

**UNIVERSIDAD IBEROAMERICANA**

---

Facultad de Química Berzelius

- **Diferenciación Cinética de las Fosfatasas Alcalinas del Suero y su Importancia en el Diagnóstico Clínico.**

**T E S I S**

Que para obtener el título de:

**QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO**

**p r e s e n t a :**

**MA. GUADALUPE NAVARRETE JASSO**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**A mis padres con respeto, cariño y gratitud**

A mis hermanos.

A mi gran amigo,  
Sr. Benjamin Arcos.

Al Dr. Jesús Torres G.,  
por su acertada dirección en este  
trabajo.

Este trabajo fue realizado en el Departamento de Bioquímica del Instituto Nacional de la Nutrición, gracias a la gentileza del Dr. Salvador Zubirán, Director del Instituto y al Dr. Guillermo Sobaron Jefe del Departamento, por lo cual hago presente mi agradecimiento

DIFERENCIACION CINETICA DE LAS FOSFATASAS ALCALINAS  
DEL SUERO Y SU IMPORTANCIA EN EL DIAGNOSTICO CLINICO.

1.- INTRODUCCION

2.- MATERIAL Y METODOS

a).- Fundamento

b).- Procedimiento

c).- Unidad

3.- RESULTADOS

4.- DISCUSION

5.- RESUMEN Y CONCLUSIONES

6.- BIBLIOGRAFIA.

## INTRODUCCION

Desde el año de 1940 el interés por el estudio de las enzimas de la sangre periférica, se ha incrementado considerablemente. Numerosos investigadores, han enfocado sus mejores esfuerzos, a la solución de los diversos problemas que este campo plantea.

Los enzimólogos al trabajar con otros tejidos, han considerado a la sangre periférica como un contaminante que es necesario eliminar. Afortunadamente, los investigadores clínicos, (2, 3), impresionados por la facilidad en la obtención del material de estudio y por la elegancia de los métodos disponibles para la medición de las actividades enzimáticas, han realizado grandes esfuerzos en la investigación de las alteraciones enzimáticas en las enfermedades más diversas. Esta fase, indudablemente de gran trascendencia, ha sido complementada con investigaciones básicas que han permitido aclarar el mecanismo de las alteraciones enzimáticas en diferentes padecimientos. Como consecuencia, factores relativos al movimiento de las enzimas a través de las membranas celulares, al origen, utilización, degradación, excreción y características cinéticas de las enzimas del suero recien en la actualidad la consideración entusiasta de numerosos investigadores (4,5,6,7,8).

Gracias a esta investigación coordinada entre científicos con diferente orientación y al análisis estadístico, los resultados son más concluyentes.

Como consecuencia de todos estos esfuerzos, la literatura de que hoy disponemos en este capítulo del conocimiento humano es un extremo abundante; las publicaciones en relación con el patrón enzimático normal de los leucocitos (9,10,11), plaquetas (12,13,14), eritrocitos (15,16,17,18) y del suero (19,20,21,22) y las alteraciones del mismo bajo diferentes condiciones (23,24,25,26), se cuenta por miles.

El estudio de las enzimas en suero debe realizarse en cinco etapas:

En la primera se deberán establecer las condiciones óptimas para la medición de la actividad enzimática.

En la segunda se determinará si esta actividad es consecuencia de una o varias proteínas.

En la tercera se aclarará si estas diferentes proteínas proceden de uno o de varios órganos.

En la cuarta se investigará el comportamiento de estas proteínas, con actividad enzimática similar, en aquellas condiciones que afectan los diferentes órganos de procedencia.

En la quinta y última se realizará la purificación de las proteínas involucradas en la actividad enzimática estudiada para proponer hipótesis sobre el mecanismo de la reacción catalítica y de las modificaciones encontradas en clínica.

Varios investigadores han seguido en parte esta metodología y los resultados han sido muy importantes. En efecto, los



estudios de Wroblewsky (27), Hess y Hill (28,29) han demostrado la existencia en suero de cinco dehidrogenasas lácticas, señalan también los órganos de procedencia de estas diferentes fracciones proteínicas y las alteraciones que ellas experimentan en el infarto del miocardio, anemia perniciosa, leucemia linfocítica, leucemia granulocítica y algunas neoplasias malignas. De modo similar Vesell y Bearn (30) han evidenciado la presencia de tres dehidrogenasas málicas y Marks (31) y colaboradores han demostrado las diferencias en comportamiento cinético de la gluco-6-fosfato dehidrogenasa obtenida de glóbulos rojos de pacientes sensibles a la primaquina y de la purificada a partir de glóbulos rojos normales.

El estudio de la actividad de fosfatasa alcalina no específica en suero es muy interesante desde varios ángulos: 1.-Su estudio ha sido muy útil en el diagnóstico diferencial de los padecimientos de la encrucijada hepatobiliar y óseos, (32,33). 2.-Se ha demostrado esta actividad en todos los tejidos animales investigados. 3.-Era probable por consiguiente, la presencia en suero de varias proteínas diferentes, responsables de ésta actividad. 4.- La separación de estas distintas proteínas con actividad de fosfatasa alcalina sería ineludablemente de alto valor en clínica.

Estudios previos realizados en este laboratorio, ha permitido apuntar la posible existencia de isoenzimas en actividad de fosfatasa alcalina, (isoenzimas).

El objeto de este trabajo experimental es determinar si las diferencias encontradas en el comportamiento cinético son de utilidad en el diagnóstico diferencial de los padecimientos de la encrucijada biliar y óseos.

## MATERIAL Y MÉTODOS.

Se usó suero de aquellos pacientes en los que podía suponerse la existencia de alteración en los niveles de fosfatasa alcalina.

Los sustratos utilizados fueron para-nitrofenil fosfato y beta-glicerofosfato, los cuales fueron obtenidos comercialmente.

El método del para-nitrofenil fosfato reportado por Bessey Lowry y Brock (34), se basa en el cuanteo a 415 m $\mu$  del para-nitrofenol liberado por la acción enzimática. Se define como unidad, la actividad catalítica necesaria para liberar un milimole de para-nitrofenol por hora y por litro de suero.

El método en que se usa beta-glicerofosfato, se basa en la medición a 720 m $\mu$  del fósforo inorgánico liberado por acción enzimática, este método fué propuesto por Bodansky (35). La unidad es la actividad enzimática necesaria para liberar 1 mg. de fósforo en una hora por 100 ml. de suero.

El suero se diluye de modo de obtener la liberación de una milimole de para-nitrofenol o de fósforo inorgánico en una hora por litro de suero.

El pH se varió de 7.4 a 10.65 con el fin de estudiar las diferentes variables que posteriormente se analizan. El amortiguador utilizado fué glicina 60 mM, previo ensayo de otros sistemas para eliminar la posibilidad de introducir activación ó

inhibición por la sustancia amortiguadora.

La concentración del sustrato seleccionado se varió de acuerdo con el experimento, buscando siempre obtener velocidad inicial en todos los experimentos.

Para examinar el efecto del cloruro de magnesio, se adicionó esta sustancia para obtener una concentración final de 8.33 mM; otras concentraciones fueron ensayadas también pero la anotada con anterioridad fué la que permitió una diferenciación más segura. Se eliminó el efecto del cloruro de magnesio por fuerza iónica por comparación con el efecto obtenida por la adición de cloruro de sodio al sistema a una concentración 25 mM.

## RESULTADOS.

Actividad en función del pH.- En los pacientes con fractura, hiperostosis múltiple familiar, agenesia de vesícula biliar y durante el embarazo, la curva de pH (Figs. I, VI, VII, VIII) presenta un rangese de actividad óptima mucho mas amplia que en los casos normales, la actividad en unidades a un solo pH no demostró incremento constante.

En los sujetos con obstrucción de vías biliares sin daño hepatocelular (Fig. II) demostrable por las pruebas del funcionamiento hepático habituales, la curva de pH exhibe un comportamiento similar a los pacientes analizados en el párrafo anterior.

En los pacientes con daño hepatocelular aparente, (III, IV, V) la curva de pH muestra dos pHs óptimos uno a pH entre 8.9 y 9.3, y el otro entre pH de 9.6 y 9.9

La energía de activación no se modificó de modo significativo al variar el pH, (Tabla I) excepto cuando se adicionaron cloruro de magnesio ó cloruro de sodio al sistema. Las cifras obtenidas fueron de 4.000 calorías por mole a los pHs de 9.05 a 10.45 y de 6.000 a 7.000 calorías para la misma zona de pH en presencia de cloruro de magnesio; la modificación de la energía de activación fué más importante en presencia de cloruro de sodio ya que se elevó desde 4.000 hasta cerca de 20.000 calorías al elevarse el pH del sistema en la zona mencionada.

La  $K_m$  (Fig. IX y Tabla II) nos muestra para el para-nitro fenil fosfato un incremento con un factor de 400 al modificarse el pH del sistema desde 9.83 a 10.65; en cambio la  $K_m$  para beta-glicerofosfato (Fig. X, Tabla II) aumenta por un factor de dos unidades unicamente, como respuesta a la variación del pH dentro del rango mencionado.

El  $pK_m$  (Fig. XI y Tabla II) nos muestra para el para-nitro fenil fosfato dos concavidades hacia abajo a pHs de 9.83 y 10.05 respectivamente; así mismo se exhibe una concavidad hacia arriba a pH de 10.15 cuando se usa este mismo sustrato. La curva de  $pK_m$  para beta-glicerofosfato (Fig. XI y Tabla II) muestra una sola concavidad hacia arriba a pH de 9.63

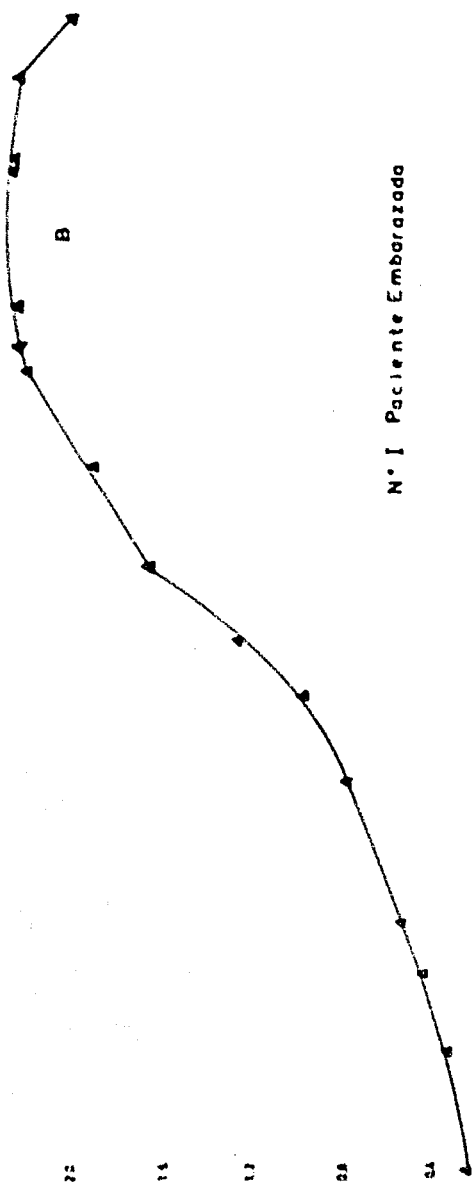
28  
26  
24  
22  
20  
18  
16  
14  
12  
10  
8  
6  
4  
2  
0

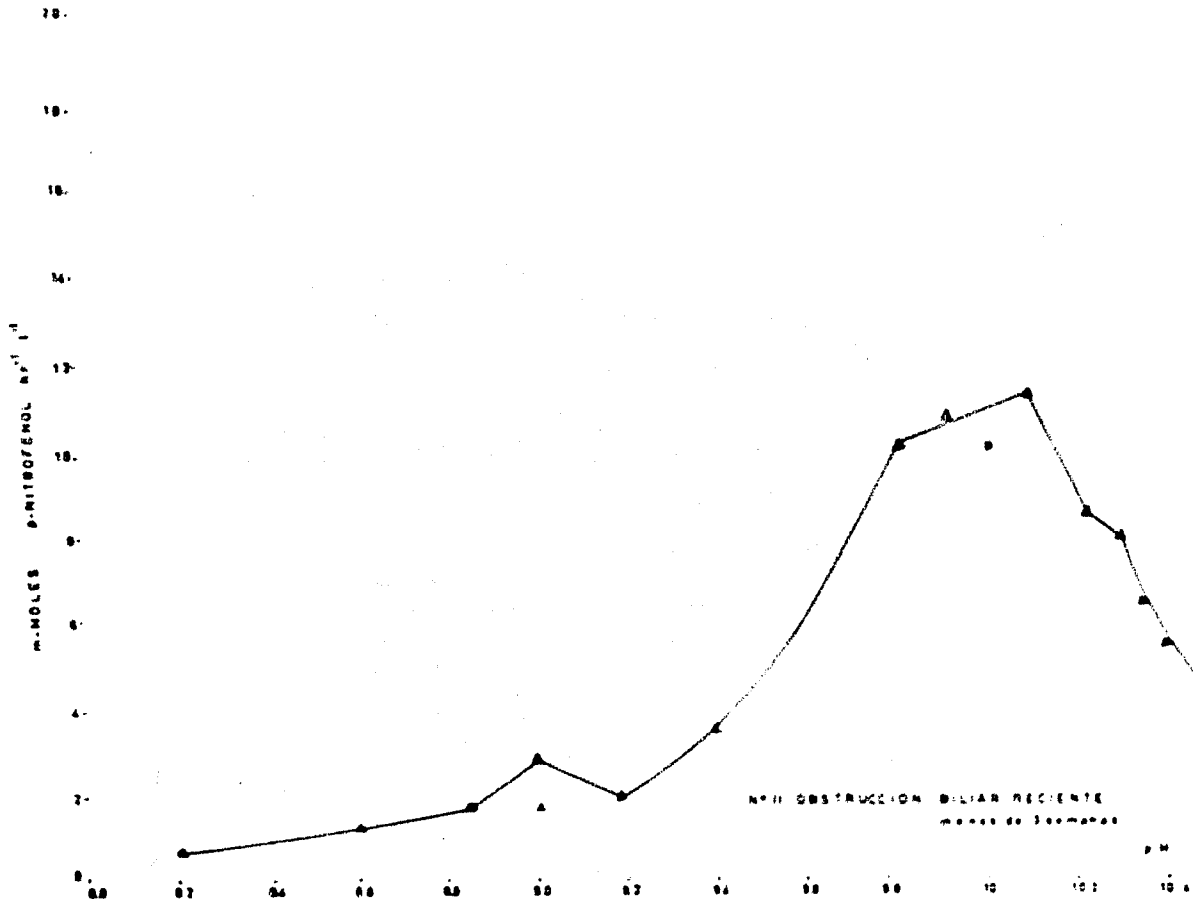
10.6  
10.4  
10.2  
10  
9.8  
9.6  
9.4  
9.2  
9  
8.8  
8.6  
8.4  
8.2  
8  
7.8  
7.6  
7.4  
7.2  
7  
6.8  
6.6  
6.4  
6.2  
6  
5.8  
5.6  
5.4  
5.2  
5  
4.8  
4.6  
4.4  
4.2  
4  
3.8  
3.6  
3.4  
3.2  
3  
2.8  
2.6  
2.4  
2.2  
2  
1.8  
1.6  
1.4  
1.2  
1  
0.8  
0.6  
0.4  
0.2  
0

B

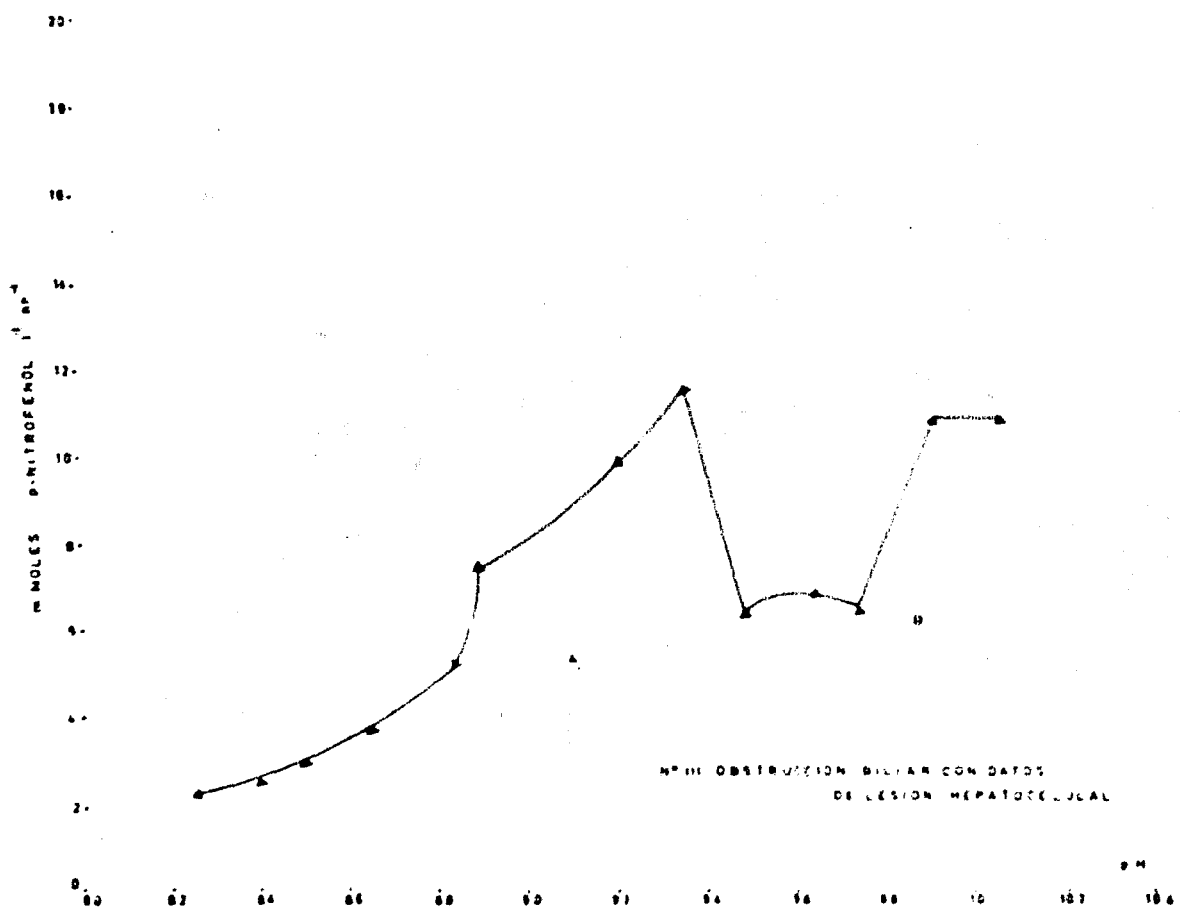
N° I Paciente Embarazada

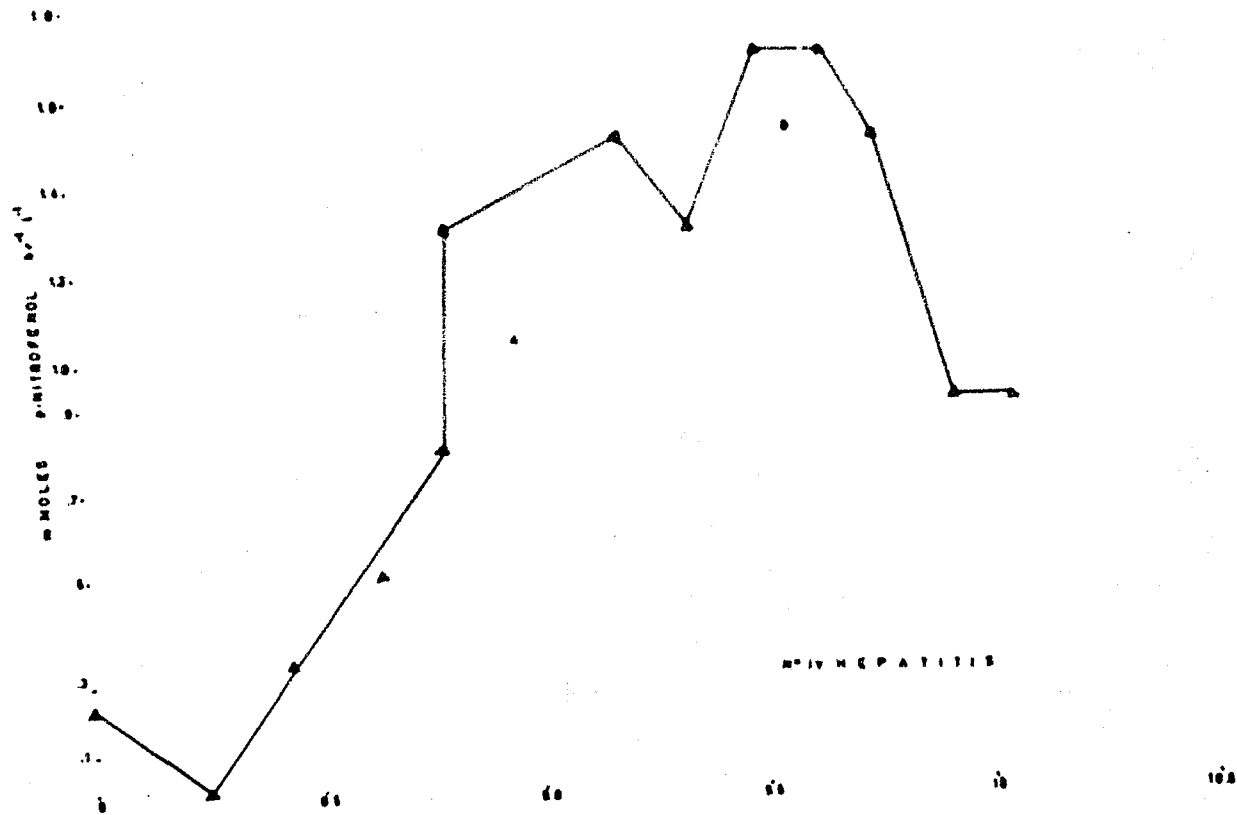
0.2 0.4 0.6 0.8 1 1.2 1.4 1.6 1.8 2 2.2 2.4 2.6 2.8 3 3.2 3.4 3.6 3.8 4 4.2 4.4 4.6 4.8 5 5.2 5.4 5.6 5.8 6 6.2 6.4 6.6 6.8 7 7.2 7.4 7.6 7.8 8 8.2 8.4 8.6 8.8 9 9.2 9.4 9.6 9.8 10 10.2 10.4 10.6 9 M

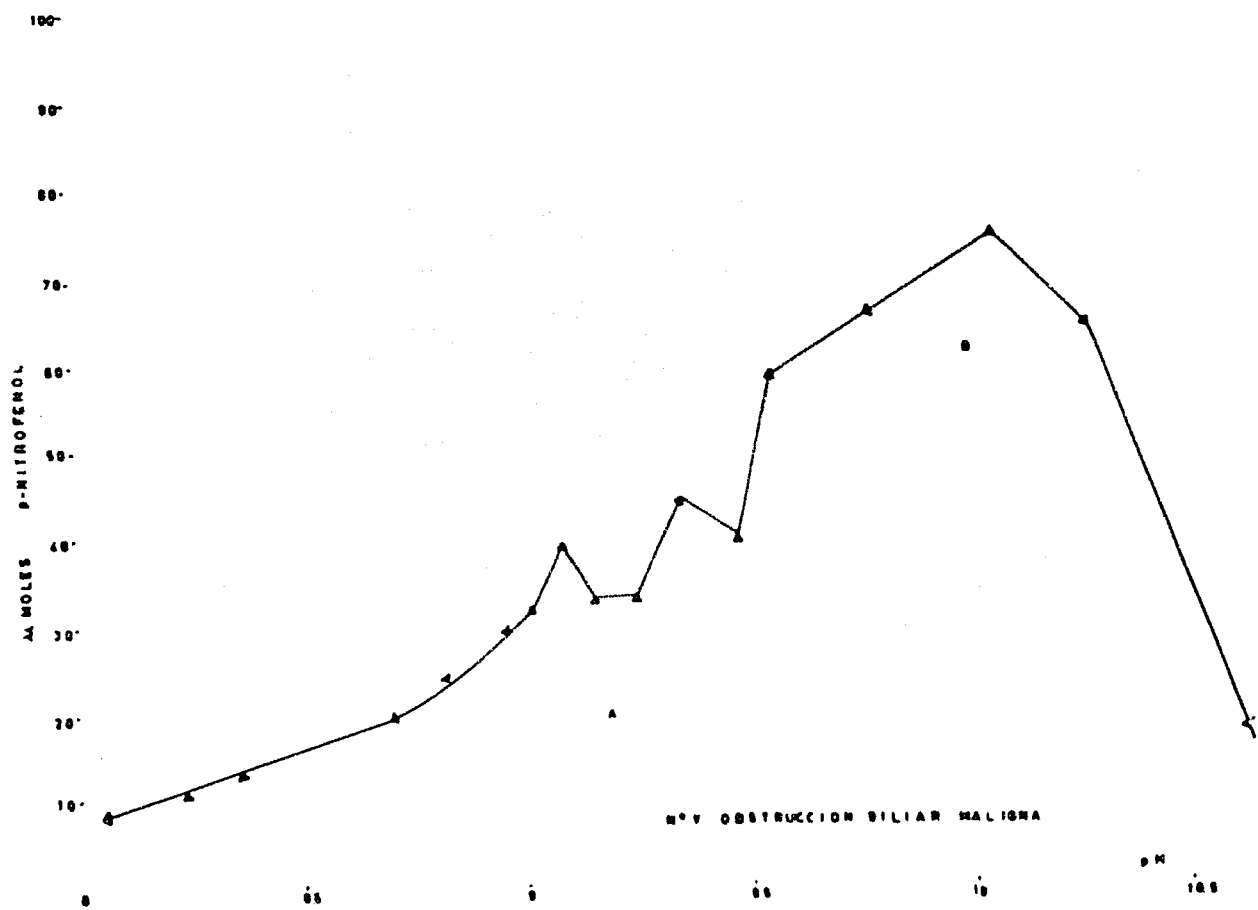








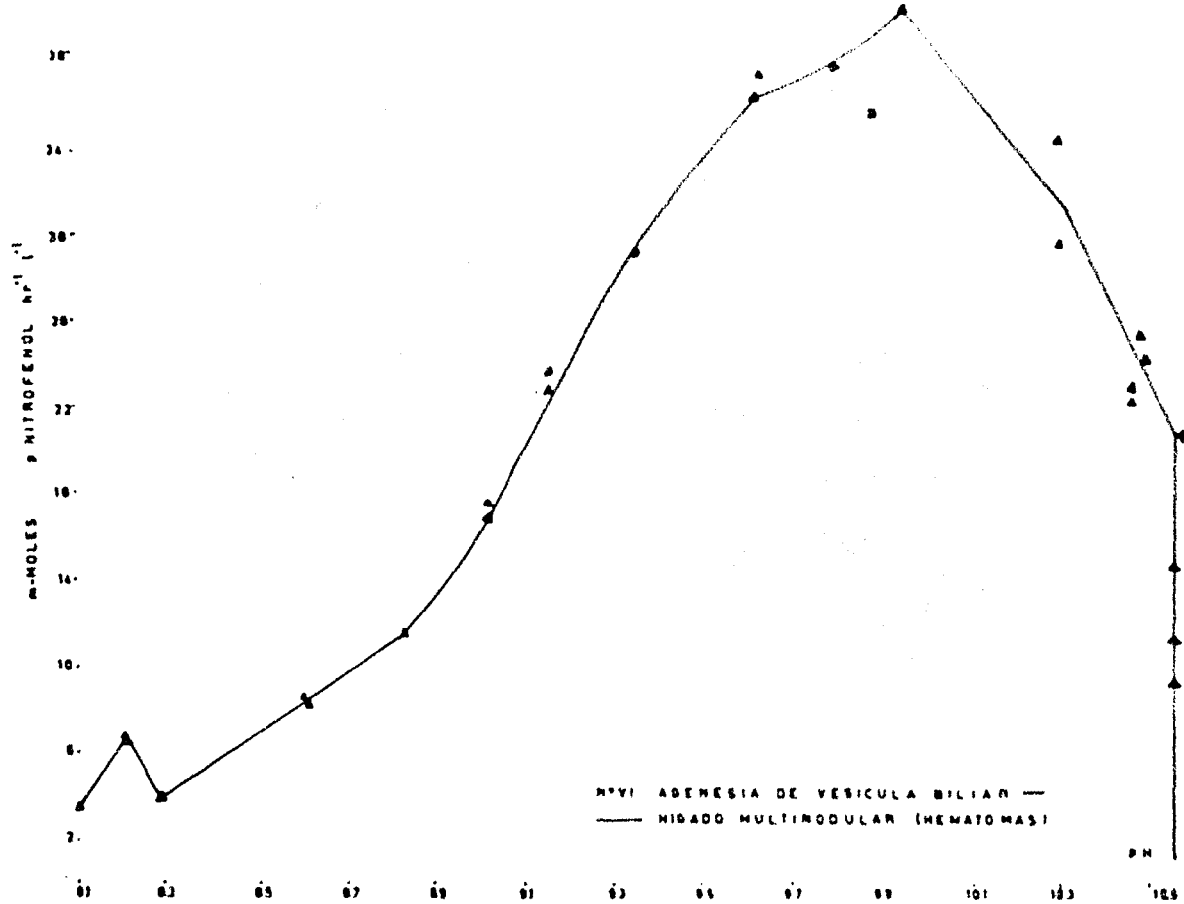


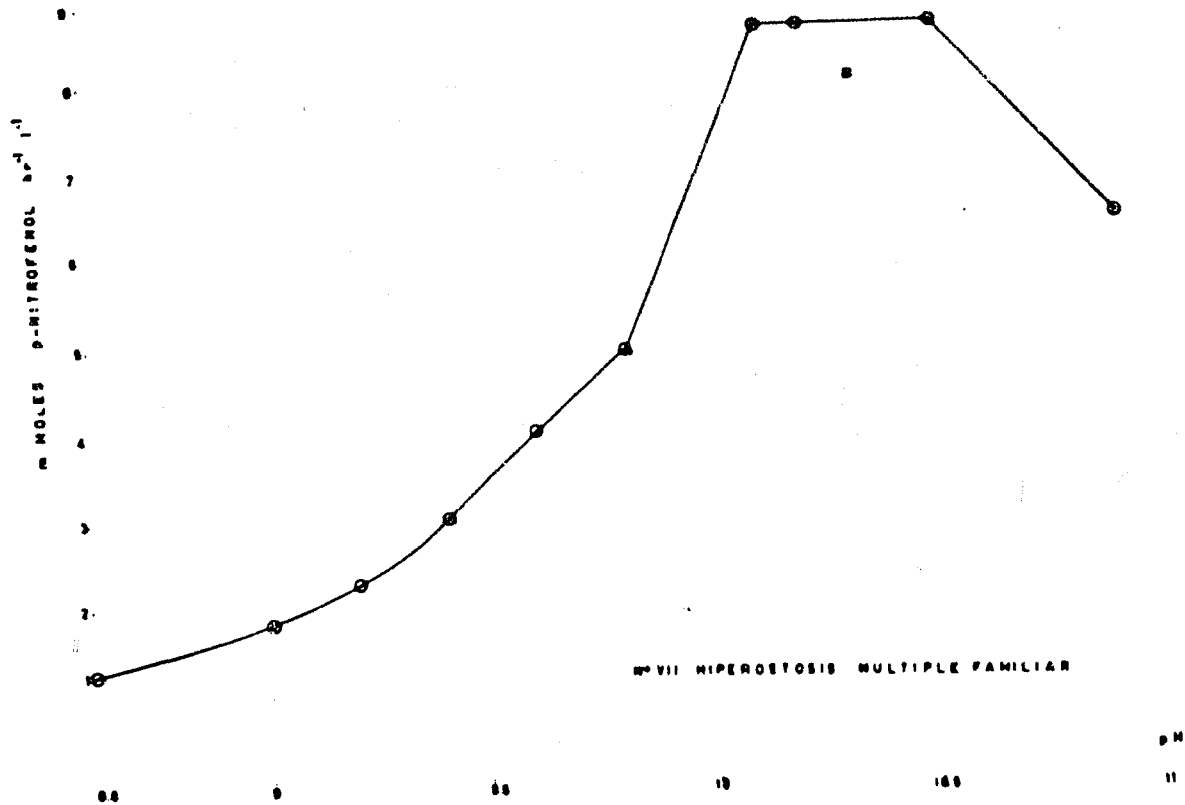


Nº V OBSTRUCCION BILIAR MALIGNA

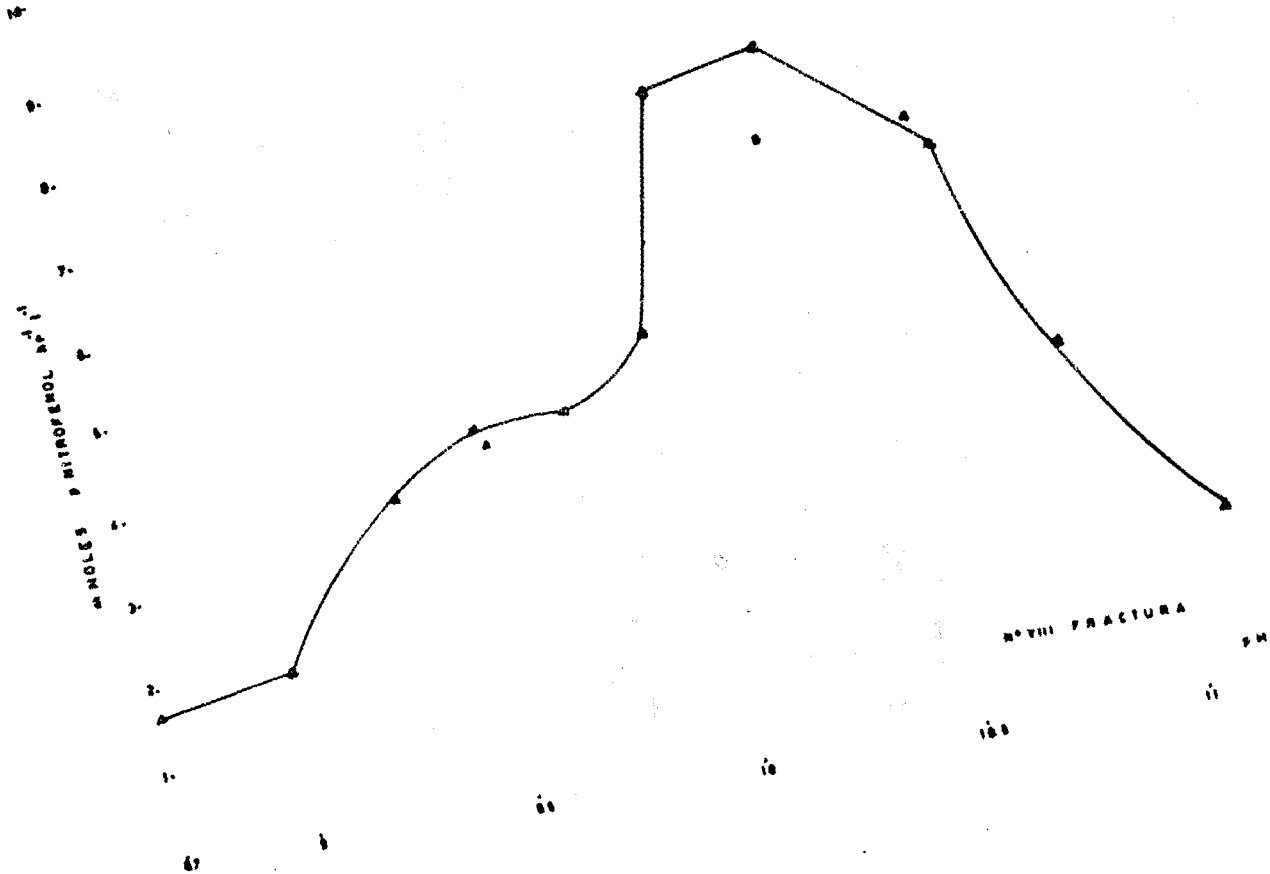
P.M

10.5

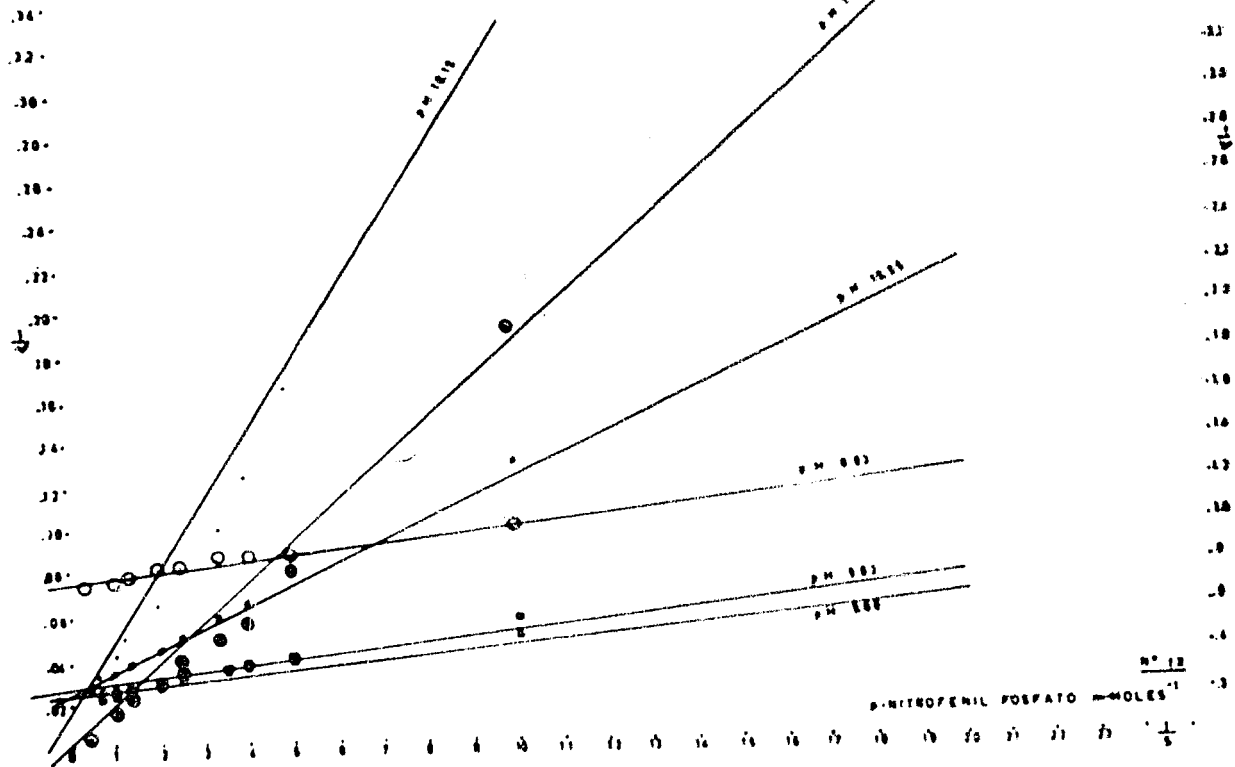




NO VII HIPEROSTOSIS MULTIPLE FAMILIAR

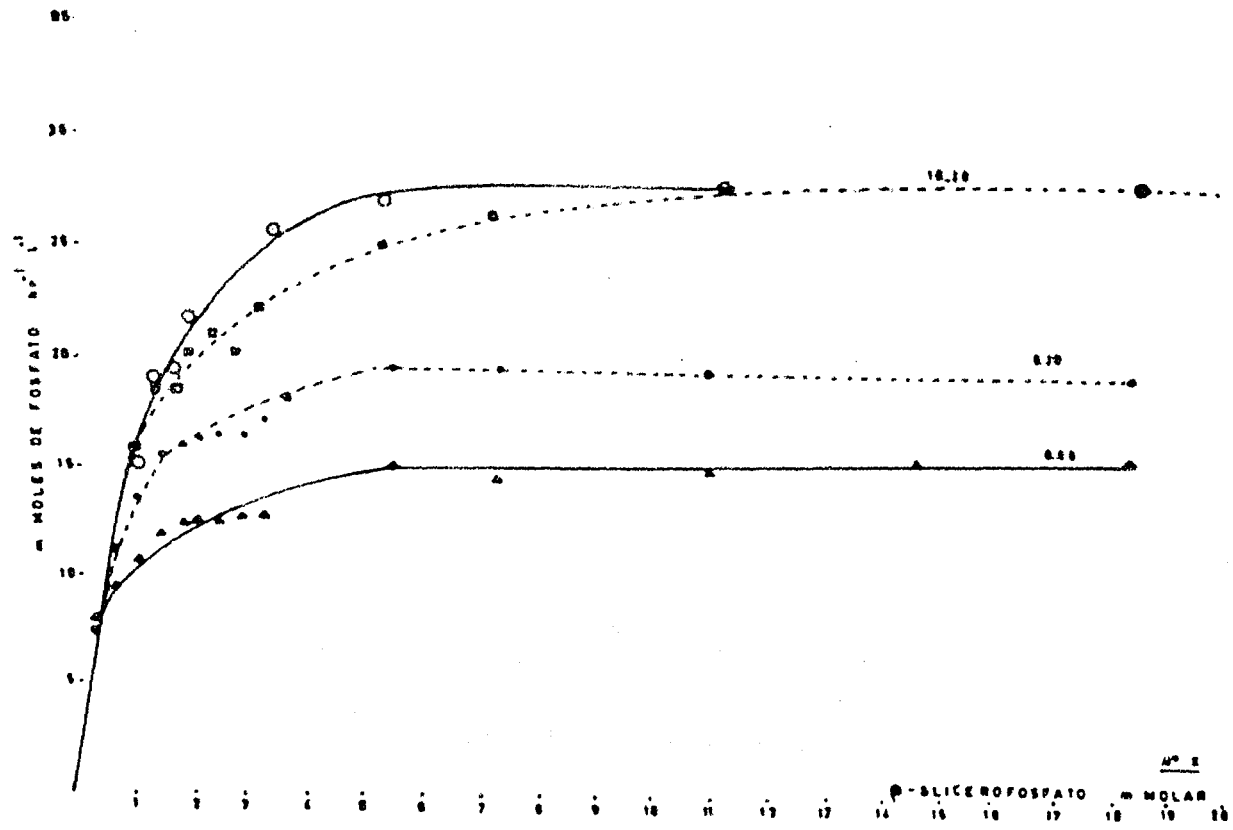


CONSTANTES DE MICHAELIS EN FUNCION DE  $pH$



Nº 12

p-NITROFENIL FOSFATO  $\mu\text{-MOLES}^{-1}$





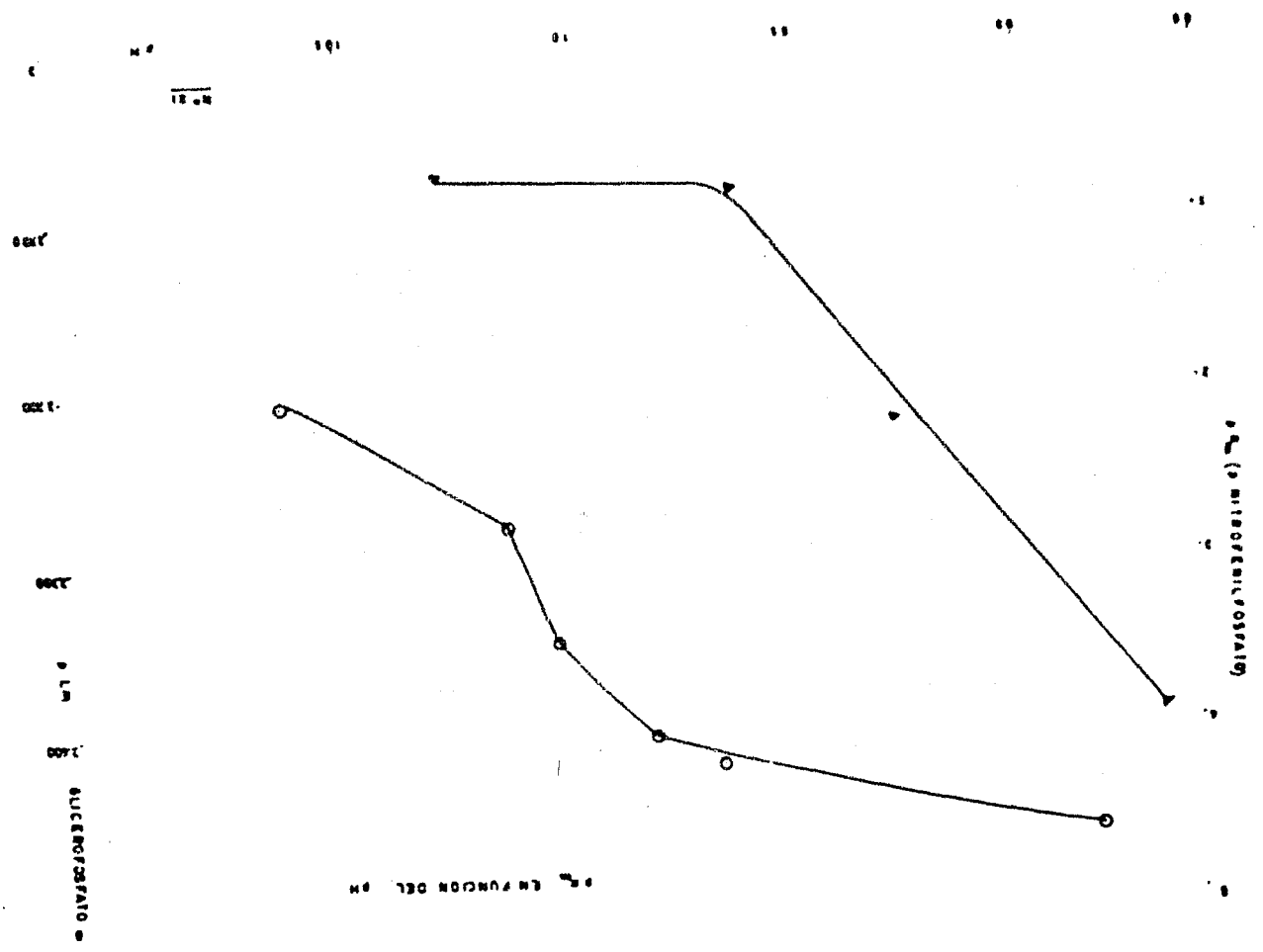


Fig. 1. EN FUNCIÓN DEL pH

TABLA I

Efecto del pH sobre la energía de activación en sistemas con fuerza iónica variable o modificada por la acción del cloruro de magnesio a concentraciones de 8.325 mM.

pH	Mg <sup>++</sup>	NaCl.
9.05	57%	-17%
9.80	-21%	—
10.45	18%	14.5%

$\%$  =  $\frac{\text{EHa MgCl}_2 \text{ ó NaCl} - \text{EHa sin adición.}}{\text{EHa sin adición.}}$

EHa - energía de activación.

TABLA II

$pK_m$  en función de pH

Con beta-glicerofosfato.

pH	$k_m$	$pK_m$
8.68	$4 \times 10^{-4} \text{ M}$	3.390
9.28	$6 \times 10^{-4} \text{ M}$	3.220
9.63	$8 \times 10^{-4} \text{ M}$	3.085
10.28	$.82 \times 10^{-4} \text{ M}$	3.076

---

Con para-nitrofenil fosfato.

pH	$K_m$	$pK_m$
8.83	$2.47 \times 10^{-5} \text{ M}$	4.607
9.68	$6.77 \times 10^{-5} \text{ M}$	4.170
9.83	$8.72 \times 10^{-5} \text{ M}$	4.060
10.05	$34.60 \times 10^{-5} \text{ M}$	3.460
10.15	$157 \times 10^{-5} \text{ M}$	2.804
10.65	$915 \times 10^{-5} \text{ M}$	2.038

---

## DISCUSION.

Estudios por diferentes procedimientos han demostrado la presencia en suero de al menos dos fosfatasa alcalinas de origen tisular diferente. Vale mencionar entre esas investigaciones las realizadas por Schlamowitz y colaboradores (36), quienes de muestran cromatográfica e inmunquímicamente dos fosfatasa una que es susceptible de relacionarse con el sistema esquelético; la otra con el hígado, riñón, bazo e intestino; hallazgos simila res han sido reportados por Moss y colaboradores en Inglaterra (37) con electroforesis en gel de almidón y pequeñas cantidades de suero, ellos han sido capaces de distinguir las diferentes fosfatasa alcalinas por sus km en relación a Beta-naftil fosfato.

Resultados similares han sido obtenidos por nosotros en este laboratorio usando cr matografía con dietil-amino-etil-celulosa y gradiente de pH de 9.5 a 4.5 y fuerza iónica de 0.03 a 0.3 M, sin embargo creemos que el método cinético reportado en este trabajo, nos proporciona un método sencillo para diferenciar las distintas proteínas con actividad de fosfatasa alcalina; en efecto, el diferente comportamiento de la curva de pH ante pad cimientos con participación del sistema esquelético por un lado y de la célula hepática por el otro, nos indica claramente que este puede ser el caso.

Las energías de activación permanecen constantes en el rango de pH, nos indican que el proceso de activación en la reacción es muy similar para las diferentes proteínas. Las  $K_m$  diferentes en su incremento para beta-glicerofosfato y para-nitrofenil fosfato, sustratos que como se comprobó estaban completamente ionizados en toda la zona explorada, nos indican con toda probabilidad la presencia de los centros activos, cada uno de ellos con participación predominante en el proceso de transformación de uno de los sustratos mencionados. Para el beta-glicerofosfato se puede suponer que las diferentes constantes de velocidad para la reacción enzimática se modifican de una manera similar ya que no existe una modificación importante en las velocidades máximas y en las  $K_m$ .

Para el para-nitrofenil fosfato por el contrario debe razonarse en el sentido de disminución de la constante de velocidad ( $k_1$ ) para la formación del complejo enzima-sustrato, lo que explicaría la afinidad disminuida que para el sustrato tiene la enzima a medida que se eleva el pH; las constantes de velocidad para el rompimiento del complejo enzima-sustrato, ( $k_2$  y  $k_3$ ) deben por el contrario incrementarse ya que el incremento de la  $K_m$  corresponde un aumento en la velocidad máxima.

La curva de  $pK_m$  para beta-glicerofosfato nos indica liberación de una carga positiva al romperse el complejo enzima-sustrato en enzima más producto, en la zona de pH comprendida entre 8.68 y 9.61 (Fig. XI); ya que la pendiente de la curva es de  $-1$  aproxi

madamente. La concavidad hacia arriba a pH 9.63 nos señala la existencia de una ionización en el complejo enzima-sustrato ya formado. A pHs superiores a 9.63 la formación del producto tiene lugar sin cambio notó de carga, ya que esta zona la pendiente es cero.

La curva de  $pK_m$  en relación a para-nitrofenil fosfato exhibe varias concavidades hacia abajo (Fig. XI) que se interpretan como ionizaciones que ocurren en el centro activo de la enzima, estos cambios de carga posiblemente tengan lugar sobre grupos no relacionados con el proceso de activación del complejo enzima sustrato ya que el cambio de pendiente es de menos de una unidad.

A pH de 10.15 la concavidad hacia arriba nos indica ionización sobre el complejo enzima-sustrato formado. El cambio de carga cuando el complejo intermedio se rompe es menor que la unidad tanto a pHs por debajo de 9.03 como a pHs por arriba de 10.15.

El proceso catalítico es por consiguiente muy diferente para cada uno de los dos sustratos utilizados; como se dijo, tanto el para-nitrofenil fosfato como el beta-glicerofosfato se ionizan totalmente por debajo de la zona de pH utilizada, por consiguiente, lógicamente, la única explicación posible para dos procesos tan diferentes en sus distintas etapas es el admitir la presencia de dos centros activos que pueden estar presentes en la

misma o en diferentes moléculas proteínicas.

Como ya ha sido demostrado por nosotros y algunos otros investigadores en el mismo campo de que existen al menos dos proteínas con actividad catalítica similar, tendremos que pensar en función de los datos anteriores, de que los datos cinéticos obtenidos pueden ser suficientes para demostrar en circunstancias favorables la existencia de dos proteínas con funciones similares y con respuesta específica ante la enfermedad.

RESUMEN Y CONCLUSIONES.

1.- Se analizan los datos bibliográficos referentes a proteínas con actividad enzimática similar (isoenzimas) y se discute la importancia de la distinción de esas enzimas desde el punto de vista diagnóstico diferencial.

2.- Se presentan los resultados cinéticos obtenidos en diferentes padecimientos relacionados con encefalopatía biliar y sistema esquelético.

3.- Se discuten los resultados en función de la existencia de dos proteínas con actividad de fosfatasa alcalina.

4.- Se concluye la existencia de dos fosfatasas alcalinas una originada en hueso y la otra en célula hepática con respuesta específica a padecimientos en estos dos territorios orgánicos.



BIBLIOGRAFIA.

- 1.- White L.F.  
Ann. N.Y. Acad. Sci. 75: 3, 1958
- 2.- Gutman A.B. Tyson T.L. and Gutman E.B.  
Arch. Int. Med. 57: 379, 1935
- 3.- Albright F. And J.C. Bauer.  
J.A.M.N. 102: 1276 (1934)
- 4.- W.H. Hauss and H.J. Leppelmann.  
Ann. N.Y. Acad. Sci. 75: 250, 1958.
- 5.- Dixon M. and seebb K.  
E.C.E. enzymes N.Y. Academy Press 1958
- 6.- Ciba Foundation Symposium Wolstenholme G.W.  
and 6 Connor, C.M. Boston 1959 Little Brown and Co.
- 7.- Ralph E. Thiers and Bert L. V<sub>n</sub>illee.  
Ann N.Y. Acad. Sci. 75: 214, 1958
- 8.- E.H. Drechsler, P.D., Boyer and A.G. Kowalsky  
J. Biol. Chem. 234: 2627, 1959.
- 9.- William S. Beck.  
Ann N.Y. Acad. Sci. 75: 4, 1958
- 10.- Richard Wagner and Rose Sparaco  
Ann N.Y. Acad. Sci. 75: 16, 1958
- 11.- Julius Schultz.  
Ann N.Y. Acad. Sci. 75: 32, 1958.

- 12.- Marjorie B. Zucker and Jennie Barrelli  
Ann N.Y. Acad. Sci. 75: 203, 1958
- 13.- Wagner R.M. Meyerriecks and H. Sparaco.  
Arch. Biochem. Biophys 61: 278, 1956.
- 14.- L.C. Smilthand sold Neherayan  
Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 98: 40, 1958
- 15.- Abrham S.P. Cady and I.L. Chackoff  
J. Biol. Chem. 224: 955, 1957
- 16.- Ballou, C.E., H.G.L. Fischer and D.L. MacDonald  
J. Am. Chem. Soc 77: 5957, 1955
- 17.- Rubinstein D.P. Ottolenghi and G.F. Bernadet  
Can J. Biochem. and Physiol. 34: 22, 1956
- 18.- Childs B. and W. Sinkhan.  
Bull. Johns Hopkins Hosp. 102: 21, 1958
- 19.- Beloff-Chain, A. B. Chain, D. Bovet, F. Pochiard.  
Biochem. Biophys Acta. 14: 259, 1954.
- 20.- Zierler, K.L.  
Am. J. Physiol 185: 1, 1956a.
- 21.- Aronson S.W., and B.W. Vlk.  
Proc. Soc. Exptl Biol. Med. 94: 360, 1957
- 22.- Hodansky G.  
J. Biol. Chem. 202: 829, 1958
- 23.- Albaum H.G., and L.J., Milch.  
Am. J. Physiol. 190: 333, 1957

- 24.- Luzzato A. And G. Casirola  
Riv. Patol. nervosa mentale 75: 357, 1954
- 25.- Schapira G., J.C. Dreyfus, F. Chapira and J. Kruh.  
Am. J. Phys. Med. 34: 313, 1955
- 26.- White, A.A. and A.C. Hess.  
Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 94: 561, 1957
- 27.- Peter G.S. Flagemann, Kenneth F. Gregory and Felix Wroblewsky  
J. Biol. Chem. 235: 2288, 1960
- 28.- Benno Hess  
Ann. N.Y. Acad. Sci. 75: 292, 1958
- 29.- Borroughs R. Hill.  
Ann. N.Y. Acad. Sci. 75: 354, 1958
- 30.- Elliot S. Vesell and G. Bearn.  
Ann. N.Y. Acad. Sci. 75: 286, 1958
- 31.- Marks, S.P. Szeinberg B. and Banks Jur.  
J. Biol. Chem. 236: 10, 1961
- 32.- Klendshoj, N.C. and Koepf, G.F.  
J. Clin. Endocrinol. 3: 351, 1943
- 33.- Goodari, H.Q.  
Cancer 31: 197, 1946
- 34.- Benney G. Lowry, G.H. and Brock M.J.  
J. Biol. Chem. 164: 321, 1946.
- 35.- Podansky A.  
J. Biol. Chem. 161: 93, 1953

36.- Max Schlamowitz and Oscar Modansky

J. Biol. Chem. 234, 1432, 1959

37.- D.W. Moss and E.J. King

Proceeding of the Biochem. Soc. Dec. 16, 1961