	11.30	1.02
10	4.24	2.63	5.66	2.08	4.06	3.50
11	4.21	1.10	5.33	1.63	2.00	0.37
X	5.35	1.42	5.06	1.30	5.41	1.97
SEM	1.06	0.19	1.05	0.31	0.79	0.39

Figura 3

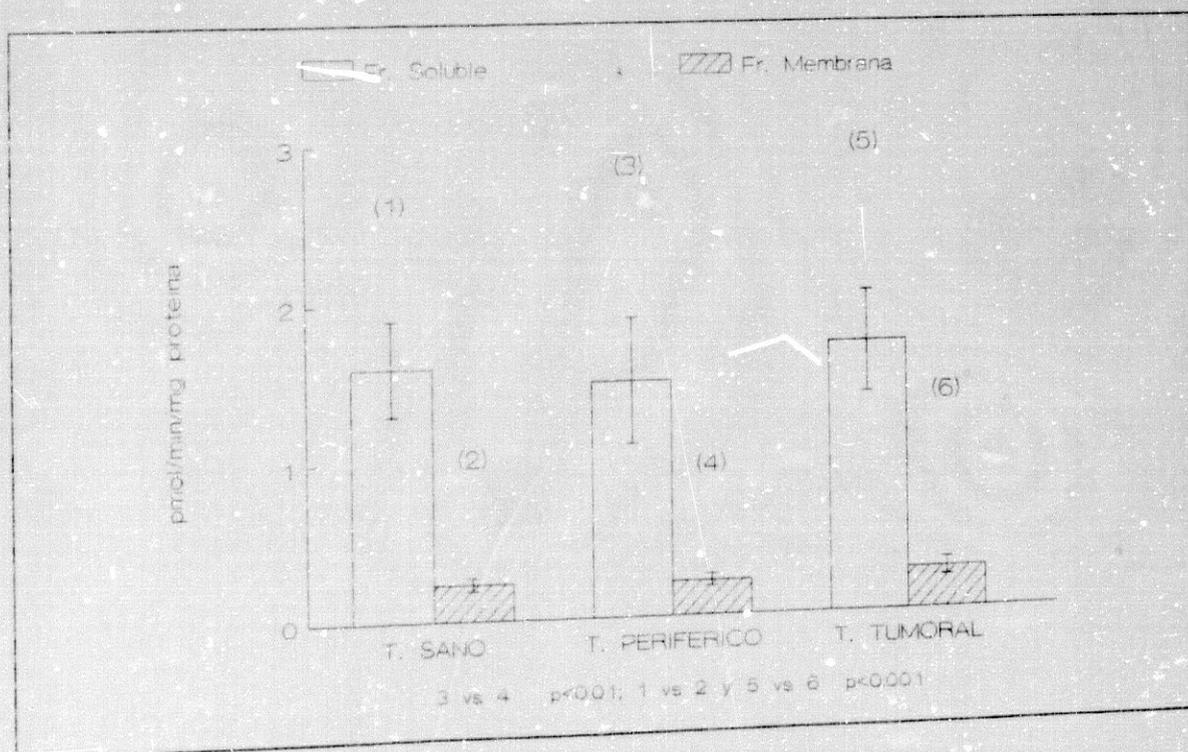


Valores individuales (tabla IV) y representación gráfica (figura 4) de la actividad cistínica aminopeptidasa medida en la fracción soluble y de membrana y su comparación estadística (test "t" de Student para comparación de muestras apareadas) en tejido sano, periférico y tumoral.

Tabla IV

Caso Nº	Tejido Sano		Tejido Periférico		Tejido Tumoral	
	F. Soluble	F. Membrana	F. Soluble	F. Membrana	F. Soluble	F. Membrana
1	0.57	0.17	0.52	0.13	1.41	0.15
2	1.38	0.11	1.07	0.09	1.95	0.08
3	0.20	0.15	0.11	0.14	0.41	0.26
4	0.95	0.05	0.69	0.04	1.21	0.03
5	1.85	0.20	1.33	0.46	2.29	0.46
6	2.26	0.46	1.47	0.33	2.87	0.56
7	1.33	0.50	0.89	0.21	0.76	0.09
8	1.70	0.18	1.03	0.15	1.43	0.20
9	3.96	0.13	5.08	0.18	4.16	0.33
10	1.58	0.40	2.07	0.35	1.52	0.55
11	1.84	0.16	2.21	0.26	0.93	0.15
X	1.60	0.23	1.50	0.22	1.72	0.26
SEM	0.30	0.046	0.40	0.038	0.32	0.057

Figura 4

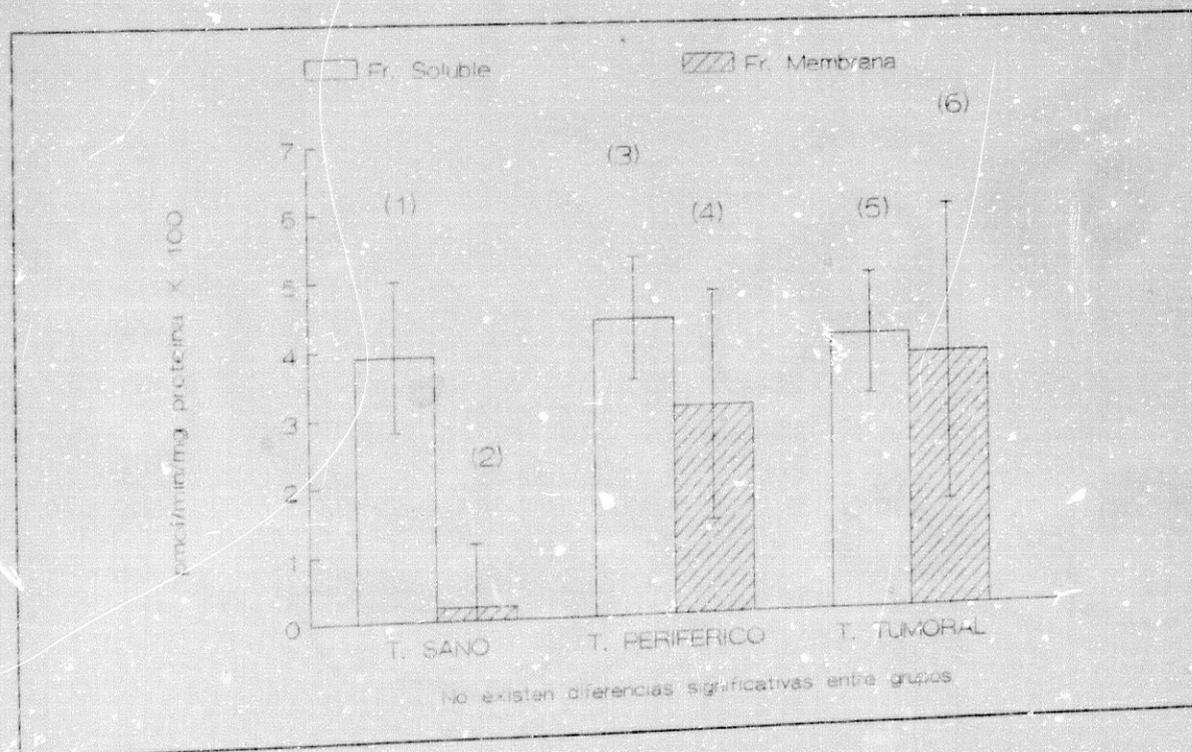


Valores individuales (tabla V) y representación gráfica (figura 5) de la actividad proteolítica aminopeptidasa medida en la fracción soluble y de membrana y su comparación estadística (test "t" de Student para comparación de muestras apareadas) en tejido sano, periférico y tumoral.

Tabla V

Caso Nº	Tejido Sano		Tejido Periférico		Tejido Tumoral	
	F. Soluble	F. Membrana	F. Soluble	F. Membrana	F. Soluble	F. Membrana
1	0.014	0.0010	0.020	0.0010	0.025	0.0010
2	0.022	0.0020	0.018	0.0015	0.002	0.0030
3	0.003	0.0015	0.001	0.0012	0.009	0.0018
4	0.029	0.0010	0.027	0.0082	0.036	0.0110
5	0.016	0.0080	0.082	0.0050	0.074	0.0060
6	0.030	0.0650	0.025	0.1700	0.030	0.2300
7	0.090	0.0210	0.060	0.0040	0.050	0.0030
8	0.108	0.0020	0.087	0.0030	0.096	0.0040
9	0.081	0.0010	0.101	0.0010	0.084	0.0030
10	0.024	0.0950	0.038	0.1190	0.032	0.1110
11	0.020	0.0240	0.024	0.0230	0.012	0.0470
X	0.039	0.0200	0.044	0.0310	0.041	0.0380
SEM	0.011	0.0095	0.009	0.0170	0.009	0.0220

Figura 5

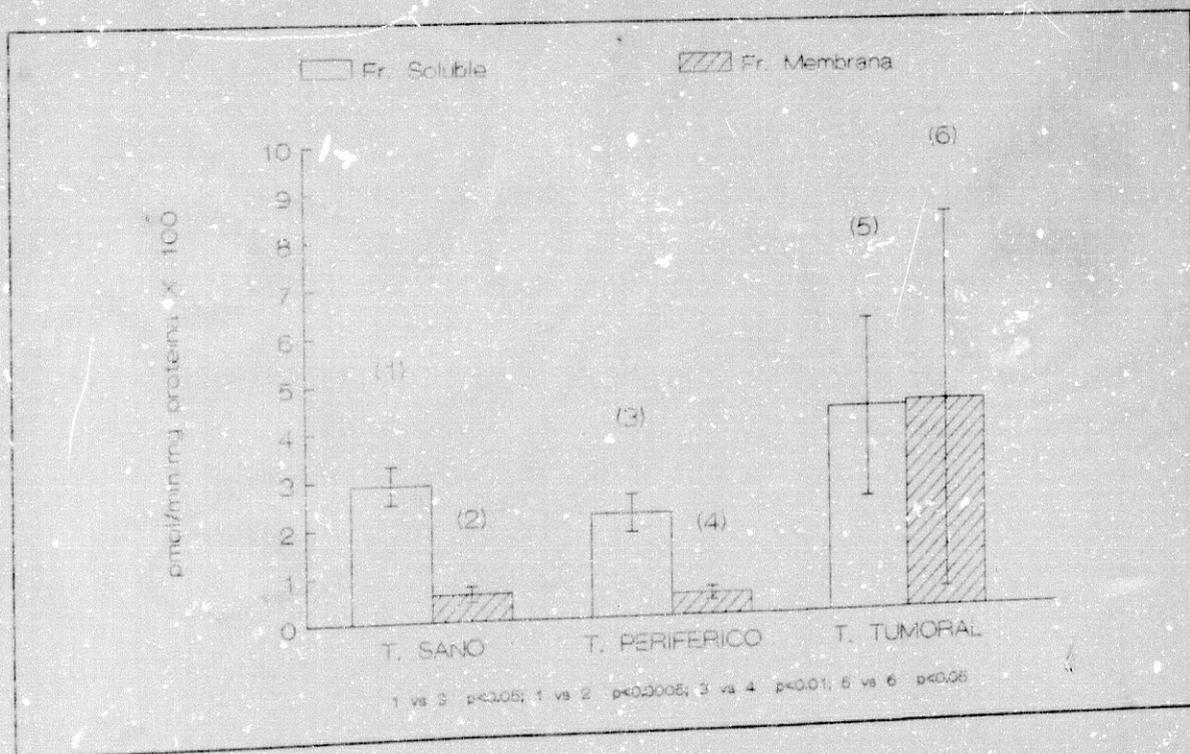


Valores individuales (tabla VI) y representación gráfica (figura 6) de la actividad piroglutamil aminopeptidasa medida en la fracción soluble y de membrana y su comparación estadística (test "t" de Student para comparación de muestras apareadas) en tejido sano, periférico y tumoral.

Tabla VI

Caso Nº	Tejido Sano		Tejido Periférico		Tejido Tumoral	
	F. Soluble	F. Membrana	F. Soluble	F. Membrana	F. Soluble	F. Membrana
1	0.030	0.0050	0.032	0.0030	0.060	0.0060
2	0.042	0.0070	0.048	0.0008	0.220	0.0060
3	0.018	0.0020	0.022	0.0010	0.023	0.0040
4	0.050	0.0140	0.030	0.0010	0.080	0.0020
5	0.024	0.0045	0.023	0.0022	0.006	0.0050
6	0.017	0.0040	0.015	0.0150	0.009	0.0070
7	0.021	0.0030	0.011	0.0020	0.007	0.0038
8	0.014	0.0001	0.007	0.0030	0.026	0.0002
9	0.042	0.0170	0.022	0.0130	0.025	0.4400
10	0.014	0.0050	0.008	0.0050	0.008	0.0090
11	0.044	0.0010	0.022	0.0030	0.007	0.0030
\bar{X}	0.029	0.0057	0.022	0.0045	0.043	0.0440
SEM	0.004	0.0016	0.004	0.0015	0.019	0.0400

Figura 6

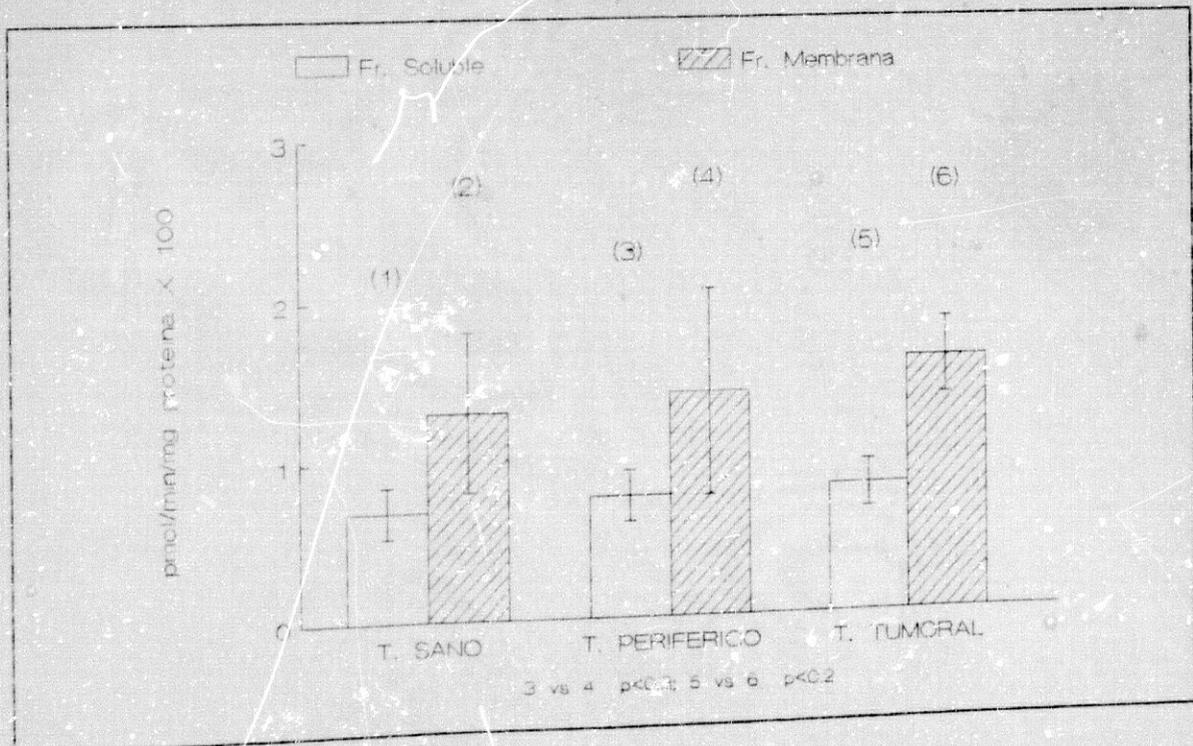


Valores individuales (tabla VII) y representación gráfica (figura 7) de la actividad aspartil aminopeptidasa medida en la fracción soluble y de membrana y su comparación estadística (test "t" de Student para comparación de muestras apareadas) en tejido sano, periférico y tumoral.

Tabla VII

Caso Nº	Tejido Sano		Tejido Periférico		Tejido Tumoral	
	F. Soluble	F. Membrana	F. Soluble	F. Membrana	F. Soluble	F. Membrana
1	0.0052	0.0068	0.0048	0.0050	0.0053	0.0073
2	0.0022	0.0036	0.0024	0.0086	0.0042	0.0100
3	0.0022	0.0041	0.0023	0.0080	0.0026	0.0070
4	0.0080	0.0170	0.0100	0.0250	0.0080	0.0100
5	0.0092	0.0200	0.0130	0.0770	0.0120	0.0300
6	0.0100	0.0075	0.0060	0.0062	0.0100	0.0100
7	0.0190	0.0600	0.0140	0.0040	0.0130	0.0040
8	0.0060	0.0050	0.0070	0.0040	0.0070	0.0080
9	0.0110	0.0050	0.0170	0.0040	0.0190	0.0220
10	0.0010	0.0090	0.0050	0.0140	0.0040	0.0150
11	0.0010	0.0030	0.0020	0.0030	0.0030	0.0040
\bar{X}	0.0068	0.0130	0.0076	0.0140	0.0080	0.0160
SEM	0.0016	0.0050	0.0016	0.0065	0.0015	0.0024

Figura 7

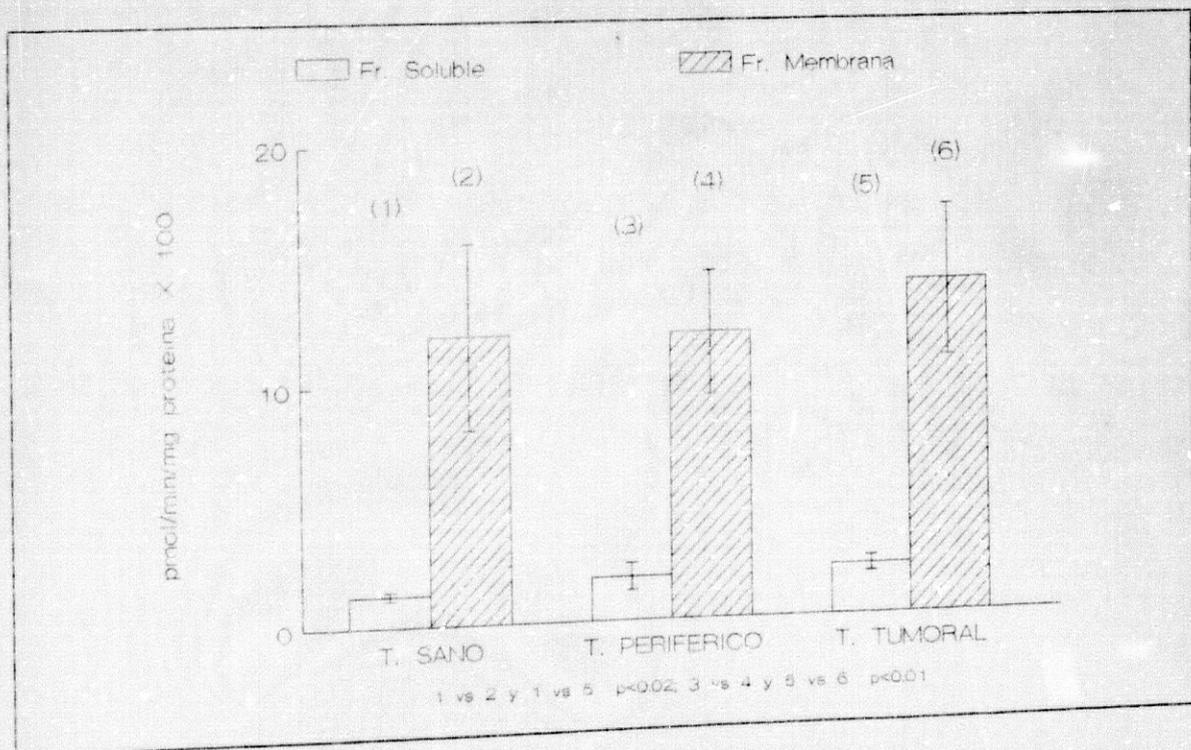


Valores individuales (tabla VIII) y representación gráfica (figura 8) de la actividad gammaglutamyl aminopeptidasa medida en la fracción soluble y de membrana y su comparación estadística (test "t" de Student para comparación de muestras apareadas) en tejido sano, periférico y tumoral.

Tabla VIII

Caso NO	Tejido Sano		Tejido Periférico		Tejido Tumoral	
	F. Soluble	F. Membrana	F. Soluble	F. Membrana	F. Soluble	F. Membrana
1	0.016	0.082	0.014	0.078	0.018	0.121
2	0.014	0.127	0.012	0.137	0.019	0.401
3	0.011	0.049	0.019	0.046	0.028	0.085
4	0.003	0.054	0.006	0.065	0.005	0.044
5	0.020	0.101	0.028	0.058	0.023	0.153
6	0.006	0.075	0.004	0.071	0.023	0.093
7	0.019	0.496	0.013	0.330	0.012	0.092
8	0.006	0.053	0.007	0.053	0.006	0.066
9	0.018	0.175	0.022	0.114	0.040	0.144
10	0.016	0.108	0.069	0.211	0.033	0.280
11	0.009	0.066	0.005	0.104	0.025	0.069
X	0.013	0.12	0.018	0.12	0.021	0.14
SEM	0.0018	0.039	0.0056	0.026	0.0032	0.032

Figura 8

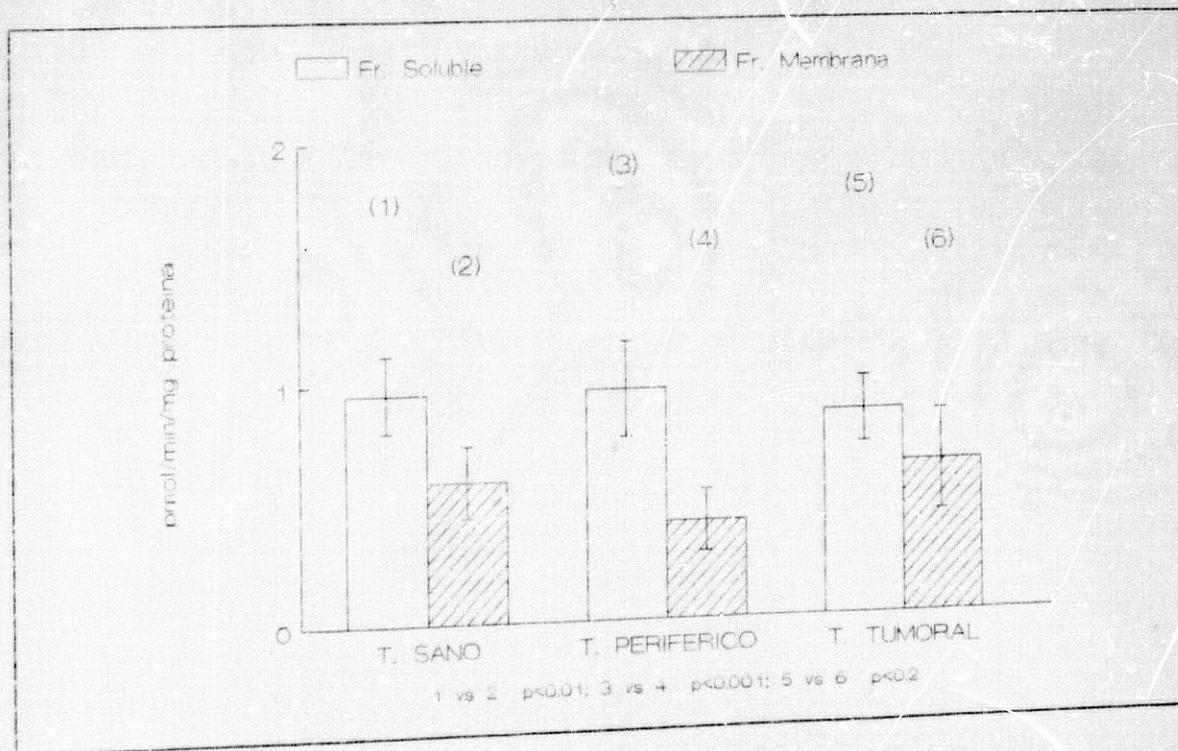


Valores individuales (tabla IX) y representación gráfica (figura 9) de la actividad glicil/arginil amino peptidasa (dipeptidil peptidasa I) medida en la fracción soluble y de membrana y su comparación estadística (test "t" de Student para comparación de muestras apareadas) en tejido sano, periférico y tumoral.

Tabla IX

Caso Nº	Tejido Sano		Tejido Periférico		Tejido Tumoral	
	F. Soluble	F. Membrana	F. Soluble	F. Membrana	F. Soluble	F. Membrana
1	0.723	0.563	0.766	0.502	0.741	0.608
2	0.815	1.045	1.344	0.565	0.707	0.945
3	0.653	0.333	0.896	0.229	0.935	0.521
4	0.536	0.614	0.343	0.341	0.389	0.459
5	1.888	0.805	2.746	1.611	1.360	1.611
6	0.990	0.170	0.940	0.110	1.440	0.200
7	0.990	0.560	0.640	0.260	0.450	0.170
8	0.813	0.287	0.546	0.101	0.416	0.055
9	2.111	1.851	1.273	0.555	1.706	2.222
10	0.653	0.190	0.589	0.140	0.604	0.180
11	0.409	0.071	0.573	0.143	0.666	0.058
X	0.96	0.59	0.97	0.41	0.86	0.64
SEM	0.16	0.15	0.20	0.13	0.14	0.21

Figura 9

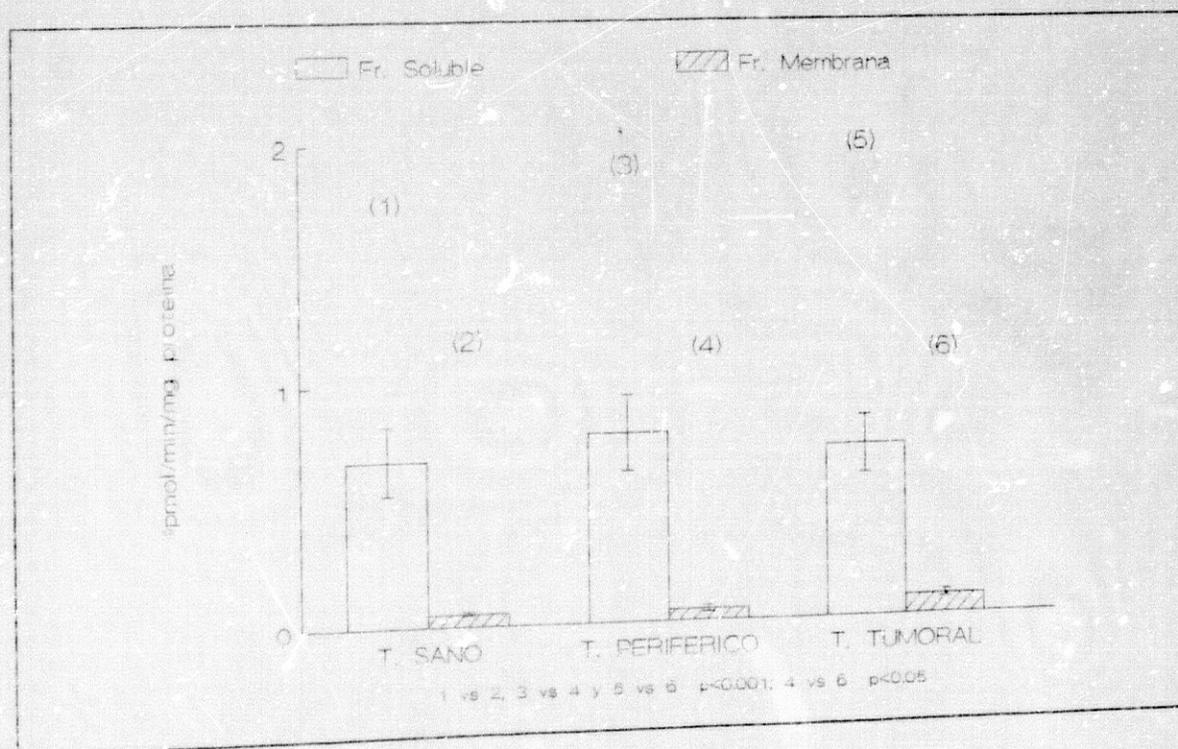


Valores individuales (tabla X) y representación gráfica (figura 10) de la actividad lisil/alaninil aminopeptidasa (dipeptidil peptidasa II) medida en la fracción soluble y de membrana y su comparación estadística (test "t" de Student para comparación de muestras apareadas) en tejido sano, periférico y tumoral.

Tabla X

Caso Nº	Tejido Sano		Tejido Periférico		Tejido Tumoral	
	F. Soluble	F. Membrana	F. Soluble	F. Membrana	F. Soluble	F. Membrana
1	0.480	0.068	0.611	0.050	0.543	0.140
2	0.680	0.086	1.150	0.044	0.592	0.077
3	0.235	0.065	0.293	0.041	0.374	0.150
4	0.454	0.050	0.779	0.029	0.539	0.043
5	1.580	0.069	1.920	0.161	1.400	0.161
6	0.370	0.020	0.240	0.030	0.680	0.040
7	1.190	0.096	1.158	0.005	1.165	0.020
8	0.698	0.023	0.960	0.003	0.861	0.016
9	0.021	0.009	0.007	0.007	0.010	0.131
10	0.723	0.066	0.681	0.083	0.752	0.083
11	1.110	0.026	0.930	0.044	1.020	0.019
\bar{X}	0.69	0.053	0.79	0.045	0.72	0.080
SEM	0.14	0.0087	0.16	0.014	0.12	0.017

Figura 10

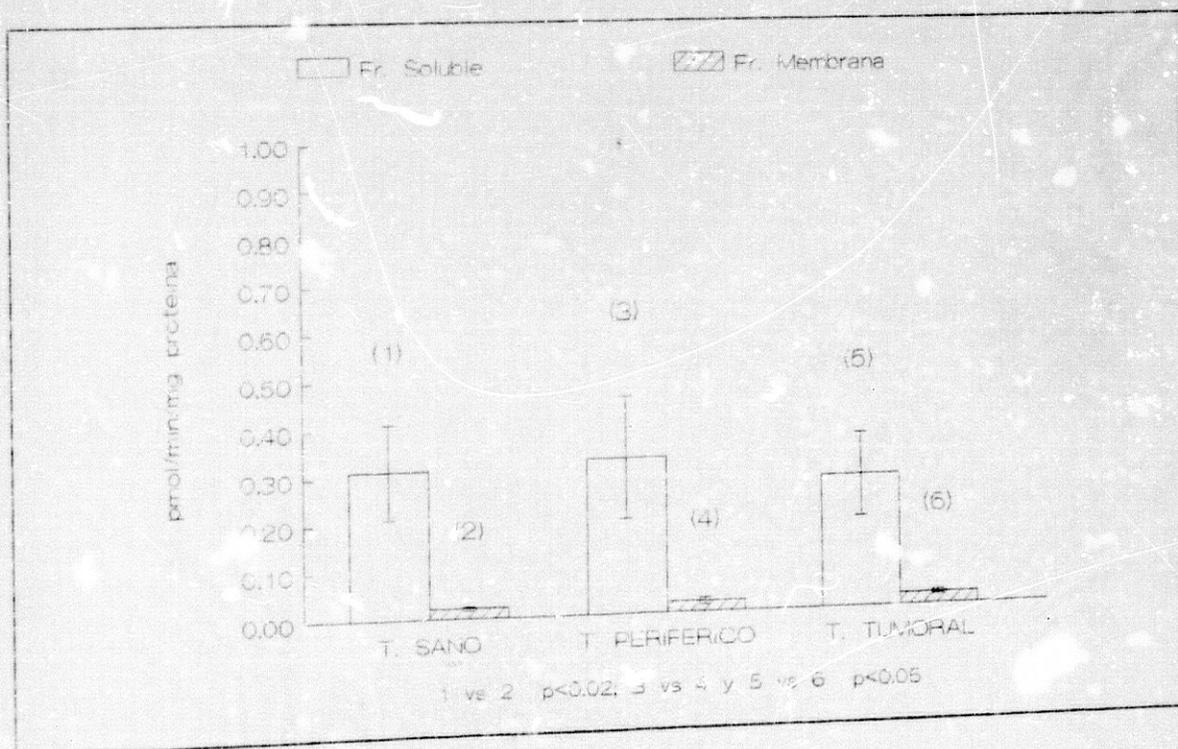


Valores individuales (tabla XI) y representación gráfica (figura 11) de la actividad arginil/arginil aminopeptidasa (dipeptidil peptidasa III) medida en la fracción soluble y de membrana y su comparación estadística (test "t" de Student para comparación de muestras apareadas) en tejido sano, periférico y tumoral.

Tabla XI

Caso	Tejido Sano		Tejido Periférico		Tejido Tumoral	
	F. Soluble	F. Membrana	F. Soluble	F. Membrana	F. Soluble	F. Membrana
1	0.089	0.021	0.032	0.028	0.164	0.025
2	0.704	0.032	1.094	0.007	0.647	0.005
3	0.021	0.010	0.007	0.008	0.028	0.017
4	0.293	0.009	0.062	0.009	0.493	0.006
5	0.083	0.030	0.476	0.061	0.106	0.040
6	0.068	0.030	0.046	0.003	0.083	0.045
7	1.021	0.034	0.994	0.009	0.806	0.023
8	0.503	0.006	0.031	0.003	0.051	0.005
9	0.588	0.010	0.813	0.009	0.665	0.010
10	0.019	0.022	0.059	0.078	0.022	0.063
11	0.020	0.014	0.024	0.025	0.019	0.031
\bar{X}	0.31	0.020	0.33	0.022	0.28	0.024
SEM	0.10	0.0031	0.13	0.0075	0.09	0.0057

Figura 11

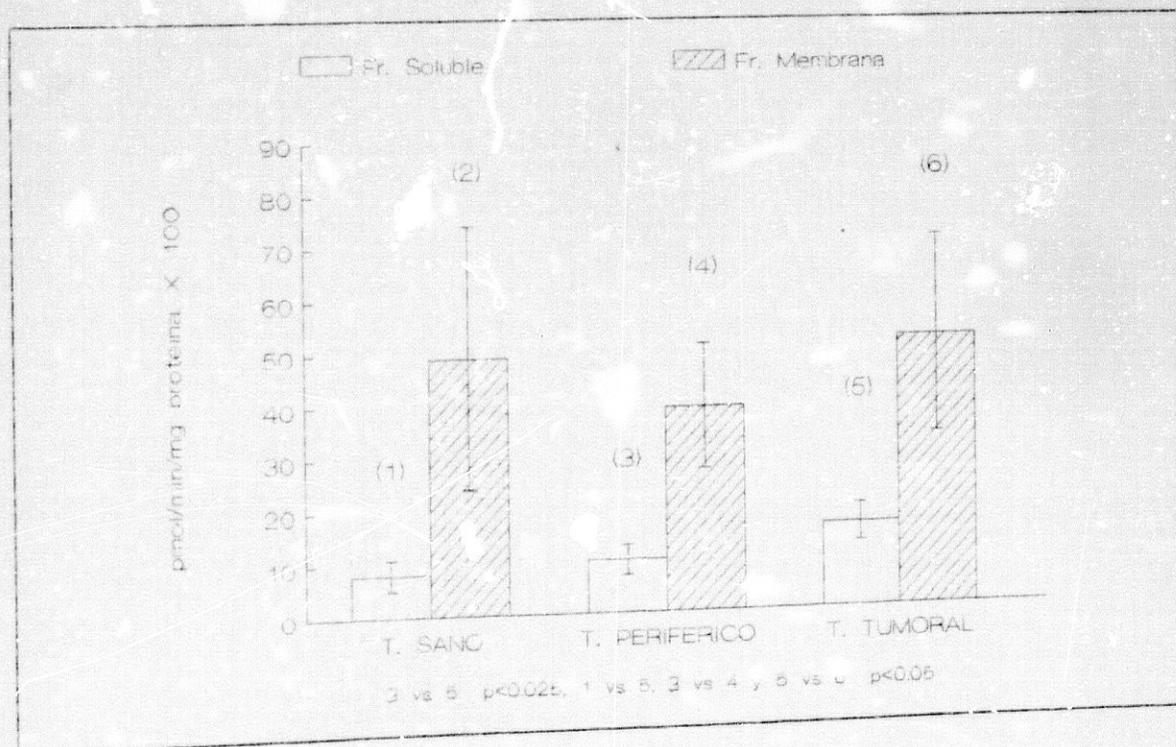


Valores individuales (tabla XII) y representación gráfica (figura 12) de la actividad glicil/propil (dipeptidil peptidasa IV) aminopeptidasa medida en la fracción soluble y de membrana y su comparación estadística (test "t" de Student para comparación de muestras apareadas) en tejido sano, periférico y tumoral.

Tabla XII

Caso No	Tejido Sano		Tejido Periférico		Tejido Tumoral	
	F. Soluble	F. Membrana	F. Soluble	F. Membrana	F. Soluble	F. Membrana
1	0.053	0.189	0.062	0.266	0.116	0.192
2	0.053	0.117	0.065	0.121	0.109	0.179
3	0.025	0.052	0.057	0.037	0.173	0.145
4	0.028	0.002	0.027	0.153	0.083	0.168
5	0.055	0.166	0.230	0.380	0.260	2.110
6	0.045	0.150	0.062	0.142	0.085	0.190
7	0.275	0.626	0.130	1.313	0.112	0.345
8	0.025	0.130	0.015	0.074	0.047	0.122
9	0.277	1.481	0.271	0.972	0.476	1.220
10	0.021	0.204	0.150	0.500	0.108	0.670
11	0.029	0.152	0.073	0.277	0.166	0.416
x	0.080	0.49	0.10	0.39	0.16	0.52
SEM	0.029	0.25	0.029	0.12	0.036	0.19

Figura 12

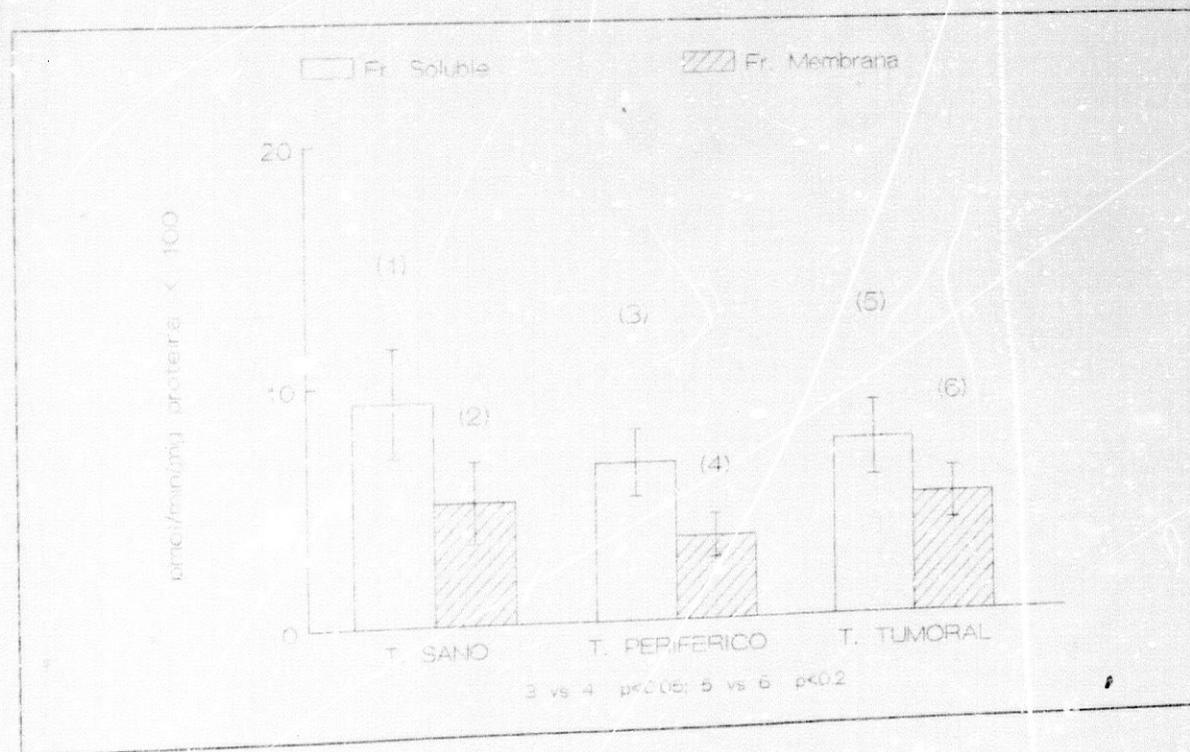


valores individuales (tabla XIII) y representación gráfica (figura 13) de la actividad alfa-glutamil aminopeptidasa medida en la fracción soluble y de membrana y su comparación estadística (test "t" de Student para comparación de muestras apareadas) en tejido sano, periférico y tumoral.

Tabla XIII

Caso Nº	Tejido Sano		Tejido Periférico		Tejido Tumoral	
	F. Soluble	F. Membrana	F. Soluble	F. Membrana	F. Soluble	F. Membrana
1	0.027	0.006	0.029	0.009	0.044	0.009
2	0.042	0.038	0.045	0.029	0.055	0.041
3	0.023	0.024	0.011	0.017	0.028	0.054
4	0.177	0.196	0.142	0.042	0.124	0.090
5	0.166	0.015	0.063	0.013	0.071	0.021
6	0.066	0.110	0.060	0.100	0.084	0.110
7	0.229	0.031	0.093	0.074	0.083	0.041
8	0.127	0.062	0.114	0.054	0.127	0.113
9	0.138	0.050	0.135	0.022	0.182	0.044
10	0.014	0.028	0.018	0.013	0.013	0.022
11	0.014	0.006	0.016	0.013	0.009	0.008
X	0.093	0.051	0.066	0.035	0.074	0.050
SEM	0.023	0.017	0.014	0.009	0.016	0.011

Figura 13



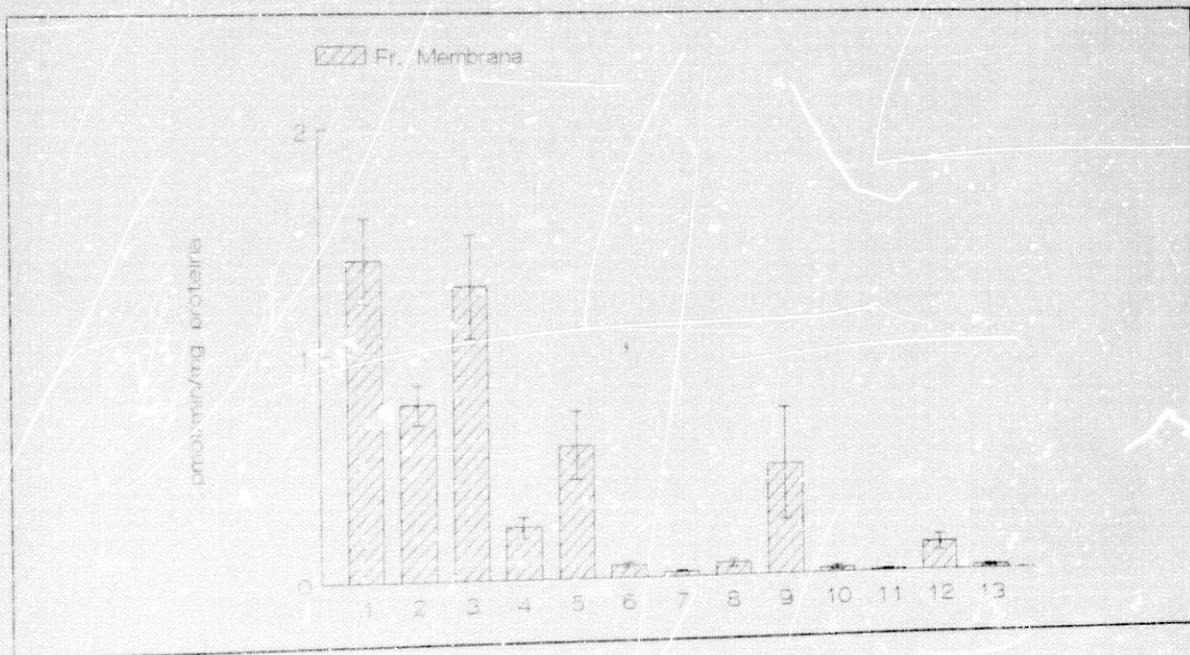
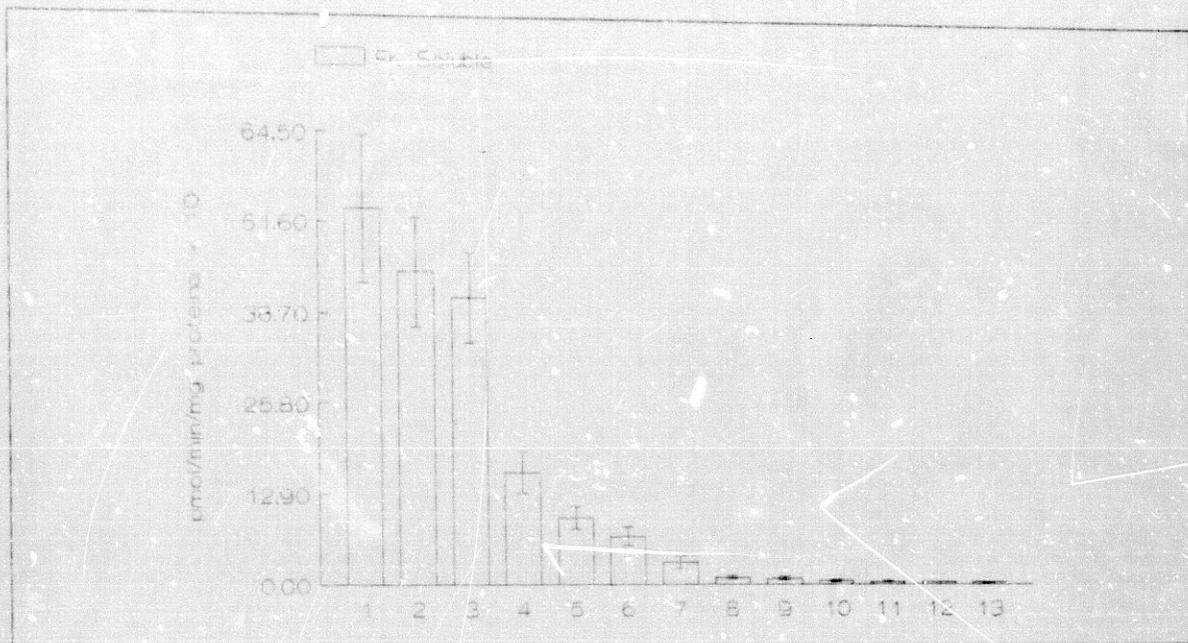


Figura 14.- Comparación de las distintas actividades aminopeptidasas medidas en la fracción soluble y de membrana del tejido sano.
 1 alanina. 2 arginina. 3 leucina. 4 cistina. 5 glicina/arginina. 6 lisina/alanina. 7 arginina/arginina. 8 alfa glutámico. 9 glicina/prolina. 10 prolina. 11 piroglutámico. 12 gamma glutámico. 13 aspártico.

TABLA XIV.- Matriz de los resultados del análisis de la varianza (ANOVA 1) de los valores de la actividad aminopeptidasa obtenidos de la fracción soluble del tejido sano.

LEU	t=0.34 n.s.	t=0.95 p<0.4	t=3.34 p<0.01	t=5.99 p<0.001	t=6.01 p<0.001	t=6.04 p<0.001	t=6.04 p<0.001	t=4.4 p<0.001	t=1.93 p<0.001	t=5.52 p<0.001	t=5.93 p<0.001	t=5.91 p<0.001
ARG	t=0.61 n.s.	t=3.26 p<0.01	t=5.41 p<0.001	t=5.42 p<0.001	t=5.45 p<0.001	t=5.44 p<0.001	t=4.19 p<0.001	t=4.55 p<0.001	t=5.03 p<0.001	t=5.35 p<0.001	t=5.34 p<0.001	
ALA		t=3.43 p<0.01	t=5.13 p<0.001	t=5.14 p<0.001	t=5.16 p<0.001	t=5.15 p<0.001	t=4.16 p<0.001	t=4.45 p<0.001	t=4.83 p<0.001	t=5.08 p<0.001	t=5.07 p<0.001	
CYS			t=5.01 p<0.001	t=5.05 p<0.001	t=5.12 p<0.001	t=5.10 p<0.001	t=1.80 p<0.1	t=2.67 p<0.02	t=3.92 p<0.001	t=4.86 p<0.001	t=4.83 p<0.001	
PRO				t=0.92 p<0.4	t=2.90 p<0.01	t=2.39 p<0.05	t=5.35 p<0.001	t=4.47 p<0.001	t=2.47 p<0.05	t=1.24 p<0.3	t=1.99 p<0.1	
p-GLU					t=4.78 p<0.001	t=3.49 p<0.01	t=5.42 p<0.001	t=4.56 p<0.001	t=2.58 p<0.02	t=1.67 p<0.2	t=2.60 p<0.02	
ASP						t=2.27 p<0.05	t=5.55 p<0.001	t=4.71 p<0.001	t=2.78 p<0.02	t=2.39 p<0.05	t=3.54 p<0.01	
g-GLU							t=5.52 p<0.001	t=4.67 p<0.001	t=2.73 p<0.02	t=2.20 p<0.05	t=3.30 p<0.01	
GLI- ARG								t=1.23 p<0.3	t=3.20 p<0.01	t=5.04 p<0.001	t=5.00 p<0.001	
LYS- ALA									t=2.08 p<0.05	t=4.11 p<0.001	t=4.05 p<0.001	
ARG- ARG										t=2.03 p<0.01	t=1.94 p<0.1	
GLY- PRO											t=0.32 n.s.	
a-GLU												

LEU ARG ALA CYS PRO p-GLU ASP g-GLU GLY- ARG LYS- ALA ARG- ARG GLY- PRO a-GLU

Se expresa en cada caso el valor de la t experimental y el nivel de significación, n. s. = no significativo. El valor de la F experimental es de 20.8065, para 12 grados de libertad entre muestras, siendo el valor de los grados de libertad en la comparación individual de 20.

TABLA XV.- Matriz de los resultados del análisis de la varianza (ANOVA 1) de los valores de la actividad aminopeptidasa obtenidos de la fracción de membrana del tejido sano.

LEU	t=2.01 p<0.1	t=0.38 n.s.	t=4.37 p<0.001	t=5.31 p<0.001	t=5.37 p<0.001	t=5.34 p<0.001	t=4.82 p<0.001	t=2.46 p<0.05	t=5.18 p<0.001	t=5.31 p<0.001	t=2.31 p<0.05	t=5.17 p<0.001	
ARG		t=2.94 p<0.01	t=5.35 p<0.001	t=8.24 p<0.001	t=6.44 p<0.001	t=8.35 p<0.001	t=6.55 p<0.001	t=1.04 p<0.4	t=7.90 p<0.001	t=8.29 p<0.001	t=1.08 p<0.1	t=7.80 p<0.001	
ALA			t=5.90 p<0.001	t=7.13 p<0.001	t=7.21 p<0.001	t=7.17 p<0.001	t=6.47 p<0.001	t=3.27 p<0.01	t=6.97 p<0.001	t=7.14 p<0.001	t=2.88 p<0.01	t=6.95 p<0.001	
CYS				t=4.25 p<0.001	t=4.64 p<0.001	t=4.47 p<0.001	t=1.66 p<0.2	t=2.15 p<0.05	t=3.60 p<0.01	t=4.34 p<0.001	t=0.99 p<0.4	t=3.46 p<0.01	
PRO					t=1.43 p<0.2	t=0.65 n.s.	t=2.46 p<0.05	t=3.52 p<0.01	t=2.40 p<0.05	t=0.03 n.s.	t=1.81 p<0.1	t=1.53 p<0.2	
p-GLU							t=1.29 p<0.3	t=2.88 p<0.01	t=3.62 p<0.01	t=5.03 p<0.001	t=3.80 p<0.01	t=1.86 p<0.1	t=2.56 p<0.02
ASP								t=2.69 p<0.02	t=3.57 p<0.01	t=3.76 p<0.01	t=1.13 p<0.3	t=1.84 p<0.1	t=2.08 p<0.05
g-GLU									t=2.80 p<0.02	t=1.70 p<0.2	t=2.53 p<0.02	t=1.39 p<0.2	t=1.62 p<0.2
GLI- ARG									t=3.32 p<0.01	t=3.53 p<0.01	t=0.34 n.s.	t=3.31 p<0.01	
LYS- ALA										t=3.36 p<0.01	t=1.68 p<0.2	t=5.44 p<0.001	
ARG- ARG											t=1.31 p<0.1	t=1.74 p<0.1	
GLY- PRO												t=1.69 p<0.2	
a-GLU													

LEU ARG ALA CYS PRO p-GLU ASP g-GLU GLY- LYS- ARG- GLY- a-GLU
ARG ALA ARG PRO

Se expresa en cada caso el valor de la t experimental y el nivel de significación, n. s. = no significativo. El valor de la F experimental es de 17.60, para 12 grados de libertad entre muestras, siendo el valor de los grados de libertad en la comparación individual de 20.

Tabla XVI.- Resultados de la comparación de los coeficientes de correlación de las actividades aminopeptidasas, medidas en la fracción soluble, que se citan, mediante la transformación de la r de Pearson en la Z de Fisher (n=11, n.s.=no significativo).

	T. sano	T. periférico	T. tumoral	Z_1-Z_2	SZ_1-Z_2	Significación
leu-pro	0.76	0.84	0.50	0.45	0.50	n.s.
leu-asp	0.60	0.83	0.71	0.20	0.50	n.s.
leu-gli/arg	0.67	0.47	0.37	0.43	0.50	n.s.
leu-gli/pro	0.81	0.83	0.51	0.95	0.50	n.s.
leu-aglu	0.64	0.55	0.71	0.14	0.50	n.s.
arg-pro	0.64	0.79	0.45	0.28	0.50	n.s.
arg-asp	0.43	0.75	0.70	0.40	0.50	n.s.
arg-gli/arg	0.70	0.52	0.40	0.46	0.50	n.s.
arg-aglu	0.51	0.48	0.67	0.05	0.50	n.s.

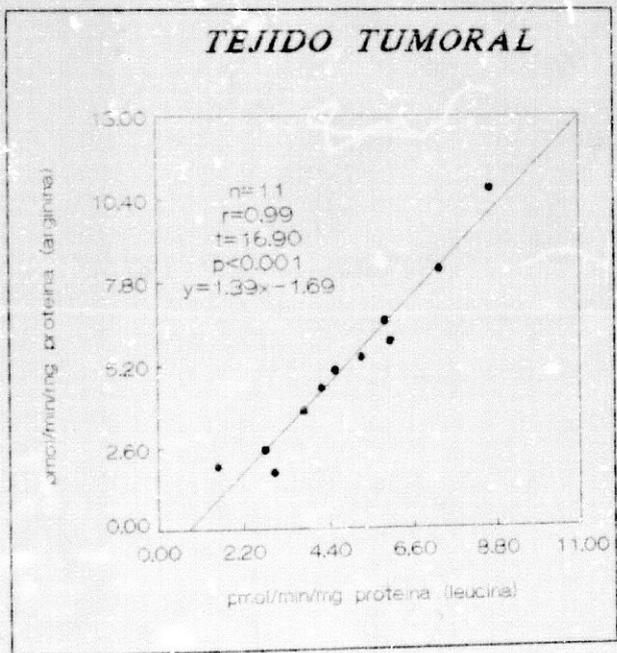
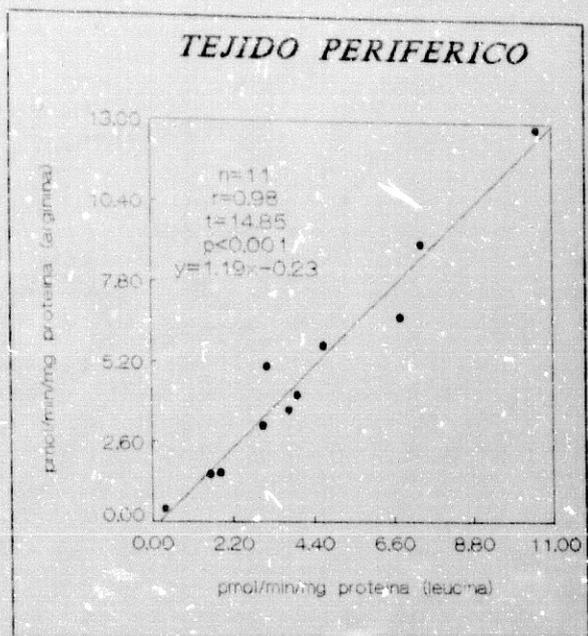
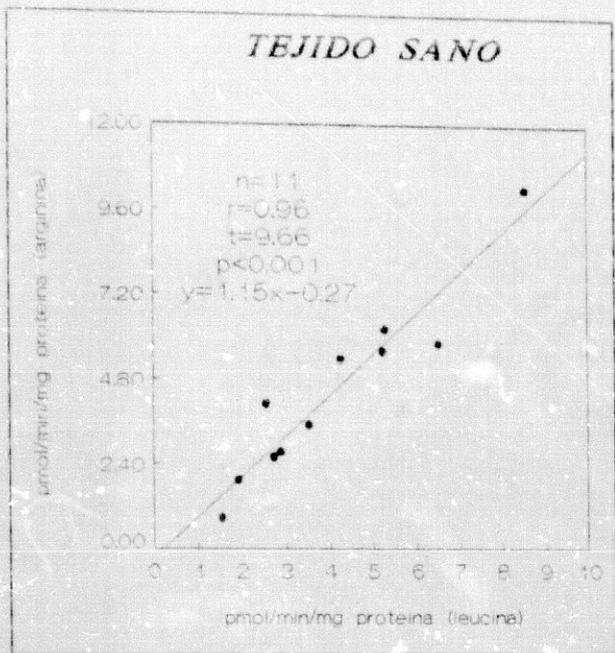


Figura 15.- Representación gráfica de la correlación lineal simple y directa de la actividad leucil aminopeptidasa con la actividad arginil aminopeptidasa medida en la fracción soluble de tejido sano, periférico y tumoral.

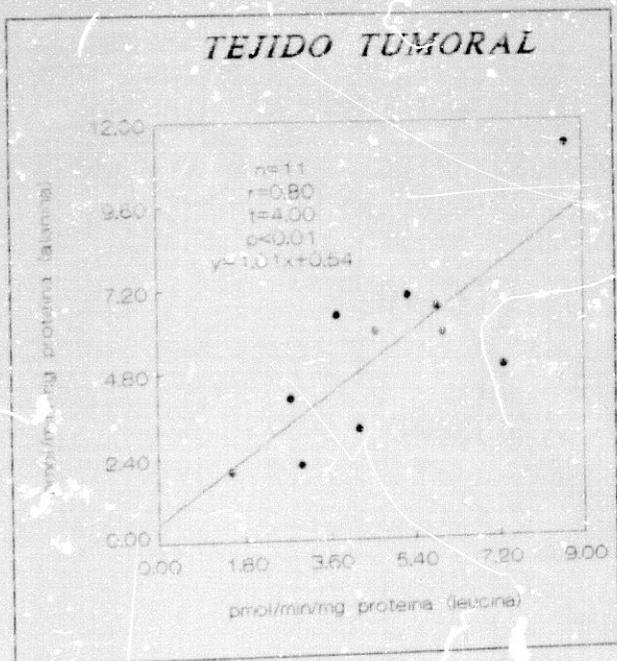
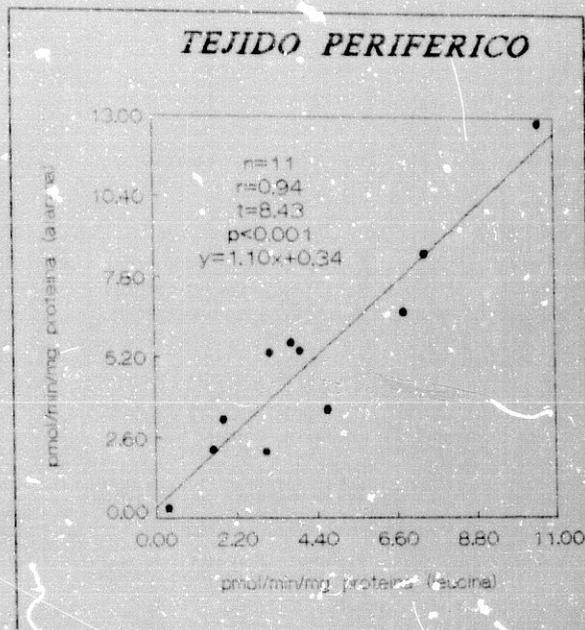
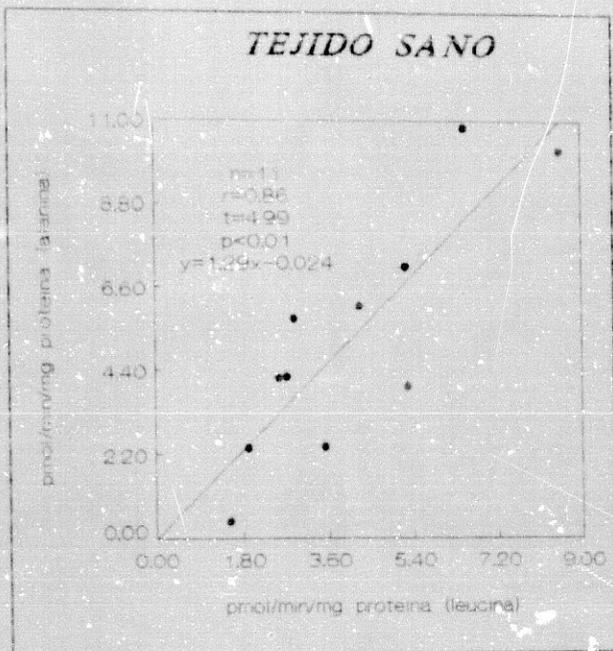


Figura 16.- Representación gráfica de la correlación lineal simple y directa de la actividad leucil aminopeptidasa con la actividad alanil aminopeptidasa medida en la fracción soluble de tejido sano, periférico y tumoral.

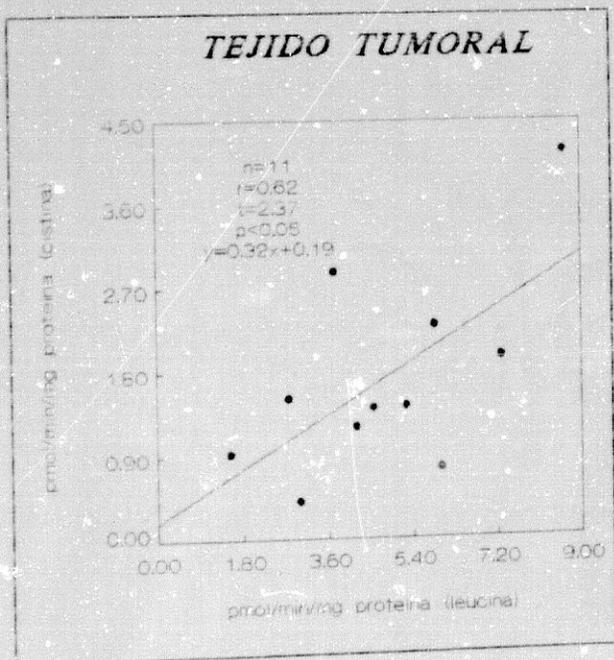
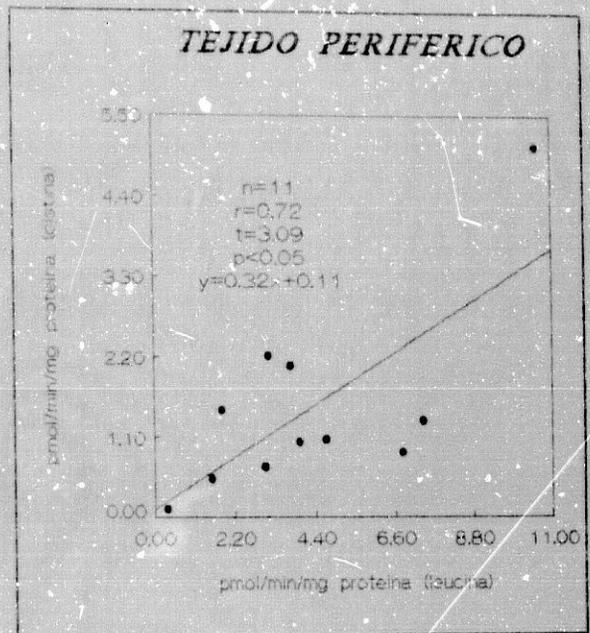
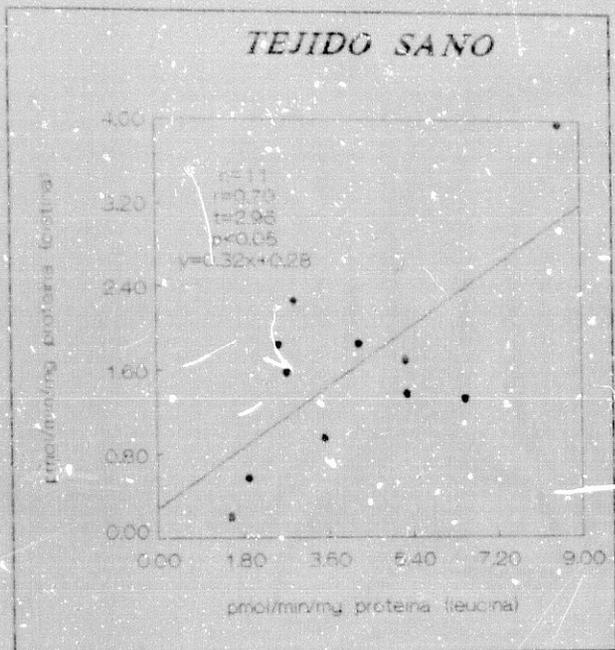


Figura 17.- Representación gráfica de la correlación lineal simple y directa de la actividad leucil aminopeptidasa con la actividad cistinil aminopeptidasa medida en la fracción soluble de tejido sano, periférico y tumoral.

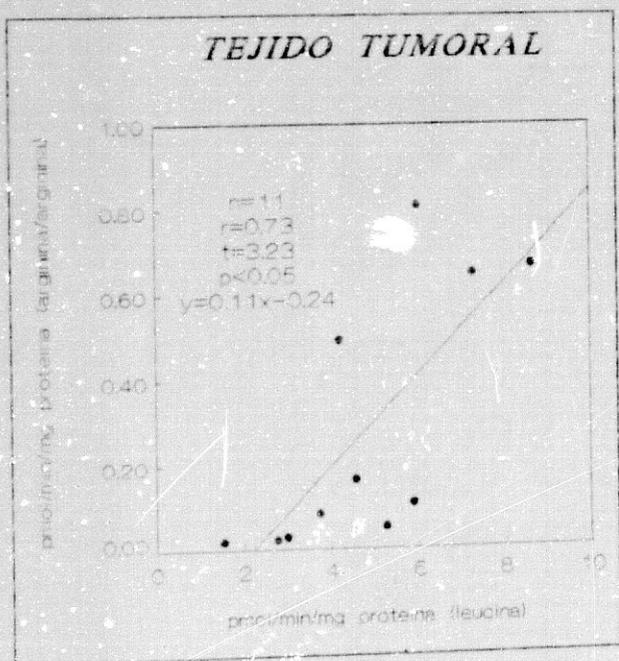
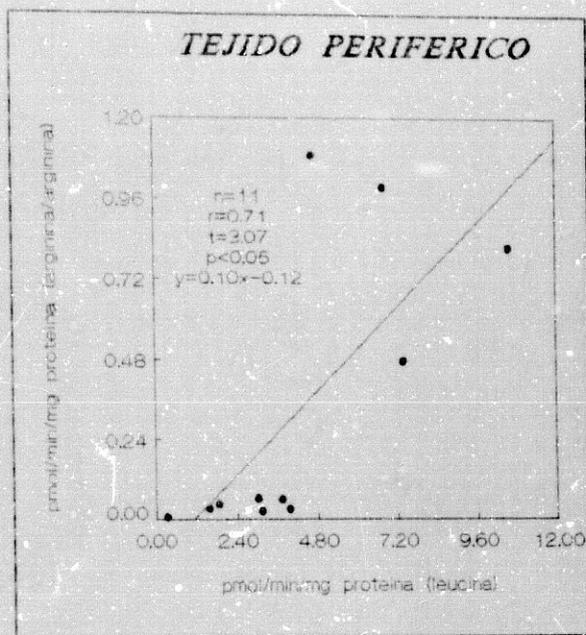
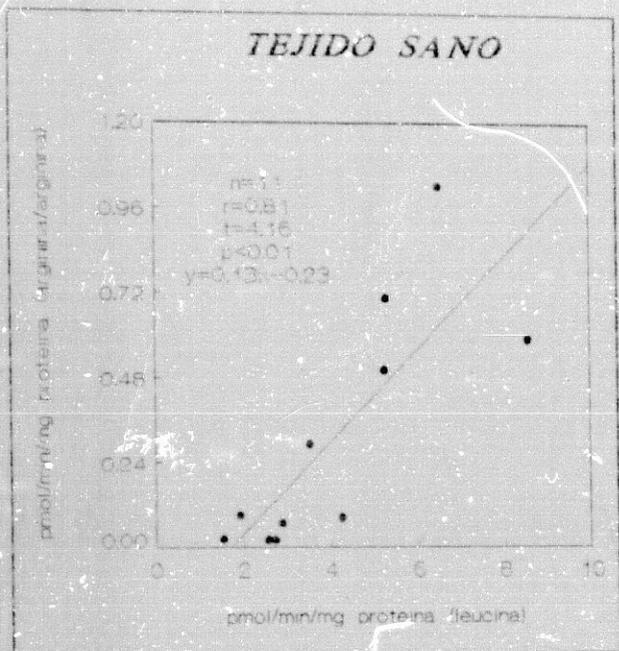
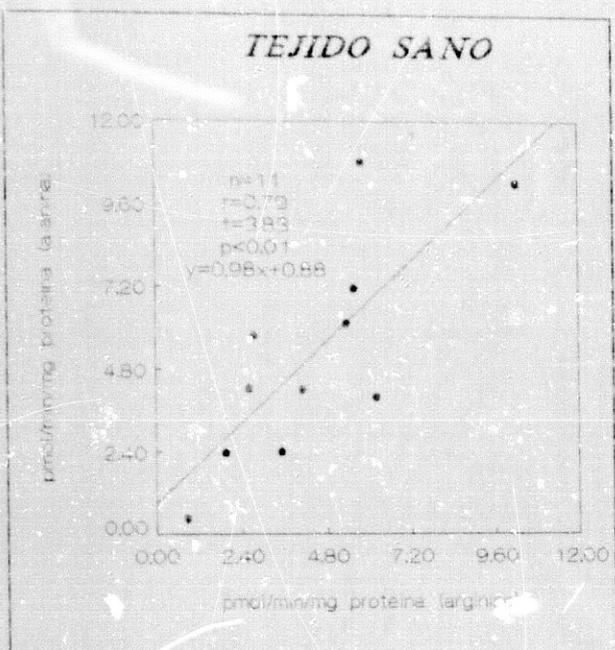
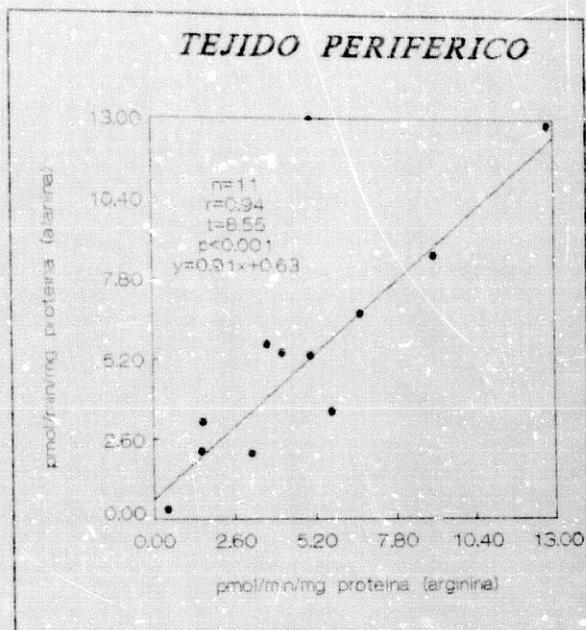


Figura 18.- Representación gráfica de la correlación lineal simple y directa de la actividad leucil aminopeptidasa con la actividad arginil/arginil aminopeptidasamedida en la fracción soluble de tejido sano, periférico y tumoral.

TEJIDO SANO



TEJIDO PERIFERICO



TEJIDO TUMORAL

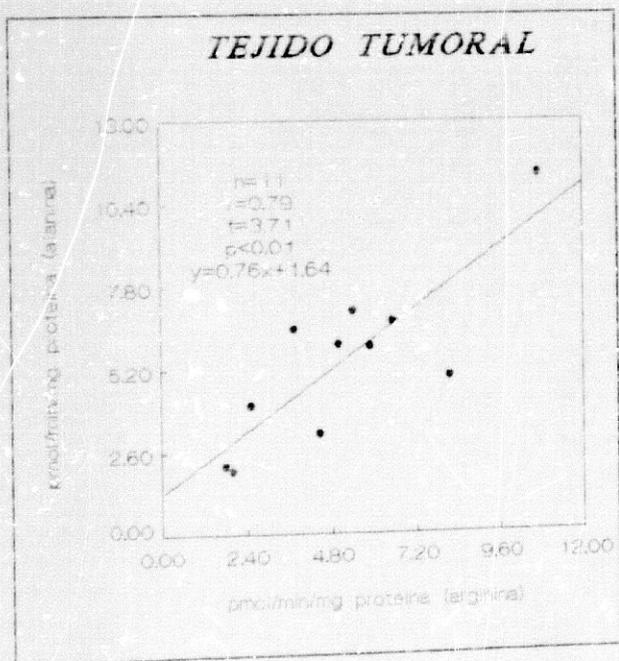


Figura 19.- Representación gráfica de la correlación lineal simple y directa de la actividad arginil aminopeptidasa con la actividad alanil aminopeptidasa medida en la fracción soluble de tejido sano, periférico y tumoral.

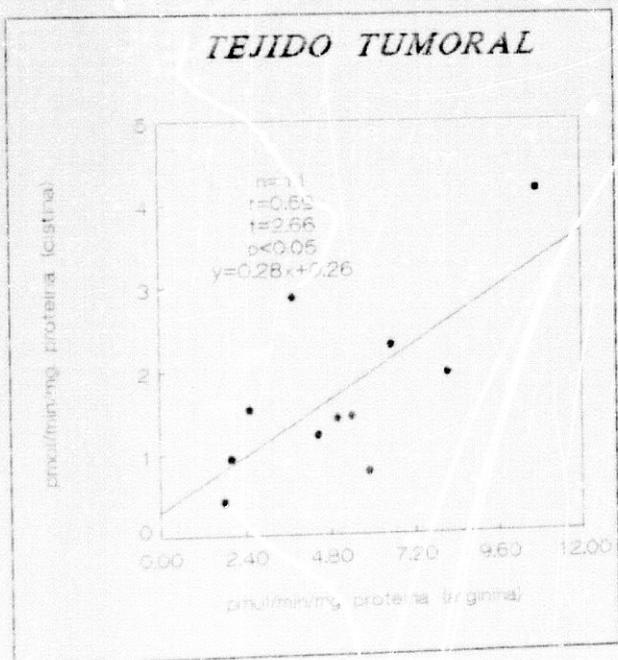
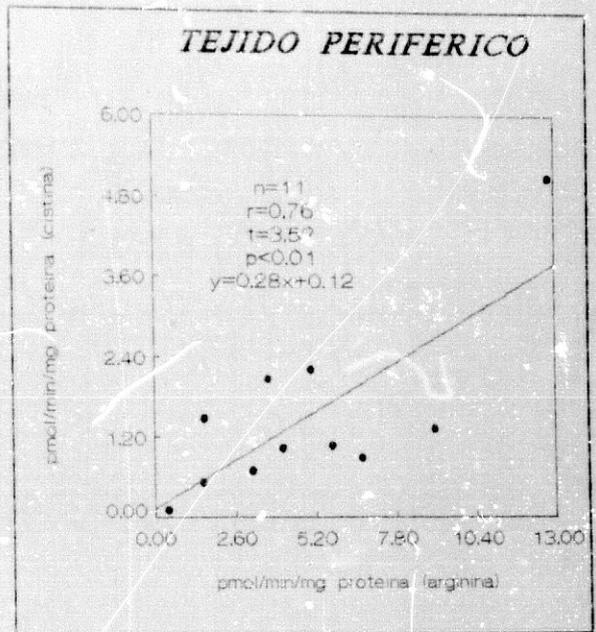
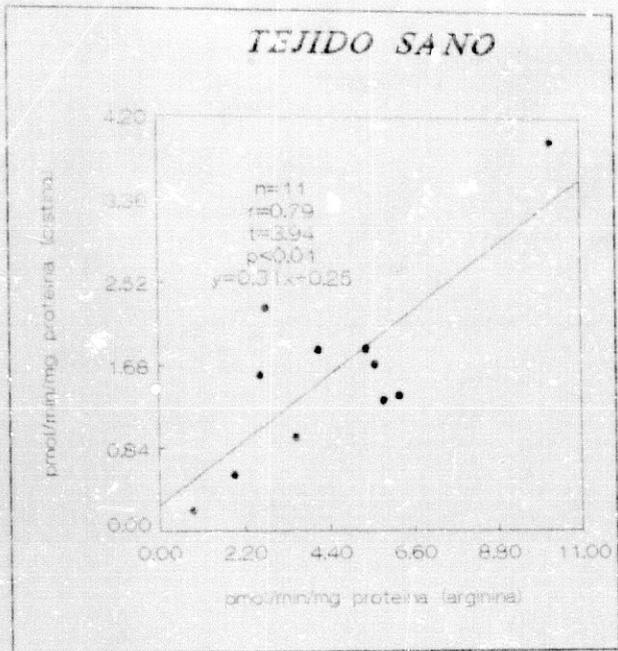


Figura 20. - Representación gráfica de la correlación lineal simple y directa de la actividad arginil aminopeptidasa con la actividad cistinil aminopeptidasa medida en la fracción soluble de tejido sano, periférico y tumoral.

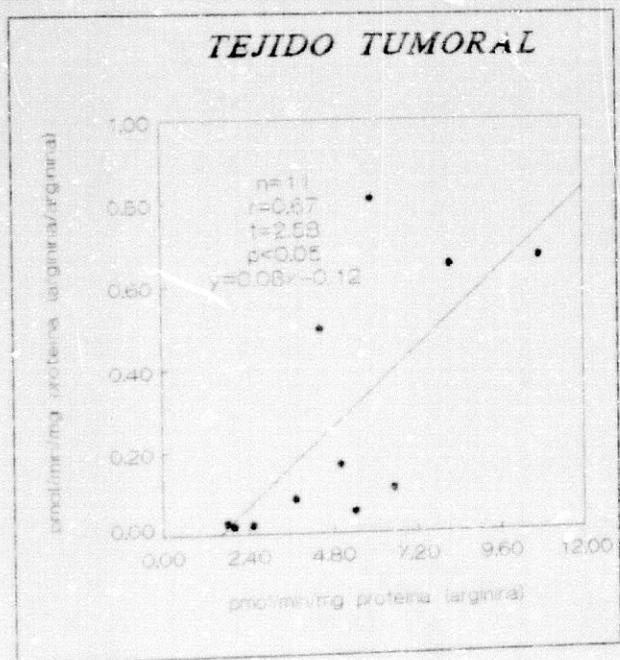
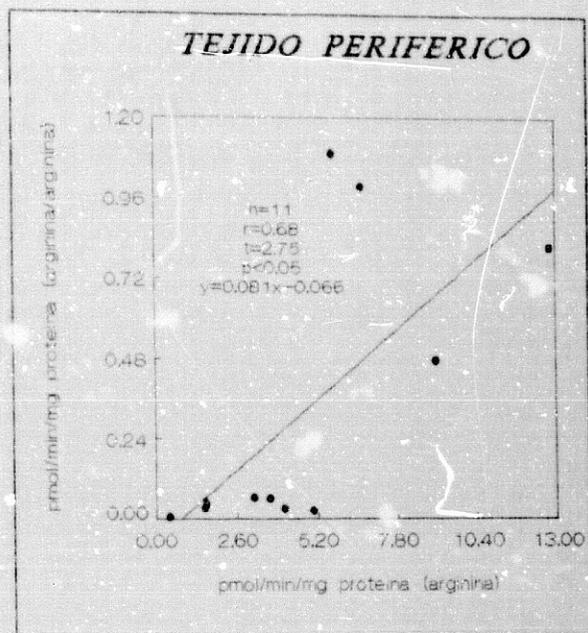
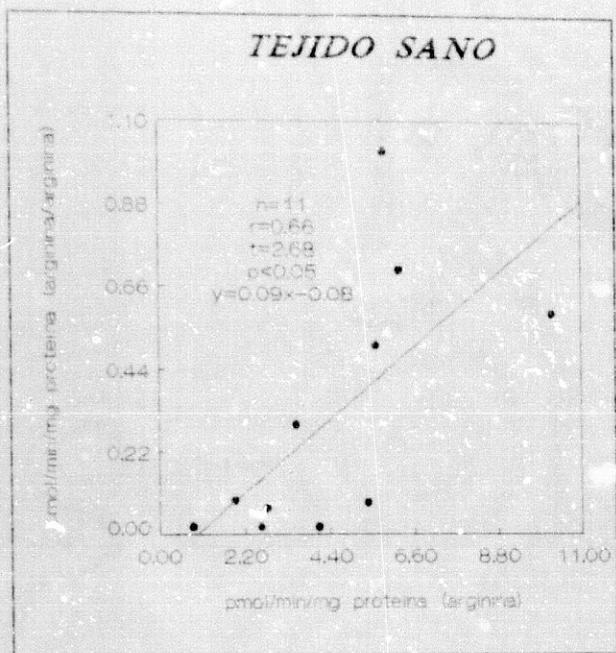


Figura 21.- Representación gráfica de la correlación lineal simple y directa de la actividad arginil amino-peptidasa con la actividad arginil/arginil amino-peptidasa medida en la fracción soluble de tejido sano, periférico y tumoral.

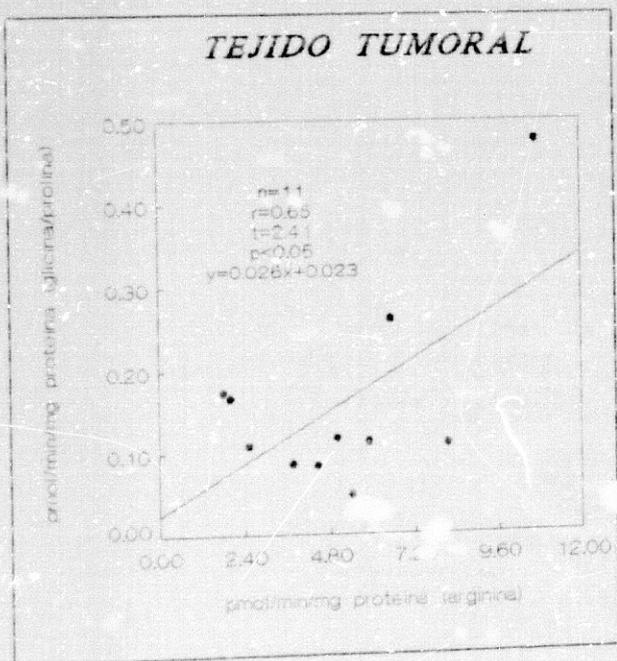
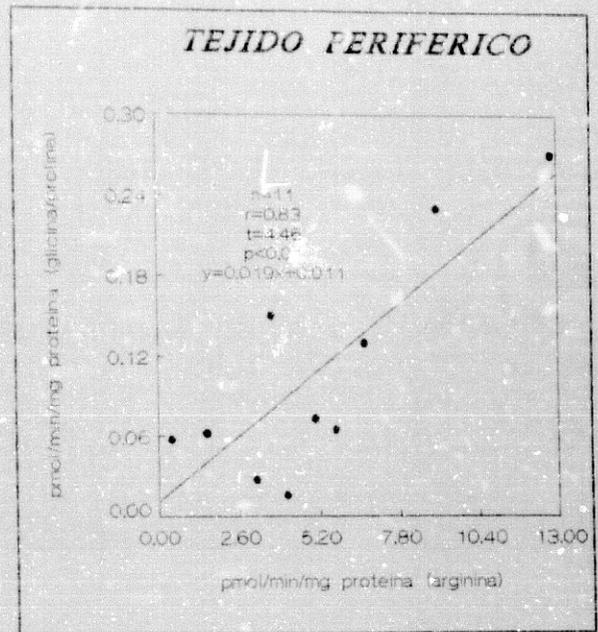
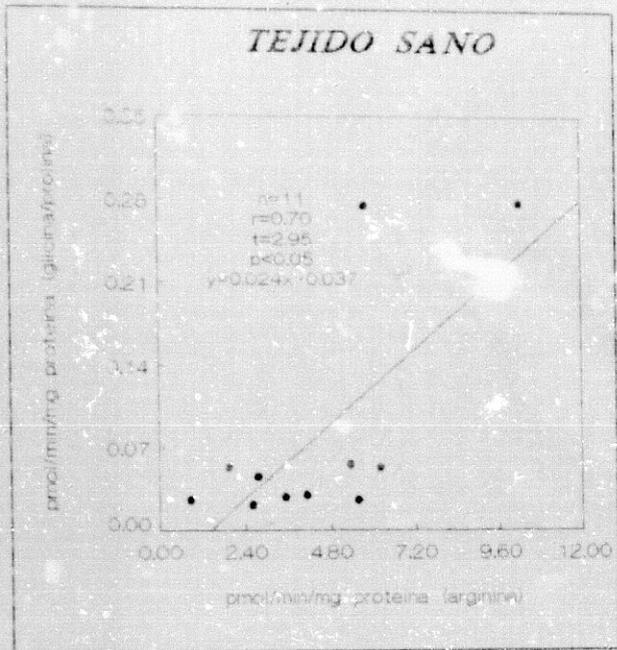


Figura 22.- Representación gráfica de la correlación lineal simple y directa de la actividad arginil amino-peptidasa con la actividad glicil/proli amino-peptidasa medida en la fracción soluble de tejido sano, periférico y tumoral.

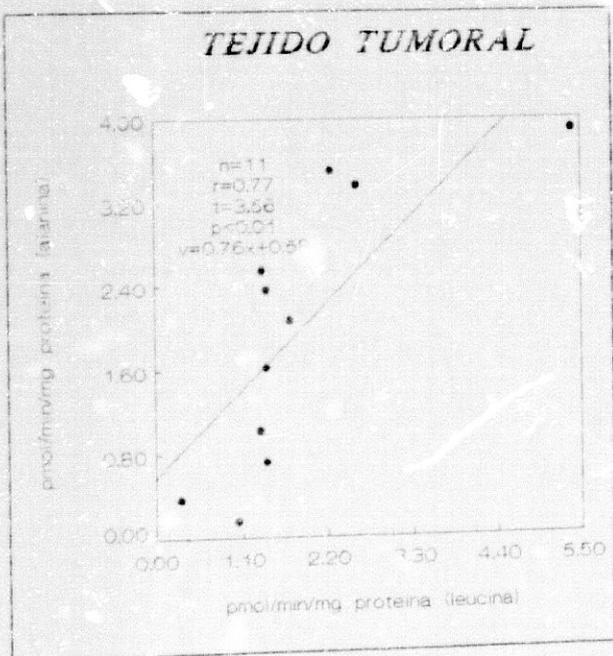
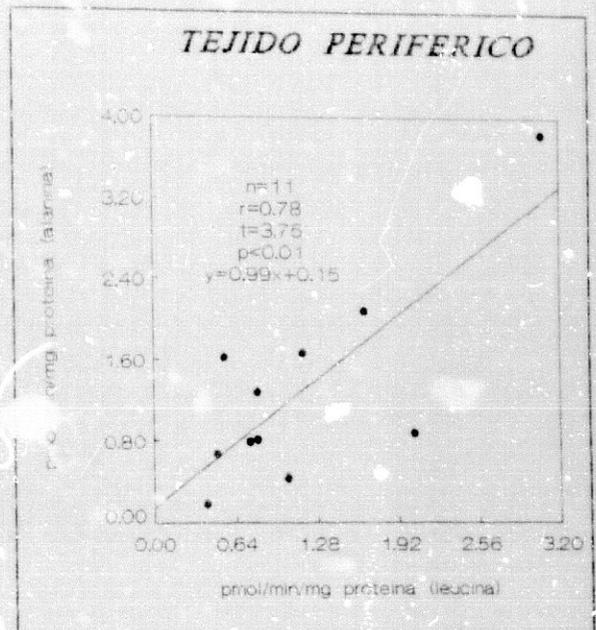
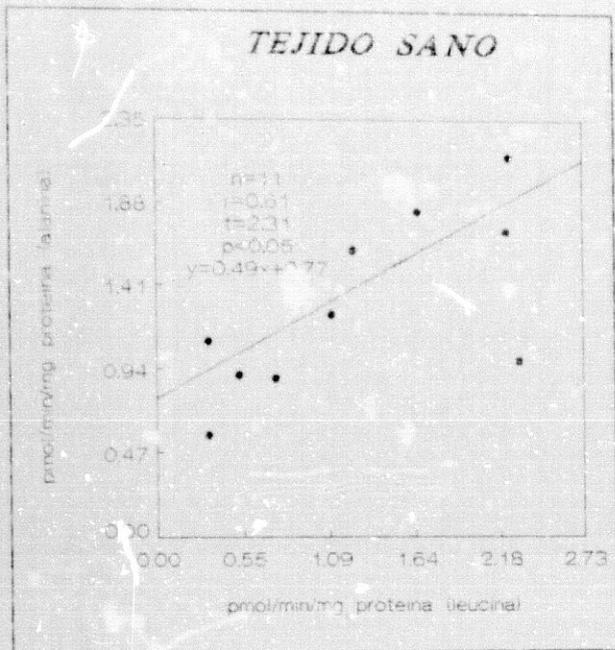


Figura 23.- Representación gráfica de la correlación lineal simple y directa de la actividad leucil aminopeptidasa con la actividad alanil aminopeptidasa medida en la fracción de membrana de tejido sano, periférico y tumoral.

DISCUSSION

Como ha quedado ya expresado en la introducción de este trabajo, existen datos que atribuyen cierta responsabilidad a diferentes enzimas proteolíticas en los mecanismos del crecimiento tumoral y la producción de metástasis.

La determinación de la actividad aminopeptidasa en este trabajo, usando diversos substratos, como queda expresado en Material y Métodos, demuestra que existen diferencias significativas de la actividad aminopeptidasa dependiendo del substrato usado, así como del tipo de tejido donde se determina y de la localización subcelular.

La determinación de la actividad aminopeptidasa medida en la fracción soluble, obtenida de los homogenizados de tejido tumoral, periférico y sano, muestra que existe un aumento significativo de la actividad leucil, arginil, gamma-glutamil y glicil-prolil aminopeptidasa del tejido tumoral, respecto de la actividad medida en el tejido sano (Tablas: I, II, VIII y XII).

El incremento medio de la actividad en el tejido tumoral respecto al tejido sano es de un 18% en el caso de la leucil aminopeptidasa, 22% para la arginil aminopeptidasa, 62% para la gamma-glutamil aminopeptidasa, produciéndose en mayor incremento en el caso de la dipeptidil peptidasa IV, que llega a ser de un 100%.

Es interesante hacer notar, que no se encuentran diferencias significativas para ninguna de las actividades aminopeptidasas medidas en la fracción soluble, entre el tejido sano y el periférico.

Cuando la actividad aminopeptidasa se mide en la fracción de membrana obtenida del homogenizado tisular y a diferencia de lo que ocurre en la fracción soluble, no se encuentran diferencias significativas para ninguno de los sustratos estudiados en el tejido tumoral y periférico respecto al tejido sano.

Todas las actividades aminopeptidasas medidas tanto en tejido sano, periférico como tumoral, son mayores en la fracción soluble respecto a las medidas en la fracción de membrana, excepto para la actividad aspartil, gamma-glutamil y glicil-prolil aminopeptidasa (Tablas: VII, VIII y XII) que tienen una actividad mayor en la fracción de membrana respecto de la fracción soluble.

En la Figura 14 se muestra la distribución de las distintas actividades aminopeptidasa medidas en este trabajo, tanto de la fracción soluble como de la fracción de membrana, obtenidas de un homogenizado del tejido intestinal sano. Como puede observarse, en este tejido existe, en la fracción soluble, una alta actividad aminopeptidasa cuando se ensaya frente a los sustratos alanina, arginina y leucina, no existiendo diferencias significativas entre estos dos últimos; la actividad alanil, arginil y leucil aminopeptidasa es significativamente más elevada que la del resto estudiadas, presentando una escasa actividad la α -glutamil, glicil-prolil, prolil, piroglutamil, gamma-glutamil y aspartil aminopeptidasa, siendo esta última tan baja como 0,0068 pmol/min/mg de proteína.

En la fracción de membrana (Figura 14) se detecta la máxima actividad aminopeptidasa con los sustratos alanina, arginina y leucina, no existiendo diferencias significativas entre la alanil y la leucil aminopeptidasa. La actividad glicil-arginil

y glicil-prolil aminopeptidasa siguen en importancia a las anteriores, correspondiendo a la piroglutamil aminopeptidasa la menor actividad, con valores medios de 0.0057 pmol/min/mg de proteína.

Cuando se realiza un estudio de correlación lineal de las distintas actividades aminopeptidasa, medidas tanto en la fracción soluble como de membrana, se encontró la existencia de correlaciones significativas, que para determinadas aminopeptidasas no lo eran simultáneamente en los tres tejidos estudiados, esto es: sano, periférico y tumoral. Para poder asegurar científicamente este resultado, se realizó un estudio (Tabla XVI) en el que se compararon los coeficientes de correlación, mediante la transformación de la "r" de Pearson en la "z" de Fisher, resultando que no existieron diferencias significativas para las comparaciones que se muestran en la Tabla XVI. Por lo tanto, en las Figuras 15 a 22 se recoge la representación gráfica de la correlación lineal simple y directa de las actividades aminopeptidasa, que fueron significativas simultáneamente en el tejido sano, periférico y tumoral y correspondiente a la fracción soluble. En la Figura 23 se recogen los resultados de la correlación lineal simple y directa de las únicas actividades aminopeptidasa que se correlacionan significativamente en tejido sano, periférico y tumoral.

Así pues, nuestros resultados muestran que en fracción soluble, existe una correlación lineal significativa medida en el tejido sano, periférico y tumoral de la actividad leucil aminopeptidasa con la arginil (Figura 15), alanil (Figura 16), cistinil (Figura 17) y arginil-arginil aminopeptidasa (Figura 18). La arginil aminopeptidasa con la alanil (Figura 19), cistinil (Figura 20), arginil-arginil (Figura 21) y glicil-prolil aminopeptidasa (Figura 22).

En la fracción de membrana, solo está significativamente correlacionada simultáneamente en tejido sano, periférico y tumoral, la actividad leucil aminopeptidasa con la actividad alanil aminopeptidasa (Figura 23).

Así pues, de nuestros resultados resaltan dos hechos fundamentales:

19.- Existe un aumento significativo de la actividad leucil, arginil, gamma-glutamil y glicil-prolil aminopeptidasa, medida en la fracción soluble del tejido tumoral, respecto del tejido sano.

20.- No existen diferencias significativas para ninguna de las actividades aminopeptidasa medidas, entre el tejido sano y el periférico.

De las cuatro actividades enzimáticas que se encuentran más elevadas en el tejido tumoral respecto del tejido sano, dos de ellas: la leucil aminopeptidasa y la arginil aminopeptidasa, son enzimas que se distribuyen fundamentalmente en el citosol celular, mientras que la gamma-glutamil aminopeptidasa y la glicil-prolil aminopeptidasa son enzimas asociados a la membrana plasmática. En este punto es interesante señalar, que las actividades enzimáticas que más se incrementan en el tejido tumoral, como es la gamma-glutamil aminopeptidasa (62%) y la glicil-prolil aminopeptidasa (100%), son precisamente dos de aquellas cuya actividad es más baja en el tejido intestinal sano, mientras que las actividades enzimáticas que sufren un menor incremento en el tejido tumoral, como es el caso de la leucil aminopeptidasa (18%) y la arginil aminopeptidasa (22%), corresponden a aquellas cuya actividad es más alta en el tejido intestinal sano, así la actividad leucil y arginil aminopeptidasa tienen valores medios superiores a la actividad gamma-glutamil y glicil-prolil aminopeptidasa, del orden del 8000%.

La característica más importante de la célula tumoral maligna es su habilidad para invadir los tejidos en donde asienta y formar focos metastásicos distantes. En los primeros estadios de invasión, la célula tumoral se desprende del tumor primario y comienza a emigrar a los tejidos adyacentes, guiada probablemente por factores quimiotácticos. En la mayoría de los casos, la célula invasora alcanza los vasos linfáticos y sanguíneos desde donde se extiende al resto del organismo, extravasa e inicia la metástasis.

La formación de metástasis es el resultado final de un proceso continuo de invasión, que se asocia con la diseminación de la célula tumoral a través del sistema circulatorio y con la invasión de tejidos distantes. Desde un punto de vista clínico, la metástasis es el aspecto más serio del cáncer, ya que es la causa principal de fatalidad en pacientes cancerosos. Los métodos clínicos para la detección precoz de la formación de metástasis son aún limitados y una vez que la célula tumoral se ha esparcido a través del organismo, el proceso es difícil de controlar. Por lo tanto, uno de los focos de atención más importantes en la investigación sobre el cáncer, se ha dirigido al estudio de los mecanismos moleculares que subyacen en el desarrollo de las metástasis.

El proceso metastásico es un fenómeno extremadamente complejo, que consta de una serie de pasos secuenciales, muchos de los cuales hoy día se están explorando, a nivel de proteína o gen. Uno de esos acontecimientos es la desorganización de la matriz extracelular, que permite la expansión de la célula tumoral. La cuestión de cómo esta

J.M. Florente

matriz se destruye para facilitar la migración y proliferación de la célula tumoral, está sujeta desde los últimos años a un extensa investigación.

Se ha observado (Crissman et al, 1986) la existencia de una disolución local de la membrana basal endotelial, en regiones de contacto de la membrana de la célula tumoral y la membrana basal; la degradación proteolítica focal, parece jugar un importante papel en los mecanismos de invasión de la membrana basal. No se ha observado en la invasión tumoral el fenómeno de diapedesis, observándose sin embargo, usando técnicas de microscopía electrónica, disolución multifocal de la membrana basal en los sitios de contacto con la membrana plasmática de la célula tumoral (Crissman et al, 1985).

Dichos focos de disolución sugieren que un enzima proteolítico, localizado bien en la membrana plasmática de la célula tumoral o liberado por la propia célula tumoral, pueda ser un mediador efectivo del proceso de extravasación y por lo tanto del proceso de metástasis.

Los enzimas proteolíticos, fundamentalmente proteinasas de las clases serina, metalo y cisteína, se han implicado recientemente en la habilidad de la célula tumoral para degradar la matriz extracelular conjuntiva (Liotta et al, 1983).

En este sentido, nuestros resultados cobran un extraordinario interés, al demostrar que ciertos enzimas proteolíticos, hasta ahora no estudiados, presentan una mayor actividad en el tejido tumoral con respecto al tejido sano. Los datos existentes hasta la actualidad en la literatura, hacen referencia a los cambios producidos en la

célula tumoral respecto a ciertos enzimas proteolíticos tales como el activador del plasminógeno, catepsinas, colagenasas, proteoglicanasas, gelatinasas, elastasas... Todos estos enzimas son parte de una cascada proteolítica metastásica, en la cual varias clases de proteasas pueden actuar concertadamente o bien pueden activar a otras proteasas. Nuestros resultados aportan por primera vez, la existencia de nuevas proteasas que se añaden a la lista ya existente y que, como previamente hemos expresado, pueden jugar un importante papel en el crecimiento y expansión tumorales.

Un aumento de la actividad de enzimas lisosomales se correlaciona "in vivo" con la malignidad del tumor, aunque se ha atribuido a menudo, a la presencia de muchas células infiltrantes o células necróticas tumorales (Dobrossy et al, 1980). Sin embargo, esto parece que no justifica por sí, las elevadas actividades de proteasas lisosomales que se producen fundamentalmente en las células más jóvenes y de crecimiento más rápido del tumor. La relevancia de la elevación de la actividad proteasa en relación con la metástasis, queda oscurecida por el hecho que el enzima medido fué la catepsina D, que tiene un pH óptimo muy ácido, entre 2 y 5, lo que hace improbable que esta proteasa posea actividad fuera del ambiente del lisosoma. En contraste con esto, las catepsinas B, H y L, que tienen un pH óptimo entre 6,2 y 6,8, sugieren que estas proteasas puedan tener alguna actividad, si se liberan desde el lisosoma al citoplasma o a la matriz extracelular o si se asocian con la membrana plasmática de la célula tumoral (Sloane et al, 1986). En este sentido, nuestros hallazgos tienen una especial relevancia por cuanto el pH óptimo de estos enzimas está comprendido en el rango de 6 a 8.

Las catepsinas B y L son consideradas normalmente como cisteina proteinasas lisosomales, sin embargo una actividad similar a la de la catepsina B se ha medido en

células y cultivos celulares tumorales (Sloane et al, 1982), en líquido ascítico de mujeres con carcinoma ovárico (Mort et al, 1981) y en extensiones de glándula mamaria (Recklies, 1985).

Muchos laboratorios han mostrado que la actividad catepsina B se encuentra asociada con la membrana plasmática de células tumorales en animales y humanos (Sloane et al, 1986).

Los enzimas lisosomales se procesan y se transportan a los lisosomas vía receptor dependiente de la manosa-6-fosfato (Sly and Fischer, 1982). Se han identificado defectos en este sistema de transporte, en pacientes con enfermedades lisosomales y en algunas líneas murina de células tumorales, en ambos casos el defecto produce un incremento de la secreción de enzimas lisosomales (Mainferme et al, 1985).

Sobre la liberación de cistein proteinasas por parte de las células tumorales, existe un amplio cuerpo de literatura. Recklies et al, 1982 y 1985, han mostrado que existe una actividad once veces mayor cistein proteinasa en medios de cultivo de tumores malignos de mama, con respecto a lo encontrado en medios de cultivo de tejido mamario normal.

Igualmente se ha encontrado aumento de la actividad catepsina B, en líquidos biológicos de distintos tipos de tumores, aunque estos hallazgos presentan cierta controversia, ya que Mort and Leduc, 1984, han demostrado que existen dos enzimas proteolíticos en el suero, que pueden degradar secuencialmente el sustrato de la

catepsina B, siendo este fenómeno responsable de la elevación de la actividad plasmática de la catepsina B.

La evidencia más sugestiva de que la catepsina B se libera desde la célula tumoral "in vivo", ha sido suministrada por Mort et al, 1981: en el líquido ascítico de mujeres con carcinoma ovárico se detecta una actividad catepsina B. Se cree que las células son la fuente de la actividad catepsina B, ya que células ascíticas desarrolladas en cultivo, liberan catepsina B, mientras que en el suero de las mismas pacientes no se ha demostrado actividad catepsina B.

A pesar de esto, no se han obtenido datos concluyentes que relacionen la liberación de una actividad catepsina B con la capacidad invasiva y metastásica de la célula tumoral (Persky et al, 1986).

Una forma latente de la catepsina L se libera de fibroblastos murina transformados y puesto que esta proteína es la más abundantemente secretada por estas células, se le denominó "Major Excreted Protein" (MEP).

No está claro hasta el momento, cual es el papel que la MEP tiene, si es que tiene alguno, en la invasión y metástasis de la célula tumoral, ya que se libera en una forma inactiva que se autoactiva a pH 3 (Gal and Gottesman, 1986). Sin embargo, recientemente Denhardt et al, 1987, admite la hipótesis que la MEP (catepsina L latente) pueda jugar un papel en la formación de metástasis, ya que su expresión viene regulada por el oncogen "ras".

Se ha estudiado la relevancia que pueda tener la existencia de una actividad catepsina B asociada a la membrana, con la metástasis celular, habiéndose suministrado evidencias que la catepsina B puede estar presente en la superficie de las células tumorales metastásicas en una forma que posea actividad bajo condiciones fisiológicas o patológicas, como por ejemplo la existencia de un pH neutro o ligeramente ácido y la presencia extracelular de inhibidores de proteasas.

Usando diferentes modelos experimentales, se ha establecido recientemente (Mignatti et al, 1986) la importancia que el papel de las proteasas puede tener en la invasión tumoral, usando células clonadas, seleccionadas para que tengan una alta capacidad invasiva de la barrera de la vejiga urinaria, se ha estudiado el efecto de inhibidores de metalo serina y cisteina proteinasas, usando células B16/BL6 tratadas con I^{125} -Iodo deoxiuridina, que se hacen crecer sobre la membrana basal de células amnióticas humanas.

La invasión celular se cuantificó midiendo la radioactividad asociada a la membrana amniótica después de eliminar de la membrana basal las células B16/BL6. Los resultados obtenidos con los inhibidores de las proteinasas mostraron que inhibidores de la colagenasa y plasmina, evitaron la invasión del amnios. La invasión tisular se bloqueó igualmente con anticuerpos anti-uroquinasa, mientras que inhibidores de proteinasas cisteina, así como inhibidores de antisuero antiactivador-plasminógeno tisular, fueron inefectivos. Un compuesto que activa la colagenasa, mersalyl, estimuló el proceso invasivo bajo condiciones en las que la formación de plasmina estuvo inhibida, lo que suministra evidencias que existe una cascada de activación (activador plasminógeno-plasmina-colagenasa) en la invasión del tumor B16.

En relación con los tumores del tubo digestivo, objeto del presente trabajo, existen datos que demuestran la existencia de un aumento de la actividad de ciertas peptidasas en el tejido tumoral, tales como catepsinas y colagenasas.

En tumores malignos de estómago, Vasishta et al, 1985, demuestran que existe un aumento significativo de la actividad colagenasa, catepsina B, catepsina (B+L), catepsina H y catepsina D, respecto al tejido sano; sin embargo estos mismos autores informan de un descenso en los niveles de activador de plasminógeno en el tejido tumoral respecto del tejido sano distal al tumor. Respecto a este resultado existen ciertas controversias, ya que otros investigadores han demostrado la existencia de niveles significativamente más altos en homogenizados de tejidos malignos respecto de los no malignos, en cáncer de pulmón (Markus et al, 1980), cáncer de colon (Corasanti et al, 1980), cáncer de recto (Scezepanski et al, 1982) y cáncer primario de mama (Evers et al, 1982). A pesar de esto, no todos los autores han podido demostrar este hecho, así Rennie and Ogston, 1975, informaron que una actividad fibrinolítica plasmática en pacientes con cáncer colo-rectal fué más baja que la obtenida con pacientes controles. De forma similar, Franklin et al, 1978, midiendo los niveles del activador de plasminógeno en 62 especímenes tumorales, observaron que la actividad fué menor en el tumor que en tejido sano. Dos posibles explicaciones podrían justificar este hecho, en primer lugar, ya que el activador de plasminógeno puede convertir proteinasas latentes en su forma activa (O'Grady et al, 1981) es posible que en los tejidos malignos el contenido intrínseco de activador de plasminógeno se utilice para activar proteinasas latentes, lo que justificaría la existencia de niveles más bajos de activador de plasminógeno junto con altas actividades de otras proteinasas en el tejido tumoral. En segundo lugar, este

hecho podría justificarse por la existencia de altos niveles de inhibidores del activador del plasminógeno en el tejido tumoral.

En el cáncer colo-rectal se ha establecido la existencia de un aumento de catepsina B y colagenasa respecto al tejido sano (Durdey et al, 1985), no pudiendo establecerse una correlación entre la actividad peptidasa y el estadio de Dukes del tumor.

El papel que la catepsina B pueda tener en la colagenolisis no está claramente definido.

La catepsina B digiere "in vitro" al colágeno y proteoglicanos que son los dos componentes más importantes de la matriz extracelular. Su actividad es máxima a pH bajo, circunstancia que no se encuentra en el medio extracelular, aunque un pH relativamente ácido se encuentra intracelularmente y una explicación del papel de la catepsina B sería que degrada porciones fagocitadas de moléculas de colágeno, que han sido escindidas por peptidasas extracelulares (Etherington, 1976).

Una explicación alternativa del papel de la catepsina B, ha sido sugerido por Graf et al, 1981, asignándole un papel activador de la colagenasa.

Así pues, nuestros resultados están plenamente de acuerdo y amplían lo observado por Durdey et al, 1985, en relación con el aumento de la actividad aminopeptidasa encontrado por nosotros en el tejido tumoral.

En nuestro estudio, además de determinar la actividad aminopeptidasa en homogenizados de tejido tumoral, realizamos igualmente la determinación de la actividad de estas enzimas en muestras de tejido intestinal tomadas a 2 cm. del límite macroscópico del tumor y que denominamos "tejido periférico". Como hemos comentado previamente, no se han podido encontrar diferencias significativas en ninguna de las actividades aminopeptidasa medidas en el tejido periférico en relación con el tejido sano.

Estos resultados son de importancia, por cuanto no hemos podido encontrar antecedentes en la literatura consultada, existiendo solo referencia a este respecto en tumores gástricos, en los que se establece, contrariamente a lo encontrado por nosotros, que la actividad catepsina B es mayor en el tejido colindante al tumor respecto a la determinada en tejido sano (Vasishta et al, 1985).

Muy recientemente, Lawson et al, 1989, estudiando la actividad ornitina decarboxilasa, timidina quinasa, fosfatasa alcalina y láctico-deshidrogenasa, en muestras de mucosa colónica tomadas a 2 y a 10 cm. del borde macroscópico de adenocarcinomas de colon o recto, mostraron la existencia de altos niveles de actividad láctico-deshidrogenasa y ornitina decarboxilasa en el tejido canceroso respecto al tejido distante al tumor, pero no encontraron diferencias para las actividades de estas enzimas entre el tejido sano y el tejido adyacente al tumor, lo que concuerda con nuestros resultados a este respecto.

Se ha sugerido, que la mucosa adyacente al tumor colo-rectal tiene un riesgo mayor de desarrollar cáncer que la más distante al mismo (Greaves et al, 1980). Esta

superficial se basa en datos histoquímicos, que muestran un predominio de sialomucina sobre sulfomucina en la mucosa de transición y por la publicación de dos estudios que muestran una menor supervivencia en pacientes con cáncer de colon en cuyo margen reseñado mostraban un predominio de sialomucina (Greaves et al, 1980; Habib et al, 1986). Por otra parte, los hallazgos morfológicos en las criptas de la mucosa transicional son similares a los cambios morfológicos encontrados en roedores tratados con carcinógenos (Chang, 1978).

Los cambios que se producen, el sitio, número y porcentaje de células proliferativas, parece correlacionarse con la susceptibilidad a malignizarse en procesos como: poliposis múltiple familiar, colitis ulcerosa, adenomas aislados y carcinomas previos de colon (Terpstra et al, 1987) pero raramente se han aplicado estos cambios a la mucosa de transición.

Usando técnicas de captación de timidina tritiada, se ha encontrado una fijación superficial mayor en algunas criptas adyacentes a pólipos y cáncer (Deschner et al, 1966) mientras que recientemente, Bleiberg et al, 1985, han mostrado un mayor índice de fijación en la vecindad de tumores tanto benignos como malignos, que en la mucosa de pacientes sin patología colónica.

Los cambios morfológicos encontrados por Lawson et al 1989, en la mucosa transicional no se acompañan, como hemos indicado anteriormente, de cambios en la actividad enzimática timidina quinasa, fosfatasa alcalina, láctico-deshidrogenasa y ornitina decarboxilasa, en contraste con el aumento de actividad ornitina decarboxilasa

encontrada en pacientes con poliposis familiar y adenoma, asociados con el cáncer de colon (Porter et al, 1987).

Por lo tanto, los resultados de este estudio corroboran los nuestros, siendo de gran interés por cuanto muestran que la mucosa transicional (libre de tumor) no está sujeta a un riesgo mayor del esperado de sufrir degeneración maligna.

Como ha quedado claramente expuesto en la discusión de este trabajo, la acción de los enzimas proteolíticos es esencial en la disolución de las estructuras proteicas extracelulares durante la migración de las células tumorales metastatizantes. Como ha quedado demostrado en este trabajo, la actividad de ciertas proteasas se incrementa claramente en el tejido tumoral, pudiendo contribuir de esta manera a la proteolisis extracelular, paso obligado del proceso invasivo y metastásico propio de los tumores malignos.

Aunque los conocimientos actuales de la proteolisis de la matriz extracelular son muy amplios, sin embargo muchos aspectos de este proceso no son suficientemente bien conocidos y por lo tanto necesitan ser aclarados en futuras investigaciones, en particular en lo referente a la regulación de la síntesis y activación de los proenzimas.

Quizás, la cuestión más intrigante concerniente a las proteasas y la invasión tumoral, en el momento presente, sea lo relativo a la expresión de los genes de las proteasas en el fenotipo maligno y cuales son los estímulos requeridos para iniciar la transcripción de estos genes.

J.M. Llorente

Así pues, los datos más recientes obtenidos en muchos laboratorios, incluido el nuestro, mostrando una estrecha relación entre la proliferación celular y la secreción de ciertas proteasas, hacen de este tema un objetivo importante en el futuro, relativo a la investigación sobre la progresión e invasión tumoral, así como en la producción de metástasis.

CONCLUSIONES

1a.- En homogenizados obtenidos de cáncer colo-rectal, existe un aumento significativo respecto del tejido sano, de la actividad leucil aminopeptidasa, arginil aminopeptidasa, gamma-glutamil aminopeptidasa y glicil-proil aminopeptidasa (Dipeptidil peptidasa IV). Este aumento de actividad solo se produce en la fracción soluble y no en la fracción de membrana.

2a.- No se encontraron diferencias significativas para ninguna de las actividades enzimáticas medidas, tanto en la fracción soluble como en la fracción de membrana, en la mucosa adyacente al tumor, cuando se compara con los resultados obtenidos en la mucosa sana distal al mismo.

3a.- El tejido colo-rectal presenta valores de actividad alanil, arginil y leucil aminopeptidasa muy superiores al resto de las actividades enzimáticas estudiadas, tanto en la fracción soluble como en la fracción de membrana.

REFERENCIAS

- Anson, M.L. (1937): Carboxypeptidase. I. The preparation of cristaline carboxipeptidase. J. Gen. Physiol. 20, 663-669.
- Auyagi, T., Wada, T.; Kojima, F.; Najai, M.; Harada, S; Hachisu, M.; Murata, S. Umezawa, H. (1986): Inhibitors of aminopeptidase B suppress the development of hypertension in spontaneously hypertensive rats. Chem. Pharm. Bull. 34, 4852-4854.
- Armentrout, R.W. (1969): Pyrrolidonecarboxyl peptidase from rat liver. Biochim. Biophys. Acta. 191, 756-759.
- Aronsen, K.F.; Hägerstrand, I.; Norden, J.G. (1970): On the cause of the increased activity alkaline phosphatase gamma-glutamyl transpeptidase in serum of patients with liver metastases. Acta Chir. Scand. 135, 569-573.
- Astler, V.B. Collier, F.A. (1954): The pronostic significance of direct extension of carcinoma of the colon rectum. Ann. Surg. 139, 846-852.
- Ballow, R.M., Rajnarsson, V. Zetterquist, D. (1983): Tripeptidyl aminopeptidase in the extralysosomal fraction of rat liver. J. Biol. Chem. 258, 11622-11628.
- Beck, S.A. Tisdale, M.J. (1987): Production of lipolytic proteolytic factors by a murine tumor-producing cachexia in the host. Cancer. Res. 47, 5919-5923.

- Behal, F.J., Klein, R.A. Dawson, F.B. (1966): Separation characterization of aminopeptidase arylamidase components of human liver. *Arch. Biochem. Biophys.* 115, 545-554.

- Bergmann, M. Fruton, J.S. (1937): On proteolytic enzymes XII. Regarding the specificity of aminopeptidase carboxypeptidase. A new type of enzyme in the intestinal tract. *J. Biol. Chem.* 117, 189-202.

- Beutler, B., Mahoney, J., Le Trang, N., Pekala, P. Cerami, A. (1985): Purification of cachectin, a lipoprotein lipase-suppressing hormone from endotoxin induced RAW 2647 cells. *J. Exp. Med.* 161, 981-995.

- Bibby, M.C., Double, J.A., Ali, S.A., Fearon, K.C.H., Brennam, R.A. Tisdale, M.J. (1987): Characterization of a transplantable adenocarcinoma of the mouse colon producing cachexia in recipient animals. *J. Natl. Cancer Inst.* 78, 539-546.

- Binkley, F. Nakamura, K. (1948): Metabolism of glutathione I. Hydrolysis by tissues of the rat. *J. Biol. Chem.* 173, 411-421.

- Bleiberg, H.; Buyse, M. Galand, P. (1985): Cell kinetic indicators of premalignant stages of colo rectal cancer. *Cancer*, 56, 124-129.

- Bolin, S., Nilsson, E. Sjö Dahl, R. (1983): Carcinoma of the colon return growth rate. *Ann. Surg.* 198 (2), 151-158.

J.M. Llorente

- Broders, A.C. (1925): The grading of carcinoma. Minn. Med. 8, 726-730.
- Burstone, M.S. (1956): Histochemical demonstration of proteolytic activity in human neoplasms. J. Nat. Cancer. Inst. 16, 1149-1161.
- Campbell, B.J., Thysen, B. Chu, F.S. (1965): Peptidase catalyzed hydrolysis of antidiuretic hormone in toad bladder. Life Sci. 4, 2129-2140.
- Carda-Abellá, P., Pérez Cuadrado, S., Lara Barugue, J., Gil Grande, L., Nuñez Puertas, A. (1982): LDH isoenzyme patterns in tumors, polyps, uninvolved mucosa of human cancerous colon. Cancer, 49, 80-83.
- Castro Fernández, M., Herrera Justiniano, J.M., Cordero Fernández, M. del C., Reina Campos, F.R., Sayago Mota, M., De la Santa López, J. (1984): Carcinoma de colon y colitis ulcerosa. Rev. Esp. Enferm. Apar. Dig. 65, 275-279.
- Corasanti, J.G., Celik, C. Camiolo, S.M. (1980): Plasminogen activator content of human colon tumours normal mucosae: separation of enzymes partial purification. J. Nat. Cancer. Inst., 65, 345-351.
- Costa, G. (1963): Cachexia, the metabolic component of neoplastic disease. Prog. Exp. Tumor. Res. 3, 321-369.

- Crissman, J.D., Hatfield, J., Schaldenbrand, M., Sloane, B.F. Honn, K.V. (1985): Arrest extravasation of B16 amelanotic melanoma in murine lungs. Lab. Invest., 53, 470-478.
- Crissman, J.D., Hatfield, J.S. Honn, K.V. (1986): Arrest extravasation of circulating murine tumor cells in the lung. Lab. Invest., 54, 14.
- Chang, W.W.L. (1978): Histogenesis of symmetrical 1-2 dimethylhydrazine induced neoplasms of the colon in the mouse. J. Natl. Cancer. Inst., 60, 1405-1418.
- Chatal, J.F., Bourdoiseau, M., Fumoleau, P., Douillard, J.Y., Kremer, M., Curtet, C., Le Mevel, B. (1983): Utilisation d'anticorps monoclonaux radio-marqués pour la detection scintigraphique des cancers colorectaux humains. Bull. Cancer. Paris. 70, 103-107.
- Chenoweth, D., Mitchell, R.E.J. Smith, E.L. (1973): Aminotripeptidase of swine kidney I. Isolation characterization of three different forms utility of the enzyme in sequence work. J. Biol. Chem. 248, 1672-1683.
- Cheung, A. Lau, H.K.F. (1986): Isolation partial characterization of a proteinase inhibitor from human colorectal adenocarcinoma. Biochim. Biophys. Acta. 882, 200-209.
- Cheung, H.S. Cushman, D.W. (1971): A Soluble aspartate aminopeptidase from dog kidney. Biochim. Biophys. Acta. 242, 190-193.

J.K. Llorente

- Dehm, P. Nordwig, A. (1970): The cleavage of prolyl peptides by kidney peptidases. Partial purification of a X-prolyl-aminopeptidase from swine kidney microsomes. Eur. J. Biochem. 17, 364-371.
- Dehm, P. Nordwig, A. (1970): The cleavage of prolyl peptides by kidney peptidases. Isolation of a microsomal carboxypeptidase from swine kidney. Eur. J. Biochem. 17, 372-377.
- DeLumen, B.O. Tappel, A.L. (1973): Histone hydrolase activity of rat liver lysosomal cathepsin B₂. Biochim. Biophys. Acta 293, 217-225.
- Denhardt, D.T., Greenberg, A.H., Egan, S.E., Hamilton, R.T. Wright, J.A. (1987): Cysteine proteinase cathepsin L expression correlates closely with the metastatic potential of H-ras-transformed murine fibroblasts. Oncogene, 2, 55-59.
- Deschner, E., Lipkin, M. Solomon, C. (1966): Study of human rectal epithelial cells in vitro. H³-thymidine incorporation into polyps adjacent mucosa. J. Natl. Cancer. Inst. 36, 849-857.
- Dobrossy, L., Pavelic, Z.P., Vaughn, M., Porter, N. Bernacki, R.J. (1980): Elevation of lysosomal enzymes in primary Lewis lung tumor correlated with the initiation of metastasis. Cancer. Res., 40, 3281-3285.

- Doebbert, T.W., Divor, A.R. Ellis, S. (1978): Identification of a tripeptidyl aminopeptidase in the anterior pituitary gland: effect on the chemical biological properties of rat bovine growth hormone. Endocrinology, 103, 1794-1804.

- Doolittle, R.F. Armentrout, R.W. (1968): Pyrrolidonyl peptidase. An enzyme for selective removal of pyrrolidonecarboxylic acid residues from polypeptides. Biochemistry, 7, 516-521.

- Dukes, C.E. (1932): The classification of cancer in the rectum. J. Pathol. Bacteriol., 35, 323-332.

- Durdey, P., Cooper, J.C., Switala, S., King, R.F.G. Williams, N.S. (1985): The role of peptidases in cancer of the rectum sigmoid colon. Br. J. Surg., 72, 378-381.

- de Duve, C., Pressman, B.C., Gianetto, R., Wattiaux, R. Appelmans, F. (1955): Tissue fractionation studies. Intracellular distribution patterns of enzymes in rat liver tissue. Biochem. J. 60, 604-617.

- Einhorn, S., Wasserman, J., Lundell, G., Blomgren, H., Cedermark, B., Jarstrand, C., Petrini, B., Strander, H., Theve, T., Ohman, V. (1984): Treatment of patients with disseminated colorectal cancer with recombinant human alpha 2-interferon. Studies on the immuned system. Int. J. Cancer., 33, 251-256.

- Ellis, S. Nuenke, J.M. (1967): Dipeptidyl arylamidase III of the pituitary. Purification characterization. J. Biol. Chem., 242, 4623-4629.

- Enomoto, K., Oyamada, M., Sato, M., Asakura, S., Oyamada, Y., Dempo, K., Kanetro, A. Mori, M. (1987): Induction of a novel Ca^{++} dependent protease in preneoplastic neoplastic liver tissues during rat liver carcinogenesis. *Carcinogenesis*, 8, 1933-1934.
- Etherington, D.J. (1976): Bovine spleen cathepsin B1 collagenolytic cathepsin: a comparative study of the properties of the two enzymes in the degradation of native collagenase. *Biochem. J.*, 153, 199-209.
- Evers, J.L., Patel, J. Madeja, J.M. (1982): Plasminogen activator activity composition in human breast cancer. *Cancer. Res.*, 42, 219-226.
- Falterman, K.W., Hill, C.B., Markey, J.C. (1974): Cancer of the colon, rectum anus: a review of 2313 cases. *Cancer*, 34, 951-959.
- Fernández Velazquez, J., Pérez Fernández, E., Cabañas Armesilla, M.D., López Bejarano, M.C., López de la Riva, M., Alberdi Frias, J.M., Pérez Mota, A. (1982): Pólipos de rectosigma y su relación con el cáncer de recto. *Rev. Esp. Enf. Ap. Digest.*, 62, 466-469.
- Folk, J.E. (1956): A new pancreatic carboxypeptidase. *J. Am. Chem. Soc.*, 78, 3541-3542.
- Folk, J.E. Gladner, J.A. (1958): Carboxypeptidase B I. Purification of the zymogen specificity of the enzyme. *J. Biol. Chem.*, 231, 379-391.

- Franklin, J.D., Gervin, A.F., Bowers, D.G. Lynch, J.B. (1978): Fibrinolytic activator activity in human neoplasms. *Plast. Reconst. Surg.*, 61, 241-249.
- Fruton, J.S. Bergmann, M. (1939): On the proteolytic enzymes of animal tissues. I. Beef spleen. *J. Biol. Chem.*, 130, 19-27.
- Fruton, J.S., Irving, G.W. Jr. Bergmann, M. (1941): On the proteolytic enzymes of animal tissues. III. The proteolytic enzymes of beef spleen, beef kidney swine kidney. Clasification of the cathepsins. *J. Biol. Chem.*, 141, 763-774.
- Fujita, K., Hirano, M., Tokunaga, K., Nagatsu, I., Nagatsu, T. Sakakibara, S. (1977): Serum glycyproline p-nitroanilidase activity in blood cancers. *Clin. Chim. Acta.*, 81, 215-217.
- Fujita, K., Hirano, M., Ochiai, J., Funabashi, M., Nagatsu, I., Nagatsu, T. Sakakibara, S. (1978): Serum glycyproline p-nitroanilidase activity in rheumatoid arthritis systemic lupus erythematosus. *Clin. Chim. Acta.*, 88, 15-20.
- Gai, S. Gottesman, M.M. (1986): The major excreted protein of transformed fibroblasts is activable acid-protease. *J. Biol. Chem.*, 261, 1760-1765.
- Garcia Fidalgo, G., Barreiro Alvarez, F., Berdullas Guerra, M., Mateo Martínez, A., Fraga Fernández, J. (1982): Leiomioma de colon. *Rev. Esp. Ap. Digest.*, 62, 236-239.

- Ciemer, G.G., Mc Millan, P.J. Folk, J.E. (1962): A mammalian peptidase specific for the hydrolysis of N-terminal α -L-glutamyl aspartyl residues. *Nature.*, 194, 867.
- Gold, P. Freedman, J.O. (1965_a): Demonstration of tumor-specific antigens in human colonic carcinomata by immunological tolerance absorption techniques. *J. Exp. Med.*, 121, 439-441.
- Gold, P. Freedman, J.O. (1965_b): Specific carcinoembryonic antigens of the human digestive system. *J. Exp. Med.*, 122, 467-470.
- Goligher, J.C. (1976): The Dukes A, B C categorization of the extend of spread of carcinoma of the rectum. *Surg. Gyn. Obstet.*, 143, 793-795.
- Goligher, J.C., Duthie, H.L. Nixon, H.H. (1979): Cirugía del ano, recto y colon. Salvat Ed., S.A. Barcelona, España.
- González Calvin, J., Gutiérrez Gea, F., Osorio, C., Aguilar Martínez, J.L., Peña Anculo, J.F., Peña Yañez, A. (1982): Comportamiento del antígeno carcinoma embrionario en familiares de pacientes cancerosos y de sujetos sanos con valores altos. *Rev. Esp. Enf. Ap. Digest.*, 62, 455-459.
- González Martínez, J., Baldonado Cernuda, R. (1982): Tumores vellosos de colon y recto. *Rev. Esp. Enf. Ap. Digest.*, 6, 473-476.

- Graf, M., Baici, A., Strauli, P. (1981): Histochemical localisation of cathepsin B the invasion front of the rabbit V2 carcinoma. *Lab. Invest.*, 45, 587-596.

- Grassmann, W., von Schoenebeck, O., Auerbach, G. (1932): Uber die enzymatische spaltbarkeit der Prolinpeptide II. *Z. Physiol. Chem.*, 210, 1-14.

- Greaves, P., Filipe, M., Branfoot, A. (1980): Transitional mucosa survival in human colorectal cancer. *Cancer.*, 46, 764-770.

- Greenbaum, L.M., Sherman, R. (1962): Studies on catheptic carboxipeptidase. *J. Biol. Chem.*, 237, 1082-1085.

- Habib, N., Dawson, P., Bradfield, J., Williamson, R., Wod, C. (1986): Sialomucins at resection margin likelihood of recurrence in colorectal carcinoma. *Br. Med. J.*, 293, 521-523.

- Haley, E.E. (1970): B-Aspartyl peptidase from rat liver. *Methods. Enzymol.*, 19, 737-741.

- Hanes, C.S., Hird, F.J.R., Isherwood, F.A. (1952): Enzymic transpeptidation reactions involving gamma-glutamyl peptides α -amino-acyl peptides. *Biochem. J.*, 51, 25-35.

- Hanski, C., Zimmer, E.R., Gossrau, R., Reutter, W. (1986): Increased activity of dipeptidyl peptidase IV in serum of hepatoma-bearing rats coincides with the loss of the enzyme from the hepatoma plasma membrane. *Experientia.*, 42, 826-828.

- Hanson, H.T. Smith, E.L. (1949): Carnosinase: an enzyme in swine kidney. J. Biol. Chem., 179, 789-801.

- Hanson, H., Glasser, D. Kirschke, H. (1965): Leucinaminopeptidase aus Reinderaugenlinsen. Kristallisation, Eigenschaften und optimale Wirkungsbedingungen des Enzyms. Z. Physiol. Chem., 340, 107-125.

- Hardcastle, J.D., Farrands, P.A., Balfour, T.W., Chamberlain, J., Amar, S.S., Sheldon, M.G. (1983): Controlled trial of faecal occult blood testing in the detection of colorectal cancer. Lancet, 2, 1-4.

- Hino, M., Nagatsu, T., Kakumu, S., Okuyama, S., Yoshii, Y. Nagatsu, I. (1975): Glycylprolyl β -naphthylamidase activity in human serum. Clin. Chim. Acta., 62, 5-11.

- Hoffbrand, A.V. Peters, T.J. (1969): The subcellular localization of pteroyl polyglutamate hydrolase folate in guinea pig intestinal mucosa. Biochim. Biophys. Acta., 192, 479-485.

- Hopso-Havu, V.K. Glennev, G.G. (1966): A new dipeptide naphthylamidase hydrolyzing glycyl-prolyl- β -naphthylamide. Histochemie, 7, 197-201.

- Hopsu, V.K., Kantonen, U.M. Glennev, G.G. (1964): A peptidase from rat tissue selectively hidriyzing N-terminal arginine lysine residues. Life Sci., 3, 1449-1453.

- Icdice, A.A. (1967): The carboxypeptidase nature of cathepsin A. Arch. Biochem. Biophys., 121, 241-242.

- Isemura, M., Hanyu, T., Gejyo, F., Nakazawa, R., Igarashi, R., Matsuo, S., Ikeda, K. Sato, Y. (1979): Plolidase deficiency with imidodipeptiduria. A familial case with without clinical symptoms. Clin. Chim. Acta., 93, 401-407.

- Jensen, H.K. Ledet, T. (1986): Proteolysis of arterial basement membrane containing different amounts of carbohydrates. Thromb. Res., 44, 47-53.

- Josephson, K. von Euler, H. (1926): Enzymatische spaltung von dipeptiden. IV. Über die wirkungsweise des Darmerepsins (Darmpeptidase). Hoppe-Seyler's. Z. Physiol. Chem., 162, 85-94.

- Kar, N.C. Pearson, C.M. (1978): Dipeptidyl peptidases in human muscle disease. Clin. Chim. Acta., 82, 185-192.

- Kim, E.E., Deland, F.H., Casper, S., Corgan, R.L., Primus, F.J., Goldenberg, D.M. (1980): Radioimmunodetection of colorectal cancer. Cancer, 45, 1243-1247.

- Kirklin, J.W., Dockerty, M.B. Waugh, J.M. (1949): The role of the peritoneal reflection in the prognosis of carcinoma of the rectum sigmoid colon. Surg. Gynecol. Obstet., 88, 326-331.

- Kirschke, H., Langner, J., Wiederanders, B., Ansorge, S., Bohley, D., Hanson, H. (1977): Cathepsin H: an endoaminopeptidase from rat liver lysosomes. Acta. Biol. Med. Ger., 36, 185-199.
- Kitada, S., Hays, E.F., Mead, J.F. (1980): A lipid mobilizing factor in serum of tumor-bearing mice. Lipids, 15, 168-174.
- Knuutila, M., Virtanen, K., Söderling, E., Mäkinen, K.K. (1978): A chloride-activated aminopeptidase in rat inflammatory exudate: properties evidence of the origin of the enzyme. Biochem. Biophys. Res. Comm., 81, 374-381.
- Koprowski, H., Gilliland, D.G., Steplewski, Z., Collier, R.J., Mitchell, K.F., Chang, T.H. (1981): Antibody-directed cytotoxic agents: use of monoclonal antibody to direct the action of toxin A chain to colorectal carcinoma cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, 4539-4543.
- Lawson, M.J., Frapp., White, L.M., Coyle, P., Butler, R.N., Roberts-Thomson, I.C., Conyers, R.A. (1989): An assessment of proliferative enzyme activity in transitional mucosa adjacent to colonic cancer. Cancer, 64, 1061-1066.
- Lenny, J.F., Kan, S.C., Siu, K., Sugiyama, G.H. (1977): Homocarnosinase: a hog kidney dipeptidase with a broader specificity than carnosinase. Arch. Biochem. Biophys., 184, 257-266.

- Lieberman, J., Nosal, A., Schiessner, L.A. Sastre-Foken, A. (1979): Serum angiotensin-converting enzyme for diagnosis therapeutic evaluation of sarcoidosis. Am. Rev. Respir. Dis., 120, 329-335.
- Lieberman, J. Sastre, A. (1980): Serum angiotensin-converting enzyme: elevations in diabetes mellitus. Ann. Intern. Med., 93, 825-826.
- Linderstrom-Lang, K. (1929): Uber Darmerepsin. Hoppe-Seyler's. Z. Physiol. Chem., 182, 151-174.
- Liotta, L.A., Rao, C.N. Brasky, S.H. (1983): Tumor invasion the extracellular matrix. Lab. Invest., 49, 636-649.
- López Bejarano, M^a.C., Cabañas Armesilla, M^a D., Alberdi Frias, S. M., Pérez Fernández, E., Fernández Navarro, M^a. D., Linares García, F., Pérez Mota, A. (1982): Cancer de recto y colon. Rev. Esp. Enf. Ap. Digest., 63, 33-35.
- Mahoney, K.H., Miller, B.E. Heppner, G.H. (1985): FACS quantification of leucine aminopeptidase acid phosphatase on tumor-associated macrophages from metastatic nonmetastatic mouse mammary tumors. J. Leuk. Biology., 38, 573-585.
- Mainferme, F., Wattiaux, R. von Figura, K. (1985): Synthesis, transport processing of cathepsin C in Morris hepatoma 7777 cells rat hepatocytes. Eur. J. Biochem., 153, 211-216.

- Mäkinen, K.K., Haataja, M., Huusko, P.J., Mäkinen, P.L., Hamäläinen, M., Nieminen, L. Laine, H. (1980): The involvement of the Cl^- dependent arginine aminopeptidases in rheumatoid arthritis. *Clin. Chim. Acta.*, 100, 71-74.

- Markus, G., Takita, H., Camiolo, S.M., Corasanti, J.G., Evers, J.L. Hobika, G.H. (1980): Content characterization of plasminogen activators in human lung tumours normal lung tissue. *Cancer Res.*, 40, 841-848.

- Martin, A., Luna, J.D., Sánchez-Cantalejo, E. Bolaños, M.J. (1986): *Bioestadística*. Universidad de Granada.

- Masuno, H., Yamasaki, N. Okuda, H. (1981): Purification characterization of lipolytic factor (toxohormone-L) from cell-free fluid of ascites sarcoma 180. *Cancer Res.*, 41, 284-288.

- Masuno, H., Yoshimura, H., Ogawa, N. Okuda, H. (1984): Isolation of lipolytic factor (Toxohormone-L) from ascitis of patients with hepatoma its effect on feeding behaviour. *Eur. J. Cancer. Clin. Oncol.*, 20, 1177-1185.

- Matsunaga, M. (1971). Nature of lysosomal angiotensinase activity. *Jpn. Circ. J.*, 35, 333-338.

- Mc Donald, J.K., Ellis, S. Reilly, T.J. (1966): Properties of dipeptidyl arylamidase I of the pituitary. Chloride sulfhydryl activation of seryltyrosyl- β -naphthylamide hidrolisis. *J. Biol. Chem.*, 241, 1494-1501.

- Mc Donald, J.K., Reilly, T.J., Zeitman, B.B. Ellis, S. (1968): Orpeptidyl arylamidase II of the pituitary, properties of isylalanyl-B-Naphthylamide hidrolisis: inhibition by cations, distribution in tissues subcellular localization. *J. Biol. Chem.*, 243, 2028-2037.

- Mc Donald, J.K., Zeitman, B.B., Reilly, T.J. Ellis, S. (1969_a): New observations on the substrate specificity of cathepsin C (dipeptidyl aminopeptidase I). Including the degradation of gamma-corticotropin other peptide hormones. *J. Biol. Chem.*, 244, 2693-2709.

- Mc Donald, J.K., Callahan, P.X., Zeitman, B.B. Ellis, S. (1969_b): Inactivation degradation of glucagon by dipeptidyl aminopeptidase I (Cathepsin C) of rat liver. Including a comparative study of secretin degradation. *J. Biol. Chem.*, 244, 6199-6208.

- Mc Donald, J.K., Zeitman, B.B. Ellis, S. (1970): Leucine naphthylamide: an inappropriate substrate for the histochemical detection of cathepsins B B'. *Nature*, 225, 1048-1049.

- Mc Donald, J.K., Callahan, P.X., Ellis, S. Smith, R.E. (1971): Polypeptide degradation by dipeptidyl aminopeptidase I (Cathepsin C) related peptidases. In: *Tissue proteinases*. North Holland Publishing, Co. Amsterdam, 69-107.

- Mc Donald, J.K., Zeitman, B.B. Ellis, S. (1972): Detection of a lysosomal carboxypeptidase a lysosomal dipeptidase in highly-purified dipeptidyl aminopeptidase I (Cathepsin

C) the elimination of their activities from preparations used to sequence peptides. Biochem. Biophys. Res. Commun. 45, 62-70.

- Mc Donald, J.K., Zeitman, B.B., Callahan, P.X. Ellis, S. (1974): Angiotensinase activity of dipeptidyl aminopeptidase I (Cathepsin C) of rat liver. J. Biol. Chem., 249, 234-240.

Mc Donald, J.K. Ellis, S. (1975): On the substrate specificity of cathepsins B1 B2 including a new fluorogenic substrate for cathepsin B1. Life Sci., 17, 1269-1276.

-Mc Donald, J.K. Schwabe, C. (1977): Intracellular exopeptidases. In: Proteinases in mammalian cells tissues. North Holland Publishing Co. Amsterdam, 311-391.

- Mc Donald, J.K. Schwabe, C. (1980): Dipeptidyl peptidase II of beef dental pulp. Initial demonstration characterization as a fibroblastic lysosomal peptidase of the serine class active on collagen-related peptides. Biochim. Biophys. Acta., 616, 68-81.

- Mc Donald, J.K., Hoisington, A.R. Eisenhaver, D.A. (1985): Partial purification characterization of an ovarian tripeptidyl peptidase: a lysosomal exopeptidase that sequentially release collagen-related (Gly-Pro-X) triplets. Biochem. Biophys. Res. Commun., 126, 63-71.

- Mc Donald, J.K. Barret, A.J. (1986): In mammalian proteases. Vol. 2. Academic Press Inc, (London) LTD.

- Market, R.L., Westbroek, D.L., Jeeke, S. (1984): Interferon treatment of a transplantable rat colon adenocarcinoma: importance of tumor site. Int. J. Cancer, 33, 689-692.
- Mignatti, P., Robbins, E., Rifkin, D.B. (1986): Tumor invasion through the human amniotic membrane: requirement for proteinase cascade. Cell, 47, 487-498.
- Mort, J.S., Leduc, M., Recklies, A.D. (1981): A latent thiol proteinase from ascitic fluid of patients with neoplasia. Biochim. Biophys. Acta, 662, 173-180.
- Mort, J.S., Leduc, M.S. (1984): The combined action of two enzymes in human serum can mimic the activity of cathepsin B. Clinical Chim. Acta, 140, 173-182.
- Nathanson, L., Hall, T.C. (1974): A spectrum of tumors that produce paraneoplastic syndromes. Lung tumors: how they produce their syndrome. Ann. NY. Acad. Sci., 230, 367-377.
- Nemoto, K., Ohnishi, Y. (1983): Studies on aminopeptidase activity in acute non-lymphocytic leukemia. Acta. Pathol. Jpn., 33, 495-499.
- Nilsson, E., Gregersen, N.P., Hartvig, B., Sjö Dahl, R. (1984): Carcinoma of the colon rectum. Results of treatment in 284 cases. Acta. Chir. Scand., 150, 177-182.
- Ninjoor, V., Taylor, S.L., Tappel, A.L. (1974): Purification characterization of rat liver lysosomal cathepsin B2. Biochim. Biophys. Acta, 370, 308-321.

M. Diorente

- Nordwig, A. Mayer, H. (1973): The cleavage of prolyl peptides by kidney peptidases. Detection of a new peptidase capable of removing N-terminal proline. *Hoppe-Seyler's. Z. Physiol. Chem.*, 354, 380-383.
- Norton, J.A., Moley, J.F., Green, M.V., Carson, R.E. Morrison, S.D. (1985): Parabolic transfer of cancer anorexia/cachexia in male rats. *Cancer Res.*, 45, 5547-5552.
- O'Grady, R.L., Upfold, L.I., Stephens, R.W. (1981): Rat mammary carcinoma cells secrete active collagenase activate latent enzyme in the stroma via plasminogen activator. *Int. J. Cancer.*, 28, 509-515.
- Orłowski, M. Meister, A. (1965). Isolation of gamma-glutamyl transpeptidase from pig kidney. *J. Biol. Chem.*, 240, 338-347.
- Oshima, G., Kato, J. Erdos, E.G. (1975): Plasma carboxypeptidase N, subunits characteristics. *Arch. Biochem. Biophys.*, 170, 132-138.
- Ostrowski, L.E., Sothar, A., Pagast, P., Bacn, D., Wong, C., Patel, A. Schultz, R.M. (1986): Selective inhibition of proteolytic enzymes in a in vivo mouse model for experimental metastasis. *Cancer. Res.*, 46, 4121-4128.
- Otto, K. (1967): Über ein neues Kathepsin. Reinigung aus Rindermilz, Eigenschaften, sowie vergleich mit kathepsin B. *Hoppe-Seyler's. Z. Physiol. Chem.*, 348, 1449-1460.

- Perry, T.P., Hansen, S., Tischler, B., Bunting, R. Berry, K. (1967): Carnosinemia. A new metabolic disorder associated with neurologic disease mental defect. New. Eng. Med. 277, 1219-1227.

- Persky, B., Ostrowski, L.E., Pagast, P., Ahsan, A. Shultz, R.M. (1986): Inhibition of proteolytic enzymes in the in vitro amnion model for basement membrane invasion. Cancer. Res., 46, 4129-4134.

- Pfeleiderer, G. Celliers, P.G. (1963): Isolierung einer aminopeptidase aus Nierenpartikeln. Biochem. Z., 339, 186-189.

- Plaquet, R., Ledeme, N., Vincent-Fiquet, O. Biserte, G. (1973): Automatic determination of leucine aminopeptidase in human serum. Clin. Chim. Acta., 46, 91-103.

- Porter, C., Herrera-Ornelas, L., Pera, P., Petrellis, N. Mittleman, A. (1987): Polyamine biosynthetic activity in normal neoplastic human colorectal tissues. Cancer, 60, 1275-1281.

- Recklies, D., Poole, A.R. Mort, J.S. (1982): A cysteine proteinase secreted from human breast tumors is immunologically related to cathepsin B. Biochem. J., 207, 633-636.

- Recklies, A.D., White, C., Mitchell, J. Poole, A.R. (1985): Secretion of a cysteine proteinase from a hormone independent cell population of cultivated explants of murine mammary gland. Cancer. Res., 45, 2294-2301.

- Reitman, M.L., Varki, A. Kornfeld, S. (1981): Fibroblasts from patients with I-cell disease pseudo-Hurler polydystrophy are deficient in UDP-N-Acetylglucosamine: glycoprotein N-Acetylglucosaminyl-phosphotransferase activity. J. Clin. Invest., 67, 1574-1579.
- Rennie, J.A. Ogston, D. (1975): Fibrinolytic activity in malignant disease. J. Clin. Pathol., 28, 872-874.
- Robbins, S.L. (1974): In: pathological basis of disease. Philadelphia, W.B. Saunders, Co. 106-115.
- Robinson, D.S., Birnbaum, S.M. Greenstein, J.P. (1957): Purification properties of an aminopeptidase from kidney cellular particulates. J. Biol. Chem., 207, 1-26.
- Rozen, P. Baratz, M. (1982): Familial juvenile colonic polyposis with associated colon cancer. Cancer, 49, 1500-1503.
- Ruggiero, V., Johnson, S.F. Baglioni, C. (1987): Protection from tumor necrosis factor cytotoxicity by protease inhibitors. Cellular immunology, 103, 317-325.
- Sato, S., Quarles, R.H., Brady, R.O. Tourtellotte, W.W. (1984): Elevated neutral protease activity in myelin from brains of patients with multiple sclerosis. Ann. Neurol., 15, 264-267.

- Szczeplanski, M., Lucer, C., Zawadski, J., Tollockzo, T. (1982): Procoagulant fibrinolytic activities of gastric colorectal cancer. *Int. J. Cancer.*, 30, 329-333.
- Schoenberger, O.L., Schwöbel, H., Ebert, W. (1986): N-acetylalanine aminopeptidase activity in normal tumour cells. *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.*, 24, 375-378.
- Schwabe, C. (1969): Peptide hydrolases in mammalian connective tissue. II. Leucine aminopeptidase. Purification evidence for subunit structure. *Biochemistry.*, 8, 783-794.
- Sheldon, C.A., Mc Kinley, C.R., Hartig, P.R., González, R. (1983): Carcinoma at the site of ureterosigmoidostomy. *Dis. Colon. Rectum.*, 26, 55-58.
- Shimojo, H., Kitahashi, S., Naka, K., Fujii, A., Okuda, K., Tanaka, S., Fujii, S. (1987): Comparison of N-acetyl-β-D-glucosaminidase alanine aminopeptidase activities for evaluation of microangiopathy in diabetes mellitus. *Metabolism.*, 36, 277-280.
- Sillink, M., Rowe, P.B. (1975): The localization of glutamate carboxypeptidase in rat liver lysosomes. *Biochim. Biophys. Acta.*, 381, 28-26.
- Sjaastad, O., Gjessing, L., Berstad, J.R., Gjesdahl, P. (1977): Homocarsinosis. Spinal fluid amino acids in familial spastic paraplegia. *Acta Neurol. Scand.*, 55, 158-162.
- Skeggs, L.T., Jr., Kahn, J.R., Shumway, N.P. (1956): The preparation function of the hypertensin-converting enzyme. *J. Exp. Med.*, 103, 295-299.

- Sloane, B.F., Honn, K.V., Sadler, J.G., Turner, W.A., Kimpson, J.J., Taylor, J.D. (1982): Cathepsin B activity in 8-16 melanoma cells: a possible marker for metastatic potential. *Cancer Res.*, 42, 980-986.
- Sloane, B.F., Honn, K.V. (1984): Cystine proteinases metastasis. *Cancer Metast. Rev.*, 3, 249-263.
- Sloane, B.F., Rozhin, J., Johnson, K., Taylor, H., Crissman, J.D., Honn, K.V. (1986): Cathepsin B: Association with plasma membrane in metastatic tumors. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*, 83, 2483-2487.
- Siv, W.S., Fischer, H.D. (1982): The phosphomannosyl recognition system for intracellular intercellular transport of lysosomal enzymes. *J. Cell. Biochem.*, 18, 67-85.
- Smith, E.L., Bergmann, M. (1944): The peptidases of intestinal mucosa. *J. Biol. Chem.*, 153, 627-651.
- Smith, E.L. (1948_a): The glycylglycine dipeptidases of skeletal muscle human uterus. *J. Biol. Chem.*, 173, 571-583.
- Smith, E.L. (1948_b): Studies on dipeptidases II. Some properties of the glycyl-L-leucine dipeptidases of animal tissues. *J. Biol. Chem.*, 176, 9-19.

- Sokal, R.R., Rohlf, F.J. (1979): *Biometria: Principios y métodos estadísticos en la investigación biológica*. Ed. Blume, Madrid, España.
- Salt, B.B., Farber, E. (1976): New principle for the analysis of chemical carcinogenesis. *Nature*, 263, 702-703.
- Spackman, D.H., Smith, E., Brown, D.W. (1955). Leucine aminopeptidase. IV. Isolation properties of the enzyme from swine kidney. *J. Biol. Chem.*, 212, 255-269.
- Stearns, M.V. Jr. (1978): Benign malignant neoplasms of colon rectum. Diagnosis management. *Surg. Clin. North. Am.*, 58, 605-618.
- Streeter, D.H.P., Kerr, L.P., Kerr, C.B., Prior, J.C., Dalakos, T.G. (1972): Hyperbradykinism: a new orthostatic syndrome. *Lancet*, 2, 1048-1053.
- Sylven, B., Snellman, O. (1968): Studies on the histochemical "leucine aminopeptidase" reaction V. Cathepsin B as a potent effector of LNA hydrolysis. *Histochemic*, 12, 240-243.
- Summerton, J., Fynn, M., Taylor, I. (1983): Bile acid receptors in colo rectal cancer. *Brit. Journ. Surg.*, 70, 549-551.
- Tallan, H.H., Jones, M.E., Fruton, J.S. (1952): On the proteolytic enzymes of animal tissues. X. Beef spleen cathepsin C. *J. Biol. Chem.*, 194, 793-805.

- Teresa Galvan de, J., Esteban Carretero, J., Martinez Moreno, J., Lacarcel Fernández, E. (1984): Exploración funcional del colon. *Gastrum.*, Mayo, 80-88.
- Terpstra, O., van Blankenstein, M., Dees, J. Eilers, G. (1987): Abnormal pattern of cell proliferation in the entire colonic mucosa of patients with colon adenoma or cancer. *Gastroenterology.*, 92, 704-708.
- Theologides, A. (1976): Anorexia-producing intermediary metabolites. *Am. J. Clin. Nutr.*, 29, 552-558.
- Tighe, B.F., Power, B., O'Driscoll, J. Delaney, P.W. (1981): Collagenolytic activity in colon cancer. *Br. J. Surg.*, 69, 680.
- Tsuji, S. Matsushita, H. (1986): Successful treatment of murine muscular dystrophy with the protease inhibitor bestatin. *J. Neur. Sci.*, 72, 183-194.
- Tsunasawa, S., Narita, K. Ogata, K. (1975): Purification properties of acylamino acid-releasing enzyme from rat liver. *J. Biochem.*, 77, 89-102.
- Turnbull, R.B., Kyle, K. Watson, F.R. (1967): Cancer of the colon: the influence of the no-touch isolation technic on survival rates. *Ann. Surg.*, 166, 420-427.
- Vasishta, A., Baker, P.R., Hopwood, D., Holley, P.M. Cuschieri, A. (1985): Proteinase-like peptidase activities in malignant non-malignant gastric tissue. *Br. J. Surg.*, 72, 386-388.

- Vuk-Pavlovic, S., Djura, E.C., Levanat, S., Urbanec, D., Pavelic, K. (1986): Autocrine tumor growth regulation tumor-associated hypoglycemia in murine melanoma B16 in vivo. *Cancer. Res.*, 46, 2208-2213.
- Waldschmidt-Leitz, E. Purr, A. (1929): Über Proteinase und Carboxy Polypeptidase aus Pankreas. XVII Mitteilung zur spezifität tierischer Proteasen. *Berichte*, 62B, 956-962.
- Waldschmidt-Leitz, E., Balls, A.K. Waldschmidt-Graser, J. (1929): Über Dipeptidase und Polypeptidase aus Darm-Schleimhaut. (XVI. Mitteilung zur Spezifität tierischer Proteasen). *Berichte.*, 62B, 2217-2226.
- Waldschmidt-Leitz, E., Ziegler, F., Schaftner, A. Weil, L. (1931): Über die struktur der Protamine I. Protaminase und die produkte ihrer Einwirkung auf clupein und Salmin. *Z. Physiol. Chem.*, 197, 219-236.
- Waldschmidt-Leitz, E. (1931): The mode of action differentiation of proteolytic enzymes. *Physiol. Reviews.*, 11, 358-370.
- Wanebo H.J., Rao, B., Attiyeh, F., Pinsky, C., Middleman, P., Stearns, M. (1980): Immune reactivity in patients with colorectal cancer: assesment of biologic risk by immunoparameters. *Cancer.*, 45, 1254-1263.
- Welch, J.B. Donaldson, G.A. (1979): The clinical correlation of an autopsy study of recurrent colorectal cancer. *Ann. Surg.*, 189, 496-502.

- Willighagen, R.G.J. Planteydt, H.T. (1959): Nature, 183, 263-264.

- Willstätter, R. Bamann, E. (1929): Über die Proteasen der Magenschleimhaut Erste Abhandlung über die Enzyme der Leukocyten. Hoppe-Seyler's. Z. Physiol. Chem., 180, 127-143.

- Yang, H.Y.T., Erdös, E.G. Chiang, T.S. (1968): New enzymatic route for the inactivation of angiotensin. Nature., 218, 1224-1226.

- Yang, H.Y.T. Erdös, E.G. (1971): Prolylcarboxypeptidase: a recently described lysosomal enzyme. In: Immunopathology of Inflammation. Forscher, B.K. Houck, J.C. Eds. pp, 146-148.