



Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Estudios Superiores CUAUTITLAN

Evaluación de la sensibilidad del Método Químico para la determinación de la Fracción Osea de la Fosfatasa Alcalina en pacientes con Hiperfunción de la Glándula Tiroides.

T E S I S

Que para obtener el Título de:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P r e s e n t a

Dagoberto Gutiérrez Villa

D i r i g i d a p o r:

Dra. Margarita Becerril Morales

Jefe del Laboratorio Análisis Clínicos del Hospital de
Especialidades del centro Médico la "Raza" IMSS



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

I N D I C E

ABREVIATURAS	1
RESUMEN	2
GENERALIDADES	3-14
ANTECEDENTES	15-18
JUSTIFICACION Y OBJETIVOS	19-20
MATERIAL Y METODOS	21-31
RESULTADOS	32-39
DISCUSION	40-48
CONCLUSIONES	49-50
BIBLIOGRAFIA	51-63

ABREVIATURAS

Absorbancia	A
Coefficiente de correlación	r
Desviación estándar	SD
Fosfatasa alcalina	FA
Grados centígrados	°C
Mayor que	>
Menor que	<
Método electroforético	ME
Método manual (Técnica de Bessey-Lowry-Brock)	MM
Microlitros	μ l
Microgramos	μ g
Milimoles	mM
Nanogramos	ng
Nanómetros	nm
Paranitrofenilfosfato	PNFF
Peso molecular	PM
Porcentaje de actividad de fosfatasa alcalina total ..	% AFAT
Porcentaje de actividad inhibida de fosfatasa alcalina	% AIFA
Porcentaje de actividad residual de fosfatasa alcalina	% ARFA
Probabilidad	P
Tiroxina	T ₄
Transmitancia	T
Triyodotironina	T ₃
Unidades Bessey-Lowry-Brock	U BLB
Unidades internacionales	UI

RESUMEN

En este trabajo se evaluó la sensibilidad, en la determinación de la fracción ósea de la fosfatasa alcalina, realizada por dos métodos diferentes.

Uno de ellos es la técnica electroforética de los laboratorios Helena, para la determinación de las isoenzimas de la fosfatasa alcalina (fracciones de hígado, hueso, intestino y placenta) El otro método, es la técnica manual, que consiste en la determinación de la actividad de la fosfatasa alcalina, usando como sustrato p-nitrofenilfosfato.

Ambas técnicas se trabajaron con muestras de sueros de pacientes hipertiroideos, parte de ellas fué precalentada a 56° C - durante 10 min. Se compararon los resultados de las determinaciones, con los obtenidos en un grupo de voluntarios eutiroides - - (control normal).

A los pacientes hipertiroideos se les comprobó su padecimiento checando el cuadro clínico con determinaciones de niveles séricos de triyodotirosina y tetrayodotirosina los cuales estuvieron elevados. De igual manera se estudió al grupo de voluntarios eutiroides.

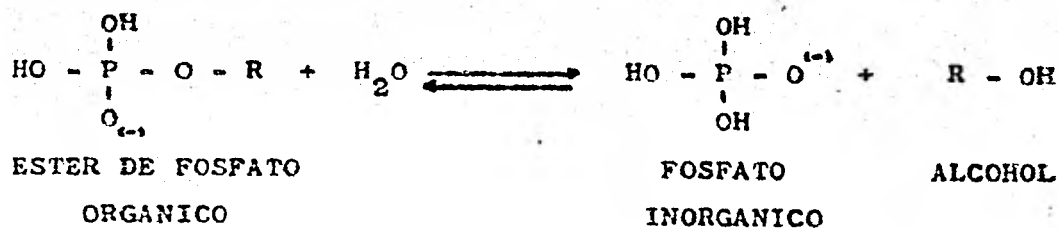
Los resultados indican que ninguno de los dos métodos lo -- gran diferenciar claramente la fracción ósea de la fosfatasa alcalina de la fracción hepática de la misma enzima. En la técnica -- electroforética: por haber una sobreposición de la fracción ósea con la fracción hepática, y en la técnica manual: no hay forma de saber la proporción exacta de la fracción ósea, ya que la actividad inhibida por el calentamiento no corresponde totalmente a dicha fracción, y sí a otras fracciones presentes.

GENERALIDADES

Las fosfatasas alcalinas son un grupo de enzimas con una -
 baja especificidad de sustrato, catalizan la hidrólisis de una
 extensa variedad de ésteres de fosfato a un pH alcalino. Este -
 grupo de enzimas son encontradas en la mayoría de los tejidos ,
 incluyendo huesos ⁸⁴, intestino ⁶⁸, riñón ¹¹, hígado ⁶⁹, placenta ²,
 y células blancas de la sangre ⁹².

Los sustratos típicos de la fosfatasa alcalina incluyen -
 ésteres de fosfato de alcoholes alifáticos primarios y secunda-
 rios por ejemplo; B-glicerolfosfato, alcoholes cíclicos, fenoo-
 les , naftoles y nucleotidos de monofosfatos ⁹⁷. Aunque algunos-
 reportes sugieren que las fosfatasas son incapaces de hidrolizar
 pirofosfatos tanto orgánicos como inorgánicos ⁹², estudios re- -
 cientes con fosfatasa alcalina de hígado ^{21,70}, hueso ²², intesti-
 no ^{21,70} y placenta ¹⁰¹, demostraron cierta actividad pirofosfatá
 sica.

Los numerosos métodos analítico usados en los laboratorios
 clínicos para medir la actividad de la fosfatasa alcalina en -
 suero refleja un amplio rango de ésteres de fosfato que pueden-
 actuar como sustratos para la fosfatasa alcalina. (tabla 1). -
 Estos métodos pueden dividirse dentro de dos categorías genera-
 les: La primera basada en la medida de los fosfatos libres y la
 segunda sobre la medición del alcohol liberado, según la reac--
 ción siguiente



Método	Sustrato (nM/ml)	pH	Amortiguador	Unidades	Rango normal
Bassey- Lowry - Brock	p-Nitrofenil fosfato (5.4)	10.5	Glicina	1 mmol de p-nitrofenol/ litro/60 min.	0.8-3.0
Bodansky	B-Glicerol- fosfato (14.5)	8.6	Diétil - barbiturato	1 mg de P/ 100 ml/60 min.	1.5-4.0
Internacional	p-Nitrofenil fosfato (2.8)	10.5	2-Amino-2- metil-1- propanol	1 umol de p-nitrofenol/ litro/min.	21.0-85.0
Eing - Armstrong	Fenilfosfato (4.75)	9.3	Diétil - barbiturato	1 mg de fenol/100 ml/ 30 min.	3.0-13.0
Klein-Read- Babson	Difosfato Fenolftaleína (2.5)	9.3	Tris	1 mg de fenolftaleína/ 100 ml/30 min.	1.0-4.0
Skinowara- Jones - Reinhart	B-Glicerol- fosfato (3.2)	9.3	Diétil - barbiturato	1 mg fenol/ 100 ml/60 min.	2.2-8.6

Tabla 1. Características de algunos métodos utilizados en el laboratorio para la determinación de fosfatasa alcalina en suero a 37°C.

Históricamente, el primer éster de fosfato usado como sustrato en la medición de la actividad de la fosfatasa alcalina - en el suero fue el B-glicerolfosfato⁸ (método de Bodansky) , y el primer método basado en la determinación de la cantidad de alcohol liberado fue el de King y Armstrong⁵⁶. Otros sustratos - incluyen al p-nitrofenilfosfato en el método de Bessey Lowry⁶ , y difosfato de fenolftaleína en los métodos de Klein, Read y Babson⁵⁷.

Estudios en el microscopio electrónico y de luz, demostraron que la fosfatasa alcalina se localiza en la superficie de las células de absorción^{34,73,87}, en los bordes del tubulo renal proximal^{34,108}, en la mucosa intestinal^{81,109}, en la superficie más externa de los canalículos biliares¹⁰⁸, superficie sinusoidal del hígado⁸⁰, células epiteliales alveolares de la glándula lactogénica mamaria⁷⁴.

Todas las fosfatasas alcalinas estudiadas han sido Zinc-metaloproteínas con un residuo de serina, capaz de revertir la fosforilación, localizado en el centro activo de la enzima.

La fosfatasa alcalina placentar fue purificada por homogenización y cristalización^{32,33,36,37}, y estudiada por electroforesis en gel de poliacrilamida e inmunoelectroforesis, reconociendo a un dímero de glucoproteína de peso molecular entre 116 000 y 125 000^{36,103}. La fosfatasa alcalina placentar contiene fucosa, manosa, galactosa y siete residuos de ácido siálico,

el último de los cuales puede ser removido mediante incubación con la enzima neuraminidasa^{33,90}. Los coeficientes de sedimentación de las fosfatasas alcalinas de hueso, hígado e intestino, determinado por un gradiente de Sacarosa, fue similar - para todos, aproximadamente 7.5 que corresponde a un peso molecular de aproximadamente 150 000. (Dato no publicado M.M. Kaplan). El peso molecular de la fosfatasa alcalina de riñón, - similarmente determinado, fue de 130 000⁶.

Por filtración en Sephadex G-200 los pesos moleculares de las fosfatasas alcalinas de hígado, intestino, hueso y de riñón fueron de 225 000, 190 000, 180 000 y 170 000 respectivamente⁶⁷.

Se ha intentado identificar diferencias estructurales - entre las fosfatasas alcalinas por medio de técnicas inmunoquímicas. Boyer¹⁰, utilizando anticuerpos producidos en conejo - con preparaciones relativamente crudas de fosfatasa alcalina, demostró tres clases antigénicas de fosfatasa alcalina humana, el primer grupo incluye fosfatasa alcalina de hígado, hueso, - baso y riñón, el segundo a la enzima intestinal y la tercera a la fosfatasa alcalina placentar. La especificidad de tejido - fue muy baja en estos estudios. Utilizando fosfatasa alcalina - altamente purificada como antígeno, Sussan y col.¹⁰³ mostraron una especificidad más considerable al tejido como se indica en estudios más recientes, donde se muestra que anticuerpos de -

borrego para fosfatasa de hígado humano y para fosfatasa placent^u tal son específicos para sus respectivos antígenos homologos y no reaccionan con fosfatasa alcalina de hueso, intestino o riñon . Los determinantes antigénicos de las fosfatasas alcalinas no son localizados en los centros activos de estas enzimas ya que los complejos antígeno-anticuerpo retienen su actividad enzimática.

La función fisiológica de la fosfatasa alcalina permanece desconocida. Su localización en la superficie celular, sugiere un papel en la facilitación del movimiento de sustancias a través de las membranas celulares. La fosfatasa alcalina de hueso desempeña algún papel en el proceso de calcificación en hueso - pero la función precisa todavía no ha sido definida. Esta actividad en hueso parece estar relacionada con la actividad fisiológica del hueso y con el número de osteoblastos identificables 47,105. La enzima es probablemente localizada dentro de los osteoblastos¹⁰⁵. En pacientes con enfermedad de hueso^{50,76,84} - tales como enfermedad de Paget's, hiperparatiroidismo¹⁹, raquitismo²⁶ e hiperfosfatasa idiopática de la infancia (osteoctasia), así como en todos los niños normales^{14,50}, donde es frecuente una elevación de la isoenzima de hueso en suero. Aunque esta elevación indica un aumento de actividad de la fosfatasa alcalina de hueso parece relacionarse con la proporción de calcio en hueso⁵⁸. La elevación de la enzima es frecuentemente

relacionada con la severidad del desorden de hueso y determinada por otros medios tales como radiología^{19,77}, excreción urinaria de hidroxiprolina^{58,77}, y niveles de Vitamina D en suero. Similarmente la disminución de los niveles de fosfatasa alcalina en suero parece relacionarse con los niveles disminuidos de la fosfatasa alcalina de hueso en hipofosfatasa^{48,72,96}.

La existencia de más de una forma física de fosfatasas alcalinas en suero fue inicialmente demostrada por electroforésis en papel³ y confirmada por el uso de electroforésis en otros medios de soporte incluyendo bloques de almidón^{55,93}, gel de almidón^{23,60,75}, agar gel³⁵, tiras de acetato de celulosa⁵⁹, gel de Sephadex⁴⁶ y gel de poliacrilamida^{59,95}. El objetivo de estos estudios fue de encontrar un método confiable y clínicamente aplicable para la identificación del origen de la fosfatasa alcalina de tejido, suero, como una ayuda para el diagnóstico.

En la tabla 2 se resumen los resultados de tales esfuerzos⁴³. Las fosfatasas alcalinas de hígado y hueso son relativamente inestables al calentamiento^{75,84} y a la desnaturalización con urea^{7,43} y sólo son moderadamente inhibidos por la L-fenilalanina^{29,43}. Ambas tienen residuos de ácido siálico cuya hidrólisis con neuraminidasa dan una migración electroforética atrasada⁹⁰.

	Origen de la fosfatasa alcalina promedio(rango)			
	Hígado	Hueso	Intestino	Placenta
Porcentaje de actividad de fosfatasa alcalina que permanece después de:				
Una exposición a 56° C durante 15 minutos.	21(8-33)	11(5-15)	90(82-95)	87(80-98)
Una inhibición en urea-3M.	44(15-65)	16(7-23)	79(72-89)	79(71-88)
Una inhibición en L-fenilalanina 0.005M.	63(54-106)	71(61-77)	18(15-20)	22(17-25)
Efecto de la neuraminidasa sobre la movilidad electroforética.	ATRASADA	ATRASADA	INVARIABLE	ATRASADA

Tabla 2. Tipos de isoenzimas que han sido diferenciadas entre las variantes de la fosfatasa alcalina de tejidos humanos por comparación de sus propiedades catalíticas o sus estabilidades bajo diferentes condiciones⁶⁵.

Las fosfatasa alcalinas intestinal y placental son más estables al calor^{75,84} y a la desnaturalización con urea^{7,43} y su actividad enzimática es inhibida por la L-fenilalanina^{25,33}. La isoenzima intestinal difiere más notablemente de la isoenzima placental por su resistencia a la neuraminidasa^{33,90}. En la misma tabla muestra una considerable sobreposición en las propiedades de estabilidad de esas isoenzimas de tejido. Esta sobreposición y las pequeñas diferencias entre las estabilidades de la fosfatasa alcalina de hígado y hueso limitan la efectividad de tales técnicas cuando la actividad en el suero de fosfatasa alcalina es moderadamente elevada.

Normalmente la fosfatasa alcalina de suero consiste de isoenzimas de hueso e hígado^{24,41,51,95}. La estabilidad de las fosfatasa alcalinas intestinal y placental y su inhibición por la L-fenilalanina ha permitido que estas isoenzimas sean reconocidas cuando se presentan en el suero^{25,27,71,78}. Las isoenzimas de la fosfatasa alcalina son similares con respecto a las propiedades tales como pH óptimo²⁵, afinidad a sustrato^{25,67}, constante de Michaelis⁷⁵ y coeficientes de sedimentación^{25,37}. Por consiguiente, la determinación de estas propiedades no ayudan comúnmente a la identificación de las isoenzimas en suero. Aunque las fosfatasa alcalinas de hígado y placenta son antigénicamente distintas, métodos inmunológicos para la detección de estas isoenzimas no son aún prácticos para el laboratorio clínico de rutina¹⁰³.

El desarrollo de la electroforésis ha dado caminos precisos para la identificación de las isoenzimas de la fosfatasa alcalina en suero. Sin embargo, los resultados de diferentes estudios no son siempre los mismos^{17,41}, y resultados confusos han conducido a valores dudosos de cualquier separación electroforética en la identificación de isoenzimas de la fosfatasa alcalina en suero⁸³.

El hígado contiene una isoenzima principal finamente delimitada y que migra más rápidamente hacia el ánodo. Por lo general se presenta en forma de una banda compacta. Sin embargo, se llega a observar dos bandas hepáticas en el suero de pacientes con trastornos hepáticos. El hueso contiene una isoenzima ósea de la fosfatasa alcalina, se presenta como una banda mayor y migra justamente detrás de la banda de hígado. En muchos casos de elevación del componente isoenzimático óseo, la banda puede extenderse hasta la región que ocupa la banda hepática. Las fosfatasas de hígado y hueso migran muy cercanas la una de la otra y no pueden ser separadas¹⁷. La fosfatasa intestinal migra considerablemente atrás de las bandas de hueso e hígado, con aproximadamente la mitad de movilidad electroforética de la banda de hígado. La migración de la fosfatasa alcalina placentar es entre la banda de hueso y la de intestino. Su presencia en suero es mejor confirmada por determinación de su resistencia a la desnaturalización por calor a 56°C. El riñón presenta dos bandas difusas, una de las cuales migra delante y la otra detrás de la fosfatasa

alcalina intestinal⁶³. (Representación gráfica en la figura 1).

Las pruebas disponibles sugieren que en el suero de individuos normales la fosfatasa alcalina proviene de cuatro orígenes: Hígado, hueso, intestino y en mujeres embarazadas proviene de placenta. Después del corrimiento electroforético, la mayor parte de la actividad de la fosfatasa alcalina en suero de individuos sanos presentan dos bandas de isoenzimas que tienen movilidades electroforéticas de fosfatasa alcalina de hígado y de hueso^{41,51,95}.

Elevaciones de la fosfatasa alcalina en el suero ocurren en una extensa variedad de situaciones clínicas. Los niveles más elevados son encontrados en pacientes con desordenes de hueso asociados con aumentos de actividad osteoblástica y en individuos con desordenes que impiden el flujo biliar. Casi cualquier desorden que afecta al hígado puede causar una elevación moderada de la fosfatasa alcalina en suero.

En la gran mayoría de pacientes con fosfatasa alcalina elevada en suero, la elevación es debida a sus isoenzimas de hígado y hueso^{30,50,76}.

Las excepciones son encontradas en pacientes con cirrosis alcohólica, donde el aumento es debido a la fracción intestinal²⁷, en el embarazo donde es debido a la isoenzima placentar⁷¹,¹⁰², en pacientes con ciertos males particularmente carcinomas de pulmon, donde una variante de fosfatasas alcalina producida por el tumor aparece en el suero (isoenzima de Regan)^{28, 100}.

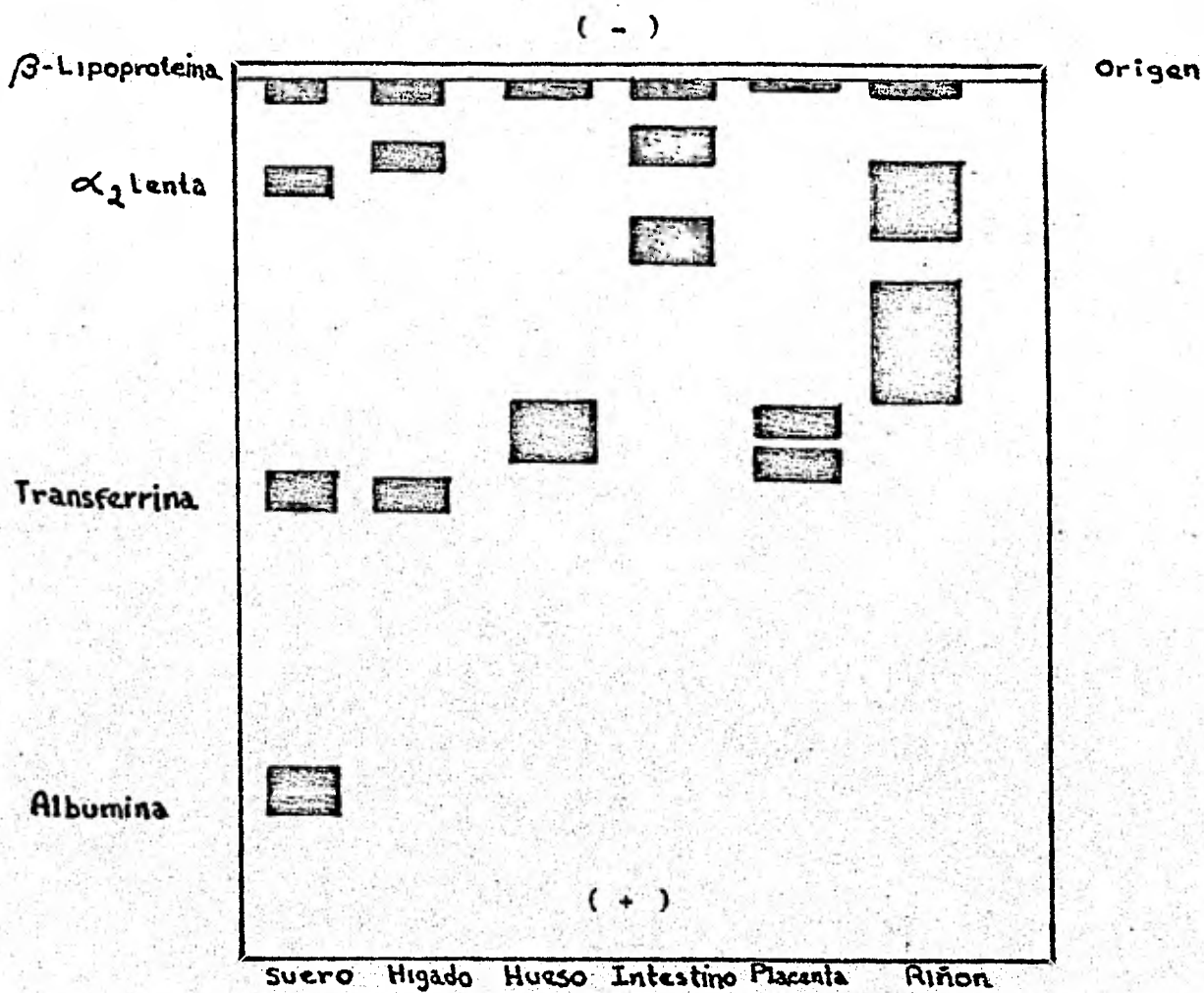


Figura 1. Resumen de muestras de isoenzimas de la fosfatasa -
 alcalina de extractos de tejido humano con sacarosa -
 0.25 M. Vistos despues del corrimiento electroforéti-
 co sobre poliacrilamida o bloques de gel de almidón⁴,
 17,47,51,76,95.

Ocasionalmente, elevaciones moderadas de la fosfatasa alcalina son vistas en desordenes de afecciones no primarias de hígado, y hueso, incluyendo el estado I y II de la enfermedad de -
Hodkin's¹, metaplasia mieloide⁵⁰, falla congestiva del corazón⁵⁰, enfermedades de inflamación intestinal e infecciones intra-abdominales⁵⁰. En estos desordenes la elevación de la fosfatasa alcalina parece ser de origen hepático^{1,15,50,51}.

Si una elevación de la fosfatasa alcalina en suero es la única anormalidad encontrada en un individuo aparentemente sano la identificación del origen de la isoenzima aumentada es de -
mucha ayuda.

ANTECEDENTES

En 1952 Nielsen⁸⁶ reportó elevaciones de la fosfatasa alcalina en el suero de pacientes con tirototoxicosis, y en los años siguientes muchos otros autores han confirmado esta observación .

Joseph y Simon⁴⁹ trabajaron con 81 pacientes con una difusión sospechosa de tiroides, reportando un aumento en el promedio de la actividad de la fosfatasa alcalina en pacientes con tirototoxicosis, comparada contra controles eutiroides.

Richer y Ohlen⁸⁹ en 16 pacientes con hipertiroidismo, a los cuales se les determinó semicuantitativamente la distribución de isoenzimas de la fosfatasa alcalina, obtuvieron resultados discrepantes frente a una colectividad normal, encontrando que los niveles de la fracción intestinal de la fosfatasa alcalina permanecían dentro de lo normal, en ambos grupos, mientras que en el grupo de los pacientes hipertiroideos notaron un desplazamiento de la fracción ósea. El aumento de la fracción ósea de la fosfatasa alcalina se observó, no solo en los casos con actividad global de la fosfatasa alcalina, sino también en el grupo de pacientes hipertiroideos en los cuales la actividad global permaneció dentro de los límites normales. Los resultados del análisis señalan que la elevación de la actividad total de la fosfatasa alcalina en el hipertiroidismo es atribuible en gran parte al aumento de la isoenzima de origen óseo.

David S., Cooper¹⁶ mencionan que de 35 pacientes hipertiroideos, 15 tuvieron elevaciones de la actividad de la fosfatasa alcalina en suero. No hubo diferencia en las medidas de T_3 y T_4 con relación a la edad y a la duración de la enfermedad entre los grupos con la fosfatasa alcalina elevada y el de fosfatasa alcalina normal. Después del tratamiento, los niveles de la fosfatasa alcalina aumentaron, mientras que los de T_4 disminuyeron. En algunos pacientes los valores de la fosfatasa alcalina permanecieron elevados por más de un año a pesar de que las variables tiroideas continuaron normales.

Gerlach, Paul y Latze³¹ estudiaron a 92 pacientes con tirotoxicosis que tenían niveles elevados de fosfatasa alcalina, y encontraron que el 73% de la elevación pudo ser atribuida a la isoenzima de hueso y el 27% de la elevación a la isoenzima de hígado.

El uso más frecuente del fraccionamiento de las isoenzimas de la fosfatasa alcalina es en la diferenciación entre las isoenzimas de hueso e hígado de la fosfatasa alcalina como el origen de la actividad elevada en suero.

Recientemente han sido desarrolladas nuevas técnicas de fraccionamiento de la fosfatasa alcalina para identificar su origen, incluyendo el procedimiento de inactivación por calor inhibición con urea, inhibición con L-fenilalanina, electroforesis en gel de almidón, poliacrilamida o en membranas de

acetato de celulosa, así como la utilización de antisueros -
específicos para cada una de las isoenzimas de la fosfatasa -
alcalina 6,12,13,29,30,39,54,66,79,94,98,106,110.

Moss y King⁷⁵ investigaron la actividad de las isoenzi--
mas de la fosfatasa alcalina por inactivación con calor. Sin
embargo el análisis de curvas de inactivación por calor ha -
sugerido un número de inconvenientes incluyendo: Falta de co-
rrelación entre los resultados obtenidos en sueros normales y
de aquellos derivados de extractos de tejidos que contienen -
fosfatasa alcalina, la temperatura en el proceso de inactiva-
ción requiere de un control estricto en las condiciones del -
calentamiento, particularmente en el tiempo tomado para que -
las muestras de suero alcancen la temperatura de inactivación
y enfriamiento al final de la inactivación¹¹⁰.

Fishman, Inglis y Green²⁹ utilizaron L-fenilalanina como
inhibidor selectivo para determinar el origen de la fosfatasa
alcalina elevada en suero, observando una inhibición efectiva
de la fosfatasa alcalina intestinal; las isoenzimas de hueso-
y riñon son las más susceptibles a la inhibición por urea⁸⁶. -
Sin embargo, la inhibición de la fosfatasa alcalina, con inhi-
bidores selectivos requiere de un control estricto de las -
condiciones de incubación y una precisión elevada en las medi-
ciones tanto de tiempo como de la temperatura.

Métodos electroforéticos han sido utilizados con varios-
tipos de soportes para la identificación de las isoenzimas de

la fosfatasa alcalina. La gel de poliacrilamida es probablemente la que da mejor resolución entre las isoenzimas^{86,95}. No obstante el máximo cuidado, es necesario para distinguir entre la fosfatasa alcalina de hueso y la fosfatasa alcalina de hígado, especialmente cuando estas isoenzimas están presentes con igual actividad⁶⁶. Las separaciones electroforéticas son principalmente de naturaleza cualitativa¹¹⁰.

Todavía no se confirma que las fosfatasas alcalinas de hígado y hueso sean antigénicamente distintas una de otras. Esto puede ser debido al hecho de que se dificulta obtener preparaciones inmunológicamente puras de antígeno. Sin embargo, se ha descrito que ciertas isoenzimas de la fosfatasa alcalina son inmunológicamente distintas¹⁰.

La medida de otras enzimas en suero, tales como la 5' nucleotidasa y la leucín aminopeptidasa, pueden ayudar a distinguir el origen óseo o hepático de la fosfatasa alcalina elevada, estas enzimas se elevan raramente en desórdenes óseos y frecuentemente en enfermedades hepatobiliares^{5,40,65}.

JUSTIFICACION Y OBJETIVOS

En el Hospital de Especialidades del Centro Médico la "Raza", se tiene con frecuencia pacientes cuyos padecimientos involucran un recambio acelerado de la matriz ósea y, en que los médicos tratantes obtienen orientación con el estudio de las isoenzimas de la fosfatasa alcalina. El interés en la determinación de la fracción ósea de la fosfatasa alcalina, se debe a que en diferentes entidades nosológicas, esta isoenzima se encuentra aumentada en suero, por ejemplo; en el raquitismo hiperparatiroidismo, enfermedad de Paget's, sarcoma osteoblástico y en el hipertiroidismo, entre otras. La principal utilidad de esta determinación es para el diagnóstico diferencial entre lesiones hepáticas ó lesiones óseas en casos de carcinomas metastásicos. De allí que surgió la necesidad de contar con la alternativa de sustituir al método electroforético, que es caro, requiere de instrumentación y de entrenamiento especializado, por el método químico manual, que es más barato y no requiere de instrumentación especializada.

En vista de la fácil disponibilidad de muestras de pacientes hipertiroideos en quienes la isoenzima ósea de la fosfatasa alcalina alcanza cifras mayores, se decidió estudiar un grupo de ellas y otro de personas normales en las que la fracción ósea se encuentra en más baja proporción.

Por lo tanto los objetivos del presente estudio son:

1. Evaluar la sensibilidad de los dos métodos para la determinación de la fracción ósea de la fosfatasa alcalina.

2. Examinar la correlación entre la actividad de la fosfatasa - alcalina total y la actividad inhibida de la fosfatasa alcalina en pacientes hipertiroideos.

3. Determinar que proporción de las muestras tanto de pacien-- tes hipertiroideos como de voluntarios normales, que sometidas a la fraccionación de la fosfatasa alcalina exhiben un aumento predominante de la isoenzima de hueso.

MATERIAL Y METODOS

MATERIAL BIOLÓGICO

Se estudia un grupo de 57 adultos hipertiroideos y otros - de 21 voluntarios normales (control normal).

El criterio de selección para los pacientes hipertiroideos fué que tuvieran el cuadro sintomático de hipertiroidismo, basado en el criterio clínico clásico de elevaciones en la determinación de triyodotironina (T_3), tiroxina (T_4) y I^{131} en 24 hrs. Determinaciones hechas por el Laboratorio de Medicina Nuclear - del Hospital de Especialidades del Centro Médico la "Raza".

MUESTRAS BIOLÓGICAS

Se trabaja con muestras de sueros tanto de pacientes hipertiroideos como de los adultos normales. Se divide cada muestra en dos porciones, una de ellas se incuba a 56°C durante 10 minutos exactamente, en un baño de agua con regulador de temperatura. La otra porción se mantiene sin exposición al calor, para ser después procesada.

REACTIVOS

1. Solución amortiguadora de cloruro de magnesio / glicina pH 10.3
2. Sustrato amortiguador de p-nitrofenilfosfato disódico - 0.4%

Añadir igual cantidad de solución amortiguadora pH 10.3

3. Hidróxido de sodio 0.2 N
4. Hidróxido de sodio 0.02 N

5. Solución de p-nitrofenol 10 mM
6. Solución de p-nitrofenol 0.05 mM
7. Amortiguador electra HR (tris-barbital-sodico) pH 8.8
8. Reactivo FLUR (naftol AS-MX ácido fosfórico 2.4 mM)
9. Reactivo azul firme RR 2.6 mM
10. Controles isoenzimáticos de fosfatasa alcalina
(intestino-hígado)
11. Sueros Controles Normales y Anormales (PRECINORM U)
12. Acido clorhídrico concentrado

EQUIPO

1. Membranas de acetato de celulosa Titan III Iso-Vis
2. Papel absorbente (108 mm x 89 mm)
3. Marcadores Helena
4. Aplicador de muestras modelo super Z-12
5. Microdistribuidor (5 microlitros)
6. Cámara de electroforésis
7. pH metro digital Beckman
8. Espectrofotómetro Coleman Junior II (modelo 6/20)
9. Integrador digital de Microzona Beckman (modelo R-111)
10. Densitómetro de Microzona Beckman (modelo R-110)
11. Plancha de evaporación
12. Baño de agua (modelo BMT-4)
13. Balanza analítica monoplato
14. Tubos de ensayo (13 x 120)
15. Pipetas graduadas (0.1, 1, 5, 10 ul.)

TECNICA DE BESSLY LOWRY-BROCK PARA LA DETERMINACION DE FOSFATASA
ALCALINA⁶

PRINCIPIO

La enzima fosfatasa alcalina hidroliza el substrato fosfato de p-nitrofenilo, dando fosfato inorgánico y p-nitrofenol. Se mide la cantidad de p-nitrofenol liberada en condiciones estándar (tiempo, temperatura, y pH) por absorbancia de color que presenta la solución alcalina. La unidad Bessey Lowry-Brock de actividad de fosfatasa alcalina se define como la cantidad de enzima que libera una milimol de p-nitrofenol por litro de suero en 60 minutos. Una unidad Bessey Lowry-Brock corresponde a 15.6 unidades internacionales, cuando estas últimas se definen como número de micromoles de substrato hidrolizados por minuto por efecto de un litro de suero.

PROCEDIMIENTO

1. Se marcan dos tubos con los números 1 y 2 respectivamente y se añade 1 ml de substrato amortiguador alcalino pH 10.3 precalentado a 37°C
2. Se añade 0.1 ml de suero al tubo marcado con el número 1 y 0.1 ml de agua destilada al tubo marcado con el número 2.
3. Se incuban a 37°C durante 30 minutos exactamente.
4. Se agrega a cada tubo 10 ml de hidróxido de sodio 0.02 N y se mezcla por inversión.

5. Se lee a una longitud de onda de 415 nm.
6. Se lleva a 100% de T con el tubo número 2 y se anota - la lectura del tubo 1.
7. Se añaden dos gotas de ácido clorhídrico concentrado a cada tubo y se mesclan.
8. Se lee nuevamente ajustando a 100% de T con el tubo 2.

CALCULOS

Unidades de fosfatasa alcalina Bessey Lowry-Brock

= 1a. lectura - 2a. lectura

CURVA DE CALIBRACION

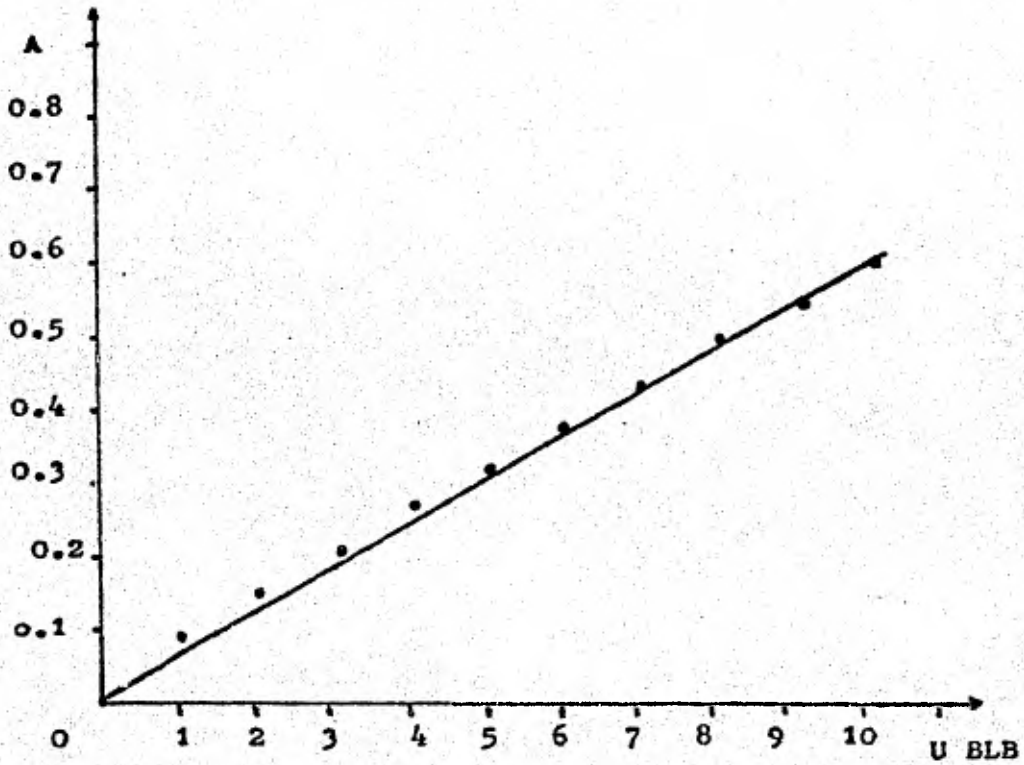
Tubo No.	ml. de agua destilada	Hidróxido de sodio 0.2 N	Solución de p-nitrofenol 0.05 mM .	Unidades (BLB)
1	10	1.1	0	0
2	8	1.1	2	2
3	6	1.1	4	4
4	4	1.1	6	6
5	2	1.1	8	8
6	0	1.1	10	10

VALORES NORMALES DE REFERENCIA

Adultos de 0.8 a 2.3 U BLB

Niños de 2.8 a 6.7 U BLB

CURVA DE CALIBRACION OBTENIDA EXPERIMENTALMENTE PARA LA
 DETERMINACION DE FOSFATASA ALCALINA SEGUN EL METODO DE
 BESSEY-LOWRY-BROCK ⁶.



A	U BLB
0.000	0
0.075	1
0.133	2
0.194	3
0.254	4
0.307	5
0.363	6
0.421	7
0.480	8
0.535	9
0.593	10

PRINCIPIO

La fosfatasa alcalina hidroliza el fosfato del alfa naftil fosfato As-MX, liberando al naftol que se une por una reacción de copulación a un compuesto diazo (azul firme RR) produciendo un compuesto colorido insoluble y que se precipita.

Las isoenzimas de la fosfatasa alcalina de suero y tejido humano son separadas por electroforésis sobre membranas de acetato de celulosa.

PROCEDIMIENTO

1. Se vierten 50 ml. de amortiguador HR diluido a 750 ml. en cada uno de los compartimientos exteriores de la cámara de electroforésis, se humedecen dos tiras de papel en el amortiguador de tal manera que el amortiguador esté en contacto con todo el papel en forma de puente.

2. Se coloca la membrana de acetato de celulosa en amortiguador HR diluido a 750 ml. para que se humedezca durante 5 minutos. Se marca la membrana de tal manera que se indique donde quedará la muestra número uno. Se humedece una membrana adicional para utilizarla en el momento de la revelación.

3. Se llena cada una de las ranuras de la placa con muestras con 5 ul utilizando el microdistribuidor, la placa se toma

cubriéndose con un portaobjetos mientras se toman las muestras .

4. Se carga el aplicador , y la primera toma se seca con una gasa o papel secante, se toma nueva muestra y se aplica sobre la membrana (que previamente fué secada) de dos a tres veces según la actividad enzimática.

5. Se coloca una gota de agua en la base alineadora, para evitar que se mueva la membrana al momento de hacer la aplicación. Se quita el exceso de amortiguador de la membrana de acetato de celulosa con dos papeles secantes. Colocar rápidamente la membrana en la cámara electroforética, pero teniendo cuidado que la capa de acetato de celulosa quede hacia arriba y el plástico hacia abajo. Se conecta a 180 voltios por 25 minutos.

6. Se prepara el substrato desarrollador de color para visualización y densitometría, se añade 5 ml. de amortiguador HR diluido a 750 ml. al frasco marcado con reactivo AS-MX, se agita y se deja reposar 10 minutos, y se agrega 2 ml. de esta solución al frasco marcado como reactivo azul firme RR. Este reactivo debe utilizarse dentro del primer minuto después de haberse preparado.

7. Dos minutos antes de terminar el corrimiento electroforético, se seca entre dos papeles la membrana que se puso a remojar, se pipetea un mililitro del substrato en la superficie de la membrana.

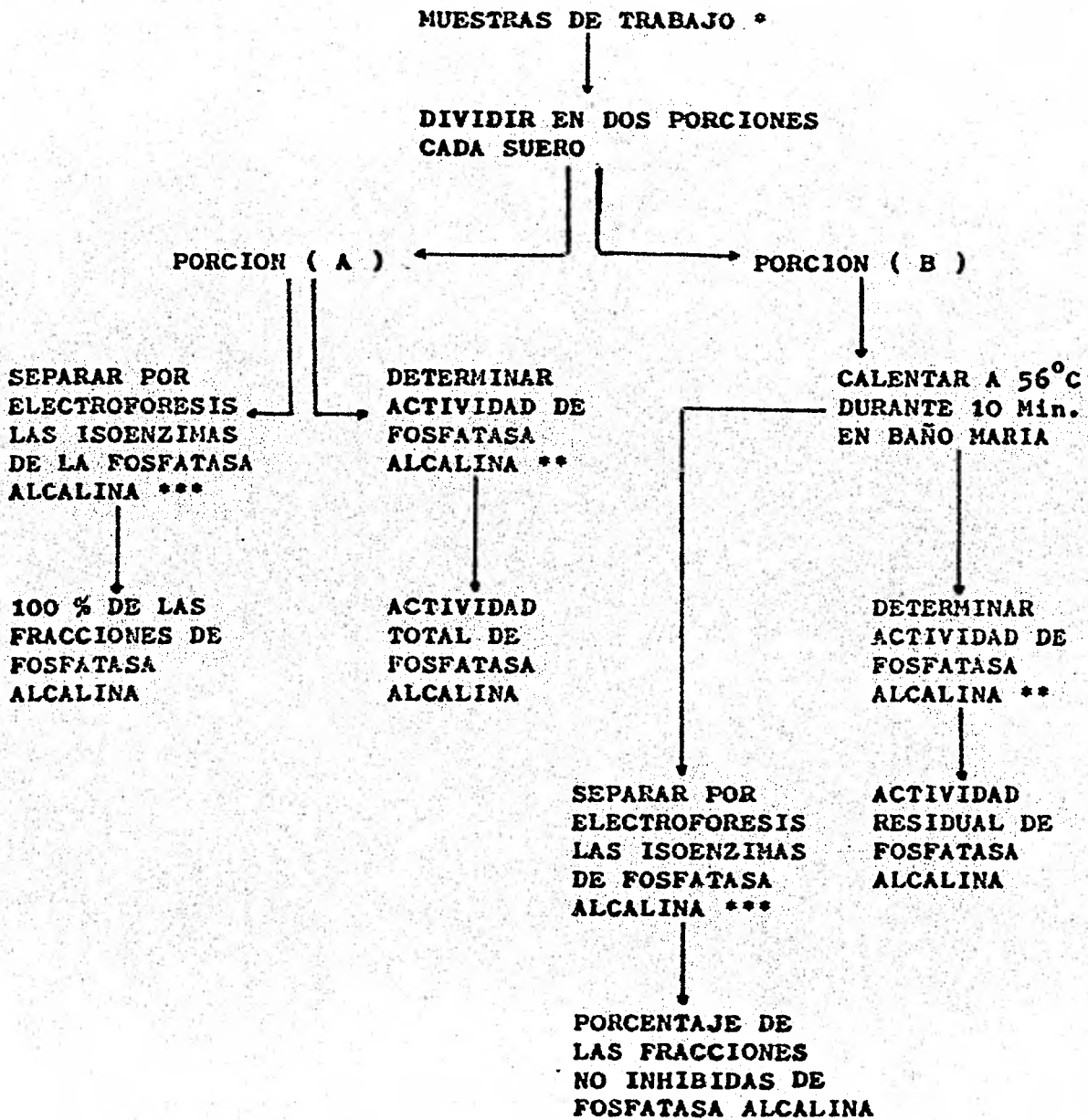
8. Inmediatamente se quita la membrana de la cámara electroforética y se seca ligeramente y se sobrepone con la otra membrana, teniendo cuidado de no dejar burbujas de aire atrapadas.

9. Se seca el exceso de solución sustrato desarrollador de color, y se coloca entre dos papeles secantes precalentados con anterioridad.

10. Se incuba a 37°C por 30 minutos aunque el desarrollador de color es suficiente en 15 minutos, sin embargo un tiempo de incubación más prolongado genera más intensidad.

11. Se seca la membrana al aire o por medio de una plancha evaporadora a 60°C , y se grafica en un densitómetro.

DIAGRAMA DE TRABAJO



* Se procesan de la misma forma las muestras de pacientes hipertiroideos como las de los voluntarios normales.

** La determinación se realiza por la técnica de Bessey - Lowry-Brock.

*** La separación electroforética es según la técnica de los Laboratorios " Helena "

DESARROLLO DE TRABAJO

En sueros previamente inactivados a 55°C durante 10 minutos, y en otra porción de los mismos sin inactivar, tanto de los pacientes hipertiroideos como de los voluntarios normales, se les determina simultáneamente la actividad de la fosfatasa alcalina por el método de Bessey Lowry Brock y el porcentaje de las diferentes fracciones de la fosfatasa alcalina mediante la técnica electroforética de los Laboratorios Helena.

El objeto de la inactivación, es para obtener el porcentaje de la fracción residual de la fosfatasa alcalina que representa el valor de la fracción de la fosfatasa alcalina que no se inactiva por el calentamiento. Para los sueros sin calentamiento, la determinación del fraccionamiento de la fosfatasa alcalina corresponde al porcentaje total de las fracciones de la fosfatasa alcalina presentes en el suero. Si restamos al porcentaje total de las fracciones de la fosfatasa alcalina, el porcentaje de la fracción residual, obtenemos el porcentaje de fracción inhibida de la fosfatasa alcalina, que representa a la fracción que se inactiva por el calentamiento del suero.

De esta manera se obtiene por el método electroforético en forma indirecta el porcentaje de la fracción de la fosfatasa alcalina sensible al calor que predomine en el suero.

En el método manual de Bessey Lowry Brock determinamos la actividad de la fosfatasa alcalina, reportando ésta en unidades Bessey Lowry Brock, de tal forma que para sueros inactivados -

a 56°C durante 10 minutos se obtiene la actividad residual y para la porción que no fue inactivada, representa la actividad total de fosfatasa alcalina, que corresponde en porcentaje al 100% de la actividad de la enzima en suero. Entonces como nuestro objetivo principal es el de evaluar un método con respecto a otro, tenemos que comparar los resultados obtenidos por ambos métodos, y como el método electroforético reporta solo en porcentaje y no en unidades como el método manual, convertimos la actividad de la fosfatasa alcalina en unidades Bessey-Lowry Brock a porcentaje. De esta forma trabajamos con porcentajes de actividad inhibida de la fosfatasa alcalina obtenida por ambos métodos.

$$\% \text{ AFAT} - \% \text{ ARFA} = \% \text{ AIFA}$$

El procedimiento se basa en reportes previos en la literatura^{38,65}, los que mencionan una inhibición de la actividad de la fosfatasa alcalina, para la fracción ósea de un 90%, para la fracción hepática de un 75%, para la fracción intestinal de un 10%, y para las fracciones de Regan y placentaria de 0%, en sueros precalentados a 56°C durante 10 minutos.

La decisión de inactivar los sueros a esta temperatura y durante este tiempo, es en vista de que son los parámetros más usados por diferentes autores, pues no existe un acuerdo unánime en ellos.

RESULTADOS

Los resultados de los exámenes practicados fueron agrupados respetando a los dos grupos de trabajo:

Grupo I - Pacientes hipertiroideos, y

Grupo II- Sujetos eutiroides (control normal)

El grupo I, formado por 57 pacientes hipertiroideos, se dividió en dos subgrupos, tomando en cuenta si la actividad de la fosfatasa alcalina estaba elevada (subgrupo 1) o si permanecía dentro de los límites normales para adultos (subgrupo 2). Se encontró que al subgrupo 1, pertenecieron 36 pacientes, en cuyos sueros la fosfatasa alcalina estaba por arriba de 3 U BLB (normal 0.8 a 2.8 U BLB o de 21 a 85 UI/L). Los 21 pacientes restantes no registraron elevación de la enzima sérica, por lo que se les incluyó en el subgrupo 2 según se muestra en las tablas I y II. En ellas pueden observarse también los niveles de T_3 y T_4 , la actividad residual de la fosfatasa alcalina, actividad total de la fosfatasa alcalina en unidades Bessey-Lowry-Brock y el porcentaje de la actividad inhibida de la fosfatasa alcalina obtenida por ambos métodos.

El promedio de los valores para el grupo I fué de 22.4 ± 7.8 ug/dl para T_4 , de 439 ± 23 ng/dl para T_3 y de 4.5 ± 2.8 UBLB de la actividad total de la fosfatasa alcalina. El promedio de porcentajes de actividad inhibida de la fosfatasa alcalina por los dos métodos fué de $82 \pm 10\%$ para el grupo I.

En la tabla III se resumen los datos encontrados en los sujetos eutiroides. En ella apreciamos que los valores para este grupo fueron de 10 ± 1.2 ug/dl para T_4 , de 131 ± 26 ng/dl

para T_3 y de 2.1 ± 0.5 U SLB de actividad total de fosfatasa alcalina. El promedio de actividad inhibida de fosfatasa alcalina obtenido a partir de los dos métodos para el grupo II fué de $71 \pm 5\%$.

Los resultados de los porcentajes de actividad inhibida de la fosfatasa alcalina obtenidos por ambos métodos fueron tratados estadísticamente mediante el análisis de regresión lineal y la prueba de t-pareada para cada uno de los grupos y subgrupos de trabajo. En la tabla IV enlistamos los valores de coeficientes de correlación, de t calculada y de t de tablas así como sus promedios y desviaciones estándares para los grupos de trabajo antes mencionados. Las fórmulas estadísticas y su interpretación se exponen en el apéndice A.

Los datos de las tablas I, II y III, fueron analizados estadísticamente, utilizando una calculadora TEXAS INSTRUMENT TL-55 Programable, la cual trabaja con las fórmulas siguientes:

FORMULA PARA LA DETERMINACION DE LA MEDIA O PROMEDIO

$$\bar{X} = \frac{\sum X_i}{n}$$

FORMULA PARA LA DETERMINACION DE LA DESVIACION ESTANDAR

$$SD_x = \sqrt{\left(\frac{\sum X_i^2}{n} - \frac{(\sum X_i)^2}{n^2} \right) \frac{n}{n-1}}$$

FORMULA PARA LA DETERMINACION DEL COEFICIENTE DE CORRELACION

$$r = \frac{\left(\frac{\sum (X - \bar{X})}{SDx} \right) \left(\frac{\sum (Y - \bar{Y})}{SDy} \right)}{n}$$

FORMULA PARA OBTENER EL VALOR DE t-PAREADA

$$t = \frac{\bar{X} - \bar{Y}}{\sqrt{\frac{SD^2_x + SD^2_y - 2r SDx SDy}{n}}}$$

DONDE:

X = Porcentaje de actividad de fosfatasa alcalina inhibida - -
obtenida por el método manual

Y = Porcentaje de actividad inhibida de fosfatasa alcalina - -
obtenida por el método electroforético de los laboratorios
Helena.

\bar{X} = Valor promedio del porcentaje de actividad inhibida de fos-
fatasa alcalina para el método manual.

\bar{Y} = Valor promedio del porcentaje de actividad inhibida de fos-
fatasa alcalina para el método electroforético de los -
laboratorios Helena.

SDx=Desviación estándar para los valores de X.

SDy=Desviación estándar para los valores de Y.

n =Número de muestras

r = Coeficiente de correlación

t_c = Valor de t calculado por la fórmula de t -pareada

t_t = Valor de t encontrados en tablas para un nivel de significancia de 0.05

INTERPRETACION DEL VALOR DEL COEFICIENTE DE CORRELACION (r)

Si r es positivo, la correlación entre las variables es positiva

Si r es negativo, la correlación entre las variables es negativa

Si $r = 0$, no existe relación lineal entre las variables

Si $r = 1$, la correlación entre las variables es máxima

Si $r = -1$, la correlación entre las variables es máxima

Si $0 \leq r \leq 1$, la correlación es fuerte o débil según r se aproxima a uno o a cero.

INTERPRETACION DEL VALOR DE t PARA MUESTRAS PAREADAS

Si la t calculada es mayor que la t de tablas el valor de P es menor de 0.05, pero si la t calculada es menor que el valor de t de tablas, el valor de P es mayor de 0.05 y no hay significancia estadística.

Si t_c es menor que t_t no existe diferencia entre los dos métodos

Si t_c es mayor que t_t existe diferencia entre los dos métodos.

T A B L A I RESULTADOS OBTENIDOS EN PACIENTES HIPERTIROIDEOS
HOSPITAL DE ESPECIALIDADES CENTRO MEDICO LA "RAZA" IMSS, Mayo, 1982

GRUPO I

SUBGRUPO I	Sexo	Edad Años	T ₃ ng/dl	T ₄ ug/dl	Fosfatasa Alcalina Total U BLB	Fosfatasa Alcalina Residual U BLB	% Actividad - Inhibida de la Fosfatasa alca lina (MM)	(ME)
1	F	66	288	18.2	4.2	0.8	83	69
2	F	24	771	30.6	6.8	1.8	74	77
3	F	59	221	24.0	3.2	1.0	71	71
4	F	48	244	15.6	9.6	2.0	79	80
5	F	24	281	20.6	3.6	0.0	100	91
6	M	35	310	13.5	6.4	0.0	100	98
7	F	42	253	14.9	3.4	0.0	100	90
8	M	53	396	21.9	11.8	1.6	86	84
9	F	57	231	14.3	16.0	0.6	97	90
10	F	25	250	12.5	3.6	1.2	67	62
11	F	60	353	14.2	6.6	1.4	79	65
12	F	72	379	32.8	3.8	1.0	73	72
13	F	60	401	22.0	7.6	1.8	76	84
14	F	30	813	35.2	8.6	2.0	77	77
15	M	45	360	28.4	3.6	1.0	71	74
16	F	36	604	38.4	4.6	0.8	83	70
17	F	31	240	14.3	8.6	1.4	85	79
18	F	38	404	16.1	5.0	0.2	96	89
19	F	33	1223	38.3	5.0	1.2	76	79
20	F	60	225	16.1	3.8	0.6	87	93
21	F	31	251	17.1	7.6	1.0	87	84
22	F	34	480	22.8	4.2	0.8	81	79
23	F	70	384	26.5	6.8	1.8	75	76
24	F	28	642	23.6	4.4	0.8	82	80
25	F	68	284	17.0	4.8	1.0	79	70
26	F	55	577	23.1	6.0	1.2	81	85
27	F	34	613	42.6	3.8	0.8	81	89
28	F	64	246	20.6	3.6	0.8	81	80
29	F	51	508	29.3	5.0	0.8	84	88
30	M	44	1145	45.4	3.8	0.6	87	88
31	F	42	885	31.5	3.6	0.6	83	78
32	F	39	593	37.4	7.8	1.0	88	78
33	F	60	582	23.8	3.4	0.8	76	74
34	F	41	323	18.5	5.0	1.0	82	77
35	M	29	305	20.0	9.8	1.2	88	78
36	F	48	252	14.7	3.6	0.8	77	72
PROMEDIO \bar{x}		45	452	23.8	5.8	0.98	83	80

T A B L A II RESULTADOS OBTENIDOS EN PACIENTES HIPERTIROIDEOS
HOSPITAL DE ESPECIALIDADES CENTRO MEDICO LA "RAZA", Mayo, 1982

G R U P O I

SUBGRUPO 2	Sexo	Edad	T ₃	T ₄	Fosfatasa Alcalina	Fosfatasa Alcalina	% Actividad Inhibida de la Fosfatasa Alcalina	
			Años	ng/dl	ug/dl	U BLB	U BLB	(MM)
37	F	36	865	19.6	2.4	0.0	100	97
38	F	31	558	22.8	2.8	0.0	100	100
39	F	38	284	14.0	3.0	1.4	54	60
40	F	45	310	18.0	3.0	0.6	83	92
41	F	53	492	20.0	2.6	0.8	73	76
42	F	60	240	20.6	1.6	0.3	81	87
43	F	53	236	16.7	1.8	0.4	82	82
44	F	42	270	13.0	1.2	0.4	67	82
45	F	33	606	23.5	1.6	0.2	87	86
46	F	51	662	19.2	2.4	0.4	83	75
47	F	62	266	22.8	1.8	0.8	56	71
48	F	26	273	17.8	1.6	0.6	69	85
49	F	30	246	15.6	2.6	0.4	84	91
50	F	27	344	21.4	2.2	0.4	82	80
51	F	65	238	17.0	2.2	0.2	91	80
52	F	48	365	17.6	2.2	0.1	95	94
53	F	37	417	22.7	2.2	0.6	76	81
54	F	50	817	33.0	2.8	0.4	85	82
55	M	45	385	17.6	2.6	0.6	77	76
56	F	31	445	27.7	2.8	0.6	79	80
57	F	28	452	20.0	2.4	0.4	87	75
PROMEDIO \bar{x}		42	418	20.0	2.3	0.45	81	83
PROMEDIO DEL GRUPO TOTAL		43	439	22.4	4.5	0.71	82	81

T A B L A I I I RESULTADOS OBTENIDOS EN VOLUNTARIOS NORMALES
HOSPITAL DE ESPECIALIDADES CENTRO MEDICO LA " RAZA "
Mayo, 1982.

G R U P O I I

CONTROL EUTIROIDEO	Sexo	Edad Años	T ₃ ng/dl	T ₄ ug/dl	Fosfatasa	Fosfatasa	% de actividad	
					alcalina total U BLB	alcalina residual U BLB	inhibida de la fosfatasa alcalina (MM)	(ME)
1	F	26	170	12.0	2.1	0.6	71	72
2	M	26	155	10.2	2.5	0.8	72	73
3	F	27	130	9.2	1.6	0.5	69	72
4	F	34	100	10.7	2.1	0.6	71	74
5	F	33	135	12.0	1.6	0.5	69	72
6	F	20	120	9.2	1.5	0.4	73	76
7	F	40	135	10.4	2.3	0.7	70	70
8	F	27	135	10.7	1.2	0.4	67	70
9	F	32	135	12.0	2.0	0.5	75	78
10	F	52	110	9.6	2.2	0.5	73	72
11	F	30	90	11.0	2.8	0.8	71	74
12	F	32	155	11.4	1.5	0.6	60	61
13	F	27	120	9.6	1.5	0.5	67	71
14	F	30	165	9.4	2.0	1.0	67	72
15	M	34	130	9.0	1.9	0.6	68	68
16	M	29	135	7.4	2.5	0.8	68	66
17	F	30	130	9.0	2.4	0.7	71	68
18	M	34	135	9.0	2.6	0.8	69	65
19	F	39	85	9.0	1.8	0.6	67	65
20	F	48	100	9.2	2.7	0.9	67	65
21	F	51	150	9.0	2.3	0.5	78	74
FROMEDIO \bar{X}		34	131	10.0	2.1	0.64	69.6	70.6

T A B L A IV
 RESULTADOS DEL ANALISIS ESTADISTICO (PRUEBA t-PAREADA Y CORRELACION) PARA LOS PORCENTAJES DE ACTIVIDAD
 INHIBIDA DE LA FOSFATASA ALCALINA, OBTENIDOS MEDIANTE DOS METODOS DIFERENTES.
 HOSPITAL DE ESPECIALIDADES CENTRO MEDICO LA "RAZA" IMSS. Mayo, 1982

PACIENTES HIPERTIROIDEOS	% DE ACTIVIDAD INHIBIDA DE LA FOSFATASA ALCALINA				COEFICIENTE DE CORRELACION	VALORES DE		t Interpreta ción del - valor de t
	(METODO MANUAL) \bar{x}	SDx	(METODO ELECTROFORETICO) \bar{y}	SDy		(calculada) t_c	(tablas) t_t	
GRUPO I	81.80	9.80	80.70	8.70	0.719	1.15	2.000	NO EXISTE DIFERENCIA
SUBGRUPO 1	82.55	8.29	79.72	8.25	0.744	2.86	2.021	EXISTE DIFERENCIA
SUBGRUPO 2	80.52	12.08	82.47	9.23	0.764	-1.14	2.086	NO EXISTE DIFERENCIA
PACIENTES NORMALES								
GRUPO II	69.66	3.66	70.61	4.49	0.753	-1.46	2.086	NO EXISTE DIFERENCIA

DISCUSSION

Al comparar los valores obtenidos de los porcentajes de actividad inhibida de fosfatasa alcalina por el método químico manual, contra los obtenidos por el método electroforético, para los grupos de pacientes hipertiroideos y control normal eutiroideo, no se encontró diferencia significativa entre las determinaciones hechas por un método como por el otro. Sin embargo si la hubo, aún cuando fué muy pequeña, para el subgrupo de pacientes hipertiroideos con actividad de fosfatasa alcalina elevada (subgrupo 1).

Lo anterior hace pensar en que si se trataran los sueros de pacientes con actividad de fosfatasa alcalina muy aumentada, el valor del porcentaje de la actividad inhibida de la fosfatasa alcalina sería diferente para cada uno de los métodos estudiados

Aunque los resultados indican que no existe diferencia significativa en los porcentajes de actividad inhibida de la fosfatasa alcalina obtenidos por los dos métodos, esto no quiere decir que los métodos tengan igual sensibilidad con lo que respecta a la isoenzima ósea de la fosfatasa alcalina, ya que en el presente trabajo se pudo observar que tanto el método electroforético como el método químico manual no logran diferenciar claramente dicha fracción ósea de la fosfatasa alcalina. Cuando se hace la determinación por el método electroforético se presenta solamente una banda electroforética que engloba a las dos fracciones que corren en esa posición, o sea fracción ósea y fracción hepática, aún cuando la casa comercial especifica que la separación de dichas fracciones es bien definida, en éste estudio no

se pudo diferenciar la una de la otra. Por otra parte cuando se hace la determinación por el método químico manual, al calentar los sueros a 56°C durante 10 minutos, se inactiva en gran parte la isoenzima de hígado junto con la isoenzima de hueso, y no hay manera de saber cuánto exáctamente correspondió a cada una de ellas.

Consideramos que para una mejor diferenciación entre éstas dos isoenzimas y en general para las otras, se debe buscar la posibilidad de trabajar con una técnica más específica, como la técnica inmunológica, que utiliza anticuerpos específicos altamente purificados para cada una de las isoenzimas de la fosfatasa alcalina.

Sin embargo todavía no es práctico para uso de rutina debido al hecho de que se dificulta obtener preparaciones inmunológicamente puras de antígeno¹⁰.

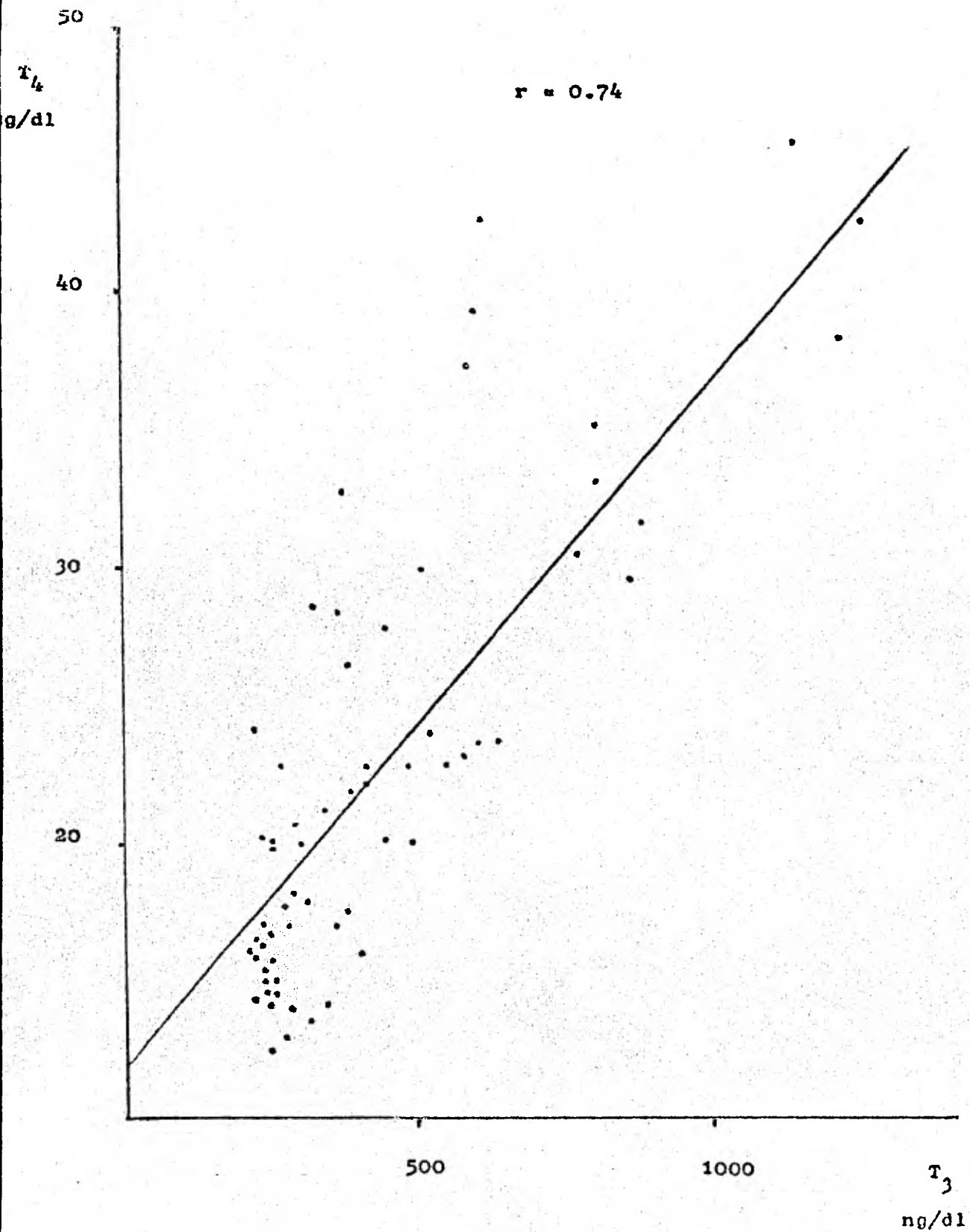
Como lo anterior aún no se resuelve creemos que si se realiza simultáneamente a la determinación de isoenzimas de la fosfatasa alcalina, la medida de otras enzimas en suero, tales como la 5'nucleotidasa, leucinaminopeptidasa y en especial la gamma glutamil transpeptidasa, se ayudará a distinguir el origen óseo o hepático de la fosfatasa alcalina elevada. Estas enzimas se elevan raramente en desordenes óseos y frecuentemente en enfermedades hepatobiliares^{5,40,65}.

Con respecto al padecimiento, el grupo de pacientes hipertiroideos mostró una correlación estadísticamente significativa

entre los valores de T_3 y T_4 , mientras que para el grupo control-eutiroides no hubo tal correlación. Esto indica que el padecimiento se encontraba en forma activa en los pacientes hipertiroideos y que en el grupo control no registraba alteración alguna con lo que respecta a la glándula tiroides (Gráficas 1 y 2).

Los resultados indican que aproximadamente la mitad de los pacientes hipertiroideos tuvieron niveles elevados de fosfatasa alcalina. Y que la actividad total de la fosfatasa alcalina se correlaciona fuertemente con la actividad inhibida de la fosfatasa alcalina para el grupo de pacientes hipertiroideos como para el grupo control eutiroides (Gráficas 3, 4, 5 y 6).

El porcentaje tan elevado de actividad inhibida de la fosfatasa alcalina obtenido por los dos diferentes métodos para el grupo entero de pacientes hipertiroideos, sugiere, como han señalado otros autores, que en el hipertiroidismo la elevación de los niveles de actividad de fosfatasa alcalina es indicio de una enfermedad de hueso relacionada con la fracción ósea de la fosfatasa alcalina y no con la fracción hepática de la enzima^{16,30,65,}
89.



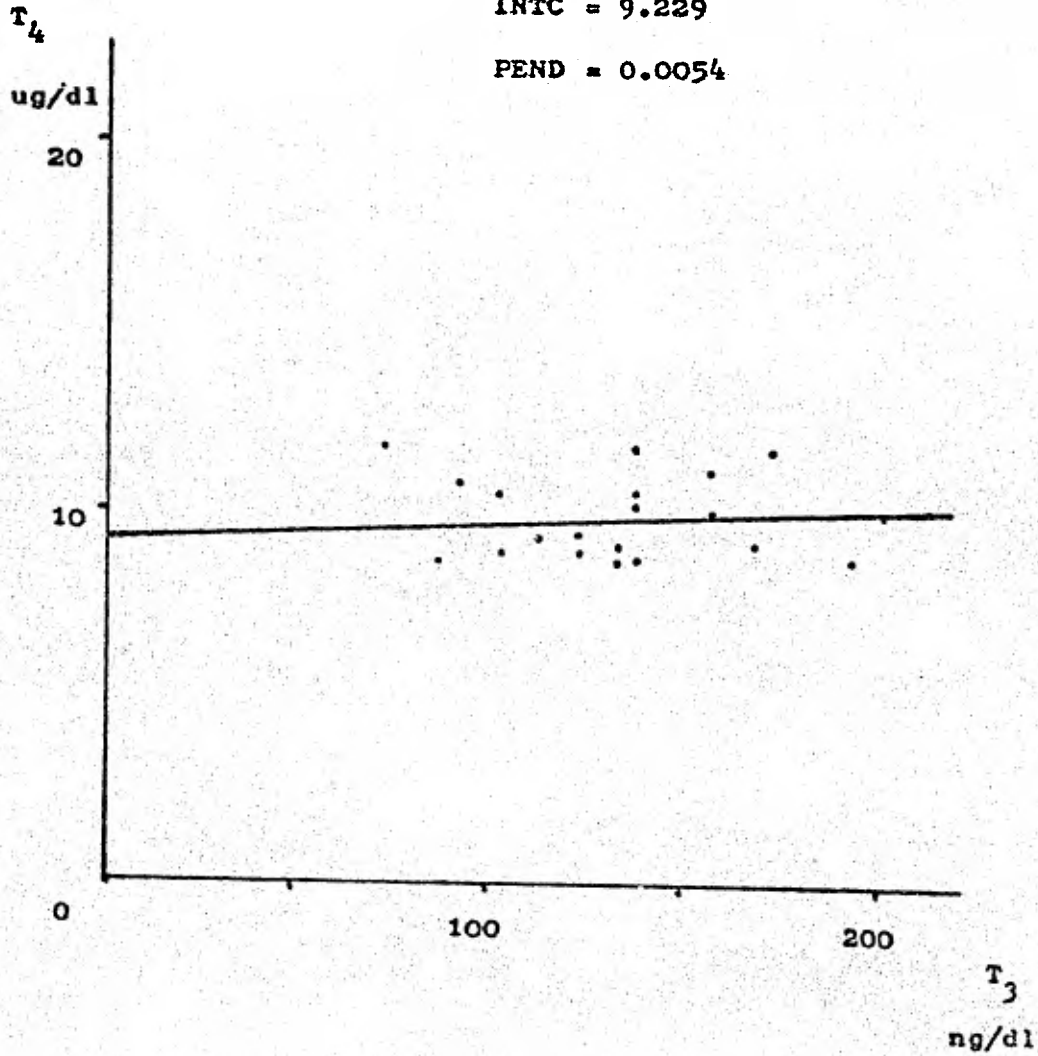
GRAFICA 1

CORRELACION ENTRE LOS VALORES DE T_3 Y LOS DE T_4 PARA EL GRUPO
 ENTERO DE PACIENTES HIPERTIROIDEOS

$r = 0.117$

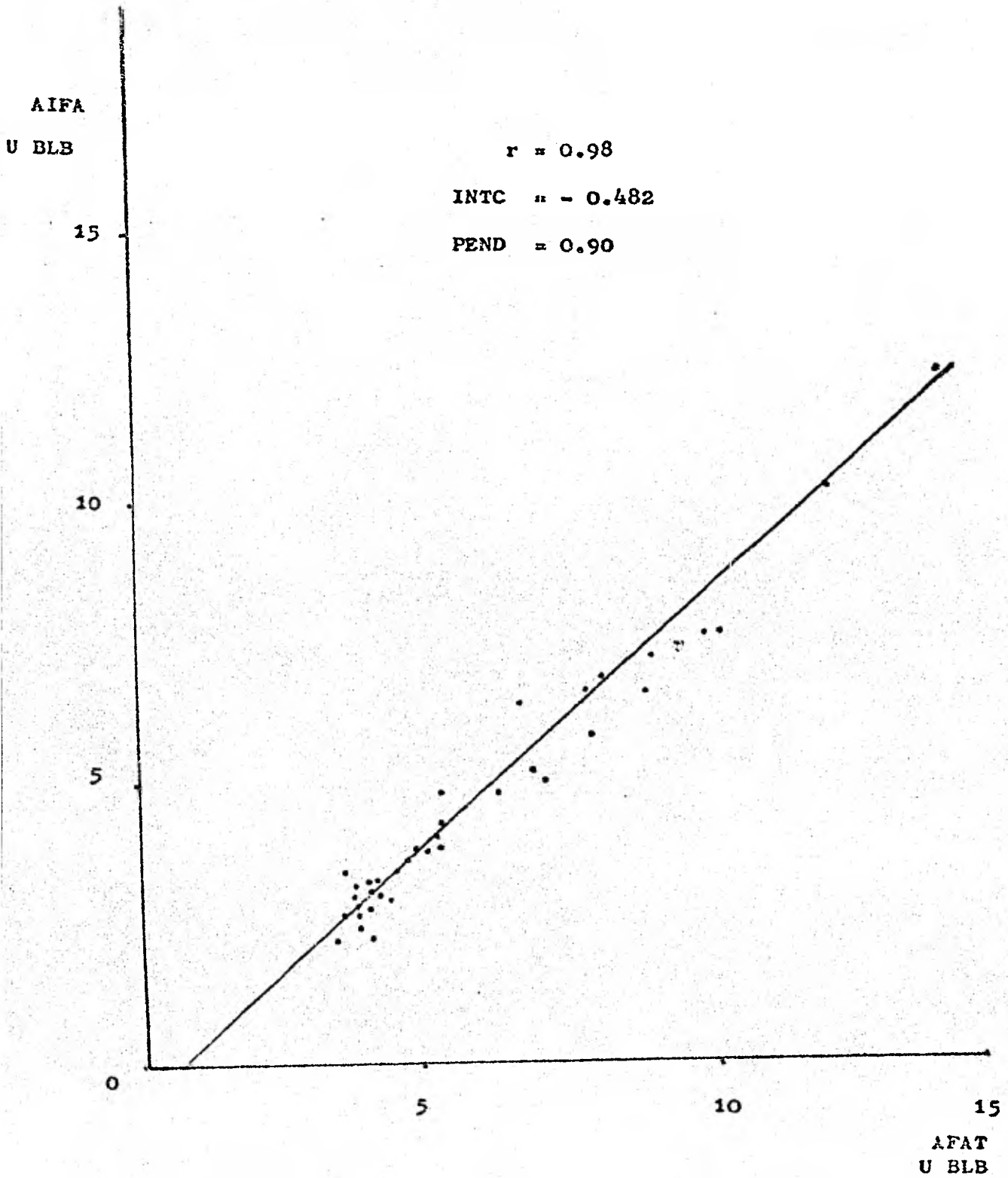
INTC = 9.229

PEND = 0.0054



GRAFICA 2

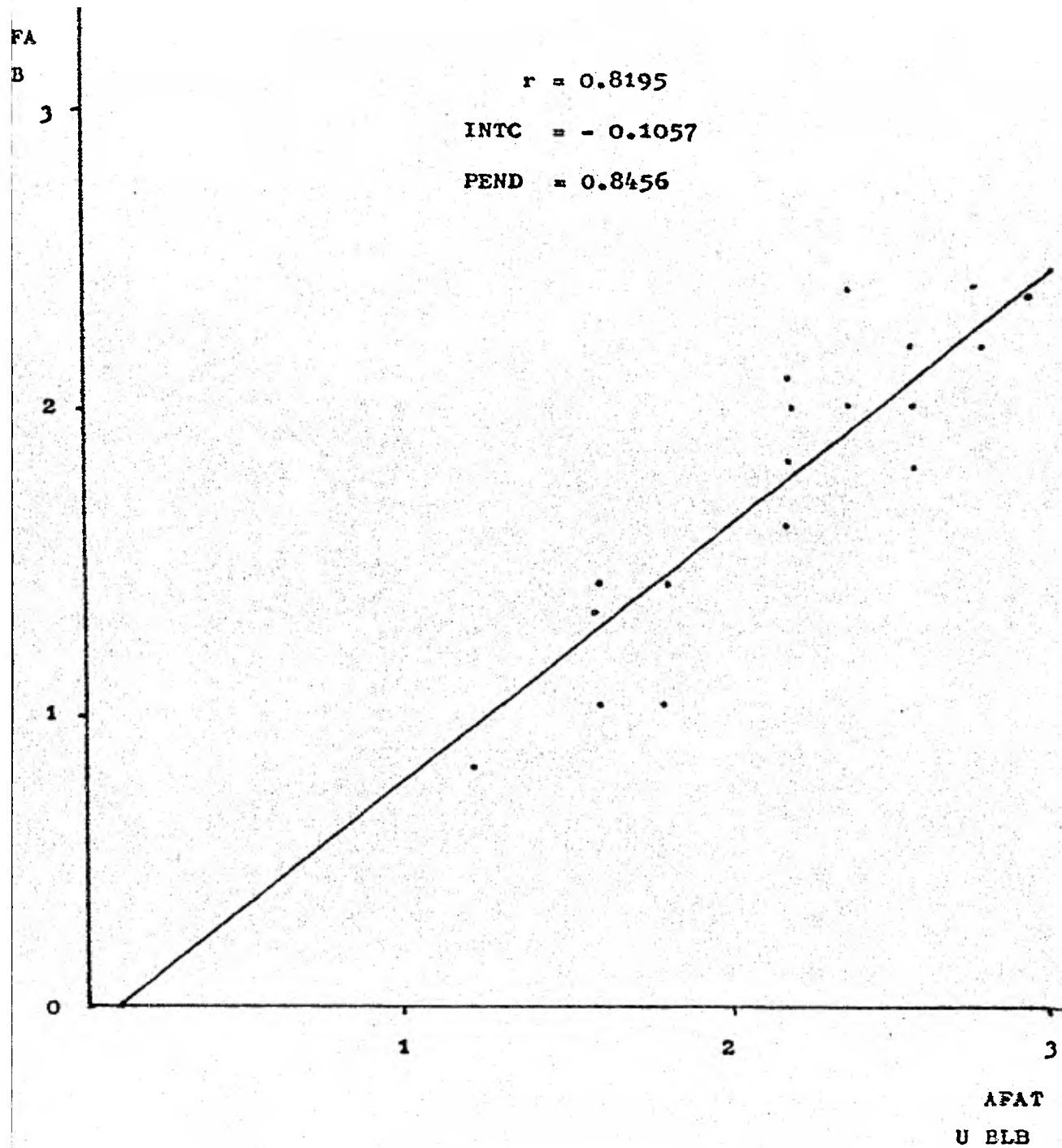
CORRELACION ENTRE LOS VALORES DE T_3 Y T_4 PARA EL GRUPO
DE VOLUNTARIOS EUTIROIDEOS



GRÁFICA 3

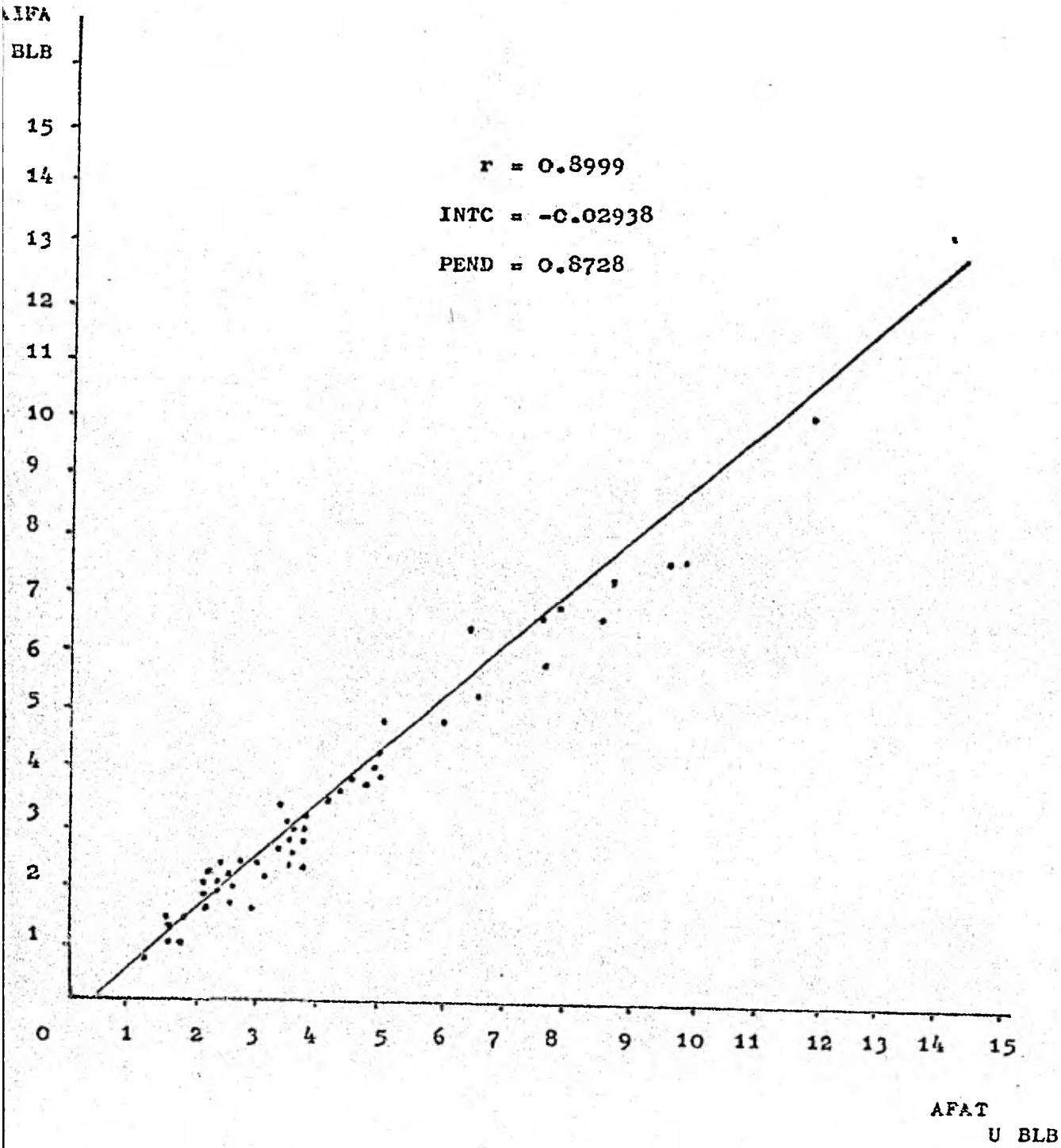
CORRELACION ENTRE LA ACTIVIDAD DE FOSFATASA ALCALINA TOTAL
 Y LA ACTIVIDAD INHIBIDA DE LA FOSFATASA ALCALINA, PARA EL GRUPO
 DE PACIENTES HIPERTIROIDEOS CON FOSFATASA ALCALINA ELEVADA

(SUBGRUPO I)



GRAFICA 4

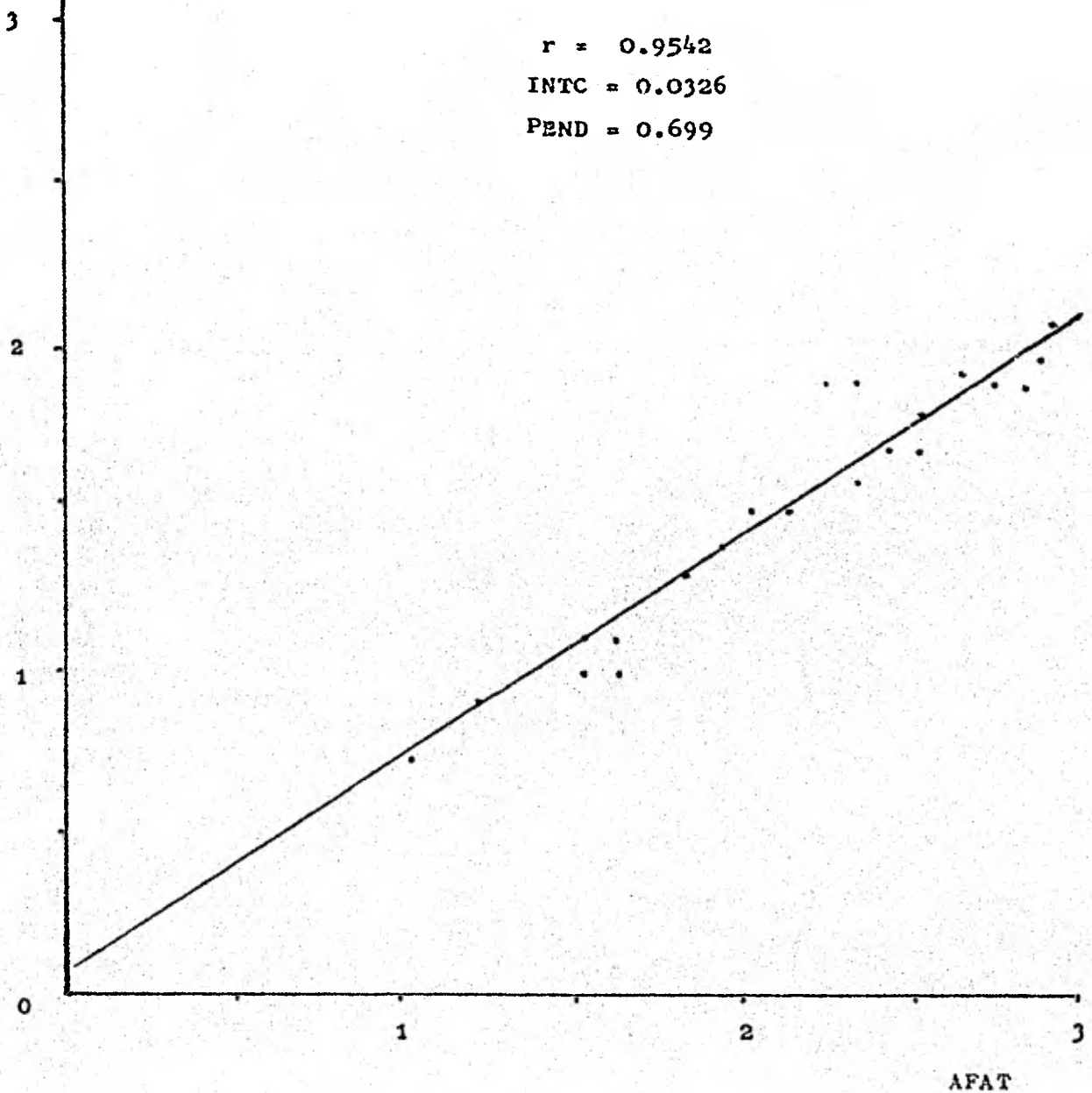
CORRELACION ENTRE LA ACTIVIDAD DE FOSFATASA ALCALINA TOTAL
Y LA ACTIVIDAD INHIBIDA DE FOSFATASA ALCALINA, PARA EL GRUPO
DE PACIENTES HIPERTIROIDEOS CON ACTIVIDAD DE FOSFATASA
ALCALINA NORMAL (SUBGRUPO 2) -46-



GRAFICA 5

CORRELACION DE LA ACTIVIDAD DE FOSFATASA ALCALINA TOTAL
 Y LA ACTIVIDAD INHIBIDA DE LA FOSFATASA ALCALINA, PARA EL
 GRUPO ENTERO DE PACIENTES HIPERTIROIDEOS (GRUPO I).

FA
BLB



GRAFICA 6

U BLB

CORRELACION ENTRE LA ACTIVIDAD DE FOSFATASA ALCALINA TOTAL
Y LA ACTIVIDAD DE FOSFATASA ALCALINA INHIBIDA, PARA EL
GRUPO DE VOLUNTARIOS EUTIROIDEOS (GRUPO II).

CONCLUSIONES

En base a nuestros objetivos planteados al iniciar éste trabajo, y al analizar los resultados, concluimos, que si se tuviera que decidir, cual es el mejor de los dos métodos empleados para la determinación de la fracción ósea de la fosfatasa alcalina, con respecto a su sensibilidad específica de dicha fracción, diríamos que ninguno de -- ellos diferencia claramente a la isoenzima de hueso de la isoenzima de hígado, y por lo tanto el método electroforético como el método -- químico manual, carecen de sensibilidad para la determinación específica.

No obstante es importante considerar que, si ni se cuenta con -- alguna otra técnica que sea más sensible y más específica para la --- determinación de la fracción ósea de la fosfatasa alcalina en suero, -- y solo se quiera conocer de una manera aproximada la proporción de la fracción ósea de la fosfatasa alcalina, el método químico manual de -- Bessey-Lowry-Brock para la determinación de la actividad de la fosfatasa alcalina trabajado con sueros inactivados a 56°C , y sin inactivar será de gran ayuda, si se trabaja simultáneamente con la determinación de otras enzimas que ayuden a descartar la posibilidad de que el aumento de la actividad de la fosfatasa alcalina en suero sea de origen hepático. Y aunque el procedimiento sólo da resultados aproximados, -- se puede realizar con un mínimo de aparatos y de habilidad técnica, -- lo que significa una ventaja sobre el método electroforético, que es caro y que utiliza aparatos y reactivos especiales.

El método electroforético no ayuda a la determinación cuantitativa de las fracciones, por falta de separación característica de las dos isoenzimas de movimiento rápido (hepática y ósea).

Sin embargo el método electroforético ayudará en la diferenciación de las otras isoenzimas que pudieran estar presentes en el suero, siempre y cuando se tengan marcadores isoenzimáticos de cada una de las fracciones de la fosfatasa alcalina.

Los valores de actividad inhibida de fosfatasa alcalina tan aumentados en comparación con los obtenidos en los voluntarios normales, sugiere que la elevación en la actividad de la fosfatasa alcalina en los pacientes hipertiroideos es debida en gran parte a la fracción ósea.

BIBLIOGRAFIA

1. Aisenberg, A.C., Kaplan, M.M., Rinder, S.V.: Serum alkaline -- phosphatase at onset of Hodkin's disease. *Cancer* 26: 318, 1970.
2. Ahmed, Z., King, E.J.: Placental phosphatases. *Biochim. Bio---phys. Acta.*34: 313-325, 1959.
3. Baker, R.W.R., Pellegrino, C.: The separation and detection of serum enzymes by paper electrophoresis. *Scand. J. Clin. Lab. In--vest.* 6: 94-101, 1954.
4. Bamford, K.F., Harris, H., Luffman, S.E.: Serum-alkaline-phos- phatase and the blood-groups. *Lancet* 1 : 530-531, 1965.
5. Banks, B.M., Pineda, E.P., Goldberg, J.A.: Clinical value of - serum leucine aminopeptidase determinations. *N. Engl. J. Med.* 263 1267-1281, 1960.
6. Bessey, O.A., Lowry, O.H., Brock, M.: A method for the rapid - determination of alkaline phosphatase with five cubic millimeters of serum. *J. Biol. Chem.* 164: 321-329, 1946.
7. Birkett, D.A., Conyers, R.A., Neale, F.C.: Action of urea on - human alkaline phosphatase: With a description of some automated techniques for the study of enzyme kinetics. *Arch. Biochem. Bio--phys.* 121: 470-479, 1967.
8. Bodansky, A.: Phosphatase studies. II. Determination of serum phosphatase factors influencing the accuracy of determination. *J. Biol. Chem.* 101: 93-104, 1933.
9. Boyer, S.H.: Alkaline phosphatase in human sera and placentae. *Science* 134: 1002-1004, 1961.
10. Boyer, S.H.: Human organ alkaline phosphatase: Discrimination by several means including starch-gel-electrophoresis of antien--zyme supernatant fluids. *Ann. N. Y. Academ. Sci.* 103: 938-951, -- 1963.

11. Butterworth, P.J., Moss, D.W., Pitkanen, E.L.: Patterns of -- urinary excretion of alkaline phosphatase in acute renal failure. *Chim. Acta.* 11: 220-226, 1965.
12. Burlina, A.: Parallel electrophoresis fractionation of alkali ne phosphatase and serum protein on cellulose acetate strips, --- clinical evaluation. *Clin. Chem.* 22 (2): 261-263, 1976.
13. Carter, P.M.: Better electrophoresis separation of hepatic / skeletal isoenzymes of alkaline phosphatase (letters). *Clin. -- Chem.* 23(11): 2172, 1977.
14. Clark, L.C., Beck, E.: Plasma alkaline phosphatase activity. I. Normative data for growing children. *J. Pediatr.* 36: 335-341, - 1950.
15. Cohen, S., Kaplan, M.M., Rinder, S.V.: Liver diseases and gallstones and regional enteritis. *Gastroenterology* 60: 237-245, -- 1971.
16. Cooper, D.S.: Alkaline phosphatase isoenzymes patterns in --- hyperthyroidism. *Ann. Intern. Med.* 90(2): 164-168. 1979.
17. Chiandussi, L., Greene, S.F., Sherlock, S.: Serum alkaline -- phosphatase fractions in hepatobiliary and bone diseases. *Clin. - Sci.* 22: 425-434, 1962.
18. Davidson, D.F.: Diferentiation between liver and bone as the - source of raised serum alkaline phosphatase a rule of thumb. *Medi cal laboratory Sciences* 35 (3): 259-263, 1978.
19. Dent, C.E., Harper, C.M.: Plasma-alkaline-phosphatase in nor- mal adults and in patients with primary hyperparathyroidism. *Lan- cet* 1: 559, 1962.
20. Dymling, J.F.: Separation of serum and placental alkaline --- phosphatase by agarose gel electrophoresis and Sephadex chromato- graphy. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 18: 130-133, 1966.

21. Eaton R.H., Moss, D.W.: Organic pyrophosphates as substrates for human alkaline phosphatases. *Biochem. J.* 105: 1307-1312, 1967.
22. Eaton, R.H., Moss, D.W.: Partial purification and some properties of human bone alkaline phosphatase preparation. *Enzymologia* - 35:31-39, 1968.
23. Estborn, B.: Visualization of acid alkaline phosphatase after starch gel electrophoresis of seminal plasma, serum and bile. --- *Nature (Lond)* 184: 1636-1637, 1959.
24. Fennelly, J.J., Fitzgerald, M.X., McGeeney, K.: Value of differential thermostability, urea inhibition, and gel filtration of alkaline phosphatase in the identification of disease states. *Gut* 10: 45-51, 1969.
25. Fishman, W.H., Ghosh, N.K.: Isoenzymes in biology and human alkaline phosphatase. *Advances in Clinical Chemistry*, vol. 10. -- New York Academic Press 1967, p. 255-370.
26. Fishman, W.H., Green, S., Inglis, N.I.: Decline in rat-serum alkaline phosphatase following bile duct ligation. *Biochim Biophys Acta* 62: 429-431, 1962.
27. Fishman W.H., Inglis, N.I., Krant, M.J.: Serum alkaline phosphatase of intestine origin in patients with cancer and cirrhosis of the liver. *Clin. Chim. Acta.* 12: 298-303, 1965.
28. Fishman W.H.: Immunologic and biochemical approaches to alkaline phosphatase isoenzyme analysis: The Regan isoenzyme. *Ann. N. Y. Sci.* 116: 745-759, 1969.
29. Fishman W.H., Green, M.A., Inglis, N.I.: Method of inhibition of alkaline phosphatase. *Nature* 198: 685-686, 1963.
30. Fritche, H.A., Adams, P.H.R.: Cellulose acetate electrophoresis of alkaline phosphatase isoenzymes in human serum and tissue. *Clin. Chem.* 18(5): 417-421, 1972.

31. Gerlach, U., Paul, L., Latzel, H.: Isoenzymes of alkaline --- phosphatase in hypertyroidism. *Enzymol Biol. Clin.* 11: 251-256, - 1970.
32. Ghosh, N.K., Fishman, W.H.: Purification and properties of -- molecular weight variants of human placental alkaline phosphatase *Biochem. J.* 108: 779-792, 1968.
33. Ghosh, N.K.: Purification and molecular propertis of placenta and intestinal alkaline phosphatasses. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 166: 604-640, 1969.
34. Goldfischer S., Essner, E., Novikoff, A.B.: The localization of phosphatase activities at the levels of ultrastructure. *J. --- Histochem Cytochem* 12: 72-95, 1964.
35. Haije W.H., DeJong, M.: Isoenzyme patterns of serum alkaline phosphatase in agar-gel electrophoresis and their clinical significance. *Clin. Chim. Acta.* 8: 620-623, 1963.
36. Harkness, D.R.: Studies placental alkaline phosphatase. I. -- Purification and crystalization. *Arch. Biochem. Biophys.* 126: 503 512, 1968.
37. Harness, D.R.: Studies on human placental alkaline phosphata- se. II. Kinetic properties and studies on the apoenzyme. *Arch. -- Biochem. Biophys.* 126: 513-523, 1968.
38. Harper, H.A., Rodwell, V.M., Mayes, P.A.: *Manual de Química - Fisiológica.* (6a. ed.) 1978. México D.F. El Manual Moderno S.A.
39. Hitz, J.: Automated Quantification of bone and liver alkaline phosphatase isoenzymes of serum. *Clin. Chim. Acta.* 107 (3): 303 - 310, 1980.
40. Hill, P.G., Sammons, H.G.: An assessment of 5'nucleotidase as a liver-function test. *Q. J. Med.* 36: 457-468, 1967.

41. Hodson, A.W., Latner, A.L., Raine, L.: Isoenzymes of alkaline phosphatase. *Clin. Chim. Acta* 7: 255-261, 1962.
42. Hollander, C.S., Mitsuma, T., Lastin, A.J.: Hipertriodotiro_nemia as a promonitory manifestation of thyrotoxicosis. *Lancet*. 2: 731-733. 1971
43. Horne, M., Cornish, C.J., Posen, S.: Use of urea alkaline denaturation in the identification of human Phosphatases. *J Lab. Clin. Med.* 72: 905-915, 1968.
44. Huldah, Bancroft.: *Introducción a la Bioestadística.* (9^a ed.) 1976. Buenos Aires Argentina. Eudeaba Manuales. Editorial Universitaria de Buenos Aires.
45. Inglis, N.L., Krant, M.J., Fishman, W.H.: Influence of a fat-enriched meal on human serum (L-phenylalanine-sensitive) "intestinal" alkaline phosphatase. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 124: 699-702, 1967.
46. Inglis, N.L., Ghosh, N.K., Fishman, W.H.: Sephadex G-200 gel electrophoresis of human serum alkaline phosphatase. *Anal. Biochem* 22: 382-386, 1968.
47. Jeffree, G.M.: Phosphatase actsvity in the limb bones of monkeys (*Lagothrix humboldti*) with hiperparathyroidism. *J. Clin. Pathol.* 15: 99-111, 1962.
48. Jose Luis Millan, Michael, P., Whyte Louis V.A.: Hypophosphatazia (adult form); cuantification of serum alkaline phosphatase isoenzymes activity in a large kindred. *Clin. Chem.* 26(7): 840 - 845, 1980.
49. Joseph Cassar, Simon Joseph.: Alkaline phosphatase levels in thyroid disease. *Clin. Chem. Acta.* 23: 33-37, 1969.

50. Kaplan, M.M., Rogers L.: Separation of serum-alkaline-phosphatase isoenzymes by polyacrylamide gel electrophoresis. *Lancet* 2: 1029-1031, 1969.
51. Kaplan, M.M.; Origin of the serum alkaline phosphatases. *Clin Res.* 16: 530, 1968.
52. Kay, H.D.: Plasma Phosphatase in osteitis deformans and in other diseases of bone. *Br. J. Exp. Path.* 10: 253-256, 1929.
53. Kay, H.D.: Plasma phosphatase. II. The enzyme in disease, particularly in bone disease. *J. Biol. Chem.* 89: 249-266, 1930.
54. Keiding, N.R.: Intestinal alkaline phosphatase in human lymph and serum. *Scand. J. Lab. Invest.* 18: 134-140, 1966.
55. Keiding, N. R.: Differentiation into three fractions of serum alkaline phosphatase and behaviour of the fractions in diseases of bone and liver. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 6: 94-101, 1954.
56. King, E.J., Armatrog, A.R.: A convenient method for determining serum and bile phosphatase activity. *Can. Med. Assoc. J.* 31: 376-381, 1934.
57. Klein, B., Read, P.A., Babson, A.L.: Rapid method for the quantitative determination of serum alkaline phosphatase. *Clin. Chem.* 6: 269-275, 1960.
58. Klein, L., Lafferty F.W., Pearson O.H.: Correlation of urinary hydroxyproline, serum alkaline phosphatase and skeletal calcium turnover. *Metabolism* 13: 272-284, 1964.
59. Korner, N.H.: Distribution of alkaline phosphatase in serum protein fractions. *J. Clin. Pathol.* 15: 195-199, 1962.

60. Kowlessar, O.D., Pert, J.H., Haeffner, L.J.: Localization of 5-nucleotidase and non-specific alkaline phosphatase by starch-gel electrophoresis. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 100: 191-193, 1959
61. Kowlessar, O.D., Haeffner, L.J., Riley, E.M.: Comparative study of serum leucine aminopeptidase, 5-nucleotidase and non-specific alkaline phosphatase in diseases affecting the pancreas, hepatobiliary tree and bone. Am. J. Med. 31: 231-237, 1961.
62. Label, B.L., Deane, H. W., Romney, S.L.: Enzymic histochemistry of the villous portion of the human placenta from six weeks of gestation to term. Am. J. Obstet. Gynecol 83: 295-299, 1962.
63. Latner, A.L.: Phosphatase isoenzymes. Enzymes in Clinical Chemistry. Edited by R. Ruysen, L. Vandendviessche. Amsterdam, Elsevier, 1965, p. 110-119.
64. Lilian, M.Y., Lee N.: Electrophoretic method for assessing the normal and pathological distribution of alkaline phosphatase isoenzymes in serum. Clin. Chem. 21 (8): 1128-1135, 1975.
65. Marsall, M., Kaplan, M.D.: Progress in hepatology. Gastroenterology. 62(3): 452-463, 1972.
66. Moss, D.W.: A simplified heat-inactivation method for investigation alkaline phosphatase isoenzymes in serum. Clin. Chim. Acta 61 (1): 63-71, 1975.
67. Moss, D.W.: The heterogeneity of human alkaline phosphatase. Fed. Europ. Biochem. Soc. Sym. 18: 227-239, 1970.
68. Moss, D.W.: Properties of alkaline phosphatase fractions in extracts of human small intestine. Biochem. J. 94: 458-462, 1965.
69. Moss, D.W.: Iso-enzymes of alkaline phosphatase in autolysed and butanol-extracted liver preparations. Nature (lond) 193: 981-982, 1962.

70. Moss, D.W., Eaton, R.H., Smith, J.K.: Association of inorganic pyrophosphatase activity with human alkaline-phosphatase preparations . Biochem. J. 108: 53-57, 1967.
71. McMaster, Y., Tennat, R., Clubb, J.S.: The mechanism of serum-alkaline phosphatase in pregnancy. J. Obstet. Gynecol. Brit. - Commonw. 71: 735-739, 1964.
72. McCance, R. A., Fairweather, D.V.I., Barrett, A.M.: Genetic , Clinical, biochemical and pathological features of hypophosphatasia Q.J. Med. 25: 523-537, 1956.
73. Mizutani, A., Barnett, R.J.: Fine structural demonstration of phosphatase activity at pH 9. Nature (Lond) 206: 1001-1003, 1965.
74. Morton, R.K.: The purification of alkaline phosphatases of animal tissues. Biochem. J. 57: 595-603, 1954.
75. Moss, D.W., King, E.J.: Properties of alkaline-phosphatase fractions separated by starch-gel electrophoresis. Biochem.J. 84 : 192-195, 1962.
76. Newton, M.A.: The clinical application of alkaline phosphatase electrophoresis. Q.J. Med. 36: 17-28, 1967.
77. Magant de Deuxchaisnes, C., Krane, S.M.: Paget's disease of bone: Clinical and metabolic considerations. Medicine (Baltimore) 43: 233-266, 1964.

78. Neale, F.C., Clubb, J.S., Hotchkis, D.: Heat stability of human placental alkaline phosphatase. *J. Clin. Chim. Acta. Pathol.* 18: 359-363, 1965.
79. O'carrol, D.; Chemical inhibition method for alkaline phosphatase isoenzymes in human serum. *Am. J. Clin. Pathol.* 63 (4): 564-572, 1975.
80. Picardi, R., Gardiol, D., Gautier, A.: Ultrastructural localization of alkaline phosphatase activity in human fetal liver. *Histochemie* 9: 58-67, 1967.
81. Plosscowe, R.P., Berg, G.C., Segal, H.L.: Enzyme histochemical studies of human gastric and jejunal biopsy specimens in normal and disease states. *Am. J. Dig. Dis.* 8: 311-318, 1963.
82. Pope, C.E., Cooperband, M.D.: Protein Characteristics of serum- and bile alkaline phosphatase. *Gastroenterology* 50: 631-636, 1966.
83. Posen, S.P. : Alkaline phosphatase. *Ann. Intern. Med.* 67: 183 - 203, 1967.
84. Posen, S., Neale, F.C., Clubb, J.S.: Heat inactivation in the study of human alkaline phosphatases. *Ann, Intern. Med.* 62: 1233- - 1243, 1965.
85. Posen, S., Neale ,F.C., Birkett, D.J.: Intestinal alkaline - phosphatase in human serum. *J. Clin. Pathol.* 48: 81-85, 1967.

86. Puukka, Raija: Comparison of alkaline phosphatase isoenzymes determined by inhibition and electrophoresis. Clin. Chim. Acta . 85(2): 111-114, 1978.
87. Reale, E.: Electron microscopic localization of alkaline - phosphatase from material prepared with the cryostat-microtome . Exp. Cell. Res. 26: 210-211, 1962.
88. Rhone, D.P.: Tissue source of elevated serum alkaline phos-- phatase activity in hyperthyroid patients. Am. J. Clin. Pathol . 74 (4): 381-386, 1980.
89. Richter, J., Ohlem, J.: Hypertyroidism and the isoenzymes - determination by of phosphatase alkaline. Dt. Sch. Med. - Wochenschr. 96: 196-202, 1971.
90. Robinson, J.C., Pierce, J.E.: Diferential action of neurami- nidase on human serum alkaline phosphatase. Nature (Lond) 204 : 472-473, 1964.
91. Robinson, J.C., Goldsmith, L.A.: Genetically determined - variants of serum alkaline phosphatase: a review. Vox Sang 13 : 289-307, 1967.
92. Roche, J.: Blood phosphatases. Biochem. J. 25: 1724-1733, - 1931.
93. Rosenberg, I.N.: Zone electrophoresis studies of serum alka- line phosphatase. J. Clin. Invest. 38: 630-644, 1959.

94. Side, W.H.: Quantitative alkaline phosphatase isoenzymes -
determination by electrophoresis on cellulose acetate membranes.
Clin. Chem. 23 (1): 28-34, 1977.
95. Smith, I., Lightstone, P.J., Perry, J.D.: Separation of -
human tissue alkaline phosphatases by electrophoresis on acryla-
mide disc gels. Clin. Chim. Acta. 19: 499-505, 1968.
96. Sobel, E.H., Clark, L.C., Fox, R.P. : Rickets, deficiency of
"alkaline" phosphatase activity and premature loss of teeth in
childhood. Pediatrics 11: 309-322, 1953.
97. Stadtman, T.C.: Alkaline phosphatases, The enzymes, vol. 5.
Edited by P.D. Boyer, H. Lardy, K. Myrbäck, New York, Academic
Press, 1961, p. 55-71.
98. Stepan, J.A.: Modified inactivation-inhibition method for -
determining the serum activity of alkaline phosphatase isoenzymes
Clin. Chim. Acta. 69 (1) : 1-9, 1976.
99. Stepan, J.A.: Bone isoenzymes of alkaline phosphatase in -
acromegaly. Clin. Chim. Acta. 93 (3): 355-363, 1979.
100. Stolbach, L.L., Krant, M.J., Fishman, W.H.: Ectopic produc-
tion of an alkaline phosphatase isoenzyme in patients with cancer
N.Engl. Med. 281: 757-762, 1969.
101. Susseman, H., Laga, E: Inorganic pyrophosphatase activity of
human placental alkaline phosphatase. Biochim. Biophys. Acta. 151
281-283, 1968.

102. Sussman, H., Bowman, M.: Placental alkaline phosphatase in maternal serum during normal and abnormal pregnancy. *Nature (Lond)* 218: 359-360, 1968.
103. Sussman, H.H., Small, P.A., Cotlove, E.: Human alkaline phosphatase. Immunochemical identification of organ-specific isoenzymes. *J. Biol. Chem.* 243: 160-166, 1968.
104. Sussman, H.H., Gottlieb, A.J.: Human placental alkaline phosphatase. II. Molecular and subunit properties of the enzyme. *Biochim. Biophys. Acta.* 194: 170-179, 1969.
105. Teaford, M.E., White, A.A.: Alkaline phosphatase and osteogenesis in vitro. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 117: 541-546, 1964.
106. Van Belle, H.: Alkaline phosphatase II. Conditions affecting determination of total activity in serum. *Clin. Chem.* 22 (7): 977-981, 1976.
107. Wachstein, M., Bradshaw M.: Histochemical localization of enzyme activity in the kidneys of three mammalian species during their postnatal development. *J. Histochem. Cytochem.* 13: 44-56, 1965.
108. Wachstein, M., Meisel, E.: Histochemistry of hepatic phosphatases at a physiological pH with special reference to the demonstration of bile canaliculi. *Am. J. Clin. Pathol.* 27: 13-23, 1957.

109. Watanabe, K., Fishman, W.H.: Application of the stereo inhibitor L-phenylalanine to enzymorphology of intestinal alkaline - phosphatase. J. Histochem. Cytochem. 12: 252-260, 1964.

110. Whitby, L.G.: Analisis of inactivation curves of alkaline - phosphatase isoenzymes in serum. Clin. Chim. Acta. 59 (3): 361 - 367, 1975.