

Esta página está disponible en los siguientes idiomas:



# Abstract Licencia Creative Commons

**Atribución-NoComercial-CompartirIgual 4.0  
Internacional (CC BY-NC-SA 4.0)**

Este es un resumen legible por humanos de (y no un sustituto) de la licencia .

## Usted es libre de:

**Compartir** — copiar y redistribuir el material en cualquier medio o formato

**Adaptar** — remezclar, transformar y construir a partir del material

La licenciante no puede revocar estas libertades en tanto usted siga los términos de la licencia

## Bajo los siguientes términos:



**Atribución** — Usted debe dar crédito de manera adecuada , brindar un enlace a la licencia, e indicar si se han realizado cambios . Puede hacerlo en cualquier forma razonable, pero no de forma tal que sugiera que usted o su uso tienen el apoyo de la licenciante.



**NoComercial** — Usted no puede hacer uso del material con propósitos comerciales .



**CompartirIgual** — Si remezcla, transforma o crea a partir del material, debe distribuir su contribución bajo la misma licencia del original.

**No hay restricciones adicionales** — No puede aplicar términos legales ni medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otras a hacer cualquier uso permitido por la licencia.

## Avisos:

No tiene que cumplir con la licencia para elementos del material en el dominio público o cuando su uso esté permitido por una excepción o limitación aplicable .

No se dan garantías. La licencia podría no darle todos los permisos que necesita para el uso que tenga previsto. Por ejemplo, otros derechos como publicidad, privacidad o derechos morales pueden limitar la forma en que utilizan el material.

22

UNIVERSIDAD NACIONAL DE CORDOBA  
FACULTAD DE CIENCIAS MEDICAS  
Cátedra de Química Biológica



LA FOSFOMONOESTERASA ALCALINA DE LA GLANDULA MAMARIA

Sus propiedades físicas, químicas y enzimáticas y sus  
relaciones con la fosfomonoesterasa de la sangre

TESIS DE DOCTORADO EN MEDICINA

por

Ranwel Caputto

CORDOBA

1943

22-18

UNIVERSIDAD NACIONAL DE CORDOBA  
FACULTAD DE CIENCIAS MEDICAS

Cátedra de Química Biológica.

*Al prof. Dr. Bernardo A. Houssay con admiración y  
respeto, por su obra de investigación y por su in-  
fatigable labor para elevar el nivel científico argen-  
tino que nos ha beneficiado a todos los que  
desde este país aspiramos a colaborar a la pro-  
moción de las ciencias.*  
Abril 14 de 1944.  
*R. Caputto*

LA FOSFOMONOESTERASA ALCALINA DE LA GLANDULA MAMARIA

Sus propiedades físicas, químicas y enzimáticas y sus  
relaciones con la fosfomonoesterasa de la sangre

TESIS DE DOCTORADO EN MEDICINA

por

Ranwel Caputto



C O R D O B A

1943



Padrino de Tesis

Prof. Dr. Alberto Marsal



W. 1051015

S. 1051015

A LA MEMORIA DE MI PADRE  
Y A MI MADRE.

Homenaje agradecido a los  
dos nobles luchadores que  
supieron prosperar por el  
camino de los propósitos  
elevados



A mis maestros, los Drs.  
GUILLERMO V. STUCKERT y  
ALBERTO MARSAL.-



## P R O L O G O

El intenso interés que despiertan los problemas relacionados con las fosfomonoesterasas animales se manifiestan en el elevado número de comunicaciones que sobre este tema se han dado a conocer en todos los países evolucionados del mundo. Este interés ha sido encauzado principalmente por las promisoras sugerencias que encierran las elevadas actividades fosfatásicas en hueso, riñón e intestino delgado y por la comprobación, en el campo de la patología, de que la fosfatasa sanguínea sufre modificaciones en las enfermedades óseas generalizadas, en las afecciones hepáticas y en las prostáticas. Los estudios acerca de la estructura molecular y de las propiedades físicas y químicas de esta enzima son menos numerosos y los resultados al presente logrados dejan sin respuesta muchas cuestiones fundamentales relativas a su constitución.-

Respondiendo a sugerencias del prof. Dr. Alberto Marsal, hemos emprendido el estudio de la fosfatasa extraída de la glándula mamaria, dirigiendo nuestros esfuerzos en dos sentidos: por una parte, luego de conseguido un preparado de la enzima en alto estado de purificación, se han estudiado sus propiedades físicas, químicas y las específicamente enzimáticas. En otro sentido, hemos procurado establecer si la glándula mamaria interviene en alguna forma en las modificaciones que sufre la fosfatasa sanguínea durante los períodos de preñez y de lactación.-

Hemos referido en forma preferentemente detallada los datos ya conocidos que tienden a aclarar la estructura química de la molécula porque ignoramos que se haya publicado en ninguna parte un resumen más o menos integral sobre este tema. La lista bibliográfica final abarca una parte importante de los trabajos de la literatura occidental que a aquel tema se refieren; su deficiencia sería, y cuyo subsanamiento ha estado completamente fuera de nuestros alcances, reside en que en ella se ignoran casi por completo los trabajos originados en el Japón y en Rusia, países ambos (principalmente el primero) que han aportado una elevada contribución en los problemas conexos con las fosfatasas.-

Parecenos, y deseamos decirlo porque su mérito escapa totalmente a nuestros merecimientos personales, que se ha logrado reunir en esta obra elementos de trabajo relativamente evolucionados. La obra de mis maestros, los profesores Drs. Guillermo V. Stuckert y Alberto Marsal, ha hecho que esto fuera posible; la obra de ambos a lo largo de años, ha formado un laboratorio y una biblioteca de química en los cuales generalmente se encuentran los materiales y la información que el trabajador necesita. Les debo la posibilidad de poder proseguir estas tareas y, especialmente al Dr. Marsal, innumerables consejos y sugerencias en el trabajo de todos los días. Cumplo aquí con el grato deber de expresarles mi profundo agradecimiento.-

El estudio del espectro de absorción ultravioleta de los preparados de fosfatasa fué realizado en el Instituto de Física de la Universidad de La Plata; debo agradecer a su director, el prof. Dr. Ramón G. Loyarte, quien me facilitó todos los medios necesarios y que posteriormente tuvo la amabilidad de leer los originales sobre dicho estudio e indicarme algunas modificaciones.-

Finalmente, deseo recordar a mis compañeros del Laboratorio de Química Biológica con quienes hemos trabajado en un ambiente de franca cordialidad y de los cuales he recibido tantas estimulantes manifestaciones de afecto y, especialmente, a la Dra. Alis Mansur que se encargó de operar y vigilar durante dos años a los animales que se utilizaron en el trabajo que se relata en el capítulo VI de esta obra.

Modestos cuanto se quieran nuestros resultados, son los frutos de un afán resuelto que al cabo de tres años de labor solo desea volver al trabajo; de ellos esperamos que puedan justificar que se nos siga facilitando por parte de nuestros maestros, los consejos y los medios de trabajo en la forma generosa que hasta hoy lo han hecho.-

# I N T R O D U C C I O N



## LOS SUBSTRATOS FISIOLÓGICOS DE LAS FOSFATASAS

La historia del elemento fósforo comienza casi simultáneamente con la historia de sus relaciones con los fenómenos biológicos; se puede decir, en efecto, que si bien es posible que existan algunas referencias anteriores sobre este elemento, la intensa curiosidad que él despierta nace cuando en el año 1669 el iatroquímico hamburgués Dr. Hennig Brand, lo descubre entre los residuos de la evaporación de orina.-

No se intentará dar aquí referencias sobre los diversos aspectos que abarca la importancia de su estudio biológico; solo nos proponemos relatar, en un orden aproximadamente cronológico, la adquisición de una serie de compuestos estrechamente ligados al tema de nuestro trabajo. La enumeración que sigue es, en este sentido, la de la serie de compuestos que han de tomarse en consideración cuando se plantea en concreto - sobre la base de lo ya conocido - el asunto de los substratos fisiológicos de las fosfatasas.-

La lecitina es uno de los compuestos más tempranamente conocido; en el año 1846 ya había sido aislado por Goble y poco tiempo después Diakonow, que trabajaba en los laboratorios dirigidos por Hoppe Seyler, dió a conocer su estructura.-

Los conocimientos sobre nucleo-proteídos comienzan en el año 1876; por aquella época Hoppe Seyler propuso a su discípulo Miescher el estudio de los compuestos ligados al fósforo que quedan en los tejidos después que estos han sufrido la extracción alcohólica (por medio de la cual se separan los fosfolípidos) y la extracción acuosa en medio ácido (mediante la cual se separan los fosfatos inorgánicos). Puesto en tarea Miescher aísla de material purulento un producto al que denomina "nucleína" y que constituyen el punto de partida de los nucleo-proteídos, el estudio de los cuales se prosigue hoy con renovado interés.-

Un nuevo impulso a estos conocimientos vino conexas con el gran interés que a fines del siglo pasado suscitaba el estudio químico del tejido nervioso; fué estudiado por varias escuelas entre las que se destacó una comisión

especialmente designada por el gobierno inglés y dirigida por el químico alemán Thudicum. Ese intenso movimiento dió como fruto principal un progreso considerable en el conocimiento de los lípidos cerebrales y entre ellos los fosforados; quedaron bien asentados los conocimientos sobre lecitina y se aislaron la cefalina y la esfingomiélin. La frase de Liebig "ohne Phosphor keine Gedanke" (sin fósforo no hay ideas) hizo gran fortuna por aquel entonces y da una idea de la importancia que se les asignó a los compuestos fosforados en la fisiología nerviosa.-

Sin embargo, el mérito de las adquisiciones más numerosas y probablemente más importantes debe reservarse a nuestro siglo; en él, estudios emprendidos por diferentes escuelas en temas que en un principio pudieron parecer inconexos, coincidieron en mostrar la importancia fundamental de los compuestos de este elemento en los procesos metabólicos en general. La fermentación de los azúcares por los micro-organismos, el catabolismo de los glúcidos por los animales superiores, la química de la contracción muscular y los fenómenos de óxido-reducción, problemas que en su conjunto han abarcado una de las partes más importantes en la investigación bioquímica en los últimos treinta años, se han encontrado trabajando con ésteres en los que el ácido fosfórico se une a una gran variedad de compuestos orgánicos.-

Una comunicación precursora y de notable trascendencia fué la que hicieron en el año 1905 Harden y Young cuando comunicaron que el agregado de fosfatos acelera la fermentación de los azúcares por la levadura. Ella fué seguida poco tiempo después por la hipótesis del químico botánico ruso Iwanoff quien supuso que los fosfatos eran esterificados por la levadura como primera etapa del proceso de fermentación.-

El aislamiento del primer éster hexoso-fosfórico se consiguió en el Lister Institute que dirigía el prof. Harden. Fué el éster hexoso-di-fosfórico, obtenido por Young en 1907 al estado de sal bárica. A él siguió en 1914 el aislamiento por Harden y Robison de un éster hexoso-mono-fosfórico, cuya composición exacta fué revelada posteriormente por Robison, quien distinguió su vida por haber aislado e identificado numerosos compuestos de esta naturaleza.(1).-

---

(1).- En el transcurso del año 1941 ha debido lamentarse la desaparición del prof. Robert Robison; la nota obituarial publicada por el Biochemical Journal y firmada por W.T.J.M. (seguramente W.T.J.Morgan) constituye un provechoso resumen sobre un tema muy relacionado con el presente trabajo.-

El ester fructosa-6-fosfórico fué obtenido en 1918 por C. Neuberg hidrolizando parcialmente en medio ácido al hexoso-di-fosfórico; del mismo origen fué obtenido en 1933 por Macleod y Robison pero por hidrólisis mediante la fosfatasa ósea.-

Los ésteres aislados por Robison además de los citados, incluyen al trehalosa-mono-fosfórico obtenido en colaboración con Morgan en 1918; al manosa-6-fosfórico en 1932; al fructosa-1-fosfórico en colaboración con Tankó en 1935, y a un probable derivado de la mano-ceto-heptosa aislado conjuntamente con Macfarlane y Tazelaar en 1938.-

Al éster glucosa-1-mono-fosfórico aislado por Cori y Cori en 1936 se le atribuye importancia especial pues es tenido como el primero que se forma en el proceso del catabolismo glucídico muscular.-

Por lo que a los ésteres triosa-fosfórico se refiere, puede decirse que su intervención en el quimismo muscular constituyó una hipótesis más o menos bien fundada hasta el año 1934 en el que recibió confirmación por Meyerhoff y Lohmann; en aquel año estos autores pudieron aislar la fosfo-dioxi-acetona entre los productos formados por la acción del extracto dializado de músculo de conejo sobre el hexoso-difosfato de sodio. Poco después los mismos autores aislaron el fosfo-pirúvico originado por transformación del ácido fosfo-glicérico, el cual, a su vez, había sido obtenido por medios biológicos haciendo actuar la levadura sobre una solución de glucosa (Neuberg y Kobel, 1933).-

También fueron aislados otros tipos de compuestos a los cuales se asignaron funciones en los fenómenos de la contracción muscular; C.H.Fiske y Y.Subbarow en 1927 aislaron a partir de filtrado de músculo la fosfo-creatina y al año siguiente Meyerhoff y Lohmann obtuvieron la fosfo-arginina a la cual se asignó funciones parecidas a la anterior pero en animales inferiores.-

Compuestos fosforados resultaron ser también un conjunto muy importante de sustancias que poseen acciones co-enzimáticas. La adenosina-tri-fosfórica fué obtenida separadamente por Fiske y Subbarow y Lohmann siendo este último (1929) quien determinó su composición exacta. Probablemente este cuerpo sea un producto intermedio o de destrucción parcial de las llamadas co-enzimas, aisladas pocos años más tarde.-

La co-enzima de la fermentación, co-enzima I, descrita por Harden y Young en el año 1909 fué purificada por la escuela de Estocolmo dirigida por el prof. v.Euler, la cual determinó también su constitución (H.v.Euler, H.Albers

y F. Schlenk, 1936; H.v.Euler y F. Schlenk, 1937); es un difosfo-piridin-nucleótido constituido por adenina, dos grupos fosfóricos y nicotin-amida.-

La co-enzima transportadora de hidrógeno de los glóbulos rojos, co-enzima II, fué descrita por Warburg en 1931 y purificada años más tarde de eritrocitos de caballos por Warburg y Christian (1934). Es de constitución muy parecida a la anterior de la cual solo se diferencia por poseer un grupo fosfórico más.-

El fermento amarillo fué aislado por Warburg y Christian (1932) de la levadura de cerveza y su constitución fué establecida por el trabajo conjunto de diferentes escuelas. Está constituida por una proteína conjugada cuyo nucleo prostético es un aloxasin-mono-nucleótido (1 molécula de lacto-flavina y 1 molécula de ácido fosfórico), De parecida constitución es el núcleo prostético de la d-aminoácido-oxidasa formado por una aloxasin-adenin-dinucleótido (Warburg y Christian, 1938). Este dinucleótido es tambien el núcleo prostético de otro fermento amarillo aislado por E.Haas (1938) y de la xantino-oxidasa purificada por E.C.Ball (1938) en los laboratorios que dirige el prof.Warburg.-

Finalmente la co-carboxilasa (co-enzima de la carboxilasa descrita por Neuberger y Hildesheimer) que fué purificada por Lohmann y Schuster en 1937 y estudiada luego por Lohmann (1938) reveló que se trataba de un tiamin-pirofosfato.-

#### EVOLUCION DE LOS CONOCIMIENTOS SOBRE FOSFATASA

Contemporaneamente con el desarrollo de los conocimientos sobre los mencionados cuerpos fosforados se ha ido profundizando en el conocimiento de las enzimas que seguramente intervienen catalizando el metabolismo de los mismos.-

Las primeras referencias acerca de la presencia de actividad fosfatasa en tejidos vegetales se remontan a los años 1906 y 1907; en el primero Zalesky, en Alemania, refirió que las plantas en crecimiento son capaces de "poner en libertad ácido fosfórico de los compuestos fosforados solubles" (1). Al año siguiente los autores japoneses U.Suzuki, K.Yoshimura y N.Takaishi en un trabajo que ha tenido más trascendencia, refirieron que los extractos obtenidos de la corteza del grano del trigo y del arroz poseían la propiedad de sepa-

---

(1).-Citado por Demuth, 1925.-

rar el grupo fosfórico de la sal cálcica y magnésica del inositol, cuerpo corrientemente conocido con el nombre de fitina.-

Muy poco tiempo después, en 1908, fué referida la presencia de este tipo de actividad también en tejidos animales: E. V. McCollum y E.B. Hart la encontraron en el hígado y la sangre del ternero, y luego en una serie ininterrumpida de comunicaciones formuladas por numerosos autores y en diversos países fué dándose a conocer su presencia en prácticamente todos los elementos vivos.-

Muy extensa resultaría la enumeración detallada de los distintos materiales biológicos en los cuales se han encontrado fosfatasa. El lector interesado puede encontrar referencias que abarcan el tema en forma completa en los trabajos de McFarlane y Salaman ( 1938 ) y Hoagland Ward, Smadel y Rivers (1942) para los ultravirus; en Pett, Heard y Wynne ( 1933 y 1938 ) para las bacterias; en Bamman y Salzer ( 1936 ) para el "Aspergillus orizae", origen de la taka-diastasa; y en Tapadhinas ( 1934 ) e Ignatieff y Wastineg ( 1936 ) para distintas especies y partes constituyentes de las plantas.-

Por lo que a órganos animales se refiere, los estudios han alcanzado a prácticamente todos ellos, ( vease el trabajo de resumen de Folley y Kay, 1932 ) y puede decirse que sin excepción ha sido encontrada en todos. En el hombre han sido inicialmente estudiados por Forrai ( 1924 ) quien comprobó la capacidad hidrolítica para los ésteres fosfóricos del glicerol, fructosa y sacarosa de órganos tanto normales como patológicos ( testículos, suprarrenales, corazón, tiroides, músculo, intestino, coágulo sanguíneo, hígado canceroso, riñón amiloide, fibromioma uterino y en una metástasis de bazo ).-

Las primeras referencias que hemos encontrado en fluídos humanos pertenecen a Demuth ( 1925 ) quien estudió la presencia de hexoso-difosfatasa especialmente en lactantes normales y enfermos ( raquíticos y meningíticos ) ; encontró que el hexoso-di-fosfato de sodio era escindido por la bilis, la saliva, la orina, el líquido cerebro espinal y por la leche, tanto de mujer como de vaca. Entre los fluídos estudiados por Demuth la fosfatasa se encontraba ausente en el jugo estomacal.

También es bastante completa la información que se posee acerca de los substratos que sufren la acción fosfatásica de los tejidos; el ácido ortofosfórico esterificado con alcoholés de alto y bajo peso molecular, hidroalcoholés, compuestos alifáticos y cíclicos, ha sido escindido, no citándose más excepción entre los compuestos ensayados que la de los ésteres mentil y dimentilfosfóricos ( Jacobson y Tapadhinas, 1931 ).-

De los substratos fisiológicos que hemos enumerado anteriormente debemos recordar que han sido directamente verificados los siguientes ésteres hexoso-fosfóricos: el hexosa-di-fosfórico, el glucosa-6-fosfórico y el fructosa-6-fosfórico por Robison en 1923; el trehalosa-mono-fosfórico por Robison y Morgan en 1928 y el glucosa-1-monofosfórico por Cori, Colowick y Cori en 1937.-

Así mismo, de los ésteres triosa-fosfóricos aislados de materiales biológicos han sido verificados los siguientes: el fosfo-glicérico ( Voght, 1929 ); el fosfo-gliceroaldehído ( Smythe y Gerischer, 1933 ); el fosfo-pirúvico ( Meyerhoff y Lohmann, 1934 ) y los ésteres dioxi-aceton-fosfórico, fosfo-láctico y difosfo-glicérico ( Neuberg y Rotini, 1935 ).-

Por lo que a otros tipos de compuestos se refiere, se deben mencionar los nucleótidos cuya hidrólisis por los tejidos fué descubierta por Levene y Medigreceanu ( 1911 ) y mejor estudiada por Levene y Dillon en 1930. La capacidad de los extractos renales para escindir la lecitina fué establecida por Kay en 1926 y la de escindir la fosfo-creatina, por Waldschmidt-Leitz y Köhler en 1933; el ácido adenil-pirofosfórico fué usado como substrato por Barreschen y Lang ( 1932 ) y finalmente la cozimasa por Myrbäck y Örtenblad en 1936.-

Las adquisiciones sobre las diversas propiedades enzimáticas así como también las nociones que se poseen sobre su constitución constituyen los temas del presente trabajo y se darán en detalles en los capítulos siguientes. Un resumen detallado sobre los métodos de determinación cuantitativa se dará en la parte final, en forma de Apéndice.-

## Capítulo I

### CLASIFICACION DE LAS FOSFATASAS

#### La fosfomonoesterasa de la glándula mamaria

En el comienzo del conocimiento de este efecto fosfatásico tan extendido en todos los materiales biológicos se plantea el problema de averiguar si la enzima es única y la misma en todas partes o si por el contrario existen distintas enzimas que pueden cumplir el mismo efecto mencionado.-

Si bien debe admitirse que toda información experimental acerca de fosfatasas obtenidas en fuentes distintas puede servir para asemejar o diferenciar una de otra, en el hecho los autores han debido manejarse con pocos datos para establecer las diferenciaciones y ellas no siempre han sido completamente concordantes.-

Las bases de las clasificaciones son las siguientes:

1º.- La acción sobre distintos substratos; fosfatasas de distintos orígenes o aún de un mismo órgano podrán o no escindir un mismo éster, estableciendo en caso negativo una diferencia indiscutible entre ambas. Cuando dos de ellas son capaces de actuar sobre un mismo grupo de ésteres suele ofrecer datos de interés averiguar la velocidad relativa con que escinden a cada uno de ellos.-

2º.- El pH de acción óptima.-

3º.- La susceptibilidad de la enzima frente a diversos activadores e inhibidores.-

#### LA CLASIFICACION GENERAL DE FOLLEY Y KAY

En 1936 Folley y Kay publicaron una clasificación en la cual incluyeron toda la información recogida hasta ese momento. Según ellos, atendiendo a las características químicas de los substratos sobre los que actúan, todas las fosfatasas se pueden dividir en 5 clases, a las cuales han denominado en forma tal que en los nombres de cada una de ellas va explícito cuales son esos substratos.- Las clases son: A) Fosfomonoesterasas, B) Fosfodiesterasas, C) Pirofosfatasas, D) Metafosfatasa, E) Fosfoamidasas.- Estas clases a su vez, se pueden dividir en sub-clases.-

## A) FOSFOMONOESTERASAS

Salvo la rara excepción de algún substrato no fisiológico, esta clase es capaz de hidrolizar todo cuerpo en que el ácido fosfórico tenga esterificada una sola de sus funciones ácidas.- La excepción alegada por Wagner-Jaureg para el ácido fosfo-1-(+)-láctico no ha sido confirmada (Rotini y Neuberg, 1935).

Esta clase se divide en 4 tipos; además incluyen los autores dos tipos más a los que llaman de "fosfatasas inclasificadas" y que se diferencian de las otras por actuar sobre substratos en los que existen más de un grupo fosfórico en la molécula; son estas las Fitatas y las Hexoso-difosfatasas.-

I.- Tipo alcalino (pH óptimo 9 - 10); presente en la generalidad de los órganos animales siendo especialmente abundante en hueso, riñon, mucosa intestinal y glándula mamaria.- En condiciones normales es el tipo que da valores más elevados en el plasma sanguíneo.-

Probablemente, en base a las experiencias de Kay (1928), debe incluirse en este tipo la nucleotidasa descrita en distintos órganos.-

II.- Tipo de pH óptimo alrededor de 5, encontrada junto al tipo anterior en hígado, bazo, riñon, cerebro, etc.- Probablemente pertenece también a este tipo la fosfatasa de próstata estudiada por W. Kutscher y A. Wörner, cuyo pH óptimo oscila entre 3,7 y 6,0.- Este órgano es extraordinariamente rico en fosfatasa y hay razones para suponer que la fosfatasa de la orina del sexo masculino se origina en él (Scott y Huggins, 1942).-

III.- Tipo ácido (pH óptimo 3 - 4) obtenida de la taka-diastasa por Akamatzu.- El óptimo de actividad de esta enzima es asignado a pH 3 por los autores japoneses, a 4 por Kay y Lee y 5,5 por Contardi y Ercoli; esta discrepancia parece haber sido aclarada por la presencia de dos enzimas (pH óptimos 4,1 y 6,2) una de las cuales se destruye dejando el preparado durante media hora a pH 8,0 - 8,2 (Bamann y Riedel, 1936).-

IV.- Tipo de fosfomonoesterasa que actúa a pH óptimo de aproximadamente 6,5 y que hidroliza el alfa-glicero fosfato más rápidamente que el beta-glicero fosfato; se la encuentra en los glóbulos rojos donde ha sido estudiada por Roche (1931) y en la levadura.- En esta última parece probable que se puedan diferenciar 3 tipos de fosfatasas: una de pH óptimo alrededor de 4, otra cuyo pH es 6,5 y una tercera más activa en medio alcalino (Schäffner y Krumei, 1938).-

Como ya hemos dicho, a esta clase se agregan 2 tipos más de "fosfatasas inclasificadas"; una de ellas es la Fitasa, enzima que hidroliza a la fitina a pH óptimo 5,4; su diferencia con los otros tipos de fosfomonoesterasas

estaría asegurada por el hecho de haberse conseguido preparados de estas últimas exentos de actividad fitásica.-

También parece existir una enzima específica que hidroliza el éster hexoso-di-fosfórico; algunos autores japoneses arguyen haberla separado de las otras fosfatasas por métodos de absorción. Deben recordarse a este respecto las investigaciones de Forrai ( 1924 ); este autor estudió la hidrólisis de los ésteres glicero-fosfórico, fructoso-di-fosfórico y sacarosa fosfórico y encontró que el primero era escindido por los órganos de origen epitelial pero no ( o por lo menos mucho menos ) por los órganos originados en el mesenquima mientras que el fructoso-di-fosfórico era igualmente hidrolizado por todos los órganos.-

#### B) FOSFODIESTERASAS

Comprende esta clase el conjunto de fosfatasas que actúan cuando en una molécula de ácido ortofosfórico hay dos funciones ácidas esterificadas. Se las ha encontrado en extracto de riñón, en el salvado del arroz y en los venenos de algunas serpientes; se han conseguido preparados de monoesterasas libres de diesterasas, ( pero no estos últimos libres de monoesterasas ), a partir del salvado del arroz ( Uzawa). Otra prueba de que esta enzima es diferente de las monoesterasas la ha dado también Uzawa: los venenos de serpientes de algunas especies dejan fenol en libertad a partir del difenil-fosfato, pero no liberan fósforo inorgánico; esto revelaría que no actúan sobre el mono-fenilfosfato.-

La lecitinasa ha sido descrita en distintos órganos animales; su pH de acción óptima es de 7.5 ( King, 1931 ) y la riqueza de diferentes tejidos ( en orden decreciente ) es la siguiente: riñón, intestino delgado, bazo, hígado, testículos, páncreas, intestino grueso, cerebro, suprarrenales, pulmón, etc.-

Esta enzima es contemplada por Folley y Kay como un posible conjunto de enzimas; en este conjunto actuarían en primer término las lipasas separando los grupos ácidos; luego las fosfodiesterasas dejarían en libertad el grupo glicero-fosfórico sobre el cual, finalmente, actuaría una monoesterasa dejando el fósforo inorgánico en libertad.-

### C) PIROFOSFATASAS

Este grupo de fosfatasas actúan sobre los ésteres del ácido pirofosfórico, dejando ortofosfatos en libertad. Están muy ampliamente distribuidas y actúan a pH óptimo de 7.2 a 7.8. Munemura sostiene haber diferenciado tres tipos cuyo pH óptimos respectivos residen en 4.5 y 9 pero Folley y Kay no creen que haya todavía razones suficientes para aceptar esa división.-

En 1931 ha sido descripta la presencia en el hígado de mamíferos de una adenil-pirofosfatasa ( Jacobsen, Barrescheen y Lang ). También se encuentra en los músculos y los autores rusos Engelhardt y Lyubimova ( 1939 ) han dado a conocer algunos hechos que sugieren la conclusión extraordinariamente importante de que dicha enzima y la miosina pueden ser un mismo elemento dado que los medios de extracción cuantitativa, la solubilidad, termolabilidad y sensibilidad a los ácidos son muy parecidos para ambos.-

### D) METAFOSFATASA

Son enzimas que catalizan la transformación del ácido metafosfórico a ortofosfórico; fueron descriptas por Kitasato ( 1928 ) quien las encontró presentes en la taka-díastasa, levaduras y en algunos tejidos animales ( hígado y riñón ). Folley y Kay hacen notar que esta enzima cataliza la transformación de un substrato inorgánico que hasta este momento no ha sido encontrado en los materiales biológicos.-

### E) FOSFOAMIDASAS

Estas enzimas catalizan la escisión del grupo fosfórico de la fosfo-arginina y la fosfo-creatina; fueron descriptas por Waldschmidt-Leitz y Köhler. Según Ichihara las fosfo-amidasas de origen animal actúan a pH óptimo de 9 y las de origen vegetal a pH 6. Este mismo autor ha logrado separar la fosfo-amidasa del riñón de las fosfomonoesterasas, adsorbiendo estas últimas con caolin o con hidróxido de aluminio.-

El problema de la unidad o pluralidad de la fosfomonoesterasa alcalina

De toda la larga serie de fosfatasas enumeradas, las que se encuentran más frecuentemente en los tejidos animales son las fosfomonoesterasas alcalinas

( tipo AI de la clasificación de Folley y Kay ). Este tipo es el que ha merecido la atención preferente de los autores, pero no parece haber sido definitivamente resuelto todavía si corresponde a una sola enzima o a varias.-

En un trabajo anterior al que terminamos de resumir, publicado por Kay en 1932, este autor sistematizaba las propiedades que en aquel entonces parecían igualar a la mayoría de las fosfatasas de origen animal; indudablemente ya no se puede aceptar esto en un sentido tan amplio, pero sí pueden quedar tales condiciones como una base para discutir si la fosfomonoesterasa tipo AI constituye o no una unidad enzimática.-

Tomando en cuenta las fosfatasas de hueso, mucosa intestinal, riñón y plasma sanguíneo, Kay decía:

a) El mismo procedimiento es igualmente efectivo para extraer casi completamente la fosfatasa de los diferentes tejidos.-

b) El pH óptimo para la actividad de las 4 fosfatasas es el mismo.-

c) El Mg estimula la actividad de todas ellas y el qMg óptimo es aproximadamente el mismo.-

d) Si una serie de ésteres son hidrolizados, la relación de la intensidad de la hidrólisis de uno a otro es la misma con extractos de cada uno de los diferentes órganos.-

e) La constante de disociación del compuesto enzima-substrato ( Michaelis y Menten ) es aproximadamente la misma para cada uno de los extractos tisulares actuando sobre el mismo substrato; el beta-glícero-fosfato de sodio.-

f) La fosfatasa de riñón, hueso, intestino y plasma son capaces de sintetizar ésteres fosfóricos en condiciones convenientes, y estas condiciones son las mismas para cada uno de los extractos tisulares.-

Frente a este conjunto impresionante de razones de orden positivo que tienden a asemejar las distintas fosfatasas alcalinas, han sido referidas por distintos autores la existencia de propiedades diferenciales.-

Belfanti, Contardi y Ercoli ( 1935 ) han pretendido demostrar que las fosfatasas de riñón e hígado eran distintas de las fosfatasas de hueso y posiblemente plasma; según ellos la fosfatasa de hueso sería más activa en presencia de "buffer" de glicocola que en presencia de "buffer" de veronal, mientras que ocurriría lo contrario con las fosfatasas de hígado y riñón. También sería la fosfatasa ósea más lábil en medio ácido que las otras dos y se comportaría

de manera diferente frente a los iones oxalatos. Las fosfatasa alcalinas de los tres órganos son inhibidas por el ión oxalato y según los autores eso se debería a la formación de un compuesto enzima-oxalato inactivo; la diferencia del comportamiento de la fosfatasa de hueso con respecto a las otras dos reside en el hecho de que la presencia del ión fosfato liberado por el mismo resto de actividad de la enzima sería capaz de separarla de su unión con los oxalatos y reactivarla en el caso de la fosfatasa de hígado y riñón pero no la reactiva en el caso de la fosfatasa de hueso.-

O. Bodansky ( 1937 ) en procura de datos para resolver el problema del origen de la fosfatasa del suero sanguíneo estudió el comportamiento de las fosfatasa de hueso, riñón, intestino y suero sanguíneo; no encontró diferencias en la intensidad de hidrólisis frente al beta-glícero-fosfato de sodio, hexosa-difosfato de sodio, benzil-fosfato de potasio y propil-fosfato de sodio. Ninguna de las mencionadas fosfatasa son inhibidas por los alcaloides de la cinchona y todas son inhibidas, en forma que no permite ninguna diferenciación, por el cloruro mercurico. En cambio los ácidos biliares ( taurocólico, glicocólico, desoxicólico y dehidrocólico ) permiten diferenciar las fosfatasa de hueso, riñón y suero que son inhibidas, de la fosfatasa de intestino que no es inhibida.-

También de los trabajos de R. Cloetens surgen diferencias entre las fosfatasa alcalinas. Según este autor ellas se pueden dividir en dos tipos: I y II; ambas son activadas por las sales de manganeso, pero mientras la tipo I es inactiva en ausencia de magnesio la de tipo II no requiere este catión para su actividad; la tipo I en presencia de iones de Mg es poco afectada por el KCN mientras que la tipo II es completamente inactivada; el NaF a la concentración 0.01 M inhibe el tipo I pero no afecta el tipo II y finalmente, la primera es más estable en medio ácida que la segunda. El hígado es especialmente rico en fosfatasa I y el intestino en fosfatasa II, habiéndose establecido una escala del valor de la relación I/II en los distintos órganos; esta escala da la siguiente serie: intestino, hueso, pulmón, riñón, hígado,-

#### INVESTIGACION DE LAS FOSFOMONOESTERASAS EN LA GLANDULA MAMARIA

Con el objeto de averiguar cuales son los tipos de fosfomonoesterasas presentes en la glándula mamaria y comparar la concentración relativa de cada una de ellas, hemos efectuado determinaciones en un amplio medio de variación

de pH.-

Determinaciones de pH óptimo de la glándula mamaria fueron efectuadas por Folley y Kay en 1935; usaron el fenil-fosfato-disódico como sustrato y en un medio iónico que se extendía desde pH 8.5 hasta 10.5. solo puede revelarse, con esto, la presencia de fosfomonoesterasa alcalina; para ella, en el caso de la glándula mamaria se la cobaya y en determinaciones de media hora de duración encontraron un pH óptimo de 9.8.-

En nuestras determinaciones hemos usado como fuente de fosfatasa la glándula mamaria de vacuno y en un medio de concentración de hidrogeniones más extenso: entre pH 2.8 y 9.8.-

Las determinaciones se han efectuado en glándulas en reposo secretorio, para evitar la presencia de leche. También, con el objeto de evitar las fos-

Cuadro Nº 1

Extracto de glándula mamaria en reposo secretorio. Extracción con agua destilada adicionada de tolueno al 10 %. Tiempo de incubación 1 hora. Temperatura 37°C

| Subs-<br>trato<br>ml. | HCl<br>0.1 N<br>ml. | NaOH<br>0.1 N<br>ml. | sol.<br>Fosfatasa<br>ml. | pH         |              | P<br>Inorg.<br>mg. | P<br>Liberado<br>mg. |
|-----------------------|---------------------|----------------------|--------------------------|------------|--------------|--------------------|----------------------|
|                       |                     |                      |                          | Antes inc. | Después inc. |                    |                      |
| 5                     | 6.00                | 9.00                 | 0                        | 9.77       | 9.77         | 0.00               | 0.00                 |
| 0                     | 6.00                | 9.00                 | 1                        | --         | --           | 0.15               | --                   |
| 5                     | 6.00                | 9.00                 | 1                        | 9.75       | 9.76         | 0.300              | 0.150                |
| 5                     | 7.00                | 8.00                 | 1                        | 9.25       | 9.25         | 0.813              | 0.663                |
| 5                     | 7.10                | 7.90                 | 1                        | 9.20       | 9.22         | 0.905              | 0.755                |
| 5                     | 7.20                | 7.80                 | 1                        | 9.12       | 9.13         | 1.972              | 1.822                |
| 5                     | 7.40                | 7.60                 | 1                        | 9.00       | 9.01         | 1.670              | 1.520                |
| 5                     | 7.50                | 7.50                 | 1                        | 8.85       | 8.85         | 1.014              | 0.864                |
| 5                     | 8.00                | 7.00                 | 1                        | 8.79       | 8.81         | 0.960              | 0.811                |
| 5                     | 9.00                | 6.00                 | 1                        | 8.45       | 8.46         | 0.614              | 0.464                |
| 5                     | 10.00               | 5.00                 | 1                        | 7.94       | 7.94         | 0.452              | 0.302                |
| 5                     | 11.00               | 4.00                 | 1                        | 7.44       | 7.45         | 0.409              | 0.259                |
| 5                     | 12.00               | 3.00                 | 1                        | 6.85       | 6.86         | 0.298              | 0.148                |
| 5                     | 13.00               | 2.00                 | 1                        | 6.33       | 6.32         | 0.195              | 0.045                |
| 5                     | 13.50               | 1.50                 | 1                        | 5.70       | 5.70         | 0.192              | 0.042                |
| 5                     | 13.60               | 1.40                 | 1                        | 5.17       | 5.18         | 0.186              | 0.036                |
| 5                     | 13.70               | 1.30                 | 1                        | 4.68       | 4.65         | 0.193              | 0.043                |
| 5                     | 13.80               | 1.20                 | 1                        | 3.85       | 3.84         | 0.195              | 0.045                |
| 5                     | 13.90               | 1.10                 | 1                        | 3.06       | 3.07         | 0.183              | 0.033                |
| 5                     | 14.00               | 1.00                 | 1                        | 2.67       | 2.65         | 0.170              | 0.020                |
| 5                     | 14.50               | 0.50                 | 1                        | 2.45       | 2.45         | 0.162              | 0.012                |
| 5                     | 14.50               | 0.50                 | 0                        | --         | --           | 0.00               | 0.00                 |
| 0                     | 14.50               | 0.50                 | 1                        | --         | --           | 0.151              | --                   |

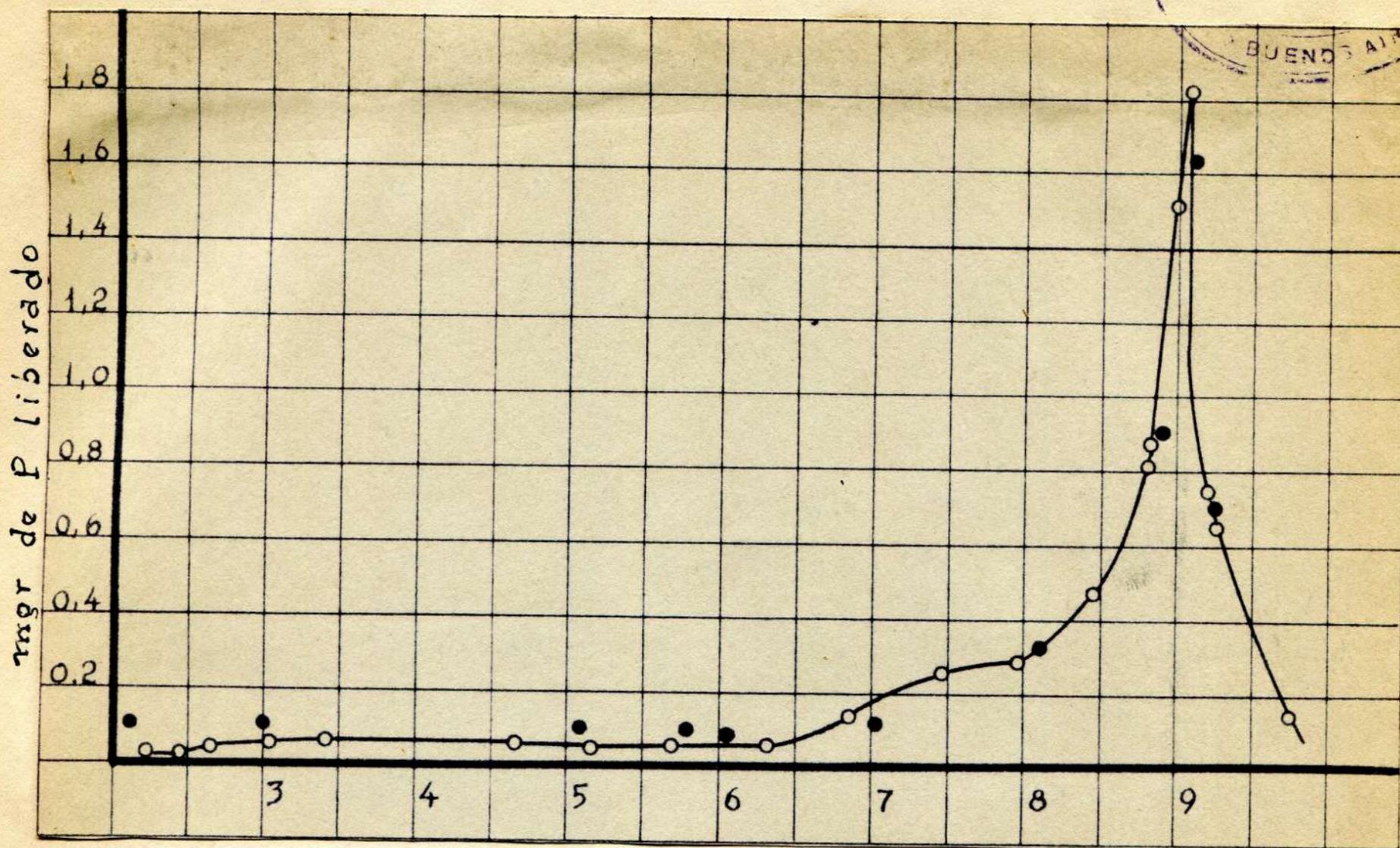


Figura 1

Extracción con agua destilada

● ● 72 horas en maceración

—○—○— 48 horas en maceración

fatasas de la sangre, los trozos del órgano fueron lavados antes de ser sometidos a la extracción propiamente dicha, haciendo pasar una corriente de agua por sus vasos sanguíneos mayores. Gracias a que la fosfatasa se comporta como una enzima endocelular, que requiere una autólisis previa del órgano para ponerse en libertad, la operación del lavado no acarrea una pérdida significativa para nuestro trabajo.-

Las extracciones se efectuaron con tres líquidos distintos: 1º) agua destilada adicionada de tolueno al 10 %; 2º) "buffer" de borato preparado según Sørensen a pH 9.0 y 6.5, al cual se adicionó tolueno al 10 %, y 3º) mezcla de extracción según Albers ( vease capítulo siguiente ). La duración de las extracciones oscilaron entre 48 y 72 horas y se efectuaron en todos los casos a temperatura ambiente y agitando circunstancialmente.-

En las determinaciones de valor fosfatásico se usó el "buffer" de Michaelis, compuesto por acetato de sodio y veronal sódico, al cual se le agregaba 0.1 N de HCl ó 0.1 N de NaOH para lograr el pH deseado.- Las determinaciones de pH se efectuaron por el método potenciométrico y en algunos casos se efectuaron antes y después de incubación.-

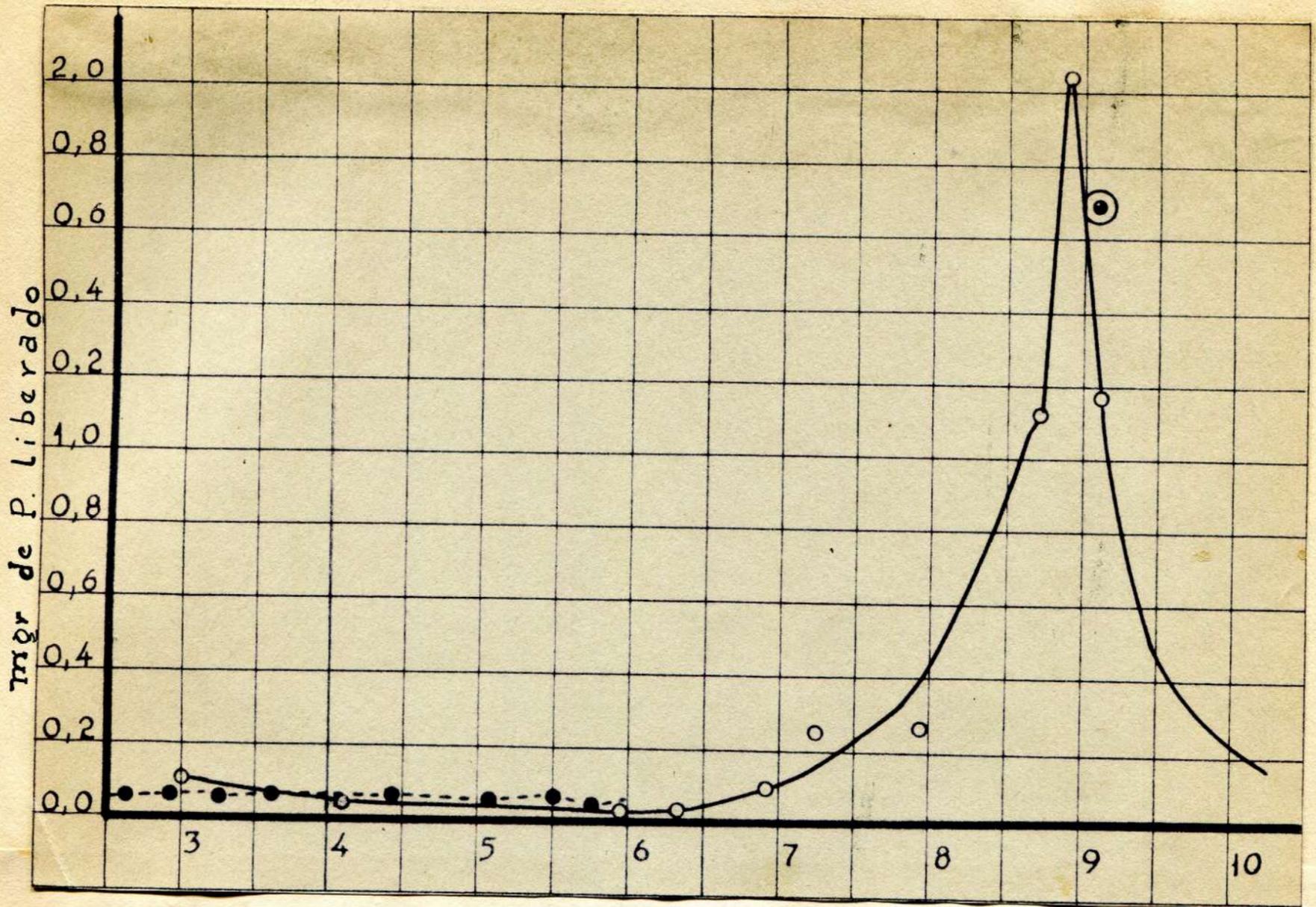


Figura Nº 2

Extracción con mezcla de Albers

---●--- 24 horas en maceración

—○— 72 horas en maceración

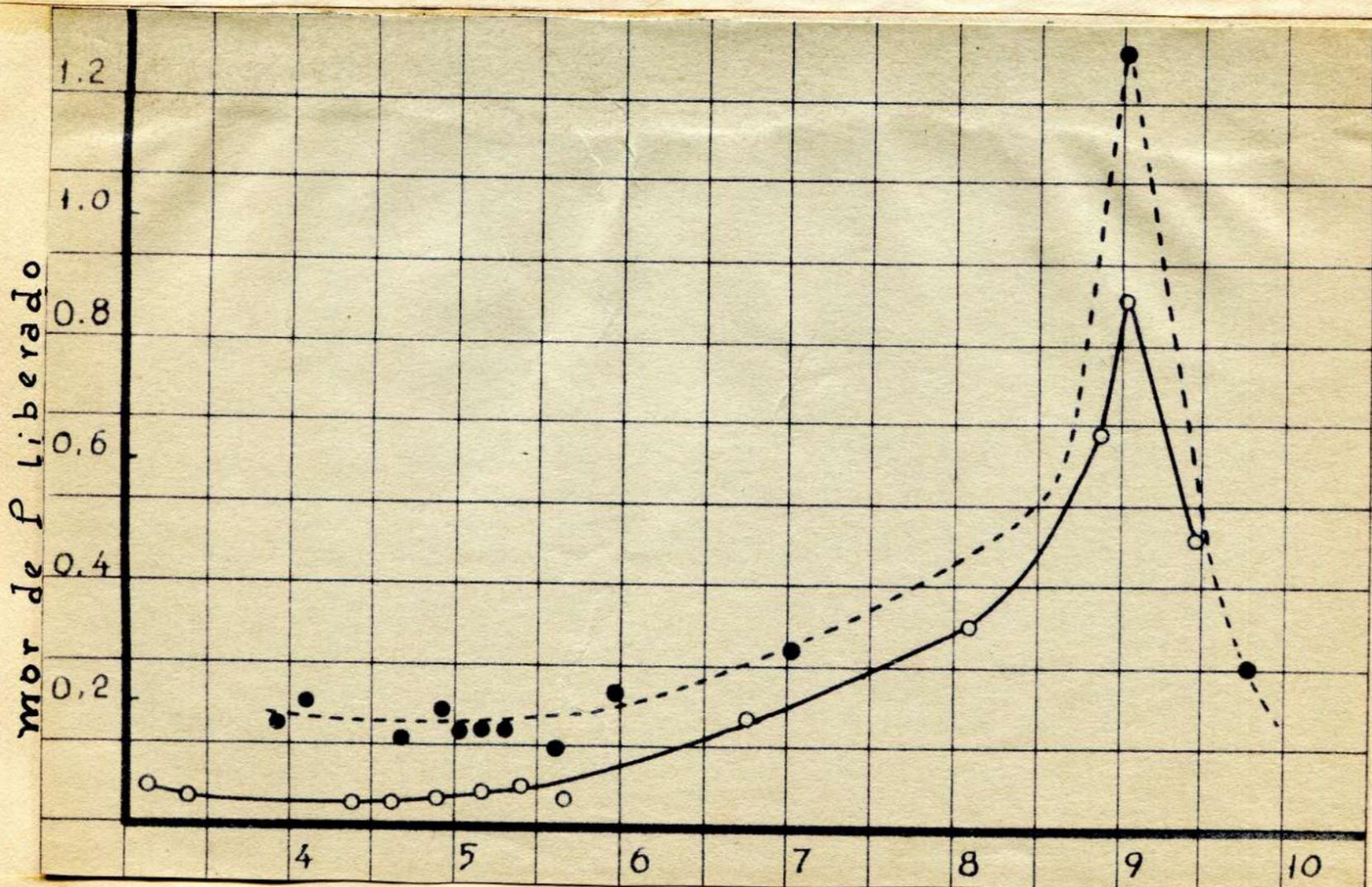


Figura Nº 3

Extracción con mezcla de borato

---●--- "buffer" a pH 9,0

—○— "buffer" a pH 6,5

En el cuadro Nº 1 se muestra, a manera de ejemplo, el protocolo de las determinaciones que sirvieron para dibujar una de las curvas de la figura Nº 1.-

Puede apreciarse en los resultados que anteceden, que la actividad fosfatásica de los extractos mamarios no se extingue totalmente en ninguna parte del extenso medio de variaciones de pH en el que ha sido buscado. Esto probablemente debe atribuirse a la presencia de los tres tipos de fosfomonoesterasas ( AI, AII y AIV de la clasificación de Folley y Kay ) que se encuentran distribuidas en forma casi universal en los tejidos de origen animal.-

Los valores de los tipos AII y AIV deben ser sin embargo, muy pobres en la glándula mamaria dado que no ha sido posible revelar ningún óptimo en las condiciones en que los hemos ensayado. La posibilidad de una inactivación durante la extracción o de un fracaso en los medios extractivos parece muy improbable dada la uniformidad de los resultados conseguidos con los cuatro líquidos usados y dado también que la duración del tiempo de extracción no parece tener influencia sobre los valores de las soluciones obtenidas.-

Debe hacerse notar que la falta de valores para los tipos ácidos asemeja a la glándula mamaria a lo que ocurre con el tejido óseo, donde también se encuentran valores muy elevados de fosfatasa alcalina y muy escasos en los otros tipos. También la curva del plasma sanguíneo adopta la misma forma, con valores relativos de los tipos ácidos muy inferiores a la alcalina, pero las cantidades absolutas de esta última quedan muy por debajo de los encontrados en los órganos anteriores.-

Por lo que al óptimo alcalino se refiere, se debe notar que al igual que lo que ocurre en todos los otros órganos, tiene una zona de pH muy restringida para su máximo cayendo bruscamente a ambos lados del mismo. El máximo se ha encontrado entre 8.9 y 9.1 en todas nuestras experiencias, marcando así una diferencia franca con los valores encontrados por Folley y Kay; esta diferencia se explica fácilmente si se tiene en cuenta que el substrato usado por estos autores es diferente al usado por nosotros y sobre todo, que sus determinaciones fueron efectuadas en tiempo menor. ( Vease más adelante )

#### ESTUDIO HISTOQUIMICO DE LA FOSFATASA EN LA GLANDULA MAMARIA

La distribución de la fosfatasa en el seno de los tejidos ha sido estudiada de acuerdo con los principios siguientes (Gomori, 1939 - 41): si se incuban cortes tisulares con un substrato de glicero-fosfato de sodio y en presen-

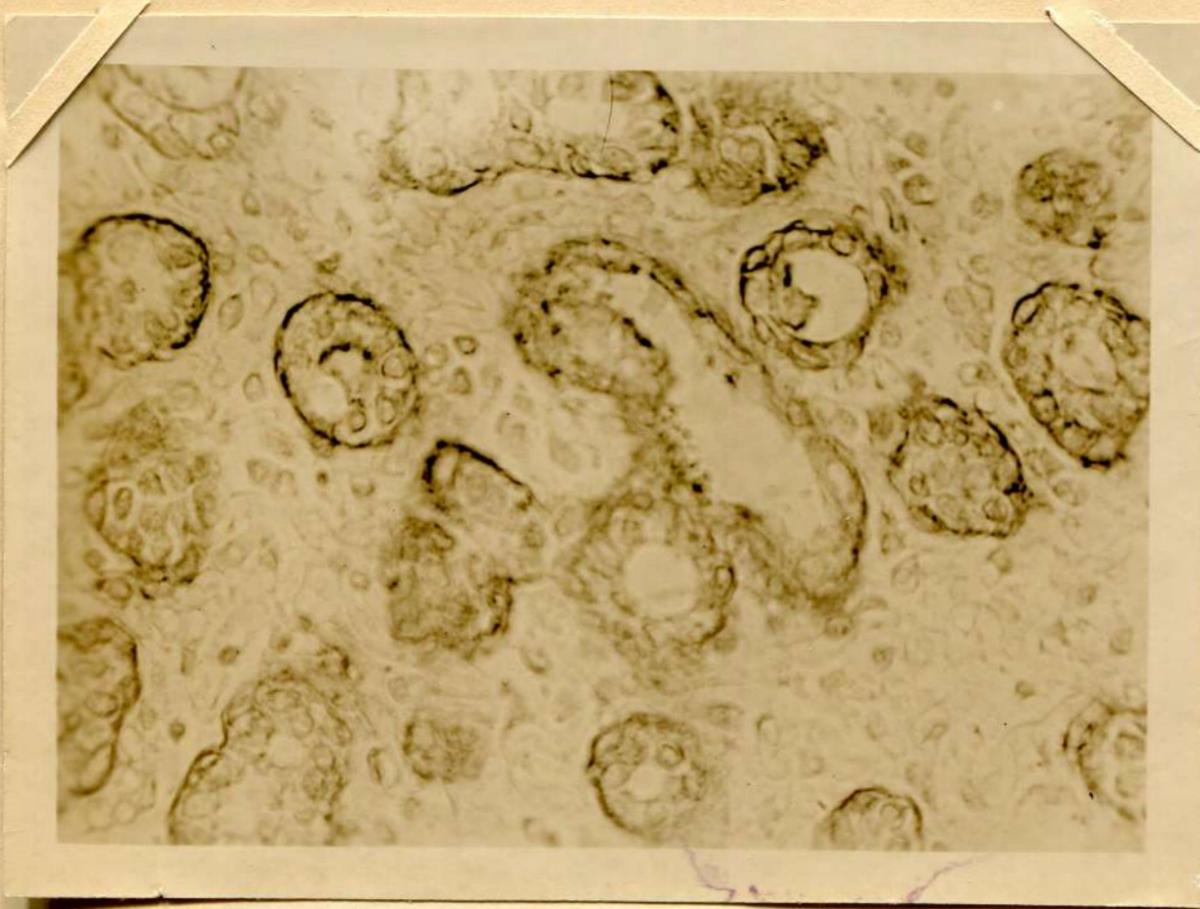


Figura Nº 4

Distribución de la fosfatasa en la glándula mamaria en reposo secretorio.- El sulfuro de cobalto (negro) que revela el sitio donde se encuentra la fosfatasa, se distribuye en los elementos epiteliales y muy escasamente o nada en los elementos inter-epiteliales.-



Figura Nº 5

Distribución de la fosfatasa en la glándula mamaria en actividad secretoria.- La proliferación de los elementos epiteliales ha enriquecido el preparado en fosfatasa.-

Aunque el método se presta difícilmente para apreciaciones cuantitativas, repárese que la imagen en este caso revela una actividad más intensa que la del preparado anterior.-

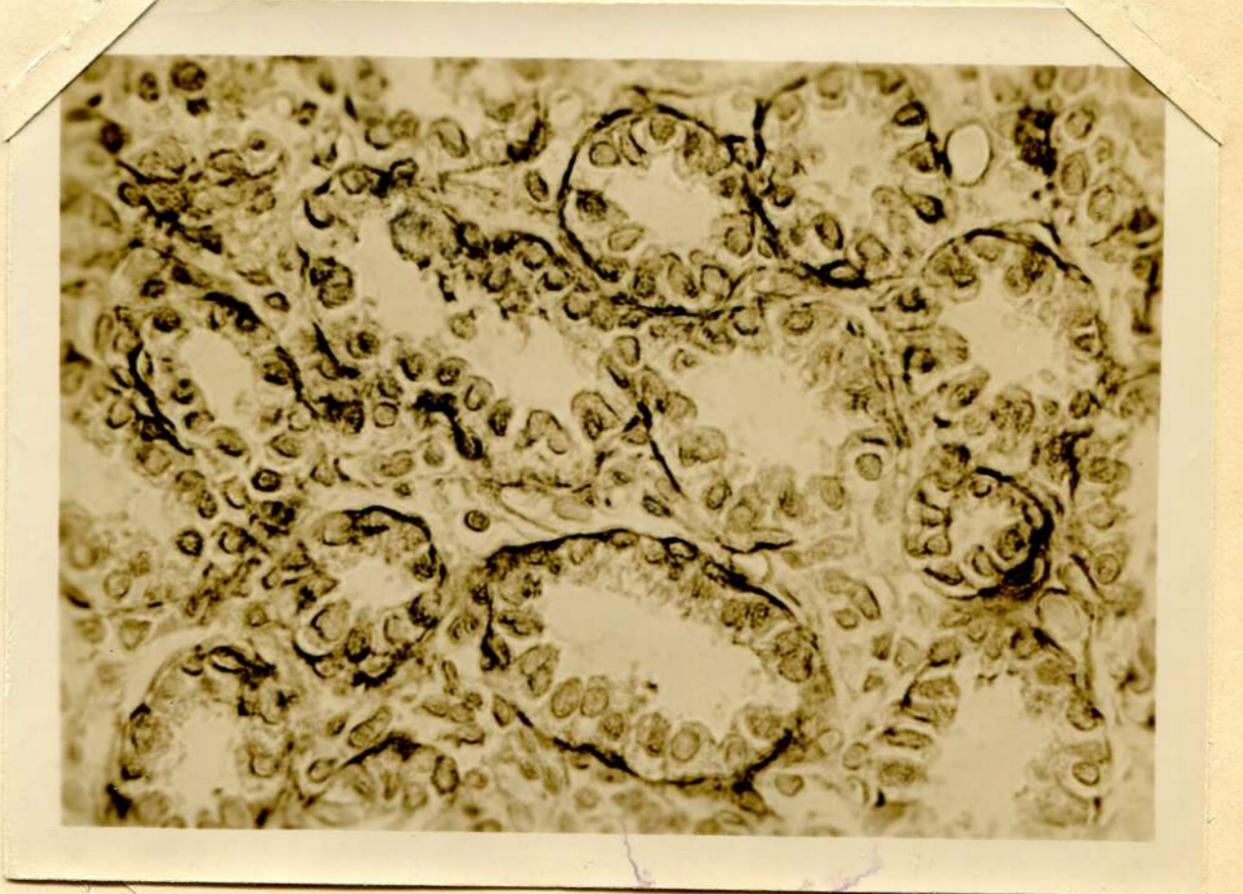
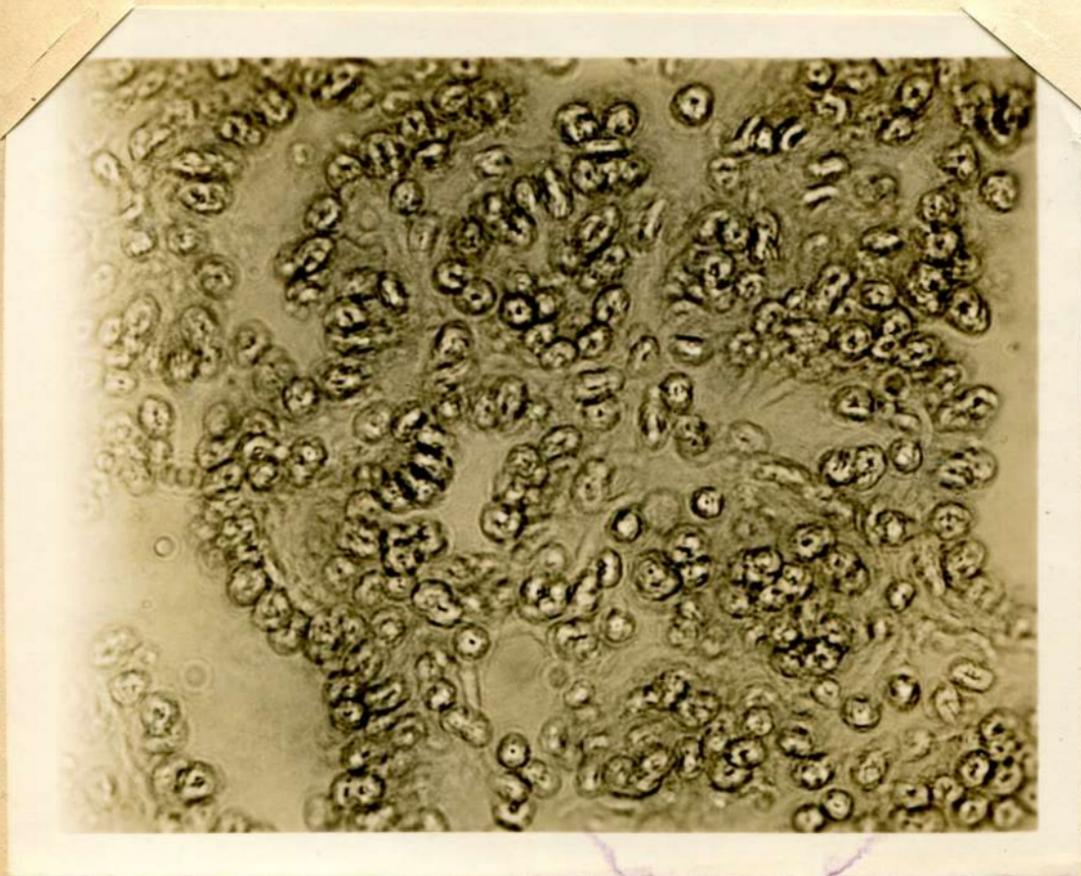


Figura Nº 5 bis

Preparación testigo de la tomada para la figura Nº 5

El tratamiento de la preparación es igual al de la anterior excepto que no se ha incubado con glicero-fosfato sódico.-

Demuestra la especificidad de la reacción.-



cia de una sal soluble de calcio, los fosfatos inorgánicos liberados por acción enzimática precipitan "in situ" al estado de fosfato de calcio. El fosfato depositado se puede visualizar posteriormente sea transformandolo en fosfato de plata, el cual por ser fotosensible se oscurecerá bajo la acción de los rayos ultravioleta (método de Kóssa) o sea transformandolo en fosfato de cobalto y posteriormente en sulfuro de cobalto que por ser de color negro se puede ver fácilmente en el microscopio.- Esta última variante es la que ha sido adoptada para obtener las preparaciones que se describen a continuación.-

La figura N<sup>o</sup> 4 corresponde a una fotomicrografía de una preparación de glándula mamaria de cobaya en condiciones fisiológicas habituales y la figura 5, al de una cobaya en período de lactación. El "blanco" de esta última, es decir, la imagen de un corte tratado en la misma forma con excepción de la incubación con glicero-fosfato sódico, se da en la figura 5 bis.-

La fosfatasa se distribuye casi exclusivamente por las células epiteliales que rodean los túbulos y alveolos glandulares y se aprecia también que la reacción fosfatásica dibuja por fuera de ellas una membrana propia, en la misma forma que ha sido descrita por la observación de tinciones con los métodos histológicos comunes.- El tejido conjuntivo interglandular muestra una reacción sumamente pobre con respecto a la del tejido epitelial.-

Aun cuando las condiciones del método se prestan mal para una apreciación cuantitativa rigurosa, la comparación de las glándulas en períodos de lactación con aquellas fuera de este período parece revelar una actividad más intensa en las células epiteliales de las primeras. De todas maneras, la mayor concentración de enzima en estas glándulas queda asegurada por la proliferación del tejido epitelial y por el aumento de volumen de sus células. En el mismo sentido deben interpretarse los resultados de las experiencias de extracciones efectuadas con glándulas mamarias de vacunos. (capítulo II)

## Capítulo II

### EXTRACCION Y PURIFICACION DE LA FOSFOMONOESTERASA ALCALINA

#### Método de purificación de la fosfatasa de la glándula mamaria

Forrai elaboró en 1923 un procedimiento para pulverizar y conservar extractos de órganos humanos; los polvos obtenidos se revelaron posteriormente ricos en fosfatasas.- Sin embargo, los primeros intentos sistemáticamente realizados con el objeto de obtener extractos purificados de fosfatasa pertenecen a Erdtmann, quien en 1927 revela que a partir de riñones picados extraídos en un medio con tolueno se pueden conseguir hasta 6,8 unidades de fosfatasa por 0,5 ml.

Martland y Robison (1929) purificaron la fosfatasa de hueso; estos autores extraían trozos de huesos con 5 veces su peso de agua cloroformada durante 7 a 10 días; el extracto filtrado se precipitaba luego con una mezcla de alcohol y eter (200 ml de alcohol y 300 ml de eter para cada 100 ml de extracto). El precipitado filtrado y lavado luego con alcohol absoluto, se deseca; en esta forma se obtiene un polvo incoloro y soluble en agua. Este polvo puede luego ser extraído con alcohol de 50%, con lo cual, aunque ocurren pérdidas en la actividad total, se gana en purificación. Estos mismos autores indican como otro procedimiento conveniente para purificar, la precipitación de proteínas inactivas a pH 5,8, dejando la enzima en solución. Los intentos de purificación por medio de la adsorción con caolín, fosfato de calcio e hidróxido de aluminio (tipo B) no dieron resultados satisfactorios. Los mejores valores logrados por estos autores referidos en las unidades que se utilizarán en este trabajo y por mg de contenido seco total, es de 5,7.-

Ehrensward (1933) efectúa extracciones siguiendo las reglas dadas por Erdmann y aprovecha la relativa resistencia de la fosfatasa para la digestión triptica para purificarla; somete a la acción de la tripsina las proteínas inertes y luego adsorbe la enzima por medio del ácido esteárico. Con este procedimiento logra preparados de 1,1 U.F. /mg. contenido seco total.-

La fosfatasa de intestino ha sido purificada por Holmberg (1935); el extracto de fosfatasa es sometido a una intensa agitación con cloroformo, con lo cual provoca una desnaturalización de las proteínas acompañantes; el autor no da ninguna relación precisa del grado de purificación alcanzado; establece que logra un producto límpido, "que no da precipitado con el ácido sulfosalicílico", pero, seguramente, debe tratarse de un producto muy diluido.-

Las heces de perro como material adecuado de partida en la purificación de la fosfatasa fué propuesto por Armstrong (1935); 1 Kg. de heces se homogenizan agitándolo prolongadamente con 3 litros de agua helada; la suspensión se pasa por un tamiz que retiene las partículas gruesas, y al líquido se le agregan 20 ml. de ácido acético. Se filtra y luego los fosfatos que han sido disueltos por el tratamiento ácido se precipitan llevando el medio a pH 8 con amoníaco. El filtrado se precipita con sulfato de amonio a saturación y acetona, separándose el precipitado proteico; este se disuelve posteriormente con agua amoniacal a pH 8 - 9 y se trata con 0,5 ml. de ácido acético glacial para llevar a pH 4 - 4,5 con lo cual precipita material inactivo. La solución se agita con carbón y se filtra; el filtrado se lleva a pH 7 con 1 ml de amoníaco concentrado y posteriormente se precipita nuevamente con acetona. Se produce un precipitado gomoso que se lleva a un vidrio de reloj y se deseca en vacío. Los autores han logrado valores de 130,000 a 185,000 unidades King y Armstrong por gramo de precipitado desecado.-

#### El procedimiento de purificación de H. y E. Albers

Indudablemente, al tiempo de escribirse este trabajo los intentos más felizmente ejecutados con el fin de purificar la fosfomonoesterasa alcalina, pertenecen a H. y E. Albers, del Instituto Bioquímico de Estocolmo que dirige el prof. H. v. Euler.-

Estos autores comenzaron por utilizar el medio de extracción de Erdtmann ya citado; si durante 1 o 2 días se autolizan riñones de cerdo con agua toluolada se obtiene una excelente extracción en lo que se refiere a los valores de fosfatasa; sin embargo, el líquido que se obtiene está lejos de ser satisfactorio a los fines subsiguientes: es un líquido muy difícil de filtrar y además, cuando se lo somete al tratamiento alcohólico da un precipitado muy rico en proteínas inerte; tiene también hemoglobina originada en los eritrocitos hemolizados durante la extracción. En vista de todos estos inconvenientes que presenta la extracción con agua toluolada, los autores usaron el acetato de etilo como agente de autólisis; con él se evita la hemólisis y se consiguen extractos con relativamente bajos contenidos en proteínas; esto es debido a que el acetato de etilo es descompuesto por las esterases del tejido y el ácido acético liberado hace en conjunto con los otros elementos del medio un sistema "buffer" cuyo pH oscila entre 5 y 6 en el cual, las proteínas de elevado peso molecular son insolubles. El extracto posee además la ventaja de filtrar fácilmente, dando un líquido claro, color amarillo oro y de fuerte fluorescencia verde.-

La extracción con acetato de etilo tiene el inconveniente muy serio de que pierde mucha fosfatasa; los valores U.F./0,5 ml que en las extracciones con tolueno eran de 6,77 a 5,0 bajaron cuando se usó acetato de etilo a valores de 1,18 - 1,58.- Afortunadamente, las ventajas obtenidas con una y otra extracción se mostraron aditivas cuando el tolueno y el acetato de etilo actuaron simultáneamente, y en vista de ello, los autores adoptaron para extraer el líquido que resulta de agregar a 1 litro de agua, 100 ml de una mezcla compuesta por partes iguales de acetato de etilo y tolueno.-

La purificación ulterior fué lograda por precipitación alcohólica fraccionada. Puede decirse en resumen que fueron ensayadas tres fracciones; primero, una fracción que precipita agregando un volumen de alcohol igual al del extracto ensayado; con esta fracción precipita muy poco fosfatasa y muy impurificada. En una segunda precipitación, obtenida agregando otro volumen de alcohol a los líquidos sobrantes del tratamiento anterior, se obtiene la mayor cantidad de fosfatasa y con el mayor grado de pureza. El agregado ulterior de otro volumen de alcohol no aumenta sino muy poco la recuperación de enzima y ella está nuevamente muy impurificada.-

Dado que según los resultados de estos fraccionamientos la fosfatasa se comportaba como un cuerpo soluble en alcohol de baja graduación, los autores resolvieron reemplazar la mezcla de extracción que hemos citado por otra que está compuesta por 1 litro de alcohol de 50% al cual se le agrega la mezcla a partes iguales de tolueno y acetato de etilo (100 ml de la mezcla). En esta forma consiguieron mejorar no solo la relación de pureza de los extractos si no que inclusive mejoró el rendimiento en fosfatasa. En este medio alcohólico es posible dejar un tiempo más prolongado para que se cumpla la autólisis con lo cual se consigue el efecto buscado por Ehrensvärd cuando agregaba tripsina a sus medios de extracción, pero en este caso se logra con el concurso de las propias enzimas del órgano extraído.-

A estos extractos se les agregó luego alcohol hasta obtener una concentración final de 65 volúmenes %. El precipitado que así se obtuvo fué lavado con alcohol o con eter y luego secado al vacío o al aire. El polvo resultante tiene de 40 a 50 U.F./ mg contenido seco total y es soluble en agua. Si de este material se eliminan los constituyentes inorgánicos - principalmente al estado de fosfato amónico magnésico - y luego se vuelve a precipitar con alcohol a 65 vol. %, se obtienen polvos cuyos valores en fosfatasa alcanzan hasta 150 U.F./mg de contenido seco total.-

Los intentos realizados por los Albers para purificar esta enzima

por medio de adsorción con hidróxido de aluminio Cy, con fosfato de calcio, fosfato de magnesio o caolín, fracasaron. En aquellos casos en que la encima fué adsorbida por uno de estos agentes, no fué luego posible eluirla.-

Los principios de extracción propuestos por H. y E Albers han sido utilizados en trabajos posteriores por Lora Tamayo y Rodriguez Blanco (1936) Cheng, Scheermann y Ivy (1940) y Caputto y Marsal (1941).-

#### Purificación de los extractos renales (Marsal, 1940)

Después de haber ensayado distintas mezclas para extraer la fosfatasa renal, el prof. Marsal se decidió por la extracción de Albers. Los extractos obtenidos fueron luego precipitados con acetona en proporciones que variaron entre 28 y 33 volúmenes %; a menores concentraciones de acetona el rendimiento en fosfatasa disminuye mucho y a mayores concentraciones se obtiene un valor U.F./mg proteína, muy bajo. El precipitado obtenido es decantado, centrifugado y luego suspendido dos veces en "buffer" de borato a pH 9,1. Con objeto de purificarla, la fosfatasa fué posteriormente precipitada con p-dioxi-dietileno (1,4 dioxana "astmann), en condiciones de concentración, pH, temperatura y tiempo óptimos, que se determinaron: se encontró que los preparados más purificados se obtienen cuando el eluido en "buffer" de borato se precipita con 1 volumen de dioxana, a 3° - 5° de temperatura, pH 8,5 y durante 1 hor. El precipitado que se obtiene en esta forma se disuelve nuevamente en "buffer" de borato y se filtra. Con este método se han obtenido preparados de hasta 1458 U.F./mg proteínas.-

### EXTRACCION Y PURIFICACION DE LA FOSFATASA DE LA GLANDULA MAMARIA

#### Elección del material de partida

El elevado contenido en fosfatasa de la glándula mamaria fué establecido por Folley y Kay en 1936. Estos autores encontraron en la cobaya que dicha glándula era por lo menos tan rica como el riñon del mismo animal; compararon además los valores de los extractos de glándulas en reposo secretorio con aquellas que manifestaban signos de secreción lactea y encontraron que por gramo de órgano las glándulas en reposo daban más fosfatasa que las glándulas en actividad; atribuyeron este hecho, en parte, a que la presencia de leche que es una secreción pobre en fosfatasa, aumenta relativamente mucho más el peso del órgano que lo que aporta en enzima; por otra parte admiten que intrínsecamente la glándula en reposo sea más rica que la glándula secretante.-

Durante nuestro trabajo con glándulas de vacunos traídas de los Mata-  
deros Municipales hemos podido constatar una enorme irregularidad en los valores  
obtenidos; el hecho se debe, a nuestro juicio, a que por razón del mismo origen  
del material que hemos usado no ha sido posible sino tomar en consideración si  
la glándula estaba en actividad o no y desconociendo la edad del animal - que  
posiblemente sea el factor preponderante - y el período de actividad en que la  
glándula se hallaba. En vista de que el trabajo de Folley y Kay no menciona que  
tales factores han sido tomados en consideración, sus conclusiones no pueden ser  
tenidas como definitivas.-

En el cuadro siguiente todos los extractos han sido obtenidos con la  
misma técnica y en él 1 ml equivale a 1 gr de órgano; los extractos han sido ob-  
tenido por autólisis durante 72 horas.-

Cuadro Nº 2

Extracción con mezcla de Albers.- Autólisis durante 72 horas.- 1 ml equivale a  
1 gr de órgano.-

| <u>Glándulas en reposo<br/>secretorio</u> | <u>Glándulas en actividad<br/>secretoria</u> |
|---|--|
| U.F./ml                                   | U.F./ml                                      |
| 3,60                                      | 27,40  |
| 10,00                                     | 67,20  |
| 9,60                                      | 23,00  |
| 11,30                                     | 11,30  |
| 43,80                                     | 25,00  |
| 32,60                                     | 27,80  |
| 33,63                                     | 10,20  |
| 40,08                                     |  |

Se puede apreciar que tanto entre las glándulas en reposo como entre  
aquellas que están en actividad, las diferencias son muy grandes; hay que adver-  
tir sin embargo, que los cuatro últimos valores de las glándulas en reposo co-  
rresponden a animales jóvenes ("vaquillonas"(1)) y presentan una diferencia os-  
tensible con los otros valores de la misma columna.- También debemos hacer no-  
tar que el valor 67,20 que aparece entre las glándulas en actividad secretoria  
pertenece a un animal en avanzado estado de preñez (1), por lo cual, aunque no  
hubiera todavía secreción lactea, lo hemos incluido en este grupo.-

(1) Dato del Sr. Veterinario de la Inspección Sanitaria Municipal en los Mata-  
deros.-

Las glándulas de animales jóvenes, que parecerían mostrarse como el material de partida preferible, son sin embargo, glándulas muy chicas, invadidas por la grasa y por añadidura difíciles de conseguir. Por eso hemos preferido las glándulas en actividad secretoria: proveen siempre abundante material y, en general más ricas en fosfatasa que el común de las glándulas mamarias de animales adultos.-

#### Extracción de la fosfatasa mamaria

Glándulas de vacunos recientemente faenados se liberan de la grasa perimamaria e interlobulillar; si ellas son ricas en leche se las exprime y se las lava con el objeto de extraer la mayor cantidad posible de la misma; este lavado practicado antes de la trituration del órgano no afecta apreciablemente el contenido en enzima. Luego se procede a la trituration con máquina picadora de carne y se extrae con un volumen de líquido en mililitros igual a la cantidad de gramos de órgano que se extrae.-

Con diversas finalidades ( especialmente para asegurarnos la extracción de todos los tipos de fosfomonoesterasas para estudiar las curvas de pH óptimo ) hemos extraído a veces con agua más tolueno al 10 %, con "buffer" de borato a pH 6,5 y 9,0, con alcohol de 50% y con la mezcla de Albers.-

Las cuatro primeras extracciones mencionadas, son muy inferiores a la extracción de Albers; al cabo de 48 horas el líquido de extracción y el tejido han constituido una masa viscosa que es sumamente difícil de filtrar; el valor en fosfatasa por ml de extracto no es apreciablemente menor que el extraído con la mezcla de Albers pero la cantidad total de extracto que se puede recuperar es mucho menor; además son mezclas putrescibles y disuelven muchas proteínas tisulares; también disuelven hemoglobina en cantidad suficiente como para dar bastante color al extracto.- En el cuadro N° 3 se pueden apreciar algunas de las diferencias cuantitativas mencionadas.-

La extracción con el líquido de Albers es imputrescible aún en las temporadas de más calor, que en nuestro ambiente exceden los 35°C, pero hay que tomar especial cuidado de efectuar una buena agitación en los primeros momentos en que se mezcla con el tejido. El extracto que se obtiene es de color amarillo, con una ligerísima fluorescencia verdosa y la cantidad es por lo común un poco mayor que la cantidad de líquido de la que se partió.-

En algunas ocasiones se ha notado que también con esta mezcla se obtie

Cuadro N° 3

Comparación de las extracciones obtenidas con mezcla de Albers con las obtenidas con agua y con "buffer" de borato a pH 6,5. Temperatura ambiente (15° - 24°).- Se utilizan N ml de líquido de extracción para N gr de órgano.-

| Líquido de extracción       | U.F./ml. | U.F./mg N | Extracto total ml | U.F. total |
|-----------------------------|----------|-----------|-------------------|------------|
| Extracción durante 48 horas |          |           |                   |            |
| Albers                      | 17,40    | 17,60     | 250               | 4350       |
| Agua                        | 17,00    | 10,33     | 110               | 1870       |
| Extracción durante 72 horas |          |           |                   |            |
| Albers                      | 12,40    | 13,80     | 340               | 4216       |
| Agua                        | 12,50    | 8,30      | 120               | 1500       |
| Extracción durante 48 horas |          |           |                   |            |
| Albers                      | 21,20    | 19,70     | 275               | 5830       |
| Borato (pH 6,5)             | 20,60    | 15,40     | 130               | 2678       |

nen líquidos algo viscosos y que ofrecen algunas dificultades para filtrarlos, pero siempre estas dificultades son mucho menores a las que se presentan cuando la extracción se hace con agua toluolada. La causa más probable de aquellas dificultades con la extracción de Albers debe atribuirse a que el pH, que normalmente oscila entre 5,5 y 6, no desciende en estos casos suficientemente; en esos mismos extractos suele ocurrir también que la desnaturalización de la hemoglobina no se efectúe tan completamente como en condiciones comunes.-

Es frecuente que los extractos sean muy ricos en lípidos; estos lípidos, como lo hemos verificado repetidas veces, no arrastran ninguna fosfatasa por lo cual nos desembarazamos de ellos. Esto se puede hacer muy fácilmente dejando reposar los extractos y refrigerándolos: los lípidos forman una masa sólida y compacta en la parte superior del líquido que se quita con toda facilidad.-

En el cuadro N° 4 se pueden comparar las relaciones de purificación (U.F./mg de N total) de los extractos obtenidos a partir de glándulas en reposo secretorio y glándulas en actividad; se aprecia que en general estas últimas dan valores más elevados que aquellas en reposo, lo que parece indicar que el aumento en actividad fosfatásica es relativamente mayor que el aumento de los componentes nitrogenados que se producen en el proceso de la secreción lactea. Debe recordarse, sin embargo, que estas conclusiones quedan limitadas por las mismas consideraciones que sobre otros factores (especialmente la edad del ani-

Cuadro N° 4

Comparación entre las relaciones de purificación de los extractos obtenidos de glándulas en reposo y en actividad secretoria. Extracción con líquido de Albers.-

| Glándulas en reposo secretorio | Glándulas en actividad secretoria |
|--------------------------------|-----------------------------------|
| U.F./mg N total                | U.F./mg N total                   |
| 2,90                           | 25,0                              |
| 7,80                           | 23.-                              |
| 32,90                          | 23,45                             |
| 15,64                          | 20,9                              |

Los dos últimos valores de las glándulas en reposo son de animales jóvenes ("vaquillonas").-

mal) se hicieron a propósito de la riqueza absoluta en fosfatasa de estos mismos extractos (vease antes).-

#### Concentración de las preparaciones

El extracto crudo anteriormente descripto es precipitado con etanol a 95°C, agregando en la proporción de 1 litro de alcohol para 800 ml de extracto. El conjunto se deja en el refrigerador eléctrico (5 grados) durante toda la noche y al día siguiente se separa por decantación y centrifugación las proteínas precipitadas; generalmente no hay ninguna dificultad en esta centrifugación y las proteínas de un color blanco amarillento se separan perfectamente del líquido sobrenadante; este último, que es muy pobre en fosfatasa, se desecha.-

El precipitado de proteínas se somete a la acción del disolvente para efectuar la elución de la enzima. Hemos estudiado los siguientes solventes: agua destilada, "buffer" de borato sódico (según Sørensen) a pH 9 y el etanol a 25 grados centesimales. En todos los casos hemos empleado una cantidad de disolvente que equivalía a 1/10 del volumen primitivo del extracto, de modo tal, que debía esperarse un aumento en la concentración de la enzima de aproximadamente 10 veces el primitivo. Esta solución de fosfatasa parcialmente purificada la denominaremos EL<sub>1</sub> (elución N° 1). En el cuadro N° 5 presentamos los resultados obtenidos con los diferentes solventes mencionados.-

Puede apreciarse que el etanol de 25° supera a los otros disolven-

Cuadro Nº 5

Comparación del agua destilada, "buffer" de borato a pH 9 y alcohol de 25%, como agentes de elución de la fosfatasa. Se usan N/10 ml de agente de elución para N ml del extracto del cual se parte.-

| Agente elución  | Ext. crudo<br>U.F./mg N | Elución<br>U.F./mg N | Re. xión<br>purificación | Fosfatasa<br>recuperada<br>% |
|-----------------|-------------------------|----------------------|--------------------------|------------------------------|
| Agua destilada  | 7,8                     | 10,9                 | 1,4                      | 75,12                        |
| " " "           | 10,4                    | 14,2                 | 1,5                      | ---                          |
| "Buffer" borato | 4,3                     | 11,0                 | 2,5                      | 80,2                         |
| Etanol 25%      | 11,3                    | 275,8                | 24,4                     | 90,5                         |
| " " "           | 18,02                   | 267,0                | 14,8                     | ---                          |
| " " "           | 23,0                    | 320,0                | 14,1                     | 68,0                         |
| " " "           | 15,64                   | 268,60               | 17,2                     | 82,0                         |
| " " "           | 20,9                    | 376,2                | 18,0                     | 79,3                         |
| " " "           | 23,45                   | 361,13               | 15,4                     | 83,3                         |

tes ensayados por nosotros, en la elución de la fosfatasa precipitada. Debe observarse que el título del alcohol que eluye se eleva en contacto con el precipitado que es más rico en etanol; por eso no hemos usado etanol de 30% o 35% en los cuales es soluble la fosfatasa alcalina: de partirse de alcohol de esa graduación, al elevarse ésta en contacto con el precipitado la solubilidad de la enzima disminuye y las recuperaciones no son satisfactorias.-

En algunas ocasiones hemos desecado el precipitado antes de eluirlo con el etanol; esta manera de proceder resulta muy cómoda pues permite almacenar enzima y usarla en el momento oportuno. Tiene sin embargo como inconveniente que las recuperaciones son inferiores a las que se consiguen cuando las eluciones se efectúan inmediatamente. Tenemos registrados dos ejemplos: una precipitación efectuada el 24/ XI/ 1941 fué desecada al aire y sobre CaCl<sub>2</sub> y luego estacionada hasta el 3/ II/ 1942, vale decir, durante 71 días. Al cabo de ese tiempo se efectuó la elución en alcohol de 25% y se recuperó el 45 % del valor en fosfatasa del extracto crudo del cual se partió. En otro ejemplo, precipitado el 28/ I/ 1942, fué desecado y eluido posteriormente el 8/ IV/ 1942 recuperándose el 48 % de la fosfatasa inicial. Se aprecia que ambas recuperaciones son inferiores a las registradas en el cuadro anterior, de experiencias en las cuales las eluciones se efectuaron inmediatamente.-

Al llegar a este punto interesa hacer notar la llamativa diferencia que existe entre el comportamiento de los precipitados de extractos renales y los de la glándula mamaria. En los primeros, al disolver el precipitado enzimá

tico se recupera una cantidad de actividad fosfatásica que habitualmente dobla o triplica la del extracto crudo del que se parte (Albers, Marsal). Esto no puede explicarse si no es admitiendo que la purificación elimina un inhibidor el que, a juzgar por los resultados de su acción, es bastante enérgico. En la glándula mamaria, en cambio, no parece que existan tales inhibidores o, si los hay, ellos deben ser de acción muy débil; la posibilidad de que existan no debe ser totalmente descartada, sin embargo, pues las recuperaciones excesivamente buenas que se constatan en el cuadro N° 5 después de un tratamiento enérgico de las proteínas, como es de la precipitación alcohólica, dejan cierto margen para esa suposición.-

### Purificación de las preparaciones

En eluciones repetidas con etanol de 25% después de sendas precipitaciones con distintos agentes, se consiguió mejorar ligeramente la relación de purificación de los preparados, pero en escala ciertamente poco satisfactoria. En vista de ello, resolvimos ensayar las soluciones salinas a diversas concentraciones. Usamos en primer lugar, soluciones de sulfato de amonio y sulfato de magnesio, pero con ninguno de ellos hemos podido elaborar hasta ahora una técnica que diera buenos resultados. Es de hacer notar que en las precipitaciones de fosfatasa con sulfato de amonio la enzima se destruye notablemente: hasta más del 50% en una sola precipitación y por un mecanismo que todavía desconocemos.-

Hemos encontrado, que las soluciones saturadas de acetato de magnesio constituyen un buen agente de elución de la enzima: a la vez que no destruye la fosfomonoesterasa alcalina disuelve cantidades relativamente menores de proteínas inespecíficas.- Por otra parte, el acetato de magnesio posee la ventaja de ser soluble en alcohol de alta graduación lo que nos permite en lo que nos permite en aquellos casos en que es necesario, desembarazarnos fácilmente de las grandes concentraciones salinas.-

La segunda precipitación la efectuamos con acetona. Se probaron las concentraciones de 33, 50 y 60 volúmenes de acetona por cien de solución final; la fosfatasa mamaria frente a esas concentraciones de acetona se precipita paulatinamente, lográndose solo a 50 o 60 vol. % una buena precipitación de aquella.-

Habíamos usado la acetona durante un período de casi dos años sin encontrar ningún inconveniente; últimamente, sin embargo, hemos debido perder algunos preparados porque al ser tratados con acetona se formaba una solución tur-

bia, de apariencia coloidal, de la cual resulta absolutamente imposible precipitar las proteínas. El inconveniente está motivado por defectos de la acetona que se presenta en el comercio y que no siempre se eliminan con una sola destilación pero despues de doble destilación han desaparecido siempre.- Tambien hemos adoptado ultimamente la precaución de refrigerar previamente la acetona y no agitar violentamente en el momento de mezclar el El<sub>2</sub> con la misma.-

El procedimiento definitivamente adoptado, fué el siguiente: la solución de fosfatasa parcialmente purificada ( a la cual anteriormente hemos denominado El<sub>1</sub> ) se precipita con un volumen igual de acetona y se deja durante una noche en el refrigerador. El precipitado proteico - que contiene practicamente toda la fosfatasa - es eluído al día siguiente con la solución saturada de acetato de magnesio cuyo pH se ha ajustado entre 6 y 7; se usa medio volumen de esta solución por cada volumen de El<sub>1</sub> del cual se partió. Obtenemos así una solución de fosfatasa en solución saturada de acetato de magnesio, que llamaremos El<sub>2</sub> (segundo eluído).-

Cuadro Nº 6

Resumen de los resultados del método de purificación. Como norma de las concentraciones se usa: El<sub>1</sub> = N extr. crudo/10. El<sub>2</sub> = N El<sub>1</sub>/2 y El<sub>3</sub> = N El<sub>2</sub>/2

| Extr. crudo<br>U.F./mg N | 1 <sup>o</sup> pp.<br>agente<br>(1) | Elución 1a.                     |                                     | Elución 2a.                     |                                     | Elución 3a.                      |  |
|--------------------------|-------------------------------------|---------------------------------|-------------------------------------|---------------------------------|-------------------------------------|----------------------------------|--|
|                          |                                     | U.F./mg N<br>y agente<br>lución | 2 <sup>o</sup> pp.<br>agente<br>(2) | U.F./mg N<br>y agente<br>lución | 3 <sup>o</sup> pp.<br>agente<br>(3) | U.F./ mg N<br>y agente<br>lución |  |
| ---                      | etanol                              | 301,1 alc.                      | acetona                             | ---                             | etanol                              | 453,3 alc.                       |  |
| 11,3                     | "                                   | 275,8 "                         | "                                   | 400,2 alc.                      | "                                   | 577,0 "                          |  |
| 18,0                     | "                                   | 267,0 "                         | "                                   | 389,2 "                         | "                                   | 477,0 "                          |  |
| 32,2                     | etanol                              | 360,0 alc.                      | acetona                             | 985,0 Mg. <sup>1</sup>          | etanol                              | ---                              |  |
| ---                      | "                                   | 247,2 "                         | "                                   | 716,3 Mg.                       | "                                   | 1504,- Mg. <sup>1</sup>          |  |
| 24,0                     | "                                   | 307,0 "                         | "                                   | 816,2 Mg.                       | "                                   | 2086.- Mg.                       |  |
| 23,45                    | "                                   | 361,1 "                         | "                                   | 866,4 Mg.                       | "                                   | 1800.- Mg.                       |  |
| 15,64                    | "                                   | 268,6 "                         | "                                   | ---                             | "                                   | 2232.- Mg.                       |  |
| 29,7                     | "                                   | 402,9 "                         | "                                   | 996,5 Mg.                       | "                                   | 2480.- Mg.                       |  |
| 34,8                     | "                                   | ---                             | "                                   | ---                             | "                                   | 2609.- Mg.                       |  |

(1) Concentración final: 65 % . (2) Concentración final : 60 % . (3) Concentración final : 85 %.-

(<sup>1</sup>) Mg significa solución saturada de acetato de magnesio.-

La solución  $El_2$  es tratada con un exceso (4 o 5 volúmenes de etanol de 95% refrigerado. Después de 3 o 4 horas las proteínas están bien precipitadas y se pueden centrifugar. El precipitado es luego sometido a la tercera elución, la cual, habitualmente la hemos efectuado de nuevo con solución saturada de acetato de magnesio. En algunos preparados efectuados con fines especiales y que serán descritos en capítulos posteriores, hemos realizado la segunda y tercera eluciones con agua destilada o con alcohol de 25%; el valor de estos preparados es siempre menor a los obtenidos con solución saturada de acetato de magnesio.-

En el cuadro Nº 6 se resume la marcha del método descrito y los resultados obtenidos con el mismo. A los efectos de poder establecer comparaciones con el método de las sucesivas eluciones en alcohol de 25% damos también los resultados obtenidos con tres de estas preparaciones.-

#### LA EFICACIA DEL METODO DE PURIFICACION PROPUESTO

Es difícil comparar la eficacia de los métodos de purificación propuestos por los distintos autores porque generalmente no se ha seguido la misma relación para expresar los resultados finales logrados.-

Habitualmente, aquellos autores que han usado o llegan a una solución final en la cual todos los materiales agregados son evaporables, se guían por la relación "U.F./mg peso seco total", y aun así, a pesar de que la relación es la misma, los resultados son difíciles de comparar porque no han usado la misma definición de unidad fosfatásica: tal es, por ejemplo, lo que ocurre con los preparados de Martland y Robison, Albers y Albers, Armstrong, etc.-

Otra manera de expresar los valores de los preparados es relacionando su potencia enzimática con el contenido en proteínas del mismo: "U.F./mg de proteínas". Esta relación, que ha sido muy usada en trabajos con otras enzimas, es la que ha seguido el prof. Marsal para expresar los resultados obtenidos con la fosfatasa renal. Nosotros también intentamos seguirla pero encontramos tales inconvenientes en la precipitación cuantitativa de las proteínas de la glándula mamaria que debimos desistir. Desde entonces hemos usado la expresión "U.F./mg de N total".-

Teniendo en cuenta las limitaciones que nacen de las consideraciones anteriores, puede intentarse establecer parangones entre los diversos preparados de fosfomonoestrasa alcalina que actualmente se disponen. Los preparados de Albers y Albers de 150 U.F./mg contenido seco total y especialmente los del prof.

Marsal de 1458 U.F./mg de proteína, deben ser tenidos junto con los de Armstrong elaborados a partir de materias fecales de perro y con un valor de 185,000 U. K.y A. (1)/gr de contenido seco total, como las preparaciones más puras de esta enzima. Los preparados obtenidos por nosotros a partir de glándula mamaria y con un contenido de 2500 U.F./mg N total deben colocarse muy próximos a los anteriores, pues como veremos más adelante, el valor de 178 U.F./mg contenido seco total ha sido alcanzado por un preparado de 1853 U.F./mg N total que no había sido tratado con acetato de magnesio.-

Si aun fuera posible establecer comparaciones entre dos fosfatasas de distintos tipos, debemos decir que las fosfatasas AI no son las que se han logrado más activas de todas las fosfomonoesterasas de origen animal; en efecto, Kutscher y Panny (1938) refieren haber obtenido preparados de fosfatasa de próstata (tipo AII) de un valor de 467 mg P liberado/ mg contenido seco total (corresponderían a 4670 U.F./con mg. contenido seco total).-

Por lo que a nuestro método se refiere debemos agregar que si se toman en consideración los valores de fosfatasa por gramo de glándula de la cual se parte y se los compara con los valores del preparado final, se verifica una purificación de alrededor de 5000 veces. Si la comparación se hace entre los valores en el extracto crudo y en la elución final, la purificación oscila entre 85 y 100 veces.-

La recuperación final de enzima total es en nuestro método bastante buena: generalmente han oscilado entre el 35 y el 45 % del total determinado en el extracto crudo.-

---

(1).- Unidades King y Armstrong. Para la definición de esta como de otras unidades de actividad fosfatásica vease el "Apendice".-

## Capítulo III

### PROPIEDADES Y NATURALEZA QUIMICA DE LA FOSFOMONOESTERASA ALCALINA

#### ALGUNAS RELACIONES ELEMENTALES DEL PREPARADO PURIFICADO

##### OBTENIDO DE LA GLANDULA MAMARIA

#### Nitrógeno total

La solución final que se obtiene con el método descrito es casi incolora, con un ligero tinte amarillento en los preparados cuyas concentraciones oscilan entre 1000 y 1500 u.F. por ml.-

Se ha procurado establecer mediante la relación porcentual del contenido en nitrógeno total con respecto al contenido seco total si la parte disuelta está constituida exclusivamente por cuerpos de naturaleza proteica. Ignoramos que se haya determinado dicha relación en otros preparados de fosfomonoesterasa alcalina; ella ha sido determinada, en cambio, en preparados purificados de fosfatasa de próstata ( tipo AII de Folley y Kay ), en las cuales Kutscher y Pany ( 1935 ) encontraron un contenido de N total de 11,7 %, 15,1 %, y 16,4 % con respecto al contenido seco total, pudiéndose apreciar que estos valores concuerdan satisfactoriamente con los que habitualmente se encuentran en proteínas purificadas.-

Nuestras determinaciones se efectuaron en cuatro preparados obtenidos con el procedimiento descrito en el capítulo anterior, pero luego lavados reiteradamente con alcohol refrigerado hasta quitar el exceso de acetato de magnesio.-

De dichas determinaciones ha resultado que con respecto al "contenido seco total" los valores porcentuales del nitrógeno oscilan entre 8 y 10.5 ( cuadro N° 7 ), los cuales son sin duda más bajos que los que se encuentran generalmente en proteínas simples. Cabe esperar que una mayor purificación aproxime más la mencionada relación a las que se encuentran en estos cuerpos, a semejanza de lo que ocurre con la fosfatasa de próstata. Debe recordarse,

Cuadro N<sup>o</sup> 7

Relaciones entre el contenido seco total y el "nitrógeno total" en preparados purificados de fosfatasa mamaria

| Relación purific. | mg. cont. seco total para 1000 U.F. | mg. de N total para 1000 U.F. | N %   |
|-------------------|-------------------------------------|-------------------------------|-------|
| 1329 U.F./mg. N   | 9.71                                | 0.753                         | 7.75  |
| 1853 U.F./mg. N   | 6.14                                | 0.541                         | 8.77  |
| 1082 U.F./mg. N   | 8.82                                | 0.920                         | 10.36 |
| 1522 U.F./mg. N   | 7.23                                | 0.652                         | 8.99  |

sin embargo, que la fosfatasa AII se comporta como una proteína no escindible por diálisis mientras que la fosfatasa alcalina se divide en dos fracciones bajo la acción de la misma ( vease más adelante ). No debe desecharse la posibilidad de que este distinto comportamiento frente a la diálisis traduzca diferencias en la composición química que también pueden manifestarse por diferencias en las relaciones elementales.-

#### Nitrógeno amínico libre

Parte del nitrógeno se encuentra al estado de N amínico libre y lo hemos dosado en algunos preparados siguiendo la técnica de Sørensen-Henriquez, la cual está basada en la reacción de la formaldehida que bloquea las referidas funciones amínicas y eleva la acidez del medio.-

La relación N total/N amínico libre es aproximadamente característica de cada grupo de proteínas y está aumentada en aquellas que poseen especial riquezas en amino-ácidos diaminados tales como las protaminas o las histonas y en los productos de desintegración hidrolítica de todas las proteínas.-

Los valores encontrados en nuestros preparados no son más altos que los que se encuentran habitualmente y no parecen pertenecer a compuestos en los cuales los diamino-ácidos sean abundantes. He aquí dos ejemplos de nuestras determinaciones:

|     |                           |                 |
|-----|---------------------------|-----------------|
| 1 ) | Relación de purificación: | 1329 U.F./mg. N |
|     | N total para 4840 U. F. : | 3.64 mg.        |
|     | N amínico p. " " " :      | 0.20 mg.        |
|     | N total/N amínico :       | 18.2            |

|     |                           |                 |
|-----|---------------------------|-----------------|
| 2 ) | Relación de purificación: | 1303 U.F./mg. N |
|     | N total para 3000 U. F. : | 2.30 mg.        |
|     | N amínico p. " " " :      | 0.19 mg.        |
|     | N total/N amínico :       | 12.1            |

### Fosfatos y P orgánico

Estudiando los fosfatos inorgánicos en las distintas etapas del método de purificación se constata la presencia de los mismos en el extracto crudo y en el primer eluido, siendo excepcional que se lo encuentre también en el segundo eluido. En cualquier momento que se necesite eliminarlos se lo hace fácilmente agregando solución diluída de amoníaco al cual se le debe agregar en ocasiones soluciones diluídas de alguna sal magnésica. Si la operación se realiza prudentemente sin permitir que se eleve la alcalinidad en el seno del preparado se pueden precipitar prácticamente todos los fosfatos sin pérdidas de actividad enzimática.-

El preparado definitivo nunca requiere este tratamiento pues no contiene cantidades dosables de P inorgánico; con el reductor de Kuttner y Lichtenstein de cloruro estañoso, en presencia de molibdato de sodio apenas se obtuvieron ligerísimos tintes azulados con 1936, 3000 y 3300 U. F..-

El fósforo orgánico, en cambio, acompaña siempre al preparado definitivo y por ello, hemos procurado averiguar si existía una relación aproximadamente constante en distintos preparados, entre los valores de ese tipo de fósforo y el valor enzimático.-

Se ha efectuado esta determinación en tres preparados hasta ahora, siendo difícil multiplicar los ejemplos porque cada determinación exige destruir cantidades relativamente grandes de preparados. Los valores encontrados en dichas determinaciones son los siguientes:

|                               |            |
|-------------------------------|------------|
| 0.0236 mg. de P orgánico para | 1936 U. F. |
| 0.0204 mg. " " " "            | 3000 U. F. |
| 0.0220 mg. " " " "            | 3300 U. F. |

Estos resultados son de una gran constancia dentro de los amplios límites de determinaciones de esta naturaleza y permiten suponer que el fósforo dosado está probablemente involucrado dentro de la reacción que produce el efecto fosfatásico.-

### Presencia del azufre

También se ha verificado la presencia de azufre no oxidado en nuestros preparados, pero no se ha dosado. La reacción del nitroprusiato sódico por medio de la cual se revela presencia de grupos sulfhidrúlicos libres, ha resultado negativa en diversos preparados. Debe recordarse aquí que Giri ( 1938 ) ha sugerido que algunos compuestos del tipo cisteína o glutatión actúan en el seno de los tejidos o en algunos extractos tisulares impurificados como protectores de la fosfatasa. Seguramente en nuestros preparados estos compuestos no existen.-

### ESTABILIDAD DEL PREPARADO DE FOSFATASA MAMARIA

En condiciones adecuadas de concentración, pH y temperatura, la fosfomonoesterasa alcalina se ha revelado como una enzima particularmente estable.-

M. Covello estudió las condiciones de estabilidad de los preparados obtenidos por los métodos de Forrai, Ertmann y Albers encontrando que este último es el que se conserva mejor al cabo de un año, tiempo en el cual pierde relativamente muy poca actividad.-

El preparado obtenido en las condiciones de acidez y concentraciones que se han establecido para purificar la fosfatasa de la glándula mamaria permanece inalterado durante largo tiempo; una solución valorada el 27/IX/41 que poseía 849 U. F./ml y otra valorada el 14/XII/41 con 780 U.F./ml. fueron estacionadas en el refrigerador y nuevamente tituladas ambas el 30/VII/42, vale decir 10 y 7 meses más tarde y se encontraron prácticamente de los mismos valores iniciales respectivos.-

Alejada de estas condiciones óptimas de conservación, la enzima puede ser rápidamente destruída. Un hecho revelador de la labilidad en condiciones desfavorables de concentración de hidrogeniones fué puesto de manifiesto por Martland y Robison ( 1929 ); estos autores estudiando la curva de pH óptimo de una preparación de fosfatasa ósea, encontraron que aquella variaba cuando las determinaciones se hacían en distintos períodos de tiempo. Así, si se hace actuar la enzima durante 24 horas se obtiene una curva que revela un pH óptimo extendido entre pH 8.4 y 9.4, pero si las mediciones se efectúan en períodos de tiempo mucho más cortos la zona óptima se traslada hacia el lado de la alcali-

nidad y, además, se hace mucho más restringida.-

De esas experiencias dedujeron los autores que el pH óptimo está parcialmente condicionado por la estabilidad de la enzima, la cual se hace mucho más labil a medida que desde pH 8.4 se traslada hacia la alcalinidad. Posteriormente el fenómeno de la inactivación fué corroborado por medios directos tanto en medio ácido como en el alcalino.-

#### La acción de las modificaciones del pH sobre la fosfatasa mamaria

La estabilidad de la fosfatasa mamaria en relación con las modificaciones del pH fué estudiada por Folley y Kay en preparados muy diluídos a los cuales estacionaron durante 2 y 3 horas a temperatura de 37°C. Encontraron una zona entre pH aproximadamente de 6.5 a 9 en la cual la enzima mantiene prácticamente su actividad completa al cabo de dos horas, pero en experiencias de tres horas de duración, se marcaba ostensiblemente una zona más restringida de pH alrededor de 7.-

En nuestras determinaciones se han conservado preparaciones mucho más concentradas, cuyos valores iniciales eran ligeramente superiores a 100 U.F. por ml.-

Se usaron preparaciones relativamente concentradas con el objeto de aprovechar la mayor estabilidad de esas soluciones pues deseabamos seguir también el curso de la inactivación con relación al tiempo. Además, por las consideraciones que se verán más adelante, teníamos interés en estudiar el enturbiamiento del medio, lo cual no es posible hacer en soluciones purificadas y diluídas debido a la escasa cantidad de material que contienen.-

Las soluciones se mantuvieron en mezclas tampones de veronal y acetato de sodio adicionada de tolueno al 10 %, y a la temperatura de 34°C. Las determinaciones de pH se hicieron al comenzar las experiencias y al terminar notándose pequeñas variaciones con desplazamientos que en todos los casos tendían hacia la neutralidad.-

En el cuadro N° 8 se anotan los resultados de las determinaciones del valor fosfatásico de las soluciones conservadas a los distintos pH, efectuadas dentro del término de 9 días. En la figura N° 4 se aprecia el valor porcentual de la actividad que restaba al término de dicho período de tiempo, con

Cuadro Nº 8

Estabilidad de la solución purificada de fosfatasa mamaria diluida al 1/5 del valor original. Temperatura de conservación 34°C. Medio de dilución, "buffer" de veronal adicionado de tolueno al 10 %. En las determinaciones: temperatura 37°C y pH 9.0 - 9.1.-

| pH (°)  |      |      |      |      |      |      |                   |      |      |      |      |      |      |      |
|---|------|------|------|------|------|------|-------------------|------|------|------|------|------|------|------|
|   | 9.04 | 8.86 | 8.66 | 8.30 | 8.28 | 8.19 | 7.94 <sup>2</sup> | 7.50 | 6.90 | 6.05 | 5.45 | 5.07 | 4.66 | 4.15 |
| mg. de fósforo liberado por 1 ml. de solución |      |      |      |      |      |      |                   |      |      |      |      |      |      |      |
| 0   | 11.6 | 11.3 | 11.2 | 8.6  | 9.0  | 9.0  | 9.1               | 9.1  | 9.2  | 9.2  | 8.8  | 8.0  | 7.1  | 6.8  |
| 1   | ---  | --   | 10.3 | 8.9  | 9.2  | 9.1  | 9.9               | 10.0 | 10.1 | 10.0 | 8.0  | 4.1  | --   | --   |
| 2   | 1.6  | 2.8  | 8.9  | 9.0  | 10.0 | 10.0 | 10.2              | 10.2 | 10.2 | 10.0 | 7.5  | 3.6  | 2.1  | --   |
| 4   | --   | 1.4  | 6.8  | 7.5  | 8.7  | 9.6  | 10.0              | 10.0 | 10.1 | 9.9  | 5.9  | 3.0  | 1.9  | --   |
| 6   | --   | --   | 4.8  | 7.0  | 8.3  | 9.0  | 9.9               | 9.8  | 10.0 | 9.4  | 4.6  | 2.0  | --   | --   |
| 9   | --   | --   | 3.0  | 6.7  | 7.8  | 8.7  | 9.4               | 9.5  | 9.8  | 9.2  | 3.8  | 1.6  | 0.6  | --   |
| %<br>Fi-<br>nal                               | --   | --   | 26.4 | 77.6 | 85.8 | 95.7 | 103               | 103  | 106  | 100  | 44.2 | 20.3 | 8.3  | --   |

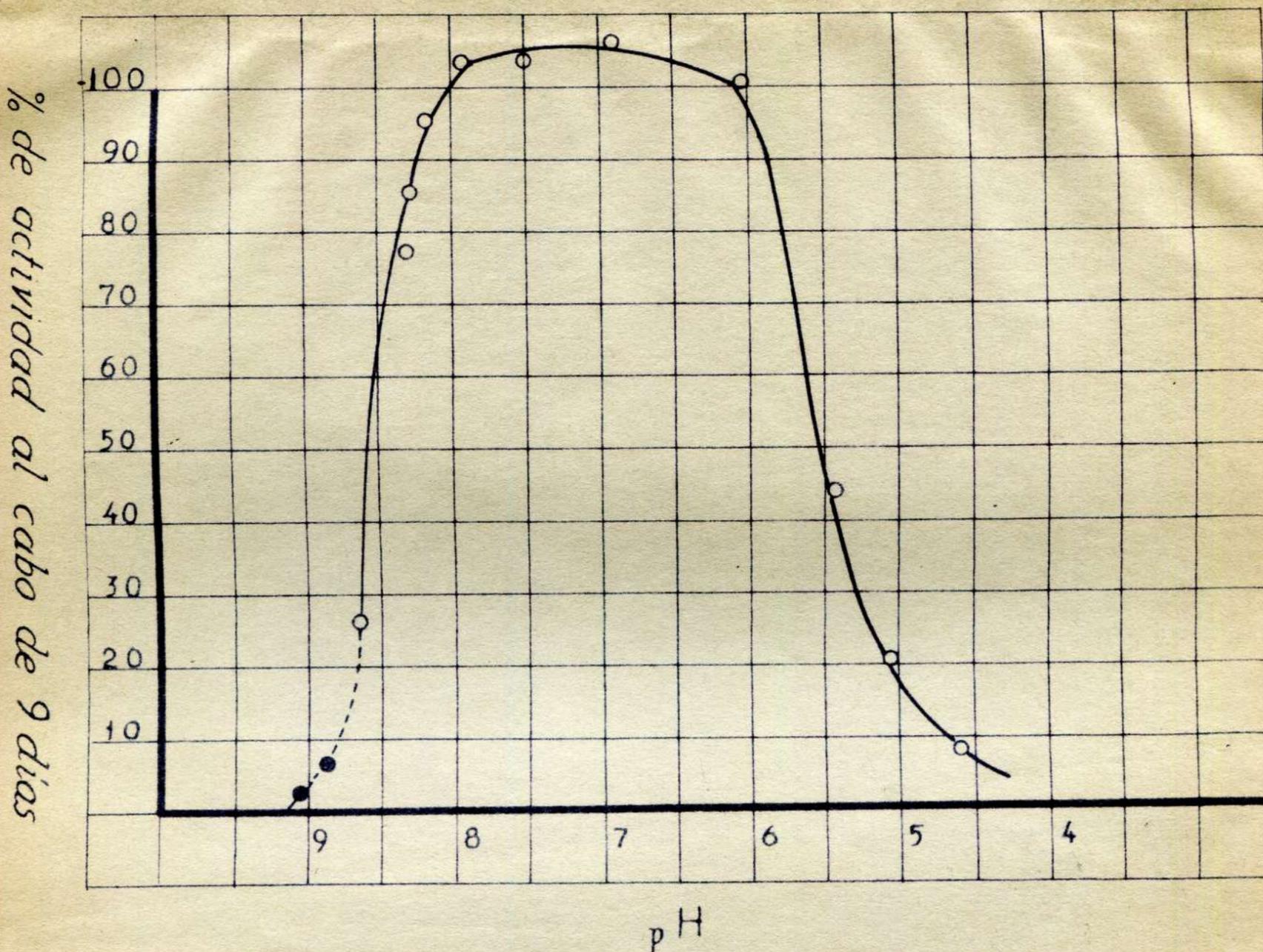
(2) Determinaciones efectuadas al comienzo de la experiencia. En las efectuadas al cabo de 9 días se observaron pequeños desplazamientos hacia el lado de la neutralidad, tanto en los tubos ácidos como en los alcalinos.-

respecto al valor inicial.-

La actividad se mantiene constante entre pH 8 y 6 disminuyendo bruscamente la estabilidad al exceder estos límites; la disminución es continua y progresiva pero no obedece las cinéticas de las reacciones de primer ni de segundo orden, lo cual indica que los mecanismos responsables del fenómeno deben ser de índole complejas.-

La turbidez del medio al primer día de estacionamiento era francamente mayor en los preparados puestos en medios ácidos - hasta pH 5.45 - que en

Figura Nº 6



Resto de actividad fosfatásica de soluciones conservadas a distintos pH y 34° C de temperatura, durante 9 días.- Valores porcentuales con respecto a la actividad inicial.-

todos los otros, pero luego fueron paulatinamente enturbiándose los demás y de manera muy uniforme.-

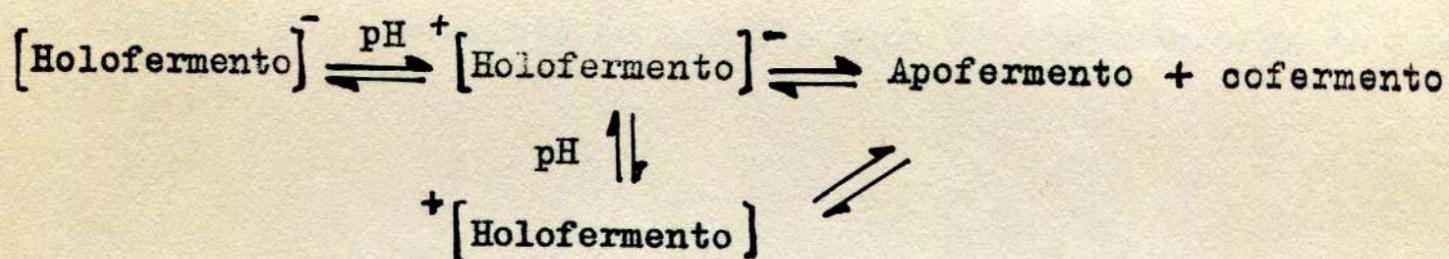
#### Interpretación de los fenómenos de inactivación

Albers, Beyer, Bohnenkamp y Müller ( 1938 ) han estudiado detenidamente las condiciones de estabilidad de preparados purificados de fosfomonoesterasa alcalina de riñón, relacionándola con la hipotética naturaleza compuesta de la enzima.-

Son de opinión los mencionados autores que las modificaciones del pH en el medio en el cual la enzima se conserva son capaces de hacer cambiar las

cargas eléctricas de su parte proteica. Esta, a la cual se denomina "apofosfatasa", en medio alcalino actúa al estado de anión, pero puede pasar sucesivamente al estado de "zwitterion" y al de catión por descenso gradual del pH del medio.-

Las dos partes constituyentes de la enzima activa, la apofosfatasa y la cofosfatasa, tenderían a separarse cuando la primera se encuentra en los estados de "zwitterion" y de catión, lo cual, a su vez, daría lugar a la inactivación. He aquí el esquema del proceso:



El estado de "zwitterion", ( es decir, con carga positiva y negativa simultáneamente ) corresponde a la enzima disuelta entre el pH 5 y 6, lo que coincide con la zona en la cual se encuentra generalmente el punto isoelectrico de las proteínas.-

Aportan datos en apoyo de esta interpretación de la curva de inactivación los dos hechos siguientes: 1º. Es posible recuperar parcialmente la actividad de los preparados inactivados en medio ácido, ( siempre que no se excedan ciertos límites de acidez y que la permanencia no se prolongue demasiado ) lo cual demostraría la reversibilidad del proceso y 2º, la curva de turbidez estudiada por los mismos autores; esta curva adopta una imagen especular con respecto a la de estabilidad, es decir, la turbidez es máxima en las zonas de mínima estabilidad, lo que concuerda con la hipótesis de que la inactivación se hace en condiciones isoelectricas en las cuales las proteínas disminuyen su solubilidad.-

A los resultados obtenidos en nuestras experiencias con preparaciones de glándula mamaria se pueden adaptar solo parcialmente las conclusiones de Albers y sus colaboradores. No se ha confirmado, en primer término, que el pH de acción óptima coincida con el de máxima estabilidad, si no que por el contrario a dicho pH ocurre una destrucción rápida de la enzima; probablemente en la zona en que por las particularidades del grupo activo se manifiesta el óptimo de su acción debe ocurrir un proceso desnaturizante de la parte protéica del complejo enzimático, que lleva a la inactivación del mismo.-

La curva de turbidez poca importancia puede tener por el momento puesto que no hay ninguna razón para suponer que la parte que precipita de los preparados sea en realidad fosfatasa. Algunas de nuestras soluciones en las cuales se percibía un franco enturbiamiento no disminuyeron su actividad, lo cual demuestra que la desnaturalización ha correspondido más bien a las proteínas inespecíficas.-

Nuestra experiencia coincide, sin embargo, con la opinión de Albers y colaboradores de que la inactivación en medio ácido, a pH alrededor de 5, se cumple en concordancia con una tendencia del complejo a disociarse en 2 partes constitutivas que se reactivan mutuamente al unir las a un pH más elevado; es así, en efecto, que nuestros intentos de separación ( vease capítulo IV ) se han cumplido más satisfactoriamente en aquella zona de concentración de hidrogeniones.-

#### LA CONSTANTE DE DISOCIACION DE LA FOSFATASA

El comportamiento de una enzima que modifica paulatinamente su actividad como respuesta a las modificaciones en la concentración de hidrogeniones del medio en que actúa, la asemeja a un electrolito débil que frente a las mismas variaciones de pH responde aumentando o disminuyendo su grado de disociación.-

Esta analogía sugirió a Michaelis que la actividad enzimática debía estar en relación con el grado de disociación de sus moléculas, sean ellas ácidos débiles, bases débiles o cuerpos con propiedades anfóteras. En aquellos casos en que actúa como ácido o base débil la actividad está necesariamente ligada a la parte disociada de la molécula o al resto no disociado de la misma, pero en aquellos otros casos en que actúa como un anfólito su actividad puede estar ligada a la molécula disociada como ácido, como base o, también, en aquel grado preciso de disociación que corresponde a su punto isoeléctrico.-

Aceptada la analogía mencionada, es posible determinar la constante de disociación de una enzima, basándose en una coincidencia matemática que existe entre el valor de dicha constante y el valor de la concentración de hidrogeniones necesaria para que el mismo electrolito se encuentre con la mitad de sus moléculas disociadas ( grado de media disociación ).-

La demostración de la existencia de dicha coincidencia se realiza muy sencillamente en el caso de un electrolito débil. Se tiene, por acción de masas que el producto de la concentración de iones de hidrógeno  $H^+$  por la concentra-

ción de moléculas disociadas [R] constituyen una parte constante de la concentración de moléculas no disociadas [RH]

$$[H] \cdot [R] = K [RH]$$

Si se expresa por T la concentración total del electrolito ( el conjunto de la parte disociada más la no disociada ) se deduce de la expresión anterior

$$\begin{aligned} [H] \cdot [R] &= K ( [T] - [R] ) \\ [H] \cdot [R] &= K [T] - K [R] \\ [H] \cdot [R] + K [R] &= K [T] \\ ([H] + K) [R] &= K [T] \end{aligned}$$

De donde se puede deducir la relación entre la concentración de la parte disociada y la concentración total ( grado de disociación ) en función de la constante de disociación y la concentración de hidrogeniones

$$\frac{[R]}{[T]} = \frac{K}{[H] + K}$$

En esta ecuación se aprecia facilmente que cuando [H] y K son iguales el grado de disociación  $\frac{[R]}{[T]}$  es igual a 1/2.-

Si se supone que una enzima actúa por su parte disociada (2) su actividad será máxima cuando toda la molécula esté disociada y será mitad cuando su grado de disociación sea igual a 1/2. Ahora bien, como para este valor del grado de disociación la concentración de hidrogeniones [H] es igual a la constante de disociación K, por lo que antes se ha demostrado, será suficiente buscar el valor de [H] para la actividad media del máximo posible para que quede determinado el valor de K.-

#### Aplicación a las fosfomonoesterasas alcalinas

Martland y Robison basados en este principio han calculado la constante de disociación de fosfatasa de hueso encontrando un pK de 8.2 y Albers haciendo determinaciones de curvas de pH óptimo para la fosfatasa purificada de riñón

---

(2) Lo mismo vale si actúa por su " resto no disociado ".-

calculó las constantes de disociación de las dos partes de la curva, es decir, la que desciende del lado ácido del punto óptimo y la que desciende del lado alcalino del mismo punto; los valores encontrados fueron de  $2.5 \cdot 10^{-7}$  y  $0.18 \cdot 10^{-7}$  respectivamente.-

Nosotros hemos calculado solamente la constante de disociación de la parte de la curva que está hacia la parte más ácida del punto óptimo porque las experiencias de estabilidad con el preparado purificado demostraron que los resultados de las experiencias en el lado más alcalino están fundamentalmente invalidados por la rápida inactivación que ocurre en esta zona.-

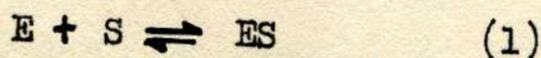
Los resultados obtenidos de 5 curvas de pH óptimo obtenidas en tiempos de incubación de 1 hora y con preparados purificados de glándula mamaria dieron resultados cuyo término medio dan un valor de  $K = 1.87 \cdot 10^{-7}$  y para pK 8.72. Debe notarse ( veanse figuras 1, 2 y 3 ) que los resultados calculados con preparados no purificados dan los mismos valores.-

No puede decirse por ahora en el caso de la fosfatasa si los valores mencionados deben atribuirse a la parte disociada de un ácido débil o al resto no disociado de una base débil, pero como ya hemos dicho el razonamiento aplicado es válido para ambos casos.-

#### LA UNIÓN ENZIMA - SUBSTRATO (CONSTANTE DE MICHAELIS)

Michaelis y Menten en 1913 ( veanse v. Euler y Haldane - Stern ) postularon como mecanismo de acción de las enzimas que estas debían unirse al substrato formando un compuesto de gran tendencia a disociarse. La acción enzimática se cumple gracias a que los productos de esta disociación no son los mismos que aquellos con los cuales se efectuó la síntesis si no que los componentes del substrato se separan del compuesto divididos en los productos finales de la reacción.-

Si se esquematiza la reacción usando como símbolos: E enzima; S = substrato; G y F = constituyentes del substrato, se obtienen las siguientes ecuaciones;



La demostración de que el supuesto (1) es correcto, exige la corroboración experimental de que el curso de la reacción enzimática es dependiente no solo de la concentración de la enzima, sino también de la concentración del substrato.-

Si en la ecuación (1) se consideran las concentraciones, se tendrá de acuerdo a la ley de masas:

$$[S] \cdot ([E] - [ES]) = K_m [ES]$$

donde  $([E] - [ES])$  significa la concentración de enzima libre ( concentración de enzima total menos concentración de enzima unida al substrato ).-

De la ecuación anterior resulta:

$$[ES] = [E] \frac{[S]}{[S] + K_m}$$

y como la velocidad inicial  $v$  del proceso enzimático debe ser proporcional a la concentración de  $ES$ , se tendrá:

$$v = c \cdot [E] \frac{[S]}{[S] + K_m}$$

donde  $c$  es una constante de proporcionalidad.-

Si ahora en una serie de ensayos se mantienen constantes  $c \cdot [E]$  se puede involucrar  $\frac{v}{c \cdot E}$  bajo el valor de  $V$  simplemente y tendremos:

$$V = \frac{[S]}{[S] + K_m}$$

$K_m$  ( la constante de Michaelis ) ha sido investigada para diversas enzimas y se han encontrado valores que satisfacen muy bien la ecuación, dentro de los márgenes de errores tolerables.-

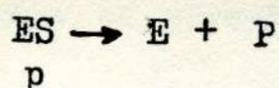
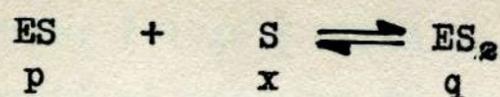
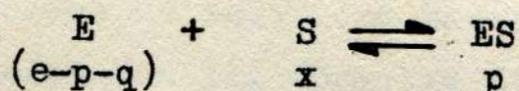
Con esta ecuación se obtiene una curva que se asemeja a la del resto no disociado y en la cual la velocidad se aproxima asintóticamente a un máximo. Esto, sin embargo, no se verifica en todas las enzimas pues en algunos casos, después de alcanzado un máximo, la velocidad vuelve a disminuir si se continúa aumentando la concentración del substrato.-

Para restablecer la concordancia de la hipótesis de Michaelis con estos casos, ha sido necesario suponer ( Haldane, 1930 ) la existencia de dos reacciones sucesivas. La primera de estas reacciones es aquella del tipo arriba descripto y por medio de la cual se reúnen la enzima y el substrato formando un

compuesto ES, de naturaleza lábil y que por lo tanto se escinde con facilidad.-

La segunda de las reacciones tiene lugar cuando el substrato está en exceso; al compuesto ES se le agrega otra molécula de substrato dando origen a ES<sub>2</sub> el cual, al contrario del anterior es un compuesto de naturaleza estable que en lugar de favorecer tiende a disminuir el trabajo de la enzima.-

Las tres reacciones que se producen según el mecanismo expresado se pueden esquematizar en la siguiente forma: ( las letras en minúsculas por debajo de los símbolos que ya hemos usado para la demostración de Michaelis, simbolizan las concentraciones de estos últimos )



P representa los productos de escisión del substrato.-

De acuerdo a la ley de masas:

$$(e-p-q)x = K_1p$$

$$p \cdot x = K_2q$$

de donde

$$p = \frac{ex}{K_1 + x + \frac{x}{K_2}}$$

Puesto que la velocidad, v, de la escisión enzimática depende del complejo ES, ella debe ser proporcional a p. Tendremos entonces:

$$v = cp = \frac{cex}{K_1 + x + \frac{x}{K_2}}$$

donde c es una constante de proporcionalidad.-

y

$$\frac{v}{ce} = \frac{x}{K_1 + x + \frac{x}{K_2}} = \frac{1}{1 + \frac{K_1}{x} + \frac{x}{K_2}}$$

Si en una serie de ensayos se mantiene constante c.e, es condición de la hipótesis de Haldane que se obtengan valores de K<sub>1</sub> y K<sub>2</sub> coincidentes con las determinaciones experimentales.-

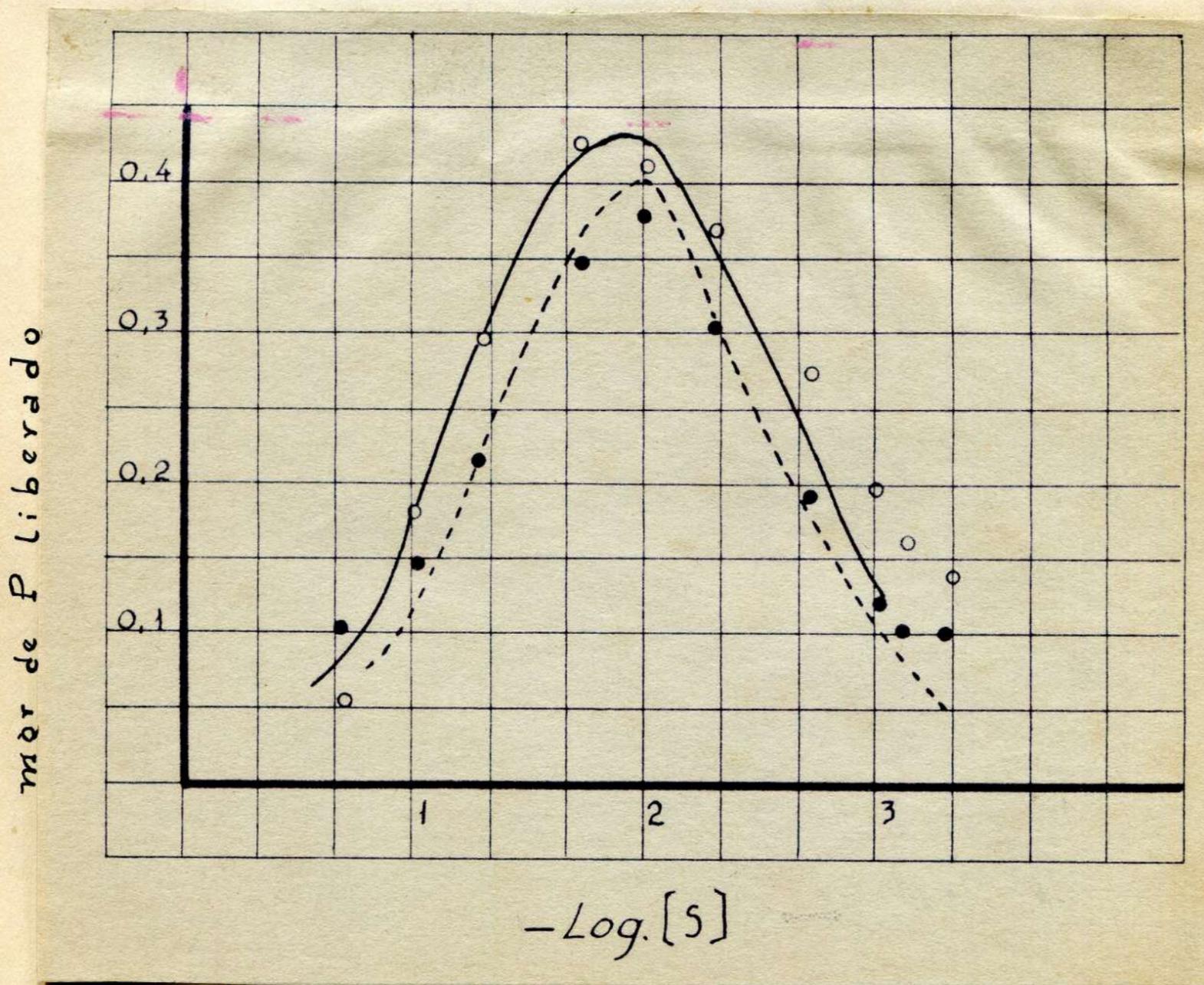
La constante de Michaelis en la fosfatasa alcalina

El primer intento de comprobar si en las fosfomonoesterasas alcalinas se cumplía la hipótesis de Michaelis se debe a Martland y Robison, quienes en 1927 la estudiaron en la fosfatasa ósea; el resultado fué negativo pues no se encontraron si no pequeñas diferencias, irregulares y según los autores no atribuible a los cambios en la concentración del sustrato usado, que fué el beta-glicero-fosfato sódico y en concentraciones que variaron desde 0.3 a 0.003 molar.-

Folley y Kay en 1935 obtuvieron resultados en desacuerdo con los anteriores; realizaron sus experiencias con fosfatasas de riñón y de glándula mamaria y encontraron que las curvas de actividad trazadas en función de la concentración de sustrato coincidían con las fórmulas de Haldane.-

Muy recientemente Sizer ( 1942 ) buscó por otros métodos datos que informaran sobre este tema; estudió el espectro de absorción de la fosfatasa para la luz ultravioleta, en ausencia y en presencia del sustrato, sin encontrar nin-

Figura Nº 7



—○— beta-glicero fosfato de sodio.-  
-●- Fenil-fosfato disódico.-

guna diferencia atribuible a la formación del complejo enzima-substrato. De este hecho, sin embargo, no se puede concluir definitivamente que el mencionado complejo no existe puesto que no hay ninguna razón para atribuir al grupo activo de la enzima la producción de los accidentes que aparecen en el espectrograma en ausencia de substrato.-

Hemos sometido preparados purificados de glándula mamaria a la verificación de la teoría de Michaelis-Haldane, usando como substratos el beta-glicero-fosfato sódico y el fenilfosfato disódico. En el gráfico N° 5 se pueden apreciar los resultados de determinaciones realizadas en incubaciones de 30', a pH 9.1 (determinación colorimétrica) y 37°C, pero en las cuales se modificaron muy ampliamente las concentraciones de los substratos. Las curvas fueron trazadas sobre los valores  $V = \frac{v}{ce} = \frac{1}{1 + \frac{K_1}{x} + \frac{x}{K_2}}$  haciendo valer  $K_1$  0.0045 y

$K_2$  0.017 para la curva de trazados continuos (más próxima a los puntos experimentales encontrados en las determinaciones con el beta-glicero-fosfato sódico) y  $K_1$  0.0083 y  $K_2$  0.015 para la curva con trazos discontinuos (más próxima a las determinaciones con el fenilfosfato disódico).-

La coincidencia de los datos experimentales y la curva teórica es indudable y apoya el punto de vista de que la enzima y el substrato se reúnen en un complejo como etapa previa al fenómeno de la escisión de aquel último y además, también, de que un exceso de substrato da lugar a la formación de un complejo más estable cuya presencia retarda la reacción enzimática.-

#### ACCION DE LA PANCREATINA SOBRE LA FOSFATASA

Con el objeto de informarnos mejor sobre la naturaleza proteica de la fosfatasa alcalina de la glándula mamaria, se la ha sometido a la acción proteolítica de la tripsina. El empleo de las otras enzimas proteolíticas comunmente usadas debió ser descartado por los inconvenientes que ellas presentaban; se sabe, en efecto, que la pepsina requiere para su acción un pH demasiado bajo, incompatible con las condiciones de estabilidad requeridas por la fosfatasa, y la papaína que actúa a pH más conveniente para la conservación de nuestros preparados, no se ha ensayado porque no hemos conseguido un preparado suficientemente activo sin la adición de sus activadores que son los cianuros, y el ácido sulfhídrico; de estos activadores de la papaína sabemos que los cianuros, como se verá mejor más adelante, inhiben energicamente a la fosfatasa y el ácido sulfhí-

drico, aunque de acción menos probada, es posible que también sea un inhibidor de la misma.-

La acción de la tripsina no ha sido todavía ensayada sobre preparados purificados de fosfatasa alcalina, aunque desde tiempo atrás Ehrensvard ( 1933 ) sometía a sus extractos a la acción de aquella enzima en un procedimiento de purificación de la fosfatasa intestinal y aprovechaba así la resistencia relativamente grande de la misma en comparación de las otras proteínas del extracto. Ha sido estudiada, en cambio, en preparados muy purificados la fosfatasa de próstata ( tipo AII de Folley y Kay ) por Kutscher y Pany ( 1935 ) quienes encontraron que la actividad de la misma es sumamente resistente a la acción proteolítica de la tripsina.-

En nuestras experiencias hemos estudiado la acción de un preparado de pancreatina comercial ( Merck ), sobre una solución  $El_3$ , eluída en agua y al 1/5 de la concentración original : esta solución liberaba 16.6 mg. de fósforo en 30 minutos.-

Cuadro Nº 9.

Acción de un preparado de pancreatina sobre la fosfatasa en solución acuosa. La mezcla de las dos enzimas se ha estacionado a 34°C y a pH 8.0.-

| Tiempo horas         | SOLUCION DE FOSFATASA |       |                       |       | Solución de caseína NaOH' |
|----------------------|-----------------------|-------|-----------------------|-------|---------------------------|
|                      | Pancreatina activa    |       | Pancreatina calentada |       |                           |
|                      | U.F./ml. <sup>2</sup> | NaOH' | U.F./ml. <sup>2</sup> | NaOH' |                           |
| 0                    | 166.5                 | 6.5   | 166.5                 | 6.5   | 3.4                       |
| 16                   | ---                   | 9.0   | ---                   | 6.7   | 16.8                      |
| 22                   | 153.3                 | ---   | 164.4                 | ---   | ---                       |
| 24                   | ---                   | 9.9   | ---                   | 6.7   | 25.0                      |
| 39                   | 134.4                 | 13.1  | 160.0                 | 7.0   | 27.2                      |
| % final en fosfatasa | 80.7                  | ---   | 96.2                  | ---   | ---                       |

2). Las determinaciones de fosfatasa fueron efectuadas en períodos de incubación de 30 minutos.-

1). ml. de solución 0.02 N de hidróxido de sodio ( vease texto ).-

La actividad proteolítica de la pancreatina fue controlada sobre la misma solución de fosfatasa y sobre una solución de caseína al 5% y a pH 8, en experiencias que se realizaron simultáneamente. Para efectuar este control se utilizó el método de Sørensen, esto es, el bloqueo de las funciones amínicas li-

bres por el formaldehído y con posterior titulaci3n alcalimétrica de los restos ácidos que quedan en exceso a consecuencias de dicho bloqueo. En el cuadro N<sup>o</sup> 9 el progreso de la acci3n específicamente proteolítica se expresa por la cantidad de NaOH 0,02 normal necesaria para neutralizar estas funciones ácidas.- Tambien se descartó cualquier posible acci3n inespecífica del preparado de pancreatina realizando un testigo con una fracci3n de la misma inactivada por calentamiento a 100<sup>o</sup> C durante 15 minutos.-

Comparando la acci3n de la misma cantidad de pancreatina activa sobre la soluci3n de caseína y sobre la soluci3n de fosfatasa puede verse que existe un exceso de pancreatina para el efecto producido sobre esta última y sin embargo la disminuci3n de la actividad fosfatásica alcanzó al cabo de 39 horas, solo al 19,3 % del valor inicial, lo que revela la gran resistencia de la fosfomonoesterasa alcalina a la acci3n proteolítica de la tripsina.-

Debe insistirse sin embargo, en que la disminuci3n se debe a la acci3n específica de la tripsina, pues en la soluci3n sometida a la acci3n de la pancreatina calentada la disminuci3n ha sido mucho menor ( 3,8 % ), y ella además, por ser progresiva e ir acompañada de un ligero aumento de la funciones amínicas libres, debe atribuirse a restos de actividad proteolíticas que no han sido totalmente destruidos.-

#### PRECIPITACION DE LA FOSFATASA POR LAS SOLUCIONES DE SULFATO DE AMONIO

Desde que se poseen preparados purificados de fosfatasa alcalina se intenta por diversos métodos precisar la naturaleza química de la enzima, y puesto que la parte cuantitativamente más importante de todos los preparados hasta hoy obtenidos corresponden a cuerpos proteicos, se ha procurado ubicar a la fosfatasa dentro de alguna de las clases de proteínas conocidas.-

Debe incluirse en estos intentos la determinaci3n del peso molecular de la fosfatasa renal efectuada por H. y E. Albers en 1935. Estos investigadores usaron el método de v.Euler de la "libre difusi3n", mediante el cual basándose en la comparaci3n de la velocidades de difusi3n de una substancia con actividad específica con otra cuyo peso molecular es conocido, es posible determinar el peso molecular de aquella aunque no esté perfectamente purificada. Usaron un preparado de 8,3 U.F. por mg. de peso seco total y con él encontraron un peso molecular cuyos valores oscilan entre 6000 y 10.000.-

Estas determinaciones de peso molecular efectuadas con un preparado muy escasamente purificado y que han dado un valor inesperadamente bajo, son apoyadas por las experiencias de Cetrángolo (1939) quien encuentra que la actividad fosfatásica corresponde a un cuerpo con las propiedades de una proteosa.-

No completamente concordantes con esta hipótesis son los estudios de precipitación con soluciones de sulfato de amonio comunicados por los mismos H. y E. Albers; la fosfatasa es precipitable parcialmente por solución semi-saturada de sulfato de amonio y casi completamente por las soluciones saturadas de la misma sal y como esto difícilmente acontecerá con un cuerpo de tan bajo peso molecular, los autores han debido suponer que bajo la acción de las sales las partículas de fosfatasa disminuyen su grado de dispersión. Cattaneo (1938) por otra parte, en trabajos de fraccionamiento del suero sanguíneo encuentra que la fosfatasa se asocia a la fracción albumínica, lo que como se ve, está de acuerdo con las experiencias de precipitación de los Albers.-

Finalmente, la conclusión de que esta actividad enzimática corresponde a una globulina ha sido apoyada por diversos investigadores. Esta es la opinión de D. Albers (1940) después de analizar los efectos de la luz ultravioleta y los rayos Röntgen sobre preparados en distintos grados de pureza y la de Kraemer, Weil, Sanigar y Allen (1941) quienes efectuaron investigaciones en la ultracentrífuga con celdas de partición perpendicular a la dirección de sedimentación y con las cuales se evita que la solución se mezcle cuando la ultracentrífuga se detiene. Con el auxilio de este dispositivo encontraron que la fosfatasa del plasma de la rata sedimenta con lo que ellos llaman la fracción proteica principal y especialmente junto a las globulinas.-

También se inclinan en este sentido las investigaciones de Sizer (1942) quien ha estudiado el espectro de absorción ultravioleta de las fosfatasas de intestino y riñón de bovino; encuentra que la curva de absorción recuerda la de una proteína típica y perteneciente al grupo globulínico.-

Una importante contribución de Kabat (1941) parece contradecir que la fosfatasa se trate de un cuerpo de alto peso molecular y aclara el valor relativo de todas aquellas investigaciones cuyas conclusiones están supeditadas no solo a la naturaleza de la enzima específica sino también a las de las proteínas inespecíficas que la acompañan y que pueden tener adsorbida a la fosfatasa y comunicarles sus propiedades. Este autor encuentra que si se ponen a extraer 10 riñones de ratones divididos en dos partes iguales y en condiciones tales que

una de estas fracciones no sufra la autólisis mientras la otra si, en la primera fracción la fosfatasa sedimenta por una ultracentrifugación de 17.000 revoluciones por minuto, mientras que en la fracción que ha sufrido autólisis no sedimenta fosfatasa a esa velocidad. Deben interpretarse tales experiencias en el sentido de que la autólisis ha liberado a la fosfatasa de un material de alto peso molecular, sedimentable a 17.000 revoluciones por minuto y que arrastra a la fosfatasa en los preparados no autolizados.-

Acción del sulfato de amonio sobre el preparado purificado de  
fosfatasa mamaria

Hemos sometido nuestros preparados purificados a la acción precipitante del sulfato de amonio. Las primeras experiencias fueron efectuadas con  $\text{Et}_3$  y dieron resultados muy imprecisos porque el etanol que tiene este preparado, aunque de baja concentración, precipita el sulfato de amonio; sucede en estas circunstancias que al agregar un volumen de solución saturada de sulfato de amonio a un volumen de  $\text{Et}_3$  el líquido se divide en dos capas entre las cuales se deposita un precipitado blanco que está parcialmente compuesto por proteínas y por sal inorgánica.-

Cuadro Nº 10

Precipitación de la fosfatasa mamaria por el sulfato de amonio. La enzima ha sido mantenida 1 hora a la concentración salina indicada y luego centrifugada. Las operaciones han sido realizadas a temperatura ambiente.-

| Concentración en $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ | FOSFATASA             |                 | pH en la determinación | Recuperación total % |
|---|-----------------------|-----------------|------------------------|----------------------|
|   | Solución sobrenadante | Precipitado (1) |                        |                      |
| 0   | 1712,0                | 0,0             | 8,90                   | 100,0                |
| 1/2 saturación                                | 969,6                 | 0,0             | 8,92                   | 56,5                 |
| 1/1 saturación                                | 0,0                   | 900,2           | 8,89                   | 52,5                 |

(1).- Lavado 1 vez con la solución de sulfato de amonio con la cual había sido previamente tratado.-

Para evitar este inconveniente hemos precipitado una vez más el  $\text{El}_3$  y el precipitado, luego de centrifugado se desecó en vacío y a la temperatura ambiente, con el objeto de eliminar todo rastro de alcohol. Una vez conseguido esto último se redisolvió la enzima en la mitad del volumen primitivo de agua destilada, con lo cual se obtuvo una solución cuyo valor era de 1600 U.F./mg N, habiendo desmejorado solo muy poco la relación de purificación.-

Puede apreciarse en el cuadro Nº 10 que la mencionada solución de fosfatasa no es precipitada por el sulfato de amonio a media saturación si no que requiere saturación completa de esta sal para ser precipitada.-

También se puede apreciar que la sal provoca una destrucción energética de la enzima, pues la recuperación es muy baja (recuperación sumada del líquido sobrenadante y el precipitado). Esta destrucción no es debida a que la solución concentrada de sulfato de amonio lleve el medio a un pH desfavorable a la estabilidad de la fosfatasa, como lo hemos probado en una precipitación en que se efectuó en el medio óptimo de conservación de la enzima. (Cuadro Nº 11)

Cuadro Nº 11

Precipitación de la fosfatasa mamaria por el sulfato de amonio. La enzima ha sido mantenida durante 1 hora a la concentración salina indicada y luego centrifugada. Operaciones a temperatura ambiente.-

| Concentración en $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ | pH de la mezcla | Fosfatasa             |             | pH en la determinación | Recuperación total % |
|---|-----------------|-----------------------|-------------|------------------------|----------------------|
|   |                 | Solución sobrenadante | Precipitado |                        |                      |
| 0   | --              | 1760,0                | 0,0         | 8,4                    | 100,0                |
| 1/2 satur.                                    | 7,9             | 1095,8                | 0,0         | 8,4                    | 62,3                 |
| 2/3 "   | 7,6             | 766,2                 | 32,0        | 8,3                    | 45,4                 |
| 1/1 "   | 7,2             | 0,0                   | 600,0       | 8,3                    | 34,4                 |

Indudablemente estas experiencias efectuadas con fosfatasa purificada obtenida de la glándula mamaria no apoyan la opinión de que se trata de una globulina, si no de un tipo de proteína que precipita a una concentración mayor de sulfato de amonio, sea ella una albúmina u otra molécula de menor magnitud.-

EL ESPECTRO DE ABSORCION ULTRAVIOLETA DEL PREPARADO PURIFICADO  
DE FOSFATASA MAMARIA

El análisis espectrográfico ha aportado información de gran valor para el conocimiento de la constitución de las enzimas, adelantándose frecuentemente a las posibilidades de otros métodos que requieren mayores cantidades de materiales para poder preacticarse.-

Las enzimas están constituidas por proteínas simples o compuestas y el espectrograma suele revelar modificaciones que permiten colocarlas dentro de uno u otro de estos grupos. Así, por ejemplos, la curva de absorción de la pepsina (Lavin y Northrop, 1935) o de la papaína (Fruton y Lavin, 1939; Darby, 1941) reproducen curvas de proteínas simples con una banda de absorción ultravioleta, mientras que la catalasa (Stern y Lavin, 1938) o el fermento amarillo (Haas, 1938) dan formas de curvas en las cuales diversos accidentes correspondientes al nucleo prostético se agregan al del componente proteico.-

No hay razones por el momento que permita afirmar que la fosfatasa alcalina ha sido completamente aislada de toda substancia inespecífica; ello no obstante, el hecho de que se posean preparados muy purificados en comparación con los materiales de los cuales se parten y en concentraciones tales que permiten el estudio espectrográfico de los mismos, ha llevado a que se efectuara esta investigación.- En 1942 Sizer ha estudiado el espectro de absorción de un preparado de fosfatasa intestinal y encontró que el espectro corresponde a una globulina que tiene una zona de absorción máxima para una longitud de 278 u, mínima a 253 u y con una zona de "absorción final" por debajo de los 263 u.-

La investigación planeada por nosotros fué emprendida con vistas a aportar dos tipos de informaciones. La primera de ellas consistía en averiguar hasta que punto, en el estado actual de nuestros conocimientos de la fosfatasa, podrían atribuirse a esta enzima las modificaciones halladas en el espectrograma. Aún cuando todavía no se podrá resolver definitivamente este problema conque se pueda hacer una selección de posibilidades mediante el estudio comparativo de preparados en distintos grados de purificación; es razonable, en efecto, que un accidente cualquiera que acentúe su importancia en el espectrograma a medida que los preparados se purifiquen se podrá atribuir con más probabilidades de verosimilitud a la fosfatasa en sí, que aquellos accidentes que se compor.

ten en forma inversa, es decir, que se eliminen paulatinamente a medida que los preparados se purifican.-

La otra información que planeabamos obtener de este trabajo, derivan del estudio intrínseco del preparado más purificado.-

### Métodos espectroscópicos.-

Se usaron dos espectrógrafos de cuarzo A. Hilger. Las fotografías de la figura 8 fueron obtenidas con el modelo N° E 4302/26210; las de la figura 9 se obtuvieron con un modelo más pequeño, N° E 37301/26214, y se hicieron con el objeto de descartar cualquier modificación en el extremo ultravioleta que pudiera pasar desapercibida en el modelo anterior a causa de la distancia relativamente grande que en él hay desde la fuente luminosa hasta la placa.-

Como fuente de luz se usó la descarga en un tubo de hidrógeno a presión reducida con electrodos de aluminio. Se utilizaron placas "Ilford S.R. Panchromatic H y D 400" y "Eastmann Spectroscopic plates" tipo III, ambas con anti-halo.-

El estudio del ennegrecimiento relativo en las distintas zonas de los espectros se hizo con un microfotómetro - fotoeléctrico (C. Zeiss) en el cual se registra directamente la curva de absorción (figura 10). El ennegrecimiento está dado, como es sabido (vease Loyarte, Carratalá y Vucetich, 1941), por una expresión de la forma

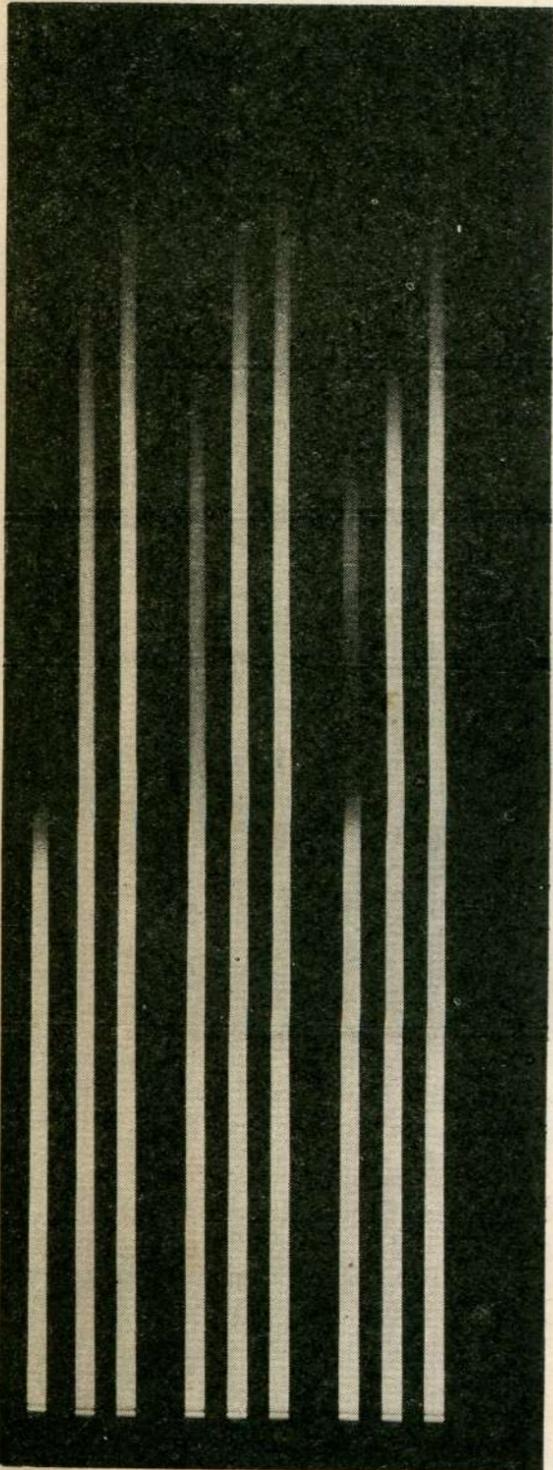
$$e = \varphi(I) e^{-\alpha t}$$

donde  $\varphi(I)$  es una función de la intensidad  $I$  de la luz y una constante. Tanto  $\varphi(I)$  como  $\alpha$  dependen del tipo de la placa.-

En primera aproximación puede considerarse, según enseña la experiencia, a  $\varphi(I)$  proporcional a  $I$ , de modo que para tiempos iguales de exposición en la misma placa se tiene para dos ennegrecimientos correspondientes al mismo largo de onda

$$\frac{e_1}{e_2} = \frac{I_1}{I_2}$$

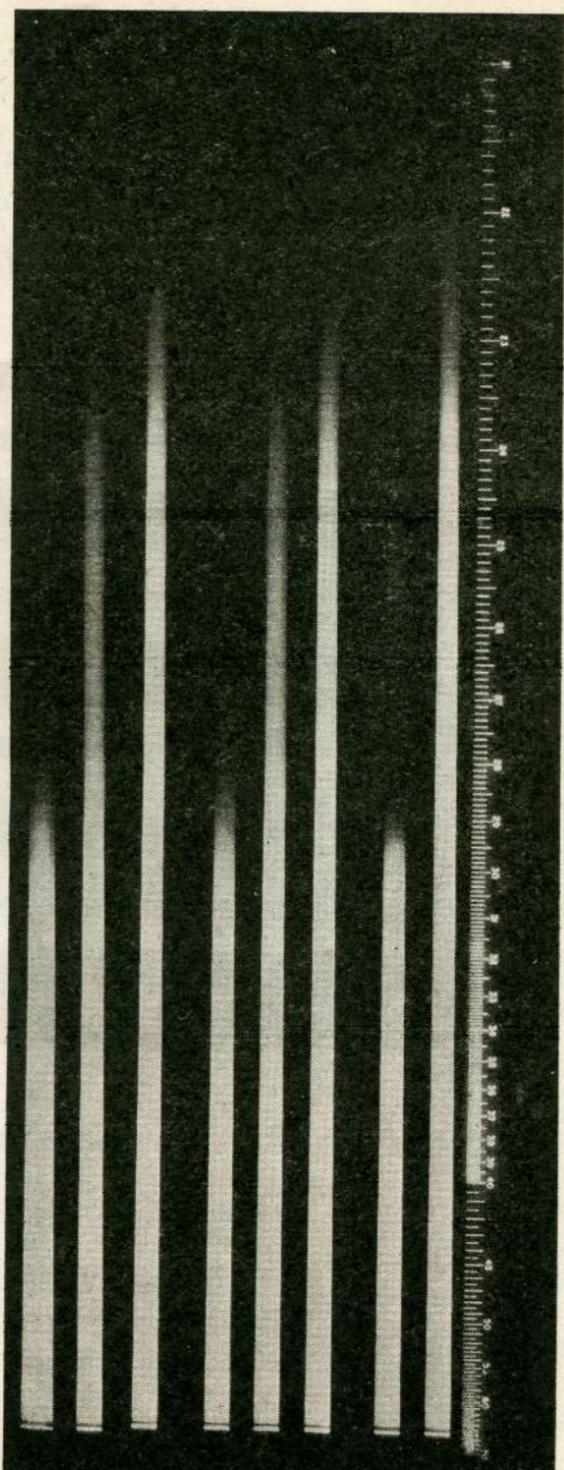
Puesto que, por otra parte, dentro de la región de la banda que hemos estudiado la luz de la fuente a través de la cuva con agua destilada es practicamente constante, se sigue con buena aproximación que la curva microfotométrica de la banda es la curva de absorción.-



Extracto crudo  
20.4 U. F./mg. N

El<sub>1</sub>  
153.4 U. F./mg. N

El<sub>3</sub>  
1707 U. F./mg. N



Ext. crudo  
20.4 U. F./mg. N

El<sub>1</sub>  
153.4 U. F./mg. N

El<sub>3</sub>  
1707 U. F./mg. N

E.C. [ El<sub>1</sub> ] [ El<sub>3</sub> ]

E.C. [ El<sub>1</sub> ] [ El<sub>3</sub> ]

Figura Nº 8

ESPECTROGRAMA DE PREPARADOS DE FOSFATASA MAMARIA EN DISTINTOS GRADOS DE PURIFICACION

|                       |                 |                 |
|-----------------------|-----------------|-----------------|
| E.C. = Extracto crudo | El <sub>1</sub> | El <sub>3</sub> |
| Diluciones            | Diluciones      | Diluciones      |
| 1 = 1/5               | 1 = 1/3         | 1 = 1/1         |
| 2 = 1/25              | 2 = 1/15        | 2 = 1/5         |
| 3 = 1/250             | 3 = 1/150       | 3 = 1/50        |
| 4 = 1/10              | 4 = 1/2         | 4 = 1/1         |
| 5 = 1/20              | 5 = 1/5         | 5 = 1/100       |
| 6 = 1/100             | 6 = 1/10        |                 |

Tiempo de exposición 10 minutos



S. R. Panchromatic H y D 400" y "Eastman Spectroscopic Plates" tipo III; ambas con anti-halo.

El estudio del ennegrecimiento relativo en las distintas zonas de los espectros se hizo con un microfotómetro-fotoeléctrico (C.

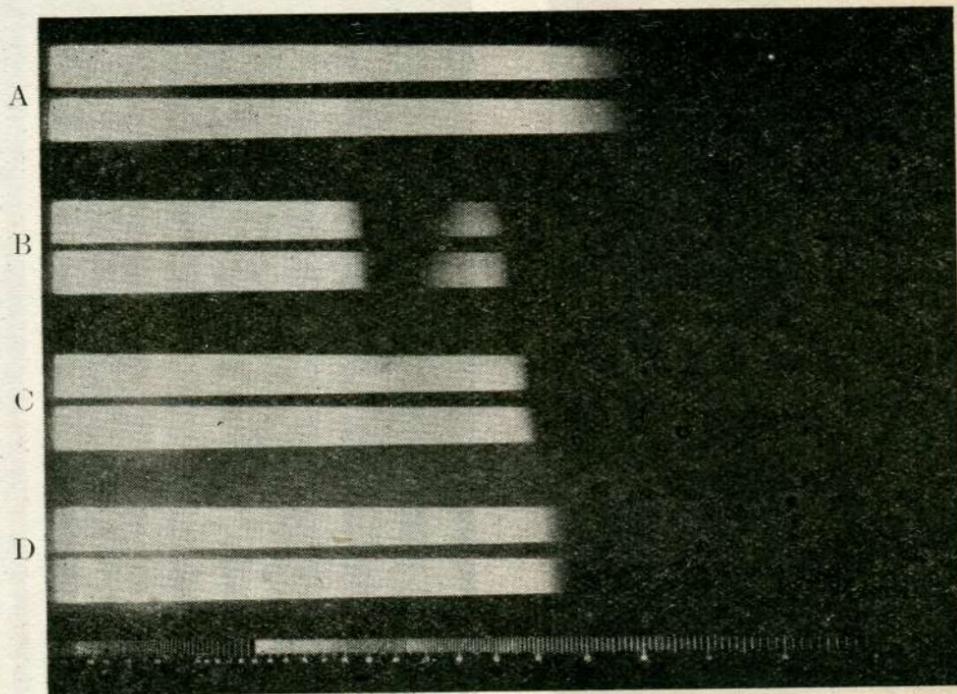


FIGURA N.º 2

|   |   |                 |                 |   |
|---|---|-----------------|-----------------|---|
| A | = | El <sub>1</sub> | diluido al 1/5. | Exposición 5 y 10 minutos respectivamente |
| B | = | El <sub>2</sub> | " " 1/1.        | " 5 y 10 " "                              |
| C | = | El <sub>3</sub> | " " 1/2.        | " 5 y 10 " "                              |
| D | = | El <sub>4</sub> | " " 1/5.        | " 5 y 10 " "                              |

Zeiss) en el cual se registra directamente la curva de absorción (Fig. 3). El ennegrecimiento está dado, como es sabido (véase Loyarte, Carratalá y Vucetich (7), por una expresión de la forma

$$e = \varphi (I) e^{-\alpha t}$$

Las longitudes de ondas que limitan la banda registrada se determinaron aprovechando las melladuras dadas en la imagen por tres líneas del espectro de emisión del mercurio, cuyos valores son conocidos.-

#### Materiales.-

Las soluciones en estado de purificación sucesivos son todas de un mismo origen y corresponden a aquellas que bajo las mismas denominaciones han sido estudiadas anteriormente.- Los tres preparados son transparentes y límpidos presentando el primero de ellos un ligero color amarillo mientras que los otros dos son incoloros a las concentraciones usadas.-

Las concentraciones y las relaciones de pureza de los tres preparados son respectivamente las siguientes: para el "extracto crudo" 15 U.F./ml y 20 U.F./mg N; para la solución "El<sub>1</sub>" , 150 U.F./ml y 153 U.F./mg N y para la solución "El<sub>3</sub>" 870 U.F./ml y 1707 U.F./mg N.-

#### Resultados y discusión

Los tres preparados revelan una gran transparencia en la región del espectro visible y en las primeras longitudes del ultravioleta, comenzando la absorción en todos ellos para longitudes de ondas entre 295 y 290 m $\mu$ .- En esta primera parte, entre los espectrogramas de los diversos preparados no existen diferencias pero ellas aparecen en la zona siguiente distinguiendo el "extracto crudo" y el "El<sub>1</sub>" por un lado, del preparado más purificado, "El<sub>3</sub>", por el otro.- Mientras en los dos primeros la absorción es continua en todos los espectros a pesar de las variadas diluciones y tiempo de exposición a que han sido obtenidos, en el tercero se puede apreciar una banda selectiva (figuras 8 y 9) cuyos límites precisos se señalan en la curva de absorción: comienza en 295 m $\mu$ , tiene su máximo en 280 m $\mu$  y termina en 253 m $\mu$  (figura 10).-

En la región extrema del ultravioleta - en longitudes de ondas menores de 230 m $\mu$  - las tres soluciones son muy absorbentes, pudiendo observarse en las imágenes obtenidas a diluciones sucesivas que la absorción es continua.-

La utilización de estos resultados con objeto de averiguar si el espectrograma del preparado más purificado corresponde en realidad a la fosfatasa, nos induce a destacar que ellos se han modificado paulatinamente en un sentido cualitativo hasta alcanzar el espectro típico que presentan algunas proteínas

A

B

C

D

Figura Nº 9

ESPECTROGRAMAS DE ABSORCION DE PREPARADOS DE FOSFATASA MAMARIA PURIFICADA

|     |                 |         |    |     |    |    |               |           |      |   |   |    |         |
|-----|-----------------|---------|----|-----|----|----|---------------|-----------|------|---|---|----|---------|
| A = | El <sub>1</sub> | diluido | al | 1/5 | de | la | concentración | original. | Exp. | 5 | y | 10 | minutos |
| B = | El <sub>3</sub> | "       | "  | 1/1 | "  | "  | "             | "         | "    | " | " | "  | "       |
| C = | El <sub>3</sub> | "       | "  | 1/2 | "  | "  | "             | "         | "    | " | " | "  | "       |
| D = | El <sub>3</sub> | "       | "  | 1/5 | "  | "  | "             | "         | "    | " | " | "  | "       |

Figura Nº 10

CURVA DE ABSORCION DEL PREPARADO PURIFICADO

Las longitudes de ondas están dadas por tres rayas del espectro de emisión  
Hg contenido en la fuente luminosa

animales. Si a esto se agrega que este resultado coincide con los hallados por Sizer quien trabajó con fosfatasa extraída de otro órgano y purificada mediante un método de fraccionamiento salino completamente distinto al seguido por nosotros, se tendrán dos razones para suponer que se ha logrado el espectrograma de un cuerpo simple y que probablemente corresponda al de la fosfatasa dado el alto grado de purificación de los preparados. Debe insistirse, sin embargo, en que la evidencia completa de esta afirmación solo se conseguirá cuando ulteriores intentos de fraccionamientos demuestren cuantitativamente la invariabilidad del espectrograma relacionado a la concentración enzimática y en concordancia a la invariabilidad de la relación de pureza, concentración centesimal, etc..-

La imagen definitiva corresponde a la de una proteína en cuya composición intervienen amino-ácidos cíclicos. Es conocido, en efecto, que los amino-ácidos alifáticos carecen de banda de absorción selectiva mientras que los cíclicos - triptofano, tirosina y fenilalanina - si la tienen (vease Greenberg, 1938), y que en correspondencia con esto, aquellas preteínas tales como la gelatina de bajo contenido en estos últimos amino-ácidos, carecen de bandas, la cual es bien manifiesta en aquellas que los contienen en mayores cantidades (Stenström y Reinhard, 1925).-

Según los valores más comunmente hallados en la literatura el triptofano tiene una banda estrecha en  $287,5 \text{ m}\mu$  y una más amplia alrededor de  $275 \text{ m}\mu$ ; la tirosina absorbe entre  $290$  y  $275 \text{ m}\mu$  desplazándose con las modificaciones del pH y la fenil-alanina, con un poder absorbente mucho menor, presenta su banda entre  $260$  y  $250 \text{ m}\mu$ . La amplitud de la banda en el caso de la fosfatasa abarca la zona de absorción de estos amino-ácidos y es probable que, como en el caso de otras enzimas (Lavin y Northrop, 1935), los tres intervengan en su constitución.-

Es interesante señalar que en estos espectrogramas no aparecen accidentes atribuibles al nucleo prostético; si tal nucleo existe es menester entonces suponer que tiene muy escaso poder absorbente o bien que existe en cantidades muy pequeñas en relación al componente proteico.-

Los espectrogramas fueron obtenidos en el Instituto de Física de la Facultad de Ciencias Físico-matemáticas (La Plata); el autor agradece a su director, prof. Dr. Ramón G. Loyarte, y sus colaboradores, las facilidades y atenciones dispensadas durante su permanencia en dicho Instituto.-

## Capítulo IV

### ACTIVADORES DE LA FOSFOMONOESTERASA ALCALINA

#### ACTIVACION POR LAS SALES DE MAGNESIO

La activación de la fosfatasa de origen oseo por los iones de magnesio fué descrita en 1927 por Erdtmann, quien estudió también la acción de otros cationes, a los cuales encontró ineficaces, y comenzó la discusión del probable mecanismo de la activación.-

Este efecto de las sales magnésicas fué corroborado posteriormente y extendido a las fosfatasas alcalinas extraídas de todos los órganos, ampliándose también la discusión sobre las hipótesis que tratan de explicar el proceso mediante el cual se produce dicho efecto.-

Erdtmann, ya en su publicación inicial analizó las posibilidades de los tres mecanismos siguientes: 1º, el Mg puede obrar protegiendo a la enzima de su auto - destrucción; 2º, el activador puede obrar uniéndose a los fosfatos (hacia los cuales manifiesta una afinidad mayor a la que tiene la enzima por los mismos) y en esta forma impedir la acción inhibitoria que aquellos ejercen sobre la reacción catalizada; 3º, finalmente, el activador puede unirse a la enzima y protegerla por ese mecanismo de la acción inhibitoria de los fosfatos.- De los resultados de sus ensayos concluyó Erdtmann que la última de las tres hipótesis enunciadas debía considerarse como la más aceptable.-

No se adhieren a esta opinión Jenner y Kay (1931) después de haber estudiado la relación del Mg con los momentos iniciales de la acción fosfatásica; encuentran en el Mg que actúa desde antes que la concentración de fosfatos sea lo suficientemente alta como para actuar en calidad de inhibidores, por lo cual afirman que la acción activadora se debe a la formación de un complejo enzima - magnesio que constituiría el grupo verdaderamente activo.-

Sin embargo Holmberg (1935) al insistir en estos estudios y comparar la velocidad de la escisión en los estados iniciales y avanzados de la liberación de fósforo vuelve a la explicación de Erdtmann. Trabaja con un preparado de fosfatasa intestinal privado de magnesio y encuentra que si lo hace actuar durante 1/4 de hora deja 0,0033 mg de fósforo en libertad, activándose hasta un 21 % por adición adecuada de Mg, pero que si se le permite actuar durante 2 horas el mismo preparado deja 0,0112 mg de fósforo en libertad y se puede activar hasta el 109 % por adición de magnesio.-

A estas explicaciones hay que agregar otra, un tanto inesperada, dada por Hommerberg en 1933. Este autor encontró que el cloruro de magnesio a baja concentración cataliza por si mismo la hidrólisis de los ésteres fenil-fosfórico y glicerín-fosfórico y deduce de ello que la acción activadora estudiada no es más que la suma de los efectos particulares de las catálisis por la enzima y por las sales magnésicas. El hecho aducido por Hommerberg no ha podido ser comprobado y la explicación puede probadamente darse por errónea.-

La relación entre la solubilidad de la enzima y su activación ha sido estudiada por Bamann, Riedel y Diederich (1934) quienes ensayan extractos obtenidos por diferentes métodos y deducen de sus experiencias que aquella parte de la fosfatasa que se disuelve más fácilmente - la lio-enzima de la terminología de algunos autores alemanes - es la parte más activable y además, que todo el conjunto fosfatásico se activa en relación inversa a la magnitud del vector coloidal.-

En otro sentido, en un conjunto interesante de investigaciones, se ha procurado establecer la influencia que ejercen algunas sustancias ajenas a la fosfatasa en si, sobre la activación de esta enzima por el magnesio.- Bodansky O. (1936) estudia el efecto retardante que tienen algunas sustancias que pueden ser eliminadas por diálisis y Giri (1938) señala que la purificación por ultrafiltración, la edad del preparado y el tiempo de extracción influyen sobre la activación de los extractos obtenidos de riñón, de hígado y de cerebro pero no influyen sobre los obtenidos a partir de intestino delgado.-

La comparación en este respecto entre fosfatasas de origen patológico y las de origen normal ha hecho surgir también algunas diferencias que deben ser atribuidas a las partes no específicas de los preparados; así, Köhler (1934) refiere que la fosfatasa sanguínea de la rata normal es más activable que la de los animales cancerosos, lo cual es ampliado y parcialmente confirmado por Schoonover y Ely (1935) quienes encuentran que la fosfatasa de los eritrocitos normales es porcentualmente más activable que la de los eritrocitos patológicos.-

La activación por el magnesio de preparados mamarios en distintos grados de pureza.-

A pesar de que algunas de las referencias dadas permiten suponer una acción efectiva de las sustancias inespecíficas acompañantes en el proceso de la activación por el magnesio, no ha sido estudiado en ningún órgano, con criterio cuantitativo, si realmente existe una relación entre el grado de pu-

reza de los preparados y su activación por el magnesio, que de paso descarte definitivamente la existencia de un mecanismo ageno a la fosfatasa en sí.-

Nosotros hemos efectuado determinaciones con los preparados denominados extracto crudo, El<sub>1</sub>, El<sub>2</sub>, cuyas relaciones de purificación eran respectivamente las siguientes: 16,4 U.F./mg N, 246,1 U.F./mg N y 2394,4 U.F./mg N siendo obtenidos todos ellos con la técnica habitual pero lavando posteriormente al El<sub>3</sub> repetidas veces con etanol refrigerado (4 - 5 gradosC) para quitarle el exceso de acetato de magnesio que contiene.-

No se dializaron los preparados ni se tomó ninguna otra medida tendiente a disminuir su contenido en magnesio, si no que se determinó cuantitativamente en todos ellos el contenido en dicho catión.- El motivo de adoptar este temperamento reside en que fundadamente debe temerse que la diálisis afecte a otros factores de la actividad enzimática y en medida desigual en los preparados purificados con respecto a los que contienen muchas impurezas.-

Las determinaciones del Mg se efectuaron precipitándolo al estado de fosfato amónico-magnésico y dosando luego en el precipitado el fósforo de acuerdo al método de Fiske y Subbarow.- Las cantidades de magnesio encontradas en los preparados y referidas a los volúmenes de los mismos usados en cada determinación de fosfatasa, son los siguientes:

|                 |             |       |
|-----------------|-------------|-------|
| Extracto crudo: | 0,00292 mg  | de Mg |
| El <sub>1</sub> | : 0,00235 " | " "   |
| El <sub>3</sub> | : 0,00015 " | " "   |

Estos valores fueron sumados a las cantidades de Mg (al estado de solución de MgCl<sub>2</sub> agregadas a cada tubo y con resultado de la suma se ha elaborado el cuadro N<sup>o</sup> 13.- En el mismo cuadro figuran también las concentraciones del activador expresadas en qMg, que es una denominación creada por Jenner y Kay (1931) con el objeto de facilitar la expresión: designa el logaritmo negativo de la molaridad en magnesio.-

#### Conclusiones del estudio:

El óptimo de concentración, que se ha encontrado en qMg 1,3 para el extracto crudo (16,4 U.F./mg N) y en qMg 2,3 para el El<sub>1</sub> (246,1 U.F./mg N) y para el El<sub>3</sub> (2394,4 U.F./mg N), pone de manifiesto una clara tendencia a desplazarse hacia concentraciones menores a medida que los preparados se purifican. Además puede apreciarse que hay un aumento de la activación en el mismo sentido; en efecto, si se comparan en el extracto crudo los tubos cuyos qMg son 4,9 y 1,3 (máximo y mínimo valor en fosfatasa respectivamente) se encuentra que hay un aumento del 68 % de la actividad; en cambio, en la serie de ensayos efectuados con el El<sub>1</sub> hay un aumento de 140 % entre los tubos cuyos qMg son 4,8 y 2,3 y en la serie del El<sub>3</sub> entre aquellos de qMg 5,0 y 2,3 el aumen-

Cuadro Nº 12

Activación de preparados de fosfatasa mamaria en distintos grados de pureza por el Mg.- Substrato beta-glicero fosfato sódico 0,01 M.- 37°C; 1 hora de incubación.-

| N total mgr | pH en la determ. | concentración (1) Mg moles. | qMg  | Fósforo liberado mgr. |
|-------------|------------------|-----------------------------|------|-----------------------|
| 0,209       | 8,90             | 1,20 - 10                   | 4,9  | 0,204                 |
|             |                  | 1,63 . 10                   | 4,7  | 0,215                 |
|             |                  | 5,49 . 10                   | 4,2  | 0,257                 |
|             |                  | 4,41 . 10                   | 3,3  | 0,318                 |
|             |                  | 4,31 . 10                   | 2,3  | 0,341                 |
|             |                  | 4,30 . 10                   | 1,3  | 0,344                 |
|             |                  | 4,29 . 10                   | 0,2  | 0,204                 |
|             |                  | 0,012                       | 9,10 | 9,37 . 10             |
| 1,32 . 10   | 4,8              |                             |      | 0,127                 |
| 5,22 . 10   | 4,3              |                             |      | 0,172                 |
| 4,38 . 10   | 3,3              |                             |      | 0,269                 |
| 4,29 . 10   | 2,3              |                             |      | 0,305                 |
| 4,28 . 10   | 1,3              |                             |      | 0,277                 |
| 4,28 . 10   | 0,3              |                             |      | 0,154                 |
| 0,0018      | 9,10             |                             |      | 5,78 . 10             |
|             |                  | 1,00 . 10                   | 5,0  | 0,186                 |
|             |                  | 4,87 . 10                   | 4,2  | 0,279                 |
|             |                  | 4,35 . 10                   | 3,3  | 0,413                 |
|             |                  | 4,30 . 10                   | 2,3  | 0,431                 |
|             |                  | 4,29 . 10                   | 1,3  | 0,369                 |
|             |                  | 4,29 . 10                   | 0,3  | 0,192                 |

(1) Agregado al estado de  $Cl_2Mg$ .-

to es del 132 %.-

Estos resultados se suman a los obtenidos por Giri (1938) en experiencias planeadas sobre preparados ultrafiltrados y señalan que algunas de las sustancias inespecíficas acompañantes que se encuentran presentes en los extractos impurificados disminuyen la acción del agente activador, siendo muy probable que en el seno de los tejidos la acción reguladora de dichas sustancias sea de más importancia todavía y que los fenómenos tanto de activación como de disminución de la actividad fosfatásica dependan de un mecanismo mucho más complejo del que se realiza con la enzima purificada.-

ACTIVACION POR LAS SALES DE MANGANESO

En comunicaciones relativamente recientes Cloetens (1939) ha insistido en la importancia de las sales de manganeso en la función de activar a la fosfatasa. Este autor, que ha establecido una clasificación de las fosfomonoesterasas alcalinas cuyas características hemos resumido en el capítulo I, ha estudiado a este respecto las fosfatasas de intestino, hueso, pulmón, riñón e hígado y ha encontrado que todas ellas son activables por las sales de manganeso

Fosfatasas de otros tipos, originadas en las levaduras y que escinden el beta-glicerofosfato de sodio a pH óptimo de 6 - 7, son igualmente activables por las sales de manganeso y por las de magnesio, según Massart y Duffait (1939) .-

Activación de la fosfatasa mamaria.-

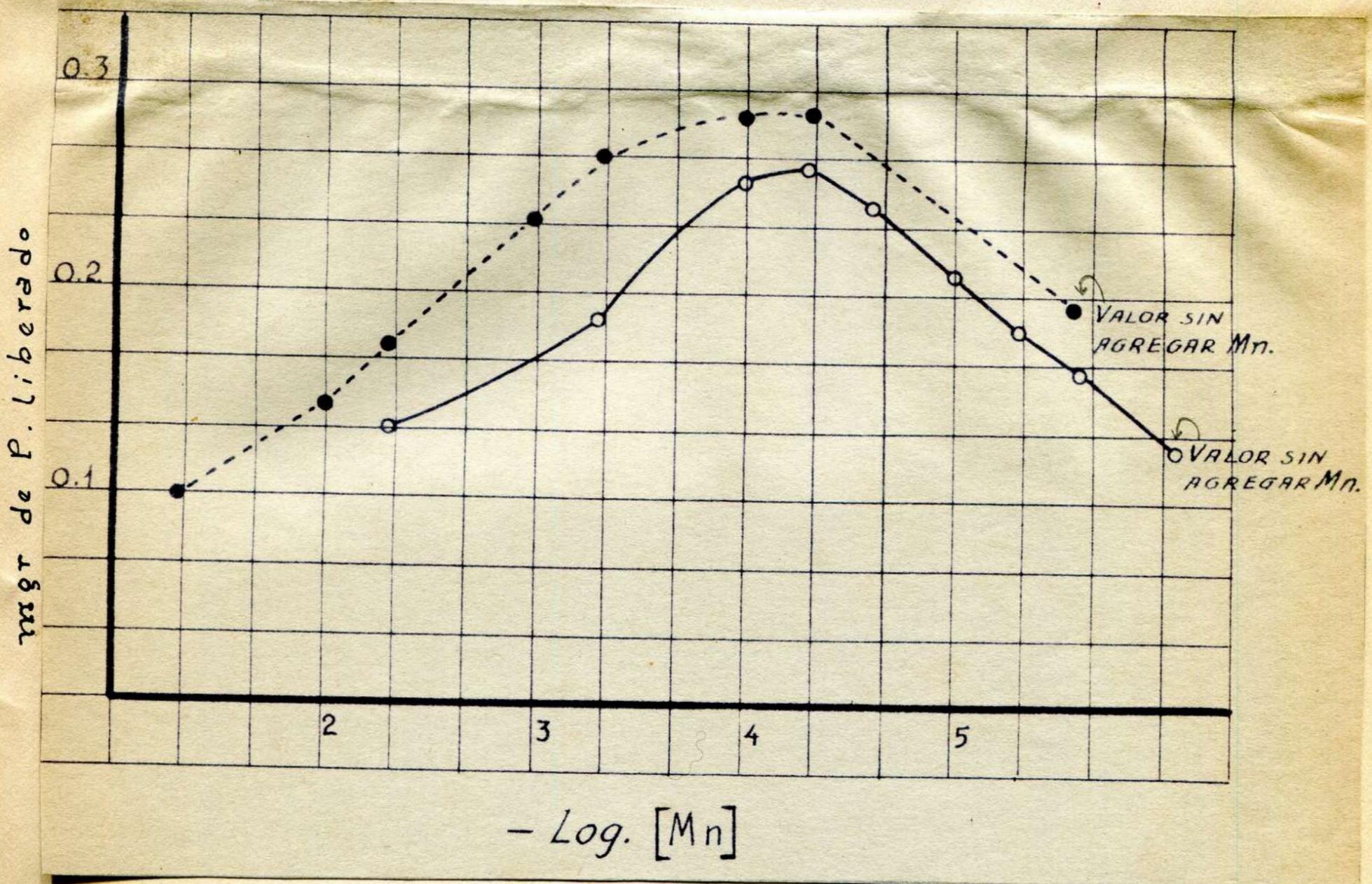
La acción de este catión ha sido muy poco estudiada hasta ahora, y no se conocía todavía sus efectos sobre fosfatasa de la glándula mamaria por lo cual hemos efectuado ensayos con dos de nuestros preparados. Se utilizaron para ello una solución  $E_2$  dializada durante 48 horas en saco de papel celofán (Clar Appel M.P. 600, Duperial) y otra solución,  $E_3$ , la cual fué lavada repetidas veces con etanol refrigerado.-

El manganeso se agregó en solución de  $MnCl_2$  (purísimo Merck) inmediatamente antes de la titulación del valor fosfatásico, y en cantidades tales que las concentraciones finales del catión en los ensayos variaron desde  $1 \cdot 10^{-6}$  hasta  $1 \cdot 10^{-1}$ . Los tubos en los que la concentración del manganeso es mayor de  $1 \cdot 10^{-3}$  aparecen fuertemente coloreados debido probablemente a la descomposición de la sal en el medio alcalino que tiene el substrato; esta coloración no molesta, sin embargo, en la determinación final de los fosfatos, gracias a que al agregar la mezcla reductora usada en el método de Fiske y Subarow - que es el que hemos empleado en estos ensayos - la solución vuelve a decolorarse, debiéndose este efecto, seguramente, a la acción del bisulfito de sodio que contiene la mencionada mezcla. A concentraciones de Mn menores de  $1 \cdot 10^{-3}$  la coloración no es perceptible.-

Los resultados de las determinaciones han sido representados gráficamente en la figura N<sup>o</sup> 11. Para expresar los valores en manganeso se han usado los logaritmos negativos de sus concentraciones molares; a estos logaritmos en

lo sucesivo los designaremos qMn a semejanza de la designación introducida por los autores canadienses antes citados, para expresar las concentraciones en magnesio. En esta forma se tendrá una notación que permite comparar fácilmente los óptimos de ambos cationes. Los mg de fósforo inorgánico dado en ordenadas han sido liberados por una cantidad equivalente a 0,02 ml de El<sub>2</sub>

Figura Nº 11



-----El<sub>2</sub> dializado durante 48 horas.-    -o-o-El<sub>3</sub> lavado con etanol.-

y a 0,01 ml de El<sub>3</sub>, durante 1 hora de incubación, a pH 9,0 y usando como sustrato el beta-glicero-fosfato de sodio.-

Puede apreciarse que la acción activadora del manganeso sobre la fosfatasa mamaria es bien evidente, alcanzando en algunos de los tubos en los que aquel se ha agregado, valores que duplican a los que se obtienen en aquellos a los cuales no se agregó el activador. Debe repararse también en que la concentración de manganeso necesaria alcanza un óptimo, excedido el cual, los valores de actividad fosfatásica decrecen hasta manifestar una acción inhibi -

dora. Las concentraciones óptimas corresponden a qMg que oscilan entre 4 y 4,3, siendo notoriamente inferiores a los óptimos de concentración para la activación por el magnesio, los cuales para preparados de aproximadamente el mismo grado de purificación se ha encontrado ( veáse más atrás) en qMg 2,3 .-

#### LA ACTIVACION CONJUNTA POR LOS IONES DE MAGNESIO Y MANGANESO

La activación de una enzima por dos elementos distintos plantea el problema de averiguar si ellos lo hacen por un mismo mecanismo. Esta hipótesis aparece como muy verosímil en el caso de la fosfomonoesterasa alcalina, que es activada por dos cationes.-

Se ha visto en el caso del magnesio que las hipótesis más aceptables establecen que actúa formando un complejo enzima - magnesio que posteriormente actuará sea protegiendo a la enzima del efecto inhibitor de los fosfatos (Erdtmann), sea comportándose como el agente verdaderamente activo frente a los substratos (Jenner y Kay).-

Si suponemos que este es también el mecanismo por el cual actúa el manganeso, cabe preguntarse si las uniones de ambos cationes se realizan o no sobre el mismo grupo de la molécula de fosfatasa. Debe esperarse, si la activación se realiza en un todo por el mismo mecanismo en ambos casos, que sea posible lograr una activación completa con uno solo de ellos, e inversamente, si los mecanismos difieren se logrará el máximo de activación posible solamente por la acción conjunta de ambos activadores.-

En el cuadro N° 14 se dan los resultados de dos experiencias planeadas con vistas a averiguar cual de las dos posibilidades se verifica. Las experiencias se realizaron con los mismos preparados con los cuales se constató la activación por las sales de manganeso, es decir, con una solución El<sub>2</sub> dializada durante 48 horas en saco de celofán contra agua destilada y con otra solución, El<sub>3</sub>, lavada con etanol refrigerado. Las concentraciones finales de magnesio ( agregado al estado de solución de MgCl<sub>2</sub> ) y de manganeso ( agregado en forma de solución de MnCl<sub>2</sub> ) corresponden a las que se encontraron ser óptimas en los ensayos anteriores, vale decir, que fueron de  $5,0 \cdot 10^{-5}$  en mangane - y  $3,0 \cdot 10^{-3}$  en magnesio.-

#### Conclusiones:

Los resultados de estos dos ensayos concuerdan mejor con la hipótesis de que ambos activadores actúan por mecanismos que se superponen el uno al otro. Si se toman, en efecto, los resultados de las determinaciones efectua -

Activación conjunta por los iones de Mg. y Mn.- Substrato beta-glícero-fosfato sódico 0,01 M.- Temperatura 37° C.- Tiempo 1 hora.-

| Mg moles  | Mn moles | Fósforo liberado. mg | Aumento % |
|---|----------|----------------------|-----------|
| Eluido <sub>2</sub> dializado                     |          |                      |           |
| 0,0   | 0,0      | 0,088                | ---       |
| 3,0 10  | 0,0      | 0,126                | 43,0      |
| 0,0   | 5,0 10   | 0,133                | 51,0      |
| 3,0 10  | 5,0 10   | 0,133                | 51,0      |
| Eluido <sub>3</sub> lavado con etanol refrigerado |          |                      |           |
| 0,0   | 0,0      | 0,2105               | ---       |
| 3,0 10  | 0,0      | 0,3418               | 62,3      |
| 0,0   | 5,0 10   | 0,3175               | 50,8      |
| 3,0 10  | 5,0 10   | 0,3478               | 65,2      |
| 1,5 10  | 2,5 10   | 0,3571               | 69,2      |

das con el El<sub>2</sub> dializado, se ve que el aumento por ciento logrado con la activación conjunta no es mayor que el logrado solamente con manganeso y solo es muy poco superior a la activación alcanzada con sales de magnesio. El valor de la activación conjunta debió de ser de 94 % si las activaciones de los dos cationes se hubiesen sumados pero solo alcanzó al 51 % en la determinación.-

En el caso del El<sub>3</sub> lavado con etanol la activación conjunta es un poco mayor que las sendas activaciones separadas de las sales de magnesio y manganeso pero los valores quedan de todas maneras muy por debajo de la suma de estos. Asi, mientras el valor de la suma teórica da 113,1 % los resultados de las determinaciones en los tubos de activación conjunta dan activaciones de 65,2 % y 69,2 % .-

Estos resultados nos parecen una buena prueba de que las activaciones con los dos cationes se realizan por un mismo mecanismo y además, actuando sobre la misma parte de la molécula enzimática.- El interés de dejar bien aclarado este hecho atañe no solamente a la investigación del mecanismo por medio del cual actúa la fosfatasa, sino también a la validez de las determinaciones cuantitativas. Hasta ahora, solo ha sido cuidado en estas determinaciones que quede satisfecho el óptimo de concentración de magnesio con pres-

cindencia del manganeso; esta conducta quedará justificada si experiencias en variadas circunstancias de pH, presencia de inhibidores, fosfatos, etc. dan resultados en concordancia con las conclusiones que terminamos de exponer.-

#### Otros activadores.-

Además de los cationes estudiados se han referido en repetidas ocasiones la existencia de otros activadores de las fosfatasas, pero en general ellos no han podido ser confirmados.-

En 1927, Neuberg y Leibowitz comunicaron que la fosfatasa de la tadiastasa y la fosfatasa renal eran activadas por los arseniatos, pero Pett y Wynne (1934) no pudieron confirmar esta afirmación.-

La activación por amino-ácidos de la fosfatasa de hueso, riñon e intestino fué comunicada por O. Bodansky en 1936, pero Albers D. en 1940 encuentra que los amino-ácidos al igual que una serie de sales metálicas estudiadas no muestran ningún efecto acelerador sobre la hidrólisis cumplida por la fosfatasa. -

En 1937 en una serie de trabajos Thannhauser, Reichel y Grattan comunicaron que el ácido ascórbico activaba la acción de la sero-fosfatasa; en base a ello discutieron si los aumentos que se registran en ciertas circunstancias normales o patológicas deben atribuirse a un verdadero aumento de la enzima o si solamente es debido a un aumento de la "actividad fosfatásica" en relación con los activadores de la enzima que en dichas circunstancias pueden ponerse en circulación.-

La activación por el ácido ascórbico, que ofrecía sugerencias tan interesantes no pudo, sin embargo, ser confirmada por King y Delory (1938) y el mismo Thannhauser y sus colaboradores reconocieron posteriormente que sus resultados debieron a un error de técnica que consistió en dejar el substrato en presencia de ácido ascórbico y en un medio acidificado por el ácido tricloroacético durante un tiempo excesivamente largo, dando así lugar a una hidrólisis inespecífica.-

En medio de un conjunto de materiales de importancia biológica que comprendían diversas vitaminas, hormonas, amino-ácidos y sustancias del metabolismo intermedio, estudiadas por Pyle, Fisher y Clark (1937) con respecto a la fosfatasa renal, encontraron que solo la creatina y creatinina tienen efecto activador sobre la enzima.-

LA INACTIVACION POR DIALISIS DE LA FOSFATASA MAMARIA

Y SU REACTIVACION

Del conjunto de conocimientos sobre enzimas cuyas estructuras químicas estan bien determinadas, se desprende que ellas pueden ser agrupadas en dos grandes clases: unas constituídas por proteínas simples y las otras constituídas por un complejo en el cual se agrega a la proteína otro núcleo químico, de naturaleza variable, pero que siempre es de menor magnitud molecular que la proteína y que por lo general puede ser separada de ella por diálisis.-

La ubicación de la fosfomonoesterasa alcalina dentro de uno u otro de estos grupos es un problema que ha sido tratado por diversos autores con resultados discrepantes. En 1931 Jenner y Kay estudiaron cuidadosamente el comportamiento de soluciones de fosfatasa en experiencias de diálisis y encontraron que se inactivan paulatinamente cuando se dializan en sacos de colodion contra agua destilada, solución de cloruro de sodio o frente a soluciones "buffers" a distintos pH. Las sales de magnesio reactivan estas soluciones inactivadas por diálisis siempre que la inactivación no se lleve hasta un grado tal que se haga completa, en cuyo caso las sales magnésicas carecen de efecto. No encontraron estos autores otro procedimiento por el cual fuera posible reactivar aquellos preparados, por lo cual rechazan la existencia de un verdadero co - fermento.-

H. y E. Albers (1935) creen que la dialisis simple de los preparados renales obtenidos por ellos, elimina una substancia estabilizadora de la fosfatasa. Tambien por electrodiálisis han podido inactivar esos mismos preparados pero se fracasa al quererlos reactivar con cualquiera de los líquidos electródicos por separado o con ambos reunidos, asi como tambien con la solución de las membranas dializadoras.-

D. Albers (1939), en cambio, encuentra que si se hacen dializar preparados purificados en un dializador a circuito cerrado, modelo Manegold, la enzima se inactiva y puede ser luego reactivada agregándole el líquido exterior del dializador. El magnesio en concentraciones óptimas es incapaz de reactivar estos preparados cuando se han inactivado en forma completa.-

Las experiencias anteriores son confirmadas por S. Kumai (1941); este autor encuentra que la fosfatasa es escindible en apo y co - fermento y pro-

ponen métodos para elaborar cada uno de estos componentes necesarios para la actividad de la enzima. Para obtener apo - fosfatasa propone dializar durante 1 día frente a solución de borax al 1 % y luego otro día frente a solución de carbonato ácido de sodio al 2 %, manteniendo la enzima durante este tiempo a temperatura por debajo de 10 grados C.- Para obtener la fracción co - fosfatásica utiliza extractos autolizados de hígado y riñon de cerdo, levadura desecada y salvado del arroz; dializa dichos extractos hasta pérdida del fósforo inorgánico y calienta en baño hirviendo durante 5 minutos; luego deseca el filtrado a presión reducida y extrae con alcohol a 40% centesimales y centrifuga. Completa la purificación electrodiálizándolo con 100 voltios de potencial y usando membrana de pergamino.-

## DIALISIS DE LOS PREPARADOS PURIFICADOS DE LA GLANDULA MAMARIA

### Elección de la membrana dializadora

Dado que en los comienzos de nuestro trabajo hemos tropezado con algunas dificultades debidas a la inadecuada elección de las membranas dializadoras, daremos una descripción detallada de los resultados obtenidos en experiencias preliminares efectuadas con membranas de celofán que se pueden obtener facilmente en el comercio de nuestro medio.-

Se ha usado el papel celofán marca "Clar Appel" (Duperial) de los cuales hay diversos tipos, denominados T P T 300, P T 600 y 450 y MST 300, siendo calificado este último como impermeable. El tipo P T 450 no fué posible conseguirlo en el momento en que se realizaron estas experiencias, no se tomará en consideración por este motivo.-

En el cuadro N° 15 se pueden apreciar los resultados obtenidos con las mencionadas membranas despues de 48 horas de diálisis. Hemos encontrado que el papel denominado MST 300 impermeable es de diálisis sumamente lenta y por otra parte sufre una especie de exfoliación al cabo de algunos días de estar sumergido en el agua. El denominado TPT 300, en cambio, es de diálisis muy rápida pero tiene el inconveniente de que deja pasar algo de fosfatasa, sobre todo cuando ésta se encuentra purificada; tambien nos ha ocurrido en algunas oportunidades que preparados inactivados por diálisis a traves de este papel no los hemos podido reactivar por los medios habituales y esto lo hemos

Cuadro Nº 15

Análisis de los líquidos contenidos en los sacos de celofán y de los exteriores a los mismos, después de 48 horas de diálisis a temperatura de 3 a 6 ° C.-

| Denominación del celofán. | Posición del líquido | FOSFATASA |        | Magnesio    | Fosfatos    |
|---------------------------|----------------------|-----------|--------|-------------|-------------|
|                           |                      | Sin Mg    | Con Mg |             |             |
| 300 imperm.               | Interior             | 4,32      | 4,32   | Reac.franca | Reac.Franca |
|                           | Exterior             | 0,0       | 0,0    | " muy debil | " muy debil |
| 600 P T                   | Interior             | 3,10      | 3,47   | Reac.franca | Reac.franca |
|                           | Exterior             | 0,0       | 0,0    | " debil     | " franca    |
| 300 T P T                 | Interior             | 2,5       | 3,0    | Reac.franca | Reac.franca |
|                           | Exterior             | 0,2       | 0,3    | " débil     | " franca    |

El magnesio ha sido apreciado por concentración al 1/4 de las soluciones originales y precipitando posteriormente con fosfato de amonio y amoníaco. Las designaciones del cuadro responden a una escala arbitraria del grado de enturbiamiento. Las designaciones de los fosfatos dependen de la intensidad del color azul tomada al efectuar el método de Fiske y Subbarow.-

interpretado en el sentido de que al menos parcialmente la inactivación se puede deber al paso de la enzima por la membrana.- El denominado P T 600 se ha revelado como el más adecuado para nuestros fines: es de diálisis relativamente rápida y no permite el paso de fosfatasa. En las experiencias que se relatan a continuación es el que generalmente se ha usado.-

#### Técnica para obtener la fracción no dializable

Hemos preferido dializar simplemente contra agua destilada. En algunos ensayos en que se siguió el método de Kumai en el cual se usan soluciones de borax y carbonato ácido de sodio sucesivamente, no hemos encontrado ninguna ventaja y sí inconvenientes porque el carbonato ácido de sodio, además de estabilizar el pH en valores que a veces pueden no ser los deseables, produce precipitados con algunos preparados de la parte termo - estable.-

Las directivas generales para obtener la fracción no dializable quedan restringidas por el hecho de que dependen de las propiedades particulares de cada

preparado del cual se parte y es por ello aconsejable comenzar con cantidades de solución de fosfatasa suficientemente grandes como para efectuar repetidas diálisis con un mismo preparado y adquirir cierta experiencia en el manejo del mismo. Esto permitirá ver que el envejecimiento de los preparados purificados se manifiesta por una inactivación más rápida que la ocurrida en los preparados recientemente obtenidos.-

Entre los factores que influyen en la velocidad de inactivación deben contarse la purificación y la concentración enzimática. Por lo que a la purificación se refiere, hemos encontrado una marcada dificultad para inactivar la solución que anteriormente hemos denominado "extracto crudo" pero en cambio se inactivan casi indistintamente los preparados denominados "El<sub>1</sub>", "El<sub>2</sub>" y "El<sub>3</sub>" entre los cuales hay una marcada diferencia en el grado de purificación.

Las concentraciones enzimáticas que hemos encontrado más favorables son aquellas de una potencia tal, que liberan 0,3 a 0,4 mg de P inorgánico por cada 0,5 ml de solución y al cabo de 10 minutos de incubación con beta-glícero-fosfato sódico como substrato.- A mayores diluciones, el proceso de inactivación irreversible que se cumple a la par de la inactivación por diálisis y que es debido al solo estado de dilución, adquiere importancia en el conjunto del fenómeno y oculta los resultados. Por otra parte, en soluciones demasiado concentradas la inactivación se efectúa muy lentamente, con todos los inconvenientes de esta contingencia.-

En general hemos dializado durante 6 días los preparados recientes, pero como se comprenderá por lo dicho, este tiempo debe necesariamente ser variable y debe seguirse siempre el proceso de inactivación titulando el valor enzimático restante, cada dos días; el agua contra la cual se dializa se renueva cada 2 horas el primer día y en los sucesivos 4 y 2 veces por día, manteniendo las soluciones permanentemente en el refrigerador.- Las soluciones que en los cuadros 16, 17, 18 y 19 figuran como "solución dializada" han sido obtenidas siguiendo estas directivas generales.-

#### Técnica para obtener la fracción termo - estable

Designaremos simplemente "fracción-termoestable" a aquella solución mediante la cual se reactiva la fracción inactivada por diálisis, hasta tanto su mecanismo de acción quede mejor discutido.-

En los ensayos preliminares esta fracción fué obtenida a partir de "extracto crudo" obtenidos siguiendo la técnica dada en el capítulo II y el cual fué acidificado con ácido clorhídrico a la concentración final de 0,01 normal. Estos "extractos crudos" acidificados, fueron posteriormente calentados en baño-maría con agua hirviendo. Como estos extractos son relativamente ricos en fosfatos inorgánicos, conviene desembarazarse de ellos alcalinizando con amoníaco hasta alcanzar un pH de alrededor de 9 y adicionando luego gotas de solución concentrada de acetato de magnesio hasta que no se produzca más precipitado. La adición de sales magnésicas es indispensable para la precipitación completa de los fosfatos pues aquellas se encuentran en cantidades relativas insuficientes en los extractos.- La "fracción termo-estable" que figura en el cuadro Nº 16 ha sido obtenida con esta técnica.-

Debido a que con la técnica anterior hemos tenido algunos fracasos resolvimos modificarla a favor de una separación a un pH ligeramente ácido y a temperatura de 37° C, procurando producir una precipitación lenta de las proteínas, con lo cual creemos que se obtienen resultados más uniformes y un mayor

Cuadro Nº 16

Reactivación por medio de la fracción termo-estable, de una solución "El<sub>2</sub>" dializada durante 7 días con papel celofán PT 600 contra agua destilada.-

| Tubo Nº  | 1     | 2     | 3     | 4     | 5   | 6   |
|--|-------|-------|-------|-------|-----|-----|
| Sol. antes de dial. ml                                   | 0,5   | ---   | ---   | ---   | --- | --- |
| Sol. dializada "   | ---   | 0,5   | 0,5   | 0,5   | --- | --- |
| F. Termo-estable "                                       | ---   | ---   | 0,5   | 1,0   | 1,0 | --- |
| "Buffer" Michaelis "                                     | 2,0   | 2,0   | 2,0   | 2,0   | 2,0 | 2,0 |
| Agua destilada "   | 1,5   | 1,5   | 1,0   | 0,5   | 1,0 | 2,0 |
| Conservados en el refrigerador 4 horas y a 37°C 1/2 hora |       |       |       |       |     |     |
| MgCl <sub>2</sub> (Sol. 0,02M) ml.                       | 1,0   | 1,0   | 1,0   | 1,0   | 1,0 | 1,0 |
| BGF(1) (Sol. 1%) "                                       | 5,0   | 5,0   | 5,0   | 5,0   | 5,0 | 5,0 |
| Incubación a 37°C durante 10 minutos                     |       |       |       |       |     |     |
| P inorg. liberado mg                                     | 0,366 | 0,172 | 0,274 | 0,266 | 0,0 | 0,0 |
| % de actividad   | 100   | 36    | 74,8  | 72,4  | 0   | 0   |

(1).-beta-Glicero-fosfato sódico.-

rendimiento en la fracción activadora.-

Hemos partido por lo general de 1000 ml. de extracto crudo obtenido con la técnica habitual; a ellos se agregan solución 1 normal de ácido clorhídrico hasta alcanzar un pH de alrededor de 5 (zona en la cual vira del rojo al amarillo el indicador rojo de cresol). A este pH y a temperatura ambiente comienza un enturbiamiento lento y gradual del extracto, que provee un medio seguro de que el pH deseado ha sido alcanzado y no debe continuarse agregando más ácido.- La solución es llevada luego a un termostato a 37°C y se la deja durante 24 a 36 horas. Es innecesario tomar precauciones contra la contaminación pues la mezcla es imputrescible.-

Al cabo de dicho tiempo se filtra para desembarazarse del precipitado proteico y se procede a eliminar los fosfatos inorgánicos agregando amoníaco concentrado hasta alcanzar un pH de 9 y luego gotas de solución concentrada de acetato de magnesio hasta que aparentemente no precipite más; al cabo de 24 horas se separan los fosfatos por centrifugación o por filtración a través de papel exento de fosfatos.-

Cuadro Nº 17

Reactivación por medio de la fracción termo-estable, de una solución "El<sub>3</sub>" dializada 4 días con papel celofán PT 600 contra agua destilada.-

| Tubo Nº                              | 1     | 2     | 3     | 4     | 5   | 6   |
|--------------------------------------|-------|-------|-------|-------|-----|-----|
| Sol. antes de dialisis ml            | 0,5   | --    | --    | --    | --  | --  |
| Sol. dializada "                     | --    | 0,5   | 0,5   | 0,5   | --  | --  |
| F. Termo-estable 1/10 "              | --    | --    | 0,5   | 1,0   | 1,0 | --  |
| "Buffer" Michaelis "                 | 2,0   | 2,0   | 2,0   | 2,0   | 2,0 | 2,0 |
| Agua destilada "                     | 1,5   | 1,5   | 1,0   | 0,5   | 1,0 | 2,0 |
| Conservado a 37°C durante 1 hora     |       |       |       |       |     |     |
| MgSO <sub>4</sub> (0,02M) ml         | 1,0   | 1,0   | 1,0   | 1,0   | 1,0 | 1,0 |
| BGF (Sol. 1%) "                      | 5,0   | 5,0   | 5,0   | 5,0   | 5,0 | 5,0 |
| Incubación a 37°C durante 10 minutos |       |       |       |       |     |     |
| P inorg. liberado mg                 | 0,310 | 0,100 | 0,288 | 0,271 | 0,0 | 0,0 |
| % de actividad                       | 100   | 32,2  | 90,3  | 87,4  | 0,0 | --  |

La precipitación de los restos de proteínas que aún contienen estos extractos la hemos efectuado adicionando ácido sulfo-salicílico a la concentración final del 2 % y dejando de 1/2 a 1 hora en el refrigerador antes de filtrar por papel exento de fosfato.- Nuevamente neutralizado con amoníaco y luego de esperar entre 12 y 24 horas para eliminar los restos de fosfatos insolubles que se formen, conviene verificar la presencia de la fracción termo-estable en esta etapa antes de proseguir con la precipitación. En el cuadro 17 se dan los resultados de una de estas verificaciones.-

La fracción termo-estable es precipitada por el alcohol y por la acetona. Hemos aprovechado esta propiedad para purificar parcialmente dicha fracción, prefiriendo la acetona porque nos ha dado resultados cuantitativos mayores y porque los precipitados son más fáciles de separar.- Para efectuar la precipitación se agregan 2,5 a 3 volúmenes de acetona purificada a 1 volumen de extracto crudo y se deja sedimentar durante 1 o 2 días en cilindros de capacidad adecuada; al cabo de este tiempo se decanta y centrifuga.-

El precipitado se lava con alcohol y con acetona y luego se deseca hasta que desaparezca todo vestigio de acetona. Es casi totalmente soluble en agua destilada o en alcohol de 25°C.- La denominada fracción termo-estable pp. del cuadro N° 18 ha sido obtenida con la técnica mencionada.-

Cuadro N° 18

Activación de solución dializada de fosfatasa por el precipitado acetónico de la fracción termo-estable.-

| Tubo N°                              |    | 1     | 2     | 3     | 4   | 5   |
|--------------------------------------|----|-------|-------|-------|-----|-----|
| Sol. antes de diálisis               | ml | 0,5   | ---   | ---   | --- | --- |
| Sol. dializada                       | "  | ---   | 0,5   | 0,5   | --- | --- |
| F. Termo-estable pp.                 | "  | ---   | ---   | 0,5   | 0,5 | --- |
| "Buffer" Michaelis                   | "  | 2,0   | 2,0   | 2,0   | 2,0 | 2,0 |
| Agua destilada                       | "  | 1,5   | 1,5   | 1,0   | 1,5 | 2,0 |
| Conservado a 37°C durante 1 hora     |    |       |       |       |     |     |
| MgCl <sub>2</sub> (0,02 M)           | ml | 1,0   | 1,0   | 1,0   | 1,0 | 1,0 |
| BGF (sol. 11%)                       | "  | 5,0   | 5,0   | 5,0   | 5,0 | 5,0 |
| Incubación a 37°C durante 10 minutos |    |       |       |       |     |     |
| P inorgánico liberado                | mg | 0,244 | 0,082 | 0,180 | 0,0 | 0,0 |
| % de actividad                       |    | 100   | 73,7  | 33,6  | --- | --- |

El mecanismo de la reactivación de los preparados dializados

¿ Son las sales de magnesio las que activan los preparados dializados ?

Se ha visto en páginas anteriores que las sales magnésicas producen una marcada reactivación en los preparados inactivados por diálisis. La posibilidad que el efecto que estudiamos ahora sea debido al agregado de estas sales con la fracción termoestable, ha quedado parcialmente eludida por la adición de  $MgCl_2$ , en las concentraciones que generalmente se estiman óptimas, a todos los tubos (cuadros 16 a 18).-

Sin embargo, nos ha parecido que la demostración definitiva de que dicho efecto es ageno a las sales magnésicas requiere un estudio más completo y para realizarlo hemos dispuesto una serie de tubos en los cuales la solución de fosfatasa dializada, adicionada y no adicionada de fracción termoestable, se hizo actuar frente a concentraciones crecientes de magnesio, que se aumentaron hasta que se manifestó un efecto inhibitor.- En el cuadro N° 19 se pueden apreciar el dispositivo experimental y los resultados.-

Cuadro N° 19

Activación de la fosfatasa dializada por la fracción termoestable frente a concentraciones crecientes de sales de magnesio.-

| Tubo N°           | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
|-------------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|
| Antes diálisis ml | 1 | - | - | - | - | - | - | - | - | -  |
| Sol. dializada "  | - | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | -  |
| F.Term-estable "  | - | - | 1 | - | 1 | - | 1 | - | 1 | 1  |
| B. Michaelis "    | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3  |
| Agua destilada "  | 1 | 1 | - | 1 | - | 1 | - | 1 | - | 1  |

1 hora a 37° C.-

|                  |      |   |   |      |      |     |     |   |   |    |
|------------------|------|---|---|------|------|-----|-----|---|---|----|
| $MgCl_2$ mEq (1) | 0,03 | 0 | 0 | 0,03 | 0,03 | 0,3 | 0,3 | 3 | 3 | 0, |
| BGF (1%)         | 4    | 4 | 4 | 4    | 4    | 4   | 4   | 4 | 4 | 4  |

Incubación 20 minutos a. 37° C.-

|                |      |      |      |      |      |      |      |      |      |   |
|----------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|---|
| pH             | 9,5  | 9,8  | 9,8  | 9,8  | 9,8  | 9,5  | 9,5  | 9,4  | 9,4  | - |
| P liberado mg  | 0,48 | 0,08 | 0,20 | 0,14 | 0,30 | 0,15 | 0,28 | 0,10 | 0,18 | 0 |
| % de actividad | 100  | 17,8 | 41,1 | 29,6 | 61,7 | 31,2 | 58,8 | 20,8 | 35,8 |   |

(1).- mili-equivalentes agregados en 1 ml de solución acuosa.-

La comparación por separado de los pares de tubos 2 - 3, 4 - 5, 6 - 7, y 8 - 9 permite afirmar que existe una activación independiente del agregado de sales magnésicas pues hasta el par 8 - 9 en el cual la adición de magnesio es excesiva manifiesta activación por el agregado de la fracción termo-estable. El máximo valor alcanzado en cada una de las series donde se agregó y no se agregó fracción termo-estable, es respectivamente de 61,7 % y 31,2 % del valor original antes de diálisis.-

¿ Son las sales de manganeso las que activan los preparados dializados ?

Hemos visto anteriormente que las sales de manganeso también activan la fosfatasa mamaria; debe, por consiguiente, considerarse la posibilidad de que sean estas sales las que alcancen su concentración óptima al agregarse la fracción termo-estable sobre las soluciones dializadas y que por este mecanismo se produzca la activación.-

El mismo dispositivo experimental que ha probado que no puede atribuirse al agregado de sales magnésicas toda la activación de la fracción termo-estable, prueba que tampoco puede atribuirse a las sales de manganeso que con aquella fracción pudiera agregarse.-

En el cuadro N° 20 se puede apreciar que la fracción termo-estable mantiene su efecto de activación aún frente a concentraciones de sales de manganeso superiores a las del óptimo de acción de este catión.-

Cuadro N° 20

Activación de la fosfatasa dializada por la fracción termo-estable frente a concentraciones crecientes de sales de manganeso.-

| Tubo N°                          | 1    | 2    | 3    | 4    | 5    | 6    | 7    | 8    | 9    |
|----------------------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| Antes diálisis ml                | 1    | --   | --   | --   | --   | --   | --   | --   | --   |
| Sol. dializada "                 | --   | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    |
| F.Term-estable "                 | -    | -    | 1    | -    | 1    | -    | 1    | -    | 1    |
| B.Michaelis "                    | 3    | 3    | 3    | 3    | 3    | 3    | 3    | 3    | 3    |
| Agua destilada                   | 1    | 1    | -    | 1    | -    | 1    | -    | 1    | -    |
| 1 hora a 37° C.-                 |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
| MnCl <sub>2</sub> mEq/100 (1)    | 1    | 0    | 0    | 1    | 1    | 10   | 10   | 50   | 50   |
| BGF <sup>2</sup> (1%)            | 4    | 4    | 4    | 4    | 4    | 4    | 4    | 4    | 4    |
| 30 minutos de incubación a 37° C |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
| P liberado mg                    | 0,38 | 0,04 | 0,18 | 0,10 | 0,25 | 0,11 | 0,24 | 0,09 | 0,17 |
| % de actividad                   | 100  | 10,5 | 47,3 | 26,3 | 65,7 | 28,9 | 63,1 | 23,7 | 44,7 |

(1).- Centesimos de mili-equivalente.-

### Destrucción de la fracción termo-estable por mineralización

Por medio de la mineralización puede descartarse, en términos generales, que el efecto de activación deba ser atribuido a un componente inorgánico de la fracción termo-estable.-

Se han mineralizado en seco, sin adición de oxidantes ni catalizadores, las diversas fracciones termo-estables obtenidas con los métodos previamente descritos y todas han dado resultados concordantes: el efecto de activación desaparece prácticamente por completo como consecuencias de la mineralización.-

Dos ejemplos típicos de los ensayos que se efectuaron con el propósito de verificar esta destrucción, son los siguientes (la disposición general de la experiencia es la misma que aquellas que se informan en los cuadros 16 - 20):

|    |  |                              |
|----|--|------------------------------|
| 1) | Actividad de la Sol. dializada               | 30,3 % de la activ. original |
|    | Actividad de la fracción termo-estable       | 0,0                          |
|    | Act. de la sol. dial. f. termoestable        | 63,8 % " " " "               |
|    | Act. de sol. dial. f. termoestab. mineral.   | 33,4 % " " " "               |
| 2) | Actividad de la sol. dializada               | 26,0 % de la act. original   |
|    | Actividad de la fracción termo-estable       | 0,0                          |
|    | Act. de la sol. dial. f. termoestable        | 70,2 % " " " "               |
|    | Act. de sol. dial. f. termoestab. mineraliz. | 29,9 % " " " "               |

### La acción de la fracción termoestable sobre la estabilidad de la solución dializada.-

Se ha visto que H. y E. Albers (1935) encontraron que la diálisis de sus preparados renales purificados eliminaba una substancia estabilizadora de los mismos. La posibilidad de que el efecto de la fracción termoestable que estamos estudiando revele simplemente una mejor estabilización de los preparados estacionados a un pH inadecuado para conservar su potencia, no queda eliminada en nuestras experiencias anteriores.-

Por este motivo se efectuaron determinaciones con preparados previamente "no conservados" a 37°C y pH 9 y con otros previamente "conservados" a

a la misma temperatura y pH. Los resultados de estas determinaciones muestran que las diferencias entre ambos preparados son mucho menores que las necesarias para explicar el fenómeno de la reactivación por la fracción termo-estable.-

He aquí un ejemplo de una de estas experiencias (la disposición general de la experiencia es similar a la que se informa en los cuadros 16 - 20):

|    |  |                       |
|----|--|-----------------------|
| 1) | "No conservado" a 37°C y pH 9  | 0,22 mg de P liberado |
|    | "Conservado" a 37°C y pH 9 durante 1 hora  | 0,21 " " " "          |
| 2) | "No conservado" a 37°C y pH 9  | 0,23 mg de P liberado |
|    | "Conservado" a 37°C y pH 9 durante 1 hora, adicionado de la fracción termo-estable.- | 0,48 mg de P liberado |

## Capítulo V

### LOS INHIBIDORES DE LA FOSFOMONOESTERASA ALCALINA

Al estudiarse los inhibidores de una enzima cualquiera, deben tomarse en consideración, en primer lugar, los mismos productos formados a consecuencia de la actividad enzimática, los cuales actuando por acción de masas frenan paulatinamente el desarrollo de la reacción. Este fenómeno general se cumple en el caso de la fosfomonoesterasa alcalina y es así que tanto la presencia del grupo fosfórico como la del grupo alcohólico en exceso, detiene el desarrollo de la escisión.- En este sentido se comportan en forma igual ambos grupos, pero además, según se desprende de los cuidadosos estudios de la cinética de la reacción efectuados por Jacobsen (1933), el grupo fosfórico posee otra acción por la cual inhibe competitivamente a la fosfatasa mediante la formación de un complejo enzima-fosfato que es inactivo.-

También sufren las fosfatasas las acciones de otros numerosos reactivos que las inhiben más o menos específicamente. No resulta sencillo uniformar las abundantes referencias que existen acerca de este tema, pero se desprende del estudio de las mismas, que los investigadores han perseguido en ellas principalmente dos finalidades. Se manifiesta en primer término una finalidad fisiológica; esto es, procuran mediante los mencionados fenómenos inhibitorios obtener información sobre las funciones que desarrolla la enzima en el interior del organismo y como están ellas reguladas por factores ajenos a la enzima en sí.-

La otra finalidad reiteradamente perseguida es la de comparar el comportamiento frente a variados inhibidores, de fosfomonoesterasas alcalinas aisladas de distintos órganos y que se conducen en forma parecida en los estudios de cinética; aquella comparación aporta datos adicionales a favor o en contra de la identidad de las mismas.-

Puede perseguirse una tercera finalidad con el estudio de los fenómenos inhibitorios. Desde que se afianza cada vez más la idea de que en las relaciones entre la enzima y el substrato hay una reacción de tipo químico, se busca aclarar cuales son los grupos de la molécula enzimática por medio de los cuales el substrato se une a la misma. Dada la enorme complejidad de la constitución de las enzimas este es un problema sumamente arduo, al cual han aportado una importante información los estudios sobre las inhibiciones. En el caso de las fosfatasas estos estudios no han sido emprendidos hasta hoy, en que daremos en este capítulo, los primeros datos sobre una reacción que probablemente tendrá interés a este respecto.-

INHIBICIONES QUE APORTAN DATOS DE INTERES PARA EL ESTUDIO  
DE LAS FUNCIONES DE LA FOSFATASA

Waldschmidt-Leitz y colaboradores (1932 - 33) encontraron que la fosfatasa de origen renal es inhibida por el glutatión y por otros compuestos sulfidrílicos que toman participación en los fenómenos de óxido - reducción y dedujeron de este hecho que los mencionados compuestos actúan en el interior de las células como directores de las funciones de fosforilización y que a la inversa, estas funciones están estrechamente ligadas con los procesos de óxido reducción. La acción inhibidora de algunos de estos tiol-derivados fue posteriormente confirmada por Thannhauser y colaboradores (1937), pero fue negada por Lohmann en 1933, quien sostuvo que no se revela ninguna inhibición de la fosfatasa por el glutatión a pH fisiológico, concluyendo este autor que no existe la dependencia sostenida por Waldschmidt-Leitz entre el glutatión y los fenómenos de fosforilización.-

La floridzina ha sido estudiada en relación con las funciones de la fosfatasa renal; no afecta sensiblemente la acción hidrolítica de esta a pH alcalino o neutro (Lambrechts; Walker y Hudson; Kritzer y Gutman), pero sí afecta a la fosfatasa de este órgano que actúa en medio ácido, y además, lo que es más importante, actúa inhibiendo las funciones sintetizantes de la enzima, lo que ha dado lugar a la hipótesis de que el tipo especial de diabetes producido por aquel alcaloide se produce por una falla del mecanismo de fosforilización deteniendo así una etapa previa a la reabsorción de la glucosa a nivel de los túbulos (Lundsgard, Kalchar y Beck).-

La interrelación entre vitaminas y fosfatasa ha despertado explicable interés, pero no parece que se han conseguido resultados importantes; Pyle, Fisher y Clark (1937) encuentran que la fosfatasa renal es inhibida por la vitamina C; Giri (1939), en cambio, halla que la mencionada vitamina sola no actúa frente a las fosfatasas alcalinas y ácidas aisladas de riñón, hígado y cerebro, sino que necesita estar acompañada por el ión cúprico para que las inhiba;- Esta inhibición de la fosfatasa por el complejo vit.C - Cu' es anulada por el glutatión, cisteína, cistina compuestos del tipo del NaCN y Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> y por cuerpo integrantes de los extractos impuros que probablemente correspondan a algunos de los protectores primeramente citados (glutatión, cisteína, etc.-).-

La acción de las vitaminas A y D sobre la fosfatasa del suero sanguíneo han sido estudiadas por Baumgartner, King y Page (1929), Reside y Page

(1930) y por Crimm y Strayer (1935 - 36). Estos últimos autores concluyen en que las ratas intoxicadas con viosterol muestran una reducción marcada de las fosfatasas contenidas en sangre y en riñón mientras que aumenta en el intestino delgado y no muestra ninguna variación sobre el escaso contenido que hay en hígado y bazo.-

El efecto inhibitorio de los fluoruros sobre la glicolisis descubierto por Lépine y la inhibición que esos mismos aniones producen sobre los procesos de fermentación de la levadura, han dado lugar a que se investigue la posibilidad de que dicho efecto fuera debido a una acción sobre la capacidad que poseen los tejidos de escindir los ésteres fosfóricos, los cuales como es sabido, son productos intermediarios en el desarrollo de ambos procesos.-

Lipmann en 1928 encontró que el NaF, a concentraciones que oscilan entre 0,1 molar y 0,001 molar, inhibía la hidrólisis de derivados hexosofosfóricos y glicero - fósforicos en proporciones que variaban entre el 15 y el 92 %, cuando se trabajaba con músculos lavados o con extracto de músculos de rana. Relacionando estas experiencias con la inhibición que sufre el proceso de formación del ácido láctico también en presencia de NaF, concluyó Lipmann que en este último fenómeno hay que tomar en consideración la inhibición de la actividad fosfátásica.-

También ha sido estudiada la acción de los fluoruros sobre la fosfatasa plasmática en relación con los fenómenos característicos que ejercen aquellas sales sobre dientes y huesos. Phillips relató que en las vacas lecheras el aumento de fosfatasa era una indicación de fluorosis, pero esto no pudo ser confirmado por las stas. Smith y Lantz en las ratas albinas; la comunicación de estas autoras concluye que los fluoruros no ejercen su daño característico en los dientes de la ratas mediante un efecto sobre la enzima, ni puede ser considerado como una indicación sensible de fluorosis en las ratas, el aumento del contenido de fosfatasa plasmática.-

El estudio de la inhibición por medio de los fluoruros ha servido además, para diferenciar fosfatasas de distintos orígenes. Auhagen y Grzyki (1933) estudiaron detenidamente la acción de los fluoruros sobre las fosfatasas de la levadura, riñón y taka - diastasa, encontrando que en la levadura hay dos fosfatasas una ( pH óptimo 6) es fuertemente inhibida por el fluoruro de sodio 0,02 M. y otra (pH óptimo alcalino) que no es inhibida. Igual que esta última se comporta la fosfatasa alcalina de riñón, mientras que en la taka - diastasa hay dos: una, insensible a los fluoruros y otra (tipo ácido) poco sensible.-

Belfanti y colaboradores (1935) no encuentran inhibiciones por los fluoruros para las fosfatasas alcalinas de plasma, hueso, riñón, hígado e intestino, pero Cloetens (1939) como ya hemos visto (vease cap. I) divide las fosfomonoesterasas alcalinas en dos tipos: la de tipo I es inhibida por el NaF 0,01 normal en presencia de iones de magnesio mientras que la de tipo II no es afectada en esas condiciones .-

#### La acción de los fluoruros sobre la fosfatasa mamaria

Con el objeto de averiguar si los fluoruros toman alguna intervención en los procesos de defosforilización de la glándula mamaria y además para tratar de ubicar la fosfatasa de este órgano dentro de algunos de los grupos a los que nos hemos referido anteriormente, se han efectuado determinaciones con nuestros preparados purificados.-

Es probable que la enorme discrepancia que se encuentra frecuentemente en la descripción del efecto de un reactivo cualquiera sobre la actividad fosfatásica y sobre las cuales hemos dado varias referencias, sea debido a que se descuida tomar todas las precauciones necesarias para fijar el pH en los valores deseados.-

En las experiencias que comunicamos se ha usado el "buffer" de veronal propuesto por Michaelis, para obtener un pH determinado y este ha sido posteriormente controlado en la mezcla final en que se efectúa la hidrólisis. En algunos casos las diferencias de pH debidas al agregado de soluciones salinas son mucho mayores de lo que generalmente se prevee y estos cambios en la concentración de hidrogeniones pueden alterar fundamentalmente la interpretación del hallazgo de una disminución de la actividad.-

En el cuadro N° 21 se dan los valores de una experiencia efectuada con un preparado de 1963 U.F./mg N, sobre el cual se estudian los efectos del NaF a la concentración final 0,01 M, y en el gráfico N° 12 se dan los resultados de una experiencia con un preparado de 2470 U.F./mg N sobre el que ha actuado el NaF a la concentración 0,02 M. En ambos casos se adicionó magnesio en cantidades tales que se lograba un qMg 3 .-

No hay inhibición significativa en ninguno de los dos ejemplos; el valor ligeramente menor que se puede observar en el cuadro N° 21 para los tubos que contienen fluoruros con relación a los que contienen cloruro de sodio carece de importancia y es, por otra parte, una diferencia de sentido con-

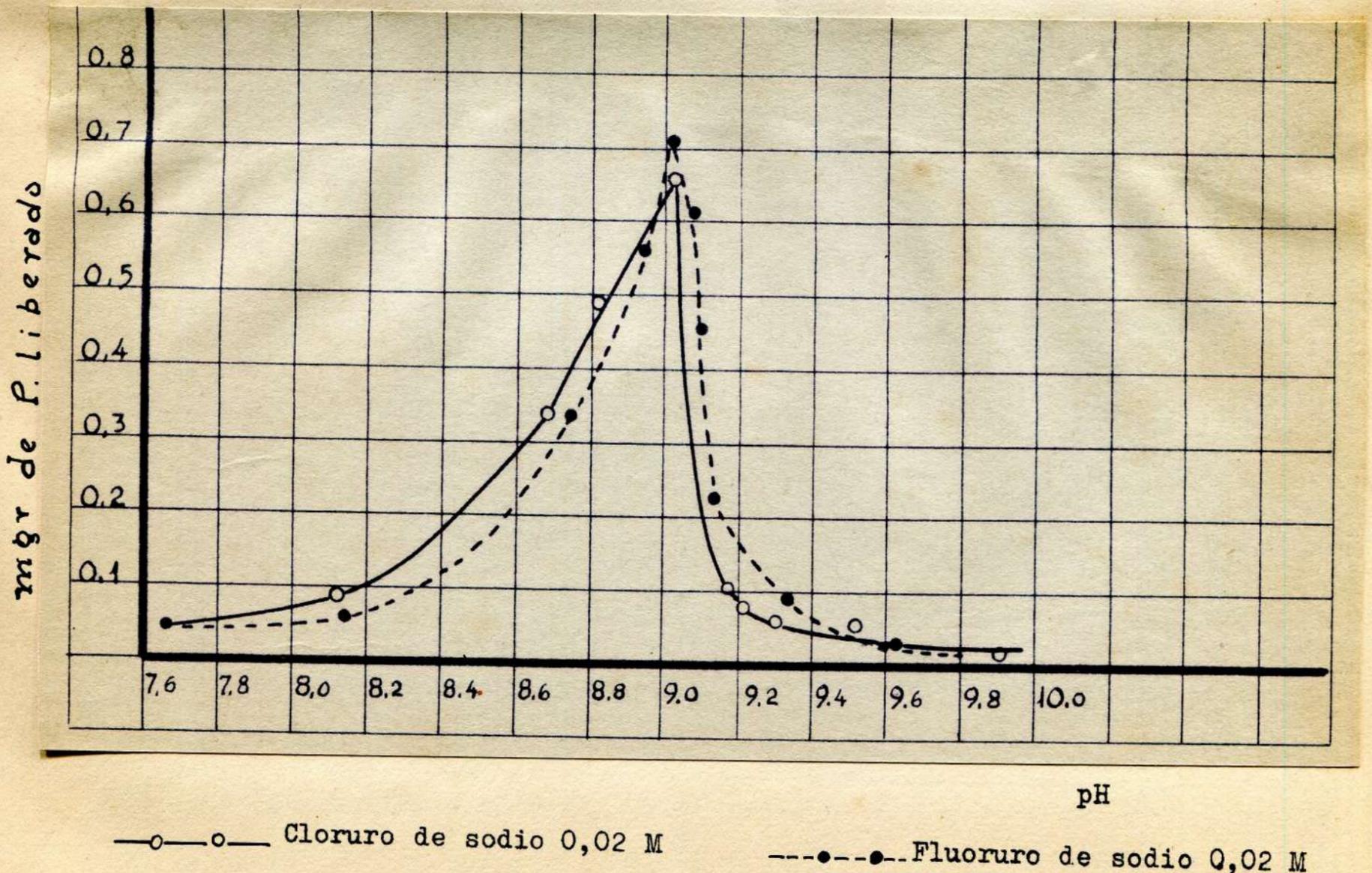
Cuadro N° 21

Acción del NaF sobre la fosfatasa mamaria, en presencia de magnesio.- Substrato, beta-glicero-fosfato sódico 0,01 molar.- "Buffer" de Michaelis.- Temp. 37°  
Período de incubación 1 hora.-

| Sin adición de NaF |            | Con adición de NaF 0,01 M (') |            |
|--------------------|------------|-------------------------------|------------|
| pH                 | P liberado | pH                            | P liberado |
| 9,15               | 0,209      | 9,20                          | 0,495      |
| 9,00               | 0,410      | 9,07                          | 0,414      |
| 8,90               | 0,525      | 9,00                          | 0,375      |
| 8,75               | 0,460      | 8,95                          | 0,330      |
| 8,24               | 0,111      | 8,68                          | 0,202      |
| 7,82               | 0,064      | 7,30                          | 0,068      |
| 7,20               | 0,031      | 6,20                          | 0,040      |
| 5,85               | 0,015      | 5,44                          | 0,040      |
| 5,00               | 0,040      | 4,02                          | 0,032      |
| 4,22               | 0,042      | 3,50                          | 0,028      |
| 3,66               | 0,033      | 2,90                          | 0,025      |
| 3,20               | 0,022      |                               |            |

(').- Concentración final, en la mezcla incubada.-

Figura N° 12



trario a aquella que se puede apreciar en el gráfico N°12. Más frecuentemente que las diferencias en aumento o disminución de la actividad, se puede observar un ligero desplazamiento del pH óptimo, tal como se observa en el cuadro; no es sin embargo, un fenómeno constante aun cuando lo tenemos observado en otras experiencias con NaF.-

Debe concluirse de estos resultados que los procesos de fosforilización en la glándula mamaria no son afectados por los fluoruros y además, que la fosfatasa de este órgano debe agruparse con las del tipo II de Cloetens ( vease cap. I ) por lo que su comportamiento frente a los fluoruros se refiere.-

INHIBICIONES QUE APORTAN DATOS DE INTERES PARA DIFERENCIAR  
LAS FOSFATASAS ALCALINAS ENTRE SI

Las referencias encontradas en la literatura con respecto a estas inhibiciones se han dado en el capítulo primero. Aquí debemos agregar que con el objeto de aclarar la ubicación de la fosfomonoesterasa alcalina mamaria, hemos estudiado su comportamiento frente a los oxalatos y a los cianuros.-

Acción de los oxalatos sobre la fosfatasa mamaria

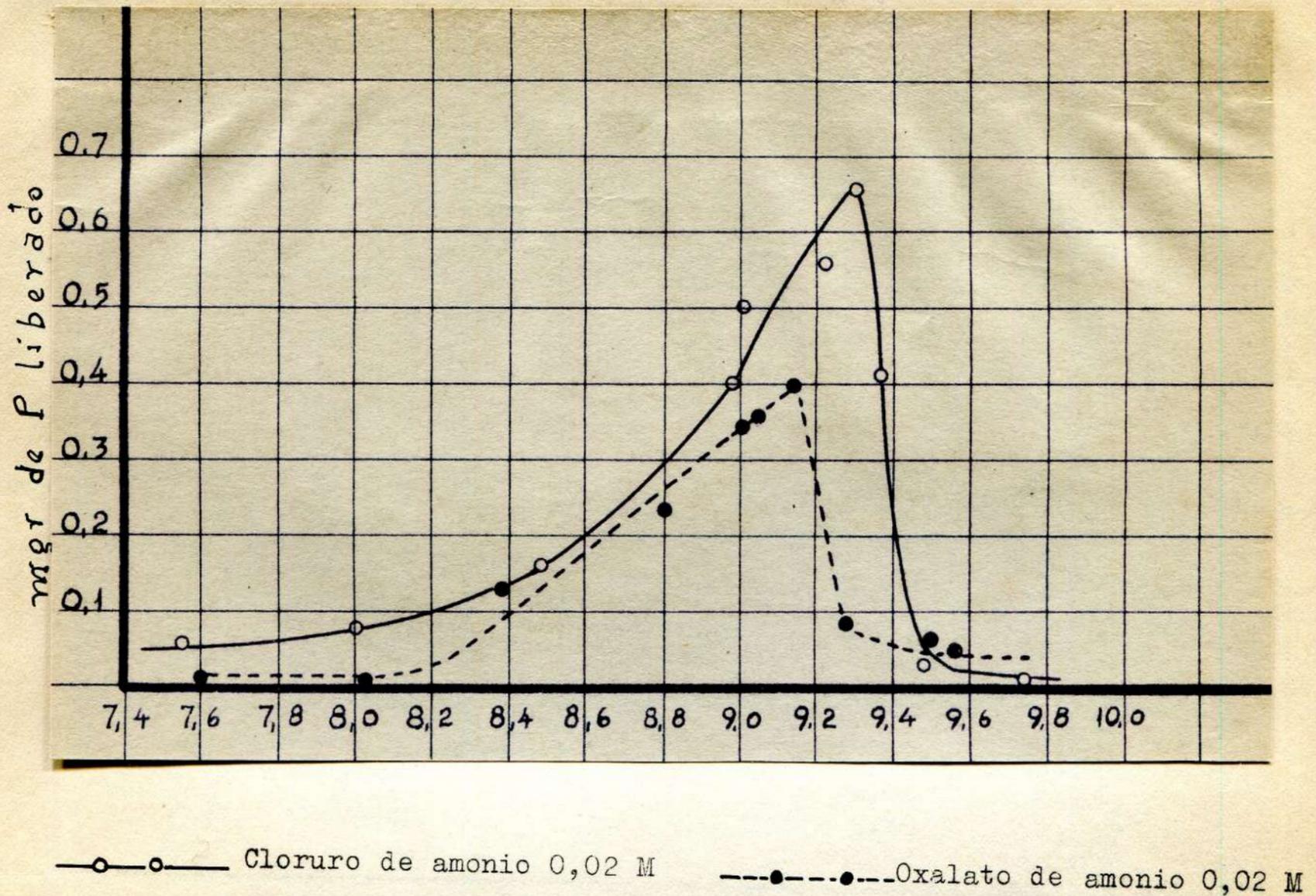
Cuadro N° 22

Inhibición de la fosfatasa mamaria por el oxalato de amonio 0.01 M en presencia de Mg.Subst. beta-glicero-fosfato sódico 0.01 M. Temp. 37°C. Inc. 1 hora.

| Con cloruro amónico 0.01 M (') |            | Con oxalato amónico 0.01 M (') |            |
|--------------------------------|------------|--------------------------------|------------|
| pH                             | P liberado | pH                             | P liberado |
| 9.40                           | 0.067      | 9.60                           | 0.103      |
| 9.25                           | 0.354      | 9.20                           | 0.557      |
| 9.15                           | 0.321      | 9.09                           | 0.481      |
| 9.01                           | 0.743      | 9.02                           | 0.400      |
| 8.90                           | 0.590      | 8.90                           | 0.350      |
| 8.85                           | 0.482      | 8.60                           | 0.307      |
| 8.76                           | 0.337      | 8.30                           | 0.224      |
| 8.00                           | 0.130      | 7.23                           | 0.131      |
| 7.43                           | 0.113      | 7.00                           | 0.110      |
| 7.03                           | 0.102      | 6.13                           | 0.090      |
| 6.21                           | 0.077      | 5.45                           | 0.050      |
| 5.66                           | 0.059      | 4.39                           | 0.052      |
| 3.98                           | 0.044      | 4.13                           | 0.049      |
| 3.20                           | 0.044      | 3.95                           | 0.042      |

('). Concentración final.-

Figura N° 13



Los resultados que se dan en el cuadro N° 22 corresponden a un preparado de 1963 U.F./mg. N, el cual fué tratado, para comparar los efectos, con cloruro de amonio y oxalato de amonio a las concentraciones finales de 0.01 M, y los resultados del gráfico N° 13 corresponden a un preparado de 2470 U.F./mg.N tratado con cloruro y oxalato de amonio a la concentración final de 0.02 M. En los dos casos los efectos se estudiaron en presencia de magnesio a la concentración final de qMg 3. Se utilizó "buffer" de veronal, según Michaelis y se determinaron potenciométricamente los pH en las mezclas finales.-

Se puede apreciar que la fosfatasa mamaria es claramente inhibida por el oxalato de amonio desde la concentración de 0.01 M, en la cual inhibe hasta el 26 %; a la concentración de 0.02 M la inhibición alcanza al 41 % si se toman los valores máximos de las curvas sin oxalatos y con oxalatos.-

Recordamos que en experiencias similares a estas, Belfanti y colaboradores encontraron que las fosfatasas del hígado y del riñón del conejo no son inhibidas por el oxalato, mientras que éste inhibe parcialmente la fosfatasa alcalina de suero y hueso de aquel mismo animal y también la del suero del caballo.

La confrontación de nuestros resultados con los comunicados por los autores italianos, asemejarían la fosfatasa mamaria con las de suero y hueso.-

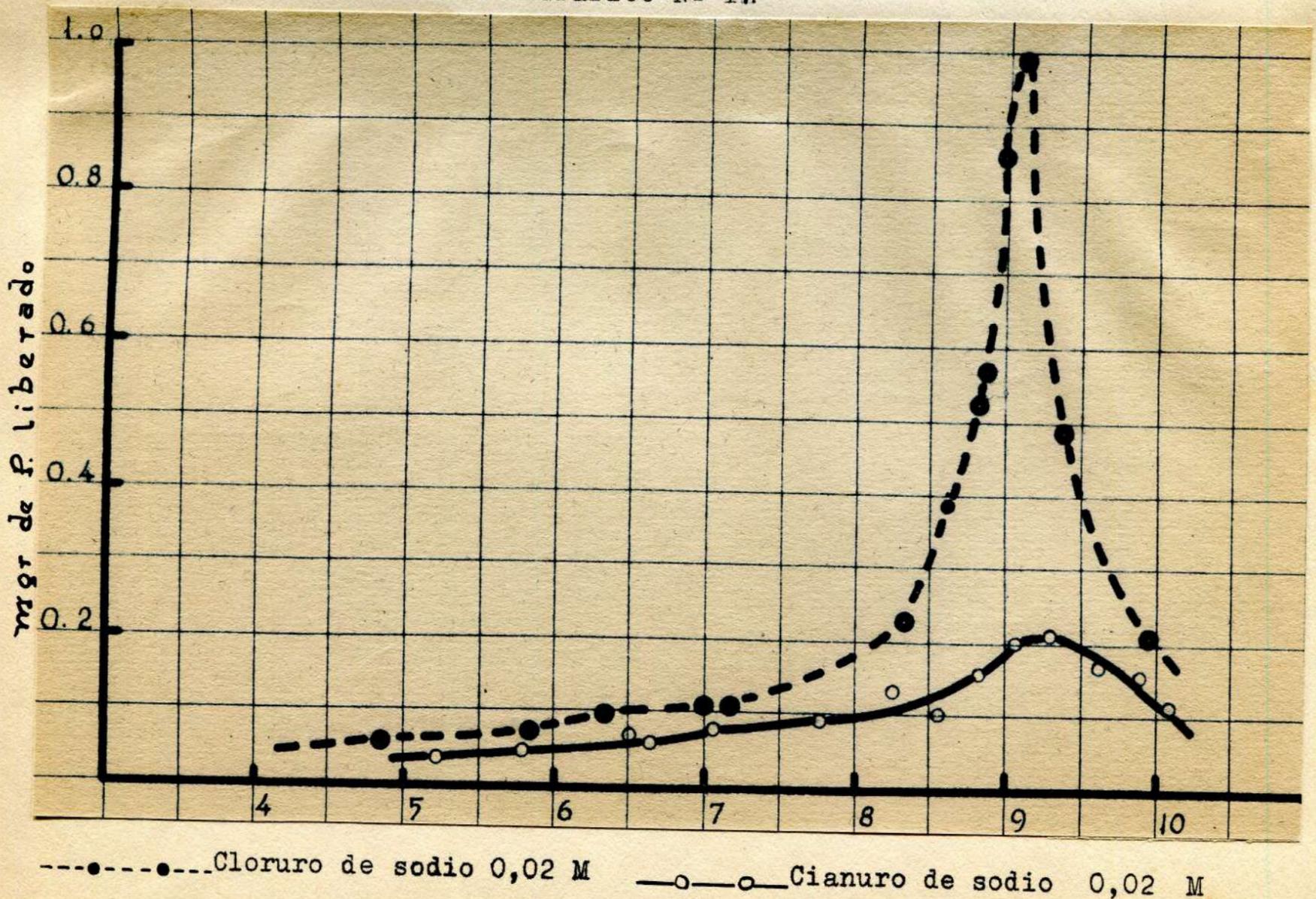
Acción de los cianuros sobre la fosfatasa mamaria

Cuadro Nº 23

Inhibición de la fosfatasa mamaria por el cianuro de sodio 0.01 M, en presencia de Mg'. Substrato beta-glícero-fosfato sódico. Temp. 37°C. Tiempo de incubación 1 hora.-

| Con NaCl | 0.01 M<br>P<br>liberado | pH   | Con NaCN | 0.01 M<br>P<br>liberado | pH   |
|----------|-------------------------|------|----------|-------------------------|------|
|          | 0.092                   | 9.61 |          | 0.061                   | 9.72 |
|          | 0.260                   | 9.30 |          | 0.098                   | 9.33 |
|          | 0.590                   | 9.11 |          | 0.302                   | 9.25 |
|          | 0.433                   | 9.00 |          | 0.272                   | 9.10 |
|          | 0.257                   | 8.72 |          | 0.200                   | 8.98 |
|          | 0.108                   | 8.16 |          | 0.113                   | 8.01 |
|          | 0.069                   | 7.50 |          | 0.062                   | 7.50 |
|          | 0.045                   | 6.71 |          | 0.040                   | 6.50 |
|          | 0.045                   | 5.78 |          | 0.040                   | 6.01 |
|          | 0.040                   | 4.98 |          | 0.040                   | 5.40 |
|          |                         |      |          | 0.030                   | 4.83 |

Gráfico Nº 14.



Con los mismos preparados que se estudiaron la inhibición de la fosfomonoesterasa mamaria por medio de los oxalatos, fué determinada la inhibición por medio de los cianuros. Las concentraciones de cianuro de sodio usada para estas determinaciones fueron de 0.01 M y 0.005 M, siendo todas las otras condiciones exactamente iguales a las de las experiencias anteriores. Los resultados se resumen en el cuadro N<sup>o</sup> 23 y en el gráfico N<sup>o</sup> 14.-

La relación entre los valores más elevados de las dos series de determinaciones, revela que la adición de NaCN 0.01 M inhibe a la fosfatasa mamaria hasta un 48.5 % con respecto a aquellos preparados a los cuales se agregó NaCl en la misma concentración. Cuando se adiciona una y otra sal a la concentración 0.005 M los valores en menos de la serie a la que se agrega NaCN alcanzan hasta el 27.3 %.-

La comparación de estos resultados con los referidos por Cloetens ( 1939 ) asemeja la fosfatasa aislada de la glándula mamaria con el tipo II de este autor, que es fuertemente inhibida por el KCN y se encuentra especialmente abundante en intestino y hueso.-

Clasificación de la fosfomonoesterasa alcalina de la glándula mamaria, según las acciones inhibitorias estudiadas.-

De las experiencias de inhibición efectuadas por varios autores, parece posible distinguir dos tipos dentro del extenso grupo correspondiente a las fosfomonoesterasas alcalinas. Los resultados a los cuales nos referimos no son, por cierto, totalmente concordantes, ya que estos autores no han tomado siempre fosfatasas de iguales orígenes para establecer las comparaciones.-

Recordaremos en primer término, que según las experiencias de Belfanti, Contardi y Ercoli ( 1935 ), las fosfatasas extraídas de hígado y riñón reaccionan de una manera diferente frente a los oxalatos a lo que lo hacen las extraídas de suero y hueso; ambos tipos se reúnen con los oxalatos para constituir un complejo inactivo, pero mientras en las fosfatasas de suero y hueso dicho complejo es irreversible, la reunión con las fosfatasas de riñón e hígado es lo suficientemente lábil como para que los fosfatos inorgánicos presentes en el medio lo descompongan y dejen un compuesto fosfatasa-fosfato activo. Como consecuencia de esta distinta conducta, resulta en experiencias de corta duración, que todas las fosfatasas son inhibidas por los oxalatos, pero en experiencias de una hora de duración, las fosfatasas de hígado y riñón no son inhibidas por los oxalatos mientras que las de hueso y suero sí lo son.-

Por otra parte Cloetens R. ( 1939 ), ha encontrado dos tipos de fosfatasas alcalinas que se encuentran desigualmente distribuidas en los órganos por él estudiados. Del tipo I son especialmente ricos riñón e hígado mientras que el tipo II prepondera en intestino y hueso, y como propiedades que la distinguen tenemos las siguientes; en presencia de iones de Mg el tipo I es poco afectado por el KCN, mientras que el tipo II es completamente inactivado; a la inversa el NaF a la concentración 0.01 M inactiva el tipo I pero no afecta el tipo II.-

Aunque ya hemos confrontado a propósito de cada inhibición estudiada en la glándula mamaria, los resultados obtenidos con los relatados para otras fosfatasas creemos oportuno resumir las conclusiones en este lugar, para recalcar, que si las anteriores comunicaciones de Belfanti y colaboradores por un lado y las de Cloetens, por otro, se confirman, la fosfatasa mamaria debe ser colocada en un grupo junto a las de suero, hueso e intestino y diferenciarla de las de riñón e hígado, puesto que no es inhibida por el fluoruro de sodio a la concentración final 0.01 M y es inhibida por los oxalatos 0.02 M y por los cianuros desde la concentración 0.005 M.-

#### LA INHIBICION DE LA FOSFATASA ALCALINA POR EL FORMALDEHIDO

En el mecanismo de acción de una proteína específica interviene en forma necesaria todo el conjunto molecular; por esto, siempre que se afecte la estructura general de esas enormes moléculas se afectarán paralelamente sus actividades. Es así, por ejemplo, que no debe esperarse reencontrar en las fracciones producidas como consecuencia de un proceso hidrolítico cualquiera, la actividad de la molécula de la cual se partió.-

Sin embargo, sin pretender contradecir la afirmación anterior, ha de esperarse que sea posible evidenciar que la actividad específica se cumpla a través de determinados grupos químicos que actuarían como funcionales en estos procesos. La confirmación experimental requiere que el bloqueo de dichas funciones mediante reactivos que producen muy escasas modificaciones en el conjunto molecular, afecten, no obstante, marcadamente la actividad específica.-

Investigaciones planeadas en base a tal razonamiento permitieron avanzar algunas hipótesis sobre el mecanismo de acción de hormonas de naturaleza proteica tales como la insulina o la gonadotropina ( vease Bischoff, 1942 ). También fueron aplicados por Ross y Stanley ( 1938 ) para estudiar los grupos activos en la molécula del virus cristalizabile que provoca la enfermedad del mosaico del ta-

baco; estudiando la acción del formaldehído sobre dicho virus han podido concluir que las funciones aminos y aquellos otros grupos de la molécula que reaccionan con el reactivo de los fenoles de Folin, son indispensables para que se manifieste la actividad del virus.-

En el campo de la enzimología se han realizado también numerosas experiencias; estudios con objeto de verificar la intervención que puedan tomar las funciones aminos u otros grupos componentes de la molécula proteica en los casos de la catalasa, sacarasa, etc. han sido emprendidos desde tiempo atrás ( vease Haldane y Stern, 1932 ). Más recientemente, deben mencionarse las brillantes conclusiones obtenidas por Northrop y Herriot ( 1938 ) del estudio de la acción inhibitoria del "ketene" y del iodo sobre la pepsina, mediante los cuales dejaron establecido que las funciones fenólicas libres son indispensables para la acción de la enzima.-

Ignoramos que en el caso de la fosfatasa se haya emprendido estudios de esta naturaleza, siendo los datos que damos a continuación sobre los efectos del formaldehído en los preparados purificados de la glándula mamaria, los primeros sobre este tema. Se ha elegido el formaldehído para efectuar estas determinaciones porque él produce sobre las grandes moléculas proteicas cambios relativamente muy sencillos y, por otra parte, bastante bien conocidos. Se creyó en un principio que solo reaccionaba con las funciones aminos, y si bien ya no puede admitirse una explicación tan simple como unica explicación de todo el fenómeno, es sí muy probable que ella queda como base para describir las modificaciones que sufren las proteínas frente a este reactivo.-

#### Acción del formaldehído sobre la fosfatasa mamaria

Las inhibiciones con el formaldehído fueron estudiadas sobre los preparados denominados E1<sub>3</sub>, desprovistos de magnesio en exceso ( éste quedaba a la concentración de qMg 3 ). Los resultados que se dan en el cuadro N<sup>o</sup> 24 y en el gráfico N<sup>o</sup> 11 son de determinaciones en las cuales el formaldehído se agregó en el momento en que la fosfatasa se puso a incubar con el substrato, es decir, que no hubo acción previa del inhibidor sobre la enzima. Las concentraciones finales del formaldehído fué de M/100 y M/50 respectivamente.-

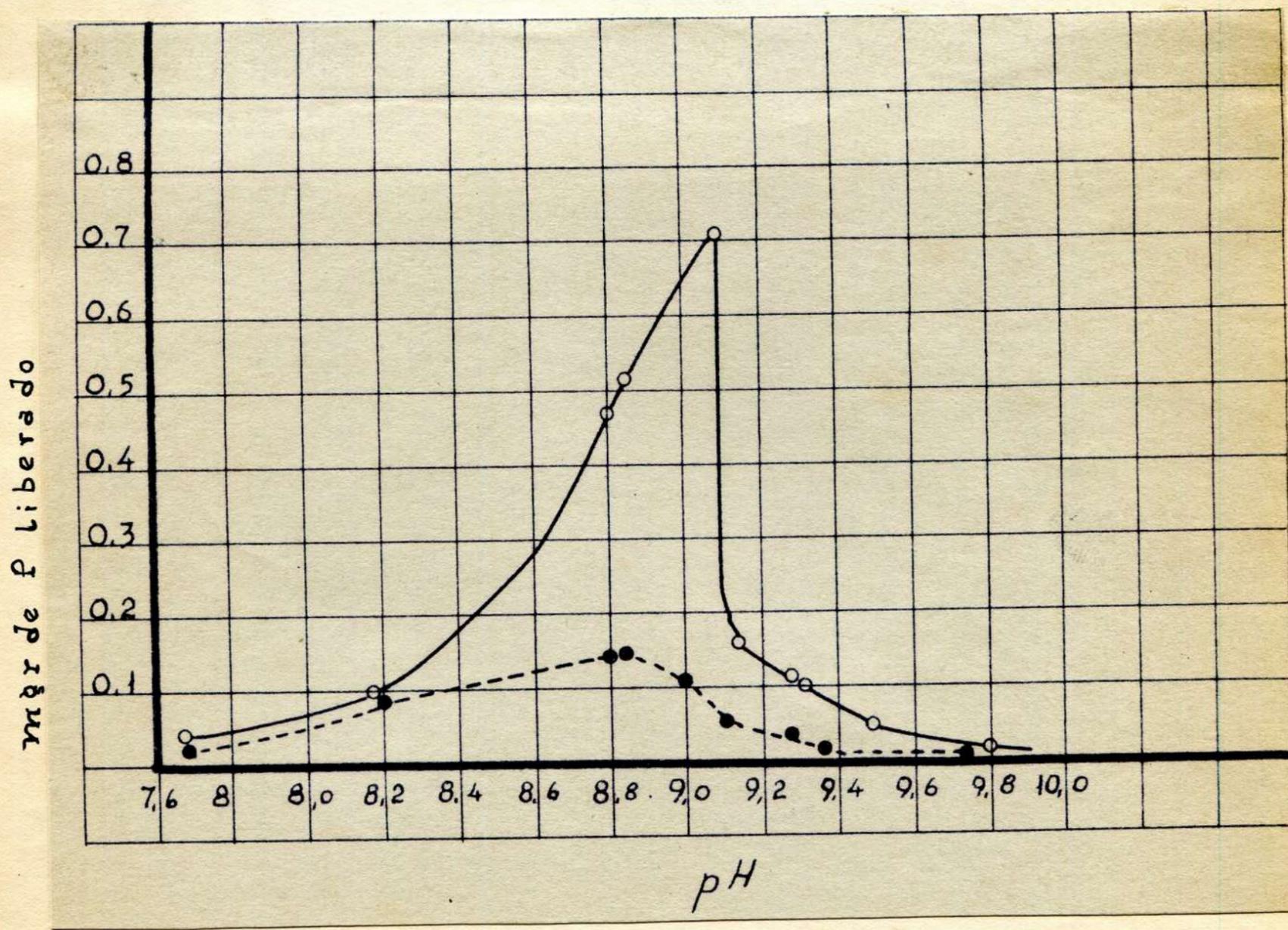
La inhibición en estas condiciones es sumamente enérgica; en la serie cuya concentración en formaldehído es de 0.01 molar el máximo valor es 47.2 % más bajo que en la serie determinada simultaneamente y a la cual no se adicionó el inhibidor ( cuadro N<sup>o</sup> 24 ), y en la serie cuya concentración final en formal-

Cuadro Nº 24

Inhibición de la fosfatasa mamaria por el formaldehído 0.001 M. beta-glícero-fosfato sódico como substrato. Temp. 37°C. Incubación 1 hora.-

| Sin adicionar metanal |                | Adicionado de metanal 0.01 M |                |
|-----------------------|----------------|------------------------------|----------------|
| pH                    | P liberado mg. | pH                           | P liberado mg. |
| 9.40                  | 0.024          | 9.43                         | 0.016          |
| 9.30                  | 0.042          | 9.28                         | 0.022          |
| 9.22                  | 0.121          | 9.19                         | 0.150          |
| 9.09                  | 0.759          | 9.10                         | 0.233          |
| 8.93                  | 0.633          | 9.00                         | 0.401          |
| 8.75                  | 0.505          | 8.89                         | 0.311          |
| 8.30                  | 0.214          | 8.51                         | 0.192          |
| 8.08                  | 0.103          | 8.10                         | 0.110          |
| 7.80                  | 0.061          | 7.90                         | 0.090          |
|                       |                | 7.43                         | 0.080          |

Gráfico Nº 15



—○— Sin adicionar metanal      -●- Adicionado de metanal 0,02 M

dehído es de 0.02 molar el máximo valor fosfatásico es 77.4 % más bajo que en la serie determinada simultaneamente como control y a la cual no se agregó formaldehído.-

Desarrollo de la reacción entre el formaldehído y la fosfatasa mamaria

La inhibición realizada en las condiciones que terminamos de exponer se efectúa con excesiva energía y rapidez y no permite seguir el curso de la inactivación; algunas experiencias posteriores, no obstante, nos mostraron la posibilidad de lograr condiciones en las cuales fuera factible seguir la inactivación en función del tiempo, lo cual nos permitiría establecer el tipo de reacción química que sigue la formación del hipotético compuesto inactivo de fosfatasa y formaldehído.-

Si la marcha de la reacción se puede seguir con un exceso relativamente grande de formaldehído, se logra experimentalmente las condiciones que asemejan el tipo de la reacción a una forma monomolecular, donde solo las variaciones de la enzima determinará la velocidad del proceso de inactivación. ( Reacción pseudo-monomolecular ).-

En una reacción de aquel tipo se tiene que la velocidad ( $\frac{dx}{dt}$ ) es proporcional a la concentración de la substancia que se modifica, En nuestro caso en el que la concentración de enzima libre tiende a deorecer, tendríamos:

$$- \frac{da}{dt} = ka$$

donde,

da = diferencial de la concentración en fosfatasa

dt = diferencial del tiempo

k = constante de proporcionalidad

$$- \frac{da}{a} = k dt$$

Si se integra entre los límites ( a - x ) y a, presentes a los tiempos  $t_2$  y  $t_1$ , se tiene:

$$\int_a^{(a-x)} - \frac{da}{a} = \int_{t_1}^{t_2} k dt$$

donde x es la cantidad de enzima inactivada al tiempo  $t_2$

CURSO DE LA INACTIVACION DE LA FOSFATASA MAMARIA POR MEDIO  
DEL FORMALDEHIDO

Los valores han sido referidos a mg. de P por ml. de El. Las determinaciones se han efectuado en 30' a pH entre 8.9 - 9.1 y 37°C. El pH de conservación es el habitual en que se obtiene el El de acuerdo a la técnica dada más atrás, vale decir 6.5 - 7.-

| Temperatura | Metanal | t horas | a mg. P | a - x mg. de P | $k = \frac{1}{t} \log \frac{a}{a-x}$ |
|-------------|---------|---------|---------|----------------|--------------------------------------|
| 30°         | 3.00    | 0       | 84.90   | -----          | -----                                |
|             |         | 2       |         | 68.49          | 0.04495                              |
|             |         | 4       |         | 60.24          | 0.03575                              |
|             |         | 6       |         | 45.04          | 0.04569                              |
|             |         | 8       |         | 38.16          | 0.04402                              |
| 36°         | 6.00    | 0       | 74.04   | -----          | -----                                |
|             |         | 1       |         | 50.00          | 0.17050                              |
|             |         | 2       |         | 38.24          | 0.12347                              |
|             |         | 3       |         | 31.44          | 0.12399                              |
|             |         | 4       |         | 23.51          | 0.12455                              |
|             |         | 5       |         | 19.37          | 0.11646                              |
| 37°         | 8.02    | 0       | 206.45  | -----          | -----                                |
|             |         | 1       |         | 160.00         | 0.11059                              |
|             |         | 2       |         | 118.08         | 0.12127                              |
|             |         | 3       |         | 80.00          | 0.13720                              |
|             |         | 4       |         | 61.30          | 0.13181                              |
|             |         | 5       |         | 42.59          | 0.13709                              |
|             |         | 6       |         | 36.36          | 0.12568                              |
|             |         | 7       |         | 30.50          | 0.11863                              |
| 37°         | 3.00    | 0       | 290.88  | -----          | -----                                |
|             |         | 7       |         | 111.60         | 0.05814                              |
|             |         | 20      |         | 53.17          | 0.03539                              |
|             |         | 31      |         | 25.53          | 0.03407                              |
|             |         | 44      |         | 17.91          | 0.02772                              |
|             |         | 52      | 20.33   | 0.02730        |                                      |

$$- \left[ \log_e a \right] \frac{(a-x)}{a} = \left[ k t \right] \frac{t_2}{t_1}$$

$$(-\log_e a-x) - (-\log_e a) = k (t_2 - t_1)$$

$$k = \frac{1}{t_2 - t_1} \log_e \frac{c}{(a-x)}$$

Transformando a logaritmos decimales:

$$k = \frac{2.303}{t_2 - t_1} \cdot \log_{10} \frac{a}{(a-x)}$$

y si al comenzar la experiencia, consideramos  $t = 0$ , tendremos:

$$k = \frac{2.303}{t} \cdot \log_{10} \frac{a}{(a-x)}$$

y para simplificar, en el cuadro N° 25 se han tomado los valores de  $k$  cuyo valor está definido por la siguiente ecuación:

$$k = \frac{k}{2.303} = \frac{1}{t} \log_{10} \frac{a}{(a-x)}$$

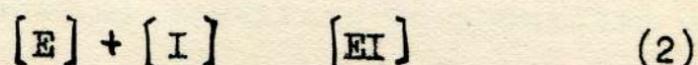
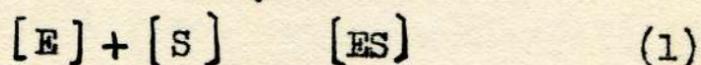
Los valores de  $k$  encontrados experimentalmente se mantienen dentro de una constancia satisfactoria ( cuadro N° 25 ) aunque en períodos de tiempo largos ( experiencia N° 4 ) la inactivación es más lenta de lo que la teoría prevee. Las razones precisas de la variación de las constantes en las distintas series de experiencias, no ha sido investigada todavía; los factores que probablemente intervendrán deben estar seguramente relacionados con la relación entre metanal y enzima, con la temperatura y pH a las cuales se estacionan los preparados y a las impurezas de estos últimos.-

La posibilidad de poder describir la marcha de acuerdo con un tipo de reacción química sencilla tiene importancia, además del hecho en sí del estudio cinético, porque nos permite esperar que sea posible encontrar el proceso al cual se debe la inactivación de la enzima.-

#### La inhibición por el formaldehído es competitiva

Mediante el concepto de inhibición competitiva y no competitiva se ha procurado establecer si un inhibidor actúa ligándose a las mismas funciones de la superficie enzimática a las cuales se une el substrato o si ejerce su acción por un mecanismo en el cual no están involucradas dichas regiones activas de la superficie del conjunto enzimático.-

La diferenciación de estos dos tipos de inhibiciones ha nacido de la observación de que algunos inhibidores actúan con una intensidad dependiente solamente de las concentraciones del inhibidor y de la enzima y casi por completo independiente de la concentración del substrato, mientras que otras acciones inhibitorias, en cambio, son también fuertemente influenciadas por la concentración del substrato. Si se admite que el inhibidor forma un compuesto con la enzima, tendremos en un sistema donde también se encuentre presente el substrato, las siguientes reacciones: (vease Haldane-Stern, 1932)



donde la formación de EI se cumplirá independiente de [S] si ambas reacciones se realizan con grupos distintos de E; pero si se unen con el mismo grupo de la enzima, la relación de ambos compuestos dependerá del valor de las constantes de disociación de los procesos (1) y (2) y además, por acción de masas, puesto que [E] es del mismo valor para los dos procesos, dependerán de [S] e [I].-

En el cuadro Nº 26 se dan los resultados de una experiencia planeada para resolver cual de las dos posibilidades se cumple en el caso de la inhibi-

Cuadro Nº 26

Inhibición de la fosfatasa mamaria por el metanal 0.1 M, frente a variadas concentraciones de substrato. Determinaciones a pH 9.0 y durante 1/2 hora .-

| Metanal 0.1 M | Glicero-fosfato<br>sódico | Fósforo<br>liberado | Resto de<br>actividad |
|---------------|---------------------------|---------------------|-----------------------|
| ml.           | gr. %                     | mg.                 | %                     |
| 0             | 0.4                       | 0.242               | 73.1                  |
| 5             | 0.4                       | 0.177               |                       |
| 0             | 0.3                       | 0.363               | 61.1                  |
| 5             | 0.3                       | 0.222               |                       |
| 0             | 0.2                       | 0.363               | 57.8                  |
| 5             | 0.2                       | 0.210               |                       |
| 0             | 0.1                       | 0.333               | 50.9                  |
| 5             | 0.1                       | 0.185               |                       |
| 0             | 0.05                      | 0.333               | 48.0                  |
| 5             | 0.05                      | 0.160               |                       |

ción de la fosfatasa mamaria por el formaldehído. Se ha hecho actuar una misma cantidad de fosfatasa sobre un substrato cuya concentración en beta-glicero-fos-

fato sódico osciló desde 0,4 a 0,05 % y se ha comparado en cada concentración de substrato ensayada, la inhibición producida por el metanal a la concentración final de 0,02 molar.-

Puede apreciarse que la inhibición es francamente influenciada por la concentración del substrato, variando el resto de actividad de la enzima desde el 73,1 % cuando el substrato se encuentra a la concentración 0,4 % hasta el 48,0 % cuando este se encuentra al 0,05 %, lo que demuestra claramente que entre el inhibidor y el substrato se establece una verdadera "competencia" frente a la molécula de enzima.-

---

## Capítulo VI

### RELACIONES DE LA GLANDULA MAMARIA CON LA FOSFATASA SANGUINEA EN CONDICIONES FISIOLÓGICAS HABITUALES, DURANTE LA PREÑEZ Y LA LACTANCIA

#### Origen de la fosfatasa sanguínea

El origen normal de la fosfatasa sanguínea, así como las modificaciones de su valor en algunos estados especiales no patológicos y patológicos, no aparece todavía como un problema definitivamente resuelto. Para la solución del mismo se han aportado datos obtenidos en la observación clínica, en experiencias de extirpación de órganos, por las modificaciones observadas como respuestas a los cambios en el régimen alimenticio, por la comparación entre las propiedades de la fosfatasa plasmática y las del órgano supuesto origen de la misma, etc., sin que de las referencias ya abundantes que se pueden reunir sobre este tema, surja una solución uniforme y satisfactoria.-

El origen óseo, sino total por lo menos parcial, de la fosfatasa plasmática es generalmente admitido. Las verificaciones efectuadas por Fell y Robison en 1929 según las cuales los cultivos de tejidos óseos en crecimiento son capaces de sintetizar fosfatasa, han sido consideradas desde entonces como un buen punto de apoyo para aquella suposición; a esta aptitud del tejido óseo deben agregarse las corroboraciones efectuadas por diversos autores en el terreno patológico; en una serie de enfermedades generalizadas de los huesos - raquitismo, osteitis fibrosa generalizada, osteomalacia, etc. - existe un aumento muy marcado del valor de la fosfatasa de la sangre.-

También han quedado como una demostración indirecta del origen óseo de la sero-fosfatasa las investigaciones de Banting y Armstrong ( 1935 ) en animales a los cuales se les extirparon intestino delgado, intestino grueso, riñones hígado, páncreas, bazo, testículos y epidídimos, sin que en ninguno de ellos descendiera el valor de la fosfatasa sanguínea, sino que por el contrario al extirpar algunos de estos órganos aquella aumentó; tampoco descendió en una experiencia en la que se eliminaron conjuntamente todos los órganos abdominales menos las cápsulas suprarrenales y la vejiga.-

Hay que hacer notar que a pesar del conjunto de razones aducidas en favor de la hipótesis del origen óseo de la fosfatasa plasmática, todavía no se ha demostrado directamente la influencia ejercida por la extirpación del esqueleto,

debido seguramente a las enormes dificultades que importaría la extirpación de una parte importante de este sistema. Quedan también como factores negativos frente a esta hipótesis el hecho de que no existen diferencias con respecto al valor fosfatásico entre la sangre afluyente y efluente de los huesos ( Armstrong y Banting ), ni se ha conseguido revelar modificaciones de la sero-fosfatasa en el período de reparación de fracturas producidas accidentalmente en el hombre o experimentalmente en el conejo ( Boterell y King, 1935 ).-

La teoría de que el origen de esta enzima no solamente reside en el hueso sino también en otros órganos ha sido defendida principalmente por A. Bodansky. Este autor (1934) determinó el valor de la sero-fosfatasa en perros jóvenes a los cuales mantuvo primero en ayunas y luego les dió comidas que sucesivamente eran ricas en glúcidos, lípidos y prótidos; concluyó de esas experiencias que los glúcidos hacen aumentar la sero-fosfatasemia, los lípidos tienen escasa o nula acción y, finalmente, los prótidos tienden a disminuirla. De la discusión de tales resultados concluye que es muy improbable que la fosfatasa originada en tejido óseo sea la causante del aumento debido a la ingestión de glúcidos y opina que este debe estar condicionado por una sobreproducción o sobre-secreción de fosfatasa por el hígado, mucosa intestinal, riñón y posiblemente músculo. Por extensión, sugiere que la sero-fosfatasa en condiciones habituales debe tener también diversos orígenes.-

Posteriormente el mismo Bodansky (1934) del estudio de la curva de sero-fosfatasa en perritos recién nacidos, alimentados y no alimentados obtiene evidencias adicionales sobre el origen no óseo de la enzima y en las condiciones particulares de la nutrición del recién nacido, encuentra que es especialmente plausible la hipótesis de las contribuciones de la mucosa intestinal y del hígado.-

En relación con el problema del origen de la fosfatasa sanguínea deben también considerarse aquellas experiencias por medio de las cuales se ha procurado determinar la identidad de fosfatasas aisladas de distintos órganos; razonablemente, en efecto, aquellos órganos cuyas fosfomonoesterasas alcalinas manifiestan propiedades distintas a las de la sangre, deben ser descartados como posibles orígenes de esta última. Los resultados que se han comunicado a este respecto son todavía insuficientes pero deben citarse las investigaciones de Belfanti, Contardi y Ercoli (1935) según las cuales, la fosfatasa de plasma reacciona igual que la ósea frente al oxalato de amonio, mientras que las de hígado y riñón lo hacen de una manera diferente y las investigaciones de O. Bodansky (1937) de inhibición por medio de algunos ácidos biliares; según estas últimas la fosfatasa plasmática se asemeja a las de hueso y riñón y se diferencia de la fosfatasa intestinal.-

Debemos advertir que el nombre genérico de fosfatasa que se ha usado en las experiencias que terminamos de resumir, se refiere siempre a la fosfomonoesterasa alcalina (tipo AI de la clasificación de Folley y Kay) pero hay que recordar que también existe en el plasma sanguíneo fosfatasa de tipo ácido (tipo AII de la misma clasificación); el óptimo de esta última fosfatasa reside en pH 4,9 y su actividad en el plasma es mucho menor que la dada por el tipo alcalino; sus propiedades la asemejan mucho a la que se encuentra en los extractos de próstata y en líquido seminal (Gutman y Gutman, 1940) y probablemente se origina en este órgano. Ha sido estudiado en conexión con problemas patológicos del mismo y no la trataremos en nuestro trabajo pues ya hemos visto que en las curvas de pH óptimo de fosfatasa mamaria no ha sido posible revelar su presencia.-

#### Factores que modifican el valor de la fosfatasa plasmática

Variaciones a distintas edades. El contenido en fosfatasa del plasma sanguíneo se modifica con la edad; generalmente se produce un ascenso desde la fecha del nacimiento hasta un período variable según el animal y luego desciende paulatinamente. En el hombre, Stearns y Warweg ( 1933 ) encontraron valores bajos en el momento del nacimiento, pero crece rápidamente hasta alcanzar el máximo al final del primer mes. El nivel máximo se mantiene muy poco tiempo, aunque los términos medios son altos durante los dos primeros años de vida y se mantienen por sobre los valores del adulto durante la niñez y la adolescencia.-

En el perro el valor aumenta durante las primeras 24 horas hasta alcanzar 60 unidades por 100 ml. de suero ( Bodansky A. 1934 ) y luego declina rápidamente primero y lentamente después, para alcanzar los valores normales del perro joven. En la rata ocurre el mismo fenómeno, siendo de un mes el período durante el cual los valores aumentan ( Weil y Russel, 1940 ).-

Acción de las glándulas de secreción interna. Binet y Pantrot ( 1934 ) refirieron que la fosfatasa sanguínea aumenta como respuesta a la extirpación del páncreas, siendo posteriormente confirmado por Martinez ( 1936 ) y por Freemann y Ivy (1937) la inyección de insulina en concentraciones que disminuyen fuertemente la glucemia no produce sino escasas modificaciones en la fosfatasa elevada.-

En el trabajo mencionado de Martinez se refiere también que la supra-renalectomía total eleva la fosfatasa sanguínea en el perro y que ésta se encuentra así mismo aumentada en el hiperparatiroidismo y como respuesta a la inyección de extracto de lóbulo anterior de hipófisis; la tiroidectomía y la ingestión de polvo de tiroides tienden a disminuir este valor; igual efecto produce la inyección de adrenalina.

En vacas lactando encontró Folley ( 1936 ) que la inyección de hormonas estrogénicas produce un transitorio aunque considerable aumento de la sero-fosfatasa mientras que la administración de tiroxina ( Folley y White, 1936 ) produce un ligero aumento de actividad.-

De las enfermedades de secreción internas ha sido investigada en la diabetes y en la enfermedad de Basedow e hipertiroidismo ( vease Kay, 1932 ) sin encontrar variaciones dignas de interés. En el hiperparatiroidismo, en cambio, se encuentra fuertemente aumentada, según Gutman, Tyson y Benedict ( 1936 ), lo que ha sido confirmado en un caso por Martinez.

Acción de las variaciones en la alimentación. Sobre las modificaciones producidas por regímenes alimenticios especialmente ricos en determinados principios, los resultados comunicados son discrepantes entre ellos; ya hemos visto que Brandsky A. ( 1934 ) encuentra que una comida rica en glúcidos aumenta el valor de la fosfatasa sanguínea en los perros jóvenes. Las investigaciones de Weil y Russel ( 1940 ) en la rata señalan, en cambio, que las dietas ricas en glúcidos y prótidos no ejercen influencias sobre la sero-fosfatasa de este animal, siendo solo la ingestión de la fracción etero-alcohol soluble de la dieta la que la aumenta; el efecto es debido, según los autores, a los ácidos grasos no saturados, de cierta magnitud molecular, y que tienen un grupo carboxílico libre; fué verificado además, que la cefalina aumenta la sero-fosfatasa pero la lecitina no.-

#### LA FOSFATASA SANGUINEA DURANTE LA PREÑEZ Y LA LACTANCIA

Durante la preñez, el trabajo del parto y el período de lactancia el contenido de fosfatasa en sangre sufre modificaciones que han sido estudiadas en la mujer y en los animales.-

Cayla y Fabre ( 1935 ) estudiaron la fosfatasemia en 15 mujeres embarazadas y compararon los resultados con los obtenidos en mujeres de la misma edad fuera del embarazo, encontrando un aumento del 136 %, término medio, en aquellas; además, de la comparación del aumento encontrado en los meses 8º y 9º, deducen que la hiperfosfatasemia no está en relación con la fijación del calcio por el fetopués cronologicamente la hiperfosfatasemia precede a los aumentos de necesidades cálcicas.-

Según Celentano ( 1936 ) en la mujer no cambian los valores de la fosfatasa en los 4 primeros meses del embarazo, pero aumenta después de este período

do para caer en lo normal al 6º o séptimo día del post-parto; Meranze, Meranze y Rothmann ( 1937 ) la encuentran aumentada durante la preñez y el parto, mientras que Ramsay, Thierens y Mager ( 1938 ) no encuentran modificaciones en 101 mujeres hasta el 7º mes del embarazo. Para Bodansky ( 1939 ) el aumento durante el embarazo está en relación con la actividad de las paratiroides; encuentra los siguientes promedios en sus determinaciones: 2º a 6º mes, 2.92 U.B.; 7º mes, 3.23 U.B.; 8º mes, 4.7 U.B.; 9º mes, 5.9 U.B.; y 10º mes, 6.6 U.B..-

En los animales los resultados no han sido totalmente concordantes; mientras Auchinachie y Emslie ( 1933 ) encuentran en las vacas preñadas valores más bajos que en las vacas no preñadas, Allcroft y Folley ( 1941 ) hallaron, en cambio, que los valores muestran tendencia a ser más altos en los animales preñados que en los no preñados, aunque no pudieron revelar ninguna relación con el período de la preñez. En la rata no se han encontrado modificaciones durante la primera parte de la preñez ( Weil, 1941 ) pero si se manifiesta una disminución marcada al final de la preñez, 6 o 4 días antes del parto. En el período del post-parto de este mismo animal la fosfatasa del plasma tiende a aumentar alcanzando el máximo a la tercera semana.-

En el trabajo mencionado de Allcroft y Folley, se estudió también la fosfatasa del suero de vacas lecheras, en relación a la capacidad de producir leche; una serie de determinaciones se dividieron en dos grupos según que el animal hubiera producido una cantidad mayor o menor de 7500 libras de leche en la lactación anterior a la toma de sangre para el análisis; los resultados hacen concluir a los autores que la mayor o menor producción de leche es independiente de la sero-fosfatasa.-

Algunas relaciones endócrinas con los valores que estamos estudiando, fueron investigadas por Folley ( 1936 ) y por Folley y White ( 1936 ); las hormonas estrogénicas inhiben la lactación disminuyendo la producción de leche pero sin alterar la concentración de sus constituyentes; concurrentemente produce una caída temporaria del calcio sérico seguida de un aumento transitorio aunque considerable de la sero-fosfatasa. La administración de tiroxina aumenta también la actividad de la fosfatasa sanguínea pero es acompañada, en este caso, por un aumento de la secreción láctea.-

#### FOSFATOS INORGANICOS Y FOSFATASA ALCALINA EN COBAYAS NORMALES

#### Y MAMECTOMIZADAS DURANTE LA PREÑEZ Y EL POST - PARTO

Dada la importancia de los constituyentes fosforados de la leche es de presumir que la fosfatasa ha de desempeñar funciones del más alto interés durante

el período en el cual la glándula mamaria se prepara para entrar en acción y durante el tiempo de su secreción activa. Por esto nos ha parecido necesario aclarar si las modificaciones de los fosfatos y fosfatasa sanguíneos que pudieran ocurrir durante los tiempos de preñez y lactación de la cobaya, son en alguna forma dependientes de la presencia o ausencia de dicha glándula.-

Para resolver este problema se han determinado los valores de ambos constituyentes sanguíneos en un conjunto de cobayas divididas en 4 grupos. A dos de estos grupos se los ha tomado como testigos de los valores normales en nuestras colonias: el primer grupo lo constituyeron animales normales y sirvió para contrastar los valores de fosfatasas y fosfatos inorgánicos tomando el peso del animal como referencia; el segundo grupo estaba constituido por animales previamente mamectomizados y con ellos se descartó la posibilidad de que la glándula mamaria - órgano siempre rico en fosfatasa alcalina - pudiera tener alguna influencia en condiciones fisiológicas habituales. En los otros dos grupos se efectuaron las determinaciones durante la preñez y la lactancia; uno de ellos (tercer grupo) lo constituyeron animales normales y el otro, (cuarto grupo) animales previamente mamectomizados.-

Las determinaciones fueron efectuadas durante un período de más de dos años, en animales alimentados con forraje fresco, en la forma habitual que mantiene la colonia en condiciones completamente normales. Las variaciones posibles estacionales o por causas alimenticias, quedan en esta forma eliminadas.- La necesidad de mantener los animales a los cuales se les determina la fosfatasa sanguínea, en buen estado general debe ser especialmente anotada en vista de los resultados comunicados por Freemann y Farmer (1933) en perros normales y en mal estado general.-

La elección de la cobaya para efectuar estas experiencias se hizo en atención a dos ventajas que dicho animal presenta; en primer lugar, tiene solamente dos glándulas mamarias, las cuales, como ya lo han hecho notar Folley y Kay (1935) están bien diferenciadas de todo órgano o tejido circundante; en segundo lugar, es posible obtener de este animal por punción cardíaca, sangre suficiente para las necesidades de los análisis con los métodos que corrientemente se practican en nuestro laboratorio; los riesgos de la punción cardíaca por lo que a la supervivencia del animal se refiere son tolerables y las consecuencias de esta operación sobre el estado general del animal son prácticamente nulas dentro de un período de tiempo mucho mayor que el necesario para la realización de este trabajo.-

#### Extirpación de la glándula mamaria.-

A los animales bajo anestesia etérea se les extirpó la glándula mamaria mediante una incisión que va desde el pezón de un lado al pezón del otro. Cada glán-

### Extirpación de la glándula mamaria

A los animales bajo anestesia etérea, se les extirpó la glándula mamaria mediante una incisión que va desde el pezón de un lado al pezón del otro. Cada glándula se presenta en medio del tejido graso subcutáneo como una prolongación que a partir del pezón se dirige hacia la parte media y posterior, junto a la vulva del animal; en esta parte se encuentra la masa glándular más importante y es donde se adhiere más fuertemente a los tejidos que la rodean; es necesario limpiar con toda prolijidad esta zona pues de lo contrario quedan restos glandulares que se denunciarán solo en el momento de la lactancia en el que se ingurgitan. La revisión de estos animales en este período debe efectuarse sistemáticamente pues a pesar de todo el cuidado que se ponga suelen quedar pequeños restos glandulares. Este hecho es muy lamentable porque las determinaciones efectuadas durante la preñez de animales en tales condiciones deben ser desechadas.- Afortunadamente, sin embargo, las posibilidades de que se pase por error un animal insuficientemente operado son mínimas porque un simple corte de un nodulito sospechoso en el post-parto hace brotar leche en cantidad reconocible sin ninguna dificultad si es que realmente se trata de tejido mamario.-

La cicatrización de las heridas después de una operación en la que se efectúa una amplia resección de tejido celular, se hace por lo general solo después de una supuración que se prolonga bastante. Ignoramos que la supuración tenga alguna influencia sobre los valores que estudiamos pero como medida de precaución, no hemos efectuado ninguna determinación hasta que la cicatrización se normalizara.-

### Grupos 1 y 2 : cobayas normales y mamectomizadas en condiciones fisiológicas habituales.-

De los 84 animales que constituyeron el total de estos dos grupos, 59 eran animales vírgenes, es decir, que estuvieron alejadas de toda posibilidad de contacto con machos desde el momento en que, ya capaces de alimentarse a forrajes fueron separadas de sus madres y de sus hermanos machos; las otras 25 habían estado con machos y algunas de ellas también habían tenido crías pero en el momento en el que se tomó la muestra de sangre para el análisis estaban alejadas de toda actividad sexual por lo menos desde tres meses antes.-

Los resultados de 51 determinaciones de sero-fosfatasa efectuadas en 41 cobayas normales, pueden apreciarse en el cuadro N° 26; en el gráfico N° 12 los mismos valores se han dispuesto en un sistema coordinado en el cual las abscisas representan los pesos de los animales en gramos.-

Cuadro N° 27



Sero-fosfatasa en cobayas normales ordenadas según un orden creciente de peso  
Determinación de fosfatasa por el método de Bodansky .-

| Fecha     | Animal N° | Fosfatasa U. B. | Promedio c./50 gr. U. B. | Fosf.inorg. mg. | Promedio c./50 gr. mg. de P | Peso gr. |      |     |
|-----------|-----------|-----------------|--------------------------|-----------------|-----------------------------|----------|------|-----|
| 30/X/41   | 30        | 12.80           | 16.28                    | 5.46            | 5.62                        | 170      |      |     |
| 24/X/41   | 29        | 23.28           |                          | 4.32            |                             | 191      |      |     |
| 17/XI/41  | 31        | 12.69           |                          | 7.09            |                             | 193      |      |     |
| 22/XI/41  | 32        | 12.56           | 11.67                    | 7.22            | 5.46                        | 203      |      |     |
| 30/XII/41 | 37        | 14.23           |                          | 4.94            |                             | 210      |      |     |
| 30/I/42   | 41        | 4.40            |                          | 4.67            |                             | 217      |      |     |
| 2/XII/41  | 33        | 14.03           |                          | 5.88            |                             | 235      |      |     |
| 15/XII/41 | 35        | 17.19           |                          | 4.47            |                             | 250      |      |     |
| 30/XII/41 | 38        | 9.21            |                          | 4.07            |                             | 250      |      |     |
| 14/IV/42  | 49        | 7.92            |                          | 6.97            |                             | 250      |      |     |
| 3/XII/41  | 34        | 11.56           |                          | 10.28           |                             | 5.96     | 6.51 | 265 |
| 28/III/42 | 47        | 15.78           |                          |                 |                             | 7.20     |      | 265 |
| 4/III/42  | 44        | 7.73            |                          |                 |                             | 6.53     |      | 275 |
| 14/IV/42  | 30        | 6.07            | 6.36                     |                 | 280                         |          |      |     |
| 14/XI/40  | 12        | 6.34            | 6.22                     |                 | 304                         |          |      |     |
| 20/XII/41 | 36        | 14.39           | 4.78                     | 305             |                             |          |      |     |
| 28/XI/40  | 17        | 6.40            | 6.68                     | 310             |                             |          |      |     |
| 3/II/42   | 42        | 4.04            | 4.97                     | 317             |                             |          |      |     |
| 9/V/42    | 51        | 5.83            | 6.11                     | 325             |                             |          |      |     |
| 7/XI/40   | 6         | 5.95            | 4.76                     | 337             |                             |          |      |     |
| 9/III/42  | 33        | 4.74            | 6.11                     | 350             |                             |          |      |     |
| 1/IV/42   | 32        | 9.82            | 7.19                     | 7.83            | 5.93                        | 350      |      |     |
| 14/XI/40  | 13        | 8.13            | 7.19                     | 4.64            | 5.93                        | 352      |      |     |
| 27/I/42   | 39        | 4.18            |                          | 5.71            |                             | 353      |      |     |
| 26/XI/40  | 16        | 6.40            |                          | 6.68            |                             | 355      |      |     |
| 2/III/42  | 38        | 7.01            |                          | 6.46            |                             | 370      |      |     |
| 24/III/42 | 34        | 3.87            |                          | 5.79            |                             | 387      |      |     |
| 16/XII/40 | 22        | 3.10            |                          | 5.31            |                             | 390      |      |     |

Cuadro Nº 27 (Continuación)

| Fecha     | Animal<br>Nº | Fosfatasa<br>U. B. | Promedio<br>c./50 gr.<br>U. B. | Fosf.inorg.<br>mg. | Promedio<br>c./50 gr.<br>mg. de P | Peso<br>gr. |
|-----------|--------------|--------------------|--------------------------------|--------------------|-----------------------------------|-------------|
| 26/XI /40 | 15           | 5.97               | 5.52                           | 7.41               | 6.00                              | 400         |
| 15/XI/40  | 14           | 1.58               |                                | 3.42               |                                   | 410         |
| 28/I/42   | 40           | 4.74               |                                | 7.06               |                                   | 410         |
| 5/XI/40   | 4            | 3.38               |                                | 7.83               |                                   | 417         |
| 29/IX/41  | 25           | 6.42               |                                | 7.16               |                                   | 420         |
| 13/IV/42  | 37           | 5.56               | 4.33                           | 5.75               | 6.24                              | 440         |
| 12/XI/40  | 9            | 4.32               |                                | 5.88               |                                   | 480         |
| 23/IV/42  | 31           | 3.29               |                                | 4.30               |                                   | 495         |
| 8/XI/40   | 8            | 3.68               | 3.76                           | 5.11               | 5.09                              | 500         |
| 2/XII/40  | 20           | 0.95               |                                | 5.03               |                                   | 505         |
| 29/XI/40  | 19           | 2.07               | 1.51                           | 5.83               | 5.43                              | 524         |
| 1/XI/40   | 1            | 2.49               |                                | 4.49               |                                   | 555         |
| 7/XI/40   | 1            | 2.88               |                                | 5.07               |                                   | 555         |
| 22/V/42   | 52           | 2.49               |                                | 4.99               |                                   | 560         |
| 7/XI/40   | 7            | 2.96               |                                | 4.57               |                                   | 570         |
| 29/XI/40  | 18           | 3.25               |                                | 4.97               |                                   | 580         |
| 13/XI/40  | 10           | 1.78               |                                | 5.31               |                                   | 595         |
| 9/VI/42   | 36           | 3.18               |                                | 5.37               |                                   | 600         |
| 7/III/42  | 50           | 3.48               | 2.81                           | 3.78               | 4.75                              | 600         |
| 13/XI/40  | 11           | 2.51               |                                | 4.43               |                                   | 612         |
| 4/XI/40   | 3            | 1.47               |                                | 5.79               |                                   | 637         |
| 5/XI/40   | 5            | 1.63               | 1.87                           | 4.07               | 4.76                              | 637         |
| 30/XI/40  | 21           | 1.24               | 1.24                           | 4.44               | 4.44                              | 664         |

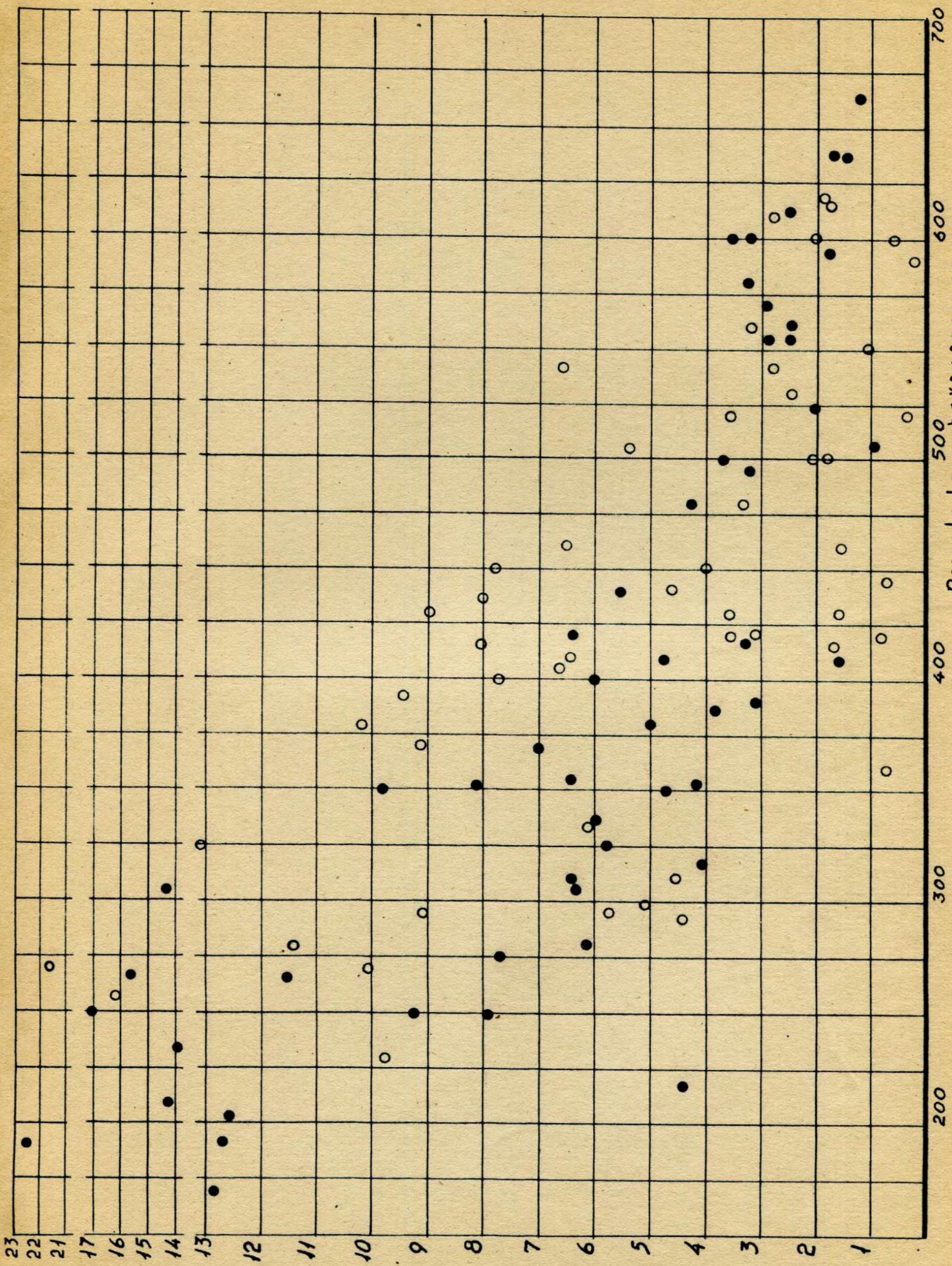
Cuadro N° 28

Sero-fosfatasa y fosfatos inorgánicos en cotayas mamectomizadas ordenadas según un orden creciente de peso. Determinaciones de fosfatasa por el método de Bodansky.

| Fecha      | Animal<br>N° | Fosfatasa<br>U.B. | Promedio<br>c./50 gr.<br>U.B. | Fosf.inorg.<br>mg. | Promedio<br>c./50 gr.<br>mg. de P | Peso<br>gr. |
|------------|--------------|-------------------|-------------------------------|--------------------|-----------------------------------|-------------|
| 24/XI/41   | 55           | 9.77              | 9.77                          | 9.45               | 9.45                              | 230         |
| 13/II/42   | 90           | 16.20             | 5.96                          | 5.96               |                                   | 260         |
| 26/XI/41   | 56           | 10.06             |                               | 7.09               |                                   | 270         |
| 14/II/41   | 83           | 21.74             |                               | 2.68               |                                   | 270         |
| 30/XII/41  | 65           | 11.43             |                               | 3.46               |                                   | 280         |
| 27/I/42    | 77           | 4.40              |                               | 4.28               |                                   | 292         |
| 28/I/42    | 78           | 5.78              |                               | 4.42               |                                   | 295         |
| 3/III/42   | 94           | 9.02              |                               | 8.31               |                                   | 295         |
| 26/I/42    | 75           | 5.01              | 10.45                         | 5.15               | 5.16                              | 298         |
| 27/I/42    | 76           | 4.54              |                               | 4.70               |                                   | 310         |
| 20/XII/41  | 58           | 13.00             |                               | 7.16               |                                   | 325         |
| 30/I/42    | 79           | 6.08              | 7.90                          | 6.51               | 6.12                              | 332         |
| 3/V/41     | 54           | 0.74              |                               | 4.32               |                                   | 360         |
| 15/IV/42   | 105          | 9.01              |                               | 6.34               |                                   | 370         |
| 7/III/42   | 93           | 10.29             |                               | 4.83               |                                   | 380         |
| 6/IV/42    | 99           | 5.00              |                               | 5.58               |                                   | 380         |
| 9/IV/42    | 94           | 9.40              |                               | 8.00               |                                   | 393         |
| 27/III/42  | 97           | 7.74              | 7.03                          | 5.88               | 5.82                              | 400         |
| 23/III/42  | 95           | 6.63              |                               | 4.35               |                                   | 405         |
| 25/III/42  | 96           | 6.48              |                               | 6.21               |                                   | 410         |
| 29/VI/41   | 57           | 1.71              |                               | 4.77               |                                   | 415         |
| 27/III/42  | 98           | 8.02              |                               | 6.60               |                                   | 415         |
| 8/VII/41   | 101          | 3.51              |                               | 5.31               |                                   | 420         |
| 29/VI/41   | 60           | 0.86              |                               | 5.06               |                                   | 420         |
| 20/VIII/41 | 102          | 3.17              |                               | 3.31               |                                   | 420         |
| 3/V/41     | 62           | 1.65              |                               | 5.33               |                                   | 430         |
| 1/IV/42    | 106          | 8.97              |                               | 7.13               |                                   | 430         |
| 7/VIII/42  | 104          | 3.58              |                               | 5.62               |                                   | 430         |
| 15/IV/42   | 107          | 8.05              |                               | 5.46               |                                   | 437         |
| 24/III/42  | 65           | 4.56              |                               | 4.64               |                                   | 440         |
| 3/VI/41    | 81           | 0.78              |                               | 6.03               |                                   | 445         |

Cuadro Nº 28 (Continuación)

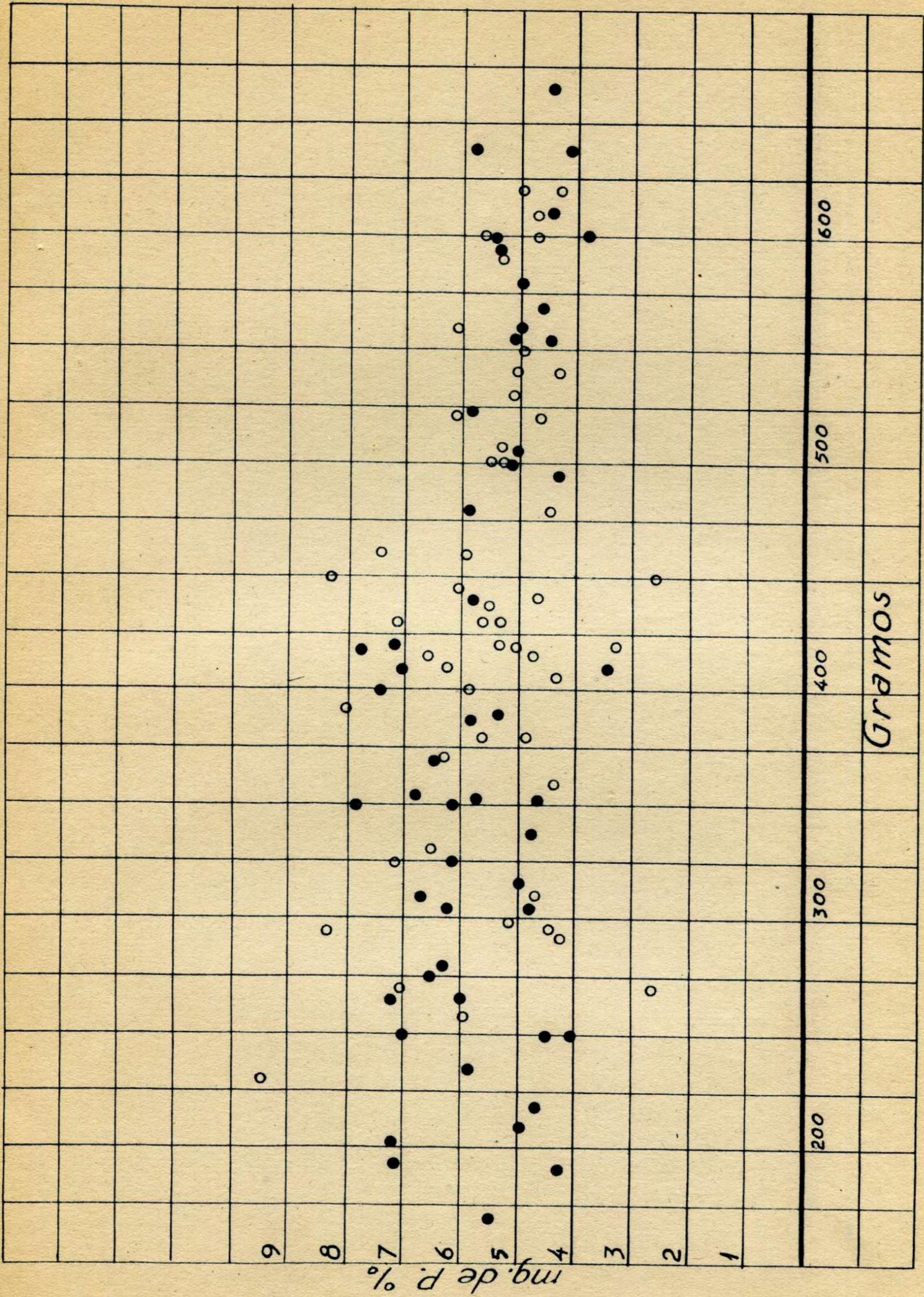
| Fecha      | Animal<br>Nº | Fosfatasa<br>U. B. | Promedio<br>c./50 gr.<br>U.B. | Fosf.inorg.<br>mg. | Promedio<br>c./50 gr.<br>mg. de P | Peso<br>gr. |
|------------|--------------|--------------------|-------------------------------|--------------------|-----------------------------------|-------------|
| 10/IX/41   | 101          | 7.78               |                               | 8.32               |                                   | 450         |
| 3/V/41     | 82           | 3.95               | 4.64                          | 2.66               | 5.38                              | 450         |
| 1/VII/42   | 108          | 6.51               | .                             | 5.88               |                                   | 459         |
| 25/VIII/41 | 110          | 1.55               |                               | 7.49               |                                   | 460         |
| 20/III/41  | 109          | 3.37               |                               | 4.49               |                                   | 480         |
| 4/V/41     | 83           | 2.09               |                               | 5.17               |                                   | 500         |
| 7/V/41     | 84           | 1.82               | 3.07                          | 5.44               | 5.69                              | 500         |
| 21/VII/41  | 88           | 5.45               |                               | 5.26               |                                   | 505         |
| 26/VI/41   | 89           | 0.42               |                               | 4.64               |                                   | 520         |
| 26/IX/42   | 104          | 3.68               |                               | 6.11               |                                   | 520         |
| 19/IX/41   | 111          | 2.45               |                               | 5.08               |                                   | 530         |
| 3/VII/41   | 80           | 2.81               |                               | 5.01               |                                   | 540         |
| 7/VII/42   | 106          | 6.59               |                               | 4.30               |                                   | 540         |
| 26/VI/41   | 109          | 1.08               | 3.21                          | 4.89               | 5.04                              | 550         |
| 29/IX/42   | 93           | 3.17               |                               | 6.07               |                                   | 560         |
| 26/VI/41   | 85           | 0.22               |                               | 5.27               |                                   | 590         |
| 3/VII/41   | 86           | 0.65               |                               | 4.64               |                                   | 600         |
| 26/IX/41   | 87           | 2.01               | 1.51                          | 5.48               | 5.36                              | 600         |
| 15/IX/41   | 110          | 2.79               |                               | 4.70               |                                   | 610         |
| 8/VIII/41  | 116          | 1.81               |                               | 4.30               |                                   | 620         |
| 29/VIII/41 | 117          | 1.84               | 2.17                          | 4.91               | 4.63                              | 620         |



Sero-fosfatasa en relación con el desarrollo corporal de cobayas normales y mamectomizadas en condiciones fisiológicas habituales.-

● Normales  
○ Mamectomizadas

U.B. %



Fosfatos inorgánicos del suero en relación con el desarrollo corporal de cobayas normales y mamectomizadas, en condiciones fisiológicas habituales.-

● Normales      ○ Mamectomizadas

Indudablemente, y a pesar de las variaciones relativamente grandes que se observan de un animal a otro, se ve que los valores decrecen en forma lineal a medida que el peso aumenta entre 200 y 500 gramos; la declinación anterior a los 200 gramos se efectúa mucho más rápidamente (repárese que en el gráfico N° 12 los valores más elevados de las ordenadas están dados en una escala distinta a la dada para los valores por debajo de 13 unidades) y después de los 500 gramos de peso la sero-fosfatasa se mantiene prácticamente constante.-

Las variaciones entre animales de un mismo peso pueden ser tan grandes que la sero-fosfatasa de una cobaya llega hasta a duplicar o triplicar el valor de otra de su mismo peso. En lo que a un mismo individuo se refiere se ha encontrado siempre que disminuye a medida que el animal crece; en los animales señalados bajo los números 30, 31, 32, 33, 34, 36, 37 y 38 se han efectuado determinaciones al cabo de un tiempo variable y se ha encontrado el resultado dicho.-

Los valores de las determinaciones efectuadas en animales mamectomizados se dan en el cuadro N° 27 y en el gráfico N° 13; las variaciones de la sero-fosfatasa de este grupo ha sido todavía mayor que en el grupo anterior pero el comportamiento general del decrecimiento con respecto al peso es casi exactamente el mismo; si comparamos los promedios obtenidos de animales agrupados dentro de límites de pesos que van de 50 en 50 gramos de cobayas normales y mamectomizadas, tenemos respectivamente:

|     |   |     |        |   |       |      |   |       |      |
|-----|---|-----|--------|---|-------|------|---|-------|------|
| 200 | - | 250 | gramos | : | 11,67 | U.B. | y | 9,77  | U.B. |
| 251 | - | 300 | "      | : | 10,28 | U.B. | y | 10,45 | U.B. |
| 301 | - | 350 | "      | : | 7,19  | U.B. | y | 7,90  | U.B. |
| 351 | - | 400 | "      | : | 5,52  | U.B. | y | 7,03  | U.B. |
| 401 | - | 450 | "      | : | 4,33  | U.B. | y | 4,64  | U.B. |
| 451 | - | 500 | "      | : | 3,76  | U.B. | y | 3,07  | U.B. |
| 501 | - | 550 | "      | : | 1,51  | U.B. | y | 3,21  | U.B. |
| 551 | - | 600 | "      | : | 2,81  | U.B. | y | 1,51  | U.B. |
| 600 | - | 650 | "      | : | 1,87  | U.B. | y | 2,17  | U.B. |

De acuerdo con estas experiencias, la glándula mamaria debe sumarse a aquellos órganos ricos en fosfatasa pero cuya extirpación no provoca modificaciones en condiciones fisiológicas habituales, sobre el contenido de fosfatasa sanguínea. Debe también anotarse que las cobayas de más de 400 gramos de peso - y que son las que hemos usado en las experiencias ulteriores - poseen regularmente menos de 8 unidades de fosfatasa por 100 ml de suero.-

Por lo que respecta a los fosfatos inorgánicos, los valores encontrados se pueden ver en los cuadros N° 26 y 27 y en el gráfico N° 13. El decrecimiento que experimentan a medida que los animales alcanzan el estado adulto es prácticamente

nulo; los valores promedios tomados igualmente que para la fosfatasa son, para animales normales y mamectomizados, respectivamente los siguientes:

|     |   |     |        |   |      |    |   |      |     |
|-----|---|-----|--------|---|------|----|---|------|-----|
| 200 | - | 250 | gramos | : | 5,46 | mg | y | 9,45 | mg. |
| 251 | - | 300 | "      | : | 6,51 | mg | y | 5,16 | mg  |
| 301 | - | 350 | "      | : | 5,93 | mg | y | 6,12 | mg  |
| 351 | - | 400 | "      | : | 6,00 | mg | y | 5,82 | mg  |
| 401 | - | 450 | "      | : | 6,24 | mg | y | 5,38 | mg  |
| 451 | - | 500 | "      | : | 5,09 | mg | y | 5,69 | mg  |
| 501 | - | 550 | "      | : | 5,43 | mg | y | 5,04 | mg  |
| 551 | - | 600 | "      | : | 4,75 | mg | y | 5,36 | mg  |
| 601 | - | 650 | "      | : | 4,76 | mg | y | 4,63 | mg  |

Tampoco los valores de los fosfatos inorgánicos son afectados por la extirpación de la glándula mamaria cuando el animal se encuentra en condiciones habituales y por lo que respecta a los valores generales de uno y otro grupo, debe destacarse que todos los promedios están dentro de límites que oscilan entre 4,50 y 6,50 mg por 100 ml de suero, con excepción del primer valor de los animales mamectomizados que corresponde a un solo animal.-

Grupos 3 y 4 : cobayas normales y mamectomizadas durante la preñez y el período de lactación

Las cobayas fecundadas fueron separadas de macho desde el momento en que se les extrajo sangre por primera vez para efectuar las determinaciones de fosfatasa y fosfatos inorgánicos. Procediendo en esta forma, las tomas de sangre más alejadas del parto que hemos obtenido oscilan alrededor de los 60 días anteriores al mismo, por lo cual suponemos que la duración de la preñez en esos animales debe ser de este tiempo. En los primeros animales con los cuales trabajamos se hicieron varias punciones cardíacas durante el período de preñez, pero como la mortalidad por punción cardíaca en la cobaya preñada es algo mayor que en el animal normal, en lo sucesivo evitamos esa conducta. Los animales que por cualquier causa se murieron antes del parto, no fueron tomados en consideración pues no se intentó ningún procedimiento para diagnosticar el período de la preñez en un momento dado.-

Durante el tiempo de la lactación de las cobayas normales, las madres estuvieron con sus hijos en jaulas separadas por familias y aisladas de machos. Los hijos de las cobayas mamectomizadas fueron generalmente separados de sus madres.-

Los valores encontrados se han dispuesto separándolos por animales en

Cuadro N° 29

Sero-fosfatasa y fosfatos inorgánicos durante la preñez y la lactancia de cobayas normales. Determinación de fosfatasa por el método de Bodansky

| Fecha     | Animal<br>N° | Fosfatasa<br>U.B. % | Fosf.inorg.<br>mgr. % | N° de<br>hijos | Dias antes<br>o después<br>del parto | Peso<br>gr. |
|-----------|--------------|---------------------|-----------------------|----------------|--------------------------------------|-------------|
| 1/X/41    | 111          | 1.16                | 4.07                  |                | 2                                    | 880         |
| 3/X/41    | "            | P A R T O           |                       | 2              | -                                    | --          |
| 8/IX/41   | "            | 1.53                | 5.68                  |                | 5                                    | 655         |
| 8/XI/41   | "            | 2.42                | 5.08                  |                | 65                                   | 575         |
| 8/IX/41   | 112          | 6.13                | 6.67                  |                | 32                                   | 700         |
| 9/X/41    | "            | P A R T O           |                       | 3              | --                                   | --          |
| 21/X/41   | "            | 1.87                | 5.16                  |                | 12                                   | 590         |
| 15/XI/41  | "            | 2.64                | 4.30                  |                | 36                                   | 560         |
| 1/X/41    | 113          | 0.46                | 2.34                  |                | 0                                    | 830         |
| 1/X/41    | "            | P A R T O           |                       | 3              | --                                   | --          |
| 9/X/41    | "            | 2.29                | 3.13                  |                | 8                                    | 540         |
| 10/XI/41  | "            | 3.31                | 4.55                  |                | 40                                   | 550         |
| 11/X/41   | 114          | 1.52                | 0.84                  |                | 1                                    | 790         |
| 12/X/41   | "            | P A R T O           |                       | 3              | --                                   | --          |
| 29/X/41   | "            | 4.94                | 4.89                  |                | 17                                   | 550         |
| 25/XI/41  | "            | 4.63                | 5.16                  |                | 43                                   | 520         |
| 24/X/41   | 115          | 3.86                | 3.50                  |                | 7                                    | 645         |
| 31/X/41   | "            | P A R T O           |                       | 3              | --                                   | --          |
| 8/XI/41   | "            | 3.27                | 6.06                  |                | 8                                    | 525         |
| 7/X/41    | 116          | 3.83                | 5.54                  |                | 24                                   | 700         |
| 31/X/41   | "            | P A R T O           |                       | 2              | --                                   | --          |
| 15/XI/41  | "            | 2.61                | 3.43                  |                | 15                                   | 560         |
| 30/I/42   | "            | 2.36                | 5.31                  |                | 90                                   | 610         |
| 7/X/41    | 117          | 9.43                | 3.44                  |                | 24                                   | 840         |
| 31/X/41   | "            | P A R T O           |                       | 3              | --                                   | --          |
| 3/XI/41   | "            | 1.46                | 1.38                  |                | 3                                    | 635         |
| 1/XI/41   | 118          | 3.56                | 6.03                  |                | 36                                   | 760         |
| 30/X/41   | "            | 2.21                | 0.95                  |                | 6                                    | 820         |
| 6/XI/41   | "            | P A R T O           |                       | 4              | --                                   | --          |
| 6/XII/41  | "            | 2.71                | 3.65                  |                | 30                                   | 540         |
| 14/X/41   | 119          | 6.80                | 3.40                  |                | 23                                   | 780         |
| 7/XI/41   | "            | P A R T O           |                       | 3              | --                                   | --          |
| 27/XI/41  | "            | 1.24                | 4.55                  |                | 20                                   | 540         |
| 11/X/41   | 120          | 4.36                | 4.55                  |                | 29                                   | 800         |
| 3/XI/41   | "            | 2.65                | 1.95                  |                | 6                                    | 880         |
| 9/XI/41   | "            | P A R T O           |                       | 3              | --                                   | --          |
| 1/XII/41  | "            | 1.95                | 4.20                  |                | 22                                   | 600         |
| 23/X/41   | 121          | 5.55                | 4.57                  |                | 16                                   | 790         |
| 9/XI/41   | "            | P A R T O           |                       | 3              | --                                   | --          |
| 20/XII/41 | "            | 2.48                | 3.63                  |                | 41                                   | 625         |

Cuadro N° 29 (continuación)

| Fecha     | Animal<br>N° | Fosfatasa<br>U.B.% | Fosf.inorg.<br>mgr.% | No.de<br>hijos | Dias antes<br>o despues<br>del parto | peso<br>gr. |
|-----------|--------------|--------------------|----------------------|----------------|--------------------------------------|-------------|
| 23/X/41   | 122          | 5,82               | 7,56                 |                | 25                                   | 820         |
| 18/VI/41  | "            | P A R T O          |                      | 3              | —                                    | —           |
| 17/XII/41 | "            | 1,99               | 4,81                 |                | 29                                   | 622         |
| 3/II/42   | "            | 1,93               | 4,55                 |                | 75                                   | 654         |
| 13/VII/41 | 123          | 17,59              | 9,55                 |                | 25                                   | 630         |
| 7/I/42    | "            | P A R T O          |                      | 3              | —                                    | —           |
| 9/I/42    | "            | 0,90               | 4,75                 |                | 2                                    | 550         |
| 26/I/42   | "            | 2,22               | 5,10                 |                |                                      | 495         |
| 13/XII/41 | 124          | 10,20              | 6,67                 |                | 22                                   | 520         |
| 4/I/42    | "            | P A R T O          |                      | 2              | —                                    | —           |
| 9/IV/42   |              | 2,51               | 5,10                 |                | 5                                    | 440         |
| 3/III/42  | 121          | 14,77              | 3,99                 |                | 28                                   | 705         |
| 31/III/42 | "            | P A R T O          |                      | 3              | —                                    | —           |
| 1/IV/42   | "            | 2,89               | 4,47                 |                | 1                                    | 670         |
| 13/II/42  | 125          | 4,02               | 5,69                 |                | 58                                   | 495         |
| 25/III/42 | "            | 5,08               | 3,19                 |                | 15                                   | 730         |
| 10/IV/42  | "            | P A R T O          |                      | 3              | —                                    | —           |
| 16/IV/42  | "            | 1,70               | 4,00                 |                | 6                                    | 505         |
| 27/IV/42  | "            | 3,96               | 4,95                 |                | 17                                   | 490         |
| 26/III/42 | 126          | 5,72               | 6,97                 |                | 44                                   | 450         |
| 10/V/42   | "            | P A R T O          |                      | 1              | —                                    | —           |
| 23/V/42   | "            | 2,52               | 5,08                 |                | 13                                   | 430         |
| 13/IV/42  | 127          | 6,65               | 5,31                 |                | 30                                   | 510         |
| 7/V/42    | "            | 3,67               | 3,69                 |                | 6                                    | 665         |
| 13/V/42   | "            | P A R T O          |                      | 2              | —                                    | —           |
| 13/IV/42  | 128          | 6,29               | 6,13                 |                | 31                                   | 470         |
| 14/V/42   | "            | P A R T O          |                      | 2              | —                                    | —           |
| 23/V/42   | "            | 1,93               | 5,17                 |                | 9                                    | 400         |
| 15/IV/42  | 129          | 3,93               | 5,54                 |                | 58                                   | 450         |
| 13/VI/42  | "            | P A R T O          |                      | 2              | —                                    | —           |
| 22/VI/42  | "            | 1,97               | 7,23                 |                | 9                                    | 449         |
| 15/IV/42  | 130          | 6,89               | 7,70                 |                | 50                                   | 472         |
| 9/VI/42   | "            | 6,18               | 6,41                 |                | 26                                   | 600         |
| 5/VI/42   | "            | P A R T O          |                      | 2              | —                                    | —           |
| 6/VI/42   | "            | 2,33               | 6,30                 |                | 1                                    | 555         |
| 30/IV/42  | 131          | 6,08               | 6,51                 |                | 55                                   | 405         |
| 25/VI/42  | "            | P A R T O          |                      | 2              | —                                    | —           |
| 26/VI/41  | "            | 1,38               | 4,41                 |                | 1                                    | 480         |
| 30/IV/42  | 132          | 4,82               | 4,32                 |                | 61                                   | 425         |
| 26/VI/42  | "            | 2,44               | 4,20                 |                | 5                                    | 480         |
| 1/VII/42  | "            | P A R T O          |                      | 2              | —                                    | —           |
| 8/VII/42  | "            | 2,25               | 3,83                 |                | 7                                    | 410         |
| 22/V/42   | 133          | 1,75               | 5,07                 |                | 51                                   | 630         |
| 22/VI/42  | "            | 4,23               | 4,07                 |                | 21                                   | 805         |
| 13/VII/42 | "            | P A R T O          |                      | 2              | —                                    | —           |
| 17/VII/42 | "            | 0,75               | 3,95                 |                | 4                                    | 710         |
| 3/VIII/42 | "            | 2,55               | 4,80                 |                | 20                                   | 700         |

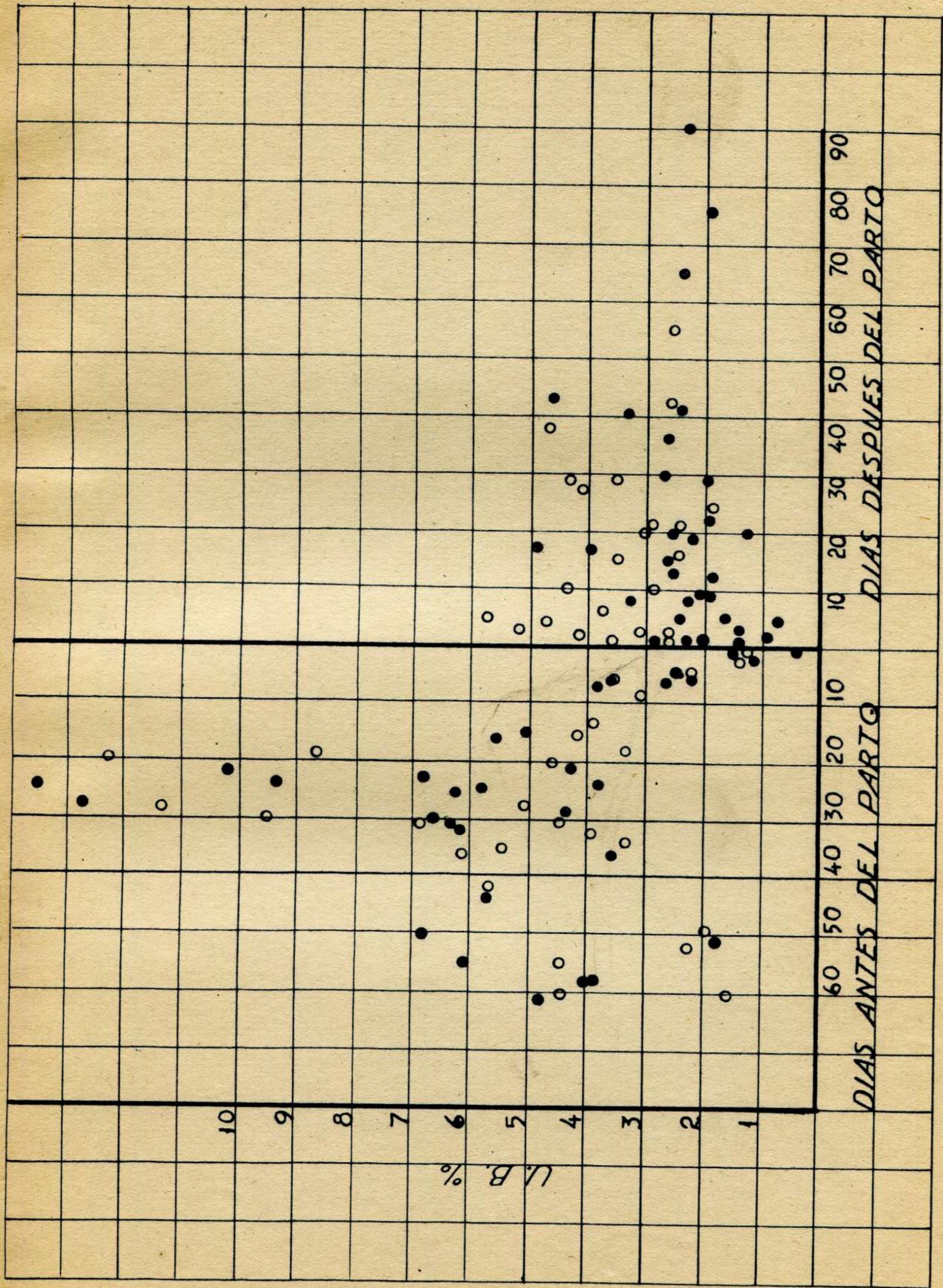
Cuadro Nº 30

Sero-fosfatasa y fosfatos inorgánicos durante la preñez y la lactancia de cobayas mamectomizadas. Determinación de fosfatasa por el método de Bodansky .-

| Fecha      | Animal<br>Nº | Fosfatasa<br>U.B. % | Fosf.inorg.<br>mg. % | Nº de<br>hijos | Dias antes<br>o después<br>del parto | Peso<br>gr. |
|------------|--------------|---------------------|----------------------|----------------|--------------------------------------|-------------|
| 11/VIII/41 | 140          | 1.53                | 3.76                 |                | 60                                   | 520         |
| 5/IX/41    | "            | 3.32                | 5.88                 |                | 34                                   | 530         |
| 9/X/41     | "            | 1.23                | 2.68                 |                | 1                                    | 690         |
| 10/X/41    | "            | P A R T O           |                      | 3              | ---                                  | ---         |
| 31/X/41    | "            | 2.90                | 5.46                 |                | 21                                   | 600         |
| 29/VIII/41 | 141          | 2.17                | 6.80                 |                | 52                                   | 570         |
| 17/IX/41   | "            | 3.91                | 5.79                 |                | 32                                   | 570         |
| 19/X/41    | "            | P A R T O           |                      | 3              | ---                                  | ---         |
| 29/X/41    | "            | 2.91                | 4.62                 |                | 10                                   | 540         |
| 17/XI/41   | "            | 4.32                | 5.88                 |                | 29                                   | 555         |
| 27/VIII/41 | 142          | 1.90                | 4.54                 |                | 49                                   | 570         |
| 15/IX/41   | "            | 4.45                | 5.67                 |                | 30                                   | 480         |
| 14/X/41    | "            | P A R T O           |                      | 2              | ---                                  | ---         |
| 18/X/41    | "            | 4.74                | 6.15                 |                | 4                                    | 630         |
| 10/XI/41   | "            | 4.10                | 4.95                 |                | 27                                   | 640         |
| 3/XII/41   | 143          | 6.86                | 5.08                 |                | 31                                   | 684         |
| 3/I/42     | "            | P A R T O           |                      | 3              | ---                                  | ---         |
| 24/I/42    | "            | 2.46                | 4.48                 |                | 21                                   | 565         |
| 14/VII/42  | "            | 2.54                | 2.98                 |                | 42                                   | 605         |
| 6/XII/41   | 144          | 11.37               | 2.89                 |                | 29                                   | 680         |
| 4/I/42     | "            | P A R T O           |                      | 3              | ---                                  | ---         |
| 28/I/42    | "            | 1.89                | 3.47                 |                | 24                                   | 600         |
| 9/XII/41   | 145          | 21.70               | 4.06                 |                | 28                                   | 570         |
| 6/I/42     | "            | P A R T O           |                      | 3              | ---                                  | ---         |
| 2/III/42   | "            | 3.54                | 6.56                 |                | 55                                   | 559         |
| 13/XII/41  | 146          | 5.09                | 3.82                 |                | 28                                   | 500         |
| 10/I/42    | "            | P A R T O           |                      | 2              | ---                                  | ---         |
| 26/I/42    | "            | 2.45                | 4.56                 |                | 16                                   | 483         |
| 15/XII/41  | 147          | 8.66                | 2.32                 |                | 19                                   | 590         |
| 4/I/42     | "            | P A R T O,          |                      | 3              | ---                                  | ---         |
| 24/I/42    | "            | 3.08                | 6.02                 |                | 20                                   | 635         |
| 15/XII/41  | 148          | 12.14               | 3.67                 |                | 20                                   | 640         |
| 5/I/42     | "            | P A R T O           |                      | 3              | ---                                  | ---         |
| 13/II/42   | "            | 4.63                | 4.97                 |                | 38                                   | 655         |
| 4/III/42   | 149          | 4.59                | 5.01                 |                | 20                                   | 602         |
| 24/III/42  | "            | 2.22                | 4.76                 |                | 5                                    | 690         |
| 29/III/42  | "            | P A R T O           |                      | 1              | ---                                  | ---         |
| 28/IV/42   | "            | 3.50                | 4.52                 |                | 29                                   | 710         |

Cuadro Nº 30 (Continuación)

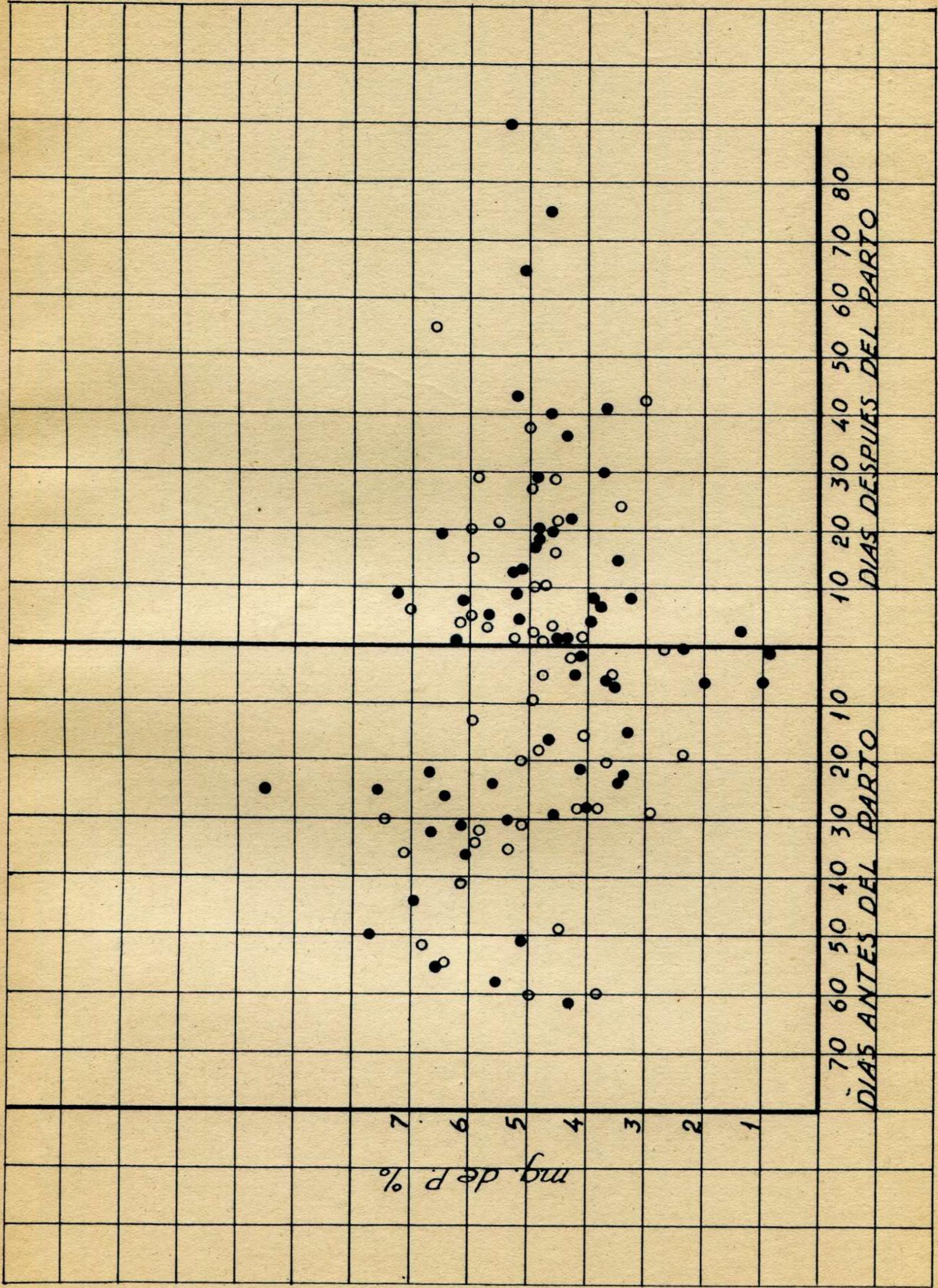
| Fecha     | Animal<br>Nº | Fosfatasa<br>U.B. % | Fosf.inorg.<br>mg. % | Nº de<br>hijos | Dias antes<br>o después<br>del parto | Peso<br>gr. |
|-----------|--------------|---------------------|----------------------|----------------|--------------------------------------|-------------|
| 26/III/42 | 150          | 6.10                | 7.09                 |                | 36                                   | 520         |
| 1/V/42    | "            | P A R T O           |                      | 2              | —                                    | —           |
| 7/V/42    | "            | 3.75                | 7.03                 |                | 6                                    | 545         |
| 27/III/42 | 151          | 4.40                | 5.01                 |                | 60                                   | 640         |
| 27/IV/42  | "            | 9.53                | 7.49                 |                | 30                                   | 765         |
| 27/V/42   | "            | P A R T O           |                      | 3              | —                                    | —           |
| 30/V/42   | "            | 3.01                | 4.66                 |                | 3                                    | 698         |
| 13/IV/42  | 152          | 5.66                | 6.11                 |                | 42                                   | 485         |
| 25/V/42   | "            | P A R T O           |                      | 3              | —                                    | —           |
| 30/V/42   | "            | 5.73                | 5.94                 |                | 5                                    | 500         |
| 6/IV/42   | 153          | 4.43                | 6.45                 |                | 55                                   | 450         |
| I/V/42    | "            | P A R T O           |                      | 1              | —                                    | —           |
| 15/V/42   | "            | 3.50                | 5.95                 |                | 15                                   | 530         |
| 1/VII/42  | 154          | 3.23                | 4.76                 |                | 18                                   | 535         |
| 19/VII/42 | "            | P A R T O           |                      | 2              | —                                    | —           |
| 21/VII/42 | "            | 5.18                | 5.67                 |                | 3                                    | 460         |
| 7/VII/42  | 155          | 3.99                | 5.90                 |                | 13                                   | 510         |
| 20/VII/42 | "            | P A R T O           |                      | 1              | —                                    | —           |
| 21/VII/42 | "            | 2.54                | 5.22                 |                | 1                                    | 440         |
| 1/VII/42  | 156          | 5.45                | 5.30                 |                | 35                                   | 507         |
| 3/VIII/42 | "            | 1.24                | 4.28                 |                | 2                                    | 710         |
| 5/VIII/42 | "            | P A R T O           |                      | 2              | —                                    | —           |
| 7/VIII/42 | "            | 2.58                | 4.95                 |                | 2                                    | 525         |
| 6/X/42    | 157          | 3.08                | 4.97                 |                | 9                                    | 603         |
| 15/X/42   | "            | P A R T O           |                      | 1              | —                                    | —           |
| 31/V/42   | "            | 3.21                | 3.96                 |                | 16                                   | 470         |
| 15/X/42   | 158          | 3.55                | 1.74                 |                | 6                                    | 680         |
| 21/X/42   | "            | P A R T O           |                      | 2              | —                                    | —           |
| 31/X/42   | "            | 4.31                | 4.89                 |                | 10                                   | 500         |
| 15/X/42   | 159          | 4.11                | 4.07                 |                | 15                                   | 620         |
| 30/X/42   | "            | P A R T O           |                      | 2              | —                                    | —           |
| 30/X/42   | "            | 3.52                | 4.70                 |                | 0                                    | 585         |
| 30/X/42   | 160          | P A R T O           |                      | 2              | —                                    | —           |
| 31/X/42   | "            | 4.11                | 4.07                 |                | 1                                    | 500         |



Sero-fosfatasa en cobayas normales y mamectomizadas durante la preñez y despues del parto.-

● Normales

○ Mamectomizadas



Fosfatos inorgánicos en el suero de cobayas normales y mamectomizadas durante la preñez y despues del parto.-

● Normales  
○ Mamectomizadas

los cuadros Nos. 30 y 29 y en el gráfico N° 18 se puede apreciar el conjunto de las determinaciones de los dos grupos - normales y mamectomizadas - dispuestas en un sistema coordinado en el cual las abscisas muestran los días transcurridos antes y después del parto.-

Durante la preñez los valores de fosfatasa aumentan desde los primeros días hasta alcanzar un máximo en la decena que corresponde entre los treinta y veinte días que preceden al parto; a partir de esa fecha los valores decrecen : : nuevamente y en los últimos días del período de la preñez el contenido de fosfatasa sanguínea tiene nuevamente las cifras que se encuentran en condiciones fisiológicas habituales y aún por debajo de ellas para animales correspondientes al peso de los que se tomaron para esta experiencia.-

La comparación de los resultados obtenidos con cobayas normales y mamectomizadas no revela diferencias entre uno y otro grupo; ambos han alcanzado los valores más altos durante el mismo período anterior al parto; el valor más alto alcanzado corresponde al animal mamectomizado señalado con el número 145 (cuadro N° 30) y la comparación de los promedios de los dos grupos en las determinaciones efectuadas entre los 30 y 21 días es ligeramente mayor en los mamectomizados, pero esta diferencia es ciertamente mucho menor que las que existen entre los animales de cada grupo entre sí. Los promedios agrupados cada diez días para cobayas normales y mamectomizadas respectivamente, son los siguientes:

|    |   |    |      |   |           |   |            |
|----|---|----|------|---|-----------|---|------------|
| 60 | - | 51 | días | : | 4,12 U.B. | y | 3,13 U.B.  |
| 50 | - | 41 | "    | : | 6,30 U.B. | y | 3,78 U.B.  |
| 40 | - | 31 | "    | : | 5,32 U.B. | y | 5,12 U.B.  |
| 30 | - | 21 | "    | : | 8,16 U.B. | y | 10,42 U.B. |
| 20 | - | 11 | "    | : | 5,31 U.B. | y | 6,12 U.B.  |
| 10 | - | 0  | "    | : | 2,22 U.B. | y | 2,26 U.B.  |

Los fosfatos inorgánicos del suero sufren también variaciones durante el período de la preñez, pero de amplitudes menores que en el caso de la sero-fosfatasa. Los valores máximos han sido registrados entre los 50 y 30 días anteriores al parto y manifiestan luego una clara tendencia a disminuir, para hacerse francamente inferiores a los valores normales en condiciones fisiológicas habituales. Los promedios en animales normales y mamectomizados respectivamente son los siguientes:

|    |   |    |      |   |         |   |         |
|----|---|----|------|---|---------|---|---------|
| 60 | - | 51 | días | : | 5,52 mg | y | 5,07 mg |
| 50 | - | 41 | días | : | 7,33 "  | y | 5,67 "  |
| 40 | - | 31 | días | : | 6,35 "  | y | 5,89 "  |
| 30 | - | 21 | días | : | 5,49 "  | y | 4,95 "  |
| 20 | - | 11 | días | : | 3,88 "  | y | 4,28 "  |
| 10 | - | 0  | días | : | 2,69 "  | y | 3,68 "  |

El comportamiento en los animales normales y mameotomizados es tambien muy parecido en lo que a fosfatos inorgánicos se refiere, pudiendo anotarse solamente que las variaciones son menores en estos últimos y el descenso al final de la preñez no tan pronunciado como en los animales normales.-

Ocurrido el parto, la tasa de sero-fosfatasa toma los valores corrientes en los animales normales de su peso, con tendencia a los límites inferiores. La mayor diferencia que se ha observado entre las cobayas normales y mamectomizadas se encuentran en los primeros dias que siguen al parto; si se toman en efecto, los valores de los 10 primeros dias de uno y otro grupo y se disponen ordenados según el número de animales cuya riqueza en fosfatasa está comprendida dentro de los límites que se especifican, se tiene el siguiente cuadro comparativo:

| U.B. % | Número de animales normales | Número de animales mamectomizados |
|--------|-----------------------------|-----------------------------------|
| 6 - 5  | 0                           | 2                                 |
| 5 - 4  | 0                           | 3                                 |
| 4 - 3  | 1                           | 3                                 |
| 3 - 2  | 4                           | 3                                 |
| 2 - 1  | 6                           | 0                                 |
| 1 - 0  | 2                           | 0                                 |

Los promedios totales en este período dan 3,94 U.B. % para los animales mamectomizados y 1,83 U.B. % para los normales.-

Los valores de los fosfatos inorgánicos de las cobayas normales en estos 10 primeros dias de lactación, son tambien ligeramente inferiores a los de las cobayas mamectomizadas; las diferencias son, sin embargo, menores que las que se encuentran para la fosfatasa y la distribución de acuerdo al contenido en mg de P inorgánico por 100 ml de suero en un cuadro similar al que hemos dado para la fosfatasa, señala una distribución más uniforme para los dos grupos.-

#### Discusión de los resultados

El comportamiento de la sero-fosfatasa durante el período de la preñez difiere en los animales de distintas especies. Mientras que en la mujer en período de gestación aumenta paulatinamente desde los primeros dias hasta la producción del parto (Cayla y Fabre; Celentano; Meranze, Meranze y Rothmann; Bodansky); en los vacunos en cambio, si esos aumentos se producen (según Auchinachie y Emslie no aumentan si no que por el contrario disminuyen) ellos no tienen relación con el progreso de la preñez (Allcroft y Folley). En otro de los

de los animales investigados, la rata, no se producen modificaciones durante el primer tiempo pero disminuye al final, desde los 6 días anteriores al parto (Weil), y finalmente, en la cobaya hemos encontrado que aumenta paulatinamente hasta los 20 - 30 días anteriores al parto para disminuir luego y alcanzar valores inferiores a los normales en los últimos días.-

En general, los autores que se han ocupado de este tema han procurado establecer si estas modificaciones de la sero-fosfatasa materna están en relación con las necesidades minerales aumentadas del feto, que se producen en fechas coincidentes. Meranze, Meranze y Rothmann analizan la sangre materna y la sangre obtenida del cordón umbilical y opinan que sus resultados "pueden indicar que el feto, en el útero al menos, es incapaz de proveer suficiente cantidad de fosfatasa para sus necesidades y que los valores altos encontrados en la sangre materna durante los últimos meses de gestación pueden representar una útil respuesta compensadora por parte de la madre".-

El papel que pudiera desempeñar la entrada en actividad de la glándula mamaria, que es uno de los órganos más ricos de la economía en fosfatasa, en el aumento de esta enzima en la sangre de la gestante, no había sido considerado todavía. Nuestras experiencias tendieron a establecer si dicha glándula podía o no ser considerada como el origen de la sero-fosfatasa en exceso durante este período. Los resultados descartan absolutamente dicha posibilidad pues en nuestros animales no ha existido ninguna diferencia entre los normales y los mamectomizados.-

La interpretación del fenómeno en un sentido inverso, esto es, que el organismo materno ponga en movimiento una gran cantidad de fosfatasa a beneficios del desarrollo de esta glándula, tampoco es apoyada por esos mismos resultados, pero no queda definitivamente descartada.-

Las diferencias encontradas durante el primer período del post-parto, entre los animales que lactan y los mamectomizados, apoyan el punto de vista de que la glándula mamaria se sirve de la fosfomonoesterasa alcalina de la sangre para satisfacer sus necesidades seguramente aumentadas de dicha enzima.-

## A P E N D I C E

### TECNICAS DE DETERMINACION DE FOSFOMONOESTERASA ALCALINA TISULAR

El problema de la determinación cuantitativa de una enzima tisular encuentra su primera dificultad en la liberación de la enzima del interior del tejido que la contiene. No se puede ciertamente, dada la extrema delicadeza de la molécula enzimática, aplicar los métodos de extracción corrientemente usados para otras sustancias y es imposible dar normas generales con respecto a los procedimientos a seguir para cumplir debidamente con este primer aspecto del análisis; no nos proponemos insistir aquí sobre este punto; solo quisiéramos indicar que si se puede dejar como sentado que el mejor procedimiento es aquel que extrae mayor actividad en condiciones fácilmente reproducibles, para el caso de nuestro trabajo debemos remitirnos a lo tratado en el capítulo II a propósito de la extracción de la fosfomonoesterasa de la glándula mamaria.-

El objeto de este Apéndice es tratar algunos aspectos de la determinación cuantitativa de la fosfatasa alcalina, partiendo del supuesto que se la tiene disuelta. Debe prevenirse que aún en estas circunstancias es conveniente distinguir en la técnica a seguir, la posibilidad de que la enzima esté disuelta en un líquido de extracción o que lo esté en un fluido biológico; en el primer caso las condiciones del medio son mucho más variables que en el segundo, desde que las propiedades del órgano que se extrae y las del líquido de extracción pueden introducir mayores variaciones en el pH o en la concentración de activadores e inhibidores que las causadas por los fluidos biológicos, que en general son de propiedades más constantes.-

En los párrafos siguientes se considerarán en primer término los principios generales en los que se basan las determinaciones de fosfatasa alcalina. En estos principios generales se considerarán, a su vez, primero, las condiciones para la acción de la enzima y luego la determinación de los productos finales originados a consecuencia de dicha acción.-

En segundo término se darán detalladamente las técnicas usadas en el presente trabajo, que difieren en diversos detalles de todas las publicadas y que creemos, son especialmente recomendables para la determinación en líquidos de extracción.-

A).- Principios generales para la determinación de fosfatasa alcalina

1º) Las condiciones para la acción de la enzima

SUBSTRATO.- Hemos visto en la "Introducción" que prácticamente todos los ésteres monofosforados son escindidos por la fosfatasa. Sin embargo, en los métodos para determinaciones sistemáticas solo se han aconsejado muy pocos. El beta-glicero-fosfato de sodio ha sido el preferido en este sentido; constituye el sustrato en los métodos de Kay (1930), Bodansky (1933), Cayla (1935), Lundsteen y Vermehren (1935), Weil (1940), Mácola y Fazio (1940) y en las macro y micro-técnica de Shinowara, Jones y Reinhart (1942).-

El monofenilfosfato disódico se ha usado desde más recientemente; lo introdujeron en las determinaciones sistemática King y Armstrong (1934), quienes determinan el grupo fenol liberado por la enzima, en lugar de determinar el grupo fosfórico.- Posee como ventajas el hecho de que la fosfatasa tiene mayor afinidad por este sustrato que por el constituido por beta-glicero-fosfato y, además, la sensibilidad de los métodos de determinación de fosfatos y fenoles para cantidades equimoleculares es mayor para los últimos.-

EL pH DEL MEDIO.- El pH en el cual se estabilizó el curso de la reacción es 7,7 en el primer método de Kay; este autor lo prefirió por ser aproximadamente fisiológico y por que en él la fosfatasa es estable mientras que no lo es en el medio óptimo para su actividad. Un pH tan bajo tiene como inconveniente que la acción enzimática está muy retardada y requiere tiempos de incubación excesivamente largos para obtener una cantidad de fósforo inorgánico (liberado) adecuado para los métodos analíticos corrientemente usados para este fin.-

La tendencia de efectuar las determinaciones en un medio de reacción más próximo al óptimo de actividad ha ido predominando; las determinaciones se efectúan hoy en pH que oscilan entre 8,7 y 9,0 en la generalidad de los métodos propuestos y, menos frecuentemente a pH más elevados de 9,5.-

Como sustancia estabilizadora del medio se ha usado preferentemente el dietilbarbiturato sódico (veronal sódico) que constituye la base de un sistema "buffer" propuesto por Michaelis (1931). La objeción de sustancia onerosa que se le hiciera en un principio no ha impedido que prevaleciera sobre todas las otras propuestas, debido principalmente a que es muy poco inhibidora de la fosfatasa alcalina. También han sido usadas las mezclas tampones de "glicocola - NaOH" y la de "Cloruro amónico-amoniaco" (Lunsteen y Vermehren).-

TIEMPO DE INCUBACION.- El tiempo durante el cual se somete el substrato a la acción de la enzima se ha abreviado en lo posible. De 48 horas en el primer método de Kay, fué reducido a 3 horas por el mismo autor; generalmente se efectúan hoy las determinaciones en 1 hora, siendo el de King y Armstrong el único que nosotros conocemos cuyas determinaciones se efectúan en 1/2 hora.-

La conducta de abreviar el tiempo de incubación tiene diversas ventajas: en primer término, la estabilidad de la enzima es más uniforme; segundo, la hidrólisis espontánea de los substratos se reduce, y tercero, es más cómodo para el experimentador. En algunos casos especiales, sobre todo por la necesidad de trabajar con la menor cantidad de material posible (método de Lunsteen y Vermeiren planeado para trabajar en una clínica pediátrica y método de Weil y Russel planeado para trabajar con sangre de ratas), aquellas ventajas del período corto de incubación han debido ceder ante factores más importantes.-

TEMPERATURA.- Las temperaturas a las cuales se efectúan las incubaciones han variado entre 30 y 37,5 grados C. en los diferentes métodos.-

## 22).- Determinación de los fosfatos

Salvo en el método de King y Armstrong en el cual se determina cuantitativamente el fenol liberado del fenilfosfato disódico, en todos los otros métodos se determinan los fosfatos liberados como medida de la acción de la enzima.-

Las microtécnicas para determinaciones cuantitativas de ortofosfatos comprenden métodos gravimétricos, gasométricos y colorimétricos.- Nos ocuparemos solamente de estos últimos porque son los únicos que se han usado para determinaciones de fosfatasa.-

Todos los métodos de este tipo actualmente en uso se basan en la reducción de los fosfomolibdatos con producción de derivados de color azul. El hecho de que la reducción de los molibdatos es tan escasa que puede darse por nula junto a la de los fosfomolibdatos, ha simplificado enormemente la técnica pues evita la precipitación de estos últimos como tiempo previo a la reacción colorimétrica.-

Desde 1914, el cual Taylor y Miller propusieron la reducción por medio de la fenil-hidrazina el método ha sufrido una variedad grande de modificaciones.- Bell y Doisy en 1920 usaron como reductor la hidroquinona en medio alcalino, lo que tiene como inconveniente que el color producido en estas condi-

ciones se obscurece rápida e irregularmente. Briggs consiguió salvar este inconveniente efectuando la reducción en medio ácido pero manteniendo la hidroquinona como reductor.-

Fiske y Subbarow (1925) modifican el método de Briggs; proponen el ácido 1-2-4 amino-naftol-sulfónico como reductor al cual hacen actuar en presencia de sulfito y bisulfito de sodio. Este método subsiste como uno de los más usados; fué sometido a escasas modificaciones por Lohmann y Jendrassik (1926) y por King (1933) quien reemplazó el ácido sulfúrico por el perclórico.-

Kuttner y Cohen (1927) y Kuttner y Lichtenstein (1930. - 32) utilizan el cloruro estañoso como reductor; han propuesto un método de gran sensibilidad y de colores estables pero que es muy sensible a las modificaciones de la acidez y a las sustancias que interfieren la reacción.-

Además de las citadas sustancias han sido usadas como reductoras el el amidol (clorhidrato de 2-4-diaminofenol) por Lundsteen y Vermehren(1935) y el elón (sulfato de metil-p-aminofenol) por Gomori (1942).-

#### Substancias que interfieren las reacciones colorimétricas de los fosfatos

Un grupo relativamente numeroso de sustancias interfieren con la reacción colorimétrica de los fosfatos y su desconocimiento puede llevar a errores fundamentales. Estas sustancias actúan en casi todos los métodos antes descritos y deben tomarse todas las precauciones posibles cuando se conozca la presencia de algunas de ellas en el problema a analizar. Fiske y Subbarow han prevenido contra el intento de pretender salvar las dificultades alterando los "patrones" con adiciones de las sustancias perturbadoras.-

Beremblum y Chain (1938) han clasificado estas sustancias en los tres grupos siguientes:

A).-Sustancias que alteran la acidez del medio y en consecuencia alteran la cantidad de ácido molíbdico reducible. Pertenece a este los ácidos, bases y "buffers".-

B).-Sustancias que forman con el molibdeno complejos difícilmente reducibles y por consiguiente disminuyen las cantidades disponibles para la reducción. Ejemplos: fluoruros, citratos, oxalatos, etc.-

C).-Sustancias que alteran la concentración del agente de reducción. Ejemplos: nitritos, hipocloritos, etc.-

Métodos colorimétricos de aplicación circunstancial.-

Debido a la presencia de cualquiera de las sustancias mencionadas puede hacerse imposible la determinación de los fosfatos por los métodos corrientes. En tales casos lo mejor es acudir a la aplicación de métodos que eluden la dificultad separando el grupo fosfórico o el complejo fosfomolibdico previamente formado, del medio en el cual la reacción se encuentra dificultada.-

G.E. Delory (1938) precipita los fosfatos al estado de  $Ca_3PO_4 \cdot 2H_2O$  y en el precipitado aplica el método de Fiske y Subbarow modificado por King. Beremlum y Chain (1938) extraen el complejo fosfomolibdico con alcohol iso-butílico en el cual es soluble. También puede recurrirse al método de King y Delcry (1937) : consiste en precipitar los fosfatos con 8-oxiquinolina y en el precipitado lavado dosar los fenoles de la oxiquinolina; mediante un factor se transforman los resultados obtenidos en fenoles a fosfatos.-

B).- Métodos de determinación de fosfatasa alcalina usados en el presente trabajo

Para las determinaciones de fosfatasa alcalina efectuadas en el presente trabajo se han adoptado dos métodos. Para las determinaciones en suero sanguíneo se ha adoptado el método de Bodansky (1932 - 1937) pero para las determinaciones en extractos tisulares ha sido necesario adaptar un método de condiciones más elásticas que permitiera en cada caso ajustar el pH y los reactivos adicionados a las necesidades particulares de cada extracto.-

Las condiciones generales del método propuesto son: 1º, trabajar a un pH más elevado que el método de Bodansky y estabilizarlo con la mezcla "buffer" de Michaelis en la composición y concentración original: esta composición estabiliza mejor que la simple mezcla de veronal y glicerofosfato sódico y la concentración original nos permite el agregado de ácido o base en aquellos casos en los cuales el extracto tisular altera el pH en mayor medida de lo que ocurre habitualmente (1)

2º, se ha aplicado el método de Fiske y Subbarow (con modificaciones de M. Logan (2)) para la determinación de fosfatos. Esta modificación se ha he-

---

(1).- En determinaciones de extractos de órganos de perros hemos encontrado que los extractos de hígado y bazo disminuyen más el pH que los extractos de riñón e intestino. La glándula mamaria de vacuno afecta relativamente poco.-

(2).- Modificaciones comunicadas personalmente por el prof. Logan al prof. A. Marsal.

cho en razón de que es generalmente admitido que el método de Fiske y Subbarow es menos sensible a la acción de las sustancias que interfieren la reacción que el método de Kuttner y Cohen adoptado por Bodansky para su método.-

### Reactivos

- a).- Mezcla tampón de Michaelis (1): 9,714 g de acetato de sodio ( $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ) y 14,714 g de veronal sódico se disuelven en 5500 ml de agua destilada exenta de  $\text{CO}_2$ .-
- b).- Solución de beta-glicero-fosfato de sodio (Eastman) al 1%. Preparar semanalmente.-
- c).- Solución de cloruro de magnesio 0,01 M (0,2032 g de  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) en 100 ml de agua destilada).
- d).- Patrón de fosfatos: 0,1755 g de fosfato monopotásico purísimo y desecado a 105 - 110 grados C, en 10 ml de 10 N  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ; diluye en agua destilada hasta 1 litro.- 5 ml de esta solución contienen 0,2 mg de P.-
- e).- Acido tricloro-acético al 10 %.-
- f).- Acido sulfúrico 10 N.-
- g).- Solución de molibdato de amonio: Molibdato de amonio 8,3 g en 100 ml de ácido sulfúrico 3,3 N.-
- h).- Solución reductora (preparar quincenalmente). 3,75 g de mezcla reductora en 25 ml de agua.-

Mezcla reductora: En un mortero coloque 142,5 g de bisulfito de sodio, 2,5 g de 1-2-4 aminonaftolsulfónico previamente pulverizado y 5 g de sulfito de sodio anhidro. Mezcle perfectamente, pulverizando y conserve en frasco coloreado. Frecuentemente la solución del aminonaftol sulfónico no es perfecta; en tal caso es necesario agregar gotas de solución saturada de sulfito para terminar la disolución.-

### Técnica de la determinación

Acción de la enzima.- En un tubo de ensayo (Pirex) se colocan 4 ml de solución "buffer", 2 ml de solución de  $\text{MgCl}_2$  y 2 ml del extracto a determinar ( las diluciones del extracto dependerán de las riquezas de los mismos)

(1).- Michaelis da la siguiente tabla para los pH de su mezcla cuando a 5 ml de la misma se le agregan 2 ml de NaCl al 8 % , "a" ml de N/10 de HCl y (18 - a) ml de agua.-

| a    | pH   | a   | pH   | a   | pH   | a   | pH   | a  | pH   |
|------|------|-----|------|-----|------|-----|------|----|------|
| 0    | 9,64 | 1,0 | 8,55 | 5,0 | 7,42 | 7,0 | 6,12 | 11 | 4,33 |
| 0,25 | 9,16 | 2,0 | 8,18 | 5,5 | 7,25 | 8,0 | 5,32 | 12 | 4,13 |
| 0,5  | 8,90 | 3,0 | 7,90 | 6,0 | 6,99 | 9,0 | 4,93 | 13 | 3,88 |
| 0,75 | 8,68 | 4,0 | 7,66 | 6,5 | 6,75 | 10  | 4,66 | 14 | 3,62 |

4 ml de esta mezcla se pasan a otro tubo de ensayo (de paredes finas y vidrio neutro). En los 4 ml restantes se efectúa la determinación del pH; cuando se trabaja con un extracto cuyas propiedades se desconocen por completo, conviene comenzar añadiendo 4 gotas de azul de timol (según Clark y Lubs) y guiarse por la coloración de este indicador para agregar alternativamente HCl N/10 o NaOH N/10 según sea necesario corregir un exceso de alcalinidad o de acidez. Finalmente debe corroborarse potenciométricamente que se ha logrado el pH deseado.-

La cantidad exactamente medida de ácido o base agregada al tubo control debe agregarse posteriormente al tubo donde se efectuará la determinación y se completa a 5 ml con agua destilada.-

Prepárese otro tubo con 2 ml de solución "buffer", 1 ml de sol. de cloruro magnésico y 2 ml de agua destilada. Este tubo sirve como blanco.-

Llévense los dos tubos a un baño de agua a temperatura constante (37°) y luego de algunos minutos se agregan a cada uno de ellos 5 ml de sol. de beta-glícero-fosfato sódico. Se llevan al baño maría a temperatura constante y se dejan exactamente 1 hora. Simultáneamente se debe ir preparando un tubo que contiene 9 ml de agua destilada y 1 ml de extracto sin diluir, el cual se lleva al refrigerador.-

Al cabo de 1 hora los tubos se colocan en un baño con hielo triturado y se precipitan las proteínas con 5 ml de ácido tricloroacético al 10 %. Se filtra y en el filtrado se determinan los fosfatos.-

Determinación de los fosfatos.- En un frasco volumétrico de 50 ml se colocan 5 ml de solución patrón de fosfatos, 2ml de ácido sulfúrico 10 N y 1,50 ml de solución de molibdato. En cada uno de los tres frascos volumétricos de 25 ml se agregan: 5 ml de filtrado, 0,9 de ácido sulfúrico 10 N y 0,75 de sol. de molibdato.- Todos los frascos son adicionados de agua destilada hasta casi completar sus volúmenes y se les agregan: 2 ml de sol. reductora al frasco vol. de 50 , 1 y 1 ml a los frascos de 25 ml. Se completan con agua y se efectúa la lectura colorimétrica, cuando se termine de desarrollar el color.- La cantidad de fósforo cuando el patrón se coloca en 20 mm está dada por la siguiente fórmula.-

$$\frac{20}{\text{lectura}} \quad 0,1 \quad 3 \quad \text{dilución del extr.} = P/\text{ml de extracto}$$

La diferencia entre el tubo refrigerado y el incubado da la cantidad de fósforo liberado. El blanco debe quedar incoloro: cuando tome un ligero tinte azulado es conveniente renovar la solución de beta-glícero-fosfato.-

Consideraciones sobre la precisión en las determinaciones de fosfatasa

Las determinaciones en dobles, con las mismas cantidades de enzima, se pueden realizar con un alto grado de precisión; el 2 o 4 % en los errores que en estas circunstancias se producen son solo muy ligeramente superiores a a los dados en la simple determinación colorimétrica de los fosfatos.-

Sin embargo, debe recordarse que la determinación de una enzima está afectada en gran medida por acciones que en los análisis corrientes no entran en consideración. Si la reacción colorimétrica de determinación de fosfatos es proporcional dentro de una escala muy amplia de concentración, no puede decirse lo mismo con respecto a la actividad de la fosfatasa. Con el método arriba descrito pueden compararse soluciones que liberen entre 0,075 mg de P por ml y 0,3 de P por ml, con una precisión mayor del 5 % de error, pero para concentraciones que liberen entre 0,3 y 0,4 mg de P los errores aumentan rápidamente al 10 y 20 %, siendo para concentraciones mayores de 0,4 mg de P liberado, tan aleatorios que carecen de todo valor.-

Unidades usadas para expresar la actividad fosfatásica

Unidad Jenner y Kay.- Es la cantidad de enzima que libera 1 mg de P como fosfato libre, de un exceso de beta-glicero-fosfato disódico a pH 8,8 en 3 horas a 37° C.-

Unidad Bodansky.- Equivalente a 1 mg de fósforo liberado al estado de ión fosfato, del glicero-fosfato sódico durante la primera hora a pH 8,6 y 37°C.-

Unidad Albers.- Es la cantidad de enzima que en una hora, a 37°C libera 0,1 mg de P del substrato de beta-glicero-fosfato y a pH de 9.-

Unidad Lundsteen y Vermehren.- Es la cantidad de fosfatasa que en 24 horas, a 37°C libera 1 mg de P de un substrato de beta-glicero-fosfato disódico.-

Unidad King y Armstrong.- Es la cantidad de enzima que libera 1 mg de fenol actuando sobre un exceso de fenil-fosfato disódico, a pH 9 durante 30 minutos y 37,5°C.-

Otras técnicas usadas en el presente trabajo

Determinaciones de pH.- Las determinaciones de pH fueron ejecutadas con el potenciómetro de Leeds y Northrop modelo 7660 y el electrodo de vidrio de Mc Innes, usando como patrón la solución de ftalato ácido de potasio del National Bureau of Standards de Washington con un pH de 3,974 a 20 grados.-

Determinaciones de nitrógeno.- Se han efectuado según el método de Kjeldahl; Durante el primer año en que se efectuó este trabajo se usó una técnica que consistía en mineralizar con perhidrol, destilar el amoníaco bajo corriente de vapor de agua de acuerdo a la microtécnica de Michaelis y titulación final por yodometría.- Posteriormente pudimos disponer del aparato para destilación a vacío parcial propuesto por Keys (1940) y adoptamos la técnica de determinación de nitrógeno indicada por el mismo.-

Determinaciones de magnesio.- Se precipitó el magnesio adicionando fosfato amónico y amoníaco; el precipitado, lavado con agua y alcohol amoniacal, es disuelto posteriormente con ácido sulfúrico 10 N y en la solución se practica la determinación de los fosfatos de acuerdo con el método de Fiske y Subbarow.-

-----

## RESUMEN Y CONCLUSIONES

- 10.- Con el beta-glicero-fosfato de sodio como substrate, se ha estudiado la actividad fosfatásica de extractos de glándula mamaria de vacuno. Estos extractos, que han sido obtenidos por diversos métodos, se han revelado ricos en fosfomonoesterasa alcalina (hasta 40 unidades Albers por gramo de órgano) pero en las curvas de pH óptimo no ha sido posible revelar la presencia de otro tipo de fosfomonoesterasa.-
- 20.- El estudio histoquímico revela que la fosfatasa de la glándula mamaria se localiza en los elementos epiteliales; la actividad de los elementos interepiteliales es sumamente escasa o nula.-
- 30.- Se completa el estudio de la técnica de purificación previamente descrita y basada en la precipitación con etanol y acetona con solubilización posterior en solución saturada de acetato de magnesio. En las consideraciones sobre la eficacia del método de purificación propuesto se aprecia que se purifica alrededor de 5000 veces con respecto al órgano y 85 a 100 veces si se considera con respecto al extracto crudo, con una recuperación final del 35 al 45 % del total del cual se partió.-
- 40.- La relación porcentual del nitrógeno total con respecto al contenido seco total muestra que hay de 7,75 a 10,36 % de N, es decir, un valor inferior al de las proteínas comunes. Dos determinaciones de la relación  $N \text{ total}/N \text{ amínico}$  dieron los valores siguientes: 18,2 y 12,1.- El fósforo orgánico oscila alrededor de 0,0204 mg para 3000 U.F. y en proporciones aproximadamente constantes.-
- 50.- Al cabo de 9 días de estacionamiento a temperatura de 34° los preparados mantenidos a pH entre 8,19 y 6,05 mantienen su actividad. Fuera de estos límites la actividad disminuye rápidamente.- La constante de disociación de la fosfatasa en los preparados purificados da un valor de  $K = 1,87 \cdot 10$  y  $pK = 8,72$ .- Las constantes de Michaelis - Haldane se han encontrado en  $0,0045 = K$  y  $0,017 = K$  para el beta-glicero-fosfato sódico y  $K = 0,0083$  y  $K = 0,015$  para el fenilfosfato disódico.-
- 60.- La actividad del preparado purificado es poco afectado por las soluciones de pancreatina activa. La solución de sulfato de amonio a 1/2 saturación no precipita la fosfatasa; precipita parcialmente a 2/3 de saturación en dicha sal y está totalmente precipitada, aunque muy destruída a saturación completa.-

7o.-El preparado purificado tiene un espectro de absorción ultravioleta con una banda de absorción limita entre 295 m y 280 m similar a la de las proteínas con rico contenido en amino-ácidos cíclicos.-

8o.- Las sales de magnesio activan la fosfatasa mamaria. Los preparados más purificados son porcentualmente más activados que los preparados impuros.- Las sales de manganeso tambien activan la fosfatasa mamaria. La activación conjunta con los dos cationes revela que es posible lograr el máximo de activación con uno solo de ellos.-

9o.- La diálisis inactiva los preparados purificados de fosfatasa. Una fracción termo-estable obtenida de los extractos mamarios reactiva las soluciones dializadas. La fracción termo-estable es independiente del magnesio, del manganeso y de toda otra sal inorgánica que con ella pueda adicionarse. El efecto no parece deberse a una simple acción estabilizadora sobre la fracción no dializable.-

10.- La fosfatasa mamaria no es inhibida por los fluoruros pero si por los oxalatos y los cianuros. El formaldehído inhibe esta fosfatasa; el proceso de esta última inactivación sigue el curso de una reacción pseudo-unimolecular y es competitiva con respecto al glicerofosfato sódico.-

11.- En cobayas normales y mamectomizadas se han determinado los valores normales a distintas edades, no encontrándose diferencias entre ambos grupos, ni en la sero-fosfatasa ni en los fosfatos inorgánicos.-

En la cobaya preñada los valores de sero-fosfatasa aumentan paulatinamente desde los comienzos de la preñez hasta la decena comprendida entre los 30 y 20 dias anteriores al parto; posteriormente los valores descienden para ser en los últimos dias de la preñez inferiores a los animales normales de su mismo peso. La ausencia de glándula mamaria no modifica esta evolución de la sero-fosfatasa durante la preñez.-

En el período de post-parto la sero fosfatasa recupera rapidamente los valores normales; en este período se ha encontrado valores ligeramente más elevados en los animales mamectomizados

## B I B L I O G R A F I A

- ALBERS D.- Die vollständige Trennung der alkalischen Nierenphosphatase in Protein und prosthetische Gruppe und ihre Reaktivierung. Z. für Phys. Chem. 261, 269, 1939.-
- " Die Darstellung und Reinigung der Alkalischen Phosphatase auf Pferdennieren.- Z. für Phys. Chem. 265, 129, 1940
- " Über sogenannten Aktivatoren der alkalischen Phosphatase.- Z. für Phys. Chem. 266, 1, 1940.-
- " Effect of ultraviolet light and Röntgen rays on phosphatase of varying degree of purity ( a study of the protein nature of the enzyme).- Bioch. Zeits. 306, 143, 1940 (En Chem. Abs. 35, 762, 1941)
- ALBERS H. y E.- Über die Nierenphosphatase.- Z. für Phys. Chem. 232, 165, 1935
- " Über eine einfache Methode zur Darstellung hochaktiver phosphatasepräparate aus tierische Material.- Z. für Phys. Chem. 232, 189, 1935.-
- AKAMATSU S.- Über lecithinspaltung durch "Takadiastase".- Bioch. Zeits. 142 186, 1923.-
- ALLCROFT W.M. y FOLLEY S.J.-Observations on the serum phosphatase of cattle and sheep.- Bioch. J. 35, 254, 1941.-
- ARMSTRONG A.R.- Purification of the active phosphatase found in dog faeces.- Bioch. J. 24, 2020, 1935.-
- AUHAGEN E. y GRZYCKI S.- Der Einfluss von Fluorid auf die Phosphatasewirkung. Bioch. Zeits. 265, 217, 1933.-
- AUCHINACHIE D. y EMSLIE W.-The significance of phosphatase estimation in the adult fowl.- Bioch. J. 28, 1993, 1934.-
- BAMANN E. y SALZER W.-Über die aktivierende Wirkung einer Reihe ähnlich konstituierter Verbindungen auf Taka-Phosphoesterase.- 2 Abhandlung zur Kenntnis pflanzlicher Phosphatasen.- Bioch. Zeits. 288, 299, 1936.-
- " Die "Phosphatase" aus *Aspergillus orizae*, ein Gemisch isodynamer Phosphoesterasen. 1 Abhandlung zur Kenntnis der pflanzlichen phosphatasen.- Bioch. Zeits. 287, 380, 1936.-
- BECK L. V.- Action of Phloridzin on acid phosphatase activity and on glucose phosphorylation of kidney cortex extracts.- Proc. of the Soc. for Exp. Biol. and Med. 49, 435, 1942.-
- BELFANTI S. CONTARDI A. y ERCOLI A.- Studies on the phosphatase.-I. The influence of some electrolytes on the phosphatasen of animal tissues. Phosphatasen of the liver, kidney, serum and bones of the rabbit.- Bioch J. 29, 517, 1935.-
- " Studies on the phosphatasen. II.-Inactivation and reactivation of the phosphatasen of animal tissues. Bioch J. 29, 842, 1935.-

- BELFANTI S., CONTARDI A. y ERCOLI A..- Studies on the phosphatases. III. On the mechanism of the inactivating action of sodium oxalate and of phosphate on the "alcaline" phosphatases of animal tissues.- Bioch. J. 29, 1491, 1935.-
- BEREMBLUM I. y CHAIN I..- Studies on the colorimetric determination of phosphate.- Bioch. J. 32, 286, 1938.-
- BINET L. y PAUTRAT J..- La phosphatase plasmatique au cours du diabetes pancreatique experimental.- C.R. Soc. Biol. 116, 709, 1934.-
- BISCHOFF F..- The reaction of human chorionic and equine gonadotropine to nitrous acid.- Endocrinology 30, 525, 1942.-
- BODANSKY A..-Phosphatase studies. I.- Determination of inorganic phosphate. Beer's law and interfering substances in the Kuttner - Lichstenstein method.- J. of Biol. Chem. 99, 197, 1932.-
- " Phosphatase studies. II.- Determination of serum phosphatase. Factors influencing the accuracy of the determination.- J. of Biol. Chem. 101, 99, 1933.-
- " Phosphatase studies. III.- Non osseous origins of serum phosphatase. Its increase after ingestion of carbohydrates.- J. of Biol. Chem. 104, 473, 1934.-
- " Phosphatase studies. IV.- Inorganic phosphorus and phosphatase of the serum in new born puppies.- J. of Biol. Chem. 104, 717, 1934.-
- " Note on the determination of serum inorganic phosphate and serum phosphatase activity.- J. of Biol. Chem. 120, 167, 1937.-
- BODANSKY O.- The effect of  $\alpha$ -amino acids and magnesium on the activity of kidney and intestinal phosphatases. J. of Biol. Chem. 115, 101, 1936.-
- " Are the phosphatases of bone, kidney, intestine and serum identical? The use of bile acids in their differentiation. J. of Biol. Chem. 118 341, 1937.-
- " The energy of activation of the hydrolysis of sodium  $\beta$ -glycerophosphates by bone phosphatases at optimal pH.- J. of Biol. Chem. 129, 197, 1939.
- BODNAR J. y TANKO B..- Phosphorylierung, Milchsäurebildung und Phosphatasewirkung in Muskelbrei und Muskelpulver.- Bioch. Zeits. 230, 228, 1931.-
- BODNAR J. y KARRELL E..- Phosphorylierung und Phosphatasewirkung bei B-Avitaminose.- Bioch. Zeits. 230, 233, 1931.-
- BOIVIN A. y MESROBEANU L..- Contribution a l'étude de la composition chimique des bacteries. Les substances phosphorées au cours de l'autolyse bacterienne. C.R. Soc. Biol. 112, 611, 1933.-
- BOWERS R.V., OUTHOUSE E.L. y FORBES J.C..- Phosphatase studies. The hydrolysis of amino-ethylphosphate and  $\beta$ -glycerophosphate by fecal and kidney phosphatase.- J. of Biol. Chem. 132, 1940.-
- BOYLAND E. y BOYLAND M.E.- Studies in tissue metabolism. The action of tumour extracts on hexosediphosphate.- Bioch. J. 29, 1910, 1935.-

- CAPUTTO R y MARSAL A..-Concentración y purificación de la fosfatasa de la glándula mamaria.- Rev.Soc.Arg. de Biol. 17, 139, 1941.-
- CATTANEO C..- Phosphatase and esterase activity of protein fraction of blood serum. *Enzymologia* 2, 356, 1938. (En Chem. Abs. 33, 6366, 1939).-
- CAYLA J..- Determination de l'activité phosphatasique du sang total, du plasma ou du serum.- Bull.Soc.Chim.Biol. 17, 1706, 1935.-
- CAYLA J. y FABRE F..- La phosphatase du serum humaine pendant la grossesse.- C.R.Soc.Biol. 120, 748, 1935.-
- CEDRANGOLO F..- Nature of the alkaline phosphatase.- *Enzymologia* 6, 72, 1939. (En Chem. Abs. 33, 6366, 1939)
- CLOETTENS R..-Aktivierung und Hemmung der alkalischen Phosphatase.- Naturwissenschaften 27, 806, 1939.-
- " Preparation and properties of alkaline phosphatase.- *Enzymologia* 7, 157, 1939. (En Chem. Abs. 34, 1340, 1940)
- COHEN S.S. y STANLEY W.U..- The action of intestinal nucleophosphatase on tobacco mosaic virus.- *J. of Biol. Chem.* 142, 863, 1942.-
- CONTARDI A. y ERCOLI A..- Über die enzymatische Spaltung der Lecithin und Isolecithin.- *Bioch. Zeits.* 261, 275, 1933.-
- CORI C.F., COLOWICK S.P. y CORI G.T..- The isolation and synthesis of glucose -1- phosphoric acid.- *J. of Biol. Chem.* 121, 465, 1937.-
- COURTOIS J. - Hydrolyse comparée des acides alfa y beta glycerophosphoriques par divers phosphatases végétales. II. Etude de la taka-diaastase.- *Bull.Soc.Chim.Biol.* 17, 1318, 1935.-
- " Le pouvoir fixateur de la taka-diaastase vis-a-vis des glycerophosphates. *Bull.Soc.Chim.Biol.* 17, 1340, 1935.-
- CRIMM P.D. y STRAYER J.W..- Phosphatase content of blood serum and tissues in the rat following administration of vitamins D and A.- *J. of Biol. Chem.* 112, 511, 1935 - 36.-
- CHENG J.P., FREEMAN S. y IVY A,C.,- The preparation of a concentrated fecal phosphatase and its effect on dogs and rats.- *J. of Biol. Chem.* 132, 445, 1940.-
- DARBY H.H..- Ultraviolet absorption spectrum of papain.- *J. of Biol. Chem.* 139, 721, 1941.-
- DAVIES D.R..- The phosphatase activity of spleen extracts.- *Bioch.J.* 28, 528, 1934.-
- DEMUTH F..- Über Phosphatstoffwechsel.- Über Hexosephosphatasen in menschlichen Organen und Körperflüssigkeiten.- *Bioch. Zeits.* 159, 415, 1925.-
- DUCKWORTH J. y GODDEN W.J..- The influence of dietary fibre on the secretory activities of the alimentary tract.- *Bioch. J.* 35, 16, 1941.-

- EULER H.V..- Chemie der Enzyme. Munich, 1932. Bergmann Ed.
- EULER H.V., ALBERS H. y SCHLENK F..- Chemische Untersuchungen auf hochgereinigter Co - Zymase.- Z. fur Phys. Chem. 140, 113, 1936.-
- EULER H.V. y SCHLENK F..- Co - Zymase. Z. fur Phys. Chem. 146, 64, 1937.-
- FISKE C.H. y SUBBAROW Y..- The colorimetric determination of phosphorus.- J. of Biol. Chem. 66, 375, 1925.-
- " The "inorganic phosphate" of muscle.- J. of Biol. Chem. 74, 22, 1927.-
- " Phosphocreatine.- J. of Biol. Chem. 81, 629, 1929.-
- FOLLEY S.J..- The effect of oestrogenic hormones on lactation and on the phosphatase content of the blood and milk of the lactating cow.- Bioch. J. 33, 192, 1940.-
- FOLLEY S.J. y KAY H.D..- The alkaline phosphomonoesterase of the mammary gland.- Bioch. J. 29, 1837, 1935.-
- " The phosphatases.- Ergebnisse der Enzymforschung 5, 159, 1936.-
- FOLLEY S.J. y YOUNG F.G..- The effect of continued treatment with anterior pituitary extracts on milk volume and milk-fat production in the lactating cow.- Bioch. J. 33, 192, 1940.-
- FORRAI E..- Menslicher Phosphatase differenzierung.- Bioch. Zeits. 145, 54, 1934.-
- FREEMAN S. y Ivy A.C..- The influence of the pancreas on the serum phosphatase of dogs.- Am. J. of Physiol. 118, 541, 1937.-
- FRUTON J.S. y LAVIN G.I..- Ultraviolet absorption spectrum of papain.- J. of Biol. Chem. 130, 375, 1935.-
- GIRI K.V..- Uber Frauenmilch Phosphatase.- Z. fur Phys. Chem. 243, 57, 1936.-
- " Uber Speichel Phosphatase.- Bioch. Zeits.. 285, 306, 1936.-
- " Die Aktivierung von Gewebephosphatasen durch Magnesium.- Z. fur Phys. Chem. 254, 117, 1938.-
- " Uber Pflanzenphosphatasen.- Beziehungen zwischen Vitamin C und Pflanzenphosphatasen.- Z. fur Phys. Chem. 254, 126, 1938.-
- " Interaction of vitamin C and tissue phosphatases.- Bioch. J. 33, 309, 1939.-
- GIRI K. V. y DATTA N. CH..- Brain Phosphatase.- Bioch.J. 30, 1809, 1936.-
- GREENBERG D.M..- En C.L.A.Schmidt : The chemistry of amino-acids and protein. pag. 552.- C.C.Thomas, Springfield, Illinois.-
- GOMORI G..- Microtechnical demonstration of Phosphatase in tissue sections.- Proc. of the Soc. Exp. Biol. and Med. 42, 23, 1939.-

- GOMORI G.- A modification of the colorimetric P determination for the use with photoelectric colorimeter.- J. Lab. and Clin. Med. 27, 955, 1942.-
- GOMORI G.- Distribution of phosphatase in normal organs and tissues.- J. Cell. and Comp. Physiol. 17, 171, 1941.-
- " Hexosediphosphatase.- J. of Biol. Chem. 148, 139, 1943.-
- GULLAND J.M. y JACKSON E. M.- Phosphoesterases of bone and snake venoms.- Bioch. J. 32, 590, 1938.-
- GUTMAN E.B. y GUTMAN A.B.- Estimation of "acid" phosphatase activity of blood serum.- J. of Biol. Chem. 136, 201, 1940.-
- " Erythrocyte phosphatase activity in hemolysed sera, and estimation of serum acid phosphatase.- Proc. of the Soc. Exp. Biol. and Medi. 47, 513, 1941.-
- HAAS E.- Isolierung eines neuen gelben Ferments.- Bioch. Zeits. 298, 378, 1938.-
- HAASE A.- Über die Spezifität der Adenylpirophosphatase des Leberextraktes.- Z. für Phys. Chem. 239, 1, 1936.-
- HALDANE J.B.S. y STERN K.G.- Allgemeine Chemie der Enzyme.- T. Steinkoff, ed. Dresden und Leipzig, 1932.-
- HEARD H. y WYNNE A.M.- The decomposition of phosphoric acid esters by "Clostridium acetobutylicum weizmann".- Bioch. J. 27, 1655, 1933.-
- HOLMBERG C.G.- Über den Mechanismus bei der Mg Aktivierung der Darmphosphatase.- Bioch. Zeits. 279, 145, 1935.-
- IGNATIEFF V.- Distribution of P and phosphatase in the floral parts of Nicotiana Affinis, Petunia, salpinglossis and gladiolus.- Bioch. J. 30, 1815, 1936.-
- IGNATIEFF V. y WASTINEGS H.- Phosphatase distribution in some higher plants. Bioch. J. 30, 1171, 1936.-
- IWATSURU R. y NANJO K.- Studien über Phosphatase.- Über den Einfluss verschiedener organischer Farbstoffe auf die Phosphatase.- Bioch. Zeits. 301, 15, 1936.-
- JACOBSON K.P. y TAPADINHAS J.- Zur Spezifität der Phosphatase.- Bioch. Zeits. 230, 304, 1931.-
- JONES L.M. y SHINOWARA Y.- Serum inorganic phosphate and "alkaline" phosphatase activity in hypophysectomized rats.- J. of Biol. Chem. 142 935, 1942.-
- KABAT E.A.- Association of phosphatase with a material in kidney sedimentable at high speed and its liberation by autolysis.- Science 23, 43, 1941.-
- KABAT E.A. y FURTH J.- Histochemistry studies of the alkaline phosphatase in normal and neoplastic tissues.- The Amer. J. of Pathology. 17, 303, 1941.-

- KAY H.D..- Kidney phosphatase.- Bioch. J. 20, 791, 1926.-
- " The phosphatases of mammalian tissues.- Bioch. J. 22, 855, 1928.-
- " The phosphatases of mammalian tissues. II. Pyrophosphatase.- Bioch. J. 122, 1446, 1928.-
- " Plasma phosphatase. I Method of determination. Some properties of the enzyme.- J. of Biol. Chem. 89, 249, 1930.-
- "
- " Phosphatase in normal and pathological conditions.- Phys. Rev. 12, 384, 1932.-
- KAY H.D. y LEE E.R..- The rate of hydrolysis of a- and b-glycerophosphates by enzymes.- J. of Biol. Chem. 91, 135, 1931.-
- KEYS A..- A rapid micro-Kjeldahl method. J. of Biol. Chem. 132, 181, 1940.-
- KINARD F.W. y CHANUTIN A..- Studies on the phosphatase content of the whole rat and of the vasoligated kidney.- J. of Biol. Chem. 103, 461, 1933.-
- KING E.J..- The enzymic hydrolysis of lecithin.- Bioch. J. 25, 799, 1931.-
- " The colorimetric determination of phosphorus.- Bioch. J. 26, 292, 1932.-
- " The enzymic hydrolysis of phosphatides.- The hydrolysis of natural and synthetic phosphatides.- Bioch. J. 28, 476, 1934.-
- KING E.J. y DELORY G.E..- A method for the determination of small amounts of phosphate by the use of 8-hydroxiquinoline.- Bioch. J. 31, 2046, 1937.-
- " Ascorbic acid and phosphatase activity.- Bioch. J. 32, 1157, 1938.-
- KING E.J. y ARMSTRONG A.R..- A convenient method for determining serum and bile phosphatase.- Canad. Med.Ass.J. 31, 376, 1934.-
- KING E.J. y DOLAN M..- The enzymic hydrolysis of phosphatides. Lysolecithin. Bioch. J..-27, 403, 1933.-
- KUMAI S..- Uber die Phosphomonoesterase. The Journal of Biochemistry (Japan) 33, 277, 1941.-
- KUTSCHER W. y WORNER A..- Prostataphosphatase.- Z. fur Phys. Chem. 239, 109, 1936.-
- KUTSCHER W. y PANY J..- Prostataphosphatase.- Z. fur Phys. Chem. 255, 169, 1938.-
- LAVIN G.I. y NORTHROP J.H..- The ultraviolet absorption spectrum of pepsin.- J. of Am. Chem. Soc. 57, 874, 1935.-
- KUTTNER T. y COHEN H R..A molybdic acid, stannous chloride reagents. The microestimation of P and Ca in pus, plasma and spinal fluid. J.of Biol. Chem. 75, 517, 1927.-
- KUTTNER T. y LICHTENSTEIN L..- Estimation of phosphorus; molybdic acid-stannous chloride reagent.- J. of Biol. Chem. 86, 671, 1930.-

- KUTTNER T. y LICHTENSTEIN L..- Stimation of organically bound phosphorus. A system of analysis of phosphorus compound in blood.- J. of Biol. Chem. 95, 661, 1932.-
- LAVIN G.I. y NORTHROP J.H..- The ultraviolet absorption spectrum of pepsin.- J. of Am. Chem. Soc. 57, 874, 1935.-
- LEVENE P. A. y DILLON R.T..- Intestinal nucleotidase.- J. of Biol. Chem. 88, 752, 1930.-
- LIPMANN F..- Versuche zum Mechanismus der Fluoridwirkung.- Bioch. Zeits. 196, 3, 1928.-
- LOHMANN K..- Notiz über das Verhalten der Phosphatase in Gegenwart von Glutation und Monojodessigsäure.- Bioch. Zeits. 262, 157, 1933.-
- LOHMANN K. y MEYERHOFF O..- Über die enzymatische Umwandlung von Phosphoglycerinsäure in Brenztraubensäure und Phosphorsäure.- Bioch. Zeits. 273, 60, 1934.-
- LOYARTE R.G., CARRATALA R. y VUCETICH D..- Como absorbe la luz la sangre normal y la sangre oxi-carbonada.- Publ. de la Facul. de Ciencias Fisico-matemát. de La Plata. 143, 24, 1941.-
- LUNDSTEEN E. y VERMEHEREN E..- Micro-methods for the estimation of phosphatase in blood plasma and inorganic phosphorus in blood.- C.R. Lab. Carlsberg. 21, 147, 1935 - 38.-
- LYUBIMOVA M.N. y ENGELHARDT V.A..- Biochemia 4, 716, 1939. (Citado por Needham D.M. "Myosin and adenosintriphosphatase". Bioch. J. 36, 113, 1942)
- MACFARLANE M.G., BROWN PATTERSON L.M. y ROBISON R..- The phosphatase activity of animal tissues.- Bioch. J. 28, 720, 1934.-
- MACFARLANE M.G. y SALOMON M.H..- Phosphatase in virus.- British J. of Exp. Path. 19, 184, 1938.-
- MACLEOD M. y ROBISON R..- The hydrolysis of hexosediphosphoric esters by bone phosphatase.- Bioch. J. 27, 286, 1933.-
- MACOLA B.A. y FAZIO C..- Modificaciones a la técnica para determinar el valor fosfatásico del suero.- Rev. Soc. Arg. Biol. 16, 737, 1940.-
- MARSAL A..- Estudio sobre la fosfatasa renal. I. Extracción y purificación Rev. Soc. Arg. de Biol. 15, 215, 1940.-
- MARTINEZ C.O..- La fosfatasa de la sangre y sus relaciones con las glándulas endocrinas.- Tesis, 1936. Buenos Aires.-
- MASSART L. y DUFFAIT R..- Fluoridhemmung und Metallaktivierung der Hefephosphatase.- Naturwissenschaften 27, 806, 1939.-
- M.W.T.J..- Robert Robison (Obituary Notice).- Bioch. J. 35, 1081, 1941.-
- MERANZE T., MERANZE D.R. y ROTHMANN M.M..- Blood phosphatase in pregnancy Am. J. Obst. Gynecol. 33, 444, 1937.-
- MEYERHOFF O. y LOHMANN K..- Über die natürlichen Guanidino phosphorsäure (Phosphogene) in der quergestreifen Muskulatur. Bioch. Zeits. 196, 22, 1928.-

- MEYERHOF O. y LOHMANN K.- Uber die enzymatische Gleichgewichtsreaktion zwischen Hexosedisphosphorsäure und Dioxyacetonphosphorsäure.- Bioch. Zeits. 271, 89, 1934.-
- MICHAELIS L.- Der Acetat-Veronal-Puffer.- Bioch. Zeits. 234, 139, 1931.-
- MYRBACK K. y ORTENBLAD B.-Zur kennitz der Co-Zymase. Phosphatase und Co-Zymase.- Z. fur Phys. Chem. 241, 148, 1936.-
- NEUBERG C. y WAGNER J.- Zur Kenntnis der Phosphatase und über die Darstellung von Sauren Ester der Pyrophosphorsäuren.- Bioch. Zeits. 171, 485, 1926.
- NEUBERG C. y KOBEL M.-Uber das verhalten der Glycerinsäure-mono-phosphorsäure gegen Hefe.- Bioch. Zeits. 263, 219, 1933.-
- PERLMANN G. E. y FERRY R.M.- A note on the separation of kidney phosphatases.- J. of Biol. Chem. 142, 513, 1942.-
- PETT L.B. y WYNNE A.M.- Studies on bacterial phosphatases. II The phosphatases of clostridium aceto-butylicum weizmann and propionibacterium jensenii Van Niel.- Bioch. J. 27, 1660, 1933.-
- " " The influence of arsenate and arsenite on the enzymic breakdown of phosphoric acid esters.- Bioch. J. 28, 365, 1934.-
- " " Studies on bacterial phosphatases. III. Phosphatases of aerobacter aerogenes, alcaligenes faecalis and bacillus subtilis.- Bioch. J. 32, 563, 1938.-
- PFANKUCH E. Uber die Phosphatase der Kartoffel und der Zuckerrube...- Z. fur Phys. Chem. 141, 34, 1936.-
- PFANKUCH E. y KAUSCHE G.A.- Phosphatatische Inaktivierung von pflanzlichen Viren.- Bioch. Zeits. 301; 223, 1939.-
- PILLAI R.K.- Dephosphorylation in muscle extracts.- Bioch. J. 32, 1087, 1938.-
- PRINGSHEIM H. y GINSBURG S.- L'amylolyse et l'ester phosphorique de l'amidon et du glycogène.- Bull. Soc. Biol. 17, 1599, 1935.-
- PRINGSHEIM H. y LOEW F. Sur la déphosphorylation de l'amidon par la phosphatase.- Bull. Soc. Biol. 17, 1607, 1935.-
- PYLE J.J., FISHER J.H. y CLARK R.H.- The effect of certain physiological important materials upon kidney phosphatase.- J. of Biol. Chem. 119, 283, 1937.-
- ROBISON R. y KING E.J.-Hexosemonophosphoric esters.- Bioch. J. 25, 323, 1931.-
- ROCHE J.- Blood phosphatases.- Bioch. J. 25, 1724, 1931.-
- ROSS W.F.- The spectroscopic identification of phenyl alanine in protein material.- J. of Biol. Chem. 104, 531, 1934.-
- ROTINI O.T. y NEUBERG C.- Zur Frage nach der Spezifität der Phosphatase. Die Phosphatatische Spaltung der Phospho-1-(+)-milchsäure.- Bioch. Zeits. 279, 453, 1935.-

- SCOTT W.W. y HUGGINS CH. The acid phosphatase activity of human urine, an index of prostatic secretion.- *Endocrinology* 30, 107, 1942.-
- SCHAFFNER A. y BAUER E..-Uber die Phosphatase der Hefe.- *Z. fur Phys. Chem.* 232, 66, 1935.-
- SCHAFFNER A. y KRUMEY F..- Uber die Phosphatase der Hefe.- *Z. fur Phys. Chem.* 243, 149, 1934.-
- SCHAFFNER y KRUMEY F..- Uber die Phosphatase der Hefe.- *Z. fur. Phys. Chem.* 255, 145, 1938
- SCHUCHARDT W..- Uber die Phosphatasen von Hefe.- *Bioch. Zeits.* 285, 448, 1936.
- SCHOONOVER J.W. y ELY J.O..- Enzymes in cancer. The beta-Glycerophosphatase of the erythrocytes.- *Bioch. J.* 29, 1809, 1935.-
- SCHOONOVER J.W..- Enzymes in cancer.- II. The glycerophosphatases of human erythrocytes.- *Bioch. J.* 30, 1097, 1936.-
- SHINOWARA G.Y., JONES L.M. y REINHART H.L..- The estimation of serum inorganic phosphatase and "acid" and "alkaline" phosphatase activity.- *J. of Biol. Chem.* 142, 921, 1942.-
- SIZEI H.W..- Ultraviolet absorption spectrum of bovine phosphatase in presence and absence of added substrate.- *Proc. of the Soc. for Exp. Biol. and Med.* 49, 700, 1942.-
- SKILL D.I. y KAY H.D..- Note on the phosphoric ester content of the red cells and liver, and the phosphatase of the kidney in experimental osteoporosis in young rats.- *Bioch. J.* 28, 1228, 1934.-
- SMITH M.C. y LANTZ E.M..- The effect of fluorine upon the phosphatase content of plasma, bones, and teeth of albino rats.- *J. Biol. Chem.* 112, 303, 1935/36.-
- STENSTROM W. y REINHARD M.- Ultraviolet absorption spectrum of blood serum and certain amino-acids. *J. of Biol. Chem.* 104, 531, 1934.-
- THANNHAUSER S.J., REICHEL M. y GRATAN J.F..- The effect of ascorbic acid on beta-Glycerophosphate.- *Bioch. J.* 32, 1163, 1938.-
- TANKO B. y ROBISON R..- The hydrolysis of hexosediphosphatic esters by bone phosphatase. a) The participation of hexokinase. b) the isolation of pure fructose 1 phosphate. *Bioch. J.* 29, 961, 1935.-
- TOMITA M. Zur Kenntnis der Phosphatasen. I. Mitteilung. Saccharo-phosphatase. *Bioch. Zeits.* 131, 161, 1922.-
- TANKO B. y ROBISON R..- The hydrolysis of hexosediphosphoric esters by bone phosphatase. II. a) The participation of phosphohexokinase. b) The isolation of pure fructose I-phosphate.- *Bioch. J.* 29, 961, 1935.-
- WALDSCHMIDT-LEITZ E. y KOHLER F..- Zur Spezifität der Nierenphosphatase. *Bioch. Zeits.* 258, 360, 1933.-

WARBURG O. y CHRISTIAN C W..- Co - Fermentproblem.- Bioch.Zeits. 274, 112, 1934.-

" Co - Fermentproblem.- Bioch. Zeits. 275, 464, 1935.-

WARD S.M., HOAGLAND CH. L., SMADEL J.E. y RIVERS T.M..- Constituents of elementary bodies of vaccinia.- Studies of the enzymes associated with the purified virus.- J. of Exp. Med. 76, 163, 1942.-

WEIL L. y RUSSEL M..- Studies on plasma phosphatase activity in relation to fat metabolism in rats. J. of Biol. Chem. 136, 9, 1940.-

WEIL L. Studies on plasma phosphatase activity durin embrionic and tumor growth. J. of Biol. Chem. 138, 375, 1941.-

YOUNGBORG G.E..- Concentration by dialysis of enzymes.- Science, 94, 498, 1940.-

I N D I C E

PROLOGO . . . . . 1

-----

INTRODUCCION . . . . . 3  
Los substratos fisiológicos de las fosfatasas . . . . . 3  
Evolución de los conocimientos sobre fosfatasas . . . . . 6

-----

Capítulo I

CLASIFICACION DE LAS FOSFATASAS . . . . . 9  
La clasificación general de Folley y Kay . . . . . 9  
    Fosfomonoesterasas . . . . . 10  
    Fosfodiesterasas . . . . . 11  
    Pirofosfatasas . . . . . 12  
    Metafosfatasas . . . . . 12  
    Fosfoamidasas . . . . . 12  
El problema de la unidad o pluralidad de la fosfomonoesterasa alcalina . . . . . 12  
INVESTIGACION DE LAS FOSFOMONOESTERASAS DE LA GLANDULA MAMARIA 14  
Estudio de las curvas de pH óptimo . . . . . 14  
Estudio histoquímico . . . . . 18

-----

Capítulo II

EXTRACCION Y PURIFICACION DE LA FOSFOMONOESTERASA ALCALINA . . . . 20  
El procedimiento de extracción de H. y E. Albers . . . . . 21  
Purificación de los extractos renales (Marsal, 1940) . . . . . 23  
EXTRACCION Y PURIFICACION DE LA FOSFATASA DE LA GLANDULA MAMARIA . . . . . 23  
    Elección del material de partida . . . . . 23  
    Extracción de la fosfatasa mamaria . . . . . 25  
    Concentración de las preparaciones . . . . . 27  
    Purificación de las preparaciones . . . . . 29  
La eficacia del método de purificación propuesto . . . . . 31

-----

### Capítulo III

|   |    |
|---|----|
| PROPIEDADES Y NATURALEZA QUIMICA DE LA FOSFOMONOESTERASA ALCALINA . . .         | 33 |
| Algunas relaciones elementales del preparado mamario purificado . . .           | 33 |
| N total . . . . .   | 33 |
| N amínico libre . . . . .   | 34 |
| Fosfatos y P orgánico . . . . .   | 35 |
| Presencia del azufre . . . . .  | 36 |
| Estabilidad del preparado de fosfatasa mamaria . . . . .                        | 36 |
| La acción de las modificaciones del pH sobre la fosfatasa mamaria . . . . .     | 37 |
| Interpretación de los fenómenos de inactivación . . . . .                       | 39 |
| La constante de disociación de la fosfatasa . . . . .                           | 41 |
| Aplicación a la fosfomonoesterasa alcalina . . . . .                            | 42 |
| La unión Enzima-Substrato (Constante de Michaelis) . . . . .                    | 43 |
| La constante de Michaelis en la fosfatasa alcalina . . . . .                    | 46 |
| Acción de la pancreatina sobre la fosfatasa mamaria . . . . .                   | 47 |
| Precipitación de la fosfatasa por las soluciones de sulfato de amonio . . . . . | 49 |
| Acción sobre el preparado purificado de fosfatasa mamaria . . . . .             | 51 |
| El espectro de absorción ultravioleta de la fosfatasa mamaria . . . . .         | 53 |
| Métodos espectroscópicos . . . . .  | 54 |
| Materiales . . . . .  | 56 |
| Resultados y discusión . . . . .  | 56 |

### Capítulo IV

|  |    |
|--|----|
| ACTIVADORES DE LA FOSFOMONOESTERASA ALCALINA . . . . .   | 59 |
| Activación por las sales de magnesio . . . . .   | 59 |
| La activación por el magnesio de preparados mamaros en distintos grados de pureza . . . . .    | 60 |
| Conclusiones del estudio . . . . .   | 61 |
| Activación por las sales de manganeso . . . . .  | 63 |
| Activación de la fosfatasa mamaria . . . . .   | 63 |
| La activación conjunta por los iones de magnesio y manganeso . . . . .                         | 65 |
| Otros activadores . . . . .  | 67 |
| LA INACTIVACION POR DIALISIS DE LA FOSFATASA MAMARIA Y SU REACTIVACION . . . . .               | 68 |
| Diálisis de los preparados purificados de la glándula mamaria . . . . .                        | 69 |
| Elección de la membrana dializadora . . . . .  | 69 |
| Técnica para obtener la fracción no dializable . . . . .                                       | 70 |
| Técnica para obtener la fracción termo-estable . . . . .                                       | 71 |
| El mecanismo de la reactivación de los preparados dializados . . . . .                         | 75 |
| ¿Son las sales de magnesio las que activan los preparados dializados? . . . . .                | 75 |
| ¿Son las sales de manganeso las que activan los preparados dializados? . . . . .               | 76 |
| Destrucción de la fracción termo-estable por mineralización . . . . .                          | 77 |
| La acción de la fracción termo-estable sobre la estabilidad de la solución dializada . . . . . | 77 |

Capítulo V

|   |    |
|---|----|
| INHIBIDORES DE LA FOSFOMONOESTERASA ALCALINA . . . . .  | 79 |
| Inhibiciones que aportan datos de interés para el estudio de las funciones de las fosfatasa . . . . .                       | 80 |
| La acción de los fluoruros sobre la fosfatasa mamaria . . . . .   | 82 |
| Inhibiciones que aportan datos de interés para diferenciar las fosfatasa alcalinas entre sí . . . . .                       | 84 |
| Acción de los oxalatos sobre la fosfatasa mamaria . . . . .   | 84 |
| Acción de los cianuros sobre la fosfatasa mamaria . . . . .   | 86 |
| Clasificación de la fosfomonoesterasa alcalina de la glándula mamaria, según las acciones inhibitorias estudiadas . . . . . | 87 |
| La inhibición de la fosfatasa mamaria por el formaldehído . . . . .   | 89 |
| Desarrollo de la reacción entre el formaldehído y la fosfatasa . . . . .  | 91 |
| La inhibición por el formaldehído es competitiva . . . . .  | 93 |

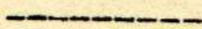
Capítulo VI

|   |     |
|---|-----|
| RELACIONES DE LA GLANDULA MAMARIA CON LA FOSFATASA SANGUINEA EN CONDICIONES FISIOLÓGICAS HABITUALES, DURANTE LA PREÑEZ Y LA LACTANCIA . . . . . | 96  |
| Origen de la fosfatasa sanguínea . . . . .  | 96  |
| Factores que modifican el valor de la fosfatasa plasmática . . . . .  | 98  |
| La fosfatasa sanguínea durante la preñez y la lactancia . . . . .   | 99  |
| Fosfatos inorgánicos y fosfatasa alcalina en cobayas normales y mamectomizadas durante la preñez y el post-parto . . . . .                      | 100 |
| Extirpación de la glándula mamaria . . . . .  | 102 |
| Grupos 1 y 2: cobayas normales y mamectomizadas en condiciones fisiológicas habituales . . . . .  | 102 |
| Grupos 2 y 3: cobayas normales y mamectomizadas durante la preñez y el período de lactación . . . . .   | 110 |
| Discusión de los resultados . . . . .   | 118 |

APENDICE

|  |     |
|--|-----|
| TECNICAS DE DETERMINACION DE FOSFOMONOESTERASA ALCALINA TISULAR . . . . .            | 120 |
| Principios generales para la determinación de la fosfatasa alcalina . . . . .        | 121 |
| Las condiciones para la acción de la enzima . . . . .                                | 121 |
| Determinación de los fosfatos . . . . .  | 122 |
| Substancias que interfieren en la determinación de los fosfatos . . . . .            | 123 |
| Métodos colorimétricos de aplicación circunstancial . . . . .                        | 124 |
| Métodos de determinación de fosfatasa usados en el presente trabajo . . . . .        | 124 |
| Consideraciones acerca de la precisión en las determinaciones de fosfatasa . . . . . | 127 |
| Unidades usadas para expresar la actividad fosfatásica . . . . .                     | 127 |
| Otros métodos usados en el presente trabajo . . . . .                                | 128 |

RESUMEN Y CONCLUSIONES . . . . . 129



BIBLIOGRAFIA . . . . . 131

