

CARACTERIZACIÓN ELECTROFORÉTICA Y CINÉTICA DE LAS ISOENZIMAS OSEAS, HEPÁTICA E INTESTINAL DE FOSFATASA ALCALINA DE RATA

1 INTRODUCCION

1.1 FOSFATASA ALCALINA

La fosfatasa alcalina [FA] (Fosfohidrolasa de ésteres monofosfóricos: EC 3.1.3.1) es una fosfomonoesterasa que hidroliza inespecíficamente enlaces éster fosfórico a pH alcalino.

Se encuentran varias isoenzimas, siendo las más importantes la fosfatasa alcalina ósea (FAo), hepática (FAh), intestinal (FAi), renal (FAr) y placentaria (FAp). A nivel óseo se expresa en la membrana del osteoblasto cuando estos se diferencian a partir de células progenitoras y es secretada a la circulación. En hígado se expresa en la membrana de los canálculos biliares y en riñón en la membrana apical de los túbulos contorneados distales. En intestino se expresa ligada a la membrana apical de los enterocitos y en placenta en el sinciciotrofoblasto.

Muchas evidencias indican que las isoenzimas *hepática*, *renal* y *ósea* humanas son productos de un mismo gen por lo que se conocen como isoenzimas tejido no específicas (TNAP). Entre estas evidencias se puede citar que: a) la actividad de las 3 isoenzimas está deprimida en la hipofosfatasa autosómica recesiva; b) muestran similar termoestabilidad y sensibilidad a inhibidores; c) presentan reactividad cruzada inmunoquímica; d) muestran similar patrón electroforético luego de la digestión por neuraminidasa [1]. Todo esto indica que las diferencias halladas entre ellas se deberían a modificaciones post-traduccionales, principalmente a nivel de contenido de ácido siálico. El gen responsable se localiza en el brazo corto del cromosoma 1 (banda p34-p36) [2].

Por su parte, las isoenzimas *intestinal* y *placentaria*, presentan una homología del 87%, comparten ciertos determinantes antigénicos, termoestabilidad y sensibilidad a inhibidores, pero presentan diferencias en la corrida electroforética. Por ello se planteó que debían ser originadas en genes diferentes los cuales han sido identificados en el cromosoma 2 (banda q34-q37).

En suero, más del 95% de la actividad de fosfatasa alcalina es de origen hepático y óseo, predominio de la primera, con excepción de los jóvenes en crecimiento donde es mayor la isoenzima ósea y en el tercer trimestre de embarazo donde la isoenzima placentaria cobra importancia. La contribución de la FAi a la actividad de la FA sérica total es poca, aun en condiciones patológicas [3,4].

1.1.1 *Propiedades*

Todas las isoenzimas tienen un pH óptimo próximo a 9,8, similar afinidad por los sustratos, y son metaloproteínas dependientes de zinc y magnesio [5,6].

El aminoácido L-fenilalanina es inhibidor no competitivo y estereoespecífico de las isoenzimas de fosfatasa alcalina de manera diferencial cuando se encuentra en concentraciones entre 5 y 10 mM. Estudios realizados empleando homogenados de tejido hepático, óseo e intestinal demostraron que la isoenzima intestinal es la más afectada por este inhibidor (actividad remanente: isoenzima intestinal 5%, ósea 74,5%, hepática 74,5%) [7,8,9]. Resultados similares se han hallado con el L-triptófano. Con concentración de 3 mM de este inhibidor las isoenzimas intestinal y placentarias se inhibieron aproximadamente un 70%, mientras que las isoenzimas ósea y hepática sufren menos del 25% de inhibición [10].

A diferencia de L-fenilalanina, el levamisole (5-20 mM), el L-p-bromotetramisol (0.10-0.27 mM) y la L-homoarginina (8 mM), actúan inhibiendo predominantemente las isoenzimas ósea, hepática y renal. Con el primero la actividad remanente de la misma ronda, según la concentración utilizada, entre 0.7 y 2% mientras que las isoenzimas de intestino y placenta presentan una actividad remanente entre 47% y 75%. El L-p-bromotetramisol muestra 3-10% de actividad remanente para las isoenzimas tejido no específicas, con un 82-90% para las isoenzimas de intestino y placenta [11,12,13,14].

Las isoenzimas ósea y hepática son relativamente inestables a la temperatura (15 min 56°C) y a la desnaturalización por urea (1.3 - 3 M) y clorhidrato de guanidina (0.3 M) [15,16,17].

Empleando Sephadex G200 se determinó el peso molecular de las isoenzimas hepática (225kDa), intestinal (190kDa), ósea (180kDa) y renal (170kDa). Estas diferencias son atribuidas al contenido de carbohidratos (fucosa, N-acetil galactosamina, N-acetil glucosamina). A diferencia de la isoenzima intestinal, las del tejido óseo, hepático y renal contienen residuos de ácido siálico demostrado por cambios en la movilidad electroforética por efecto de la incubación con neuraminidasa [18].

1.1.2 *Función*

El rol fisiológico de la fosfatasa alcalina es parcialmente conocido. Su localización sugiere un rol en el movimiento de moléculas través de membrana.

Algunas investigaciones sugieren que la **isoenzima ósea** tendría funciones en el proceso de mineralización. La mineralización tanto del cartílago como del hueso requiere la presencia de vesículas en la matriz que son el sitio de acumulación de calcio (Ca^{2+}) y fosfato (Pi). La fosfatasa alcalina crea un ambiente favorable para la deposición de este material y la formación del núcleo del cristal de hidroxapatita (HA). Luego de alcanzar los cristales cierto tamaño, se rompería la membrana de las vesículas y se liberarían los cristales de HA a la matriz. Luego, la matriz extracelular contiene suficiente calcio y Pi, para mantener el proceso de nucleación y propagar la mineralización.

La isoenzima ósea, marcador de actividad osteoblástica, se localiza también en las vesículas de la matriz. En casos de hipofosfatasa se detectan defectos en la mineralización ósea y en ratones con deficiencia en el gen de TNAP presentan un cuadro similar a la hipofosfatasa. Se propone que la TNAP participa en el proceso de mineralización proveyendo Pi por hidrólisis de sustratos ya que en cultivos celulares, la suplementación de beta-glicerofosfato como fuente externa induce osteogénesis y deposición de HA y el levamisol, inhibidor de fosfatasa alcalina, previene esta inducción por beta-glicerofosfato. También hidrolizaría el pirofosfato inorgánico (PPi) y de esta forma estimularía la formación de HA [19,20].

La isoenzima **intestinal** parece más relacionada a la absorción de ciertos nutrientes, como el calcio y las grasas. La administración de vitamina D a pollos raquícticos produce un incremento en 2-3 veces de la actividad de FAi y esto se incrementa paralelamente al transporte de calcio [21]. Se demostró que la alimentación con aceite de pescado por sonda orogástrica incrementó un 94% la actividad de la AP en plasma. Los animales que recibieron aceite conjuntamente con inhibidores de la síntesis proteica como la cicloheximida o actinomicina D, no difirieron del grupo control, indicando que los nutrientes modificarían de alguna manera la traducción de FAi o de alguna proteína involucrada en su movilidad. También se investigaron los cambios de actividad a nivel de la mucosa, por determinación de la actividad de FAi por corrida electroforética y se obtuvieron los mismos resultados que en plasma [22]. Hallazgos recientes sugieren que actuaría limitando la entrada de grasa al organismo. En ratones con *knock-out* del gen de FAi II se observó mayor transporte y absorción de grasa y ganancia de peso acelerada respecto de los animales controles [23].

Las FA tejido no específica y de intestino de ratón están codificadas por *akp2* y *akp3* respectivamente. No se observaron anormalidades metabólicas severas en ratones con disrupción del gen *akp3*, mientras que ratones *akp2*-null exhibieron una severa forma de hipofosfatasa. El ratón *akp3*^{-/-} presenta una ganancia de peso acelerada y aumento de los triglicéridos en plasma a las 7 horas, indicando la participación de la enzima en el proceso de absorción de grasa [23,24].

Respecto a su función en el **hígado**, hay trabajos que indican que la FAh podría estar involucrada en el transporte de colina a través de las membranas canaliculares de los hepatocitos y en la superficie luminal de las células epiteliales biliares [25].

1.1.3 Alteraciones séricas de la fosfatasa alcalina

La actividad de FA se halla muy elevada en enfermedades hepáticas, pancreatitis, neoplasia hepáticas o pancreáticas debido principalmente al incremento de la isoenzima hepática, al encontrarse alterada su síntesis o su eliminación biliar. Los incrementos de la actividad plasmática de FA a expensas de la isoenzima

ósea son normales en los estados de crecimiento y reparación de fracturas así como en patologías como hiperparatiroidismo, osteomalacia, osteomielitis, y neoplasias óseas [25].

Descensos en la actividad de FA plasmática son de valor en el diagnóstico de hipofosfatasa, enfermedad autosómica recesiva caracterizada por una extrema disminución de la actividad de FA tejido no específica causada por una mutación del gen que codifica estas isoenzimas. Esta deficiencia resulta en una marcada disminución de la mineralización ósea que puede ser fatal en neonatos e infantes [19].

Como se desprende de esta revisión sobre las isoenzimas de la fosfatasa alcalina, existe abundante información respecto de las estructuras y los inhibidores de cada una. Existen diversos trabajos donde se ha logrado caracterizar parcialmente las diferentes isoenzimas en plasma (4,12,13,**Error! Marcador no definido.**,26,27,28,29,30), sin embargo no existe aun un método sencillo y reproducible que permita estudiar en plasma las modificaciones de la diferentes isoenzimas.

Un objetivo a largo plazo que excede los objetivos de esta tesina es desarrollar una forma de determinación plasmática de la isoenzima ósea y su correlación con el proceso de remodelación ósea. Este objetivo podrá ser alcanzado si se logra en primer lugar caracterizar las diferente isoenzimas y luego desarrollar un método de medición de las diferentes isoenzimas en plasma.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL

Caracterizar las isoenzimas séricas de fosfatasa alcalina de rata desde el punto de vista de sus movilidades electroforéticas y la sensibilidad a factores fisicoquímicos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1- Aislar las isoenzimas ósea, hepática e intestinal a partir de extractos de los órganos productores
- 2- Evaluar la actividad y la movilidad electroforética de las diferentes isoenzimas luego del proceso de aislamiento.
- 3- Evaluar la actividad de las isoenzimas frente a diferentes factores fisicoquímicos

3 MATERIALES Y METODOS

Se utilizarán ratas Sprague-Dawley adultas del bioterio de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de Rosario. En el caso que los experimentos del laboratorio lo permitan, se emplearán animales que han sido utilizados en otros experimentos y cuyos tratamientos no interfieran con los efectos en estudio en este proyecto.

Todos los experimentos que involucren animales serán llevados a cabo bajo las normas internacionales de cuidado y uso de animales de laboratorio [31,32].

En el caso de requerir anestesia: se realizará preanestesia por inyección subcutánea de una mezcla de 1,2 mg Xilazina /100 g peso corporal y 3 mg ketamina /100 g de peso corporal. Luego de alcanzado un grado adecuado de narcosis y sedación se inyectarán por vía intramuscular 3 mg Ketamina /100 de peso corporal [33].

Cuando se lo requiera, la eutanasia se realizará sometiendo en primer término al animal a anestesia inhalatoria con éter sulfúrico, hasta obtener una profunda anestesia y analgesia. Luego se realizará una inyección intracardíaca de KCl saturado que produce un paro cardiorespiratorio instantáneo [34].

Luego de la eutanasia, se obtendrán el hígado, huesos largos de miembros anteriores y posteriores y el duodeno para purificar cada isoenzima.

3.1 PURIFICACIÓN DE LAS ISOENZIMAS DE FOSFATASA ALCALINA

El **hígado** será cortado en pequeños trozos y se procederá como se detalla en Procedimientos comunes.

Los **huesos** serán incubados 30 días en una solución de EDTA 10%. Pasado este tiempo el extracto con EDTA se procesará como se indica en Procedimientos comunes. Como método alternativo se pulverizarán los huesos luego del tratamiento con nitrógeno líquido y posterior extracción con EDTA.

Una vez obtenido el **duodeno**, se procederá a realizar un corte longitudinal del mismo y raspado de la mucosa contra el borde de un portaobjeto. Luego se procederá como se detalla en Procedimientos comunes.

Procedimientos comunes [35,36]

- Preparación de una suspensión de mucosa al 30% P/V en buffer Tris.Cl 20 mM, MgCl₂ 1 mM pH 8,2, utilizando un homogenizador (Ultraturrax, Ika-werk Janke&Kunkel, D7813 Staufen) a 20000 rpm a 4° C.
- Extracción de lípidos por tratamiento de la suspensión con igual volumen de butanol. Luego de una hora de agitación a 4° C, este proceso libera la enzima de su unión a la membrana.
- Centrifugación a 10000 rpm (15000 g) 30 minutos a 4° C (centrifuga refrigerada Z-323-K-Hermle Labortechnik GmBh. Wehingen.F.R Germany). Eso permite obtener tres fracciones: una fase butanólica que contiene los lípidos, un precipitado de fracciones insolubles y una fase acuosa donde se concentra la actividad de fosfatasa alcalina.
- Precipitación de las proteínas de la fase acuosa con igual volumen de acetona a -20°C.
- Centrifugación a 6000 rpm 15 minutos a 4°C (centrifuga refrigerada Z-323-K-Hermle Labortechnik GmBh. Wehingen.F.R Germany). Esto permite obtener las proteínas en el pellet. .
- Disolución del precipitado obtenido en buffer Tris 20 mM, MgCl₂ 1 mM, pH 8,2.
- Cromatografía sobre Sephadex G200 (Sephadex®-Pharmacia Fine Chemical-Uppsala S75104-Sweden). Las fracciones con alta actividad de fosfatasa alcalina se juntarán y se precipitarán con acetona a -20° C. El precipitado se redisolverá en buffer Tris.Cl 20 mM, MgCl₂ 1 mM, pH 8,2.
- La solución del paso anterior se cromatografiará utilizando DEAE celulosa (Sigma Chemicals Co, St Louis, MO, USA), con buffer Tris.Cl 20 mM, MgCl₂ 1 mM, pH 8,2 con un gradiente de NaCl de 0 a 0,3 M. Se juntarán las fracciones que presentaron actividad de FA y se precipitarán con acetona a -20°. Se centrifugarán a 10000 rpm a -10° C y el precipitado se redisolverá en el buffer Tris.Cl 20 mM, MgCl₂ 1 mM, pH 8,2.

En el caso que la actividad de la enzima sea indetectable o muy baja, se concentrarán las muestras por ultrafiltración utilizando membranas AMICON de corte adecuado al peso molecular de la FA.

Se determinará la actividad de la enzima (Ver 3.1.2) y concentración de proteínas (Ver 3.1.1) en las muestras obtenidas en los diferentes pasos, con los cuales se calculará el factor de purificación (FP) en cada etapa de la purificación (FP = actividad específica en un dado paso de purificación *100 / actividad específica inicial).

3.1.1 Determinación de la concentración de proteínas

Se empleará el método de Bradford. Este método se basa en la reacción del colorante Coomassie Brillante Blue con las proteínas. Como testigo se utilizará albúmina sérica bovina (BSA). Sensibilidad 1-10 ug [37,38].

Si la concentración de proteínas lo permite se realizará el dosaje con reactivo de Gornall (Proti 2 Wiener Lab, Rosario, Argentina).

3.1.2 Determinación de la actividad fosfatasa alcalina

Para la determinación de la actividad enzimática se disponen de diferentes técnicas, las que se emplearán dependiendo de las necesidades del proyecto.

3.1.2.1 En solución

Para la determinación de la actividad de la FA se empleará un equipo comercial que utiliza p-nitrofenilfosfato (pNFF) como sustrato a pH 9,8 en buffer dietanolamina (DEA) 1M, (Wiener Lab, Rosario, Argentina). Esta solución se incubará con alícuotas de las muestras conteniendo FA y se determinará el cambio de absorbancia a 405 nm durante 1 minuto en un espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda 11. Los datos obtenidos se analizarán con el software PECSS (*Perkin Elmer Computerized Spectroscopy Software. Perkin Elmer Corporation Norwalk, CT. USA.*). Para la determinación de la actividad se utilizará el coeficiente de extinción (E) del p-nitrofenilfosfato (pNFF) determinado para nuestras condiciones de trabajo (279 unidades Abs.litro/cm.μmol pNFF). La actividad de la enzima se calcula utilizando la fórmula $\text{Actividad} = \text{Absorbancia}/\text{E.L.}$ El método presenta un coeficiente de variación intraensayo entre 1.6 y 3.1%.

3.1.2.2 En geles de poliacrilamida

Esta metodología permite detectar la enzima en geles sin necesidad de la utilización de transferencia a membranas de nitrocelulosa y de anticuerpos anti FA. La técnica se fundamenta en que la FA hidroliza β-glicerofosfato liberando fosfato que en presencia de nitrato cobaltoso genera un precipitado de color violáceo de fosfato cobaltoso $[\text{Co}_3(\text{PO}_4)_2]$. Básicamente, luego de la electroforesis, consta de lavado del gel con agua destilada, incubación del gel con β-glicerofosfato de sodio 1M (pH 8,2) y nitrato cobaltoso 1M (proporción 1:1) hasta la observación de las bandas de precipitación de $\text{Co}_3(\text{PO}_4)_2$. Finalmente se lava con agua hasta eliminar el nitrato cobaltoso sin reaccionar, se procede al secado del gel, digitalización de la imagen y posterior análisis utilizando un software específico. Este método permitiría recuperar la enzima a partir de sus bandas de migración, por disgregación del gel y redisolución de la FA.

3.1.2.3 En membrana de nitrocelulosa

Luego de transferencia a membrana de nitrocelulosa se detectará la actividad de FA por incubación con 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato (BCIP) durante 30 minutos a pH 9.5 [15]. La región de la membrana con FA se evidencia por la aparición de un cromóforo color índigo producido por la acción de la enzima sobre el sustrato.

3.1.3 Electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE)

Las muestras a ser utilizadas en la PAGE, se disolverán en un buffer especial para electroforesis (Tris 1.52%P/V, glicerol 20%V/V, SDS 2%P/V, 2-mercaptoetanol 2%V/V, azul bromofenol 0.001%P/V, pH 6,8). Es habitual la realización de PAGE en condiciones desnaturalizantes, por lo cual la muestra con el buffer descrito se calienta a 100° C [39]. Dado que se realizará la determinación de la actividad de la FAi, no se realizará el calentamiento a 100° C.

Se realizará electroforesis en geles de poliacrilamida al 5% [38]. El porcentaje de acrilamida y el pH de los geles se seleccionaron en función del peso molecular de la fosfatasa alcalina: 180±5 kDa y su punto isoelectrico (pI): 5,5. El gel utilizado estará compuesto por un gel de resolución de pH 8,8 y el gel stacking pH 6,8. La electroforesis se realizará con el mismo buffer en los compartimientos anódicos y catódicos (Tris 1.51%P/V, glicina 7.2%P/V, SDS 0.5%P/V, pH 8.3).

Se utilizará una fuente EPS 3500 (Pharmacia Biothec-Uppsala S75184- Sweden). La intensidad corriente a utilizar será de 10 mA durante el tiempo que las muestras migren en el gel de stacking y de 5 mA por el tiempo que la muestra migren por el gel de resolución.

En el caso de realizar tinción con Coomasie Brilliant Blue para la detección de proteínas, la fijación se realizará con solución fijadora (50%V/V metanol, 10%V/V ácido acético glacial, 40%V/V agua) durante 2 horas. Posteriormente el gel se incubará con Coomasie Brilliant Blue como solución colorante (50%V/V metanol, 0,05%V/V Coomasie Brilliant Blue R, 10%V/V ácido acético, 40%V/V agua) durante 12 horas. Luego de este tratamiento el gel se decolorará con una solución 5%V/V metanol, 7%V/V ácido acético, 88%V/V agua.

Como patrones de peso molecular se utilizarán: apoferritina (443 kDa), fibrinógeno (341 kDa), gama globulina equina (158 kDa), albúmina sérica bovina dímero (132 kDa) y monómero (66 kDa), Sigma Co, St. Louis, MI, USA.

3.1.4 Electroforesis bidimensional

La misma se llevará a cabo de acuerdo al protocolo descrito por O'Farrell [40]

3.1.4.1 Primera Dimensión: Isoelectroenfoque

Las muestras a ser utilizadas en isoelectroenfoque (IEF), se disolverán en un buffer especial para electroforesis: BS (Tris 15.2 g/L, glicerol 200 ml/L, 2-mercaptoetanol 20 g/L, 0.0001 g/L azul bromofenol, pH 6.8).

Se realizará isoelectroenfoque en geles de poliacrilamida (5%) con gradiente de pH 3.5-9.5 (Ampholine PAGplate, Pharmacia Biotech, Uppsala Sweden) con una corriente de 0.33 mA/cm de ancho de gel, siendo la corriente

eléctrica constante. El voltaje variará según cambios en la resistencia. La soluciones buffer a utilizar en ambos electrodos será: H₃PO₄, 1M para el ánodo y NaOH, 0,5 M para el cátodo.

Teniendo en cuenta que el pI de la FAi es de aproximadamente 4.55, se emplearán como patrones de pI: rojo metilo (pI 3.8), inhibidor de tripsina (pI 4.5), albúmina sérica bovina (pI 5) y anhidrasa carbónica (pI 6).

3.1.4.2 Segunda Dimensión: Electroforesis horizontal en geles de poliacrilamida SDS-PAGE.

Luego del isoelectroenfoco, las calles serán sometidas a electroforesis en geles de poliacrilamida (5%) SDS-PAGE en dirección perpendicular a la corrida de la primera dimensión desde el extremo catódico como se describió previamente.

3.2 EVALUACIÓN DE LA SENSIBILIDAD DE LAS ISOENZIMAS FRENTE A DIFERENTES FACTORES FISICOQUÍMICOS

La actividad de las diferentes isoenzimas aisladas de los órganos productores será medida variando el valor de algunas variables fisicoquímicas (pH, temperatura, tiempo de exposición a 56 °C, L-fenilalanina y urea o clorhidrato de guanidina). En cada caso, se evaluará la actividad en un rango de valores de la variable y se mantendrán las demás variables a un valor constante.

3.2.1 Efecto del pH

Se determinará la actividad de cada isoenzima (Ver 3.1.2.1) ante la variación del pH (de 6 a 10) del medio de incubación.

3.2.2 Efecto de la temperatura [15]

Se determinará la actividad de cada isoenzima (Ver 3.1.2.1) ante la variación de temperatura (de 10 a 90 °C) del medio de incubación.

3.2.3 Efecto del tiempo de exposición a 56 °C [16]

Se determinará la actividad de cada isoenzima (Ver 3.1.2.1) ante la variación del tiempo de exposición (de 0 a 30 minutos) a 56 °C de temperatura del medio de incubación.

3.2.4 Efecto de L-fenilalanina [7,8]

Se determinará la actividad de cada isoenzima (Ver 3.1.2.1) ante la variación de concentración de L-fenilalanina (de 0 a 16 mM) del medio de incubación.

3.2.5 Efecto de urea o clorhidrato de guanidina [15,17]

Se determinará la actividad de cada isoenzima (Ver 3.1.2.1) ante la variación de concentración de urea (de 0 a 5 M) o clorhidrato de guanidina (de 0 a 3 M) del medio de incubación.

3.3 REALIZACIÓN DE UN MODELO MATEMÁTICO PARA ESTIMAR LA ACTIVIDAD DE CADA ISOENZIMA EN UNA MEZCLA DE LAS TRES ISOENZIMAS

Se determinará la actividad de cada isoenzima produciendo variaciones de diferentes propiedades fisicoquímicas del medio, como se explicó en los párrafos 3.2.1 a 3.2.5: pH, Temperatura (T), tiempo de exposición a 56° C (t), L-fenilalanina (Fal) y urea o clorhidrato de guanidina como agentes desnaturizantes (des). Se obtendrá la función de ajuste de la actividad enzimática en función del valor de la variable fisicoquímica estudiada y se determinará el porcentaje de la actividad enzimática a un dado valor de la variable estudiada (pH*, T*, t*, Fal* y Des*). De esta manera para cada isoenzima (FAo, FAh, FAi) se tendrán pares de valores: (valor de la variable estudiada, % actividad).

En una mezcla de las tres isoenzimas a un dado valor de la variable fisicoquímica, la actividad total de la FA será la suma algebraica de las actividades de cada isoenzima por su porcentaje, pudiéndose escribir para el pH la ecuación:

$$\text{Act}(\text{pH}^*) = \text{Act FAo} \times \%_{\text{pH}} + \text{Act FAh} \times \%_{\text{pH}} + \text{Act FAi} \times \%_{\text{pH}}$$

Donde Act(pH*) es la actividad total de la mezcla al valor de pH seleccionado (pH*), Act FAo es la actividad de fosfatasa alcalina ósea en la mezcla, Act FAh la actividad de fosfatasa alcalina hepática en la mezcla y FAi, la actividad de fosfatasa alcalina intestinal. En la ecuación %_{pH} representa el porcentaje de actividad de cada isoenzima al pH seleccionado.

para la Temperatura, la ecuación toma la forma

$$\text{Act}(\text{T}^*) = \text{Act FAo} \times \%_{\text{T}} + \text{Act FAh} \times \%_{\text{T}} + \text{Act FAi} \times \%_{\text{T}}$$

donde las variables y constantes tienen el mismo tipo de definición que para el caso anterior, pero en este caso para un dado valor de temperatura.

Para el tiempo de exposición a 56°C, la ecuación resulta

$$\text{Act}(\text{t}^*) = \text{Act FAo} \times \%_{\text{t}} + \text{Act FAh} \times \%_{\text{t}} + \text{Act FAi} \times \%_{\text{t}}$$

Para la L-fenilalanina

$$\text{Act}(\text{Fal}^*) = \text{Act FAo} \times \%_{\text{Fal}} + \text{Act FAh} \times \%_{\text{Fal}} + \text{Act FAi} \times \%_{\text{Fal}}$$

Para la urea o clorhidrato de guanidina

$$Act(des^*) = Act FAo \times \%_{des} + Act FAh \times \%_{des} + Act FAi \times \%_{des}$$

De las cinco ecuaciones se seleccionarán 3, en las que los % de las diferentes isoenzimas de FA permitan la solución del problema matemático que se plantea a continuación. Con ellas se construirá un sistema de tres ecuaciones algebraicas lineales con tres incógnitas (Act FAo, Act FAh y Act FAi). Los % de actividad serán los coeficientes de la ecuación, hallados al estudiar cada isoenzima por separado y los Valores Act(pH*), Act(T*), Act(t*), Act(Fal*) y Act(des*) serán los valores de las actividades de una mezcla de las diferentes isoenzimas a cada uno de los valores de las variables fisicoquímicas.

Suponiendo que las variables fisicoquímicas convenientes son el pH, t y concentración de urea o clorhidrato de guanidina, el sistema de ecuaciones algebraicas quedará:

$$\begin{cases} Act(pH^*) = Act FAo \times \%_{pH} + Act FAh \times \%_{pH} + Act FAi \times \%_{pH} \\ Act(t^*) = Act FAo \times \%_t + Act FAh \times \%_t + Act FAi \times \%_t \\ Act(des^*) = Act FAo \times \%_{des} + Act FAh \times \%_{des} + Act FAi \times \%_{des} \end{cases}$$

el que se resolverá con los métodos tradicionales de resolución de sistemas de ecuaciones algebraicas lineales. Si el sistema es compatible, tendrá una solución, la que se puede escribir:

$$S = \{Act FAo, Act FAh, Act FAi\}$$

donde Act FAo, Act FAh, Act FA , son los valores de actividad de las diferentes isoenzimas en la mezcla.

3.4 ANÁLISIS DE LOS DATOS

Los geles se escanearán y se analizarán empleando un software específico (Gel-Pro Analyzer 3.0, Media Cybernetics, Silver Spring MD, USA).

Los Rf y los pl de las diferentes isoenzimas se compararán utilizando ANOVA a un criterio de clasificación, para lo que se utilizará un software adecuado para este fin [GraphPad Prism 2.0. GraphPad Software, San Diego, CA USA].

4 REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- 1 McKenna MJ, Hamilton TA, Sussman HH. Comparison of human alkaline phosphatase isoenzymes. Structural evidence for three protein classes. *Biochem J.* 181(1):67-73. 1979.
- 2 Weiss MJ, Ray K, Henthorn PS, Lamb B, Kadesch T, Harris H. Structure of the human liver/bone/kidney alkaline phosphatase gene. *J Biol Chem*; 263(24):12002-12010. 1988
- 3 Van Hoof VO, Hoylaerts MF, Geryl H, Van Mullem M, Lepoutre LG, De Broc ME. Age and sex distribution of alkaline phosphatase isoenzymes by agarose electrophoresis. *Clin. Chem.* 36(6): 875-878. 1990.
- 4 McLachlan R, Coakley J, Murton L, Campbell N. Plasma intestinal alkaline phosphatase isoenzymes in neonates with bowel necrosis. *J Clin Pathol*, 46: 654-659. 1993.
- 5 Cathala G, Brunel C. Bovine kidney alkaline phosphatase. Catalytic properties, subunit interactions in the catalytic process, and mechanism of Mg²⁺ stimulation. *J Biol Chem*; 250(15):6046-53. 1975.
- 6 Harada T, Koyama I, Matsunaga T, Kikuno A, Kasahara T, Hassimoto M, Alpers DH, Komoda T. Characterization of structural and catalytic differences in rat intestinal alkaline phosphatase isozymes. *FEBS J*; 272(10):2477-2486. 2005.
- 7 Ghosh NI, Fishman WH. On the mechanism of inhibition of intestinal alkaline phosphatase by L-phenylalanine. *The Journal of Biological Chemistry*, 241(11), 2516-2522. 1966.
- 8 Stepan J, Volek V, Kolar J. A modified inactivation - inhibition method for determining the serum activity of alkaline phosphatase isoenzymes. *Clinica Chimica Acta*, 69, 1-9. 1976.
- 9 Shephard MDS, Peake MJ. Quantitative method for determining serum alkaline phosphatase isoenzyme activity II. Development and clinical application of method for measuring four serum alkaline phosphatase isoenzymes. *J Clin Pathol.* 39: 1031-1038. 1986.
- 10 Lin CW, Sie HG, Fishman WH. L-tryptophan. A non-allosteric organ-specific uncompetitive inhibitor of human placental alkaline phosphatase. *Biochem J*; 124(3):509-16. 1971.
- 11 Van Belle H. Alkaline phosphatase. I. Kinetics and inhibition by levamisole of purified isoenzyme from humans. *Clin.Chem.* 22(7): 972-976. 1976.
- 12 Peak MJ, Pejakovic M, White GH. Quantitative method for determining serum alkaline phosphatase isoenzyme activity: estimation of intestinal component. *J Clin Pathol.* 41: 202-206. 1988.
- 13 Kuwana T, Rosalki SB. Measurement of alkaline phosphatase of intestinal origin in plasma by P-bromotetramisole inhibition. *J Clin Pathol.* 44(3): 236-237. 1991.
- 14 Van Belle H, De Broe ME, Wieme RJ. L-p-Bromotetramisole, a new reagent for use in measuring placental or intestinal isoenzymes of alkaline phosphatase in human serum. *Clin. Chem.* 23(3): 454-459. 1977.
- 15 Whitby LG, Moss DW. Analysis of heat inactivation curves of alkaline phosphatase isoenzymes in serum. *Clin Chim Acta.* 59(3): 361-367. 1975.
- 16 Moss DW, Whitby LG. A simplified heat-inactivation method for investigating alkaline phosphatase isoenzymes in serum. *Clin Chim Acta*; 61(1):63-71. 1975.
- 17 Shephard MDS, Peake MJ. Quantitative method for determining serum alkaline phosphatase isoenzyme activity I. Guanidine hydrochloride: new reagent for selectively inhibiting major serum isoenzyme of alkaline phosphatase. *J Clin Pathol.* 39: 1025-1030. 1986.
- 18 Kaplan MM. Alkaline phosphatase. *Gastroenterology*; 62(3):452-68. 1972.
- 19 Balcerzak M, Hamade E, Zhang L, Pikula S, Azzar G, Radisson J, Bandorowicz-Pikula J, Buchet R. The roles of annexins and alkaline phosphatase in mineralization process. *Acta Biochim Pol*; 50(4):1019-1038. Review. 2003.
- 20 Register TC, Wuthier RE. Effect of vanadate, a potent alkaline phosphatase inhibitor, on ⁴⁵Ca and ³²Pi uptake by matrix vesicle-enriched fractions from chicken epiphyseal cartilage. *J Biol Chem*; 259(6):3511-3518.1984
- 21 Norman AW, Mircheff AK, Adams TH, Spielvogel A. Studies on the mechanism of action of calciferol. 3. Vitamin D-mediated increase of intestinal brush border alkaline phosphatase activity. *Biochim Biophys Acta*;215(2):348-59. 1970
- 22 Grewal R, Mahmood A. Coordinated secretion of alkaline phosphatase into serum and intestine in fat-fed rat. *Indian J gastroenterology* 23:175-177 2004.
- 23 Narisawa S, Huang L, Iwasaki A, Hasegawa H, Alpers DH, Millán JL. Accelerated fat absorption in intestinal alkaline phosphatase knockout mice. *Mol Cel Biol.* 23: 7525-7530. 2003.
- 24 Narisawa S, Fröhlander N, Millán JL. Inactivation of two mouse alkaline phosphatase genes and establishment of a model of infantile hypophosphatasia. *Dev Dyn*;208(3):432-46. 1997.
- 25 Fernandez NJ, Kidney BA. Alkaline phosphatase: beyond the liver. *Vet Clin Pathol*; 36(3):223-33. 2007

-
- 26 Shephard MDS, Peake MJ. Quantitative method for determining serum alkaline phosphatase isoenzyme activity I. Guanidine hydrochloride: new reagent for selectively inhibiting major serum isoenzyme of alkaline phosphatase. *J Clin Pathol.* 39: 1025-1030. 1986.
- 27 Itoh H, Kakuta T, Genda G, Sakonju I, Takase K. Canine serum alkaline phosphatase isoenzymes detected by polyacrylamide gel disk electrophoresis. *J Vet Med Sci*; 64(1):35-39. 2002.
- 28 Tan It-Koon, Moss DW. The estimation of intestinal alkaline phosphatase in human blood serum. *Clin Chim Acta*; 25(1):117-125.1969.
- 29 Valenzuela GJ, Munson LA, Tarboux NM, Farley JR. Time-dependent changes in bone, placental, intestinal, and hepatic alkaline phosphatase activities in serum during human pregnancy. *Clin Chem*; 33(10):1801-1806. 1987.
- 30 Van Belle H. Alkaline phosphatase. II. Conditions affecting determination of total activity in serum. *Clin.Chem.* 22(7): 977-981. 1976.
- 31 Guide for the care and use of laboratory animals, Nacional Institute of Health. Publication N° 86-23, revised 1985.
- 32 Guide to the care and use of experimental animals. Vol1. 2nd Ed. 1993 Canadian Council on animal Care Guidelines. www.ccaac.ca
- 33 De Candia F, Rigalli A, Di Loreto V. Anesthesia and Analgesia. En *Experimental Surgical Models in the Laboratory rat*. Rigalli A, Di Loreto V Eds. CRC Press. Taylor & Francis Group. Boca Ratón. USA. 2009. Pag 21-30.
- 34 Rigalli A. Euthanasia. En *Experimental Surgical Models in the Laboratory rat*. Rigalli A, Di Loreto V Eds. CRC Press. Taylor & Francis Group. Boca Ratón. USA. 2009. Pag. 31
- 35 Cathala G, Brunel C. Bovine kidney alkaline phosphatase. Purification, subunit structure, and metalloenzyme properties. *J Biol Chem*; 250(15):6040-6045.1975.
- 36 Nakasaki H; Matsushima T; Sato S; Kawachi T. Purification and properties of alkaline phosphates from the mucous of rat small intestine. *J.Biochem (Tokyo)*, 86(5):1225-31 (1979).
- 37 Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254. 1976
- 38 *Current Protocols in molecular Biology*. Ed. John Wiley & Sons, Inc. 2000 Massachusetts General Hospital, Harvard Medical School. 2000. USA.
- 39 Laemmli, U.K. Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature (London)* 227: 680-685 (1970).
- 40 O'Farrell PH. High resolution two-dimensionl electrophoresis of proteins. *J Biol. Chem*, 250 (10):4007-21. 1975