

ESTUDO DA FOSFATASE ALCALINA SÉRICA E FORMAS ISODINÂMICAS NA ESQUISTOSSOMOSE MANSÔNICA *

Maria Orleide Pires Borba **

O estudo das formas isodinâmicas da fosfatase alcalina sérica em pacientes esquistossomáticos, revelou modificações de suas propriedades físico-químicas na fase hépato intestinal e hepatosplênica compensada e descompensada, comparando-se com as da fosfatase alcalina sérica de indivíduos considerados como normais. Por filtração molecular em Sephadex G-200 foi possível separar três (3) formas moleculares distintas de fosfatase alcalina sérica na esquistossomose mansônica hepatosplênica compensada e descompensada, duas das quais se apresentaram como termorresistentes, diferindo das equivalentes formas isodinâmicas de soro normal, que são termolábeis. Na fase hépato intestinal da esquistossomose mansônica, empregando a mesma metodologia, foi detectada uma única forma da fosfatase alcalina, termolábil, que parece corresponder à primeira forma isodinâmica do soro normal. Foi também realizado um estudo das diferentes formas moleculares de fosfatase alcalina humana de: fígado, intestino delgado, osso e placenta provenientes de tecidos considerados normais, bem como do extrato de Schistosoma mansoni.

INTRODUÇÃO

A fosfatase alcalina sérica foi identificada em 1926¹ por Martland e Robison muito embora já se conhecesse noutros tecidos animais e vegetais. As maiores contribuições científicas ocorreram na década de cinqüenta, quando foi purificada e isolada a enzima de soro humano²⁻⁶. Posteriormente, foram estudadas as propriedades físico-químicas e comportamento cinético da fosfatase alcalina sérica; como também o seu estudo em órgãos animais tais como: Fígado, intestino delgado, osso, placenta e rim. Os resultados obtidos foram comparados com os estudos da fosfatase alcalina sérica de diversos animais situados na escala zoológica e, mantiveram um padrão de constância^{6-24, 29, 30}, o que implica ser a fosfatase alcalina sérica originária da liberação das fosfohidrolases integrantes dos referidos órgãos.

Durante a década de sessenta a metodologia analítica foi aperfeiçoada permitindo o emprego da eletroforese em gel de poliacrilamida e filtração molecular em coluna de Sephadex para o estudo da enzima tendo como resultado a identificação de pequenos componentes da fosfatase alcalina^{6, 25-28}

Moss²⁵ conseguiu identificar a fosfatase alcalina hepática quando separada em eletroforese gel de poliacrilamida apresentava três frações que migravam com a transferrina β globulina, a β lipoproteína e α_2 globulina em ordem decrescente de massa molecular respectivamente. Porém a fosfatase alcalina renal e a intestinal apresentavam apenas uma forma enzimática.

A nomenclatura empregada na denominação das frações com atividade enzimática após separação em eletroforese em gel de poliacrilamida ou filtração molecular pelo Sephadex, é muito controversa. A nomenclatura das múltiplas formas

* *Resumo da tese que foi apresentada ao Departamento de Medicina Tropical do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco para obtenção do grau de Mestre.*

** *Mestre em Medicina Tropical — Prof.^ª Colaboradora da Disciplina de Medicina Tropical da Universidade Federal de Pernambuco.*

(*) *A tese foi orientada pelo Professor Dr. Luiz Gonzaga de Azevedo Accioly, Chefe de Laboratório de Enzimologia do Departamento de Bioquímica do Centro de Ciências Biológicas da UFPe.*

das enzimas foi definida em 1971³¹ pela Comissão de Nomenclatura de Bioquímica (CBN) da União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC-IUB).

Neste trabalho as frações com diferentes propriedades físico-químicas encontradas nos soros humanos estudados serão denominadas de formas isodinâmicas de fosfatase alcalina.

A hiperfosfatemia na esquistossomose mansônica tem sido relatada na literatura desde 1975³², porém a investigação do comportamento das formas isodinâmicas nesta patologia ainda não foi descrita na literatura médica. Justifica-se portanto este estudo pela possível contribuição ao conhecimento das modificações bioquímicas decorrentes desta doença, fornecendo, deste modo melhores subsídios a novas orientações diagnósticos e terapêuticas.

O presente trabalho se propõe a estudar as alterações que ocorrem com a fosfatase alcalina sérica e formas isodinâmicas em pacientes com esquistossomose mansônica nas fases hêpato intestinal e hêpato esplênica compensada em descompensada; comparando-se com um grupo testemunho considerado normal.

MATERIAL

A fosfatase alcalina sérica foi dosada em soro humano obtido do sangue total após centrifugação refrigerada durante dez minutos a 1.000xg. O sangue coletado era de indivíduos que se enquadrava nos grupos dentro da patologia da esquistossomose mansônica. Os grupos apresentavam indivíduos numa faixa etária de 20 a 50 anos. Os pacientes deveriam apresentar o pré-requisito de não ter outra patologia associada à esquistossomose mansônica.

GRUPO A — Indivíduos sem esquistossomose mansônica ou outra patologia que venha modificar o metabolismo hepático.

GRUPO B — Indivíduos portadores de esquistossomose mansônica hêpato intestinal, isto é, sem visceromegalia e sem sintomas clínicos.

GRUPO C — Indivíduos portadores de esquistossomose mansônica hêpato esplênica compensada podendo ser um paciente que se recuperou de uma descompensação ou então nunca ter descompensado.

GRUPO D — Indivíduos portadores de esquistossomose mansônica hêpato esplênica descompensada podendo ser o quadro clínico com ascite e/ou hemorragia gastrentestinais.

A fosfatase alcalina proveniente do fígado, intestino delgado, osso, placenta e *Schistosoma*

mansoni — verme adulto — também foram investigadas e os resultados comparados com aqueles obtidos da enzima sorológica dos grupos analisados. Amostras destes órgãos foram provenientes de cirurgia de pacientes não esquistossomático e, o material placentário colhido logo após o delivramento, os vermes adultos do *Schistosoma mansoni* provieram de uma filtração hepática extra corpórea.

Os reagentes químicos utilizados para separar, dosar a atividade enzimática da fosfatase alcalina sérica e suas formas isodinâmicas e, determinação da massa molecular foram: Sephadex G-200 partícula 40-120 do Pharmacia; Amido do Reagen; Ácido 3,5, dinitroisobutírico do Nutritional Biochemicals e os demais obtidos de E. Merk Darmstadt.

METODOLOGIA

A — Separação de frações isodinâmicas de fosfatase alcalina sérica mediante filtração molecular em Sephadex G-200.

Procedeu-se à separação das formas isodinâmicas da fosfatase alcalina mediante filtração molecular em coluna de Sephadex G-200 medindo 15 X 75 mm de dimensões: Aplicando-se 2,0 ml do soro em estudo e empregando-se água destilada com eluente. Frações de 3,5 ml foram coletadas durante o processo com o auxílio de um coletor de frações LKB e preservados em temperatura de 0-4°C.

B — Determinação da atividade enzimática.

Foi utilizado o método de Bessey, Lowry, Brock³³ para determinar a atividade enzimática da fosfatase alcalina sérica e das frações coletadas durante a filtração molecular em Sephadex, com a seguinte modificação:

Solução tampão: glicina, NaOH 50mM, pG 10,5 contendo MgCl₂ 0,5mM.

Solução substrato tampão: 1 comprimido do substrato (paranitrofenilfosfato 5,5mM) dissolvido em 10 ml da solução tampão.

Incuba-se em uma cubeta de quartzo (trajeto óptico de 1 cm) a 36°C 2,0 ml do substrato tampão e 0,5 ml da solução tampão. Estabelecido o equilíbrio térmico 0,1 ml do soro ou da fração coletada é adicionado ao sistema e a absorbância no comprimento de onda de 405 nm foi registrada a atividade enzimática com o auxílio do espectrofotometro Cary 118 contra um "branco" preparado de modo semelhante exceto que a amostra enzimática foi desnaturada prevea-

mente mediante tratamento térmico de 100°C por 5 minutos.

A labilidade térmica das frações isodinâmicas foi investigada segundo tratamento térmico de 56°C durante 10 minutos.

As amostras dos tecidos tais como placenta, fígado, intestino delgado e periósteo humano foram homogeneizados em solução tampão e, do sobrenadante foram colhidos 2,0 ml aplicados no topo de uma coluna de Sephadex G-200 para filtração molecular semelhante à metodologia empregada para a separação da fosfatase alcalina sérica, já descrita anteriormente. Para o estudo do *Schistosoma mansoni* foram utilizados 1.356 vermes adultos os quais foram homogeneizados em solução tampão e, do sobrenadante 2,0 ml foram aplicados no topo de uma coluna Sephadex G-200; procedendo-se de ora em diante de modo semelhante aos demais tecidos estudados.

Para determinar a massa molecular das formas isodinâmicas 1, 2 e 3 da fosfatase alcalina sérica foi utilizado o método de Andrews³⁴, usando como padrões a catalase e α amilase.

A atividade catalásica foi determinada empregando-se o método modificado de Accioly e Melo³⁵ enquanto que a α amilásica foi procedida conforme metodologia descrita por Benfeld³⁶.

RESULTADOS

O Histograma 1 exemplifica um dos resultados obtidos com a filtração molecular em Sephadex G-200 de fosfatase alcalina de soro normal, a Tabela resume os resultados da atividade da fosfatase alcalina total e formas isodinâmicas estudadas no grupo normal.

As formas isodinâmicas quando submetidas ao tratamento térmico apresentaram uma redução de 44% para o primeiro pico e de 100% para o segundo e terceiro picos.

No estudo da atividade enzimática da fosfatase alcalina e formas isodinâmicas em soro de pacientes com esquistossomose mansônica na fase hépato intestinal, como exemplificado no Histograma 2, foi detectado apenas uma forma isodinâmica da enzima, e o correspondente tratamento térmico resultou em uma redução de 56%. Estes resultados estão apresentados na Tabela II. Estudando o soro de paciente com esquistossomose mansônica hepatosplênica compensada a atividade da fosfatase alcalina e suas formas isodinâmicas e o seu respectivo tratamento térmico, como apresenta o Histograma 3; observamos o aparecimento das três formas isodinâmicas da fosfatase alcalina.

A Tabela III resume os dados do grupo em estudo. O comportamento térmico destas resul-

Tabela I
Estudo da FAS e suas formas, isodinâmicas em soro normal

NOME	SEXO	1º pico mU/ml			2º pico mU/ml			3º pico mU/ml			
		E	A	R%	E	A	R%	E	A	R%	
1 OPB	F	29,25	10,5	6,6	40	6,45	0	100	4,95	0	100
2 LC	M	21,0	4,5	1,95	50	2,25	0	100	1,5	0	100
3 L	F	39,0	9,0	4,5	50	3,0	0	100	2,7	0	100
4 CB	M	43,5	11,25	4,5	60	4,50	0	100	4,5	0	100
5 MLS	F	48,0	0,0	4,5	30	6,0	0	100	3,0	0	100
6 AM	F	48,0	12,0	9,0	30	4,5	0	100	6	0	100
7 EMO	F	25,5	19,5	3,0	80	13,5	0	100	3,0	0	100
8 C	M	31,5	25,5	16,5	30	19,5	0	100	19,5	0	100
9 J	M	25,5	16,5	10,5	40	22,5	0	100	9,0	0	100
10L	F	48,0	6,0	4,5	30	6,0	0	100	3,0	0	100

- FAS — Fosfatase Alcalina Sérica
 FA — Fosfatase Alcalina
 E — Fração encontrada no soro
 A — Fração aquecida a 56°C — Iomin.
 R% — Redução sofrida após o aquecimento

tou numa redução de $37 \pm \%$ para o primeiro pico, o segundo de $23 \pm \%$ e, o terceiro pico não sofreu redução da atividade enzimática.

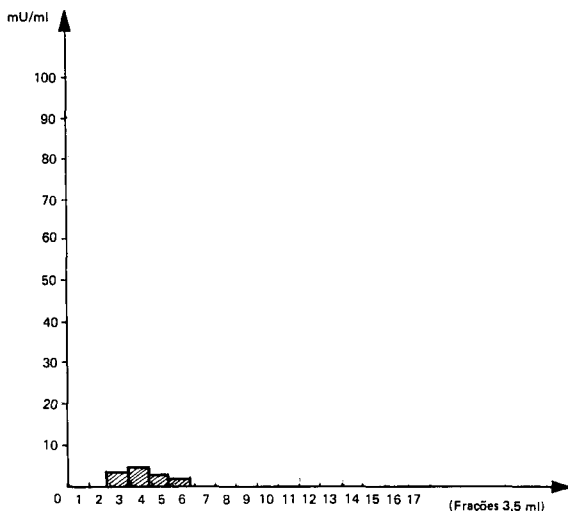
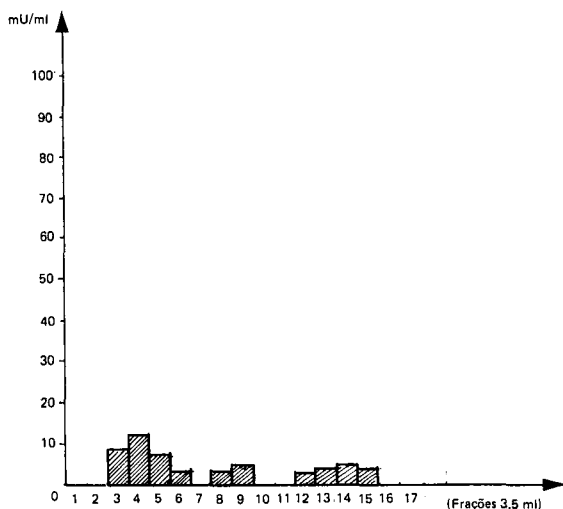
O Histograma 4 refere-se ao estudo da fosfatase alcalina e suas formas isodinâmicas no soro de um paciente com esquistossomose mansônica na fase hepatoplênica descompensada com o correspondente tratamento térmico. A Tabela IV reúne os dados do referido grupo. Nesta fase da esquistossomose mansônica observam-se novamente as três formas isodinâmicas de fosfatase alcalina. O comportamento térmico destas frações revelou que o primeiro pico sofreu uma

redução de $55 \pm \%$; o segundo e o terceiro pico uma redução de $5 \pm \%$.

O Histograma 5 apresenta o resultado da atividade enzimática da fosfatase alcalina do verme adulto o qual apresenta apenas um pico, que não sofreu redução de sua atividade enzimática, após tratamento térmico de 56°C durante 10 minutos.

O Histograma 6 é o resultado do estudo em extrato de fígado humano onde as três formas isodinâmicas foram isoladas, sendo a redução da atividade enzimática em torno de $70 \pm \%$ para o primeiro pico, enquanto o segundo e o terceiro

Histograma 1
Estudo da atividade da FA e suas formas isodinâmicas
em soro normal



Estudo da atividade enzimática após tratamento
térmico 56°C / 10 minutos

picos sofreram redução de 100% em suas atividades.

O Histograma 7, referente a fosfatase alcalina e formas isodinâmicas do intestino delgado humano, apresenta as três formas isodinâmicas e que, submetidas a tratamento térmico, apresentaram uma redução de $30 \pm \%$ para o primeiro pico e de $100 \pm \%$ para o segundo e terceiro picos.

Os resultados do estudo da fosfatase alcalina e formas isodinâmicas em osso humano estão no Histograma 8, reveland apenas uma forma isodinâmica com um comportamento térmico cuja

redução da atividade enzimática foi de $85 \pm \%$. O Histograma 9, alusivo aos estudos da fosfatase alcalina e formas isodinâmicas em placenta humana, revela apenas uma forma isodinâmica da fosfatase alcalina e que quando submetida a tratamento térmico sofreu redução de atividade em torno de $20 \pm \%$.

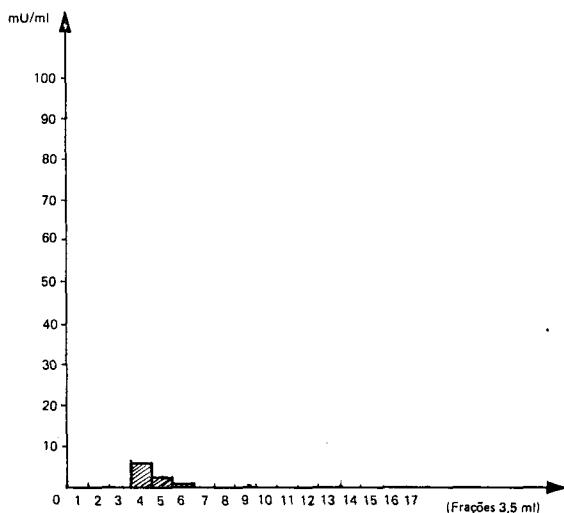
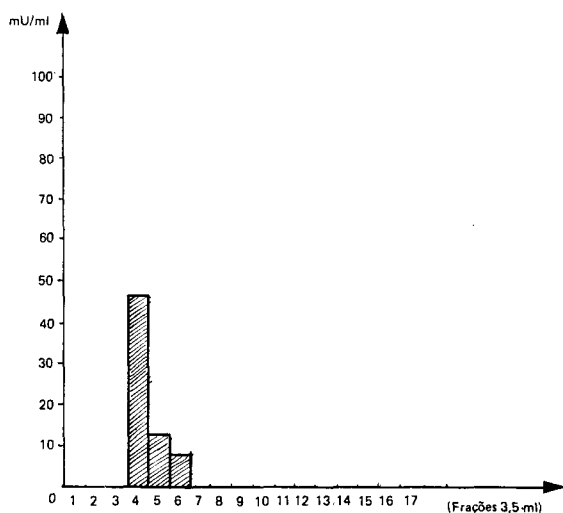
As massas moleculares das três formas isodinâmicas da fosfatase alcalina sérica da esquistossomose mansônica descompensada, F_3 , F_2 , F_1 , respectivamente, conforme está demonstrado na Figura 1.

Tabela II
Estudo da FAS e suas formas isodinâmicas na EMHI

NOME	SEXO	1.º pico mU/ml			2.º pico mU/ml			3.º pico mU/ml			
		E	A	R%	E	A	R%	E	A	R%	
1 NB	F	31,5	10,5	0	100	—	—	—	—	—	—
2 JO	M	31,5	6,3	1,5	80	—	—	—	—	—	—
3 VS	F	31,5	7,5	3,75	50	—	—	—	—	—	—
4 JL	F	141,0	47,0	6,0	90	—	—	—	—	—	—
5 MJS	F	141,0	48,0	6,0	90	—	—	—	—	—	—
6 E	F	27,0	7,5	6,0	20	—	—	—	—	—	—
7 JG	M	31,5	8,25	4,5	50	—	—	—	—	—	—
8 ES	F	27,0	7,5	6,0	20	—	—	—	—	—	—
9 ML	F	69,0	34	6	22,5	10	—	—	—	—	—
10AR	M	31,5	8,25	4,5	50	—	—	—	—	—	—

- FAS — Fosfatase Alcalina Sérica
- FA — Fosfatase Alcalina
- E — Fração encontrada no soro
- A — Fração aquecida a 56°C — Iomin.
- R% — Redução sofrida após o aquecimento

Histograma 2
Estudo da atividade da FA e suas formas isodinâmicas em soro de paciente com EMHI



Estudo da atividade enzimática após tratamento térmico 56°C / 10 minutos

Histograma 3
Estudo da atividade da FA e suas formas isodinâmicas
em soro de paciente com EMHE compensada

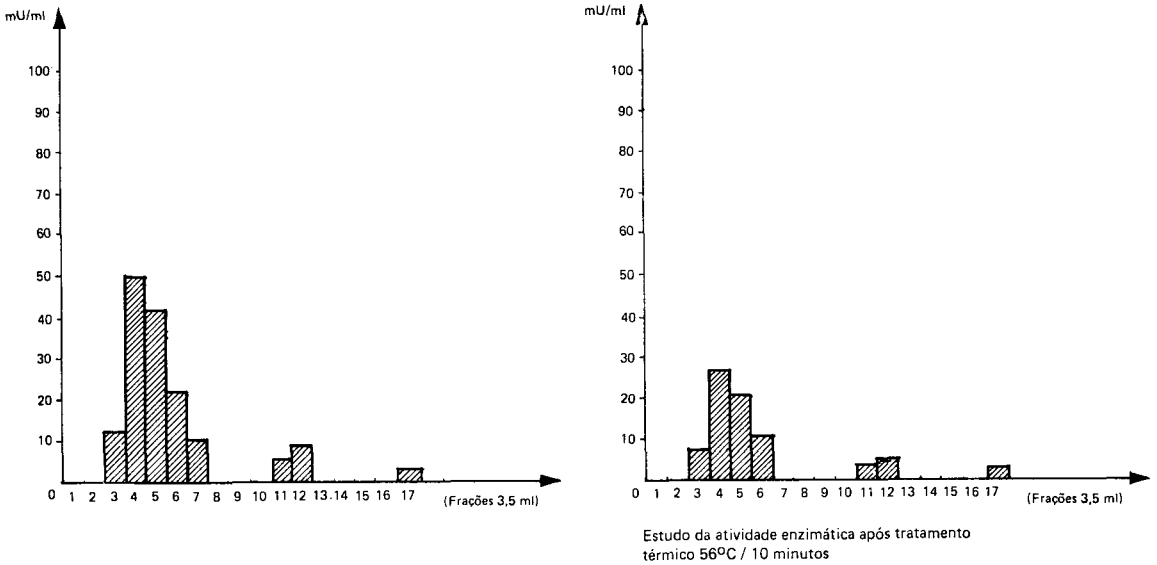


Tabela III
Estudo da FAS e suas formas isodinâmicas na EMHE compensada

Paciente	Sexo	FA total mU/ml	1º pico mU/ml			2º pico mU/ml			3º pico mU/ml		
			E	A	R%	E	A	R%	E	A	R%
1 SA	M	31,5	7,5	4,5	30	2,1		1,5	20	3,2	0
2 MMP	M	292,5	42,0	22,5	50	6,5	4,2	30	2,1	2,1	0
3 GCA	M	75,0	19,5	15,0	30	6,0	4,0	30	2,1	2,1	0
4 ESS	M	36,0	7,5	6,0	10	2,4	1,8	30	2,4	2,4	0
5 JRS	M	97,5	18,0	13,5	30	3,9	3,0	20	1,8	1,8	0
6 JLS	M	159,0	25,5	15,0	40	3,9	3,9	0	1,5	1,5	0
7 JR	M	142,5	28,5	15,0	50	18,0	6,0	70	7,2	7,2	0
8 AFG	M	67,5	12,0	7,5	40	2,7	2,7	0	3,3	3,3	0
9 FJS	M	290,0	41,0	40,0	50	6,0	4,0	30	2,1	2,1	0
10 RS	M	150,0	25,0	14,5	40	4,0	4,0	0	1,5	1,5	0

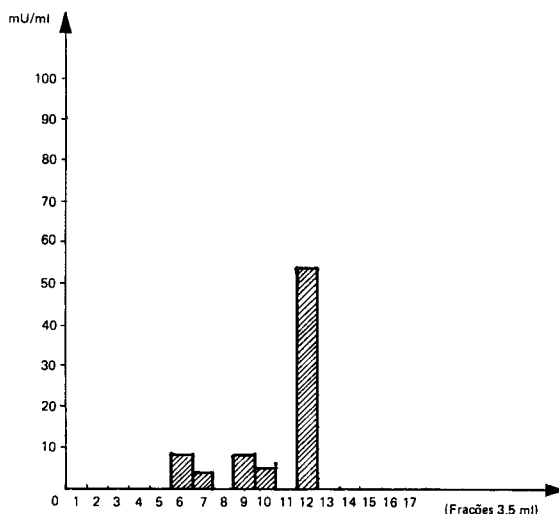
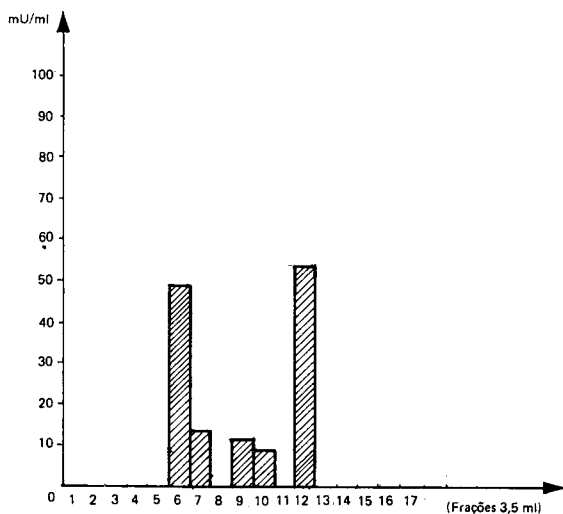
FAS — Fosfatase Alcalina Sérica
 FA — Fosfatas Alcalina
 E — Fração encontrada no soro
 A — Fração aquecida a 56°C — omin.
 R% — Redução sofrida após o aquecimento

Tabela IV
Estudo da FAS e suas formas isodinâmicas na EMHE descompensada

Paciente	Sexo	FA total mU/ml	1.º pico mU/ml			2.º pico mU/ml			3.º pico mU/ml		
			E	A	R%	E	A	R%	E	A	R%
1 JJB	M	148,5	39,75	19,85	50	49,5	24,8	50	49,5	49,5	0
2 L ₃	M	82,5	24,75	12,75	50	9,3	3,57	60	3,6	3,6	0
3 JB	M	52,5	27,0	14,5	50	1,8	1,05	50	2,4	1,65	30
4 AT	F	37,5	4,5	3,0	30	3,0	2,25	20	3,0	3,0	0
5 JA	F	42,0	7,5	3,75	50	3,0	3,0	0	3	2,25	20
6 RPA	M	168,0	73,5	15,0	80	63,0	63,0	0	12,0	12,0	0
7 GFN	M	147,0	46,5	7,5	80	48,0	13,5	70	55,5	55,5	0
8 DSV	M	199,5	63,0	48,0	20	34,5	16,5	50	27,0	24,0	10
9 MJP	M	175,5	48,0	6,0	80	10,5	6,0	40	52,5	52,5	0
10 AAS	M	85,5	16,5	6,0	60	4,5	4,5	0	6,0	6,0	0

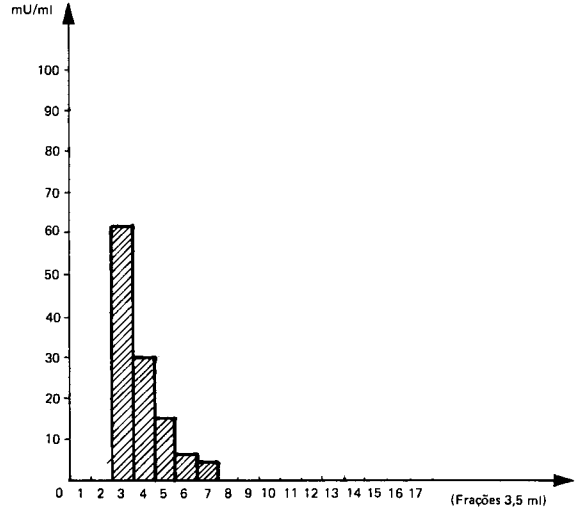
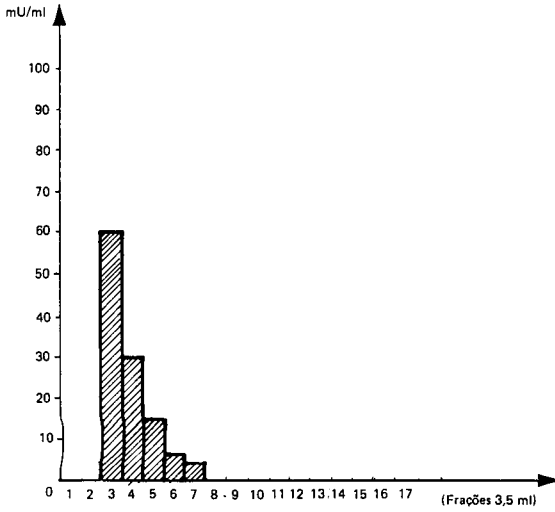
FAS — Fosfatase Alcalina Sérica
 FA — Fosfatase Alcalina
 E — Fração encontrada no soro
 A — Fração aquecida a 56°C — Iomin.
 R% — Redução sofrida após o aquecimento

Histograma 4
Estudo da atividade da FA e suas formas isodinâmicas
em soro de paciente com EMHE descompensada



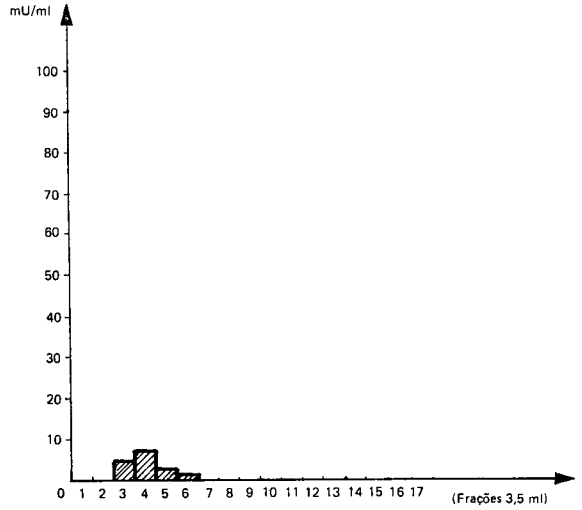
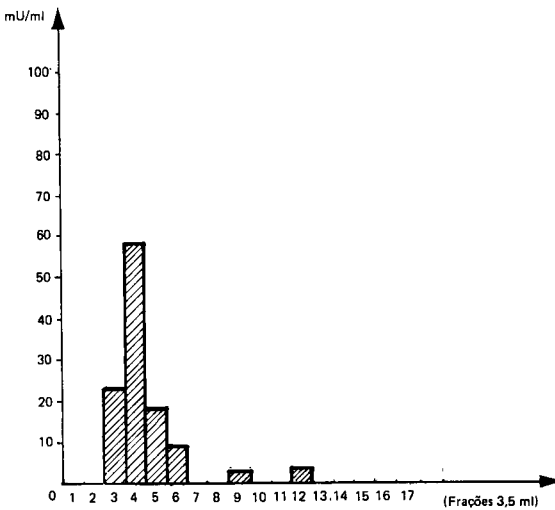
Estudo da atividade enzimática após tratamento
térmico 56°C / 10 minutos

Histograma 5
Estudo da atividade da FA e suas formas isodinâmicas
em extrato *Schistosoma mosoni*



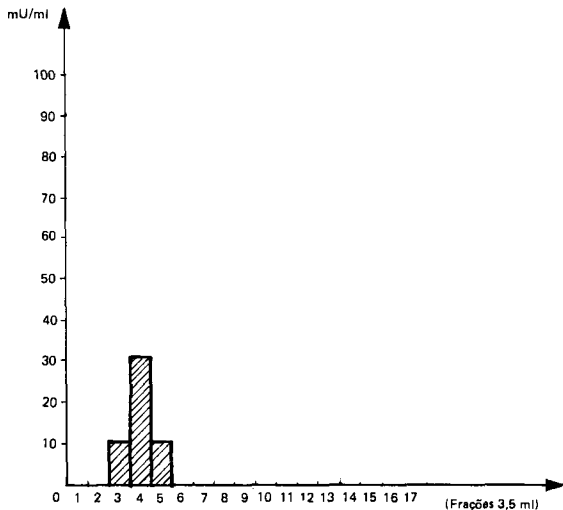
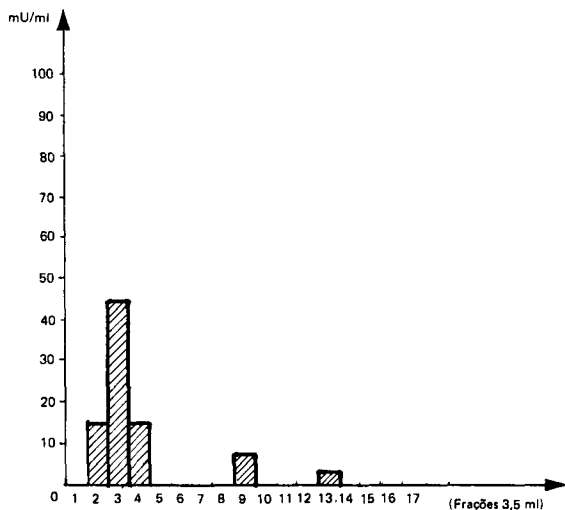
Estudo da atividade enzimática após tratamento
térmico 56°C / 10 minutos

Histograma 6
Estudo da atividade da FA e suas formas isodinâmicas
em extrato de fígado humano



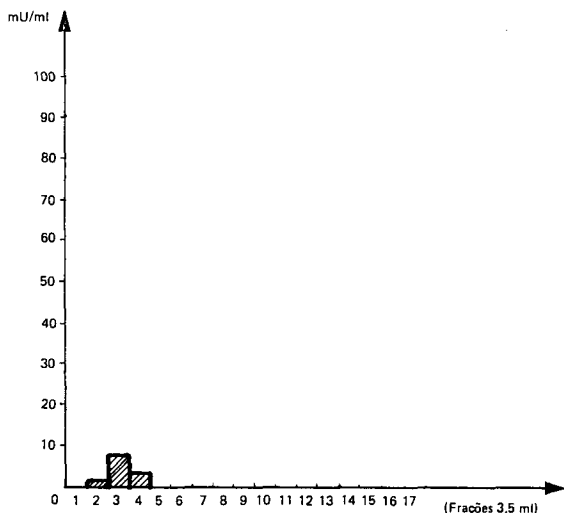
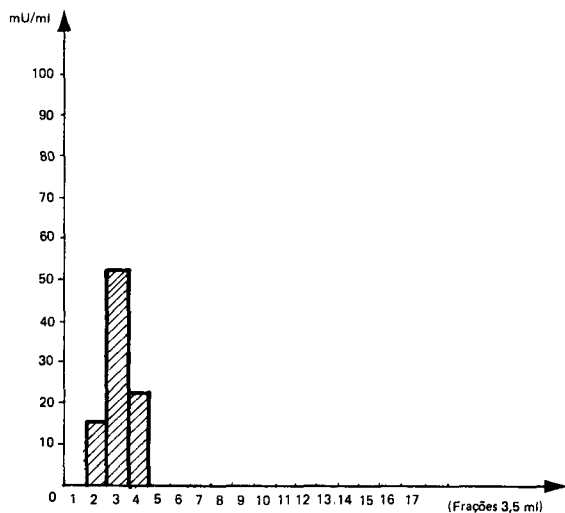
Estudo da atividade enzimática após tratamento
térmico 56°C / 10 minutos

Histograma 7
 Estudo da atividade da FA e suas formas isodinâmicas
 em extrato de intestino delgado humano



Estudo da atividade enzimática após tratamento
 térmico 56°C / 10 minutos

Histograma 8
 Estudo da atividade da FA e suas formas isodinâmicas
 em extrato ósseo humano



Estudo da atividade enzimática após tratamento
 térmico 56°C / 10 minutos

Histograma 9
Estudo da atividade da FA e suas formas isodinâmicas
em extrato de placenta humana

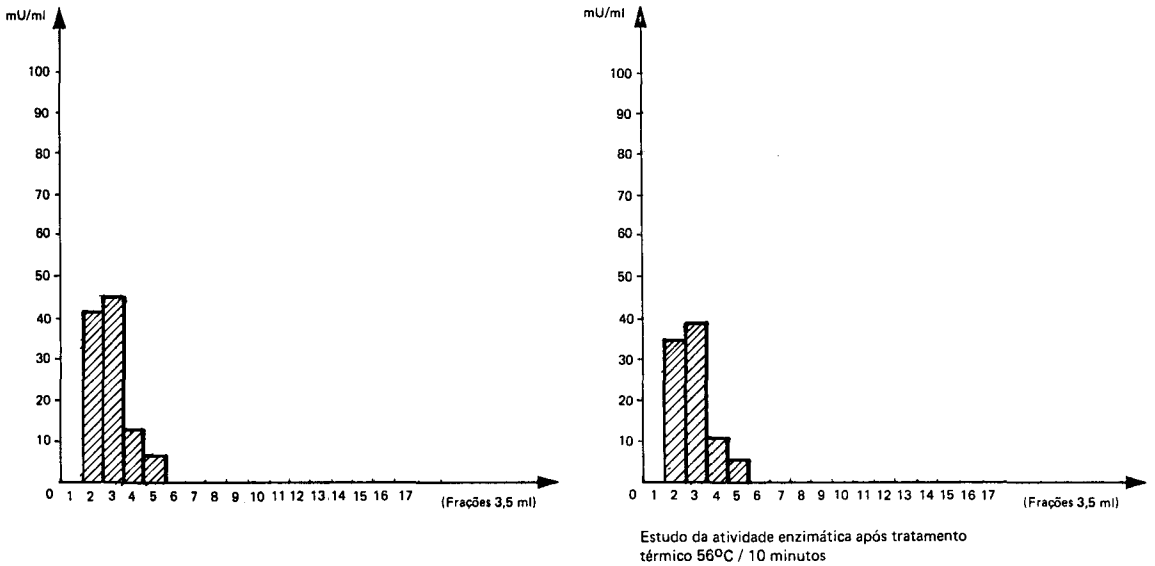
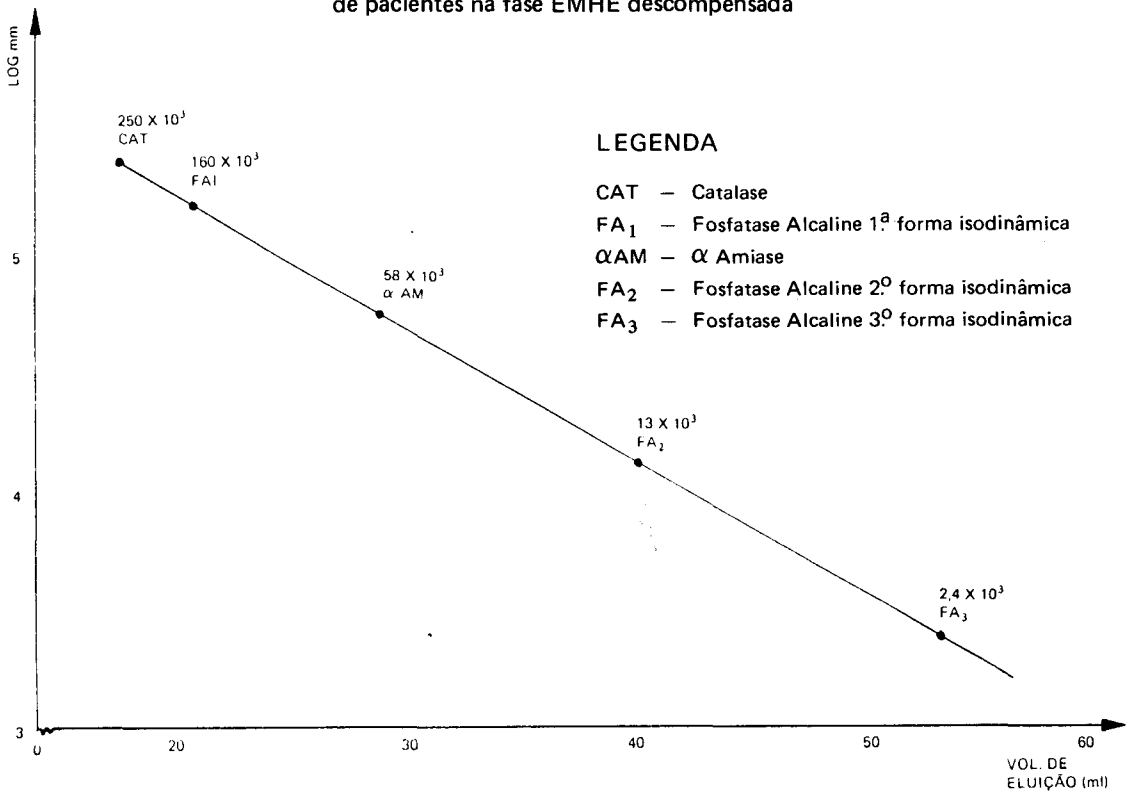


Figura 1
Determinação da massa molecular das formas isodinâmicas da FAS
de pacientes na fase EMHE descompensada



DISCUSSÃO

O estudo da fosfatase alcalina sérica e suas formas isodinâmicas no grupo controle, demonstrou a existência de três formas isodinâmicas. A atividade enzimática do primeiro pico submetido a tratamento térmico sofre redução de 43,5%, assemelhando-se ao comportamento da forma isodinâmica de maior atividade descrita na literatura³⁷, enquanto que o segundo e o terceiro picos sofreram redução de $100 \pm \%$.

Nos pacientes com esquistossomose mansônica hépato intestinal, a fosfatase alcalina sérica, quando filtrada em Sephadex, revelou apenas um pico com atividade enzimática, correspondente ao primeiro pico encontrado no grupo controle, uma vez que a sua eluição e comportamento térmico são aproximadamente correspondentes.

Os resultados obtidos com o grupo de indivíduos com esquistossomose mansônica hepatoplênica compensada apresentaram três picos com atividade enzimáticas bastante elevadas, o que é compatível com a elevação da atividade enzimática total dos níveis séricos já descrito na literatura³². As reduções das atividades enzimáticas dos diferentes picos, quando submetidos a tratamento térmico, demonstraram sensíveis modificações em relação ao grupo controle, desde que o primeiro pico sofreu redução de $37 \pm \%$ de sua atividade, o segundo pico reduziu-se em apenas $23 \pm \%$, enquanto que o terceiro pico praticamente não sofreu redução de atividade.

Investigando-se os pacientes com esquistossomose mansônica hépato intestinal e obedecendo ao rigor clínico laboratorial de seleção empregado na obtenção do material, um paciente apresentou três formas isodinâmicas da fosfatase alcalina sérica com termolabilidade semelhante às encontradas na esquistossomose mansônica hepatoplênica compensada, ver Histograma 10. Estes dados sugerem que embora esse paciente esteja dentro do grupo com esquistossomose mansônica hépato intestinal, de acordo com os critérios estabelecidos neste trabalho, o estudo de sua fosfatase alcalina sérica e formas isodinâmicas (empregando a presente metodologia) sugere já existirem alterações compatíveis com a esquistossomose mansônica hepatoplênica compensada. No grupo de pacientes com esquistossomose mansônica hepatoplênica descompensada, as três formas isodinâmicas da fosfatase alcalina sérica comportaram-se de modo semelhante ao observado para o grupo com esquistossomose mansônica compensada.

Considerando a hipótese de que os níveis séricos da fosfatase alcalina dos pacientes com esquistossomose mansônica, compensada ou

descompensada, pudessem ser influenciados pela participação de enzima do *Schistosoma mansoni*, o estudo de atividade enzimática da fosfatase alcalina no trato de verme adulto, a que se procedeu, demonstrou ser tal evento altamente improvável, em face do diferente comportamento térmico apresentado por esta enzima, conforme pode ser observado no Histograma 5. Além do mais, se o extermínio dos 1.356 vermes ocorresse simultaneamente dentro do hospedeiro, a atividade enzimática elevar-se-ia de apenas 0,1 mU/ml de sangue.

O estudo realizado nos diversos extratos de órgãos tinha como objetivo esclarecer a contribuição destas fosfatases alcalinas nos níveis séricos, correlacionando o comportamento da fosfatase alcalina dos diversos órgãos com a fosfatase alcalina do soro de indivíduos considerados normais.

Os resultados obtidos com o extrato de fígado humano apresentam a fosfatase alcalina hepática com um comportamento semelhante à fosfatase alcalina sérica. O estudo com o intestino delgado humano apresenta resultados semelhantes à fosfatase alcalina hepática, no entanto, a atividade enzimática é bem menor na fosfatase alcalina intestinal comparando-se com a atividade da fosfatase alcalina hepática. Os resultados da fosfatase alcalina óssea demonstraram apenas uma forma isodinâmica correspondente à primeira forma isodinâmica do soro e, com uma atividade enzimática e resistência térmica muito baixas, conforme já relatado na literatura por Posen *et alii*³⁸.

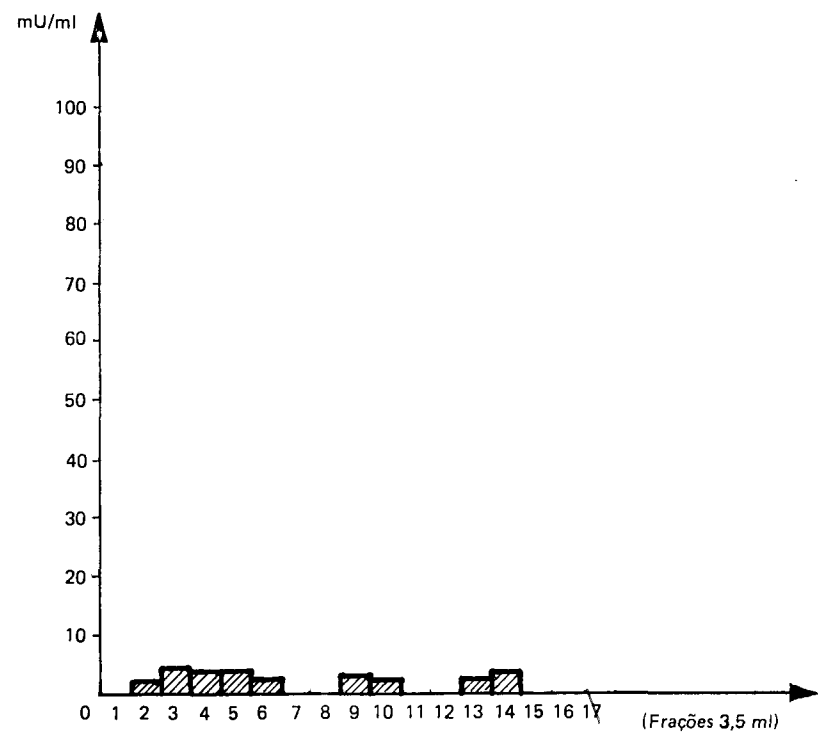
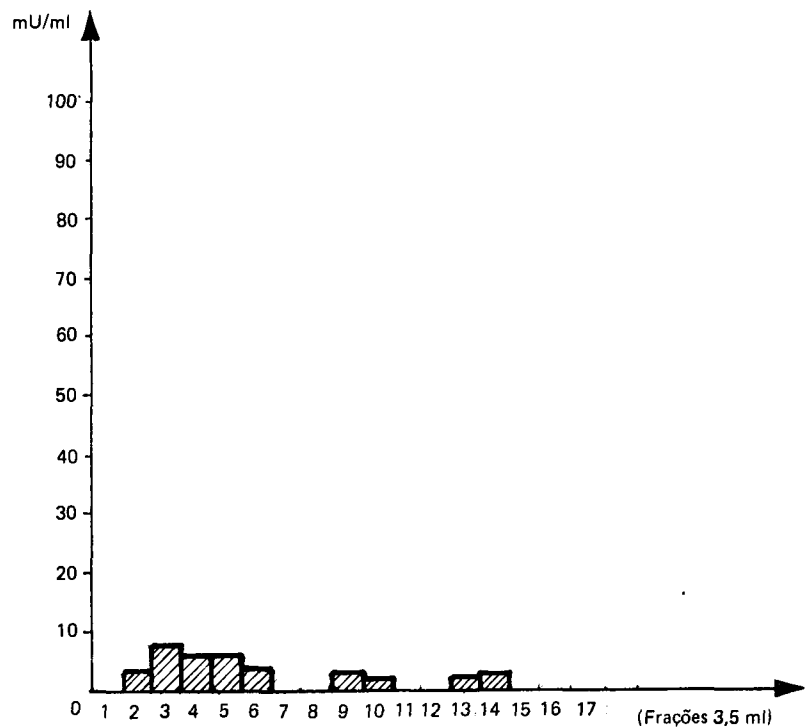
Com a fosfatase alcalina placentária também só foi identificada uma forma isodinâmica, Porém, com uma atividade enzimática muito elevada e com maior resistência ao tratamento térmico comparando-se com o primeiro pico da fosfatase alcalina sérica de indivíduos normais; Resultados semelhantes foram descritos por Posen *et alii*³⁸.

Finalmente vale ressaltar a pequena massa molecular das duas formas isodinâmicas, F₂, e F₃, descritas neste trabalho, que, embora verificadas em pacientes com esquistossomose mansônica hepatoplênica descompensada, eram coincidentes com as formas F₂ e F₃, verificadas com o grupo controle, como podem ser depreendidos dos resultados obtidos durante o estudo da fosfatase alcalina sérica em Sephadex.

CONCLUSÕES

1. Presença de formas moleculares da fosfatase alcalina de baixa massa molecular no soro humano, extratos de fígado e intestino delgado

Histograma 10
Estudo da atividade da FA e suas formas isodinâmicas
em soro de paciente com EMHI



Estudo da atividade enzimática após tratamento
térmico 56°C / 10 minutos

humano, que foram denominadas FORMAS ISODINÂMICAS da fosfatase alcalina.

2. O número de propriedades físico-químicas das formas isodinâmicas apresentaram distribuição distinta e características próprias nos sistemas estudados:

A — indivíduos normais

- . Soro humano
duas formas termolábeis
- . Extrato de fígado
idem
- . Extrato de intestino delgado
idem
- . Extrato de osso
uma forma termolábil
- . Extrato de placenta
nenhuma forma

B — Indivíduos com esquistossomose mansônica

- . Soro de esquistossomótico na fase hepato intestinal
nenhuma forma
- . Soro de esquistossomótico na fase hepatoplênica compensada
duas formas termorresistentes
- . Soro de esquistossomótico na fase hepatoplênica descompensada
idem

3. O aumento da fosfatase alcalina sérica não é devido à liberação da fosfatase alcalina do próprio verme.

4. O número e a propriedade das formas isodinâmicas independem da atividade da fosfatase alcalina sérica.

5. A massa molecular das formas isodinâmicas foi estimada em: F_2 13×10^3 daltons e F_3 $2,4 \times 10^3$ daltons.

SUMMARY

The study of the multiple forms of serum alkaline phosphatase in patients with schistosomiasis (hepatointestinal compensated and decompensated hepatosplenic) revealed modifications in their physico-chemical properties. Molecular filtration with a Sephadex G-200 column separated three distinct molecular forms of serum alkaline phosphatase in patients with hepatosplenic schistosomiasis mansoni. Two of these forms presented as thermoresistant, contrasting with the equivalent multiple forms in normal serum which are thermolabile. In the hepatointestinal phase of schistosomiasis mansoni only one thermolabile form of alkaline phosphatase was isolated which corresponded to the primary isodynamic form in normal serum.

Studies were also done on the different molecular forms of human alkaline phosphatase. From liver, small intestine, bone and placenta, originating from tissues considered as normal, and from *Schistosoma mansoni* itself.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

1. MARTLAND, M. and ROBISON, R. Possible significance of hexosephosphoric esters in ossification VI Phosphoric esters in blood plasma. *Biochem. J.* 20, 847, 1926.
2. MALAMY, M. H. and HORECKER, B.L. Purification and crystallization of the alkaline phosphatase of *E. coli*. *Biochemistry* 8, 1898, 1954.
3. GHOSH, N.K. and FISKMAN, W. H. Characterization of human placental alkaline phosphatase isoenzymes. *Fed. Proc.* 26, 558, 1967.
4. GHOSH, N.K. and FISKMAN, W.H. Purification and properties of molecular-weight variants of human placental alkaline phosphatase. *Biochem. J.* 108, 779, 1968.
5. GHOSH, N.K. Purification and molecular properties of placental and intestinal alkaline phosphatases. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 166, 604, 1969.
6. ANIDO, G., MCBETH, C.H., ROMERO, P. Isoenzymes of alkaline Phosphatase. *QUAD. Sclavo Diagn.* 8, nº 1. 541-553, 1972.
7. GHOSH, N.K., GOLDMAN, S. S. and FISKMAN, W.H. Human placental alkaline phosphatase: A sialo-protein. *Enzymologia* 33, 113, 1967.
8. AHMED, Z. and King, E.J. Purification of placental alkaline phosphatase. *Biochem. Biophys. Acta.* 40, 320, 1960.
9. EATON, R.H. and Moss, D.W. Partial purification and some properties of human bone alkaline phosphatase. *Enzymologia.* 35, 81, 1968a.
10. SMITH, J.K., EATON, R.H., WITBY, L.G. and MOSS, D.W. Large scale-gel filtration in the purification of human liver and small intestine alkaline phosphatase. *Analyt. Biochem.* 23, 84, 1968.
11. POSEN, S., NEALE, F.C. and CLUBB, J.S. Heat inactivation in the study of human alkaline phosphatases. *Ann. Intern. Med.* 62, 1234, 1965.
12. BALESTRIERI, C., COLONNA, G., IRACE, C., CEDRANGOLO, C. Purification and some properties of an alkaline

- phosphatase from beef brain. *Comparative Biochem. Physiol.* vol. 50b, 203, 207, 1975.
13. CALAM, R. ROGER., HENRY, R.L., MURANO, G., GRIGNOL, G., *Analytical Biochem.* 71, 426-435, 1975.
 14. CHANG, C. H., ANGELLIS, D., FISKMAN, W. Reaction of concanavalin a with alkaline phosphatase extracted from various human tissursources. molecular and celular *Biochem. V.* 9, nº 1, 55-57, 1975.
 15. HAGERSTRAND, I., NORDIM, J.G., *Acta Path. Microbiol. Scand. Section A* 80, 539-547, 1972.
 16. OTANI, R., HIGASHINE, K., YAMAMURA. C. *Chim. Acta.* 60, 112-115, 1975.
 17. PITARRA, G.C., CHARM, S.E., GREEN, S. Purification of placental alkaline phosphatase by immunoadsorption, 1975.
 18. SABBIONI, E., GIRARDT, F., MARAFANTI, E. *Biochem. V.* 2 27-276, 1976.
 19. SAGIURA, M., HIRANO, K., IINO, S., SUZUKI, H., ODA, T. Purification and properties of alkaline phosphatase from human bile. *Cham. Pharm. Bull.* v. 23, nº 9, 2019-2024, 1975.
 20. SUGIURA, H., ISOBE, M., HIRANO, K., IINO, S., SUZUKI, H., ODA, T. Comparison of properties of human intestinal and placental alkaline phosphatase. *Chem. Pharm. Bull.* V. 23, nº 7, 1542-1547, 1975.
 21. ENGSTROM, L. Studies on bovine liver alkaline phosphatase, phosphate incorporation. *Biochem. Biophys. Acta* 92, 71, 1964.
 22. TRÉPAMER, J.M., SEARGEANT, L. E., STINSON, R. A. *Biochem. Journal* 155, 653-660, 1976.
 23. SUSSMAN, H.H., *Ann.N.Y.Acad. Sci.* 166. 681, 1969.
 24. OBINSON, J.C. and Pierre, J.E., Differential action of neuraminidase on human serum, alkaline phosphatase. *Nature (Lond.)* 204. 472, 1964.
 25. MOSS, D.W., Properties of alkaline phosphatase isoenzymes separated by starch-gel eletrophoresis. *Proc. Assc. Clinc. Biochem.* 2,5, 1962a.
 26. CHIANDUSSI, L., GRAENE, S.F., and SHERLOCK, S., Serum alkaline phosphatase fractions in hepatobiliary and bone diseases. *Clin. Sci.* 22. 245, 1962.
 27. HODSON, A.W., LATNER, A.L. and RAINE, L., Isoenzymes of alkaline phosphatase. *Clin. Chim. Acta.* 7, 255, 1962.
 28. CUNNINGHAM, V.R. and RIMER, J.G. Isoenzymes of alkaline phosphatase of human serum. *Biochem. J.* 89. 50, 1963.
 30. BOYER, S.G. Alkaline phosphatase in human sera and placental. *Science.* 134, 1002, 1961.
 31. The nomenclature of Multiple Forms of Enzymes IUPAC. IUB (CBN) *Eur. J. Biochem.* 24. 1-3, 1971.
 32. MARQUES, J.J. e Col. Fosfatase alcalina na Esquistossomose Mansônica - boletim trimestral da Clínica de Doenças Infecciosas e Parasitárias. v. III nº 1, 9-22, 1975.
 33. O.A. BESSEY, O. H. LOWRY and M.J. BROCK *J. Biol. Chem.* 164, 321, 1946.
 34. ANDREWS, P. Estimation of the molecular weights of protein by sephadex gel-filtration. *Biochem. J.* 91, 222, 1964.
 35. ACCIOLY, L.G.A. and MELO, R. M. Determinação colorimétrica da atividade catalásica método modificado. *Mem. Inst. Bioc. Univ. Fed. PE. Recife* 1 (1) : 53, 56, 1974.
 36. BERNIFELD, P. In *Methods in enzymology* (Collowick, S.P. e Kaplan, N.O. e eds), Academic Press, N. York V. 1, 149-150, 1945.
 37. FENNLy in ANIDO, G., MEBETH, G.H., ROMERO, P., Isoenzymes of alkaline phosphatase. *Quad. Sclavo Diagn.* 8, nº 1, 541-553, 1972.
 38. POSEN, S.M.B., FRANCIS, C., NEALE, P.H. and John, S. CUBB, M.B. Heat inactivation in the study of human alkaline phosphatases. *Ann. of Internal Medc.* V. 62 nº 6 1234-1243, 1965.