

Estudios Bioquímicos sobre el Carcinoma Cérvicouterino

I. Actividad de Transaminasa Tumoral y su Respuesta a las Radiaciones

JOSE LAGUNA* ENRIQUE PISA**, ARMANDO GOMEZ POUYOU**, VICTORIA CHAGOYA* Y GUADALUPE VILLASESOR*

En 1957, Laguna y Rangel¹ comunicaron sus resultados sobre la actividad de transaminasa del suero en un grupo de enfermos cancerosos tratados con radiaciones o quimioterapia. Entre los resultados se registró la ausencia de modificaciones de la actividad transaminásica del suero en un grupo de enfermas de carcinoma cérvicouterino tratadas con rádium, aunque en teoría los autores esperaban cierto aumento en vista de que buena parte de procesos de destrucción tisular producen un aumento de la actividad de la enzima; se consideró que esta falta de respuesta se debe al factor tiempo ya que las observaciones se hicieron días después de terminado el tratamiento con radiaciones. Mich y Albaum², por ejemplo, han demostrado que se observa un aumento de la actividad de transaminasa en el suero de conejos irradiados con rayos X; con dosis fuertes, aplicadas en lapsos muy cortos; el máximo del ascenso se registró entre las 3 y las 6 horas después de la irradiación. Por lo tanto, en las condiciones en que se hizo el trabajo de Laguna y Rangel, parecía que las radiaciones administradas en la forma convencional no modifican suficientemente el estado tisular como para permitir la salida de la enzima a la circulación o simplemente no produce un aumento de la actividad de dicha enzima. En vista de esos resultados se planeó hacer el estudio correspondiente de la actividad de transaminasa pero en el seno del propio tumor, comparando los resultados de unas series obtenidas antes del tratamiento radioterápico con los de otras, obtenidos después de dicho tratamien-

to. Los resultados alcanzados en esta comparación son la base del presente trabajo.

Material y métodos

Se obtuvieron fragmentos de carcinoma cérvicouterino por medio de biopsia, procedentes de enfermas del Instituto Nacional de Cancerología. Se analizaron de preferencia, muestras de tumores proliferativos para asegurar un fragmento de tamaño adecuado para hacer los estudios analíticos correspondientes. En la gran mayoría de los casos se hicieron estudios histológicos simultáneos en una parte de los fragmentos para estar totalmente seguros de hacer los análisis en el tejido tumoral.

Se estudiaron 18 tumores de enfermas antes de ser sometidas a tratamiento y 10 tumores de casos radiados con el tratamiento convencional con rádium. La mayor parte de estos tumores se estudiaron en el lapso de un mes a partir de la terminación del tratamiento pero en dos casos el período se extendió a 6 y 10 semanas.

La muestra se conservó en frío mientras se procedía a su análisis. La determinación de la actividad de transaminasa se practicó en el homogenado del tumor, hecho con solución amortiguadora de fosfatos a pH 7.4. Los lineamientos generales de la técnica son los de Karmen y colaboradores³. Se incubó el homogenado del tumor más ácido alfa-cetoglutarico más alanina durante un período de 3 horas, tiempo óptimo para las determinaciones en estos tejidos. En el líquido de incubación, precipitadas las proteínas por medio de alcohol absoluto, se determinó el ácido glutámico formado siguiendo, en principio, la técnica recomendada por Awapara⁴, usando método de papel, en cromatografía unidimensional, con fenol-agua como solvente.

* De la División de Investigación Biológica de la Industria Nacional Químico Farmacéutica.

** Becarios del Instituto Nacional de Cancerología en la Escuela Nacional de Medicina.

El tiempo de desarrollo fue de 36 horas y la técnica de cuanteo fué colorimétrica revelando el sitio donde se encontraba la mancha del ácido glutámico con ninhidrina y después eluyendo el color totalmente formado por medio de acetona. La actividad de la enzima se expresa en unidades que representan miligramos de ácido glutámico formado por hora de incubación por gramo de nitrógeno de tejido. Los análisis de nitrógeno para lograr esta expresión se hicieron en parte del homogenado, aplicando un método de Kjeldhal, micro.

los promedios y las desviaciones standard resultaron, respectivamente, 157.1 ± 85.1 y 60.6 ± 40.5 lo que denota cierto grado importante de dispersión. Sin embargo, el cálculo de *t* arrojó un valor de 2.7 lo que coloca a *p*, la probabilidad de que la diferencia no sea casualidad, entre 0.02 y 0.01.

El análisis de los resultados en función del tiempo se expresa en la fig. 1, que muestra la actividad de transaminasa en los 10 tumores irradiados tomando en cuenta el tiempo, en semanas, en que se tomó la muestra después de

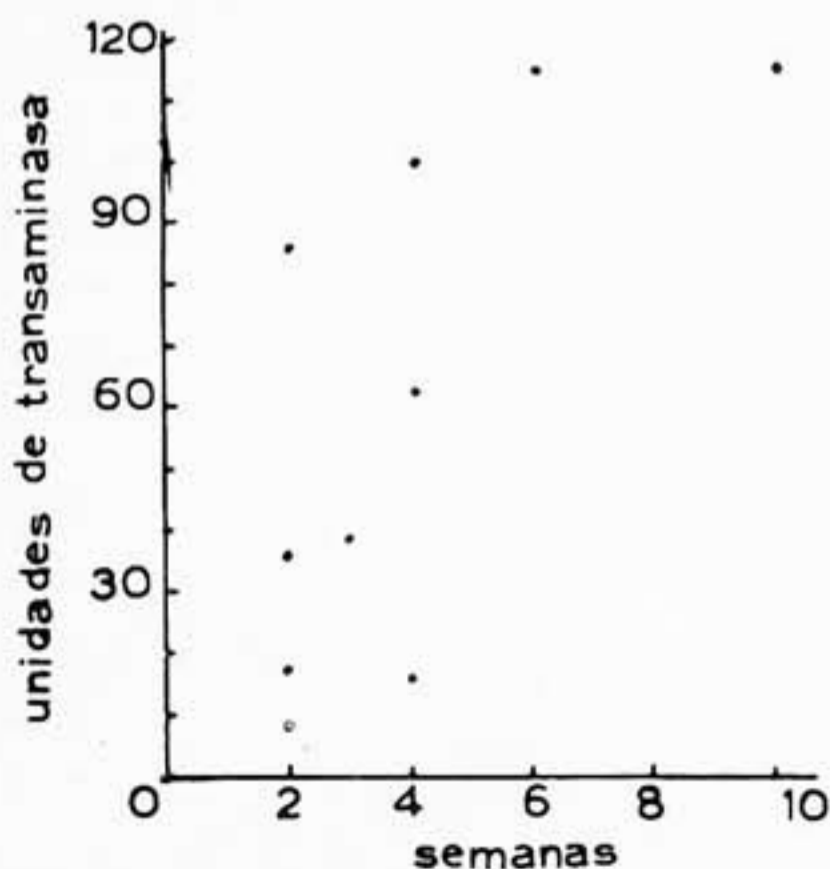
TABLA 1

ACTIVIDAD DE TRANSAMINASA EN CARCINOMAS CERVICOUTERINOS NO RADIADOS Y RADIADOS

	No. de casos	Promedio \pm D.S.	Extremos	t	p
Antes de la radiación	18	157.1 ± 85.1	45-298		
Después de la radiación	10	60.6 ± 40.5	9-115	2.7	<0.02

Resultados

En la tabla No. 1 está consignado el resultado de los análisis de actividad de transaminasa en los casos no radiados y en los radiados;



Correlación entre la actividad de transaminasa del tumor radiado con el tiempo transcurrido después de la irradiación.

la irradiación. Como se ve, hay casos que tienen actividad relativamente alta o baja con muestras tomadas entre 2 y 4 semanas después del tratamiento. En rigor, el número de casos es insuficiente para hablar de una tendencia real; lo único que puede decirse es que después de varias semanas de haber sido irradiados los tumores tienen tendencia a presentar cifras mayores.

Discusión

Los resultados del presente trabajo señalan, de manera clara un efecto inhibitor de las radiaciones sobre la actividad de transaminasa en el caso del carcinoma cérvicouterino tratado de modo convencional por medio de radiaciones, que además se sostienen varias semanas. La interpretación del fenómeno presenta dificultades, sin embargo. Por un lado, es bien sabido que es posible producir la inactivación fotoquímica de las enzimas —como parte del fenómeno general de la desnaturalización fotoquímica de las proteínas— *in vitro*, especialmente usando soluciones acuosas diluidas de las proteínas puras; de hecho, esta es la base de una de las teorías más invocadas para explicar el mecanismo de las radiaciones sobre las células (Dale^{5,6}).

Sin embargo, in vivo, la situación es más compleja, puesto que existen sistemas enzimáticos que son activados por las radiaciones, al paso que otros son inhibidos. En efecto, muchos laboratorios radiobiológicos han demostrado aumento de la actividad después de la irradiación, a veces de magnitud considerable (hasta 400 por ciento), aunque en general el aumento es más notable poco después de la irradiación. Entre los casos más típicos de esta respuesta se encuentran el sistema peroxidasa-oxidasa del triófano⁷, cuya actividad aumenta notoriamente después de la irradiación; el interesante sistema de la carboxipeptidasa del riñón de la rata cuya actividad aumenta porque los rayos X destruyen el inhibidor de esa enzima⁸; el aumento de actividad de fosfatasa alcalina en homogenados de bazo después de la irradiación⁹ y otras más. En contra de estos casos en los que las radiaciones aumentan la actividad de un sistema enzimático se conocen otros en los que producen inhibiciones sobre sistemas enzimáticos aislados, in vivo. A este respecto conviene asentar que los sistemas enzimáticos impuros o las enzimas in vivo son extraordinariamente resistentes a la inhibición; es probable que las enzimas sean protegidas in vivo por su localización sobre las estructuras intracelulares. Entre los casos más representativos de inhibición enzimática se encuentran el referido por Conrad¹⁰ sobre la colinesterasa inespecífica del músculo y la mucosa intestinal en ratas, cuyo efecto máximo, se lograba después de 48 horas; el de la catalasa en el hígado de ratón¹¹ é incluso, en el terreno microbiológico, los datos de Brandt y colaboradores¹², quienes encontraron que la radiación ultravioleta inhibe la formación adaptativa de galactozimasa en *Saccharomyces cerevisiae*; las dosis que inhibían por completo la síntesis de la enzima presentaban escaso efecto sobre la enzima preformada; Billen y Lichstein¹³, de la misma manera, encontraron que los rayos X producen una creciente inhibición en la formación adaptativa de hidrogenilasa fórmica en *E. coli*.

En cuanto al efecto de las radiaciones sobre la actividad de transaminasa, lo único que logramos encontrar fué la aseveración de Bacq y Alexander¹⁴ en el sentido de una reducción en la transaminación tisular, hasta del 5 por ciento, en animales irradiados, coincidiendo con la

aparición de graves lesiones anatómicas, a los 4 a 6 días de la irradiación total.

A la luz de estos hechos, nuestros resultados parecen señalar un efecto de las radiaciones sobre el tejido tumoral más en consonancia con la inhibición de la síntesis de la propia enzima que con la inactivación de las moléculas presentes. Por el momento, no se puede asentar si esto es sólo un efecto observable en tumores o es común a los tejidos normales, puesto que no hemos encontrado en la literatura referencia a este respecto. Esto puede ser el resultado del efecto mismo de las radiaciones o podría deberse a la regresión a tejido menos anormal. Por otro lado, no es posible comparar los valores de transaminasa del carcinoma cérvicouterino con los del tejido normal, pues el epitelio de revestimiento del que se origina el tumor, en estado normal, representa una estructura microscópica en la que no es posible aplicar técnicas cuantitativas. Es decir, no sabemos cual es la actividad de transaminasa del tejido normal y en este trabajo, en efecto, sólo podemos comparar los valores de tejido tumoral antes y después de las radiaciones. En otras localizaciones se ha estudiado la actividad de transaminasa en tejido tumoral en comparación con tejido sano vecino. Tal es el caso de Cohen y colaboradores¹⁵ que encontraron disminución de la actividad de transaminasa en carcinomas hepáticos desarrollados con colorantes azoicos.

Parece por lo tanto, que en los casos observados por nosotros, la franca disminución de la transaminasa puede deferirse más a la modificación en los procesos de síntesis de la enzima misma. Este hecho puede tener ciertas implicaciones desde el punto de vista del metabolismo proteínico del tumor. En efecto Laguna y colaboradores¹⁶ han encontrado una disminución marcada de los aminoácidos libres en el carcinoma cérvicouterino tratado con radiaciones lo que contribuye a la idea de que las radiaciones en este caso actúan posiblemente alterando la conversión de aminoácidos a proteína—hecho por otro lado común, cuando menos teóricamente, a cualquier tumor en regresión—y quizás su metabolismo intermedio, ejemplificado en este caso, por las reacciones de transaminación.

Resumen

Se hizo un estudio sobre la actividad de transaminación del tejido tumoral antes y después de tratamiento radioterápico en 28 pacientes con carcinoma cérvicouterino, siendo 10 de ellas estudiadas después de las radiaciones. Se encontró un promedio de 157.1 ± 85.1 y de

60.6 ± 40.5 unidades de transaminasa, respectivamente, en los tumores no radiados y en los radiados. Estos valores fueron significativos al análisis estadístico. Se discuten las implicaciones del hallazgo y se considera como aceptable la posibilidad de que se trate de un efecto de las radiaciones sobre la síntesis de la enzima con la correspondiente disminución del metabolismo proteínico.

Referencias Bibliográficas

1. Laguna, J. y M. L. Rangel. *Rev. Inst. Nac. Cancerol.* 1:211, 1957.
2. Mich, L. J. y H. G. Albaum. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 93:955, 1956.
3. Karmen, A., K. Wroblewski y R. S. La Due. *J. Clin. Invest.* 34:126, 1955.
4. Awapara, J. *J. Biol. Chem.* 200:537, 1953.
5. Dale, W. M. *Biochem. J.* 34:1367, 1940.
6. Dale, W. M. *Biochem. J.* 36:50, 1942.
7. Knox, W. E. *Brit. J. Exp. Path.* 32:462, 1951.
8. Feinstein, R. N. y J. C. Dallin. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 83:10, 1953.
9. Maxwell, E. y G. Aswell. *Arch. Biochem.* 43:389, 1953.
10. Conard, R. A. *Amer. J. Physiol.* 170:418, 1952.
11. Feinstein, R. M., C. L. Butler y D. D. Hendley. *Science* 111:149, 1950.
12. Brandt, C. L., P. I. Freeman y P. A. Swenson. *Science* 113:383, 1951.
13. Billen, D. y H. C. Lichstein. *J. Bacteriol.* 63:533, 1952.
14. Bacq, O. M. y P. Alexander. *Fundamentals of Radiobiology*. Academic Press New York, 1955, p. 238.
15. Cohen, P. P., L. G. Hekhius y E. K. Soher. *Cancer Research* 2:405, 1942.
16. Laguna, J. y colaboradores. Datos no publicados.