

UNIVERSIDAD

IBEROAMERICANA

I N C O R P O R A D A A L A U. N. A. M.

ESCUELA DE CIENCIAS QUIMICAS

ESTUDIOS CINETICOS EN LAS ISO-
ZIMAS DE LA FOSFATASA ALCALI
NA PRESENTE EN HIGADO Y EN -
HUESO HUMANO.

III.- Energias de activación, -
conversion, estabilidad de -
mezclas de enzimas, y efec-
to del suero humano sobre
las enzimas purificadas.

TESIS PROFESIONAL

MERCEDES

BACA

L. DE G.



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.

36

UNIVERSIDAD

IBEROAMERICANA

I N C O R P O R A D A A L A U. N. A. M.

ESCUELA DE CIENCIAS QUIMICAS

**ESTUDIOS CINETICOS EN LAS ISO-
ZIMAS DE LA FOSFATASA ALCALI
NA PRESENTE EN HIGADO Y EN -
HUESO HUMANO.**

**III.- Energias de activación, -
conversion, estabilidad de -
mezclas de enzimas, y efec-
to del suero humano sobre
las enzimas purificadas.**

TESIS PROFESIONAL

MERCEDES

BACA

L. DE O.

9642

A la memoria de mi madre

A mi padre con todo cariño y gratitud

A Gloria y mis hermanos

9649

A mis queridos abuelitos

A mis tíos y primos cariñosamente

Al Dr. Jesús Torres G. con admiración
y agradecimiento por su acertada
dirección en este trabajo.

Este trabajo se llevó a cabo en el
Departamento de Bioquímica del Hos-
pital de Enfermedades de la Nutri-
ción, gracias a la ayuda y coopera-
ción del Dr. Guillermo Soberón Je-
fe del Departamento, al cual hago
patente mi agradecimiento.

A mi profesor Don Luis M. Vereea
con cariño y respeto

A mis inolvidables maestros

A mis compañeros y amigos
con sincero afecto

I N D I C E

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

G E N E R A L I D A D E S

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

R E S U L T A D O S

D I S C U S I O N

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

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

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

zimas de la fosfatasa alcalina ósea y hepática - pudieran tener mayor aplicación en problemas clínicos, ya que es frecuente observar aumento en dicha actividad catalítica del suero, tanto en padecimientos de la encrucijada hepatobiliar, como en aquéllas que cursan con una actividad osteoblástica aumentada (12).

Los procedimientos que con más frecuencia se han utilizado con este fin son: La cromatografía en celulosas modificadas (13), la separación por electroforesis en gel de almidón (14,15,16), procedimientos inmunoquímicos (17,18), uso de activadores e inhibidores (19,20,21), afinidad por diferentes sustratos (22), medición de la actividad a diferentes valores de pH (23,25), y determinación de las constantes de Michaelis también a diferentes valores de pH (1,26).

Por procedimientos quirúrgicos se ha pretendido relacionar el aumento de la actividad con las particulares condiciones experimentales empleadas, así mismo se ha buscado la relación entre la ingestión de dietas de diferente composi-

En trabajos anteriores efectuados en el Departamento de Bioquímica del Hospital de Enfermedades de la Nutrición, se hizo un intento para encontrar criterios que permitieran distinguir en el suero humano la fosfatasa de origen óseo, de aquella actividad similar que se origina en hígado (1-5). Esta idea de distinguir el origen tisular de las enzimas ha sido aplicada también a otras isozimas, designándose con este nombre a aquellas proteínas que tienen la particularidad de catalizar la misma reacción química (6).

Debe quedar bien establecido, que además de las isozimas de fosfatasa alcalina de hígado y de hueso, existen en el suero otras isozimas que proceden de la mucosa intestinal, del riñón y de los leucocitos (7,8).

Por métodos inmunoquímicos y electroforéticos se ha precisado que, probablemente, el componente más importante de las isozimas de la fosfatasa alcalina presente en el suero es aquél que procede del tejido óseo (9,10,11). Por otra parte cabe considerar que la distinción de las iso-

zimas de la fosfatasa alcalina ósea y hepática - pudieran tener mayor aplicación en problemas clínicos, ya que es frecuente observar aumento en dicha actividad catalítica del suero, tanto en padecimientos de la encrucijada hepatobiliar, como en aquéllas que cursan con una actividad osteoblástica aumentada (12).

Los procedimientos que con más frecuencia se han utilizado con este fin son: La cromatografía en celulosas modificadas (13), la separación por electroforesis en gel de almidón (14,15,16), procedimientos inmunoquímicos (17,18), uso de activadores e inhibidores (19,20,21), afinidad por diferentes sustratos (22), medición de la actividad a diferentes valores de pH (23,25), y determinación de las constantes de Michaelis también a diferentes valores de pH (1,26).

Por procedimientos quirúrgicos se ha pretendido relacionar el aumento de la actividad con las particulares condiciones experimentales empleadas, así mismo se ha buscado la relación entre la ingestión de dietas de diferente composi-

ción y la actividad existente en linfa y en suero (27,28,29,30), y en ambos casos se han aplicado de varios criterios con la misma intención.

Es de gran trascendencia para el diagnóstico de diferentes condiciones patológicas, el poder distinguir la procedencia tisular de las enzimas, puesto que esta información necesariamente dará luz acerca del órgano fundamentalmente afectado por un padecimiento determinado. Es bien conocido el hecho de que lesiones parenquimatosas producen escape al espacio intravascular de actividades enzimáticas que pueden ser cuantificadas, aunque por lo demás debe entenderse que la presencia de enzimas tisulares en el suero no se explica únicamente por el escape de las mismas cuando hay lesiones parenquimatosas. La distinción de las isozimas también sería de gran valor para poder seguir la evolución de las enfermedades.

El primer intento de distinción de las fosfatasa alcalinas ósea y hepática efectuado por el grupo de investigación con el que se ha cola-

borado fue hecho directamente en suero, estudiando características cinéticas de las actividades medidas a diferentes concentraciones de iones hidrógeno: en esta forma se determinaron constantes de Michaelis para dos diferentes sustratos - (p-nitro fenilfosfato de sodio y β -glicerofosfato de sodio), el efecto de Mg^{++} y de la fuerza iónica así como la influencia de la temperatura sobre la estabilidad y actividad de la enzima -- (1-3). Sin embargo, no se pudo obtener un criterio claro que permitiera la distinción fácil de dichas isozimas, puesto que existía la duda de la variabilidad en la composición del suero con respecto a los diferentes componentes de fosfata sa alcalina que se originan en varios tejidos. En estas condiciones se hizo indispensable purificar las isozimas de hígado y de hueso y estudiar cada una de sus características cinéticas. Se exploró en ellas la influencia del pH y la temperatura sobre la velocidad máxima y la constante de Michaelis (4), y también el efecto de la temperatura sobre cada una de las isozimas en

lo que respecta a su estabilidad y a la velocidad de la reacción que cataliza (5).

Una vez conocidos los datos anteriores hubo indicación precisa de estudiar las mismas constantes en mezclas de isozimas ya que es así como se encuentran en el suero humano y por lo tanto también investigar el efecto de este último sobre las constantes de las isozimas aisladas y sobre sus mezclas.

En este trabajo se informan los resultados obtenidos al estudiar el efecto de la temperatura sobre las mezclas de isozimas solas y adicionadas de suero humano.

G E N E R A L I D A D E S

Parece pertinente referirnos en este capítulo a revisar en forma somera el efecto que la temperatura tiene sobre las reacciones químicas catalizadas por enzimas, ya que éste fue el tema de estudio que se abordó en el presente trabajo.

Al aumentar la temperatura de un sistema enzimático se modifican a la vez varios factores - que determinan la velocidad de la reacción catalizada por la enzima.

a).- En primer lugar, es bien sabido que a mayor temperatura las proteínas se desnaturalizan con más rapidez y ésto como consecuencia de la elevación térmica ocasiona un rompimiento de los puentes de hidrógeno que son responsables en gran parte de la estructura terciaria de las proteínas. El efecto de la temperatura sobre la estabilidad de la enzima se puede explorar preincubando la solución de enzima a diferentes temperaturas durante un tiempo determinado y midiendo la velocidad residual en

las mismas condiciones (pH, fuerza iónica, etc.).

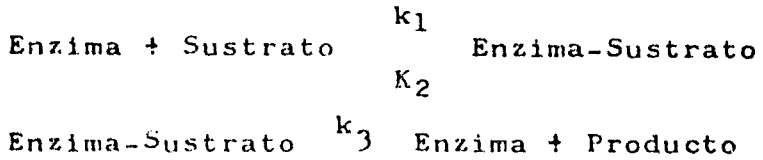
Debe tenerse presente que la desnaturalización de una proteína por el calor varía con las condiciones experimentales, de tal manera que siempre debe -- precisarse el pH de la solución, fuerza iónica de la misma y tiempo de calentamiento.

Puesto que la desnaturalización de las proteínas puede ser un proceso reversible y ya que la medición de la velocidad residual es representativa del número de moléculas de la enzima que se encuentra en estado nativo, es decir - no desnaturalizada, al graficar el logaritmo de la velocidad residual vs:

$1/T$ se obtiene una línea con pendiente positiva cuyo valor multiplicado por $-RT$ da la energía de activación para el proceso de conversión de enzima nativa en enzima desnaturalizada o sea lo que

se ha llamado energía de conversión o energía de desnaturalización.

b).- La elevación de la temperatura ocasiona un aumento en la velocidad de rompimiento del complejo ES en E+P, es decir en la reacción:



equivale a un aumento de k_3 lo que se representa por un incremento en la velocidad máxima. Al medir esta última constante a varias temperaturas se tiene una representación de lo que se ha designado como coeficiente de temperatura que indica como aumenta la velocidad para un incremento dado de temperatura. Esto mismo se ha expresado como el valor Q_{10} de cada enzima que indica las veces que aumenta la velocidad de la reacción por un incremento de temperatura de 10°C . Si se mide la veloci-

dad de una reacción a diferentes temperaturas y los resultados obtenidos se grafican conforme a la ecuación de Arrhenius:

$$\log \frac{v_2}{v_1} = \frac{H_a + RT}{2.303R T_2 - T_1}$$

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

en donde:

v_1 y v_2 = velocidades encontradas a las temperaturas absolutas T_1 y T_2

H_a = energía de activación

R = constante de los gases

RT = se ha aproximado a un valor de 600 calorías para todos los casos.

Es decir logaritmo de V vs. $1/T$ se obtiene una línea cuya pendiente negativa es la representación del quebrado:

$$\frac{H_a + RT}{2.303 R}$$

dicha pendiente se multiplica por 2.303 R o sea 4.57 (2.303 x 1.987 cal-1, mole-1), se obtiene un valor que es = $H_a + RT$. Este valor es el habitualmente consignado en la li

temperatura como energía de activación y corresponde a lo que se ha designado con la letra E y es mayor que el calor de activación en una cantidad aproximada de 600 calorías / mol. Los valores consignados en este trabajo corresponden al calor de activación (Ha).

- c).- La temperatura modifica la afinidad de la enzima por el sustrato, es decir se modifican los valores de k_1 y k_2 . Debido a ésto es muy importante tener la precaución de que al estudiar el efecto de la temperatura sobre una reacción enzimática se tenga la concentración suficiente de sustrato para saturar la enzima.
- d).- La temperatura afecta el pH de los componentes del sistema enzimático, ya que como es sabido cada uno de los grupos funcionales disocia con un particular calor de ionización, de modo que al modificar la temperatura, se modifi

ca el pK de dichos grupos.

- e).- La temperatura modifica la afinidad de las enzimas por posibles activadores ó inhibidores.
- f).- Si el sistema comprende la sucesión de dos reacciones catalizadas por diferentes enzimas, es posible que al elevar la temperatura haya un cambio en el -- marcador de paso, ya que las dos enzimas pueden tener diferente coeficiente de temperatura.
- g).- Por último la temperatura puede modificar las condiciones del sistema mismo de incubación, ya que el pH de la solución amortiguadora puede cambiar, así como también la solubilidad de los gases, etc.

Por lo anteriormente considerado es obvio - que no tiene sentido hablar de temperatura óptima, ya que ésta dependerá del tiempo de incubación, lo cual se deduce del hecho de que por una parte la velocidad puede aumentar con la conse--

cuente elevación de la temperatura y por la otra la velocidad tiende a disminuir como consecuencia de la desnaturalización de la enzima y el -- cambio de la afinidad de la enzima por el sustrato etc.

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

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

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

te la posibilidad de poder comparar nuestros resultados con los datos obtenidos anteriormente.

El procedimiento de purificación descrito - por Schlamowitz y colaboradores (9) consistió en:

HIGADO

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

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

3.- Se ajustó el pH a 6.9.

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

5.- La preparación se centrifugó a 18000xg durante 20 minutos a una temperatura de 5°C, se-

parando de esta manera los núcleos, las células completas y las membranas.

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

7.- Se dejó reposar una hora a 18°C.

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

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

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

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

b.- Se suspendió en agua suficiente, mez-- clándose perfectamente bien con un agitador me-- cánico durante 15 minutos, inmediatamente des-- pués se centrifugó a 1200x g durante 10 minutos y se decantó: esta operación se hizo tres veces.

c.- Una vez decantada se le agregó un volu-- men de una solución 0.3 M de fosfato monosódico,

se mezcló perfectamente con el agitador mecánico durante 15 minutos, se centrifugó a 1200x g durante 10 minutos y se decantó; ésto se hizo tres veces.

d.- Se le agregó a la celulosa ya decantada suficiente hidróxido de sodio 0.5 N y se mezcló con el agitador mecánico durante 15 minutos centrifugando a 1200x g durante 10 minutos.

e.- Se lavó tres veces con agua.

f.- Se le adicionó un volumen de una mezcla alcohol-éter 1:1 mezclando con el agitador mecánico durante 15 minutos y se centrifugó 10 minutos a 1200x g, esta operación se hizo tres veces.

g.- Se agregó agua con un pH entre 8 y 9, - ésto se hizo dos veces y finalmente se empacó -- una columna de vidrio de 13 mm de diámetro inferior y 500 mm de altura.

La columna se empacó a presión (200 mm de - Hg), una vez montada se instaló en el cuarto --- frío a 4°C en el cual iba a estar hasta el término de la purificación; se lavó la columna con -- 100 ml de amortiguador de fosfatos, inmediatamen

te después se agregó la muestra liofilizada y pesada (0.249 g.), se corrió un gradiente hiperbólico de fosfatos (fosfato monosódico 0.3M y fosfato disódico 0.01M), empleando un sistema de tres matraces erlenmeyer comunicados entre sí por el fondo, con presión de aire uniforme en los tres.

Se recolectaron fracciones de 5 ml. mediante un colector de fracciones automático, por la columna se pasaron 800 ml. de gradiente de fosfatos.

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

ta el momento de utilizarlos.

Una vez terminada la cromatografía se regeneró la columna, siguiendo nuevamente los incisos c al h, quedando de esta manera lista para emplearse otra vez.

HUESO

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

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

3.- Se separó el sobrenadante por centrifugación en frío y se dializó durante 72 horas contra dos litros de agua destilada fría, ésta se -

cambió una vez a las 12 horas, se hizo esta diálisis en el cuarto frío (4°C).

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

La actividad de la fosfatasa alcalina se de terminó mediante dos procedimientos: el descrito por Bessey Lowry y Brock (32) que se basa en el cuanteo del producto formado por la hidrólisis -- del p-nitro-fenil-fosfato que se utiliza como -- sustrato, y midiendo el producto formado en un -- fotocolorímetro Bausch & Lomb a 415 mμ.

Se hizo la modificación de incrementar la -- concentración de hidróxido de sodio, que se usa para detener la reacción, llegando hasta 0.2N -- puesto que la aconsejada por los autores (0.05M) se encontró que no es suficiente, además se au-- mentó la concentración del amortiguador usado -- hasta ser de 66 mM en el sistema, puesto que se observó que concentraciones menores no mantenían

el pH durante el curso de la reacción.

El segundo procedimiento es el de Bodansky (33) que usa β -glicero-fosfato como sustrato y -- determina fósforo inorgánico liberado, por un -- procedimiento colorimétrico midiendo a 720 mu.

Para ajustar el pH del medio de la reacción se utilizó amortiguador glicina-NaOH (0.2M) que tiene un pK de 9.7. Siempre se tuvo la certeza de que el pH se mantuvo a través del período de incubación.

Se trabajó siempre con tiempos de incuba--- ción diferentes de acuerdo con los resultados de los experimentos sobre estabilidad enzimática -- realizados de modo preliminar, el tiempo de incu bación fue el mínimo necesario para obtener buena sensibilidad aún con conocimiento de que a pH por arriba de 10 la velocidad inicial se mantiene sólo en los primeros minutos; no obstante con curvas de progreso obtenidas en esas condiciones es posible hacer las correcciones adecuadas.

Se define como actividad específica el núme ro mil micro moles de producto liberadas en una

hora por mg. de proteína.

En las curvas de variación de sustrato empleadas para determinar las constantes de Michaelis, se incluyeron de 21 a 26 puntos experimentales. La concentración de sustrato empleada en el sistema de incubación, para estos estudios varió de 0.0063 a 5.04 mM en el caso del p-nitrofenil-fosfato y de 0.0257 a 25.7 μ M para β -glicero-fosfato.

R E S U L T A D O S

La figura # 1 señala las energías de activación de las mezclas de las isozimas de hígado y hueso a diferentes valores de pH, estudios que - se hicieron con el fin de averiguar si el efecto de pH sobre la energía de activación de las isozimas en estudio, es similar al que se observa - en las isozimas aisladas y que ha sido informado con anterioridad (5). Puesto que como se ha men-cionado antes, el propósito fundamental de este trabajo es el de lograr distinguir el origen ti-sular de la actividad de la fosfatasa alcalina - del suero, se exploró el efecto que tiene la adi-ción de éste último sobre la energía de activa-ción de la isozima hepática y de una mezcla de - ella y de la ósea, lo cual se ilustra en la figu-ra # 2.

Los valores encontrados para las energías - de activación en los experimentos referidos en - las figuras anteriores para fines de comparación son presentados en la tabla # 1, juntos con aqué-llos que fueron obtenidos para las isozimas ais-ladas en diferentes condiciones experimentales y

que fueron comunicados con anterioridad (5) (tabla # I).

En lo que se refiere a la desnaturalización de la enzima los datos se ilustran en la figura # 3 que contiene los estudios realizados con la isozima de hígado y de hueso después de que fueron cromatografiadas con las mezclas de dichas fracciones. Los resultados se han graficado como el logaritmo de la velocidad vs. la recíproca de la temperatura a la que fue sometida la isozima durante su preincubación para desnaturalizarla, que en esa forma la pendiente positiva obtenida ilustra lo que ha sido designado como energía de desnaturalización o de conversión según se ha expresado con anterioridad.

La figura # 4 contiene el mismo tipo de estudio, pero en el que se ha explorado la influencia de la adición de suero sobre la desnaturalización de las isozimas y de sus mezclas por la temperatura.

La tabla # II contiene los valores de la energía de conversión para los experimentos ilus

trados en las figuras # 3 y 4.

El efecto de la adición de suero sobre la estabilidad de la enzima incubada a alta temperatura es también ilustrado en la figura # 5, en donde se presenta la velocidad de desnaturalización de las fosfatasas alcalinas de hígado y de hueso cuando son incubados en presencia de cantidades variables de suero humano.

Puesto que de los criterios explorados hasta ahora (1-6) que podrían permitir distinguir las isoenzimas de la fosfatasa alcalina del suero el más prometedor parece ser la desnaturalización por temperatura, se investigó el efecto sobre el suero de enfermos con diferentes estados patológicos y como ilustración se presentan los resultados obtenidos en sujetos normales (fig. # 6), y en pacientes afectados de diferentes condiciones patológicas en las que se observa un aumento de la fosfatasa alcalina sérica (fig. # 7), así mismo se estudió la energía de conversión del suero de un caso con obstrucción de vías biliares solo y después de ser adicionado a enzima

purificada de hígado y hueso y a una mezcla de -
las mismas (fig. # 8).

Los valores obtenidos para la energía de --
conversión se presentan en la tabla # III.

T A B L A I
 ENERGIAS DE ACTIVACION

ESPECIE	pH 8.40	pH 9.25	pH 9.65	pH 10.1
Hígado antes de Cromatografía	9510	5700	7600	7800
Hígado después de Cromatografía	-	-	10650	-
Mezcla de Isozimas	9140	7769	9140	9597
Hígado más Suero	-	5941	5027	6398
Mezcla de Isozimas más Suero	-	-	5027	-

Los valores se expresan en Calorías/Mole.

T A B L A II
ENERGIAS DE DESNATURALIZACION

ESPECIE	ENERGIA
Hígado después de cromatografía	93,000
Hígado antes de cromatografía	110,000
Hígado antes de cromatografía más suero	104,000
Hígado y hueso antes de cromatografía más suero	137,000
Hueso después de cromatografía	200,000
Hueso antes de cromatografía	135,000
Hueso antes de cromatografía más suero	120,000
Hueso después de cromatografía más hígado después de cromatografía	157,000
Suero normal Julio 11	89,000

T A B L A III
ENERGIAS DE DESNATURALIZACION

FECHA	ESPECIE	ENERGIA
Julio 12	Suero patológico # 1	57,000
Julio 27	Suero patológico # 1	99,000
	Suero patológico # 1	58,000
	Suero patológico # 1	124,000
	Suero patológico # 1	93,000
	Suero patológico # 2	162,000

D I S C U S I O N

El pH afecta la energía de activación de las mezclas de isozimas de hígado y hueso en la misma forma que la isozima hepática, según se había visto anteriormente (5). A pH de 9.25 o más elevado el suero añadido causa una disminución de la energía de activación de manera considerable lo cual quizá puede ser interpretado en el sentido de que la isozima hepática forma algún agregado más o menos firme con alguna proteína del suero, y el complejo así formado, responde en menor cuantía al efecto de la temperatura que se refleja en un aumento de la velocidad de la reacción. Puesto que las especies de las isozimas que se seleccionaron para estudiar la energía de activación en las mezclas de las mismas a aquéllas que no están completamente purificadas, es decir, antes de ser sometidas a la cromatografía en celulosa modificada, ya que las especies así obtenidas tienen energías de activación del mismo orden de magnitud, no es posible esperar que se refleje en la mezcla un comportamiento diferente del observado en cada una de las isozimas.

Este tipo de estudios debería ser efectuado con las isozimas que ya han sido purificadas, puesto que en estas especies se ve mayor diferencia en los valores correspondientes a la energía de activación. De cualquier forma se puede anticipar que la determinación de la energía de activación no nos proporcionaría un criterio adecuado para resolución del problema que se ha planteado, o sea la diferenciación de los componentes de la fosfatasa alcalina que existen en el suero humano en condiciones normales y patológicas.

En cambio, los estudios realizados con la desnaturalización por la temperatura ofrecieron información que ha sido la más alentadora para el fin que se ha perseguido a través de la serie de trabajos sobre este tema que se han efectuado en este laboratorio, ya que puede apreciarse tanto en la figura # 3 y 4, como en la tabla # II que la enzima de origen óseo es más sensible a la temperatura, que la enzima de origen hepático y ésto se aprecia sobre todo para aquellas especies que han sido completamente purificadas, ya que para la primera se

Este tipo de estudios debería ser efectuado con las isozimas que ya han sido purificadas, puesto que en estas especies se ve mayor diferencia en los valores correspondientes a la energía de activación. De cualquier forma se puede anticipar que la determinación de la energía de activación no nos proporcionaría un criterio adecuado para resolución del problema que se ha planteado, o sea la diferenciación de los componentes de la fosfatasa alcalina que existen en el suero humano en condiciones normales y patológicas.

En cambio, los estudios realizados con la desnaturalización por la temperatura ofrecieron información que ha sido la más alentadora para el fin que se ha perseguido a través de la serie de trabajos sobre este tema que se han efectuado en este laboratorio, ya que puede apreciarse tanto en la figura # 3 y 4, como en la tabla # II que la enzima de origen óseo es más sensible a la temperatura, que la enzima de origen hepático y esto se aprecia sobre todo para aquellas especies que han sido completamente purificadas, ya que para la primera se

encontró un valor de 200,000 calorías por mol para la energía de desnaturalización y para la serinasa de 67,000 calorías por mol; en cambio, esta diferencia no fue tan apreciable para las especies que no fueron sometidas a la cromatografía de intercambio iónico, ya que los valores de la energía de desnaturalización fueron de 135,000 y 112,000, respectivamente. Respecto al efecto del suero sobre la sensibilidad de las enzimas al calentamiento, se encontró un efecto paradójico, ya que por una parte el valor ofrecido para las enzimas después de añadirse en el suero no fue mayor que el que se observó en las isoenzimas solas, sin embargo, en las curvas que se presentaban en la figura 4.5, se ve en forma concluyente que el añadir cantidades crecientes del suero hace que tanto la isoenzima ósea como la hepática tengan menor resistencia a la temperatura. Estudios posteriores al que aquí se informan han demostrado que efectivamente éste es el caso (31), en la misma figura se aprecia también que al parecer la enzima hepática es menos resistente que la enzima ósea.

ósea, observación que es contraria a lo que se ha afirmado anteriormente por el análisis de la tabla # II. Esta aparente discrepancia puede explicarse si se toma en cuenta de que los valores de la energía de desnaturalización fueron calculados para los intervalos de temperatura comprendidos - entre 59 y 60 y que el experimento de la figura # 5 se realizó sometiendo la enzima a una temperatura de incubación de 55°C. Puesto que la pendiente positiva que se obtiene al graficar los datos para obtener la energía de desnaturalización cambia con la temperatura, se debe ser muy cauto en el intervalo escogido a fin de poder comparar los datos obtenidos en diferentes condiciones experimentales.

Una exploración más cuidadosa de estos hechos que permitieran aplicar el criterio de desnaturalización a la diferenciación de las enzimas - de la fosfatasa alcalina, ha demostrado que efectivamente existe una disociación del comportamiento en el sentido de que a temperaturas por debajo de 50°C el hígado es más sensible a un tiempo de

calentamiento de 5 minutos, pero a temperaturas superiores a las que se ha indicado, la enzima de hueso es menos resistente.

Los resultados obtenidos en las figuras # 6 y 7, que están consignados en la tabla # III, claramente indican que la desnaturalización por temperatura puede constituir un criterio para la diferenciación de las enzimas de la fosfatasa alcalina. En efecto, en un caso de hiperparatiroidismo, padecimiento en el que hay una actividad osteoblástica aumentada, se observa que la enzima tiene una energía de desnaturalización elevada, más precisa a la que se observó con la isozima ósea, tal como era de esperarse, y en cambio, con un paciente con obstrucción de vías biliares se encontró que la energía de desnaturalización se aproxima y aún se encuentra por debajo de los valores encontrados para la isozima hepática. Esto indicaría que la fosfatasa alcalina se eleva en los casos de obstrucción biliar como consecuencia de un aumento de la isozima correspondiente a hígado, en otras palabras se apoyaría la hipótesis

de sobreproducción y no la de regurgitación de la fosfatasa alcalina.

El análisis de los experimentos consignados en la figura # 6 y en la tabla # III proporcionan datos de gran interés. En primer lugar se ve que sobre una gran parte de la temperatura, la adición de las isozimas purificadas ó de una mezcla de ellas no modifica sustancialmente la velocidad con la que se destruye por el calor la fosfatasa alcalina presente en un suero patológico. Sin embargo a temperaturas por arriba de 58°C se separan para presentarse en la forma que era de esperarse ó sea mayor sensibilidad al calor para la isozima de origen óseo que para la hepática y una posición intermedia para la mezcla de ambas. Por otra parte puede verse que el valor obtenido para la energía de desnaturalización del suero solo, (99,000 calorías por mol) es bastante más elevado del que se obtuvo para el mismo paciente 15 días antes (57,000 calorías por mol). La diferencia observada se debe al hecho de que durante este intervalo la paciente, que padecía una obs--

trucción de las vías biliares por un carcinoma de la ampolla de Vater fue operada, restableciéndose el drenaje de la bilis por una anastomosis del colédoco con el yeyuno.

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

- 1.- La adición de suero humano disminuye la energía de activación de las isozimas de la fosfata alcalina de manera considerable, notándose ésta sobre todo en la isozima hepática.
- 2.- La energía de activación no proporciona un -- criterio adecuado para la diferenciación de -- los componentes de la fosfatasa alcalina presente en el suero humano normal y patológico.
- 3.- De mayor valor es la energía de conversión -- (desnaturalización) con lo cual se comprueba el hecho de que la isozima de origen óseo es más sensible a la temperatura que la isozima de origen hepático, ya que para la primera se encontró un valor de 200,000 calorías por mole, y para la segunda el valor fue de 93,000 calorías por mol.
- 4.- La adición de suero humano a las isozimas correspondientes produce una mayor sensibilidad de éstas a la temperatura.

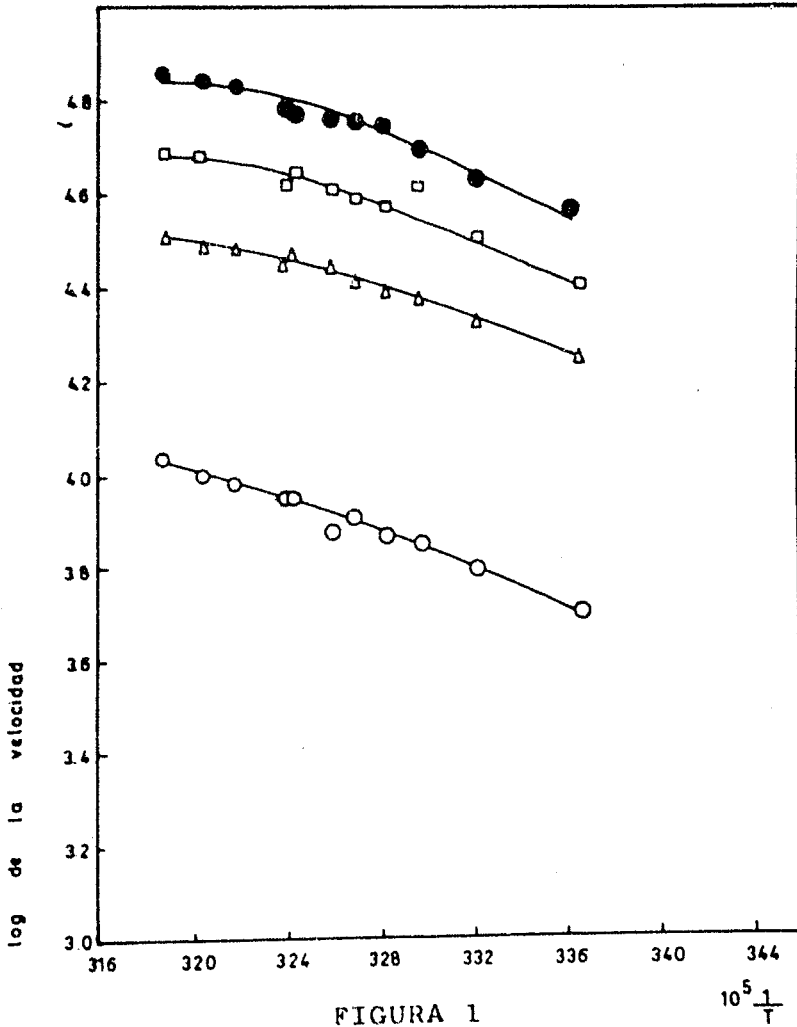


FIGURA 1

Energía de activación de mezclas de isozi--
mas de hígado y hueso a diferentes valores
de pH.

○ - 8.4 Δ - 9.25 □ - 9.65 ● - 10.1

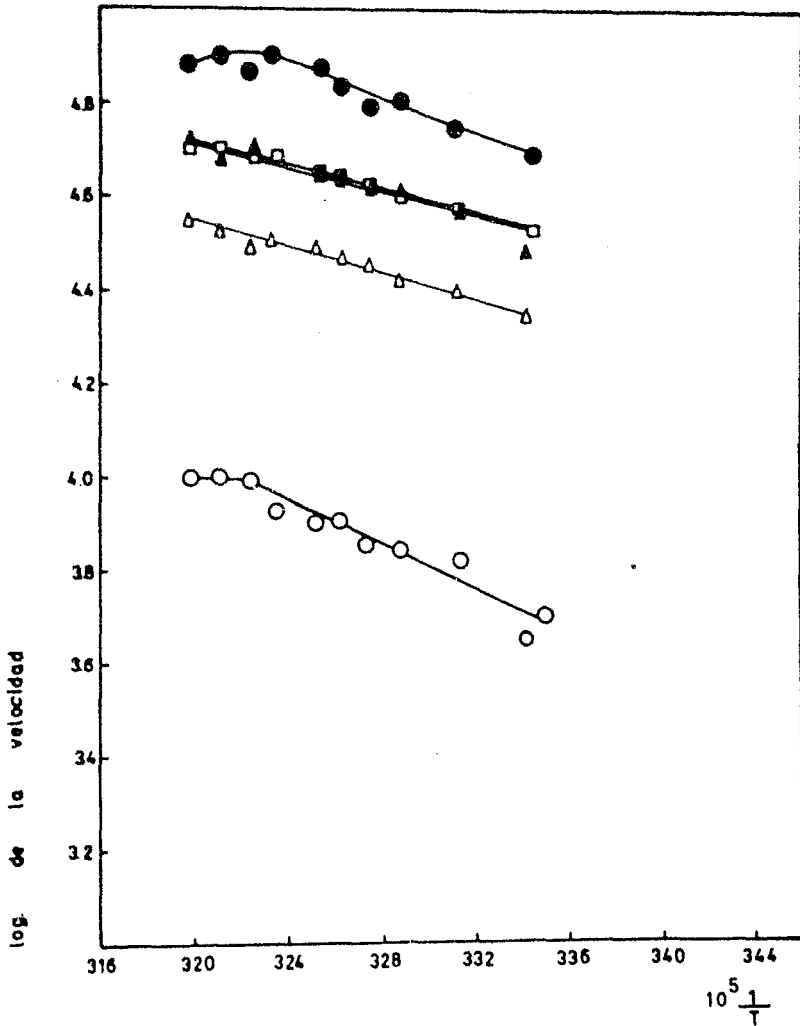


FIGURA 2

Efecto de la adición de suero sobre la energía de activación de la fosfatasa alcalina y sobre la mezcla de éste con isozima ósea a los valores de pH que se indican.

Hígado + suero \circ - 8.4 \triangle - 9.25 \square - 9.65
 \bullet - 10.1
Hígado + hueso + suero \blacktriangle - 9.65

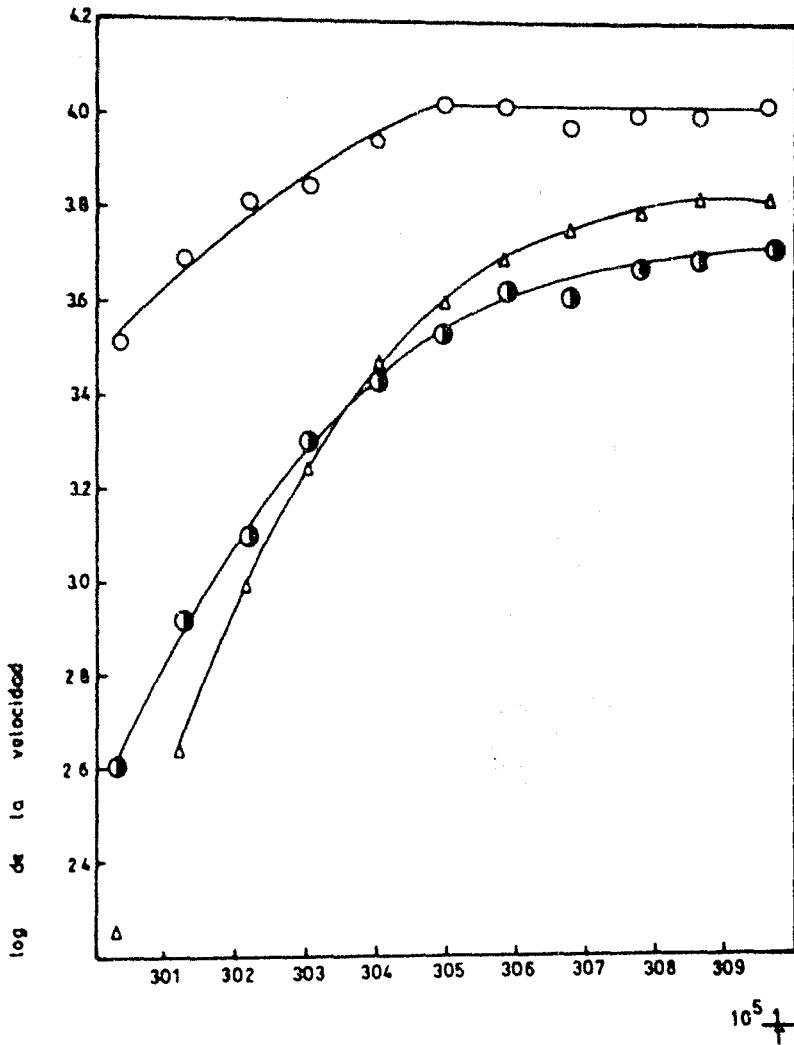


FIGURA 3

Energía de desnaturalización de las isozimas ósea y hepática después de cromatografía y de su mezcla.

hígado después de cromatografía ○
hueso después de cromatografía △
mezcla de las dos isozimas ●

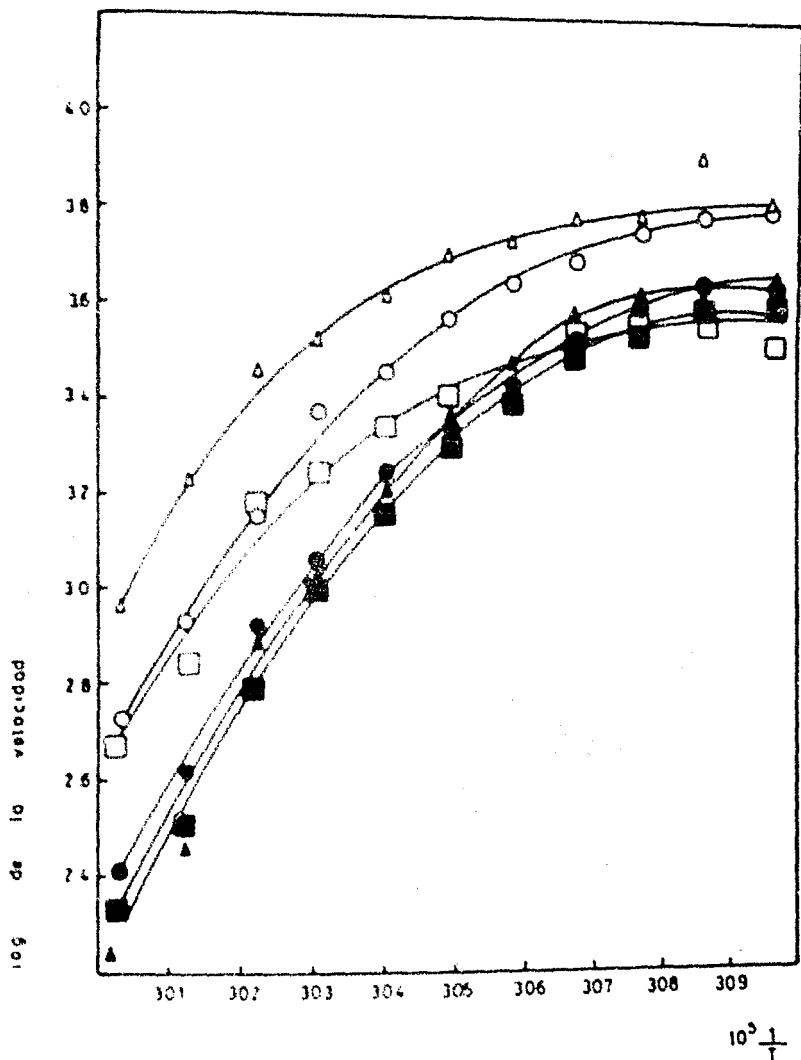


FIGURA 4

Efecto del suero sobre la energía de desnaturación de las isozimas ósea y hepática antes de cromatografía y sobre su mezcla.

hígado antes de cromatografía
hueso antes de cromatografía
hígado más suero
hueso más suero
hígado más hueso más suero
suero

○
△
●
▲
■
□

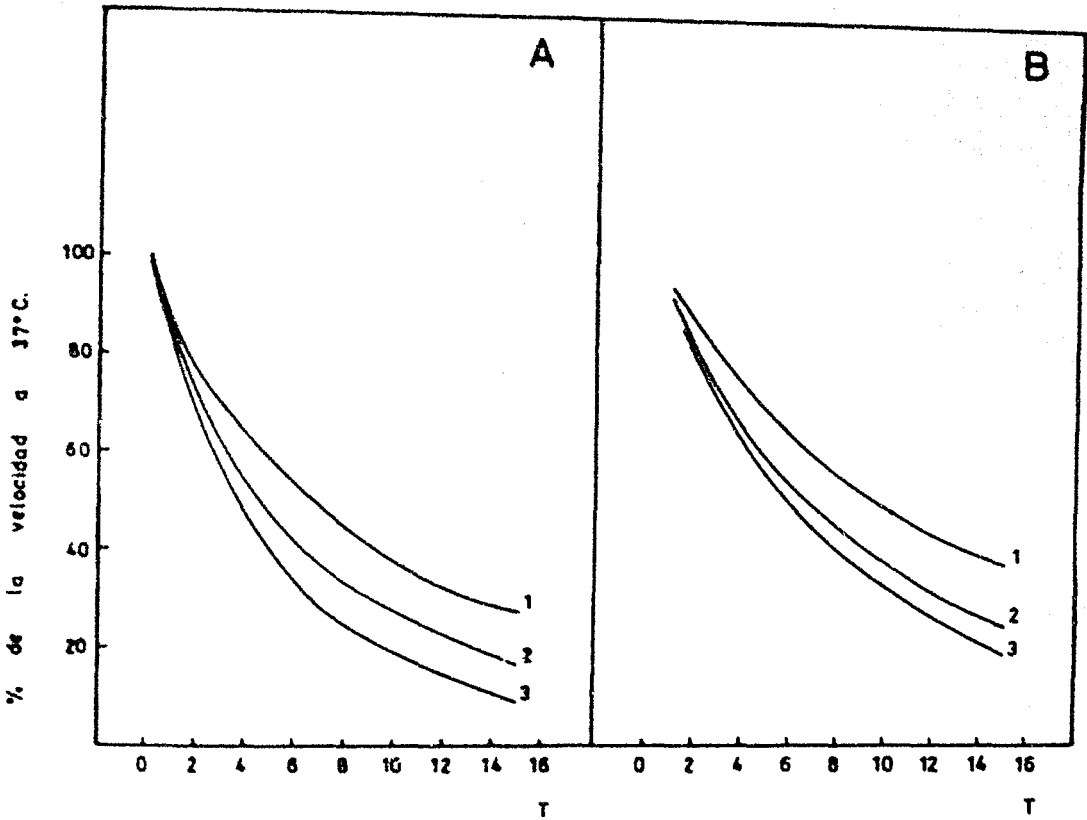


FIGURA 5

Efecto del calentamiento sobre la desnaturación de las isozimas ósea y hepática solas y adicionadas de suero, a distintas diluciones.

1 - 1:25

2 - 1:2.5

3 - 1:5

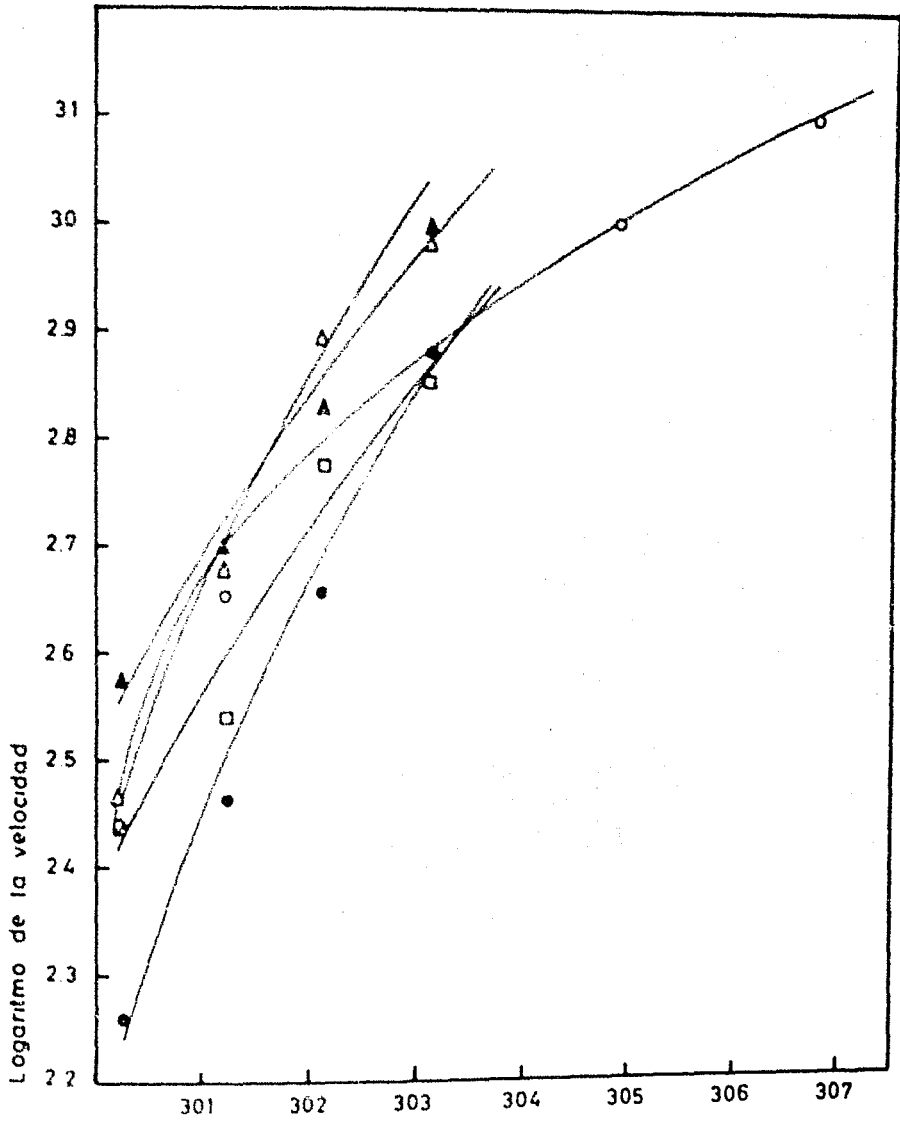


FIGURA 6

$10^5 \frac{1}{T}$

Energía de desnaturalización de la fosfatasa alcalina presente en el suero de sujetos normales: cada símbolo representa un caso.

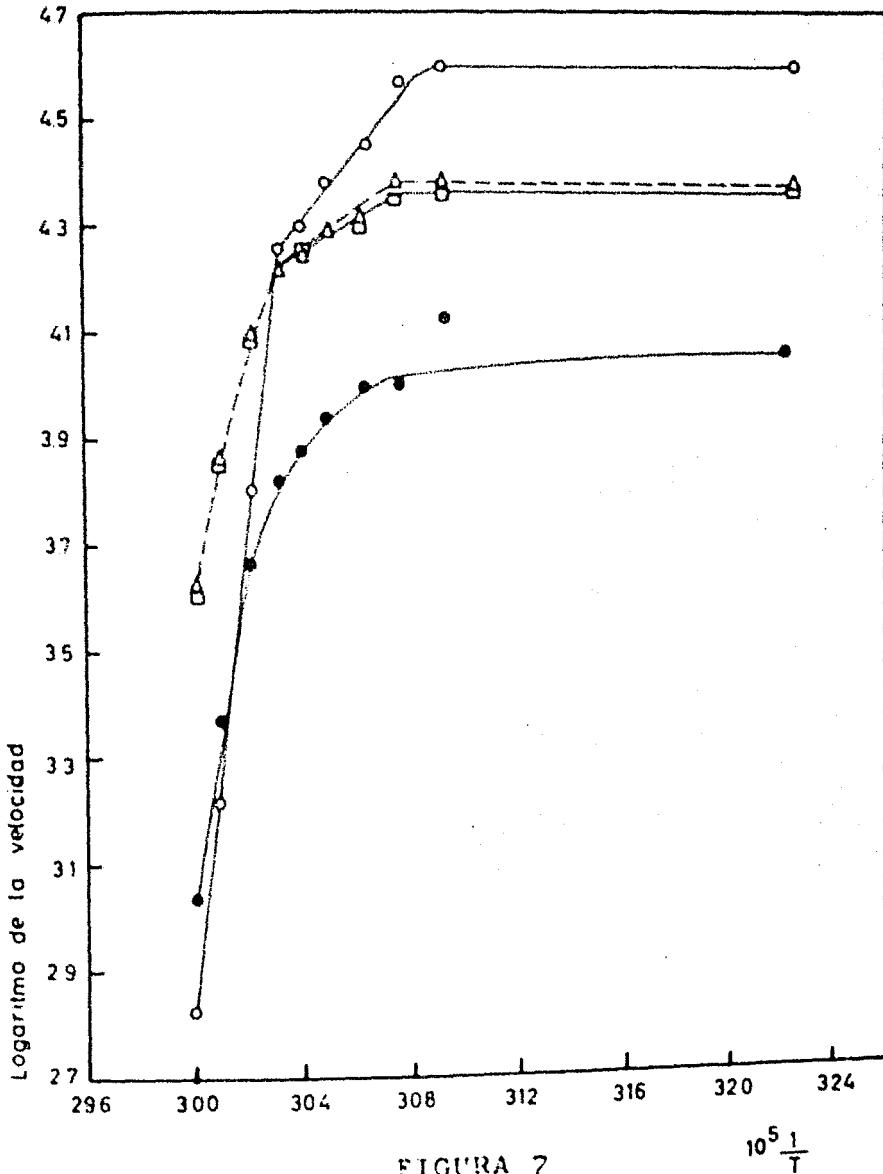


FIGURA 7

Energía de desnaturalización de la fosfatasa alcalina presente en el suero de sujetos con estados patológicos.

○ hiperparatiroidismo △ - obstrucción de ---
vías biliares, □ - hígado poliquístico con obs-
trucción parcial de vías biliares ● - cirrosis
postnecrótica.

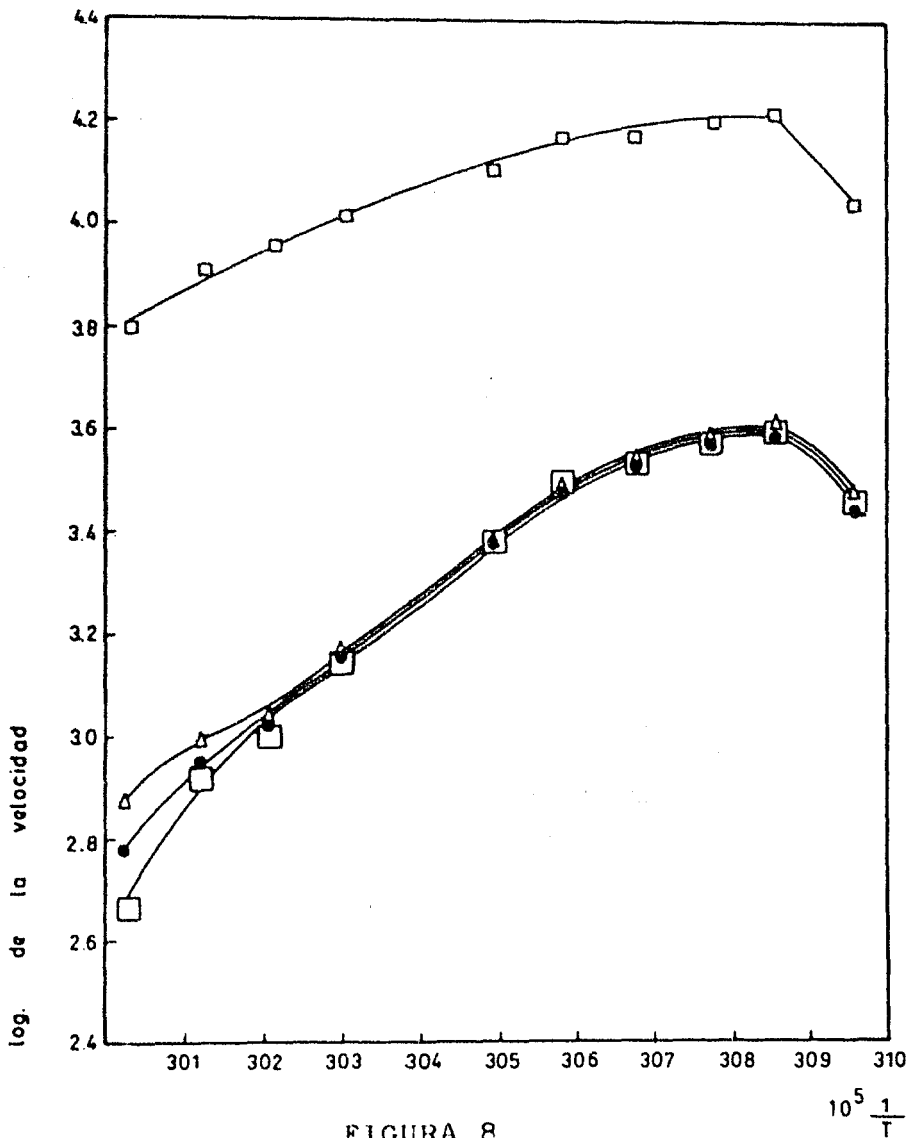


FIGURA 8

Efecto de la adición del suero de un caso de -- obstrucción biliar sobre la energía de desnaturalización de las isozimas ósea y hepática y so bre una mezcla de las mismas.

suero obstrucción biliar
 hígado antes de cromatografía
 hueso antes de cromatografía
 hígado más hueso más suero



BIBLIOGRAFIA

- 1.- Torres, J., Soberón, G.
ESTUDIOS CINETICOS DE LA FOSFATASA ALCALINA DEL PLASMA HUMANO.
Comunicación presentada en la I Reunión --- Anual de la Sociedad Mexicana de Bioquímica febrero de 1962.
- 2.- Alfaro, A.M.
LA(S) FOSFATASA(S) ALCALINA(S) DEL SUERO HUMANO Y SU PROCEDENCIA TISULAR.
Tesis Profesional 1961.
- 3.- Navarrete, J.G.
DIFERENCIACION CINETICA DE LAS FOSFATASAS - ALCALINAS DEL SUERO Y SU IMPORTANCIA EN EL DIAGNOSTICO CLINICO.
Tesis Profesional 1962.
- 4.- Tarraba, Z.R.
ESTUDIO CINETICO DE LAS ISOZIMAS DE LA FOSFATASA ALCALINA DE HIGADO Y HUESO HUMANO I. INFLUENCIA DEL pH Y LA TEMPERATURA SOBRE LAS VELOCIDADES MAXIMAS Y LA CONSTANTE DE - MICHAELIS.
Tesis Profesional 1963.
- 5.- Zárate, G.
ESTUDIOS CINETICOS EN LAS ISOZIMAS DE LA -- FOSFATASA ALCALINA, PRESENTES EN HIGADO Y - HUESO HUMANO II. INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA Y EL pH SOBRE LAS ENERGIAS DE ACTIVA-- CION Y CONVERSION.
Tesis Profesional 1962.
- 6.- Wroblewsky, F.
THE SIGNIFICANCE OF ALTERATIONS IN SERUM ENZYMES IN THE DIFFERENTIAL OF JAUNDICE.
Arch. Int. Med. 100: 635, 1957.
- 7.- Moss, D.F., B. Campbell, E. Anagnoston, Kakaras, and E.J. Mink.
CHARACTERIZATION OF TISSUE ALKALINE PHOSPHATASES AND THEIR PARTIAL PURIFICATION

BY STARCH-GEL, ELECTROPHORESIS.

Biochem. J. 91: 441, 1961.

- 8.- Pasquale, F. Penille, and S.C. Finch.
ALKALINE PHOSPHATASE ACTIVITY OF EXUDATIVE,
LEUKOCYTE IN ACUTE LEUKEMIA.
Blood 19: 572, 1961.
- 9.- Schlamowitz, M., and O. Bodansky.
TISSUE SOURCES OF HUMAN SERUM ALKALINE
PHOSPHATASE AS DETERMINED BY IMMUNOCHEMICAL
PROCEDURES.
J. Biol. Chem. 234: 433, 1954.
- 10.- Schlamowitz, M.
SPECIFICITY OF DOG INTESTINAL PHOSPHATASE
ANTISERUM.
J. Biol. Chem. 206: 369, 1954.
- 11.- Korner, N.H.
DISTRIBUTION OF ALKALINE PHOSPHATASE IN
SERUM PROTEIN FRACTIONS.
J. Clin. Path. 15: 195, 1962.
- 12.- Chiandussi, L., S.F. Greene and S. Sherlock
SERUM ALKALINE PHOSPHATASE FRACTIONS IN
HEPATO BILIARY AND BONE DISEASES.
Clin. Sci. 22: 425, 1962.
- 13.- Grossber, A.L., E.H. Hanis and M.
Schlamowitz.
ENRICHMENT AND SEPARATION OF ALKALINE
PHOSPHATASE ACTIVITIES OF HUMAN TISSUES BY
CHROMATOGRAPHY ON CELLULOSE.
Arch. of Biochem. and Biophys. 93: 267,
1961.
- 14.- Boyer, S.H.
ALKALINE PHOSPHATASE IN HUMAN SERUM AND
PLACENTAE.
Sci. 134: 1002, 1961.

BY STARCH-GEL., ELECTROPHORESIS.

Biochem. J. 91: 441, 1961.

- 8.- Pasquale, F. Penille, and S.C. Finch.
ALKALINE PHOSPHATASE ACTIVITY OF EXUDATIVE,
LEUKOCYTE IN ACUTE LEUKEMIA.
Blood 19: 572, 1961.
- 9.- Schlamowitz, N., and O. Bodansky.
TISSUE SOURCES OF HUMAN SERUM ALKALINE
PHOSPHATASE AS DETERMINED BY IMMUNOCHEMICAL
PROCEDURES.
J. Biol. Chem. 234: 433, 1954.
- 10.- Schlamowitz, N.
SPECIFICITY OF DOG INTESTINAL PHOSPHATASE
ANTISERUM.
J. Biol. Chem. 206: 369, 1954.
- 11.- Korner, N.B.
DISTRIBUTION OF ALKALINE PHOSPHATASE IN
SERUM PROTEIN FRACTIONS.
J. Clin. Path. 15: 195, 1962.
- 12.- Chiandussi, L., S.F. Greene and S. Sherlock
SERUM ALKALINE PHOSPHATASE FRACTIONS IN
HEPATO BILIARY AND BONE DISEASES.
Clin. Sci. 22: 425, 1962.
- 13.- Grossber, A.L., E.H. Hanis and N.
Schlamowitz.
ENRICHMENT AND SEPARATION OF ALKALINE
PHOSPHATASE ACTIVITIES OF HUMAN TISSUES BY
CHROMATOGRAPHY ON CELLULOSE.
Arch. of Biochem. and Biophys. 93: 267,
1961.
- 14.- Boyer, S.H.
ALKALINE PHOSPHATASE IN HUMAN SERUM AND
PLACENTAE.
Sci. 137: 1002, 1961.

- 15.- Keiding, N.R.
DIFFERENTIATION INTO THREE FRACTIONS OF THE
SERUM ALKALINE PHOSPHATASE AND THE BEHAVIOR
ON THE FRACTIONS IN DISEASES OF BONE AND
LIVER.
Scand. J. Clin. and Lab. Invest. 11: 106,
1959.
- 16.- Moss, D.W. and E.J. King.
PROPERTIES OF ALKALINE PHOSPHATASE
FRACTIONS, SEPARATED BY STARCH-GEL,
ELECTROPHORESIS.
Biochem. J. 84: 192, 1962.
- 17.- Schlamowitz, M.
IMMUNOCHEMICAL STUDIES ON ALKALINE
PHOSPHATASE.
Ann. of the New York Acad. of Sci. 75: 373,
1958.
- 18.- Landau, W. and M. Schlamowitz.
STUDIES OF FACTORS RELATED TO THE
DIFFERENTIATION OF ALKALINE PHOSPHATASE
DERIVED FROM SEVERAL TISSUES.
Arch. of Biochem. and Biophys. 95: 474,
1961.
- 19.- Anderson, A.P.
INHIBITION OF ALKALINE PHOSPHATASE BY
ADRENALINE AND RELATED DIHYDROXYFENOLS AND
QUINONES.
Biochem. and Biophys. Acta 54: 110, 1961.
- 20.- Madsen, N.P. and Juler Tuba.
ON THE SOURCE OF THE ALKALINE PHOSPHATASE
IN RAT SERUM.
J. Biol. Chem. 195: 741, 1952.
- 21.- Nisselbaum, J.S., M. Schlamowitz, O.
Bodansky.
IMMUNOCHEMICAL STUDIES OF FUNCTIONALLY
SIMILAR ENZYMES.
Ann. of the New York Acad. of Sci. 94: 970,
1961.

- 22.- Roche, J. et Henri Sarles.
SPECIFICITE DES PHOSPHATASES ALCALINES ET
HIPERPHOSPHATASEMIAS.
Bull. Soc. Chim. Biol. 33: 667, 1951.
- 23.- Motzok, I. and H.Q. Branion.
STUDIES ON ALKALINE PHOSPHATASE 2. FACTORS
INFLUENCING, pH OPTIMA AND MICHAELIS
CONSTANT.
Biochem. J. 72: 177, 1959.
- 24.- Motzok, I.
STUDIES ON THE PLASMA PHOSPHATASE OF NORMAL
AND RACHITIC CHICKS (RELATIONSHIP BETWEEN
PLASMA PHOSPHATASE AND THE PHOSPHATASES OF
BONE, KIDNEY, LIVER, AND INTESTINAL MUCOSA).
Biochem. J. 47: 193, 1950.
- 25.- Moss, D.W. and E.J. King.
SOME PROPERTIES OF ALKALINE PHOSPHATASE
ISOZYMES.
Biochem. J. 82: 19P, 1962.
- 26.- Dixon, A.
PHOSPHATASE, EFFECT OF pH ON MICHAELIS
CONSTANTS.
Biochem. J. 55: 162, 1953.
- 27.- Fikri, Alican, James, D. Hardy.
LYMPHATIC TRANSPORT OF BILE PIGMENTS AND
ALKALINE PHOSPHATASE IN EXPERIMENTAL COMMON
DUCT.
Obstruction Surgery 52: 366, 1962.
- 28.- Jakson, S.H.
THE EFFECT OF FOOD INGESTION ON INTESTINAL
AND SERUM ALKALINE PHOSPHATASE IN RATS.
J. Biol. Chem. 195: 741, 1952.
- 29.- Jakson, S.H.
THE EFFECT OF FOOD INGESTION ON INTESTINAL
AND SERUM ALKALINE PHOSPHATASE IN RATS.
J. Biol. Chem. 199: 553, 1952.

- 30.- Flock, E.V. and J.L. Bollmen.
ALKALINE PHOSPHATASE IN THE INTESTINAL
LYMPHATIC OF THE RAT.
J. Biol. Chem. 175: 439, 1948.
- 31.- Esteban, M.J.
ESTUDIO SOBRE LAS ISOZIMAS OSEA Y HEPATICA
DE LA FOSFATASA ALCALINA. SU IMPLICACION
DIAGNOSTICA.
Tesis Profesional 1963.
- 32.- Bessey, O., O.H. Lowry and H.J. Brock.
J. Biol. Chem. 164: 321, 1946.
- 33.- Bodansky, O.
J. Biol. Chem. 112: 341, 1935.