

UNIVERSIDAD M O T O L I N I A

ESTUDIO CINETICO DE LAS ISOZIMAS DE LA FOSFATASA
ALCALINA DE HIGADO Y HUESO HUMANOS.-II.-INFLUENCIA
DE LA TEMPERATURA Y EL pH SOBRE LAS ENERGIAS DE
ACTIVACION Y CONVERSION.

F E S I S

Que para obtener el título de:

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

p r o p o n t a :

graciela xdrate durán
m é x i c o 1 9 6 2



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

Sr. Ignacio Zárate Muñoz

Sra. Marina Durán de Zárate

A mis hermanos

Marina

Dora

Ignacio

Alejandro

A LA AMISTAD

A m i t s a s

Este trabajo se llevó a cabo en el laboratorio del Departamento de Bioquímica del Hospital de Enfermedades de la Nutrición bajo la Dirección de los Drs. Guillermo Soborón A. y Jesús Torres G.

SUMARIO

INTRODUCCION

GENERALIDADES

MATERIAL Y METODOS

RESULTADOS

DISCUSION

CONCLUSIONES

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

Se conoce con el nombre de metabolismo intermedio el conjunto de reacciones que en forma secuencial tienen lugar en un organismo vivo unicelular o multicelular, y que son responsables de la transformación de las sustancias ingeridas a productos de excreción incluyendo aquellas que utilizan algunos de los metabolitos formados para la síntesis de material propio. Cada una de las reacciones está catalizada por una sustancia de naturaleza proteínica bastante específica para la reacción considerada y que se conoce con el nombre de enzima.

Recientemente se ha descrito que en un mismo organismo pueden existir varias proteínas con la misma función catalítica y a ellas se les ha dado el nombre de isoenzimas (1) ó isoenzimas (2)

En el suero humano se encuentran numerosas actividades enzimáticas (3) que provienen necesariamente de los órganos en los que se han sintetizado dichas proteínas; aunque no se ha establecido el mecanismo íntimo por el que las enzimas son vertidas a la circulación general, se ha demostrado que en caso de enfermedad aumenta la actividad de algunas enzimas que se encuentran en niveles

da concentración en el órgano afectado. Este criterio ha sido de gran ayuda en el diagnóstico de algunos padecimientos (4, 33, 34).

La diferenciación y caracterización de las enzimas presentes en el suero humano ha recibido gran atención en los últimos años, pues es lógico pensar que una isozima determinada puede ser indicadora de su origen y por lo tanto ayudar al clínico a determinar los tejidos lesionados en un proceso morboso (33-34).

Las isozimas presentes en suero han sido diferenciadas por diferentes procedimientos; uno de los más usados es la electroforesis en gel de almidón (5, 35, 36), la cromatografía en celulosas modificadas (6), técnicas inmunológicas (7, 28, 31, 32), uso de inhibidores y activadores (8, 29, 30) y otros procedimientos cinéticos (9, 38-40).

En esta forma se ha indicado la existencia de varias deshidrogenasas: lácticas (10, 41), málicas (11, 41, 42, 43), glucosa-6-fosfáticas (12) y otras más. El interés tan grande de esto tema ha originado numerosos trabajos como se observa por la frecuencia con la que aparecen publicaciones al respecto en las revistas especializadas de

Bioquímica y Medicina.

En el Departamento de Bioquímica del Hospital de Enfermedades de la Nutrición, por el tipo de enfermedades que en él se atienden, ha existido la inquietud de participar activamente en el problema antes mencionado; los esfuerzos que se han hecho han sido dirigidos fundamentalmente a diferenciar las isoenzimas de la fosfatasa alcalina presentes en el suero humano y los resultados hasta ahora obtenidos han sido objeto de varias comunicaciones (13-16). La investigación continúa de modo que en la actualidad hay varios trabajos en elaboración (17-19).

La diferenciación de la fosfatasa alcalina reviste importancia en relación a padecimientos hepato-biliares puesto que se piensa que la mayor parte de la enzima presente en suero es de origen óseo y que es excretada por la bilis (20).

Existe una controversia acerca del mecanismo de elevación en la fosfatasa alcalina que se observa en enfermos con obstrucción de las vías biliares: quienes afirman que el incremento se debe a sobrepoducción hepática (21) y otros que es por regurgitación de la fosfatasa alcalina excreta-

da en la bilis (22). Además, la fosfatasa alcalina del suero está elevada en procesos que cursan con una actividad osteoblástica aumentada como fracturas (23), tumores óseos (24), hipertiroidismo (25) y otros.

Ya que las isozimas son diferentes moléculas proteicas es de pensarse que puedan distinguirse por el uso de procedimientos que afecten su actividad catalítica o la arquitectura misma de la molécula proteica. En el presente estudio se investigó el efecto de la temperatura y el pH, ya que su acción se manifiesta de las dos maneras antes mencionadas (26).

Estudios similares efectuados en forma paralela al que aquí se informa, exploraron el efecto del pH y la temperatura sobre la velocidad máxima y la constante de Michaelis de las isozimas de hígado y hueso (17), las modificaciones cinéticas que existen en las mezclas de las isozimas purificadas y el efecto del suero humano (18), así como la posible aplicación de estos estudios en diferentes casos patológicos (19).

GENERALIDADES

La fosfatasa alcalina es una enzima de poca especificidad, que cataliza la hidrólisis de los monoésteres del ácido fosfórico (44) de una gran variedad de sustratos (fenólicos, alcohólicos, azúcares) (45).

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 (46), para transferir 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 manera siguiente:



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 organismo, con relación a los distintos aceptores y donadores del fosforilo.

Otro factor importante es el pH intracelular.

En efecto, cuando se trabaja con cinética orden cero, como es usual en el laboratorio, el pH es de 9-10 con pequeñas variaciones según el sustrato utilizado. No obstante, es probable que en la célula (entre las reacciones sean de primer orden, ya que el sustrato, es 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 o igual al fisiológico (47). Cuando el sustrato se aproxima a la saturación, es decir, cuando tenemos una reacción cinética 95% "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 este 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(s) actúan a un pH muy distinto del fisiológico.

Los métodos histoquímicos (48,49) demuestran mayor actividad de fosfatasa alcalina en el hígado, a pHs cercanos al nivel 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 sustratos 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 sustancias catalogadas como inhibidoras actuarían sobre la formación del complejo enzima-sustrato. Probablemente el papel de la fosfatasa alcalina pueda explicarse mejor en función de la reacción(2), ya indicada.

Se ha visto, por ejemplo, que la fosfatasa alcalina de origen intestinal (50-51) aumenta notablemente en la circulación linfática, proveniente del intestino durante el proceso de absorción de alimentos; la fosfatasa alcalina en exceso tal vez desempeñe cierto papel en la fosforilación de azúcares y otras sustancias en su paso a tra-

ves de mucosa intestinal.

En el padecimiento congénito conocido como "glucosuria 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 (52).

La fosfatasa alcalina, por otra parte tiene una función importante en el proceso de osteificación del osqueleto (53). Entoncez, 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 tricalcico, que por insolubilidad precipitaría sobre la materia orgánica del osqueleto.

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 biliar en una proporción de 95% (54)

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 varios focos, otros han desechado tal posibilidad.

M A T E R I A L Y M E T O D O S

Se purificaron las enzimas de un hígado y de un tumor maligno de hueso (osteosarcoma). - En lo que se refiere al primer órgano se tuvo la seguridad de que la paciente a la que se le practicó la autopsia no presentaba ningún padecimiento - del órgano, la causa de la muerte fue hemorragia aguda.

Se tomó esta precaución con el fin de estar razonablemente ciertos de que la enzima purificada era la correspondiente a tejido normal. Por supuesto que en el caso del osteosarcoma no se tiene ninguna seguridad que la enzima purificada corresponda al tejido óseo normal, sin embargo, se procedió en esta forma por el hecho de que el tumor representa una situación extrema de actividad osteoblástica aumentada y es en cierta forma probable que el incremento en fosfatasa alcalina que se ve en esta condición, tanto en tejido neoplásico, como en suero, correspondo a la enzima que normalmente se encuentra en hueso. Además, en los estudios hechos por otros autores se utilizó el mismo tipo de tumor y por lo tanto existe la posibilidad de poder comparar nuestros resultados con los datos obtenidos anteriormente.

El procedimiento de purificación descrito por Schlamowitz y colaboradores (5) consistió en :

HIGADO

1.- El hígado que pesaba 1105 g. se tomó inmediatamente después de extirpado y se perfundió con agua destilada fría, hasta que se eliminó la mayor parte de la sangre del lecho vascular, esta maniobra se hizo a través de la vena porta y de otros vasos en la cara inferior del órgano.

2.- Se homogeneizó el hígado en una licuadora con un volumen de agua y un volumen de alcohol; se agregó al homogeneizado un volumen igual de una mezcla de acetato de etilo y tolueno (1:1).

3.- Se ajustó el pH a 6.9.

4.- El homogeneizado se dejó en autólisis cuatro días y medio a temperatura ambiente, el método original recomienda tres días.

5.- La preparación se centrifugó a 18 000 G durante 20 minutos a una temperatura de 5°C, separando de esta manera los núcleos, las células completas y las membranas.

6.- Al sobrenadante a 10°C se le ajusta el pH con ácido acético glacial a 4.6.

7.- Se dejó reposar una hora a -18°C.

8.- Se centrifugó durante 15 minutos a 2 500 G a 5°C y el sobrenadante se trató con etanol absoluto (1.14 volúmenes).

9.- El sedimento se separó nuevamente por centrifugación en frío y se lavó una vez más con etanol.

10.- Se liofilizó y el polvo residual se cromatografió con di-ótil-amino-ótil-celulosa (DEAE-Celulosa); en las siguientes condiciones:

a.- Se pesaron 25 g. de DEAE-celulosa

b.- Se suspendió en agua suficiente, mezclándose perfectamente bien con un agitador mecánico durante 15 minutos, inmediatamente después se centrifugó a 1 200 G durante 10 minutos y se decantó, esta operación se hizo tres veces.

a.- Una vez decantada se le agregó un volumen de una solución 0.3 M de fosfato monosódico, se mezcló perfectamente con el agitador mecánico durante 15 minutos, se centrifugó a 1 200 G durante 10 minutos y se decantó, esto se hizo tres veces.

d.- Se le agregó a la celulosa ya decantada suficiente hidróxido de sodio 0.5 N y se mezcló con el agitador mecánico durante 15 minutos centrifugando a 1 200 G durante 10 minutos.

e.- Se lavó tres veces con agua.

f.- Se le adicionó un volumen de una mezcla alcohol-éter 1:1 mezclando con el agitador-mecánico durante 15 minutos y se centrifugó 10 minutos a 1 200 G, esta operación se hizo tres veces

g.- Se agregó agua con un pH entre 8 y 9 (este pH se obtiene agregando hidróxido de sodio).

h.- Finalmente se le puso un litro de una solución 0.01 M de fosfato disódico con un pH entre 8 y 9, esto se hizo dos veces y finalmente se empacó una columna de vidrio de 13 mm de diámetro interior y 500 mm de altura.

La columna se empacó a presión (200 mm de mercurio), una vez montada se instaló en el cuarto frío (4°C), en el cual iba a estar hasta el término de la purificación; se lavó la columna con 100 ml. de amortiguador de fosfatos, inmediatamente después se agregó la muestra liofilizada y pesada (0.249 g.), se corrió un gradiente hiperbólico-

de fosfatos(fosfato monosódico 0.3 M y fosfato disódico 0.01 M), empleando un sistema de tres matraces Erlenmeyer comunicados entre sí por el fondo, con presión de aire uniforme en los tres.

Se recolectaron fracciones de 5 ml. - mediante un colector de fracciones automático, por la columna se pasaron 600 ml de gradiente de fosfatos (figura 1).

De las fracciones recolectadas se tomó el pH cada 10 tubos y una muestra de 0.5 ml para determinación de fósforo inorgánico; según se iban recolectando las fracciones se dializaban en bolsas de celofán contra un amortiguador de acetato(0.05 M)- cloruro de sodio(0.1 M) con un pH de - 7.2, cambiándose el líquido de diálisis cada 2 o 3 horas, cuatro veces y dejando dializar una última vez durante 8 horas, al término de este tiempo se vaciaron las bolsas en tubos diferentes guardándose bien tapados y a 4°C hasta el momento de utilizarlos.

Una vez terminada la cromatografía se regeneró la columna, siguiendo nuevamente los inóculos a el H; quedando de esta manera lista para emplearse otra vez.

HUESO

1.- El tumor obtenido fue un osteosarcoma del tercio superior de la rodilla inmediatamente después de la amputación, se quitaron las partes blandas y se resaco la parte tumoral blanda separándola del tejido óseo. 70 g. de este tejido se homogeneizaron en agua destilada fría, utilizándose primero un molino para triturar el tejido y posteriormente una licuadora. La homogenización se hizo con cuatro volúmenes de agua, al volumen final (352 ml.) se le agregó 1 ml. de cloroformo.

2.- Se dejó reposar el homogeneizado a temperatura ambiente durante 48 horas.

3.- Se separó el sobrenadante por centrifugación en frío y se dializó durante 72 horas contra 2 litros de agua destilada fría, esta se cambió una vez a las 12 horas, se hizo esta diálisis en el cuarto frío (4°C.)

4.- Se liofilizó la preparación obtenida después de la diálisis, una porción del liofilizado se cromatógrafió en DEAE-Colulosa siguiendo la secuencia de purificación ya señalada en hígado

Las enzimas purificadas han servido también para otros estudios experimentales (17-19)

R E S U L T A D O S

La actividad de la fosfatasa alcalina se determinó mediante dos procedimientos: el descrito por Bessey Lowry y Brock (26) que se basa en el cuanteo del fosfato de p-nitro-fenil a 415 m μ - como sustrato. Se hizo la modificación de incrementar la concentración de hidróxido de sodio, que se usa para detonar la reacción, hasta 0.2 M puesto - que la aconsejada por los autores (0.05 M) se encontró que no era suficiente, además se aumentó la concentración del amortiguador usado hasta ser de 0.6 M en el sistema, puesto que se observó que concentraciones menores no mantenían el pH durante el curso de la reacción.

El segundo procedimiento es el de Bodansky (27) que usa -glicerofosfato como sustrato- y determina fósforo inorgánico liberado por un procedimiento colorimétrico.

Para ajustar el pH del medio de la - reacción se utilizó amortiguador glicina-hidróxido de sodio (0.2 M) que tiene un pK de 9.78, el intervalo explorado fue de 8.4 a 10.65 unidades de pH en la mayor parte de los experimentos. Se exploraron variaciones entre los puntos experimentales de 0.2 a 0.3 unidades de pH. Siempre se tuvo la certeza de que el pH se mantuvo a través del período de incubación.

El tiempo de incubación no fue constante, sino que las lecturas al fotocolorímetro se hicieron cuando se había desarrollado color a una densidad óptica de 0.15, algunas veces el color se desarrolló en un minuto, otras se requirieron veinte o más.

Estudios preliminares(14) sobre estabilidad enzimática habían indicado que solo era conveniente esperar el tiempo necesario para obtener buena sensibilidad.

La reacción se detenía por adición de solución de hidróxido de sodio; se puede hacer la corrección adecuada mediante curvas de progreso trazadas con cantidades crecientes de sustrato.

Se define como actividad específica el número de micro-Moles de producto liberadas en una hora, por miligramo de proteína.

Se estudió el efecto de la temperatura sobre la actividad de las enzimas a diferentes valores de pH antes y después de ser cromatografiada en DEAE-Celulosa; la variación de temperatura fue de 17.6° a 38.5°C y el intervalo de pH fue de 8.4 a 10.5.

También se estudió la desnaturaliza-

ción de las enzimas a temperaturas que oscilaron - entre 61° y 25°C. Para el primer tipo de estudios' el sistema completo de incubación se ajustó a la temperatura deseada y en estas condiciones se efectuó la reacción enzimática, el tiempo de incubación varió entre 2 y 30 minutos de acuerdo con la estabilidad de la enzima a distintos valores de pH(16)

Para los estudios de desnaturalización se pre-incubó la enzima a la temperatura indicada- durante 5 minutos, se enfrió rápidamente y se ajustó a las condiciones de incubación indicadas.

El termostato usado en los baños de incubación mantiene la temperatura deseada sin ninguna variación apreciable en un termómetro que tiene una escala de 0 a 100°C con divisiones de 0.5°C

D I S C U S S I O N

El aumento de la actividad sobre la velocidad máxima de las enzimas de hígado y hueso a diferentes grados de acidez se observa en las figuras 2,3 y 4, el incremento en actividad es proporcional al de la temperatura. Es de notarse que para la mayor parte de las curvas existe un pH óptimo 10.2 (figuras 5,6,7).

De acuerdo con la ecuación de Arrhenius se han trazado los datos en la forma expresada en las figuras 8,9,10 de donde se puede obtener la energía de activación a partir del segmento recto de las líneas encontradas. El cálculo de la energía de activación se hace utilizando la siguiente fórmula:

$$\log \frac{V_2}{V_1} = - \frac{\Delta H_a + RT}{2.303R T_2 - T_1}$$

$$\Delta H_a = 2.303R(\text{pendiente}) - RT$$

en donde:

V_1 y V_2 = velocidades encontradas a las temperaturas absolutas T_1 y T_2

ΔH_a = energía de activación

R = constante de los gases

RT .- se ha aproximado a un valor de 600 calorías para todos los casos (26).

Los valores de ΔH_a se encuentran consignados en la tabla 1 y en la figura 11.

El efecto de la temperatura sobre la desnaturalización de las enzimas se aprecia en la figura 12 y en la tabla 2.

Es aparente la menor estabilidad de la enzima Úsea y además que la fosfatasa alcalina de hígado antes de pasar por la columna doceca con dos pendientes claramente distinguibles (figura 12) la primera con una vida media \approx 5 minutos ($t_{1/2}$) y la segunda con una vida media de 21.5 minutos.

El pH no afecta la manera relativa en que se desnaturalizan las isozimas estudiadas, lo que se observa en la figura 13 en la que se muestran las velocidades residuales en relación a la original después de someterlas a una temperatura de 54.5°C durante 5 minutos.

La energía de conversión (ΔH_a) de las isozimas de hígado y hueso se observan en la figura 14. Se define como energía de conversión la energía de activación del siguiente proceso:

Enzima nativa \rightleftharpoons Enzima desnaturalizada

T A B L A 1 ENERGIA DE ACTIVACION

Enzima	Columna	pH	ΔH cal/Mol
H	A	8.40	9 150
H	A	9.25	5 700
H ₁	A	9.65	7 600
H	A	10.10	7 800
H	D	9.65	10 650
O	A	8.40	8 150
O	A	8.70	8 650
O	A	8.96	7 550
O	A	9.32	6 260
O	A	9.65	5 630
O	A	9.94	6 270
O	A	10.22	7 040
O	A	10.50	7 040
O	D	8.40	15 650
O	D	8.70	15 750
O	D	8.96	14 600
O	D	9.32	14 300
O	D	9.65	14 000
O	D	9.94	13 100
O	D	10.22	12 600
O	D	10.50	12 850

H = hígado

O = hueso

A = antes de pasar por la columna

D = después de pasar por la columna

El incremento en la velocidad de una reacción catalizada por una enzima al elevar la temperatura del medio de incubación, obedece fundamentalmente a variación en dos factores determinantes: por una parte aumenta la energía cinética de las moléculas y aumenta consecuentemente el número de probabilidades de que las moléculas de enzima y sustrato choquen entre sí, al haber choques entre las moléculas se efectúa la reacción; por otra parte, el aumento de la temperatura ocasiona modificaciones en el contenido energético del complejo activo enzima-sustrato, de modo que es posible que se facilite la transformación a los productos de la reacción.

A los diferentes de pH a que se trabajó, se observó igual aumento en la velocidad de la reacción, o expresado en otra forma, para el caso de las isozimas de fosfatasa alcalina de hígado y de hueso el pH afecta poco a la energía de activación, la cual es del mismo orden de magnitud y alrededor de 6 000 a 9 000 cal/Mol. para la enzima de hígado antes de cromatografía y de 6 000 a 8 500 cal/Mol. para la enzima de hueso en las mismas condiciones.

Es por demás interesante observar que la energía de conversión, tanto para la enzima 6-

ósea como para la enzima hepática, aumenta una vez que la proteína ha sido cromatografiada en DEAE - Celulosa. Esto constituye una observación constante para la primera y aún que para la segunda hay - solo un punto experimental es suficiente para establecer que la diferencia es casi despreciable. Puede suponerse que el paso a través de la celulosa modificada hace que las fosfatasa alcalinas se separen de otras proteínas a las que deben estar unidas con más o menos firmeza y que por tanto adquieren al quedar libres de ellas caracteres cinéticos diferentes.

Esta manera de pensar encuentra mayor justificación si se analizan los datos de la figura 12 en la que se observa que la desnaturalización de las isozimas por efecto del calentamiento a 61° sigue una cinética de primer orden que puede ser expresada en la siguiente ecuación:

$$-\frac{dx}{dt} = kx$$

on donde:

x = cantidad de enzima

t = tiempo

k = constante de desnaturalización

Una vez que ha sido integrada y convertida de log natural a log de base 10. Esta ecuación puede ser expresada:

$$\log x = kt + a$$

Por tanto si se grafica logaritmo de la velocidad residual contra el tiempo de calentamiento de la enzima se obtienen líneas rectas cuya pendiente es una expresión de la constante de desnaturalización. Puede observarse en la figura 12 y tabla 2 que la enzima de hígado purificada antes de ser cromatografiada decae al principio rápidamente con una vida media de 5 minutos y súbitamente a los 7 minutos se desnaturaliza en forma más lenta teniendo una vida media de 21.5 minutos.

Este valor es comparable a la rapidez con que se desnaturaliza la enzima después de ser cromatografiada, la cual tiene una vida media de 23.7 y 19.8 minutos.

Lo anterior sugiere que al someter la enzima a elevada temperatura hace que se disocie de alguna proteína que la hace decaer en forma más rápida y que esta separación también se logra en la cromatografía de intercambio iónico.

Para la enzima de hueso no se observa el fenómeno anterior a pesar de que como se ha señalado antes es probable que la cromatografía ocasione también su disociación de otras proteínas, la vida media de la enzima de hueso antes de ser cromatografiada es de 9.35 minutos y después del procedimiento dió valores de 9.35 y 10.4 minutos para dos experimentos diferentes.

Es interesante observar que la vida media de la fosfatasa alcalina del suero normal fue de 10.1 minutos, o sea semejante a lo observado para el caso de la enzima de hueso, lo que sugiere que esta isozima se encuentra posiblemente en mayor proporción que las otras.

De todas formas es bien aparente que la enzima ósea es menos resistente que la hepática a la acción denaturalizante de la temperatura elevada y que esta diferencia puede ser aprovechable para dilucidar la proporción en que se encuentran las isozimas en el suero, tanto de sujetos normales como de pacientes. Estudios simultáneos al que aquí se informa han demostrado que esto es el caso (18-19).

Lo anterior necesariamente se refleja en los valores obtenidos para la energía de conversión según se aprecia en la tabla 3; puede apreciarse que hay un cambio entre los valores de la energía de conversión de las enzimas antes y después de ser cromatografiadas lo cual es también sugerente de la existencia de un agregado de la enzima con otras proteínas de las que se separa al someterse al procedimiento de purificación indicado.

T A B L A 2 DESNATURALIZACION

En- zima	A_0	A_t	A_0/A_t	$\log A_0/A_t$	t min.	k min^{-1}	t 1/2 min.
HA							
O-7	2.20	0.06	2.650	0.424	7	0.139	5
MA							
0-15	0.75	0.60	1.250	0.099	7	0.0322	21.5
ND							
O-15	2.04	1.37	1.555	0.192	15	0.0292	23.7
ND	3.60	2.35	1.690	0.220	15	0.035	19.6
OA	2.14	0.01	2.640	0.422	13	0.074	9.3
OD	65.10	21.14	3.050	0.484	15	0.074	9.3
OD	9.95	1.45	2.730	0.435	15	0.0667	10.4
SH	1.7	0.60	2.810	0.449	15	0.0688	10.1

SH = suero normal

T A B L A 3 ENERGIA DE CONVERSION

Enzima	Culemnas	pH	ΔH_0 cal/Mol
N	A	9.65	7 200
H	D	9.65	6 500
O	A	9.65	8 300
O	D	9.65	15 600

CONCLUSIONES

1.- El pH no afecta la energía de activación de ninguna de las dos isozimas.

2.- La energía de conversión aumenta para la isozima ósea después de la cromatografía.

3.- La energía de conversión de la isozima hepática se mantiene casi constante antes y después de ser cromatografiada.

4.- La vida media de la fosfatasa alcalina del suero normal establece que la mayor parte de la isozima presente en él es de origen óseo.

5.- La diferencia que se aprecia en la desnaturalización de las isozimas ósea y hepática puede ser aprovechada para establecer la proporción en que se encuentran presentes tanto en suero normal, como en suero de enfermos.

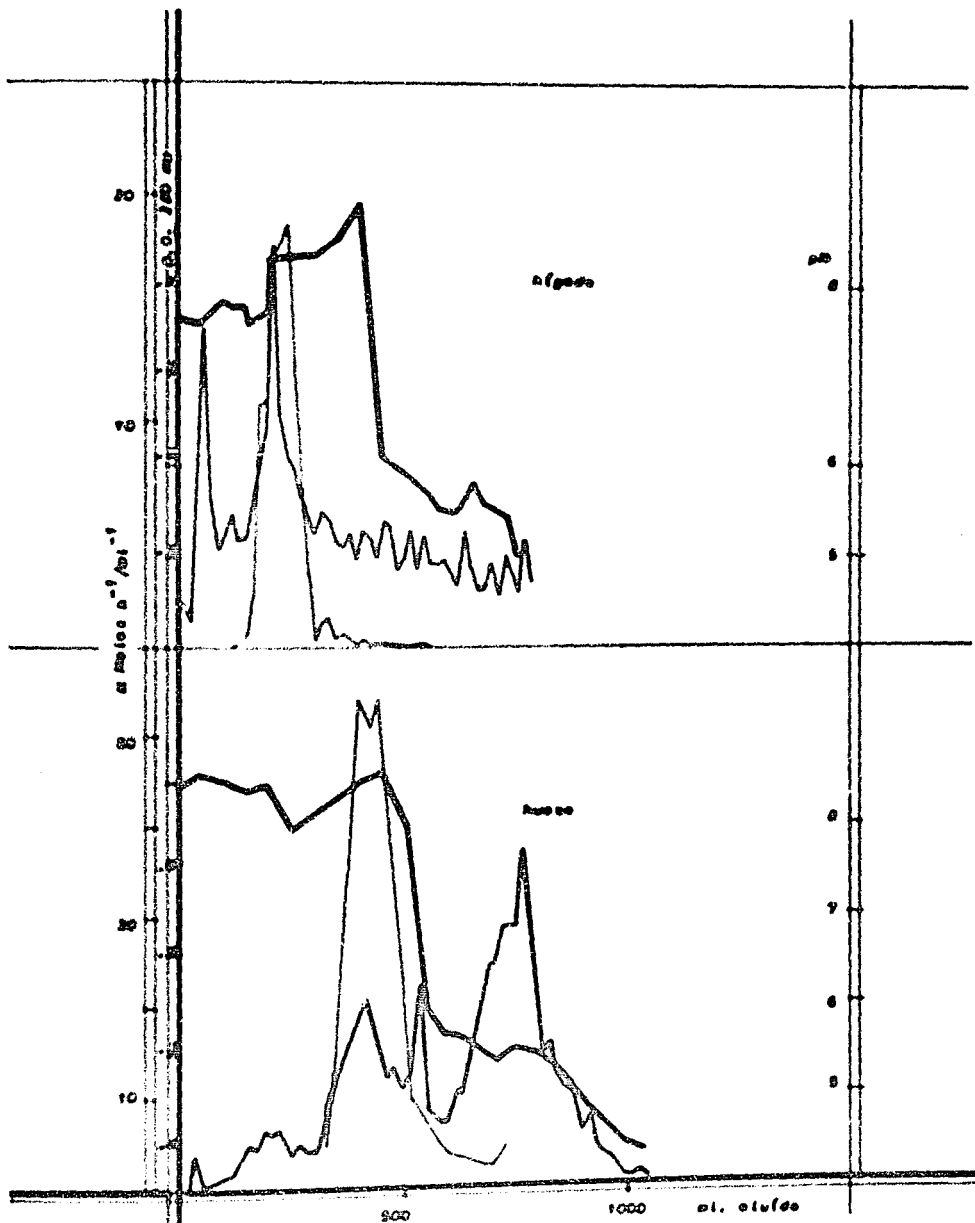


Figura 1. - Cromatografía de fosfatos alcalinos de Alfalfa y de Lucerne en DEAE-Celulosa.

■■■■■ gradiente
 ————— plataforma
 actividad específica

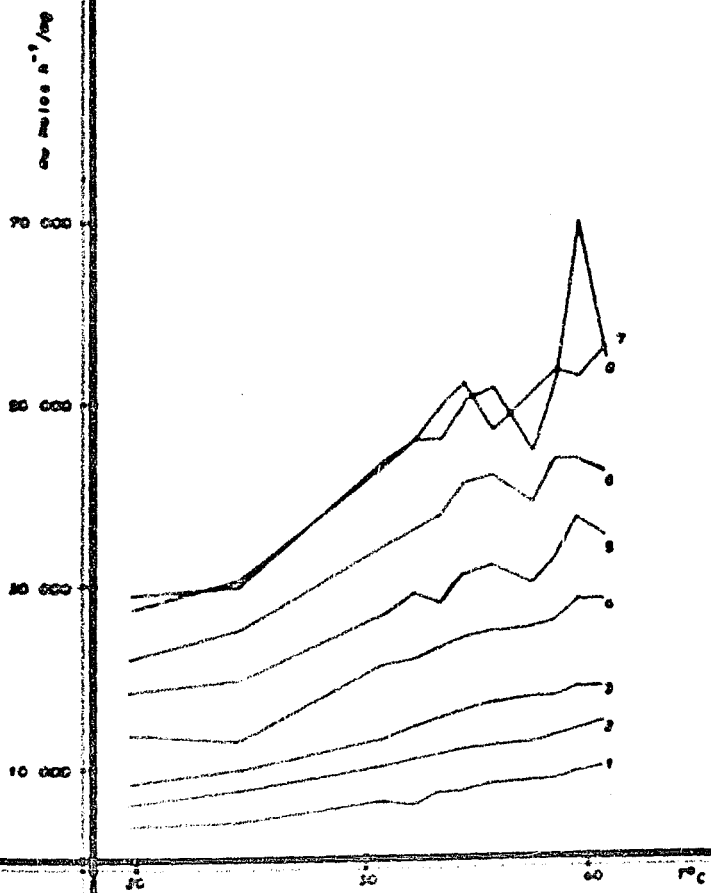


Figura 2.- Efecto del incremento de la temperatura sobre la actividad de la fosfatasa eléctrica de Pisco antes de ser arcasoligrúrida.

curva	pH	curva	pH
1	6.6	5	9.65
2	6.7	6	9.65
3	6.85	7	10.65
4	6.25	8	10.65

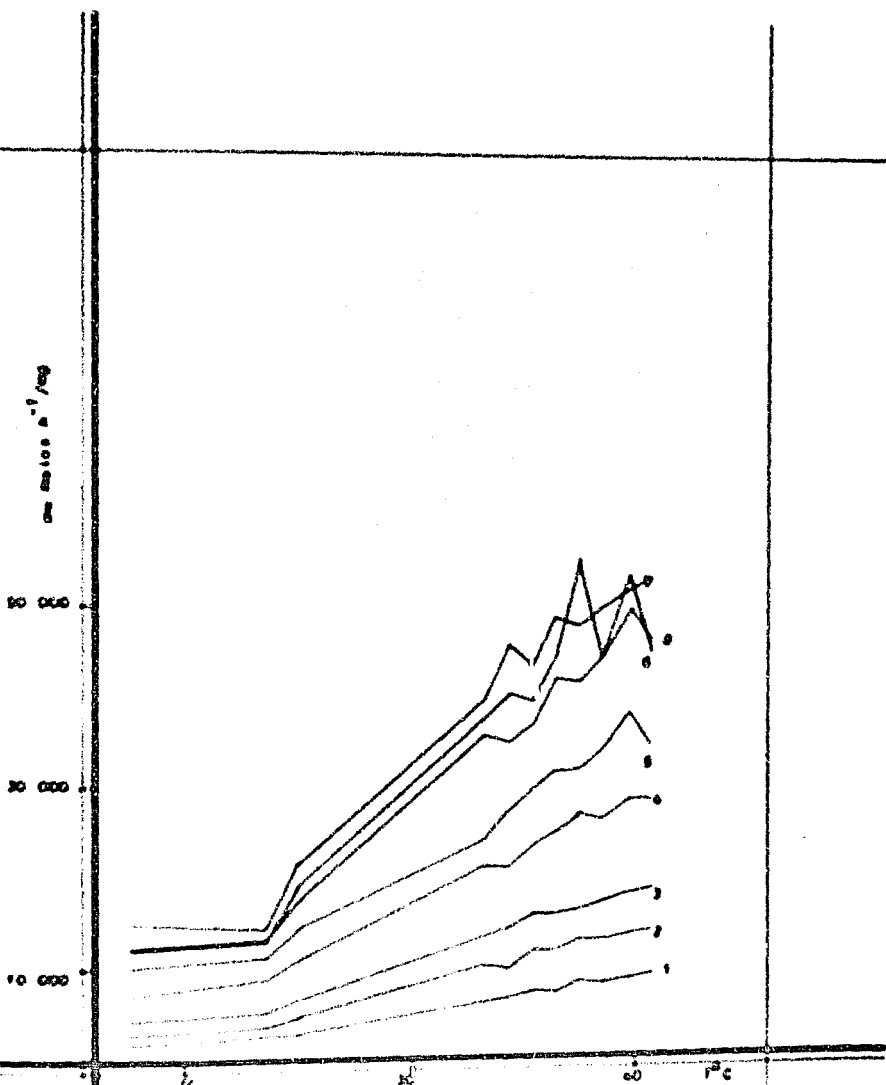


Figura 2. - Efecto del incremento de la temperatura sobre la actividad de la fosfatasa alcalina de huesos fósfora de ratas cromatografiadas.

curva	pH	curva	pH
1	8.6	5	8.68
2	8.7	6	8.84
3	8.88	7	10.22
4	8.25	8	10.52

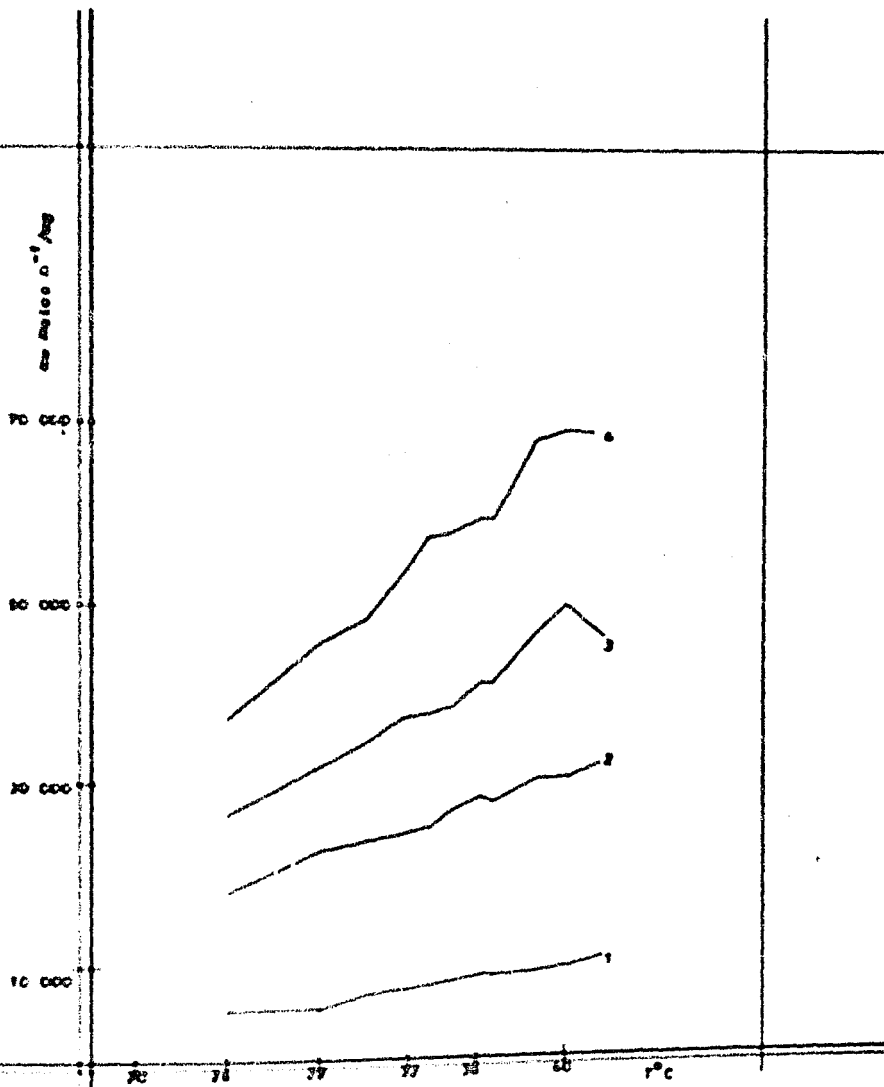


Figura 4. - Efecto del incremento de la temperatura sobre la actividad de la fosfatasa alcalina de *Algae* antes de ser creamiografadas.

Curva	pH
1	6,6
2	7,25
3	8,05
4	10,1

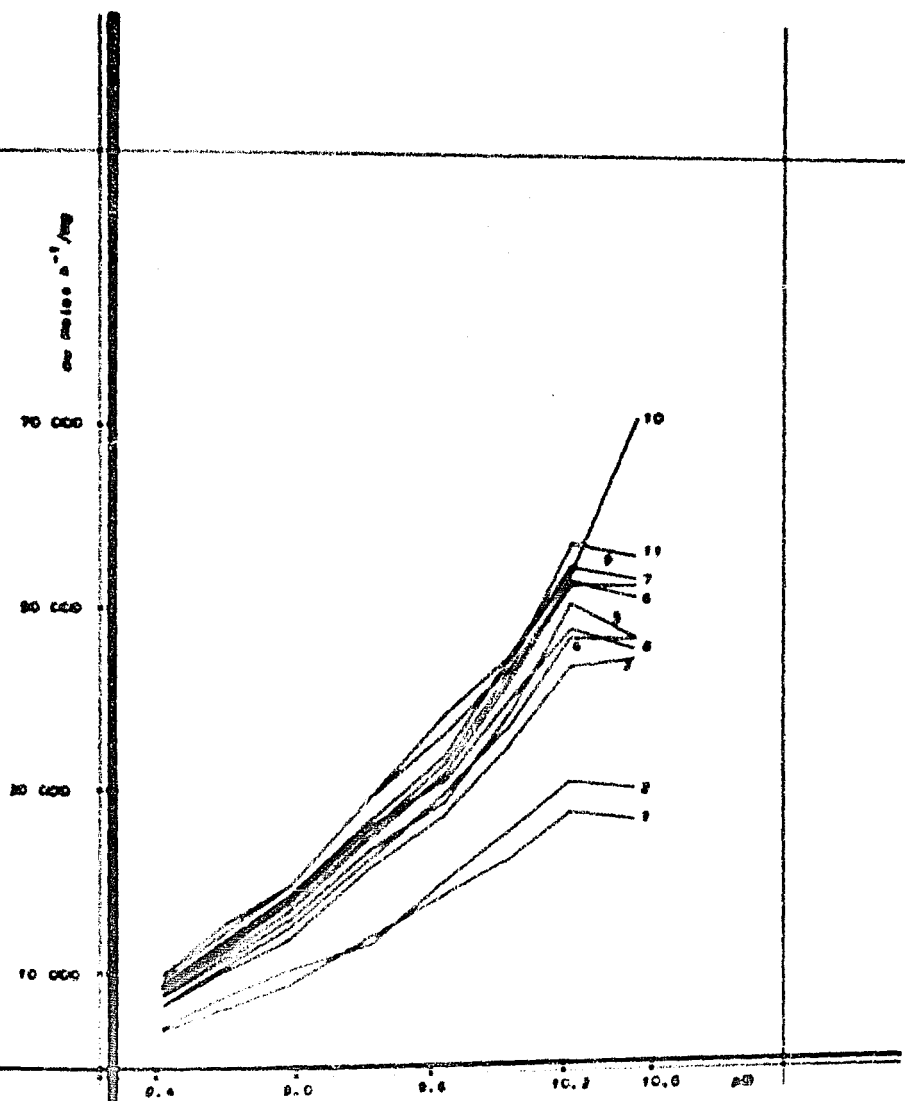


Figura 1. - Efecto de variación del pH y la temperatura sobre la actividad de fosfatasa alcalina antes de ser enzimografiada. (Ansoo)

Curva	°C	Curva	°C
1	19.6	7	29.2
2	20.3	8	37.2
3	20.3	9	38.2
4	22.0	10	39.2
5	23.2	11	40.0
6	23.2		

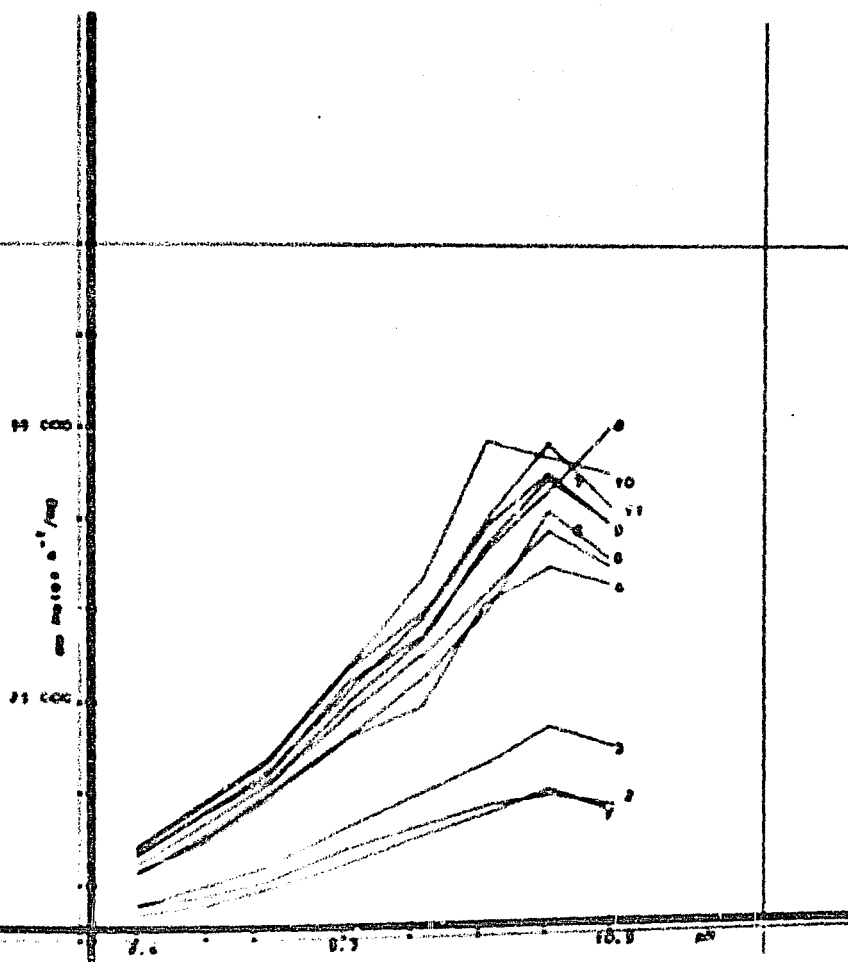


Figura 8.- Efeito da variaçãõ da temperatura sobre a actividade de fosfatos alcalinos de águas doces de car. arenolagradas.

temper.	°C	temper.	°C
1	17.0	7	23.0
2	20.0	8	27.0
3	20.0	9	29.0
4	22.2	10	29.0
5	24.3	11	40.0
6	27.0		

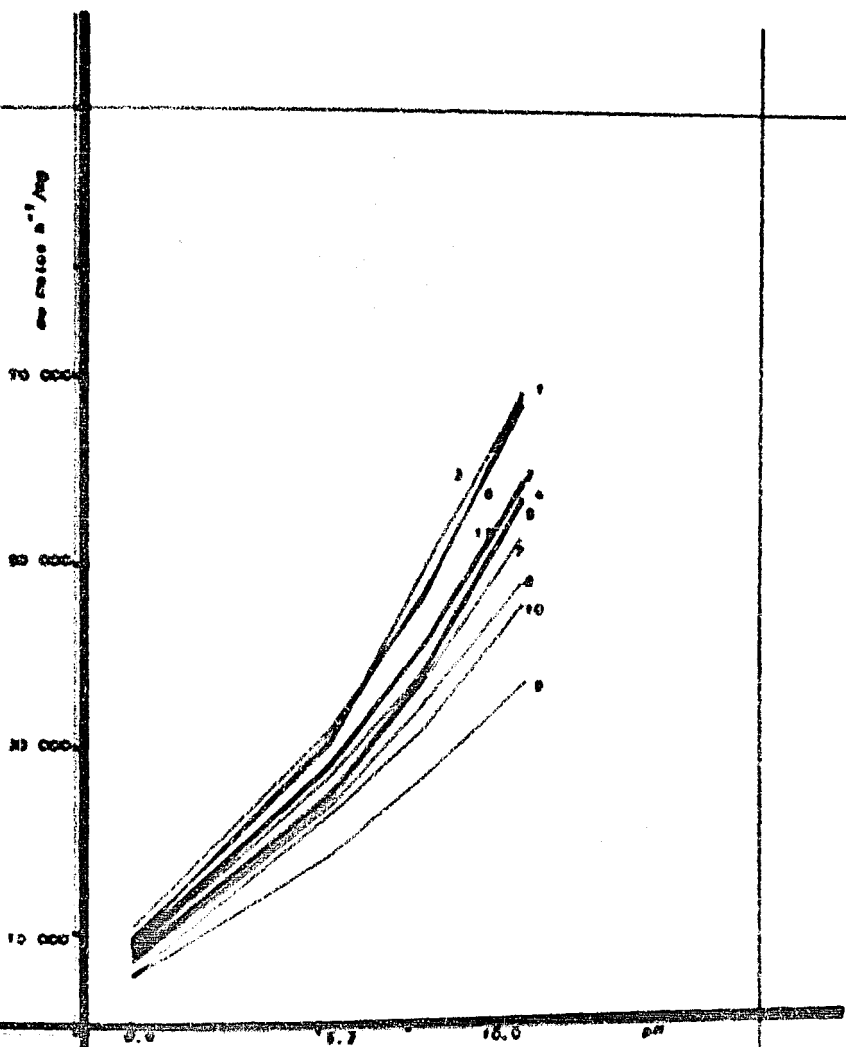


Figura 7.- Efecto de variación pH y de temperatura sobre la actividad de fosfatasa alcalina de hígado antes de ser eritropoietina.

Curso	T°C	Curso	T°C
1	22.0	7	21.6
2	23.2	8	20.2
3	22.2	9	20.0
4	23.0	10	20.1
5	22.9	11	22.0
6	27.8		

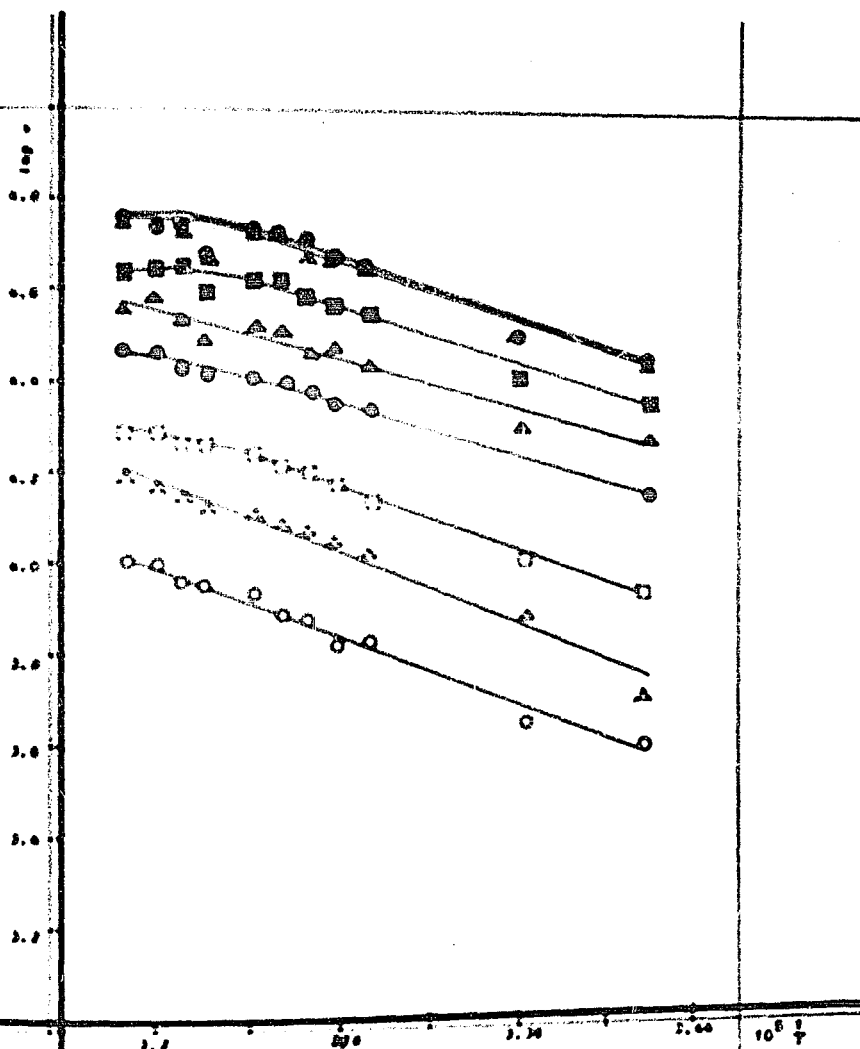
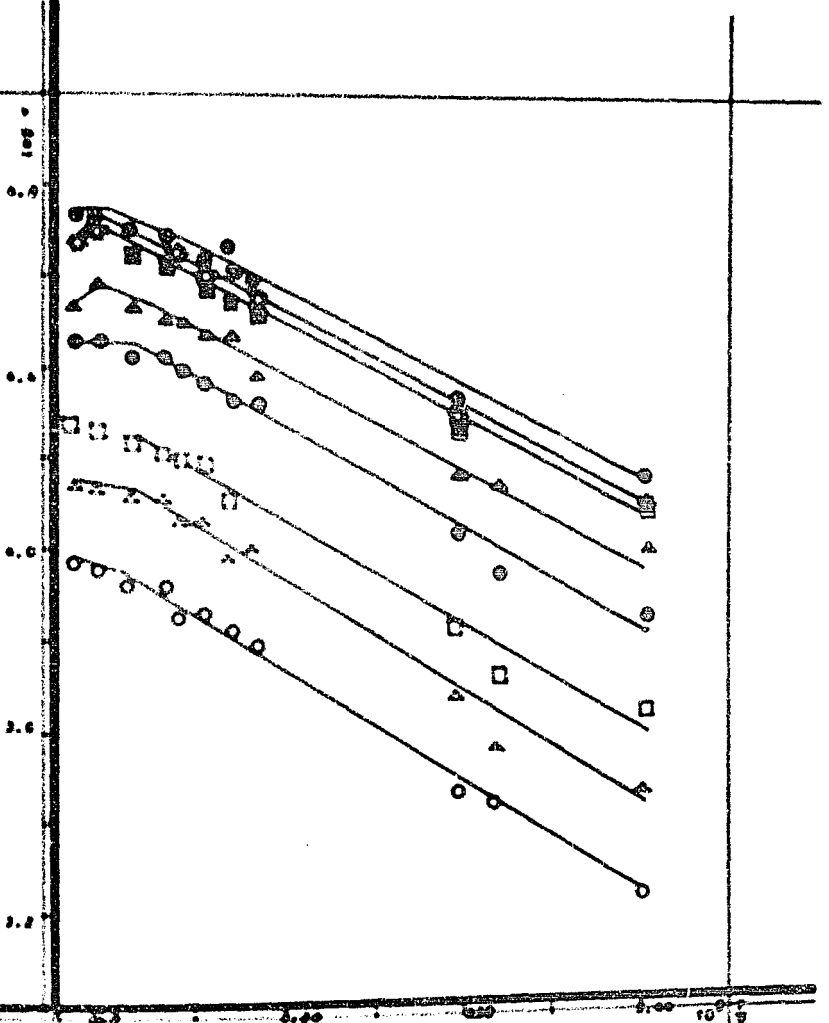


Figura 2.- Energia de excitação de 10 ondas de ruído antes de ser cronometradas.

p^0	0.0-0
0.03	□-□-□
0.07	△-△-△
0.10	○-○-○
0.13	◇-◇-◇
0.16	▽-▽-▽
0.20	◇-◇-◇
0.23	○-○-○
0.27	△-△-△



Figur. Energía de activación de la oxidación de los azúcares después de ser calentados.

0.62	○-○-○
0.7	□-□-□
0.98	△-△-△
0.22	◇-◇-◇
1.08	○-○-○
0.86	□-□-□
10.22	△-△-△
10.8	◇-◇-◇

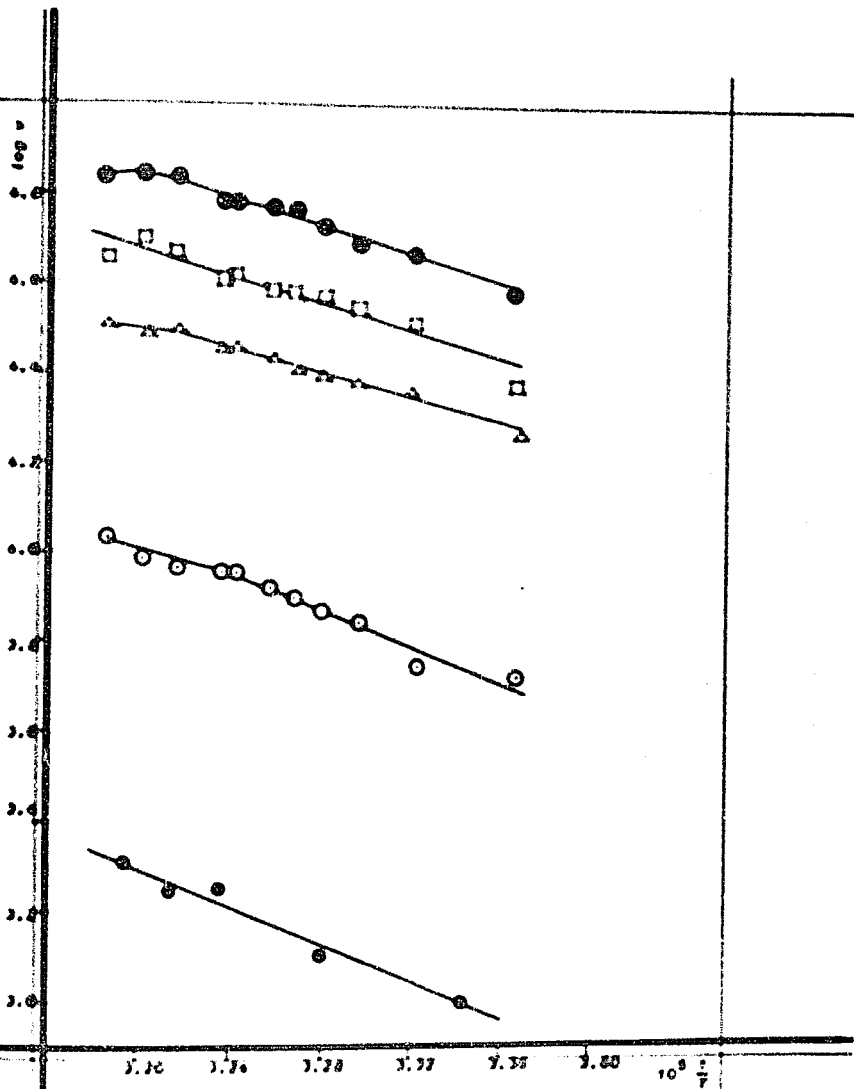


Figura 10.-Energía de activación de la enzima de Algado antes y después de ser cromatografada.

enzima	E_a			
NA	6.6	o	o	o
NA	9.73	Δ	Δ	Δ
NA	9.65	□	□	□
NA	10.1	o	o	o
NA	0.68	o	o	o

NA = Algado ~~antes~~
 NA = Algado ~~después~~

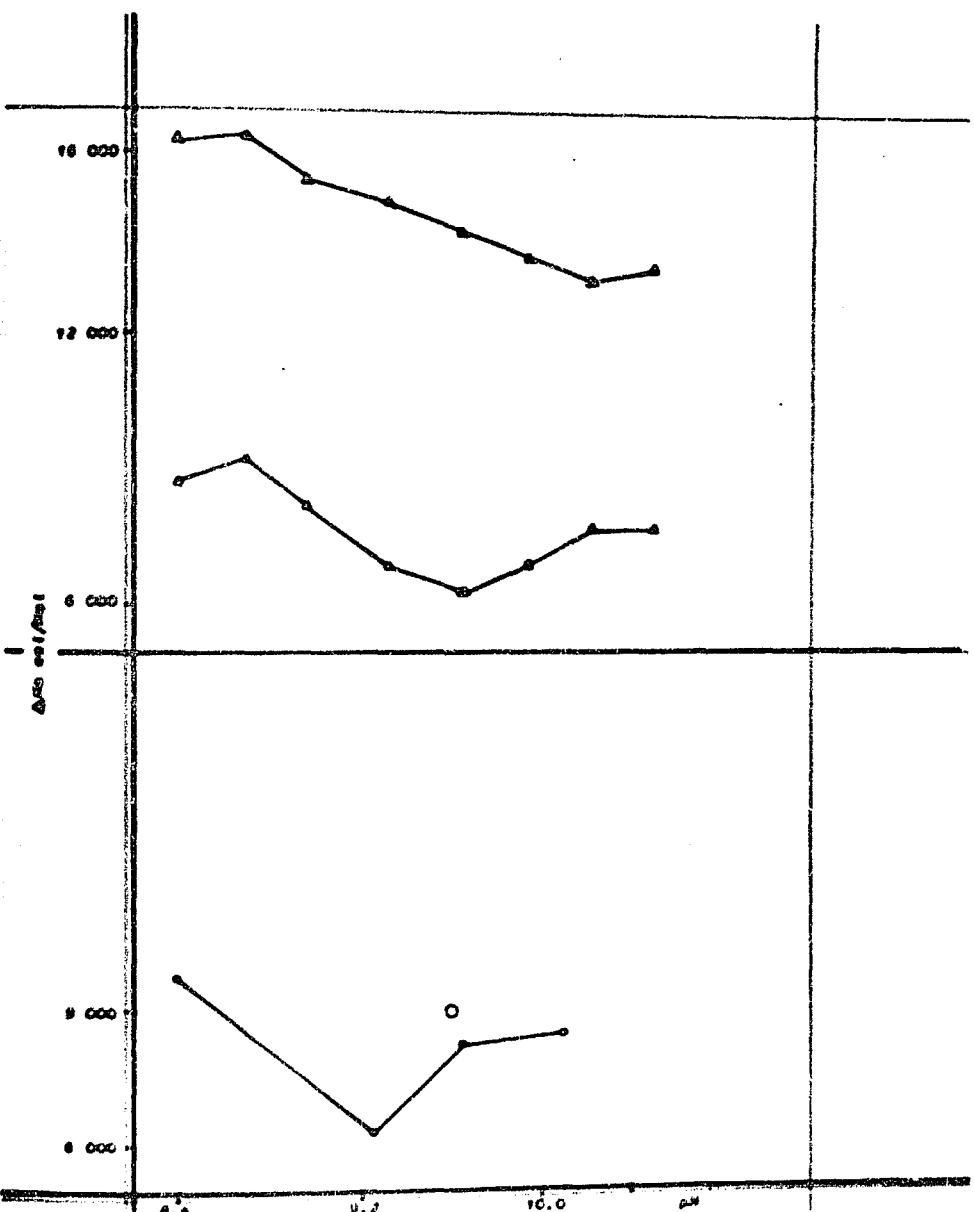


Figura 11.- Efecto del pH sobre la energía de activación de las fosfatasas alcalinas de alfalfa y alfalfa antes y después de ser cromatografiadas.

Antes antes ΔΔΔ después antes O-O-O
 Después después O Después después I-O-O

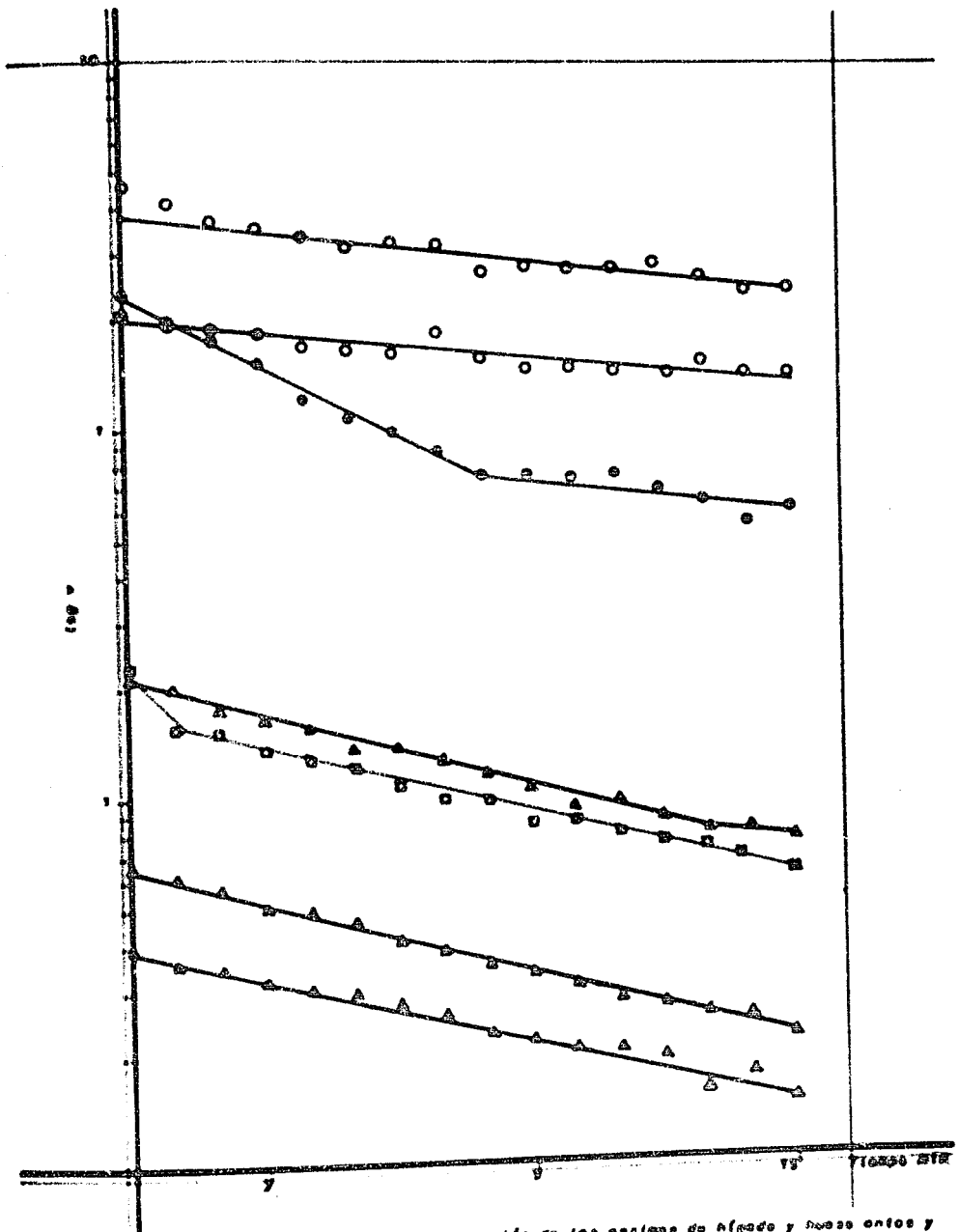


Figura 12. - Valores de desnaturalización de los ensayos de Albúmina y Albumen antes y después de ser cromatografados. - Línea normal (124) (1-2)

Albumen antes $\Delta\Delta\Delta$
 Albumen después $\square\square\square$

Albúmina antes $\circ-\circ-\circ$
 Albúmina después $\circ-\circ-\circ$

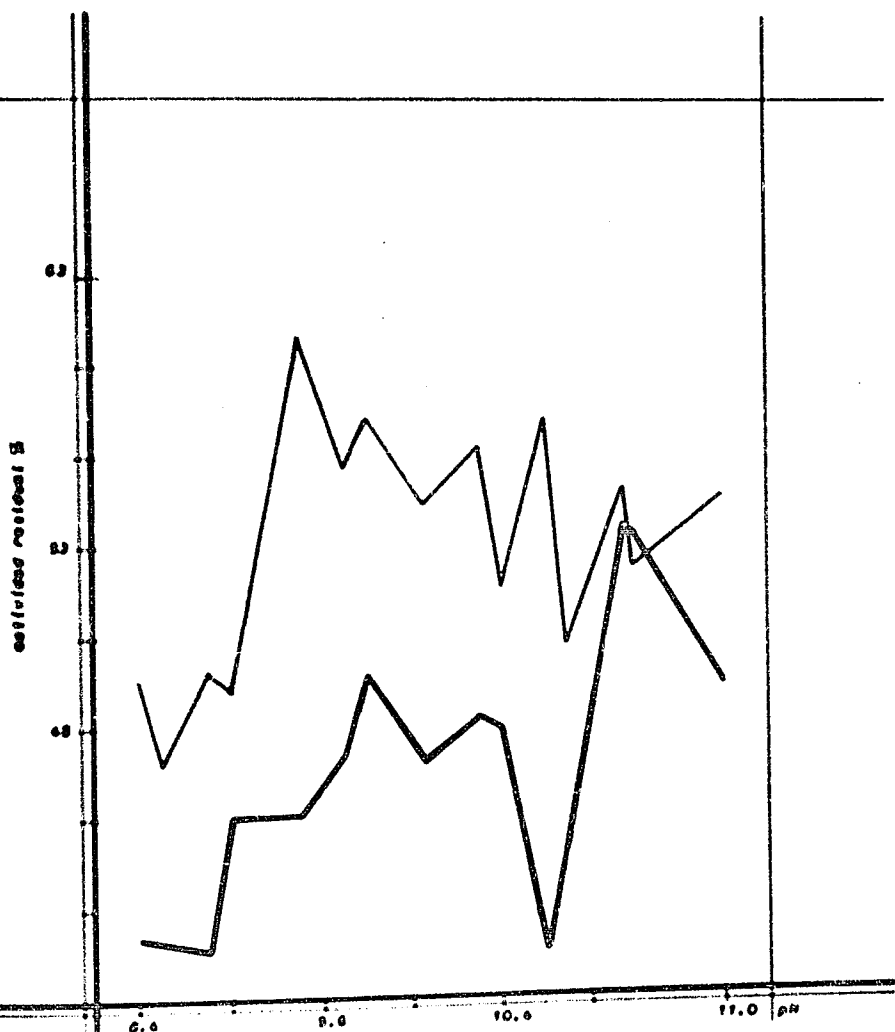


Figura 13. - Efecto desnaturalizante de la temperatura sobre los análisis de Algas y Mariscos a diferentes pH.

algas ———
 mariscos - - - -

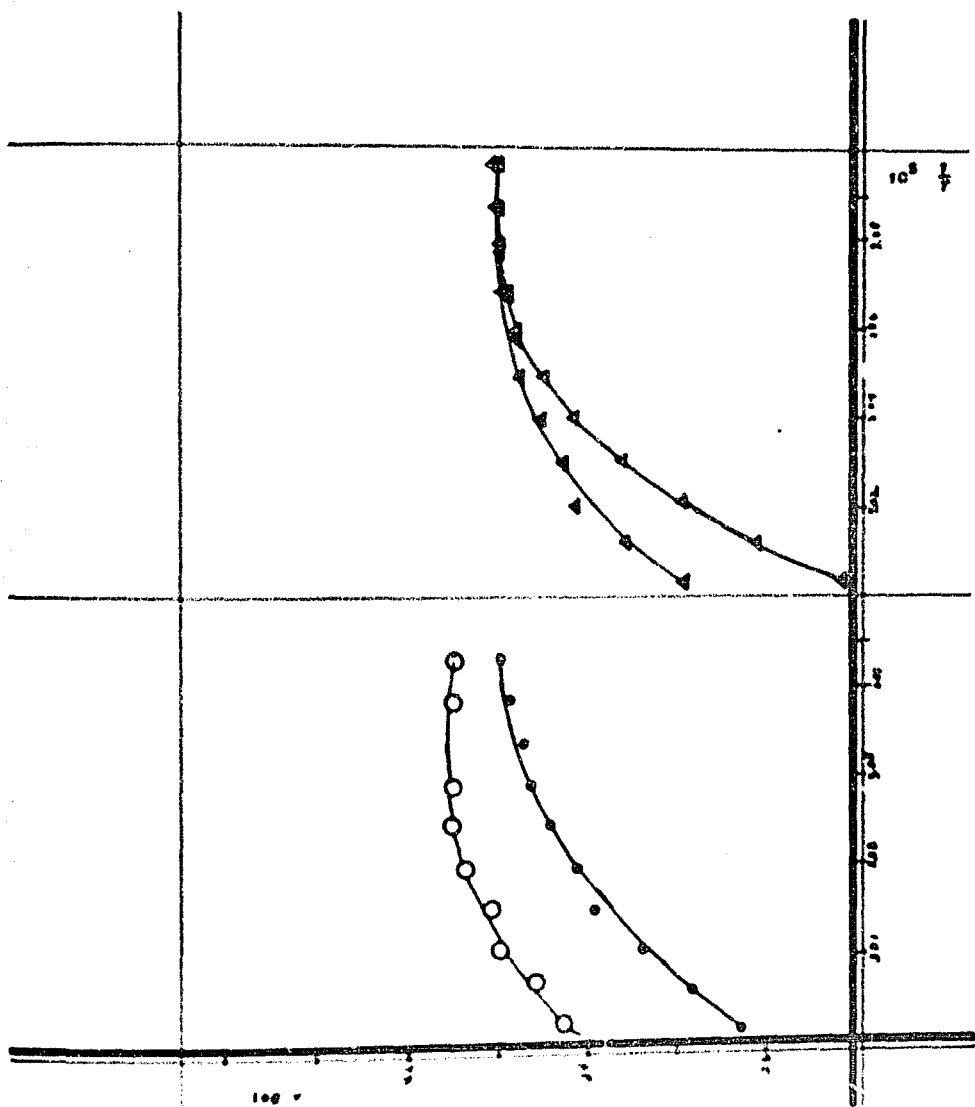


Figura 10.- Energía de conversión de los ensayos de Almonds y Avosco antes y después de ser cronotografados.

Avosco antes	△ △ △	Almonds antes	○-○-○
Avosco después	◇ ◇ ◇	Almonds después	○-○-○

BIBLIOGRAFIA

1.- Plagemann, P.G.W., Gregory, K.F. y -
Wroblewski, F.A.

J. Biol. Chem. 235:2288 (1960)

2.- Laudan, W. y Schlemowitz, M.
Arch. Biochem. Biophys. 95:474 (1961)

3.- Bodansky, O. Summary of Panel discussion on clinical significance of enzymes blood
Ann. N.Y. Acad. Sci. 75:360-4 (1958).

4.- Franklin, M. Liver function Tests
Medical Clinics of North America 44 -
No. 3 (1960)

5.- Schlemowitz, M. y Bodansky, O.

J. Biol. Chem. 236:1433 (1959)

6.- Fahey, J.L. Mc. Cay, P.F. y Coulfan

M.

J. Clin. Invest. 37:272 (1958)

7.- Rosenberg, I.N.

J. Clin. Invest. 38:630 (1959)

8.- Bodansky, O.

J. Biol. Chem. 179:81 (1949)

9.- Hone, D.W., Campbell, M.D., Koberas

E.A. y King, E.J.

Biochem. J. 81:441 (1961)

10.- Hisselbaum, J.S. y Bodansky, O.

J. Biol. Chem. 235:401 (1961)

11.- Vercot, E.S. y Deam, A.G.

Ann. N.Y. Acad. Sci. 79:205 (1958)

12. - Marks, P.A., Szolberg, A. y Banks,

J.

J. Biol. Chem. 236:10 (1961)

13. - Gordillo, C.F. Estudios comparativos de las células de Bodansky y Bessoy Lowry y Franck para emitir actividad de fosfatasa alcalina. Tesis de maestría (1961)

Universidad Autónoma, México, D.F.

14. - Alfaro, A.N. La(s) fosfatasa(s) - nitrato(nas) del suero humano y su procedencia tisular. Tesis de maestría (1961)

Universidad Autónoma, México, D.F.

15. - Navarrete, J.G. Diferenciación etnológica de las fosfatasa alcalinas del suero y su importancia en el diagnóstico clínico. - Tesis de maestría (1962)

Universidad Panamericana, México, D.F.

16. - Torres, J. y Sandoval, G. Estudio crítico de la fosfatasa alcalina del plasma humano (determinación preoperatoria en la primera reunión anual de la Sociedad Mexicana de Singulaciones). México, D.F. febrero de 1962.

17. - Torres, J.G. Estudio crítico de los métodos de la fosfatasa alcalina de hipotesis y

hueso humanos.-I.- Influencia del pH y la temperatura sobre las velocidades máximas y la Constante de Michaelis.- Tesis receptoral (1962)

Ciencias Químicas U.N.A.M. México, D.F.

18.- Vaca, M. Estudio cinético de las isozimas de la fosfatasa alcalina de hígado y hueso humanos.-III.- Comportamiento de las mezclas de isozimas y efecto de la adición de suero humano.

Trabajo por publicarse.

19.- Estoban, M.J. Estudio de las fosfatases alcalinas ósea y hepática del suero. Su importancia diagnóstica.

Trabajo por publicarse.

20.- Chiandrossi, L., Sally, F., Green y Sherlock, S. Serum Phosphatase Fractions in Hepato-Biliary and Bone Diseases.

Clin. Sci. 22:425-36 (1962)

21.- Becker, K.L., Stauffer, M.H. Evaluation of concentrations of serum alkaline phosphatase in hepatitis an obstructivo jaundico.

Amer. J. Med. Sci. 236:222-7 feb. 1962

22.- Sherlock, S.

Clin. Sci. 22:425 (1962)

23.- Nicosta, U., Paronzi, G. Study of the plasmatic proteins and of alkaline phosphatases

in some bone diseases.

Chir. Organ Mov. 49:381-9 (1960)(It)

24.- Dent, C.E. y Harper, C.M. Plasma - alkaline phosphatase in normal adults and in patients with primary hyperparathyroidism.

Lancet 1:559-63 17 Mar 1962

25.- Bossay, O., Lowry, O.H. y Brock, M.J.

J. Biol. Chem. 164:321 (1946)

26.- Dixon, M. y Webb, E.C., *Enzymes* - pag. 151. Longmans Green and Co. L.T.D. Londres - 1958

27.- Bodansky, O.

J. Biol. Chem. 101:93 (1933)

28.- Nisselbaum, J.S., Schlamowitz, M. y Bodansky, O. *Immunochemical studies of functionally similar enzymes.*

Ann. N.Y. Acad. Sci. 94:970-81 (1961)

29.- Drill, V.A., Annorgora, J.H. y Foy, A.C. *Effect of cyanido fluorido and magnesium on serum phosphatase activity during hepatic damage.*

J. Biol. Chem. 152:339 (1944)

30.- Bodansky, O. *The influence of magnesium and cobalt on the inhibition of phosphatase of bone intestine and otrogenic systems by amino - acids.*

J. Biol. Chem. 179:81 (1949)

31.- Schlamowitz, M. y Bodansky, O. Tissue sources of human serum alkaline phosphatase as determined by immunochemical procedures.

J. Biol. Chem. 234:143 (1959)

32.- Schlamowitz, M. Immunochemical studies on alkaline phosphatase.

Am. N.Y. Acad. Sci. 75:373 (1958)

33.- Klendshoj, N.C. y Koopf, G.F.

J. Clin. Endocrinol. 3:351 (1943)

34.- Woodard, H.O.

Cancer 9:352 (1956)

35.- Kewlensar, O.D., Port, J.M., Neeffner, L.J. y Sletsenger, M.H. Localization of 5'-nucleotidase auden, specific alkaline phosphatase by starch gel electroferesis.

Proc. Soc. Exp. Biol. & Med.

36.- Kolding, N.R. Differentiation into three fraction of the serum alkaline phosphatase and the behaviour of the fractions in diseases of bone and liver.

Scand. J. Clin. & Lab. Invest. 11:106

(1959)

37.- Marton, R.K. Phosphatase alkaline

kinetics of hidrolisis of pheny-phosphate.

Biochim. J. 65:674 (1957)

38.- Horden, M. E. y Herbert, M. The effect of magnesium on upon the alkaline phosphatase activity in the thyroid of the hypophysectomized rat.

J. Biol. Chem. 204:977 (1953)

39.- Ahmed, Z. y King, J. E. Kinetics of placental alkaline phosphatase.

Biochim. Biophys. Acta 45:581-82 (1960)

40.- Ross, M. N., Ely, J. O. y Arch, J. C. A Alkaline phosphatase and pH optima.

J. Biol. Chem. 192:561 (1951)

41.- Vesuu, E. S. y Bean, A. G. The heterogeneity of lactic and malic dehydrogenase.

Ann. N.Y. Acad. Sci. 75:286 (1958)

42.- Hono, D. P., D. P. N. Dependent enzyme in serum.

Ann. N.Y. Acad. Sci. 75:292 (1958)

43.- Elliot, S. Vossell y Doarn, G.

Ann. N.Y. Acad. Sci. 207:325 (1958)

44.- Grot, Man. A. B., Warrinck, R. R. y Gutmann, E. B. Phosphorylative glycogonolysis and calcification in cartilage.

Science 95:461 (1942)

45.- Gutman, A.B., Olson, K.B., Gutman, E. B. y Flood, C.S. *Effect of diseases of the liver - and biliary tract & upon the phosphatase activity- of the serum.*

J. Clin. Invest. 19:129 (1940)

46.- Newman, W.R., Distefano, V. y Hylan- yan, B.J.

Fed. Proc. 10:220 (1951)

47.- Ross, M.H., Ely, V.O. y Archer, V.G. *Alkaline phosphatase activity and pH optima.*

J. Biol. Chem. 62:551 (1951)

48.- Wechslein, M. y Zak, F.G. *Histoche- mical distribution of alkaline phosphatase in dog liver after experimental biliary obstruction.*

Proc. Soc. Exper. Biol. and Med. 62: 73 (1946)

49.- Gomori, G., *Microscopic microche- mistry. Principle and Practice.*

University of Chicago Press. Chicago
1952

50.- Sanford, H.J. *The effect of food injection on intestinal and serum alkaline phospha- tase.*

J. Biol. Chem. 190:553 (1952)

51.- Pollak, V.E., Bonting, S.L., Hueltreke, R.C. y Kark, R.N. Quantitative histochemistry - of the nephron.

J. Clin. Invest. 39:1386 (1960)

52.- Dixon, A. Phosphatase effect of - pH on Michaelis constants.

The Biochem. J. 55:162 (1953)

53.- Fruton, J.S. y Simmonds, S. General Biochemistry John Wiley and Sons Inc. Nueva York 1957

54.- B. Chance Enzyme-substrate compound, Advances in Enzymology 12:153 (1951)