

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

" FACULTAD DE QUIMICA "

" DEMOSTRACION DE LA ISOENZIMA PANCREATICA
DE LA FOSFATASA ALCALINA EN AFECCIONES -
PANCREATICAS BENIGNAS. "

(tema mancomunado)

ELISA HAYDEE MACHUCA MONTES

LEONOR DEL CARMEN QUIJANO FERRER

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

orientación BIOQUIMICO MICROBIOLOGO

1 9 7 8



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.

CLAS TESIS 1978

ABO M. T. 268 ~~1788~~ 263

FECHA _____

PROG. _____

3 _____



J U R A D O :

Presidente: Q.F.B. GUADALUPE VELEZ PRATT
Vocal: Q.F.B. DEA CORONADO PERDOMO
Secretario: Q.F.B. MA. ELENA BUSTAMANTE CALVILLO
1o. suplente: Q.F.B. GPE. LETICIA CARRASCO RIVERA
2o. suplente: Q.F.B. ROSA BEATRIZ MARTINEZ GOMEZ

Sitio donde se desarrollo el tema:

LABORATORIO DE BIOQUIMICA DEL HOSPITAL GENERAL CEN-
TRO MEDICO " LA RAZA " .

Sustentantes:

ELISA HAYDEE MACHUCA MONTES
LEONOR DEL CARMEN QUIJANO FERRER

Asesor del tema:

Q.F.B. DEA CORONADO PERDOMO

Supervisor técnico:

DR. SADO TH VASQUEZ ALCANTARA.

Maestra Dea Coronado Perdomo:

Reciba de dos de sus hijas, no solo
la gratitud por haber hecho posible
la realización de nuestro trabajo -
sino también el cariño que como amig
ga nos merece.

Dr. Sadoth Vásquez Alcántara:

Su ayuda y experiencia han sido de inestimable valor para nosotras, - no tenemos palabras para manifestar nuestra gratitud.

Dr. Pablo Rivera Hidalgo:

Gracias por habernos abierto las - puertas y habernos facilitado el - camino.

Dr. Jorge Mario Fuxman Rosemblat:

Permitanos expresarle nuestro sincero reconocimiento por la valiosa ayuda que nos brinda .

Queremos resaltar que en ningún otro lugar hubiésemos recibido el afecto y la cooperación que tan desinteresadamente nos brindó el personal de laboratorio de análisis clínicos del Hospital General Centro Médico " La Raza ". En especial la señorita Q.F.B. - Socorro Guedea Baca y la señorita Q.F.B. Guadalupe Martínez Vásquez

A mis amados padres:

José de Jesús Quijano Roca y

Leonor Ferrer de Quijano:

De quienes he recibido solo cosas buenas, decisión, confianza en mí misma, educación y sobre todo -- amor y respeto.

A mis queridos padres políticos:

Gustavo Millán Alpizar y

Alicia Ramirez de Millán:

Porque sin su ayuda y cariñosa -- protección, nunca hubiese podido alcanzar mis metas.

A mis hermanitos:

Pata, Felo, Tavo, Nana y Ariadnita

deseando que las cosas que puedan separarnos sean siempre mas pequeñas que nuestra decisión de permanecer unidos.

A Miguel Angel:

Quién ha sido un maravilloso compañero y mejor padre, y a quien quiero, respeto y admiro profundamente

Para Alain:

mi hijo adorado, porque para él han sido y serán mis esfuerzos, mi trabajo y todo mi amor de madre.

Con cariño para mi mejor amiga a --
quien quiero tanto como a cualquiera de mis hermanos y con quien ha sido un verdadero gusto trabajar, -
.... Haydeé

Con cariño a:

mi tía Elsa:

Quién como madre abnegada, lo dió
todo sin esperar nada, legándome
la más valiosa herencia, mi carre
ra.

mis papas, Héctor y Gloria:

Como una pequeña recompensa ante
los esfuerzos que han realizado -
para guiarme en la vida por el me
jor camino, con sabiduría y amor,
formando los principios que han -
regido y regirán mi existencia.

mis abuelos:

Elisa, Clementina y Luis y

mis hermanitos:

Jerry, Miny, Luigui y Sandrita,
por el cariño y la confianza que
han depositado en mi siempre

Leo:

deseando sinceramente que la cul-
minación de esta meta, sea el ini
cio de una nueva vida en la que -
imperen Lealtad, amor y felicidad

Joaquín:

Quién me ha hecho sentir el amor
verdadero y me ha convertido en
la mujer mas feliz.

I N D I C E
+++++

INTRODUCCION	...	1
GENERALIDADES	...	3
a) Concepto general de enzima	...	4
b) Concepto general de isoenzima	...	4
c) Importancia clínica de enzimas e isoenzimas	...	4
d) Las fosfatasa	...	5
e) Fosfatasa Alcalina (3.1.3.1)	...	6
f) Significado clínico de la fosfatasa alcalina	...	8
g) Isoenzimas de la fosfatasa alcalina	...	12
h) La fracción " Pa " de la fosfatasa alcalina	...	17
i) Hallazgos del servicio de laboratorio de análisis clínicos del hospital general Centro Médico " La Raza "	...	27
PARTE EXPERIMENTAL	...	30
- Material Biológico	...	31
- Metodología	...	33
I.- Extracción de la fosfatasa alcalina	...	33
II.- Determinación de unidades de fosfatasa alcalina	...	34
III.- Electroforesis de microzona	...	37
RESULTADOS	...	43
DISCUSION	...	55

RESUMEN	... 59
CONCLUSIONES	... 61
BIBLIOGRAFIA	... 63

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

El descubrimiento de las isoenzimas ha sido de gran importancia por su gran especificidad tisular y resulta de gran valor en la emisión de diagnósticos diferenciales, ya que puede ser definitivo para la salud e incluso, la vida del paciente.

Hasta hace poco se tenía conocimiento de las isoenzimas de origen hepático, óseo, placentario e intestinal de fosfatasa alcalina todas ellas plenamente identificadas y estudiadas química y electroforéticamente. Sin embargo estudios recientes efectuados por Chung-Ja Mo Cha y colaboradores (1), revelaron la presencia de una nueva isoenzima de fosfatasa alcalina, la cual demostró un corrimiento electroforético más lento que la isoenzima intestinal lenta (la fracción más lenta conocida hasta entonces) y fué llamada fracción " Pa " o pancreática, atribuyéndole un origen pancreático en virtud de que aparecía en sueros de pacientes con cáncer pancreático exclusivamente (exceptuando un caso de hemocromatosis sin desarrollo maligno).

Por otra parte en el laboratorio de bioquímica del Hospital General de Centro Médico " La Raza " y con motivo del estudio de padecimientos de vías biliares, se hicieron hallazgos interesantes con respecto a la banda " Pa ", ya que se encontró en sueros de pacientes con afecciones benignas del páncreas (pancreatitis) y en otras cuyo diagnóstico era " obstrucción de vías biliares " (2), lo cual ponía en tela de juicio la exclusividad de la fracción " Pa " en padecimientos malignos y señalaba

al mismo tiempo la necesidad de investigar más a fondo si dicha fracción isoenzimática podía presentarse en -- cualquier afección pancreática benigna o maligna.

En los casos con diagnóstico "obstrucción de vías biliares", cabría pensar en una participación pancreática en atención a la contiguidad de la glándula con estructuras que pudieran estar involucradas con la patología en cuestión, tales como hígado, vías biliares y duodeno por lo que está abierta la posibilidad de demostrarla estudiando los tejidos participantes.

Estas han sido las inquietudes básicas que han fomentado nuestro interés para aclarar estos puntos, pues existen corrientes contrarias que pueden no serlo realmente y todo se explica por la existencia de detalles que hasta ahora no se han tomado en cuenta.

Nosotros nos proponemos mediante el estudio electroforético de extractos de los órganos cercanos al páncreas, - de páncreas enfermos, sanos así como en sueros de pa -- cientes con pancreatitis y otros tipos de afecciones, - tratar de comprobar que la banda " Pa " es en efecto originada por el páncreas y dilucidar si es o no exclusiva de afecciones malignas pancreáticas, determinando -- así su valor diagnóstico real .

“ G E N E R A L I D A D E S ”
+++++

a) CONCEPTO GENERAL DE ENZIMA.-

Las enzimas constituyen la clase de moléculas proteicas más numerosa y especializada, son catalizadores químicos específicos de las reacciones que, en conjunto, -- constituyen el metabolismo intermediario de las células, muestran un grado de especificidad bastante alto para los sustratos, variando el grado de especificidad de una enzima a otra. (3)

b) CONCEPTO GENERAL DE ISOENZIMA.-

Cierto número de enzimas diferentes existen en múltiples formas moleculares dentro de una misma especie o célula, estas pueden ponerse de manifiesto y separarse mediante electroforesis de extractos celulares. Las formas múltiples de una misma enzima, reciben el nombre de " isoenzimas " y exhiben diferencias en sus propiedades y características en general.

Entre las enzimas de interés clínico que existen en múltiples formas tenemos: amilasa, fosfatasa alcalina, cinasa de creatina, deshidrogenasa láctica, y otras.

El número de formas electroforéticas variarán de acuerdo con la técnica usada para separarlas y con la presencia o ausencia de diversos iones (3,4).

c) IMPORTANCIA CLÍNICA DE ENZIMAS E ISOENZIMAS.-

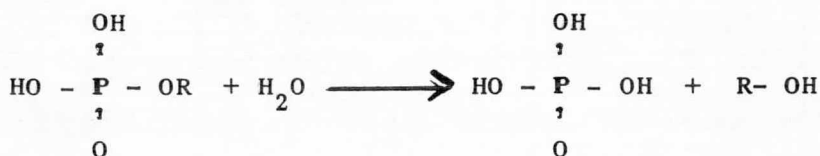
Cambios en la concentración de enzimas en células tis-

lares, reflejarán estados de salud o enfermedad, es por ésto que se utiliza la medición o detección de las concentraciones de enzimas en la sangre, ya que guardan paralelismo con los cambios ocurridos en órganos o tejidos específicos.

Es de interés considerable el hecho de que las diversas isoenzimas de una enzima dada varían de un tejido a otro y son identificables, obteniendo patrones enzimáticos en los que el tipo de imagen observada sirve para poner de manifiesto la fuente tisular de la enzima. Es evidente que las imágenes de las enzimas para diagnóstico diferencial pueden ser de valor significativo.

d) LAS FOSFATASAS.-

Muchas enzimas del suero, hidrolizan monoesteres de fosfato, en especial monoesteres del ácido orto-fosfórico con formación de un alcohol y un ión fosfato:

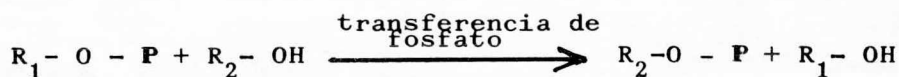


Las enzimas que catalizan la reacción anterior se conocen como fosfatasa; el alcohol esterificado del ácido orto-fosfórico ($(\text{HO}_3)\text{PO}$) puede ser un alcohol alifático simple, un alcohol polihidroxilado o un compuesto

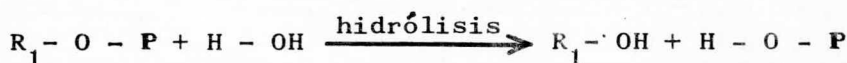
aromático, ya que las fosfatasa no son una sola enzima sino un grupo de enzimas afines relativamente inespecíficas en cuanto al sustrato que atacan (4)

Entre las menos específicas por lo que hace al sustrato encontramos dos tipos que se diferencian porque su actividad es óptima a pH alcalino (de 8 a 10) Fosfatasa alcalina o ácido (de 4 a 5); de ahí que se conozcan como fosfatasa alcalina (F.A) (3.1.3.1) y ácida (3.1.3.2) -- respectivamente(5).

Se considera que probablemente las fosfatasa transfieren un grupo fosfato de un sustrato donador a un compuesto aceptor que contiene un grupo -OH



Si el aceptor es agua lo que ocurrirá será una hidrólisis.



e) FOSFATASA ALCALINA (3.1.3.1).-

Pertenece al grupo de enzimas que hidrolizan los monoes-
 teres del ácido orto-fosfórico. Tiene una actividad
 óptima a pH 9.8 pero puede variar de acuerdo a la natu-
 raleza del sustrato y al medio amortiguador presentes.

Cuando se usa fenil-alanina como sustrato, la escala normal de actividad en suero de la enzima es de 2.1 a 9.2 unidades internacionales/ litro (UI/l), con glicero-fosfato como sustrato, a pH 8.6 va de 0.8 a 2.7 UI/l usando el mismo sustrato pero a pH 9.3 la actividad normal en el suero es de 1.3 a 4.9 UI/l, si bien se han encontrado valores mayores en la infancia y la pubertad (6).

Los iones Mg^{++} y Mn^{++} son activadores de la enzima, los iones $PO_4^{=}$, Zn^{++} , CN^{-} , AsO_4^{-4} , Be^{++} , $SO_4^{=}$ y oxalato la inhiben. La naturaleza del amortiguador afecta la velocidad de acción de la enzima. Entre los amortiguadores más comunmente utilizados para determinar fosfatasa alcalina se encuentran el barbital, glicina, piperacina, 2-metil, 2-amino propanol (MAP), trishidroximetilaminometano (TRIS) y dietanol amina con un pH que varia entre 8 y 10 (4).

La fosfatasa alcalina está presente en todos los tejidos del organismo y es en los espacios intercelulares del hueso, en los hepatocitos, en el riñón, intestino y placenta en donde alcanza una concentración especialmente alta (5).

La fosfatasa alcalina en suero se desnaturaliza rápidamente pero es estable a temperaturas más bajas (las formas de placenta son más estables). A temperatura ambiente la enzima mantiene su actividad por 24 horas

y en ocasiones se observa un aumento del 10 % en su actividad enzimática. En refrigeración la actividad -- desciende muy lentamente y en congelación mantiene su -- plena actividad por largo tiempo (6,7)

f) SIGNIFICADO CLINICO DE LA FOSFATASA ALCALINA.-

Como elemento diagnóstico diferencial de las enfermedades hepáticas, se mide la F.A. desde hace más de 30 años; también se utiliza su determinación en el estudio de enfermedades óseas, hiperparatiroidismo y recientemente se le ha encontrado aumentada en neoplasias de -- páncreas y vesícula aunque en estos casos se le considera con mucha reserva, ya que todavía no hay un acuerdo unánime acerca de las causas y mecanismos bioquímicos -- que motivan la elevación del nivel de F.A. sérica en ta les enfermedades . No obstante los niveles elevados -- de esta enzima en obstrucción de conductos biliares por cálculos y neoplasias parecerían lógicos, pues en condiciones normales se excretan grandes cantidades de enzi-ma en la bilis. Sin embargo esta consideración pierde parte de su valor cuando se sabe que el nivel de F.A. -- se mantiene dentro de los límites normales en niños con atresia completa (falta de desarrollo) de los conductos biliares. Altos niveles en cirrosis sin aumento paralelo de bilirrubina en suero hacen pensar que podría intervenir otra fuente de F.A. .

Los aumentos moderados de esta enzima que suelen acompañar a la hepatitis viral, a diferencia de las elevaciones considerables de otras enzimas celulares como aminotransferasa de piruvato (GPT), sugieren que no hay liberación de la enzima desde los hepatocitos. Sin embargo se ha demostrado que la fracción sérica de isoenzimas de F.A. que aumentan durante la ictericia intrahepática es semejante a la que se puede extraer de las células hepáticas (5,6,8).

En resumen en padecimientos hepáticos se presentan valores altos de F.A. en ictericia obstructiva e intrahepática, correspondiendo los valores más altos a la ictericia obstructiva.

En ausencia de ictericia, un nivel aumentado de F.A. es una buena pauta para el diagnóstico de lesiones hepáticas como tumores de hígado, trastornos hepáticos debidos a fármacos o condiciones más raras como sarcoidosis e histoplasmosis entre otras. (5).

Ultimamente apareció otra indicación para la valoración de F.A. sérica al descubrir que en el tercer trimestre del embarazo el nivel de la enzima se ve aumentado en un 57.6 % del valor normal; el origen de este aumento se ha atribuido a la placenta. En caso de separación prematura con muerte y remoción fetal, se producirá un descenso brusco del nivel de F.A. en suero. Esta de -

terminación sólo tendrá un valor diagnóstico cuando se ha llevado un control del nivel sérico de la enzima desde el inicio del embarazo. La fosfatasa alcalina de origen placentario es fácilmente identificable, ya que es termoestable (resiste calentamiento por 30 min a 56° C) resiste a la inactivación con EDTA (ácido etilen diamino tetraacético) y tiene una mayor actividad si se utiliza glicerofosfato como sustrato (5).

En enfermedades óseas encontramos valores elevados de F.A. en la enfermedad de Paget (osteitis deformante) -- hiperparatiroidismo, osteomalacia, raquitismo, algunas fracturas y cuando existen metástasis de carcinoma osteoblástico.

En la enfermedad de Paget los valores más altos encontrados pueden exceder a 140 UI/l si se utiliza el método de Bessey, Lowry Brock, los niveles enzimáticos son proporcionales a la cantidad de hueso que involucra la enfermedad. Los niveles pueden permanecer estacionarios por largos períodos o mostrar sólo aumentos pequeños; un repentino incremento sugiere el desarrollo de un sarcoma osteogénico.

En hiperparatiroidismo los valores aumentan también -- hasta 140 UI/l (por el método de Bessey, Lowry, Brock -- B.L.B.) por lo general son más bajos que en la enfermedad de Paget. Los niveles pueden permanecer esta

cionarios por largos períodos pero suelen regresar a la normalidad después de una paratiroidectomía.

Raquitismo infantil o problemas nutricionales con desórdenes renales o intestinales vienen acompañados por un aumento del nivel sérico de F.A. el cual refleja la severidad de las condiciones; raquitismos tempranos dan valores de 28 UI/l (B.L.B.) pero valores de 140 UI/l (B.L.B) se encuentran en casos serios. Una terapia adecuada con vitamina " D " es seguida de un declive de los valores en suero hacia la normalidad.

En osteomalacia el nivel de F.A. no excede de 21 UI/l (B.L.B.), en sarcoma osteogénico los niveles séricos de la enzima pueden variar desde la normalidad en tumores líticos, hasta muy elevados en tumores osteoblásticos; algunas fracturas pueden acompañarse de una pequeña elevación de la fosfatasa alcalina sérica que generalmente es menor a 14 UI/l (B.L.B.).

Se conoce una hipofosfatasa que afecta a los lactantes con trastornos genéticos hereditarios; la deficiencia de F.A. se observa en suero, leucocitos y tejidos, incluyendo los osteoblastos presentándose fracturas incluso en el caso de traumatismos pequeños. Otra característica bioquímica importante de la enfermedad es la excreción urinaria de la fosfoetanol amina, quizá porque este compuesto sea el sustrato habitual de la enzima y

su falta de utilización podría explicar su excreción urinaria.

g) ISOENZIMAS DE LA FOSFATASA ALCALINA.-

Las isoenzimas de fosfatasa alcalina que se han diferenciado hasta la fecha son:

- | | | |
|----|-----------------|-------------------|
| 1) | Hígado rápido | (L ₁) |
| 2) | Hueso | (B) |
| 3) | Placenta | (P1) |
| 4) | Hígado lento | (L ₂) |
| 5) | Intestino | (I ₁) |
| 6) | Intestino lento | (I ₂) |

Actualmente se ha encontrado una nueva banda electroforética a la que se ha denominado " Pa " en virtud que se le atribuye origen pancreático aunque todavía está en estudio (1,7).

Las isoenzimas de fosfatasa alcalina pueden diferenciarse por varios métodos como son:

10. Ensayo de especificidad de sustrato.
20. Uso de activadores e inhibidores
30. Inactivación por calor.
40. Procedimientos inmunológicos.
50. Cromatografía.
60. Electroforesis.

10. Ensayo de especificidad de Sustrato.-

Aunque las isoenzimas de F.A. son relativamente inespecíficas en cuanto a sus requerimientos de sustrato, algunos sustratos se pueden emplear para diferenciarlas entre sí como por ejemplo: Beta-glicerofosfato, fenil---fosfato, para-nitrofenil fosfato, fosfato de fenoftaleina, etc.

Moss y colaboradores caracterizaron las isoenzimas de los diferentes tejidos determinando su constante de Michaelis (Km) con beta-naftil fosfato como sustrato; los valores encontrados son:

Hígado	6.7×10^{-5}
Intestino	9.0×10^{-5}
Hueso	1.1×10^{-4}
Riñón	1.0×10^{-4}

Como se puede notar, la diferencia entre los valores de Km es muy pequeña y su determinación por lo tanto no resulta práctica.

20. Uso de activadores e inhibidores.-

El uso de activadores e inhibidores enzimáticos para caracterizar enzimas ha tenido aplicación para la diferenciación de las isoenzimas ósea e intestinal de F.A..

Las fosfatasas ósea y hepática son inhibidas en un 70 % por solución de $\text{Ni } 10^{-2} \text{ M}$; la isoenzima de placenta es

más resistente a la inactivación con EDTA que las de - otros tejidos: la intestinal es inhibida por l-fenilalanina de tal manera que utilizando una mezcla de EDTA y fenilalanina como sustrato podremos diferenciar entre - la banda intestinal inhibida y placentaria resistente. Sin embargo, la utilización de activadores e inhibido - res para la caracterización de las isoenzimas de F.A. es complicada y requiere gran cuidado y tiempo, por lo que se utiliza poco en la práctica.

3o. Inactivación por calor.-

Las técnicas de inactivación por calor fueron las prime ras que se usaron para el estudio de la fosfatasa alcalina de placenta. Esta se ha encontrado estable al calor 10 min a 56°C o 5 min a 65°C La inactivación por calor tiene una seria desventaja: se producen marcados cambios en la desnaturalización aún con pequeñas variaciones de temperatura, por lo que no se pueden determinar las fuentes orgánicas de la F.A. sérica conociendo sólo su sensibilidad al calor, ya que el error sería -- muy grande (7).

4o. Procedimientos inmunológicos.-

La aplicación de técnicas inmunológicas para el estudio de tejidos específicos fué largamente estudiada por --- Schalomowitz y Bodansky, quienes encontraron que las -- isoenzimas de hueso e intestino precipitan siempre com-

plétamente con enzimas homólogas pero muestran reacciones cruzadas.

Existen tantas formas antigénicas de F.A. como isoenzimas, de tal manera que hay una forma antigénica para cada una de ellas, motivo por el cual, al reaccionar con los antisueros se presenta una gran cantidad de reacciones cruzadas, por lo que la importancia de la diferenciación inmunoquímica de F.A. no está bien clara (7,9,10,11).

5o. Cromatografía.-

La fosfatasa alcalina sérica ha sido fraccionada por cromatografía utilizando columnas de celulosa, encontrando 2 picos de actividad en suero humano. Últimamente también se ha utilizado para este tipo de cromatografía columnas de Sephadex G 200, pero la técnica de elución es un poco compleja y presenta diversos problemas.

6o. Electroforesis.-

Las isoenzimas de fosfatasa alcalina son separadas por electroforesis en acetato de celulosa u otros soportes tales como gel de acrilamida, agar o almidón. La actividad relativa es determinada por incubación en gel de agar, que contiene indoxil sustrato, seguida de la determinación densitométrica del color azul resultante.

Con el objeto de facilitar la interpretación de los electroforegramas, cantidades iguales de suero calentado y no calentado son aplicadas en dos posiciones en la misma membrana.

En presencia de fosfatasa de hueso el calor produce un agudo decremento en la actividad y sólo un 20 % de variación en la fosfatasa de hígado. Una mezcla de fosfatasa intestinal y placentaria se incluye como una marca que sirve de punto de referencia para determinar la posición de las diferentes isoenzimas de F.A.

Por este método se han encontrado cuando menos 6 bandas cuya movilidad al ánodo en membranas de acetato de celulosa Beckman de microzona No. 324330, es en orden decreciente como sigue:

- a) Hígado rápido (L₁)
- b) Hueso (B)
- c) Placenta (Pl)
- d) Hígado lento (L₂)
- e) Intestino rápido (I₁)
- f) Intestino lento (I₂)

una séptima banda de mayor movilidad que las isoenzimas intestinales es encontrada ocasionalmente. Se trata de la isoenzima pancreática o banda " Pa ".

La separación de isoenzimas de fosfatasa alcalina se u-

tiliza clínicamente para determinar su origen, conociendo es fácil determinar la causa de la enfermedad o de la lesión que existe y por consiguiente resulta más fácil el tratamiento ya que se ataca desde un principio - el problema específico. (4,5,7,8).

h) LA FRACCION " Pa " DE LA FOSFATASA ALCALINA.-

De acuerdo con los estudios efectuados por Chung-Ja Mo Cha y colaboradores (1), se han separado por electroforesis en membranas de acetato de celulosa siete bandas diferentes ya mencionadas anteriormente, la banda de movimiento más lento llamada " Pa ", se observó en sueros de 16 pacientes, 15 de los cuales estaban afectados de cáncer pancreático y sólo uno con un padecimiento benigno (hemocromatosis). Se estudiaron además 50 pacientes con otros tipos de afecciones malignas y benignas - sin encontrar la mencionada banda " Pa ".

Chung-Ja Mo Cha utilizó sueros que en la rutina del laboratorio tuvieron actividad anormalmente alta de F.A., aunque algunos pacientes mostraron actividad dentro de las escalas normales.

La separación de las isoenzimas por electroforesis de microzona y el estudio de sus propiedades ayudó en la determinación de sus respectivos orígenes tisulares. En la figura No. 1 se muestran electroforegramas que ex

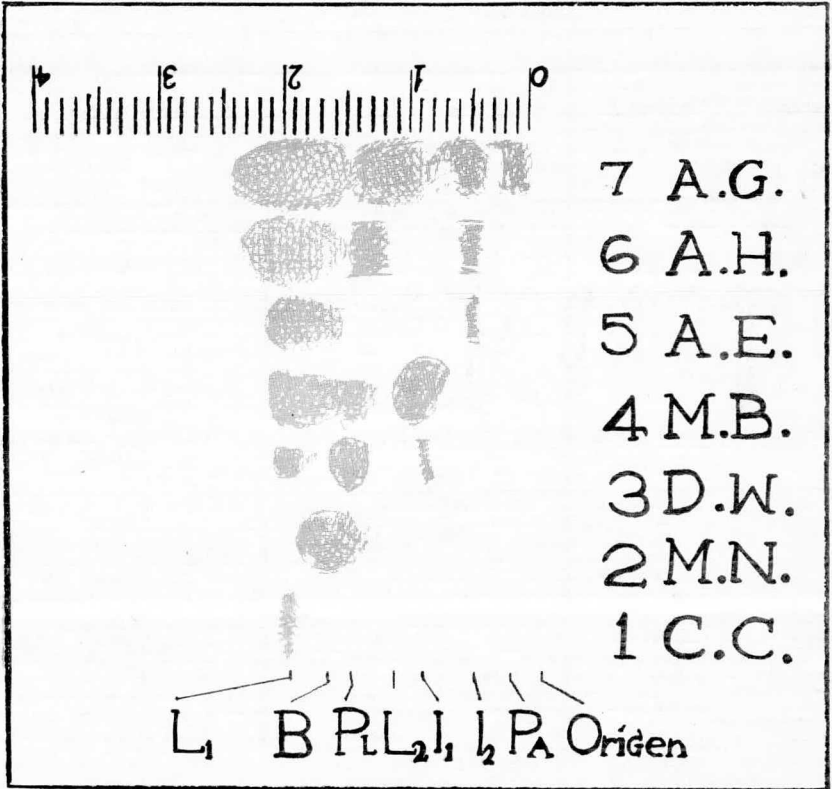


Figura No. 1.- Perfiles y orígenes tisulares de las isoenzimas de F.A. en sueros con la actividad de la enzima incrementada .

hiben varias bandas correspondientes a las isoenzimas de la F.A. sérica humana.

La figura No. 2 muestra los trazos densitométricos obtenidos de los mismos sueros teñidos con una mezcla de -- reacción que contiene L-fenilalanina o L-Homoarginina. Los sueros pertenecen a personas cuyas iniciales, edad en años, sexo, diagnóstico y actividad de fosfatasa alcalina sérica total en unidades King-Armstrong (KA) son

- 1) C.C., 40 fem., normal, 4 U.KA
- 2) M.N., 70, fem., osteoporosis, fracturas de compresión parcial de T - 3, T - 4 y T - 9 (cuerpos vertebrales/cáncer uterino metastásico a la pelvis/ efusión pleural, 16 UKA.
- 3) D.W., 64, fem., embarazo normal a término completo (parto normal el mismo día) 14 UKA.
- 4) M.B., 64, fem., osteoporosis/ várices esofágicas/ congestión mucosa del ileón terminal/ cirrosis post-hepática, 40 UKA.
- 5) A.G., 50, mas., carcinoma de cabeza de páncreas, 14 UKA.
- 6) A.H., 72, mas., carcinoma de cabeza de páncreas, 18 meses pancreatoclectomía total postoperativa/ adenocarcinoma metastásico de hígado, pulmones y retroperitoneo, 55 UKA.
- 7) A.G. 65, fem., adenocarcinoma de la cabeza del páncreas con metastásis a duodeno y estómago, 100 UKA.

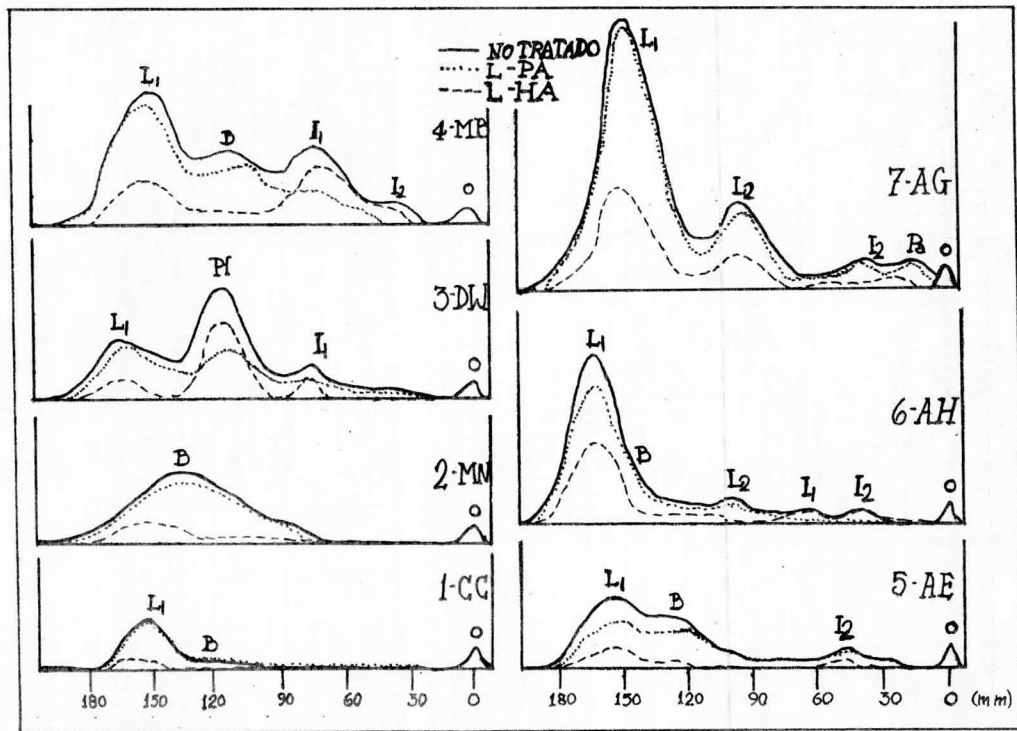


Figura No. 2.- Líneas sólidas.- Trazos densitométricos de los electroforegramas de la figura No. 1

Líneas punteadas y líneas quebradas.- trazos densitométricos de los electroforegramas de los mismos sueros teñidos sobre la mezcla de -gel-sustrato con L-f y L-h, respectivamente

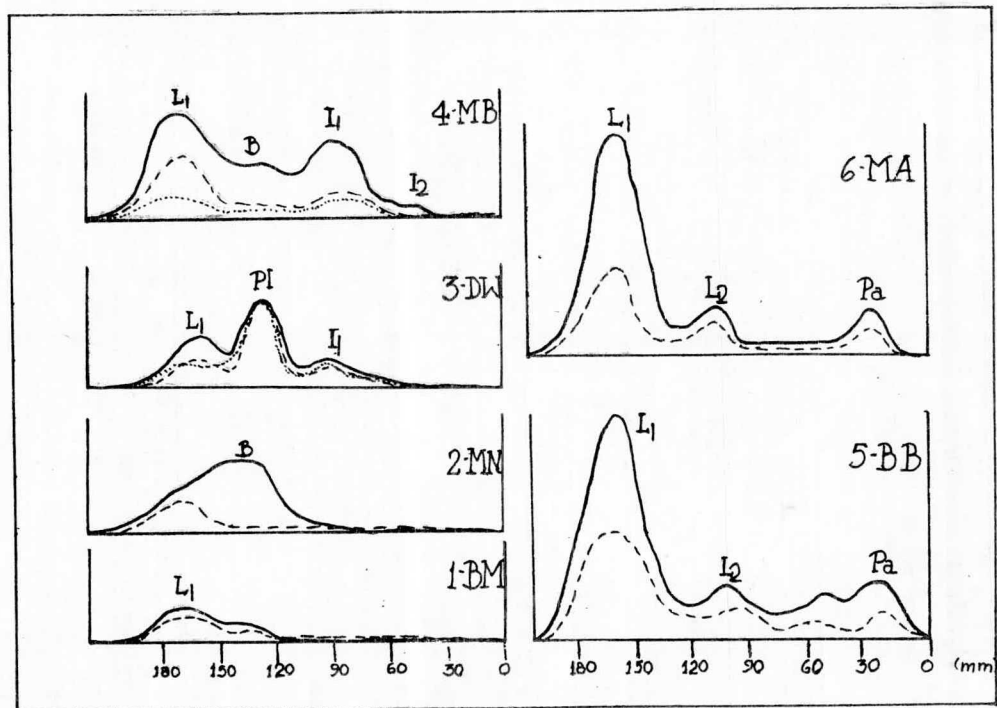


Figura No. 3.- Líneas sólidas.- trazos densitométricos de electroforegramas de sueros no calentados

Líneas quebradas y líneas punteadas.- trazos densitométricos de * electroforegramas de los mismos sueros, calentados 10 min a 56°C y por 5 min a 65°C respectivamente.

La figura No. 3, muestra los efectos del calentamiento sobre los mismos sueros.

las iniciales de los pacientes, edad, sexo, diagnóstico y unidades de F.A. sérica total son:

- 1) B.N., 29, mas., normal, 4 UKA.
- 2) M.N., 70, fem., osteoporosis, fracturas de compresión parcial de T - 3, T - 4, T - 9 (cuerpos vertebrales) cáncer uterino metastásico a la pelvis/ efusión pleural, 16 UKA.
- 3) D.W., 23, fem., embarazo normal a término completo -- parto normal el mismo día, 14 UKA
- 4) M.B., 64, fem., osteoporosis, várices esofágicas/ - congestión mucosa del ileón terminal/ cirrosis post - hepática, 40 UKA.
- 5) B.B., 65, fem., adenocarcinoma de la cabeza del páncreas/ metástasis a hígado, pulmones, nódulos linfáticos, 100 UKA.
- 6) M.A., 44, fem., adenocarcinoma de la cabeza del páncreas, 115 UKA (1).

De acuerdo con lo que hemos visto se sabe que la banda " Pa " es más termolabil que la isoenzima hepática y su comportamiento ante inhibidores del tipo de la l-fenilalanina y L-homoarginina es semejante al de la banda L₁. Los sueros en que se ha encontrado la fracción " Pa ", exhiben una banda difusa en la región en que emigran -- las isoenzimas de origen intestinal, siendo su estabili

Tabla No. 1.- Efectos del calor y los inhibidores estereoespecíficos sobre las isoenzimas de fosfatasa alcalina sérica humana .

	% de actividad remanente \pm SD		
	Calor	i n h i b i d o r e s	
	56°C, 10 min.	L-fenilalanina	L-homoarginina
	Sueros que no presentaron la banda " Pa "		
L ₁	36.3 \pm 19.3 (9)	86.1 \pm 10.8 (13)	41.6 \pm 11.2 (12)
B	6.9 \pm 9.9 (10)	81.7 \pm 19.7 (11)	34.4 \pm 15.1 (11)
Valor P Vs L ₁	0.001	0.40 n.s.	0.30 n.s.
L ₂	9.8 \pm 9.8 (5)	70.5 \pm 25.0 (5)	37.4 \pm 32.0 (6)
Valor P Vs L ₁	0.02	0.50 n.s.	0.30 n.s.
I ₁ + I ₂	38.5 \pm 16.8 (9)	20.1 \pm 16.9 (13)	84.2 \pm 16.6 (12)
	Sueros que presentaron la banda " Pa "		
L ₁	47.4 \pm 1.9 (13)	82.6 \pm 5.3 (8)	49.7 \pm 3.8 (7)
L ₂	28.8 \pm 2.7 (13)	74.6 \pm 19.3 (8)	41.0 \pm 2.3 (7)
Valor P Vs L ₁	0.001	0.20 n.s.	0.10 n.s.
Valor P Vs Pa	0.005	0.10 n.s.	0.70 n.s.
Región I	24.3 \pm 4.0 (13)	61.3 \pm 15.9 (8)	56.3 \pm 10.3 (7)
Valor P Vs L ₁	0.001	0.01	0.50 n.s.
Valor P Vs Pa	0.005	0.10 n.s.	0.50 n.s.
Banda " Pa "	39.0 \pm 1.9 (13)	82.6 \pm 27.4 (8)	47.5 \pm 12.2 (7)
Valor P Vs L ₁	0.001	0.995 n.s.	0.80 n.s.

Comparación de isoenzimas hepática e intestinal.

Con L ₁ Vs sin Pa	0.05 n.s.	0.40 n.s.	0.05 n.s.
I ₁ + I ₂ con Pa Vs			
región I sin Pa	0.001	0.001	0.001

** n.s. = no significativa

dad al calor y su inhibición estereoespecífica diferentes a las de estas isoenzimas cuando pertenecen a sueros que no muestran la banda " Pa ". Es decir cuando estuvo presente la banda " Pa " la isoenzima intestinal no sólo se separa claramente en I_1 e I_2 , sino que también las propiedades de las isoenzimas en esta banda de la región I parecen diferir de las propiedades de las isoenzimas intestinales en suero que no presenta la banda " Pa " .

La tabla No. 1 reúne los efectos del calor, L-fenilalanina y L-homoarginina sobre la banda " Pa " y sobre algunas de las bandas isoenzimáticas que aparecen más frecuentemente; L_1 , B, L_2 , Pl, I_1 e I_2 ; los efectos del calor sobre las bandas I_1 e I_2 y los de inhibidores son idénticos, de ahí que fuese tratada como una entidad -- única.

La banda " Pa " localizada a 20 - 30 mm, difiere claramente del punto de aplicación y de las bandas intestinales, es más termoestable que la banda L_2 y menos estable que la banda L_1 . Los efectos de inhibidores sobre la banda " Pa " no son significativamente diferentes de los obtenidos sobre las isoenzimas L_1 y L_2 hepáticas.

En la tabla No. 2 observamos la frecuencia de aparición en sueros de pacientes con cáncer de páncreas de la banda " Pa ", en ella se resumen datos sobre la F.A. séri-

Tabla No. 2.- Mediana y rango, Fosfatasa alcalina sérica total actividad de le enzima.

Grupo ^a	No. pa- cientes	Banda "pa"	Unidades K-A ^b	Fracción de actividad enzimática (% total)				Pa
				L ₁	B + Pl	L ₂	I ₁ + I ₂	
I	18	15	43(8 - 190)	68(50 - 78)	— ^c	11(0 - 35)	6(0 - 20)	7(0 - 14)
II	10	0	29(7 - 155)	56(33 - 81)	18(0 - 53)	5(0 - 30)	6(2 - 33)	0
III	18	0	11(7 - 25)	59(0 - 86)	30(14 -100)	0(0 - 11)	1(0 - 19)	0
IV	16	1 ^d	23(10 - 55)	64(5 - 84)	17(0 - 82)	5(0 - 26)	6(0 - 30)	0(0 - 13)
V	4	0	21(14 - 27)	61(31 - 78)	8(0 - 54)	18(0 - 30)	9(3 - 15)	0

a.- GRUPO I: malignidad envolviendo páncreas. GRUPO II: malignidad envolviendo el sistema hepato-
biliar pero no páncreas. GRUPO III.- malignidad de otros órganos con inclusión del sistema -
hepatobiliar y páncreas. GRUPO ½V: Desordenes benignos del sistema hepatobiliar y el páncreas
GRUPO V: otras condiciones no malignas.

b.- Actividad de fosfatasa alcalina sérica en unidades King Armstrong.

c.- B y/o Pl (bandas) en este grupo resuelto únicamente para L₁ y L₂.

d.- Pacientes con hemocromatosis.

Tabla No. 3.- Fracción de actividad enzimática (% total)

No.	Pacien te	Edad	Sexo	K-A	L ₁	B + Pl	L ₂	Región I	Pa	Diagnóstico.
1	D.F.	65	M	12	62	'b	11	20	6	Adenocarcinoma de la cabeza del páncreas, metástasis a hígado y nódulos linfáticos, pancreatitis crónica, ictericia obstructiva, después de muchas operaciones/G.L.
2	E.P.	59	M	36	78	'	9	4	9	Adenocarcinoma de la cábeza del páncreas, metástasis a cavidad peritoneal.
3	V.T.	67	M	40	64	'	14	8	14	Cáncer de la cabeza del páncreas con obstrucción completa del ducto biliar común, diabetes M.
4	L.S.	40	M	40	68	'	18	6	8	Adenocarcinoma de la cabeza del páncreas.
5	B.B.	65	F	100	66	'	12	10	12	Adenocarcinoma de la cabeza del páncreas, metástasis a hígado, pulmones, linfáticos, etc.
6	H.A.	71	F	110	66	'	10	3	9	Adenocarcinoma de la cabeza del páncreas, metástasis a hígado.
7	M.A.	44	F	115	75	'	9	4	12	Adenocarcinoma de la cabeza del páncreas.
8	J.J.	52	M	40	77	'	9	10	4	Cáncer metastásico, envolviendo glándula adrenal, colón, hígado y páncreas.
9	H.S.	46	M	55	53	'	35	9	3	Cáncer metastásico de páncreas.
10	A.G.	65	F	65	75	'	18	3	4	Adenocarcinoma de páncreas con metástasis a ovario, estomago.
11	C.W.	62	M	62	64	'	16	6	14	Cáncer de páncreas con metástasis a hígado.
12	H.M.	31	F	150	67	'	15	7	11	Cáncer de ovario, metástasis a páncreas y nódulos linfáticos.
13	A.E.	53	F	190	50	30	9	6	5	Cáncer de seno, metástasis a páncreas, huesos y pulmones.
14	A.E.	75	F	20	69	'	17	7	6	Cistadenocarcinoma del páncreas
15	I.P.	65	M	12	66	9	11	6	9	Cáncer de páncreas, metastasis a hígado, y linfáticos.
16	H.A.	73	M	8	68	32	0	0	0	Adenocarcinoma del páncreas con carcinomatosis peritoneal .
17	A.E.	67	M	14	70	25	0	5	0	Tumor en el cuerpo del páncreas.
18	A.H.	72	M	55	74	17	0	8	0	Adenocarcinoma metastásico del hígado pulmones, después de pancreatctomía total por cáncer.

b.- Bandas B y/o Pl resueltas únicamente para L₁ y L₂(bandas)

ca total e isoenzimas de 66 pacientes, de los que 16 exhiben la banda " Pa " y excepto uno de ellos todos tienen cáncer de páncreas.

La actividad total de F.A. y la actividad enzimática relativa, de pacientes con malignidad que involucra al -- páncreas se muestra en la tabla No. 3.

Siete pacientes de los estudiados por Chung-Ja Mo Cha y colaboradores (1 - 7) tuvieron cáncer de la cabeza del páncreas. Los ocho pacientes restantes con banda " Pa " en suero (8 - 15) tuvieron cáncer en localidades inespecíficas del páncreas. No obstante los ocho pacientes tuvieron metastásis avanzadas de manera que la cabeza - del páncreas pudo estar involucrada. La banda " Pa " sérica no fué detectada en suero de tres pacientes (16-18) o de otros 50 pacientes (grupos II, III, IV, V, de la tabla No. 2) con enfermedades malignas o benignas - del sistema hepatobiliar o de otros órganos (1).

i) HALLAZGOS DEL SERVICIO DE LABORATORIO DE ANALISIS - CLINICOS DEL HOSPITAL GENERAL DEL CENTRO MEDICO -- " LA RAZA ", DEL I.M.S.S.

Con motivo del estudio de algunos problemas obstructivos de vías biliares, efectuados en el mencionado servicio, se encontró en el suero de algunos pacientes con diagnóstico clínico (ocasionalmente comprobado por estu

dio anatomopatológico) de afecciones malignas de hígado vías biliares y páncreas y en ocasiones de pancreatitis aguda edematosa, una fracción similar por su desplazamiento electroforético, pero más nitida y angosta que la descrita por los autores mencionados.

Se tomaron para el estudio los electroforegramas de todos los casos en donde apareció la banda nítida que migra ente el punto de aplicación y la banda lenta de intestino, además de un extracto de páncreas humano en amortiguador de tris-glicina, pH 9.3, el que fué sometido a electroforesis como cualquier muestra de suero.

El estudio de los electroforegramas demostró claramente que la banda encontrada es distinta de la banda de intestino lento (I_2) y de la mancha que en ocasiones queda en el punto de aplicación y lo señala.

La electroforesis del extracto pancreático demostró la presencia de una banda semejante a la observada colocada entre el punto de aplicación y la banda lenta de la isoenzima de intestino .

La fracción isornzimática encontrada en el suero de pacientes con diagnóstico de neoplasias malignas de hígado, vías biliares y páncreas, así como de pancreatitis aguda edematosa se identifica con aquella fracción des-

crita por Chung-Ja Mo Cha y colaboradores en relación -
extricta con neoplasias malignas de páncreas, sólo que
aparece en pacientes con diagnóstico clínico de afeccion
nes de territorios extrapancreáticos (hígado y vías bi
liares), así como alteraciones benignas del páncreas, -
surgiendo la posibilidad de que la totalidad de los pa-
cientes sufrieran participación pancreática bien porque
la afección benigna o el tumor primario se localizara -
en esa glándula, o porque existieran en ella lesiones -
metastásicas (2).

P A R T E E X P E R I M E N T A L
+++++

MATERIAL BIOLOGICO

El material biológico usado, en el estudio que nos ocupa estuvo constituido por 21 sueros de pacientes, proporcionados por el servicio de gastroenterología, del centro médico " La Raza ", sus diagnósticos estuvieron relacionados con enfermedades hepáticas y pancreáticas o bien tuvieron una actividad de fosfatasa alcalina sérica superior a 10 UI/l y de los cuales 11 fueron mujeres y 10 hombres, con edades que fluctuaban entre los 20 y 80 años. Después de determinar las unidades de F.A. - sérica los sueros fueron sometidos a electroforesis de microzona y posteriormente las membranas graficadas densitométricamente.

Del servicio de patología del Centro Médico " La Raza " obtuvimos 25 muestras de páncreas, de ellos 16 fueron - de mujeres y 9 de hombres; 7 muestras de hígado, 4 de - mujeres y 3 de hombres; 5 muestras de duodeno, 2 de mujeres y 3 de hombre; 6 muestras de colédoco, 4 de mujer y 2 de hombre, todos ellos de personas cuyas edades se encontraban entre 2 y 95 años.

Los diagnósticos de defunción fueron variados y las -- muestras de órganos procedían de autopsias efectuadas - entre 1 y 28 horas post mortem. Las muestras fueron - conservadas en congelación para ser procesadas dentro - de las 12 horas siguientes a su obtención, siguiendo pa - ra todas la misma metodología consistente en:

- 1o. Pesar el tejido.
- 2o. Hacer un extracto del órgano con solución salina.
- 3o. Medir las unidades de F.A. presentes por el método de Bessey Lowry Brock.
- 4o. Electroforesis de microzona.
- 5o. Graficar densitometricamente las membranas obtenidas de la electroforesis.

Todo lo anterior se efectuó para corroborar la aparición o no de la fracción " Pa ", de la Fosfatasa Alcalina en cada caso.

METODOLOGIA

I.† EXTRACCION DE LA FOSFATASA ALCALINA.-

a) Fundamento.-

Mediante la destrucción de las células del tejido, la F.A. intracelular es liberada y extraída en solución salina, procediendo después a la purificación de la misma por centrifugación y filtración.

b) Material.-

1 homogenizador de tejidos Potter Elvenjheim, --
marca Pyrex, modelo 7727.

1 Equipo de filtración millipore.

1 Estuche de disección.

1 Charola.

1 Balanza analítica.

1 Centrifuga.

Material de vidrio (vasos de precipitado, pipetas y matraces de varios tamaños).

c) Reactivos.-

Solución de NaCl 0.1 M.

Amortiguador de Barbital, pH 8.6, fuerza iónica 0.8.

Hielo.

d) Técnica.-

1o. Se pesa la cantidad de tejido.

20. se corta con tijera en trozos muy pequeños.
30. se coloca el tejido dentro del homogenizador previamente enfriado y se macera.
40. Se añade aproximadamente 1 ml de solución salina por gramo de tejido para moler bien el mismo.
50. Se coloca el extracto del tejido en vasos de precipitados de 15 ml, preenfriados.
60. Se agita con magnéto durante 15 minutos.
70. Se pasa a un tubo de ensayo de 13 x 100 y se centrifuga 20 minutos a 3,000 r.p.m..
80. Se separa el sobrenadante y se filtra por millipore.

II.- DETERMINACION DE UNIDADES DE FOSFATASA ALCALINA.-

a) Fundamento.-

El fosfato de paranitrofenilo (**PNPP**) es incoloro. La enzima escinde del compuesto el grupo fosfato y de este modo se forma para-nitrofenol libre (**PNP**) que en forma ácida en solución diluida es también incoloro. En condiciones alcalinas, se convierte en el ión para-nitrofenilato, el cual asume una estructura quinoide con color amarillo muy intenso. Al pH de la -- reacción enzimática la mayor parte del para-nitrofenol amarillo, está libre está libre en la forma quinoide. Así, se puede seguir el cur-

so de la reacción por observación del aumento - en el color amarillo. Se deja que la reacción prosiga durante 30 min. exactamente y entonces se interrumpe por adición de hidróxido de sódico el cual inactiva la enzima y al mismo tiempo diluye el color del nitrofenilato, que se mide -- por absorbancia a 410 nm. La cantidad de nitrofenol formado en la reacción de 30 minutos - se calcula a partir de la curva estándar . La unidad activa de la enzima se define como el número de milimoles de p-nitrofenol formados en 60 minutos por litro de suero.

b) Material.-

Tubos de ensayo de 13 x 100

Pipetas graduadas de 0.025, 1.0 y 10 ml.

Baño de agua a temperatura constante de 37°C.

Espectrofotómetro Leitz, modelo M (115 Volts, - 50 Watts, 50 Hertz), con juego de celdillas.

Reloj de intervalos.

Termometro de 0 a 100°C.

c) Material Biológico.-

Suero sanguineo fresco.

Extractos de tejido.

d) Reactivos.-

Sustrato, para-nitrofenil fosfato disódico q.p. en tabletas de 5 mg.

Amortiguador alcalino de glicina q.p. 0.10 M con un contenido de Mg^{++} 0.001 M, pH 10.3 a 10.4 -- (glicina q.p. cloruro de magnesio hexahidratado q.p.)

Sustrato amortiguador alcalino pH 10.3 (se prepara en el momento de usarse. Disolver una tableta de sustrato en 1.2 ml de agua destilada y añadir la misma cantidad de amortiguador alcalino).

Solución patrón concentrada 10 mM/1 (p-nitrofenol).

Solución patrón diluida 0.05 mM/1 (aforar 5 ml del patrón concentrado a 1000 ml con agua destilada).

Hidróxido de sodio 0.2 N (hidróxido de sodio - q.p.).

Hidróxido de sodio 0.02 N (tomar 100 ml de la solución de hidróxido de sodio 0.2 N y aforar a 1000 ml).

d) Procedimiento.-

Se marca un tubo con la letra " B ", para el -- blanco, un tubo con la letra " E " patrón y un tubo con la letra " P " problema y se procede de acuerdo al siguiente cuadro:

	Blanco	Patrón	Prob.
Sustrato alcalino	0.25 ml	0.25 ml	0.25 ml
	incubar 5 min a 37°C		
Sol. Patrón de F.A.	-	0.015	-
suero problema	-	-	0.025
agua destilada	0.025	-	-
	incubar 30 min a 37°C		
Hidróxido de sodio 0.2 M	2.5	2.5	2.5
	Mezclar por inversión		
	Leer contra blanco a 415 nm.		

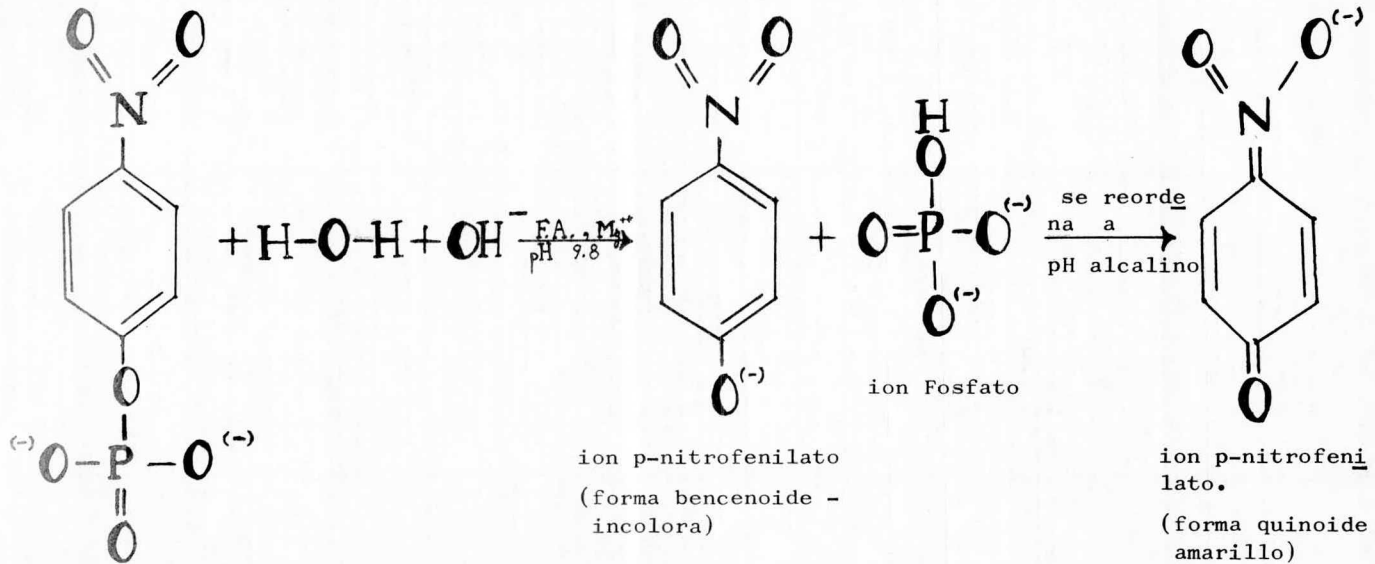
valores de referencia de 0.8 a 2.4

III.- ELECTROFORESIS DE MICROZONA.-

a) Fundamento.-

La electroforesis se usa comunmente para la separación de proteínas del suero, se aplica la muestra se satura con el amortiguador y se aplica el voltaje. La solución amortiguadora transporta unos cuantos miliamperios de corriente, que causa la separación de las moléculas conforme a su densidad de carga neta. Cuando se interrumpe la corriente a la celda electroforética se extrae de la celda el medio de soporte y se introduce a una solución colorante que tiñe las diversas --

Figura No. 4.- Reacción que se efectúa durante la determinación de unidades de fosfatasa alcalina.



fracciones. El análisis cuantitativo de las fracciones se hace por medio de un densitómetro que mide o la intensidad de la luz reflejada -- por la fracción teñida o la cantidad de luz -- transmitida. Las áreas bajo los picos obtenidos en el densitómetro para cada una de las bandas halladas en el soporte matriz, son proporcionales a las concentraciones de las fracciones correspondientes.

b) Material.-

Equipo de electroforesis de microzona marca -- Beckman, modelo R - 100 (cámara de electroforesis, puente, fuente de poder, aplicador de 0.25 microlitros)

Membranas de acetato de celulosa, para electroforesis de microzona, Beckman No. 324330, para el sistema de electroforesis Beckman modelo R-100.

Placas de plástico para agar.

Agitador.

Tubos capilares.

Tinzas de electroforesis.

Charolas para electroforesis .

Pipetas.

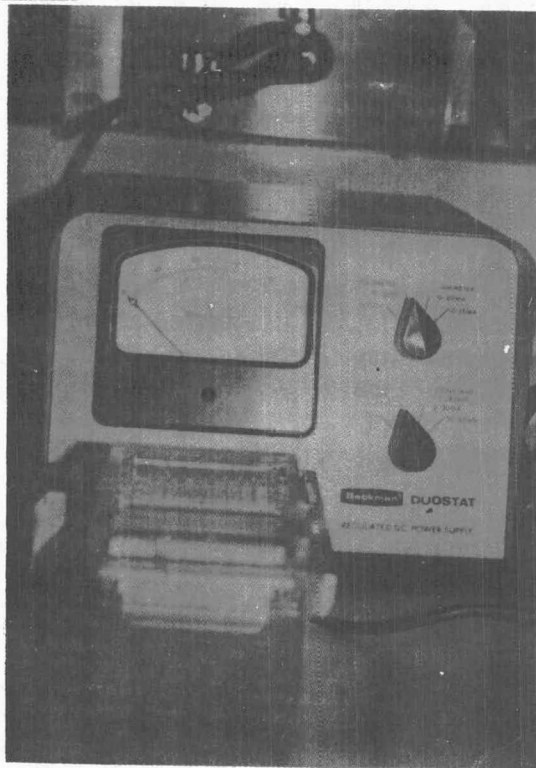


Figura No. 5

Muestra dos vistas del equipo de electroforesis utilizado.

Densitómetro de microzona Beckman, modelo R-110
Integrador digital de microzona, Beckman, modelo R - 111.

Fuente de poder, Beckman Duostat.

c) Material Biológico,-

Extractos de tejidos, sueros.

d) Reactivos,-

Reactivos para la determinación de isoenzimas de fosfatasa alcalina, DADE n.c.d. No. 0354 49 00 01, conteniendo:

Sustrato para fosfatasa alcalina, 10 vls. equivalente a 5 ml de EA 2.0×10^{-3} M (P-toluidina, 5 bromo, 4-cloro-3-indoxil fosfato), anhidro y en medio estabilizador.

Amortiguador para fosfatasa alcalina: 2-amino-2 metil, 1,3-propanediol 2×10^{-3} M, con cloruro de magnesio pH 10.2, 2M.

Agar Noble Difco especial al 2 %.

Marcador para isoenzimas de fosfatasa alcalina-de intestino y placenta.

e) Procedimiento:

10. Humedecer una membrana de acetato de celulosa en amortiguador de barbital 5 min. y co-

locar en la cámara.

20. Aplicar un microlitro de suero o extracto - de tejido (4 aplicaciones que podrán variar de acuerdo al número de unidades de F.A. -- que contenga la muestra.)
30. Aplicar un microlitro de fosfatasa alaclina intestinal y placentaria en la membrana para usarla como referencia en cuanto a la posición de las diferentes isoenzimas de F.A.
40. Desarrollo de color:
 - a) Reconstituir el sustrato de fosfatasa alcalina y disolver su contenido.
 - b) Durante la separación electroforética, - calienta en un baño hirviente el frasco que contiene agar noble Difco especial - al 2 % hasta fundirlo, se enfria a una - temperatura de 40° C y se mezcla con el sustrato reconstituido, se vierte en un recipiente de plástico dejando que se forme el gel a la temperatura del cuarto, - se mantiene en la oscuridad hasta el momento de ser usado.
 - d) Cuando la separación electroforética es completa, se separa la membrana de la - celda y se invierte sobre la superficie del gel, cuidando que no se formen burbujas, incubar a 37!° C por una hora.
 - f) Dejar secar la membrana.
50. Graficar con ayuda de un densitómetro.

R E S U L T A D O S
+++++

Tabla No. I.- Fosfatasa alcalina total y fracciones isoenzimáticas determinadas en suero de pacientes con los padecimientos que se indican.

No.	Paciente	Sexo	Diagnóstico	F.A.T.	Isoenzimas de Fosfatasa Alcalina %							
					L ₁	B	Pl	L ₂	I ₁	I ₂	Pa	
1	C.G.M.	M	Carcinoma de vías biliares, colecistitis crónica litiasica	20.0	52.2	-	-	30.8	-	-	-	17.0
2	D.D.C.	F	Carcinoma de vías biliares	10.0	43.7	10.8	-	45.5	-	-	-	-
3	A.C.S.	M	Ictericia, metastásis de cancer de próstata	10.0	60.2	20.0	-	19.8	-	-	-	-
4	F.C.D.	M	Ictericia obstructiva	16.0	64.3	-	-	35.7	-	-	-	-
5	A.P.S.	F	Colecistitis crónica	16.0	62.0	-	-	38.0	-	-	-	-
6	J.M.B.	M	Colecistitis crónica, hepatitis reactiva	30.0	83.5	-	-	16.5	-	-	-	-
7	G.C.J.	F	Abseso hepático	8.3	67.0	-	-	22.2	7.7	-	-	3.1
8	L.R.G.	F	Abseso hepático severo	8.9	47.1	-	-	28.1	6.4	5.8	-	12.6
9	G.J.S.	F	Abseso hepático	5.5	74.6	-	-	-	18.5	-	-	6.9
10	G.A.H.	M	Hepatitis viral	8.3	78.7	-	-	23.3	-	-	-	-
11	H.R.J.	M	Carcinoma de próstata, metastasis ósea	18.5	-	59.2	-	15.4	25.4	-	-	-
12	F.B.G.	F	Hepatitis mielo fibrosa	13.6	-	-	-	68.4	31.6	-	-	-
13	G.C.J.	M	Ictericia, control cirrosis	17.2	68.0	-	-	27.2	-	-	-	4.8
14	R.S.B.	M	Pancreatitis aguda edematosa	5.1	32.2	-	-	36.5	24.1	-	-	7.2
15	M.M.T.	F	Pancreatitis necrótico hemorrágica	17.6	51.4	-	-	48.6	-	-	-	-
16	M.G.R.	M	Hepatitis infecciosa	10.0	57.3	-	-	23.5	13.9	-	-	5.3
17	A.G.	M	Carcinoma de próstata, metastasis ósea	40.0	29.0	71.0	-	-	-	-	-	-
18	R.R.I.	M	Pancreatitis aguda edematosa	4.9	67.5	-	-	32.5	-	-	-	-
19	F.S.V.	M	Pancreatitis aguda edematosa	8.0	9.0	-	-	91.0	-	-	-	-
20	R.V.E.	F	Pancreatitis aguda edematosa	9.3	73.5	-	-	28.5	-	-	-	-
21	C.L.I.	F	Pancreatitis aguda edematosa	6.0	-	-	-	100.0	-	-	-	-

** F.A.T.- Fosfatasa alcalina total en UI/l

Tabla No II.- Casos en donde la banda " Pa " estuvo presente

No.	Paciente	Sexo	Diagnóstico	F.A.T.	Isoenzimas de fosfatasa alcalina %						
					L ₁	B	Pl	L ₂	I ₁	I ₂	Pa
1	S.G.M.	M	carcinoma de vías biliares colecistitis crónica litiasica	20.0	52.2	-	-	30.8	-	-	17.0
2	G.C.J.	M	Abseso Hepático	8.3	67.0	-	-	22.2	7.7	-	3.1
3	L.R.G.	F	Abseso Hepático severo	8.9	47.1	-	-	28.1	6.4	5.8	12.6
4	G.J.S.	M	Abseso Hepático	5.5	74.6	-	-	-	18.5	-	6.9
5	G.C.J.	M	Ictericia, control cirrosis	17.2	68.0	-	-	27.2	-	-	4.8
6	R.S.B.	M	Pancreatitis aguda edematosa	5.1	32.2	-	-	36.5	24.1	-	7.2
7	M.O.R.	M	Hepatitis infecciosa	10.0	57.3	-	-	23.5	13.9	-	5.3

** F.A.T.- Fosfatasa Alcalina Total

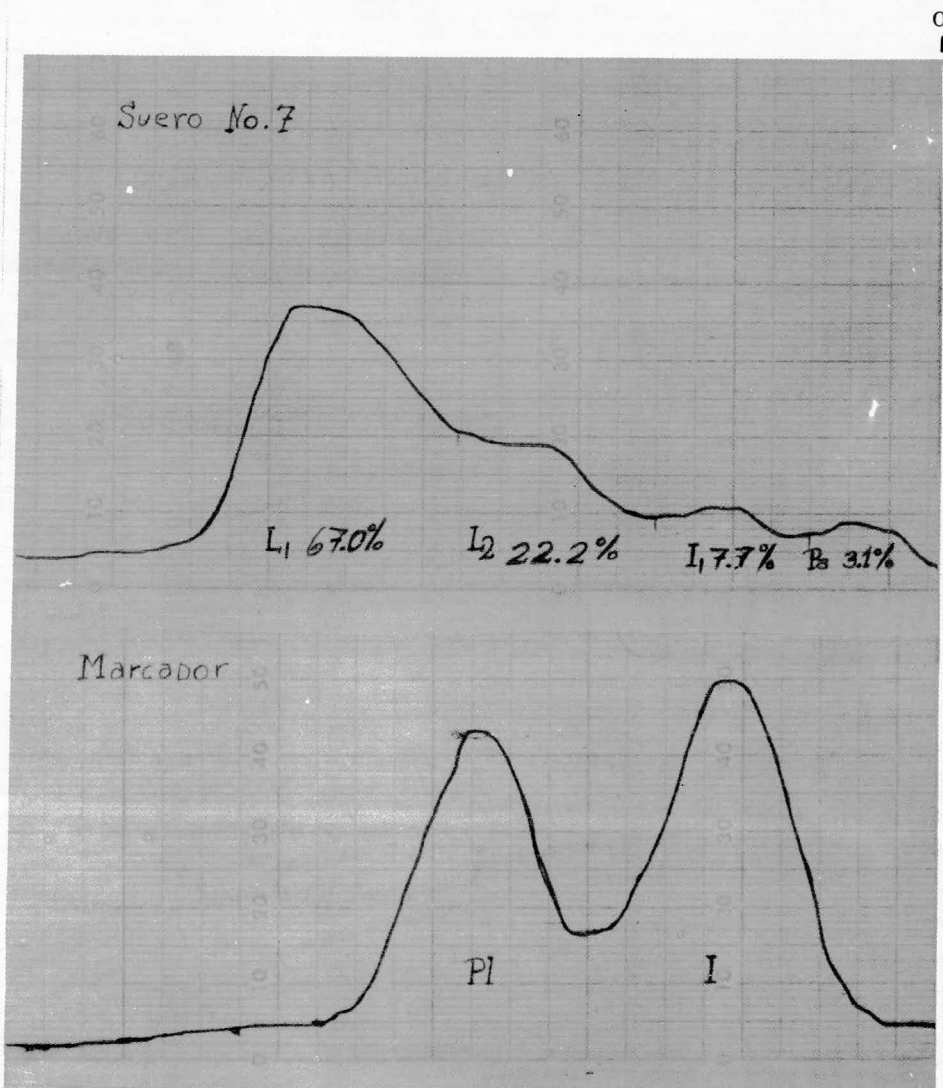


Figura No. 6.-

Trazos densitométricos de los electroforegramas del suero No. 7 (G.C.J., fem., 8.3 U.I/l de F. A., diagnóstico de absceso hepático) y el marcador intestino-placenta respectivamente.

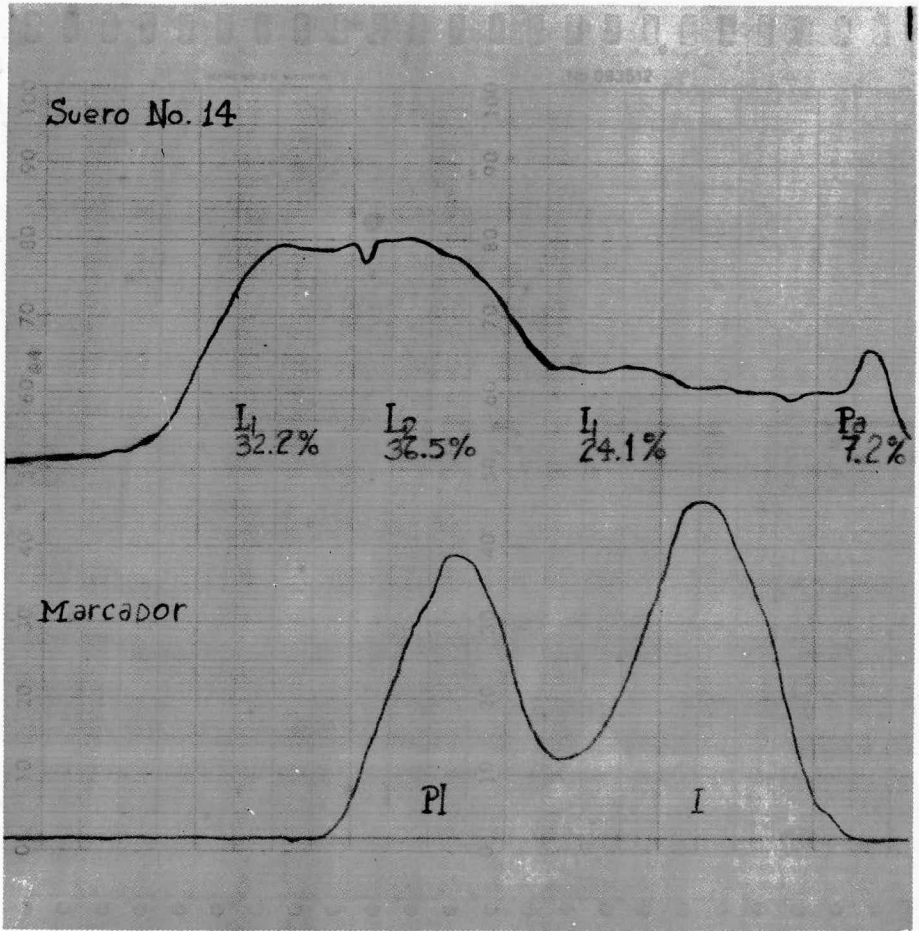


Figura No. 7

Trazos densitométricos del suero No. 14 (R.S.B.,mas., 5.1 UI/l, con diagnóstico de pancreatitis aguda edematosa) y el marcador intestino-placenta respectivamente .

Tabla No. III.- Fosfatasa alcalina total y fracciones isoenzimáticas en extractos pancreáticos de pacientes fallecidos por las causas que se indican.

No.	Pacien te	Edad	Sexo	H.P.M.	Diagnóstico Post Mortem	F.A.T.	Isoenzimas de Fosfatasa Alcalina %						
							L ₁	B	Pl	L ₂	I ₁	I ₂	Pa
1	V.H.C.	64	F	3	Carcinoma de vesícula biliar	0.9	-	-	-	-	-	-	-
2	C.C.E.	18	F	4	Neurosis aguda masiva del hígado	2.4	-	-	-	36.2	67.4	-	-
3	A.S.G.	2	M	-	Edema cerebral	2.6	-	-	-	65.0	35.0	-	-
4	G.C.C.	45	M	7	Úlcera peptica, nefrosclerosis	0.5	-	-	-	56.0	44.0	-	-
5	E.R.S.	45	F	-	Colecistolitiasis, septicemia	0.5	-	-	-	100.0	-	-	-
6	C.R.R.	64	M	4	Pancreatitis necrótico hemorrágica	0.0	-	-	-	-	-	-	-
7	B.P.G.	50	F	6	Cardiopatía reumática	0.06	-	-	-	-	-	-	-
8	G.R.B.	1	F	12	Taponamiento cardíaco por hemopericardía	0.9	-	-	-	-	-	-	-
9	R.P.M.	18	F	3	Síndrome de Guillen Barré	3.2	-	-	-	56.4	43.6	-	-
10	R.A.R.	83	M	6	Tuberculosis renal	1.6	-	-	-	-	-	-	-
11	A.M.E.	32	F	12	Litiasis retrouretral izquierda	0.4	-	-	-	-	-	-	-
12	M.B.M.	52	F	2	Miocarditis reumática, nefrosclerosis	24.8	-	-	-	55.0	45.0	-	-
13	A.G.O.	37	F	3	Necrosis hepática masiva	7.7	-	-	-	73.7	26.3	-	-
14	A.M.A.	45	F	-	Adenocarcinoma de vesícula biliar	20.0	44.9	-	-	46.3	8.8	-	-
15	A.M.A.	35	F	-	Adenocarcinoma de vesícula biliar	20.0	35.9	-	-	51.7	12.4	-	-
16	C.M.A.	80	F	11	Carcinoma de vesícula biliar	4.0	-	-	-	36.4	37.2	-	-
17	L.L.M.	67	M	-	carcinoma de páncreas	2.3	42.0	-	-	42.0	16.0	-	-
18	L.L.M.	67	M	-	carcinoma de páncreas	4.0	69.3	-	-	27.0	3.7	-	-
19	L.L.M.	67	M	-	carcinoma de páncreas	2.7	65.3	-	-	28.0	6.7	-	-
20	L.L.M.	67	M	-	carcinoma de páncreas	4.2	36.0	-	-	40.0	24.0	-	-
21	S.C.A.	34	F	12	Leucemia mieloblástica aguda	0.1	22.0	-	-	28.0	50.0	-	-
22	M.A.N.	25	F	28	Púrpura trombocitopénica	0.1	32.0	-	-	48.0	30.0	-	-
23	P.P.E.	63	M	12	Aneurisma arterial del -- comunicante anterior	2.8	-	-	-	43.0	57.0	-	-
24	A.Q.I.	53	F	4	Litiasis uretral bilateral	7.5	-	-	-	-	100.0	-	-
25	C.D.F.	61	M	-	Hepatitis reactiva, hipoplasia medular tóxica, esofagitis crónica, úlceras unión esofagogástrica	0.6	50.0	-	-	-	30.0	-	20.0

** H.P.M. horas Post Mortem

F.A.T. Fosfatasa Alcalina total en UI/1/g

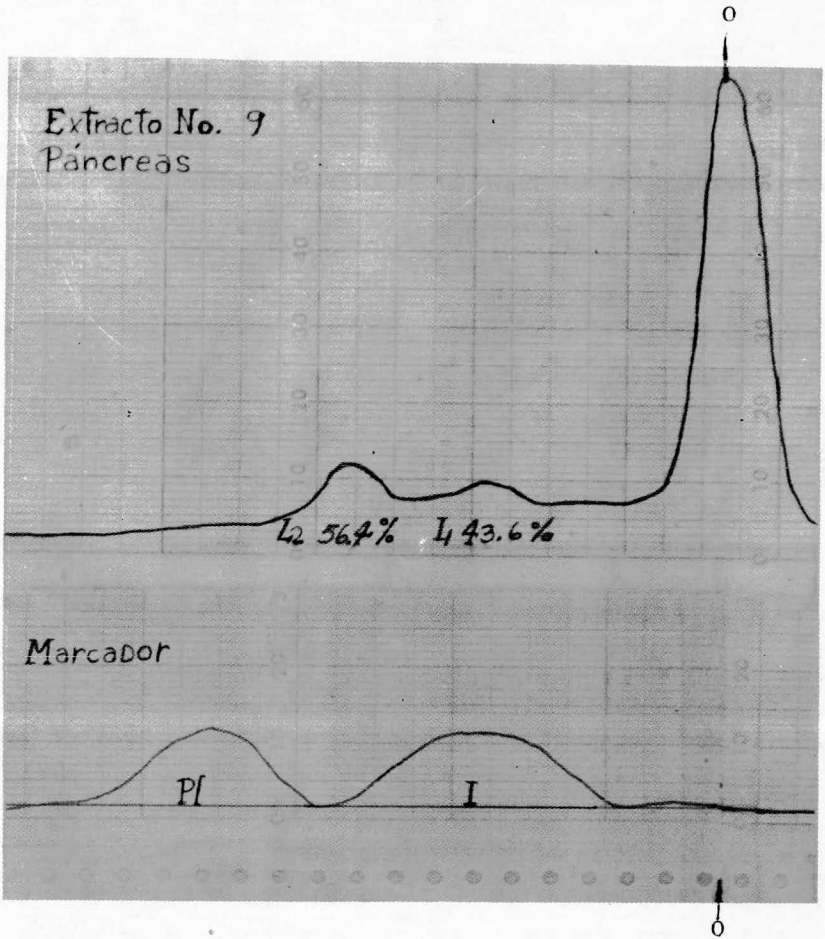


Figura No. 8

Trazos densitométricos de los electroforegramas del extracto No. 9 de páncreas (R.P.M.A., fem., 18 años, 10.0 U.I./1/ g, con diagnóstico de Síndrome de Guillen Barré) y el marcador intestino-placenta respectivamente.

Tabla No. IV.- Casos de extractos pancreáticos donde la banda " Pa " estuvo presente. (fuente tabla III)

No.	Pacien te	edad	Sexo	H.P.M.	Diagnóstico Post Mortem	F.A.T.	Isoenzimas de fosfatasa Alcalina %						
							L ₁	B	Pl	L ₂	I ₁	I ₂	Pa
1	C.M.A.	80	F	11	Carcinoma de vesícula <u>bi</u> liar	4.0	-	-	-	36.4	37.2	-	26.3
2	C.D.F.	61	M	-	Hepatitis reactiva, hipo plasia medular tóxica, e sofagitis crónica, úlce ras unión esofagogástri ca	0.6	50.0	-	-	-	30.0	-	20.0

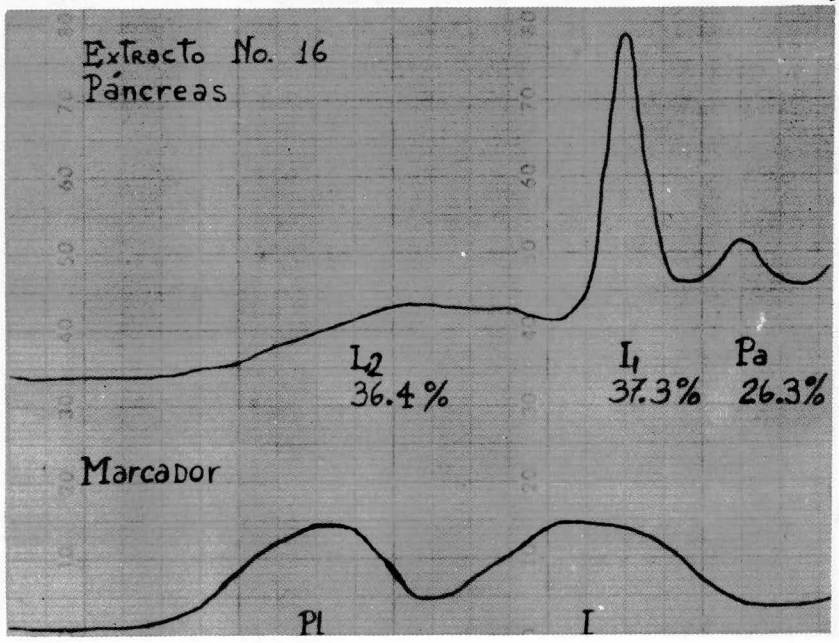


Figura No. 9
Trazos densitométricos de los electroforegramas del -
extracto No. 16 de páncreas (C.M.A., fem., 80 años, 8.3
UI/1/g, carcinoma de vesícula) y el marcador intestino
placenta respectivamente.

Tabla No. V.- Fosfatasa alcalina total y fracciones isoenzimáticas en extractos hepáticos de pacientes fallecidos por las causas que se indican.

No.	Pacien. te	Edad	Sexo	H.P.M.	Diagnóstico post mortem	F.A.T.	Isoenzimas de Fosfatasa Alcalina %						
							L ₁	B	Pl	L ₂	I ₁	I ₂	Pa
1	V.H.C.	64	F	3	Carcinoma de vesícula biliar	20.3	86.3	-	-	16.4	-	-	-
2	M.D.V.	69	F	11	Cirrosis hepática, peritonitis	9.3	78.1	-	-	21.9	-	-	-
3	C.C.E.	18	F	4	Necrosis aguda masiva - del hígado	27.3	37.2	-	-	43.9	18.9	-	-
4	B.F.M.	58	M	-	Pancreatitis necrótico - hemorrágica	7.8	-	-	-	100.0	-	-	-
5	A.S.Q.	2	M	-	Edema cerebral	3.0	36.5	-	-	29.0	34.5	-	-
6	G.C.C.	45	M	-	Colecistolitiasis, septicemia	36.4	45.0	-	-	27.0	28.0	-	-
7	E.A.S.	95	F	7	Úlcera péptica, nefrosclerosis	3.0	-	-	-	43.0	27.0	-	-

Tabla No. VI.- Fosfatasa alcalina total y fracciones isoenzimáticas en extractos de colédoco de pacientes fallecidos por las causas que se indican.

No.	Pacien te	Edad	Sexo	H.P.M.	Diagnóstico Post Mortem	F.A.T.	Isoenzimas de Fosfatasa Alcalina %						
							L ₁	B	PI	L ₂	I ₁	I ₂	Pa
1	V.H.C.	64	F	6	Carcinoma de vesícula bi liar	9.5	-	-	-	100.0	-	-	-
2	M.D.V.	69	F	11	Cirrosis hepática, peri- tonitis	2.0	-	-	-	-	-	-	-
3	C.C.E.	18	F	4	Necrosis aguda masiva de hígado	79.7	-	-	-	100.0	-	-	-
4	B.F.M.	58	M	-	Pancreatitis necrótico - hemorrágica	8.9	-	-	-	-	-	-	-
5	A.S.G.	2	M	-	Edema cerebral	4.6	-	-	-	-	-	-	-
6	E.R.S.	95	F	-	Ulcera péptica, nefroes- clerosis	7.4	100.0	-	-	-	-	-	-

Tabla No. VII.- Fosfatasa alcalina total y fracciones isoenzimáticas en extractos de duodeno de pacientes fallecidos por las causas que se indican .

No.	Pacien te.	Edad	Sexo	H.P.M.	Diagnóstico post mortem	F.A.T.	Isoenzimas de Fosfatasa Alcalina %						
							L ₁	B	Pl	L ₂	I ₁	I ₂	Pa
1	C.C.E.	18	F	4	Necrosis aguda masiva de hígado	13.7	-	-	-	37.2	62.8	-	-
2	B.F.M.	58	M	-	Pancreatitis necrótico - hemorrágica	2.2	-	-	-	100.0	-	-	-
3	A.S.G.	2	M	-	Edema cerebral	1.2	-	-	-	37.0	63.0	-	-
4	G.C.C.	45	M	-	Colecistolitiasis, septi cemia	1.7	24.0	-	-	76.0	-	-	-
5	E.R.S.	95	F	7	Ulcera péptica, nefroes- clerosis	6.2	-	-	-	100.0	-	-	-

D I S C U S S I O N
+++++

Originalmente buscamos para la preparación de los extractos de tejidos, una técnica de purificación de enzimas -- " Extracción butanólica de enzimas " (12,13,14,15) la cual utilizamos observando resultados insatisfactorios, pues los extractos daban aproximadamente un 50 % menos de las unidades de F.A. que los extractos preparados -- con solución salina unicamente, debido a esto suspendimos el uso de dicha técnica.

Así mismo efectuamos pruebas de comparación extractando trozos del mismo tejido con solución salina y amortiguador de barbital pH 8.6, fuerza iónica 0.08, simultaneamente, el resultado en cuanto al redimiento de la fosfatasa alcalina fué enteramente el mismo por lo que continuamos utilizando solución salina.

Para efectuar la electroforesis de microzona, comparamos resultados utilizando amortiguador de barbital pH 8.6, fuerza iónica 0.08 y amortiguador de Tris-glicina pH 8.8, fuerza iónica 0.04, obteniendo muchos mejores resultados con el primero, pues el segundo caso, presento traslapamiento de las fracciones de F.A., por esto continuamos utilizando amortiguador de barbital.

En la tabla No. 1 integrada por los resultados del análisis de sueros con cifras elevadas de fosfatasa alcalina total, generalmente corresponderían a enfermos de hígado y vías biliares y de sueros con pacientes con pan-

creatitis, puede apreciarse que el 33.3 % de los casos presentaron isoenzima pancreática de la F.A. (7 casos - de 21). El porcentaje aparentemente elevado, puede explicarse si se considera la selección de los sueros - estudiados en cuanto a la concentración de F.A. ya que procedieron de pacientes con afecciones pancreáticas o de órganos vecinos a esta glándula, aunque se dió cabida también a tres casos de carcinoma prostático.

En la tabla No. II, formada exclusivamente por los casos que presentaron banda " Pa " se puede observar que el 87.5 % de aquellos correspondió a hepatopatias y sólo un 14.2 % a afecciones pancreáticas. Por lo que hace a las enfermedades de hígado el 50 % de ellas fueron abseso hepático.

Un hecho trascendente es que, excepto el primer caso en donde se señala la posibilidad de un carcinoma de vías biliares, todos los demás a afecciones benignas lo que se aleja de la aseveración de los artículos que señalan que la banda " Pa " es exclusiva de padecimientos pancreáticos malignos y apoya, en cambio, los hallazgos -- que se hicieron en el laboratorio de bioquímica del hospital de " La Raza ".

En la tabla No. III, que muestra el análisis de los 25 extractos de páncreas obtenidos de otras tantas autopsias, hace notar que sólo el 8 % de los casos (2 de 25)

presentó banda " Pa ". Se puede ver también que el 40% de los extractos (10 de 25) tuvo menos de 1 UI/l de F.A total; el 48 % (12 de 25) tuvo entre 1 y 10 UI/l y el - 12 % restante, (3 de 25) tuvo más de 10 UI/l de fosfata sa alcalina total.

En la tabla No. IV, que se ocupa exclusivamente de los extractos que tuvieron banda " Pa ", muestra que uno - de ellos alcanzó 4.0 UI/l de fosfatasa alcalina total, con 26 % de banda " Pa ", en tanto que otro tuvo 0.6 - UI/l de fosfatasa alcalina total con 20 % de banda "Pa" que con que parece demostrar que no existe relación en tre la concentración de F.A. total y la aparición de la isoenzima pancreática.

Por otra parte los casos positivos corresponden a pade cimientos extrapancreáticos.

Del análisis de las tablas V, VI y VII, que correspon den al estudio de extractos de hígado, colédoco y duo deno respectivamente, se desprende el hecho de que nin gún tejido que no fuera páncreas produjo fracción "Pa"

Este hallazgo, junto con el hecho de que los dos ex - tractos pancreáticos que presentaron banda " P a " co rrespondieron a padecimientos extrapancreáticos, está en favor de la presunción de que la fracción isoenzi-- mática en cuestión sí se puede presentar en padecimien tos ajenos al páncreas, malignos o benignos, pero que siempre es el resultado de la participación pancreáti- ca.

R E S U M E N
+++++

Se mencionaron conceptos generales de enzimas, isoenzimas y su importancia clínica fundamentalmente de la fosfatasa alcalina y sus isoenzimas, haciendo incapié sobre la fracción " Pa ", así como los hallazgos de ella en el laboratorio de Bioquímica Clínica del hospital general Centro Médico " La Raza ".

Se explica con detalle la metodología para determinar unidades de fosfatasa alcalina (Bessey Lowry Brock) y de electroforesis de microzona que se empleó para determinar la fracción " Pa " de 21 sueros de pacientes con afecciones pancreáticas, hepáticas y extrahepáticas, -- así como de 25 extractos de tejido de páncreas, 7 de hígado, 6 colédoco y 5 de duodeno, cuyos resultados se -- presentaron en las tablas I, II, III, IV, V, VI y VII, en donde se reporta el porcentaje de sueros que presentan la isoenzimas pancreática 33.3 %, de los cuales 87.5 % corresponden a hepatopatías y 14.3 % a afecciones -- pancreáticas.

Por lo que respecta a los extractos de tejido de páncreas, el 8 % presentan banda " Pa " y se observa una falta de relación total entre la cantidad de fosfatasa alcalina presente y la aparición de dicha fracción.

Ninguno de los otros tejidos estudiados presenta fracción " Pa ".

Por último se presenta una breve discusión de los resultados y las conclusiones.

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

De lo expuesto anteriormente a de la revisión efectuada de los resultados, podemos pensar que en el estudio practicado, podemos pensar que la presencia de la banda " Pa " no es patognomónica de afecciones malignas - pancreáticas, sino que pueden presentarse en afecciones extrapancreáticas benignas o malignas.

La metodología empleada dió resultados satisfactorios para los fines perseguidos, comprobado por la utilización de los marcadores isoenzimáticos de intestino y - placenta.

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

- 1.- CHUNG JA MO CHA BALDUINO, Electrophoretic patterns of Alkaline Phosphatase isoenzymes in human sera, with abnormality high activity, and an unusual band observed in sera of patient with Pancreatic cancer.
Clinical Chemistry, Vol 21, No. 8, 1067-1071 (1975)
- 2.- VAZQUEZ S., GUEDEA SOCORRO, RIVERA PABLO.,
Una nueva fracción isoenzimática de la fosfatasa - Alcalina., Jornadas Médicas Regionales, 4 noviembre 1976, Centro Médico " La RAZA ".
- 3.- Albert J. Lehninger.
Bioquímica, Ediciones Omega S.A., 159-200, Barcelona (1972)
- 4.- TIETZ, NORBERTO.
Química Clínica Moderna, Editorial Interamericana- 372-455, México (1971)
- 5.- DR. MATHEU J. LYNCH.
Métodos de Laboratorio, editorial Interamericana - 2o. edición, México, (1972).
- 6.- CAMPBELL, D.M., Biochemistry Journal., Alkaline - Phosphatase Isoenzymes., Vol 82, 34-41, (1962)
- 7.- SIDA SOTO PH. D.
Alkaline Phosphatase Isoenzymes, Dade, Miami, Florida (1972).

- 8.- TODD, SANFORD.
Clinical Diagnosis by Laboratory Methods, Davison and Henry, Sanders Co., 15 th Ed. Philadelphia - 846-848 (1974).
- 9.- SUSSMAN; H.H., SMALL, P.A.
Catlowe, Tr. E., J. Biological Chemistry., Vol. - 243, 160-166, (1968)
- 10.- SUSSMAN, H.H., Clinical Chemistry., Acta, Vol. 27 121-127 (1970)
- 11.- BOYER, S.H., Annuals New York Academy Science, -- Vol. 103, 938 (1963).
- 12.- ROBERT K. MORTON., Methods of extration of enzi - mesfrom animal tissues., Nature Vol. 57, 25-29.
- 13.- ROBERT K. MORTON., The purificantion of alkaline- Phosphatases of animal tissues, Biochemistry J. - vol. 57, pag 595-603 (1954).
- 14.- ROBERT K. MORTON., Separation and purification of enzymes associated with insoluble particles, Natu re, Vol. 166, 1092-1093 (1950).
- 15.- ROBERT K. MORTON., Microsomal particles of Normal Cow's Milk., Nature, vol 171, 734-735 (1953)
- 16.- ROBERT K. MORTON., Alkaline Phosphatase of Milk - Biochemistry Journal, Vol. 55, 795-799 (1953).