

Recomendaciones para la determinación de formas múltiples de fosfatasa alcalina en suero sanguíneo humano

Sociedad Española de Bioquímica Clínica y Patología Molecular

Comité Científico, Comisión de Enzimas.

Documento K, Fase 3, Versión 1

Preparado por R. Rueda Rúa, D. Balsells Roselló, R. Ferragut Mas, A. Galán Ortega, F. J. Gella Tomás, G. Gubern Olivella, A. Padrós Fluvia y F. Canalias Reverter

1. Introducción

La determinación de las formas múltiples de la fosfatasa alcalina ha sido durante muchos años, y continúa siendo, de gran interés en el laboratorio clínico. A pesar de ello, todavía hoy en día no se conocen totalmente sus funciones biológicas y sus sustratos naturales. Existen estudios recientes que mediante técnicas de clonaje molecular, mutagénesis *in vitro* o el uso de animales transgénicos con deficiencias de alguna de las formas isoenzimáticas (1) tratan de llegar a un mejor conocimiento de su función biológica, lo que conllevará en un futuro próximo a una mejor valoración clínica y una mayor especificidad en los métodos de determinación.

El objetivo del presente documento es informar sobre las ventajas e inconvenientes de los distintos métodos que existen para valorar las formas múltiples de la fosfatasa alcalina. Esta Comisión ha considerado más conveniente recomendar una estrategia de trabajo que un método concreto, para que sea el propio usuario quien decida en base a sus objetivos, necesidades y situación.

2. Formas moleculares

La fosfatasa alcalina (EC 3.1.3.1) constituye una familia de varias formas enzimáticas. Algunas de ellas son isoenzimas codificadas por genes distintos, mientras que otras están codificadas por un mismo gen y modificaciones postraduccionales dan lugar a diferentes formas moleculares (2).

Se conocen cuatro *loci* implicados en la síntesis de las diferentes formas de la fosfatasa alcalina que dan lugar a cuatro grupos de formas múltiples con diferencias inmunológicas, funcionales, estructurales y catalíticas. Estas formas son: las de origen intestinal, las de origen placentario, las de origen óseo, hepático y renal, y las de células germinales (3,4). Las formas ósea y hepática representan la práctica totalidad de la fosfatasa alcalina en el suero de adultos sanos (5).

La isoenzima intestinal se presenta en dos formas, fetal y adulta, con propiedades estructurales e inmunológicas diferentes y propiedades catalíticas idénticas. En el suero de

pacientes con tumor primario de hígado se ha detectado una forma atípica, denominada Kasahara, que se ha propuesto como marcador tumoral (6).

La isoenzima placentaria está codificada por un único gen pero tiene un alto grado de polimorfismo (7,8). La isoenzima de células germinales se encuentra fundamentalmente en testículo y timo y está codificada por un gen estructural propio, distinto del que codifica la isoenzima placentaria (9). Las dos isoenzimas pueden encontrarse reexpresadas en tumores del aparato reproductor humano, particularmente en cáncer de ovario y en seminoma testicular (10). Estas formas neoplásicas atípicas de las isoenzimas placentaria y de células germinales se denominan Regan y Nagao, respectivamente. Son formas con diferencias de expresión genética, tanto cualitativas como cuantitativas, lo que ocasiona diferencias entre las isoenzimas de tejidos normales y tumorales (11).

Además de los cuatro grupos de formas múltiples descritos y sus variantes, se han identificado en suero otras dos formas atípicas:

—Formas de alta masa molar. Constituidas por la forma de fosfatasa alcalina característica de cada tejido asociada a fragmentos de membrana. La más conocida es la denominada fracción biliar, la determinación de su concentración catalítica en suero posee una gran sensibilidad diagnóstica para la colestasis y las metástasis hepáticas (12).

—Inmunocomplejos. Constituidos por alguna de las formas de fosfatasa alcalina e inmunoglobulinas G. Presentes en algunas enfermedades autoinmunes, en el carcinoma hepatocelular y en la hepatitis vírica (13).

3. Métodos de determinación de formas múltiples

Los numerosos métodos desarrollados para la determinación de las formas múltiples de fosfatasa alcalina se basan en las diferencias de sus propiedades fisicoquímicas (carga eléctrica, estabilidad térmica y química), catalíticas (especificidad por determinados sustratos e inhibidores) y anti-génicas.

3.1. Electroforesis

La separación electroforética puede llevarse a cabo utilizando como soportes acrilamida (14), acetato de celulosa (15), agarosa (16) y almidón (17). Sea cual sea la naturaleza del soporte y el pH al que se realice la electroforesis, las formas ósea y hepática migran de forma superpuesta. Para mejo-

rar su resolución se realiza un tratamiento previo del suero con exo- α -sialidasa (EC 3.2.1.18) (18) o se incluye en el soporte lectina de germen de trigo (19). Tanto la exo- α -sialidasa como la lectina actúan sobre las cadenas glicosiladas de las formas ósea y hepática, provocando una migración diferencial en base a su mayor (ósea) o menor (hepática) glicosilación. La cuantificación de las formas, una vez finalizada la electroforesis, se efectúa preferentemente mediante una reacción específica con fosfato de 5-bromo-4-cloro-3-indolilo como sustrato y nitroazul de tetrazolio como cromógeno y por espectrometría de absorción molecular en fase sólida (densitometría).

Los métodos basados en la electroforesis asociada a la densitometría son cualitativos o semicuantitativos, fácilmente estandarizables y permiten detectar todas las formas múltiples presentes en el suero, incluyendo las formas atípicas que son verdaderos marcadores tumorales. Sin embargo, su mayor inconveniente es su escasa especificidad analítica para las formas ósea y hepática; además son métodos largos, laboriosos y de coste relativamente alto, por lo que son poco adaptables al trabajo de rutina.

3.2. Isoelectroenfoque

La separación de formas múltiples mediante métodos de isoelectroenfoque permite mejorar la resolución de los métodos electroforéticos (20). Sin embargo, la posibilidad de visualizar un gran número de bandas sin poder asociarlas a una forma enzimática específica y el hecho de ser métodos lentos y laboriosos hace que sean más adecuados en trabajos de investigación que en la rutina del laboratorio clínico.

3.3. Cromatografía

La separación de formas múltiples mediante cromatografía puede hacerse utilizando geles de intercambio aniónico (21) o de afinidad con lectinas acopladas a la resina (22). Ninguna de las dos variantes consigue separar las formas ósea y hepática. La introducción de la cromatografía en fase líquida de alta eficacia permite una mejor resolución de las dos formas. Al igual que el isoelectroenfoque es una técnica más adecuada en investigación que en el laboratorio clínico de rutina.

3.4. Inactivación selectiva

Los métodos de inactivación selectiva se basan en el diferente grado de inactivación de las formas múltiples por agentes físicos como el calor (23) o por sustancias químicas (24), tales como urea, aminoácidos (L-fenilalanina, L-triptófano, L-homoarginina, L-leucina), levamisol e imidazol. Se mide la concentración catalítica de fosfatasa alcalina en suero antes y después del tratamiento con el agente inactivante.

Son métodos de escasa aceptación, ya que se producen distorsiones importantes de los resultados debido a las pequeñas diferencias en susceptibilidad térmica y grado de inhibición de las diferentes formas enzimáticas, así como a la necesidad de un control riguroso del tiempo, la temperatura y las condiciones de medición. Además, son métodos bastante inespecíficos ya que la presencia de fracciones diferentes a las ósea o hepática puede falsificar los resultados.

3.5. Precipitación con lectina de germen de trigo

Los métodos de separación por precipitación con lectina de germen de trigo (19,25,26) se basan en la capacidad de unión de la lectina a los residuos N-acetil glucosamina y ácido siálico que contienen las distintas formas de fosfatasa alcalina. Esta característica permite la separación de la forma ósea de las formas hepática, intestinal y placentaria. Se mide la concentración catalítica antes y después de la precipitación

de la forma ósea con la lectina. Se consigue que la forma ósea precipite en más de un 90%, mientras que el porcentaje de precipitación del resto de formas es inferior al 5%.

La imprecisión de los procedimientos de este tipo es baja (coeficiente de variación inferior al 5%) y comparable a la que se obtiene cuando se mide la concentración catalítica de la fosfatasa alcalina «total» (27). El inconveniente de este método es la interferencia producida por la forma biliar y el control de la calidad que debe hacerse de la preparación de lectina. La ventaja es su gran especificidad por la forma ósea, su simpleza técnica, y su rapidez y fácil automatización, lo que la hace útil como método de rutina.

3.6. Inmunoanálisis

Los métodos inmunológicos se utilizan preferentemente para la determinación de las formas intestinal y placentaria (28-30), ya que se ha logrado obtener anticuerpos monoclonales específicos para cada una de las dos fracciones. Las formas ósea y hepática, al proceder del mismo gen estructural, poseen una especificidad antigénica similar, lo que ha complicado la obtención de un anticuerpo que no presente reactividad cruzada entre las dos formas. Recientemente, se han conseguido anticuerpos monoclonales específicos para la forma ósea y con menos de un 3% de reactividad cruzada con la forma hepática (29,31), lo que ha permitido la comercialización de un equipo de determinación inmunológica de fosfatasa alcalina ósea por radioinmunoanálisis (32) y otro por enzimoimmunoanálisis (33).

4. Recomendaciones para el estudio de formas múltiples

La elección del método o métodos para el estudio de las formas múltiples de la fosfatasa alcalina estará en función de la enfermedad que se vaya a estudiar, aunque hay que tener en cuenta que prácticamente la totalidad de las variaciones de su concentración sérica se deben a las formas ósea y hepática.

Ante la presencia de concentraciones elevadas de fosfatasa alcalina en suero sin evidencias clínicas, y sólo cuando se quiera conocer el origen de esta elevación, se recomienda la realización de una electroforesis. A pesar de ser un método poco practicable para la rutina del laboratorio, es el único que proporciona una amplia información de todas las formas presentes, incluyendo las atípicas (4).

Hasta la aparición de los métodos inmunológicos, se aconsejaba la precipitación con lectina de germen de trigo en los casos de sospecha de predominancia de la forma ósea en el suero sin afectación hepática importante: cáncer de mama o de próstata con metástasis ósea, enfermedad de Paget, raiquitismo, osteosarcoma, etc. En los casos en que se observaba además un incremento de la concentración de las enzimas hepáticas en suero, se utilizaban combinadamente la precipitación con lectina y la electroforesis. En la actualidad, la existencia de métodos inmunológicos con anticuerpos monoclonales específicos para la forma ósea ha supuesto un gran avance al obtener una mayor sensibilidad y especificidad diagnósticas que las logradas hasta ahora con los otros métodos. Además, son métodos practicables y completamente adaptables al trabajo de rutina del laboratorio clínico. Por lo tanto, se recomienda la utilización de los métodos inmunológicos, ya sea radioinmunoanálisis o enzimoimmunoanálisis, en los casos de sospecha de predominancia de la forma ósea (4,32).

La determinación de las formas atípicas carcinoplacentarias y oncofetales no tiene utilidad diagnóstica debido a

la baja probabilidad (3-15%) de encontrarlas en enfermos de cáncer, y al hecho de que también pueden aparecer en personas sanas, lo que les confiere una baja sensibilidad y especificidad diagnósticas. Sin embargo, se ha observado una buena correlación entre las variaciones de su concentración catalítica en suero y los cambios fisiopatológicos de los pacientes, por lo que se les considera unos marcadores tumorales útiles para la monitorización del tratamiento (4,34).

La presencia en suero de la forma atípica biliar sólo puede evidenciarse mediante electroforesis, por lo que, a pesar de que posee una gran sensibilidad diagnóstica para la colestasis y la metástasis hepática, no se recomienda su determinación, ya que existen otros métodos más practicables y sensibles (determinación de la concentración catalítica en suero de la γ -glutamyltransferasa y la 5'-nucleotidasa) para el diagnóstico de estas enfermedades.

Correspondencia:
Sociedad Española de Bioquímica Clínica
y Patología Molecular.
Comisión de Enzimas.
Llançà, 51. 08015 Barcelona

Bibliografía

1. Millán JL. Reexpresión de las isoenzimas de fosfatasa alcalina en cáncer: Utilidad en el seguimiento clínico e inmunolocalización de tumores. *Anal Clin* 1992; 69: 248-9.
2. McComb RB, Bowers GN, Posen S. Alkaline phosphatase. New York: Plenum Press, 1979: 986.
3. Moss DW. Perspectives in alkaline phosphatase research. *Clin Chem* 1992; 38: 2486-92.
4. Price CP. Multiple forms of human serum alkaline phosphatase: detection and quantitation. *Ann Clin Biochem* 1993; 30: 355-72.
5. Rosalki SB. Some clinical applications of plasma alkaline phosphatase isoenzyme determinations. *Adv Clin Enzymol* 1986; 3: 12-8.
6. Moss DW. Alkaline phosphatase isoenzymes. *Adv Clin Enzymol* 1986; 3: 1-11.
7. Robson EB, Harris H. Further genetics of placental alkaline phosphatase. *Ann Hum Genet* 1967; 30: 219-32.
8. De Broe ME, Nouwen EJ, Pollet DE et al. Human placental alkaline phosphatase as a tumor marker. *Adv Clin Enzymol* 1986; 3: 39-52.
9. Hoylaerts MF, Millan JL. Site-directed mutagenesis and epitope-mapped monoclonal antibodies define a catalytically important conformational difference between human placental and germ cell alkaline phosphatase. *Eur J Biochem* 1991; 202: 605-16.
10. Millán JL, Manes T. Seminoma-derived Nagao isozyme is encoded by a germ-cell alkaline phosphatase gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 85: 3024-8.
11. Mc Langhlin PJ. Cancer-associated forms of human placental-type alkaline phosphatase. *Adv Clin Enzymol* 1986; 3: 30-8.
12. Crofton PM, Smith AF. High molecular-mass alkaline phosphatase in serum and bile: physical properties and relationship with other high-molecular-mass enzymes. *Clin Chem* 1981; 27: 860-6.
13. Hattori Y, Yamamoto K, Taniguchi B. Formation of an alkaline phosphatase-immunoglobulin G complex in human sera. *Clin Chim Acta* 1979; 97: 243-52.
14. Johnson RB, Ellingboe K, Gibbs P. A study of various electrophoretic and inhibition techniques for separating serum alkaline phosphatase isoenzymes. *Clin Chem* 1972; 18: 110-5.
15. Fristche HA, Adams-Park HR. Cellulose acetate electrophoresis of alkaline phosphatase isoenzymes in human serum and tissue. *Clin Chem* 1972; 18: 417-21.
16. Hagerstrand I, Skude G. Improved electrophoretic resolution of human serum alkaline phosphatase isoenzymes in agarose gel by Triton X-100. *Scand J Clin Lab Invest* 1976; 36: 127-9.
17. Jennings RC, Brocklehurst D, Hirst M. A comparative study of alkaline phosphatase enzymes using starch gel electrophoresis and Sephadex gel filtration with special reference to high molecular weight enzymes. *Clin Chim Acta* 1970; 30: 509-17.
18. Moss DW, Edwards RK. Improved electrophoretic resolution of bone and liver alkaline phosphatases resulting from partial digestion with neuraminidase. *Clin Chim Acta* 1984; 143: 177-82.
19. Rosalki SB, Foo AY. Two new methods for separating and quantifying bone and liver alkaline phosphatase isoenzymes in plasma. *Clin Chem* 1984; 30: 1182-6.
20. Griffiths J, Black J. Separation and identification of alkaline phosphatase isoenzymes and isoforms in serum of healthy persons by isoelectric focusing. *Clin Chem* 1987; 33: 2171-7.
21. Schoenau E, Herzog KH, Boehies HJ. Liquid chromatographic determination of isoenzymes of alkaline phosphatase in serum and tissue homogenates. *Clin Chem* 1986; 32: 816-8.
22. Anderson DJ, Branum EL, O'Brien JF. Liver- and bone-derived isoenzymes of alkaline phosphatase in serum as determined by high-performance affinity chromatography. *Clin Chem* 1990; 36: 240-6.
23. Moss DW, Whitby LG. A simplified heat inactivation method for investigating alkaline phosphatase isoenzymes in serum. *Clin Chim Acta* 1975; 61: 63-71.
24. O'Carroll D, Statland BE, Steele BW et al. Chemical inhibition method for alkaline phosphatase isoenzymes in human serum. *Am J Clin Pathol* 1975; 63: 564-72.
25. Behr W, Barnert J. Quantification of bone alkaline phosphatase in serum by precipitation with wheat germ lectin: a simplified method and its clinical plausibility. *Clin Chem* 1986; 32: 1960-6.
26. Sorensen S. Wheat-germ agglutinin method for measuring bone and liver isoenzymes of alkaline phosphatase assessed in postmenopausal osteoporosis. *Clin Chem* 1988; 34: 1636-40.
27. Rosalki SB, Foo AY, Burlina A et al. Multicenter evaluation of Iso-ALP test kit for measurement of bone alkaline phosphatase activity in serum and plasma. *Clin Chem* 1993; 39: 648-52.
28. Baillyes EM, Seymour PM, Fulton I et al. A monoclonal antibody capture assay for intestinal alkaline phosphatase and the measurement of this isoenzyme in pregnancy. *Clin Chim Acta* 1988; 172: 267-74.
29. Hill CS, Wolfert RL. The preparation of monoclonal antibodies which react preferentially with human bone alkaline phosphatase and no liver alkaline phosphatase. *Clin Chim Acta* 1989; 186: 315-20.
30. Millan JL, Nustad K, Norgaard-Pedersen B. Highly sensitive solid-phase immunoenzymometric assay for alkaline phosphatases with a monoclonal antibody and monodisperse polymer particles. *Clin Chem* 1985; 31: 54-9.
31. Masuhara K, Suzuki S, Yoshikawa H et al. Development of a monoclonal antibody specific for human bone alkaline phosphatase. *Bone Mineral* 1992; 17: 182-6.
32. Garnerio P, Delmas PD. Assessment of the serum levels of bone alkaline phosphatase with a new immunoradiometric assay in patients with metabolic bone disease. *J Clin Endocrinol Metab* 1993; 77: 1046-53.
33. Gomez B, Haugen S, Ardakani S, Cerelli MJ, Leung SS, Ju HSJ et al. Measurement of bone-specific alkaline phosphatase activity in serum using a monoclonal antibody. *J Bone Miner Res* 1994; 9: S348.
34. Favre G, Canal P, Soula G, Bagnoux JP, Jardillier JC, Laboratoires Sebïa. Communiqué: Les phosphatases alcalines. Aspect génétique-Identification et interprétation clinique. *Ann Biol Clin* 1990; 48: 119-25.