

**UNIVERSIDAD DE SONORA**

ESCUELA DE CIENCIAS QUIMICAS

**ESTUDIO DE INHIBIDORES DE LA  
FOSFATASA ALCALINA PARA APLICACION  
EN METODO DE LABORATORIO**

# **TESIS PROFESIONAL**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

***QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO***

P R E S E N T A

**JOSE TIBURCIO LEYVA CARRERAS**

HERMOSILLO, SONORA, MEXICO,

1 9 7 1

# Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



"El saber de mis hijos  
hará mi grandeza"



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

C O N T E N I D O

- I.- RESUMEN.
- II.- INTRODUCCION.
- III.- MATERIAL Y METODOS.
- IV.- RESULTADOS.
- V.- DISCUSION.
- VI.- CONCLUSIONES.
- VII.- BIBLIOGRAFIA.

R E S U M E N

Se hizo un estudio sobre los distintos orígenes de la fosfatasa alcalina, haciendo uso de los inhibidores específicos para cada fracción.

De acuerdo con los resultados obtenidos se llegó a las conclusiones siguientes:

- a) Que la fosfatasa alcalina de cualquier origen no tiene afinidad hacia determinado sustrato.
- b) Que la técnica de Klein-Babson-Read, modificada con inhibidores puede ser de uso frecuente en el Laboratorio Químico Clínico de rutina.

I N T R O D U C C I O N

El estudio de la fosfomonoestearasa alcalina a la cual se han abocado numerosos investigadores, da por consecuencia que existan abundantes trabajos al respecto, en los cuales se observa lo laborioso que ha sido ajustar la determinación de la enzima a un método de laboratorio que sea confiable y de aplicación práctica.

La fosfatasa alcalina se encuentra distribuida en la mayoría de los tejidos de nuestro organismo, con mayor proporción en hígado y tejido óseo. El suero de origen humano contiene dos enzimas que catalizan la hidrólisis de ésteres de fosfato (Fosfatasas), de alcoholes tales como glicerol, fenol, p-nitrofenol, fenolftaleína, etc.; estas fosfatasas no específicas pueden ser diferenciadas por el pH al cual cada una exhibe su máxima actividad. Elevados valores de fosfatasa alcalina en sueros (pH: 9-10) son encontrados en enfermedades hepáticas, biliares, desórdenes del metabolismo óseo, hiperparatiroidismo, raquitismo, etc.

La medida de la actividad de la fosfatasa alcalina fue una de las primeras determinaciones enzimáticas y es en la actualidad una de las más usadas en el laboratorio clínico. Con el tiempo se han elaborado nuevas modificaciones a métodos establecidos que han sido introducidos con el fin de acortar el tiempo de ensayo, incrementar la sensibilidad para dar mayor - -

precisión, sencillez de la determinación, estabilidad de los reactivos, afinidad del sustrato, etc.

En 1930 H. D. Kay (10), fue el primero en describir un método para la determinación cuantitativa de la fosfatasa alcalina plasmática -- usando beta-glicerofosfato de sodio como sustrato a pH de 7.6 en ausencia de amortiguador e -- incubando 48 horas a 38° C. y midiendo el fósforo liberado en la hidrólisis.

Los trabajos de Bodansky (2,3), usando el mismo sustrato pero utilizando amortiguador de dietilbarbiturato de sodio para mantener la solución sustrato a pH de 8.6 y a una temperatura de 37° C., dio por resultado la reducción del tiempo de incubación a dos horas y utilización de menor cantidad de plasma oxalatado (1-3 ml.), Este trabajo recomienda el uso de suero en lugar de plasma oxalatado por los errores que éste presenta en la determinación y reduciendo de esta manera el tiempo de incubación a una hora. Shinowara, Jones y Reinhart (15), trabajando -- con el procedimiento de Bodansky encontraron -- que el pH óptimo para la actividad enzimática -- era de 9.3 .

En 1933 King y Armstrong (5,16), reportaron un método basado en la hidrólisis del fenilfosfato disódico durante 15 minutos de incubación a 37° C. en amortiguador de carbonato --

bicarbonato de sodio a pH de 10.0 con la respectiva determinación del color desarrollado por el fenol liberado en un medio alcalino.

En 1960 Bernard Klein, Read y Babson (1), dan a conocer los resultados obtenidos con un método usando un complejo de fenolftaleína-fosfato como sustrato a pH 9.9 y 37° C. con 30 minutos de incubación, donde la cantidad de fenolftaleína liberada en un medio alcalino es medida colorimétricamente.

La desproteínización era un problema para los investigadores, ya que además de consumir tiempo, no eliminaba en su totalidad la cantidad de proteína y el filtrado contenía fósforo proveniente de la acción del ácido tricloroacético sobre el papel filtro utilizado. Con el tiempo estos problemas fueron resueltos (1,6, 8,13), dándose gran avance en las técnicas al tomar como base la determinación de la fenolftaleína, la cual presenta la ventaja de ser una sustancia no presente en el suero con lo cual se elimina cualquier interferencia en su determinación.

En 1964 Kay, H. y J.A. Trew (9), automatizaron el procedimiento de Bodansky, determinando en forma simultánea el fósforo inorgánico y la fosfatasa alcalina en suero. En 1967, Kirsten Hviid (11), automatizó el método de Babson y su ensayo consiste en la determinación - - -

colorimétrica de la fenolftaleína, proveniente de la hidrólisis del complejo fenolftaleína----fosfato.

Debido a la mayor o menor acción enzimática de la fosfatasa alcalina en los diferentes - sustratos y su comportamiento debido a varia--- ciones de temperatura y tiempo de incubación, - se sospechó que existían fracciones de la misma que tenían diferentes condiciones de acción - - enzimática. Esto fue corroborado posteriormente al someter a electroforesis la fosfatasa obte-- nida de diferentes extractos de tejidos, obte-- niéndose varias fracciones (isoenzimas), con -- las que se han elaborado patrones electroforéti-- cos, y han sido utilizados para conocer el ori-- gen de la fosfatasa alcalinosérica. En los ul-- timos años (7,20), la fosfatasa alcalina ha si-- do fraccionada mediante varias técnicas electro-- foréticas en varios componentes; el número y -- localización de éstos, varían de acuerdo a las técnicas y condiciones experimentales usadas.

Steenson y Evered (18), encontraron que el citrato de sodio inhibe la actividad de la fos-- fatasa alcalina. Fishaman Inglis y Krant (19), - establecieron que solamente la fosfatasa alca-- lina de origen intestinal es inhibida por la -- L-fenilalanina, aproximadamente en un 80-90 %.- Bahr, Maryane y Wilkinson (12), encontraron que las enzimas de origen óseo y renal son las más-- susceptibles a su inhibición por la urea; la --

enzima que presenta elevación en su actividad a bajas concentraciones de urea es la de origen hepático, la cual presenta una elevación de un 5 % aproximadamente. Conyers (14), dio a conocer en sus trabajos que la enzima de origen placentario es la más resistente a su inhibición por E.D.T.A. disódico que las demás.

Debido a la gran cantidad de técnicas utilizadas en la actualidad y con el fin de observar el comportamiento de la actividad enzimática de la fosfatasa alcalina, se utilizaron tres técnicas originales: Bodensky, King-Armstrong y Bessey Lowry-Brock, y las mismas modificadas -- con un mismo amortiguador que nos permite trabajar las tres técnicas en las mismas condiciones de pH, temperatura y tiempo de incubación, con el fin de observar si la enzima de la cual se desconoce el origen es específica para determinados sustratos o bien actúa sobre ellos indistintamente.

El principal problema que se presenta en el laboratorio es el reporte de niveles altos de fosfatasa alcalina sin precisar el origen de tal elevación; para ésto, se han tomado en cuenta los estudios hechos sobre los inhibidores de la fosfatasa alcalina, optando por aplicar éstos a una técnica de uso común en nuestro medio (phosphatabs-Alkaline quantitative). La razón por la cual se utilizó esta modificación es la siguiente: La solución de urea 2M y 3M, inhibe-

la enzima de origen hepático, óseo y renal en un 80-90 %; la de origen intestinal es poco afectada a esta concentración. La urea 0.5M, incrementa la actividad de la enzima de origen hepático en un 5 % aproximadamente. La fenilalanina de 0.005M, inhibe casi completamente la enzima de origen intestinal.

MATERIAL Y METODOS

Se usó como biológico suero sanguíneo, el cual después de ser recolectado, se procedió a la determinación de la fosfatasa alcalina.

1.- METODO DE BODANSKY (2)

a) Principio: Se basa en la hidrólisis enzimática del sustrato de beta-glicerofosfato sódico a 37°C. durante una hora de incubación, y la determinación del fósforo liberado por la enzima mediante el método de Fiske y Subbarow (4).

b) Equipo:

- 1.- Tubos de ensaye de 13 X 100 y 18 X 150 mm.
- 2.- Pipetas de 1 ml. graduadas en 0.1 ml.
- 3.- Pipetas de 5 y 10 ml.
- 4.- Embudos para filtrar y papel Whatman # 42.
- 5.- Espectrofotómetro Coleman Junior modelo 6 A con celdas de 19 X 105 mm.

c) Material químico :

- 1.- Glicerofosfato sódico (Nutritional Bioch C )
- 2.- Dietilbarbiturato sódico (Fisher Cat. B - 22)
- 3.- Eter de petróleo (Prod. Q. Gardir)

- 4.- Ácido Aminonaftolsulfónico - --  
(E. K. 360)
- 5.- Bisulfito de sodio (Mallinck. -  
Cat. # 7448)
- 6.- Sulfito de sodio (Mallinck. Cat.  
# 7384)
- 7.- Acido sulfúrico (J. T. Baker --  
Cat. # 9681)
- 8.- Molibdato de amonio (J. T. Ba--  
ker Cat. # 0716)
- 9.- Acido tricloroacético ( J. T. -  
Baker Cat. # 0414)

d) Reactivos:

1.- Amortiguador:

Glicerofosfato sódico.. 0.500g.  
 Dietilbarbiturato só-  
 dico ..... 0.424g.  
 Disolver y diluír a ... 100 ml.  
 Transferir a un frasco y cubrir  
 con capa de 3 cm. de éter de pe-  
 tróleo. Guardar en refrigerador.  
 Estable un mes.

2.- Acido aminonaftol-

sulfónico ..... 0.25 %  
 Bisulfito de sodio . 14.250 g.  
 Acido aminonaftol-  
 sulfónico ..... 0.250 g.  
 Añadir 70 ml. de agua; agitar -  
 vigorosamente durante dos minu-  
 tos.

Agitar vigorosamente 5 minutos.  
Si el ácido no se disuelve completamente añadir 0.2 ml. de la solución sulfito de sodio. Agitar hasta disolución.

Aforar a..... 100 ml.  
Filtrar. Estabilidad un mes.

3.- Reactivo de molibdato:

Acido sulfúrico 10 N .. 150 ml.

Disolver separadamente:

Molibdato de amonio ... 12.5 g.

Agua..... 100 ml.

Añadirlo al ácido sulfúrico y diluir a 500 ml. con agua.

4.- Acido tricloroacético al 10% --  
(P/V).

e) Técnica:

1.- En tres tubos marcados: 1, 2 y 3.  
Colocar 7.5 ml. de amortiguador.

2.- Tubo # 1: Incubar a 37°C. por 5 minutos, agregar 0.5 ml. de suero problema e incubar a 37°C. por una hora. Colocar después en baño de agua helada por dos minutos.

3.- Tubo # 2: Agregar 0.5 ml. de suero.

4.- Tubo # 3: (Blanco), agregar 0.5 ml. de agua.

de ácido tricloroacético al --  
10 %. Esperar 5 minutos y fil-  
trar con papel Whatman # 42.

6.- Tomar 5 ml. del filtrado co- -  
rrespondiente a cada tubo.

7.- Agregar 1.0 ml. de molibdato-  
y 0.4 ml. de aminonaftol sul--  
fónico a los tres tubos.

8.- Diluir a 10 ml. con agua y re-  
posar 15-20 minutos.

9.- Leer a 660 nm. usando el Blan-  
co a 100 % T, en Espectrofotó-  
metro Coleman Junior Modelo 6A  
con celdas de 19X105 mm.

f) Cálculos:

Fósforo tubo # 1 menos fósforo tu-  
bo # 2 igual a unidades Bodansky.

g) Cifras normales:

Adultos = 1.5 - 4.0 U.B.

Niños = 5.0 - 14.0 U.B.

h) Unidades Bodansky: Es la cantidad-  
de enzima que libera un mg. de fós-  
foro del sustrato a pH 9.5 durante  
una hora de incubación.

## 2.- METODO DE KING-ARMSTRONG (5)

a) Principio: La enzima hidroliza el -  
fenilfosfato disódico liberando ---  
cantidades equivalentes de fenol y-  
fosfato. Después el fenol es deter-  
minado colorimétricamente por la --  
medida del color azul, el cual es -  
producido por la adición d

carbonato de sodio.

b) Equipo:

- 1.- Tubos de ensaye de 13X100 mm.
- 2.- Pipetas serológicas de 0.2 ml.
- 3.- Pipetas de 5 y 10 ml.
- 4.- Embudos y papel Whatman # 42.
- 5.- Espectrofotómetro Coleman Junior Modelo 6A con celdas de 19X105 mm.

c) Material químico:

- 1.- Fenilfosfato disódico (Sigma - P - 775).
- 2.- Cloroformo ( Harleco L - 2552)
- 3.- Carbonato de sodio (J. T. Baker Cat. # 3604 )
- 4.- Bicarbonato de sodio (Mallinck.- Cat. # 7412).
- 5.- Tungstato de sodio (J.T. Baker Cat. # 3966)
- 6.- Molibdato de sodio (J.T. Baker Cat. # 3764)
- 7.- Acido fosfórico (Tec. Q. S. A. Cat. # 1140)
- 8.- Acido Clorhídrico ( J.T. Baker Cat. # 9535)
- 9.- Sulfato de litio ( J.T. Baker-Cat. # 2388)
- 10.- Bromo ( J.T. Baker Cat. # 9760)
- 11.- Hidróxido de sodio (Mallinck.- Cat. # 7708)
- 12.- Iodo (Mallinck. Cat # 1008)

d) Reactivos:

1.- Fenilfosfato disódico M/100:  
Fenilfosfato disódico 1.0 g.  
Agua..... 500 ml.  
Calentar rápidamente, enfriar;  
añadir un poco de cloroformo.-  
Guarde en refrigerador.

2.- Carbonato de sodio 0.06M - Bi-  
carbonato 0.04M.  
Carbonato de sodio -  
anhidro ..... 3.18 g.  
Bicarbonato de so--  
dio ..... 1.68 g.  
Agua ..... 500 ml.  
Guarde en refirgerador.

3.- Sustrato de trabajo:  
Volúmenes iguales de 1 y 2. --  
Guarde en refrigerador.

4.- Reactivo concentrado de fenol:  
Tungstato de sodio.. 100 g.  
Molibdato de sodio.. 25 g.  
Agua ..... 700 ml.  
Acido fosfórico 85 % 50 ml.  
Acido clorhídrico -  
concentrado ..... 100 ml.  
Reflujar por 10 horas.

Sulfato de litio ... 150 g.  
Agua. .... 50 ml.

Agregar 5-10 gotas de bromo --

solución será clara o amarillo claro. En caso de presentar un tinte verdoso, repetir el tratamiento con bromo. Enfríe y diluya a un litro.

Estable vario meses.

5.- Reactivo fenol diluido:

Un volumen del reactivo concentrado con dos volúmenes de --- agua.

6.- Solución tipo de fenol:

Fenol cristalizado 1.0 g.

Acido clorhídrico -

N/10 ..... 1000 ml.

Normalización de la solución tipo de fenol. 25 ml. de solución (6) más 50 ml. de hidróxido de sodio 0.1 N y calentar a 65°C. más 25 ml. de Iodo N/10. Tape y deje reposar 30-40 minutos. Agregar 5 ml. de ácido clorhídrico concentrado y valorar el exceso con tio sulfato de sodio 0.1 N usando un ml. de almidón como indicador.

1 ml. de Iodo N/10 = 1.57 mg. de fenol.

7.- Solución tipo diluida de fenol:

5 mg. de fenol en 100 ml. Estable un mes. Guarde en refrigerador.

8.- Carbonato de sodio 6 % (P/V) -  
en agua.

e) Técnica:

- 1.- En dos tubos marcados A y B, -  
colocar 4 ml. de sustrato de -  
trabajo e incubar 5 minutos a  
37°C.
- 2.- Al tubo "A" agregar 0.2 ml. de  
suero problema e incubar durante  
15 minutos a 37°C.
- 3.- Agregar 2 ml. del reactivo de-  
fenol diluido a los tubos "A"-  
y "B".
- 4.- Al tubo "B", agregar 0.2 ml. -  
de suero problema.
- 5.- Reposar y filtrar en papel - -  
Whatman # 42.
- 6.- Tomar 2 ml. del filtrado y ---  
agregar 8 ml. de carbonato de  
sodio al 6 % y reposar 20 minutu  
tos.
- 7.- Solución tipo: 1 ml. de fenol-  
(7) más 3.2 ml. de agua más --  
2 ml. de reactivo de fenol di-  
luído. Tomar 2 ml. y agregar -  
8 ml. de carbonato de sodio --  
6 %.
- 8.- Blanco: 4.2 ml. de agua más --  
2 ml. de reactivo de fenol di-  
luído. Tomar 2 ml. y agregar -  
8 ml. de carbonato de sodio --  
6 %.

9.- Leer a 660 nm usando el Blanco a 100 % T en Espectrofotómetro Coleman Junior Modelo 6A en -- celdas de 19X105 mm.

f) Cálculos:

$$U.K.A. = \frac{RA - RB}{RT} \times 25$$

g) Cifras normales:

Adultos = 4 - 10 U.K.A.

Niños = 10 - 20 U.K.A.

h) Unidades King- Armstrong: Es la -- cantidad de enzima que libera un -- mg. de fenol del sustrato a pH de -- 10.0 durante 15 minutos de incuba -- ción a 37°C.

### 3.- METODO DE BESSEY-LOWRY-PROCK (17)

a) Principio: Se basa en la acción -- enzimática sobre el p-nitrofenil-- fosfato disódico a 37°C. durante -- 30 minutos, liberando p-nitrofenol, el cual es medido colorimétrica--- mente en un medio alcalino.

b) Equipo:

1.- Tubos de ensaye de 13X 100 mm.

2.- Pipetas serológicas de 0.1 ml.

3.- Pipetas de 1.0 ml.

4.- Pipetas de 5 y 10 ml.

5.- Espectrofotómetro Coleman Ju-- nior Mod. 6A con celdas de --- 10X75 mm.

- 1.- Glicina (E.K. Cat. # 445)
- 2.- Cloruro de magnesio (J.T. Baker Cat. 2444)
- 3.- Hidróxido de sodio (Mallinck.- Cat. # 7708)
- 4.- p-nitrofenilfosfato (Sigma- -- S-6750)
- 5.- p-nitrofenol (Harleco 952)
- 6.- Acido clorhídrico (J.T. Baker- Cat. # 9535)

d) Reactivos:

1.- Amortiguador:

Glicina .....	7.5 g.
Cloruro de magnesio	0.095 g.
Agua .....	750 ml.
Hidróxido de sodio N 85	85 ml.
Aforar a .....	1000 ml.
Estable un año.	

2.- Sustrato:

p-nitrofenilfosfato- disódico .....	0.400 g.
Agua .....	100 ml.

3.- Sustrato de trabajo:

Volúmenes iguales de amortiguador y sustrato. pH final de --  
10.3 - 10.4

Duración 4 - 6 semanas.

4.- Solución concentrada:

p-nitrofenol.....	0.1391 g.
Agua .....	100 ml.

aforada a 1000 ml. con agua.

e) Técnica:

- 1.- En dos tubos marcados "B" y --  
"P", colocar 1.0 ml. de sus--  
trato de trabajo.
- 2.- Incubar 5 minutos a 37°C. am--  
bos tubos.
- 3.- Agregar 0.1 ml. de suero pro--  
blema al tubo "P" y 0.1 ml. de  
agua al tubo "P". Incubar am--  
bos durante 30 minutos a 37°C.
- 4.- Agregar 10 ml. de hidróxido de  
sodio 0.02N a cada tubo.
- 5.- Leer a 445 nm usando "B" a - -  
100 % T. ( $L_1$ ).
- 6.- Agregar dos gotas de ácido clo--  
rhídrico concentrado y leer de  
nuevo en Espectrofotómetro Co--  
leman Junior Modelo 6A con cel--  
das de 10X75 mm. ( $L_2$ ).

f) Cálculos:

$(L_1) - (L_2) =$  Unidades de fosfata--  
sa alcalina.

g) Cifras Normales:

Adultos = 0.8 - 2.3 Unidades

Niños = 2.8 - 6.7 Unidades

- h) Unidades Pesse~~y~~ Lowry-Brock: Es la  
cantidad de enzima que libera 1 mg.  
de p-nitrofenol del sustrato a pH-  
10.5 durante 30 minutos de incuba--

4.- METCDO DE BODANSKY, KING-ARMSTRONG Y -  
BESSEY-LOWRY-BROCK, MODIFICADOS CON --  
AMORTIGUADOR DE GLICINA.

1) Los dos primeros métodos fueron mo-  
dificados con amortiguadores de gli-  
cina y ajustados a pH de 10.3

2) Sustrato de trabajo del método de -  
Bodansky:

Glicerofosfato sódico.. 0.500 g.

Glicina ..... 0.120 g.

Disolver y diluir a ... 100 ml.

Transferir a un frasco y cubrir con  
una capa de 3 cm. de éter de petró-  
leo. Guardar en refrigerador.

3) Amortiguador del método de King-Ar-  
mstrong:

Glicina ..... 3.753 g.

Agua ..... 500 ml.

Guarde en refrigerador.

5.- METODO DE BODANSKY, KING-ARMSTRONG Y -  
BESSEY-LOWRY-BROCK, MODIFICADOS CON --  
AMORTIGUADOR DE TRIS.

1) Los tres métodos fueron modificados  
con amortiguador de TRIS y ajusta-  
dos a pH de 9.5.

2) Sustrato de trabajo del método de -  
Bodansky:

Glicerofosfato sódico.. 0.500 g.

TRIS (Hidroximetilami-  
no metano) ..... 0.193 g.

Disolver y diluir a ... 100 ml.

Transferir a un frasco y cubrir con

una capa de 3 cm. de éter de petróleo. Guardar en refrigerador.

- 3) Amortiguador del método de King-Armstrong:

TRIS (Hidróximetilamino-  
metano ..... 6.057 g.  
Agua ..... 500 ml.  
Guarde en refrigerador.

- 4) Amortiguador del método Pessey- ---  
Lowry-Brock:

TRIS (Hidroximetilamino-  
metano) ..... 11.9 g  
Cloruro de magnesio .... 0.095 g.  
Agua ..... 750 ml.  
Hidróxido de sodio N ... 85 ml.  
Aforar a ..... 1000 ml.  
Estable un año.

6.- METODO DE KLEIN-BABSON AND READ (1) --  
MODIFICADO CON INHIBIDORES.

a) Principio: este método mide la fenolftaleína liberada por la acción de la enzima sobre el sustrato de fosfato de fenolftaleína. La fenolftaleína en medio alcalino desarrolla color, el cual es medido colorimétricamente.

b) Equipo:

- 1.- Tubos de ensaye de 13X100 mm.
- 2.- Pipetas de 1.0 ml. graduadas en 0.1 ml.
- 3.- Pipetas de 5 ml.

4.- Espectrofotómetro Coleman Ju---  
nior Modelo 6A con celdas de --  
10X75 mm.

c) Material químico:

- 1.- Equipo de phosphatabs alkaline-  
(General Diag. Warner-Chilcott-  
Lab.)
- 2.- Urea (Mallinck. Cat. # 8648)
- 3.- L-fenilalanina (Sigma P-2126)

d) Reactivos:

- 1.- Tabletetas del sustrato phosphab--  
tabs alkaline (fosfato de fe---  
nolftaleina amortiguado).
- 2.- Desarrollador de color (Hidró--  
xido de sodio).
- 3.- Solución tipo de fenolftaleina.
- 4.- Urea 0.5M (3.003 g/100 ml.)
- 5.- Urea 2.0M (12.012 g/100 ml.)
- 6.- Urea 3.0M (18.018 g/100 ml.)
- 7.- L-fenilalanina 0.005M - - - - -  
(82.6 mg/100 ml.)

e) Técnica:

1.- En cinco tubos: B, 1, 2, 3 y 4  
Colocar:

- Tubo "B" 0.5 ml. de agua.
- Tubo # 1, 0.5 ml. de urea 0.5M.
- Tubo # 2, 0.5 ml. de urea 2.0M.
- Tubo # 3, 0.5 ml. de urea 3.0M.
- Tubo # 4, 0.5 ml. de fenilala--  
nina 0.005M.

2.- Colocar una pastilla (Phospha--  
tabs) a los tubos 1, 2, 3 y 4;-

disolver e incubar 5 minutos a 37°C.

3.- Agregar 0.2 ml. de suero problema a los tubos 1, 2, 3 y 4; e incubar a 37°C. durante 30 minutos.

4.- Agregar 0.2 ml. de suero al tubo "B"

5.- Agregar 5 ml. de desarrollador de color a todos los tubos.

6.- Leer a 550 nm en Espectrofotómetro Coleman Junior Modelo 6A -- con celdas de 10X75 mm.

f) Cálculos:

Convertir en microgramos de fenoltaleina; pasar éstos a unidades de fosfatasa alcalina.

g) Unidades Klein-Babson-Read: Es la cantidad de enzima que libera un mg. de fenoltaleina del sustrato a pH 9.9 durante 30 minutos de incubación a 37°C.

R E S U L T A D O S

Los resultados obtenidos en tres técnicas-originales: Bodansky, King-Armstrong y Bessey - Lowry-Brock y modificadas con amortiguador de TRIS y glicina, están contenidas en las tablas I y II.

Los resultados logrados con la técnica --- Klein-Babson-Read, modificada con inhibidores - se encuentra en la tabla III.

TABLA I

SUEROS TRATADOS CON TECNICAS NORMALES Y --  
TECNICAS MODIFICADAS USANDO AMORTIGUADOR --  
TRIS pH 9.5

Sue ro No.	A	B	C	D	E	F
1	1.7	0.9	6.25	5.95	1.3	1.2
2	1.15	0.8	5.3	4.1	2.1	1.8
3	1.0	1.2	3.2	3.6	1.6	1.3
4	2.45	2.20	8.75	7.4	3.05	2.55
5	4.7	4.5	19.7	16.0	6.4	5.5
6	3.0	2.9	16.0	12.5	4.7	4.0
7	2.3	1.4	9.4	8.2	2.65	2.5
8	2.4	1.9	8.4	7.3	2.8	2.5
9	7.3	7.1	29.5	28.5	7.4	6.5
10	1.4	1.7	8.2	7.5	2.4	1.9
11	1.35	1.9	7.2	5.3	1.6	1.7
12	1.85	1.35	5.9	2.3	1.55	1.45

- A.- UNIDADES BODANSKY, TECNICA NORMAL.
- B.- UNIDADES BODANSKY, TECNICA MODIFICADA.
- C.- UNIDADES KING-ARMSTRONG, TECNICA NORMAL.
- D.- UNIDADES KING-ARMSTRONG, TECNICA MODIFICADA
- E.- UNIDADES BESSEY-LOWRY -BROCK, TEC. NORMAL
- F.- UNIDADES BESSEY-LOWRY-BROCK, TEC. MODIFICADA.

TABLA II

SUEROS TRATADOS CON TECNICAS NORMALES Y --  
TECNICAS MODIFICADAS USANDO AMORTIGUADOR --  
DE GLICINA A pH 10.5

Sue ro No.	A	B	C	D	E
1	0.5	1.5	7.3	3.0	1.3
2	1.4	2.4	8.4	6.6	1.6
3	0.8	0.8	5.2	3.0	1.2
4	2.8	4.8	18.8	15.3	3.6
5	0.5	0.9	6.2	1.3	0.8
6	0.0	0.2	8.5	3.3	2.0
7	0.9	1.7	7.2	6.4	1.9
8	1.7	1.0	6.2	5.6	1.1
9	2.6	4.3	12.7	9.6	3.0
10	1.8	3.3	9.3	7.1	2.1
11	1.3	2.3	8.0	6.2	1.5
12	0.7	1.6	7.3	6.3	2.0

- A.- UNIDADES BODANSKY, TECNICA NORMAL.  
B.- UNIDADES BODANSKY, TECNICA MODIFICADA.  
C.- UNIDADES KING-ARMSTRONG, TECNICA NORMAL.  
D.- UNIDADES KING-ARMSTRONG, TECNICA MODIFICA  
DA.  
E.- UNIDADES BESSEY-LOWRY-BROCK, TECNICA NOR-  
MAL.

TABLA III

SUEROS TRATADOS CON TECNICA DE KLEIN-BARSON-READ Y MODIFICADA CON INHIBIDORES.

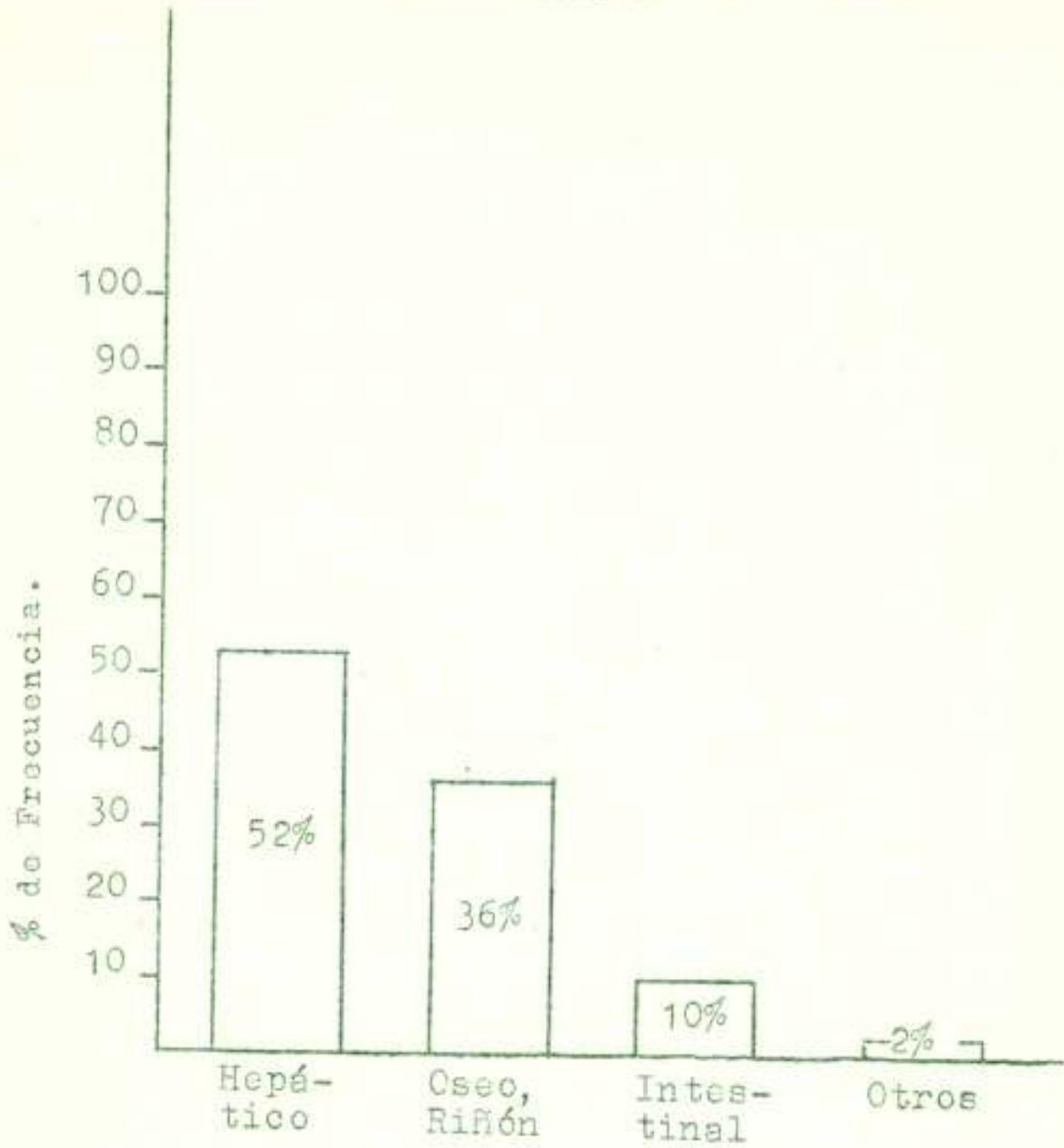
SUE RO No.	A	B	C	D	E
1	27.0	25.5	16.0	7.0	20.0
2	2.5	2.0	1.0	0.5	2.0
3	13.5	14.0	7.0	2.5	12.5
4	15.0	15.5	8.0	3.5	13.5
5	2.5	1.5	1.0	0.5	1.5
6	8.5	9.0	5.0	1.5	7.5
7	28.0	29.0	15.0	8.5	26.5
8	22.0	18.5	8.0	2.0	20.0
9	7.5	6.5	4.0	1.5	6.5
10	13.5	12.0	6.5	2.5	11.0
11	3.5	3.7	1.5	0.5	2.0
12	29.5	30.8	20.5	9.0	28.5
13	3.0	2.8	1.5	0.5	2.0
14	15.0	13.5	8.0	3.5	13.5
15	12.0	10.6	5.0	0.5	2.5
16	8.5	6.0	5.5	1.5	7.5
17	7.0	7.3	4.0	0.2	6.0
18	28.0	21.0	14.0	8.0	5.6
19	4.5	4.7	2.5	1.5	3.3
20	3.5	3.0	1.0	0.3	3.0
21	29.0	27.5	20.5	11.0	29.5
22	12.0	12.8	6.2	1.5	11.3
23	4.5	4.9	2.3	0.5	3.8
24	5.5	5.8	2.5	0.8	4.7

###

25	4.0	3.5	0.5	0.2	3.5
26	9.5	10.0	6.0	2.9	8.7
27	9.0	10.2	5.5	2.5	8.2
28	5.5	5.9	2.4	0.5	5.0
29	6.5	6.0	3.2	1.5	5.8
30	21.0	22.5	9.5	2.5	20.0
31	17.5	18.5	8.0	2.0	17.0
32	11.0	9.5	4.0	1.5	10.5
33	6.0	4.5	2.0	0.5	1.5
34	4.5	5.0	3.0	0.5	4.0
35	4.5	4.8	2.0	0.5	4.5
36	6.0	6.3	2.5	0.5	5.5
37	16.5	16.8	7.0	2.5	16.0
38	5.5	5.0	3.5	1.0	0.5
39	8.5	7.5	3.5	0.5	8.0
40	20.0	21.3	8.5	1.5	19.0
41	6.5	7.0	2.5	0.5	6.3
42	2.0	1.8	0.5	0.0	1.5

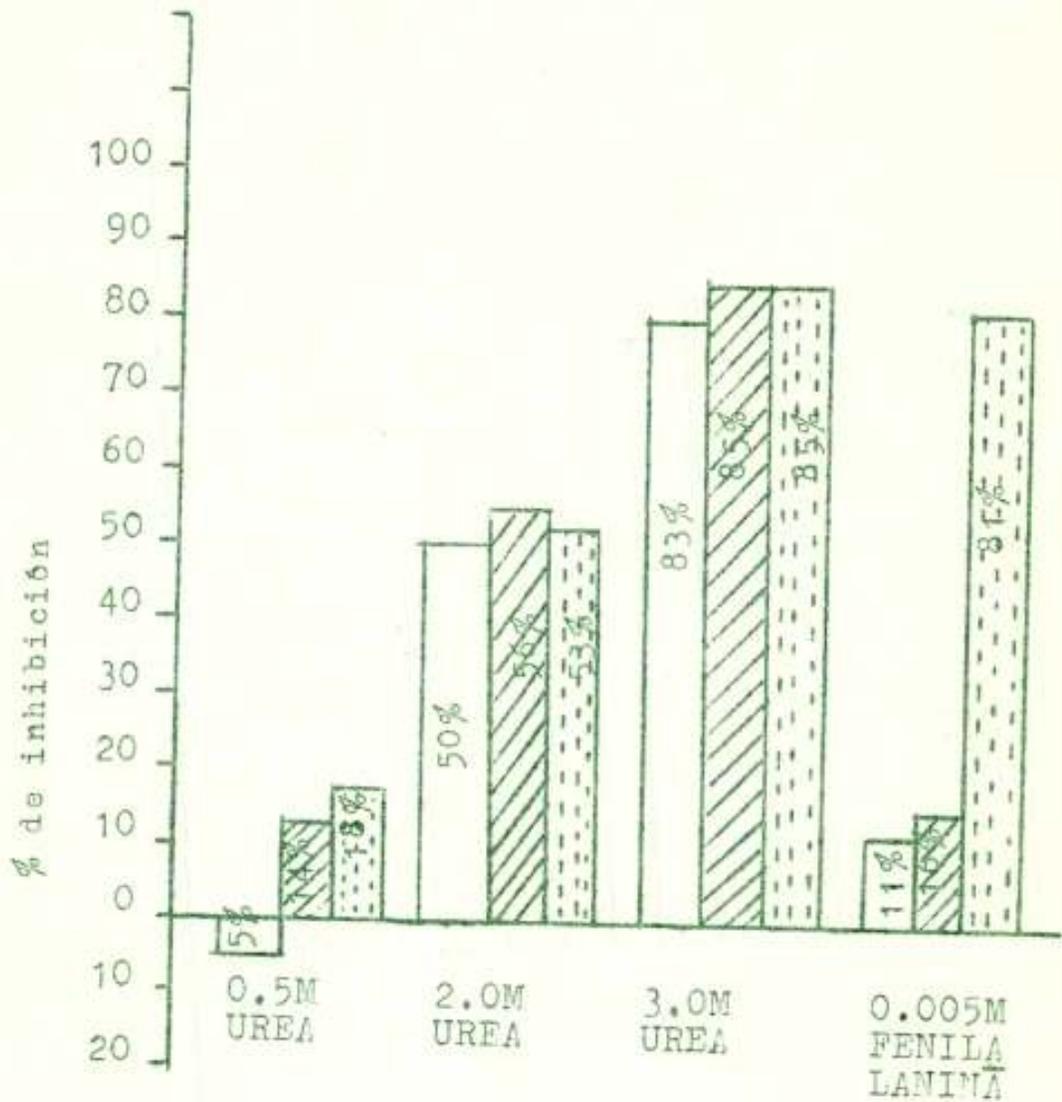
- A.- UNIDADES K.B.R., TECNICA NORMAL
- B.- UNIDADES K.B.R. USANDO UREA 0.5M
- C.- UNIDADES K.B.R. USANDO UREA 2.0M
- D.- UNIDADES K.B.R. USANDO UREA 3.0M
- E.- UNIDADES K.B.R. USANDO FENILALANINA  
0.005M

HISTOGRAMA I



Probable origen de la fosfatasa alcalina en 42 sueros

HISTOGRAMA II



ORIGEN HEPATICO : 

ORIGEN OSEO, RIÑON: 

ORIGEN INTESTINAL: 



En los sueros tratados con técnicas originales y modificadas con buffer de TRIS a pH 9.5 (Tabla I), se observa que la fosfatasa alcalina actúa sobre ellas de una manera uniforme, sin haber gran diferencia en los resultados obtenidos.

En los sueros tratados con técnicas originales y modificadas con buffer de glicina a pH 10.5 (Tabla II), se observó que existen irregularidades en cuanto a los resultados obtenidos en las técnicas de Bodansky y King-Armstrong, -- probablemente debido el pH utilizado.

De acuerdo con los resultados obtenidos (Tabla I y II), se observa que la fosfatasa alcalina actúa indistintamente sobre cualquier -- sustrato, donde su actividad enzimática va de -- acuerdo a las condiciones experimentales usadas.

En la tabla III, tenemos los resultados -- obtenidos con el uso de inhibidores, donde vemos que sí existen variaciones de la actividad enzimática de acuerdo con el origen de la misma; ésto debido a la acción de los diferentes tipos de inhibidores, así como a sus respectivas concentraciones.

Las soluciones de urea 0.5M y 2.0M, no --- presentan gran estabilidad, por lo que recomienda prepararlas a partir de la solución 3.0M, al iniciar las determinaciones.

Las soluciones de urea pueden ser esterilizadas por filtración, pero esto nos da por consecuencia un trabajo bastante laborioso, por lo que no es recomendable para el uso rutinario.

En nuestro histograma se observa en orden decreciente el por ciento de frecuencia del probable origen de la fosfatasa alcalina en 42 sueros tratados. La fosfatasa de origen hepático es la que se presenta con más frecuencia.

C O N C L U S I O N E S

- 1.- La fosfatasa alcalina de cualquier origen - no tiene afinidad hacia determinado sustrato.
- 2.- La técnica de Klein-Babson-Read, modificada con inhibidores, nos da una buena orientación sobre el probable origen de la fosfatasa alcalina; además es sencilla y adaptable a las necesidades de un Laboratorio Clínico Químico de rutina.
- 3.- La solución de urea es preferible utilizarla a concentración 3M y de allí prepararla a 0.5 y 2M; o bien se puede preparar y esterilizarla por filtración, aunque de esta manera nos da una técnica que no es práctica para el trabajo rutinario.

B I B L I O G R A F I A

- 1.- Bernard Klein, Prunella A. Read y Arthur L. Babson "Rapid Method for the quantitative - determination of serum alkaline phosphatase" Clin. Chem. 6: 269, 1960.
- 2.- Bodansky, A. "Phosphatase Studies; II.- Determination of serum phosphatase" J. Biol.- Chem. 101: 93, 1933.
- 3.- Bodansky, A. "Determination of inorganic -- phosphate" J. Biol. Chem. 99: 197, 1932.
- 4.- C. H. Fiske y Y. Subbarow "The colorimetric determination of phosphorus" J. Biol. Chem. 66: 375;1925.
- 5.- E. J. King y A. R. Armstrong. Can Med. Assoc. J. 31: 376, 1934.
- 6.- George N. Bowers, Jr. y Robert B. Mc. Comb "A continuous Spectrophotometric method --- for measuring the activity of serum alkali- ne phosphatase" Clin. Chem. 12: 70, 1966.
- 7.- Haije, W.G; and M. de Jong "Izo-enzyme --- patterns of serum alkaline phosphatase in - agar-gel electrophoresis and their clinical significance" Clin. Acta 8: 620, 1963.
- 8.- J. Fischl, S. Segal, y S. Rabiah "Microde-- termination of phosphatases employing phenol phtalein diphosphate as substrate" Clin. -- Chem. 13: 941, 1967.
- 9.- Keay, H; y J. A. Trew "Automated determina- tion of serum alkaline phosphatase using a modified Bodansky Technic" Clin. Chem. --- 10: 75, 1964.
10. Kay, H. D. ; Plasma phosphatase. I. "Method of determination some proprieties of the -

- enzyme" J. Biol. Chem. 89: 235, 1930.
11. Kirsten Hviid "An automated alkaline phosphatase assay with phenolphthalein monophosphate as substrate" Clin. Chem. 13:281, --- 1967.
  12. Maryanne Bahr y J. H. Wilkinson "Urea as a selective inhibitor of human tissue alkaline phosphatases" Clin. Chim. Acta 17: 367,- 1967.
  13. Neumann, H; y M. Van Vreedendaal "An improved alkaline phosphatase determination with p-nitrophenil phosphate (man)" Clin. Chim.-Acta 17: 183, 1967.
  14. R. A. J. Conyers; Austr. J. Sc. 29:83, --- 1966.
  15. Shinowara, G. Y.; Jones, L. M.; y Reinhart, H. L.; "The determination of alkaline phosphatase" J. Biol. Chem. 142: 921, 1942.
  16. Standard methods of Clin. Chem. Vol. I, 1953
  17. Bessey, Lowry, O. H. y Brock, M. J.; J. --- Biol. Chem. 164: 321, 1946.
  18. Steenson, J. L.; y D. F. Evered "Citrate -- inhibition of serum alkaline phosphatase"-- Lancet 7311: 792, 1963.
  19. W. H. Fishman, Norma I. Inglis y M. J. ---- Krant" Serum alkaline phosphatase of intestinal origin in patients with cancer and -- with cirrhosis of the liver" Clin. Chim. -- Acta 12: 298, 1965.
  20. William C. Romel, S. J. LaMancusa, y John - K. DuFrene "Detection of serum alkaline --- phosphatase Iso-enzymes with phenolphthalein

monophosphate following cellulose acetate -  
electrophoresis" Clin. Chem. 14: 2, 1968.