

Laboratorio de Fisiología Animal de la
Facultad de Ciencias
Universidad de Barcelona
(Prof. F. Ponz)

Fosfatasa alcalina y anhidrasa carbónica en algunos gasterópodos

por Manuel Gómez-Larrañeta y Francisco Ponz

(Recibido para publicar el 3 de noviembre de 1954)

Se ha investigado profusamente la presencia de fosfatasa alcalina y anhidrasa carbónica en moluscos en relación con su posible papel en la calcificación de la concha.

La formación de la concha de los moluscos lleva consigo un primer proceso de elaboración de una matriz orgánica (periostraco, conquiolina) de naturaleza proteica con azúcares reductores (3, 15) y un segundo de mineralización con depósito de calcita. Este último se inicia a nivel de las glándulas mucosas con granos de depósito sobre la matriz compuestos de fosfato cálcico, y que más tarde son de carbonato cálcico. El fósforo de la concha (24) habría de referirse exclusivamente al constituyente orgánico (Bevelander, 2).

El paso de fosfato a carbonato no se ha explicado satisfactoriamente. Por una parte, se ha pensado en la colaboración de la anhidrasa carbónica (19), que parece intervenir en la formación de la concha del huevo de las aves (8, 1, 14) y que se encuentra en el manto de muchos moluscos (6, 9, 11, 12, 17, 20, 25). Freeman y Wilburg (12) encuentran anhidrasa en el manto de la gran mayoría de las 20 especies investigadas, aunque en algunas de ellas puede darse formación de la concha con una actividad anhidrásica en el manto casi despreciable. Además, la anhidrasa está en otros órganos y flúidos internos.

Por otra parte, los iones — especialmente orgánicos — pueden aumentar la solubilidad del fosfato cálcico (13), fijando de algún modo el calcio, lo que podría ser facilitado por la fosfatasa trans-

firiendo fosfato a algún substrato. Con ello el carbonato del medio iría precipitando como carbonato cálcico. Para Manigault (18) hay una correlación directa entre actividad fosfatásica y precipitación del calcio en la concha. Hay muchos datos histoquímicos que refieren la presencia de fosfatasas en el epitelio del manto de moluscos [Bourne (5)] y Bevelander y Benzer la han localizado en la superficie de las células que vienen a quedar en contacto con la matriz y los gránulos.

Investigaciones posteriores de Bevelander (2), con ayuda de isótopos, han revelado que el calcio y el P del agua pasan a encontrarse en el manto. El Ca aparece preferentemente en la periferia del manto y se incorpora en los cristales de carbonato cálcico de la concha. El P se localiza en el interior del margen del manto, en la región de las glándulas mucosas y en la matriz orgánica que rodea los cristales de carbonato. La fosfatasa se encuentra en todo el interior de la superficie del manto, en las células epiteliales. Quizá condicione allí un proceso de fosforilación sobre el mucus del manto (4) en relación con la matriz orgánica. De la formación de la concha es, desde luego, responsable el manto con relativa independencia del resto del animal, dado que preparaciones manto-concha *in vitro* muestran el crecimiento de la concha (16), aunque a velocidad bastante menor que *in vivo*.

Hemos escogido tres especies de gasterópodos para estudiar su actividad fosfatásica. Una terrestre, provista de concha [*Helix* (*Cryptomphalus*) *aspersa*, Müll.], otra terrestre sin concha (*Agriolimax agrestis*, L.) y una acuática con concha (*Lymnaea stagnalis*, L.). La anhidrasa carbónica se ha investigado solamente en *H. aspersa*.

Métodos

La determinación de actividad fosfatásica se realizaba mediante la técnica descrita por Sols y Ponz (23), modificación de la de Bodansky. Como substrato se utilizaba el glicerofosfato sódico y la solución amortiguadora era de acetato-veronal, una hora de incubación e interrumpiendo la hidrólisis con ácido tricloroacético. El fósforo se valoraba colorimétricamente por la reacción del azul de molibdeno, utilizando como reductor el amidol.

La hemolinfa se utilizaba sin dilución. Los órganos o animales enteros se trituraban con arena lavada a los ácidos y se preparaban autolizados con agua clorofórmica en las proporciones de volumen/peso que se señalan en cada caso, separando la fracción líquida a las 24 horas por filtrado por algodón.

La anhidrasa carbónica se ha determinado mediante el método manométrico de Meldrum y Roughton (19), de acuerdo con Roughton y Booth (21), con solución amortiguadora de fosfatos y como

substrato bicarbonato sódico. La temperatura se mantenía a 17°. Se preparaban extractos acuosos de los órganos, manteniéndolos previamente triturados durante 24 horas en agua clorofórmica (50 a 100 cc./g. de tejido fresco).

Resultados

1. FOSFATASA ALCALINA EN *H. (Cryptomphalus) aspersa*, Müll.

Se ha investigado la actividad fosfatásica de la hemolinfa, órgano de Bojanus, hepatopáncreas, intestino y manto.

Hemolinfa. — Practicada una incisión en el ventrículo, se dejaba fluir la hemolinfa sobre tubo de hemolisis. Se reunía la de 10 a 20 animales para disponer del volumen líquido necesario. Los resultados se expresan en miligramos de P liberados por 100 cc. de hemolinfa.

En un primer ensayo se estudió la actividad a distintos pH entre 5 y 9'4. La tabla I muestra que se encontraron los valores más altos a pH 9'4 y que no se revelaba actividad entre pH 5 y 6.

Las incubaciones verificadas a temperaturas de 34 y 38° no diferían significativamente.

TABLA I

Actividad fosfatásica de Helix (Cryptomphalus) aspersa a diferentes pH, a temperaturas de 34 y 38°. Actividad en mg. de P liberados en una hora por 100 cc. de hemolinfa. — indica actividad inapreciable y + actividad muy débil

pH	a 34°		a 38°	
	Núm. de ensayos	Actividad	Núm. de ensayos	Actividad
5	1	—	1	—
6	1	—	1	—
7	1	+	1	+
8			1	4'66
	1	5'2	2	5'85
9'4	7	9'09	10	8'45

La actividad fosfatásica media, a pH 9'4, deducida de 17 determinaciones en que cada una correspondía a mezclas de hemolinfa de unos 15 a 20 animales, fué de 9'72, con desviación standard de 2'17 y error standard de la media de 0'516.

Organos. — Las determinaciones se hicieron reuniendo órganos de varios ejemplares que se disecaban cuidadosamente. El peso de tejido tomado se obtenía después de secado ligeramente sobre papel de filtro. Los autolizados se hacían en 100 veces su peso de

agua clorofórmica para el manto pulmonar ó 50 ó 100 para intestino, órgano de Bojanus y hepatopáncreas.

TABLA II

Actividad fosfatásica en diferentes órganos de Helix (Cryptomphalus) aspersa Müll. Se expresa en mg. de P. liberados por gramo de peso fresco de órgano en una hora a 38° y pH 9'4

Órgano	Núm. de datos	Media	Desviación standard	Error standard de la media
Manto	10	13'67	3'898	1'23
Bojanus	19	7'69	1'654	0'379
Hepatopáncreas	8	6'31	1'603	0'606
Intestino	6	7'22	1'581	0'65

Los resultados se reúnen en la tabla, en la que se ve que el manto tiene casi dos veces mayor actividad que los otros órganos. El análisis estadístico de los valores obtenidos se da en la tabla III, de acuerdo con la «prueba t» de Student (10, 22), tomando pares de ensayos realizados simultáneamente.

TABLA III

Análisis estadístico de las diferencias entre actividades fosfatásicas de distintos órganos de H. aspersa a pH 9'4 y a 38°. Las "pruebas t" de Student se hacen tratando pares de resultados cuyas determinaciones se hicieron simultáneamente. El número de grados de libertad es igual al de pares de ensayos menos uno

Organos comparados	Actividades medias	Grados de libertad	t	Probabilidades		Diferencia
				P	t	
Manto Hepatopáncreas	15'58 6'50	5	8'41	0'001	6'859	Significativa
Manto Bojanus	14'82 7'70	7	6'98	0'001	5'405	Significativa
Manto Intestino	16'02 7'22	5	6'43	0'01 0'001	4'032 6'859	Significativa
Intestino Hepatopáncreas	6'78 6'76	4	0'02	0'9	0'134	No significativa
Bojanus Intestino	7'72 6'78	4	1'17	0'4 0'3	0'941 1'190	No significativa
Bojanus Hepatopáncreas	7'54 6'50	7	1'26	0'3 0'2	1'119 1'415	No significativa

Puede comprobarse que las diferencias de actividad fosfatásica entre el manto pulmonar y los demás órganos son significativas, en tanto no lo son las de intestino, órgano de Bojanus y hepatopáncreas entre sí. Se ha querido ver con más detenimiento la distribución de la actividad fosfatásica en el manto. La figura 1 representa

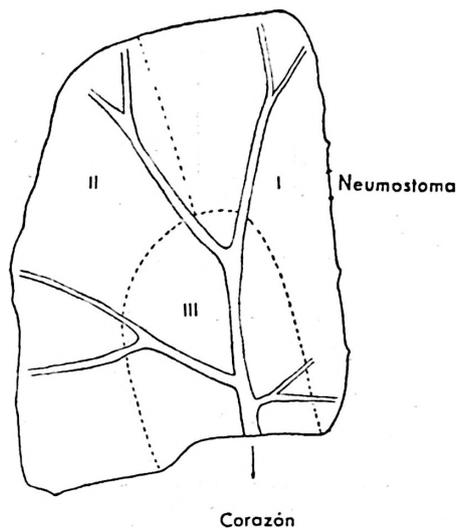


Figura 1
Zonas en que se ha dividido el manto de *H. aspersa* para el estudio de su actividad fosfatásica.

en esquema las tres regiones (I, II y II) del manto pulmonar que se han considerado en vistas a las posibles diferencias en la riqueza en fosfatasa, según su mayor o menor participación en la formación de la concha. Los resultados aparecen en la tabla IV y su análisis estadístico en la tabla V. Las únicas diferencias encontradas significativas son entre la región III y las I y II, sin que tampoco sean suficientemente acusadas para deducir valor biológico.

TABLA IV

Actividad fosfatásica de diferentes regiones del manto de *Helix Cryptomphalus*) *aspersa*. Regiones I: borde derecho y más anterior; II: borde izquierdo; III: zona interna con la vena pulmonar y venas confluyentes (ver figura 1)

Región	Núm. de datos	Media	Desviación Standard	Error standard de la media
I	15	12'75	4'19	1'081
II	19	13'68	3'21	0'736
III	15	15'01	3'02	0'779

TABLA V

Análisis estadístico de las diferencias de actividad fosfatásica en las distintas regiones del manto de *Helix* (*Cryptomphalus*) *aspersa*.

Regiones comparadas	Actividades medias	Grados de libertad	t	Probabilidades P	Diferencias
I	12'75	14	1'569	0'1 — 1'761	No significativa
II	13'73			0'2 — 1'345	
I	13'10	12	2'889	0'01 — 3'055	Significativa
III	15'13			0'02 — 2'681	
II	13'77	14	2'925	0'01 — 2'977	Significativa
III	15'01			0'02 — 2'624	

2. FOSFATASA ALCALINA DE *Agriolimax agrestis*, L.

Se determinó la actividad fosfatásica del manto y tubo digestivo. Los valores medios obtenidos son :

Intestino : 3'64 mg. P liberado/g.
Manto : 2'52 mg. P. liberado/g.

Si se comparan estos resultados con los de *H. aspersa*, se aprecia que en éste el cociente de actividad fosfatásica intestino/manto (tabla III) es de $\frac{7'22}{16'02} = 0'45$, mientras en *Agriolimax* es de $\frac{3'64}{2'52} = 1'44$, es decir, que en *Agriolimax*, que no tiene concha, por una parte hay menos actividad fosfatásica en ambos órganos y, por otra, es marcadamente menor la del manto hasta caer a valores bastante más bajos que los del intestino.

3. FOSFATASA ALCALINA DE *Limnaea stagnalis*, L.

Se quiso estudiar la posible variación en actividad fosfatásica total a lo largo del desarrollo escogiendo *Limnaea stagnalis*, a cuyo fin se instalaron para su cría un sistema adecuado de acuarios.

En algunos adultos se investigó la actividad en órgano de Bojanus, manto y resto del cuerpo «in totum». Los valores medios encontrados fueron los de :

Órgano de Bojanus 19'0
Manto 1'0
Resto del cuerpo. 1'4

Se observa una notable diferencia respecto de la distribución en *H. aspersa*: en *Limnaea* el órgano de Bojanus es muy rico en fosfatasa alcalina, mientras el manto es muy pobre.

Para la cría de *Limnaea* se atendieron las indicaciones de M. R. Carriker (7), disponiendo las puestas de huevos en acuarios independientes, de modo que se seguía con exactitud la edad de todos los ejemplares.

La determinación de actividad fosfatásica alcalina se realizaba triturando los ejemplares «in totum», incluyendo la concha para los animales pequeños y separándola en los mayores.

La tabla VI incluye todos los resultados. Se utilizaba, para cada medida, el número de animales necesario para reunir suficiente autolizado (50 veces su peso fresco en agua clorofórmica). La edad se contaba desde la eclosión.

TABLA VI

Actividad fosfatásica alcalina (mg. de P liberados en una hora por gramo de peso fresco) de *Limnaea stagnalis* a pH 9'4 y 38° a lo largo del desarrollo

Edad (días)	Actividad	Longitud (mm.)	Actividad
Incluida la concha			
2	1'71	1'5	1'05
5	1'39	1'8	1'06
6	1'74-0'71	2'0	1'03
9	0'72	2'5	0'61
10	1'63	3	1'47
14	1'05-0'80	4'0	0'85
19	0'85	7'3	1'41
20	2'40	9	1'04
29	1'47	9'4	1'74
30	1'41		
45	1'04		
Separada la concha			
30	1'75	7	1'75
45	2'32	9'5	2'32
60	1'75-2'36	12	1'46-2'36
120	2'87	15	2'50
140	2'18	17	1'75-2'87
150	1'83	23	2'18
		25	1'81-1'85

Se encuentran valores que no permiten establecer diferencias a lo largo del desarrollo. Un inconveniente difícil de soslayar que contribuye a la variación que se observa en los resultados es la de obtener el peso fresco, ya que el secado sobre el papel de filtro no permite asegurar una eliminación homogénea del agua del acuario retenida por los animales.

Con la técnica empleada no se reveló apenas actividad en las puestas y huevos antes de la eclosión. En cambio, a los pocos días de ésta, ya hay una bien apreciable actividad fosfatásica.

4. ANHIDRASA CARBÓNICA EN *Helix (Crytomphalus) aspersa*, Müll

Se ha utilizado en líneas generales el método manométrico de Meldrum y Roughton (19), de acuerdo con Roughton y Booth (21), con solución amortiguadora de fosfatos y bicarbonato sódico como sustrato. Se opera a 17°.

Los extractos acuosos del manto respiratorio (24 horas en 100 ó 50 cc. de agua clorofórmica por gramo de tejido) tenían notable actividad anhidrásica.

Se realizaron estudios comparativos de la actividad anhidrásica del hepatopáncreas y órgano de Bojanus con el manto respiratorio y tomando la del manto por 1 resultó la del hepatopáncreas 0'17 y la del órgano de Bojanus 0'5. El manto visceral sólo posee actividad 0'7 en relación con el pulmonar tomado como 1.

Discusión

La hemolinfa de *Helix aspersa* contiene fosfatasa alcalina con pH óptimo (acetato-veronal, 1 hora de incubación y 38°) próximo a 9'4, cuya riqueza es de 9'7 unidades Bodansky. La actividad del manto, órgano de Bojanus, hepatopáncreas e intestino es, respectivamente, 13'67, 7'69, 6'31 y 7'22 mg. de P liberados por gramo de tejido. Las diferencias entre los tres últimos órganos no son significativas, pero hay clara diferencia entre cualquiera de ellos y el manto. Las tres regiones del manto que se han separado presentan pocas diferencias de actividad y sólo puede señalarse con significación estadística una riqueza algo mayor de la zona interna (III).

En *Agriolimax agrestis* gasterópodo sin concha, la actividad fosfatásica del intestino es bastante menor que en *Helix*, pero lo más notable es la mucho más débil actividad del manto. El cociente intestino/manto, que en *Helix* vale 0'45, pasa a ser en *Agriolimax* 1'44.

En *Limnaea stagnalis* acuático y con concha hay muy poca actividad (1'0) en el manto comparativamente a *Helix*. En el órgano de Bojanus, en cambio, se encuentran valores muy altos (19'0). En el resto del cuerpo es también escasa (1'4).

No ha sido posible encontrar alguna relación entre actividad fosfatásica y desarrollo. Sin embargo, sí que se aprecia un notable aumento de la misma en el paso de huevos no eclosionados a larvas de pocos días.

Se ha demostrado actividad anhidrásica en el manto, órgano de Bojanus y hepatopáncreas de *Helix aspersa*, con una relación de 1:0'5:0'17. Entre el manto respiratorio y el visceral hay una relación de 1:0'7.

Estos resultados sugieren que el órgano de Bojanus es mucho más rico en fosfatasa alcalina en la especie dulceacuícola (*L. stagnalis*) que en la terrestre (*H. aspersa*), lo que quizá esté en relación con el intenso trabajo osmótico que debe hacer el nefridio de *Limnaea* para mantener el gradiente $\Delta_i > \Delta_e$.

La gran diferencia entre la alta riqueza fosfatásica del manto en la especie terrestre con concha (*Helix*) y la escasa de la que carece de ella, puede confirmar el papel de la fosfatasa del manto en la formación de la concha. Sin embargo, el manto de *Limnaea* que produce concha tiene también muy poca fosfatasa.

Respecto a la anhidrasa carbónica, aparece el manto con la mayor actividad de los tres órganos estudiados y dentro del manto es algo más alta en la parte respiratoria que en la visceral. Ello puede relacionarse con la función respiratoria de la anhidrasa carbónica, especialmente abundante en las branquias de los invertebrados marinos y dulceacuícolas (Florkin), así como a la función que pueda ejercer en la mineralización de la concha, ya que el manto visceral posee también bastante actividad.

Resumen

Helix (Cryptomphalus) aspersa, Müll. posee en su hemolinfa fosfatasa alcalina cuya actividad (pH 9'4 con acetato-veronal, 60 minutos a 38°) es próxima a 10 unidades Bodansky. La actividad (mg.P liberados/g. tejido fresco) del manto (13'7) es aproximadamente doble de la del órgano de Bojanus, hepatopáncreas o intestino (7'7, 6'3, 7'2), no siendo significativas las diferencias encontradas entre estos últimos.

Agliolimax agrestis, L., gasterópodo que no forma concha, tiene mucha menos actividad fosfatásica en el manto. La relación de fosfatasa intestino/manto es en *H. aspersa* 0'45, mientras que en *A. agrestis* es 1'44.

Limnaea stagnalis L., gasterópodo acuático que forma concha, tiene también muy poca actividad fosfatásica en el manto (1'0), mientras es muy rico el órgano de Bojanus (19'0). El estudio de su desarrollo en el laboratorio reveló un aumento muy notable de actividad fosfatásica alcalina total, desde la casi inapreciable de los huevos a la relativamente alta de las larvas de pocos días.

H. aspersa presenta actividad anhidrásica en manto, órgano de Bojanus y hepatopáncreas en la relación de 1:0'5:0'17. Es algo más rico el manto respiratorio (1) que el visceral (0'7).

Summary

Helix (Cryptomphalus) Aspersa (Müll) contains in its haemolymph, an alkaline phosphatase, the activity of which (at 9.4 pH with veronal-ace-

tate during 60 minutes at 38°) is about 10 u. Bodansky. The activity (mgrs. P. liberated/g. fresh tissue) of the mantle (13.7) is about double that of the Bojanus organ, hepatopancreas or intestine. (7.7 6.3 7.2) the difference between the latter not being significative.

Agriolimnax agrestis, L., a Gastropod not forming shell, has much less phosphatasic activity in the mantle. The relation of phosphatasic content between intestine and mantle amounts in *H. Aspersa* to 0.45 whilst in *A. Agrestis* it is 1.44.

Limnaea stagnalis L. a water Gastropod forming shell, has also very little phosphatasic activity in the mantle (1.0) whilst the Bojanus organ is very rich in same (19.0). Studied during its development in laboratory, it shows a notable increase of total alkaline phosphatasic activity, very scarce in the eggs and rising considerably in a few days in the larvae.

The anhydrasic activity found in the mantle, Bojanus organ and Hepatopancreas of *H. Aspersa* is in relation of 1/0.5/0.17. The respiratory mantle (1) is somewhat richer than the visceral one (0.7).

Bibliografía

1. BENESCH, R., BARRON, N. S. y MAWSON, C. A. : *Nature*, **153**, 138, 1944.
2. BEVELANDER, G. : *Biol. Bull.*, **102**, 3, 1952.
3. BEVELANDER, G. y BENZER, P. : *Biol. Bull.*, **94**, 176, 1948.
4. BEVELANDER, G. y KRIMSKY, I. : *Bermuda Biol. Sta. Ann. Report.*, 1949.
5. BOURNE, G. : *Quart. Jour. Exp. Physiol.*, **32**, 1, 1943.
6. BRINKMAN, R. : *J. Physiol.*, **80**, 171, 1933.
7. CARRIKER, M. R. : *Transact. Wisconsin Acad. Scienc. Arts a. Let.*, **38**, 1, 1946.
8. COMMON, R. H. : *Journ. Agric. Sc.*, **31**, 412, 1941.
9. FERGUSON, J. K. W., LEWIS, L. y SMITH, J. : *Journ. cell. comp. Physiol.*, **10**, 395, 1937.
10. FISHER, R. A. y YATES, F. : Tablas estadísticas para investigadores científicos. Ed. Aguilar, Madrid, 1949.
11. FLORKIN, M. y MARCHIN, P. : *Arch. intern. Physiol.*, **51**, 130, 1941.
12. FREEMAN, J. A. y WILBUR, K. M. : *Biol. Bull.*, **94**, 55, 1948.
13. GREENWALD, J. : *J. Biol. Chem.*, **124**, 437, 1938.
14. GUTAWSKA, M. S. y POZZANI, U. C. : *Bull. Mass. Agric. Exper. Sta.*, **428**, 47, 1945.
15. HASS, F. : Bronns Klassen und Ordnungen des Tier-Reichs. III Bd., Abt. 3, Bivalvia Teil I, 1935.
16. JODREY, L. H. : *Biol. Bull.*, **104**, 398, 1953.
17. MAETZ, J. : *Bull. Inst. Oceanogr.*, Mónaco, n.º 899, 1946.
18. MANIGAULT, P. : *Ann. Inst. Oceanogr.*, **18**, 331, 1939.
19. MELDRUM, N. U. y ROUGHTON, F. J. W. : *J. Physiol.*, **80**, 113, 1933.
20. ROBERTSON, K. y FERGUSON, J. K. W. : *Amer. J. Physiol.*, **116**, 130, 1936.
21. ROUGHTON, F. J. W. y BOOTH, V. H. : *Biochem. J.*, **40**, 309, 319, 1946.
22. SNEDECOR, G. W. : Métodos de Estadística. Acme Agency, Buenos Aires, 1948.
23. SOLS, A. y PONZ, F. : *R. esp. Fisiol.*, **2**, 283, 1946.
24. TUREK, R. : *Arch. Naturgesch.*, **2**, 291, 1933.
25. VAN GOOR, H. : *Arch. intern. Physiol.*, **45**, 491, 1937, *Enzymologia*, 1948.