

Medicentro 1998, 2(3)

**INSTITUTO SUPERIOR DE CIENCIAS MÉDICAS
VILLA CLARA**

LA FOSFATASA ALCALINA EN LA PLACENTA HUMANA

Por:

Lic. Jesús Alfonso Rodríguez¹ y Dra. María Boffill Cárdenas²

1. Licenciado en Bioquímica. Profesor Auxiliar. ISCM-VC.
2. Dra. C. Med. Profesora Titular de Bioquímica. ISCM-VC.

Resumen

Se estudió la estabilidad, termostabilidad, pH y concentración de sustrato de la fosfatasa alcalina (3.1.3.1) en homogeneizado total de placenta de madres normales, obtenidas en el Hospital Provincial Docente Ginecoobstétrico "Mariana Grajales" de Santa Clara, con el objetivo de conocer el comportamiento de esta enzima y de que los resultados sirvan como base para realizar estudios posteriores. La enzima se mostró estable durante las siete semanas estudiadas, y termostable a las temperaturas de 50° C, 60° C, 70° C y 80° C; se observó que la enzima retuvo más del 90 % de su actividad en las tres primeras ensayadas y el pH óptimo fue de 8,6 en un amortiguador de veronal. La enzima cumple la cinética de Michaelis-Menten, y se encontró que el valor de la Km fue de 0,74 mmoles/l.

Descriptores DeCS:

FOSFATASA ALCALINA
PLACENTA

Summary

Stability, thermostability, pH, and substrate concentration of the alkaline phosphatase (3.1.3.1.) were studied in total homogenate of placentas of normal women obtained from the Provincial Teaching Gyneco-Obstetric Hospital "Mariana Grajales" of Santa Clara city to determine the behavior of this enzyme and to use the outcome in further studies. The enzyme was stable during the seven-week study period and it was also thermostable at temperatures of 50°C, 60°C, 70°C, enzyme retained more than 90°C of its activity during the first three studied weeks, and the optimal pH was 8,6 in a veronal buffer. This enzyme fulfils the Michaelis-Mentin's kinetics, and the Km value was 0,74 mmol/l.

Subject headings:

ALKALINE PHOSPHATASE
PLACENTA

Introducción

La fosfatasa alcalina es un grupo heterogéneo de sialoproteínas funcionales que se encuentran ampliamente distribuidas en los tejidos de los mamíferos, y se localizan en la membrana celular y en pequeñas concentraciones en el citoplasma^{1,2}.

Existen, como mínimo, tres isoenzimas de la fosfatasa alcalina en humanos: intestinal, placentaria y una inespecífica que se encuentra en hígado, hueso y riñón³⁻⁵. La función de la fosfatasa alcalina depende de su localización dentro del citoplasma. Participa en la regulación de procesos intracelulares, como es la fosforilación de metabolitos, además de sintetizar e hidrolizar ésteres de fosfatos. En algunas membranas intervienen en el transporte activo de fosfatos inorgánicos, lípidos, proteínas y carbohidratos¹. La isoenzima de placenta humana es una glicoproteína que es sintetizada en el sincitiotrofoblasto y se encuentra localizada principalmente en la membrana plasmática. Esta enzima es un dímero constituido de subunidades idénticas. La fosfatasa alcalina placentaria se localiza en las vellosidades placentarias, lugar donde la sangre materna tiene acceso directo al feto, por lo que debe desempeñar una importante función en el transporte de nutrientes de la madre al feto⁶. Esta enzima ha sido comúnmente utilizada para el diagnóstico clínico y observaciones terapéuticas de varias enfermedades, y como marcador asociado a tumores^{7,8}. Además, se ha informado que esta enzima se ha utilizado como un índice de la función placentaria o de bienestar fetal⁶. En nuestro trabajo nos proponemos estudiar la estabilidad, termostabilidad, pH y concentración de sustratos de la fosfatasa alcalina en homogeneizado total de placentas de embarazos normales a términos, con el objetivo de conocer el comportamiento de esta enzima y de que los resultados permitan realizar estudios posteriores.

Material y Método

Las placentas utilizadas en este trabajo fueron obtenidas en el Hospital Provincial Materno Docente "Mariana Grajales" de Santa Clara. El homogeneizado de las mismas se realizó según Boffill y col⁹.

La estabilidad de la enzima se estudio durante un período de siete semanas, y la misma se mantuvo almacenada a -20° C. La actividad de la enzima se midió cada siete días, y la termostabilidad se determinó preincubando el homogeneizado entre los 50° C y 80° C a los 20, 40 y 60 min. La actividad se determinó siempre dentro de las 72 horas posteriores a la preparación de la muestra.

El efecto del pH sobre la actividad de esta enzima se ensayó en pH de 8,0 a 9,4 en intervalos de 0,2 unidades, y se utilizó para ello un amortiguador veronal de 0,032 M.

El estudio del comportamiento de la actividad de la fosfatasa alcalina, con la variación de la concentración de sustrato, se desarrolló utilizando diferentes concentraciones de beta-glicerofosfato en un rango de 0,64 a 3,20 mmoles/l.

La actividad de la fosfatasa alcalina (EC 3.1.3.1) se determinó por el método de King-Deloy¹⁰; la misma fue medida en un espectrofotómetro CO 46 soviético.

Las proteínas totales fueron determinadas por el método de Lowry¹¹.

Para realizar estos estudios cinéticos se utilizaron como mínimo 5 placentas diferentes para cada experimento: la actividad se determinó siempre dentro de las 72 horas posteriores a la preparación de la muestra, excepto para la estabilidad. Los reactivos utilizados en los análisis fueron todos de calidad puro.

Resultados

El estudio de la estabilidad de la fosfatasa alcalina demostró que la misma fue estable durante las siete semanas en que se evaluó su actividad (tabla 1).

Tabla 1 Estabilidad de la fosfatasa alcalina.

Semana	Actividad específica MM/min/mg prot.	%
0	0,213	90,6
1	0,225	95,7
2	0,221	94,2
3	0,212	90,2
4	0,235	100,0
5	0,228	97,0
6	0,220	93,6
7	0,214	91,1

Al estudiar la termostabilidad de la enzima (tabla 2) se observó un comportamiento estable en el rango de 50-70°C, y todos los valores de actividad fueron superiores al 90 %. La actividad catalítica descendió marcadamente a la temperatura de 80°C.

Tabla 2 Termostabilidad de la fosfatasa alcalina.

Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Actividad específica (MM/min/mg)	%
50	20	0,325	90,8
50	40	0,340	95,0
50	60	0,334	93,3
60	20	0,337	99,7
60	40	0,342	95,5
60	60	0,340	95,0
70	20	0,351	98,0
70	40	0,358	100,0
70	60	0,358	100,0
80	20	0,193	53,9
80	40	0,061	17,0
80	60	0,006	1,70
37	0	0,346	96,6

La enzima desarrolló su máxima actividad a un pH de 8,6 (Figura 1).

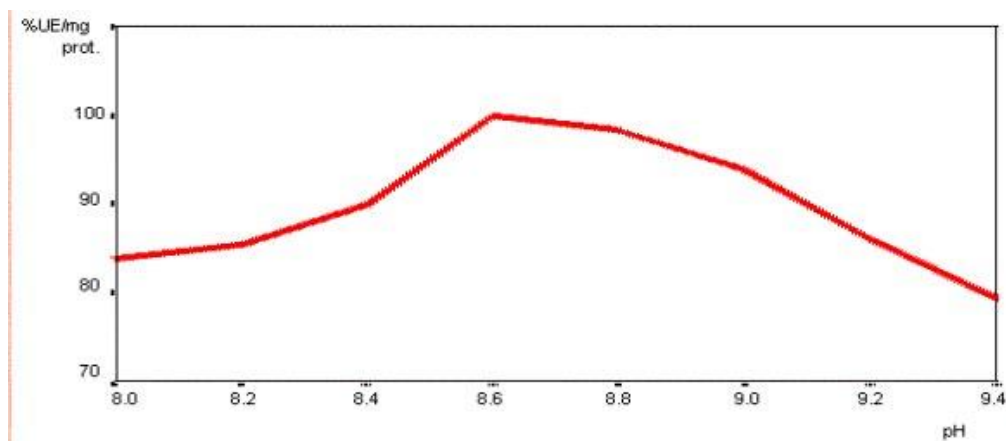


Figura 1 Efecto del pH de la fosfatasa alcalina.

La fosfatasa alcalina cumple con la cinética de Michaelis-Mente y la linealidad de Lineweaver-Burj (Figura 2), lo que permitió calcular el valor de K_m , que fue de 0,74 mmoles/l a un pH de 8,6. Se utilizó como sustrato el beta-glicerofosfato.

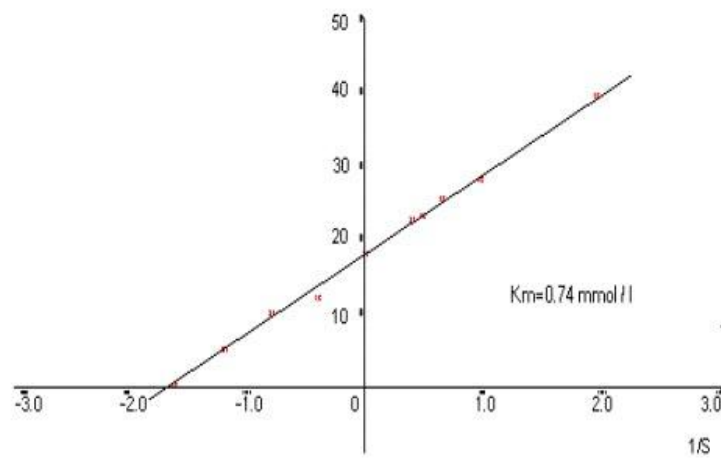


Figura 2 Efecto de la concentración de sustrato de la fosfatasa alcalina.

Discusión

Los resultados obtenidos de nuestro trabajo demostraron que la fosfatasa alcalina de placenta humana es estable durante siete semanas. Estos resultados debían esperarse atendiendo a los estudios realizados por Duncan y col¹², los cuales encontraron que la isoenzima placentaria en el suero humano mantenía un 98 % de su actividad en el período aproximado de 6 meses.

La fosfatasa alcalina se presentó un comportamiento termostable desde 50°C hasta 70°C, en los tiempos de preincubación ensayados. Estos resultados también eran esperados por nosotros, debido a que Adeniyi y col¹³ utilizaron una temperatura de 70°C durante 30 min como vía de inactivación de las diferentes isoenzimas de la fosfatasa alcalina, con excepción de la placentaria, para conocer el aporte de esta última al suero de embarazadas normales y con preeclampsia. Un efecto similar de la temperatura sobre esta enzima lo informaron Meyer-Sabellek⁷ y Tillyer¹⁴.

En nuestro trabajo se encontró que la fosfatasa alcalina presenta un pH óptimo de 8,6 en un sistema amortiguador veronal. Este resultado es similar al encontrado por Sumikawa y col⁵, ya que ellos informaron un pH óptimo de 8,5 para la isoenzima placentaria purificada en sistemas amortiguadores como Tris-Hcl y dietanolamina, cuando estudiaban las diferencias en las actividades hidrolíticas de las isoenzimas de la fosfatasa alcalina humana sobre los fosfatidatos.

El valor de K_m de 0,74 mmoles/l informado en este trabajo, se acerca al encontrado por Sumikawa y col⁵ que fue de 0,8 mmoles/l para el p-nitro fenil fosfato. Además, Okochi y col¹⁵, encontraron un valor similar de K_m para una nueva isoenzima de fosfatasa alcalina en el tejido adiposo humano, que fue de 1,1 mmoles/l para el fenil fosfato.

Referencias bibliográficas

1. Griffeth M. Alkaline phosphatase. Newer concepts in isoenzymes and clinical application. Clin Lab Med 1989; 9:717-730.
2. Gordon T. Factors associated with serum alkaline phosphatase level. Arch Pathol Lab Med 1993;117:187-190.
3. Henthorn P, Raducha M, Edwards Y, Weiss M, Slaughter C, Lafferty MM. Nucleotide and aminoacid sequences of human intestinal alkaline phosphatase close homology to placental alkaline phosphatase. Proc Natl Acad Sci USA 1987;84:1234-1238.
4. Takata K, Sumikawa K, Saeki K, Okochi T, Adachi K. Improved purification of human liver alkaline phosphatase by phenylsepharose column chromatography. Clin Chem Acta 1988;171:317-324.
5. Sumikawa K, Okochi T, Adachi K. Difference in phosphatidate hydrolytic activity of human alkaline phosphatase isoenzymes. Biophys Acta 1990;(1046):27-31.
6. Okamoto T, Seo H, Mano H. Expression of human placenta alkaline phosphatase in placenta during pregnancy. Placenta 1990;2:319-327.
7. Meyer-Sabellek W, Saha P, Kuttgen E. Alkaline phosphatase laboratory and clinical implications. J Chromatogr 1998;129:119-111.
8. Sumikawa K, Saeki K, Okochi T, Adachi K, Nishimura H. Hydrolysis of phosphatidate by human placental alkaline phosphatase Clin Chem Acta 1987;167:321-328.
9. Boffill Cárdenas M. Actividad maltasica en la placenta humana. Medicentro 1986;2:100.
10. King J. Estudio de las fosfatasas. En su Enzimología clínica práctica. Zaragoza Editorial Acrebia, 1968;346.
11. Lowry DF. Proteine measurement with the folin phenol reagent. J Biol Chem 1951;193:265.
12. Duncan Ph, McKneally ML, Fast DM, Bayse DS. Development of a reference material for alkaline phosphatase. Clin Chem 1984;30:93-97.
13. Adeniyi FA, Olatubosun DA. Origins and significance of the increased plasma alkaline phosphatase during normal pregnancy and pre-eclampsia Br J Obstet Gynecol 1984;91:857-862.
14. Tillyer GR. Error estimation in quantification of alkaline phosphatase isoenzyme by selective inhibition methods. Clin Chem 1988;34:2490-2493.
15. Okochii T, Seike H, Seike K. A novel alkaline phosphatase isoenzyme in human adipose tissue. Clin Chim Acta 1987;162:19-27.