

FOSFÁTASE ALCALINA SÉRICA HUMANA E ENVELHECIMENTO*

M. R. NEGRÃO, M. J. MARTINS, E. RAMOS, H. BARROS, C. HIPÓLITO-REIS, I. AZEVEDO
Serviços de Bioquímica (U-38 FCT), de Higiene e Epidemiologia. Faculdade de Medicina,
Universidade do Porto. Porto.

RESUMO/SUMMARY

Está descrita uma relação inversa entre a idade e a actividade da fosfatase alcalina (FA) em modelos experimentais de envelhecimento. No presente trabalho caracterizámos os níveis séricos da actividade da FA humana, de acordo com a idade e o sexo. A actividade sérica da FA foi determinada em 203 indivíduos, residentes na área do Hospital de S. João, com idade igual ou superior a 40 anos. No grupo dos homens (n=87) observou-se um aumento da FA da quinta para a sexta década, que estabilizou em seguida. O grupo das mulheres (n=116) apresentou um ligeiro aumento da FA da quinta para a sexta década, seguindo-se um aumento acentuado após os 69 anos de idade. Obteve-se para a população total uma correlação positiva entre a actividade da FA sérica total e a idade. A actividade sérica da FA parece ser um biomarcador da idade no Homem.

Palavras-chave: determinação da actividade enzimática; estudo comunitário; fosfatase alcalina; idade; inibidores específicos de isozimas; sexo.

Abreviaturas usadas.

FA, fosfatase alcalina; FA_{int}, fosfatase alcalina intestinal; FA_{pl}, fosfatase alcalina placentária; FA_{te}, fosfatase alcalina tecidual não específica; FA_{total}, fosfatase alcalina total; p-NFF, p-nitrofenilfosfato.

HUMAN SERUM ALCALINE PHOSPHATASE AND AGEING

Background: In experimental ageing models an inverse relationship between age and alkaline phosphatase activity has been observed. *Objective:* To characterize serum levels of alkaline phosphatase activity in humans according to age and gender. *Methods:* Serum alkaline phosphatase was determined in a random sample of 203 community dwellers aged 40 or more years. *Results:* In men (n=87) total serum alkaline phosphatase markedly increased from the 5th to the 6th decade and then stabilized. For women (n=116) there was a slight increase in total serum alkaline phosphatase from the 5th to the 6th decade, followed by a bend upward after 69 years of age. There was a significant positive correlation between total serum alkaline phosphatase and age for the whole population. *Conclusions:* Serum alkaline phosphatase activity appears as a biomarker of age in humans, similarly to what has been described for experimental animal models.

Key-words: age; alkaline phosphatase; community study; gender; enzyme activity determination; specific isoenzyme inhibitors.

* Estudo financiado pela FCT, POCTI e FEDER (projecto 32550/99)

INTRODUÇÃO

Há mais de 70 anos que o doseamento da actividade da FA (EC 3.1.3.1.; fosfo-hidrólase de mono-ésteres ortofosfóricos, pH óptimo alcalino) no soro sanguíneo é utilizado na Bioquímica Clínica¹⁻⁵.

A FA representa um sistema de isozimas e isoformas. As diferentes isozimas são codificadas por diferentes genes e modificações pós-tradução em cada uma delas originam as várias isoformas. No Homem existem quatro isozimas da FA: a FA tecidual não específica (FATne), a FA intestinal (FAint), a FA placentária (FApl) e a FA das células germinais. A FATne encontra-se em quase todos os tecidos sendo, no entanto, mais abundante nos rins, osso e fígado. As outras três isozimas da FA, embora a especificidade relativamente ao tecido que lhes confere o nome não seja absoluta, são conhecidas como isozimas teciduais específicas e a designação de cada uma delas reflecte o local de expressão mais elevada¹⁻⁵.

A FA é uma ecto-enzima que se liga ao exterior da superfície celular por uma âncora de glicosilfosfatidilinositol^{2,4,6}. A libertação de cada uma das isozimas e isoformas da FA para a corrente sanguínea, o lúmen intestinal ou a bile está na dependência de situações fisiológicas e patológicas. O mecanismo e a velocidade com que as diversas isozimas da FA são eliminadas da circulação sanguínea também condicionam os seus níveis séricos. No soro humano encontram-se predominantemente a FATne hepática e a óssea. A FApl aumenta no soro entre o primeiro e o segundo trimestres da gravidez, observando-se um aumento mais acentuado no terceiro trimestre. A FATne sérica de origem óssea aumenta, por exemplo, na osteoporose, no raquitismo, na osteomalácia e na doença de Paget; a de origem hepática aumenta em situações de obstrução biliar. Existe uma correlação entre o desenvolvimento de alguns tumores e níveis séricos de isozimas ou isoformas da FA¹⁻⁵.

A FA existe em muitos tecidos, como já mencionado, e num amplo leque de seres vivos, desde o *Dictyostelium discoideum* até ao Homem, o que indicia uma função fundamental. Contudo, o seu papel fisiológico não está ainda totalmente esclarecido¹⁻⁵.

Foi sugerido o envolvimento (directo ou indirecto) da FA no transporte intestinal de lípidos⁷, no transporte renal de fosfato⁸, na modulação da actividade da glicoproteína-P hepática⁹⁻¹², na modulação da captação hepática de taurocolato¹³, (*resultados não publicados de MJ Martins, MR Negrão, C Hipólito-Reis, I Azevedo*) e na internalização de insulina pela barreira hemo-encefálica¹⁴. Foi demonstrada uma correlação positiva entre a actividade da FA por unidade de peso - no fígado, nos rins, no

duodeno e no jejuno - e a extensão da membrana plasmática apical por unidade de volume dos mesmos tecidos¹⁵, o que reforça a associação entre a FA e sistemas de transporte.

Por outro lado, no estudo do envelhecimento foi encontrada uma correlação negativa entre a actividade da FA e a taxa metabólica. Curiosamente, mutações com redução de função nos genes *age-1* e *daf-2*, que aumentam bastante o tempo de vida dos vermes *Caenorhabditis elegans*, são acompanhadas por uma diminuição na actividade da FA¹⁶. A actividade da FA aumenta drasticamente com a idade nos animais usados como grupo testemunho^{16,17}. Adicionalmente, numa tentativa de identificar biomarcadores sanguíneos para o envelhecimento em macacos *rhesus*, a FA surgiu como uma das cinco variáveis a ser considerada¹⁸.

Na literatura encontram-se dados imprecisos, e por vezes contraditórios, sobre os valores de FA sérica humana em função da idade. Com o objectivo de clarificar a relação entre a FA e a idade (e o sexo) no Homem, avaliámos a FA sérica numa amostra aleatória de 203 indivíduos, residentes na área do Hospital de São João, com 40 ou mais anos de idade.

MATERIAL E MÉTODOS

População e amostras de sangue

Neste estudo participaram 203 indivíduos (87 homens e 116 mulheres), aparentemente saudáveis, com 40 ou mais anos de idade. Os indivíduos foram seleccionados pela técnica de *random digit dialling* entre os residentes em habitações com telefone cujo código telefónico correspondia à área do Hospital de S. João. Os participantes estavam integrados numa amostra mais larga avaliada no âmbito de um estudo comunitário - Projecto EPICardis - desenvolvido para avaliação de factores de risco na doença coronária. A taxa de participação foi de 70%¹⁹. O estudo foi autorizado pela Comissão de Ética do Hospital de S. João e todos os participantes deram o seu consentimento informado. A colheita de sangue foi realizada após jejum nocturno. As amostras de soro foram obtidas por centrifugação e armazenadas a -80°C até serem usadas.

Reagentes

p-Nitrofenilfosfato (p-NFF) (Sigma 104D), L-fenilalanina (P-2126) e levamisole (L-9756) (adquiridos à Sigma-Aldrich Quimica S.A., Alcobendas, Espanha). Os restantes reagentes utilizados eram também de natureza analítica.

Actividade da fosfatase alcalina

A actividade sérica da FA foi quantificada a 37°C, tendo o p-NFF como substrato, conforme recomendado e frequentemente usado^{1,2,7,12-15,20-22}. As determinações

enzimáticas foram feitas, no mínimo em duplicado, em condições de proporcionalidade em relação ao tempo de incubação e ao volume das amostras.

A actividade da FA foi determinada em 500 µL do meio de reacção, contendo Tris a 80 mmol/L (pH 10,4), MgCl₂ a 0,4 mmol/L e p-NFF a 2 mmol/L^{12,13}. Foi quantificado o efeito da L-fenilalanina ou levamisole (em concentrações finais de 2 mmol/L e 0,81 mmol/L, respectivamente) na actividade da FA de todas as amostras, usando o meio de incubação já descrito. A reacção enzimática foi iniciada pela junção de 50 µL de soro e parada, após 15 minutos, pela adição de 2 mL de NaOH a 20 mmol/L. A leitura da absorbância do p-nitrofenol formado foi realizada a 400 nm (Spectronic Genesys 5, Milton Roy, Rochester, NY, Estados Unidos da América).

Uma unidade (U) de actividade da FA representa a quantidade de enzima presente no soro que hidrolisa 1 mmol de p-nitrofenilfosfato (p-NFF) por minuto a pH 10,4 e a 37°C.

A actividade da FATne foi calculada subtraindo ao valor da actividade da FATtotal o valor da actividade recuperada na presença de levamisole. Este fármaco é um inibidor específico e potente da FATne. A FAint foi obtida de um modo análogo mas recorrendo ao valor de actividade recuperada obtido na presença de L-fenilalanina, uma vez que este aminoácido inibe a FAint^{1-4,12,20,21}.

Análise estatística

Os resultados foram expressos como média aritmética ± desvio padrão. O significado estatístico das diferenças

entre as médias foi avaliado pelo método do *t* de Student não emparelhado e por análise de variância.

RESULTADOS

Na Quadro I mostra-se a variação da actividade da FA sérica humana de acordo com a idade e o sexo.

Relativamente à população total, observou-se que a FATne aumenta gradualmente com a idade. A FATtotal também aumentou com a idade ($p < 0,001$), embora se tenha observado patamar entre os 59 e os 69 anos de idade devido ao facto de a FAint estabilizar a partir dos 59 anos.

No grupo dos homens ($n=87$), a FATtotal aumentou acentuadamente da quinta para a sexta década, tendo estabelecido nas faixas etárias seguintes. A FATne aumentou sempre com a idade, embora o aumento tivesse sido mais acentuado da quinta para a sexta década. A FAint aumentou da quinta para a sexta década, diminuindo em seguida. A FATtotal e a FATne apresentaram uma variação significativa com a idade ($p=0,001$ e $p(0,001$, respectivamente).

No grupo das mulheres ($n=116$), a FATne aumentou sempre com a idade, embora o aumento tenha sido mais acentuado após os 69 anos ($p=0,01$). A FATtotal também aumentou com a idade ($p=0,009$), embora se note um patamar entre os 59 e os 69 anos de idade devido ao facto de a FAint estabilizar (diminuindo ligeiramente até) naquela faixa etária.

Para a população total, para o grupo dos homens e para o grupo das mulheres, observou-se uma correlação positiva significativa entre a FATtotal e a idade (Figura 1).

Quadro I - Fosfatase alcalina (FA) no soro humano (média aritmética ± desvio padrão). Actividade da FA total (FATtotal), da FA tecidual não específica (FATne) e da FA intestinal (FAint) de acordo com a idade e o sexo.

Idade (anos)	n	FATtotal (U/L)				FATne(U/L)				FAint (U/L)			
		♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀
40-49	62	26	36	16,50±5,05	15,80±4,18	17,00±5,60	11,60±4,08	10,90±2,99	12,10±4,63	4,50±1,99	4,50±2,06	4,50±1,96	
50-59	59	21	38	20,10±5,65	21,20±4,97	19,40±5,96	13,70±4,16	14,40±3,54	13,30±4,49	5,80±3,03	6,10±3,92		
60-69	52	20	32	20,00±7,58	21,40±7,78	19,20±7,44	14,80±5,66	15,20±4,78	14,60±6,18	5,20±2,97	5,50±3,77	5,00±2,38	
>69	30	20	10	21,90±6,18	20,90±5,84	23,90±6,68	16,40±4,54	15,50±3,70	18,10±5,80	5,60±2,34	5,20±2,29	6,30±2,37	

Uma unidade (U) de actividade da fosfatase alcalina (FA) representa a quantidade de enzima presente no soro que hidrolisa 1mmol de p-nitrofenilfosfato (p-NFF) por minuto a pH 10,4 e a 37°C. A actividade da FA foi quantificada adicionando 50 µL de soro ao meio de incubação [num volume final de 500 µL contendo Tris a 80 mmol/L (pH 10,4), MgCl₂ a 0,4 mmol/L e p-NFF a 2 mmol/L].

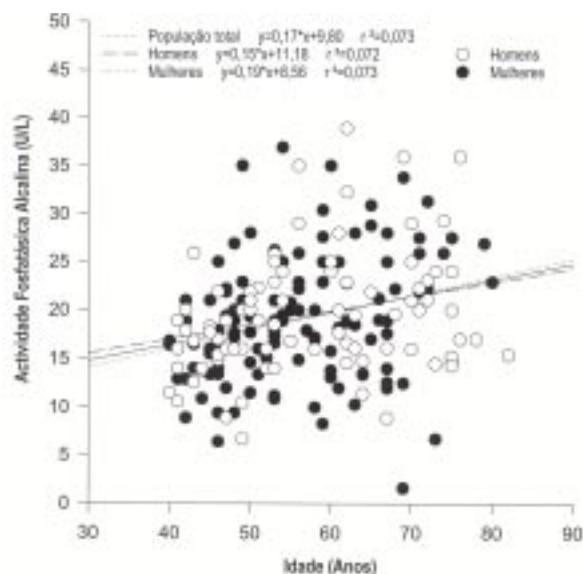


Fig. 1- Distribuição da actividade fosfatásica alcalina sérica total (U/L) com a idade (anos), na população total ($n=203$), nos homens ($n=87$) e nas mulheres ($n=116$).

Uma unidade (U) de actividade da fosfatase alcalina (FA) representa a quantidade de enzima presente no soro que hidrolisa 1mmol de p-nitrofenilfosfato (p-NFF) por minuto a pH 10,4 e a 37°C. A actividade da FA foi quantificada adicionando 50 μ L de soro ao meio de incubação [num volume final de 500 μ L contendo Tris a 80 mmol/L (pH 10,4), $MgCl_2$ a 0,4 mmol/L e p-NFF a 2 mmol/L].

DISCUSSÃO

A quantificação da FATotal e/ou das isozimas da FA presentes no soro assim como a das fracções electroforéticas da FA sérica é frequentemente usada na Bioquímica Clínica. Em trabalhos anteriores, mostrámos a importância de usar as mesmas condições de ensaio naquelas quantificações^{21,22}.

Estudando uma população de adultos com 40 ou mais anos de idade e aparentemente saudáveis, observámos uma associação positiva entre a actividade da FA sérica e a idade. A associação foi mais forte com a FATne sérica do que com a FATotal, o que pode parcialmente explicar os diferentes resultados encontrados na literatura.

Muito frequentemente, em revistas e em livros de texto, a variação dos níveis de FA humana com a idade é unicamente associada com surtos de crescimento, i.e., níveis mais elevados em crianças e adolescentes²³⁻²⁹. Uma associação positiva entre a FA e idades jovens foi também descrita para cavalos³⁰, galinhas³¹ e macacos³².

Para a população humana adulta, os resultados descritos na literatura são contraditórios. Eastman e Bixler³³ e Van Hoof *et al*²⁵ não observaram diferenças com a idade ou com o sexo na FA sérica. Stepán *et al*³⁴ não encontraram nenhuma variação da FA com a idade, com a excepção

de um pequeno aumento nas mulheres por altura da menopausa. Kuwana *et al*³⁵, numa população de 488 indivíduos saudáveis, descreveram um aumento e uma diminuição na actividade da FA óssea em mulheres e homens idosos, respectivamente. No mesmo estudo, foi observada uma maior actividade de FA hepática nos homens em comparação com as mulheres, aumentando a mesma gradualmente com a idade em ambos os sexos. A ocorrência de um aumento na FA sérica exclusivamente em mulheres está descrita em revistas³⁶⁻³⁹ e em livros⁴⁰⁻⁴². Alguns livros de Bioquímica não fazem qualquer referência à variação dos valores da FA sérica na idade adulta^{26-29,43}. Mayne⁴⁴ refere um ligeiro aumento da isozima óssea sérica na velhice. Marshall⁴⁵ descreve um aumento da FA sérica com a idade, mas relaciona-o com doenças frequentes na velhice.

Existe um trabalho com valores de FATotal sérica obtidos em mais de 10000 indivíduos, na Austrália, em 1986⁴⁶. Em 1993 foi publicado um estudo norte-americano sobre este assunto com valores de FATotal sérica de 6000 indivíduos⁴⁷. Em ambas as publicações se observa uma relação entre a FA sérica e a idade semelhante à obtida pelo nosso grupo: a FA aumenta progressivamente com a idade em ambos os sexos, sendo o aumento mais acentuado nas mulheres após a menopausa. O mesmo tipo de resultados encontra-se descrito num artigo de revisão⁴⁸. O objectivo destes estudos era o de estabelecer intervalos de referência para os valores analíticos laboratoriais da FA ou investigar possíveis relações com doenças. Que tenhamos conhecimento, somente Tietz *et al*⁴⁹, num estudo longitudinal durante dois anos em 167 indivíduos saudáveis, conclui que um aumento da FA com a idade (observado somente em mulheres) era consequência do processo normal de envelhecimento.

O uso da actividade da FA como biomarcador da idade em estudos experimentais de envelhecimento, juntamente com os resultados aqui apresentados, sugere uma nova abordagem para este parâmetro analítico no Homem. Algumas complicações patológicas da idade, como por exemplo endurecimento dos tecidos e calcificação, poderão estar relacionadas com a actividade da FA⁵⁰⁻⁵². Por outro lado, a actividade da FA pode ser manipulada farmacologicamente^{12,14,53}, o que poderá contribuir para o tratamento de algumas daquelas complicações.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a ajuda prestada por M. Graça Barros na colheita das amostras de sangue.

BIBLIOGRAFIA

1. MCCOMB RB, BOWERS GN Jr, POSEN S: Alkaline Phosphatase. New York: Plenum Press, 1976
2. VAN HOOF VO, DE BROE ME: Interpretation and clinical significance of alkaline phosphatase isoenzyme patterns. *Crit Rev Clin Lab Sci* 1994; 31: 197-293
3. WHYTE MP: Hypophosphatasia and the role of alkaline phosphatase in skeletal mineralization. *Endocr Rev* 1994; 15: 439-61
4. MILLÁN JL, FISHMAN WH: Biology of human alkaline phosphatases with special reference to cancer. *Crit Rev Clin Lab Sci* 1995; 32: 1-39
5. MILLÁN JL: Oncodevelopmental alkaline phosphatases: in search of a function. *Prog Clin Biol Res* 1990; 344: 453-475
6. LOW MG, ZILVERSMIT DB: Role of phosphatidylinositol in attachment of alkaline phosphatase to membranes. *Biochemistry* 1980; 19: 3913-3918
7. YOUNG GP, FRIEDMAN S, YEDLIN S, ALPERS DH: Effect of fat feeding on intestinal alkaline phosphatase activity in tissue and serum. *Am J Physiol* 1981; 241: G461- G468
8. PETITCLERC C, PLANTE GE: Renal transport of phosphate: role of alkaline phosphatase. *Can J Physiol Pharmacol* 1981; 59: 311-323
9. MARTEL F, MARTINS MJ, HIPÓLITO-REIS C, AZEVEDO I: Inward transport of [³H]-1-methyl-4-phenylpyridinium in rat isolated hepatocytes: putative involvement of a P-glycoprotein transporter. *Br J Pharmacol* 1996; 119: 1519-1524
10. MARTEL F, CALHAU C, MARTINS MJ, AZEVEDO I: Uptake of [³H]-adrenaline by freshly isolated rat hepatocytes: putative involvement of P-glycoprotein. *J Auton Pharmacol* 1998; 18: 57-64
11. MARTEL F, MARTINS MJ, CALHAU C, HIPÓLITO-REIS C, AZEVEDO I: Postnatal development of organic cation transport in the rat liver. *Pharmacol Res* 1998; 37: 131-136
12. MARTINS MJ, NEGRÃO MR, HIPÓLITO-REIS C: Alkaline phosphatase from rat liver and kidney is differentially modulated. *Clin Biochem* 2001; 34: 463-468
13. MARTINS M J, NEGRÃO M R, HIPÓLITO-REIS C, AZEVEDO I: Physiologic concentrations of bile salts inhibit rat hepatic alkaline phosphatase but not the intestinal isoenzyme. *Clin Biochem* 2000; 33: 611-617
14. CALHAU C, MARTEL F, PINHEIRO-SILVA S, PINHEIRO H, SOARES-DA-SILVA P, HIPÓLITO-REIS C, AZEVEDO I: Modulation of insulin transport in rat brain microvessel endothelial cells by an ecto-phosphatase activity. *J Cell Biochem* 2002; 84: 389-400
15. CALHAU C, HIPÓLITO-REIS C, AZEVEDO I: Alkaline phosphatase and exchange surfaces. *Clin Biochem* 1999; 32: 153-154
16. VANFLETEREN JR, DE VREESE A: The gerontogenes *age-1* and *daf-2* determine metabolic rate potential in aging *Caenorhabditis elegans*. *FASEB J* 1995; 9: 1355-1361
17. VANFLETEREN JR, BRAECKMAN BP, ROELENIS I, DE VREESE A: Age-specific modulation of light production potential, and alkaline phosphatase and protein tyrosine kinase activities in various age mutants of *Caenorhabditis elegans*. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 1998; 53: B380- B390
18. NAKAMURA E, LANE MA, ROTH GS, INGRAM DK: A strategy for identifying biomarkers of aging: further evaluation of hematology and blood chemistry data from a calorie restriction study in rhesus monkeys. *Exp Gerontol* 1998; 33: 421-443
19. BARROS H, LOPES C, VON HAFPE P *et al*: Risco de enfarte do miocárdio: um estudo comunitário. *Arq Med* 1997; 11: 285-294
20. VAN BELLE H: Alkaline Phosphatase I. Kinetics and Inhibition by levamisole of purified isoenzymes from human. *Clin Chem* 1976; 22: 972-976
21. MARTINS MJ, DIAS PO, HIPÓLITO-REIS C: Rat serum alkaline phosphatase electrophoretic fractions: variations with feeding, starvation and cellulose fibre ingestion. *Clin Nutr* 1998; 17: 279-285
22. HIPÓLITO-REIS C, DIAS PO, MARTINS MJ: Importance of assay conditions in visualization and quantitation of serum alkaline phosphatase isoenzymes separated by electrophoresis. *Scand J Clin Lab Invest* 1999; 59: 593-606
23. FLEISHER GA, EICKELBERG ES, ELVEBACK LR: Alkaline phosphatase activity in the plasma of children and adolescents. *Clin Chem* 1977; 23: 469-472
24. MOLLA A, KHURSHID M, LALANI R, MANSER WW, ALAM A: Serum alkaline phosphatase in apparently healthy Karachi population. *JPMA J Pak Med Assoc* 1990; 40: 182-184
25. VAN HOOF VO, HOYLAERTS MF, VAN MULLEM M, LEPOUTRE LG, DE BROE ME: Age and sex distribution of alkaline phosphatase isoenzymes by agarose electrophoresis. *Clin Chem* 1990; 36: 875-878
26. WALMSLEY RN, WHITE GH: A Guide to Diagnostic Clinical Chemistry. 3rd Ed. Blackwell Science, 1994
27. MARSHALL WJ: The acquisition of biochemical data. In: Marshall WJ, Bangert SK, Ed. *Clinical Biochemistry. Metabolic and Clinical Aspects*. Pp 7-14. New York: Churchill Livingstone, 1995
28. KAPLAN A, JACK R, OPHEIM KE, TOIVOLA B, LYON AW: *Clinical Chemistry*. 4th Ed. William and Wilkins, 1995
29. BURTIS CA, ASHWOOD ER: *Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry*. 4th Ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 1996
30. HANK AM, HOFFMANN WE, SANECKI RK, SCHAEFFER DJ, DORNER JL: Quantitative determination of equine alkaline phosphatase isoenzymes in foal and adult serum. *J Vet Intern Med* 1993; 7: 20-24
31. al-BUSTANY Z, al-ATHARI AK, ABDUL-HASSAN IA: Plasma alkaline phosphatase and production traits in laying hens as influenced by dietary protein, strain and age. *Br Poult Sci* 1998; 39: 568-571
32. LEES CJ, RAMSAY H: Histomorphometry and bone biomarkers in cynomolgus females: a study in young, mature, and old monkeys. *Bone* 1999; 24: 25-28
33. EASTMAN JR, BIXLER D: Serum alkaline phosphatase: normal values by sex and age. *Clin Chem* 1977; 23: 1769-1770
34. STEPÁN JJ, TESAROVÁ A, HAVRÁNEK T, JODL J, FORMANKOVÁ J, PACOVSKÝ V: Age and sex dependency of the biochemical indices of bone remodelling. *Clin Chim Acta* 1985; 151: 273-283
35. KUWANA T, SUGITA O, YAKATA M: Reference limits of bone and liver alkaline phosphatase isoenzymes in the serum of healthy subjects according to age and sex as determined by wheat germ lectin affinity electrophoresis. *Clin Chim Acta* 1988; 173: 273-280
36. BOHNEN N, DEGENAAR CP, JOLLES J: Influence of age and sex on 19 blood variables in healthy subjects. *Z Gerontol* 1991;

- 24: 339-345
37. TIETZ NW, SHUEY DF, WEKSTEIN DR: Laboratory values in fit aging individuals – sexagenarians through centenarians. *Clin Chem* 1992; 38: 1167-1185
38. MARTIN H, SAUER I, MALZ K, RIEGEL H, SCHILOW W, THALHEIM T: Clinical laboratory diagnosis and aging. 1: results of data evaluation of clinico-chemical laboratory values in a study of aging. *Z Gerontol Geriatr* 1999; 32: 89-96
39. MARTIN H, SAUER I, MALZ K, RIEGEL H, SCHILOW W, WEISBRICH C: Clinical laboratory diagnosis and aging. 2: suitability of clinico-chemical basic parameters as markers of biological aging. *Z Gerontol Geriatr* 1999; 32: 97-103
40. JEPPESEN ME: Laboratory values for the elderly. In: Carnaval DL, Patrick M, Ed. *Nursing management for the elderly*. 2nd Ed. Philadelphia: Lippincott, 1986; Pp. 102-112
41. ALDRICH JE: Geriatric changes in laboratory results. In: Davies B, Bishop M, Mass D, Ed. *Clinical Laboratory Science: Strategies for Practice*. Philadelphia: Lippincott, 1989
42. DUBEN-ENGELKIRK JL: Geriatric clinical chemistry. In: Bishop ML, Duben-Engelkirk JL, Fody EP, Ed. *Clinical Chemistry*. Lippincott-Raven Publishers, 1996; Pp. 685-692
43. NASER NA, NASER SA: *Clinical Chemistry Laboratory Manual*. St. Louis: Mosby, 1998
44. MAYNE PD: *Clinical chemistry in diagnosis and treatment*. 6th Ed. London: Arnold, 1994
45. MARSHALL WJ: *Clinical Chemistry*. 3rd Ed. Mosby, 1997
46. SINTON TJ, COWLEY DM, BRYANT SJ: Reference intervals for calcium, phosphate, and alkaline phosphatase as derived on the basis of multichannel-analyzer profiles. *Clin Chem* 1986; 32: 76-79
47. GORDON T: Factors associated with serum alkaline phosphatase level. *Arch Pathol Lab Med* 1993; 117: 187-190
48. DYBKAER R, LAURITZEN M, KRAKAUER R: Relative reference values for clinical and haematological quantities in “healthy” elderly people. *Acta Med Scand* 1981; 209: 1-9
49. TIETZ NW, WEKSTEIN DR, SHUEY DF, BRAUERS GA: A two-year longitudinal reference range study for selected serum enzymes in a population more than 60 years of age. *J Am Geriatr Soc* 1984; 32: 563-570
50. HUI M, LI SQ, HOLMYARD D, CHENG P: Stable transfection of nonosteogenic cell lines with tissue non-specific alkaline phosphatase enhances mineral deposition both in the presence and absence of beta-glycerophosphate: possible role for alkaline phosphatase in pathological mineralization. *Calcif Tissue Int* 1997; 60: 467-472
51. HUI M, TENENBAUM HC: New face of an old enzyme: alkaline phosphatase may contribute to human tissue aging by inducing tissue hardening and calcification. *Anat Rec* 1998; 253: 91-94
52. WADA T, MCKEE MD, STEITZ S, GIACHELLI CM: Calcification of vascular smooth muscle cell cultures: inhibition by osteopontin. *Circ Res* 1999; 84: 166-178
53. CALHAU C, MARTEL F, HIPÓLITO-REIS C, AZEVEDO I: Effect of P-glycoprotein modulators on alkaline phosphatase activity in cultured rat hepatocytes. *Cell Physiol Biochem* 2000; 10: 195-202