

Instituto de Fisiología  
Facultad de Medicina — Barcelona  
(Prof. J. Jiménez-Vargas)

## **Evolución de algunos procesos fosfatásicos "in vivo", en condiciones de comparabilidad de pH con el de los medios internos biológicos del organismo**

por J. Monche y Magdalena Ferrer Arenillas\*

(Recibido para publicar el 16 de junio de 1952)

Uno de nosotros, en trabajos anteriores (16, 17 y 18), viene prestando atención al comportamiento de algunos substratos cromógenos para fosfatasas, según el pH del medio. Por tal motivo, y dado su interés biológico innegable, hemos continuado desarrollando el tema expuesto, empleando las fosfomonoesterasas I y II y utilizando preferentemente como substrato los ésteres 2,4' — carboxilazobenceno — fosfórico y el 4,4' — amidosulfonilbenceno-azo-fenilfosfórico —, dada la mayor estabilidad de los mismos.

Los trabajos publicados en general sobre fosfatasas y que han servido de base para un mayor conocimiento de las mismas, se han efectuado «in vitro», y además en condiciones operatorias que distan mucho de aquellas en que actúan normalmente estos enzimas en los medios internos biológicos del organismo.

Las fosfomonoesterasas I y II, conocidas, en general, con la denominación de fosfatasas alcalinas y fosfatasas ácidas, respectivamente, son las más difundidas, como es sabido, en los órganos y tejidos animales, y especialmente las primeras. Estas manifiestan su actividad a partir de los pH = 6,5-7,0, hasta el pH = 10,0-11,0; citándose, en general, como óptimo (2) el próximo a

(\*) Este trabajo ha constituido parte de la tesis del Doctorado en Medicina de uno de nosotros (M. F. A.), apadrinada por el profesor Jiménez-Vargas, a quien nos complacemos en expresar nuestra gratitud.

8,0-9,0. Las fosfatasas ácidas, manifiestan su acción desde los pH = 4,0-4,5 a los pH = 6,5-7,0; siendo considerado como óptimo el pH próximo a 5,0-5,6 (Courtois, J.).

Pero los pH que se citan como óptimos en la literatura y publicaciones especiales corresponden, en general, a procesos fosfatásicos efectuados «in vitro», mediante el empleo como substrato de ésteres fosfóricos excesivamente estables, como las sales de los ácidos glicérfosfórico y fenilfosfórico, entre otros, que no permiten un mínimo de comparabilidad, en nuestro concepto, con los substratos de los medios internos biológicos, sujetos a una serie de influencias derivadas de la complejidad de dichos medios, y cuya labilidad ha de ser, además, muy notable para que los procesos, no ya fosfatásicos, sino enzimáticos en general, no sufran retraso alguno, que repercutiría evidentemente en el metabolismo del individuo, con el trastorno o alteración patológica correspondiente.

Por tal motivo hemos empleado como substrato los ésteres fosfóricos azoicos que hemos mencionado al principio, derivados de los colorantes monohidroxi azoicos y cuya labilidad extraordinaria ha sido objeto de estudio por uno de nosotros en trabajos anteriores (17 y 18).

Nos encontramos, por lo tanto, con unos substratos muy lábiles y que se prestan asimismo a la realización de procesos fosfatásicos en condiciones de velocidad hidrolítica muy acentuada, a los pH próximos a los de los medios internos biológicos del organismo, cuyo estudio hemos realizado y se expondrá durante el desarrollo de este trabajo.

Y el hecho de trabajar a pH óptimo próximo a 7 tiene, indudablemente, un interés considerable, puesto que hallándose tan difundidas las fosfomonoesterasas I y II en los diversos órganos y tejidos, es evidente que en los sistemas fosfatásicos correspondientes, ambas han de actuar en general en condiciones de pH muy similares, dada la escasa variación mínima del pH de los medios internos biológicos del organismo, compatible con la vida. Sólo en circunstancias excepcionales y en determinados órganos puede, como es sabido, alcanzar valores bastante dispares el pH del medio de los mismos, si bien se trata, en tales casos, de procesos que ocurren totalmente aislados e independientes del metabolismo del individuo, como, por ejemplo, en ciertos tramos del intestino, en que el pH puede alcanzar valores del orden del 8,5, o en el riñón, en que puede ser próximo a 5.

Hasta hace algunos años, las determinaciones de fosfatasas en líquidos biológicos, órganos y tejidos, se había hecho exclusivamente por

métodos químicos, empleando plasma o suero sanguíneo, y también extractos de órganos o tejidos. Siendo de extraordinario interés la investigación de la fosfatasa en los sitios mismos en que ejerce su acción, de ahí los numerosos trabajos que han aparecido recientemente y que tanto han preocupado a diversos investigadores sobre el hallazgo de fosfatasas en tejidos. Los resultados, en general, han sido contradictorios y poco convincentes.

Ya Robison y colaboradores (19) realizaron, en 1923, la primera demostración histoquímica de fosfatasa alcalina. Sus estudios permitieron ampliar los conocimientos que se tenían de la osteogénesis, pero su método tiene el inconveniente de poder aplicarse solamente al hueso, ya que la larga incubación que requiere (a 37° en un líquido muy alcalino (pH = 9,5) y a una concentración iónica poco fisiológica) produce alteraciones celulares incompatibles con el hallazgo histológico.

La primera técnica histoquímica de aplicación general fué publicada casi simultáneamente por Gomori y Takamatsu (10, 11 y 21), y trabajando independientemente, utilizando como fijador el alcohol y como sustrato el glicerofosfato sódico (pH = 9,4, conteniendo el medio de incubación nitrato cálcico). Bajo la acción de la fosfatasa, el ion fosfórico es liberado y precipita en forma de fosfato cálcico. Esta sal incolora la determinan mediante una serie de reacciones fundadas en la transformación de la misma en fosfato de cobalto y luego en sulfuro de cobalto, de color negro.

Antes de exponer nuestros ensayos citaremos, de una manera esquemática, los inconvenientes que ofrecen los fijadores utilizados actualmente y que representan, a nuestro modo de ver, uno de los principales escollos para la investigación de dichas enzimas.

La mayor parte de fijadores que se utilizan en histopatología descomponen la fosfatasa con gran rapidez.

La fijación con formol está completamente abandonada. Este fijador destruye la actividad enzimática (Gomori) de una manera evidente, como también hemos podido comprobar. Emmel y Smith creen que si el contacto ha sido corto se puede lograr una recuperación a expensas de varios días de incubación.

Emmel y Danielli (7, 3, 4, 5, 6) dicen haber obtenido buenos resultados con el formol salado (formol 10 % + cloruro de sodio al 1 %), durante el tiempo de incubación sólo dos horas.

Capellin (1) preconizó como fijador el cloroformo, ya que, según él, inhibe menos la actividad fosfatásica. Esta técnica se acepta sólo para estudios de localización fosfatásica poco precisos, ya que la fijación con cloroformo es inadmisibile desde el punto de vista histológico.

Danielli recomienda también las mezclas siguientes: Alcohol de 80° + 25 % de piridina; o bien, alcohol de 70 % + 20 % de piridina + formol (disolución comercial al 4 %) 10 %; duración de la fijación, dos horas.

Actualmente se aceptan como fijadores clásicos el alcohol (80-90°) para la investigación de la fosfatasa alcalina y la acetona pura para la ácida\*.

Krugelis (14), Danielli y Emmel (loc. cit.) afirman que dichos fijadores sólo producen una pequeña pérdida de la actividad del enzima si la fijación no pasa de dieciocho a veinticuatro horas. Sin embargo, nosotros hemos comprobado que era necesaria una fijación de cuarenta y ocho ho-

(\*) Nosotros hemos comprobado «in vitro», que la acetona activa la fosfatasa alcalina y que el cloroformo la inhibe, todo lo cual será objeto de atención especial en próximas publicaciones.

ras, ya que los cortes por congelación requieren quizá una fijación más duradera en estos líquidos que, desgraciadamente, dan una consistencia poco favorable para cortar por congelación.

Danielli y Fell han ensayado diversos fijadores en un mismo tejido (riñón) y han observado imágenes idénticas de distribución fosfatásica y que solamente cambiaba la intensidad del color según el fijador utilizado, es decir, según la inactivación producida por éste.

Otro factor importantísimo a tener en cuenta después de la fijación es evitar las excesivas manipulaciones que se utilizan según las técnicas actuales, ya que en el curso de casi todas se va disminuyendo la actividad enzimática, consiguiéndose, al llegar al término de ellas, la disminución casi total de la misma. La inclusión en parafina disminuye grandemente la actividad fosfatásica.

Danielli (loc. cit.) encuentra, después de las manipulaciones de la inclusión en parafina, una pérdida de actividad fosfatásica de un 75 %; por eso aconseja incluir rápidamente y aumentar el tiempo de incubación. Capellin (loc. cit.), completamente aparte, encuentra cifras semejantes, 70 % de pérdida. Resultados muy bajos de ésta dan también Stafford, afirmando que cuando el tejido está preparado para la incubación sólo queda un 5 % del valor original. Gomori, sin ser muy optimista, da cifras más altas.

Por el simple hecho de tener que mantener las piezas a investigar a una temperatura superior a los 50° C. durante varias horas y utilizar líquidos de propiedades disolventes y disgregantes enérgicas, hemos desistido, en la mayoría de nuestros trabajos, de la inclusión en parafina, que sólo hemos realizado a título de ensayo. Las demás las hemos efectuado todas por congelación, previa fijación en alcohol (para la fosfatasa alcalina), ya que, si bien no proporciona, como dijimos anteriormente, una fijación perfecta, es la única posibilidad prácticamente aceptable en esta clase de trabajos dada la extraordinaria sensibilidad de las fosfatasas a la acción de los agentes físicos y químicos enérgicos.

Además de las pérdidas de actividad fosfatásica por la fijación y las manipulaciones subsiguientes, hay que tener en cuenta un tercer factor a considerar: la fosfatasa se presenta, en los seres vivos, bajo dos formas: una, soluble en agua y en mezclas hidroalcohólicas (lioenzimas); la otra es fijada a los componentes insolubles del protoplasma (desmoenzimas). La primera fracción es la más importante, y se supone se pierde casi por completo, ya que si bien el alcohol y acetona precipitan las fosfatasas, el lavado e incubación posterior la redisuelven y hacen desaparecer el lioenzima. En consecuencia, los desmoenzimas son los únicos accesibles a la investigación histoquímica. De ahí la discrepancia existente entre hallazgos histoquímicos y bioquímicos. Así, Kay (12) encuentra en el bazo de conejo una actividad de fosfatasa alcalina igual a la del hueso en crecimiento; en cambio, los hallazgos histoquímicos en el mismo son muy pobres.

## Material y métodos

Se han utilizado ratas blancas adultas, de peso aproximado de 110 a 120 g., sometidas a dieta equilibrada normal.

Se han tenido ratas controles.

Fueron sacrificadas mediante un golpe en la región occipital o por sangría en la yugular.

La fijación de órganos se ha realizado durante cuarenta y ocho horas en alcohol.

Se ha investigado la actividad fosfatásica principalmente por liberación hidrolítica del colorante monohidroxiarzoico correspondiente al éster fosfórico utilizado como sustrato.

Las diversas pruebas realizadas en el curso de este trabajo las resumimos en estos apartados, englobándolas más bien por similitud de sustratos utilizados, ya que el fin primordial que pretendemos es la investigación del comportamiento de los ésteres fosfóricos de colorantes monohidroxiarzoicos «in vivo», tan poco estudiados hasta el presente.

## Resultados

### *Experiencia 1.<sup>a</sup>*

#### INVESTIGACIÓN DE FOSFATASA ALCALINA DE HÍGADO Y RIÑÓN DE RATA CON FENIL-AZO-FENILFOSFATO SÓDICO

Utilizamos un lote de ratas de peso aproximado de 110 g. Después de sacrificadas fueron extirpados sus riñones, hígado y corazón. Estos se cortaron de un espesor no superior a 2 mm. y fueron fijados con alcohol de 90°, según técnica clásica, durante veinticuatro horas. Al intentar cortar con el microtomo de congelación, se vió que esta fijación era insuficiente y se prolongó durante veinticuatro horas más. Para evitar manipulaciones, se cortaron con el microtomo de congelación, de modo no muy fino, diez  $\mu$  aproximadamente. Inmediatamente, dichos cortes fueron introducidos en una disolución recientemente preparada de fenil-azo-fenilfosfato sódico. Se dejaron los mismos en contacto con el fenil-azo-fenilfosfato sódico durante cinco minutos para que la hidrólisis fosfatásica tuviera lugar, siempre a baja temperatura (con la cantidad de hielo necesaria y utilizando dicho sustrato inmediatamente después de preparado, ya que es muy inestable).

Luego se lavaron los cortes varias veces con agua destilada y se montaron en la forma acostumbrada (alcohol, xilol, bálsamo, etc.). Vistos al microscopio dichos cortes, se observó una tonalidad amarilla homogénea, sin las zonas rojo-amarillentas claramente manifiestas que indicarían mayor actividad fosfatásica y que nosotros pretendíamos hallar fundándonos en los resultados obtenidos por Arnold, M. Seligman y León H. Manheimer (20).

### *Experiencia 2.<sup>a</sup>*

#### MÉTODO DE GÖMÖRI PARA INVESTIGACIÓN DE FOSFATASA ÁCIDA

Dos ratas de peso aproximado a 110 g., fueron sacrificadas como las anteriores y sus riñones, hígado y corazón cortados en trozos de un espesor no superior a 2 mm. Luego:

1) Fijados en acetona pura y manteniéndolos en la nevera durante 12-24 horas. Si se utilizan fragmentos más gruesos la reacción es más visible en la periferia.

2) Se pasaron los fragmentos en las veinticuatro horas siguientes por tres o cuatro cambios de acetona pura y luego fueron incluidos en

parafina. El tejido no debe permanecer en la parafina más de tres horas. Los cortes se realizaron de 6 micras de espesor. Se estiraron en agua templada, ya que en agua caliente tienen tendencia a romperse. Montamos con albúmina de Mayer.

3) Pasamos los cortes por xilol para quitar la parafina y lavar a continuación dos veces con alcohol de 95°.

4) Se lavaron con agua destilada.

5) Se pasaron a la disolución incubadora previamente calentada a 37° C. y se dejaron a la misma temperatura en la estufa, durante 1'5 a 6 horas, como mínimo.

La disolución incubadora utilizada fué la siguiente :

Mezcla amortiguadora de una disolución molar de acetato de sodio pH 4'7-5'3. . . . .	2'5 - 3 partes
Disolución al 5 % de nitrato de plomo. . . . .	1 »
Agua destilada . . . . .	6 »
Disolución al 2 % de alfa glicerofosfato sódico . . . . .	3 »

Los componentes se fueron añadiendo en el orden señalado y la disolución así preparada es la disolución madre, que se conserva en la nevera durante varios meses. Si se vuelve ligeramente turbia debe clarificarse por centrifugación, ya que el precipitado pasa a través del papel de filtro. Al prepararla se diluye una parte de la disolución madre en 2 ó 3 partes de agua destilada.

Los amortiguadores de acetato pueden prepararse de la siguiente manera : mezclar 100 c. c. de disolución molar (13'6 %) de acetato de sodio con 100 c. c. (para pH 5) o 17 c. c. (para pH 5'3) de disolución molar de ácido acético al 6 %.

6) Después de la incubación de los cortes se lavan con agua destilada y se agrega ácido acético al 2 % - 3 % para eliminar los precipitados accidentales (plomo proteico y glicerofosfato de plomo). Luego se lava bien con agua destilada.

7) Finalmente pasamos los cortes por una disolución diluida de sulfuro amónico. (Si hay enzima se formará en los cortes sulfuro de plomo negro o pardo oscuro).

Con esta técnica antigua se investiga el radical fosfórico procedente de la hidrólisis del éster. El ion fosfórico liberado (a pH 4'7) no puede precipitar en forma de fosfato cálcico, ya que éste es soluble en medio ácido. La precipitación ocurre en forma de fosfato de plomo por adición de nitrato de plomo al medio de incubación. El catión plomo se identifica por su transformación en sulfuro de plomo negro.

Una vez montados dichos cortes y observados al microscopio no se vió nada. Se pensó que el tiempo de incubación había sido escaso y se repitió prolongando éste hasta cuarenta y ocho horas, haciendo los demás pases de la misma manera. Esta segunda prueba tomó una intensidad de color tan acentuada (marrón) que en modo alguno podíamos aceptar se tratase de zonas de actividad fosfatásica, ya que precisamente la fosfatasa que investigábamos era la ácida, que en el hígado es bastante escasa, mucho más que la alcalina, según los datos de la literatura. Creyendo más bien en la presencia de fósforo inorgánico ya preexistente, pero no del formado por la actividad fosfatásica.

Pensando, pues, que dicho órgano tiene más fosfatasa alcalina, se investigó ésta en el mismo. Cambiamos el método, ya que el anterior era para la ácida.

Los trozos de tejido fueron fijados en alcohol de 90° durante veinticuatro horas y después de incluirlos en parafina, cortarlos y despara-

finarlos, se pasaron los cortes por celoidina diluida, incubándose a 37° con un sustrato de glicerofosfato sódico al 2 %. (Las disoluciones utilizadas fueron, además de ésta, nitrato cálcico al 2 %, nitrato de plata al 1 % e hiposulfito sódico al 5 %).

Resultados obtenidos: regulares, no siendo concluyentes, en nuestro concepto, por la posibilidad de fosfatos preexistentes, conforme hemos indicado anteriormente.

Danielli (loc. cit.), comprobando la técnica de Gömöri ha utilizado otro método que en lugar de identificar el radical fosfórico procedente de la hidrólisis del éster, pone en evidencia el radical alcohólico. Utiliza el fenoltaleinfosfato sódico; la fenoltaleína liberada la demuestra por virar al rojo por la acción de los vapores amoniacales. Utiliza también el fenil o el naftilfosfato cálcicos; el fenol o el naftol son evidenciados por copulación con una sal de diazonio formando un colorante azoico. Técnica semejante a la de Jünge, Menten y Green que utilizan como sustrato el fenilfosfato o el naftilfosfato cálcico. El fenol o el naftol liberados por la acción del enzima son visibles en presencia de una sal de diazonio, dando un colorante azoico. La sal de diazonio utilizada es la de la *alfa* naftilamina y que es unida al medio de incubación, y empleada a baja temperatura. Estas técnicas son más difíciles de manejar que la de Gömöri y apenas han sido empleadas aparte los trabajos de sus promotores y parece no tienen un gran interés práctico; en cambio, tienen cierto interés teórico. Proporciona el método de investigar el radical alcohólico resultante de la hidrólisis del éster fosfórico. El método de Menten, Junge y Green (15) no muestra la fosfatasa nuclear como los anteriores, debido a su menor sensibilidad, según opina Lorch.

#### Experiencia 3.ª

Para hacer una crítica de los métodos fundados en la determinación del radical fosfórico se utilizaron cuatro ratas a las que se inyectaron las siguientes sustancias: 1.º glicerofosfato, 2.º glicerofosfato y fosfatasa, 3.º fosfatasa y 4.º testigo.

De esta manera pretendemos descartar si lo que se ve en tejido es fósforo total o solamente el resultante de la hidrólisis del éster, pero los resultados no fueron muy concluyentes.

En realidad estos métodos se hicieron como complemento, pero no con verdadero interés, ni como base de nuestro trabajo.

#### Experiencia 4.ª

##### FENIL-AZO-FENILFOSFATO SÓDICO Y RATAS TRATADAS CON EFECTORES ENZIMÁTICOS

Seguimos con los ésteres fosfóricos de los colorantes azoicos. Al ver en la prueba 1) que los órganos se teñían de una manera homogénea pero sin la diferenciación que buscábamos se pensó administrar activadores e inhibidores de fosfatasa, para aumentar en lo posible la concentración de ésta en dichos órganos. El peso de las ratas oscilaba entre 100-130 g. Fueron pesadas diariamente antes de inyectarles los efectores. Se vió que durante los primeros días de darles dosis masivas de éstos, todas disminuían de peso, luego se estabilizó su curva. En este momento fueron sacrificadas, ya que ello indicaba se había normalizado su fisiologismo.

Ratas	Sustancias inyectadas	D I A S							
		1.º	2.º	3.º	4.º	5.º	6.º	7.º	8.º
		PESOS EN GR							
1	Vit. C. . . . .	100	92	95	97	99	100	101	101
2	Estrógenos . . . .	134	132	120	118	125	125	125	124
3	Sulfamidas . . . .	130	124	122	122	123	127	130	131
4	Vit. D <sub>2</sub> . . . . .	115	105	94	94	98	94	98	100
5	Hierro . . . . .	94	92	93	103	103	103	104	104
6	Vit. A y D . . . .	125	125	119	120	130	130	129	130
7	Testigo . . . . .	98	—	—	—	—	—	—	—

A pesar de las dosis masivas utilizadas no se observó alteración alguna.

La vitamina C. es considerada por la mayoría de autores como activador. Walsh cree que el ácido ascórbico inhibe ciertos substratos por similitud de estructura.

La vitamina D, se considera que tiene efecto inhibitor sobre la fosfatasa alcalina renal y en cambio carece de efecto sobre la alcalina de hígado y hueso.

Los estrógenos, según ciertos autores, activan; otros creen que no. El Fe+++ lo utilizamos como activador.

Las sulfamidas como inhibidores, a pesar de la opinión de Benesch.

Operamos del mismo modo que en el experimento 1, esto es: fijar en alcohol de 90°, durante cuarenta y ocho horas; cortamos por congelación y utilizamos el fenil-azo-fenilfosfato sódico ya descrito en el medio de incubación.

Los resultados no fueron aun definitivos, pero fueron mejores que en la 1. Las preparaciones más características eran las obtenidas del animal tratado con Fe+++ por haberse demostrado la acción activadora de este catión lo mismo que la del Mg++ y la inhibitora de las tratadas con sulfamidas; ambas representaban los extremos opuestos en la tonalidad de la coloración, o sea la más intensa y la más tenue. En este caso no hay duda de que la coloración es debida a la fosfatasa activada por el hierro (sacarato de hierro). Si hubiésemos utilizado la técnica de Gómori no podríamos afirmarlo tan categóricamente, ya que en ella todos los metales que dan lugar a formación de un sulfuro negro se pueden confundir con zonas de actividad fosfatásica. A pesar de esto Arvy hace una diferenciación clara, sometiendo los cortes tratados por el método de Gómori a la acción del ferrocianuro de potasio en medio clorhídrico, para transformar el sulfuro ferroso en ferrocianuro ferroso azul intenso (actividad fosfatásica = color marrón; Fe = azul-verde).

*Experiencia 5.<sup>a</sup>*

## ÉSTER 2,4' — CARBOXIL-AZOBENCENO-FOSFÓRICO Y RATAS CON EFECTORES ENZIMÁTICOS

Se repite la prueba anterior, pero utilizando el éster 2,4' — carboxil-azobenceno-fosfórico; dicho éster se obtuvo por copulación de la sal de diazonio del ácido *orto*-aminobenzoico con el fenil fosfato sódico (18). La identificación de los productos respectivos de la hidrólisis se efectuó igualmente comparándolos con los azoicos resultantes al copular la misma sal de diazonio con el fenol, en sustitución del fenilfosfato sódico.

Para la obtención de la sal de diazonio partimos de 3,56 g. (0,026 moles) del ácido aminobenzoico, operando exactamente en las condiciones ya descritas por uno de nosotros (Monche) en trabajos anteriores. Empleamos ácido purísimo, por ser detalle fundamental para el fin propuesto, ya que el éster azoico isómero resultante de la copulación con el fenilfosfato sódico, no puede aislarse, debiendo pues emplearse directamente las disoluciones obtenidas.

El éster es de color verde amarillento y vira al rojo vinoso intenso bajo la acción de la fosfatasa alcalina.

Una vez preparado el éster se introdujeron en el mismo cortes de hígado y riñón de unas diez micras. Se procedió a los cinco minutos a lavar estos cortes con agua destilada para luego montarlos en la forma acostumbrada. Hay que mencionar que las ratas habían sido tratadas previamente con los efectores más adecuados.

La preparación resultó mucho más pálida que las tratadas con fenil-azo-fenilfosfato sódico.

*Experiencia 6.<sup>a</sup>*

## FENIL-AZO-FENIL-FOSFATO SÓDICO Y ÉSTER 2-4' — CARBOXIL-AZOBENCENO-FOSFÓRICO EN RATAS TRATADAS CON EFECTORES Y FOSFATASA ALCALINA

Ante los resultados anteriores y buscando una mayor diferenciación en las zonas de actividad fosfatásica, pensamos inyectar la fosfatasa endovenosamente a las ratas objeto de nuestro estudio aumentando así en lo posible la concentración fosfatásica en los diversos órganos. Al mismo tiempo inyectamos dos efectores: uno, que actuaría como activador y otro, como inhibidor (Fe+++ (sulfam.) 1) Fosf.; 2) fosf. + Fe; 3) Fosf. + Sulfam.; 4) T.

Para inyectar utilizamos dispersiones acuosas de fosfomonoesterasa I y II (f. alcalina y ácida respectivamente). En estos ensayos utilizamos preparados puros de fosfatasa alcalina de intestino de perro, obtenidos según la técnica de Albers, operando en la misma forma y con los resultados ya expuestos por J. Monche, J. Jiménez-Vargas y A. Sols (16).

Como fuente de fosfatasa ácida y ante nuestra imposibilidad material de conseguir próstata humana en cantidad suficiente para obtener preparados puros, recurrimos a la fosfatasa del salvado de trigo, dadas sus propiedades generales y de especificidad de acción bastante similares, sobre todo teniendo en cuenta la fácil disponibilidad de preparados puros en cantidad. Para obtenerlos seguimos el método de extracción acuosa y precipitación final con acetona, de Fleury, Courtois (9) y colaboradores. El producto consistió en un polvo blanco finísimo y de aspecto similar al de la fosfatasa alcalina de intestino de perro.

Realizamos la prueba valiéndonos de fosfatasa ácida o alcalina, obteniendo mejores resultados con esta última. Preparamos dispersiones concentradas de fosfatasa con objeto de reducir el volumen del líquido a inyectar no alterando en lo posible el volumen sanguíneo. Utilizamos la mezcla amortiguadora de carbonato-bicarbonato sódico propuesta por King (13) para la alcalina e inyectando ésta endovenosamente en cantidad de 0'2 c. c. al mismo tiempo que administrábamos respectivamente Fe endovenoso y sulfamidas por vía oral.

Respecto al modo de preparación de los cortes operamos como en las experiencias 1, 4 y 5. Para manifestar las zonas con actividad fosfática utilizamos respectivamente los ésteres de los colorantes azoicos descritos en las experiencias 1 y 5, es decir el Fenil-azo-fenilfosfato sódico y el éster del ácido *orto*-aminobenzoico, operando también en idénticas condiciones.

Los tejidos introducidos en el primero dieron una coloración mejor. Los resultados fueron mejores, ya que al ir perfeccionando la técnica logramos una mejor identificación del enzima, si bien coincidimos con la mayoría de autores en que la investigación de fosfatasas en tejidos deja aun mucho que desear.

#### Experiencia 7.<sup>a</sup>

FENIL-AZO-FENILFOSFATO SÓDICO Y 3,4' — TOLUIL-AZO-FENILFOSFATO SÓDICO, EN RATAS TRATADAS COMO EN LA EXPERIENCIA ANTERIOR

El 3,4' — toluil-azo-fenilfosfato sódico se obtiene operando exactamente como lo hacemos al preparar el fenil-azo-fenilfosfato sódico, pero sustituyendo la anilina por 2,78 g. (0'026 moles) de meta-toluidina purísima.

La disolución resultante es de color netamente verde en medio alcalino, virando al amarillo muy pálido en medio ácido. La preparación y demostración de fosfatasa en cortes se realiza como en los casos anteriores.

#### Experiencia 8.<sup>a</sup>

ÉSTER 4,4' — AMIDOSULFONILBENZENO-AZO-FENILFOSFÓRICO INYECTADO A RATAS

En vista de todo ello, cambiamos la técnica y operando también «in vivo» inyectamos endovenosamente el éster 4,4' — amidosulfonilbenzeno-azo-fenilfosfórico de una parte, y el 4,4' — amidosulfonilbenzeno-azo-fenol de otra, que es el colorante resultante de la hidrólisis de dicho éster y cuyo colorante lo obtuvimos por copuación de la sal de diazonio de la sulfanilamida con el fenol o sea sustituyendo en tal caso el fenilfosfato sódico por el fenol, conforme ha expuesto uno de nosotros (Monche) en trabajos anteriores.

Una vez obtenidos ambos en forma de polvo amarillento se disolvieron en la mezcla amortiguadora de King, utilizándolos en forma de disolución saturada de los mismos.

Se inyectaron endovenosamente 0'2 c. c. respectivamente de cada uno de ellos a dos ratas durante tres días, observándose un tinte amarillento en ambos, muy característico, especialmente en conjuntivas.

Al hacer la autopsia se encuentran todos los epitelios y órganos en general muy teñidos. Nuestro propósito era que actuasen dentro del organismo ya que éstos no eran tóxicos y los animales los toleran bien.



Fig. 1. — Corte de hígado a cuya rata se administró previamente sustrato y fosfatasa

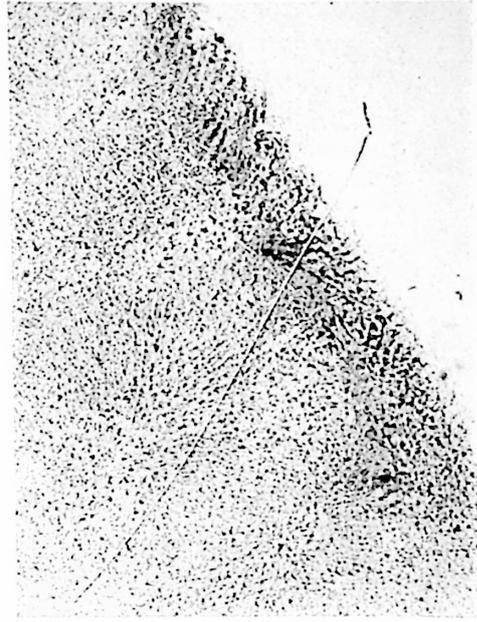


Fig. 2. — Corte de hígado, administrando previamente sólo sustrato

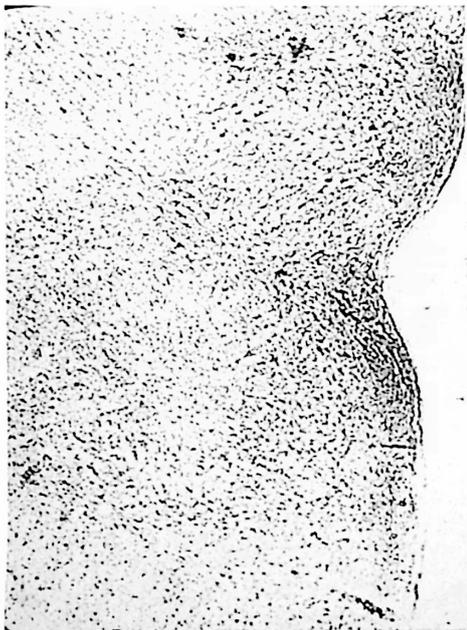


Fig. 3. — Corte de hígado, administrando previamente el colorante sólo



Fig. 4. — Corte de riñón, administrando previamente sustrato y fosfatasa

Luego se fijaron los tejidos con alcohol de 90° y se cortaron por congelación para evitar manipulaciones, montándose inmediatamente en la forma acostumbrada. Se notó una mayor tinción y por tanto hidrólisis fosfatásica en la periferia del hígado y riñón (éste también en la zona medular) siendo asimismo más intenso el color en las que se les había administrado substrato que colorante, ya que este último es menos soluble en agua y en los medios acuosos biológicos en general.

Otros cortes se fijaron en formol diluido, puesto que quedaba descartada la acción del formol sobre la fosfatasa por haber ésta actuado ya previamente sobre el substrato. Pero nos convencimos también de que el mejor fijador desde el punto de vista bioquímico y no histológico era el alcohol, ya que aquél nos producía una gran decoloración.

#### *Experiencia 9.<sup>a</sup>*

#### ÉSTER 4,4' — AMIDOSULFONILBENCENO-AZO-FENILFOSFÓRICO INYECTADO A RATAS

Repetimos la prueba anterior. Para intentar aun una mayor diferenciación, se administró substrato y colorante subcutáneamente ya que se observa que al inyectar endovenosamente ambos se eliminan en seguida. Orina muy coloreada: al dar el colorante subcutáneamente, se produjeron escaras, se repitió también dos días. Se observó una coloración en tejidos algo más subida. Como última prueba «in vivo», realizamos una pequeña modificación en la técnica del montaje consistente simplemente en introducir los cortes (cortados por congelación) en alcohol y no en agua, ya que el substrato es muy soluble en ésta, evitándose así pérdida de substrato. Los resultados son los mejores que hemos obtenido hasta ahora y los adjuntamos en el presente trabajo en forma de microfotografías.

Como puede verse, y ya dijimos anteriormente, las zonas más teñidas son las de la periferia en el hígado. Los cortes más coloreados son aquellos en que se había administrado fosfatasa y substrato al animal, correspondiendo, por lo tanto, a una mayor hidrólisis fosfatásica. Luego seguían los correspondientes a la administración de substrato y finalmente de colorante, ya que éste es el menos soluble en el agua (liq. biol.).

Seguidamente efectuamos unas experiencias «in vivo». La de tanteo previo para observar si el fenil fosfato sódico podía ser hidrolizado fácilmente por el organismo animal, habida cuenta de que el fenol liberado es extraordinariamente tóxico, sobre todo por comparación con el fenilfosfato sódico.

Al inyectar a lotes de ratas cantidades mínimas de fenol del orden del miligramo por kg. peso de animal, acusan rápidamente (en unos segundos) los síntomas de intoxicación, mientras que la acción del fenilfosfato sódico es muchísimo más lenta (unos treinta minutos), administrado a dosis del orden de 1 g. por kilo de peso de animal.

Estos hechos demuestran que el fenilfosfato sódico es hidrolizado con lentitud manifiesta a los pH de los medios internos biológicos del organismo, que conforme es sabido oscilan alrededor de 7'2.

Se dispone de técnicas apropiadas para determinar la actividad de estos enzimas. Los métodos de Bodansky y King Armstrong son los más aceptados en la actualidad para la investigación de fosfatasas. En el método de Bodansky se hace actuar el suero sanguíneo sobre un substrato de *betaglicerofosfato* de sodio; las fosfatasas hidrolizan el substrato y liberan fósforo mineral. El procedimiento consiste en consecuencia en hacer una doble determinación de fósforo inorgánico, antes y después

de la hidrólisis enzimática. Por diversas razones recomendamos y preferimos en nuestros trabajos el procedimiento de King Armstrong. En este caso, el sustrato que se emplea es el fenilfosfato disódico, del cual se libera fenol por la acción hidrolítica de las fosfatasas. El método, en consecuencia, consiste en una doble determinación de fenol, que es más exacta y segura que una doble determinación de fósforo mineral.

Disponemos asimismo del método de King basado en el empleo del fenoltaleinfosfato sódico como sustrato, y que hemos tenido que prepararlo por síntesis, pues no puede obtenerse fácilmente en el comercio. Por hidrólisis enzimática se libera fenoltaleina, que tiene gran poder cromógeno en reacción alcalina y que ofrece, por lo tanto, la ventaja indiscutible de su facilidad de determinación colorimétrica.

Nuestros sustratos cromógenos azoicos no pudieron estudiarse en la forma expuesta para el fenilfosfato sódico, debido a ser perfectamente tolerados por los animales de experimentación, aun a dosis masivas. Así pues para estudiar la velocidad de hidrólisis de dichos sustratos cromógenos azoicos a los pH similares a los de los medios internos biológicos del organismo, hemos recurrido a una serie de experiencias *in vitro*, que serán objeto de atención especial en próximas publicaciones.

### Discusión

En todo este trabajo se habrá observado nuestra preferencia por emplear el término *procesos fosfatásicos*, en lugar de referirnos a la fosfatasa o al sustrato exclusivamente, conforme hacen, en general, los autores dedicados a esta clase de trabajos.

Las fosfatasas, como todos los enzimas en general, no constituyen entidades aisladas en la complejidad de las reacciones catalíticas en que intervienen. Tales reacciones catalíticas constituyen un todo o conjunto indivisible con el sustrato y con el medio en que se realiza el proceso correspondiente. Es totalmente erróneo, en nuestro concepto, juzgar aisladamente dichos procesos con miras restringidas al tener tan sólo en cuenta a cualquiera de los componentes de la mezcla reaccionante constituída por el enzima, el sustrato y el medio en que el proceso ocurre. Debe, pues, hablarse exclusivamente de procesos fosfatásicos o enzimáticos en general, puesto que son los procesos los que tienen una realidad tangible, mas no, en cambio, los componentes aislados de las mezclas reaccionantes determinantes de los mismos.

Lo que es válido para unos procesos, o sea para los enzimas frente a unos sustratos en determinadas condiciones, puede no ser válido al variar cualquiera de dichos factores; por lo menos eso es lo que hemos observado siempre en términos generales.

En la aplicación de los colorantes hidroxiazoicos para el estudio de las fosfatasas, coinciden con nosotros, aunque trabajando en otra dirección, mediante técnicas, procesos y métodos completamente distintos, Arnold M. Seligman y León H. Manheimer (20), quienes dan un nuevo método para la demostración his-

toquímica de la fosfatasa ácida \*. Es esta una cuestión, sobre la que ya nos hemos ocupado extensamente (17 y 18). Conforme se recordará, el método de dichos autores se funda en el empleo de sales de diazonio estables o estabilizadas sin descomposición excesiva durante veinticuatro horas, rápidamente copulables con el *alfa*-naftol operando a  $\text{pH} = 5$ , mas no así, en cambio, con el *alfa*-naftilfosfato cálcico y que permite identificar la distribución de la fosfatasa ácida, puesto que al actuar hidrolíticamente sobre el *alfa*-naftilfosfato cálcico libera *alfa*-naftol que, al irse copulando a medida de su formación, con la sal de diazonio, presente inicialmente, conduce a la formación del azocolorante correspondiente, que tiñe la preparación histológica con intensidad variable en diversas zonas de la misma, según su riqueza fosfatásica. Pues bien, aparte de las objeciones que ya hicimos al indicado método, existe una muy seria, y que por la gravedad de la misma hemos preferido abtenernos de exponerla hasta practicar por nuestra parte ensayos de demostración histoquímica de fosfatasas, conforme lo hemos realizado en el presente trabajo.

Como es sabido, la unión peptídica de enlace de los aminoácidos constituyentes de las moléculas proteicas, presupone la existencia de grupos carboxilo y de grupos amino terminales libres, disponiéndose de métodos analíticos de determinación cuantitativa de los mismos, sobradamente conocidos. Pues bien, las sales de diazonio reaccionan muy fácilmente con los grupos amino-terminales libres de las proteínas, dando unos productos de copulación fuertemente coloreados, amorfos y muy elásticos. Uno de nosotros (Monche) estudió, hace tiempo, por encargo especial de una empresa de productos farmacéuticos, la copulación entre la sal de diazonio de la sulfamida y la seroalbumina, entre otras. Los productos obtenidos son, en general, de color rojo intenso, según la sal de diazonio empleada.

Es evidente que trabajando con sales de diazonio estables frente a los arilfosfatos, conforme lo hacen los referidos autores, lo que se demuestra no es precisamente la distribución de fosfatasas en tejidos, sino, en cambio, la riqueza y distribución de grupos amino libres, presentes en ellos. Por esto en todos nuestros trabajos descartamos tal eventualidad, efectuando previamente las copulaciones de las sales de diazonio con los arilfosfatos en medio alcalino, según norma proverbial más favorable, sobradamente conocida, para llevar después las disoluciones resultantes al  $\text{pH}$  conveniente, una vez completado el proceso de copulación, según las

(\*) Con anterioridad Menten, M. L., Junge, J. y Green, M. H. (J. Biol. Chem., 153, 471, 1944, habían efectuado un trabajo histoquímico similar y partiendo incluso de las mismas hipótesis, pero sin emplear sales de diazonio estables.

actividades reaccionantes respectivas de la sal de diazonio y del arilfosfato empleados.

En cuanto al empleo de nuestros substratos azoicos con fines analíticos, ofrecen una limitación seria, puesto que no siguen la ley de Beer, salvo operar en condiciones muy precisas y entre límites reducidos. Los colorantes monohidroxi azoicos formados como consecuencia de los procesos de hidrólisis enzimática, son compuestos extraordinariamente polares, de cuya propiedad participan todos los colorantes azoicos en general; tienen, pues, la particularidad de hallarse muy ionizados y de depender la intensidad y el tono del color de las disoluciones correspondientes del grado de disociación del colorante en las condiciones del medio del que el mismo forme parte. Pero si esta limitación es seria con fines analíticos, no lo es, en cambio, con fines de ensayos comparativos efectuados dentro de la mayor identidad de condiciones experimentales, en la forma realizada por nosotros. Evidentemente que nuestros substratos cromógenos azoicos podrían aplicarse con fines analíticos, pero ello obligaría a fijar previamente las condiciones operatorias imprescindibles para conseguir resultados comparables, lo que representaría una labor larga y cuidadosa para fijar el método y las técnicas de la marcha analítica a seguir, cuyo trabajo se apartaría por completo de los fines del presente, debiendo, en todo caso, ser objeto de atención especial en futuros trabajos de investigación.

Conforme hemos expuesto al iniciar el desarrollo del tema que viene ocupándonos, cualquier retraso en la evolución normal de los procesos enzimáticos del organismo repercute inmediatamente en la marcha general del metabolismo del individuo. Es este un hecho axiomático sobre el que creemos innecesario insistir. Pues bien, se observan dos tipos de sustancias que, en general, son fisiológicamente muy activas, a saber: unas, caracterizadas precisamente por su gran actividad química o, en otras palabras, por una labilidad extraordinaria; y, otras, por el contrario, caracterizadas precisamente por su gran estabilidad. Como ejemplo de las primeras podríamos citar cualquiera de las sustancias intermedias, conocidas unas o hipotéticas otras, de los distintos procesos parciales que comprende el metabolismo normal y que representan varias cadenas de síntesis especiales en cada caso concreto y cuyo conjunto constituye el metabolismo total del individuo. Estas sustancias tan fisiológicamente activas, por su labilidad extraordinaria precisamente, constituyen, en nuestro concepto, a causa de su labilidad, los componentes determinantes de la marcha normal de los procesos enzimáticos del organismo. En cuanto cualquier causa, por defectos de correlación funcional inclusive, de tipo patológico accidental o constitucional del individuo, influye determi-

nando la formación anormal de sustancias intermedias más estables en los procesos metabólicos, surgirá inmediatamente como consecuencia la anormalidad del retraso correspondiente.

Respecto a las sustancias cuya actividad fisiológica depende precisamente de su estabilidad manifiesta, los trastornos o alteraciones correspondientes se fundan, como es sabido, en los retrasos debidos, en muchos casos, a su dificultad de eliminación normal, o bien a defectos individuales de tipo patológico en los órganos y funciones que constituyen los medios normales de eliminación.

Como caso muy interesante, desgraciadamente demasiado extendido, podemos citar el de los accidentes y trastornos graves provocados por el «enquistamiento» de compuestos químicos demasiado estables que provocan, en muchos casos, en la zona afectada, variaciones considerables de tensión superficial, con proliferación anormal de células, debido precisamente a esta modificación de la tensión superficial del medio. Es esta una de las explicaciones de tipo físicoquímico comprobadas experimentalmente según numerosos trabajos.

Todos los trastornos del metabolismo debidos a causas del tipo de las indicadas precedentemente, ofrecen interés muy especial en Pediatría. Precisamente en la infancia es la época en que los órganos y funciones se hallan en pleno desarrollo. La misma variación evolutiva de la dieta hacia el régimen normal a que hay que someter prudentemente la dieta infantil, lo demuestra claramente. Por esto la vigilancia del metabolismo en la infancia tiene un interés tan considerable.

En la vejez nos encontramos con casos que ofrecen cierta similitud, por evolución regresiva de los órganos y funciones. En tal caso la dieta es preciso regularla, aproximándose a la de la infancia.

Estas cuestiones, estudiadas inicialmente desde la marcha de los procesos enzimáticos responsables, ofrecen un amplio campo a la investigación y nos han de conducir en el futuro a una visión cada vez más concreta de los complejos procesos metabólicos del organismo.

### Conclusiones

1.<sup>a</sup> Se estudia «in vivo» la hidrólisis enzimática de ésteres fosfóricos de colorantes monohidroxiázoicos, determinando cualitativamente la intensidad de la misma mediante cortes histológicos de hígado y riñón, por tinción de los mismos por el colorante liberado enzimáticamente. Se utilizan como animales de experimentación lotes de ratas para comparar las variaciones de tinción

de los cortes histológicos procedentes de órganos idénticos, y se observa que el colorante se fija preferentemente en la periferia del hígado y alrededor de los tubos renales.

2.<sup>a</sup> Se estudia comparativamente con el fenilfosfato sódico la hidrólisis enzimática de estos substratos cromógenos azoicos, observándose «in vivo» una velocidad de hidrólisis de los mismos incomparablemente mayor.

3.<sup>a</sup> Se demuestra que las técnicas histoquímicas utilizadas usualmente para la investigación de fosfatasas no se prestan a tal fin debido a la termolabilidad de estas enzimas y a su pérdida de actividad bajo la acción de agentes químicos y disolventes energéticos y se dan las normas precisas para la aplicación de dichas técnicas.

Se hace un estudio general comparativo de los procesos fosfatásicos y se fijan condiciones de trabajo óptimas para la práctica experimental de los mismos en condiciones de comparabilidad con la evolución de estos procesos en los medios internos biológicos.

### Summary

The phosphatasic hydrolysis of phosphoric esters of mono-hydroxi-azo-dyes is studied «in vivo», determining qualitatively the intensity of the same by means of hystological preparations of liver and kidney which are tinged by the azo dye liberated.

The authors have utilized as experimental animals lots of rats for comparing the variations of the colour fixed in the hystological preparations and the dye is preferently fixed in the periphery of liver and around the kidney tubes.

The comparative study with the sodium phenyl phosphate enables to observe that the splitting speed of all of this cromogenic azo-dye substrates, is extraordinarily grater «in vivo» and all the testings and experiences of the authors prouved that the hystochemical methods to be used till now for the phosphatasic pourposes are not useful because the termolability of this enzymes hindering them. But the activity of these ferments is also lost by treatements of energetic chemical and solvent agents. Many practical orientations concerning the application of this methods are reported.

### Bibliografía

- (1) CAPELLIN, M. : *Bull. histol. appl. physiol. path. tech. microscop.*, **24**, 155, 158, 1947.
- (2) COURTOIS, J. : *La Riforma Medica*, **12**, 18, Nápoles, 1951.
- (3) DANIELLI, J. F. CATCHESIDE, D. G. : *Nature*, **156**, 294, 1945.
- (4) DANIELLI, J. F. : *Jour. exper. Biol.*, **22**, 110, 1945.

- (5) DANIELLI, J. F., FELL, H. B., KODICK, E. : *Proc. mit. Soc., Cambridge*, **4**, 197, 1946.
- (6) DANIELLI : Citado por Lison, *Bull. d'Histologie appl.* **25**, 20, **41**, 1948.
- (7) EMMEL, V. M. : *Anat. Rec.*, **95**, 159, 176, 1946..
- (8) FELL, H. B., DANIELLI, J. F. : *Brit. J. exp. Path.*, **24**, 196, 1943.
- (9) FLEURY, P., COURTOIS, J., ANGNOSTOPOULOS, C. y DESJONERY, A. : *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **32**, 773, 1950.
- (10) GÖMÖRI, G. ; *Proc. Soc. exp. Biol.*, **42**, 23, 1939.
- (11) GÖMÖRI, G. : *Amer. J. chi. Path.*, **16**, 347, 1946.
- (12) KAY, H. D. : *Biochem. Jour.*, **22**, 855 1928.
- (13) KING, E. J. : *Microanálisis bioquímicos en Medicina, versión española*.
- (14) KRUGELIS, E. J. : *Biol. Bull.*, **93**, 209, 1947.
- (15) MENTEN, M. H. JUNGE y GREEN : *J. Biol. Chem.*, **153**, 471, 1944.
- (16) MONCHE, J., JIMÉNEZ-VARGAS, J. y SOLS, A. : *R. esp. Fisiol.*, **3**, 282-283, 290-291, 1947.
- (17) MONCHE, J. : *R. esp. Fisiol.*, **6**, 7, 239, 253, 229, 235, 1950, 1951.
- (18) MONCHE, J. : *Anal. R. Soc. Esp. Fis. Quím.*, **48**, 499, 522, 1952.
- (19) ROBINSON, A. y WARREN, F. L. : *Nature*, **161**, 397, 398, 1948.
- (20) SELIGMAN, A. y MANHEIMER, L. : *J. Nat. Cancer Inst.*, **9**, 427, 434, 1949.
- (21) TAKAMATSU, H. : *Trans. Soc. Path. Japan*, **29**, 492, 1939.