

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

Observaciones sobre procesos fosfatásicos

J. Monche

(Recibido para publicar el 27 de febrero de 1954)

Como consecuencia de trabajos anteriores realizados por nosotros sobre procesos fosfatásicos y de nuestras impresiones con motivo de una reciente estancia en París durante el mes de octubre, en contacto con investigadores franceses, se han afianzado algunas opiniones personales que habíamos adquirido sobre los procesos fosfatásicos al interpretar nuestros resultados experimentales y confrontarlos con los de otros autores, que desarrollaremos en el presente trabajo, a modo de revisión.

Desde hace tiempo venimos prestando atención preferente al estudio sistemático de ésteres fosfóricos, cuya constitución química especial permitiera atribuirles por anticipado una labilidad extraordinaria (5), dentro de la zona de $\text{pH} = 7.3 - 7.5$, o sea la misma precisamente que la de los medios biológicos internos del organismo.

Y el hecho de trabajar «in vitro» 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 del organismo, ambas han de actuar, por lo tanto, en condiciones de pH muy similares, dada la escasa variación mínima del pH de los medios internos biológicos, compatible con la vida; de tal modo, que ni aun en circunstancias excepcionales, y a pesar de que en determinados órganos puede, como es sabido, alcanzar valores bastante dispares el pH del medio de los mismos, se trata, sin embargo, 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 de 8'5, o en el riñón, en que puede ser próximo a 5. Valores éstos de pH que, en nuestro concepto, no tienen relación alguna con los procesos fosfatásicos que ocurren en dichos órganos, puesto que en el interior de los tejidos constitutivos de los mismos, en que se hallan las fosfatasas, el pH se mantiene siempre constante, dentro de los valores compatibles con la vida antes indicados y compatibles también, por lo tanto, con la estabilidad del protoplasma celular, gracias a los poderosos sistemas amortiguadores del organismo y a los cambios que ocurren por equilibrio de Donan, entre otros mecanismos propios de los procesos biológicos, en general poco conocidos, estudiados por Winkler y Bungenberg de Jong (9).

En relación con cuanto acabamos de exponer, llama poderosamente la atención el hecho de efectuarse con frecuencia procesos de hidrólisis enzimática «in vitro» en medios muy ácidos o excesivamente alcalinos, empleando cortes histológicos procedentes de órganos y tejidos que, por formar parte integrante de los medios internos biológicos del organismo, no pueden hallarse sujetos a variaciones extremas de pH incompatibles con la vida, o sea fuera de la zona de pH en que ocurren «in vivo» los procesos enzimáticos en el organismo de procedencia de los cortes histológicos estudiados, ya que, conforme lo hemos demostrado mediante las microfotografías correspondientes en un trabajo anterior, según un método propio de tinción histoquímica por diazorreacción (6), se observa una destrucción tanto mayor del protoplasma celular cuanto mayor sea la diferencia entre los valores de pH elegidos y los de dicha zona. Precisamente mucho antes de que tales alteraciones profundas del protoplasma puedan ser visibles al microscopio, es evidente que habrán ocurrido procesos físicoquímicos anormales, difícilmente visibles, pero asimismo incompatibles con la vida.

Queda, pues, perfectamente establecido, en nuestro concepto, el interés extraordinario de disponer de ésteres fosfóricos para su empleo como substrato en las investigaciones sobre fosfatasas, caracterizados por operarse en condiciones que sean lo más similares posible a las de los medios internos biológicos del organismo en que actúan dichas enzimas.

Si bien es ésta una meta difícil de alcanzar, dada la propia complejidad de la célula viva, no es menos cierto, en nuestro concepto, que, cuanto más se aparten los métodos empleados para la investigación de fosfatasas de las condiciones en que las mismas normalmente actúan, tanto más problemáticos y sujetos, por lo tanto, a revisión serán los resultados obtenidos.

Con arreglo a este criterio, en favor del cual hemos aportado diversos hechos experimentales en publicaciones anteriores (5 y 6),

y que continuaremos desarrollándolo en futuros trabajos en curso, ampliándolo más adelante a otros procesos enzimáticos, se nos planteó en primer lugar el problema de la disponibilidad de ésteres fosfóricos que fueran simultáneamente muy ácido y muy alcalinolábiles y susceptibles, por lo tanto, de hidrólisis, dentro de una estrecha zona de pH óptimo, próxima a 7. Pero con todo y reconocer el interés de la disponibilidad de ésteres fosfóricos de estas propiedades para su empleo como substrato en las investigaciones fosfatásicas, no por eso dejamos de reconocer también que se trata tan sólo de un primer paso obligado para aproximarnos cada vez más, en lo posible, al estudio de los procesos fosfatásicos en condiciones de comparabilidad con las de los medios biológicos internos del organismo, cuyo ideal de reproducirlas experimentalmente debe constituir, en nuestro concepto, la aspiración suprema, como tal ideal, en esta clase de trabajos.

Parte teórica

A. Desjober, en un interesante y bien documentado trabajo sobre la hidrólisis química de los monoésteres fosfóricos (2), coincide con nosotros respecto a la estabilidad de los mismos, y ha puesto en evidencia y estudiado detalladamente con numerosos ejemplos demostrativos la influencia manifiesta ejercida por los grupos funcionales que soporta el radical orgánico de los ésteres, sobre la estabilidad del enlace éster fosfórico, en función del pH del medio.

Como consecuencia de sus estudios clasifica los monoésteres fosfóricos, según los resultados por él obtenidos, en tres categorías, dependientes de que posean o no los mismos alguna función carbonilo libre o la función pseudoaldehídica de la glucosa esterificada. Precisamente los que poseen una función carbonilo libre se caracterizan por ser alcalino y ácidolábiles, según dicho autor, de acuerdo con nuestros trabajos.

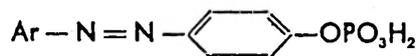
Pero el grupo carbonilo desempeña un papel de importancia fisiológica extraordinaria, por su intervención en los procesos químicos del metabolismo intermediario, fundada especialmente en la tautomería cetoenólica de compuestos capaces de reaccionar mediante la misma. Existen, como es sabido, otros tipos de tautomería muy similares, pero todos ellos caracterizados precisamente por la gran influencia que ejerce el pH del medio, como causa que es esencialmente determinante de la mayor o menor estabilidad de una de las dos formas tautómeras en equilibrio, respecto a la otra, ocurriendo de este modo procesos químicos con gran suavidad al resultar favorecida por el pH del medio la ten-

dencia al predominio de la forma tautomera capaz de reaccionar; pero quedando inhibida, en cambio, dicha tendencia por ligeras variaciones desfavorables del pH del medio, comprendidas dentro de la zona de estabilidad de una u otra forma. De este modo, mediante variaciones muy ligeras del pH del medio, se pueden provocar suavemente grandes transformaciones químicas irreversibles (7).

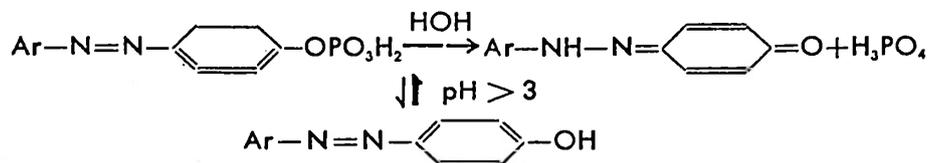
Partiendo de esta idea fundamental, iniciamos desde hace tiempo una serie de investigaciones sobre substratos cromógenos (5), siendo objeto de atención nuevos ésteres ortofosfóricos de mono y dihidroxifucsonas, que obtuvimos por primera vez y que nos hicieron entrever la posibilidad de síntesis de otros substratos cromógenos mucho más rápidamente hidrolizables por la acción de las fosfatasas, recurriendo al empleo de monoésteres ortofosfóricos, cuyo hidróxilo esterificado fuera asimismo lábil, por su tendencia a transformarse en grupo quinónico al ser liberado hidrolíticamente, según el pH del medio. Nos propusimos, en una palabra, obtener ésteres fosfóricos, por cuya constitución química especial fueran simultáneamente muy ácido y muy alcalinolábiles y derivados, además, de colorantes universalmente cromógenos, capaces, por lo tanto, de desarrollo de color a cualquier pH y de aplicación general al estudio de los procesos hidrolíticos, indistintamente por la acción de las fosfatasas ácidas y alcalinas, incluso en determinaciones paralelas.

Y partiendo de esta idea fijamos nuestra atención en los colorantes monohidroxiázoicos, cuyos isómeros *para* son muy fáciles de obtener, como es sabido, mediante copulación de las sales de diazonio correspondientes con el fenol y derivados, pero que por los hechos expuestos en un trabajo anterior (5), tuvimos que recurrir a un método indirecto para la síntesis de los respectivos ésteres fosfóricos, copulando al efecto las sales de diazonio correspondientes con el fenilfosfato sódico y obteniendo de este modo varios ésteres aril-azo-fenilfosfóricos, cuyas propiedades químicas y comportamiento como sustrato para fosfatasas estudiamos detalladamente en dicho trabajo.

A los ésteres aril-azo-fenilfosfóricos estudiados por nosotros, les corresponde la siguiente constitución química, que hemos demostrado experimentalmente (5):



La hidrólisis de los mismos debe ocurrir del modo siguiente:



Por lo tanto, en una zona de valores de pH superiores a 3, dentro de los observados por nosotros, estos procesos hidrolíticos son irreversibles contrariamente a lo que ocurre en general en la hidrólisis de los ésteres. La irreversibilidad de dichos procesos se observa experimentalmente, puesto que se completan siempre al operar en las condiciones de pH indicadas, a juzgar por el hecho de alcanzarse la misma intensidad de color en las disoluciones del colorante liberado hidrolíticamente, que en las de igual concentración del colorante obtenidas substituyendo el fenilfosfato sódico por el fenol purísimo, para copularlo con la misma sal de diazonio, en identidad de condiciones experimentales, que conduce a la síntesis directa del mismo colorante.

Todos estos ésteres aril-azo-fenilfosfóricos, al igual que los colorantes monohidroxiázoicos correspondientes, ofrecen la interesante propiedad, para su aplicación en investigaciones biológicas, de no inhibir los procesos enzimáticos y de ser perfectamente tolerados por los animales de experimentación, incluso a dosis masivas por vía endovenosa, a diferencia del fenol y del fenilfosfato sódico, ya que, al inyectar a lotes de ratas cantidades mínimas de fenol, del orden del milígramo por kilo de peso del animal, acusan rápidamente los síntomas de la conocida intoxicación, mientras que la acción del fenilfosfato sódico es muchísimo más lenta (unos treinta minutos), administrado a dosis del orden de un gramo por kilo de peso de animal. Este hecho demuestra que el fenilfosfato sódico es hidrolizado con lentitud manifiesta a los pH de los medios internos biológicos del organismo (6) y ofrece una prueba concluyente, en nuestro concepto, en apoyo de la conveniencia de elegir como substrato en esta clase de investigaciones ésteres cuyas propiedades sean lo más similares posible a las de los substratos que intervienen en los procesos metabólicos, conforme con nuestras consideraciones teóricas expuestas al principio de este trabajo.

Discusión y conclusiones

En todo este trabajo se habrá observado nuestra preferencia por emplear el término *procesos fosfatásicos*, en lugar de referirnos a la fosfatasa o al substrato exclusivamente, puesto que las fosfa-

tasas, como todos los enzimas, no constituyen entidades aisladas en la complejidad de las reacciones catalíticas en que intervienen. Conforme se habrá podido apreciar mediante los hechos expuestos precedentemente en este trabajo, tales reacciones catalíticas constituyen un todo o conjunto indivisible con el substrato y con el medio en que se realiza el proceso correspondiente.

Es, por lo tanto, muy arriesgado, 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 substrato y el medio en que el proceso ocurre y demás condiciones coadyuvantes. Debe, pues, hablarse exclusivamente, en nuestro concepto, de procesos fosfatásicos o enzimáticos en general, puesto que son los procesos los que tienen una realidad biológica, mas no, en cambio, los componentes aislados de las mezclas reaccionantes determinantes de dichos procesos.

Lo que es válido para unos procesos, o sea para los enzimas frente a unos substratos, en determinadas condiciones, no es siempre válido, ni mucho menos, conforme es sabido, al variar cualquiera de dichos factores.

Porque desde que se conoce la existencia de modelos artificiales de fosfatasa que permiten la realización «in vitro» de procesos hidrolíticos similares a los que también «in vitro» provocan los preparados fosfatásicos de origen natural, no puede afirmarse, en nuestro concepto, que la acción «in vitro» de las fosfomonoesterasas sea precisamente específica.

Sobre estos modelos de fosfatasa vienen trabajando asiduamente desde hace tiempo Lora Tamayo y colaboradores, como consecuencia de las publicaciones iniciales de Langenbeck sobre modelos de fermentos (3). Lora Tamayo y Martín Municio, en una serie de investigaciones con modelos de fosfatasa, emplean, entre otros, como modelos, precisamente los ácidos *orto* y *para*-aminobenzoicos y el ácido nicotínico, sobre un substrato de glicerofosfato sódico, en las condiciones operatorias descritas por dichos autores (4).

Nosotros tenemos ya iniciados trabajos, administrando con los alimentos dosis masivas de los ácidos *para*-aminobenzoico y nicotínico a lotes de ratas dispuestas al efecto. Sacrificados los animales al cabo de unos diez días de tratamiento, se observan valores anormales de la fosfatasemia en el suero sanguíneo de los mismos, comparado con el procedente de ratas testigo, operando según el método de King y perfectamente acusados mediante nuestro propio método, todavía en estudio.

Añadidos directamente estos dos ácidos a muestras de sangre recién extraída y obtenido el suero correspondiente, resulta la

fosfatemia del mismo considerablemente aumentada, siendo mucho mayor el efecto producido por el ácido *para*-aminobenzoico.

La administración de salicilato sódico a los animales de experimentación también provoca valores anormales de la fosfatemia en el suero sanguíneo de los mismos.

Estos hechos tienen particular interés, puesto que la acción sobre la actividad fosfatásica del suero, ejercida por diversas sustancias administradas por ingestión a animales de experimentación, fué estudiada hace años por Bodansky (1), observando diferencias notables sobre los valores normales, según las sustancias ensayadas. Admitió dicho autor la posibilidad de una superproducción de fosfatasa intestinal, pasando el exceso al torrente circulatorio, y sugiere la idea de que la fosfatasa sérica normal es de origen diverso.

En realidad se ha escrito mucho sobre la llamada fosfatasa sérica, pero nada concreto se sabe sobre la misma. La propia complejidad del suero sanguíneo es un factor decisivo a tener muy en cuenta, por la cantidad de metabolitos y de sustancias diversas, incluso anormales o patológicas, que puede contener, capaces de influir sobre la hidrólisis de los ésteres fosfóricos que se emplean como sustrato.

Lo mismo podemos decir respecto a la acción ejercida por determinados electrólitos, especialmente ciertas sales metálicas, sobre los procesos hidrolíticos de los ésteres, ya que son frecuentes en química orgánica fenómenos de activación o de inhibición provocados por sales metálicas, según la constitución química del éster y la composición del medio en que el proceso ocurre. Lo importante es, pues, saber en cada caso qué factores son los de tipo puramente químico y qué otros factores son los netamente bioquímicos. Y el único modo de saberlo es emplear como sustrato ésteres fosfóricos, previo un estudio minucioso de la hidrólisis química de los mismos en diversas condiciones experimentales y en presencia de todas las sustancias capaces de influir sobre la marcha del proceso hidrolítico correspondiente que se consideren de interés para el futuro empleo de los ésteres como sustrato. Sólo de este modo será posible descartar la influencia de los factores de tipo puramente químico, para que aparezca la evidencia de los que sean netamente bioquímicos.

Pero, desgraciadamente, muy poco o casi nada se ha hecho a este respecto, según es de ver en la literatura especial, muy abundante por cierto, a excepción de los trabajos que de un modo sistemático vienen realizando desde hace tiempo los profesores Fleury, Courtois, Desjobert y colaboradores en el Instituto de Química Biológica de la Facultad de Farmacia de París, salvo

que existan otros autores que se ocupen del mismo tema, pero de los que no tenemos noticia.

Y estos hechos tienen particular interés, en nuestro concepto, si se considera que la constitución de las fosfatasa es todavía objeto de discusión. Precisamente J. Roche y Simone Bouchilloux, en un trabajo reciente (8) sobre la purificación de la fosfatasa alcalina de intestino y su electroforesis sobre papel, consiguen resultados desfavorables a diversas hipótesis formuladas respecto a la composición o a la estructura de la fosfatasa alcalina. Según dichos autores, la fosfatasa por ellos obtenida es una proteína, en la cual ningún coenzima ha podido ser identificado. Afirman ser poco probable que las hipótesis formuladas hasta el presente sobre la naturaleza de la fosfatasa orgánica (nucleótido, pirofosforilcolina, histidina, poliósido) puedan ser retenidas, por razón de los caracteres analíticos que presentan las preparaciones del enzima purificado.

Nos encontramos con que se habla frecuentemente de fosfatasa y de preparados puros o purificados de fosfatasa, como si en realidad las fosfatasa constituyeran una especie o entidad fisicoquímica definida. Nos parecería mucho más lógico no hablar de fosfomonoesterasas, sino de preparados de acción fosfomonoesterásica, mientras no se hayan logrado resultados concluyentes sobre la constitución de las mismas que permitan descartar la influencia de otros factores no fosfomonoesterásicos sobre los procesos hidrolíticos correspondientes. Y ello representa, evidentemente, el empleo como sustrato de sustancias cuya hidrólisis química se haya estudiado a fondo, en diversas condiciones experimentales, lo más similares posible a las de los medios internos biológicos.

Nosotros, por ejemplo, a la llamada fosfatasaemia en suero, no le damos más valor que el que pueda tener para el clínico el hecho de la presencia en el suero sanguíneo de ciertas sustancias que, en determinadas condiciones, según los métodos que se apliquen, ejercen acción hidrolítica sobre los monoésteres ortofosfóricos que se emplean como sustrato por los autores de dichos métodos, puesto que dicha acción es más o menos intensa en sueros procedentes de individuos enfermos, según los síndromes, con arreglo a datos experimentales aportados por diversos autores y que son los que dan valor clínico a la llamada fosfatasaemia en suero.

Respecto a la interpretación que deba darse a todos estos hechos, nuestra posición no es ni negativa ni afirmativa. Tampoco puede ser otra, en nuestro concepto, dado el estado actual de los conocimientos sobre los procesos fosfomonoesterásicos, que ofrecen, conforme se habrá observado, amplio campo a la investigación, y a ello obedece la gran atención que les venimos prestando desde hace tiempo.

Resumen

Como consecuencia de los trabajos que viene realizando el autor sistemáticamente sobre los procesos fosfatásicos, se hace una revisión crítica de los conocimientos actuales respecto a los mismos, fundada en la comparación con los del autor, de hechos experimentales observados por otros autores.

Summary

As consequence of previous investigations accomplished by the author about de phosphatasic processes, a critical revision of the actual knowledge concerning the sames is made, based in the comparison of the experimental facts observed by others authors.

Bibliografía

1. BODANSKY, A. : *The Journ. of Biol Chem.* **104** : 473, 1934.
2. DESJOBERT, A. : *Contribution a l'étude de l'hydrolyse chimique des monoesters orthophosphoriques.* Thèse pour le grade de Docteur ès Sciences Physiques. Université de Paris. (Imprimerie Declume, Lons-le-Saunier, 1951.)
3. LANGENBECH, C. : *Ber.* **67** : 382, 1934.
4. LORA TAMAYO, M. y MARTÍN MUNICIO, A. : *Anales R. Sdad. Espa Física y Quím.* **B-46** y **47** : 55 y 143, 1950 y 1951.
5. MONCHE, J. : *R. esp. Fisiol.* **6** : 239, 1950 ; **7** : 229, 1951 ; *Anales R. Sdad. Españ. Física y Quím.* **B-48** : 499, 1952.
6. MONCHE, J. y FERRER ARENILLAS, MAGDALENA : *R. esp. Fisiol.* **8** : 131, 1952 ; **8** ; 225, 1952.
7. REMICK, A. E. : «Electronic Interpretations of Organic Chemistry» «Wiley, New York, 1947).
8. ROCHE, J. y BOUCHILLOUX, S. : *Boull Soc. Chim. Biol.* **35** ; 572, 1953.
9. WINKLER y BUNGENBERG DE JONG : *Arch. Néerland. Physiol.* **25** ; 431, 1941.

