

FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS, U.N.A.M.

Universidad Motolinia.

"ESTUDIO COMPARATIVO DE LOS METODOS DE BODANSKY
Y BESSEY LOWRY Y BROCK PARA CUANTEAR ACTIVIDAD
DE FOSFATASA ALCALINA".

Tesis que para obtener el título de

Químico Farmacéutico Biólogo

presenta

Francisca Gordillo Cervantes

México, D. F., 1961.



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.

A mis padres con amor y gratitud.

A mis hermanos Alicia, Fernando, Ma.
Auxiliadora y José.

A mi sobrina Claudia.

Al Dr. Jesús Torres Gallardo, quien con su oportuna dirección y valiosos consejos, hizo posible la realización de este trabajo.

Al Dr. Guillermo Soberón y al Departamento de Bioquímica del Instituto Nacional de la Nutrición, por la colaboración y ayuda que me brindaron.

- - - -

CAPITULO I:

INTRODUCTION.

INTRODUCCION.

La fosfatasa alcalina ha sido extremadamente útil en el diagnóstico diferencial de padecimientos de la encrucijada - hepatobiliar y del sistema óseo (1,2,3).

Los avances bioquímicos recientes han demostrado que es ta enzima está presente en todas las células del organismo, y por lo tanto, es lógico pensar que la enzima en el suero - tenga distintos orígenes (4,5). El por ciento de contribu- ción de cada órgano debe suponerse variable y provendrá prin- cipalmente de aquellos órganos en los que la actividad de la enzima mencionada es mayor. Estos órganos son: intestino, - riñón, hueso, hígado y leucocitos (6,7). Sería pues, conve- niente y útil separar la fosfatasa alcalina de acuerdo con - el órgano de origen ya que en estos casos, a más de la ense- ñanza bioquímica la utilidad clínica sería mayor. Se han -- descrito múltiples intentos para efectuar esta separación; - se ha intentado hacerlo por electroforesis (8,9), por cromatografía (10,11,12), con el uso de activadores e inhibidores (13,14), por las alteraciones obtenidas en distintos padeci- mientos, por procedimientos quirúrgicos (15,16) y por técni- cas inmunológicas (17,18). A pesar de todo, los resulta- dos han sido equívocos.

El objeto de este trabajo es el de buscar una técnica adecuada para la medición de la actividad de esta enzima, la que pueda ser utilizada en el análisis cinético y fraccionamiento de la enzima.

En el siguiente cuadro se resumen las diferentes técnicas actualmente en uso para la determinación de fosfatasa al calina en suero.

METODO	SUBSTRATO	UNIDAD	RANGO NORMAL
BODANSKY (19)	Glicerofosfato	1 mgp/100/60	de 1 a 4 U.B.
KING ARMSTRONG (20)	Fosfato de fenilo	1 mg Fenol/100/30'	de 3 a 13 U.B.
BESSEY LOWRY Y BROCK (21)	p-nitrofenilfosfato	1 mm/p-nitro Fenol/100/60'	1.8 veces menos U.B.
SHINOWARA JONES Y REINHART (22)	(β)-glicerofosfato	1 mgp/hr/100	2.8 a 8.6 U.B.

De estas técnicas se compararán la de Bodansky con la de Bessey Lowry y Brock. Estas técnicas se escogieron por ser la primera, la más conocida y usada, y la segunda por ser aparentemente la de mayor sensibilidad y más fácil manejo.

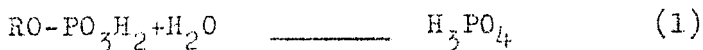
CAPITULO II:

GENERALIDADES.

GENERALIDADES.

La fosfatasa alcalina es una enzima de poca especificidad, que cataliza la hidrólisis de los monoésteres del ácido fosfórico (23) de una gran variedad de sustratos (fenólicos, alcohólicos, azúcares) (4).

Esta actividad puede referirse a dos tipos de reacciones, la primera del tipo de la hidrólisis propiamente dicha con liberación de ácido fosfórico, en la segunda la enzima se comporta como una transferasa, (24) para transportar el fosforilo de un sustrato a otro; en esta transferencia parece no haber ningún requerimiento o liberación de energía. Estas dos reacciones pueden resumirse de la siguiente manera:



En realidad la reacción (1) es un caso especial de la reacción (2).

"In vitro", la medición de la actividad de la enzima se realiza por procedimientos basados en la reacción (1); sin embargo, es probable que ambas reacciones se verifiquen simultáneamente con diferente velocidad en todas las células del or-

ganismo y que el predominio de una de ellas dependa únicamente de las diferentes constantes de Michaelis, con relación a los distintos aceptores y donadores del fosforilo. Otro factor importante es el pH intracelular. En efecto, cuando se trabaja con cinética de orden cero, como es usual en el laboratorio, el pH óptimo es de 9-10 con pequeñas variaciones según el sustrato utilizado. No obstante es probable que en la célula íntegra las reacciones sean de primer orden, ya que el sustrato, en muy pocas ocasiones podría pensarse fuera suficiente para saturar la proteína. Se ha demostrado que en estas últimas condiciones el pH óptimo es muy diferente, y cercano e igual al fisiológico (25). Cuando el sustrato se aproxima a la saturación, es decir, cuando tenemos una reacción cinética 95% de "cero" y 5% de primer orden, el pH óptimo está por debajo, pero cercano a 9; si las condiciones experimentales "in vitro" se modifican de modo que la reacción sea de 5% orden "cero" y 95% de primer orden, el pH es de 7.4. Debe imaginarse que esto es lo que sucede cuando se habla de los procesos biológicos "in vivo", lo que explicaría el porqué de la utilidad de la determinación de las enzimas, que como la(s) fosfatasa(s) alcalina(s) y ácida(a) tienen un pH muy distinto

del fisiológico.

Los métodos histoquímicos (26,27) como el de Gómori y col. demuestran mayor actividad de fosfatasa alcalina en el hígado, a pH cercanos al rango fisiológico humano. Como consecuencia, es probable que la actividad catalítica de la fosfatasa alcalina se pueda explicar a través de la formación de un complejo enzima-fosfato con capacidad de donar el grupo fosforilo a diferentes substratos de acuerdo con las condiciones.

No se ha dilucidado todavía, el papel que en la estructura del centro activo, tenga el magnesio u otros metales divalentes, ni el mecanismo por el cual el cianuro y otras substancias catalogadas como inhibidoras actuarían sobre la formación del complejo enzima-substrato.

Probablemente el papel de la fosfatasa alcalina puede explicarse mejor en función de la reacción 2, ya mencionada; en efecto, podría suponerse que esta enzima actúa en todas las células de acuerdo con el siguiente esquema.

familiar renal", la glucosuria podría explicarse si se piensa en el papel que la fosfatasa alcalina tenga en el proceso de reabsorción de glucosa a nivel del túbulo renal (31).

La fosfatasa alcalina por otra parte, tiene una función importante en el proceso de osificación del esqueleto (32). - Entonces, también la reacción 2 estaría más de acuerdo con el conjunto de fenómenos que la reacción 1. En este proceso se supone que la enzima secretada por el osteoblasto hidroliza los ésteres del ácido fosfórico de diferentes azúcares produciendo así fosfato tricálcico que por su insolubilidad precipitaría sobre la materia orgánica del esqueleto.

Es un hecho bien conocido que la única vía de excreción de la fosfatasa alcalina es a través de vías biliares; esto se ha demostrado inyectando diferentes cantidades de la proteína y recuperándolas en bilis en una proporción de 95% (33).

No se sabe si además la fosfatasa alcalina formada en un órgano es capaz de ir a otros territorios corporales para desempeñar su función o para ser degradada; en todo caso, de existir estos dos últimos procesos serían de poca importancia.

Como ya se mencionó antes varios órganos son especialmente ricos en actividad de fosfatasa alcalina; no obstante, su

contribución a los niveles séricos no es proporcional a las - actividades relativas a nivel de los distintos órganos. Para tratar de dilucidar el problema del origen de la enzima en el suero se han usado métodos distintos, como se comprende, los resultados han sido contradictorios y mientras unos investigadores han pensado en la existencia de varias fosfatasas, otros han desechado esta posibilidad.

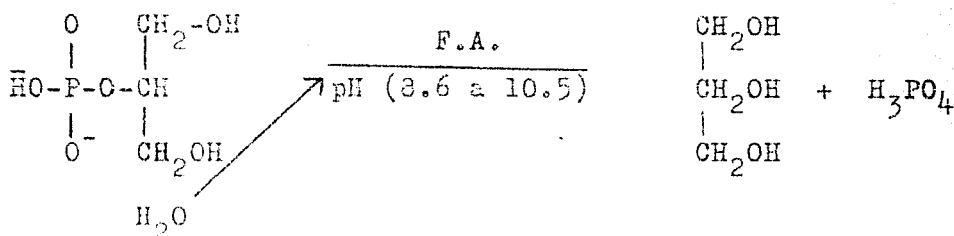
CAPITULO III:

METODO BODANSKY Y RESULTADOS.

METODO BODANSKY (19).

Fundamento del método:

El método se basa en la medición de fósforo inorgánico liberado; el producto se cuantifica por medio del método de Fiske y Subarow (33) según la reacción siguiente:



El ácido fosfórico reacciona con el molibdato de amonio, para formar un complejo incoloro que con el 1-2-4 aminonaftol sulfónico dá un complejo colorido que se lee a 720 m micras.

Reactivos empleados:

- a).- Substrato amortiguador de β -glicerofosfato.
- b).- Molibdato de amonio.
- c).- Acido 1-2-4 aminonaftolsulfónico.
- d).- Solución enzimática; dilución del suero de acuerdo con la actividad del mismo para obtener aproximadamente 1 unidad por ml.
- e).- Solución de ácido tricloroacético al 10%.

Procedimiento:

Al 2-glicerofosfato se añade la solución enzimática y se incuba a 37°C por tiempo variable (durante 1 hr. en la mayoría de los experimentos). La reacción se para con ácido tricloroacético, se filtra y se toma una alícuota de 5 ml. A la alícuota se le agrega 1 ml. de molibdato de amonio y 0.4 ml. de ácido 1-2-4 aminonaftolsulfónico, y se lee en 720 m micras después de 6 minutos.

Unidad:

Se define como "Unidad Bodansky" de actividad (U.B.) la actividad enzimática que libera un miligramo de fósforo inorgánico en una hora a 37°C y a pH de 8.6 por 100 ml. de plasma.

Cinética:

El estudio cinético de este procedimiento se efectuó con los experimentos que se señalan en las gráficas que a continuación se presentan.

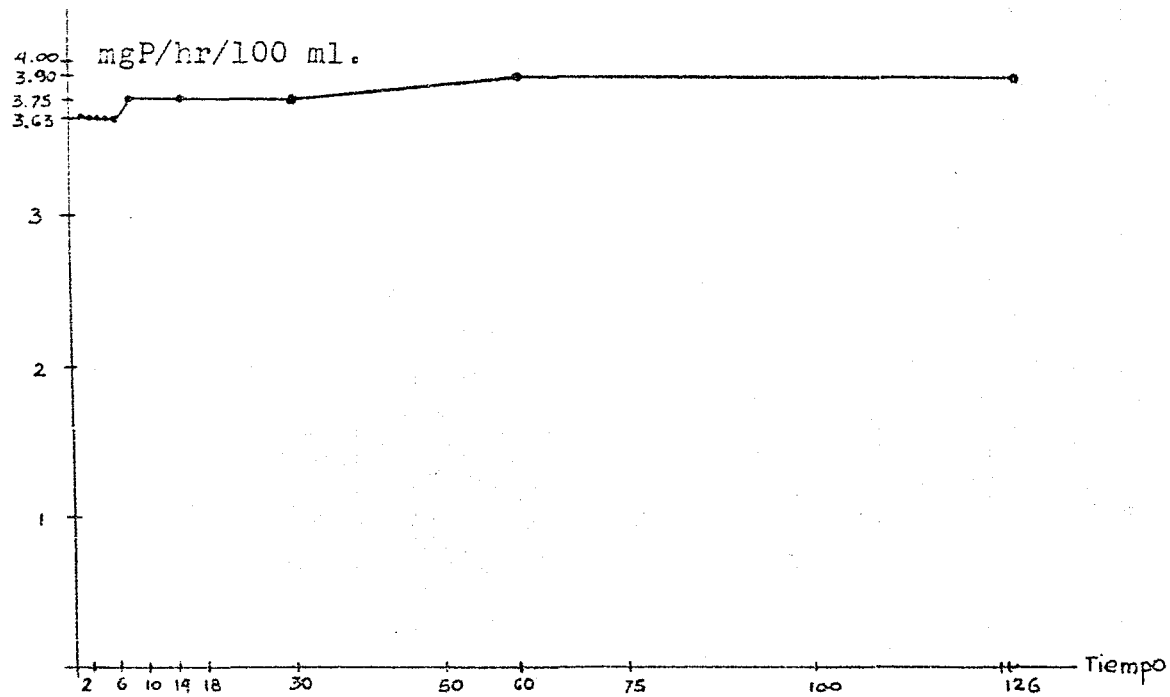


Fig. 1.- Color después de la adición del ácido 1-2-4 aminonaftolsulfónico.

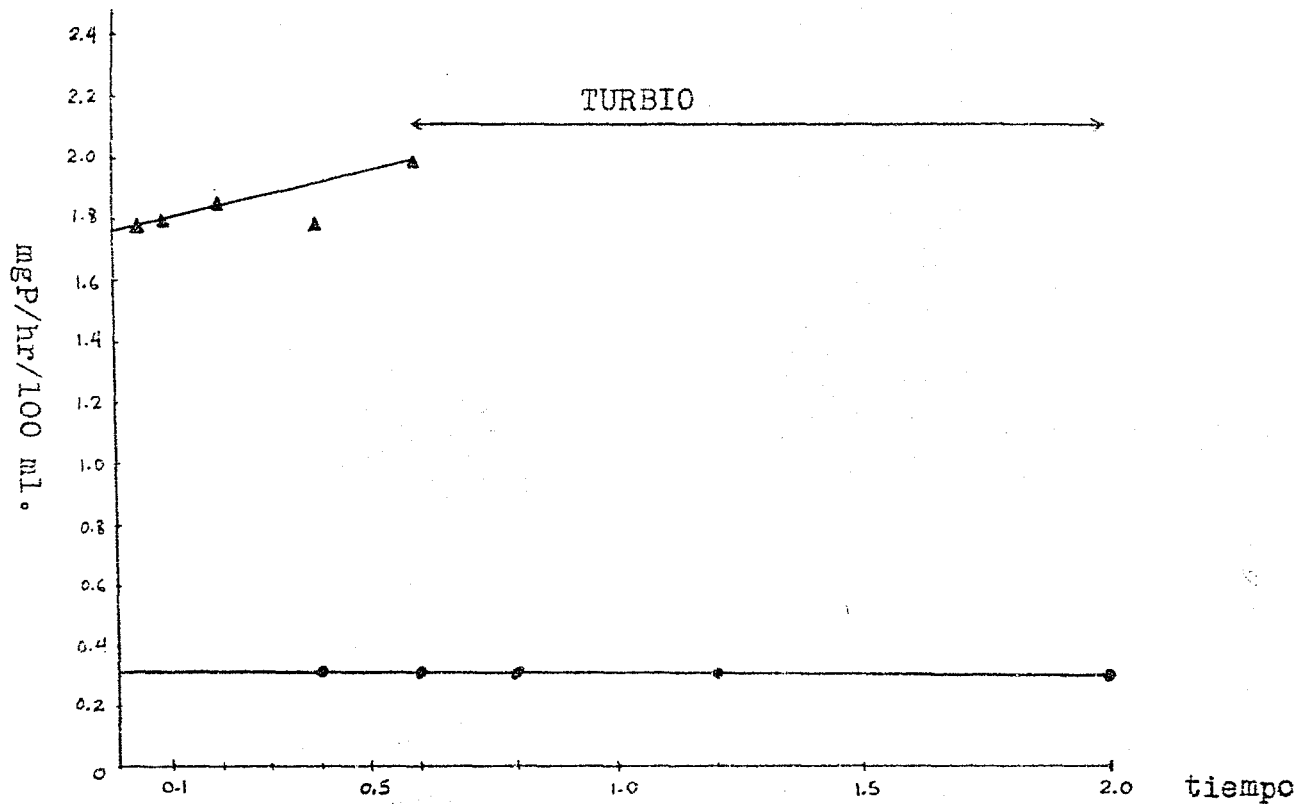


Fig. 2.- Influencia de las cantidades de Molibdato de Amonio y de 1-2-4 ácido aminonaftolsulfónico sobre el color final.

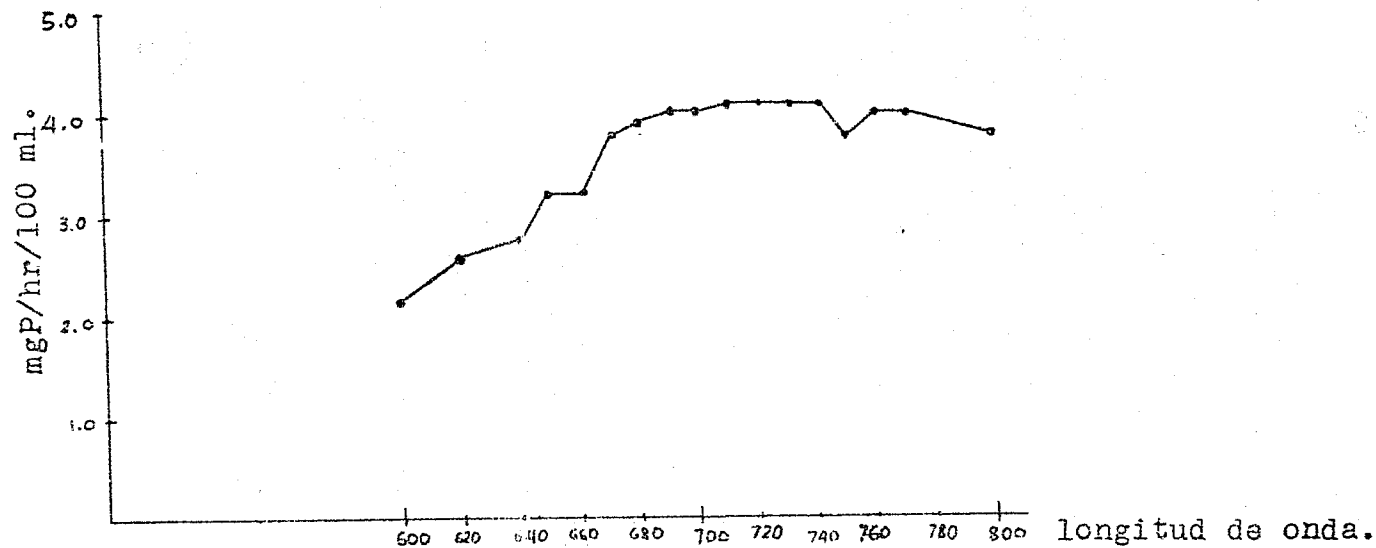


Fig. 3.- Espectro de absorción. La longitud de onda escogida para leer en el colorímetro fué a 720 m micras.

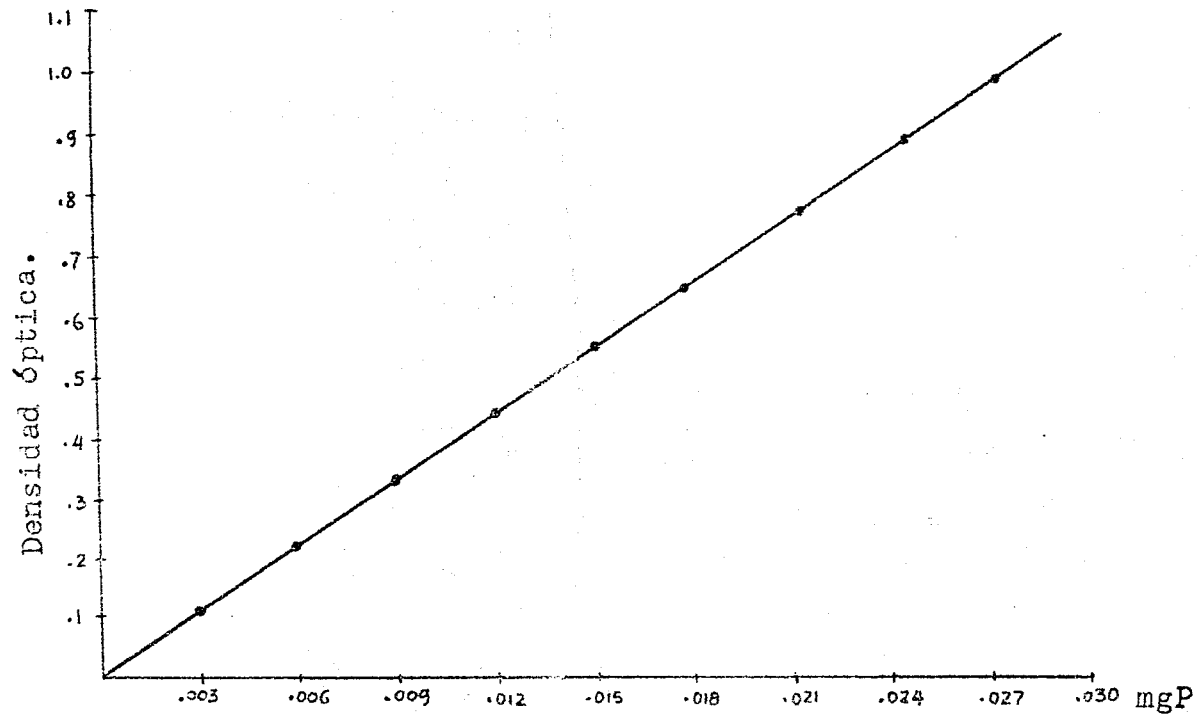


Fig. 4.- Curva de calibración. Como se vé en la figura la Curva de calibración sigue la Ley de Lambert y Beer.

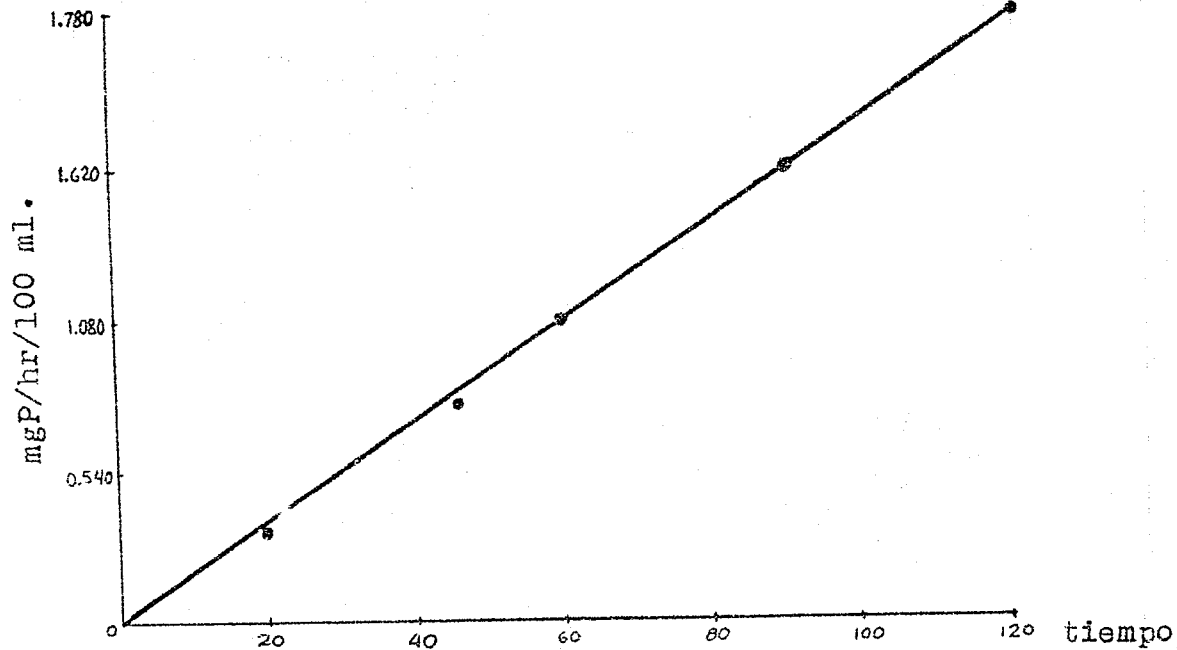


Fig. 5.- Curva de progreso. Demuestra que la velocidad inicial persiste durante 2 hrs. en las condiciones del experimento.

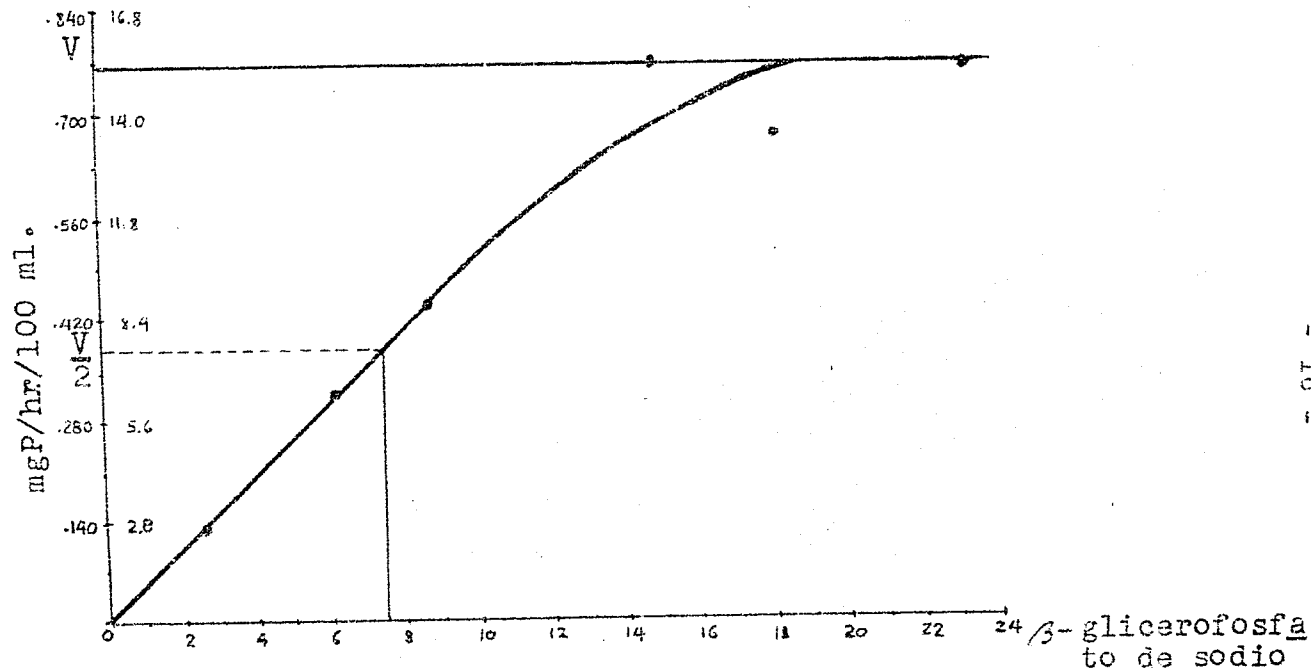


Fig. 6.- Curva de substrato. La constante de Michaleis es igual a 7.3×10^{-3} molar

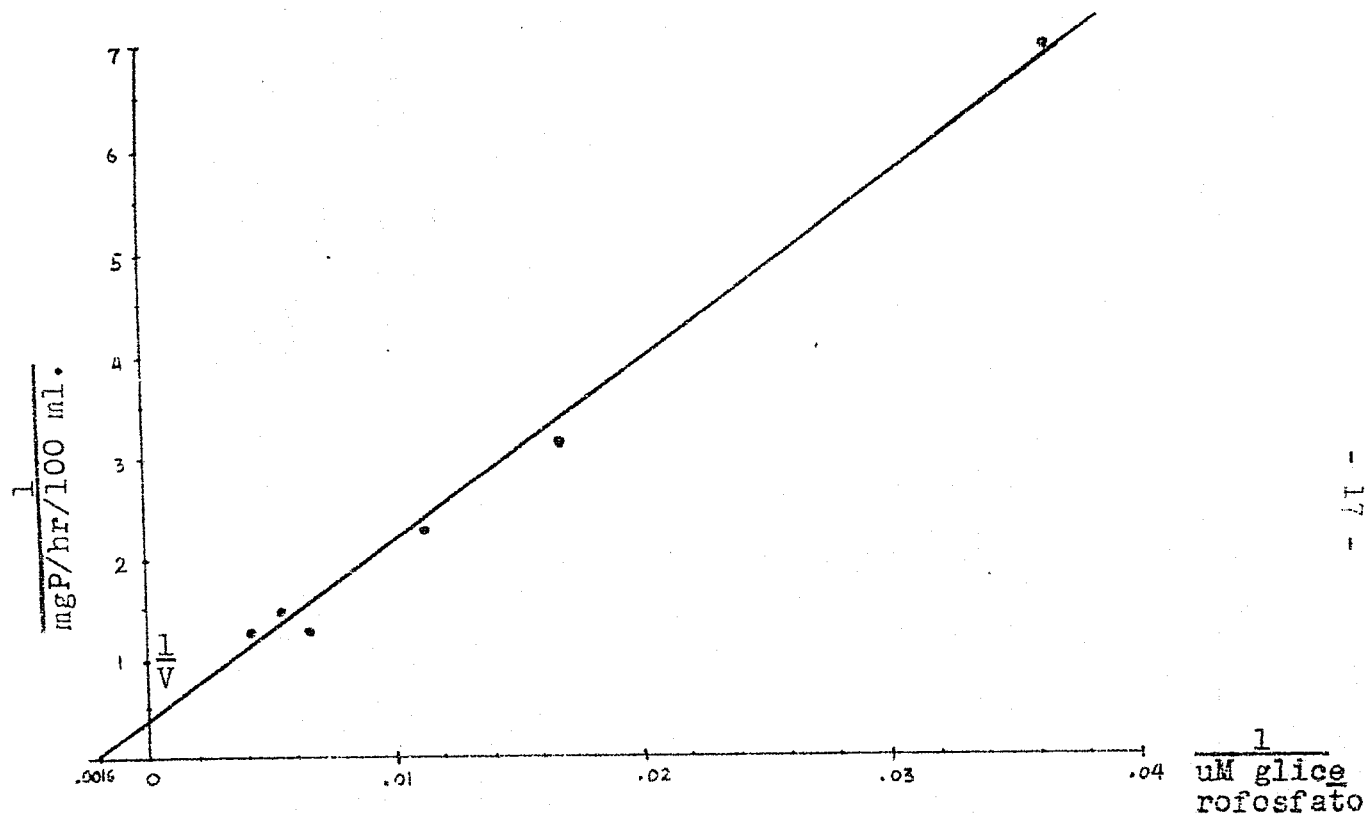


Fig. 7.- Curva de Recíprocas. La K_m y la $\frac{V}{2}$ se calculan a partir de la ecuación

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V} \frac{1}{S} + \frac{1}{V}$$

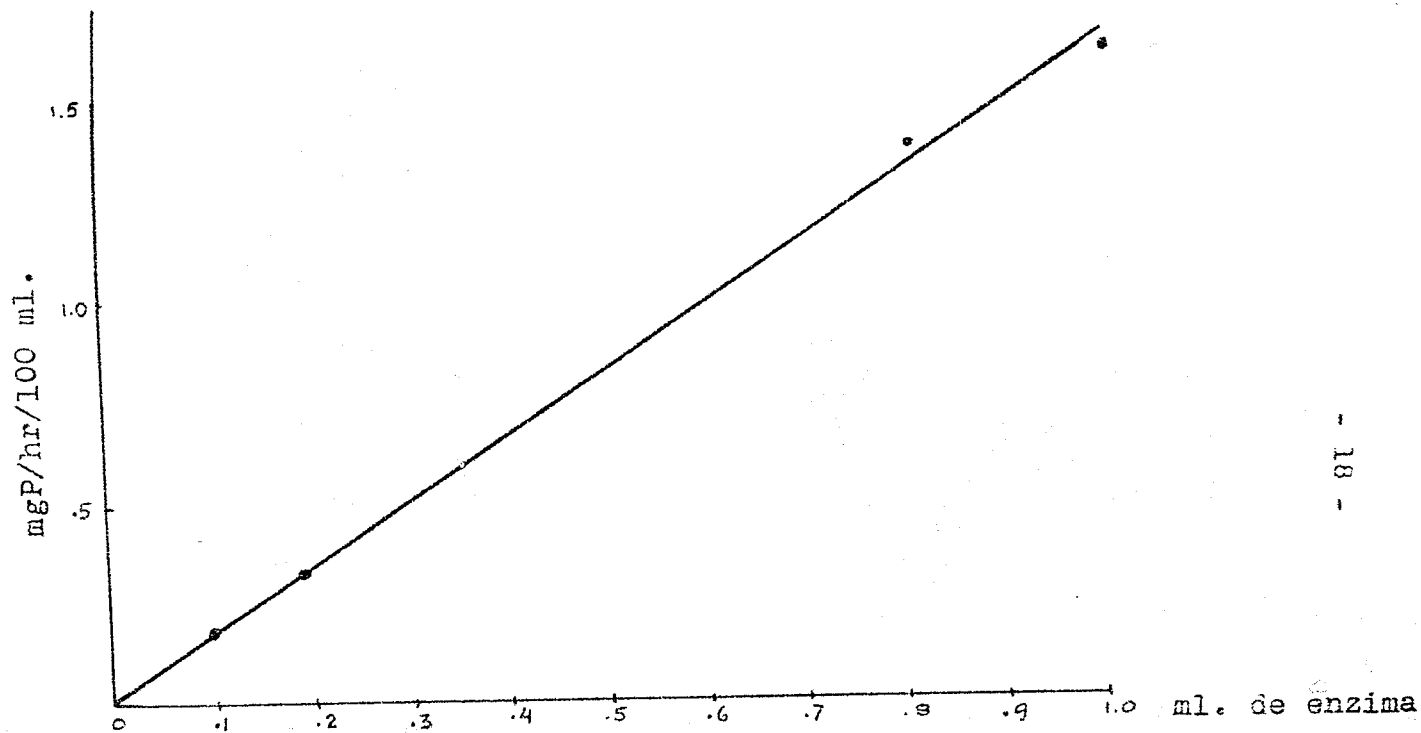


Fig. 8.- Curva de Enzima. Por lo tanto, este método es satisfactorio por lo menos con activarle hasta unas 150 U.B. - puesto que la actividad es recta hasta 1.5 mgP/hr/100 ml.

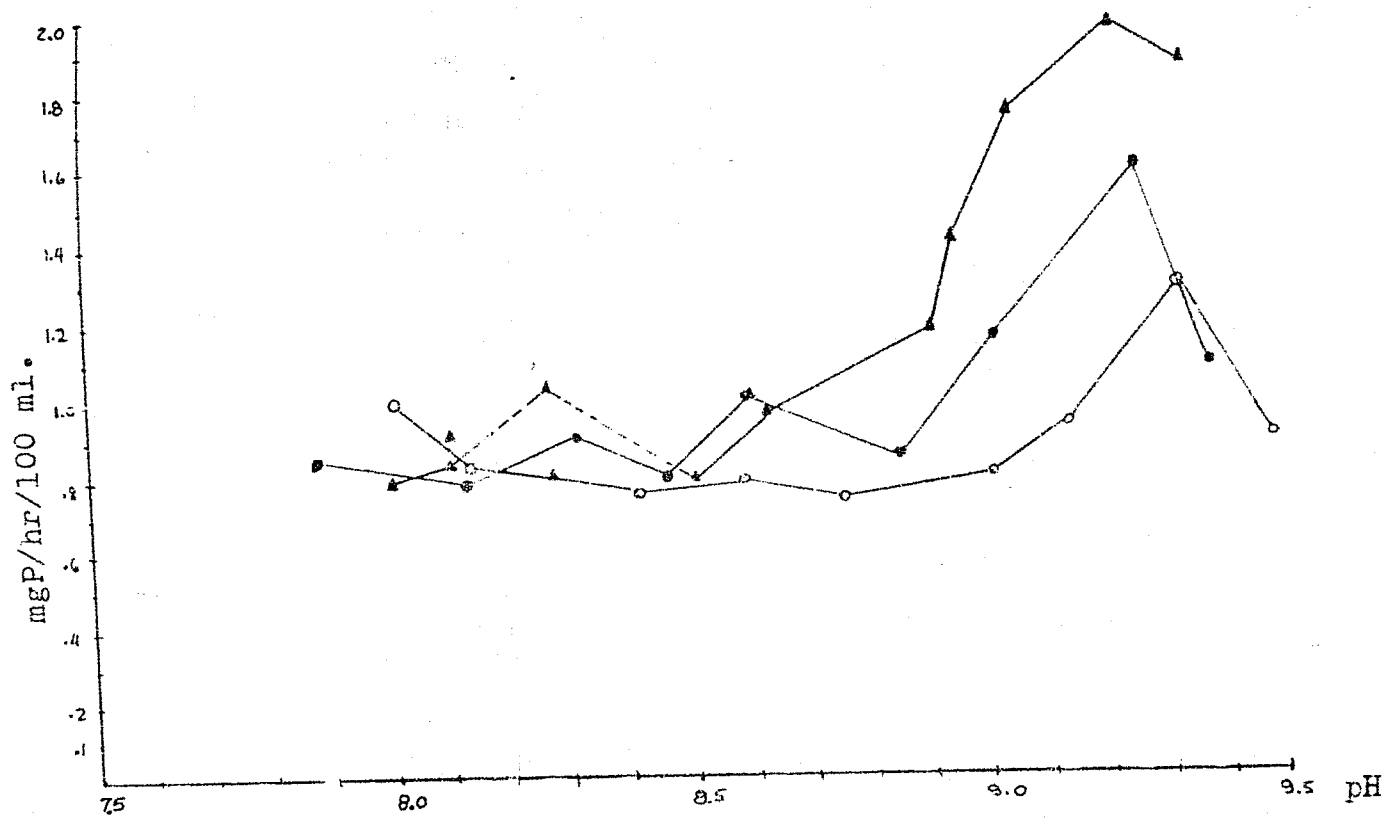


Fig. 9.- Actividad enzimática con diferentes pH desde 7.8 a 9.5; se compara la actividad basal con la del sistema, adiciónada de Mg⁺⁺ o CN⁻

●——● NORMAL ○——○ CN⁻ ▲——▲ Mg⁺⁺

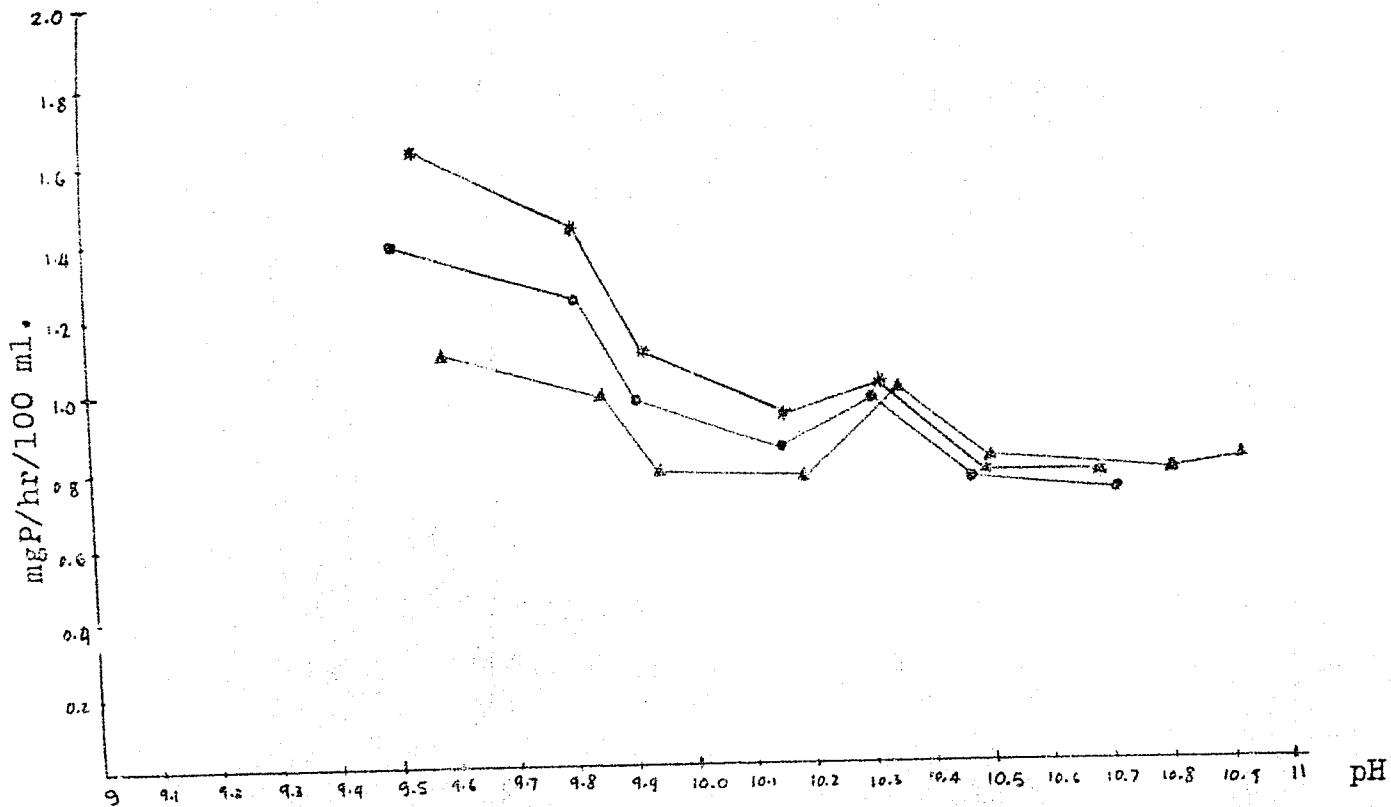


Fig. 9.- Curvas de pH. pH desde 9.5 a 10.7. Se compara la actividad basal con la del sistema adicionado de Mg⁺⁺ o CN⁻.

●-----● NORMAL *-----* Mg⁺⁺ ▲-----▲ CN⁻

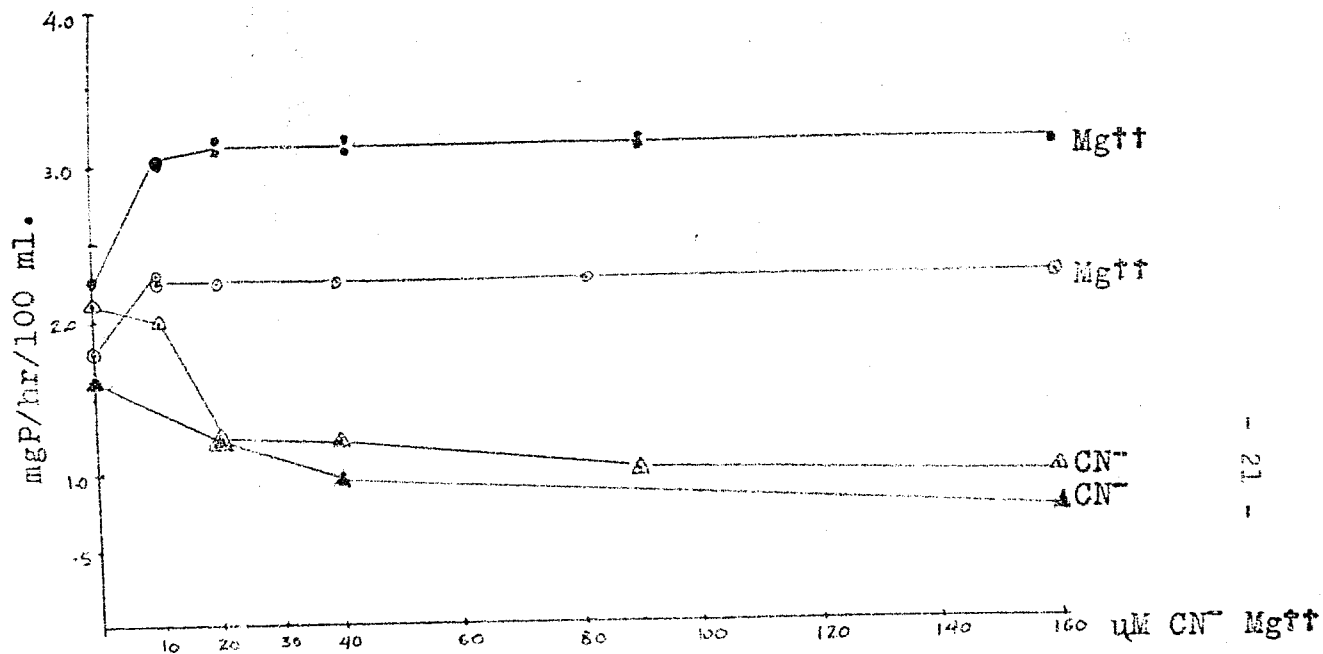


Fig. 10.- Influencia del Mg⁺⁺ y CN⁻ en la actividad enzimática a distintas concentraciones y a pH de 9.3 y 10.3

● ——— ● 10.3 Mg⁺⁺ ○ ——— ○ 9.3 Mg⁺⁺
 △ ——— △ 10.3 CN⁻ ▲ ——— ▲ 9.3 CN⁻

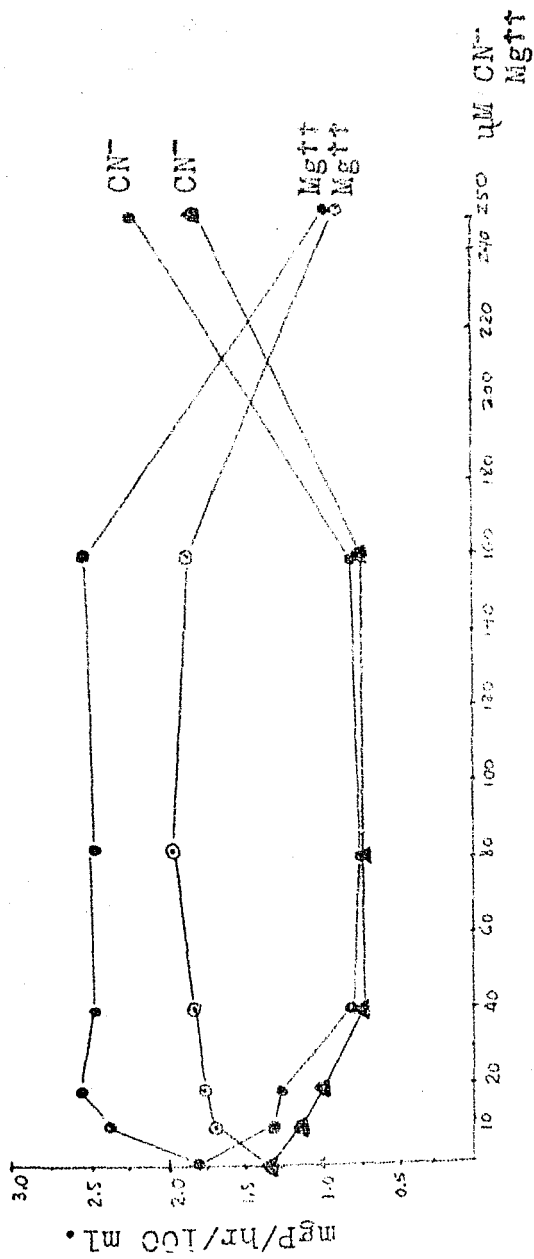


Fig. 11.- Influencia del Mg⁺⁺ y CN⁻ sobre la actividad enzimática a distintas concentraciones y a pH de 9.3 y 10.3.



RESULTADOS DEL METODO DE MODANSKY:

- 1.- La curva de desarrollo del color (Fig. 1) después de la adición del ácido 1-2-4 aminonaftolsulfónico demuestra que la intensidad aumenta proporcionalmente al tiempo, como consecuencia las lecturas deben hacerse a un tiempo fijo.
- 2.- Se demostró que las cantidades recomendadas para molibdato de amonio, y ácido 1-2-4 (ANS) para el desarrollo del color, son las más convenientes (Fig. 2).
- 3.- El espectro de absorción (Fig. 3) nos enseña que la mayor sensibilidad se obtiene cuando las lecturas se practican a 720 m μ . A esta longitud de onda la absorción por los otros componentes del sistema es despreciable.
- 4.- La curva de calibración (Fig. 4) sigue la Ley de Lambert y Beer hasta una densidad óptica de 1.13 y una concentración de fósforo de 50 μ g. en el sistema. El coeficiente de extinción molar de acuerdo con esta curva es de 4.18 por 10^3 cms.² por mola.
- 5.- La curva de progreso en las condiciones del experimento nos demuestra que la velocidad inicial persiste durante 2 hrs., lo que significa que durante este período el subs-

trato es suficiente para saturar la enzima, que el amortiguador es capaz de mantener el pH en la zona adecuada, y que no aparecen sustancias activadoras o inhibidoras por que la enzima es estable.

La curva de sustrato (Fig. 6) nos indica que la velocidad máxima se obtiene cuando la concentración del sustrato es superior a 150 μ -molas, la constante de Michaleis (K_m) es igual a 7.5×10^{-5} Molar.

En la gráfica de recíprocos (Fig. 7) la constante de Michaleis es igual 6.2×10^{-5} Molar.

La curva de enzima (Fig. 8) es recta hasta una actividad de 1.5 U.B. por consiguiente este método es satisfactorio por lo menos con activarlo hasta de 150 U.B.

Las gráficas (Fig. 9,10) de pH nos demuestran la existencia de varios picos de los cuales los más constantes corresponden a los pH 8.95 y 7.2

El magnesio tuvo efecto diferente de acuerdo con el pH y la concentración usada. A concentraciones bajas el proceso de activación es bastante aparente, alcanza su máximo entre 10 y 20 μ M y permanece constante hasta 160 μ M. Por encima de estas concentraciones el catión se comportó como inhibidor.

El proceso de activación fué más notable cuando el pH era más alcalino.

El cianuro fué inhibidor precisamente en la zona en que el magnesio fué activador. A concentraciones más altas de 160 μM . el cianuro activó la reacción a pH de 8.6; el anión fué inhibidor aún a concentraciones elevadas.

Estos resultados están esquematizados en el cuadro siguiente:

pH	MAGNESIO		CIANURO	
	16×10^{-3} M	16×10^{-3} M	16×10^{-3} M	16×10^{-3} M
8.6	138%			72.5%
9.3	130%	60.5%	50%	132%
10.3	148.5%	45.7%	40%	134%

Cuadro Núm. 1.- Se considera la actividad basal igual a 100%

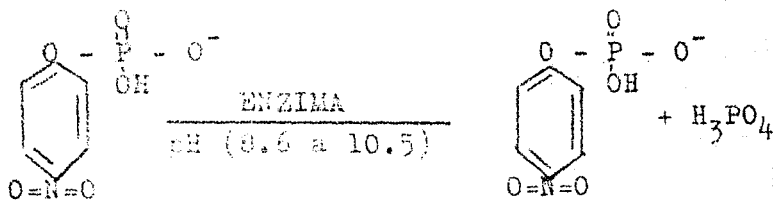
CAPITULO IV:

METODO DE BESSEY LOWRY Y BROCK
Y RESULTADOS.

METODO DE BESSEY LOWRY Y BROCK (21).

Fundamento del método:

El método se basa en la liberación del p-nitrofenol a partir del p-nitrofenilfosfato, de acuerdo con las siguientes reacciones:



El p-nitrofenol liberado se hace reaccionar con NaOH 0.25 N para desarrollar color que se mide a 415 m. micras.

Reactivos empleados:

- a).- Solución amortiguadora de glicina 0.2 Molar, pH de 8.6 a 10.5.
- b).- Solución p-nitrofenilfosfato 3.75 milimolar (1 mg./ml.)
- c).- Solución enzimática; dilución del suero de acuerdo con la actividad del mismo, para aproximadamente 1 unidad por ml.

Procedimiento:

A 1 ml. del p-nitrofenilfosfato se le añade 1 ml. de la solución amortiguadora escogida y cantidades variables de otros compuestos de acuerdo con el experimento que se reali-

za, se pre-incuba por cinco minutos, se añade 1 ml. de la solución enzimática, se incuba a 37°C por tiempo variable de acuerdo con el experimento que se verifique, se para la reacción con sosa 0.25N y se lee a 415 m. micras.

Se define como unidad de actividad de la fosfatasa alcalina, la actividad enzimática necesaria para liberar una Mola de p-nitrofenol, por libra de suero en una incubación a 37°C . Esta unidad es equivalente a 1.8 U.S.

Cinética:

El estudio cinético del procedimiento se efectúa con los experimentos que se señalan a continuación.

Las determinaciones se efectuaron por duplicado.

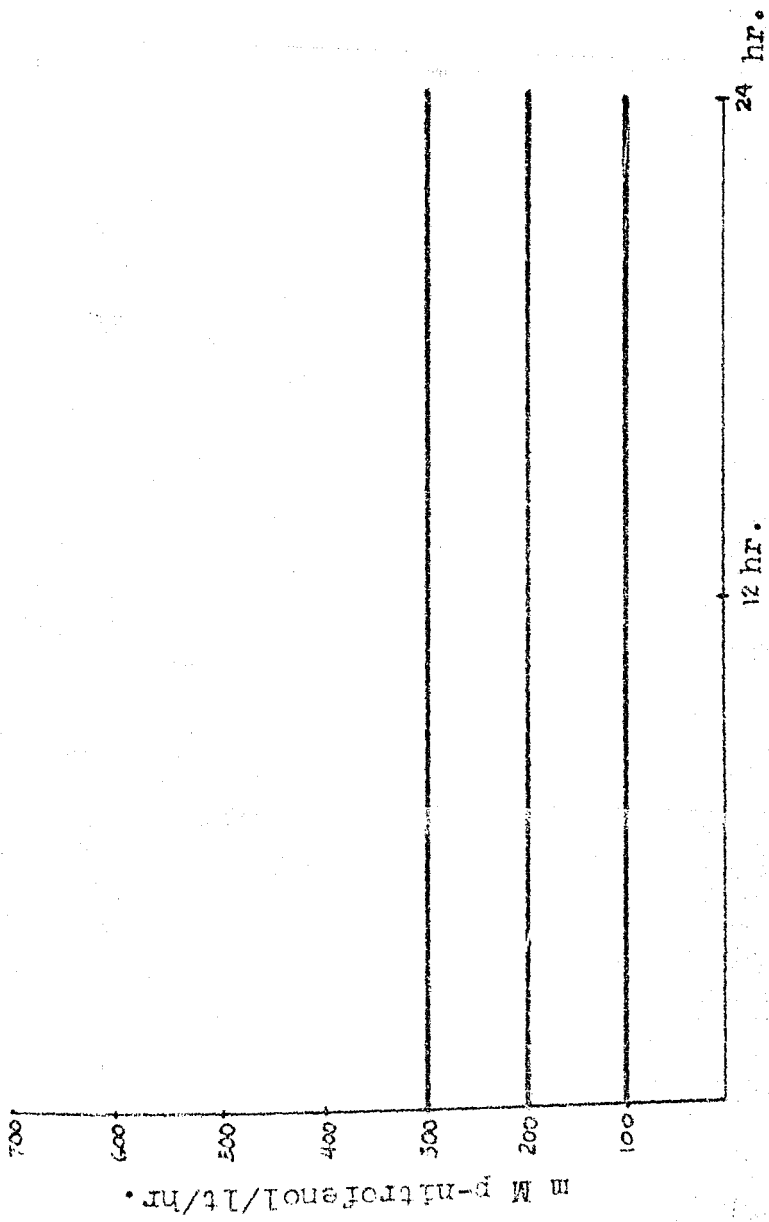


Fig. 1.- Estabilidad del color. Como se vé la estabilidad es de 24 hrs.

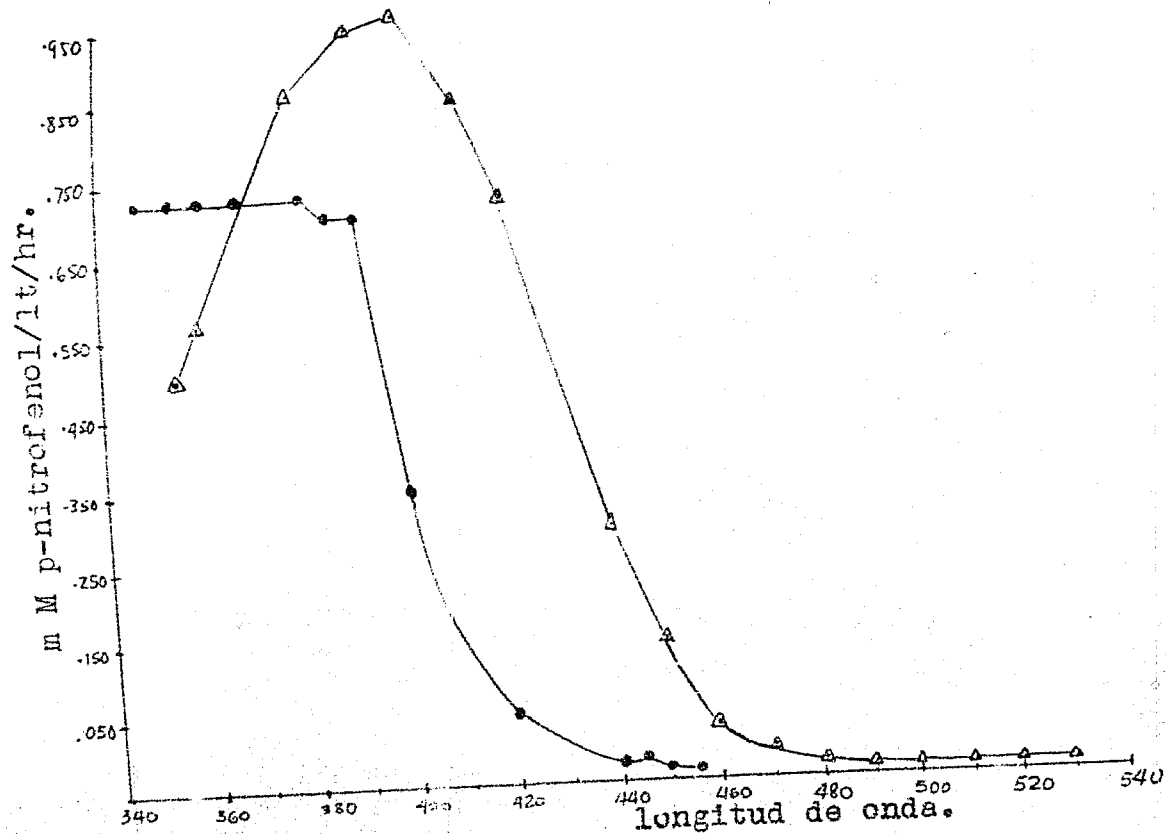


Fig. 2.- Espectro de absorción. La longitud de onda es cogida fué de 400 m. micras aunque se leé a 415 para evitar interferencia de bilirrubina y hemoglobina.

p-nitrofenol
p-nitrofenilfosfato

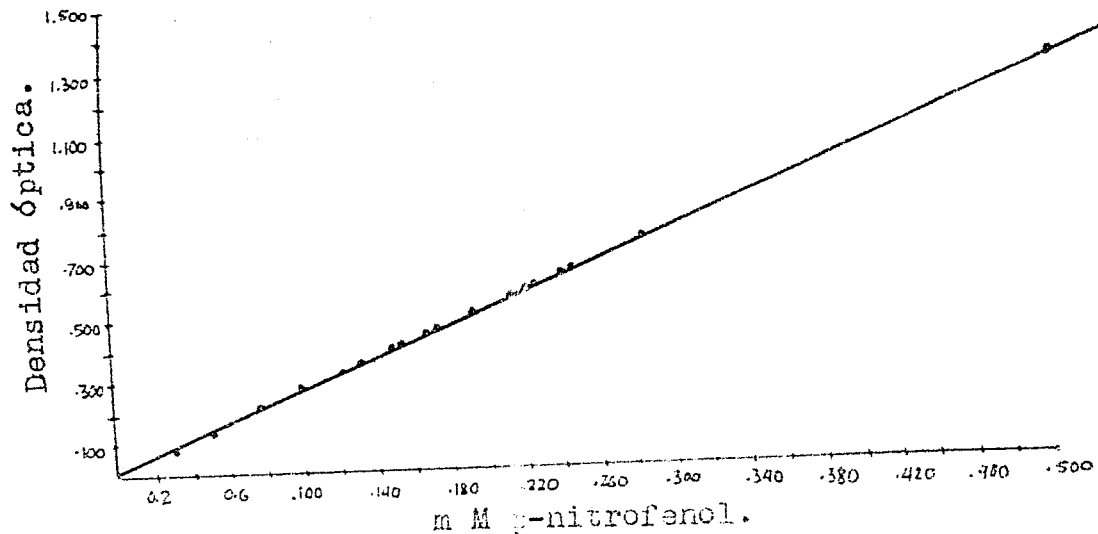


Fig. 3.- Curva de calibración.
 Para el experimento se prepararon: 10.- Tubos con diferentes concentraciones de p-nitrofenol.
 20.- pH finales variables entre 9 y 14 (NaOH desde 0.03 a 1 Molar). 30.- Tubos con diferentes concentraciones de MgSO (desde 0 a 250 micro M) y - tiempos distintos de centrifugación (2, 5, 10').
 40.- Tubos con diferentes concentraciones de p-ni trofenol y diferentes concentraciones de NaCN (0 a 250 micro M).

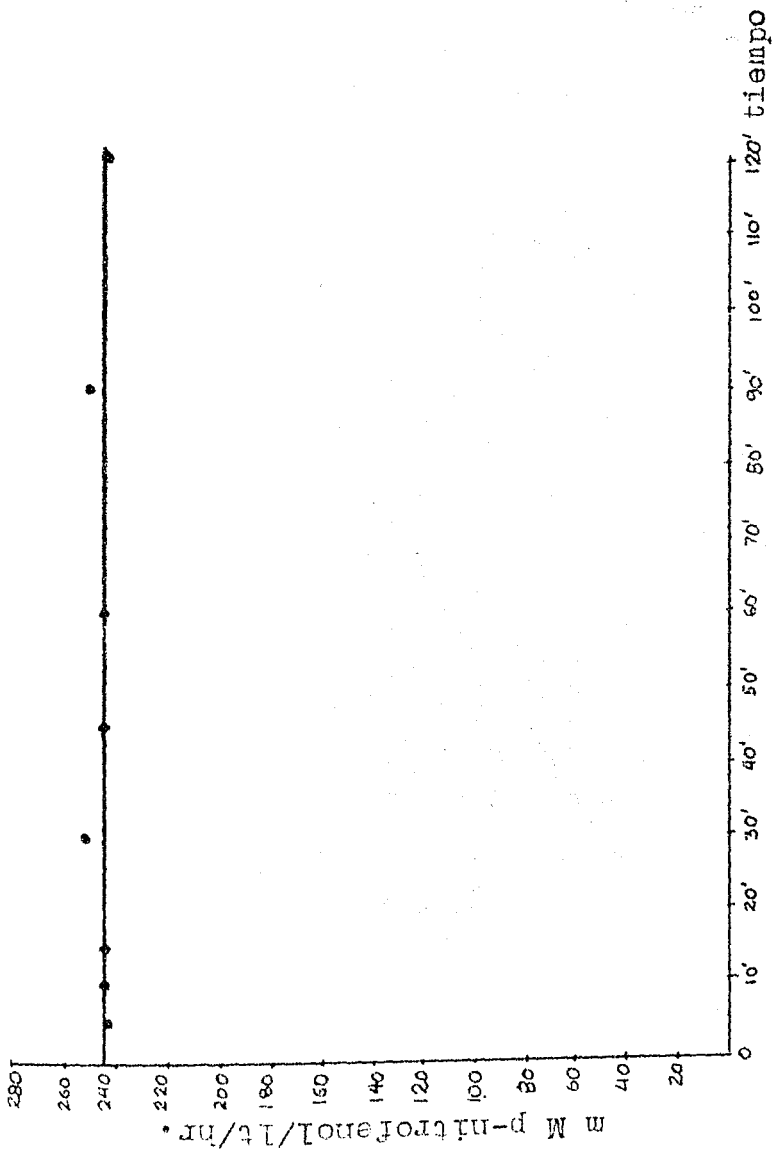


Fig. 4.- Curva de estabilidad de la enzima. La solución enzimática se obtuvo de donador normal, la dilución usada fué de 1 a 10. (pH del sistema = 9).

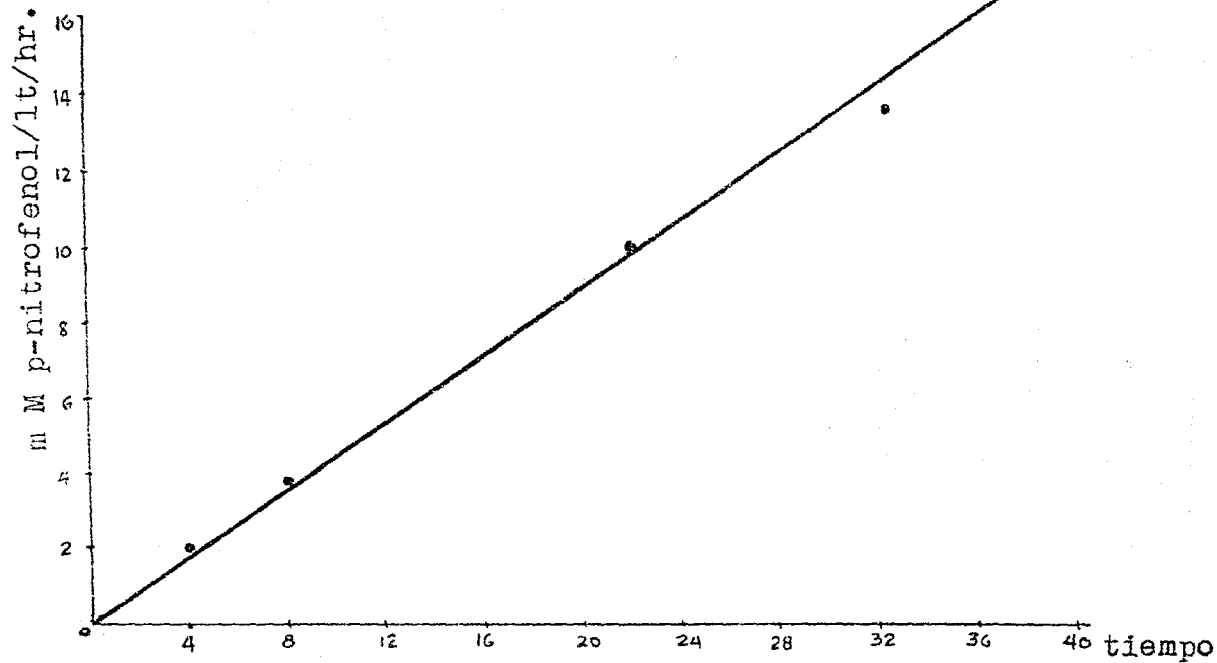


Fig. 5.- Curva de Progreso. La presente curva nos indica que las condiciones iniciales se mantienen por lo menos durante 40 minutos.

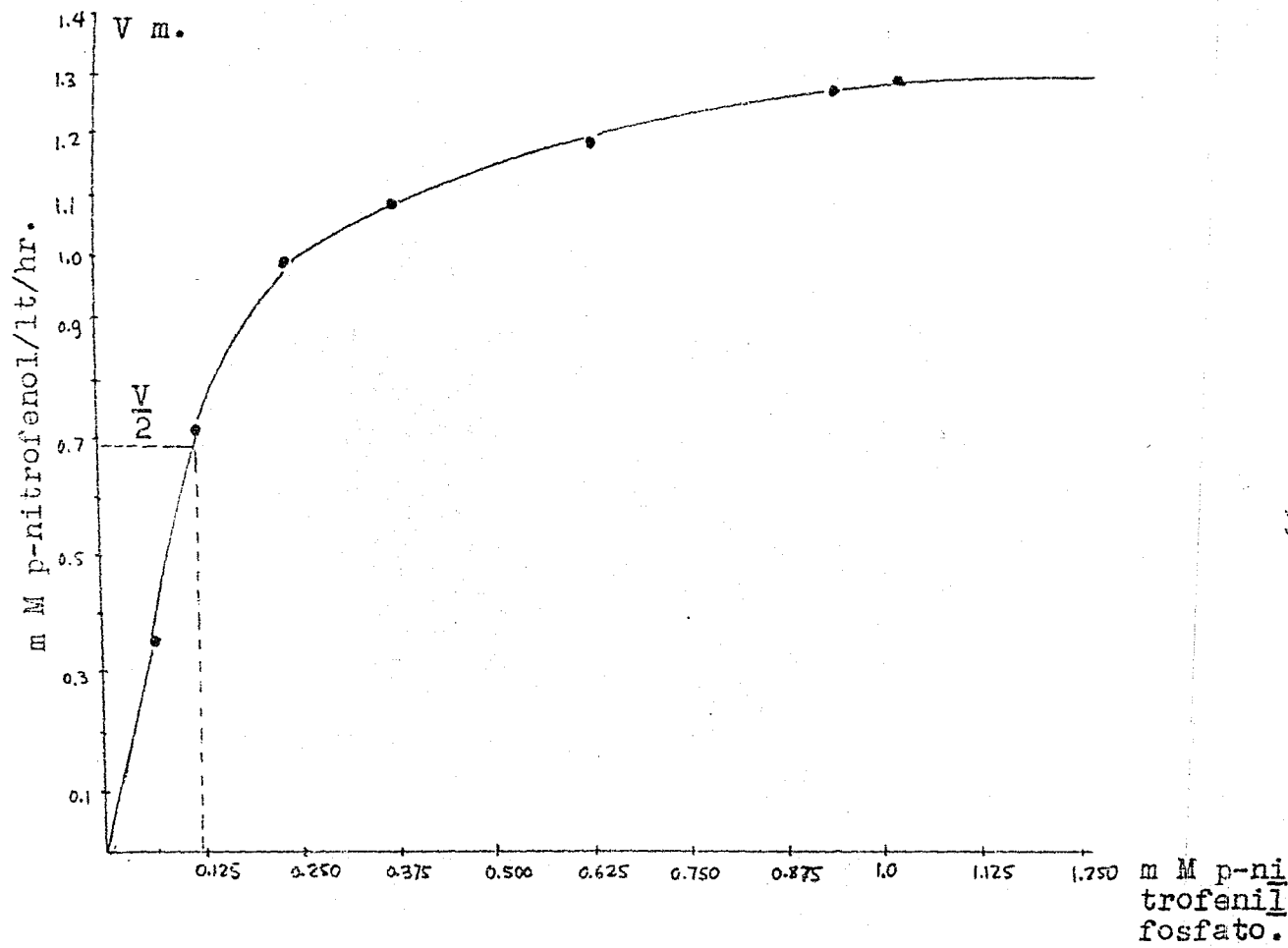


Fig. 6.- Curva de substrato. La constante de Michaleis es igual a 1.25×10^{-4} Molar.

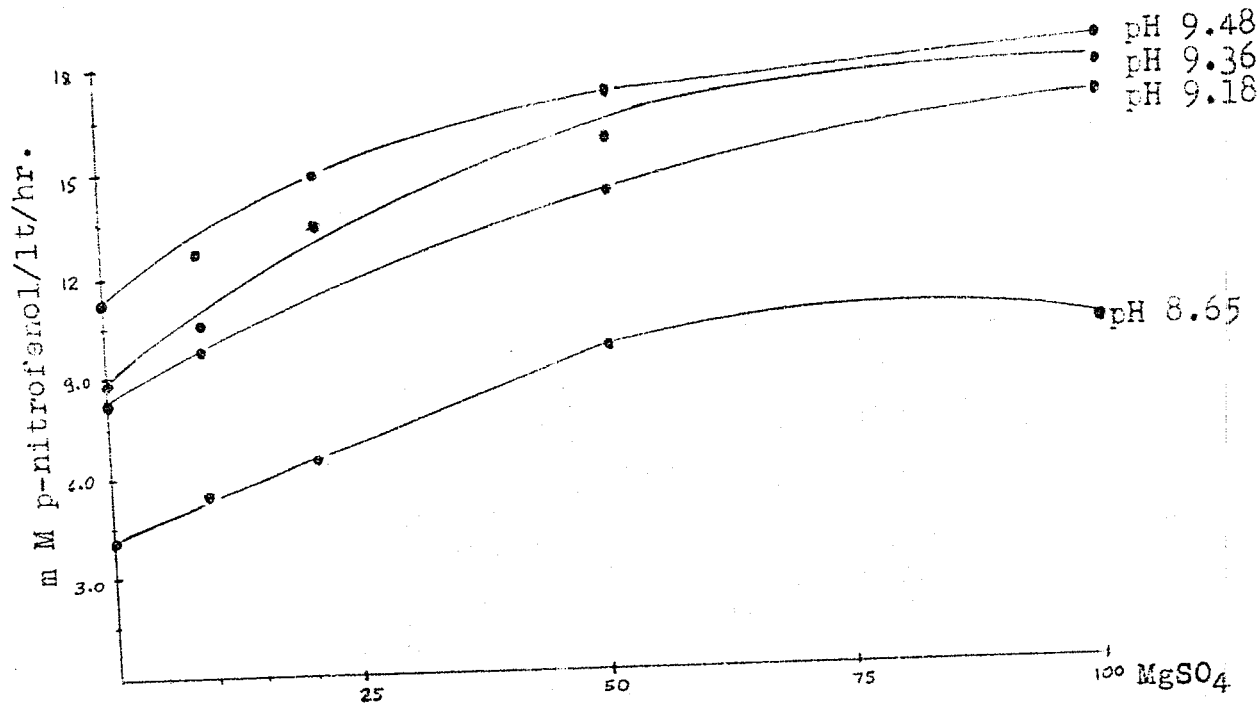


Fig. 7.- Curva de concentración de Mg⁺⁺ a distintos pH
 En la gráfica queda demostrado que el mg⁺⁺ tie
 ne un efecto activador sobre la enzima.

pH 9.48 ●————●
 pH 9.36 ●————●
 pH 9.18 ●————●
 pH 8.65 ●————●

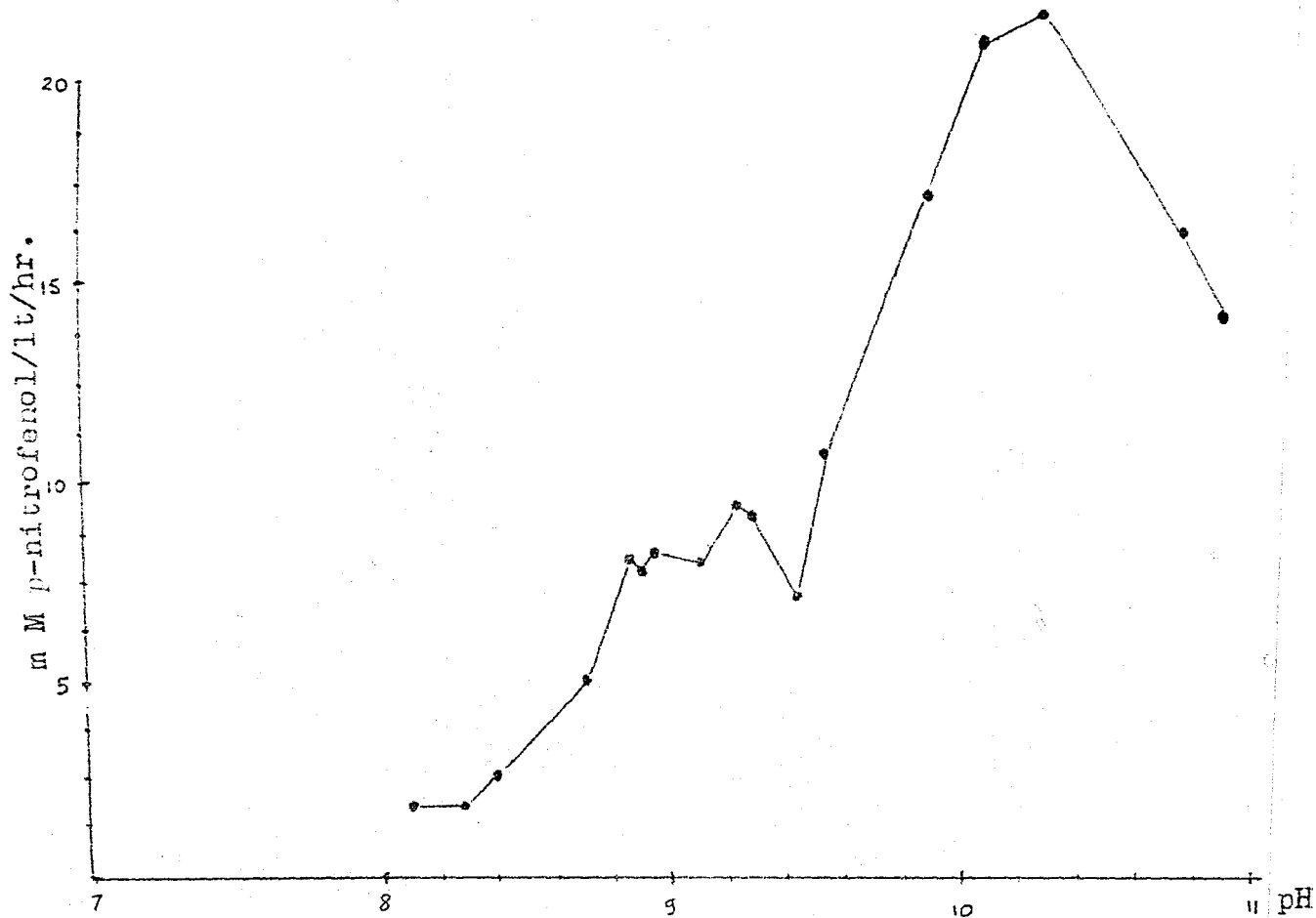


Fig. 8.- Curva de pH. Los distintos picos dan idea de la posibilidad de distintas proteínas.

Dilución 1:50

Buffers Glicina

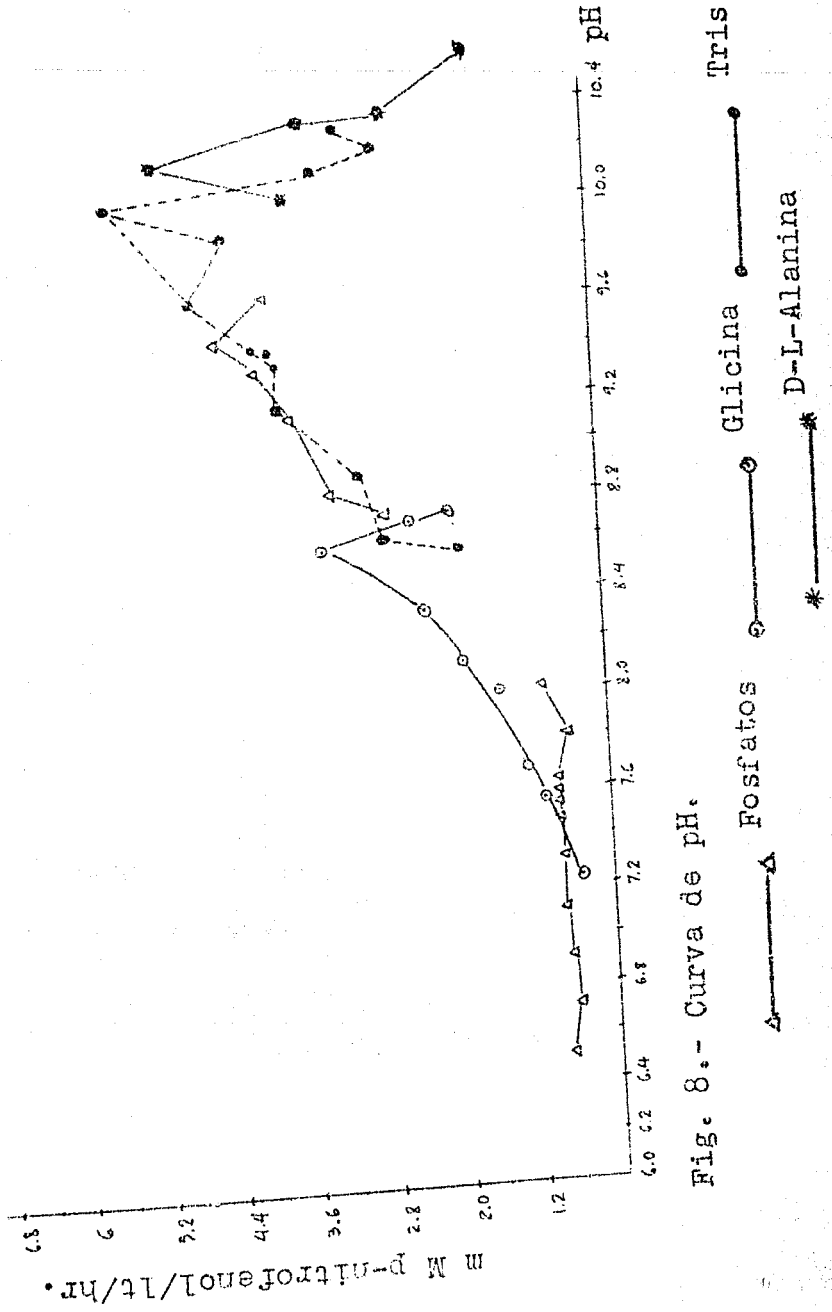


Fig. 8.- Curva de pH.

RESULTADOS DE LA TÉCNICA DE BESSEY LOWRY Y BROCK.

- 1.- La Estabilidad del color es de 24 h.
- 2.- El aspecto de absorción del p-nitrofenol tiene su máximo a 400 m. micras, sin embargo, la lectura se hace a una longitud de onda (λ) de 415 para evitar la interferencia por los componentes del suero especialmente bilirrubina y hemoglobina ya que la banda de Sorst alcanza su máximo a 400 a 410 m. micras. La interferencia de la reacción enzimática, es decir, como el p-nitrofenilfosfato no es importante ya que a 415 m. micras la absorción por estos compuestos es despreciable. El p-nitrofenol tiene un color siete veces menor en medio ligeramente ácido, que en medio alcalino.
- 3.- En la curva de calibración se nota que el color del p-nitrofenol es proporcional a la concentración de estos dos compuestos hasta una densidad óptica de 1.410; este color es influido por cambios en el pH cuando éste se mantiene mejor en el rango alcalino. El color no es absorbido por cantidades crecientes de sulfato de magnesio hasta una concentración de 250 micro Molas en el sistema. Tampoco tuvo ninguna influencia la centrifugación por tiempo

variable entre 0 y 10.

- 4.- La recuperación del p-nitrofenol añadido al sistema enzimático variaron entre 98 y 100%.
- 5.- La curva de progreso nos indica que las condiciones iniciales se mantienen por lo menos durante 40.
- 6.- La estabilidad de la enzima es más elevada ya que la velocidad máxima se mantiene durante cuatro horas en este método.
- 7.- La curva de enzima nos demuestra que la actividad es proporcional a la concentración de la proteína dentro de límites muy amplios, suficientes para medir actividades tan elevadas como 300 unidades.
- 8.- La curva del sustrato nos demuestra que la constante de Michaleis (K_m) es de 1.25×10^{-4} Molar.
- 9.- Las curvas de pH nos enseñan la presencia de varios picos que son constantes, no obstante el empleo de los diferentes sistemas amortiguadores, lo que elimina el que algunos de ellos pudieran actuar como activadores o inhibidores.
- 10.- El magnesio tuvo una influencia activadora similar a la descrita con la técnica de Bodansky.

CAPITULO V:

DISCUSION.

DISCUSION:

La técnica de Bessey Lowry y Brock ofrece sobre la de Bodansky las siguientes ventajas:

- 1.- Mayor estabilidad del color por 24 hrs. contra aumento --
proporcional con el tiempo.
- 2.- Mayor sensibilidad, pues el coeficiente de extinción mo--
lar para el p-nitrofenol es casi 2 veces mayor que el del
complejo del fósforo inorgánico.
- 3.- La interferencia para constituyentes normales del suero --
es nula con el p-nitrofenol; puede ser importante por dis-
minución de la sensibilidad, en la técnica de Bodansky --
cuando se trata de padecimientos que cursan con hiperfor-
femia.
- 4.- La dispersión es mucho menor y no mayor de 1% en la técni-
ca de Bessey Lowry y Brock.
- 5.- Las recuperaciones son más satisfactorias 98 a 100% para
el p-nitrofenol.
- 6.- El color del p-nitrofenol no es influenciado cuando el pH
se modifica dentro del rango alcalino.
- 7.- El color del p-nitrofenol no es modificado cuando se agre-
gan cantidades diversas de cationes o aniones al sistema
enzimático.

Tampoco es influenciado por períodos distintos de centrifugación.

La cinética enzimática demuestra la existencia de varios picos en la curva de pH, así como la respuesta diferente que se obtiene cuando se usan magnesio y cianuro como activador e inhibidor respectivamente; si se trabaja a diferente pH probablemente signifique la presencia de proteínas con actividad catalítica similar, aunque con estructura diferente.

La constante de Michaleis demuestra que el p-nitrofenilfosfato es un sustrato más adecuado que el α -glicerofosfato.

Para probar la posibilidad de varias enzimas con actividad parecida, será conveniente realizar un análisis enzimático más minucioso en diferentes condiciones patológicas, obstrucción biliar, hepatitis, lesiones tumorales de hígado y tal vez seguir los cambios experimentados por la enzima en el curso de la evolución de estos distintos padecimientos; -- los resultados así obtenidos deben valorarse en función de -- los cambios que normalmente ocurren en condiciones fisiológicas en sujetos normales. La experimentación en animales de -- laboratorio con ligadura de uno o más canales biliares, extirpación de porcentajes variables de la glándula hepática, el --

uso de tóxicos y la producción de raquitismo serían también -
de gran ayuda para dilucidar si se trata de una o de varias -
proteínas.

Con los resultados así obtenidos podría intentarse sim--
plificar los procedimientos para que su aplicación a la clínica
fuera eficaz.

CAPITULO VI:

RESUMEN Y CONCLUSIONES.

RESUMEN Y CONCLUSIONES:

- 1.- Se hace el análisis cinético de dos técnicas reportadas - en la literatura.
- 2.- Se concluye que la técnica de Bessey Lowry y Brock modifi cada es más conveniente que la de Bodansky.
- 3.- Los resultados obtenidos con el uso de inhibidores, acti vadores y curva de pH plantean la posibilidad de la exis tencia de dos o más proteínas con actividad de fosfatasa alcalina.
- 4.- Se plantean los diferentes procedimientos que podrían se guirse para resolver la cuestión.
- 5.- Se discute la importancia clínica que los posibles hallaz gos con tales procedimientos pudieran tener.

CAPITULO VII:

BIBLIOGRAFIA .

BIBLIOGRAFIA:

- 1.- Wachlestein, M.A.F.: Activity in normal and abnormal human blood and bone marrow cells, J. Lab. Clin. Med. 31,1,1946.
- 2.- King, E.J.: Plasma alkaline phosphatase in disease, Brit. M. Bull. 9,160,1953.
- 3.- Wroblewski, F., The significance of alterations in serum enzymes in the differential diagnosis of jaundice, Arch. - Int. Med. 100,655,1957.
- 4.- Gutman, A.B., Olson, K.B., Gutman, N.B. and Flood, C.A. - Effect of disease of the liver and biliary tract & upon - the phosphatase activity of the serum, J. Clin. Invest. 19, 129,1940.
- 5.- Gutman, Alexander, B., Serum alkaline phosphatase activity in disease of & the skeletal and hepatobiliary systems, Amer. J. of Med. 21,875, 1956 (die)
- 6.- Bodansky, O., Are the phosphatase of bone kidney, intestine and serum identical, J. Biol. Chem. 118,341,1937.
- 7.- Chamhauser, S.J., Reichel, M., Gratlan J. Find, Maddoek, S.J., Studies on serum phosphatases activity VI the influence of sera with high phosphatase activity on normal sera. J. Biol. Chem. 213,19,1955.
- 8.- Rosenberg, L.W., Zone electrophoretic studies of serum alkaline phosphatase, J. Clin. Lab. Invest. 6,94,1954.
- 9.- Baker, R.W.R. and Pellegrino, C., The separation and detection of serum enzymes by paper electrophoresis, Scandinav. J. Clin. Lab. Invest.. 6,94,1954.
- 10.- Fahey, J.L., Mac Coy Pl. F. and Goulian, M., Chromatography of serum proteins in normal and pathologic sera: the distribution of protein bound carbohydrate and cholesterol siderophilin, thyroxin binding-protein, B₁₂ binding-protein alkaline and acid phosphatases radio-iodinated albumin and myle

- oma proteins., M. Clin. Invest. 37,272,1958.
- 11.- Gutman, A.B. and Joves, B., Inhibition by cyanide of serum alkaline phosphatase in normal man, obstructive jaundice and skeletal disorders, Proc. Soc. Exper. Biol. Med. 71,572, 1949.
 - 12.- Bodansky, O., The accelerative effect of amino acids activity of bone phosphatase, J. Biol. Chem. 114,273,1936.
 - 13.- Drill, V.A. Annegers, J.H. and Foy, A.C., Effect of cyanide fluoride and magnesium on serum phosphatase activity - during hepatic damage, J. Biol. Chem. 152,339,1944.
 - 14.- Bodansky, O., The influence of magnesium and cobalt on the inhibition of phosphatases of bone intestine and otrogenic sarcoma by aminoacids, J. Biol. Chem. 179,81,1949.
 - 15.- K.F. M.D. Papill. Rev. 12,306 1932.
 - 16.- Armstrong, A. R. and Banting, F.C. Can. Med. Assoc. J. 33: 243,1935.
 - 17.- Schlanowitz, M. and Bodansky, O., Tissue sources of human serum alkaline phosphatase as determined by immunochemical procedures, J. Biol. Chem. 234:143,1959.
 - 18.- Schlanowitz, M., Immunochemical studies on alkaline phosphatase, Am. New York, Acad. Sc., 75:373,1958.
 - 19.- Bodansky, A., Phosphatase studies II determination of serum phosphatase; factors influencing the accuracy of the determination, J. Biol. Chem. 101:93,1933.
 - 20.- King, E.J. and Armstrong, A.R., A converment method for determining serum and bile phosphatase activity, Canad. M.A.J. 31:376,1934.
 - 21.- Bessey, O.A., Lowry, O.H. and Brock, M.J., A method for the rapid determination of alkaline phosphatase with five curie millimeters of serum, J. Biol. Chem. 164:321,1946.

- 22.- Shinewere, G.Y., Jones, L.M. and Reichart, R.L., The stimulation of serum inorganic phosphatase and acid and alkaline phosphatase activity, J. Biol. Chem. 142:921, 1942.
- 23.- Grub. Man. A.B. Warriner, R.R., and Gutzmann, E.B., Phosphorylative glycogenolysis and calcification in cartilage, Science 95:461, 1942.
- 24.- Neuman, W.R. Distefano, V. and Mylayan, B.J., Role of Phosphatase. Fed. Proc. 10:228, 1951.
- 25.- Ross, H.H., Ely, V.O. and Archer, V.C. Alkaline phosphatase activity and pH optima, J. Biol. Chem. 62:561, 1951.
- 26.- Wechslein, M. and Zak, F.G., Histochemical distribution of alkaline phosphatase in dog liver after experimental biliary obstruction, Proc. Soc. Exper. Biol. and Med. 62:73, 1946.
- 27.- Gomori, G., Microscopic microchemistry. Principle and Practice, Chicago 1952, University of Chicago Press.
- 28.- Madden, H.B., and Tuba J. Source of Serum alkaline phosphatase, J. Biol. Chem. 195:741, 1952.
- 29.- Sanford, H.J., The effect of food injection on intestinal and serum alkaline phosphatase, J. Biol. Chem. 198:553, 1952.
- 30.- Pollak, V.E., Bonting, S.L., Mueltroke, R.C. and Kark, R.N. Quantitative histochemistry of the nephron, J. Clin. Invest. 39:1386, 1960.

I N D I C E.

INTRODUCCION - - - - -	1
GENERALIDADES - - - - -	3
METODO BODANSKY - - - - -	9
RESULTADOS DEL METODO DE BODANSKY - - - - -	23
METODO DE BESSEY LOWRY Y BROCK - - - - -	26
RESULTADOS DE LA TECNICA DE BESSEY LOWRY Y BROCK - - -	37
DISCUSION - - - - -	39
RESUMEN Y CONCLUSIONES - - - - -	42
BIBLIOGRAFIA - - - - -	43