

Tesis de Posgrado

Determinación de fosfatasa en sangre

Kohlmann, Roberto F.

1946

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Química de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Kohlmann, Roberto F.. (1946). Determinación de fosfatasa en sangre. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_0453_Kohlmann.pdf

Cita tipo Chicago:

Kohlmann, Roberto F.. "Determinación de fosfatasa en sangre". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1946.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_0453_Kohlmann.pdf

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales

D E T E R M I N A C I O N
DE
F O S F A T A S A E N S A N G R E

T e s i s
Presentada por Roberto F.Kohlmann
para optar al título de
DOCTOR EN QUIMICA

Tesis: 453

Buenos Aires

1946

AGRADECIMIENTO

Deseo agradecer a las autoridades de la Administración Nacional del Agua el haber puesto a mi disposición un laboratorio con el equipo y drogas necesarios para realizar mi trabajo de tesis con la máxima comodidad y eficiencia posibles. Había quedado solucionado en esta forma el problema más grave con que tropiezan los ex-alumnos de nuestra escuela cuando desean efectuar sus trabajos de tesis.

También debo mi especial reconocimiento a los Doctores Rogelio A. Trelles y Ventura Morera.

Al Dr. Trelles por la proposición del tema de tesis, por haber dado curso a mi pedido ante las autoridades de la Administración Nacional del Agua para que me cediera un laboratorio y por haberme conseguido una buena parte de las muestras de sangre.

Al Dr. Ventura Morera por la eficaz ayuda prestada y los sanos consejos que me ha proporcionado en todo momento.

Finalmente quiero expresar mi más sincero agradecimiento a todos los que han colaborado en la provisión de muestras de sangre:

El Dr. Ernesto Di Leo de la sección Microbiología de la Administración Nacional de Agua; los Doctores J. Murtagh y C.A. Rivière del Instituto de Maternidad del Hospital Rivadavia y los Doctores Correo Urquiza y Bartolomé Luchetta del Instituto de Medicina Experimental.

Roberto F. Kohlmann
Buenos Aires, Setiembre de 1948

INTRODUCCION

La determinación de fosfatasa en sangre posee interés clínico, porque puede proporcionar importantes informaciones para el diagnóstico diferencial de ciertas afecciones óseas, como osteítis deformante, osteítis fibrosa y raquitismo.

Además se pueden efectuar las determinaciones de fosfatasa para distinguir diversas formas de ictericia y aplicarlas al diagnóstico de tumores.

En todos estos casos se determina fosfatasa en plasma o en suero, que constituye un material de fácil obtención.

El presente trabajo ha tenido por objeto ensayar un determinado método de dosaje de fosfatasa en suero y uniformar el criterio en lo que se refiere a valores normales y patológicos de las llamadas actividades fosfatásicas "ácida" y "alcalina".

Para valorar la actividad de una enzima es necesario aplicar un método rigurosamente tipificado y expresar los resultados en unidades exactamente definidas, aunque arbitrarias. En efecto, en la valoración de la actividad fosfatásica intervienen los cinco siguientes factores principales: naturaleza del sustrato, concentración de los reactivos, pH, temperatura y tiempo de incubación, además de otros factores secundarios como son calidad y pureza de los reactivos, variación de la composición química de los sueros ensayados, presencia ocasional de sustancias extrañas, etc.

Se comprende que siendo tantas las posibilidades de variación de las condiciones experimentales debe existir un gran número de métodos de dosaje de fosfatasa, como efectivamente sucede. Algunos métodos se diferencian fundamentalmente por la naturaleza del sustrato.

En lo referente a la expresión de los resultados ocurre que la mayoría de los investigadores usa sus "propias" unidades; así existen unidades "King y Armstrong" (91), llamadas a veces unidades "fenólicas"; otras son las unidades "Bodansky" (30), etc. Y para complicar más aun existen autores que utilizan uno de los métodos ya consagrados, pero modifican alguna condición experimental. Por ejemplo Iwatsuru (76) emplea en sus estudios el método de Bodansky (30) pero modifica el período de incubación y expresa los resultados en unidades "Iwatsuru". Pero mucho más grave aun resulta el uso de unidades mal definidas. Algunos autores describen un método de dosaje de fosfatasa, con todo detalle, sin mencionar en absoluto un dato tan fundamental como lo es el pH del sustrato. Es sucede por ejemplo en los libros de Alfredo Fisher (h) y de Kolmer y Boerner (j) en los cuales se omite el detalle importantísimo del control y ajuste del pH del sustrato.

Hemos realizado una experiencia muy significativa a este respecto: Se procedió a preparar el sustrato de β -glicerofosfato de sodio (siguiendo el método de Bodansky, como se explicará más adelante), mezclando los ingredientes de acuerdo con la técnica prescrita y luego se midió potenciométricamente el pH de la solu-

ción resultante, siendo éste alrededor de 10. En el presente caso el pH necesario era de 8,6, de modo que había aquí una diferencia por cierto muy importante y a su vez sujeta a aumentos o disminuciones de acuerdo con la alcalinidad del agua destilada utilizada. Quedó demostrada así la enorme importancia del ajuste previo del pH de los sustratos a los valores indicados en la definición de la actividad enzimática.

Debe tenerse presente, que la diferenciación entre fosfatasa "ácida" y "alcalina" reside precisamente en el pH del sustrato y que existen curvas de actividad de la fosfatasa en función del pH (12,13,14,21).

Teniendo en cuenta por una parte estos hechos y por otra la existencia de numerosos métodos y unidades se explica la confusión reinante en lo que respecta a actividad fosfatásica en sangre.

El objeto primordial del presente trabajo ha sido pues ensayar un método moderno, aplicarlo a un gran número de casos, y presentar un estudio crítico de los resultados obtenidos.

Hasta el presente, casi todos los trabajos han versado sobre la fosfatasa "alcalina" (alrededor de pH 9) (47, 48, 49, 50, 59). Recién en los últimos años se comenzó con el estudio de la fosfatasa "ácida" (aproximadamente pH 5) (10, 15, 51, 63, 68, 69, 105, 131).

Dada la imposibilidad de presentar un resumen detallado de todos los estudios efectuados hasta el presente nos limitaremos a dar un panorama en el índice bibliográfico que figura al final del presente trabajo.

¿DISTINTAS CLASES DE FOSFATASAS? LA FOSFATASA ACIDA
Y LA FOSFATASA ALCALINA

En el grupo de las fosfatasas se encuentran las fosfo monoesterasas capaces de desdoblar los monoésteres del ácido fosfórico y los nucleótidos, por ejemplo glicerofosfato, fenilfosfato, metilfosfato, adenin-nucleótidos, etc.

Al hablar de distintas clases de fosfatasas nos referimos en el presente trabajo especialmente a las fosfomonoesterasas mencionadas y particularmente con miras a estudiar el pH óptimo correspondiente a su actividad máxima.

Clasificación de las fosfomonoesterasas

pH óptimo	Activ. por Mg	Relación de desdoblamiento α-glicerofosf. : β-glicerofosfato	Origen de la fosfatasa
alrededor de 9	+	β > α	riñón
alrededor de 6	+	α > β	eritrocitos
4,5 - 5,0	-	β > α	bazo
3 - 4	inhib.	β > α	levadura alta

La fosfatasa "alcalina"

La fosfatasa más común tiene su pH óptimo de máxima actividad en medio francamente alcalino (alrededor de pH 9). Debido a su existencia predominante en el riñón se la ha denominado fosfatasa renal. Todas las fosfatasas del grupo de las fosfatasas renales se destacan por su activación por iones magnesio y además siempre hidrolizan más rápidamente el β -glicerofosfato que el α -glicerofosfato. Algunos órganos animales, especialmente la mucosa intestinal, los riñones y los huesos se caracterizan por un elevado contenido en fosfatasa alcalina, mientras que los músculos (con excepción de los del corazón) demuestran una actividad fosfatásica notablemente baja.

La fosfatasa "ácida"

Junto a las fosfatasas alcalinas se encuentran las fosfatasas con un máximo de actividad en un medio cercano al punto neutro, del tipo de la fosfatasa de eritrocitos y fosfatasa del bazo, como también un tipo poco frecuente análogo a la fosfatasa de levadura alta con un óptimo pH de actividad máxima francamente ácido. Robison y Soames (121 a) suponían la existencia de fosfatasas diferenciables por su pH óptimo de actividad máxima en el bazo, hígado y páncreas por una parte, y los riñones y huesos por la otra. También en los glóbulos rojos se halla una fosfatasa, diferente de la fosfatasa renal (106) con un óptimo pH alrededor de 6 (108). Esta "fosfatasa de eritrocitos" ha sido examinada atentamente por Roche (124, 125, 118); ella se diferencia notablemente de la fosfatasa de leucocitos y fosfatasa de plasma activas óptimamente a pH 9 (ambas muy relacionadas con la enzima renal).

Todas las fosfatasas con máxima actividad a pH 9 hidrolizan más velozmente el β -glicerofosfato que el α -glicerofosfato, en cambio la fosfatasa de eritrocitos desdobra el isómero α varias veces más rápido.

DIVERSOS METODOS DE DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD

FOSFATASICA EN LA SANGRE

Para el dosaje de fosfatasa en general y en particular en la sangre se han propuesto varios métodos, que se pueden dividir en dos categorías según el sustrato utilizado.

La mayor parte de los autores prefiere el empleo del β -glicerofosfato de sodio, mientras que King y Armstrong introdujeron el uso del fenilfosfato disódico. En el primer caso se dosa el fósforo puesto en libertad y en el segundo el fenol.

En el cuadro siguiente figuran los métodos más difundidos y las condiciones experimentales respectivas.

Método de	Sustrato	Dosa	Incubación			Bibl.
			tiempo	pH	temp.	
Kay	β -glicerofos.Na	P	48 hs.	7,6	38° C	(86)
Jenner y Kay	β -glicerofos.Na	P	3 hs.	8,8	38° C	(80)
Bodansky	β -glicerofos.Na	P	1 h.	8,6 6,4	37° C	(30)
King y Armstrong	fenilf.disódico	fenol	30 min.	9,3 5,0	37°5C	(91)
Roe y Whitmore	glicerofos.Na	P	1 h.	?	37° C	(130)

En un método de análisis clínicos interesa ante todo su rapidez, y por ello se prefieren los tres últimos métodos citados, debido al corto tiempo de incubación. Para la elección entre los métodos de Bodansky, y King y Armstrong hemos tenido en cuenta el siguiente detalle: La cantidad de fosfato inorgánico en suero tiene generalmente importancia, aunque no siempre, en los casos en los cuales se desea efectuar una determinación de fosfatasa. En el método de Bodansky es necesario dosar el fósforo inorgánico del suero, porque su principio es el siguiente: La diferencia entre el fósforo total inorgánico luego de incubar el suero con sustrato de β -glicerofosfato de sodio, y el fósforo inorgánico del suero, se utiliza como medida de la actividad fosfatásica. Esto no sucede con el método de King y Armstrong, puesto que se determina simplemente el fenol puesto en libertad luego de incubar, sin tener en cuenta el contenido en fósforo inorgánico del suero. Debido a los motivos expuestos hemos preferido el uso del método de Bodansky en el presente trabajo.

Unidades de actividad fosfatásica

Según King y Armstrong una unidad de actividad fosfatásica es la cantidad de enzima que libera 1 mg de fenol en las condiciones indicadas en el cuadro, mientras que en los métodos restantes es la cantidad de enzima que libera 1 mg de fósforo inorgánico. Estas unidades de actividad fosfatásica no son comparables sino con ciertas reservas. Con dependencia del método utilizado se producen diferencias notables en el orden de la magnitud de los datos, cuyo aprecio acarrea a menudo dificultades. Las unidades de Jenner y Kay son a las de Kay como 1:50. Determinaciones comparativas efectuadas por Palmer y Nelson (116) según los métodos de Bodansky y de Jenner y Kay establecieron la relación entre las unidades Bodansky y de Jenner y Kay. Según ellos las dos unidades se relacionan como 1:2. Por otra parte la unidad de King y Armstrong es aproximadamente igual a la de Jenner y Kay. Además según la obra de Gradwohl (d) una unidad Bo-

dansky es igual aproximadamente a 1,8 unidades King y Armstrong.
Resumiendo tenemos las siguientes relaciones aproximadas:

1 U.Jenner y Kay ~ 50 U.Kay ~ 1 U.King y Armstrong
1 U.Bodansky ~ 2 U.Jenner y Kay ~ 1,8 U.King y Armstr.

Si bien es posible constatar una marcha groseramente paralela de las actividades fosfatásicas determinadas por métodos semejantes (116), creemos que no se pueden comparar métodos que trabajan a pH muy diferentes ni mucho menos pretender reducir las unidades de un método a unidades de otro método, como si se tratara de simples magnitudes físicas, multiplicando por algún factor.

DETERMINACION DE FOSFATASA ACIDA Y ALCALINA

METODO MODIFICADO DE BODANSKY

Según descripción de la obra de
R.B.H.Gradwohl, Clinical Laboratory Methods and Diagnosis
3a.edición (1943), tomo 1, pág.303

Reactivos y material necesarios

Sustancias inorgánicas

Sales:
SnCl₂ 15 g
PO₄H₂K 110 mg
McO₄Na₂ (libre de P) 7,5 g ó en su defecto
MoO₄H₂ (libre de P y NH₃) 90 g

Acidos:
SO₄H₂ concentrado 150 ml
HCl " 30 ml

Alcalis: OHNa sólido 55 g

Mezcla sulfocrómica:

SO₄H₂ comercial 1 litro
Cr₂O₇K₂ " 30 g

Sustancias orgánicas

Solventes:
Tolueno 5 ml
Cloroformo 5 ml
Eter de petróleo (p.eb.20 - 40° C) 20 ml

Reactivos:
Ac.tricloroacético (libre de P) 10 g
β-glicerofosfato de sodio 1 g
Di-etil-barbiturato de sodio 1 g

Indicadores:
Bromocresolpúrpura 100 mg
Azul de bromotimol 100 mg
Ponjo cresol 50 mg

<u>Material de vidrio</u>	Cantidad	Capacidad en ml
<u>Matraces aferados:</u>	1	25
	1	100
	1	200
	1	250
	1	500
	1	2000
<u>Frascos con tapón de vidrio esmerilado:</u>	1	25
	4	100
	1	200 (color caramelo)
	4	250
	3	500
	1	1000
	1	2000
<u>Frascos pyrex con tapón de vidrio esmerilado:</u>	2	100
<u>Frascos goteros:</u>	3	200
<u>Vasos erlenmeyer:</u>	2	50
<u>Probetas graduadas:</u>	1	100
<u>Pipetas graduadas:</u>	1	1
	2	2
	2	5
	2	10
<u>Vasos de precipitados:</u>	2	250
10 tubes de ensayo de 20 mm por 150 mm		
2 " " " " " " " " " " con tapón de vidrio o de goma		
3 embudos de 6 cm		
1 varilla de vidrio		
1 vidrio de reloj		

Aparatos especiales: Colorímetro, Centrífuga, Balanza de precisión, Heladera, Baño de agua de 37° C, Baño de agua helada, Potenciómetro para determinar pH.

Otros útiles: Gradilla, espátula, lápiz eraso, papel de filtro.

Nota: Cuando se dispone de un potenciómetro se puede prescindir de los indicadores y viceversa.

Parte práctica

I. FOSFATASA ALCALINA

Reactivos

Solución de ácido tricloroacético al 10% Disolver 10 g de ácido tricloroacético, para análisis, en agua destilada en un matraz de 100 ml y llevar a 100 ml con agua destilada.

Solución stock de fosfato Es la misma que la solución stock standard de fosfato de Kuttner y Lichtenstein (98) :

Disolver 110 mg de fosfato ácido de potasio (grado buffer La Motte) en aproximadamente 100 ml (o más) de agua destilada en un matraz de 250 ml. Agregar 1 ml de ácido sulfúrico concentrado, c.p. Diluir hasta 250 ml con agua destilada.

10 ml contienen 1 mg de P.

Solución standard de fosfato (1 ml = 0,01 mg de P) Llevar 10 ml de solución stock de fosfato a 100 ml con agua destilada en un matraz de 100 ml. Agregar algunas gotas de cloroformo.

Solución de molibdato de sodio al 7,5% Disolver 7,5 g de molibdato de sodio, libre de fósforo, en agua destilada y llevar a 100 ml con agua destilada.

Cuando no se dispone de molibdato de sodio, también se puede proceder de la siguiente manera:

Acido molíbdico (Eimer & Amend, T.P., Especial, "libre de fosfatos y amoníaco") 90 g
OHNa 5 N 250 ml

Colocar en un matraz de 2 litros y llevar a volumen. Agitar. La solución deberá ser ligeramente alcalina a la fenolftaleína. Dejar reposar y decantar para el uso. Esta solución se prefiere a la de Kuttner y Lichtenstein, que se prepara disolviendo molibdato de sodio, porque esta última ha dado frecuentemente pruebas en blanco poco satisfactorias con desarrollo de un color azul en forma apreciable.

Solución de ácido sulfúrico 10 N

Reactivo de ácido sulfúrico-molíbdico

Solución A

A 50 ml de solución de molibdato de sodio al 7,5% agregar 50 ml de ácido sulfúrico 10 N y mezclar bien.

Solución stock de cloruro estannoso, 60% Disolver 15 g de cloruro estannoso (Eimer y Amend, T.P.) en ácido clorhídrico concentrado en un matraz de 25 ml, y llevar a 25 ml con ácido clorhídrico concentrado.

Dejar reposar en la heladera. Esta solución debe prepararse mensualmente. Bodansky y colaboradores encontraron que era posible obtener resultados más constantes dentro de un margen más amplio de valores de fosfato inorgánico, con este reactivo más concentrado, en el uso del cual han seguido a Raymond y Levene (119).

Solución diluída de cloruro estannoso Diluir 1 ml de la solución stock hasta 200 ml con agua destilada y guardar en un frasco marrón. Esta solución debe usarse dentro de los 5 días de preparada. Se obtienen resultados mejores con reactivo fresco, que con soluciones guardadas durante más de 5 días.

Sustrato de glicerofosfato sódico, pH 8,6 Colocar sucesivamente en un matraz de 100 ml en el siguiente orden:

aprox. 3 ml éter de petróleo (p.eb.20 a 40° C.)

aprox. 80 ml agua destilada

0,5 g B-glicerofosfato de sodio

y 0,424 g dietilbarbiturato de sodio, U.S.P.

diluir hasta 100 ml con agua destilada. Leer el volumen en

la interfase entre el sustrato y el éter de petróleo. Mezclar y ajustar la reacción a pH 8,6, usando HCl N/10 ó OHNa N/10. Volcar (fuera del laboratorio) en un frasco pyrex de 100 ml provisto de un tapón de vidrio y que contiene aproximadamente una pulgada de éter de petróleo. Guardar en la heladera en cantidades que no excedan los 100 ml por frasco.

Soluciones indicadoras Disolver el indicador en la cantidad de OHNa N/20 que se señala a continuación y llevar el volumen con agua destilada a 250 ml.

Soluciones indicadoras	color y pH	mg de indicador	ml OHNa N/20
bromocresolpúrpura (0,04%)	amarillo— eris —púrpura 5,4 6,0-6,2 7,0	100	3,7
azul de bromotimol (0,04%)	amarillo—verde—azul 6,0 6,6-6,8 7,6	100	3,2
rojo cresol (0,02%)	amarillo—anaranjado—rojo 7,2 7,8 8,8	50	2,65

Prueba en blanco, de los reactivos

ácido tricloroacético al 10% 5 ml
 agua destilada 5 ml
 reactivo de molibdato (solución A) 2 ml
 solución de cloruro estannoso diluída . 1 ml

Mezclar. La mezcla resultante es incolora, o a lo sumo ligeramente azul o verde. El blanco no es sólo una prueba de la calidad de los reactivos utilizados, sino también de la misma preparación del reactivo diario de molibdato.

a. Preparación del suero

Extraer aproximadamente 10 ml de sangre entera, dejar coagular a temperatura ambiente, centrifugar, separar el suero, re-centrifugar el suero, y decantar. Si es imposible usar el suero enseguida, se lo puede guardar en la heladera por varias horas. Después de estar 24 ó 48 horas en la heladera la fosfatasa en el suero es 10 a 15% más elevada. Si el suero se guarda a temperatura ambiente los resultados están sujetos a un error en más o menos 20%. Puede agregarse una gota de tolueno al suero como conservador.

b. Preparación del filtrado para fósforo inorgánico en suero

Colocar mediante una pipeta 1 ml de suero en un gran tubo de ensayo. Agregar 4 ml de ácido tricloroacético al 10%.

Mezclar y dejar reposar algunos minutos.

Filtrar a través de un papel de filtro de 9 cm Whatman N° 44 u otro "sin cenizas".

c. Preparación del filtrado para fósforo inorgánico total (fósforo inorgánico en suero y el fósforo inorgánico liberado del sustrato)

Colocar 10 ml de sustrato en un tubo de ensayo provisto de un tapón de vidrio o goma.

Ponerlo en un baño de agua a 37° C hasta que esté caliente.

Agregar 1 ml de suero sosteniendo la punta de la pipeta al rededor de 1 cm encima de la superficie del líquido. Invertir una vez, mezclando el contenido cuidadosamente, pero sin una excesiva aereación.

Volver a colocar en el baño de agua.

Al cabo de una hora, exactamente, quitar el tubo del baño de agua y enfriar en agua helada durante 2 minutos.

Agregar 9 ml de ácido tricloroacético al 10%, mezclar bien, y dejar reposar algunos minutos. Filtrar.

Si el suero contiene un elevado valor de fosfatasa, diluir la mezcla final con una cantidad adicional de ácido tricloroacético al 10%.

T é c n i c a

Determinación de fósforo inorgánico

Colocar 2 ml del filtrado (para fósforo inorgánico, v.s.) en un matraz erlenmeyer de 50 ml marcado "M" para la muestra.

Colocar 2 ml de solución standard de fosfato (conteniendo 0,02 mg P) en un matraz similar, marcado "S" para el standard.

Agregar a cada frasco 5 ml de agua destilada,

y 2 ml de reactivo ácido sulfúrico-molíbdeno, solución A.

Mezclar. Inmediatamente, soplar, con una pipeta 1 ml de solución diluida de cloruro estannoso.

Mezclar enseguida y dejar reposar a temperatura ambiente durante 15 minutos.

Leer en el colorímetro.

C á l c u l o s

$$\frac{\text{Lectura Standard}}{\text{Lectura Muestra}} \times 5 = \text{mg P inorgánico en 100 ml de suero}$$

Determinación del fósforo inorgánico total (Fósforo inorgánico en suero y el fósforo inorgánico liberado del sustrato)

Llevar a cabo el mismo procedimiento que para la determinación del fósforo inorgánico, según indicado arriba, pero usando 4 ml del filtrado obtenido con el sustrato y agregar solamente 3 ml de agua destilada.

C á l c u l o s

$$\frac{\text{Lectura Standard}}{\text{Lectura Muestra}} \times 10 = \text{mg P total inorgánico en 100 ml de suero}$$

Cálculo para la fosfatasa alcalina

$$\text{P total inorgánico} - \text{P inorgánico en suero} = \text{unidades de}$$

actividad fosfatásica alcalina por 100 ml de suero (si la hidrólisis ha continuado por una hora). (mg de P inorgánico liberado del glicerofosfato a pH 8,6)

II. FOSFATASA ACIDA

Reactivos

Los reactivos para este procedimiento son los mismos que para la fosfatasa alcalina con excepción del sustrato de glicerofosfato de sodio.

Sustrato de glicerofosfato de sodio pH 6,4

Colocar sucesivamente en el siguiente orden en un matraz de 100 ml:

alrededor de 3 ml de éter de petróleo (p.eb.20 a 40° C)

alrededor de 80 ml de agua destilada

y 0,5 g de β-glicerofosfato de sodio, y

diluir hasta 100 ml con agua destilada.

Leer el volumen en la interfase entre el sustrato y el éter de petróleo. Mezclar y ajustar la reacción a pH 6,4 usando HCl N/10 ó OHNa N/10. Volcar (fuera del laboratorio) en un frasco pyrex de 100 ml provisto de un tapón de vidrio y que contiene aproximadamente una pulgada de éter de petróleo. Almacenar en la heladera en cantidades que no excedan los 100 ml por botella.

Técnica

Seguir el método dado para la fosfatasa alcalina (v.s.), sustituyendo el sustrato de pH 8,6 por el de pH 6,4. Usar 2 ml del filtrado para P inorgánico y 7 ml del filtrado para el P total inorgánico, sin usar agua en la determinación del fósforo total inorgánico.

Cálculo para la fosfatasa ácida

Fósforo inorgánico

$$\frac{\text{Lectura Standard}}{\text{Lectura Muestra}} \times 5 = \text{mg P inorgánico en 100 ml de suero}$$

Fósforo total inorgánico

$$\frac{\text{Lectura Standard}}{\text{Lectura Muestra}} \times 5,7 = \text{mg de P total inorgánico en 100 ml de suero}$$

Fosfatasa ácida

P total inorgánico - P inorgánico en suero = unidades de actividad fosfatásica ácida por 100 ml de suero (si la hidrólisis ha continuado por una hora). (mg de P inorgánico liberado del glicerofosfato a pH 6,4)

Hemos seguido exactamente el método detallado, salvo la siguiente modificación: I. b. Preparación del filtrado para fósforo inorgánico en suero. Modificación introducida: Colocar me

diante una pipeta 1 ml de suero en un tubo de centrifuga. Agregar 4 ml de ácido tricloroacético al 10%. Mezclar y dejar reposar algunos minutos. Centrifugar. Decantar y filtrar a través de un papel de filtro de 9 cm Whatman N° 44 u otro "sin cenizas".

La dificultad que se presentaba en el método original era la siguiente: en el filtrado se obtenían apenas los 2 ml necesarios para la determinación del fósforo inorgánico debido a que gran cantidad de líquido se quedaba embebiendo el voluminoso precipitado de proteínas. Esto se evita con la centrifugación.

Hemos controlado los pH de los sustratos con un potenciómetro y con una aproximación de 0,05 unidades de pH.

Para la determinación del fósforo utilizamos un colorímetro marca Ernst Leitz, Wetzlar, N° 2145.

El ácido tricloroacético libre de fósforo era de marca Baker's U.S.A., $\text{PO}_4^{=}$ 0,000% y proporcionaba ensayos en "blanco" satisfactorios. El β -glicerofosfato de sodio era de la casa Fisher Scientific Co., Pittsburgh, Penna, U.S.A., Eimer and Amend, New York, N.Y., U.S.A. El ácido molíbdico era una droga Merck, Darmstadt.

DATOS CORREGIDOS

La fórmula común para los cálculos no incluye ninguna corrección para la desviación de la ley de Beer (§). Esta desviación, que alcanza el 20% de la diferencia entre el contenido en fósforo del desconocido y el standard, puede ser corregida utilizando la fórmula

$$\frac{0,48}{\text{Lectura del desconocido}} - 0,0040 = \text{mg P en la parte alícuota.}$$

(§) Beer (22a) estudió la influencia de la concentración de sustancias coloreadas disueltas sobre la transmisión o absorción de la luz. Encontró la siguiente relación entre transmisión y concentración, cuya formulación matemática es $I_t = I_0 a^c$ siendo I_t = intensidad de la luz transmitida, I_0 = intensidad de la luz incidente, a = fracción de la luz incidente que es transmitida y c = concentración. Relacionando la segunda ley de Lambert con la ley de Beer se llega fácilmente a la fórmula fundamental de la colorimetría

$$c_x = \frac{1}{l_x} c \quad \text{siendo } c_x = \text{concentración de la}$$

solución desconocida, c = concentración de la solución conocida. l_x = altura de la columna de la solución desconocida y l = altura de la columna de la solución conocida. La demostración de esta fórmula se puede ver en el libro de I.M.Kolthoff & E.B.Sandell, Textbook of Quantitative Inorganic Analysis, New York 1941 página 617

Sin embargo, por conveniencia, los valores correspondientes a cualquier lectura dada han sido calculados y tabulados (ver tabla XIV en Gradwohl (d)). En análisis de sueros el valor de la parte alícuota puede ser convertido en mg de P inorgánico por 100 ml utilizando la fórmula

$$T \times \frac{D}{V} \times 100 = \text{mg P en 100 ml}$$

en la cual T corresponde al valor de la parte alícuota de la tabla XIV (d), de acuerdo a la lectura en el colorímetro, D significa la dilución del suero en el filtrado (generalmente 10 en determinaciones de fosfato y 20 en la determinación de la fosfatasa), y V es igual al volumen de la parte alícuota, en ml.

Correcciones por el ácido tricloroacético y glicerofosfato

Cuando el ácido tricloroacético está presente solo o junto con glicerofosfato, como en las determinaciones de fosfato inorgánico en suero y fosfatasa en suero, respectivamente, son necesarias otras correcciones. Las concentraciones de estas sustancias se han ajustado en estos análisis de modo de permitir el uso de un factor de corrección conveniente. Este factor es igual a + 1% por ml de filtrado de fósforo en suero usado para el análisis, y + 2% por ml del filtrado para fosfatasa (máxima corrección 10%). (Para mayor precisión, las siguientes correcciones pueden ser usadas para ácido tricloroacético más glicerofosfato: para 1 ml de filtrado de fosfatasa o menos, 3% por ml; para 2 ml de filtrado una corrección del 5%; para 3 y 4 ml de filtrado, 6 y 8%, respectivamente; para 5, 6, y 7 ml de filtrado, 10%).

Se han usado soluciones de fosfato ácido de potasio de concentración conocida, conteniendo un agregado de ácido tricloroacético, y ácido tricloroacético más glicerofosfato en concentraciones iguales a las usadas en las determinaciones de fosfato inorgánico y fosfatasa en sueros, respectivamente. Partes alícuotas de 7, 5, 3, y 1 ml dan resultados similares, los cuales se han omitido aquí para ahorrar espacio.

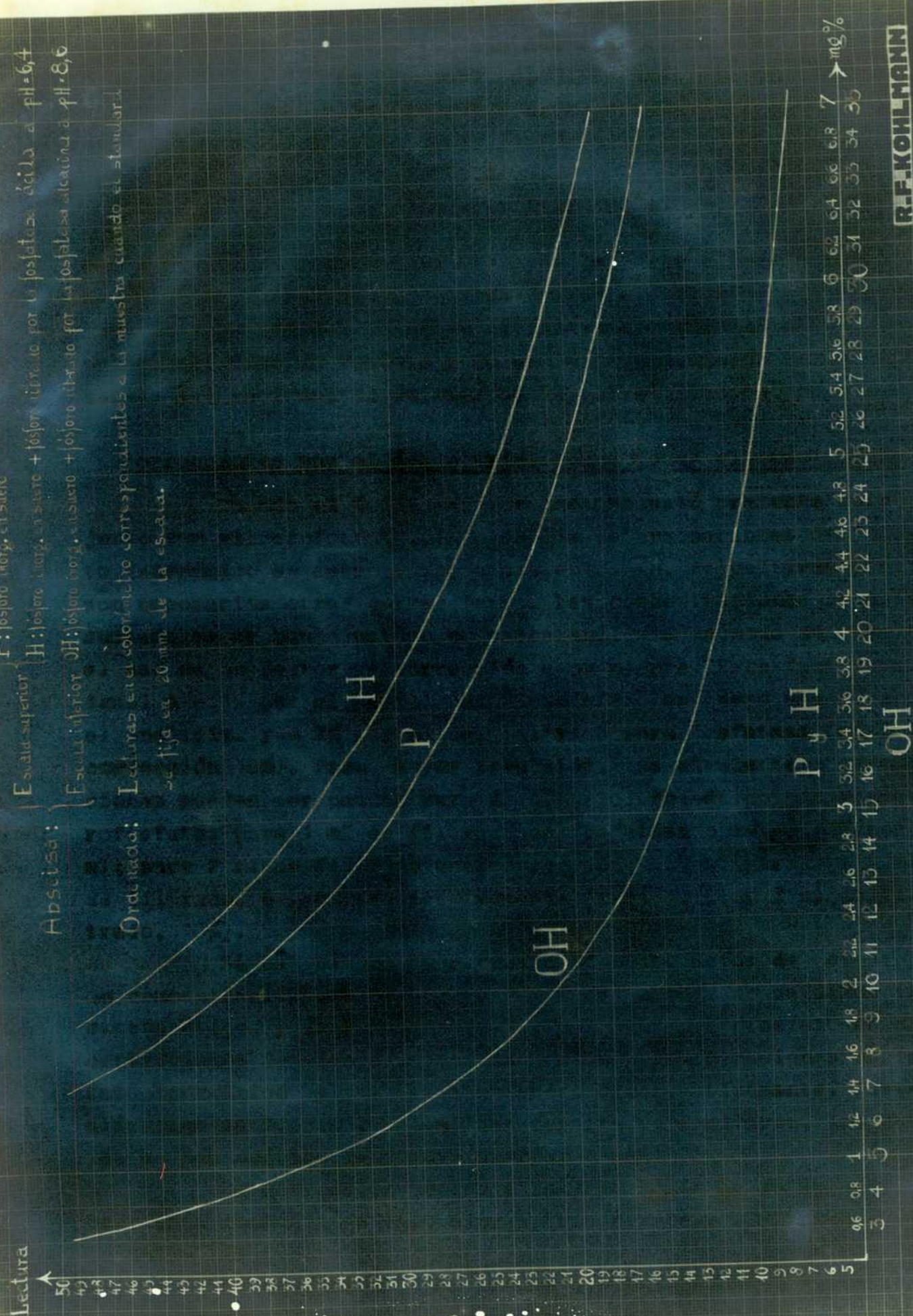
La corrección debida a la desviación de la ley de Beer está incluida en los valores "sin corregir" T (tomados de la tabla XIV).

Estas correcciones pueden ser aplicadas al valor final (P inorgánico en 100 ml) o bien, como hizo Bodansky, al valor T. Algunos valores, antes y después de corregidos, están dados en las tablas XVI y XVII (d).

Estos cálculos no presentan ninguna dificultad con las fórmulas indicadas. Sin embargo resultan ser mucho más rápidos y cómodos utilizando un método gráfico, especialmente

{ P: fósforo inorg. en suero
 Escala superior H: fósforo inorg. en suero + fósforo inorg. por la fosfatasa ácida a pH=6,4
 Escala inferior OH: fósforo inorg. en suero + fósforo inorg. por la fosfatasa alcalina a pH=8,6

Abscisa: Lecturas en el colorímetro correspondientes a la muestra cuando el estándar se fija en 20 mm de la escala.
 Ordenada:



36	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	mg%
5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35			

R.F. KOHLMANN

CURVAS DE VALORES CORREGIDOS

cuando se trata de un gran número de determinaciones en serie,

Para el cálculo gráfico hemos construido curvas con las cuales se obtiene directamente el valor corregido del contenido en fósforo inorgánico correspondiente a una lectura dada en la escala del colorímetro.

En el gráfico adjunto se pueden observar tres curvas que sirven para calcular los valores corregidos de "P inorgánico en suero", "P inorgánico en suero + P inorgánico puesto en libertad por la fosfatasa alcalina" y "P inorgánico en suero + P inorgánico puesto en libertad por la fosfatasa ácida", respectivamente.

En las ordenadas están acotadas las lecturas de la escala colorimétrica. En las abscisas se han construido dos escalas diferentes; ambas están graduadas en mg de P por 100 ml de suero. La escala superior sirve para las curvas de "P" y "fosfatasa ácida" (H), y la escala inferior debe aplicarse a la curva de "fosfatasa alcalina" (OH).

EXPRESION DE LOS RESULTADOS

Los resultados están expresados en Unidades de actividad fosfatásica de Bodansky, entendiéndose por ello lo siguiente:

P total inorgánico - P inorgánico en suero = unidades de actividad fosfatásica alcalina por 100 ml de suero, cuando la hidrólisis se ha prolongado por una hora a 37° C. (mg de P inorgánico liberado del glicerofosfato a pH 8,6).

También se puede expresar así: Una unidad de actividad fosfatásica alcalina se define como el equivalente a la liberación de 1 mg de P (como $PO_4^{=}$) durante la primera hora de incubación, bajo las condiciones descritas. Cuando se trata de la fosfatasa ácida se sustituye el pH 8,6 por pH 6,4.

El P inorgánico se expresa en mg de P por 100 ml de suero.

Como se acaba de explicar en la parte de "cálculos" los resultados se pueden expresar directamente o bien aplicando correcciones empíricas debido al incumplimiento de la ley de Beer y la presencia de β -glicerofosfato y ácido tricloroacético.

RESULTADOS EXPERIMENTALES

Estos se hallan detallados en las tablas de las páginas 21 a 26.

En la segunda columna de las tablas 1, 2 y 4 y la tercera columna de las tablas 5 y 6 figura "tiempo en horas". Este dato se refiere al tiempo transcurrido entre el momento de la extracción de la muestra y la determinación de la actividad fos

fatásica en el suero. El tiempo que se dejó pasar entre el momento de la extracción de la sangre y la separación del suero por centrifugación estaba sujeto a la velocidad de contracción del coágulo, que variaba entre 2 y 8 horas. Cuando el suero se usó recién al día siguiente, se lo guardaba en la heladera con una gota de toluol como conservador.

ACTIVIDAD FOSFATASICA EN SUEROS DE ADULTOS NORMALES

Hemos efectuado 62 determinaciones, cuyos resultados están consignados en las tablas 1, 2 y 4.

Estos resultados pueden estudiarse bajo diversos puntos de vista:

- 1) Discrepancias entre los valores individuales y el promedio hallado.
- 2) Relación entre el contenido en fosfatasa ácida y alcalina.
- 3) Diferencia entre los valores corregidos y no corregidos.
- 4) Variación de la actividad fosfatásica cuando el suero es guardado en la heladera, por varias horas, o días.
- 5) Reproducibilidad de los resultados (experimentos por duplicado).

1) Como puede observarse en las tablas 1 y 2 los valores obtenidos difieren muy poco del promedio calculado y se hallan entre límites bastante estrechos. Cabe destacar que en los casos patológicos en los cuales la actividad fosfatásica sufre alguna variación, éste suele ser enorme respecto del contenido normal; por ejemplo los casos N^o 5 y 9 de la tabla 6.

Conclusión: Los valores promedios normales corregidos para el adulto son

Fosfatasa alcalina: 2,0 Unidades Bodansky

Fosfatasa ácida : 1,0 Unidad Bodansky

Los valores normales oscilan entre:

Fosfatasa alcalina: 1,0 - 4,3 Unidades Bodansky

Fosfatasa ácida : 0,1 - 2,5 Unidades Bodansky

2) En la obra de Gradwohl (d) se puede observar en la parte de "interpretación", que transcribimos más adelante, que algunos autores dan cierta importancia a la relación entre la fosfatasa ácida y la fosfatasa alcalina. Esta relación se ha calculado en forma de porcentaje como se puede ver en las columnas 6 y 10 de las tablas 1 y 2, de la siguiente manera: unidades de fosfatasa ácida que corresponderían a una cantidad de suero que tuviese 100 unidades de fosfatasa alcalina. En la parte de interpretación mencionada (d) están citados dos trabajos de

Huggins (73 y 74) según los cuales el porcentaje de la fosfatasa ácida sería normalmente 3%. Deseraciadamente no hemos podido encontrar esta afirmación en los trabajos originales, ni tampoco confirmarla experimentalmente. Como se puede ver en la columna 10 de las tablas 1 y 2 el dato promedio corregido de

porcentaje de fosfatasa ácida = 50%
y el dato no corregido (columna 6) es = 30%

La diferencia entre los valores corregidos y no corregidos es bastante grande en este caso, debido a que los datos de fosfatasa alcalina corregidos son menores que los no corregidos, mientras que con la fosfatasa ácida ocurre la inversa.

3) Evidentemente para lograr mayor exactitud en los resultados es conveniente calcular los datos corregidos. En sueros normales, sin embargo, la diferencia entre los valores corregidos y no corregidos es pequeña, salvo en lo que atañe la fosfatasa ácida. Cuando los valores son elevados la diferencia absoluta también crece; pero en estos casos tampoco no tiene mayor importancia, porque lo mismo importa que un individuo posea por ejemplo 23,7 ó 29,8 unidades de fosfatasa alcalina para afirmar la existencia de un caso patológico.

4) Como se puede observar en la tabla 4 hemos efectuado determinaciones de fosfatasa en varios sueros y luego repetido estas determinaciones con los mismos sueros al día siguiente. De acuerdo a lo expresado ya en la parte de "técnica" se observó en general un aumento de la actividad fosfatásica. Como en muchas oportunidades ha sido imposible repetir la determinación al día siguiente por falta de suero, se han clasificado las demás experiencias simples en dos grupos según las tablas 1 y 2. En la tabla 1 se han colocado los datos obtenidos a las pocas horas de extraída la sangre, y en la tabla 2 figuran los resultados surgidos de otras muestras, analizadas recién al día siguiente.

Salta a la vista que los promedios calculados en ambos casos coinciden prácticamente. Algunos sueros se han guardado por 48 horas y los resultados que se observan al final de la tabla 2 son notoriamente bajos.

En definitiva podemos afirmar que para obtener un dato que posea un cierto valor diagnóstico es necesario efectuar la determinación de la actividad fosfatásica dentro de las 24 horas de extraída la sangre.

5) En algunos casos, en los cuales la cantidad de suero así lo permitía, hemos realizado experiencias por duplicado según lo indicado al final de la tabla 4 y primera parte de la tabla 5. En ningún caso los datos de fosfatasa alcalina diferían en más del 16%, mientras que en un caso, la fosfatasa ácida arrojaba un dato que discrepaba en un 30% de otro duplicado.

Esta aparente menor fidelidad de las determinaciones de la fosfatasa ácida se puede explicar de la siguiente manera: El sustrato para la determinación de la fosfatasa alcalina posee un poder buffer mucho mayor debido a la presencia del dietilbarbiturato sódico, que el sustrato de la fosfatasa ácida, en el cual falta esta sustancia. Cabe destacar aquí que los sustratos se han sometido a un riguroso control de pH, especialmente los sustratos de pH 6,4, no solamente en el momento de su preparación, sino también posteriormente y antes de utilizarlos. En ningún caso fué posible observar alguna modificación del pH inicial.

ACTIVIDAD FOSFATASICA EN SUEROS DE NIÑOS RECIEN NACIDOS

La sangre se obtuvo de la fontanela en todos los casos. Debe apuntarse aquí un hecho curioso: todas las muestras sin excepción estaban algo hemolizadas o sea que los sueros, una vez obtenidos por centrifugación, mostraban un color más o menos rosado y a menudo hasta rojizo. (Debemos advertir que la sangre se recogía en material de vidrio bien seco)

Las determinaciones se han efectuado siempre a las 4 horas de extraída la muestra.

En la primera parte de la tabla 3 pueden verse los resultados. En las columnas 2, 3 y 4 se han consignado las anotaciones relacionadas con los lactantes, como ser sexo, peso, y edad en horas, días o meses. La edad del niño mayor llega a 6 días.

Los datos correspondientes a la fosfatasa alcalina muestran mayor irregularidad que en el adulto normal. Pero con la fosfatasa ácida sucede algo realmente sorprendente, pues se obtienen valores prácticamente igual a cero. En cambio el promedio calculado de fosfatasa alcalina es igual a 2,5 Unidades Bodansky, o sea sólo ligeramente superior al dato correspondiente al adulto normal.

Para disipar cualquier duda que pudiese asaltar al lector respecto de lo ocurrido con la fosfatasa ácida puede manifestarse lo siguiente: para demostrar que los resultados obtenidos eran achacables únicamente a la naturaleza peculiar de los sueros de los recién nacidos se ha acompañado siempre a la serie de sueros de lactantes de un suero de adulto normal, y este último arrojaba datos normales.

De los datos anotados al final de la tabla 3 surge, que en los niños de edad más avanzada (varios meses) se produce un aumento notable de la fosfatasa alcalina, mientras que la fosfatasa ácida permanece estacionaria.

ACTIVIDAD FOSFATASICA EN SUEROS DE ENFERMOS CANCEROSOS

Fueron examinados los sueros de 28 enfermos cuyos diagnósticos no dejaban lugar a duda. Los resultados figuran en la tabla 5. Salvo los casos N° 12 y 23, se han obtenido resultados sumamente parejos y muy poco diferentes del promedio calculado. Llama la atención la similitud del contenido en fósforo inorgánico de los sueros ensayados, siempre levemente superior al contenido en sueros normales. Los valores de la fosfatasa alcalina también oscilan entre límites muy estrechos, mientras que la fosfatasa ácida presenta niveles más irregulares, llegando en varios casos al valor cero.

El promedio calculado de fosfatasa alcalina es algo superior al considerado normal, pero los resultados individuales no sobresalen de los límites normales en adultos. El valor promedio de fosfatasa ácida se halla debajo de lo normal y los datos individuales tampoco aquí no exceden los límites normales.

Los casos que arrojaron resultados anormales son: un enfermo con un cáncer de próstata (N° 12) que tenía una cantidad muy elevada de fósforo en el suero, pero las fosfatasas eran normales; y otro paciente con una neoplasia de laringe llegó a poseer 11,6 unidades de fosfatasa alcalina.

Según expondremos en la parte de "Interpretación y valor diagnóstico" varios investigadores han llegado a conclusiones contradictorias sobre el contenido de fosfatasa en suero de cancerosos en general y en particular con metastasis.

Aquí se constata lo siguiente:

1) De los 28 casos examinados, uno solo presentó un aumento de la fosfatasa alcalina, y este precisamente no sufría de metastasis ni adenopatía.

2) Ninguno de los 28 enfermos arrojó un dato anormal de fosfatasa ácida.

3) Ninguno de los 8 enfermos con metastasis o adenopatías resultó con actividad fosfatásica anormal.

De los resultados obtenidos se deduce que la determinación de fosfatasa aplicada al diagnóstico de metastasis incipientes y avanzadas es de poco valor. Si entre los 20 casos sin metastasis aparente hubiera habido algunos con metastasis, la actividad fosfatásica no los habría puesto en evidencia.

CASOS ESPECIALES

Las dos primeras determinaciones anotadas en la tabla 6 se han efectuado con sueros provenientes de sangres parcialmente hemolizadas de adultos normales. Ambos arrojaron datos bajos de fosfatasa alcalina. Los casos 3 y 4 padecían de un tumor, pero no se había podido formular un diagnóstico concreto. El

caso N° 5 corresponde a una ictericia por retención y la muestra N° 9 provenía de una niña hidrocefálica de un año de edad. En ambos casos se constató un contenido sumamente elevado de fosfatasa alcalina, mientras que la fosfatasa ácida permanecía normal. Las determinaciones N° 6, 7 y 8 sirvieron para establecer la importancia de separar en cuanto antes el suero, una vez extraída la sangre. Se puede observar, que dejando el suero en contacto con los glóbulos durante 30 horas a 7° C se obtiene un resultado aun aceptable, pero transcurridas 100 horas resultan datos muy bajos.

TABLAS DE VALORES

En ellas se hallan detallados todos los resultados experimentales que hemos obtenido a lo largo de nuestra investigación.

Volvemos a insistir aquí que las actividades fosfatásicas ácida (pH 6,4) y alcalina (pH 8,6) están expresadas en unidades Bodansky por 100 ml de suero.; y el fósforo inorgánico en mg por 100 ml de suero.

Tabla 1

SUERO DE ADULTOS NORMALES

Nº	Tiempo en horas	NO CORREGIDO				CORREGIDO			
		P inorg.	Fosfatasa alcal.	ácida	%	P inorg.	Fosfatasa alcal.	ácida	%
1	6	2,8	3,3	-	-	2,4	3,2	-	-
2	6	3,9	2,0	0,6	30	3,7	1,8	1,0	57
3	4	3,2	1,5	-	-	2,9	1,1	-	-
4	4	3,4	1,7	0,7	41	3,2	1,3	1,1	82
5	4	3,6	1,8	-	-	3,4	1,5	-	-
6	4	3,7	2,7	-	-	3,5	2,5	-	-
7	6	3,2	1,2	0,1	11	2,9	0,7	0,3	40
8	6	3,1	1,5	0,03	2	2,8	1,0	0,1	10
9	6	3,0	2,1	0,7	30	2,7	1,8	0,9	50
10	8	4,5	2,7	0,1	4	4,4	2,7	0,3	12
11	8	3,2	1,8	0,3	16	2,9	1,5	0,5	31
12	8	3,9	2,4	0,6	26	3,8	2,2	0,9	40
13	8	3,4	2,7	1,0	36	3,2	2,5	1,4	54
14	8	2,9	2,1	0,4	19	2,6	1,8	0,5	30
15	8	4,0	-	0,6	-	3,9	-	0,8	-
16	2	3,9	4,0	0,7	17	3,8	4,3	1,1	22
17	6	4,1	2,6	0,6	24	4,0	2,4	0,9	39
18	6	4,3	2,1	0,3	14	4,3	2,0	0,6	29
19	8	5,3	4,0	-	-	5,4	4,4	-	-
20	4	3,5	2,3	-	-	3,3	2,1	-	-
21	4	3,0	2,9	0,5	14	2,7	2,8	0,8	23
22	7	3,9	1,7	-	-	3,8	1,4	-	-
23	7	4,5	2,5	-	-	4,4	2,5	-	-
24	7	4,3	1,6	-	-	4,3	1,3	-	-
25	6	4,5	2,2	1,1	47	4,4	2,0	1,6	82
26	6	3,6	3,5	1,5	43	3,5	3,6	2,0	56
27	7	3,8	3,0	1,8	59	3,6	3,1	2,5	82
28	7	4,7	2,2	-	-	4,7	2,0	-	-
29	7	2,7	1,9	-	-	2,5	1,3	-	-
30	6	2,8	1,8	-	-	2,4	1,4	-	-
31	6	3,2	2,1	0,3	15	2,9	1,9	0,5	27
32	6	3,2	1,6	-	-	2,9	1,1	-	-
33	6	3,0	1,6	-	-	2,6	1,1	-	-
34	6	2,9	2,2	0,3	14	2,5	2,0	0,5	24
35	6	3,2	1,7	0,3	17	2,9	1,3	0,5	38
36	6	4,0	-	0,9	-	3,9	-	1,3	-
37	6	3,8	-	0,5	-	3,6	-	0,8	-
38	6	3,8	2,1	-	-	3,7	1,9	-	-
39	6	3,3	2,2	-	-	3,1	1,9	-	-
40	6	3,1	2,4	0,5	21	2,8	2,2	0,7	30
41	6	3,5	2,5	0,3	12	3,2	2,4	0,5	23
PROMEDIO Tabla 1:		3,6	2,3	0,6	27	3,3	2,0	1,0	50

Tabla 2

SUERO DE ADULTOS NORMALES

Nº	Tiempo en horas	NO CORREGIDO				CORREGIDO			
		P inorg.	Fosfatasa alcal. ácida	%	P inorg.	Fosfatasa alcal. ácida	%		
1	24	4,2	1,6	0,4	24	4,0	1,2	0,7	60
2	24	3,7	2,0	-	-	3,5	1,8	-	-
3	24	3,6	3,6	-	-	3,4	3,7	-	-
4	24	4,7	2,6	-	-	4,7	2,7	-	-
5	24	6,7	1,3	-	-	7,1	1,1	-	-
6	24	4,5	1,9	-	-	4,5	1,6	-	-
7	24	3,1	2,8	0,8	30	2,8	2,7	1,2	43
8	24	3,7	2,1	0,6	26	3,7	1,9	0,8	44
9	24	4,1	-	0,7	-	4,0	-	1,0	-
10	24	4,1	2,6	-	-	4,0	2,3	-	-
11	24	3,0	1,8	0,8	46	2,6	1,4	1,2	86
12	24	3,1	1,9	-	-	2,7	1,6	-	-
13	24	4,3	2,0	-	-	4,2	1,7	-	-
14	24	3,4	2,6	-	-	3,2	2,5	-	-
15	24	4,2	1,7	-	-	4,1	1,4	-	-
16	24	4,0	-	-	-	3,8	-	-	-
17	24	3,9	2,1	-	-	3,8	1,8	-	-
PROMEDIO Tabla 2:		4,0	2,2	0,7	32	3,9	2,0	1,0	50
PROMEDIO Tablas 1 y 2 :		3,7	2,3	0,7	30	3,5	2,0	1,0	50
1	48	2,9	1,7	-	-	2,6	1,2	-	-
2	48	2,6	1,6	0	0	2,2	1,1	0	0
3	48	6,4	1,3	-	-	6,8	1,0	-	-
4	48	3,9	2,6	-	-	3,8	2,5	-	-

Tabla 3

SUERO DE NIÑOS NORMALES

(La determinación se efectuó en todos los casos a las 4 horas de extraída la sangre)

Nº	SEXO	PESO Kg	EDAD	NO CORREGIDO				CORREGIDO			
				P in.	Fosfatasa alc.	ác.	%	P in.	Fosfatasa alc.	ác.	%
1	F	3,650	19 h	5,3	4,3	0	0	5,4	4,8	0,3	5
2	F	3,400	24 h	5,4	-	-	-	5,6	-	-	-
3	F	3,080	24 h	5,7	-	-	-	5,9	-	-	-
4	F	3,350	24 h	6,5	2,1	-	-	6,9	2,0	-	-
5	M	5,300	8 h	5,3	2,0	0	0	5,4	1,9	0	0
6	M	3,180	13 h	4,3	2,8	-	-	4,2	2,8	-	-
7	F	3,500	24 h	6,1	2,4	-	-	6,4	2,4	-	-
8	F	4,000	14 h	5,4	2,2	-	-	5,6	2,1	-	-
9	F	3,140	5 h	4,8	2,9	-	-	4,9	2,9	-	-
10	F	3,340	24 h	5,4	2,1	-	-	5,6	2,0	-	-
11	F	3,830	14 h	5,3	1,9	-	-	5,4	1,7	-	-
12	M	3,840	10 h	5,5	1,8	0	0	5,7	1,6	0	0
13	M	-	26 h	5,0	1,4	0	0	5,1	1,0	0	0
14	M	3,930	23 h	6,5	2,9	0	0	7,0	3,1	0	0
15	F	2,940	1 d	5,1	3,1	0	0	5,2	3,2	0	0
16	M	4,120	1 d	6,7	3,1	0	0	7,1	3,4	0	0
17	M	2,900	2 1/2 d	5,9	-	0	-	6,2	-	0	-
18	M	3,000	5 d	6,9	0,8	0	0	7,5	0,4	0	0
19	F	3,800	6 d	5,7	3,6	0	0	5,9	4,0	0,04	1
20	M	4,180	4 d	6,3	2,1	0	0	6,6	2,0	0	0
21	M	4,100	2 d	4,6	3,3	0	0	4,7	3,5	0,1	4
22	M	3,840	2 d	6,5	2,5	0	0	6,9	2,7	0	0
23	M	3,620	2 d	7,2	2,0	-	-	7,9	1,9	-	-
24	M	3,370	6 d	4,8	-	0	-	4,8	-	0	-
25	F	3,280	5 d	5,8	2,2	0	0	6,0	2,2	0	0
26	F	3,370	2 d	5,9	2,8	0	0	6,2	3,0	0	0
PROMEDIO:				5,7	2,5	0	0	5,9	2,5	0	0
27	F	2,750	2 m	7,2	2,0	0	0	7,7	2,1	0	0
28	M	2,800	2 m	5,9	4,4	0	0	6,2	5,1	0	0
29	F	3,600	3 m	6,7	5,8	0	0	7,1	6,9	0	0
30	M	3,700	5 1/2 m	6,2	2,8	0	0	6,5	3,0	0,13	4

Nota: El n° 28 había padecido de sífilis, pero en el momento de extraer la muestra se consideró curado.

Tabla 4

VARIACION DEL FOSFORO INORGANICO Y DE LA ACTIVIDAD FOSFATA-
SICA EN FUNCION DEL TIEMPO - REPRODUCIBILIDAD DE LOS DATOS

Nº	Tiempo en horas	NO CORREGIDO				CORREGIDO			
		P inorg.		Fosf. alc.		P inorg.		Fosfatasa alc.	
		mg	% dif.%	Unid.	% dif.%	mg	% dif.%	Unid.	% dif.%
1	7	3,9		1,7		3,8		1,4	
	24	3,7	-5	2,0	+16	3,5	-7	1,8	+29
2	7	4,5		2,5		4,4		2,5	
	24	3,6	-20	3,6	+43	3,4	-24	3,7	+47
3	24	6,7		1,3		7,1		1,1	
	48	6,4	-4	1,3	0	6,8	-5	1,0	-10
4	7	4,3		1,6		4,3		1,3	
	24	4,5	+4	1,9	+19	4,5	+5	1,6	+30
5	24	3,1		-		2,8		-	
	48	3,8	+23	-	-	3,7	+33	-	-
6	24	4,1		2,6		4,0		2,3	
	48	3,9	-4	2,6	0	3,8	-5	2,5	+6
7	24	9,7		-		10,9		-	
	48	10,0	+3	-	-	11,2	+3	-	-
8	6	4,5		-		4,4		-	
	30	4,4	-2	-	-	4,4	0	-	-
9	6	3,6		-		3,5		-	
	30	4,0	+10	-	-	3,9	+12	-	-
10	7	2,7		1,9		2,7		1,3	
	24	3,1	+15	1,9	0	2,7	+21	1,6	+22
11	24	4,3		-		4,2		-	
	48	4,3	0	-	-	4,2	0	-	-
12	24	3,4		-		3,2		-	
	48	3,5	+3	-	-	3,3	+5	-	-
13	24	4,2		-		4,1		-	
	48	4,3	+2	-	-	4,2	+2	-	-
14	6	3,2		-		2,9		-	
	24	4,0	+23	-	-	3,8	+31	-	-
15	6	3,2		1,7		2,9		1,3	
	24	3,9	+25	2,1	+23	3,8	+32	1,8	+26
16	6	3,9		2,1		3,7		1,9	
	6	3,3	13	2,2	5	3,1	16	1,9	0
17	6	4,0		Fosf.ác.		3,9		Fosfatasa ácida	
	6	3,5	5	0,9 0,6	33	3,6	8	1,3 0,9	30

Tabla 5

SUEROS DE ENFERMOS CANCEROSOS

Nº	LESION	Tiempo en hs.	NO. CORREGIDO				CORREGIDO			
			P in.	Fosfatasa alc.	ác.	%	P in.	Fosfatasa alc.	ác.	%
1	Neo de cara; metástasis en maxilar	6	3,5 3,6	2,8 2,8	0,6 -	21 -	3,3 3,5	2,7 2,6	0,8 -	31 -
2	Neo de nariz	6	3,3 3,3	3,0 3,2	0,5 0,7	17 22	3,0 3,0	2,9 3,2	0,8 1,0	26 31
3	Neo de recto	6	4,3 4,1	2,5 2,5	0,3 0,5	12 20	4,3 4,0	2,4 2,4	0,5 0,7	19 31
4	Neo de cara; metástasis en maxilar	6	4,0 4,1	- 2,6	0,4 0,4	15 15	3,9 4,0	- 2,5	0,8 0,6	30 26
5	Neo de labio; adenopatía de cuello	6	4,8 4,4	2,1 2,3	0,6 0,6	29 26	4,8 4,3	2,0 2,3	1,1 1,1	55 48
6	Neo de la base de la lengua	6	4,5	2,9	0,3	10	4,5	3,0	0,5	15
7	Neo de seno glosopiglótico	6	4,5	2,2	0,2	9	4,5	2,1	0,4	17
8	Neo de fosa nasal; adenopatía de cuello	6	4,2	2,4	0,0	0	4,1	2,3	0,2	7
9	Tumor de garganta operado; tratado con radioterapia	6	4,4	2,3	0,0	0	4,3	2,3	0,3	11
10	Neo de laringe	6	4,5	2,6	0,2	8	4,4	2,7	0,5	17
11	Neo de laringe; adenopatía cervical	6	4,0	2,3	0,3	13	3,9	2,1	0,6	29
12	Cáncer de próstata	6	9,3	2,1	0,0	0	10,4	2,2	0	0
13	Neo de labio inferior	6	3,8	-	0	-	3,6	-	0,13	-
14	Neo de piel cara	6	4,5	2,1	0	0	4,4	2,0	0	0
15	Neo de labio inferior; adenopatía submaxilar izquierdo	6	4,2	1,8	0	0	4,1	1,5	0	0
16	Neo de pene; adenopatía inguinal	6	5,0	1,9	0	0	5,1	1,7	0	0
17	Neo de pene; adenopatía inguinal	6	5,0	2,7	0	0	5,1	2,7	0	0
18	Neo de pene	6	3,7	3,2	0,4	13	3,5	3,3	0,6	18
19	Neo de laringe	6	3,7	2,9	0,8	28	3,6	2,8	1,1	39
20	Neo de ano	2	4,6	3,6	0,5	14	4,6	3,9	0,9	22
21	Neo de párpado inferior derecho propagado a maxilar superior	2	4,2	3,0	0,6	20	4,1	3,1	0,9	29
22	Neo de laringe	2	3,8	1,9	0,5	26	3,6	1,7	0,8	47
23	Neo de laringe	2	4,7	9,6	0,3	3	4,7	11,6	0,6	5
24	Linfo S. de hombro	6	3,7	1,7	0	0	3,5	1,4	0,1	7
25	Neo piel cuello	6	5,1	1,7	0	0	4,2	1,4	0	0
26	Neo de velo paladar	6	4,8	1,9	0	0	4,9	1,6	0	0
27	Tumor maxilar superior lado derecho	6	3,8	1,9	0	0	3,7	1,5	0,1	7
28	Cáncer de próstata	6	3,6	-	0	-	3,4	-	0	-
PROMEDIO:			4,2	2,7	0,3	10	4,1	2,7	0,5	19

Tabla 6

CASOS ESPECIALES

Nº	OBSERVACION	Tiem po en hs.	NO CORREGIDO				CORREGIDO			
			P in.	Fosfatasa alc.	ác.	%	P in.	Fosfatasa alc.	ác.	%
1	Hemólisis parcial	48	2,9	1,7	-	-	2,6	1,2	-	-
2	Hemólisis parcial	8	3,6	1,9	-	-	3,4	1,5	-	-
3	Tumor ?	6	2,9	0,9	0,3	31	2,6	0,7	0,4	54
4	N.N.	7	4,7	2,2	0	0	4,7	2,0	0,2	8
5	Ictericia obstructiva	2	4,1	23,7	1,0	4	4,0	29,8	1,4	5
6	Se guardó la sangre coagulada a 7° C por 100 horas	-	3,8	1,3	0	0	3,7	0,7	0	0
7	íd.	-	3,4	1,5	0,3	20	3,1	1,1	0,5	46
8	íd.pero por 30 hs.	-	3,6	2,4	0,5	12	3,4	2,2	0,8	36
9	Niña hidrocefálica de 1 año de edad	4	3,5	14,7	0,7	5	3,3	18,2	1,0	6

Nota: N.N (Nº 4) padecía de un tumor en el brazo derecho de naturaleza no bien establecida.

INTERPRETACION Y VALOR DIAGNOSTICO

El cuadro que sigue indica en qué enfermedades se ha constatado un aumento de la actividad fosfatásica en suero o plasma.

Aumento del contenido en fosfatasa

Fosfatasa en	Enfermedad	Bibliografía	Observación
plasma	ictericia maligna (no hemolítica)	9 - 121	50 casos provocados en perros
plasma	metastasis a huesos	134	84% sobre 506 casos
plasma	metastasis	102	
plasma	raquitismo	111	
suero	enfermedad de Basedow hipertiroidismo	86 - 117	
suero	tumor	95	
suero	enfermedades del hígado	34	
suero	hiperparatiroidismo	70	

Gutman y colaboradores (70) han efectuado extensos estudios sobre la fosfatasa alcalina (pH 8,6) utilizando el método de Bodansky. Los resultados experimentales fueron los siguientes: se encontró un aumento de la actividad fosfatásica en sangre en todos los casos de hiperparatiroidismo clásico con cambios determinados en los huesos. En pacientes con enfermedad de Paget la actividad fosfatásica del suero se hallaba invariablemente aumentada en los casos de enfermedad avanzada, alcanzando hasta valores 40 veces del normal. El nivel de la fosfatasa en suero es groseramente proporcional a la extensión del involucrimiento de los huesos y es probablemente afectado también por la actividad de la lesión ósea. En este sentido la determinación puede poseer valor pronóstico. Un aumento de la actividad fosfatásica en sangre no es específico para la enfermedad de Paget. Tampoco sirve generalmente como ayuda para distinguir casos de metastasis osteoplásticas de los huesos, en los cuales la actividad fosfatásica también está aumentada. En el mieloma múltiple la actividad fosfatásica en suero es generalmente normal o levemente aumentada. En casos de carcinoma con metastasis extensivas, particularmente osteolíticas, la actividad fosfatásica en suero se encuentra por lo común moderadamente aumentada o esencialmente normal. En casos de carcinoma con metastasis extensivas, predominantemente osteoplásticas, la actividad fosfatásica en suero puede llegar a ser tan elevada como en la enfermedad de Paget avanzada.

Fosfatasa en el suero en el carcinoma y su utilidad para el diagnóstico

En primer lugar deben mencionarse los trabajos de Kay (86, 62). Este investigador observó un poder de desfosforilización aumentado en la sangre humana en presencia de tumores malignos. Köhler confirmó el hecho hallado por Kay de un notable aumento de fosfatasa en la sangre carcinomatosa. Existen varios resultados experimentales sobre un poder de desfosforilización aumentado en suero de enfermos con tumores, especialmente en relación con metastasis a glándulas y a huesos (11, 64, 70, 135). Algunos autores encuentran un aumento de fosfatasa en metastasis a huesos y glándulas, mientras que otros solamente en el primer caso.

En oposición a lo mencionado tenemos los trabajos de Bowman y Pitts, etc. (45, 139), los cuales sólo por excepción han podido demostrar un aumento de fosfatasa en suero y más bien una disminución del poder fosfatásico, particularmente en animales con carcinoma de Walter.

Recientemente Gutman (69) demostró en una serie de determinaciones en carcinomas de próstata con metastasis la existencia de un aumento pronunciado de una fosfatasa "ácida" con un óptimo de actividad alrededor de pH 5. Pacientes con otras dolencias, salvo una excepción, no mostraban dicho aumento.

En publicaciones recientes (7, 22, 102) figuran determinaciones en serie de fosfatasa en plasma sanguíneo (por el método de Jenner y Kay) en enfermos con y sin carcinomas, con especial atención a la existencia de metastasis (18). Resultó que sobre 22 casos con metastasis segura, 19 presentaban un aumento de fosfatasa en plasma, y tanto mayor, cuanto más extensión poseía la metastasis. En tumores malignos, pero sin metastasis, no se halló ningún aumento de la fosfatasa. Sueros de cadáveres daban iguales resultados. La fosfatasa en plasma puede proporcionar un medio pronóstico muy útil para saber si todavía es posible una operación radical, o si es mejor evitar una operación ya inútil para el paciente, debido a una metastasis ya producida.

Sin embargo no debe dejarse de lado en la aplicación al diagnóstico diferencial otras enfermedades, porque las del hígado (por ejemplo ictericia por retención) y enfermedades óseas (como raquitismo, osteítis deformante, osteítis fibrosa, etc.) relacionadas con formación de tejidos nuevos y otros cambios acarrear también un aumento de la actividad fosfatásica.

A continuación presentamos una traducción del capítulo referente a "interpretación" que aparece en la obra de Gradwohl (d).

"En el adulto, la actividad fosfatásica normal está comprendida entre 1,5 y 4,0 unidades por 100 ml, con un promedio de 2,7; en los niños, de 5 a 12 unidades, con un promedio de 8. En la enfermedad de Paget con involucramiento múltiple de los huesos la actividad fosfatásica en el suero sanguíneo puede llegar a ser veinte veces el valor normal. Smith (137) informó que la fosfatasa en sangre está aumentada en el raquitismo activo, correspondiendo el grado de aumento a la gravedad de la enfermedad. En la ictericia obstructiva Roberts (121) halló la fosfatasa sanguínea muy elevada, pero en todas las otras variedades de ictericia el valor era normal o sólo ligeramente aumentado, aun cuando el paciente sufría de severa ictericia. Roberts creyó que la reacción de la fosfatasa podría ser utilizada para diferenciar la ictericia obstructiva de la ictericia tóxica. En otras condiciones de patología múltiple de los huesos la prueba de la fosfatasa puede tener valor.

Yaguda (145) encontró en tres casos de osteogénesis imperfecta que la actividad de la fosfatasa sanguínea era normal. En un caso de anemia eritroblástica con cambios marcados en todo el sistema y en dos casos de mieloma, la actividad fosfatásica estaba dentro de los límites normales. En una serie de fracturas, los valores en unidades Bodansky estaban comprendidos entre 5,5 y 6,5, lo cual está sobre el límite normal para adultos. Yaguda halló, que valores elevados en casos de fracturas con lesiones múltiples indicaban alguna relación con la gravedad de las lesiones. No encontró ningún aumento de fosfatasa sanguínea en artritis. Yaguda creyó que la actividad fosfatásica en sangre tiene significado clínico en cambios patológicos de los tejidos, especialmente los huesos, y que su determinación posee verdadero valor diagnóstico en la enfermedad de Paget, raquitismo activo e ictericia, y que es de ayuda material en el consiguiente tratamiento de estas dolencias.

El informe de Roe y Whitmore mostró que la fosfatasa está relacionada con la actividad osteoblástica. Por eso su determinación es de particular valor en las lesiones óseas. Ha sido descrita una serie de casos, indicando en cuales de ellos las determinaciones de fosfatasa poseen un valor diagnóstico diferencial. Ellos han mostrado que la fosfatasa está aumentada en metastasis osteoblástica en el carcinoma de huesos, como así mismo en la mayoría de los casos de cáncer de próstata. No estaba incrementada en metastasis osteolítica en el carcinoma de huesos, ni tampoco en cáncer de pecho. Ellos demostraron que la fosfatasa se encontraba elevada en algunas metastasis de cáncer

mamario a huesos, como se ilustró en un caso. Ellos también señalaron que no hay aumento de fosfatasa en carcinoma con metastasis que no sean de huesos. Además ellos demostraron que los estudios de fosfatasa son de gran valor en la investigación de enfermedades de los sistemas linfoide y mieloide. Teniendo en cuenta que la fosfatasa se halla normal o ligeramente elevada en el mieloma múltiple, la determinación de fosfatasa tiene importancia en la diferenciación del mieloma múltiple del hiperparatiroidismo. La fosfatasa está normal en el sarcoma de Ewing; normal o ligeramente elevada en un tumor celular gigante benigno. Además, Roe y Whitmore han mencionado un caso de leucemia aleucémica, de tipo linfoide, con involucramiento extensivo de los huesos, en el cual la fosfatasa en suero estaba debajo de lo normal para la edad del paciente. En definitiva ellos constataron: "La determinación de fosfatasa en suero ayudó aquí grandemente en la diferenciación del caso de hiperparatiroidismo".

Ha sido notado por Huggins y otros (73) que en el carcinoma de próstata hay un aumento marcado de fosfatasa ácida. Puede alcanzar hasta el 50% ó más de la fosfatasa alcalina. Normalmente, la fosfatasa ácida es aproximadamente igual al 3% de la fosfatasa alcalina. Hay un incremento determinado en la cantidad de fosfatasa ácida en el carcinoma de próstata, si no se ha aplicado un tratamiento adecuado. Nótese también que la determinación de fosfatasa ácida es importante para indicar la conveniencia de terapia hormonal o bien una intervención quirúrgica para efectuar la castración, en el tratamiento de enfermedades malignas de la próstata.

Continuando las referencias del trabajo de Huggins (74), éste ha demostrado que en el 50% aproximadamente de los hombres con carcinoma de próstata, la actividad de la fosfatasa ácida en el suero está aumentada, y que este aumento se encuentra únicamente en presencia de metastasis. Puede haber metastasis sin aumento de fosfatasa, pero cuando la fosfatasa está incrementada, se está en presencia de metastasis de carcinoma. En otras palabras, en esta prueba puede haber falsas negativas, pero no falsas positivas."

CONCLUSIONES

OBSERVACIONES GENERALES:

- 1) Se ensayó el método modificado de Bodansky en 129 casos normales y patológicos, determinando la actividad fosfatásica "ácida" y "alcalina" a pH 6,4 y 8,6 respectivamente.
- 2) Hemos encontrado que las determinaciones deben efectuarse dentro de las 24 horas de extraídas las muestras.
- 3) Para la interpretación clínica de los resultados, no es indispensable recurrir a los valores "corregidos" por el incumplimiento de la ley de Beer y la presencia de β -glicerofosfato de sodio y ácido tricloroacético.
- 4) Se ha ideado y construido un gráfico por medio del cual se obtienen directamente los datos "corregidos", resultando con su ayuda un cálculo inmediato de los resultados.

CASOS NORMALES:

- 5) Se estudió el contenido de fosfatasa de 58 sueros de adultos normales, resultando los siguientes datos:
Fosfatasa alcalina: 2,0 U.Bodansky
Fosfatasa ácida : 1,0 U.Bodansky
- 6) Se examinaron los sueros de 26 niños recién nacidos (edad máxima 6 días) resultando los siguientes datos:
Fosfatasa alcalina: 2,5 U.Bodansky
Fosfatasa ácida : 0,0 U.Bodansky
Se desprende de estos resultados, que la actividad fosfatásica alcalina en recién nacidos no es mucho mayor que en adultos, en contraposición de lo afirmado por otros autores (29).
- 7) En cuatro niños de edad comprendida entre 2 y 5 1/2 meses la actividad fosfatásica resultó ser de
Fosfatasa alcalina: 4,3 U.Bodansky
Fosfatasa ácida : 0,0 U.Bodansky
salvo en un caso en que la fosfatasa ácida llegó a 0,13 U.

CASOS PATOLOGICOS: 8) Ictericia por retención:

Fosfatasa alcalina: 29,8 U.Bodansky

Fosfatasa ácida : 1,0 U.Bodansky

9) Niña hidrocefálica de 1 año de edad:

Fosfatasa alcalina: 18,2 U.Bodansky

Fosfatasa ácida : 1,0 U.Bodansky

10) En 28 casos de cancerosos se obtuvo:

Fosfatasa alcalina: 2,7 U.Bodansky

Fosfatasa ácida : 0,5 U.Bodansky

Los resultados están comprendidos dentro de los valores normales de adultos sanos, aunque el promedio resulta ser levemente superior (con excepción del caso N° 23). Cabe señalar además, que ninguno de los enfermos con metastasis o adenopatias resultó poseer una actividad fosfatásica anormal.

Las cifras consignadas corresponden a valores promedios corregidos.

Roberto Kohlmann

BIBLIOGRAFIA CLASIFICADA POR TEMAS

GENERALIDADES, DISTINTAS CLASES DE FOSFATASAS, INFLUENCIA DE DIVERSOS FACTORES SOBRE ELLAS.

Estudios sobre la fosfatasa	23-24-25-54-61-62-83-93-94-144-	[155
Constitución de la fosfatasa	2-6	
Curvas de variación de la estabilidad en función del pH		21
Dos fosfatasas diferentes según el pH	12-13	
Fosfatasa ácida	10-51-131	
Fosfatasa alcalina	59	
Identidad de dos fosfatasas alcalinas	47	
Activación e inhibición de la fosfatasa alcalina		49
Preparación y propiedades de la fosfatasa alcalina		48
Constitución de la fosfatasa alcalina	50	
Identidad entre la fosfatasa de huesos, riñón, intestino y suero		43a-44
La fosfatasa renal	85	
Afinidad entre la fosfatasa y el sustrato	99-109	
Activación aparente de la fosfatasa	1-3-4-5-96	
Activación por iones metálicos	17-55	
Activación por iones magnesio	16-81-88	
Influencia del buffer	14	
Influencia de los colorantes orgánicos sobre la fosfatasa		78

MÉTODOS PARA DETERMINAR LA ACTIVIDAD FOSFATASICA

Determinación del fósforo (colorimetría)	27-30-58-97-98-101-130-	[141-142
Reducción del ácido fosfomolibdico a azul de molibdeno		128-143
Método de Bodansky	30-31-35-36	
Método de Kay	86	
Método de Jenner y Kay	80	
Método de King y Armstrong	91	
Método de Roe y Whitmore	130	
Método de Raymond y Levene	119	
Comparación de los métodos de Jenner-Kay y Bodansky		116
Factores que influyen en la exactitud de la determinación		30-
Desviación de la ley de Beer	28-30-41	[31-43

FOSFATASA EN LA SANGRE

Fosfatasa en sangre	72-106-124-125-126-127	
Fosfatasa en plasma	32-46-86-89-103	
Determinación de la fosfatasa en plasma		80
Valores normales de la fosfatasa en plasma		112-113
Esteres fósforicos en plasma	108	
Fosfatasa en suero	52-53	
Fosfatasa ácida en suero	68-69-105	
Fosfatasa en pequeñas cantidades de suero		114
Fosfatasa en glóbulos rojos	19-20-118-129-132	

FOSFATASA EN LA SANGRE (Continuación)

Fosfatasa en glóbulos blancos	57-75-86
Fosfatasa en suero de niños	23-138
Fósforo y fosfatasa en los perros recién nacidos	33
Microdeterminación de fosfatasa en sangre	66-104
Fosfatasa en suero y bilis	91
Fosfatasa ácida en órganos animales	15-63

CONTENIDO DE FOSFATASA EN CASOS NORMALES Y PATOLOGICOS.

INTERPRETACION Y VALOR DIAGNOSTICO

Interpretación	29-73-74-121-145
Fisiología normal y patológica de la fosfatasa	56-90-107-121
Fosfatasa y enfermedades	120
Fosfatasa en sangre y el cáncer	7-22-102
Fosfatasa en glóbulos rojos y tumores	132-133
Fosfatasa en suero y tumores	11-45-64-69-70-95-132-133-135-139
Fosfatasa en plasma y tumores	7-18-22
Fosfatasa en plasma y metastasis	102
Fosfatasa en plasma y metastasis de huesos	134
Fosfatasa, crecimiento y enfermedades de los huesos	82-84-85a- [87-144a
Fosfatasa y raquitismo	111
Fosfatasa en plasma en el raquitismo y escorbuto	136
Fosfatasa en raquitismo y otros desórdenes de crecimiento	137
Fosfatasa en suero en deficiencia de calcio y osteoporosis de cloruro de amonio	42
Esteatorrea idiopática (Gee's Disease)	26-100
Fosfatasa en suero y enfermedades del hígado	34
Fosfatasa en plasma en ictericia maligna	9-38-40-65-67-71- [121-130a-140
Fosfatasa en suero luego de ligar el conducto biliar en el perro	39
Fosfatasa en plasma, dieta y ayuno	37
Aumento de fosfatasa después de ingerir hidratos de carbono	32
Hormonas y el aumento de fosfatasa en suero	60
Fosfatasa en suero e hipertiroidismo	117
Fosfatasa en sangre y suero en eosinofilia	79
Fosfatasa en sangre y suero en leucemia mieloide crónica	76
Influencia de la luz ultravioleta y rayos Röntgen sobre la fosfatasa en suero	8-77
Acido ascórbico y la actividad fosfatásica	92
Fosfatasa y extirpación de varios órganos	9a

BIBLIOGRAFIA CLASIFICADA POR AUTORES

- (1) Albers H.- Ber.dtsch.chem.Ges. 68, 1443 (1935)
- (2) Albers H.- Z.angew.Chem. 49, 448 (1936)
- (3) Albers H. y E.- Hoppe-Seylers Z. 232, 165 (1935)
- (4) Albers H. y E.- Hoppe-Seylers Z. 232, 189 (1935)
- (5) Albers H. y E.- Hoppe-Seylers Z. 235, 47 (1935)
- (6) Albers H., Beyer, Bohnenkamp y Müller.- Ber.dtsch.chem.Ges. 71, 1913 (1938)
- (7) Albers D.- Z.exper.Med. 104, 146 (1938)
- (8) Albers D.- Fund.Radiol.(D) 5, 157 (1940)
- (9) Armstrong A.R., King E.J. y Harris R.I.- Canad.Med.Assoc. J. 31, 14 (1934)
- (9a) Armstrong A.R. y Banting F.G.- Canad.Med.Assoc.J. 33, 243 (1935)
- (10) Asakawa.- J.Biochem.(e.;Jap.) 11, 143 (1929)
- (11) Astuni.- Soc.lomb.Chir. 4, 679 (1936)
- (12) Bamann E. y Riedel E.- Hoppe-Seylers Z. 229, 125 (1934)
- (13) Bamann E. y Riedel E.- Hoppe-Seylers Z. 230, 175 (1934)
- (14) Bamann E. y Salzer W.- Biochem.Z. 286, 143 (1936)
- (15) Bamann E. y Salzer W.- Biochem.Z. 288, 299 (1936)
- (16) Bamann E. y Salzer W.- Ber.dtsch.chem.Ges. 70, 1263 (1937)
- (17) Bamann E. y Heumüller E.- Naturw. 28, 535 (1940)
- (18) Barengo E.- Chin.Med.Ital.N.S. 70, 21 (1939)
- (19) Barrenscheen y Beneschovsky.- Biochem.Z. 265, 159 (1933)
- (20) Barrenscheen y Beneschovsky.- Biochem.Z. 276, 147 (1935)
- (21) Bauer E.- Hoppe-Seylers Z. 242, 35 (1936)
- (22) Baumert H.- Z.exper.Med. 100, 468 (1937)
- (22a) Beer.- Ann.Physik 86, 78 (1852)
- (23) Belfanti S., Contardi A. y Ercoli A.- Biochem.J. 29, 517 (1935)
- (24) Belfanti S., Contardi A. y Ercoli A.- Biochem.J. 29, 842 (1935)
- (25) Belfanti S., Contardi A. y Ercoli A.- Biochem.J. 29, 1491 (1935)
- (26) Bennet, T.I., Hunter D. y Vaughan J.M.- Quart.J.Med. 1, 603 (1932)
- (27) Berenblum J. y Chain E.- Biochem.J. 32, 295 (1938)
- (28) Bodansky A.- Proc.Soc.Exp.Biol.& Med. 28, 760 (1931)
- (29) Bodansky A.- Arch.Int.Med. 54, 88 (1934)
- (30) Bodansky A.- J.Biol.Chem. 99, 197 (1932)
- (31) Bodansky A.- J.Biol.Chem. 101, 93 (1933)
- (32) Bodansky A.- J.Biol.Chem. 104, 473 (1934)
- (33) Bodansky A.- J.Biol.Chem. 104, 717 (1934)
- (34) Bodansky A.- Enzymologia 3, 258 (1937)
- (35) Bodansky A.- Amer.J.Clin.Path., Tech.Suppl. 1, 51 (1937)
- (36) Bodansky A.- Am.J.Clin.Invest. 17, 473 (1938)
- (37) Bodansky A. y Jaffe H.L.- Proc.Soc.Exper.Biol.& Med. 29, 199 (1931)

- (38) Bodansky A. y Jaffe H.L.- Proc.Soc.Exper.Biol.& Med. 31, 107 (1933)
- (39) Bodansky A. y Jaffe H.L.- Proc.Soc.Exper.Biol.& Med. 31, 1179 (1934)
- (40) Bodansky A. y Jaffe H.L.- J.Biol.Chem. 109, (1935)
- (41) Bodansky A., Hellmann L. y Bonoff R.- Proc.Soc.Exper. Biol.& Med. 28, 762 (1931)
- (42) Bodansky A., Jaffe H.L. y Chandler J.P.- Proc.Soc. Exper.Biol.& Med. 29, 871 (1932)
- (43) Bodansky A., Jaffe H.L. y Chandler J.P.- J.Biol.Chem. 97, LXVI (1932)
- (43a) Bodansky O.- J.Biol.Chem. 115, 101 (1936)
- (44) Bodansky O.- J.Biol.Chem. 118, 341 (1937)
- (45) Bowman y Pitts.- Amer.J.Obstetr. 32,957 (1936)
- (46) Cayla.- Bull.Soc.Chim.Biol. 17, 1707 (1935)
- (47) Cloetens R.- Enzymologia 6, 46 (1939)
- (48) Cloetens R.- Enzymologia 7,157 (1939)
- (49) Cloetens R.- Naturw. 27, 806 (1939)
- (50) Cloetens R.- Naturw. 28,252 (1940)
- (51) Davies.- Biochem.J. 28, 529 (1934)
- (52) Demuth.- Biochem.Z. 159, 415 (1925)
- (53) Demuth.- Biochem.Z. 166, 162 (1925)
- (54) Ehrensvärd G.- Hoppe-Seylers Z. 217, 274 (1933)
- (55) Erdtman H.- Zs.phys.Chem. 172, 182 (1927)
- (56) Fell y Robison.- Biochem.J. 23, 767 (1929)
- (57) Fiessinger N. y Boyer F.- Enzymologia 1, 172 (1936)
- (58) Fiske C.H. y Subbarow Y.- J.Biol.Chem. 66, 395 (1925)
- (59) Folin y Ciocalteu.- J.Biol.Chem. 73, 627 (1927)
- (60) Folley.- Biochem.J. 30, 2262 (1937)
- (61) Folley S.J. y Kay H.D.- Erg.Enzymforsch. 5, 159 (1936)
- (62) Folley S.J. y Kay H.D.- Erg.Enzymforsch. 5, 205 (1936)
- (63) Forrai E.- Biochem.Z. 142, 282 (1923)
- (64) Franseen C.C. y Mc.Lean R.- Amer.J.Canc. 24, 299 (1935)
- (65) Freeman y Chen.- J.Biol.Chem. 123,239 (1928)
- (66) Fujita H.- J.Biochem.(e.;Jap.) 30, 69 (1939)
- (67) Green y colaboradores.- J.Clin.Invest. 13, 1079 (1934)
- (68) Gutman A.B. y Gutman E.B.- Proc.Soc.Exper.Biol.& Med. 38, 470 (1938)
- (69) Gutman A.B. y Gutman E.B.- J.clin.Invest. 17,473 (1938)
- (70) Gutman A.B., Tyson T.L. y Gutman E.B.- Arch.int.Med. 57,
- (70a) Gutman E.B., Sproul E.E. y Gutman A.B.- Am.J.Can [379(1936)
- (71) Herbert.- Brit J.Exper.Path. 16, 365 (1935) [cer, 28,485(1936)
- (72) Hori W.- J.Biochem. (e.;Jap.) 16, 433 (1932)
- (73) Huggins C.- J.Urol. 46, 997 (1941)
- (74) Huggins C.- Gradwohl Laboratory Digest 5, N° 10, (1942)
- (75) Iwatsuru R. y Minami Y.- Biochem.Z. 269, 397 (1934)

- (76) Iwatsuru R. y Naujo K.- Biochem.Z. 300, 422 (1939)
- (77) Iwatsuru R. y Naujo K.- Biochem.Z. 300, 429 (1939)
- (78) Iwatsuru R. y Naujo K.- Biochem.Z. 301, 15 (1939)
- (79) Iwatsuru R., Minami Y. y Naujo K.- Biochem.Z. 301, 23 (1939)
- (80) Jenner H.D. y Kay H.D.- Brit.J.exper.Path. 13, 22 (1932)
- (81) Jenner H.D. y Kay H.D.- J.Biol.Chem. 93, 733 (1931)
- (82) Jaffe H.L.- Arch.Path. 15, 83 (1933)
- (83) Karrer P. y Freuler R.- Tschirch-Festschrift 421 (1926)
- (84) Kay H.D.- Brit.J.exper.Path. 7, 177 (1926)
- (85) Kay H.D.- Biochem.J. 20, 791 (1926)
- (85a) Kay H.D.- Biochem.J. 22, 855 (1928)
- (86) Kay H.D.- J.Biol.Chem. 89, 235 (1930)
- (87) Kay H.D.- Physiol.Rev. 12, 384 (1932)
- (88) Kay H.D.- Physiol.Rev. 12, 398 (1932)
- (89) Kay H.D. y Lee.- J.Biol.Chem. 91, 135 (1931)
- (90) Kay H.D. y Robison R.- Biochem.J. 18, 740 (1924)
- (91) King E.J. y Armstrong A.R.- Canad.med.Assoc.J. 31, 376 (1934)
- (92) King E.J. y Delory E.- Biochem.J. 32, 1157 (1938)
- (93) Kobayashi H.- J.Biochem. 6, 261 (1927) zit.nach Chem.Cbl. II, 2444 (1926)
- (94) Kobayashi H.- J.Biochem. 8, 205 (1927) zit.nach Chem. Cbl.I, 2410 (1928)
- (95) Köhler.- Hoppe-Seylers Z. 223, 98 (1934)
- (96) Kraut y Borkowsky.- Hoppe-Seylers Z. 220, 192 (1933)
- (97) Kuttner T. y Cohen.- J.Biol.Chem. 75, 517 (1927)
- (98) Kuttner T. y Lichtenstein L.- J.Biol.Chem. 86, 671 (1930)
- (99) Levene y Dillon.- J.Biol.Chem. 88, 753 (1930)
- (100) Lister W.A.- Lancet 2, 15 (1933)
- (101) Lohmann K. y Jendrassik L.- Biochem.Z. 178, 419 (1926)
- (102) Lubenstein H.- Z.exper.Med. 100, 456 (1937)
- (103) Lundsteen E. y Vermehren E.- C.r.Trav.Labor.Carlsberg (Din.) Ser. Chim. 21, N^o 10, 147 (1936)
- (104) Lundsteen E. y Vermehren E.- Enzymologia 1, 273 (1936)
- (105) Lundsteen E. y Vermehren E.- Enzymologia 6, 27 (1939)
- (106) Martland M., Hausman F.S. y Robison R.- Biochem.J. 18, 1152 (1924)
- (107) Martland M. y Robison R.- Biochem.J. 18, 1354 (1924)
- (108) Martland M. y Robison R.- Biochem.J. 20, 847 (1926)
- (109) Martland M. y Robison R.- Biochem.J. 21, 655 (1927)
- (110) Martland M. y Robison R.- Biochem.J. 23, 237 (1929)
- (111) Morris y colaboradores.- Arch.Dis.Childh. 12, 45 (1937)
- (112) Mulay A.S. y Hurwitz S.- J.Labor.a.clin.Med. 93, 733 (1931)
- (113) Mulay A.S. y Hurwitz S.- J.Labor.a.clin.Med. 23, 1117 (1938)
- (114) Müller E.- Hoppe-Seylers Z. 237, 35 (1935)

- (115) Ohmori Y.- Enzymologia 4, 217 (1937)
- (116) Palmer L.S. y Nelson J.W.- Proc.Soc. exper.Biol.& med. 31, 1070 (1934)
- (117) Pelezar y Murza.- Biochem.Z. 292, 212 (1937)
- (118) Pett y Wynne.- Biochem.J. 28, 369 (1934)
- (119) Raymond y Levene.- J.Biol.Chem. 79, 628 (1928)
- (120) Roberts W.M.- Brit.J.Exper.Path. 11, 90 (1930)
- (121) Roberts W.M.- Brit.med.J. 1, 734 (1933)
- (122) Robison R.- Erg.Enzymf. 1, 280 (1932)
- (123) Robison R., Macleod y Rosenheim.- Biochem.J. 24, 1927(1930)
- (123a) Robison R. y Soames.- Biochem.J. 18, 743 (1924)
- (124) Roche J.- Biochem.J. 25, 1724 (1931)
- (125) Roche J.- Bull.Soc.Chim.Biol. 13, 841 (1931)
- (126) Roche J.- Soc.Biol. 107, 640 (1931)
- (127) Roche J.- Soc.Biol. 107, 1144 (1931)
- (128) Roche J. y Latreille M.- Enzymologia 3, 75 (1937)
- (129) Roche J. y Bullinger E.- C.r.Soc.Biol. 127, 1271 (1938)
- (130) Roe y Whitmore.- Am.J.Clin.Path. 8, 233 (1938)
- (130a) Rothman M.M., Meranze D.R. y Meranze T.- Am.J.Med.Sc. 192, 525 (1936)
- (131) Schmidt G.- Hoppe-Seylers Z. 208, 185 (1932)
- (132) Schoonover J.W. y Ely I.O.- Biochem.J. 29, 1809 (1935)
- (133) Schoonover J.W. y Ely I.O.- Biochem.J. 30, 1097 (1936)
- (134) Simmons y Franseen.- Chem.Zbl. II, 637 (1936)
- (135) Simmons y Franseen.- Ann.Surg. 102, 555 (1935)
- (136) Smith J. y Maizels M.- Arch.Dis.Childh. 7, 149 (1932)
- (137) Smith J.- Arch.Dis.Childh. 8, 215 (1933)
- (137a) Spek.- Erg.Enzymforsch. 6, 1 (1937)
- (138) Stearns y Warweg.- J.Biol.Chem. 102, 749 (1933)
- (139) Sure, Barnett. Kik y Buchanan.- Biochem.J. 29, 1508 (1935)
- (140) Takata.- J.Biochem. (eng. Jap.) 16, 83 (1932)
- (141) Teorell.- Biochem.Z. 230, 1 (1931)
- (142) Teorell.- Biochem.Z. 232, 485 (1931)
- (143) Tschopp E. y Tschopp E.- Helvet. Chim. Acta 15, 793 (1932)
- (144) Umeno M.- Biochem.Z. 231, 339 (1931)
- (144a) Woodward H.Q., Twombly G.H. y Coley B.L.- J.Clin.Inv. 15, 193 (1936)
- (145) Yaguda.- Am.J.Clin.Path. 6, 57 (1936)

OBRAS FUNDAMENTALES

- a) C. Oppenheimer: Die Fermente und ihre Wirkungen, 5a edición 1925, 1er tomo, pág. 248 y 1929, 3er tomo, pág. 743
- b) F.F. Norc & R. Weidenhagen: Handbuch der Enzymologie 1940, 1er tomo, pág 408, 2º tomo, pág 1195
- c) E. Bamann y K. Myrbäck: Die Methoden der Fermentforschung 1941, (4 tomos), págs. 1605, 2975 y 3038

LIBROS DE ANALISIS CLINICOS Y METEDOS DE LABORATORIO

- d) R.B.H. Gradwohl: Clinical Laboratory Methods and Diagnosis 3a edición, 1943, tomo 1, pág. 303
- e) Meyer Bodansky & Oscar Bodansky: Biochemistry of Disease, 1940, pág. 400 y siguientes.
- f) Hawk & Bergeim: Practical physiological Chemistry, 11a edición, pág. 463
- g) Todd & Sanford: Clinical Diagnosis by Laboratory Methods, 2a edición castellana 1943, pág 394
- h) Alfredo Fisher: Laboratorio, 3a edic. 1942, pág 163
- i) Leónidas Corona T.: Tratado de Química Normal y Patológica de la sangre Edit. Ercilla 1942 (Santiago de Chile)
- j) John A. Kolmer & Fred Boerner: Métodos de Laboratorio Clínico, Traducción española de la 3a edición inglesa, Nueva York 1943, pág. 802

NOTA: Las cinco obras citadas en último término se han indicado a título de ejemplo. La mayoría de los libros de análisis clínicos contienen uno u otro método de dosaje de fosfatasa en sangre.