

21:21



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

**ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES
" Z A R A G O Z A "**

**DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DE LA
FOSFATASA ALCALINA PLACENTARIA
DURANTE EL EMBARAZO.**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO**

**P R E S E N T A :
MARIA DEL SOCORRO LAREDO DOMINGUEZ**



México, D. F.

Mayo, 1988

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



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 está 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.

I N D I C E

Página

CAPITULO I

Introducción	1
--------------	---

CAPITULO II

Generalidades	
II.1 Desarrollo del embarazo	4
II.2 Principios de enzimología clínica	7
II.3 Fosfatasa alcalina	12
II.4 Fosfatasa alcalina placentaria	19

CAPITULO III

III.1 Planteamiento del problema	31
III.2 Objetivos	33
III.3 Hipótesis	34

CAPITULO IV

IV.1 Material y equipo	35
IV.2 Reactivos	35
IV.3 Población de estudio	36

CAPITULO V

Metodología

V.1 Obtención de muestra	37
V.2 Método para fosfatasa alcalina	37
V.3 Método de fosfatasa alcalina placentaria	40

CAPITULO VI

Resultados	47
------------	----

CAPITULO VII

VII.1 Discusión de resultados	63
VII.2 Conclusiones	66
VII.3 Propuestas	67

CAPITULO VIII

Bibliografía	68
--------------	----

I. INTRODUCCION

El hombre desde un principio ha tenido que enfrentarse a cuatro fenómenos importantes: nacer, crecer, reproducirse y por último morir. De estos, uno de ellos le ha interesado desde épocas muy remotas: la capacidad de reproducirse. En el hombre este proceso de reproducción se denomina embarazo. Muchas veces a lo largo de este proceso se observan alteraciones, y en otras todo transcurre de manera normal.

Considerando el embarazo como un estado fisiológico especial en el cual ocurren cambios anatómicos, fisiológicos y bioquímicos, con la "Enzimología Clínica" se ha estudiado la variación de los niveles de actividad de diferentes enzimas en la sangre, líquido amniótico y la orina, durante este periodo.

Muchos han sido los estudios con diversos objetivos tales como encontrar un índice enzimático de madurez fetal (1), delucidar el papel de algunas enzimas del líquido amniótico en los mecanismos del desarrollo embrionario (2), esclarecer algunas anomalías genéticas, y especialmente, correlacionar niveles enzimáticos con estados patológicos agregados al embarazo. (3,4,5)

Las enzimas producidas durante el embarazo, se agrupan de acuerdo a su variación durante dicho estado fisiológico. De esta manera se encuentran enzimas cuya actividad aumenta, disminuye o no varía. (6,7)

Algunas de las enzimas que se elevan en la sangre materna son la beta-Glucoronidasa (E.C. 3.2.1.31), Lactato deshidrogenasa (E.C. 1.1.1.27), la Histaminasa (E.C.1.14.3.6), Fosfatasa alcalina placentaria (E.C. 3.1.3.1), Ocitocinasa (E.C. 3.4.1.1).

Entre las enzimas que no varían durante el embarazo se encuentran la Aspartato aminotransferasa (E.C. 2.6.1.1), Alanina aminotransferasa (E.C. 2.6.1.2), Glutamato deshidrogenasa (E.C. 1.4.1.3), Isocitrato - deshidrogenasa. (E.C. 1.1.1.41), Ornitina carbamoil transferasa (E.C. 2.1.3.3), Malato deshidrogenasa (E.C. 1.1.1.33). Todas estas enzimas tienen en común el ser útiles en el diagnóstico de enfermedades hepato biliares. La alfa-amilasa (E.C.3.2.1.1) y la lipasa (E.C. 3.1.1.3) - tienen valor diagnóstico en las enfermedades pancreáticas y tampoco varían en la sangre materna durante el embarazo normal.

Algunas de las enzimas que se encuentran disminuidas en el embarazo normal son la Gamma-glutamil-transferasa (E.C. 2.3.2.2), la Colinesterasa (E.C. 3.1.1.8) y la Creatina cinasa (E.C. 2.7.3.2).

La fosfatasa alcalina placentaria (E.C. 3.1.3.1) y la Ocitocinasa (E.C. 3.4.1.1) son enzimas consideradas como específicas del embarazo debido a que son sintetizadas por la placenta. Esto ha permitido sugerir que la elevación progresiva de su actividad en la sangre materna pueda interpretarse como índice de un crecimiento placentario normal.(8,9)

En el presente trabajo se determina la actividad de la fosfatasa alcalina total, así como de la isoenzima placentaria durante el embarazo. Los resultados obtenidos indican que dicha enzima aumenta progresivamente, aunque este incremento se acentúa notoriamente al final del embarazo.

Se proponen valores normales para la enzima en los diferentes trimestres del embarazo, pensando que quizá sea de utilidad para detectar anomalías en la placenta en el periodo gestacional.

II - GENERALIDADES

II.I - Desarrollo del embarazo

El embarazo es un estado temporal en el que se presentan cambios anatómicos y fisiológicos que ocurren secuencialmente y comprenden la fertilización, la implantación, el crecimiento embrionario y el crecimiento fetal que termina en el parto.

Durante la fertilización en la tuba uterina se unen el núcleo del óvulo y del espermatozoide para formar el cigoto del cual, por divisiones celulares, se origina la mórula que a su vez se transforma en una bolsa hueca de células diferenciadas denominada blastocito.

La segunda etapa, la implantación, ocurre una semana después de la fertilización cuando el blastocito se une a la capa interior del útero llamada endometrio, a fin de absorber nutrientes de los vasos sanguíneos.

El blastocito está constituido por dos estructuras, el trofoblasto que rodea al embrión y el macizo celular interno que forma una cavidad.

El blastocito continúa dividiéndose y diferenciándose formando tres capas germinales, el ectodermo, endodermo y mesodermo; a partir

de ellas se formarán los tejidos y membranas embrionarias. A esta etapa se le llama crecimiento embrionario y se caracteriza especialmente porque comienzan a formarse el líquido amniótico y la placenta. (10)

A medida que el embrión crece, una de las membranas (el amnios) - rodea completamente el embrión y se llena de líquido en el cual el producto en gestación quedará inmerso, lo protegerá manteniendo la temperatura constante, previniendo la desecación y recibiendo la presión de las contracciones del útero durante el parto. (11)

El crecimiento del embrión abarca hasta los dos primeros meses - del embarazo, posteriormente el producto se llamará feto y continuará el crecimiento fetal. En esta etapa maduran los tejidos embrionarios hasta constituir todos los órganos del cuerpo y finalizar el desarrollo de la placenta al tercer mes de gestación. (12)

Placenta.- La placenta es un órgano que se desarrolla durante el embarazo en el endometrio uterino. Una vez desarrollada tiene forma - de pastel, de unos 15 cm. de diámetro, 3 cm. de espesor y con un peso de 500 grs. Básicamente es de origen fetal. Su función primaria es - permitir que las sustancias disueltas en la sangre del feto difundan - hacia la sangre de la madre y viceversa. Su disposición estructural - permite que esto se produzca en alto grado. En condiciones normales, la sangre del feto y la sangre de la madre no se mezclan ni entran en

contacto una con otra. Siempre quedan separadas por lo que se denomina barrera placentaria; esta es una membrana compuesta por varios tejidos como son el citotrofoblasto, sincitiotrofoblasto que contiene microvellosidades, tejido conectivo y endotelio capilar.

En la placenta, se difunden alimentos y oxígeno, disueltos en la sangre materna, a través de la barrera placentaria hacia el torrente vascular del feto, y gracias a ello se asegura la vida y el crecimiento y desarrollo de éste, hasta el momento del nacimiento.

Formación de la placenta. El trofoblasto del blastocito se fija a la superficie libre del epitelio endometrial. Al undécimo día después de la fertilización las células del trofoblasto se han dividido y forman dos capas, la interna denominada citotrofoblasto, y la capa externa denominada sincitiotrofoblasto. En esta etapa hay en el sincitio unos espacios pequeños denominados lagunas, llenas de sangre de las venas uterinas, cuando las lagunas aumentan de volumen las tiras de trofoblasto que quedan entre ellas se denominan vellosidades trofoblásticas primarias. Cada vellosidad está formada por un núcleo de citotrofoblasto revestido de una capa irregular externa de sincitiotrofoblasto. Por otro lado en el embrión se están formando las diferentes capas germinativas, y el mesodermo ha crecido saliendo del embrión en desarrollo hasta formar una cubierta para el trofoblasto que rodea el blastocito. Cuando el trofoblasto ha quedado cubierto de mesodermo recibe

el nombre de corión. Posteriormente el mesodermo del corión penetra en las vellosidades para proporcionarle núcleos mesodérmicos. Cuando esto ocurre, las vellosidades reciben el nombre de vellosidades secundarias o definitivas, éstas crecen y se ramifican. De los núcleos del mesodermo se desarrollan vasos sanguíneos fetales, más tarde estos vasos se unen con la circulación del feto.

En el endometrio que queda entre el blastocito y el miometrio recibe el nombre de placa basal y es en este lado del blastocito donde se desarrollará la placenta a partir del corión. Esto se logra porque las vellosidades a este nivel siguen creciendo y ramificándose, al hacerlo continúan destruyendo y atravesando cada vez más endometrio. Como las lagunas que quedan entre las vellosidades están llenas de sangre materna, y los capilares de las vellosidades contienen sangre fetal pueden producir difusión de sustancias disueltas entre la sangre materna de los espacios lagunares y la sangre fetal de los capilares de las vellosidades (cotiledones). Lo antes descrito tiene por consecuencia una formación estructural de dimensiones crecientes que se conoce como placenta.

II.2 Principios de Enzimología Clínica

Las enzimas son catalizadores macromoleculares con la propiedad característica de acelerar y regular una multitud de reacciones químicas.

cas sobre las cuales se basan todas las formas de vida. La actividad metabólica de las células depende de que las enzimas actúen en forma ordenada y progresiva. (13)

Las enzimas puesto que son compuestos protéicos pueden presentar las siguientes estructuras:

- Estructura primaria, secuencia de aminoácidos de una proteína.
- Estructura secundaria, enrollamiento de la cadena de aminoácidos de una enzima en una relación estérica semifija.
- Estructura terciaria, plegamiento de la cadena de aminoácidos de una enzima para formar una estructura tridimensional.
- Estructura cuaternaria, es la asociación de subunidades semejantes o diferentes de la proteína en oligómeros (polímeros pequeños), y pueden sufrir cualquiera de estos procesos: a) desnaturalización, pérdida de las propiedades biológicas de una proteína, generalmente como consecuencia de cambios en su estructura terciaria y cuaternaria. b) Inactivación, desnaturalización reversible de una proteína.

El nombre de isoenzima, se usa para aquellas enzimas que aunque retengan su especificidad de sustrato, muestran diferencias en sus propiedades físicas y químicas. (14)

De manera general se denomina sustrato a el o los compuestos que inician la reacción y sobre el cual actúa la enzima, y productos a el o los resultantes de la reacción.

Un catalizador modifica la velocidad de una reacción sin tomar parte en ella, actúa por presencia. En el caso de las enzimas es necesaria la formación de un complejo enzima-sustrato para que se desencadene la acción; al separarse la enzima queda en posibilidad de actuar otra o varias veces más. (15)

Complejo enzima-sustrato es un complejo activo intermedio formado entre el sustrato y la enzima durante la reacción.

Las enzimas se componen de varias partes o fracciones: Tienen una fracción protéica de gran peso molecular que no atraviesan las membranas semipermeables y que se destruye por el calor; esta fracción se llama apoenzima y otra de naturaleza no protéica que se adhiere a la proteína y que es dializable (atraviesa membrana semipermeable), denominada coenzima. Si esta parte dializable está íntimamente unida a la apoenzima, se le llama grupo prostético. En el caso de que la unión sea laxa, se sigue llamando coenzima. La unión de la apoenzima y la coenzima se denomina haloenzima. Las enzimas que contienen iones metálicos unidos muy fuertemente se llaman metaloenzimas.

Se denomina actividad enzimática a la cantidad de sustrato convertida en producto por unidad de tiempo, para una reacción en particular y en determinadas condiciones. Unidad internacional de actividad enzimática es la cantidad de enzima que cataliza la conversión de un micromol de sustrato por minuto en determinadas condiciones.

Las enzimas son específicas, es decir, catalizan una reacción determinada con sustancias de estructura siempre igual: son como una complicada llave que sólo pueden abrir la cerradura correspondiente. La especificidad enzimática es el grado en el cual una enzima cataliza una o más reacciones. Especificidad estereoisométrica es la especificidad de una enzima por una de las formas, D o L, de un compuesto con un átomo de carbono asimétrico.

Así como presentan especificidad, también tienen inhibición. Se denominan inhibidores, a los materiales que reducen la actividad catalítica de una enzima, existiendo dos tipos: Inhibidor competitivo, inhibidor de una reacción enzimática que compite con el sustrato por el sitio activo. Inhibidor no competitivo, inhibidor que se fija al sitio alostérico de una enzima y no compite con el sustrato por el sitio activo. Inhibidor que se fija sólo al complejo enzima-sustrato y no a la enzima libre.

Prácticamente todos los cambios químicos (absorción, digestión, me

tabolismo, locomoción, putrefacción, etc.) que ocurren en un organismo viviente son acelerados por las enzimas (catalizadores). Sin estos catalizadores las reacciones avanzan muy lentamente e impiden que los sistemas biológicos funcionen a una velocidad significativa. La principal característica de la acción enzimática es la catálisis. Una enzima simplemente aumenta la velocidad de la reacción sobre la cual actúa. La enzima no afecta la constante de equilibrio ni es obtenida como resultado de la reacción.

Hay varios factores que afectan la velocidad con que se lleva a cabo una reacción catalizada por enzimas. Algunos de ellos son:

- a. Temperatura. Las velocidades de todas las reacciones químicas aumentan con un incremento en la temperatura. La mayor parte de las enzimas tienen una temperatura óptima, es decir, aquella en la cual catalizan con una velocidad máxima.
- b. pH. La actividad de la mayoría de las enzimas depende del pH debido a la participación de iones H^+ o iones OH^- en la reacción. Para la mayoría de las enzimas existe un intervalo definido de pH en el cual la enzima es más activa. el pH cercano al centro de dicho intervalo es el habitualmente especificado para la determinación de esa enzima en particular.

- c. Amortiguador. En muchos casos, al progresar la reacción enzimática, los productos tienden a alterar el pH. La mayoría de los ensayos incluye un amortiguador para mantener el pH dentro de un intervalo óptimo.
- d. Concentración de la enzima. La velocidad de reacción aumenta en proporción directa a la concentración de la enzima que la cataliza, lo cual sugiere que la interacción enzima-sustrato cumple la ley de acción de masas.
- e. Concentración de sustrato. Para una concentración fija de enzima la velocidad inicial (antes de que se consuma bastante sustrato) aumenta primero incrementando la concentración de sustrato. Con el tiempo se alcanza un máximo y la adición de más sustrato ya no influye sobre la velocidad.
- f. Presencia de inhibidores. Se puede disminuir la velocidad de la mayoría de las reacciones catalizadas por enzimas por medio de una serie de sustancias llamadas genéricamente inhibidores.

(16)

II.3 Fosfatasa alcalina

Las fosfatasas alcalinas humanas constituyen un sistema de múlti-

ples formas moleculares de enzimas en las cuales la heterogenicidad es parcial debida a factores genéticos.

El reconocimiento de la naturaleza y aparición de estas múltiples formas, hicieron una significativa contribución al conocimiento de que cambian los valores de la fosfatasa alcalina del suero en algunas enfermedades y que podría utilizarse la medición de ésta como diagnóstico. (17)

La importancia de la valoración de la fosfatasa alcalina (fosfohidrolasa alcalina del monoéster orto-fosfórico, E.C. 3.1.3.1.) no ha decrecido durante medio siglo, desde la introducción de la enzimología en el diagnóstico; claro, el desarrollo de múltiples parámetros bioquímicos ha consolidado su posición, entre las más frecuentes pruebas llevadas a cabo en química clínica. La determinación de las fosfatasas alcalinas inicialmente fueron aplicadas en la investigación de las enfermedades óseas, apoyándose en la teoría establecida por Robison y otros, por medio de la demostración de la asociación entre el incremento de la actividad de la fosfatasa alcalina en suero y el aumento de la actividad osteoblástica. (18) En contraste, Roberts en 1930 observó que el incremento de la actividad de la fosfatasa alcalina en suero es acompañada de enfermedades hepatobiliares. (19)

Los intentos por proporcionar una satisfactoria explicación para estos cambios es el esfuerzo de muchos enzimólogos por varios años.

Se propusieron varias teorías sobre el origen del aumento de la fosfatasa alcalina del suero; para enfermedades hepatobiliares se propuso la teoría hepatogenética, en la cual el hígado mismo fue considerado el origen de la enzima adicional, erróneamente esta teoría fue rechazada puesto que se decía que la causa del incremento de la actividad de la fosfatasa alcalina era de tejidos extrahepáticos, especialmente huesos, o el resultado de una obstrucción biliar. (20) Ellos sugerían que la fosfatasa alcalina ósea estaba presente siempre y en el caso de enfermedades óseas o hepáticas sufría una modificación.

Posteriormente se aceptó que la teoría hepatogenética era correcta, y se propuso la existencia de tejidos especiales que producían la enzima, esto proporcionó una base para el diagnóstico diferencial.

La introducción de Smithier en 1955 de la técnica de electroforesis sobre gel de almidón es un importante instrumento analítico, para corroborar la presencia de las fosfatasas alcalinas del suero en algunos tejidos.

Además de estos estudios, se demostró la presencia de la fosfatasa alcalina intestinal en algunos sueros de personas normales y en pacientes con varias enfermedades; también fue identificada la fosfatasa alcalina placentaria en el suero de embarazos normales. Enteramente imprevisto fue el descubrimiento de la presencia de la isoenzima pla-

centaría en pacientes con cáncer (21) pero después se descubrió que no es isoenzima placentaria sino fosfatasas de otros tejidos que sufren modificaciones y es llamada isoenzima de Regan (o carcinoma-placentaria) debido a que así se llamaba la persona en la que se descubrió por primera vez esta isoenzima.

La isoenzima de Regan y la placentaria presentan las mismas propiedades físicas por eso se presta a confusión. En zimogramas electroforéticos presentan la misma migración, ambas son resistentes a la inactivación a 56°C. Algunas veces esta isoenzima carcinoma-placentaria puede ser indistinguible de la fosfatasa alcalina placentaria original. (22)

Evidencias presentadas en años recientes suponen la existencia de tres genes diferentes para las fosfatasas alcalinas humanas. Un gen codifica para la fosfatasa alcalina intestinal, un segundo gen para la isoenzima placentaria y un tercer gen codifica para las isoenzimas hepática, ósea y renal. Las diferencias estructurales observadas en el tercer grupo, que producen una alteración en la movilidad electroforética y también su estabilidad al calor, se atribuye a diferentes modificaciones post-traduccionales. (23)

El suero de sujetos sanos casi siempre contiene más de una forma de fosfatasa alcalina detectable por electroforesis o por técnicas de inactivación selectiva. La fosfatasa ósea y hepática siempre están -

presentes, aunque en mayor cantidad la ósea. La isoenzima intestinal puede o no estar presente, es más probable que se encuentre en individuos de grupos sanguíneos B y O ya que son secretores positivos. (24)

La fosfatasa alcalina de origen renal no aparece en el suero de individuos sanos, ésta única y raramente se presenta en enfermedades renales, sin embargo puede ser notada en algunos casos, durante el rechazo de trasplantes renales. (25)

La ubicación celular de la fosfatasa alcalina se ha investigado mediante el fraccionamiento de componentes subcelulares por ultracentrifugación, y posteriormente examen citoquímico y microscopía electrónica. De estos resultados se puede concluir que la mayor actividad de la fosfatasa alcalina en casi la totalidad de las células estudiadas, se localiza sobre la membrana citoplasmática. No obstante, en otros sitios intracelulares, tales como el núcleo y el aparato de Golgi, se ha demostrado también actividad enzimática, aunque en menor cantidad. (24)

Estudios de fraccionamiento subcelular de varios tejidos de cultivos celulares (26) y varios órganos (27) revelaron que la mayor actividad enzimática se localiza en la fracción microsomal. En ésta se encuentra una mezcla de vesículas derivadas de varios sistemas citomembranosos, incluyendo membrana plasmática, retículo endoplásmico endotelial rugoso, liso y el aparato de Golgi.

No se conoce la función precisa de la fosfatasa alcalina, no obstante, su localización en la membrana sugiere que puede estar involucrada en las funciones de absorción y de transporte (28). El mecanismo de como la fosfatasa alcalina participa en los procesos fisiológicos es también desconocido.

Se sabe que la actividad de las isoenzimas de la fosfatasa alcalina, aumenta o disminuye en el suero sanguíneo cuando en los órganos donde se producen, existe alguna patología que lesione la membrana o bien ocasione lisis celular.

La inactivación por calor y la desnaturalización con urea, son técnicas que se han utilizado para diferenciar las isoenzimas de la fosfatasa alcalina. (29) Las fosfatasas ósea, intestinal y hepática son sensibles a la inactivación por calor a la temperatura de 56° C, mientras que la placentaria es resistente.

Uno de los mayores avances en el estudio de las isoenzimas de la fosfatasa alcalina fue el descubrimiento de inhibidores específicos.

Un tema de investigaciones extensas ha sido la cinética de varios de estos inhibidores. Dichas cinéticas incluyen la inhibición de la fosfatasa alcalina intestinal por L-fenilalanina (30); la fosfatasa alcalina placentaria por L-triptofano (31), teofilina (32), L-leucina (33)

y también por L-fenilalanina; la fosfatasa alcalina ósea y hepática por L-homoarginina, por imidazol y por levamisol. (34) Dichos resultados han demostrado que todas estas inhibiciones son estereo específicas e incompetitivas.

También se han probado diferentes sustratos y condiciones de reacción para medir su actividad, como son: (36)

ENSAYO	REACCION	AMORTIGUADOR	PH
Bodansky (1933)	glicerofosfato ---/glicerol + HPO ₄	Barbital	8.6
Shinowara-Jones Reinhart (1942)	glicerofosfato ---/glicerol + HPO ₄	Barbital	9.6
Kind-King (1954)	fenilfosfato ---/ fenol + HPO ₄	Carbonato	9.6
Babson (1966)	monofosfato de fenilalanina + HPO ₄	2-amino-2-me- til-1-propanol	9.9
Bessey-Lowry- Brock (1946)	p-nitrofenil fosfato ---/ p-nitrofenol + HPO ₄	Glicina	10.3
Bowers-McComb (1966)	p-nitrofenil fosfato ---/ p-nitrofenol + HPO ₄	2-amino- 2-metil- 1-propanol	10.2 10.3
Bowers-McComb (1972)	p-nitrofenil fosfato ---/ nitrofenol + HPO ₄	dietanol- amina	10.3

II.4 Fosfatasa alcalina placentaria

Ciertos trabajos realizados en Francia en 1939, descubrieron que durante el embarazo se incrementa la actividad de la fosfatasa alcalina del suero, (36,37). La razón de este incremento en la actividad enzimática, estuvo sujeta a considerable especulación. Algunas teorías fueron propuestas, una de ellas sugiere que este incremento se debe a un aumento en la actividad osteoblástica de la madre (38); otra propuso el paso de la enzima osteoblástica fetal a la circulación materna.(39) Finalmente, Jung-Sterk y Klees-Frenzel sugirieron que la fosfatasa alcalina adicional es de origen placentario. (40)

Beck y Clark fueron los primeros investigadores que diferenciaron la fosfatasa alcalina placentaria de las otras fosfatasas utilizando como inhibidor taurocolato de sodio y concluyeron que el incremento de la enzima en el suero durante el embarazo es debido a un material taurocolato resistente. (41)

Seelich-Ehrlich y Anagnospoulos-Matsudaira, descubrieron que la placenta humana es una rica fuente de fosfatasa alcalina cuando se purifica. (42)

Boyer, reportó que en electroforesis de Gel de almidón, la fracción de la fosfatasa alcalina del suero de mujeres embarazadas migra -

en la misma zona que la fosfatasa alcalina obtenida a partir de placenta humana. Este trabajo viene a reforzar la teoría de que el aumento de la actividad de la fosfatasa alcalina del suero de mujeres embarazadas es de origen placentario. Mediante esta técnica se observa que la enzima placentaria no se encuentra en el suero de recién nacidos, ni en cordón umbilical. (43) La razón para este aparente comportamiento paradójico de la sustancia placentaria, que aparece en la circulación materna y no en la fetal, no es enteramente clara.

Con técnicas histoquímicas se demuestra la presencia de actividad enzimática de la fosfatasa alcalina en las microvellosidades del sincitiotrofoblasto de la placenta, que están en contacto con la circulación materna, y que están separadas de la circulación fetal por numerosas estructuras. (44) Es posible que el material derive de las microvellosidades y tenga gran acceso a la circulación materna y poca o nada a la fetal. Una segunda posibilidad es que el incremento progresivo de trastornos del feto, haga que ocurra una disminución de fosfatasa alcalina placentaria en la circulación fetal.

McMaster y colaboradores descubrieron un método simple para diferenciar fosfatasa alcalina de origen placentario y no placentario. Ya que al contrario de las fosfatasas de otros orígenes, la enzima placentaria no es afectada por el calentamiento a 56°C por quince minutos. (45)

Estudios inmunológicos apoyan la teoría de la contribución de la placenta en la producción de fosfatasa alcalina durante el embarazo. - Los anticuerpos se obtienen inyectando placenta purificada como antígeno a los conejos. (46, 24)

Las isoenzimas intestinal y placentaria de la fosfatasa alcalina presentan algunas propiedades químicas similares como son inhibición con L-fenilalanina en un 80% (47), resistencia a la inhibición con urea 3M y una parcial reacción cruzada por sus respectivos anticuerpos; en esto último hay un poco de controversia ya que algunos autores reportan que hay reacción cruzada y otros que no la hay. (48, 49, 50) - Las fosfatasas alcalinas humanas de placenta e intestino tienen un peso molecular de 130,000 y 170,000 respectivamente. La isoenzima placentaria es un dímero que presenta dos subunidades con un P.M. de 65,000; la isoenzima intestinal posee también dos subunidades con un P.M. de 86,000.

La composición de cada aminoácido de la fosfatasa alcalina placentaria, varía del de la fosfatasa alcalina intestinal, lo que indica que su estructura primaria es diferente, esto se debe a que el control genético fue distinto, desde el momento en que el origen tisular es diferente. Los glucosaminos están contenidos en ambas partes aunque en menor cantidad en la intestinal. La cantidad de carbohidratos contenidos en ambas enzimas es también diferente.

La electroforesis de las dos enzimas en gel de acrilamida indica que presentan diferente movilidad. Esto se debe a que la isoenzima placentaria contiene ácido sialico y la intestinal no, esto fue comprobado con el tratamiento con neuroaminidasa ya que la isoenzima placentaria es sialidasa sensible. (51, 24)

La síntesis de la isoenzima de la fosfatasa alcalina placentaria es codificada por un locus particular que presenta variantes alélicas. Boyer utilizando electroforesis en gel de almidón identificó tres bandas para la isoenzima placentaria: una banda tipo A la cual es usualmente observada en mujeres blancas; la tipo B, que es la responsable del incremento de la fosfatasa alcalina total en las mujeres durante el embarazo; y una tipo D, que es observada en mujeres negras. (47)

Trabajos recientes reportan que se pueden obtener anticuerpos monoclonales que son capaces de discriminar entre sí las diferentes aloenzimas de la fosfatasa alcalina placentaria, estas moléculas pueden ser presumiblemente diferenciadas una a una, de acuerdo a sus residuos de aminoácidos. (48)

Fishman y Ghosh reportan un grado de especificidad hacia el sustrato de parte de las isoenzimas; la fosfatasa alcalina intestinal hidroliza más rápido el O-carboxi-fenilfosfato; la isoenzima placentaria el p-nitrofenilfosfato; y la isoenzima hepática hidroliza preferente-

mente la fosfatasa de etanolamina. (24)

La resistencia al EDTA, calor y urea que presenta la fosfatasa al calina placentaria, indica que es una enzima marcadamente estable y esta estabilidad es mantenida después de entrar a la circulación materna. (52)

Mecanismo de catalisis propuesto para la hidrolisis del p-nitrofenil--fosfato por la fosfatasa alcalina:

Se ha propuesto que la enzima contiene probablemente zinc, con un número de coordinación de 4. (24) Durante la formación del complejo - fosfatasa alcalina-p-nitrofenilfosfato (enzima-sustrato), este posible sitio metálico (Me) con carga positiva puede participar en la formación de enlaces coordinados con el oxígeno rico en electrones del sustrato. El sitio metálico (Me) se encuentra sujeto a la superficie de la enzima por coordinación con ciertos átomos ricos en electrones de la enzima, uno de los cuales puede ser el sulfuro del grupo sulfihidriilo de la cisteina, el otro átomo electronegativo puede ser el oxígeno (X) - del grupo hidroxilo de la serina.

Considerando lo anterior se propuso el siguiente mecanismo de catalisis: durante la formación del complejo enzima-sustrato, el oxígeno rico en electrones del fosfato del éster es atraído hacia la carga (+) del NH_3 de la lisina debido a su gran electronegatividad, al mismo tiempo

po el oxígeno del doble enlace adquiere una parcial carga negativa y forma enlace con el hidrógeno del grupo sulfihidrilo. La conexión con el sitio metálico ocurre porque se presenta un ataque nucleofílico por el ión hidroxilo del medio sobre el átomo de fósforo del sustrato. (Fig.1)

El alcohol y fosfato son subsecuentemente liberados del compuesto intermedio enzima-fosfato. (Fig. 1) El que los grupos reactivos O, SH, y NH₂ se encuentren en 1, 2 ó 3 cadenas polipéptidicas no interfiere en la reacción.

Mecanismo de inhibición propuesto para la L-fenilalanina.

El grupo carboxilo de la L-fenilalanina, con carga iónica negativa, favorecida por el pH de la mezcla de reacción puede atacar el centro positivo de la molécula enzimática llamado presumiblemente sitio metálica (Me) el cual también coordina simultáneamente con el N del grupo amino que acepta su par de electrones solitarios.

Como consecuencia, el oxígeno iónico del grupo fosfato (sustrato) está distante del grupo sulfihidrilo y sus oxígenos separados del sitio metálico el cual está ahora ocupado por el grupo carboxilo del inhibidor. (Fig. 2)

Los esquemas 1 y 2 representan los mecanismos generales pero fa--

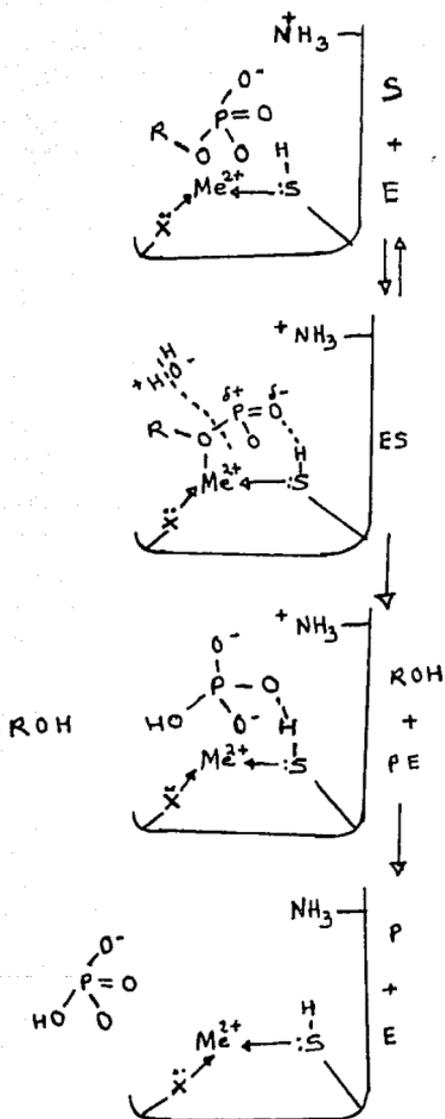


Fig. 1 Mecanismo propuesto para la catálisis de la hidrólisis de monoesteres de fosfato por la fosfatasa alcalina. (24)

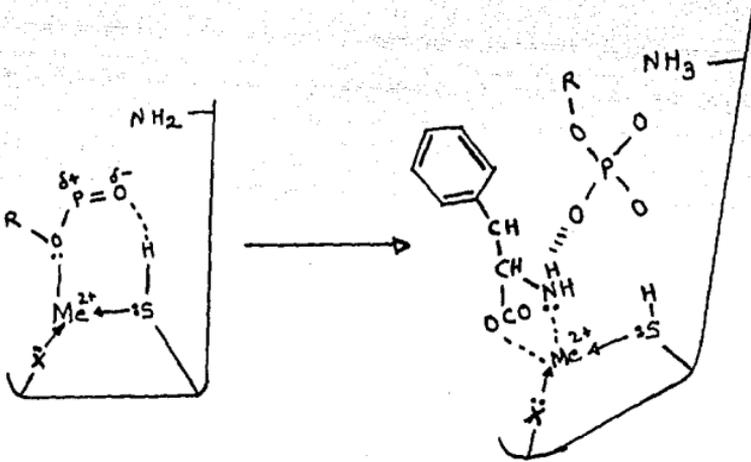
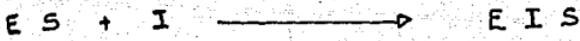


Fig.2 Representación de la formación del complejo EIS durante la inhibición de la fosfatasa alcalina por la L-fenilalanina. (24)

llan para explicar la inhibición no competitiva de los isómeros L y D de la fenilalanina. Se requiere para ello un modelo espacial que permita la visualización de las posiciones de los enantiómeros de la fenilalanina en el mecanismo de reacción.

Por lo tanto el modelo molecular es estable asumiendo que el grupo NH_3 de la lisina es atacado, que el SH pertenece a la cisteína y - que X es el oxígeno derivado del grupo hidroxilo de la serina. En la construcción del modelo los aminoácidos anteriores pueden estar en una misma cadena polipeptídica o en diferente, únicamente se requiere que los grupos esenciales ocupen la posición deseada en el espacio.

En la fig. 3 se esquematiza el complejo enzima-sustrato. En la fig. 4 la L-fenilalanina es acomodada precisamente en la posición que forma el complejo enzima-sustrato-inhibidor y los grupos interaccionan con el sitio metálica (Me) de la enzima.

En la fig. 5, por otro lado, la D-fenilalanina, tiene el grupo fenilo en un plano perpendicular a la L-fenilalanina lo que produce un impedimento estérico por la α -hélice de la molécula de la enzima.(24)

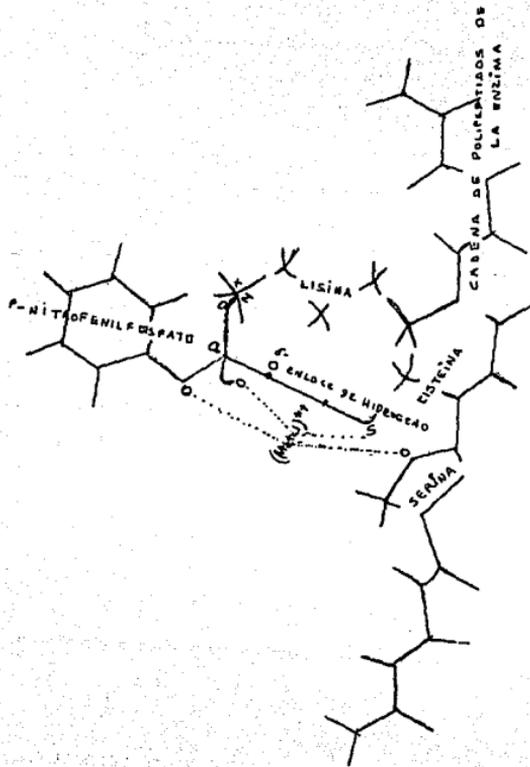


Fig. 3 Modelo hipotético espacial del complejo enzima-sustrato. (24)

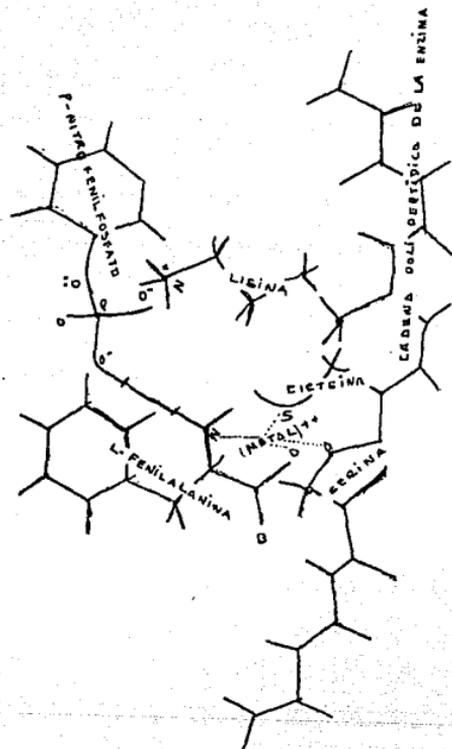


Fig. 4 Modello ipotético del complejo enzima-inhibidor-sustrato. (24)

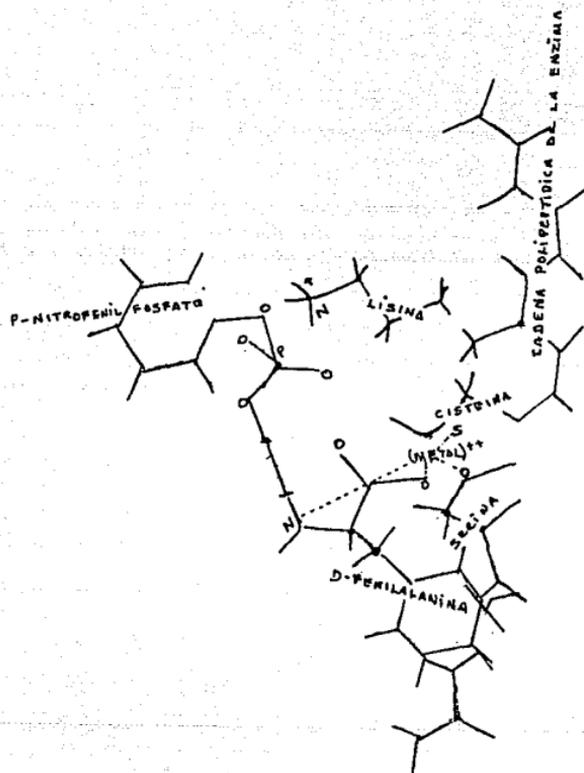


Fig. 5 Modelo hipotético del complejo enzima-sustrato-D-fenilalanina.

(24)

III.1 Planteamiento del problema

La fosfatasa alcalina del suero (E.C. 3.1.3.1. monoester, ortofosfórico fosfohidrolasa, pH óptimo alcalino). Está constituida por cinco isoenzimas la ósea, hepática, biliar, intestinal y placentaria; en algunos individuos puede no encontrarse la intestinal, esto es debido a factores genéticos.

Algunas veces se encuentran aumentados los valores de la fosfatasa alcalina total, la causa puede ser una patología de cualquiera de los órganos que producen cualquiera de las isoenzimas, o simplemente por un metabolismo acelerado, como es en el caso de los niños en desarrollo, aquí se encuentra aumentada la actividad de la fosfatasa alcalina total, y la responsable es la isoenzima ósea debido a que la formación de los huesos se encuentra muy activa.

Estas formas de fosfatasa alcalina son detectables por electroforesis o técnicas de inactivación selectiva.

Se ha observado que durante el embarazo, la fosfatasa alcalina total del suero aumenta. El incremento de la actividad se debe a la presencia de la isoenzima placentaria de la fosfatasa alcalina. Por lo anterior se ha propugnado la determinación de la actividad de la fosfatasa alcalina total, así como de la isoenzima placentaria de la fosfa-

tasa alcalina en el plasma materno como un posible control de la función de la placenta, ya que es producida por el sincitiotrofoblasto tejido exclusivo de la misma.

Se ha observado un aumento significativo en los niveles plasmáticos de esta isoenzima en mujeres con embarazo de alto riesgo por hipertensión arterial, pre-eclampsia y por pérdida del producto.

Burlina (47) indica en un trabajo realizado que la concentración de la isoenzima placentaria varía grandemente durante el embarazo, y la determinación de ésta no puede ser usada con el propósito de diagnóstico. En cambio Aleem (53) nos dice que la determinación de la fosfatasa alcalina placentaria sí puede ser usada como una prueba para determinar la función placentaria.

Debido a que no se sabe si los valores de la fosfatasa alcalina placentaria son significativos o no, se pretende realizar este trabajo, primeramente buscando los valores de referencia de la isoenzima durante el embarazo dividido en trimestres, comparados con los de mujeres no embarazadas.

· III.2 OBJETIVOS

1. DETERMINAR LA ACTIVIDAD DE LA FOSFATASA ALCALINA TOTAL EN EL SUERO DE MUJERES EMBARAZADAS POR EL METODO DE BESSEY-LOWRY AGRUPANDO LOS VALORES OBTENIDOS POR TRIMESTRE DE EMBARAZO.
2. DETERMINAR LA ACTIVIDAD DE LA ISOENZIMA PLACENTARIA UTILIZANDO METODOS DE INHIBICION TERMICA Y QUIMICA, POR TRIMESTRE DE EMBARAZO.
3. DETERMINAR LA CORRELACION EXISTENTE ENTRE LOS METODOS EMPLEADOS PARA DEMOSTRAR LA ACTIVIDAD DE LA FOSFATASA ALCALINA PLACENTARIA.
4. PROPONER VALORES DE REFERENCIA PARA LA FOSFATASA ALCALINA TOTAL Y PLACENTARIA DE MUJERES EMBARAZADAS.

HIPOTESIS

DEBIDO A QUE LA ISOENZIMA PLACENTARIA DE LA FOSFATASA ALCALINA ES PRODUCIDA POR EL SINCIOTROFOBlasto, Y ES LIBERADA AL SUERO MATERNO EN EL TRANCURSO DEL EMBARAZO, SE PODRA MEDIR SU ACTIVIDAD Y OBTENER LOS VALORES DE REFERENCIA, LOS CUALES NOS PERMITIRAN EVALUAR LA FUNCION PLACENTARIA QUE ES DE GRAN IMPORTANCIA DIAGNOSTICA.

IV.1 Material

- Tubos de ensaye 13 x 100 y 18 x 150.
- Pipetas graduadas de 0.1, 0.2, 1.0, 5.0 y 10.0 ml.
- Vasos de precipitados de 100 ml.
- Embudos de filtración tallo largo.
- Espátulas.
- Matraces aforados de 25 y 100 ml.
- Gradilla.
- Papel parafilm.
- Masking-tape.
- Algodón.
- Termómetro de 150°C.

Equipo

- Espectrofotómetro BAUSCH AND LOMB, Mod. Espectronic 20.
- Balanza analítica METER, Mod. H-80
- Baño metabólico RIOSSA, Mod. S-280.
- Cronómetro.

IV.2 Reactivos

- La determinación de la actividad de la enzima se llevó a ca

bo utilizando el equipo de Merkotest^R Art. 3304 para fosfatasa alcalina.

- Urea Merk.
- L-fenilalanina Merk.
- D-fenilalanina Merk.

IV.3 Población de estudio

En el presente trabajo se estudiaron dos grupos de mujeres clínicamente sanas, con edades comprendidas entre los 17-36 años, seleccionadas de la población que acude al Laboratorio Central de Análisis Clínicos de ENEP Zaragoza y la Clínica 29 del IMSS.

El primer grupo incluyó 90 mujeres con embarazo considerado como normal y con edades gestacionales que van desde la 7a. a la 44a. semana. En la mayoría de los casos la edad gestacional se determinó mediante la fecha de la última menstruación. Se excluyeron las pacientes cuyo diagnóstico médico, anotado en la solicitud de análisis de laboratorio indicaba alguna patología agregada al embarazo como hepatitis, toxemia, diabetes, etc.

El segundo grupo utilizado como control, estuvo constituido por 30 mujeres no embarazadas en edad productiva.

V METODOLOGIA

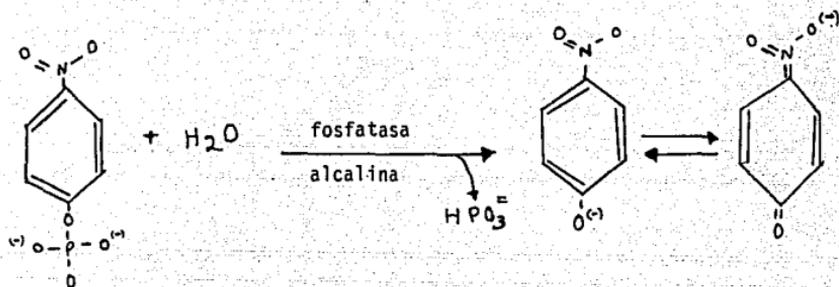
V.1 Obtención de muestra

La toma de muestra se realizó por punción venosa en ayunas. Dentro de los 60 minutos posteriores a la punción, una vez que la sangre coaguló a temperatura ambiente, se separó el suero por centrifugación a 3,000 rpm durante ocho minutos, el suero así obtenido se utilizó el mismo día para la determinación de la actividad de la enzima. La enzima es estable 7 días a 4°C. (14)

V.2 Determinación de la fosfatasa alcalina total.

Método de Bessey-Lowry-Brock. (54)

Fundamento: La fosfatasa alcalina hidroliza una gran variedad de ésteres orgánicos monofosforados con la formación de un alcohol o fenol y un ión fosfato. En la presente técnica se utiliza como sustrato p-nitrofenilfosfato, que por acción de la enzima se escinde en p-nitrofenol y ácido fosfórico. Añadiendo hidróxido de sodio se interrumpe la reacción y el p-nitrofenol liberado es transformado en el anión de color amarillo, que puede determinarse fotométricamente, a 405 nm.



p-nitrofenilfosfato
(sin color)

p-nitrofenilato
(amarillo)

Soluciones:

- 1) Amortiguador: Amortiguador de glicina y NaOH 50 mmol/L a pH 10.5;
MgCl₂ 0.5 mmol/L
- 2) Sustrato: p-nitrofenilfosfato 5.5 mmol/L
Disolver una tableta de p-nitrofenilfosfato en 10 ml. de amortiguador de glicina-NaOH.
A temperatura entre +2°C + 4°C se conserva 4 semanas.
- 3) Hidróxido de sodio 0.02 N.

Procedimiento para la determinación de la fosfatasa alcalina total.

Pipetear en tubos de ensayo:		
	Problema	Blanco
Sustrato-amortiguador (2)	1.0 ml	1.0 ml
Dejar 5 minutos en baño de agua a 37°C		
Suero (reciente)	0.1 ml	-
Mezclar, dejar exactamente 30 minutos en baño de agua a 37°C		
NaOH 0.02 N (3)	10.0 ml	10.0 ml
Suero	-	0.1 ml
Mezclar y medir la extinción a 405 nm el problema contra el blanco		

La actividad se calcula a partir de la siguiente curva patrón.

Curva patrón

Patrón p-nitrofenol mmol/L	NaOH 0.02 N	Actividad por volumen U/L
1 ml	9 ml	10 mU/ml
2 ml	8 ml	20 mU/ml
3 ml	7 ml	30 mU/ml
6 ml	4 ml	60 mU/ml
10 ml	-	100 mU/ml

V.3 Determinación de la fosfatasa alcalina placentaria

Método de Bessey-Lowry-Brock (55)

Fundamento. Inhibición con L-fenilalanina. La selección de la L-fenilalanina como inhibidor de la isoenzima placentaria de la fosfatasa alcalina se debió a que en una concentración de 0.005 mol/L inhibe preferencialmente a la isoenzima placentaria en un 80%. Dicha inhibición es de tipo no competitivo, en la cual el inhibidor forma un complejo EIS estable. Por otro lado el isomero D-fenilalanina a 0.005 mol/l no produce dicha inhibición, se incluyó en la determinación ya que así se aseguran las mismas condiciones en la prueba, como son concentración del amortiguador, sustrato, enzima y pH, excepto la posición estérica de los grupos químicos unidos al carbono alfa de la fenilalanina. (30)

Soluciones.

Solución de L-fenilalanina. Se prepara pesando 0.825 grs. del aminoácido y se aforan a 250 ml. con agua destilada. Para el isomero D-fenilalanina se hace exactamente lo mismo.

Procedimiento para L - fenilalanina.

Colocar en tubos de ensayo:		
	Problema	Blanco
Sustra-amortiguador (2)	1.0 ml	1.0 ml
Sol.de L-fenilalanina 0.005 M	1.0 ml	1.0 ml
Dejar 5 minutos en baño de agua a 37°C		
Suero (reciente)	0.1 ml	
Mezclar, dejar exactamente 30 min. en baño de agua a 37°C		
NaOH 0.02 N (3)	10.0 ml	10.0 ml
Suero	-	0.1 ml
Mezclar y medir la extinción a 405 nm del problema contra el blanco		

La actividad se calcula a partir de la curva de calibración. El porcentaje de inhibición para la isoenzima placentaria se calcula mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de inhibición} = \frac{D - L}{D} \times 100$$

Procedimiento para D-fenilalanina

Pipetear en tubos de ensayo:		
	Problema	Blanco
Sustrato-amortiguador (2)	1.0 ml	1.0 ml
Sol.de D-fenilalanina 0.005 M	1.0 ml	1.0 ml
Dejar 5 minutos en baño de agua a 37°C		
Suero (reciente)	0.1 ml	-
Mezclar, dejar exactamente 30 min. en baño de agua a 37°C		
NaOH 0.02 N (3)	10.0 ml	10.0 ml
Suero	-	0.1 ml
Mezclar y medir la extinción a 405 nm del problema contra el blanco		

Inhibición con Urea.

Fundamento. La isoenzima placentaria de la fosfatasa alcalina, tiene la propiedad de ser resistente a la inhibición con urea 3M, dicha resistencia es debida a la presencia de bandas intramoleculares que mantienen la estructura cuaternaria de la molécula. (57)

En las demás isoenzimas sensibles a la inhibición con urea, esta actúa rompiendo los enlaces de hidrógenos y sulfuros, produciendo un - desdoblamiento en las cadenas polipeptidicas, que originan cambios en la estructura cuaternaria de la molécula. (59)

Soluciones.

Solución de urea 3M. Se preparó pesando 20.1 grs. de urea y aforándose con agua destilada en un matraz de 100 ml.

Solución de suero-urea. Se toman con la pipeta 0.2 ml de suero y se adiciona 1.8 ml de urea 3M, se incuban durante 18 minutos en un baño de agua a 37°C. Posteriormente se reciben los tubos en un baño de hielo.

Procedimiento

Colocar en tubos de ensayo;		
	Problema	Blanco
Sustrato-amortiguador (2)	1.0 ml	1.0 ml
Dejar 5 minutos en baño de agua a 37°C		
Sol. suero-urea	1.0 ml	-
Mezclar, dejar exactamente 30 min. en baño de agua a 37°C		
NaOH 0.02 N (3)	10.0 ml	10.0 ml
Suero. urea	-	1.0 ml

La actividad de la isoenzima placentaria de la fosfatasa alcalina resistente a la inhibición con urea 3 M se calcula utilizando la curva patrón.

La actividad de las isoenzimas no inhibidas se puede calcular por la diferencia de la actividad total y la inhibición con urea 3 M.

Inactivación con calor.

Fundamento. La isoenzima de la fosfatasa alcalina placentaria posee la característica de ser resistente a la inactivación por calor a 56°C. Las otras isoenzimas de la fosfatasa alcalina no poseen esta propiedad y ocurre la inactivación por rompimiento de sus enlaces de hidrógeno, y otras fuerzas secundarias que mantienen unida la molécula. (57, 58)

Procedimiento

Se pone a calentar previamente el baño, una vez que se ha obtenido la temperatura deseada 56°C se colocan los tubos de ensayo y se espera a que alcancen la temperatura del baño, se colocan 0.5 ml de suero y se tapan con papel parafilm. Se incuban los tubos por 15 minutos a 56°C. Posteriormente los tubos se colocan en un baño de hielo para parar la inactivación.

Procedimiento para inactivación con calor

Colocar en tubos de ensayo:		
	Problema	Blanco
Sustrato-amortiguador (2)	1.0 ml	1.0 ml
Dejar 5 minutos en baño de agua a 37°C		
Suero-inactivado	0.1 ml	-
Mezclar, dejar exactamente 30 min. en baño de agua a 37°C		
NaOH 0.02 N (3)	10 ml	10 ml
Suero-inactivado	-	0.1 ml
Medir la extinción del problema contra el blanco, a 405 nm en el espectrofotómetro		

La actividad de la fosfatasa alcalina placentaria se calcula utilizando la curva patrón.

La actividad de las isoenzimas no inactivadas se calcula por la diferencia entre la actividad de la fosfatasa alcalina total y la actividad de la isoenzima placentaria resistente al calor.

VI RESULTADOS

En las tablas 1, 2, 3 y 4 se muestran los resultados obtenidos para la fosfatasa alcalina total y placentaria; en mujeres no embarazadas y para los diferentes trimestres del embarazo.

En las gráficas 1, 2, 3 y 4 se observan los valores de la actividad total y la correlación entre la inactivación con calor, inhibición con urea e inhibición con L-fenilalanina, para la fosfatasa alcalina para mujeres no embarazadas y los diferentes trimestres del embarazo. En la gráfica No. 5 se muestran comparativamente los valores para la fosfatasa alcalina total en los diferentes trimestres del embarazo.

En el histograma No. 6 se presentan comparativamente la frecuencia de la actividad total para mujeres no embarazadas y en los diferentes trimestres del embarazo.

En el histograma No. 7 se presenta comparativamente la frecuencia de la fosfatasa alcalina con inactivación al calor para mujeres no embarazadas y en los diferentes trimestres del embarazo.

En el histograma no. 8 se presenta comparativamente la frecuencia para la fosfatasa alcalina con inhibición con urea.

En el histograma no. 9 se presenta la frecuencia de la fosfatasa alcalina con inhibición con L-fenilalanina, para mujeres no embarazadas y los diferentes trimestres del embarazo.

Tabla 1

Los valores para fosfatasa alcalina total y la correlación entre inactivación con calor (56°C), inhibición con urea (3M) e inhibición con L-fenilalanina (0.005). Para mujeres no embarazadas

No. de muestra	Actividad total	Inactivación con calor	Inhibición con urea	Inhibición con L-fenilalanina
1	16	0	0	0
2	18	0	0	0
3	20	0	0	0
4	20	0	2	2
5	20	0	2	4
6	20	2	4	4
7	21	2	4	4
8	22	2	4	6
9	22	4	6	6
10	22	4	6	6
11	24	4	6	6
12	26	4	6	6
13	28	4	6	6
14	28	4	6	6
15	28	6	6	6
16	28	6	6	8
17	30	6	8	8
18	30	6	8	10
19	30	6	8	10
20	32	6	8	10
21	36	6	10	10
22	36	6	10	10
23	36	6	10	12
24	36	6	10	12
25	38	6	12	12
26	42	6	12	14
27	42	6	16	16
28	44	8	16	16
29	48	8	16	16
30	52	18	23	30
X =	29.8 ^{+9.4}	4.5 ^{+2.6}	7.3 ^{+4.7}	8.3 ^{+5.7}

Tabla 2

Valores para fosfatasa alcalina total y la correlación entre inactivación con calor (56°C), inhibición con urea (3M) e inhibición con L-fenilalanina (0.005M). Para mujeres en el primer trimestre del embarazo.

No. de muestra	Actividad total	Inactivación con calor	Inhibición con urea	Inhibición con L-fenilalanina
1	20	0	4	0
2	22	0	4	4
3	22	0	4	4
4	24	0	4	4
5	24	2	6	6
6	24	2	6	6
7	26	2	6	6
8	26	4	6	6
9	26	4	6	6
10	28	4	6	8
11	30	4	6	8
12	30	4	8	8
13	32	4	8	8
14	32	4	8	8
15	32	4	8	8
16	34	4	8	8
17	34	4	8	8
18	38	4	8	10
19	38	6	10	10
20	38	6	10	10
21	38	6	10	10
22	38	6	10	10
23	40	6	10	10
24	42	6	10	12
25	42	6	12	12
26	42	6	12	12
27	44	6	12	12
28	44	8	12	14
29	46	12	14	18
30	50	12	14	18
$\bar{X} =$	33.5 [±] 8.2	4.5 [±] 2.9	8.5 [±] 2.9	8.8 [±] 3.9

Tabla 3

Valores para fosfatasa alcalina total y la correlación entre inactivación con calor (56°C), inhibición con urea (3M) e inhibición con L-fenilalanina (0.005M). Para mujeres en el segundo trimestre del embarazo

No. de muestra	Actividad total	Inactivación con calor	Inhibición con urea	Inhibición con L-fenilalanina
1	20	2	4	2
2	20	2	4	2
3	24	2	4	3
4	24	4	4	4
5	28	4	6	4
6	34	4	6	4
7	36	4	6	4
8	36	4	6	8
9	36	4	6	8
10	36	4	8	8
11	36	4	8	8
12	36	4	8	10
13	38	4	10	10
14	38	8	10	10
15	40	8	10	10
16	40	8	10	12
17	40	10	10	12
18	42	10	12	12
19	42	10	12	12
20	50	10	12	16
21	52	10	14	16
22	52	10	14	16
23	54	12	14	16
24	54	12	16	16
25	60	14	16	18
26	62	14	16	18
27	64	14	18	24
28	68	18	20	24
29	70	20	20	30
30	80	44	40	46

\bar{X} = 43.8[±]15.3 9.3[±]8.0 11.4[±]7.1 12.7[±]9.3

Tabla 4

Valores para fosfatasa alcalina total y la correlación entre inactivación con calor (56°C), inhibición con urea (3M) e inhibición con L-fenilalanina (0.005M). Para mujeres en el tercer trimestre del embarazo.

No. de muestra	Actividad total	Inactivación con calor	Inhibición con urea	Inhibición con L-fenilalanina
1	44	8	10	12
2	48	8	16	14
3	56	16	16	16
4	56	16	18	20
5	60	20	22	22
6	62	24	24	24
7	70	26	24	26
8	70	26	26	26
9	70	28	28	26
10	76	30	28	30
11	76	30	28	30
12	76	32	32	30
13	76	36	36	34
14	78	36	38	36
15	78	40	40	36
16	84	40	40	36
17	90	40	40	40
18	90	46	44	44
19	90	44	42	40
20	96	46	44	44
21	96	46	48	46
22	98	50	52	46
23	100	52	56	46
24	102	56	56	48
25	116	66	60	48
26	122	66	60	52
27	122	72	60	52
28	122	90	90	60
29	140	98	90	78
30	170	100	102	86
\bar{x} =	87.8 [±] 28.2	42.8 [±] 24.0	42.1 [±] 22.5	38.2 [±] 17.0

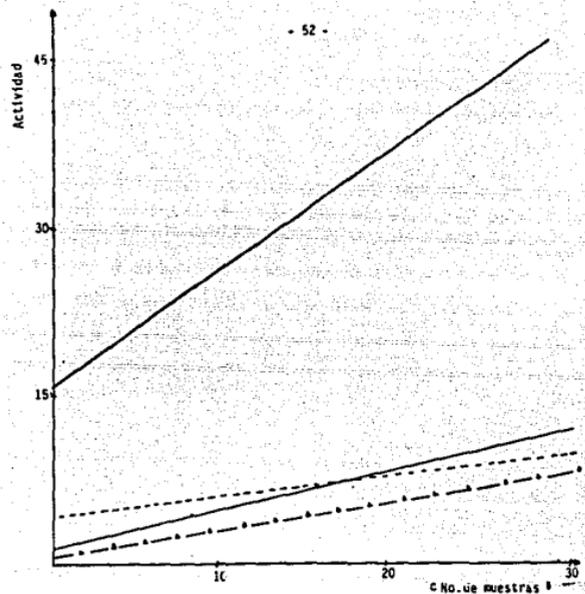


Fig. 1

Gráfica que muestra la actividad total (—), la correlación entre la estabilidad al calor (▲—▲), estabilidad a urea (■—■) y la sensibilidad a la L-fenilalanina (----) de la fosfatasa alcalina en el suero de 30 mujeres no embarazadas.

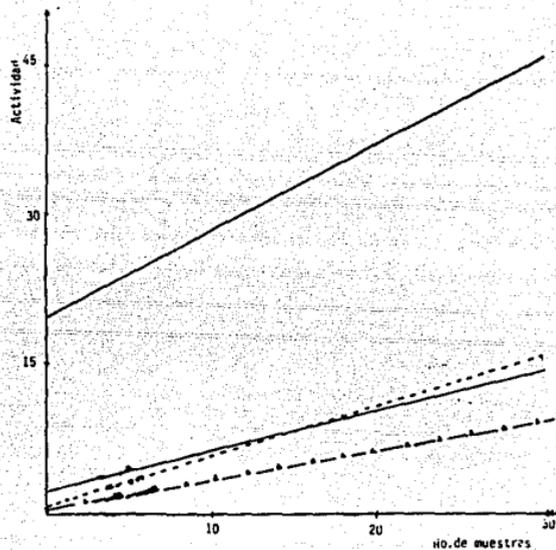


Fig. 2

Gráfica que muestra la actividad total (—), la correlación entre la estabilidad al calor (▲—▲), estabilidad a urea (■—■) y la sensibilidad a la L-fenilalanina (----) de la fosfatasa alcalina en el suero de 30 mujeres en el primer trimestre del embarazo.

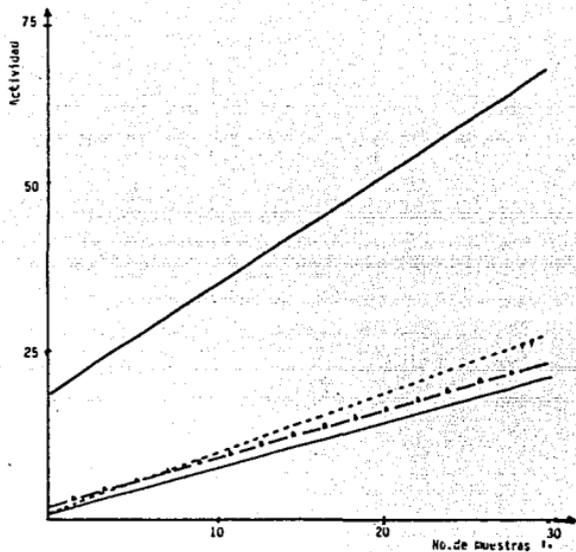


Fig. 3

Gráfica que muestra la actividad total (—), la correlación entre la estabilidad al calor (- - -), estabilidad a urea (- · -) y la sensibilidad a la L-fenilalanina (· · ·) de la fosfatasa alcalina en el suero de 30 mujeres en el segundo trimestre del embarazo.

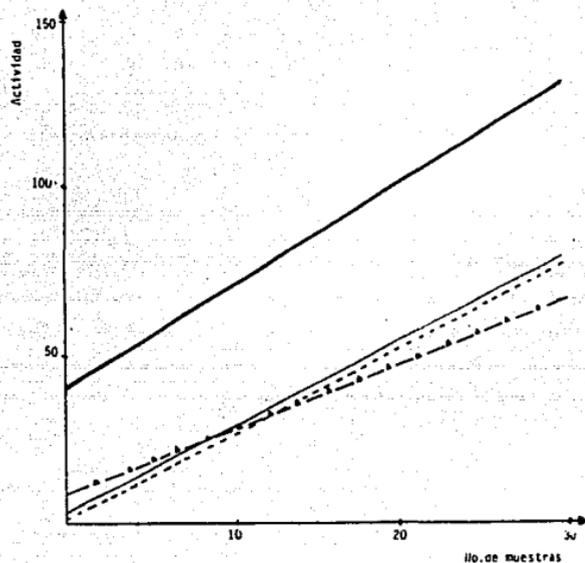
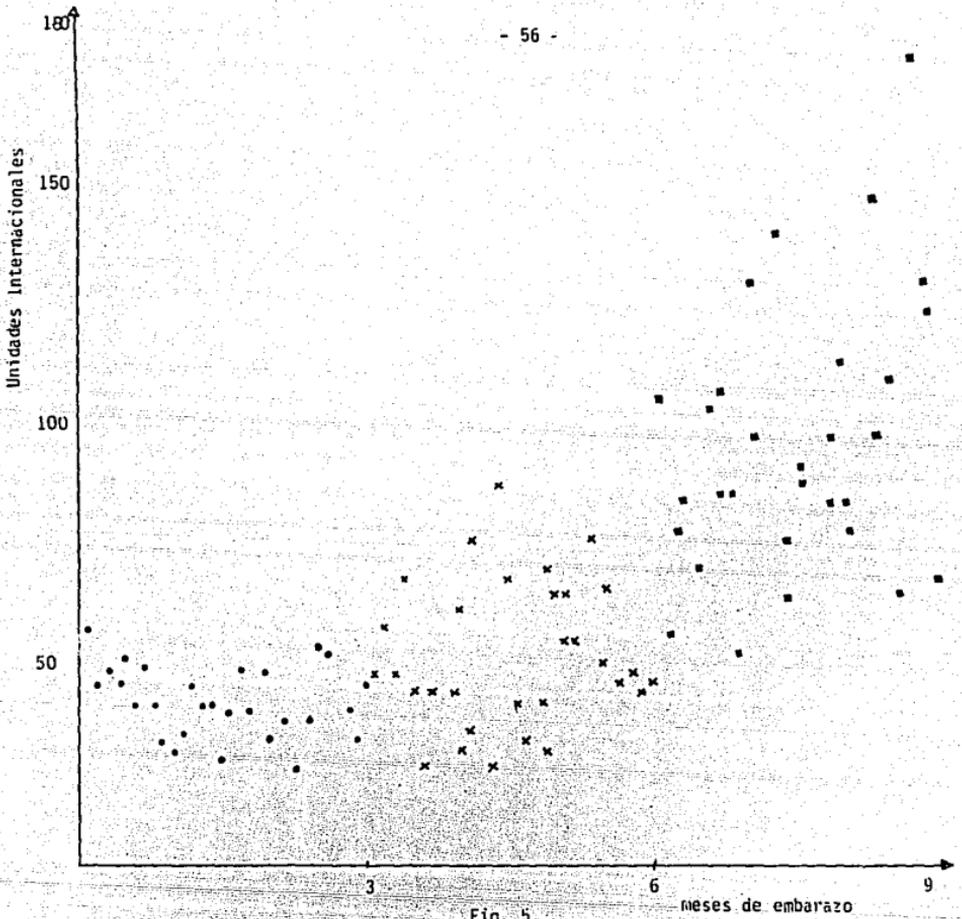


Fig. 4

Gráfica que muestra la actividad total (—), la correlación entre la estabilidad al calor (- - -), estabilidad a urea (- · -) y la sensibilidad a la L-fenilalanina (· · ·) de la fosfatasa alcalina en el suero de 30 mujeres en el tercer trimestre del embarazo.



Valores para la fosfatasa alcalina total en los diferentes trimestres del embarazo.

Primer trimestre de embarazo ●●●●●●●●

Segundo trimestre de embarazo xxxxxxxxxxxx

Tercer trimestre de embarazo ■■■■■■■■■■

Para sensibilizar los resultados aun más y poder observar si había una diferencia significativa entre los grupos o no, se procedió a efectuar un estudio estadístico con el estadígrafo "t" de student.

Con un intervalo de confianza del 95% el valor para "t" reportado por tablas es de $t = 2.00$

Contraste de hipótesis

H_0 = No hay diferencia significativa

H_a = Sí hay diferencia significativa.

$t_{calculada} > t_{tablas}$ se rechaza H_0

$t_{calculada} < t_{tablas}$ se acepta H_0

$$t = \frac{\bar{X}_1 + \bar{X}_2}{\frac{S_1^2}{N_1} + \frac{S_2^2}{N_2}}$$

$$gl = N_1 + N_2 - 2$$

Actividad total (Histograma 6)

	$t_{\text{calculada}}$	
Mujeres no embarazadas	1.63	No hay diferencia
Primer trimestre del embarazo	3.25	Sí hay diferencia
Segundo trimestre del embarazo	5.50	Sí hay diferencia
Tercer trimestre del embarazo		

Inactivación con calor (Histograma 7)

Mujeres no embarazadas	0.09	No hay diferencia
Primer trimestre de embarazo	3.00	Sí hay diferencia
Segundo trimestre de embarazo	5.70	Sí hay diferencia
Tercer trimestre de embarazo		

Inhibición con urea (Histograma 8)

Mujeres no embarazadas	1.67	No hay diferencia
Primer trimestre de embarazo	2.07	Sí hay diferencia
Segundo trimestre de embarazo	5.65	Sí hay diferencia
Tercer trimestre de embarazo		

Inhibición con L-fenilalanina (Histograma 9)

Mujeres no embarazadas	0.41	No hay diferencia
Primer trimestre de embarazo	2.07	Sí hay diferencia
Segundo trimestre de embarazo	4.80	Sí hay diferencia
Tercer trimestre de embarazo		

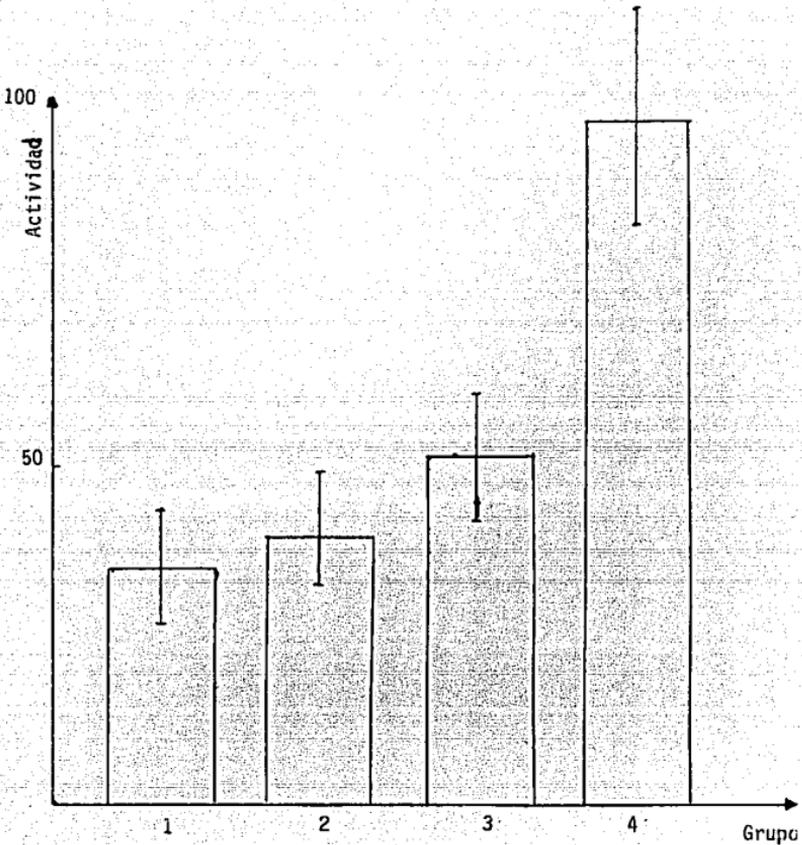


Fig. 6

Histograma que muestra comparativamente los valores normales de la actividad de la fosfatasa alcalina total en los diferentes trimestres - del embarazo.

- 1) Promedio de los valores normales en mujeres no embarazadas.
- 2) Promedio de los valores normales en el 1er. trimestre del embarazo.
- 3) Promedio de los valores normales en el segundo trimestre del embarazo.
- 4) Promedio de los valores normales en el tercer trimestre del embarazo.

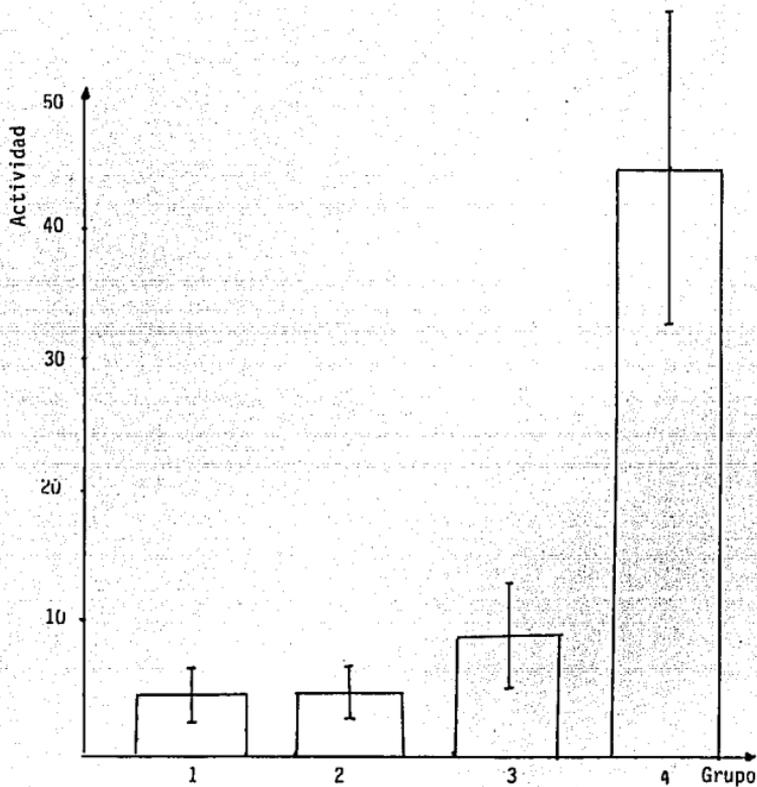


Fig. 7

Histograma que muestra los valores normales obtenidos para la fosfatasa alcalina en el suero calentado a 56°C durante 15 minutos en los diferentes trimestres del embarazo.

- 1) Mujeres no embarazadas.
- 2) Primer trimestre de embarazo.
- 3) Segundo trimestre de embarazo.
- 4) Tercer trimestre de embarazo.

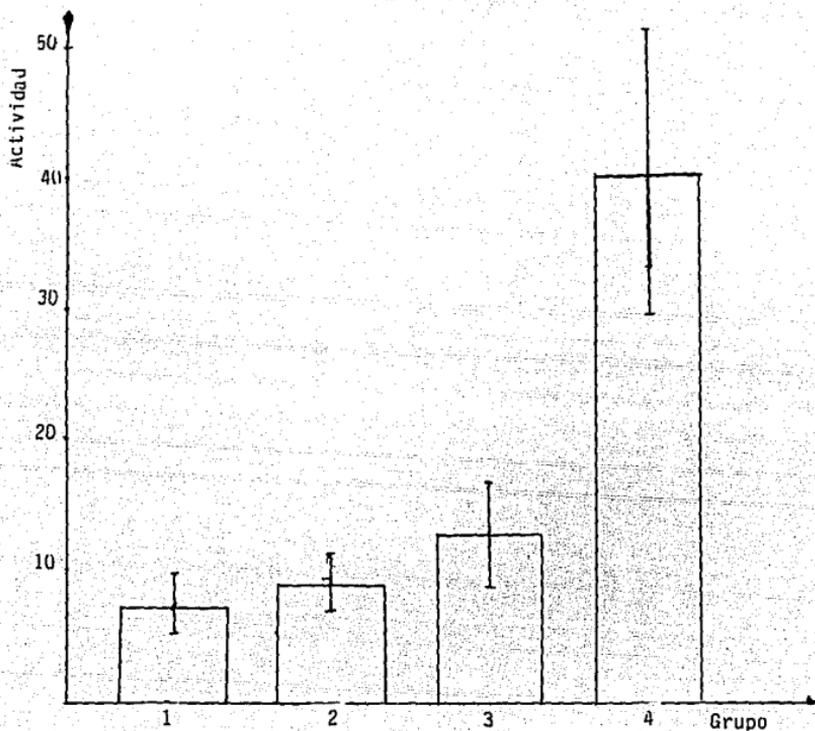


Fig. 8

Histograma que muestra comparativamente el promedio de los valores normales obtenidos para la fosfatasa alcalina tratada con urea 3M, en los diferentes trimestres del embarazo.

- 1) Mujeres no embarazadas.
- 2) Primer trimestre de embarazo.
- 3) Segundo trimestre de embarazo.
- 4) Tercer trimestre de embarazo.

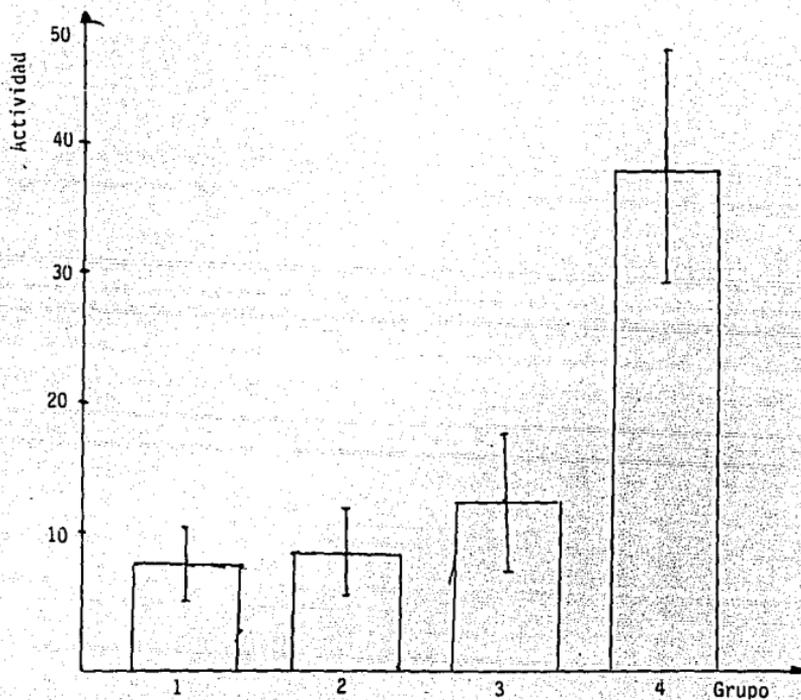


Fig. 9

Histograma que muestra comparativamente el promedio de los valores normales obtenidos para la fosfatasa alcalina tratado con L-fenilalanina 0.005 M, en los diferentes trimestres del embarazo.

- 1) Mujeres no embarazadas.
- 2) Primer trimestre de embarazo.
- 3) Segundo trimestre de embarazo.
- 4) Tercer trimestre de embarazo.

VII.1 DISCUSION DE RESULTADOS

La fosfatasa alcalina placentaria es una enzima específica del em barazo que únicamente es sintetizada por la placenta. El crecimiento placentario va acompañado de una creciente producción de esta enzima, la cual pasa a la sangre materna. Esto ha permitido sugerir que la elevación progresiva de su actividad en sangre puede interpretarse como un índice de un crecimiento placentario normal.

En el presente trabajo se trató de obtener valores normales para mujeres no embarazadas, así como para los diferentes trimestres del em barazo.

Se determinó la actividad total para la fosfatasa alcalina, y la isoenzima placentaria, aprovechando las propiedades físicas y químicas que esta última presenta, como son resistencia a la inactivación con calor, resistencia a la inhibición con urea, sensibilidad a la inhibición con L-fenilalanina.

Los valores obtenidos para la actividad total de la fosfatasa alcalina, para mujeres no embarazadas es de 19-39 Unidades Internacionales por Litro (UI/L) y para el primer trimestre de embarazo son de 25-42 UI/L, realizándole un estudio estadístico con el estadígrafo "t" de student con un intervalo de confianza de 95%, se observa que no hay diferencia significativa entre ambos. Lo mismo ocurre para los valores

obtenidos, con inactivación al calor, inhibición con urea e inhibición con L-fenilalanina.

En el suero de mujeres no embarazadas se observa que hay un porcentaje de isoenzima resistente a la inactivación con calor que viene a ser una mezcla de isoenzima hepática, ósea e intestinal, puesto que éstas no se inhiben en un 100% con el calor, este valor permanece exactamente igual en el primer trimestre de embarazo.

El rango obtenido para el segundo trimestre del embarazo para la actividad total de la enzima es muy amplio, esto se debe, según estudios histoquímicos, (44) a que la fosfatasa alcalina se empieza e incrementar notoriamente a mediados del segundo trimestre. Si se observa el histograma no. 6 se apreciará que algunos valores para el primer y segundo trimestre del embarazo se superponen, pero si se realiza un estudio estadístico con el estadígrafo "t" de student, sí hay diferencia significativa entre los dos trimestres.

En el tercer trimestre del embarazo se incrementa marcadamente la actividad de la fosfatasa alcalina total así como de la isoenzima placentaria. Latner (25) propone que el comienzo de la degeneración placentaria durante las últimas semanas del embarazo aumenta el nivel de las fosfatasas en el suero de mujeres embarazadas.

Se obtiene un rango muy amplio en el tercer trimestre del embarazo en suero materno, esta variabilidad es particularmente notable en la fracción estable al calor, esto contrasta con el estrecho rango obtenido en la fracción estable al calor en el suero de mujeres no embarazadas. Kitchener (52) cree que la amplia variación de la fosfatasa alcalina materna está sujeta a numerosos factores, estos incluyen: volumen plasmático, masa placentaria, velocidad de síntesis en las microvellosidades del sincitiotrofoblasto de la placenta y la velocidad con que es removida a la circulación materna.

La bibliografía reporta (60) que la urea y el calor tienen el mismo grado de inhibición, sin embargo en los valores presentados en las tablas 1 y 2 para la fosfatasa alcalina placentaria, tanto para mujeres no embarazadas así como para el primer trimestre de embarazo no hay correlación entre los métodos utilizados, la causa de esta discrepancia es desconocida, sin embargo, se sugiere que varios factores están involucrados, incluyendo contenido protéico, pH, la presencia de activadores e inhibidores y una imprevisible sensibilidad a la inhibición por el calor de algunas isoenzimas del suero.

La marcada estabilidad al calor de la fosfatasa alcalina placentaria no está clara aun, es posible que se deba a su composición de aminoácidos, azúcares o a su estructura en el espacio.

VII.2 CONCLUSIONES

La actividad de la fosfatasa alcalina total aumenta progresivamente durante el embarazo, este incremento es producido por la presencia de la isoenzima placentaria. El incremento de la fosfatasa alcalina se inicia a mediados del segundo trimestre.

La determinación de la isoenzima placentaria con valores significativos se restringe únicamente para el segundo y tercer trimestre.

El aumento de la actividad enzimática de la fosfatasa alcalina placentaria durante el embarazo es de magnitud suficiente para considerarla como prueba para evaluar el funcionamiento placentario.

El mejor método para determinar la isoenzima placentaria es con inhibición al calor. Para la determinación de la fosfatasa alcalina placentaria, hay correlación en los tres métodos de inhibición utilizados en el segundo y tercer trimestre del embarazo.

Los valores obtenidos en el presente trabajo y que se sugieren como Valores de Referencia para la fosfatasa alcalina total y placentaria, son:

	Actividad total	Inactivación con calor	Inhibición con urea	Inhibición con L-fenilalanina
Mujeres no embarazadas	19-39	2-7	3-11	3-10
1er. trimestre de embarazo	25-42	2-7	6-11	5-13
2o. trimestre de embarazo	29-59	1-17	4-19	3-22
3er. trimestre de embarazo	60-116	19-67	20-65	21-55

VII.3 PROPUESTAS

1. Realizar la determinación de la fosfatasa alcalina por semana o meses de embarazo para obtener rangos menos amplios.
2. Realizar la determinación de fosfatasa alcalina total y placentaria para casos patológicos agregados al embarazo.

VIII. BIBLIOGRAFIA

1. Brockchurst, A. y Wilde, D.: Amniotic fluid alkaline phosphatase, gamma-glutamyl-transferasa, y 5'Nucleotidasa activity from 13 to 40 weeks gestation, and alkaline phosphatase as an index fetal - ling maturity. Clin. Chem. 26: 588-591 (1980)
2. Montoya, B. y cols.: Determinación de la actividad de la enzima - gamma-glutamyl -transpeptidasa en líquido amniótico. Revista Clí nica Española. 151: 297-299 (1978).
3. Combs, B. et. al.: Serum gamma glutamyl transpeptidasa activity in viral hepatitis; supresion in pregnancy and by birth control pills. Gastroenterology. 72: 721-724 (1977)
4. Ichalitis, M. y Lambrionopoulos, T.: Preeclampsie associated with decrease in serum oxytocinasa. Obst. and Gyn. 24: 659 (1964)
5. Noble et. al.: The excretion de gamma-glutamyl-tranferasa in pregnancy. Br. J. Obst. Gynecol. 84: 84-87 (1977).
6. Lang, A.: Creatine kinase isoenzymes. Springer Verlag (1981) Cap. II.
7. Mullan, B.: Studies in Clinical Enzimology. William Hennis Medical Book Ltd. Cap. 6 (1969).

8. Acebedo, C.: El test leucino-amino-peptidasa (LAP) y la vitalidad fetal. Pren. Med. Argent. 58: 1700 (1971).
9. Wilkison, A.: Introducción al diagnóstico enzimático. Ed. Toray Mason, Barcelona, España. (1965) Cap. 8.
10. Tortora y Anagnostakos.: Principios de Anatomía y Fisiología. Ed. Harla, México (1977) Cap. 24, 25 y páginas 323-5 y 415.
11. Hamilton, W.J., Boyd, J.D. y Mossan H.W.: Embriología Humana, 3a. edición, Ed. Interamericana. Buenos Aires (1968) pág. 71.
12. Ham, A.W.: Tratado de Histología. 5a. Edición, Ed. Interamericana, S.A. México (1968). págs. 844-854.
13. McAllister, R.A.: Enzimas y determinación de la actividad enzimática. Ed. El Manual Moderno, S.A. México (1975) pág. 78.
14. Díaz, O.: Bioquímica Fisiológica, Ed. El Manual Moderno. México (1987), pág. 141.
15. Kaplan L.A.: Química Clínica, Ed. Panamericana, Buenos Aires, Argent. (1986) págs. 1100 y 1130.
16. Bhagavan N.V.: Bioquímica, 2a. Edición. Ed. Interamericana, S.A., México (1982) págs. 59-124.
17. Moss, D.W., Campbell, D.M., Anagnostou-Kukaras, E. y King, E.J.:
Characterization of tissue alkaline phosphatases and their partial

- purification by starch-gel electrophoresis. *Biochem. J.* 81: 444-447 (1961).
18. Moss D.W., Shakespeare M.J., y Thomas D.M.: Observation on the heat-stability of alkaline phosphatase isoenzymes in serum. *Clin. Chem. Acta*, 40: 35-41 (1972).
 19. Roberts, W.M.: Variations in the phosphatase activity of the blood in disease. *Br. J. Esp. Pathol.* 11: 90-95 (1930)
 20. Gutman, A.B.: Serum alkaline phosphatase activity in diseases of the skeletal and hepatobiliary systems. A consideration of the current status. *Am. J. Med.* 27: 875-901 (1959).
 21. Fishman, W.H., Inglis, N.R.Ghosh, N.K. Green, S., Reif A.E. y Stolbach, L.L.: Immunology and biochemistry of Regan isoenzyme of alkaline phosphatase in human cancer. *Nature, (London)* 219: 697-699 (1968).
 22. Neale, F.C., Clubb, J.S., Hotchkis, D., y Posen, S.; Heat-stability of human placental alkaline phosphatase. *J.Clin. Pathol.* 18: 359-363 (1965).
 23. Seargeant L., Stinson R.A.: Evidence that three structural genes code for alkaline phosphatase. *Nature (London)* 281: 152-154 (1979)
 24. Fishman W.H. y Ghosh N.K.: Isoenzymes of human alkaline phosphatase. *Adv. Clin. Chem.* 10: 255 (1967).

25. Latner, A.L.: Phosphatase isoenzymes. In Enzymes in Clinical Chemistry, R. Ruysen y Vanderdriessche. Eds. Elsevier, Amsterdam, (1963) págs. 110-119.
26. Nitowsky, H.M.: Alkaline phosphatase in cell cultures of human origen. Nature (London) 189: 765 (1961).
27. Ureven, J., Lieberherl, M. y Vals, g.: The acid and phosphatase inorganic pyrophosphatases and phosphoroprotein phosphatase of bone. Biochem Biophys. Acta 293: 170 (1973).
28. Norman, A., Mircheft, A.K., y Adama, T.H. et.al.: Studies on the mechanish of action of calciferol III. Vitamin D mediated increase of intestinal brush border alkaline phosphatase activity. Bioch. Biophys. Acta. 215: 348 (1970).
29. Posen S., Neale, C., y Clubb, J.: Heat inactivation in the study of human alkaline phosphatase. Ann. Inter. Med. 62: 1234 (1965).
30. Ghosh, N.K. y Fhisman, W.H.: On the mechanism of intestinal alkaline phosphatase by L-phenilalanine. J. Biol. Chem. 11: 2516-2522 (1966).
31. Lin, C., Sie, H. y Fhisman, W.; L-Tryptophan. A non allosteric organ-specific uncompetitive inhibitor of human placentar alkaline phosphatase. Biochem. J. 124: 509-516 (1971).

32. Ansari, A. y Salem, F.A.: Determination of human serum placental alkaline phosphatase, using theophylline inhibition. Clin. Chim. Acta. 118: 135-139 (1982).
33. Nakayama, T., Yoshida, M. y Kitamura, M.: L-leucina sensitive, heat-stable alkaline phosphatase isoenzymes (enzymes Nagao) detected in adeno-carcinoma of pancreas Runshokagaku 11: 80 (1971).
34. Fishman, W.H. y Sie, H.: Organon-specific inhibition of human alkaline phosphatase isoenzymes of liver, bone intestine and placenta: L-phenylalanine, L-tryptophan and L-homoarginine. Enzimologia 41: 141 (1971)
35. Sims, G.: Primer libro de Clínica Enzimática. Bechman, (1979).
36. Coryn, G.: Elevation of serum alkaline phosphatase in pregnancy. J. Chir. (Paris) 33: 213 (1934)
37. Cayla, J. y Fabre, P.: La phosphatase serique pendant la gestation. Compt. Rend. Soc. Biol. 120: 748-750 (1935).
38. Ramsay, J., Thierens, V. y Magge, H.: Phosphatase alcaline. Brit. Med. J. i: 1199 (1938).
39. Kerleu, J. y Cayla, J.: Phosphatase alkaline in pregnancy. Gynec. Obstet. 39: 112 (1939).

40. McMaster, Y., Tennant, T., Clubb, J., Neale, F. y Posen, S.: The mechanism of the elevation of serum alkaline phosphatase in pregnancy. *J. Obst. Gynecol. Brit. Commonwealth.* 71: 735-739 (1964).
41. Beck, E. y Clark, L.: Plasma alkaline phosphatase. II. Normative data for pregnancy. *Am. J. Obst. Gynecol.* 60: 731-740 (1950).
42. Ghosh, N., y Fishman, W.: Purification and properties of molecular-weight variants of human placental alkaline phosphatase. *Biochem. J.* 103: 779 (1968).
43. Boyer, S.: Alkaline phosphatase in human sera and placentae. *Science.* 134: 1002 (1961).
44. McKay, D., Hersig, A., Adams, E. y Richardson, B.: Histochemical observations on the human placenta. *Obst. Gynec.* 12: 1-36 (1958).
45. Moss, D.: Alkaline phosphatase isoenzymes. *Clin. Chem.* 28: 2007-2016 (1982).
46. Lehman, F.: Immunological relationship between human placental and intestinal alkaline phosphatase. *Clin. Chem. Acta.* 65: 257-269 (1975).
47. Burlina, A.: Diagnostic significance of alkaline phosphatase isoenzymes. *Medilab.* 6: 18-26 (1935).
48. Lawson, G., Katzman, J., Kimlinger, T. y O'brein, J.: Isolation and preliminary characterization of a monoclonal antibody that interacts preferentially with the liver isoenzymes of human alkaline phosphatase. *Clin. Chem.* 31: 381-385 (1985).

49. Horne, M., Cornish, C. y Posen, S.: Use of urea desnaturation in the identification of human alkaline phosphatase. *J. Lab. Clin. Med.* 72: 905-915 (1968)
50. Barh, M., y Wilkison, J.: Urea as a selective inhibitor of human tissue alkaline phosphatase. *Clin. Chem. Acta.* 17: 367-370 (1967).
51. Hirano, K., Siglura, M., Sizuki, H. y Oda, T.: Characterization of tissue-specific isoenzyme of alkaline phosphatase from human and intestine. *Chem. Phar. Bull.* 25: 2524-2529 (1977).
52. Kitchener, P., Neale, P., Posen, S. y Brudenell-Woods: Alkaline phosphatase in maternal and fetal sera at term and during the puerperium. *Am. J. Clin. Path.* 44: 654-661 (1965).
53. Aleem, F.: Total and heat-stable serum alkaline phosphatase in normal and abnormal pregnancies. *Obstet. Gynecol.* 40: 163-172 (1972)
54. Bessey, O., Lowty, H. y Brock, M.: Method for the rapid determination of alkaline phosphatase with five cubic millimeters of serum. *J. Biol. Chem.* 164: 241 (1946)
55. Pledger, R., Steele, C., Belfield, R. y McLelland, A.: A routine method for alkaline phosphatase assay in pregnancy serum. *Clin. Chim. Acta.* 122: 71-74 (1982)
56. Birkett, D., Conyers, A., Neale, A., Posen, S. y Brundenell-Woods, J.: Action of urea on human alkaline phosphatase: with a description

- of some automated techniques for study of enzyme kinetics. Arch. Bioch. Bioph. 121: 470-479 (1967).
57. Fitz, M., James, J., Fennelly, M. y McGeeney, K.: The value of differential alkaline phosphatase thermostability in clinical diagnosis. Am. J. Path. 51: 194-201 (1969).
58. Moss, D., y Whitby, L.: A simplified heat-inactivation method for investigating alkaline phosphatase isoenzymes in serum. Clin. Chim. Acta. 61: 63-71 (1975)
59. Botterworth, P. y Moss, D.: The effect of urea on preparations in human alkaline phosphatase. Enzimología 32: 268 (1967)
60. Davidson, I. y Bernard, J.: Diagnóstico Clínico por el Laboratorio, 6a. edición, Ed. Salvat Editores, S.A. Barcelona, España. (1978) pag. 869.
61. Henry, R.J., Cannon, D.C.; Winkelman, J.W., y Zubizarrete, A.: Química Clínica. Bases y Técnicas. 2a. edición, Ed. JIMS, Barcelona, España. (1980) Tomo II.
62. Ashokraj, G., y col.: Placental phosphatases in normal and abnormal pregnancies: Parte I Indian J. Pathol. Microbiol. 28: 39-44 (1981).
63. Firth, J.A.: Histochemical localization of phosphatase in the pig placenta I. Non specific phosphatase and their relation to uteroferrin. Placenta 7: 17-25 (1986)

64. Hirano, K.A.: A highly sensitive assay method for human placental alkaline phosphatase involving a monoclonal antibody bound to a paper disk. *Anal. Biochem.* 154: 624-31 (1986).
65. Kamoda, T.B.: Ontogenic and phylogenic studies of intestinal, hepatic, and placental alkaline phosphatase as a late evolutionary development. *Gastroenterology* 91: 277-86 (1986).
66. Posen, S., Doherty, E.: The measurement of serum alkaline phosphatase in clinical medicine. *Adv. Clin. Chem.* 22: 165-245 (1981)
67. Schoenau, E., y Herzog, K.: Liquid-chromatographic determination of isoenzymes of alkaline phosphatase in serum and tissue homogenates. *Clin. Chem.* 32: 816-18 (1986).
68. Peaston, R. y Cooper, J.: Affinity electrophoresis of alkaline phosphatase isoenzymes. *Clin. Chem.* 32: 235-236 (1986).
69. Webb, P., McLaughlin, P., Risk, J. y Hohnson, P., Isolation of placental-type alkaline phosphatase associated with human syncytiotrophoblast membranes using monoclonales antibodies. *Placenta.* 7: 405-15 (1986).