

B
014
Química

UNIVERSIDAD
NACIONAL
AUTONOMA
DE MEXICO

ESCUELA NACIONAL DE CIENCIAS QUIMICAS

**DETERMINACION DE
FOSFATASA ALCALINA EN
LEUCOCITOS HUMANOS**

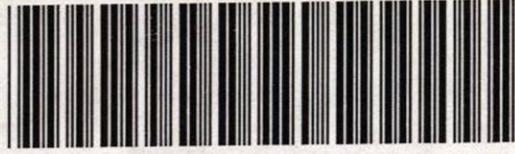
TESIS

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
PRESENTA

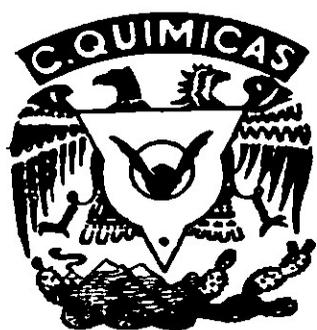
09
I. DEL CARMEN SANTAMARIA ONTAVILLA

MEXICO, D. F. ● MCMLXIV

T
QP609
.A4
S3
C.1



1080075088



UNIVERSIDAD
NACIONAL
AUTONOMA
DE MEXICO

ESCUELA NACIONAL DE CIENCIAS QUIMICAS

DETERMINACION DE FOSFATASA ALCALINA EN LEUCOCITOS HUMANOS



TESIS

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
PRESENTA

M. DEL CARMEN SANTAMARIA ONTAVILLA

MEXICO, D. F. • MCMLXIV

T
G P609
A 4
S M

A mis Padres

A mis Maestros

*Con mi reconocimiento y gratitud
a la Comisión Nacional de Energía
Nuclear, por la ayuda prestada.*

*A*l Doctor Romeo González C., Director Médico del Programa de Protección Radiológica de la C.N.E.N., agradezco el tiempo y la dedicación invertidos en el logro de este trabajo.

*C*on mi agradecimiento a las siguientes personas:

Jorge Halvas

Alvar Loria

Leonor Martínez

Mario Gutiérrez

I N D I C E

- I. INTRODUCCIÓN**
- II. GENERALIDADES**
- III. TÉCNICAS PARA EL ESTUDIO
DE FOSFATASA ALCALINA**
- IV. MATERIAL Y MÉTODO**
- V. RESULTADOS**
- VI. RESUMEN Y COMENTARIOS**
- VII. BIBLIOGRAFÍA**

INTRODUCCION

Desde hace algún tiempo, algunos autores han hecho observaciones en relación con algunas alteraciones bioquímicas, producidas por la exposición directa a las radiaciones ionizantes. (17). Por otro lado, se ha demostrado que la actividad enzimática de la Fosfatasa Alcalina de los leucocitos de personas que padecen leucemia granulocítica crónica, está disminuida (5, 7, 10, 11, 13); este hallazgo ha sido señalado inclusive como una situación que precede a las manifestaciones clínicas de tal enfermedad (17).

Puesto que la sobre exposición a la radiación ionizante expone al ser humano a sufrir de leucemia o de otras neoplasias (15), nos pareció interesante hacer un estudio para ver las posibles variaciones de la actividad de esta enzima en pacientes con neoplasias que recibían tratamiento radioterápico a dosis elevada en un segmento más o menos amplio de su cuerpo. De éstos, los más indicados fueron los pacientes con carcinoma cérvico-uterino ya que reunían las mejores condiciones para la investigación. Al mismo tiempo creímos conveniente establecer nuestras propias cifras normales en personas escogidas dentro del personal de nuestro laboratorio, ya que la técnica empleada por nosotros, tuvo pequeñas variaciones de las empleadas por otros autores (9, 16, 21) y para estar seguros de nuestros valores, empleamos otro grupo de pacientes con leucemia granulocítica crónica, pudiendo comprobarse así la eficacia de nuestra técnica.

Los primeros resultados en las enfermas con carcinoma cérvico-uterino tratadas con radiación, fueron normales, observando que a mitad del tratamiento presentaron una discreta disminución de la actividad de esta enzima, pero sin caer fuera de los límites establecidos. Esto nos hizo estudiar un nuevo lote de enfermos con diferentes neoplasias, tratando de encontrar alguna variación que nos orientara como dato diagnóstico y estudiar al mismo tiempo sus variaciones por la radiación y los posibles cambios por la administración de drogas radiomiméticas.

GENERALIDADES

Siendo fácil la separación de los elementos figurados de la sangre y debido al avance de las técnicas para el estudio de la bioquímica celular, es que en los últimos años se conocen más a fondo las funciones de estas células.

Estos conocimientos han dado una mayor solidez a los criterios con los que antiguamente se juzgaba de su función.

Atendiendo a sus diferentes aspectos morfológicos y por su distinta afinidad tintorial, los leucocitos se clasifican en: Monocitos, Linfocitos y Granulocitos (Eosinófilos, Basófilos y Neutrófilos).

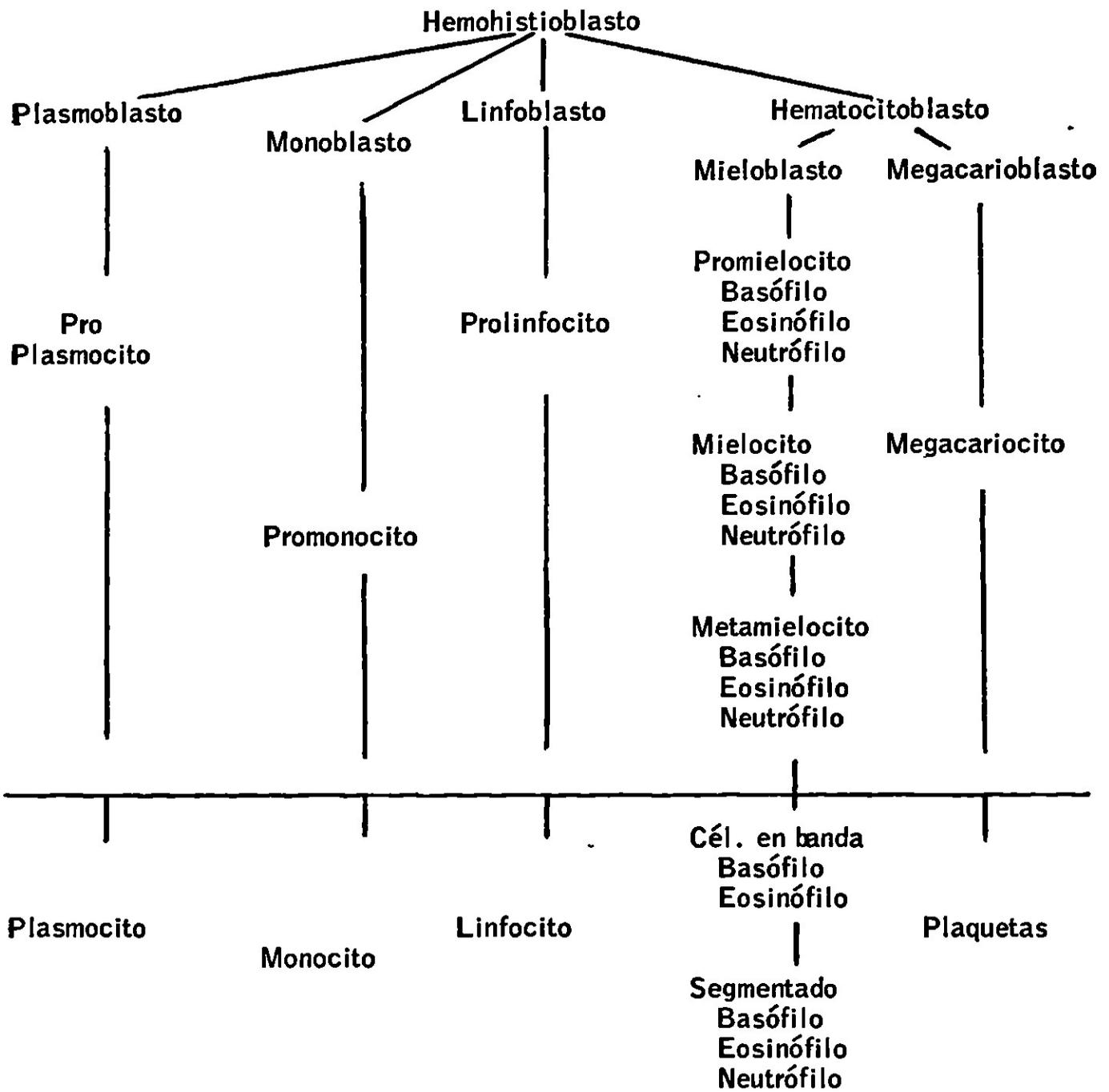
Evidentemente el origen de estas células, ha sido muy discutido en todas las épocas y se puede considerar que hasta el momento actual, no existe un acuerdo unánime sobre este particular. Sin embargo, se acepta actualmente que el hemohistioblasto sea la célula más primitiva y totipotencial, siendo capaz de dar origen a los elementos que se forman en la médula ósea: Tejido granulocítico, megacariocítico y eritrocitos.

El tejido granulocítico tiene como primer elemento distinguible de esta serie al mieloblasto, que por factores de maduración —fundamentalmente nucleoproteínas y sus precursores— origina al promielocito, después al mielocito, luego al metamielocito, para finalmente formar las células maduras con su núcleo en banda o segmentado. Atendiendo a su avidez tintorial desde la etapa de promielocito, se pueden distinguir al neutrófilo, al basófilo y al eosinófilo (Fig. 1).

Los linfocitos tienen su origen principalmente en el tejido linfático y aún cuando se acepta que de tal tejido encontramos pequeñas porciones en la médula ósea, es obvio que no es éste el principal productor de dichas células. Una situación semejante ocurre con los monocitos, los que genéricamente se han considerado como los representantes en la sangre periférica, de tejido retículo histiocitario.

Los estudios bioquímicos a los que hemos hecho referencia, han demostrado que los leucocitos son células vivas que no solo contienen una

Sangre (Histiocito móvil)



(Fig. 1)

gran variedad de enzimas, sino que éstas se encuentran en una alta concentración, lo que es esencial para su integridad, metabolismo y función. Poseen todas las enzimas para el ciclo glucolítico así como otras muchas con función específica: amilasa, aminoferasa, adenosintrifosfatasa, catalasa, glioxilasa, nucleotidasa, transaminasa y otras.

Por la degradación de productos químicos de elevado potencial energético a compuestos de bajo potencial, la célula colecta energía que almacena y utiliza para aquellas funciones cuya totalidad llamamos "vida".

La reacción a este nivel está considerablemente limitada por la necesidad de conservar las constantes fisiológica de los tejidos; el pH debe ser cercano a la neutralidad, la temperatura no puede exceder de 37°-38°C. y la célula no puede utilizar reactivos corrosivos o tóxicos. In vitro la oxidación de un ácido graso a bióxido de carbono y agua, requiere de extremas variaciones de pH del medio, altas temperaturas y de sustancias químicas corrosivas. En los tejidos ésta reacción se lleva a cabo rápidamente y dentro de las limitaciones del pH y bondad de los reactivos, que antes señalamos. Esto es posible gracias a la presencia de las enzimas que son catalizadores orgánicos de naturaleza proteínica, obviamente producidas por organismos vivos. Por lo tanto los podemos conceputar como proteínas con propiedades catalíticas y esto es debido a su poder de activación específica.

Para que las enzimas actúen requieren estar dentro de un sistema enzimático, el cual consta de:

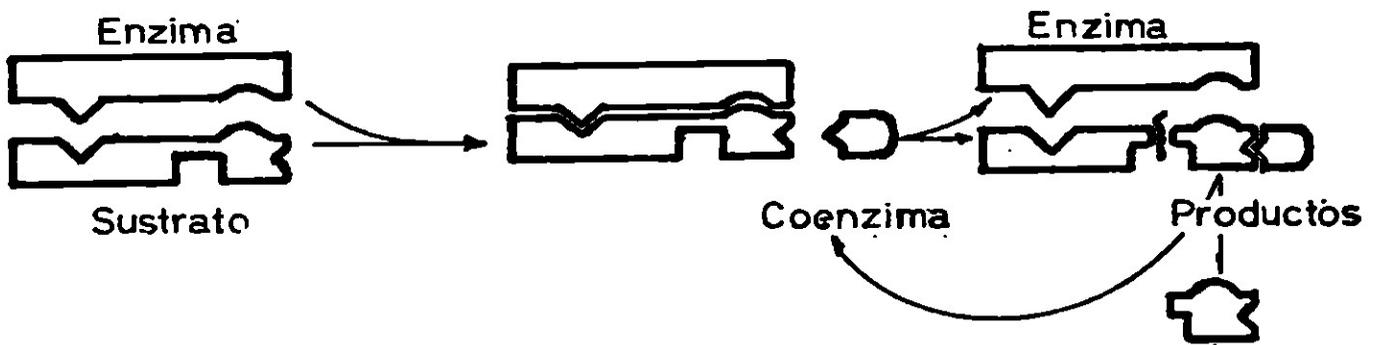
<i>Holoenzima</i>	{	<i>Apoenzima</i>	{	Fracción protéica propiamente dicha, con peso molecular elevado, termolábil y no dializable.
	{	<i>Coenzima</i>	{	Fracción no protéica, con peso molecular bajo, termoestable y dializable. Se requiere para recibir parte de los productos de la reacción o para separarlos del sistema. Cuando está unida en forma laxa a la apoenzima recibe el nombre de coenzima, pero cuando esta unión es firme, se le llama a esta fracción "grupo prostético".
<i>Sustrato</i>	{	Es el compuesto químico en transformación, el cual va a ser catalizado por la enzima, a la que se adapta física y químicamente para que se lleve al cabo la reacción.		

D I A G R A M A

Actividad de una enzima

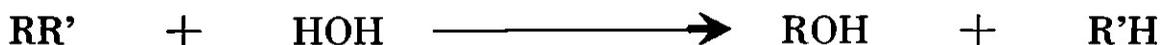


Actividad de la coenzima en el sistema enzimático



Para que el proceso se lleve a cabo, es preciso que el sustrato quede activado mediante otras sustancias que pueden ser partículas iónicas y/o moléculas termoestables. Cuando se requieren iones específicos, el mecanismo de la activación no se conoce, esto sucede por ejemplo con iones como Mg^{++} y Cl^{-} , etc. Los granulocitos adultos, además de innumerables sistemas enzimáticos —algunos mencionados— contienen elevada concentración de Fosfatasa.

La fosfatasa alcalina es la enzima que cataliza la reacción en la que como sustrato, los ésteres fosfóricos liberan fósforo. Esta enzima esta dentro del grupo de las Hidrolasas, las cuales catalizan de una manera general en la siguiente forma:



La reacción anterior ocurre siempre y cuando tengan un medio apropiado de pH y temperatura, siendo posible una reversibilidad en la reacción, desde el punto de vista termodinámico.

La presencia de Fosfatasa Alcalina en leucocitos, fue sugerida por Kay desde 1929, pero hasta 1931, Roche, mediante sus investigaciones en animales de laboratorio, la demostró. Umeno, más tarde la cuantificó en conejos, pero en sus anotaciones no daba a conocer condiciones tan importantes como el pH y la temperatura; además no especificó las diferentes células que había en suspensión.

Iwatsuru fue uno de los primeros que encontró disminución marcada de esta enzima en los leucocitos de la leucemia granulocítica crónica, afirmando que los neutrófilos y eosinófilos contenían mayores cantidades de ella. Gomori y Fell-Danielli comprobaron que la actividad de la Fosfatasa Alcalina se observaba en los leucocitos, mientras que, en otras experiencias, Greenstein y Woodard la localizaban en médula ósea. Por técnicas citoquímicas, Watchtein en 1946, la encontró en el interior de los leucocitos, basando sus estudios en comparaciones de células normales y patológicas en forma cuantitativa. En el núcleo de los granulocitos adultos, es donde se ha podido encontrar la mayor actividad de la enzima, disminuyendo a medida que la célula es más joven. En el citoplasma de los linfocitos también se ha reportado su presencia. (21).

Valentine en 1956, inició estudios profundos sobre esta enzima, encontrando una gran influencia en relación con el sistema adrenal-pituitario. Además la estudió en todo elemento figurado de la sangre y en médula ósea, encontrando que intracelularmente, en los neutrófilos, eosinófilos, linfocitos, monocitos, megacariocitos y plasmocitos, existe en una cantidad mil veces mayor que en el suero. Estas observaciones ya habían sido dadas a conocer por Witslocki (1946) y Cram (1949).

La Fosfatasa Alcalina se considera como una globulina a la que se le cataloga dentro del tipo de las enzimas hidrolíticas. Desde 1957 se consideró como alguna forma de transfosforilación más bien que una hidrólisis, por lo tanto la medida de acción hidrolítica a un pH dado, sobre un sistema artificial (no fisiológico), es ciertamente extraña de la forma de operar en el cuerpo del sistema fosfatasa. Sin embargo, estudios bioquímicos de la actividad de esta enzima en el leucocito, revelan alteraciones metabólicas que ocasionan ciertas enfermedades, las cuales pueden ser detectadas antes de que las manifestaciones lleguen a ser evidentes. Moloney (1954).

La acción enzimática es inhibida por los iones de Hg^+ , Ag^+ , Au^+ , CN^- , CH_3COO^- , o ácidos como el pícrico y compuestos fosfotúngsticos; el ion F^- y $HPO_4^{=}$, son fuertes inhibidores. Se activa su acción con

iones como Mg^{++} y Mn^{++} . Los sustratos usados son ésteres fosfóricos que dan al medio pH alcalino.

Sabiendo que es una proteína, su acción preliminar es la formación de compuestos de adsorción con sus sustratos. Su actividad es influenciada por factores, los cuales afectan la adsorción, incluyendo cambios en la concentración de los sustratos, la temperatura y el pH, por lo que debe considerarse este punto con detalle ya que al estar alterados, todo el sistema varía.

En resumen, lo interesante en el estudio de esta enzima, desde el punto de vista bioquímico y médico, es el aumento o la disminución de su actividad, de acuerdo con la madurez de la célula y su patología.

Entre los padecimientos que muestran aumento de la actividad de la Fosfatasa Alcalina, están:

La enfermedad de Hodgkin, tuberculosis, policitemia vera, carcinomatosis, mieloesclerosis y anemias hemolíticas, siempre y cuando presentes reacción leucemoide (hiperleucocitosis neutrocítica). Cuando este fenómeno no se presenta, las cifras se encuentran dentro de los límites normales.

La actividad disminuída se ha encontrado principalmente en la leucemia granulocítica crónica, como característica de esta enfermedad, aunque también se ha encontrado en niveles bajos en la leucemia aguda.

TECNICAS PARA EL ESTUDIO DE FOSFATASA ALCALINA

Existen fundamentalmente dos clases de técnicas:

- 1.—Cualitativas tinción
- 2.—Cuantitativas colorimétricas

La primera se basa en los diferentes grados de tinción de la célula, siendo mayor la avidez por el colorante cuando la actividad de la Fosfatasa Alcalina se encuentra aumentada. En general, los pasos a seguir son los siguientes:

- 1.—Preparación del extendido sanguíneo.
- 2.—Fijación.
- 3.—Extracción de la enzima.
- 4.—Adición del colorante.
- 5.—Montaje de la preparación.
- 6.—Observación al microscopio.

La coloración obtenida puede variar desde gránulos que no la poseen (en ausencia de la enzima) hasta el positivo intenso donde el punteado es profuso y de color negro; pasando por coloraciones intermedias tales como el café claro (positivo moderado) y el café (positivo).

A continuación se enumeran algunas de las técnicas cualitativas más empleadas:

Técnica de Gomori

El fundamento de esta técnica es la coloración de contraste, haciendo actuar diferentes soluciones por determinado tiempo, sobre el extendido de sangre hasta lograr la tinción deseada.

Desarrollo:

- 1.—Hacer un extendido sanguíneo.
- 2.—Fijación de éste en alcohol metílico.
- 3.—Incubar con solución de betaglicerofosfato de sodio durante una hora.
- 4.—Lavar con solución de cloruro de calcio al 2%.
- 5.—Secar.
- 6.—Sumergir las preparaciones en nitrato de cobalto al 1% durante 5'.
Lavar y secar.
- 7.—Sumergir en solución de sulfato de amonio durante 5'. Lavar y secar.
- 8.—Teñir con colorante de Wright.

Los resultados se expresan según la coloración que hayan adquirido los neutrófilos, ya que la actividad se muestra en las formas en banda y en neutrófilos adultos, teñidos en diferentes tonos; desde el café claro hasta el negro.

Técnica de Kaplow

En esta técnica también se usa la coloración de contraste. Es un método simple y rápido.

Desarrollo:

- 1.—Hacer frotis sanguíneo y fijar con metanol.
- 2.—Agregar durante cinco minutos una solución reguladora preparada con propanodiol, con pH de 9.5 a 9.8
- 3.—Contrastar con hematoxilina de Mayer.
- 4.—Montar en glicerina.
- 5.—Observar al microscopio.
La coloración obtenida es desde nula hasta café oscuro, casi negro.

Técnica Histoquímica

Se basa en tinciones con las cuales podemos estudiar características morfológicas y alteraciones bioquímicas de los leucocitos.

Desarrollo:

- 1.—Hacer extendido sanguíneo.
- 2.—Fijar con formalina.

- 3.—Poner propanodiol al 0.50 M con pH de 9.7
- 4.—Teñir con azul RR (solución diazo de 4 benzoil-2: 5 metoxi anilina).

Demuestran actividad únicamente en formas en banda y neutrófilos adultos, ya que son estos los que adquieren la coloración característica (diferentes tonos de café).

Técnica del Colorante Azoico

Como el anterior, se lleva a cabo mediante coloraciones que revelan también datos morfológicos y alteraciones dentro de los leucocitos.

Desarrollo

- 1.—Fijar con formaldehído-alcohol metílico.
- 2.—Lavar con agua de la llave.
- 3.—Mezclar con el sustrato una solución reguladora con pH de 9.7
- 4.—Dejar reposar de 5' a 10' a temperatura ambiente.
- 5.—Lavar con agua de la llave.
- 6.—Teñir con verde de metilo a la concentración deseada durante 10' ó 15'.
- 7.—Lavar con agua de la llave.
- 8.—Secar y montar en glicerina.
- 9.—Observar al microscopio.

La fosfatasa alcalina presente, se muestra en forma de gránulos de color pardo-negruzco dentro del citoplasma de los neutrófilos.

Comentario

Ultimamente se han empleado bastante estas técnicas, para detectar esta enzima en la sangre extendida sobre un portaobjetos. Su actividad se manifiesta como ya se ha especificado anteriormente, en la forma de banda y de segmentado; está ausente en formas inmaduras, linfocitos y monocitos.

Los inconvenientes que se han señalado a estos métodos, son las irregularidades de la tinción, ya que se puede obtener un teñido falso del núcleo y otras estructuras, particularmente cuando se les dan tiempos de incubación mayores que los indicados; además puede influir la apreciación del observador ya que ésta conduce muchas veces al error, por lo que es conveniente al adiestramiento de personal especializado.

Al obtenerse diferentes grados de tinción, dio lugar a que algunos investigadores hicieran escalas de valores. La escala de Brodell y Swisher, ha dado a conocer una graduación microscópica de 0 a 4 en 100 leucocitos. Estos se obtienen de un concentrado por centrifugación y la lectura se hace en microscopio de fase. La escala fue la siguiente:

- 0 Los que no se tiñen.
- 1 Los que dan ligera coloración café.
- 2 Los que dan coloración café negruzca.
- 3 Los que tienen granulación café negruzca distribuida a través de todo el citoplasma.
- 4 Los que tienen granulación negra.

Los equivalentes de coloración a actividad de Fosfatasa Alcalina, son los siguientes:

Color	0	equivale de	0 a 10 unidades
„	1	„ „	10 „ 20 „
„	2	„ „	20 „ 30 „
„	3	„ „	30 „ 50 „
„	4	„ „	50 unidades en adelante.

El control hecho por diferentes autores en humanos aparentemente normales, dio un promedio de 30 unidades.

Técnicas Cuantitativas

Dentro de estos métodos, tenemos el de Valentine y Beck, que es el más usado.

Este método se basa en una hidrólisis producida por la acción de la enzima sobre los fosfatos orgánicos. Después, por métodos colorimétricos se puede determinar la cantidad de ellas que estaban presentes en el medio.

Desarrollo:

1.—A 0.3 ml de E.D.T.A. (anticoagulante) se le añaden 0.5 ml. de una solución de dextrosa al 2% introduciéndose en una jeringa de 10 ml. Se completa con sangre hasta el volumen total.

2.—Se invierte la jeringa cinco veces y a continuación se lleva a un tubo de ensaye.

3.—Dejar reposar 30' y separar el plasma con leucocitos y plaquetas.

4.—Se lavan los leucocitos con solución salina y se centrifugan dos veces, contaminándose con las plaquetas, pero evitándose la aglutinación.

De los resultados obtenidos, se observó baja actividad en las leucemias y en caso de metaplasias mieloides e infecciones piógenas, el nivel era alto.

Comentario

La manipulación es sumamente complicada y por lo tanto, difícil de llevarse al cabo. Por lo demás, es muy semejante a lo empleado en nuestra técnica, ya que la cuantificación de fósforo también se hace por el método de Fiske-Subba-Row.

MATERIAL Y METODO

Se estudiaron 126 pacientes con diferentes tipos de enfermedad neoplásica y 10 normales. (TABLA I)

Sus edades quedaron comprendidas entre los 10 y los 69 años. Los treinta casos de carcinoma cérvico-uterino, recibieron terapia con radiación ionizante, oscilando la dosis de 3,000 r. a 10,000 r. dosis aire, practicándose las determinaciones antes y a la mitad del tratamiento. Únicamente en cinco casos se lograron hacer tres determinaciones, antes del tratamiento, a la mitad de él y cuando terminó. Más adelante se especificará en particular, todo lo referente a los resultados en detalle.

A los demás casos (50) se les practicó una sola determinación y en su tratamiento se emplearon drogas radiomiméticas y radioterapia. En éstos, la determinación se realizó en unos, antes del tratamiento y en otros, durante el tratamiento.

Los pacientes así seleccionados, fueron estudiados según el método descrito más adelante.

Material biológico:

Sangre

Con material esterilizado y en condiciones asépticas, se obtienen mediante punción venosa de 15 a 20 ml. de sangre que se adicionan al 13 ml. de una solución de fibrinógeno bovino que actúa como anticoagulante.

Esta mezcla bien homogeneizada, se deja reposar de 30 a 60' hasta que los glóbulos rojos se sedimentan y forman un paquete. En el plasma sobrenadante quedan los leucocitos en suspensión.

Fuente de enzima:

Se separa el plasma y se lleva a un tubo de centrifuga de 50 ml. de capacidad; se centrifuga durante 5' a 2,0000 rpm. y después de este lapso,

T A B L A I

<i>Diagnóstico</i>	<i>Sexo</i>	<i>Nº de Casos</i>
Normales	Fem. 4	10
	Masc. 6	
Leucemia granulocítica crónica.	Fem. 7	20
	Masc. 13	
Leucemia aguda	Fem. 8	11
	Masc. 3	
Leucemia Gr. Cr. (Remisión)	Fem. 2	4
	Masc. 2	
Leucemia aguda. (Remisión)	Fem. 1	2
	Masc. 1	
Mieloma múltiple.	Fem. 2	4
	Masc. 2	
Diversos tipos de cáncer	Fem. 30	50
	Masc. 20	
Cáncer CU (2 determinaciones)	Femenino	30
Cáncer CU (3 determinaciones)	Femenino	5

se obtiene un paquete de glóbulos blancos con algunos eritrocitos. Para reducir el número de estos últimos, se lava el concentrado 2 ó 3 veces con solución salina al 0.9%, desechando en cada ocasión el sobrenadante.

Al final queda el paquete deseado teóricamente puro, que se resuspende en 1 a 2 ml. de solución salina, con lo cual se tiene nuevamente una suspensión pero esta vez concentrada. Se hace una cuenta leucocitaria para saber su concentración por milímetro cúbico. Esta deberá de ser de 40,000 a 80,00 células /mm³. En la práctica se ha observado que se puede también llevar la determinación al cabo con cifras menores.

Este procedimiento se realiza a temperatura ambiente.

Finalmente se agrega la suspensión a una solución reguladora (sustrato) de glicerofosfato de sodio 0.026 M con pH de 9.6, donde se libera el fósforo, lo que permite cuantificar la actividad de la enzima.

Aparatos y Material de Laboratorio:

Probetas de 25 y 50 ml.

1 caja de tubos de ensaye de 12 x 1.50 cm.

Pipetas de 10 ml. graduadas en ml.

Pipetas de 5 ml. graduadas en ml.

Pipetas de 2 ml. graduadas en décimas

Pipetas de 1 ml. graduadas en décimas

Pipetas volumétricas de 5 ml.

Pipetas volumétricas de 4 ml.

Pipetas volumétricas de 3 ml.

Pipetas volumétricas de 2 ml.

Pipetas volumétricas de 1 ml.

Tubos de centrífuga de 9 x 4 cm.

Tubos de centrífuga de 9 x 3 cm.

Tubos de centrífuga de 15 ml. graduados en cm.

Celdillas de fotocolorímetro "C" de 10 x 2 cm.

Cámara cuenta glóbulos, con sus respectivas pipetas.

Centrífuga clínica

Microscopio Carl Zeiss

Fotocolorímetro Colleman Junior

Reactivos:

- 1.—Solución de fibrinógeno bovino (anticoagulante). 200-250 mg. en 13-13.5 ml. de solución salina al 0.9%
- 2.—Sustrato: Solución de Beta glicerofosfato de sodio 0.026 M. Contiene dietil barbiturato de sodio y NaOH, obteniéndose un pH de 9.6

- 3.—Solución de Saponina al 2%
- 4.—Cloruro de magnesio al 0.050 M
- 5.—Acido tricloro acético al 30%
- 6.—Acido tricloro acético al 10%
- 7.—Solución de molibdato de amonio. 12.5 g. de molibdato de amonio + 150 ml. de ácido sulfúrico 10 N + agua destilada c.b.p. 500 ml.
- 8.—Acido alfa amino naftol sulfónico (reductor) al 15%. (71.25 g. de sulfito ácido de sodio; sulfito ácido de sodio; 2.5 g. de sulfito de sodio; 1.25 g. de ácido alfa amino naftol sulfónico. De esta mezcla se toman 15 g. y se llevan a 100 ml.)
- 9.—Solución salina al 0.9%

Técnica

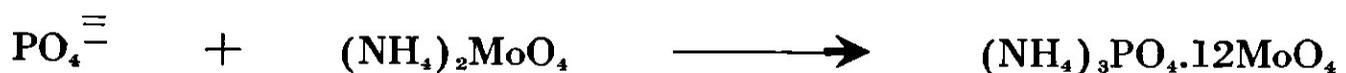
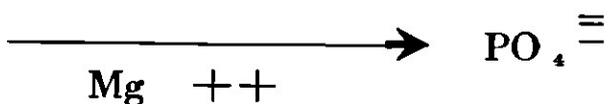
Esta prueba se basa en la acción de la enzima sobre los fosfatos orgánicos en condiciones adecuadas de pH y temperatura, liberando fósforo cuando estos son hidrolizados. El fósforo se cuantifica por el método de Fiske-Subba-Row, en el cual se ha hecho una modificación a los volúmenes requeridos en su técnica, como señalamos más adelante.

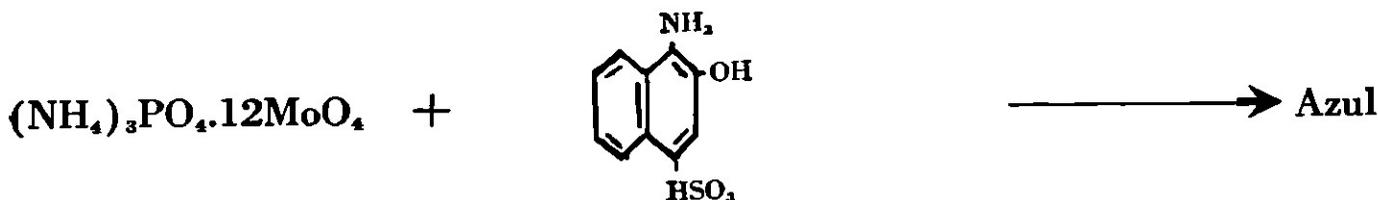
El resultado se encontrará al hacer simultáneamente la cuantificación de fósforo libre, para deducirlo más tarde del valor obtenido de las fosfatasas.

Para determinar fósforo, las proteínas sanguíneas se precipitan con ácido tricloro acético; el filtrado se trata con molibdato de amonio obteniéndose ácido fosfomolibdico, el cual se reduce con la adición de ácido alfa amino naftol sulfónico que da una coloración azul, cuya intensidad será proporcional a la cantidad de fósforo presente.



Leucocitos (fosfatasas) + Sustrato (ésteres fosfóricos) —





Descripción de la técnica empleada

Suspensión de leucocitos:

- 1.—13 ml. de fibrinógeno bovino + 20 ml. de sangre.
- 2.—Reposar de 60' a 90'.
- 3.—Separa el sobrenadante evitando el paso de glóbulos rojos.
- 4.—Centrifugar 5' a 2,000 r.p.m.
- 5.—Separar células del sobrenadante.
- 6.—Lavar con 45 ml. de solución salina. Volver a centrifugar.
- 7.—Resuspender en 1 ó 2 ml. de solución salina.
- 8.—Recuento de glóbulos blancos.

Determinación de Fosfatasa Alcalina:

- 1.—Se preparan cuatro tubos para incubación que contienen una mezcla de

9.0 ml. de solución amortiguadora.

0.5 ml. de solución de saponina.

0.2 ml. de solución de cloruro de magnesio.

	9.7 ml.
Vol. total	

Se numeran y se llevan al baño María durante 10' a 37° C.

- 2.—A los tubos 1 y 2, se les añade 0.3 ml. de suspensión de leucocitos y se incuban 60' a 37°C. Al terminar el período de incubación, se adicionan 2 ml. de ácido tricloro acético al 30% a cada tubo.
- 3.—Mientras los tubos 1 y 2 están en incubación, al tubo 3 se le añaden 2 ml. de ácido tricloro acético al 30% e inmediatamente 0.3 ml. de la suspensión leucocitaria.

- 4.—Al tubo 4 se le adiciona 2 ml. de ácido tricloro acético al 30% + 0.3 ml. de solución salina.
- 5.—Filtrar las mezclas en cuatro tubos a través de papel filtro Whatman N° 42. De preferencia estos tubos serán de centrífuga y graduados.
- 6.—Determinar la concentración de fósforo inorgánico que se encuentra en los filtratos por el método de Fiske-Subba Row.

Determinación de Fósforo:

- 1.—Se toman 11 ml. de cada filtrado y se les añade 4 ml. de ácido tricloro acético al 10%. En caso de que se presente una nueva precipitación o una opalescencia se volverá a filtrar. Usar el papel anteriormente citado.
- 2.—De estos 15 ml. se toman 13.6 ml. y se pasan a las celdillas del fotocolorímetro, donde se hará la lectura.
- 3.—Se adiciona por último 1 ml. de molibdato de amonio y 0.4 ml. de ácido alfa amino naftol sulfónico.
- 4.—Reposar 5'.
- 5.—Leer en fotocolorímetro con filtro 540 milímicras.

Cálculos:

La diferencia del contenido de fósforo del tubo 3 y el valor medio de los tubos 1 y 2, representa el fosfato liberado por la fosfatasa alcalina.

La actividad de esta fosfatasa se expresa en unidades, donde cada unidad representa 1 mg. de fósforo liberado por 10^{10} leucocitos en 60'.

Los valores normales se encuentran entre 15 a 45 U., aceptándose 50 unidades, según algunos autores (21, 23).

Para obtener el resultado final, se empleó la siguiente fórmula:

$$u = \frac{\text{lectura del aparato} \times \text{Factor (40/1.1)}}{\text{N}^\circ \text{ de leucocitos}}$$

Las lecturas se harán en % de transmitancia, siendo la lectura transformada a mg. de $\text{PO}_4 \equiv$ liberado, mediante la curva de calibración trazada previamente y que corresponderá a la unidades, Tabla II al aplicar la fórmula.

Interpretación:

En pacientes con leucemia, tanto agudas como granulocíticas crónicas, la lectura obtenida es casi siempre menor a 10 unidades, debido a la poca actividad enzimática de los leucocitos. Cuando se encuentra neutropenia, los niveles de la Fosfatasa Alcalina serán bajos. En enfermedades mieloproliferativas del tipo de metaplasia mieloide y policitemia, sucede lo contrario, ya que los resultados obtenidos son mayores de 50 unidades. Situación semejante ocurre en reacciones leucemoides y en casos de infecciones piógenas, donde también se verá el resultado aumentado.

DESARROLLO DE LA FORMULA EMPLEADA

La fórmula se tiene a partir de una serie de pasos, donde se han relacionado diferentes datos:

$$u = \frac{c \times 10^{10} \times 12}{1,000 \times \text{N}^\circ \text{ de leucocitos} \times 300 \times 11}$$

Donde...

$c = \mu\text{g}$ de fósforo (lecturas Tabla II)

$10^{10} = \text{N}^\circ$ de leucocitos que en una hora desprenden cierta cantidad la enzima que va a ser cuanteadada.

1,000 = Conversión de μg a mg.

300 = Dilución equivalente de leucocitos en 0.3 ml.

$\frac{12}{11} =$ Corrección del error por el cambio de volúmenes. (12 ml. antes de filtrar las proteínas precipitadas, de los cuales, se toman 11 ml. unicamente.).

Por lo tanto:

$$u = \frac{c \times 100 \times 1.2}{\text{N}^\circ \text{ de leucocitos} \times 3 \times 1.1}$$

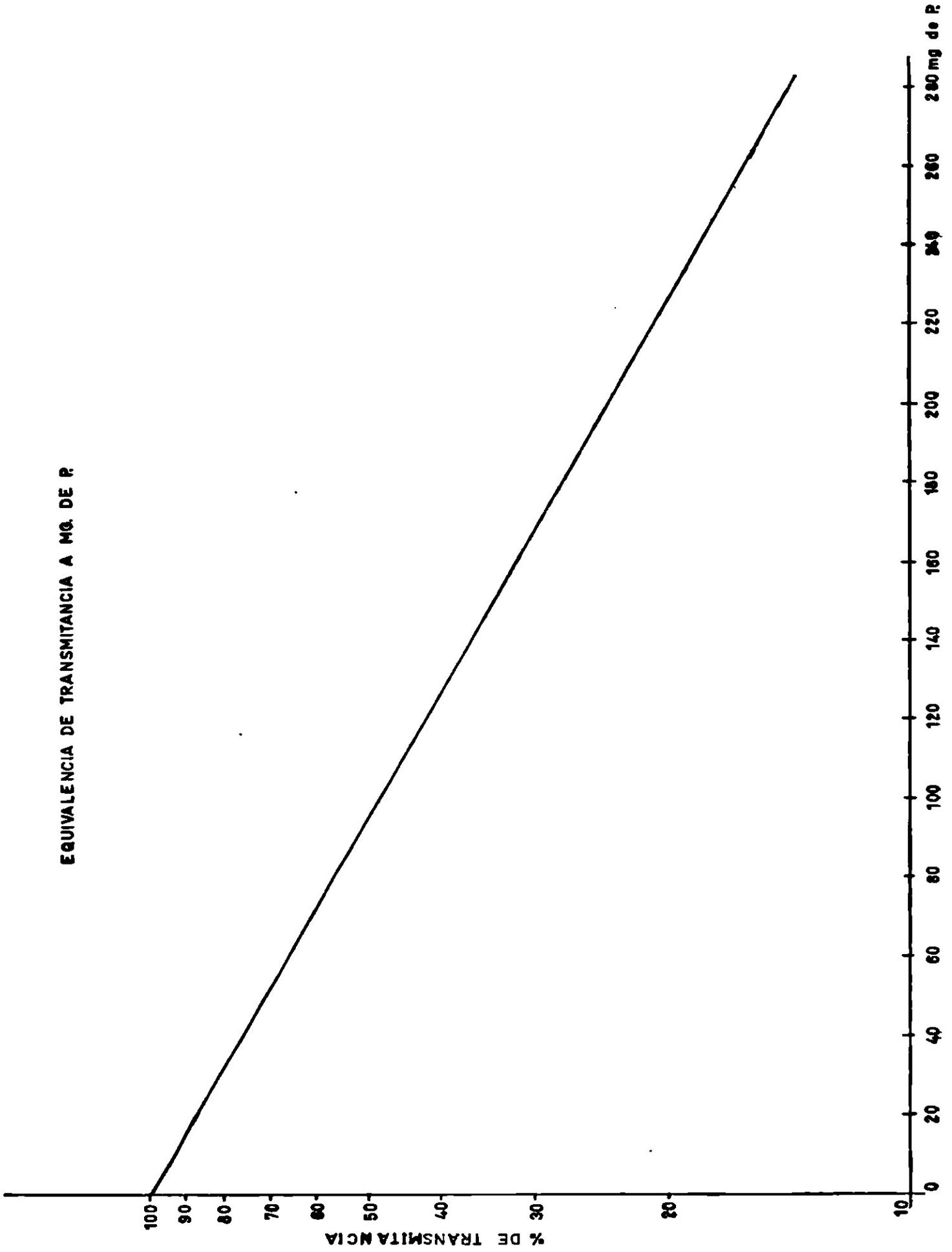
$$u = \frac{c \times 40}{\text{N}^\circ \text{ de leucocitos} \times 1.1}$$

CONSTRUCCION DE LA GRAFICA

Se toman 218.2 mg. de $\text{Na}_2 \text{HPO}_4$ (fosfato de sodio dibásico), los cuales se diluyen en 100 ml. de H_2O destilada. De esta solución se hacen diluciones subsecuentes, cada una de ellas equivalente a los μg de fósforo requeridos.

La cantidad de fósforo de cada dilución se cuantifica por el método colorimétrico empleado en la técnica, y se traza la curva que se señala a continuación.

EQUIVALENCIA DE TRANSMITANCIA A MQ. DE P.



T A B L A I I

	90	80	70	60	50	40	30	20	10
9	1	13	28.5	45.5	65	89	117	163	223
8	2	15	30	47	68	92	121	169	231
7	3	16	31.5	49	70	94	125	173	239
6	4	18	33	51	73	98	129	177	249
5	5	19	35	52.5	75	100	133	183	258
4	6.5	20.5	36.5	54.5	77	102	137	190	268
3	8	22	38	56.5	80	105	141	195	—
2	9	23.5	40	58	82	109	145	200	—
1	10	25	42	60.5	84	111	151	209	—
0	12	26.5	44	62	87	113	156	217	—

RESULTADOS

Variación de la actividad de la Fosfatasa Alcalina con respecto a la Temperatura, Incubación y Activador

Cuando se estableció la técnica, al hacer varias determinaciones en una misma persona, se encontró una variación notable en los resultados, aunque estos no salieran de los límites dados como normales. De esto, surgió la idea de hacer determinaciones a diferentes temperaturas, ya que esa alteración era un signo muy sugerente de que algo cambiaba y vimos que a mayor temperatura, la actividad se incrementaba. Por lo tanto se nos hizo interesante ver lo que pasaría con diferentes períodos de incubación y con variantes en la cantidad del activador agregado, teniendo en cuenta que el pH debe permanecer constante.

Como conclusión de este estudio tenemos:

Referente a la temperatura:

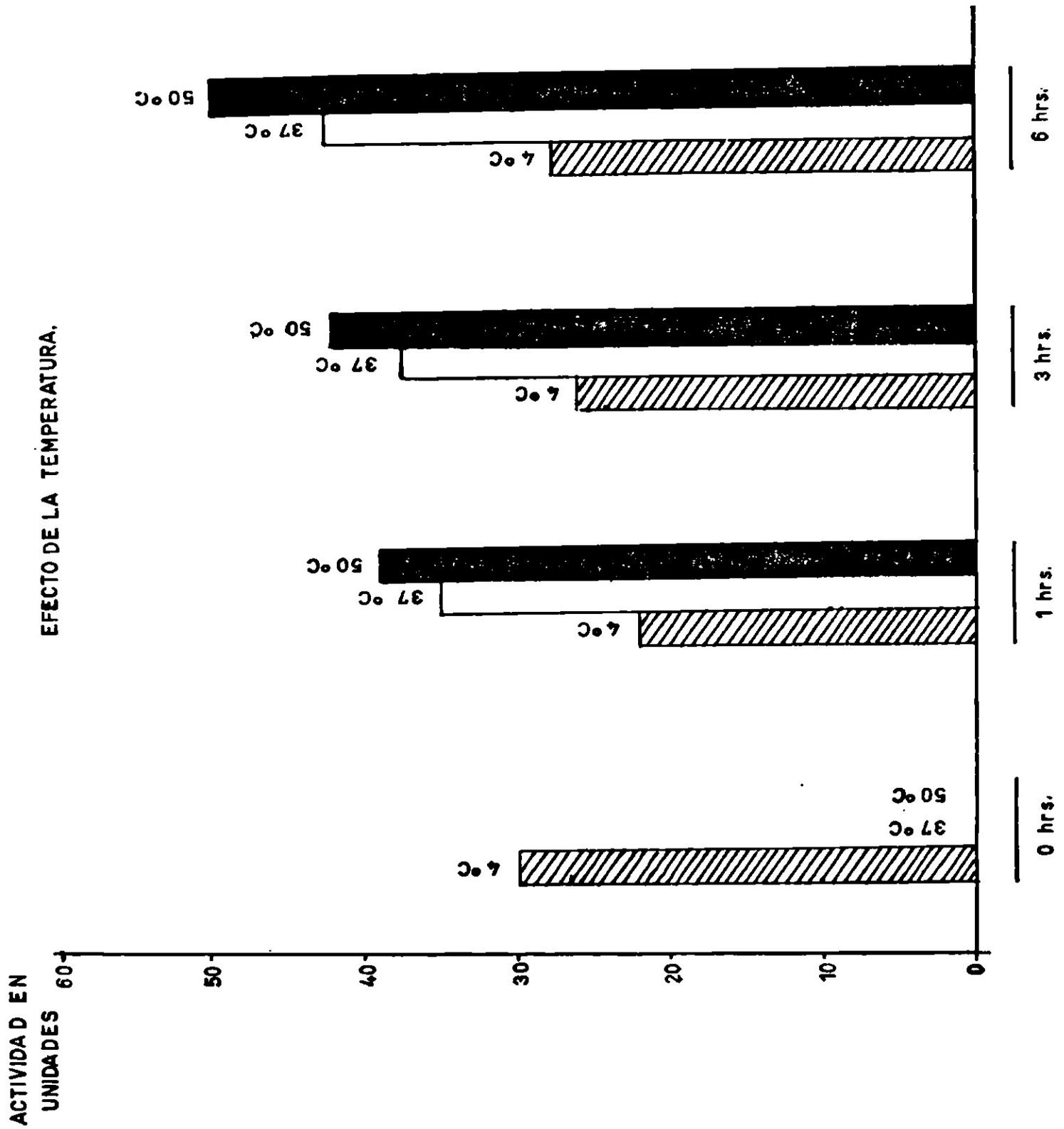
1.—A medida que se aumenta la temperatura, la actividad se incrementa, por lo menos hasta 50°C que es la máxima temperatura empleada en este trabajo. (Fig. 2).

2.—Que la temperatura normal para el funcionamiento de la enzima, se encuentra a 37°C. (Fig. 2).

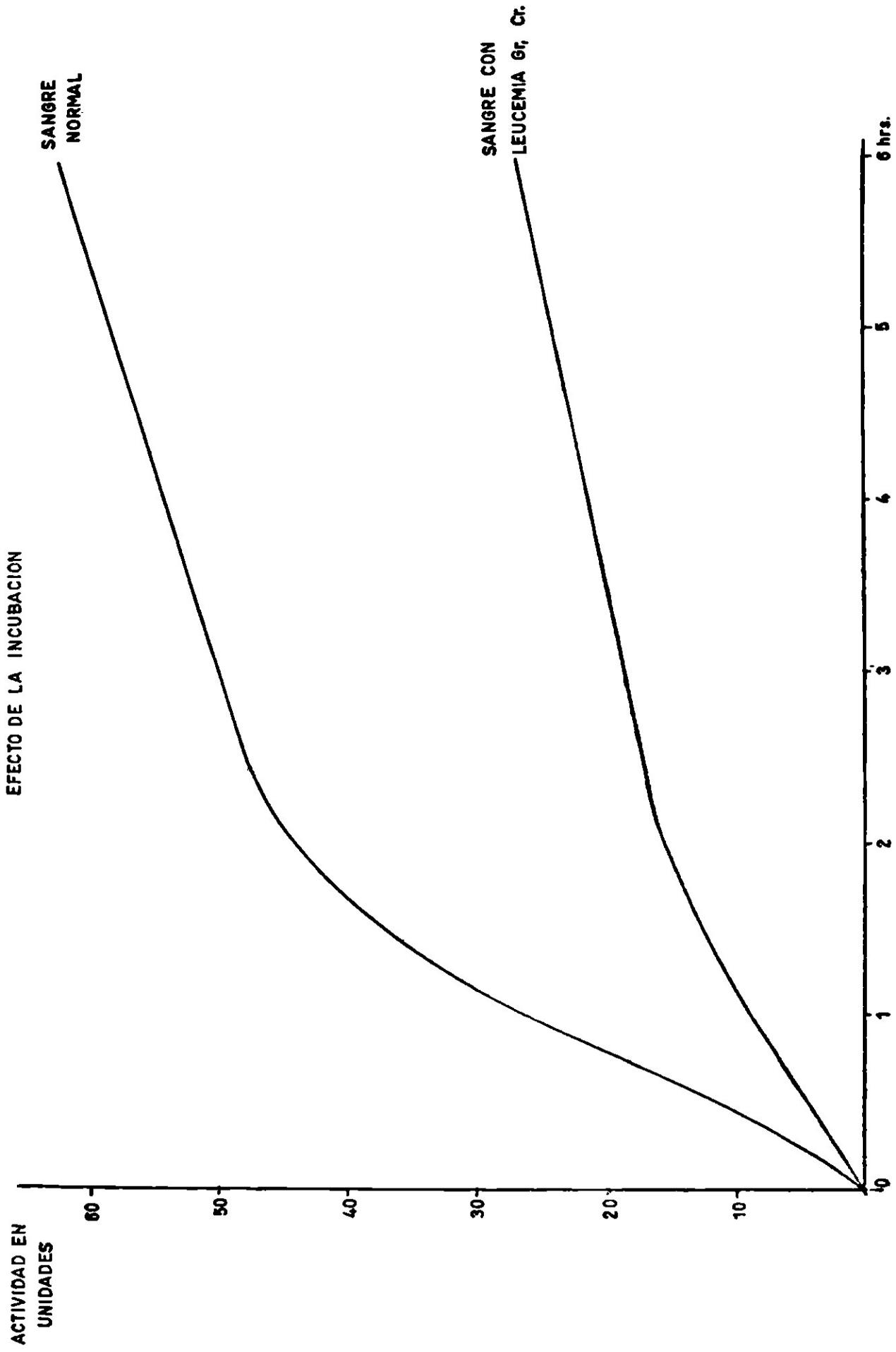
3.—A bajas temperaturas se inhibe la actividad de la enzima, mostrándose más baja de lo que relamente es.

Referente a la incubación:

A medida que se aumenta el tiempo de incubación, la lectura en el fotocolorímetro aumenta, lo que indica un incremento en la actividad, o sea una prolongación. (Fig. 3)



(Fig. 2)



(Fig. 3)

Referente al activador:

Ocurre lo mismo que en el paso anterior, sin embargo aquí el incremento no es tan sorprendente como en los casos previamente citados. (Fig. 4).

Se puede demostrar con las gráficas, que hay un evidente incremento de la actividad de la enzima, pero no se puede enfatizar de una manera categórica que solo sea la enzima lo que actúe, ya que pueden concurrir cambios que no han sido apreciados y tampoco estudiados, como son por ejemplo: las supresiones o aumentos debidos al inhibidor, los cambios que pueda producir el sustrato, etc.

Resultados obtenidos en los pacientes estudiados

De los 136 casos estudiados, los diez catalogados como normales, se encontraron dentro del límite establecido como normal de actividad (de 15 a 45 unidades) dados por otros autores (11, 15, 16, 19, 23), con lo cual comprobamos la eficacia de nuestra técnica.

En los treinta y cinco casos de carcinoma cérvico-uterino, las cifras obtenidas se encontraron dentro y por encima de los límites fijados como normales (17-137 unidades); la elevación de estas cifras, creemos fue debida probablemente a infecciones agregadas al padecimiento en el momento de la determinación, (Tabla III) pues la leucocitosis y neutrofilia así lo indicaban.

Las cinco enfermas a las cuales se les practicaron tres determinaciones (antes, a la mitad y al final del tratamiento con Radium y Rayos X) también presentaron este mismo fenómeno. (Tabla IV).

Analizando los resultados de esta tabla resulta interesante hacer notar que en general no hay una proporcionalidad o relación aparente entre el número de leucocitos y las unidades de Fosfatasa Alcalina leucocitaria, sin embargo de los cincuenta casos incluidos en este grupo se aprecia que en cada paciente al bajar el número total de neutrófilos desciende también la actividad de la enzima, conservando una relación entre ambos valores bastante estrecha.

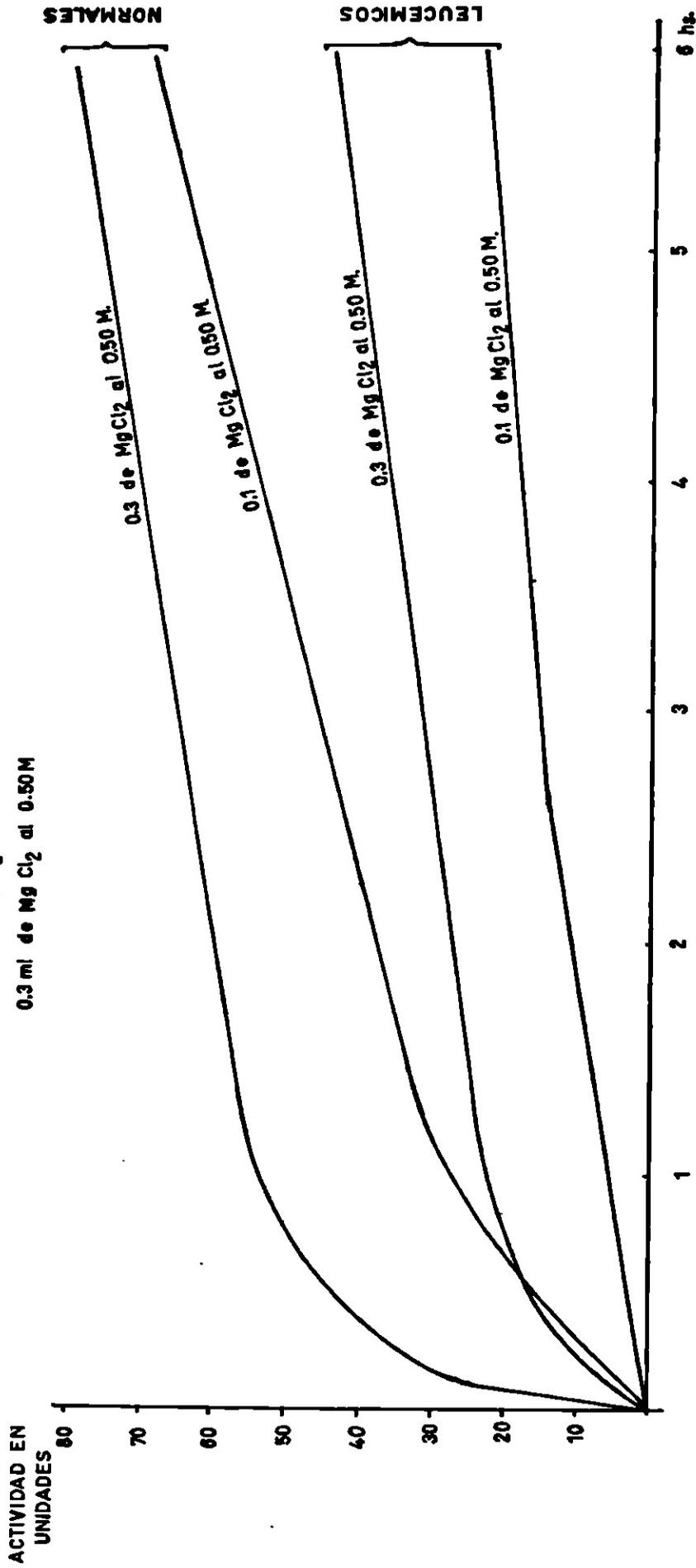
Los diversos tipos de neoplásias, mostraron actividad normal o aumentada, debido probablemente a las mismas causas que anteriormente acabamos de señalar en la carcinoma cérvico-uterino.

Enfermedades hematológicas malignas:

Estas las podemos dividir por medio de esta prueba en tres grupos: Los que dan baja actividad, los de actividad normal y por último, los que

EFEECTO DEL ACTIVADOR

0.1 ml. de Mg Cl₂ al 0.50 M.
0.3 ml. de Mg Cl₂ al 0.50 M



(Fig. 4)

dan actividad aumentada. Dentro del primer grupo, encontramos preferentemente a la leucemia granulocítica crónica en fase activa y algunos casos de leucemias agudas. Es interesante la observación, aunque ya haya sido hecha por otros autores, sobre la tendencia a la normalización de la actividad de esta enzima después del tratamiento (26, 27, 28, 33). (Tabla III).

No podemos asegurar cuales otros padecimientos o trastornos hematólogicos puedan quedar incluidos en el grupo de fosfatasa leucocitaria normal ó en el que la dé aumentada, debido al escaso número de pacientes estudiados, sin embargo es interesante ya que en los cuatro casos de mieloma múltiple, los resultados fueron desde cifras en el límite inferior de la normalidad, hasta valores muy por encima de las 45 unidades señaladas como máximo normal.

La misma observación ya se mencionó respecto a los treinta y cinco casos de cáncer cérvico-uterino y a los 50 casos de diversos tipos de neoplásias.

T A B L A I I I
R E S U L T A D O S

	<i>Nº de casos</i>	<i>Resultados</i>
Normales	10	16.0 a 45 unidades
Leucemia granulocítica crónica	20	2.9 a 10 unidades
Leucemia aguda	11	5.0 a 16 unidades
Leucemia gr. cr. (remisión)	4	14.0 a 25 unidades
Leucemia aguda (remisión)	2	20.0 a 65 unidades
Mieloma múltiple	4	17.0 a 90 unidades
Diversos tipos de neoplasia	50	14.0 a 90 unidades
Cáncer cérvico-uterino (2 determinaciones)	30	17.0 a 137 unidades
Cáncer cérvico-uterino (3 determinaciones)	5	22.0 a 80 unidades

T A B L A I V

DETERMINACIONES REPETIDAS DE LA ACTIVIDAD DE FOSFATASA ALCALINA EN LEUCOCITOS EN CINCO CASOS DE ENFERMOS RADIADOS CON CA. CERVICO UTERINO

No. de Enfermas	No. de Determinaciones (3 en cada caso)	% de Neutrófilos Totales	Actividad de Fosfatasa Alcalina en leucocitos
Caso 1	2- II-63 18-III-63 19- VI-63	73 54 60	34.0 U 26.6 U 30.0 U
Vaso 2	28- II-63 4- IV-63 23- V-63	64 47 55	73.0 U 22.0 U 44.0 U
Caso 3	27- II-63 6- IV63 10- VI63	58 36 47	72.0 U 42.0 U 80.0 U
Caso 4	5-III-63 3- IV-63 10- V-63	69 58 78	22.0 U 31.0 U 36.0 U
Caso 5	- II-63 6-III-63 -IV63	86 76 80	39.9 U 35.5 U 36.4 U

RESUMEN Y COMENTARIOS

Los leucocitos contienen fosfatasa (ácida y alcalina) en cantidad mayor a la existente en el plasma. Se ha estimado que esta concentración es mil veces mayor (21) y ha sido demostrado por otros autores que varía en proporción inversa al glucógeno del neutrofilo.

La determinación de la Fosfatasa Alcalina en leucocitos humanos, es una prueba de realización relativamente fácil una vez que el procedimiento ha quedado bien establecido, y que evidentemente ayuda en el diagnóstico diferencial de los síndromes mieloproliferativos, pues consistentemente la actividad de la enzima, está disminuida en la leucemia granulocítica crónica, mientras que se encuentra normal o aumentada en las reacciones presentadas por hiperleucocitosis neutrocíticas (leucemoides) ocasionadas por alguna infección, según lo han confirmado varios autores.

Esto se ha tratado de explicar porque en estas circunstancias ocurre aumento de la actividad adrenocortical y esto explica el que se encuentren variaciones de la actividad de este sistema enzimático en otras enfermedades diferentes de las hematológicas (infarto del miocardio, trauma, acidosis diabética, etc.) (27).

La observación de que la infección incrementa la actividad de la Fosfatasa Alcalina, sugiere que debe haber diferentes mecanismos de estímulo y de respuesta celular.

Aún cuando la determinación de la actividad enzimática de la Fosfatasa Alcalina en leucocitos, se ha encontrado disminuida en algunos casos de mielofibrosis con metaplasia mieloide, es común el criterio de que habitualmente si es de utilidad en el diagnóstico diferencial con la leucemia granulocítica crónica. La gran variación de los resultados en la metaplasia mieloide (25) sugiere que más que una cantidad definida, se trata de un grupo de enfermedades heterogéneas con una respuesta hematológica semejante.

Puede ser de utilidad para juzgar de la remisión de un proceso leucémico, ya que durante ésta, la actividad enzimática se normaliza; sin embargo, se debe tener presente que puede permanecer baja aún después de lograda la remisión completa del cuadro clínico y hematológico (25).

Por lo que aquí expusimos, consideramos que en las neoplásias en general no sufre modificación y aún cuando el número de pacientes que habían recibido radioterapia es reducido, los resultados nos permiten suponer que no ocurre variación significativa por efecto de la radiación ionizante.

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

1. Fiske C.H., Subba-Row J.: The colorimetric determination of Phosphorous. *J. Biological Chemistry*, 66:375, 1925
2. Gomori G.: Histochemical demonstration of phosphatase in tissue. *Proc. Soc. Experiment Biological and Medicine*, 42:24, 1929
3. Kempner W.; The nature of leukemic blood cells as determine by their metabolism. *J. Clinical Investigation*, 18:291, 1939
4. Takamatsu H.: Histochemical and Biochemical studies of phosphatase. *Tr. Japan Pathology Soc.*, 29:492, 1939
5. Wachstein M.: Alkaline Phosphatase activity in normal and abnormal human blood and bone marrow cells. *J. Lab. and Clin. Medicine*, 31:1, 1946
6. Danielli J.F.: A critical study of techniques for determining the cytological position of alkaline phosphatase. *J. Expl. Biology*, 22:110, 1946
7. Cram D.M. and Rossiter R.S.; Phosphatase of rabbit granulocytes. *Biochemical J.*, XXI:43, 1948
8. Haight W.F. and Rossiter R.J.: Acid and Alkaline Phosphatase in white cells. Data for the lymphocyte and polymorphonuclear leukocyte of man and rabbit. *Blood*, 5:267, 1950
9. Valentine W.N. and Beck W.S.: Biochemical studies on leukocytes. Phosphatase Alkaline activity in health, leukocytosis and mieolocytic leukemia. *J. Lab. and Clin. Medicine*, 38:39, 1951
10. Beck WS. and Valentine W.N.: Phosphatase activity in cronic linphatic leukemia, acute leukemia and miscellaneous haematologic conditions. *J. Lab. and Clin. Medicine*, 38:245, 1951
11. Valentine W.N., Beck W.S., Follet J.H., Mills H. and Lawrence J.S.: Biochemical studies in Cronic Myelocitic Leukemia, Polycytemia Vera and other Idiopathic Mieloproliferative Disorders. *Bloodr*, 7:959, 1952
12. Buckley E.S., Powell M.J. and Gibson J.: The separation of the formed elements of whole blood by means of fraction. *J. Lab. and Clin. Medicine*, 36:529 1950
13. Vercantere R.: The intracelular distribution of alkaline phosphatase in leukocytes. *Die Naturwessenschaftev*, 2:532 1954
14. Wiltslow E. and Moloney W.C.: Histochemical and biochemical studies in leukocyte alkaline phosphatase activity. *Blood*, 19:1023 1955

15. Kaploy S. Leonard: Histochemical proceeding for localizing and evaluating the alkaline phosphatase activity in smears.
Blood, 10:1023 1955
16. Valentine W.N.: Quantitative biochemical studies on leukocyte in man.
Blood, 6:845 1956
17. Wiltslow E. and Moloney W.C.: Studies of various factors influencing leukocyte alkaline phosphatase activity.
J. Lab. and Clin. Medicine, 47:691 1956
18. Valentine W.N., Follet J.H., Solomon B. and Reynolds R.: Biochemical and enzymatic characteristics of normal and leukemic leukocytes, special leukocytes, alkaline phosphatase.
Academic Press Inc., 457 (pág.) 1957
19. Hyphoc F.G.J. and Qualine G.: Cytochemical demonstration and measurement of leukocyte alkaline phosphatase activity in normal and pathological states by a modified azo-die coupling technic.
British J. Haenett, 4:375 1958
20. Wiltslow E. and Moloney W.C.: Studies on various factors in haematology under diferents conditions.
J. Lab. and Clin. Medicine, 47:234 1958
21. Kugelmans N.I.: Biochemistry of blood in health and disease.
Charles C. Thomas Publisher. Pag. 260 1959
22. Valentine W.N.: Metabolism of the leukemia leukocyte.
Journal of Heamatology, 28:699 1960
23. Valntine W.N.: Biochemistry and enzymatic activity of leukocyte in health and disease.
Progres in Haematology Ed. L.M. Tocatins, 1:293 1960
24. Toyoda S.: Studies en leukocyte alkaline phosphatase. K. Haematological Soc., 10:565 1960
25. Tomonaga M.: Leukocyte alkaline phosphatase in haematological disorders.
Acts. Médico Nagasakiensia, 5 (2-3):90 1960
26. Fortega G., Báguena R.: Fosfatasa alcalina en los leucocitos neutrófilos en casos normales y patológicos; especial referencia a la leucemia mielocítica crónica.
Revista Clínica Española, 79:37 1960
27. Page L.B. and Culver P.J.: A syllabus of laboratory examinations in clinical diagnosis.
Harvard University Press Pag. 87 1960
28. Tanaka K.R., Valentine W.N., Fredenicks R.E.: Disease or clinical conditions associated with low leukocyte alkaline phosphatase.
New England J. Medicine, 262:912 1960
29. Gotti A., Guestina G. et al.: The alkaline phosphatase activity of white cells in the cours of haemoblastosis.
Progreso Médico, 17:365 1961
30. Laguna J.: Bioquímica
Prensa Médica Mexicana Pág. 30 1960
31. Hausser E. Stroun: Alkaline Phosphatase activity of granulocytes.
Rev. Medical Suisse, 83:577 1963
32. Marmont A.C., Negrini A.C.: Leukocytic alkaline phosphatase in haematology.
Arch. Moragliano Pathology Clinical, 19:231 1963
33. Wasatjerna C., Jeglinsky B.; Mylund Ce.: The effect of X-ray treatment on leukocyte alcaine phosphatase in cancer patients.
Act. Medical Scand, 173:505 1963

