

# Fosfatasa alcalina: características generales y determinación sérica

► Mario Ariel Aranda<sup>1a\*</sup>, María Beatriz Di Carlo<sup>2b</sup>

<sup>1</sup> Bioquímico Especialista en Bioquímica Clínica.

<sup>2</sup> Doctora de la Universidad de Buenos Aires; Profesora de Bioquímica Clínica II. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad de Buenos Aires.

<sup>a</sup> Hospital Interzonal General de Agudos Luisa Cravenna de Gandulfo, Lomas de Zamora. Buenos Aires, Argentina.

<sup>b</sup> Área: Gastroenterología y Enzimología Clínica, Departamento de Bioquímica Clínica, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires. Buenos Aires, Argentina.

“El presente trabajo es parte del trabajo final de la Carrera de Especialización en Bioquímica Clínica del Bioq. Mario A. Aranda, Hiperfosfatemia en pacientes adultos y pediátricos. Revisión bibliográfica y presentación de casos, Departamento de Bioquímica Clínica, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, 2020.”

\* Autor para correspondencia.

## Resumen

La fosfatasa alcalina (ALP) es una enzima de membrana ampliamente distribuida en el organismo humano. Su papel fisiológico está aún en estudio e interviene en la catálisis hidrolítica de los monoésteres del ácido ortofosfórico en medio alcalino en presencia de cationes divalentes. Su actividad total está representada por formas múltiples que incluyen isoenzimas, isoformas y macroenzimas. Las isoenzimas son producto de diferentes genes ancestrales provenientes de cromosomas diferentes, mientras que las isoformas son el producto de varios genes ubicados en distintos *loci* de un cromosoma, que presentan un diferente patrón de glicosilación postraduccional. Las originadas a partir del cromosoma 1 son más abundantes en hígado, hueso, glóbulos blancos y riñón. Las provenientes del cromosoma 2 (intestinal, placentaria y símil placentaria), presentan síntesis tisular y estructura química diferenciales entre ellas. Las macroenzimas son asociaciones de la enzima con componentes no enzimáticos como inmunoglobulinas, lipoproteínas o con fracciones de membrana plasmática, en el caso de la macroenzima biliar. La hiperfosfatemia es la elevación de la actividad total de la ALP en suero, ya sea por causas fisiológicas como en el embarazo y durante el crecimiento; o en circunstancias patológicas en respuesta a enfermedades hepatobiliares, óseas, neoplásicas e idiopáticas. Numerosas situaciones clínicas cursan con hiperfosfatemia a causa del aumento de alguna/s de las isoenzimas, isoformas o macroenzima. El estudio de estas fracciones de la ALP facilita la determinación de su origen ante un incremento de la actividad total de la enzima ubicua, lo que contribuye a un diagnóstico más preciso.

**Palabras clave:** Fosfatasa alcalina; Hiperfosfatemia; Isoenzimas

## *Alkaline phosphatase: general characteristics and serum determination*

## Abstract

*Alkaline phosphatase is a membrane enzyme that is widely spread all over the human body. Its physiological role is still under study and it intervenes in the hydrolytic catalysis of monoesters of orthophosphoric acid in an alkaline environment, in the presence of divalent cations. Its total activity is represented by its multiple present forms, which include isoenzymes, isoforms and macro enzymes. Isoenzymes are the product of different ancestral genes from different chromosomes, while isoforms are the product of several genes located in different loci of a chromosome, which show a different post-translational glycosylation pattern. Isoenzymes originated from chromosome*

Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana

Incorporada al Chemical Abstract Service.

Código bibliográfico: ABCLDL.

ISSN 0325-2957 (impresa)

ISSN 1851-6114 (en línea)

ISSN 1852-396X (CD-ROM)

*1 are more abundant in liver, bones, white blood cells and kidney. Chromosome 2-derived isoenzymes (intestinal, placental, and placental-like forms) show differences among themselves in both syntheses from tissues and chemical structures. Macroenzymes are enzyme associations to non-enzymatic components (immunoglobulin, lipoprotein, plasmatic membrane segments), such as bile macroenzyme. Hyperphosphatasemia is a disorder that features elevated alkaline phosphatase (ALP) total activity blood levels, either due to physiological causes such as pregnancy and growth or due to pathological circumstances in response to hepatobiliary, bone, neoplastic or idiopathic disease. Several clinical situations show hyperphosphatasemia, due to the increase of some of the isoenzymes, isoforms or macroenzymes. The study of these fractions of ALP facilitates the determination of its origin in case of an increase in the total activity of the ubiquitous enzyme, which contributes to a more precise diagnosis.*

**Keywords:** Alkaline phosphatase; Hyperphosphatasemia; Isoenzymes

## Fosfatase alcalina: características gerais e determinação sérica

### Resumo

A fosfatase alcalina (ALP) é uma enzima de membrana amplamente distribuída no organismo humano. Seu papel fisiológico ainda está em estudo e intervém na catálise hidrolítica de monoésteres do ácido ortofosfórico em meio alcalino na presença de cátions bivalentes. Sua atividade total é representada por múltiplas formas, incluindo isoenzimas, isoformas e macroenzimas. As isoenzimas são o produto de diferentes genes ancestrais que provêm de diferentes cromossomos, enquanto as isoformas são o produto de vários genes localizados em diferentes loci de um cromossomo, que apresentam um padrão de glicosilação pós-traducional diferente. Os originários do cromossomo 1 são mais abundantes no fígado, ossos, glóbulos brancos e rins. As do cromossomo 2 (intestinal, placentária e símile placentária) apresentam síntese tecidual e estrutura química diferenciais entre si. Macroenzimas são associações da enzima com componentes não enzimáticos como imunoglobulinas, lipoproteínas ou com frações de membrana plasmática no caso da macroenzima biliar. A hiperfosfataseemia é a elevação total da atividade da ALP em soro, seja por causas fisiológicas como gravidez e crescimento; ou em circunstâncias patológicas em resposta a doenças hepatobiliares, ósseas, neoplásicas e idiopáticas. Inúmeras situações clínicas ocorrem com a hiperfosfataseemia, devido ao aumento de algumas das isoenzimas, isoformas ou macroenzimas. O estudo dessas frações da ALP facilita a determinação de sua origem diante de um aumento na atividade total da enzima ubíqua, o que contribui para um diagnóstico mais exato.

**Palavras-chave:** Fosfatase alcalina; Hiperfosfataseemia; Isoenzimas

El objetivo de esta revisión fue recopilar información de la literatura científica sobre la enzima fosfatasa alcalina: su estructura, ubicación, función, variantes moleculares y los métodos disponibles para la determinación de su actividad total y de las distintas isoenzimas en suero.

Se consultaron las bases de datos *Medline* a través de *Pubmed* y en *Scencedirect*, debido a ser los de uso más frecuente en nuestro medio en el área de salud, y se investigó en otros buscadores a través de Google.

La búsqueda bibliográfica se limitó hasta el año 2018 y se exploró la producción científica sobre el tema. Se utilizaron los términos del *Medical Subject Headings (MeSH)*.

Las figuras fueron reproducidas bajo los términos de *Creative Commons* que permiten su uso no comercial siempre que el trabajo original sea citado en forma apropiada.

## 1. Introducción

Las fosfatasas alcalinas (ALP) forman una gran familia de enzimas glicoproteicas. Esta es una familia

muy antigua desde el punto de vista filogenético y está ampliamente distribuida en la naturaleza. Se encuentran en muchos organismos desde las bacterias hasta el hombre, incluyendo procariontes y eucariontes, con la excepción de algunas plantas superiores (1).

Su localización celular sugiere su participación en el movimiento de moléculas a través de la membrana celular. A nivel óseo se expresa en la membrana del osteoblasto cuando éstos se diferencian a partir de las células progenitoras; en el hígado se la encuentra en la membrana luminal de las células epiteliales de los canalículos biliares; en el riñón, principalmente en la membrana apical de los túbulos contorneados proximales y en menor medida en los distales; en el intestino, en la membrana apical de los enterocitos, y en la placenta, en el sincitiotrofoblasto (2).

En los seres humanos es una enzima ubicua, localizada en diversos tejidos con roles fisiológicos no del todo claros. Cataliza la hidrólisis de una gran variedad de monoésteres fosfóricos a pH alcalino.

Algunos autores consideran que la vida media de la enzima es de siete días y sus valores de referencia en

el suero varían no solo según el estado fisiológico del paciente, sino también debido al método utilizado para su determinación (3).

La actividad total de la ALP está representada por las diferentes formas de presentación de la enzima en: isoenzimas (formas múltiples), isoformas y macroenzimas (4).

### 1.1. Nomenclatura

Su denominación o nomenclatura responde a cada una de las formas internacionalmente aceptadas:

- Sistemática, considera la reacción en la que interviene. Permite identificar a la enzima y conocer la reacción que cataliza: “monoéster-ortofosfórico-fosfohidrolasa o fosfohidrolasa monoéster ortofosfórica”.
- Recomendada, se trata de un nombre trivial, generalmente una simplificación del anterior: “*alkaline phosphatase*” (inglés) o “fosfatasa alcalina” (castellano).
- Abreviada, corresponde a las siglas internacionalmente aceptadas que identifican a la enzima: “ALP” o “FAL”.
- Numérica, relacionada con la clasificación internacional de enzimas. Consta de las letras EC (*Enzyme Commission*) seguidas de cuatro números separados por un punto. Los tres primeros números indican la pertenencia de la enzima a una determinada clase (hidrolasa), subclase (esterasas) y grupo (*phosphoric monoester hydrolases*). El cuarto número indica el orden que ocupa la enzima en su grupo. Así la nomenclatura numérica de la ALP será: “*EC 3.1.3.1*.” (5).

En resumen, su denominación es: fosfohidrolasa monoéster ortofosfórica (ALP-E.C.3.1.3.1) y debido a la gran cantidad de reacciones en las que está involucrada, se la considera como una gran familia o superfamilia. Por esta razón, frecuentemente son subclasificadas en grupos, por organismo y por sustrato utilizado (6).

### 1.2. Estructura

La ALP es una glicoproteína tetramérica que pertenece a una gran familia de proteínas unidas a las membranas celulares mediante un grupo glicano-fosfatidil-inositol carboxilo terminal (7). Generalmente confinadas a la superficie celular, son liberadas a la circulación como un dímero con dos sitios activos simétricos, homodiméricos (8). En las Figuras 1, 2 y 3 se muestran las imágenes tridimensionales de la estructura del monómero, dímero y tetramero de ALP, obtenidas por cristalografía.

Son metaloenzimas, codificadas por una familia multigénica, que contiene tres iones metálicos en el sitio catalítico: dos de zinc ( $Zn^{2+}$ ) y uno de magnesio ( $Mg^{2+}$ ), necesarios para la actividad enzimática (9). Sin embargo, estos iones metálicos también contribuyen sustancialmente a la conformación del monómero ALP y regulan indirectamente las interacciones subunidad-subunidad del dímero (10).

La estructura primaria de las ALP, las que se han elucidado en forma completa, demuestran una alta conservación entre especies. En los mamíferos, la sola sustitución por dos Hys en Asp-153 y Lys-328, es la responsable del incremento de su actividad de 20 a 30 veces con respecto a la de las bacterias (11).

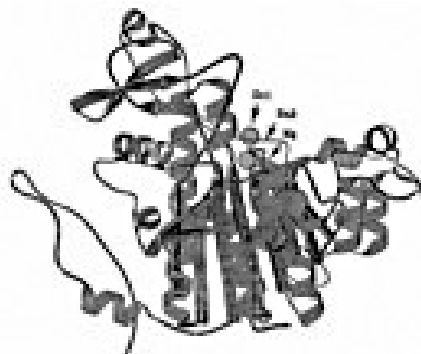


Figura 1. Estructura tridimensional del monómero de ALP (isoforma hepática).

Extraído de la referencia 15.

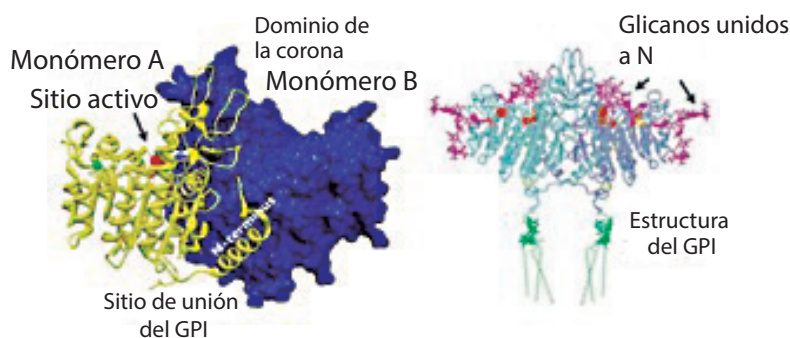


Figura 2. Estructura tridimensional del dímero de ALP (isoenzima placentaria).

Extraído de la referencia 14.

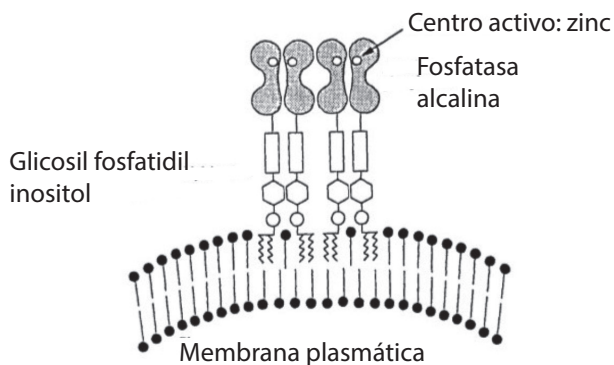


Figura 3. Estructura tridimensional del tetrámero de ALP (isoenzimas TNS, PLAP, IALP).  
Extraído de la referencia 15.

La estructura secundaria de las ALP consiste en dos cadenas polipeptídicas idénticas que, al plegarse, forman regiones con estructuras secundarias basadas principalmente en hélices alfa y vueltas beta, con algunas zonas aleatorias plegadas fuertemente en espiral. Debido a su naturaleza homodimérica, su peso molecular puede variar, dependiendo del organismo o tejido involucrado, desde 35 000 kDa (intestino de camello) hasta 494 000 kDa (células de linfoma de Hodgkin humano) (12).

A nivel celular las ALP se unen como un tetrámero a la membrana plasmática a través de un glicosil-fosfatidil-inositol (GPI) que se agrega post-traduccionalmente a la cadena peptídica naciente en una reacción de transamidación (Fig. 3). Esto implica la eliminación de un tramo de 29 aminoácidos hidrofóbicos del extremo carboxilo y la transferencia concomitante del anclaje GPI premontado al nuevo aminoácido carboxiterminal (Asp48) (9).

El reconocimiento de que la ALP pertenece a la categoría de moléculas que se localizan en las membranas celulares a través del GPI por el carboxilo terminal y que una fosfolipasa libera a la ALP como dímero a la circulación y proporciona las bases para comprender la generación de las diferentes isoenzimas observadas en el suero en distintas situaciones, ya sean patológicas o no (13) (14).

### 1.3. Acción catalítica y biológica

La ALP cataliza la hidrólisis de monoésteres del ácido fosfórico al intervenir en los procesos de hidrólisis y transfosforilación (15); esta última reacción, en presencia de grandes concentraciones de aceptadores de fosfato (Fig. 4).

Se conservan los mecanismos catalíticos cuando se comparan las ALP de mamíferos y bacterias. Las ALP de mamíferos tienen mayor actividad específica, el pH óptimo de acción es más alcalino, muestran menor estabilidad térmica, están unidas a la membrana celular y son inhibidas por L-aminoácidos y péptidos a través de un mecanismo no competitivo. Estas propiedades, sin embargo, difieren notablemente entre las diferentes isoenzimas de ALP encontradas en los mamíferos, y probablemente reflejen distintas funciones biológicas (16).

Es importante destacar que las ALP tienen homología con un gran número de otras hidrolasas y, por lo tanto, son parte de una superfamilia de enzimas con algunas propiedades catalíticas y especificidades de sustrato superpuestas (17). Hidrolizan fosfatos unidos a nucleótidos, proteínas, y muchos otros sustratos, a pH entre 8 y 11 y en presencia de iones  $Zn^{2+}$  y  $Mg^{2+}$  y ocasionalmente de  $Co^{2+}$ . Su reacción catalítica se da en dos pasos: en el primero se genera un intermediario covalente de fosfoserina y en el segundo se produce un ataque nucleofílico (en medio acuoso o alcohólico)

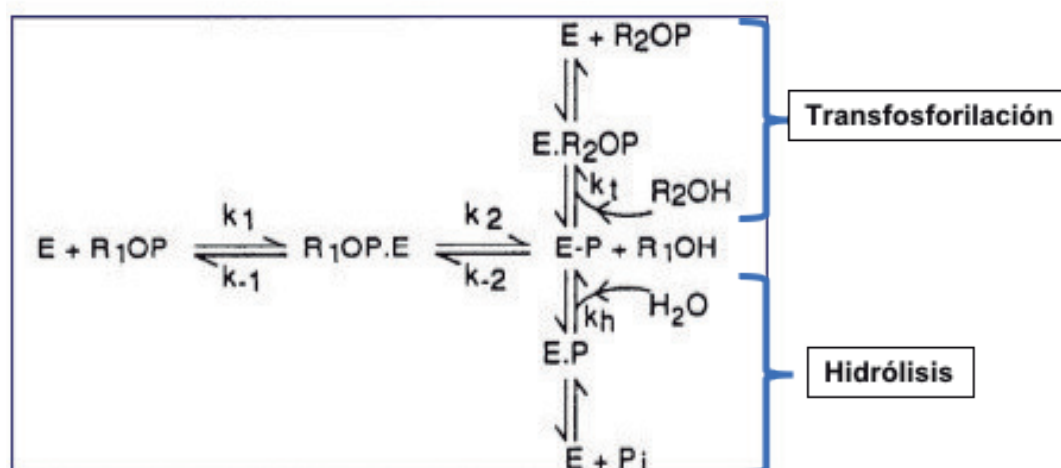


Figura 4. Reacción catalítica de hidrólisis y transfosforilación.  
Extraído de la referencia 1.



para liberar un fosfato inorgánico y un nuevo fosfoéster o especie libre (18).

Para que la ALP pueda ser activada se necesita de cationes divalentes. Ejemplos de éstos son el  $Mg^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$  y  $Co^{2+}$ . A nivel celular, la ALP necesita de los iones  $Mg^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$  cuando su actividad se da en el citoplasma y a los demás iones se los ha involucrado en la actividad de ALP unida a membrana. A mayor concentración disponible de estos iones, mayor es la actividad de la enzima, salvo para el caso del  $Zn^{2+}$  con el que se observa una acción inversa.

Para casi todas las ALP de las que se ha elucidado completamente su estructura, se involucra la coordinación de dos iones Zn ( $Zn1$  y  $Zn2$ ) y uno de Mg en la vecindad del centro activo, separados por distancias características de acuerdo a la especie. En la primera etapa de hidrólisis, el  $Zn1$  coordina el oxígeno del enlace éster ortofosfórico, mientras que  $Zn2$  lo hace durante la hidrólisis del intermediario fosfoseril. Los datos publicados sugieren una cooperatividad entre estos iones que parece favorecer el ambiente electropositivo necesario para la hidrólisis de los grupos fosfato y la perfecta conformación de la ALP para realizar la catálisis (Fig. 1) (Fig. 2).

Más aún, la «promiscuidad» para hidrolizar fosfomono o fosfodiésteres observada en algunos miembros de la superfamilia de las ALP es consecuencia de las interacciones establecidas entre algunos residuos de aminoácidos del centro activo con los átomos de oxígeno del grupo fosfato y el agua de coordinación asociada al ion  $Mg^{2+}$ . El  $Co^{2+}$  es el único metal que puede sustituir al zinc en forma dependiente de la dosis y del pH, aunque también puede sustituir al  $Mg^{2+}$ . Esta sustitución disminuye o aumenta la actividad de ALP de acuerdo a la especie (19).

La función biológica de la ALP en los seres humanos no es del todo conocida; se ha estudiado su participación en: el transporte de lípidos a través de membrana, procesos de calcificación y resorción ósea, la detoxificación a nivel hepático, la formación de la bilis, el metabolismo ribonucleoproteico y en el metabolismo de fosfatidiletanolamina, del pirofosfato y del piridoxal fosfato (1) (20).

En consideración a la función catalítica de la ALP, ésta interviene en la hidrólisis de una gran variedad de ésteres fosfóricos a pH alcalino; su función biológica se relaciona a ésta y a las ubicaciones celular y tisular de la enzima. A nivel de los epitelios del canalículo biliar, intestino y riñón, interviene en los procesos de transporte de membrana que están implicados en la formación de la bilirrubina, en el transporte de lípidos y en la detoxificación hepática principalmente. En los osteoblastos participan en los procesos de calcificación del osteoide y su aumento es indicador de actividad osteoblástica. A nivel del intestino se le atribuye una función protectora al reforzar la función de la barrera intestinal y en la determinación de la composición de la microbiota, a través de su capacidad para desfosforilar el lipopolisacárido de la pared bacteriana (21).

#### 1.4. Variantes moleculares

En los seres humanos son los cromosomas 1 y 2 los que codifican para la síntesis de la familia de las ALP (13).

En el brazo corto distal del cromosoma 1 (p34-p36) se encuentra el gen que codifica para la ALP inespecífica de tejido; éste codifica a una familia de proteínas con glicosilación diferencial (en el aparato de Golgi) que da lugar a las isoformas específicas de tejido que difieren entre sí solo por la modificación postraduccional antes mencionada. Estas isoformas de ALP están presentes en todo el organismo, siendo más abundantes en el tejido hepático, esquelético y renal. En consecuencia, se denominan ALP hepática o L (*liver*) (ALPL); ALP ósea o B (*bone*) y de riñón o K (*kidney*), o en forma colectiva considerando a estas tres más otras como isoenzimas de ALP no específicas de tejido (TNSALP) (22) (23).

Las evidencias que se pueden citar acerca de que estas isoformas son productos de un mismo gen son: 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 inmunoquímica cruzada; d) muestran un patrón electroforético luego de la digestión por neuraminidasa (2) (24).

En el brazo largo del cromosoma 2 (q34-q37) se encuentran los tres genes que se expresan de manera específica en los tejidos y producen las otras tres isoenzimas: intestinal, placentaria y símil placentaria o de células germinales. La estrecha asociación de estos tres *loci* presumiblemente refleja su ascendencia evolutiva común. Estos tres últimos genes y sus productos tienen correspondientemente secuencias similares de bases y aminoácidos; estas similitudes son particularmente marcadas en el caso de ALP placentaria y de células germinales que difieren en solo 7-10 residuos de aminoácidos (98% de homología). Las fosfatasas alcalinas intestinales y no específicas de tejido presentan una baja relación estructural (homología del 56,6%) (23).

La homología entre las isoenzimas placentarias e intestinales es del 86,5%, 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 (13).

A continuación, en la Figura 5 se describen las formas de presentación de las ALP en suero y otros fluidos biológicos humanos. El estudio de las isoenzimas, isoformas y macroenzimas de una misma enzima permite aumentar el conocimiento del origen o ubicación (órgano-especificidad) frente al aumento de la actividad total de la enzima ubicua, y favorece una orientación diagnóstica más precisa. Así se puede postular que: “El estudio de las isoenzimas de una enzima aumenta la especificidad diagnóstica en relación al estudio de su actividad total”.

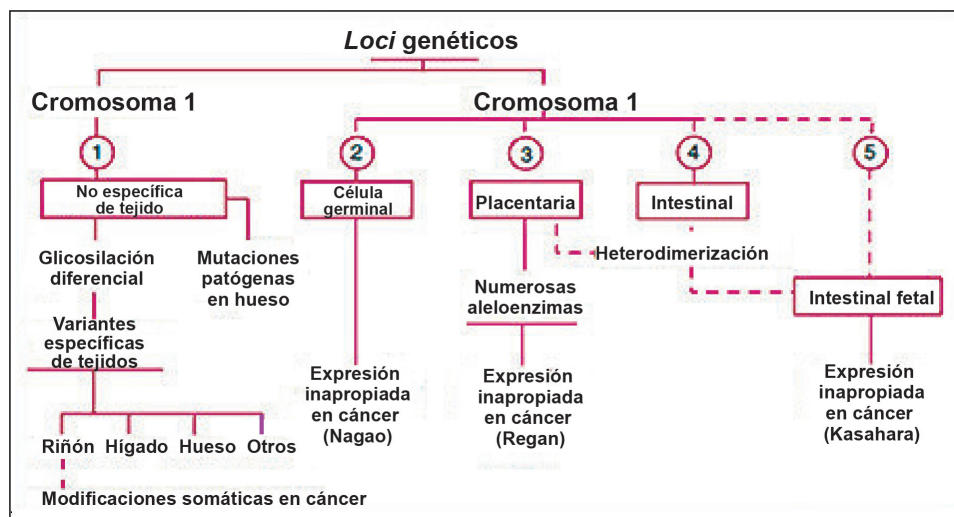


Figura 5. Asignaciones cromosómicas, variantes moleculares y expresión fisiológica y patológica principal de genes que codifican para las fosfatasa alcalinas humanas.

Extraído de la referencia 13.

#### 1.4.1. Isoenzimas e isoformas de la fosfatasa alcalina

En la bibliografía se usan indistintamente los términos isoenzimas, formas múltiples e isoformas. De manera más rigurosa la palabra “isoenzima” se aplica a las proteínas especializadas como enzimas, que catalizan la misma reacción, tienen similar especificidad de sustrato y diferente estructura molecular, y se las reconoce como formas múltiples de una enzima. Así, las isoenzimas están codificadas por diferentes genes, mientras que las “isoformas” son productos del mismo gen con modificaciones después de la traducción (20).

En particular la ALP presenta cuatro isoenzimas según el sitio o tejido de expresión: no específica de tejido (TNS-ALP), intestinal (I-ALP), placentaria (PALP) y de origen neoplásico (25). Los *loci* para las isoenzimas TNS-ALP se encuentran cerca del extremo distal del brazo corto del cromosoma 1 y para las isoenzimas I-ALP y PALP están ubicados cerca del extremo del brazo largo del cromosoma 2 (23).

##### • Isoenzima de la fosfatasa alcalina no específica de tejido de la ALP (TNS-ALP)

Representa a una familia de proteínas con igual estructura primaria pero diferente grado de glicosilación. Esta modificación postraduccional se desarrolla en el aparato de Golgi, donde se le adiciona un número diferente de moléculas de hidratos de carbono (ácido siálico principalmente) dando lugar a las isoformas específicas de tejido de la isoenzima inespecífica de tejido. Estas isoformas de ALP están presentes en todo el organismo, pero son más abundantes en el tejido hepático o L (*liver*, L-ALP) y esquelético o B (*bone*, B-ALP); se encuentran también sintetizadas por el tejido renal, y están ubicadas en la membrana apical de los túbulos

contorneados distales, y en los leucocitos circulantes. Si bien aún se encuentran en estudio, se ha observado que podrían ser sintetizadas también por otros tejidos (22).

##### • Isoforma hepática (L-ALP)

Se expresa en el hígado, en la membrana de los canalículos biliares. En condiciones fisiológicas su presencia en el plasma deriva de la membrana sinusoidal de los hepatocitos.

Respecto a la función de la isoenzima hepática, se la relaciona al transporte de colina a través de la membrana canalicular de los hepatocitos y en la superficie luminal de las células epiteliales biliares (26).

Un aumento sérico de la L-ALP se encuentra principalmente ligado a desórdenes hepatobiliares.

En los trastornos obstructivos, la alteración en la excreción normal de la bilis sería la causa de la regurgitación de la ALP dentro de la circulación vía los sinusoides hepáticos. La colestasis, patología que presenta ausencia o alteración del flujo normal de la bilis hacia el duodeno, también estimula la síntesis de ALP por las células de los ductos biliares. Así, el aumento sérico de la L-ALP es un indicador sensible pero no específico de colestasis (extra e intrahepática). Se observan también aumentos séricos de esta isoforma en todos los estadios de los procesos inflamatorios hepáticos: hepatitis, lesiones parenquimatosas tanto malignas primarias como metastásicas y en las lesiones hepáticas inducidas por drogas (27).

En condiciones patológicas, los mecanismos implicados en la regurgitación de la ALP desde el hígado son bastante complejos. Por ejemplo, en la colestasis se observa una síntesis *de novo* de L-ALP que contribuye a aumentar las cantidades de la enzima activa que regurgitan desde la membrana canalicular por procesos

transcelulares o por vía paracelular hacia la circulación. La principal fuente plasmática de la L-ALP es: en los procesos colestáticos derivada de la membrana canalicular, y en los trastornos del parénquima hepático, la membrana apical de los hepatocitos (28).

- **Isoforma ósea u osteoblástica (B-ALP)**

Se expresa en la membrana del osteoblasto cuando éstos se diferencian a partir de células progenitoras y es secretada a la circulación y forma parte de los marcadores bioquímicos utilizados en el estudio del recambio óseo, es el más frecuentemente utilizado y estudiado como marcador del recambio y del remodelamiento óseo.

Se considera que la B-ALP favorece la mineralización ósea mediante la eliminación de los inhibidores de la cristalización; así es capaz de unirse a proteínas de la matriz extracelular (colágeno principalmente), proporcionando un mecanismo para la fijación de los osteoblastos al cartílago, favoreciendo la calcificación. Es una importante promotora de la mineralización porque cataliza la hidrólisis de pirofosfato (PPi) disminuyendo las concentraciones de este inhibidor de la calcificación, aumentando los niveles de fosfatos (Pi) (29).

La elevación sérica de B-ALP se produce en períodos del crecimiento óseo, en fracturas, deficiencia de vitamina D y osteomalacia. Se observaron también aumentos de B-ALP en los procesos de osteoporosis, hiperparatiroidismo, osteodistrofia renal y neoplasias o metástasis óseas (30).

- **Isoenzima intestinal de la fosfatasa alcalina (I-ALP)**

La I-ALP se expresa ligada a la membrana apical del ribete en cepillo de los enterocitos, es una ectoenzima unida a la membrana con borde en cepillo. Es expresada y secretada por las células epiteliales intestinales y permanece activa dentro de la membrana de la mucosa, así como en la luz intestinal luego de la ingestión de una comida rica en grasas. Es secretada tanto hacia la luz intestinal como hacia el plasma, y se halla en estos sitios de manera soluble en lugar de anclada a la membrana. La forma soluble, probablemente por descamación celular, se incrementa a lo largo del intestino. La expresión de I-ALP se encuentra en todo el intestino, pero es más alta en el duodeno. Su actividad de fosfatasa es más alta en el íleon terminal y su expresión en el intestino aumenta durante la inflamación. Se secreta en el suero, donde permanece biológicamente activa (31).

En seres humanos la actividad plasmática de ALP varía según el grupo sanguíneo. Los enterocitos de pacientes del grupo A fijan ávidamente a la isoenzima intestinal, por ello una fracción muy pequeña de la actividad plasmática de ALP se debe a dicha isoenzima. Los enterocitos de pacientes del grupo B o del grupo 0 fijan menos a la IALP teniendo esta isoenzima más importancia en la actividad plasmática total de ALP. Normalmente menos del 10% del valor de actividad de ALP en circulación se debe a la I-ALP (32).

Una de las principales funciones de la I-ALP es la de intervenir en la detoxificación de los lipopolisacáridos bacterianos para controlar la inflamación intestinal (33). Otras de sus acciones fisiológicas incluyen: la regulación de la secreción de bicarbonato y del pH de la superficie duodenal; la modulación de la absorción intestinal de los ácidos grasos de cadena larga; la regulación de las comunidades microbianas y su translocación a través de la barrera intestinal y la desfosforilación de ATP liberada de tejido dañado (34). Su concentración catalítica en el intestino está regulada no solo por los procesos inflamatorios, sino también por la nutrición, los procesos digestivos y el crecimiento durante el desarrollo corporal (35).

La I-ALP sérica, producida por los enterocitos y liberada al torrente circulatorio, se metaboliza rápidamente en el hígado. El *clearance* se encuentra disminuido en la cirrosis y en la hipertensión portal (34).

- **Isoenzima placentaria de la fosfatasa alcalina (PLAP)**

Está presente en condiciones fisiológicas en el suero de las embarazadas. Su expresión está regulada por varios genes fetales en el sincitiotrofoblasto de la placenta. Existe producción de esta isoenzima por la placenta desde el implante del embrión, lo que se evidencia como un aumento sérico a partir de la semana 10 de gestación. A partir de este momento el aumento de la actividad total de la ALP en el suero materno se debe a la producción de la PLAP.

Esta isoenzima aumenta su producción a medida que avanzan las semanas de gestación. Comparativamente, está presente en concentraciones catalíticas tres veces mayores que las observadas en el suero de las mujeres no embarazadas, y permanece en el suero materno entre una semana y hasta un mes postparto.

La isoenzima PLAP también presenta isoformas: P1 y P2 que se diferencian como tales en el suero materno entre las semanas 15 y 26 del embarazo. Al final del segundo trimestre la actividad PLAP está representada en un 90% por la isoforma P1 y en un 10% por la isoforma P2, ambas producidas por el sincitiotrofoblasto de la placenta (36).

Es de considerar que, durante la gestación en el suero materno además de la PLAP, también existe un aumento de la B-ALP. Esto se debe a que la formación de hueso materno aumenta durante embarazo, como una forma de acomodar el cuerpo de la embarazada al crecimiento fetal y al parto. Se ha demostrado que entre las semanas 31 y 32 la B-ALP contribuye con un porcentaje mayor que la PLAP a la actividad total sérica de la ALP, lo que indica que la formación ósea materna puede ser más alta durante este período del embarazo (37) (38).

- **Isoenzimas oncofetales de la fosfatasa alcalina**

En líneas generales se las puede definir como la expresión inadecuada de isoenzimas de la ALP en tejidos

neoplásicos. Se ha observado también con menor significación clínica, la producción de las mismas en tejidos no tumorales (39).

Se sugiere que frente a valores inexplicablemente incrementados de ALP sérica, es importante descartar la presencia de las isoenzimas carcinoembrionarias u oncofetales, las cuales orientan al diagnóstico de enfermedades malignas o neoplásicas (20).

Existen múltiples variables de las ALP oncofetales: se citarán las que, según la bibliografía, han sido más estudiadas: Regan, Nagao y Kasahara (Fig. 3).

– La **isoenzima Regan** fue la primera en descubrirse, está asociada al carcinoma broncogénico, y se puede encontrar en el suero de pacientes fumadores aparentemente sanos.

Es la expresión de la PALP en tejidos neoplásicos, por lo que su presencia en suero es la consecuencia de la reexpresión del gen que codifica para la PALP.

Comparativamente con la PALP es prácticamente idéntica en los aspectos estructurales y físicos, a excepción de su sensibilidad mayor a la inhibición con urea y de una movilidad electroforética brevemente enlentecida.

– La **isoenzima Nagao** se considera como la expresión en neoplasias de células germinales de ALP (GC-ALP). Está muy relacionada con la isoenzima Regan. De esto último surge la denominación conjunta (Regan y Nagao) de simiplacentarias o PLAP-*like*. Está asociada a tumores de células germinales y es utilizada como marcador bioquímico de seminoma (40).

A diferencia de la PALP y la Regan, la Nagao es más sensible a la inhibición con L-leucina (41).

En la bibliografía, además, se citan otras formas también asociadas a neoplasias, sin homologías con las formas Regan y Nagao (PLAP-*like*), encontradas y secretadas por los mismos tejidos tumorales que las anteriores, denominadas “no Regan” (42).

– La **isoenzima Kasahara** es la expresión inapropiada de la I-ALP en tejidos neoplásicos. Está relacionada con la isoenzima intestinal fetal que se sintetiza entre las semanas 20 y 25 de gestación. Si bien presenta diferencias estructurales, posee propiedades catalíticas típicas de la I-ALP del adulto (43). Su presencia en el suero está asociada a hepatoma y a otros tipos de cánceres (44).

#### 1.4.2. Macroenzimas de la fosfatasa alcalina

Se considera macroenzima a la formación de complejos entre la isoenzima o isoforma de una enzima con inmunoglobulinas (Tipo I) u otras estructuras no inmunoglobulínicas (Tipo II) que, como consecuencia, presentan un peso molecular más alto y una vida media o un tiempo de recambio plasmático más largo que la forma que le dio origen (45).

Se sugiere la presencia de una macroenzima cuando se observa un aumento persistente de la actividad

total de la enzima en circulación, que no se asocia con los síntomas (46). Su falta de detección puede provocar errores de diagnóstico y la realización de pruebas innecesarias o de procedimientos invasivos (47).

De la ALP se han estudiado los dos tipos de macroenzimas (48):

- Tipo I, conocida como “inmunocomplejos de ALP”, estructuralmente es una de las isoenzimas de ALP unida a inmunoglobulinas, y
- Tipo II, conocida con el nombre de “biliar, hepática rápida o alfa I hepática”, está unida a estructuras no inmunoglobulínicas (otras enzimas, fosfolípidos y/o proteínas).

A la primera se la estudió asociada a alteraciones de tipo autoinmune y a la de tipo II se la relacionó con procesos obstructivos hepáticos (4).

## 2. Valor semiológico

En el suero de un individuo coexisten normalmente más de una forma de presentación de la ALP. Las proporciones relativas de cada forma varían en función de diversos factores, principalmente la edad, el sexo y el estado fisiológico del organismo (49) y reflejan en general el estado funcional de sus respectivos órganos de procedencia. Si bien el papel fisiológico de la ALP es parcialmente conocido, su localización celular sugiere la participación en el movimiento de moléculas a través de las membranas.

En general se considera que la vida media o tiempo de recambio de la enzima en circulación es de hasta 7 días (3), aunque otros autores indican que la misma es de 1-2 días, con mínima variación diurna (7). Las formas que presentan mayor vida media son las isoenzimas intestinal y placentaria, y menor la isoenzima hepática, 3 días (50).

Se han observado tiempos de recambio mayores; en estos casos es de considerar la vida de los osteoblastos, de 1 a 10 semanas (51).

Las formas múltiples de ALP de origen óseo y hepático se encuentran invariablemente presentes en el suero de cualquier persona y a ellas se debe la mayor parte de la actividad fosfatásica del suero (52). En el suero de un paciente adulto en ausencia de enfermedad se considera que más del 90-95% de la actividad total de ALP está representada por la isoenzima TNS, de origen hepático y óseo. También se debe considerar la contribución de la isoenzima intestinal que, si bien es poca, puede estar presente hasta en un 5-10%. La concentración catalítica de la ALP sérica varía considerablemente con la edad y en menor grado con el sexo. Se ha demostrado que los cambios en la actividad durante la infancia y la juventud se deben casi exclusivamente a la forma ósea (53).

La presencia de las isoformas hepáticas y óseas en el adulto es con predominio de la primera, conformando-



se: 70-80% a expensas de la isoforma hepática y 20-30% de la isoforma ósea. Desde el nacimiento hasta alcanzar la edad adulta se observa un cambio en la proporción de estas isoformas. En el niño en crecimiento es mayoritaria la presencia de la isoforma ósea, hasta alcanzar los porcentajes antes enunciados en la edad adulta. Los cambios en el perfil isoenzimático con la edad se deben casi exclusivamente a la forma ósea (54).

La interpretación de los resultados de la actividad sérica de la ALP usando poblaciones de referencia adecuadas es particularmente importante en niños; los límites de referencia difieren poco en los hombres y mujeres adultos entre las edades de 25 y 60 años (55). Luego de los sesenta años, los límites de referencia aumentan principalmente en las mujeres, aunque los estudios no han sido consistentemente evaluados para la presencia de osteoporosis, que puede incrementar la actividad de la ALP sérica (56). Si bien la ALP contribuye a la mineralización de la sustancia osteoide por parte del osteoblasto, con la consiguiente formación ósea, también media en la reabsorción llevada a cabo por los osteoclastos a través de la síntesis de citoquinas específicas (51).

Así, se ha observado que a partir de los 40 años existe un aumento gradual de valores de ALP con la edad y las mujeres presentan valores ligeramente más bajos que los hombres. Son de considerar también diferentes límites de referencia en relación con las mujeres pre y posmenopáusicas, debido a la influencia hormonal en el recambio óseo (57).

Debido a que el aumento sérico de la actividad de ALP se puede corresponder con múltiples fuentes de origen y que no siempre aumenta por encima del rango de referencia en los procesos de osteoporosis y otras enfermedades metabólicas óseas, es que la ALP total no ha tenido un uso generalizado como marcador de remodelación ósea, como en cambio sí lo ha tenido el estudio de la isoforma ósea. La B-ALP es la verdadera marcadora de la actividad osteoblástica; se localiza también en las vesículas de la matriz y participa del proceso de mineralización proveyendo fósforo inorgánico (Pi). Este Pi es obtenido de la hidrólisis de los sustratos, como el PPi y de esta forma la B-ALP estimularía la formación de hidroxiapatita (58). En condiciones fisiológicas se requieren rangos de referencia separados para niños basados en la edad y el sexo (59). Un rango de referencia único es adecuado para adultos mayores de 25 años (55). Debido al crecimiento y a una mayor actividad osteoblástica, existen dos picos máximos de actividad total de ALP: en neonatos, donde se observan aumentos entre 2-3 veces el valor de referencia del adulto; y otro en la pubertad, con valores de hasta 7 veces el valor de referencia del adulto. Algunos autores estiman que es alrededor de los 20 años cuando se alcanza el valor de actividad de ALP del adulto (60).

También en condiciones de salud, se requieren rangos de referencia separados para las mujeres embarazadas. Se observa un aumento sérico de la actividad de

la ALP total en mujeres adultas en edad fértil, en estado de embarazo (61). Los aumentos se corresponden con la aparición de la isoenzima PALP. En un embarazo normal, la actividad de ALP aumenta a partir del tercer mes, puede alcanzar hasta el doble hacia los 9 meses y permanece luego elevada hasta 1 mes después del parto; es en el tercer trimestre de embarazo donde la isoenzima placentaria cobra importancia (62).

Aproximadamente el 25% de la población sana expresa la isoenzima intestinal y, normalmente, menos del 10% del valor de actividad de ALP sérica se debe a la I-ALP (26). En seres humanos la actividad sérica de la ALP varía según el grupo sanguíneo. En el período posprandial, individuos secretores de los grupos sanguíneos O y B presentan aumentos séricos de I-ALP. Los enterocitos de pacientes del grupo sanguíneo A fijan ávidamente a la isoenzima intestinal, por ello una fracción muy pequeña de la actividad plasmática de ALP se debe a dicha isoenzima. En cambio, los enterocitos de pacientes de los grupo B u O fijan menos a la I-ALP y por eso esta isoenzima tiene más presencia en la actividad sérica total de ALP (63).

La hiperfosfatemia es la elevación de los niveles séricos de la actividad total de la ALP, ya sea por causas fisiológicas, como en el embarazo y en el crecimiento, o en circunstancias patológicas, en respuesta a enfermedades hepato biliares, óseas, neoplásicas e idiopáticas; una de las causas más frecuentes e inocuas en lactantes y escolares es la hiperfosfatemia transitoria benigna de la infancia (HFTBI) (3).

La forma renal de la ALP no ha sido identificada en el suero de ningún individuo sano y es rara su presencia, incluso en casos de anomalías renales (64).

La actividad de la ALP puede encontrarse muy elevada en enfermedades hepáticas primarias o secundarias, debido principalmente al incremento de la isoenzima hepática, ya que se encuentra alterada su síntesis o su eliminación biliar.

El mecanismo del aumento de la ALP total en el suero de un paciente con trastornos hepato biliares ha sido un tema de debate. Se ha demostrado de manera convincente que se debe a un aumento de la síntesis de enzimas y no a una reducción de la excreción hepato biliar de las mismas (65).

Se conoce que el aumento sérico de la actividad de las enzimas hepáticas es paralelo al aumento de la actividad de la ALP. Esto ocurre principalmente debido a la mayor traducción del ARNm de la ALP (mediada por el aumento de la concentración de ácidos biliares) y al aumento de la secreción de ALP en el suero a través de la fuga canalicular hacia el sinusoides hepático. El mecanismo por el cual se libera a la circulación no está completamente dilucidado. Está descrito en la literatura que las vesículas contienen ALP y otras enzimas unidas a las membranas sinusoidales y son éstas las que aparecen en el suero de pacientes con colestasis (66).

Algunos de los valores más elevados de la actividad de ALP relacionada a trastornos hepatobiliares se han observado en pacientes con colestasis. Se define como colestasis a la disminución o ausencia del flujo biliar hacia el duodeno a causa de distintas etiologías, que conlleva una diferente metabolización de bilirrubina, colesterol y ácidos biliares. Uno de los principales atributos clínicos de la ALP es su utilidad en el diagnóstico de enfermedad hepática colestásica. Por lo general, un aumento de cuatro veces el límite superior se observa en hasta el 75% de los pacientes con colestasis, ya sea intra o extrahepática. El grado de elevación no diferencia a los dos tipos de colestasis (67).

En el cáncer primario de hígado o metastásico se elevan los niveles séricos de ALP por obstrucción local del conducto biliar y por un aumento de la salida de la isoforma hepática.

Los incrementos de la actividad sérica de ALP a expensas de la isoenzima ósea se presentan en la reparación de fracturas y en patologías como hiperparatiroidismo, osteomalacia, osteomielitis, enfermedad de Paget y neoplasias óseas.

Algunas isoenzimas de ALP que están relacionadas con neoplasias provocarían por síntesis un aumento de la actividad sérica total de la ALP. Una variante de la isoenzima placentaria llamada Regan se incrementa en neoplasias de pulmón, tracto gastrointestinal, ovario y útero. También se describe una variante denominada Nagao en seminoma y una conocida como Kasahara que se incrementa en algunos hepatomas.

La HFTBI, descrita en 1954, es una entidad benigna y autolimitada en la cual se observa un desproporcionado y aislado aumento sérico de la actividad de ALP sin que exista una enfermedad ósea o hepática asociada (68). Un estudio registró una prevalencia de HFTBI del 2,8% en menores de 2 años. Se observa más frecuentemente en niños menores de 5 años; casi la mitad de los casos se presentan en el segundo año de vida con una media de 16 meses, aunque se ha descrito en niños mayores e incluso en adolescentes (69).

Pese a no estar aún definido el mecanismo por el cual se produce este aumento desmesurado de ALP, se han postulado diversas teorías como: la destrucción celular, el aumento de su síntesis enzimática, la ruptura del anclaje de la enzima en la membrana y la disminución del aclaramiento plasmático.

La etiología de la HFTBI es desconocida, pero su hallazgo en el contexto de virosis respiratorias y gastrointestinales, y su coincidencia temporal con anticuerpos contra distintos enterovirus, orienta a una probable etiología infecciosa (54). Otros autores asociaron la elevación transitoria de la ALP a un mal incremento pondero-estatural. Según la evidencia recogida en varios trabajos el 35% de los casos son diagnosticados en una evaluación de rutina (70).

Descensos en la actividad sérica de ALP son de valor en el diagnóstico de la hipofosfatasa. Es una enfermedad ultra rara del metabolismo mineral óseo, autosómica recesiva, caracterizada por una extrema disminución de la actividad de la isoenzima TNS-ALP, debido a la existencia de mutaciones en el gen que codifica para la misma (71). Clínicamente, se caracteriza por el desarrollo de hipomineralización esquelética y dental, junto con la frecuente aparición de manifestaciones extraesqueléticas. Su espectro fenotípico es muy variable y engloba una forma de afectación exclusivamente odontológica (odontohipofosfatasa) y 5 subtipos de afectación sistémica diferenciados según el momento de inicio de los síntomas, que puede ser fatal en neonatos e infantes (72).

Del resultado obtenido de la actividad de ALP total sérica, se debe conocer el aporte de las distintas isoenzimas, para aumentar la especificidad de órgano y realizar un diagnóstico diferencial ante aumentos de la actividad total.

### 3. Metodología para la determinación sérica

El estudio sobre las características de una enzima en particular da cuenta de su complejidad estructural, su eficiencia metabólica y hasta de su posición en la escala evolutiva. En el caso de la superfamilia de la ALP, una enzima con actividad pleiotrópica distribuida ampliamente en todos los seres vivos, ha sido explotada como indicador biológico relacionado a diferentes patologías (73).

Su interés en la utilidad para la bioquímica clínica requiere un conocimiento profundo de las metodologías disponibles para su determinación en los fluidos biológicos, principalmente en el suero.

#### 3.1. Material de muestra de elección

La determinación de ALP solo puede realizarse en suero o plasma heparinizado. La muestra se obtiene por venopunción, y es el suero recientemente obtenido y libre de hemólisis la muestra recomendada para el análisis. Como material de muestra nunca debe usarse plasma obtenido con anticoagulantes quelantes como oxalato, citrato y EDTA, ya que formarían un complejo con los iones divalentes necesarios para la actividad de la ALP ( $Mg^{2+}$  y  $Zn^{2+}$ ). En el caso de utilizarse plasma, éste deberá ser obtenido con heparina de litio, que resulta ser menos interferente que otros heparinatos. Otros cationes como:  $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Pb^{2+}$  y el  $Cr^{6+}$  que aunque no se encuentren asociados estructuralmente de forma natural, pueden aumentar su capacidad catalítica (19).

### 3.2. Estabilidad en la muestra

Las muestras deben mantenerse a temperatura ambiente y analizarse lo más pronto posible, preferiblemente antes de las 4 horas desde la punción venosa.

Las diferentes formas moleculares de la ALP tienen una estabilidad similar en suero, a excepción de la forma placentaria que es mucho más estable, ya que se mantiene activa durante 4 semanas a 4 °C. El resto de las formas son estables durante 5 días a 4 °C. Para períodos más prolongados, se recomienda congelar la muestra a -20 °C, dejándola una hora a temperatura ambiente tras la descongelación antes de proceder al análisis, para obtener una plena reactivación de la enzima. Es de considerar que la actividad de la ALP luego del descongelado puede presentar un leve incremento (74).

### 3.3. Determinación de la actividad o concentración catalítica total

En la actualidad la metodología recomendada para la determinación de la actividad o concentración catalítica de ALP se basa en métodos de monitoreo continuo o cinéticos.

Dada su relativa inespecificidad de sustratos monoésteres fosfóricos, se han empleado numerosos sustratos diferentes para medir su actividad. De ellos, los más convenientes son los llamados cromogénicos, que generan un cambio de absorbancia al ser transformados en presencia de la enzima.

Entre los sustratos cromogénicos, en la actualidad el recomendado por las diferentes escuelas [Sociedad Alemana de Química Clínica - (DGKC) y Federación Internacional de Química Clínica (IFCC)] es el 4-nitrofenilfosfato. Entre las ventajas de este sustrato se observa que todas las isoenzimas de ALP presentan alta afinidad (75) (76).

A partir de este sustrato, se genera por acción hidrolítica fosfatásica el para (p) o 4-nitrofenol, que tautomeriza a pH alcalino formando un compuesto coloreado (amarillo), el p-nitrofenóxido, el que presenta un alto coeficiente de absorptividad en el espectro visible. La formación de este último permite seguir de forma continua la velocidad de transformación del sustrato en producto por acción de la ALP, visualizado por el aumento de absorbancia a 405 nm. La reacción utilizada con fines analíticos en estudios cinéticos y de identificación de ALP se observa en la Figura 6.

La transferencia del grupo fosfato del sustrato puede realizarse por hidrólisis simple o transfosforilación. Cuando es transferido a una molécula de agua se denomina hidrólisis, y cuando el aceptor es algún compuesto que contenga un grupo amino o hidroxilo se denomina transfosforilación.

En el caso de una transfosforilación los tiempos en que se desarrolla la reacción enzimática son menores que los de la hidrólisis. Estos aceptores aumentan notablemente la actividad de la ALP. Los más utilizados son: el 2-amino-2-metil-1-propanol (AMP) y la dietanolamina (DEA), capaces de incrementar la velocidad de la reacción entre 2 y 6 veces en comparación con la hidrólisis simple. Estos compuestos tienen  $pK_a$  cercanos a 10 por lo que, además de actuar como activadores y aceptores, son tampones efectivos del pH de la reacción.

En la actualidad, prácticamente se utilizan solo dos métodos para medir la concentración catalítica de la ALP. En ambos, el sustrato es el 4-nitrofenilfosfato, y difieren en el tampón aceptor: AMP (método recomendado por la IFCC) y DEA (método recomendado por la DGKC) (75) (76). En la Tabla I se detallan los componentes recomendados por ambas escuelas y las diferencias entre ellos.

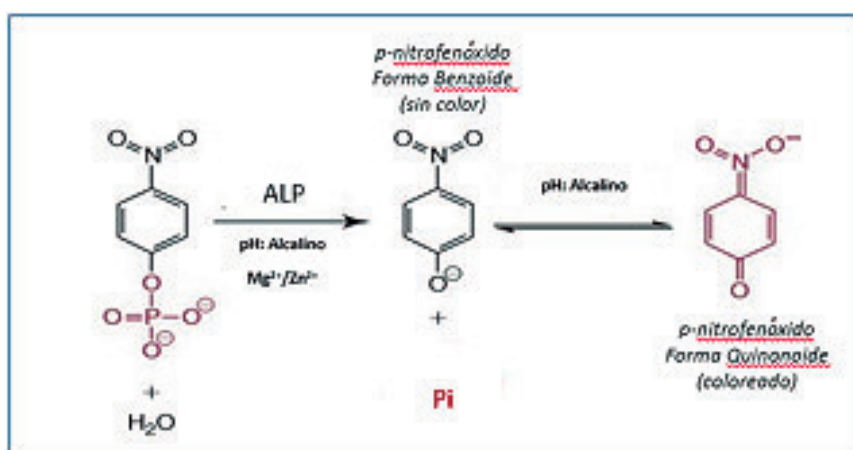


Figura 6. Reacción catalizada por la ALP sobre el 4-nitrofenilfosfato. Extraído de la referencia 74.

Tabla I. Componentes y diferencias entre los métodos recomendados por la Federación Internacional de Química Clínica (IFCC) y por la Sociedad Alemana de Química Clínica (DGKC)

Componentes	DGKC	IFCC
Buffer activador	DEA 1,0 M	AMP 0.357 M
pH	9,8	10,4
Sustrato	4-nitrofenilfosfato 12 mM	4-nitrofenilfosfato 16,3 mM
Cofactor	Cloruro de magnesio 0,5 mM	Acetato de magnesio, 2,04 mM
		Sulfato de zinc 1,02 mM
Sistema quelante	----	HEDTA 2,04 mM

AMP: 2-amino-2-metil-1-propanol, DEA: dietanolamina, HEDTA: ácido N-hidroxietilendiaminotriacético

La metodología que incluye el *buffer* DEA, si bien presenta algunas desventajas, reúne buenas condiciones en cuanto a la activación y capacidad tamponante; por tal razón la DGKC ha desarrollado su método optimizado a la temperatura de trabajo de 37 °C.

En el método de referencia, recomendado por la IFCC, se introduce un exceso de los cofactores  $Mg^{2+}$  y  $Zn^{2+}$  junto con un compuesto quelante [N-hidroxietilendiaminotriacético] (HEDTA) de tal forma que permanece solo una pequeña concentración (óptima) de los cationes en forma libre. Dado que el exceso de cationes libres es inhibitorio y que determinadas impurezas del AMP o los componentes de las muestras pueden secuestrar pequeñas concentraciones de  $Zn^{2+}$ , el sistema quelante-cationes se comporta también como un tampón cediendo o captando cationes en estas situaciones y manteniendo su concentración cercana a la óptima (77).

### 3.4. Identificación de las isoenzimas, isoformas y macroenzimas

La medida cinética de la actividad plasmática total de la ALP refleja cambios en la producción y liberación de la enzima y es una de las determinaciones más frecuentemente solicitadas al laboratorio clínico. Sin embargo, el estudio y cuantificación de las distintas fracciones que componen la actividad total, suelen ser cruciales para el diagnóstico y seguimiento de diversas patologías por el valor que aportan a la decisión médica.

Se han utilizado métodos bioquímicos e inmunológicos diferentes para discriminar y analizar selectivamente las diferentes ALP a nivel de enzima (actividad) y proteína (masa). Las características de la estructura terciaria y cuaternaria, así como la capacidad catalítica de las ALP, han sido explotadas para desarrollar técnicas para su identificación y cuantificación.

La ALP es una glicoproteína; se han encontrado algunos glúcidos unidos a su molécula representando en muchos casos alrededor del 20% del peso de la molécula madura (78). La porción glicosilada, la activi-

dad catalítica y el potencial antigénico de las diferentes formas de presentación de las ALP, permitieron el desarrollo de técnicas inmunoradiométricas (IRMA), ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas (ELISA) y ensayos de precipitación o electroforesis con lectinas (79). Surgieron así los diferentes métodos de separación y cuantificación desarrollados en base a las diferencias de las propiedades fisicoquímicas (carga eléctrica, estabilidad térmica y química), catalíticas (especificidad por determinados sustratos e inhibidores) y antigénicas de las isoenzimas, isoformas y macroenzimas de la ALP. A continuación se desarrollarán brevemente algunos de ellos.

#### 3.4.1. Electroforesis

La separación electroforética sobre acetato de celulosa o agarosa, fundamentada en la separación por la carga eléctrica de las proteínas-enzimas enfrentadas a un campo eléctrico, permite una inspección global de todas las formas presentes en el suero y ofrece la posibilidad de detectar las formas atípicas.

Para la visualización y/o cuantificación de las formas se utiliza una reacción específica con un sustrato, un éster monofosfórico como el alfa-naftil fosfato de sodio o el fosfato de 5-bromo-4-cloro-3-indolilo, y un colorante que indique color en la zona de la reacción enzimática entre la isoenzima, isoforma o macroenzima presente y el sustrato, como los colorantes: *fast-violet*, *fast-red* o nitroazul de tetrazolio (62) (Fig. 7).

Debido a su baja resolución, esta técnica no diferencia con nitidez a las formas mayoritarias de presentación de la ALP, las isoformas hepáticas y ósea, que se presentan como una sola banda en la zona de las alfa-globulinas. Para mejorar la separación de ambas se utilizan procedimientos de preincubación del suero. Uno de ellos es el pretratamiento con exo-alfa-sialidasa o adición de lectina de semilla de trigo en el soporte empleado. Tanto la sialidasa como la lectina actúan sobre





Figura 7. Esquema teórico de una corrida electroforética de las isoenzimas de ALP (B: biliar, HO: hepático-ósea, P: placentaria e I: intestinal)

las cadenas glicosiladas de las formas ósea y hepática, provocando una migración diferencial sobre la base de su mayor (ósea) o menor (hepática) glicosilación (25).

La separación electroforética y su posterior cuantificación por densitometría complementándola o no con métodos de inhibición, tanto físicos como químicos, resultan muy útiles para la identificación de las distintas isoenzimas de ALP.

### 3.4.2. Inactivación selectiva

Las enzimas son proteínas, y por tanto pueden desnaturalizarse por los mismos mecanismos generales que las demás proteínas. Las formas de presentación de la ALP reaccionan de modo diferencial frente al calor o algunas sustancias químicas. De esta manera se generaron métodos de identificación por inactivación selectiva térmica o inhibición selectiva por agentes químicos. Los métodos basados en la resistencia a la inactivación por calor o sustancias químicas se han empleado desde hace tiempo en el análisis de las isoformas, principalmente para diferenciar entre las formas hepáticas y óseas (23).

Desde el descubrimiento de la mayor termoestabilidad de la ALP de origen hepático respecto de la ósea se han desarrollado diferentes técnicas de inactivación selectiva que permiten obtener una estimación cualitativa o semicuantitativa de las proporciones relativas de las formas múltiples (L-ALP y B-ALP) presentes en el suero de un individuo (80).

Se mide la concentración catalítica de la ALP sérica antes y después del tratamiento con el agente inactivante. Tratamientos térmicos permiten identificar a la P-ALP, isoenzima resistente al tratamiento a 65 °C durante 5 minutos y a la B-ALP, que es termosensible, ya que se inactiva cuando se enfrenta a 56 °C durante 10 minutos (81) (82).

Los inactivadores químicos utilizados fueron: urea, algunos aminoácidos (L-fenilalanina, L-triptófano, L-homoarginina, L-leucina), levamisol e imidazol (83) (84). Estos métodos pueden ocasionar errores importantes por pequeñas diferencias de susceptibilidad térmica y grado de inhibición de las diferentes formas isoenzimáticas (85).

El éxito de las técnicas de inactivación diferencial, sobre todo la química, se debe a que constituyen un meca-

nismo sencillo y de baja complejidad para la evaluación de las formas predominantes de ALP presentes en el suero de un paciente. En el caso particular de la diferenciación entre L-ALP y B-ALP, debido a las pequeñas diferencias en termoestabilidad y grado de inhibición que presentan, requiere un control riguroso de las condiciones de inactivación (temperatura, tiempo de exposición al agente inactivante) y de la determinación de la actividad catalítica (pH, concentración de sustratos y cofactores).

### 3.4.3. Precipitación con lectina de germen de trigo

Esta lectina se une a los residuos de N-acetilglucosamina y a los de ácido siálico, produciéndose una precipitación de las distintas formas según contengan más o menos residuos glicosilados. Esta característica permite la separación de la isoforma ósea de la hepática, intestinal y placentaria. Precipita aproximadamente el 80% de la forma ósea, afecta ligeramente a la forma hepática (10%) y no reacciona con las formas intestinal y placentaria. En caso de que se sospeche la presencia de la forma atípica biliar, debe incluirse Tritón X-100 al medio de reacción para evitar en lo posible la coprecipitación (86).

### 3.4.4. Inmunoanálisis

Los métodos disponibles en la actualidad se basan en la diferenciación antigénica de las fracciones resultantes del grado variable en el contenido de ácido siálico y otros hidratos de carbono en la estructura de las isoformas hepática y ósea. Debido a que la B-ALP es metabolizada por el hígado, esta fracción puede aumentar en pacientes con enfermedades hepáticas. También puede haber alguna reacción cruzada de anticuerpos anti-B-ALP con la L-ALP (56).

Con el uso de anticuerpos monoclonales específicos dirigidos contra la B-ALP, es posible separar la forma ósea de la hepática con menos de un 3% de reactividad cruzada. Esto ha permitido la comercialización de métodos de determinación inmunológica de esta isoforma por radioinmunoanálisis y por enzimoimmunoanálisis. Existen métodos de enzimoimmunoensayos quimioluminiscentes completamente automatizados para la determinación de la concentración de la B-ALP que brindan una mayor sensibilidad y especificidad diagnóstica que las logradas hasta ahora con los otros métodos analíticos (87).

## Conclusiones

La fosfatasa alcalina (ALP-EC 3.1.3.1) es una metaloenzima altamente glicosilada, con un papel fisiológico parcialmente conocido. Su localización celular en la membrana plasmática sugiere su participación en el movimiento de moléculas a través de ella. Es-

estructuralmente, cuando se encuentra unida a la membrana de las células que la sintetizan es un tetrámero, y una vez liberada es dimérica. Cataliza la hidrólisis de monoésteres de ácido fosfórico a pH alcalino, interviniendo en los procesos de hidrólisis y transfosforilación.

Es una enzima ubicua y su actividad sérica está representada por sus diferentes formas: isoenzimas, isoformas y macroenzimas. Las proporciones relativas de cada forma varían en función de diversos factores como la edad, el sexo y el estado fisiológico o patológico del individuo, reflejando el estado de los tejidos de procedencia. Es muy abundante en los tejidos óseo y hepático; ambos, en condiciones fisiológicas, contribuyen mayoritariamente a la actividad total de la enzima en circulación.

La actividad sérica de la ALP se determina por métodos de monitoreo continuo o cinéticos, en el espectro visible; el método de la IFCC es el de referencia. La elevación de la actividad total se denomina hiperfosfatemia. Esta se puede presentar por causas fisiológicas como el embarazo y el crecimiento o en circunstancias patológicas, en respuesta a alteraciones hepatobiliares, óseas, neoplásicas o idiopáticas.

El estudio de las fracciones de la ALP, por las diferentes metodologías disponibles, facilitaría conocer el origen del incremento de la actividad total de la enzima; además, aumenta la organoespecificidad del resultado obtenido, lo que contribuye a un diagnóstico más preciso.

## Correspondencia

Bioq. MARIO ARIEL ARANDA  
Capitán Olivera 2071 Guernica, Provincia de Buenos Aires, Argentina  
Correo electrónico: Arielar10@mail.com

## Referencias bibliográficas

1. Millán JL. Alkaline phosphatases: structure, substrate specificity and functional relatedness to other members of a large superfamily of enzymes. *Purinergic Signal* 2006; 2 (2): 335-41.
2. McKenna MJ, Hamilton TA, Sussman HH. Comparison of human alkaline phosphatase isoenzymes. Structural evidence for three protein classes. *Biochem J* 1979; 181 (1): 67-73.
3. Houssel P. Fosfatasas alcalinas. EMC -Tratado de Medicina 2013; 17 (1): 1-5.
4. Bragantini G, Pastene H, Bresciani P, DiCarlo MB, Eguren A, Negri G, *et al.* Caracterización de formas macroenzimáticas de fosfatasa alcalina. Descripción de un nuevo método. *Acta Bioquím Clín Latinoam* 1994; 28 (2): 211-6.
5. BRENDA (1987-2019). Comprehensive Enzyme Information System [Online]: <https://www.brenda-enzymes.org/ecexplorer.php>. (Fecha de acceso: 5 de marzo de 2019).
6. Van-Loo B, Jonás S, Babtie AC, Benjdia A, Berteau O, Hyvönen M, *et al.* An efficient, multiply promiscuous hydrolase in the alkaline phosphatase superfamily. *Proc Nat Acad Sci USA* 2010; 107 (7): 2740-5.
7. Reynaga Montecinos B, Zeni SN. Marcadores bioquímicos del remodelamiento óseo. Utilidad clínica. *Acta Bioquím Clín Latinoam* 2009; 43 (2): 177-93.
8. Sharma U, Pal D, Prasad R. Alkaline phosphatase: an overview. *Ind J Clin Biochem* 2014; 29 (3): 269-78.
9. Hawrylak K, Stinson RA. The solubilization of tetrameric alkaline phosphatase from human liver and its conversion into various forms by phosphatidylinositol phospholipase C or proteolysis. *J Biol Chem* 1988; 263 (28): 14368-73.
10. Hoylaerts MF, Manes T, Millán JL. Mammalian alkaline phosphatases are allosteric enzymes. *J Biol Chem* 1997; 272 (36): 22781-7.
11. Murphy JE, Kantrowitz ER. Why are mammalian alkaline phosphatases much more active than bacterial phosphatases? *Mol Microbiol* 1994; 12 (3): 351-7.
12. Lopez-Canut V, Roca M, Bertran J, Moliner V, Tuñón I. Promiscuity in alkaline phosphatase superfamily. unraveling evolution through molecular simulations. *J Am Chem Soc* 2011; 133 (31): 12050-120.
13. Moss DW. Perspectives in alkaline phosphatase research. *Clin Chem* 1992; 38 (12): 2486-92.
14. Buchet R, Millán JL, Magne D. Multisystemic functions of alkaline phosphatases. *Phosphatase modulators* 2013; 3: 27-51.
15. Van Hoof V, de Broe M. Interpretation and clinical significance of alkaline phosphatase isoenzyme pattern. *Crit Rev Clin Lab Sci* 1994; 3 (3): 197-293.
16. Millán JL. Mammalian alkaline phosphatases. From biology to applications in Medicine and Biotechnology. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. 2006. p. 1-322.
17. Le Du MH, Millán JL. Structural evidence of functional divergence in human alkaline phosphatases. *J Biol Chem* 2002; 277: 49808-14.
18. Koutsioulis D, Lyskowski A, Mäki S, Guthrie E, Feller G, Bouriotis V, *et al.* Coordination sphere of the third metal site is essential to the activity and metal selectivity of alkaline phosphatases. *Protein Science* 2010; 19 (1): 75-84.
19. Mercado-Mercado G, Duarte-Muñoz NL, Álvarez-Parrilla E, De la Rosa LA, Wall-Medrano A. Fosfatasa alcalina (E.C.3.1.3.1): bioquímica y aplicaciones en las ciencias biomédicas, ecológicas y alimentarias. *Tecnociencia-Chihuahua* 2012; 6 (2): 112-22.
20. Di Carlo MB, Negri GA. Fosfatasas alcalinas: una familia compleja. *Bioquímica y Diagnóstico Molecular* 2003; 4: 29-33.
21. Lallès JP. Intestinal alkaline phosphatase: novel functions and protective effects. *Nutr Rev* 2014; 72 (2): 82-94.

22. 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* 1988; 263 (24): 12002-10.
23. Ujjawal S, Deeksha P, Rajendra P. Alkaline phosphatase: an overview. *Ind J Clin Biochem* 2014; 29 (3): 269-78.
24. Whyte MP. Physiological role of alkaline phosphatase explored in hypophosphatasia. *Ann N Y Acad Sci* 2010; 1192: 190-200.
25. Dziedziejko V, Safranow K, Słowik-Żyłka D, Machoy-Mokrzyńska A, Millo B, Machoy Z, *et al.* Comparison of rat and human alkaline phosphatase isoenzymes and isoforms using HPLC and electrophoresis. (*BBA*)-Proteins and Proteomics 2005; 1752 (1): 26-33.
26. Fernandez NJ, Kidney BA. Alkaline phosphatase: beyond the liver. *Vet Clin Pathol* 2007; 36 (3): 223-33.
27. Panadero García MT. Revisión: formas múltiples de fosfatasa alcalina. *Química Clínica* 1986; 5 (3): 257-63.
28. Simko V. Alkaline phosphatases in biology and medicine. *Dig Dis* 1991; 9 (4): 189-209.
29. Harmey D, Hessle L, Narisawa S, Johnson KA, Terkeltaub R, Millán JL. Concerted regulation of inorganic pyrophosphate and osteopontin by Akp2, Enpp1, and Ank: an integrated model of the pathogenesis of mineralization disorders. *Am J Pathol* 2004; 164: 1199-209.
30. Sánchez Rodríguez J, Soriano Suárez E, Girona Bastús R, Pérez Muñoz P, Viñets Gelada C. ¿Por qué aumentan las fosfatasas alcalinas? *Atención Primaria* 2002; 29 (4): 241-5.
31. Fawley J, Gourlay DM. Intestinal alkaline phosphatase: a summary of its role in clinical disease. *J Surgical Res* 2016; 202: 225-34.
32. Cho SR, Lim YA, Lee WG. Unusually high alkaline phosphatase due to intestinal isoenzyme in a healthy adult. *Clin Chem Lab Med* 2005; 43: 1274-5.
33. Lallès JP, Parra Suescún J. Fosfatasa alcalina intestinal: una enzima con propiedades antiinflamatorias. *Rev CES Med Zotec* 2014; 9 (1): 94-103.
34. Seinen W, Feil H. Alkaline phosphatase: an old enzyme newly discovered as a medicine. *Sustain Chem Pharm* 2019; 12: 1-2.
35. Bilski J, Mazur-Bialy A, Wójcik D, Zahradnik-Bilska J, Brzozowski B, Magierowski M, *et al.* The role of intestinal alkaline phosphatase in inflammatory disorders of gastrointestinal tract. *Mediators Inflamm* 2017; 2017: 9074601.
36. Boronkai A, Than NG, Magenheimer R, Bellyei S, Szigeti A, Deres P, *et al.* Extremely high maternal alkaline phosphatase serum concentration with syncytiotrophoblastic origin. *J Clin Pathol* 2005; 58: 72-6.
37. Okesina AB, Donaldson D, Lascelles PT, Morris P. Effect of gestational age on levels of serum alkaline phosphatase isoenzymes in healthy pregnant women. *Int J Gynaecol Obstet* 1995 Jan; 48 (1): 25-9.
38. Aular-García J, Reyna-Villasmil E, Mejia-Montilla J, Santos-Bolívar J, Torres-cepeda D, Reyna-Villasmil N. Fosfatasa alcalina placentaria para la predicción del parto pretérmino. *Progresos de Obstetricia y Ginecología* 2016; 59 (5): 288-92.
39. Goldstein DJ, Rogers C, Harris H. A search for trace expression of placental-like alkaline phosphatase in non-malignant humane tissues: demonstration of its occurrence in lung, cervix, testis and thymus. *Clin Chim Acta* 2002; 125: 1: 63-75.
40. Vilchez Aguilera JA, Avilés Plaza F, Martínez-Lage JF, Martínez Hernández P, Parra Pallarés S. Isoenzima fosfatasa alcalina *placental-like*, importancia clínica como marcador en tumores de tipo germinal. *Rev Laboratorio Clínico* 2012; 5 (1): 44-8.
41. Hoylaerts MF, Manes T, Millán JL. Molecular mechanism of uncompetitive inhibition of human placental and germ-cell alkaline phosphatase. *Biochem J* 1992; 286: 23-30.
42. Fishman WH. Immunology and biochemistry of the Reagan isoenzyme. *Prostate* 1980; 1: 399-410.
43. Hada T, Amuro Y, Higashino K. Studies of intestinal like alkaline phosphatase (the Kasahara variant). *Prog Clin Biol Res* 1984; 166: 235-42.
44. Hada T, Higashino K, Okochi T, Yamamura Y. Kasahara-variant alkaline phosphatase in a renal cell carcinoma. *Clin Chim Acta* 1978; 89: 311-6.
45. Turecky L. Macroenzymes and their clinical significance. *Bratisl Lek Listy* 2004; 105 (7-8): 260-3.
46. Remaley AT, Wilding P. Macroenzymes: biochemical characterisation, clinical significance, and laboratory detection. *Clin Chem* 1989; 35 (12): 2261-70.
47. Cepelak I, Cevorisec D. Why is it necessary to recognize macroenzyme? *Biochemica Medica* 2007; 17 (1): 52-9.
48. Sturk A, Sande GTB. Macroenzymes: prevalence, composition, detection and clinical relevance. *J Clin Chem Clin Biochem* 1990; 28: 65-81.
49. Gupta N, Karoli R, Fatima J, Singh PS, Srivastava AP, Agarwal GG. Estimation of reference intervals for liver function tests in apparently healthy population of Lucknow. *Intern J Med Health Res* 2018; 4 (12): 13-7.
50. Siest G, Henry J, Schiele F, Young DS. Interpretation of clinical laboratory tests: reference values and their biological variation. Foster City, CA: Biomedic Public; 1985.
51. Fernández-Tresguerres Hernández-Gil I, Alobera Gracia MA, del Canto Pingarrón M, Blanco Jerez L. Bases fisiológicas de la regeneración ósea I. *Histología y fisiología del tejido óseo. Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2006; 11 (2): 151-7.
52. Kruse K, Bantlls H, Gunlher H. Serum alkaline phosphatase isoenzyme: in childhood. *Eur J Pediatr* 1977; 126: S3-9.
53. Whilaker KB, Whitby LG, Moss OW. Activities of bone and liver alkaline phosphatases in serum in health and disease. *Clin Chim Acta* 1977; 80: 209-20.
54. Pace AL, Osinde ME. Hiperfosfatemia transitoria benigna de la infancia. Una aproximación diagnóstica racional. *Arch Argent Pediatr* 1999; 97: 383-90.
55. Dufour R. The National Academy of Clinical Biochemistry. Guías del laboratorio para screening, diagnóstico y monitoreo de la lesión hepática. *Acta Bioquím Clín Latinoam* 2005; 39 (3): 359-76.
56. Watts WS. Clinical utility of biochemical markers of bone remodelling. *Clin Chem* 1999; 45: 1359-68.

57. Garnero P, Delmas P. Assessment of the serum levels of bone alkaline phosphatase with a new immunoradiometric assay in patients with metabolic bone disease. *J Clin Endocrin Metab* 1993; 77: 1046-53.
58. Seibel MJ. Biochemical markers of bone turnover. Part II: Clinical applications in the management of osteoporosis. *Clin Biochem Rev* 2006; 27: 123-38.
59. Fontes R, Cavalari E, Vieira Neto L, Shrank Y, Santos AS, Gomes DM, *et al.* Alkaline phosphatase: reference interval transference from CALIPER to a pediatric Brazilian population. *Bras Patol Med Lab* 2018; 54 (4): 227-31.
60. Nerenz RD, Pittman ME, Scott MG. Impact of errors and variability on clinical laboratory test interpretation. En: *Pathobiology of Human Disease: A Dynamic Encyclopedia of Disease Mechanisms*. Elsevier Inc. 2014; 3222-36.
61. Briozzo G, Perego MC, Moirón MC. Fosfatasa alcalina: valores de referencia en la paciente embarazada. *Bioquím Patol Clín* 2008; 72 (1): 32-6.
62. 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* 1990; 36 (6): 875-8.
63. Matsushita M, Irino T, Stigbrand T, Nakajima T, Komoda T. Changes in intestinal alkaline phosphatase isoforms in healthy subjects bearing the blood group secretor and non-secretor. *Clin Chim Acta* 1998; 277 (1): 13-24.
64. Moss OW. Alkaline phosphatase isoenzymes. *Clin Chem* 1982; 28: 2007-16.
65. Lee TH, Kim WR, Poterucha JJ. Evaluation of elevated liver enzymes. *Clin Liver Dis* 2012; 16 (2): 183-98.
66. Yong JM. Origins of serum alkaline phosphatase. *J Clin Path* 1967; 20: 647.
67. Nishio H, Sakuma T, Nakamura S, Horal T, Ikegami H, Matsuda M. Diagnostic value of high molecular weight alkaline phosphatase in detection of hepatic metaatasia in patient with lung cancer. *Cancer* 1986; 57: 1815-9.
68. Uzcátegui-Saughí L. Hiperfosfatemia transitoria de la infancia. A propósito de dos casos. *Rev Venez Endocrinol Metab* 2010; 8 (1): 30-4.
69. Viñallonga X, Bonjoch C. Hiperfosfatemia en la infancia: interpretación y actitud diagnóstica. *Anales de Pediatría Continuada* 2011; 9 (3): 176-80.
70. Schonhaut L, Rocha A. Benign transient hyperphosphatasaemia in infants. Clinical series. *Rev Chil Pediatr* 2017; 88 (1): 169-75.
71. Millán JL, Whyte MP. Alkaline phosphatase and hypophosphatasia. *Calcif Tissue Int* 2016; 98: 398-416.
72. Martos-Moreno GA, Calzada J, Couce ML, Argente J. Hypophosphatasia: clinical manifestations, diagnostic recommendations and therapeutic options. *An Pediatr (English Edition)* 2018; 88 (6): 356.e1-11.
73. Zalatan G, Fenn TD, Herschlag D. Comparative enzymology in the alkaline phosphatase super family to determine the catalytic role of an active site metal ion. *J Mol Biol* 384 (5): 1174-89.
74. Burtis CA, Ashwood ER, Bruns DE. *Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics*. Saunders Ed. Elsevier Inc. Chapter 22: Serum enzymes: p. 579.
75. IFCC primary reference procedures for the measurement of catalytic activity concentrations of enzymes at 37 °C. Part 9: Reference procedure for the measurement of catalytic concentration of alkaline phosphatase. *Clin Chem Lab Med* 2011; 49 (9): 1439-46.
76. German Society for Clinical Chemistry Standard method for determination of alkaline phosphatase (AP) activity. *J Clin Chem Clin Biochem* 1972; 10: 290.
77. Rueda R, López R, Galán A, Canalias F, Barragán F, Gella FJ. Método recomendado para la determinación en rutina de la concentración catalítica de fosfatasa alcalina en suero sanguíneo humano. Comité Científico, Comisión de Enzimas. Sociedad Española de Química Clínica. Documento H, Fase 3. Versión 1 Preparado Química Clínica 1992; II (3): 176-180.
78. Butterworth PJ. Biochemistry of mammalian alkaline phosphatases. Alkaline phosphatase. *Cell Biochem Function* 1983; 1 (2): 66-70.
79. Seibel MJ. Biochemical markers of bone turnover: Part 1: biochemistry and variability. *Clin Biochem* 2005; 26 (4): 97-122.
80. Rosalki SB, Foo AY. Two new methods for separating and quantifying bone and liver alkaline phosphatase isoenzymes in plasma. *Clin Chem* 1984; 30 (7): 1182-6.
81. Cadeau BJ, Malkin A. A relative heat stability test for the identification of serum alkaline phosphatase isoenzymes. *Clin Chim Acta* 1973; 45 (3): 235-42.
82. Rajagambeeram R, Raghavan SA, Ghosh S, Basu S, Ramasamy R, Murugaiyan SB. Diagnostic utility of heat stable alkaline phosphatase in hypertensive disorders of pregnancy. *J Clin Diagn Res* 2014; 8 (11): CC10-3.
83. Fishman WH, Sie HG. Organ-specific inhibition of human alkaline phosphatase isoenzymes of liver, bone, intestine and placenta; L-phenylalanine, L-tryptophan and L-homoarginine. *Enzymologia* 1971; 41 (3): 141-67.
84. Peak MJ, Pejakovic M, White GH. Quantitative method for determining serum alkaline phosphatase isoenzyme activity: estimation of intestinal component. *J Clin Pathol* 1988; 41: 202-6.
85. Stepan J, Volek V, Kolar J. A modified inactivation-inhibition method for determining the serum activity of alkaline phosphatase isoenzymes. *Clin Chim Acta* 1976; 69: 1-9.
86. Rosalki SB. Bone-origin alkaline phosphatase in plasma by wheat-germ lectin methods in bone disease. *Clin Chim Acta* 1994; 226 (2): 143-50.
87. Zhan F, Watanabe Y, Shimoda A, Hamada E, Maekawa M. Evaluation of serum bone alkaline phosphatase activity in patients with liver disease: Comparison between electrophoresis and chemiluminescent enzyme immunoassay. *Clin Chim Acta* 2016; 460 (1): 40-5.

**Recibido: 8 de marzo de 2022**

**Aceptado: 19 de marzo de 2022**