

Sección de Fisioparasitología
Instituto «López-Neyra» de Parasitología (C.S.I.C.)
Cátedra de Medicina Legal
Facultad de Medicina de Granada

Estudio sobre las fosfatasa ácidas de la glándula prostática. — II. Factores que influyen en la actividad enzimática; caracteres estructurales

por

J. López-Gorgé y E. Villanueva *

(Recibido para publicar el 18 de octubre de 1967)

En un trabajo anterior (*R. esp. Fisiol.*, 24, n.º 1, 1968) hemos hecho una completa revisión del punto en que se encuentran las investigaciones sobre fosfatasa ácidas, con especial dedicación a las enzimas existentes en la próstata humana. En dicho trabajo exponíamos con detalle la técnica que nos ha permitido aislar y purificar dos fracciones enzimáticas con actividad fosfatásica ácida a partir de próstatas humanas hipertróficas. Analizando comparativamente las características cinéticas de ambas, llegábamos a la conclusión de que se trataba de dos enzimas diferentes.

En este trabajo continuamos el estudio comparativo de ambas fosfatasa ácidas, haciendo hincapié en el análisis de algunos factores que afectan a la actividad enzimática. Finalmente, hemos realizado experiencias orientadas a aclarar las características estructurales de la molécula de las dos enzimas.

Material y métodos

NATURALEZA DEL SUSTRATO. Fueron ensayados en su comportamiento frente

a los dos preparados de fosfatasa ácida 22 sustratos distintos, cuyos restos orgánicos ligados al radical fosfato pertenecían a estructuras químicas muy diversas: p-NO₂-fenil-fosfato (Boehringer & Soehne), tetracolin-fenil-fosfato (Merck), fenil-fosfato (Merck), piridoxal-fosfato (Sigma), flavinmononucleótido (Boehringer & Soehne), adenosinmonofosfato (Sigma), fosfoenolpiruvato (NBCo), beta-glicerofosfato (Analema), adenosintrofosfato (Boehringer & Soehne), pirofosfato (Riedel), adenosindifosfato (Sigma), inosintrifosfato (Sigma), fructosa-1-fosfato (NBCo), fructosa-1,6-difosfato (NBCo), glucosa-1-fosfato (NBCo), carbamil-fosfato (Boehringer & Soehne), creatinofosfato (Calbiochem), NAD (Boehringer & Soehne), NADP (Sigma), coenzima A (Sigma), lombricina y serina-etanolamina-fosfodiéster (estos dos últimos compuestos amablemente suministrados por el Prof. A. H. Ennor, del Departamento de Bioquímica, John Curtin School of Medical Research, Canberra, Australia).

* Becario de Protección Escolar.

Todos ellos fueron utilizados a una concentración en la mezcla de incubación $1,14 \times 10^{-3}$ M, disueltos en tampón M/20 cítrico-citrato $pH = 4,8$ frente a las soluciones enzimáticas disueltas en agua destilada. Las mezclas de incubación contienen: solución sustrato (1 ml) y solución enzimática (0,2 ml), siendo el tiempo de reacción de 30 minutos a 37° . Salvo en el caso del p-NO₂-fenilfosfato, en que se midió el p-nitro-fenol liberado según BESSEY y LOWRY (21), en los demás se determinó la actividad enzimática por medida del fósforo inorgánico según FISKE y col.; para cada sustrato se preparó el correspondiente blanco, con agua destilada en lugar de solución enzimática.

FILTRACIÓN MOLECULAR POR SEPHADEX Y DETERMINACIÓN DEL PESO MOLECULAR. Se utilizó para la determinación del peso molecular aproximado de las dos fosfatasa ácidas aisladas la técnica de filtración molecular a través de columnas de gel de dextrano, de acuerdo con WHITAKER (69), AURICHCHIO y col. (11) e IWATSUBO y col. (37). Se empleó una columna de 50×3 centímetros cargada de Sephadex G-100 y equilibrada con solución tampón cítrico-citrato M/10 $pH = 5,5$, que era al mismo tiempo M en ClNa (29). Esta misma solución se empleó para la elución, una vez depositada la muestra sobre la columna disuelta en ella (2 ml); la tasa de goteo fue de 0,5 ml por min, recogándose fracciones de 4 ml en un colector automático. Sobre todas ellas se determinaron proteínas y actividad fosfatásica ácida, según las técnicas descritas en el trabajo anterior, localizándose el tubo de máxima actividad y, por tanto, el volumen de solución tampón necesario para provocar la elución del enzima.

Paralelamente, y sobre la misma columna, se efectuó una filtración molecular de una solución standard de proteínas de peso molecular conocido y suficientemente escalonados. Se usaron 5 mg de cada una de las siguientes, disueltos en

2 ml de la solución tampón $pH = 5,5$ anterior (9): citocromo c (p.m. = 12.400; Sigma), albúmina de huevo (p.m. = 45.000; Merck), albúmina sérica bovina (p.m. = 67.000; Calbiochem) y gamma-globulina (p.m. = 160.000; Huber). La elución y recogida de fracciones se llevó a cabo en las mismas condiciones anteriores; se determinaron proteínas y se calcularon los volúmenes de tampón necesarios para provocar la elución de cada una de estas proteínas standard.

Por interpolación de los valores hallados anteriormente los encontrados ahora para los standard, se calcularon los pesos moleculares de las proteínas enzimáticas.

RESISTENCIA TÉRMICA DEL ENZIMA. De los dos preparados enzimáticos, que se conservaban liofilizados a 0 grados, se fueron tomando muestras a los siguientes tiempos: 12 horas, 1 día, 3 días, 7 días, 15 días, 1 mes, 2 meses y 3 meses de efectuarse la liofilización. Se disolvieron en agua destilada, determinándose proteínas y actividad fosfatásica ácida. Las actividades específicas así calculadas se compararon con las correspondientes al tiempo 0, inmediatamente después de efectuarse la liofilización.

Por otro lado, se prepararon dos soluciones en agua destilada de ambos enzimas, se determinaron proteínas y actividades, y alícuotas de las mismas se mantuvieron a las siguientes temperaturas: 60, 37, 25, 4, 0 y -8 grados, durante los tiempos: 30 minutos, 1 hora, 2 horas, 4 horas, 7 horas, 12 horas, 1 día, 3 días y 7 días. Al cabo de ellos se determinaron actividades enzimáticas y se compararon con las correspondientes al tiempo 0 de disolución.

INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA; CONSTANTE DE ACTIVACIÓN. Se efectuaron series de incubaciones a las temperaturas de 4, 13, 22, 37 y 47 grados, con tiempos de reacción de 2, 4, 6, 8, 10, 15, 20 y 30

minutos para cada serie. Las mezclas reaccionantes constaban de: sustrato p-NO₂-fenil-fosfato 1,37 × 10⁻³ M en solución tampón cítrico-citrato M/20 pH = 4,8 (1 ml) y solución enzimática en agua destilada (0,2 ml). Las reacciones se detuvieron a los tiempos indicados, y se determinó la cantidad de p-NO₂-fenol liberado en cada caso.

Se calcularon las velocidades iniciales de reacción para cada temperatura, y, de acuerdo con la ecuación de Arrhenius, se obtuvo en un sistema coordinado la representación gráfica de los valores de 1/T frente a los de log v. Según dicha ecuación:

$$\log v = \frac{-E}{2,303 \times R} \cdot \frac{1}{T} + K$$

es posible determinar gráficamente en la recta obtenida el valor de la pendiente $-E/2,303 \times R$, y a partir de él el valor de la energía de activación E del enzima.

ACTIVADORES. Fueron ensayados como posibles activadores enzimáticos de la fosfatasa ácida los cationes Mg²⁺, Ca²⁺, Mn²⁺, Zn²⁺, Ni²⁺ y Co²⁺. Todos fueron usados en forma de cloruros, y a concentraciones finales en la mezcla de incubación de: 5,62 × 10⁻³ M, 1,14 × 10⁻³ M, 0,22 × 10⁻³ M, 0,04 × 10⁻³ M y 0,02 × 10⁻³ M; el sustrato fue el p-NO₂-fenil-fosfato a concentración final 1,14 × 10⁻³ M disuelto, al igual que los activadores, en tampón cítrico-citrato M/20 pH = 4,8. Las mezclas de incubación estaban constituidas por: sustrato 2,75 × 10⁻³ M (0,5 ml), activador a las concentraciones 13,5 × 10⁻³ M, 2,75 × 10⁻³ M; 0,54 × 10⁻³ M, 0,11 × 10⁻³ M y 0,05 × 10⁻³ M (0,5 ml) y solución enzimática (0,2 ml). Los tiempos de incubación fueron de 30 minutos a 37 grados, determinándose el p-NO₂-fenol según es habitual. Los resultados obtenidos, comparados con los suministrados por testigos preparados de forma análoga, pero en los que la solución de activador estaba sustituida por

solución tampón, permitieron calcular los porcentajes de activación o inhibición.

INHIBIDORES. Hemos empleado una amplia gama de sustancias descritas en la bibliografía enzimática como posibles inhibidores. El montaje de los ensayos de incubación fue en todo análogo al descrito para el caso de los activadores, habiéndose utilizado las mismas concentraciones.

Han sido ensayados: anhídrido arsenioso, p-Cl-mercuribenzoato, 2,4-dinitrofenol, iodoacetamida, fluoruro sódico, azida de sodio, cianuro potásico, hidroxilamina, fenilhidrazina, semicarbazida, tiourea, EDTA, acroleína, ácido tartárico, ácido málico, ácido succínico, ácido maleico, ácido fumárico, ácido malónico, ácido oxálico, ácido isocítrico, ácido cítrico y cloruro mercúrico.

La acción inhibidora del p-Cl-mercuribenzoato ha sido estudiada con detalle en presencia de cisteína, glutatión y BAL como antiinhibidores. Como sustrato se empleó el p-NO₂-fenil-fosfato a concentración final en las mezclas de incubación de 1,14 × 10⁻³ M. El p-Cl-mercuribenzoato se usó en estas experiencias a tres concentraciones distintas: 5,62 × 10⁻³ M, 0,22 × 10⁻³ M y 0,02 × 10⁻³ M, en las mezclas de incubación. Estas mismas concentraciones se usaron para los tres compuestos azufrados, ensayándose cada concentración de inhibidor frente a cada una de las concentraciones de los tres antiinhibidores.

Las mezclas de incubación estaban constituidas de la siguiente forma: sustrato 2,75 × 10⁻³ M y antiinhibidor a concentraciones 13,5 × 10⁻³ M, 0,54 × 10⁻³ M y 0,054 × 10⁻³ M, en solución tampón cítrico-citrato M/20 pH = 4,8 (0,5 ml); inhibidor a concentraciones 13,5 × 10⁻³ M, 0,54 × 10⁻³ M y 0,054 × 10⁻³ M, en solución tampón cítrico-citrato M/20 pH = 4,8 (0,5 ml); solución enzimática (0,2 ml).

Los tiempos de incubación fueron de 30 minutos a 37 grados. Paralelamente se

prepararon testigos, unos sin antiinhibidor y otros sin antiinhibidor ni inhibidor. Con todos estos valores se calcularon los porcentajes de inhibición que se producían por el p-Cl-mercuribenzoato, tanto en ausencia de compuestos tiólicos como en presencia de cada una de las concentraciones de ellos.

COMPOSICIÓN EN AMINOÁCIDOS DE LA PROTEÍNA ENZIMÁTICA. Preparados altamente purificados de ambas fosfatasas se sometieron a hidrólisis ácida con clorhídrico a concentración final 6N, por ebullición a reflujo durante 12 horas. En los hidrolizados se eliminó el clorhídrico por sucesivas evaporaciones a vacío en baño maría.

El análisis de aminoácidos se efectuó mediante una técnica (47) que implicaba los siguientes pasos. Un acoplamiento bidimensional: electroforesis a $pH = 3,9$ en tampón piridina:á. acético:agua (3:10:487), seguido de cromatografía ascendente en el sistema n-butanol:á. acético:agua (12:3:5), para la separación de los aminoácidos ácidos y fracciones globales de aminoácidos neutros y básicos. Un

acoplamiento bidimensional: electroforesis a $pH = 2,7$ en tampón á. acético N/4, seguido de cromatografía ascendente en el sistema n-butanol:á. acético:agua (12:3:5), para la individualización en la fracción de aminoácidos neutros anteriores. Y una electroforesis monodimensional a $pH = 11,7$ en tampón amoníaco N, para la individualización en la fracción de aminoácidos básicos anteriores.

El revelado se efectuó con ninhidrina y la dosificación cuantitativa por elución de las manchas de aminoácidos en acetona-agua y lectura espectrofotométrica a 570 milimicras.

Resultados

En la tabla I se reseñan los resultados obtenidos usando una serie de 22 sustratos diferentes, agrupados según sus características químicas estructurales. Además de las actividades específicas, se indican los porcentajes de actividad, respecto al p-nitro-fenil-fosfato, para cada uno de ellos.

TABLA I

Influencia de la naturaleza del sustrato sobre la actividad de las fosfatasas I y II de prótata. Valores expresados en actividades específicas (A. E.) (moles de P liberados por miligramo de proteína durante 30 minutos de incubación a 37° , frente a una concentración de sustrato $1,14 \times 10^{-3}$ M en tampón citrato $pH = 4,8$); se indica también el % de actividad respecto a la que se obtiene frente al p-NO₂-fenil-fosfato.

Carácter químico de los enlaces	Sustrato $1,14 \times 10^{-3}$ M	Fosfatasa I		Fosfatasa II	
		A. E. $\times 10^{-7}$ M	Actividad %	A. E. $\times 10^{-7}$ M	Actividad %
P-OH fenólicos	p-NO ₂ -fenil-fosfato	15,0	100	1,5	100
	tetracolamín-fenolftaleín-difosfato	22,0	148	2,2	143
	fenil-fosfato	14,2	95	1,5	95
P-OH de heterociclo	piridoxal-fosfato	8,5	57	0,7	44
P-OH de ribosa	flavín-mononucleótido	4,9	32	0,2	13
	adenosín-monofosfato	2,8	19	—	—
P-restos de 3C	fosfoenolpiruvato	1,5	10	—	—
	beta-glicerofosfato	1,5	10	—	—
P-P y P-OH de ribosa internos	adenosín-trifosfato	1,0	7	—	—
	pirofosfato	0,9	6	—	—

La figura 1 constituye una representación gráfica del proceso de filtración molecular a través de la columna de Sephadex G-100. Vienen indicadas las cantidades de proteínas eluidas en cada tubo para

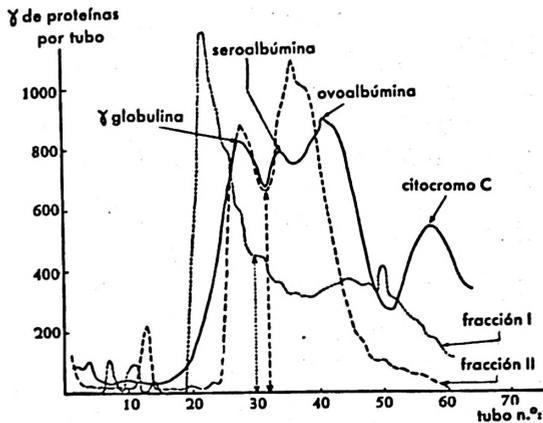


FIG. 1. Proceso de filtración molecular por columna de Sephadex G-100 (50 X 3 cm); condiciones en el texto.

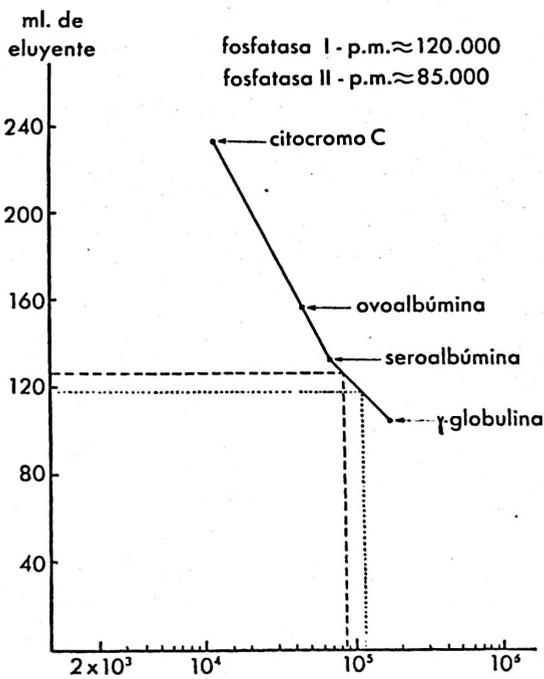


FIG. 2. Cálculo gráfico del peso molecular de las fosfatasa I y II.

las fracciones fosfatásicas I y II, así como para la solución standard de proteínas conocidas. Al mismo tiempo se indican los tubos de máxima actividad enzimática, el 30 para la fracción I y el 32 para la II.

En la figura 2 viene representado el esquema gráfico de cálculo de los pesos moleculares de ambos enzimas por interpolación de sus volúmenes de elución, 118 y 126 ml de solución tampón, respectivamente, para los enzimas I y II, en el ábaco construido a partir de los pesos moleculares y volúmenes de elución de las proteínas standard.

La oscilación de la actividad enzimática para los preparados enzimáticos de fosfatasa ácida I y II liofilizados, en función del tiempo, viene a mostrar la absoluta estabilidad que presentan estos enzimas al estado de liofilizados, al menos

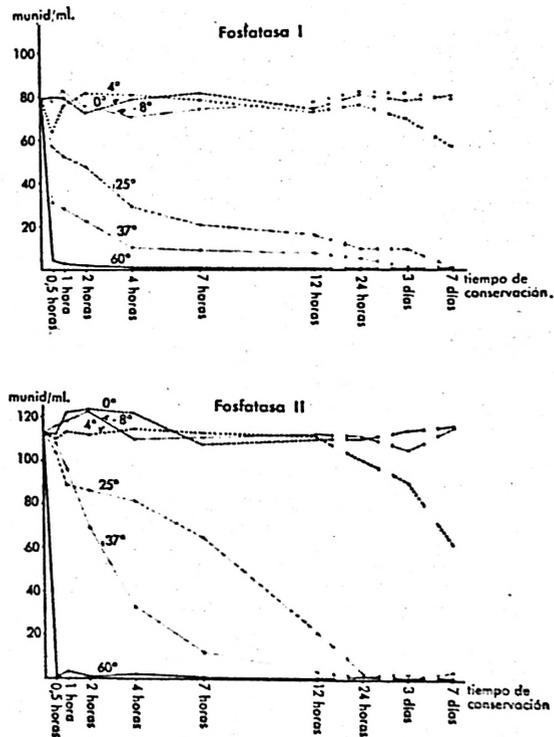


FIG. 3. Estabilidad térmica de las fosfatasa I y II en solución acuosa; condiciones en el texto.

TABLA II

Influencia de la temperatura de incubación sobre la actividad de las fracciones enzimáticas I y II. Valores expresados en moles de sustrato transformados (p-NO₂-fenil-fosfato a una concentración 1,14 × 10⁻³ M en las mezclas reaccionantes) después de incubaciones a 37° durante los tiempos indicados en tampón citrato pH = 4,8. Se indica también la velocidad inicial de reacción a cada temperatura.

Incubación grados	× 10 ⁻⁷ M de sustrato transformado en los tiempos, (min)								v _i M/min	log (10' × v _i)	10 ³ /T
	2	4	6	8	10	15	20	30			
Fosfatasa I											
4	2,1	3,7	5,6	6,7	8,0	9,3	10,5	13,1	1,07	0,0294	3,61
13	3,6	6,4	9,1	12,4	13,6	14,3	14,6	14,6	1,80	0,2553	3,47
22	5,2	9,3	11,5	14,0	14,3	14,4	14,7	14,6	2,60	0,4150	3,39
37	11,9	14,3	14,5	14,5	14,6	14,5	14,3	14,1	5,95	0,7745	3,22
47	14,4	14,7	14,7	14,7	14,5	14,6	14,5	14,7	7,20	0,8573	3,12
Fosfatasa II											
4	1,2	3,1	4,0	4,9	5,6	7,0	7,7	8,3	0,60	-0,2218	3,61
13	4,4	5,3	6,4	6,9	9,1	11,2	13,2	14,2	2,22	0,3464	3,47
22	5,4	6,6	9,1	9,6	12,5	14,4	14,6	14,8	2,72	0,4346	3,39
37	8,1	11,1	14,6	14,4	14,8	15,2	14,8	15,0	4,05	0,6075	3,22
47	10,9	14,2	14,8	14,6	14,6	14,8	15,6	15,4	5,45	0,7364	3,12

hasta un período de 3 meses, que fue el máximo tiempo de conservación ensayado.

Por otro lado, la figura 3 nos muestra la estabilidad térmica que presentan ambos enzimas en solución, en función del tiempo.

Para el cálculo de las constantes de activación de las fosfatasas ácidas I y II de tejido prostático se han obtenido los valores de la tabla II. En ella se exponen las concentraciones de sustrato transformadas en diferentes tiempos de incuba-

ción, y a diferentes temperaturas reaccionantes. Se incluyen también las velocidades iniciales de reacción calculadas a partir de estos datos.

La representación gráfica de este cuadro de valores aparece en las figuras 4 y 5, junto con el sistema coordinado de 1/T frente a log v¹ y cálculo gráfico de las constantes. De esta forma se han obtenidos los valores 7.590 calorías/mol. y 5.120 calorías/mol., para las fosfatasas I y II, respectivamente.

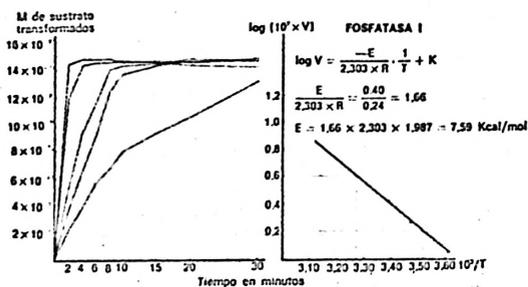


FIG. 4. Influencia de la temperatura de incubación sobre la actividad enzimática y cálculo de la energía de activación del enzima (fosfatasa ácida I); condiciones en el texto.

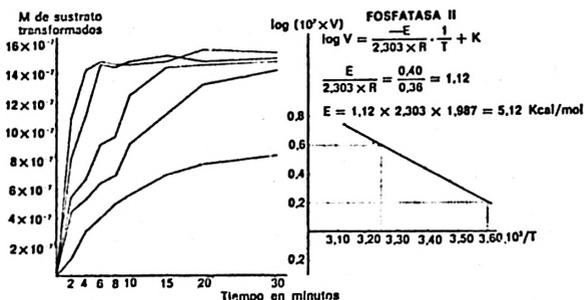


FIG. 5. Influencia de la temperatura de incubación sobre la actividad enzimática y cálculo de la energía de activación del enzima (fosfatasa ácida II); condiciones en el texto.

TABLA III

Acción activante o Inhibidora de diferentes iones metálicos, a distintas concentraciones, sobre las fosfatasa I y II. Valores expresados en moles de sustrato transformados (p-NO₂-fenil-fosfato a una concentración 1,14 por 10⁻³ M en las mezclas reaccionantes) después de incubaciones a 37° durante 30 minutos en tampón citrato pH = 4,8. Se indica también el % de inhibición respecto a un testigo sin ningún ion agregado.

Ion (5,62 × 10 ⁻³ M)	Fosfatasa I		Fosfatasa II	
	× 10 ⁻⁷ M liber.	Inhibición %	× 10 ⁻⁷ M liber.	Inhibición %
control	11,2	—	13,5	—
Mg ²⁺	3,0	73	11,8	—
Ca ²⁺	5,8	48	13,2	—
Zn ²⁺	4,8	57	13,2	—
Ni ²⁺	3,2	71	10,2	24
Co ²⁺	5,0	55	12,8	—

La influencia activante o inhibidora que sobre las fosfatasa ácidas aisladas ejercen los cationes ensayados, viene expuesta en la tabla III.

La capacidad inhibidora ejercida por numerosos agentes químicos sobre las fosfatasa ácidas prostáticas se indica en la tabla IV, con expresión del porcentaje de inhibición calculado respecto a una prueba testigo.

En la tabla V aparecen los efectos antiinhibidores que distintos compuestos sulfhidrúlicos ejercen contra la capacidad inhibidora del p-Cl-mercuribenzoato sobre las fosfatasa ácidas I y II de próstata. Además de la cantidad de sustrato transformado en todas las condiciones, vienen expresados los porcentajes de inhibición en cada caso respecto a una experiencia testigo.

La figura 6 recoge esquemáticamente

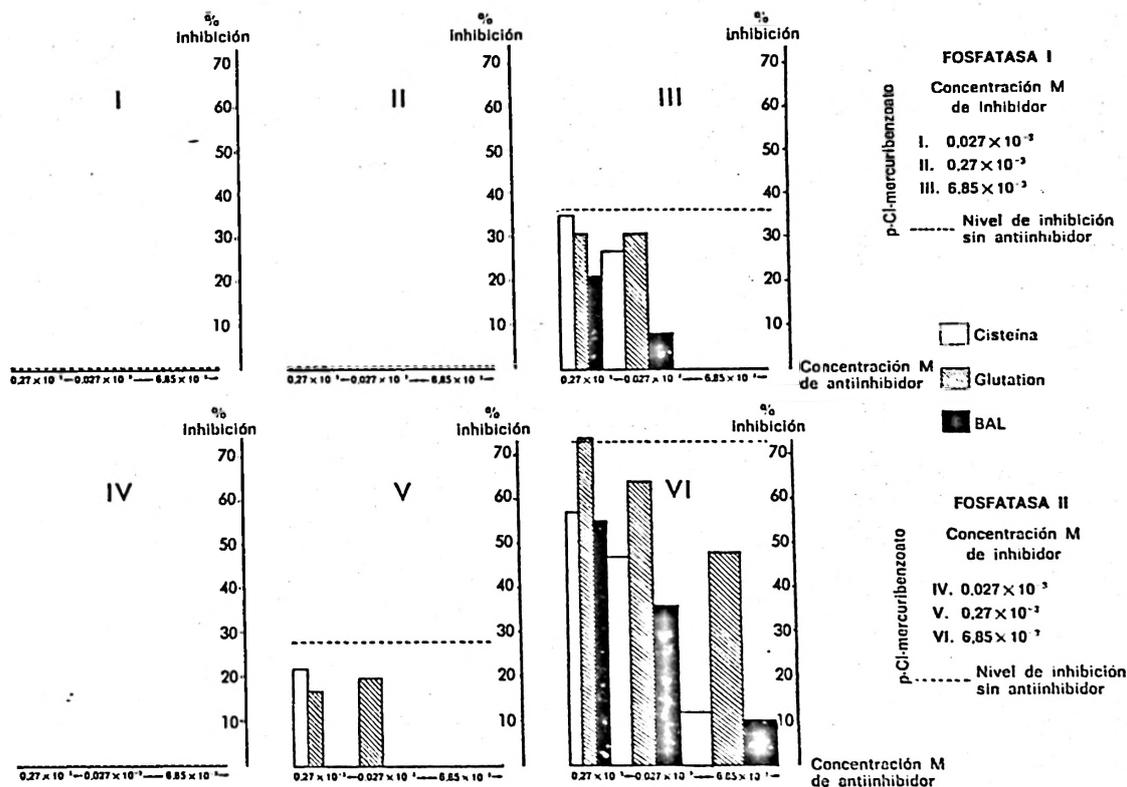


FIG. 6. Acción antiinhibidora de compuestostiólicos sobre la capacidad inhibidora del p-Cl-mercuribenzoato frente a las fosfatasa I y II; condiciones en el texto.

TABLA IV

Acción inhibitoria de diferentes agentes químicos, a distintas concentraciones, sobre las fosfatasa I y II. Valores expresados en % de inhibición respecto a un testigo sin inhibidor. Incubaciones con p-NO₂-fenil-fosfato $1,14 \times 10^{-3}$ M en tampón citrato pH = 4,8 durante 30 minutos a 37°.

Inhibidor	[$5,62 \times 10^{-3}$ M]		[$1,14 \times 10^{-3}$ M]		[$0,22 \times 10^{-3}$ M]	
	Inhibición, %		Inhibición, %		Inhibición, %	
	Fosf. I	Fosf. II	Fosf. I	Fosf. II	Fosf. I	Fosf. II
p-Cl-mercuribenzoato	44	37	49	18	29	—
Fluoruro sódico	88	83	29	—	—	—
Acido tartárico	74	50	44	—	22	—
Acido málico	22	—	—	—	—	—
Acido oxálico	45	—	—	—	—	—

TABLA V

Acción antiinhibidora de la cisteína, glutatión y BAL, frente al poder de inhibición que el p-Cl-mercuribenzoato ejerce sobre las fosfatasa I y II; ensayos efectuados a diferentes concentraciones de inhibidor y antiinhibidores. Valores expresados en % de inhibición respecto a un testigo sin inhibidor ni antiinhibidor. Incubaciones con p-NO₂-fenil-fosfato $1,14 \times 10^{-3}$ M en tampón citrato pH = 4,8 durante 30 minutos a 37°.

Antiinhibidor $\times 10^{-3}$ M	Fosfatasa I				Fosfatasa II			
	$5,62 \times 10^{-3}$ M		$0,22 \times 10^{-3}$ M		$5,62 \times 10^{-3}$ M		$0,22 \times 10^{-3}$ M	
	$\times 10^{-7}$ M liber.	Inhibición %	$\times 10^{-7}$ M liber.	Inhibición %	$\times 10^{-7}$ M liber.	Inhibición %	$\times 10^{-7}$ M liber.	Inhibición %
—	3,3	36	5,0	—	2,2	73	5,8	28
cisteína								
5,62	5,2	—	5,4	—	7,1	12	8,3	—
0,22	3,8	27	5,3	—	4,3	47	8,1	—
0,02	3,4	35	5,2	—	3,5	57	6,3	22
glutatión								
5,62	5,2	—	5,2	—	4,2	48	8,3	—
0,22	3,6	31	5,3	—	2,9	64	6,5	20
0,02	3,6	31	5,4	—	2,1	74	6,7	17
BAL								
5,62	5,5	—	5,6	—	7,3	10	8,6	—
0,22	4,8	8	5,2	—	5,2	36	7,8	—
0,02	4,1	21	5,2	—	3,6	55	8,4	—
	Testigo = $5,2 \times 10^{-7}$ M				Testigo = $8,1 \times 10^{-7}$ M			

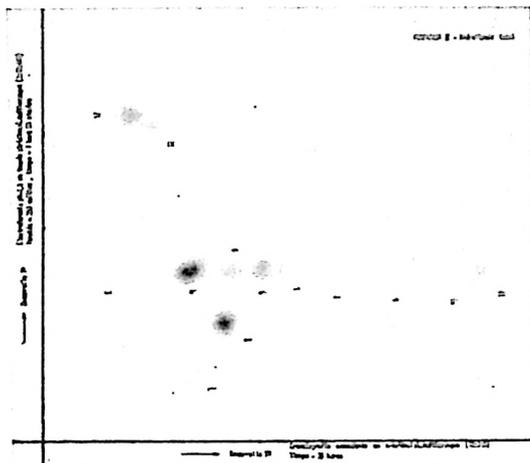


FIG. 7. Desarrollo bidimensional (electroforesis $pH = 3,9$ — cromatografía) de un hidrolizado ácido de fosfatasa ácida I; condiciones en el texto. 1, ácido aspártico; 2, ácido glutámico; 3, cisteína; 4, glicocola-serina-metionina sulfona (metionina); 5, treonina; 6, alanina; 7, prolina; 8, tirosina; 9, valina; 10, fenilalanina; 11, leucinas; 12, arginina; 13, lisina-histidina.

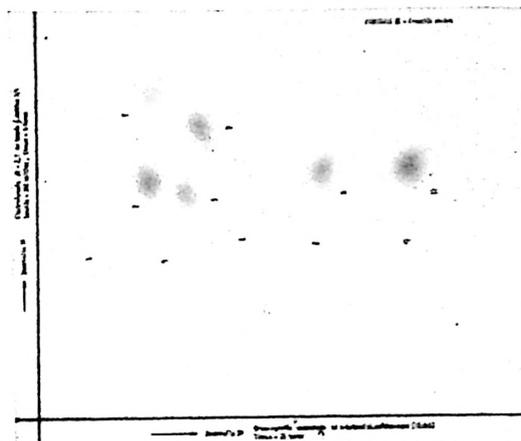


FIG. 9. Desarrollo bidimensional (electroforesis $pH = 2,7$ — cromatografía) de la fracción de aminoácidos neutros de fosfatasa ácida I; condiciones en el texto. 1, cisteína; 2, serina; 3, glicocola; 4, metionina sulfona (metionina); 5, treonina; 6, alanina; 7, prolina; 8, tirosina; 9, valina; 10, fenilalanina; 11, leucinas.

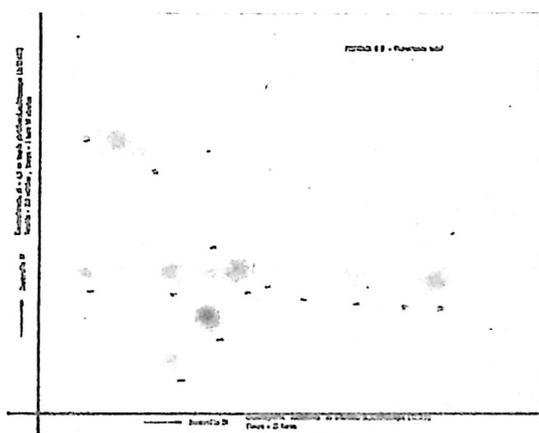


FIG. 8. Desarrollo bidimensional (electroforesis $pH = 3,9$ — cromatografía) de un hidrolizado ácido de fosfatasa ácida II; condiciones en el texto. Identificación de aminoácidos según la figura 7.

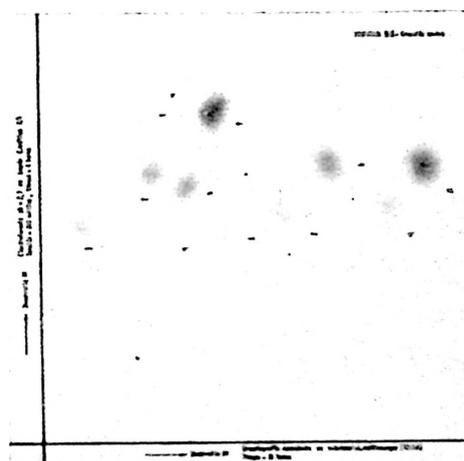


FIG. 10. Desarrollo bidimensional (electroforesis $pH = 2,7$ — cromatografía) de la fracción de aminoácidos neutros de fosfatasa ácida II; condiciones en el texto. Identificación de aminoácidos según la figura 9.

todos estos resultados, expresando por medio de barras la altura de inhibición alcanzada por el p-Cl-mercuribenzoato a distintas concentraciones de cada uno de los antiinhibidores ensayados.

Las figuras 7 y 8 constituyen sendos acoplamientos bidimensionales, electroforesis $pH = 3,9$ -cromatografía, de hidrolizados ácidos de preparados altamente purificados de las fosfatasa ácidas prostáticas I y II.

El grupo de aminoácidos neutros aparece ampliamente desarrollado en los aco-

plamientos bidimensionales, electroforesis $pH = 2,7$ -cromatografía, mostrado en las figuras 9 y 10.

Finalmente, el grupo de aminoácidos básicos de ambos enzimas aparece fraccionado en el desarrollo electroforético simple a $pH = 11,7$ de la figura 11.

La dosificación colorimétrica de todos los aminoácidos así separados viene expuesta en la tabla VI, en donde se expresa la composición centesimal de ellos para ambos preparados enzimáticos.

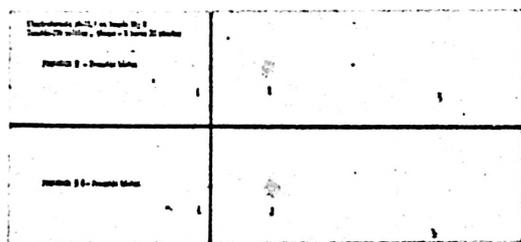


FIG. 11. Electroforesis $pH = 11,7$ de la fracción de aminoácidos básicos de las fosfatasa ácidas I y II; condiciones en el texto. 1, arginina; 2, lisina; 3, histidina.

TABLA VI

Composición porcentual de las fosfatasa ácidas I y II de próstata, en los distintos aminoácidos constituyentes.

Aminoácidos	Fosfatasa I	Fosfatasa II
Fenilalanina	2,0	2,2
Prolina	2,0	1,1
Metionina	2,3	1,8
Arginina	2,4	2,1
Tirosina	3,2	2,6
Cisteína	4,3	5,6
Lisina	4,9	7,3
Leucinas	6,4	7,7
Valina	6,5	4,5
Treonina	6,8	7,1
Glicocola	6,9	2,0
Acido aspártico	8,8	8,0
Serina	9,4	8,0
Alanina	9,5	13,8
Acido glutámico	12,3	15,8
Histidina	12,3	10,4

Discusión

Han sido bastante numerosos los sustratos que se han ensayado para la medida de la actividad fosfatásica ácida. El hecho de tratarse de un enzima de baja especificidad ha sido la causa de que desde el principio se empezaran a estudiar diferentes sustratos de síntesis; esto, junto con la comprobación efectuada posteriormente, de que muchos derivados fosforilados de sustancias aromáticas fenólicas presentaban frente al enzima actividades mucho más altas que los sustratos naturales, ha motivado que sean aquéllos los que de una forma casi exclusiva se hayan empleado en las determinaciones de rutina. Por tal motivo, se conoce perfectamente el comportamiento como sustratos del fenil-fosfato (32,70), p-NO₂-fenil-fosfato (7), alfa-naftil-fosfato (5, 57, 59, 68), difenil-fosfato (53), beta-naftil-fosfato (58), beta-glicerofosfato (60), fenolftaleín-monofosfato (13) y fenolftaleín-difosfato (42, 52, 62).

Basándose en el diferente comportamiento frente a estos sustratos, se ha llegado a determinar la diferente naturaleza de enzimas de origen muy diverso. Así, TSUBOI y HUDSON (63) puntualizan las especiales características del enzima eritrocítico porque, a diferencia de los de otro origen, es más activo frente al alfa- que frente al beta-glicerofosfato. Mediante un criterio análogo, diferencia DAVIES

(26) el enzima de eritrocitos del aislado del bazo; y ABUL-FADL y KING (4) los enzimas de eritrocitos y de próstata, ya que este último presenta un comportamiento análogo frente al alfa- y beta-glicerofosfatos. Estos dos enzimas presentan también la diferencia, según BABSON y col. (16), de que el de eritrocitos es bastante más activo frente al p-NO₂-fenilfosfato que el prostático.

Un estudio muy completo ha sido hecho por BABSON, READ y PHILLIPS (15) sobre el comportamiento de varios de estos sustratos frente a las fosfatasas de eritrocitos y próstata. Encuentran que el fenilfosfato y el fenolftaleín-difosfato son fuertemente hidrolizados por ambas, el p-NO₂-fenilfosfato y el beta-naftilfosfato sólo por el enzima de eritrocitos, y el beta-glicerofosfato y el alfa-naftilfosfato sólo por el de próstata. Nosotros, por lo que respecta a los enzimas I y II de próstata, hemos encontrado resultados muy diferentes, pues si bien coincidimos en la apreciación de fuertes actividades frente al fenilfosfato y al tetracolamín-fenolftaleín-difosfato, en cierto modo equiparable al fenolftaleín-difosfato, encontramos también una muy fuerte actividad frente al p-NO₂-fenilfosfato, y una muy baja frente al beta-glicerofosfato.

Admitiendo que el alfa-naftilfosfato sea un sustrato muy específico del enzima de próstata (14), cosa que no hemos podido confirmar por no disponer del mismo, resulta muy difícil admitir con BABSON y col. (15) que la actividad de la fosfatasa ácida prostática frente al p-NO₂-fenilfosfato sea 80 veces menor que frente al alfa-naftilfosfato. Efectivamente, NIGAM y col. (50) encuentran una gran diferencia entre el comportamiento del enzima de próstata frente a sustratos de tipo aril-fosfatos (precisamente los autores ensayan el p-NO₂-fenilfosfato y el fenilfosfato) y sustratos de tipo polialcohol-fosfatos (como el beta-glicerofosfato empleado por ellos), en el sentido de que una distinta sensibilidad existe frente

a los inhibidores, a la acción del calor, etcétera, y, sobre todo, a que las actividades frente a aquéllos son mucho mayores que frente a éstos. A las mismas conclusiones llegan ABUL-FADL y KING (4) con el enzima de próstata, y Tsuboi y HUDSON (63) con el de eritrocitos.

Examinando la tabla I podemos ver que, tal como dijimos anteriormente, los ésteres fosfóricos de sustancias de naturaleza fenólica son los que presentan mayores tasas de hidrólisis (fenilfosfato, p-NO₂-fenilfosfato y tetracolamín-fenolftaleín-difosfato), sin diferencias entre los enzimas I y II de próstata cuando se expresan los valores de actividades en porcentajes, referidos al p-NO₂-fenilfosfato. Les siguen en orden de actividades los ésteres fosfóricos de compuestos hidroxilados aromáticos no fenólicos, con núcleo de heterociclo (PLP), así como los monoésteres fosfóricos de la ribosa (FMN y AMP); finalmente, presentan una actividad pequeña los ésteres fosfóricos de derivados hidroxilados tricarbonados (fosfoenol-piruvato y beta-glicerofosfato). No aparecen actividades con estos últimos sustratos cuando se incuban con la fosfatasa ácida II, lo que en realidad se debe a la baja tasa hidrolítica con que tiene lugar la reacción, por debajo de la sensibilidad del método.

Las actividades son nulas frente a sustratos con enlaces pirofosfóricos y frente a los diésteres fosfóricos de la ribosa (pirofosfato, ATP, ADP e ITP), siendo la pequeña actividad que presentan algunos de éstos frente al enzima I debida, probablemente, a que una pequeña hidrólisis química del sustrato provoca la aparición de un compuesto sí hidrolizable enzimáticamente; tal sería el caso de la aparición de trazas de adenosín-monofosfato a partir del adenosín-trifosfato. Tampoco se aprecia actividad frente a otros diésteres fosfóricos (lombricina, SEP, DPN, TPN y Co A). Este comportamiento coincide curiosamente con el que presenta la fosfatasa alcalina purificada de leche de

vaca y de la mucosa intestinal de terneros, que, según MORTON (49), hidroliza sólo los monoésteres fosfóricos, y no los diésteres y los compuestos pirofosfóricos, en contra de la opinión de SCHMIDT y THANNHAUSER (56), que admitían una hidrólisis global. Por el contrario, y a diferencia de esta fosfatasa alcalina, ambas enzimas de la próstata no hidrolizan los ésteres fosfóricos de la glucosa y fructosa.

Un punto que merece discusión es el de la nula actividad que hemos observado frente al creatín-fosfato, ya que MORTON (48) describe una parcial hidrólisis enzimática de dicho sustrato por un preparado ligeramente purificado de fosfatasa ácida de próstata humana. Cabe pensar por esto último que estén actuando simultáneamente varios enzimas, cosa que no ocurre con los preparados muy purificados obtenidos por nosotros; está a favor de ello la teoría de FOLLEY y KAY (31), que admite que la hidrólisis enzimática de los monoésteres fosfóricos y de las fosfamidias se debe a dos enzimas distintos.

Las citas bibliográficas que hacen referencia al peso molecular de la fosfatasa ácida prostática son muy escasas, probablemente debido al hecho de requerirse para ello preparados enzimáticos de gran pureza. En la tabla VII reseñamos los datos que hemos encontrado sobre el particular, con indicación del procedimiento utilizado para la determinación.

Comparando estos valores se halla gran concordancia entre el p.m. obtenido por nosotros para la fosfatasa ácida I y el hallado por VERNON y col. para esta misma fracción usando la técnica de filtración molecular. Para la fosfatasa II hemos obtenido un valor sistemáticamente más bajo que el dado por la bibliografía con una técnica análoga, si bien se aproxima bastante al encontrado por OSTROWSKI y RYBARSKA por sedimentación en ultracentrífuga con gradiente de sucrosa.

HOFSTEN y PORATH (35) indican que el componente mayoritario de las tres

TABLA VII
Pesos moleculares de fracciones fosfatásicas ácidas de próstata.

Pesos moleculares		Técnica utilizada
Fracción I	Fracción II	
150.000	120.000	difusión (65)*
130.000	110.000	filtración Sephadex (66)
—	95.800	sedimentación (51)
—	109.000	filtración Sephadex (51)
120.000	85.000	filtración Sephadex**

* Vernon y col.
** Ver figuras 1 y 2.

fracciones de fosfatasa ácida encontradas en *Escherichia coli* presenta una marcada tendencia a polimerizarse, calculando para el monómero un peso molecular de unos 20.000. Quizás guarde alguna relación con esto las aseveraciones de VERNON y col. (66), que encuentran en el plasma seminal humano dos fracciones enzimáticas de p. m. mucho más bajo que las fracciones prostáticas. Nosotros hemos efectuado fraccionados sobre DEAE-celulosa con esperma humano y obtenido dos fracciones activas, pero el estudio de sus características físico-químicas se encuentra aún en marcha.

Como ya dijimos en un trabajo anterior, el comportamiento de las fosfatasas ácidas frente a los cambios de temperatura es un fenómeno íntimamente ligado a los cambios de pH del medio, a la naturaleza del sistema tampón e incluso a la presencia o ausencia de un tipo u otro de sustrato. En general, se admite que un suero pierde completamente su actividad fosfatásica ácida cuando se mantiene a la temperatura ambiente durante 24 horas, mientras que la conserva en su integridad al cabo de ese mismo tiempo a 0 grados (43), o al cabo de 4 meses a -20 grados (25); por otro lado, la fracción enzimática sérica de origen prostático se inactiva en un 50% a los 10 minutos de conservación a 37 grados (34). Si, por el contrario, se somete el suero a un tamponamiento para evitar las oscilaciones ascendentes de su pH con el

tiempo, conserva prácticamente toda su actividad enzimática después de 24 horas a la temperatura ambiente; y mientras que la fracción prostática apenas se inactiva después de 10 minutos a 37 grados, si el tamponamiento se ha hecho con el sistema acético-acetato, ve su actividad incluso aumentada cuando ese tamponamiento se hace con cítrico-citrato (28). Finalmente, NIGAM y col. (50) han probado que la fosfatasa ácida prostática del suero presenta actividades máximas a 60 grados frente al fenil-fosfato y al p-NO₂-fenil-fosfato, mientras que frente al beta-glicero-fosfato la temperatura óptima de actividad está sólo a 37 grados, produciéndose una desnaturalización a los 60; esta influencia del sustrato parece ser que radica en la presencia de grupos —OH no esterificados, a los cuales parecen ser muy sensibles estas enzimas.

También el enzima purificado obtenido de próstata humana parece ser muy resistente a la influencia del calor. Las dos fracciones enzimáticas aisladas por VERNON y col. (66) toleran perfectamente períodos de 6 meses conservadas en solución a 4 grados, incluso con puestas intermitentes de varias horas a la temperatura ambiente; también son resistentes a congelaciones y descongelaciones sucesivas, mientras que presentan inestabilidad por encima de 40 grados. Análogamente, las fosfatasas ácidas de los insectos *Tribolium confusum* (24) y *Stomoxys calcitrans* (10) presentan fuerte desnaturalización por arriba de los 40 grados. En cuanto al enzima altamente purificado de patata, es capaz de tolerar varios meses a —10 grados (8).

Los resultados encontrados por nosotros nos confirman que el enzima tolera en solución temperaturas de —8 y 0 grados, por lo menos hasta 7 días, que es el tiempo máximo que ensayamos. A 4 grados empieza a notarse una lenta declinación en la actividad a partir del primer día, mientras que a 25 grados y a 37 grados esa declinación es ya evidente al cabo de

una hora, con pérdida absoluta de la actividad a las 24 horas. Este comportamiento llama la atención frente a la gran resistencia, postulada por VERNON y col., y que vimos antes, que presentan estas enzimas en solución; esto puede explicarse en función del pH, ya que estos autores efectuaban las disoluciones en soluciones tamponadas a pH ácido, mientras nosotros las efectuábamos simplemente en agua destilada. Finalmente, ambas fosfatasas han mostrado una estabilidad absoluta al estado de liofilización, con mantenimiento total de la actividad hasta un período de 3 meses.

Como hecho curioso, diferencial en el comportamiento de las fosfatasas I y II, destaca el que el enzima II presente una mayor estabilidad térmica a tiempos cortos que el enzima I, pero menor a tiempos prolongados de mantenimiento a la temperatura en cuestión. Efectivamente, mientras que la inactivación total se alcanza a los 5 y 3 días, respectivamente, de exposición a 25 y 37 grados con la fosfatasa I, se produce ya a las 24 y 12 horas con el enzima II. Por el contrario, mientras que el 50 % de inactivación viene a producirse a las 3 horas y a los 20 minutos, respectivamente, de exposición a 25 y 37 grados con el enzima I, se llega a ese punto sólo a las 7 y 3 horas con la fosfatasa II (fig. 3).

Son prácticamente nulas las referencias bibliográficas referentes a los aspectos termodinámicos de la reacción enzimática que estamos estudiando. Sólo hemos encontrado el cálculo, efectuado por CHAUDHARY y col. (24), sobre el enzima de *Tribolium confusum*, con fenil-fosfato, y que da un valor para la energía de activación de 13.000 calorías/mol. para los enzimas I y II, pero ya hemos visto lo diferentes que resultan estos dos tipos de enzimas, de tan distinta procedencia, en numerosos aspectos.

La influencia de los iones Mg²⁺ sobre la actividad de las fosfatasas ácidas ha sido estudiada especialmente sobre el en-

zima de eritrocitos. ABUL-FADL y KING (4) encuentran que existe una inhibición por este ión en zonas de pH coincidentes con las del óptimo, mientras que KUTSCHER y WÖRNER (44) y BEHRENDT (19) no hallan efecto alguno; y aún más, JENNER y KAY (39), ROCHE (54), DAVIES (26) y ROCHE y col. (55) llegan a la conclusión que existe una acción activante debida a este metal. En el insecto *Tribolium confusum* su efecto sobre la actividad enzimática es muy poco claro, pues dependiendo de la concentración a que se emplee, se manifiesta una acción activadora o inhibidora (24). Nosotros hemos encontrado un fuerte efecto de inhibición, del orden del 73 %, sobre la fosfatasa ácida I, mientras que este ión se manifiesta inactivo frente al enzima II; si tenemos en cuenta que esta segunda fracción enzimática es la que aparece de forma constante en todas las próstatas, nuestros resultados son entonces concordantes con los de ABUL-FADL y KING (4), que no encontraron efecto alguno del Mg^{2+} sobre el enzima aislado de próstata.

El Ca^{2+} es un fuerte activador del enzima de *Tribolium confusum* (24). En las fosfatasas ácidas eritrocítica y prostática su comportamiento difiere mucho según la naturaleza del sistema tampón usado, lo que probablemente está ligado al distinto poder complejante de éstos (4). Hay una inhibición suave del enzima de eritrocitos y una inhibición fuerte del de próstata con el sistema acético-acetato, mientras que con el tampón cítrico-citrato no hay acción frente a ninguno de los dos. Al igual que sucedía con el Mg^{2+} , nosotros hemos encontrado una inhibición del 48 % del enzima I, y un efecto nulo sobre el enzima II.

Respecto al Ni^{2+} , hay que decir que ha sido el único ión metálico que ha mostrado un efecto inhibitorio sobre las fosfatasas I y II, simultáneamente, si bien sobre el enzima I la acción es mucho más manifiesta. La única referencia bibliográfica que hemos encontrado sobre este ca-

ción habla del efecto contrapuesto, activador o inhibitorio, que ejerce sobre el enzima de *T. confusum* (24), según que su concentración sea baja o alta.

En lo que respecta a los restantes iones inorgánicos ensayados, Co^{2+} y Zn^{2+} siguen la pauta general, ya que se muestran fuertes inhibidores, con inactivaciones del orden del 50 %, frente al enzima I, e inactivos frente al II. Sobre el insecto *T. confusum* (24) estos iones no actúan, o a lo sumo ejercen una ligera inhibición.

Todas estas inhibiciones se producen a las altas concentraciones iónicas de $5,62 \times 10^{-3}$ M, no observándose ya la aparición de efecto alguno a concentraciones de $1,14 \times 10^{-3}$ M. Por esta razón, quizás, el ión Mn^{2+} , que sólo fue ensayado a una concentración máxima de $1,14 \times 10^{-3}$ M, no haya presentado efecto alguno. Se puede sacar, pues, la conclusión de que las fosfatasas ácidas de próstata no son metaloenzimas, como le sucede a las fosfatasas alcalinas, a no ser que el componente metálico se encuentre fuertemente ligado a la proteína enzimática, sin posibilidad de dializar.

Aunque no han sido ensayados por nosotros, resulta interesante detenerse un momento en las características de la inhibición por Cu^{2+} y Fe^{3+} , ya que, según TSUBOI y HUDSON (64), algunos efectos de inactivación por el tiempo, que aparecen en preparaciones purificadas de fosfatasa ácida de próstata, se deben a trazas de estos metales, cedidos por las vasijas o por cualquier otro objeto con que se manipuló el material de partida. Especialmente hay que recordar que los homogenizados de las glándulas fueron obtenidos con «turmix» cuyas cuchillas y otros aditamentos estaban fabricados con dichos materiales.

El Fe^{3+} es un fortísimo inhibidor del enzima de próstata cuando se usa un tampón de acetato, ya que en esas condiciones es coloide, pero, sin embargo, se muestra inactivo con tampón de citrato; el Cu^{2+} , que es un potente inhibidor del

enzima de eritrocitos, inhibe sólo un 8 % al enzima de próstata en tampón de acetato, y aún menos en tampón de citrato (4). Puesto que nosotros hemos empleado sistemáticamente un tampón de citrato, no se debería temer un efecto apreciable de inhibición por estos iones; sin embargo, no hay que olvidar que el posible contacto de los enzimas con ambos metales se produjo mucho antes de dosificar sus actividades, y en relación con ello ABUL-FADL y KING (4) han comprobado que el efecto clásico antiinhibidor que la cisteína y el glutatión ejercen sobre las inactivaciones por bloqueo de grupos —SH, como es la de este caso (18), sólo se consigue cuando estos derivados azufrados se agregan pronto a la mezcla enzima-inhibidor, ya que la inhibición por Cu^{2+} no es reversible. No obstante, TSUBOI y HUDSON (64) encuentran que se consigue una recuperación sustancial de la actividad cuando el tratamiento con cisteína se potencia con una adición simultánea de glicocola o tartrato, agentes complejantes ambos de este ión.

La inhibición de las diversas fracciones de fosfatasa ácida presentes en el suero, con vistas a su determinación clínica, ha sido quizás el aspecto más estudiado de estos enzimas. Especialmente han sido ensayados como inhibidores el tartrato, formaldehído, etanol y fluoruros, ya que son los que han mostrado poderes inhibitorios más selectivos sobre los enzimas séricos.

BELFANTI (20) fue el primero en indicar que los fluoruros eran unos potentes inhibidores de la fosfatasa ácida de próstata, hecho posteriormente comprobado para el mismo enzima del suero por KAPLAN y NARAHARA (40). Esto, junto con la circunstancia de que sólo ejerce una nimia inhibición sobre el enzima de eritrocitos (4), y de que su máximo poder de inhibición sobre la fosfatasa prostática la ejerce a pH ácido, en la zona de actividad óptima de estos enzimas (6), ha motivado el que se haya usado ampliamente para

la determinación por diferencia del enzima sérico de origen prostático. Nosotros hemos hallado para este ión un poder de inhibición muy fuerte, del orden del 80 % a concentraciones $5,62 \times 10^{-3}$ M, y que afecta a los dos enzimas de próstata; este valor es comparable al 95 % de inhibición señalado por ABUL-FADL y KING (4) para la fosfatasa aislada de la glándula, y al 88 % que aparece con el enzima de *Aedes aegypti* (24). Esta inhibición por los fluoruros no puede achacarse en este caso a un bloqueamiento de algún metal, ya que estas fosfatasas, como hemos visto, no son metaloenzimas.

El formaldehído presenta la particularidad de tener un poder de inhibición absoluto y muy selectivo frente a la fosfatasa ácida de eritrocitos (1), aunque ZUCKER y BORRELLI (70) han encontrado también inhibición con el enzima de plaquetas; por el contrario, el etanol provoca una inhibición muy poco selectiva, habiéndose preconizado por ello su uso con menos frecuencia (33). Un estudio detallado del poder inhibitorio de ambas sustancias sobre fosfatasas ácidas de distinta procedencia ha sido efectuado por DELORY y col. (27) y ABUL-FADL y KING (4, 3), llegándose a la conclusión que el enzima de próstata es inhibido entre el 40 y el 70 % por el etanol, mientras que no es afectado por el formaldehído.

Constituye el tartrato el inhibidor del enzima prostático más utilizado y más ampliamente estudiado. En tal sentido ha sido objeto de uso por ABUL-FADL y KING (1, 2), AXELROD y SEWELL (12), TSUBOI y HUDSON (64), VESCIA y CHANCE (67) y JACOBSSON (38), que coinciden en afirmar que su inhibición es de tipo competitivo. Este último autor halló que su poder de inhibición era mayor, dentro de ciertos límites, a pH alcalino que ácido, precisamente lo contrario que, como antes vimos, ocurría con los fluoruros. Y un poder de inhibición análogo encontraron VERNON y col. (66) que presentaba

frente a las dos fosfatasa ácidas aisladas directamente del tejido prostático.

Hemos encontrado con este inhibidor un poder de inactivación algo menor que el producido por los fluoruros, del 74 % y 50 % sobre los enzimas I y II, cuando se usan a la alta concentración de $5,62 \times 10^{-3}$ M; pero en contrapartida ese efecto inhibidor del tartrato se mantiene aún bastante alto, del 22 % sobre la fosfatasa I, a la concentración de $0,22 \times 10^{-3}$ M, a la cual los fluoruros ya no actúan. De todas formas, se observa un comportamiento más enérgico cuando el inhibidor actúa sobre el enzima de elución temprana que sobre el de elución tardía, obteniéndose en general una inhibición algo menor que la descrita por NIGAM y col. (50), que observan frente al p-NO₂-fenil-fosfato inactivaciones del 50 % con concentraciones de tartrato de 7×10^{-4} M, comportamiento éste que desmiente las afirmaciones de FISHMAN y DAVIDSON (30), que señalan que la fosfatasa ácida prostática sérica no es inhibida eficazmente por el tartrato cuando se emplea el p-NO₂-fenil-fosfato como sustrato.

KILSHEIMER y AXELROD (41) han efectuado un estudio exhaustivo de las características químicas y estéricas que debe reunir el ácido tartárico para que presente capacidad inhibidora, haciendo al mismo tiempo un estudio análogo de una serie de compuestos orgánicos relacionados estructuralmente. De los ensayos efectuados con más de 50 de éstos, llegan a la conclusión que lo fundamental para poseer la capacidad de inhibición es un grupo carboxilo, y unido a él un carbono que lleva un grupo —OH en posición D-alfa, y que sostenga simultáneamente una agrupación electronegativa. De acuerdo con ello, hallan una máxima actividad inhibidora en las formas dextrógiras del ácido tartárico y sus derivados (ésteres monoetilico y dietílico, diamida, etc.), del ácido glicérico y del ácido málico, en el ácido tartrónico, en el ácido oxálico, etc. La máxima actividad le corresponde,

desde luego, al ácido 1-treo-(+)-tartárico, cuya inhibición ha sido considerada por ABUL-FADL y KING (4) como reversible, ya que desaparece como consecuencia de la diálisis.

Mención especial merece la inhibición por el oxalato, que hemos encontrado nosotros tiene lugar a una tasa de un 45 % sobre el enzima I de próstata, aunque no hemos podido ponerla de manifiesto sobre el enzima II. Esta capacidad inhibidora sobre la fosfatasa ácida prostática ha sido señalada por NIGAM y col. (50) y por ABUL-FADL y KING (4), y por no tratarse de un metaloenzima no puede achacarse al bloqueamiento de un ión metálico divalente. TSUBOI y HUDSON (64) supusieron que se trataría de una inhibición análoga a la del tartrato, si bien más débil, cosa que luego ha sido corroborada por KILSHEIMER y AXELROD (41), ya que la estructura de esta sustancia se ajusta a las características químicas fijadas por estos autores a este tipo de inhibidores.

De los clásicos inhibidores de enzimas por bloqueo de grupos —SH fundamentales, nosotros no hemos encontrado efecto alguno por el agente alquilante iodoacetamida. Esto ha sido un punto muy discutido, pues mientras TSUBOI y HUDSON (64) coincidían con nosotros en no observar inhibición del enzima aislado de próstata ni por el ácido iodoacético ni por la iodoacetamida, ABUL-FADL y KING (4) observaron una evidente inhibición por la iodoacetamida del enzima eritrocítico y prostático. Quizás la explicación esté en el hecho puesto de manifiesto por SINGER (61) y HOPKINS y col. (36), del reducido poder alquilante de esta sustancia sobre los enzimas dependientes de grupos —SH.

Más interés tiene la acción del p-Cl-mercuribenzoato sobre estos grupos. Aunque ANDREU y col. (8) no han encontrado acción alguna inhibidora de esta sustancia sobre la fosfatasa ácida de patata, VALENTINE y col. (65) han puesto de manifiesto una fuerte inactivación sobre

el enzima de eritrocitos; análogamente, BARRON (18) ha puntualizado que sobre el enzima prostático tiene lugar una inhibición de tipo reversible. Este hecho ha sido estudiado detenidamente por TSUBOI y HUDSON (64), que llegaron a la conclusión que la inhibición producida por el p-Cl-mercuribenzoato sobre la fosfatasa ácida purificada de próstata es sólo parcial, consiguiéndose sólo con elevadas concentraciones y tiempos elevados de incubación.

Por nuestra parte, hemos encontrado inhibiciones sustanciosas sobre los enzimas I y II de próstata incluso a concentraciones $1,14 \times 10^{-3}$ M, y aun $0,22 \times 10^{-3}$ M para la fosfatasa I, inhibiciones que son menores que las conseguidas con el tartrato a elevadas concentraciones, pero del mismo orden que las obtenidas a concentraciones medias.

La reversibilidad de esta inactivación la hemos puesto de manifiesto mediante el uso de los antiinhibidores tiólicos: cisteína, glutation y BAL. Analizando sólo los resultados obtenidos frente a la más alta concentración de p-Cl-mercuribenzoato (tabla V y fig. 6), la única verdaderamente efectiva de las utilizadas en este ensayo, podemos ver que a una concentración de antiinhibidor análoga a la de inhibidor ($5,62 \times 10^{-3}$ M), desaparece por completo la inactivación del enzima, sea cual fuere el derivado tiólico usado; a una concentración de antiinhibidor 1/25 de la de inhibidor ($0,22 \times 10^{-3}$ M), la recuperación de actividad es pequeña con la cisteína y glutation, y casi completa con BAL, mientras que a una concentración 1/250 de la de inhibidor ($0,02 \times 10^{-3}$ M), sólo se consigue una pequeña reactivación con el BAL.

Eso por lo que respecta a la fosfatasa I. Con la fosfatasa II los resultados antiinhibitorios absolutos son menos marcados, seguramente por haberse utilizado una preparación enzimática poco concentrada, pero sí mantienen las relaciones relativas de poder reactivante entre los

tres compuestos sulfhidrúlicos utilizados. Y tanto con la fracción enzimática I como con la II se observa de forma general que, a igualdad de concentración, el mayor poder antiinhibitorio le corresponde al BAL, lo que es lógico si pensamos que este compuesto tiene dos grupos —SH por molécula.

Con referencia a esto es menester destacar que TSUBOI y HUDSON (64) sólo conseguían recuperar con cisteína la actividad del enzima prostático, cuando el tiempo previo de contacto de éste con el p-Cl-mercuribenzoato no había sido muy largo, lo que quizás se explique por el hecho de que LONDON y col. (46) encontraron que la sensibilidad al calor de este enzima aumentaba cuando se hallaba unido a dicho inhibidor.

Un problema que se ha dejado prácticamente sin tocar es el de la constitución y estructura química de estos enzimas. Nosotros hemos efectuado un estudio de la composición en aminoácidos de preparados fuertemente purificados de las dos fosfatasas prostáticas, que nos suministra una idea bastante aproximada de la composición porcentual de las mismas.

Del examen de la tabla VI se saca la inmediata conclusión que ambos enzimas tienen en común la identidad de los cinco aminoácidos mayoritarios (á. aspártico, serina, alanina, á. glutámico e histidina), que constituyen ya más del 50 % del contenido porcentual total, y de los que el ácido glutámico y la histidina, los más abundantes, constituyen ya el 25 %. El hecho que entre estos cinco aminoácidos existan dos ácidos, uno básico y dos neutros, puede explicar el carácter ácido de la molécula total, definido por los valores 5,4 y 4,6 de los puntos isoelectrónicos de los enzimas I y II. Y si, por otro lado, observamos que el porcentaje de histidina disminuye en 1,9 unidades al pasar del enzima I al II, mientras que el de ácido glutámico aumenta 3,5, quedando entonces como el aminoácido mayoritario, resulta lógica la disminución del punto

isoelectrónico que presenta el componente II respecto al I.

El cambio porcentual más dramático corresponde al aminoácido glicocola, apreciable aun a simple vista en las figuras 9 y 10, que de un 6,9 % en la fosfatasa I pasa a un 2,0 % en la fosfatasa II, con una variación relativa del 72 %. Por lo que respecta a los restantes, hay algunas variaciones en los porcentajes de prolina, lisina, valina y alanina, mientras que la serina, á. aspártico, treonina, leucinas, fenilalanina, metionina, arginina, tirosina y cisteína permanecen porcentualmente más o menos constantes. Precisamente la única referencia que en su trabajo hacen VERNON y col. (66) sobre la composición en aminoácidos de las dos fosfatasas ácidas aisladas de glándula prostática, se refiere al diferente contenido en los aminoácidos alanina y valina, pero no mencionan para nada lo observado por nosotros respecto a la glicocola.

Es bastante apreciable el porcentaje en cisteína, un aminoácido habitualmente muy minoritario, en ambas enzimas; ello puede explicar el fuerte efecto inhibitorio ejercido por el p-Cl-mercuribenzoato, y la efectiva acción contraria de la cisteína, glutatión y BAL, ya que los grupos —SH de ese aminoácido deben ser esenciales para la acción enzimática.

ANDREU y col. (8) han hecho sobre la fosfatasa ácida de patata investigaciones sobre la naturaleza de sus grupos activos. Encuentran que, al menos, existen tres agrupaciones químicas esenciales para un normal mantenimiento de la actividad enzimática: una agrupación —COOH, un grupo fosfórico en segunda ionización y un resto imidazólico. Mientras que la existencia del primero debe ir ligada a la presencia de numerosos restos de ácido glutámico y, aunque en menor escala, de ácido aspártico, la presencia de un resto imidazólico fundamental en la molécula enzimática ha de ir forzosamente ligada al abundante porcentaje en histidina que

hemos hallado en ambas enzimas. Parece ser que la función del resto de imidazol en estas enzimas radica en la formación de un N-derivado del mismo, que actúa como intermediario (17).

Aunque nosotros no hemos investigado la presencia de restos fosfóricos en la molécula enzimática, la posible existencia de ellos quizás esté ligada a la de los aminoácidos serina y treonina, con los que estarían esterificados por sus grupos —OH. No es ésta la primera vez que se menciona la existencia de un grupo fosfórico como esencial para la molécula enzimática, ya que había sido señalado antes por BOMAN (22) para el enzima de próstata.

A la vista de todos estos resultados no resulta fácil montar hipótesis sobre el origen y relaciones de estas dos fosfatasas ácidas de próstata. Creemos que la fracción II es el enzima producido por la glándula en condiciones normales, y el responsable del nivel de fosfatasa ácida inhibida por el tartrato, detectable en el suero normal. La fracción I sería producida por la glándula hipertrófica, a una tasa más o menos elevada según el grado de proliferación anómala celular, ya que es un hecho admitido que los niveles más altos de este enzima coinciden con los estadios de rápida división celular; esto resulta muy demostrativo en aquellos organismos de ciclo vital corto y heterogéneo, como son los insectos, en los que CHAUDHARY y LAMBREMONT (45) han demostrado, trabajando sobre *Tribolium confusum* y *Aedes aegypti*, respectivamente, que las máximas actividades se dan en los períodos embrionarios y larvarios, y las mínimas en los de pupa e insecto adulto.

Dicha fracción I pasaría al suero, muy posiblemente con modificación de algunos de sus caracteres físico-químicos, elevando enormemente la fracción fosfatásica sérica inhibida por el tartrato. Esta alternativa resulta muy plausible, y basta para ello recordar la tendencia a la polimeriza-

ción que manifiesta la fosfatasa ácida de *E. coli* (35), y aun los evidentes cambios físico-químicos que han sufrido las fracciones enzimáticas del semen respecto a las prostáticas (66), siendo así que la procedencia de aquéllas respecto de éstas es innegable.

Por lo que respecta a la génesis de ambos enzimas, resulta difícil decir si ambos se sintetizan independientemente en la próstata hipertrófica, o si existe una relación de procedencia del enzima I, el anormal, respecto del II. Las evidentes analogías que hemos visto existen entre ellos y, en especial, la parecida composición basal en aminoácidos, avalan la segunda tesis. El poder someter a fraccionados próstatas hipertróficas de individuos tratados con el estilbestrol, permitiría quizás comprobar la primera, ya que ABUL-FADL y KING (4) demostraron que este estrógeno, muy usado en el tratamiento del cáncer de próstata, y que produce un descenso espectacular del enzima sérico inhibido por el tartrato, no actúa como un inhibidor del mismo, sino que tiene un efecto directo sobre el tejido prostático, disminuyendo su capacidad de síntesis de enzima; en ese caso podría ser que esta acción sólo se hiciera patente sobre la síntesis del componente anormal.

Lo más lógico es pensar que la formación del adenoma vaya acompañada de una alteración enzimática que perturbe en un paso intermedio la normal síntesis de la molécula proteica de fosfatasa ácida, a partir del cual la formación de la misma tomaría un rumbo acelerado y distinto.

Resumen

Se han obtenido máximas actividades enzimáticas frente a los sustratos de naturaleza fenólica (p-NO₂-fenil-fosfato, fenil-fosfato, te-tracolamín-fenoltaleín-difosfato) y ésteres fos-

fóricos de heterociclos (piridoxal-fosfato). Actividades medias aparecen con los monoésteres fosfóricos de la ribosa (FMN y AMP) y de derivados hidroxilados tricarbonados (beta-glicerofosfato y fosfoenolpiruvato). No existe actividad con los diésteres fosfóricos (NAD, NADP, Co A, etc.), con los compuestos pirofosfóricos (pirofosfato, ATP, ITP, ADP), con los ésteres de hexosas (glucosa-1-P, fructosa-1-P, fructosa-1,6-difosfato) ni con los fosfatos lábiles (creatin-fosfato, etc.).

Tanto la fracción I como la fracción II se mantienen con máxima actividad durante un tiempo prácticamente indefinido, en forma de liofilizados. En solución acuosa conservan su actividad a -8 y 0 grados, al menos durante 7 días, mientras que a 4 grados empieza a verse una declinación a las 24 horas; a 25 y 37 grados esa declinación ya es evidente al cabo de 1 hora.

Para la fracción I hemos hallado una energía de activación de 7.590 calorías/mol., y de 5.120 calorías/mol. para la fracción II.

Hemos encontrado una fuerte inhibición de la fosfatasa ácida I por los iones Mg²⁺ y Ni²⁺, y algo menor por Ca²⁺, Zn²⁺ y Co²⁺. Sobre la fosfatasa II sólo hemos encontrado una mediana inhibición por el ion Ni²⁺, siendo inactivos los demás. Se saca la conclusión de que no se trata de metaloenzimas, al menos con un componente metálico dializable.

Inhiben fuertemente tanto la fracción I como la II los fluoruros y el ácido l-treo-(+)-tartárico; una inhibición algo menor es producida por los oxalatos. La inhibición que aparece en ambos enzimas con el p-Cl-mercuribenzoato, bastante patente, desaparece cuando se agregan a las mezclas de incubación los compuestos tiólicos cisteína, glutatión o BAL, a una concentración igual a la de inhibidor. De todos ellos el más efectivo como antiinhibidor es el BAL.

Hemos obtenido para las fracciones I y II pesos moleculares de 120.000 y 85.000, respectivamente. El estudio de los aminoácidos constituyentes indica que los mayoritarios son: histidina, ácido glutámico, alanina, serina y ácido aspártico, siendo también bastante apreciable la cantidad de cisteína, lo que corrobora el carácter fundamental de este aminoácido para que se mantenga la capacidad hidrolítica. La glicocola experimenta una variación negativa del 72 % de la fracción I a la II.

Summary

Study of the acid phosphatases of the prostate gland. — II. Factors which influence enzymatic activity; structural characteristics

Maximum activities are obtained with substrates of a phenolic nature and phosphoric esters of heterocycles. Average activities appear with ribose phosphoric monoesters and those derived from tri-carbonate hydroxylates. There is no activity with phosphoric diesters, pyrophosphoric compounds, hexose esters or with labile phosphates.

Both fractions I and II retain maximum activity for a practically unlimited period of time when they are kept in a lyophilized form. In an aqueous solution they retain their activity at -8 and 0 for at least 7 days, while at 4 a decline is noted after 24 hours; at 25 and 37 this decline is evident after 1 hour.

We have found an activation energy of 7.590 calories/mole for fraction I, and of 5.120 for fraction II.

We have found a strong inhibition of acid phosphatase I by the ions Mg^{2+} and Ni^{2+} , and somewhat less by Ca^{2+} , Zn^{2+} and Co^{2+} . As regards phosphatase II we have only found an average inhibition by the ion Ni^{2+} , the others being inactive. The conclusion is drawn that they are not metalloenzymes, at least with a dialyzable metallic component.

Fluorides and 1-threo-(+)-tartaric acid strongly inhibit both fractions I and II; a somewhat less inhibition is produced by the oxalates. The inhibition which appears in both enzymes with p-Cl-mercurybenzoate, quite apparent, disappears when thvolic compounds (cysteine, glutation or BAL) are added to the incubation mixture, at a concentration equal to that of the inhibitor. Of all these, the most effective, as an anti-inhibitor, is BAL.

For fractions I and II we have obtained molecular weights of 120,000 and 85,000 respectively. The study of the constituent

amino acids indicates that the majority are: histidine, glutamic acid, alanine, serine and aspartic acid; the quantity of cysteine is also appreciable, which corroborates the fundamental character of this enzyme so that the hydrolytic capacity is maintained. Glycine undergoes a negative change of 72 % from fraction I to fraction II.

Bibliografía

1. ABUL-FADL, M. A., y KING, E. J.: *Biochem. J.*, **41**, xxxii, 1947.
2. ABUL-FADL, M. A., y KING, E. J.: *Biochem. J.*, **42**, xxviii, 1948.
3. ABUL-FADL, M. A., y KING, E. J.: *J. Clin. Path.*, **1**, 80, 1948.
4. ABUL-FADL, M. A., y KING, E. J.: *Biochem. J.*, **45**, 51, 1949.
5. ALTSCHULE, M. D., PARKHURST, B. H., y ZAGER, G. R.: *Am. J. Clin. Path.*, **21**, 480, 1951.
6. ANAGNOSTOPOULOS, C.: *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **35**, 575, 1953.
7. ANDERSCH, M. A., y SZCZYPINSKI, A. J.: *Am. J. Clin. Path.*, **17**, 571, 1947.
8. ANDREU, M., FERNÁNDEZ-ALVAREZ, E., y LORA TAMAYO, M.: *An. R. Soc. Esp. Fis. Quím.*, **56B**, 67, 1960.
9. ANDREWS, P.: *Biochem. J.*, **91**, 222, 1964.
10. ASHRAFI, S. H.: *Pakistan J. Sci. Ind. Res.*, **4**, 70, 1961.
11. AURICHCHIO, F., y BRUNI, C. B.: *Biochem. Z.*, **340**, 321, 1964.
12. AXELROD, B., y SEWELL, G. E.: *Federat. Proc.*, **15**, 214, 1956.
13. BABSON, A. L., GREELEY, S. J., COLEMAN, CH. M., y PHILLIPS, G. E.: *Clin. Chem.*, **12**, 482, 1966.
14. BABSON, A. L., y PHILLIPS, G. E.: *Clin. Chim. Acta.*, **13**, 264, 1966.
15. BABSON, A. L., READ, P. A., y PHILLIPS, G. E.: *Am. J. Clin. Path.*, **32**, 83, 1959.
16. BABSON, A. L., READ, P. A., y PHILLIPS, G. E.: *Tech. Bull. Reg. M. Technol.*, **29**, 77, 1959.
17. BARNARD, E. A., y STEIN, W. S.: *Adv. Enzim.*, **20**, 51, 1958.
18. BARRON, E. S.: *Adv. Enzim.*, **11**, 201, 1951.
19. BEHRENDT, H.: *Proc. Soc. Exp. Biol.*, **54**, 268, 1943.

20. BELFANTI, S., CONTARDI, A., y ERCOLI, A.: *Biochem. J.*, **29**, 842, 1935.
21. BESSEY, O. A., LOWRY, O. H., y BROCK, M. J.: *J. Biol. Chem.*, **164**, 321, 1946.
22. BOMAN, H. G.: *Arkiv. f. Kem.*, **12**, 453, 1958.
23. CHAUDHARY, K. D., y LEMONDE, A.: *Experientia*, **20**, 86, 1964.
24. CHAUDHARY, K. D., MOORJANI, S., y LEMONDE, A.: *Can. J. Biochem.*, **42**, 1769, 1964.
25. DAVIDSON, M. M.: *Am. J. Clin. Path.*, **23**, 411, 1953.
26. DAVIES, D. R.: *Biochem. J.*, **28**, 529, 1934.
27. DELORY, G. E., SWEETSER, T. H., y WHITE, T. A.: *J. Urol.*, **66**, 724, 1951.
28. DOE, R. P., MELLINGER, G. T., y SEAL, U.S.: *Clin. Chem.*, **11**, 943, 1965.
29. ESTBORN, B.: *Z. Klin. Chem.*, **2**, 53, 1964.
30. FISHMAN, W. H., y DAVIDSON, H. M.: *Meth. Biochem. Anal.*, **4**, 257, 1957.
31. FOLLEY, S. J., y KAY, H. D.: *Ergebn. Enzymforsch.*, **5**, 159, 1936.
32. GUTMAN, E. B., y GUTMAN, A. B.: *J. Biol. Chem.*, **136**, 201, 1940.
33. HERBERT, F. K.: *Biochem. J.*, **39**, IV, 1945.
34. HERBERT, F. K.: *Quart. J. Med.*, **15**, 221, 1946.
35. HOFSTEN, B., y PORATH, J.: *Biochem. Biophys. Acta*, **64**, 1, 1962.
36. HOPKINS, F. G., MORGAN, E. J., y LUTWAK-MANN, C.: *Biochem. J.*, **32**, 1829, 1938.
37. IWATSUBO, M., y CURDEL, A.: *C. R. Acad. Sci.*, **256**, 5224, 1963.
38. JACOBSSON, K.: *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, **11**, 358, 1959.
39. JENNER, H. D., y KAY, H. D.: *J. Biol. Chem.*, **93**, 733, 1931.
40. KAPLAN, A., y NARAHARA, A.: *J. Lab. Clin. Med.*, **41**, 825, 1953.
41. KILSHEIMER, G. S., y AXELROD, B.: *J. Biol. Chem.*, **227**, 879, 1957.
42. KING, E. J.: *J. Path. Bact.*, **55**, 311, 1943.
43. KING, E. J., y JEGATHEESAN, K. A.: *J. Clin. Path.*, **12**, 85, 1959.
44. KUTSCHER, W., y WORNER, A.: *Z. Physiol. Chem.*, **239**, 109, 1936.
45. LAMBREMONT, E. N.: *Ann. Ent. Soc. Amer.*, **53**, 87, 1960.
46. LONDON, M., WIGLER, P., y HUDSON, P. B.: *Arch. Biochem. Biophys.*, **52**, 236, 1954.
47. LÓPEZ-GORGÉ, J., MONTEOLIVA, M., y MAYOR, F.: *An. R. Soc. Esp. Fis. Quim.*, **63B**, 465, 1967.
48. MORTON, R. K.: *Thesis*, University of Cambridge, 1952.
49. MORTON, R. K.: *Biochem. J.*, **61**, 232, 1955.
50. NIGAM, V. N., DAVIDSON, H. M., y FISHMAN, W.: *J. Biol. Chem.*, **234**, 1550, 1959.
51. OSTROWSKI, W., y TSUGITA, A.: *Arch. Biochem. Biophys.*, **94**, 68, 1961.
52. PAUWELS, G. W.: *Anal. Biochem.*, **10**, 208, 1965.
53. POWELL, M. E., y SMITH, M. J.: *J. Clin. Path.*, **7**, 245, 1954.
54. ROCHE, J.: *Biochem. J.*, **25**, 1724, 1931.
55. ROCHE, J., VAN THOAI, N., y BAUDOIN, J.: *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **24**, 247, 1942.
56. SCHMIDT, G., y THANNHAUSER, S. J.: *J. Biol. Chem.*, **149**, 369, 1943.
57. SEAL, U. S., MELLINGER, G. T., y DOE, R. P.: *Clin. Chem.*, **12**, 620, 1966.
58. SELIGMAN, A. M., CHAUNCEY, H. H., NACHLAS, M. M., MANHEIMER, L. H., y RAVIN, H. A.: *J. Biol. Chem.*, **190**, 7, 1951.
59. SELIGMAN, A. M., y MANHEIMER, L. H.: *J. Nat. Cancer Inst.*, **9**, 427, 1949.
60. SHINOWARA, G. Y., JONES, L. M., y REINHART, H. L.: *J. Biol. Chem.*, **142**, 921, 1942.
61. SINGER, T. P.: *J. Biol. Chem.*, **174**, 11, 1948.
62. SUOMALAINEN, H., LINKO, M., y OURA, E.: *Biochim. Biophys. Acta*, **37**, 482, 1960.
63. TSUBOI, K. K., y HUDSON, P. B.: *Arch. Biochem. Biophys.*, **43**, 339, 1953.
64. TSUBOI, K. K., y HUDSON, P. B.: *Arch. Biochem. Biophys.*, **55**, 191, 1955.
65. VALENTINE, W. N., TANAKA, K. R., y FREDRICKS, R. E.: *J. Am. Clin. Path.*, **36**, 328, 1961.
66. VERNON, C. A., GAULDIE, J., HANSON, J. M., HUMPHREYS, J. M., SMITH, P. E., LAWRENCE, A. J., y BANKS, B. E.: *Nature*, **208**, 382, 1965.
67. VESCIA, A., y CHANCE, E. K.: *Biochim. Biophys. Acta*, **30**, 446, 1958.
68. WALKER, J. T.: *New Engl. J. Med.*, **242**, 110, 1950.
69. WHITAKER, J. R.: *Anal. Chem.*, **35**, 1950, 1963.
70. ZUCKER, M. B., y BORRELLI, J.: *J. Clin. Invest.*, **38**, 148, 1959.

