

Cátedra de Fisiología de la Facultad de Medicina de Barcelona
(Prof. Juan Jiménez Vargas)

La secreción intestinal de fosfatasas

por JOSE LOPEZ NAVARRO *

(Recibido para publicar el 31 de Agosto de 1946)

SUMARIO

	Págs.
Introducción	212
PARTE EXPERIMENTAL	
Material y técnicas	216
EXPERIENCIAS	
I. — Fosfatasas en contenido intestinal	219
II. — Fosfatasas en luz intestinal tras administración de diferentes sustancias (mét. Cori)	223
III. — Secreción de fosfatasas en asa aislada	227
IV. — Secreción de fosfatasa a distintos niveles del intes- tino	239
V. — Relaciones entre fosfatasas de la pared intestinal y secreción de las mismas	242
VI. — Curso de la secreción de fosfatasa y fósforo inor- gánico	247

* Doy las gracias al Prof. Jiménez Vargas, por las orientaciones y facilidades que me ha dado para realizar este trabajo. Al Prof. Ponz, por haberme iniciado en las técnicas de investigación de la fisiología intestinal. Y al Dr. Sols, de quien he aprendido su método de determinación de fosfatasas.

VII. — Fosfatasa de pared y luz intestinal en embriones de cobayo	251
VIII. — Influencia del pH	253
IX. — Activadores e inhibidores	256
<i>Discusión</i>	p65
<i>Conclusiones</i>	274
<i>Bibliografía</i>	278

Introducción

Una abundante bibliografía revela la *existencia de fosfatasas en diferentes tejidos* y medios orgánicos en estrecha relación con el intestino. El hígado, el páncreas y sus secreciones respectivas, bilis y jugo pancreático, contienen fosfatasas. Máxima riqueza se encuentra en la propia mucosa del intestino y es bien conocido que el jugo intestinal también las posee. Aun en las heces hay fuerte actividad fosfatásica.

No hemos encontrado, sin embargo, un estudio detenido sobre la cuantía de la secreción intestinal de fosfatasas y el curso de la misma, sus relaciones con las sustancias a absorber, posibilidades de acción a diferente pH, factores activadores e inhibidores, todo lo cual se hace imprescindible para ulteriores investigaciones acerca de su importancia fisiológica y naturaleza química. Por esto, nos decidimos a abordar este problema en el presente trabajo.

La designación de fosfatasas engloba en sentido amplio un considerable número de fermentos que catalizan hidrólisis o síntesis de compuestos de ácidos fosfóricos. *Según el tipo de substrato sobre el que actúan propusieron FOLLEY y KAY (1936) el siguiente esquema de clasificación:*

1. — Fosfomonoesterasas . . . Monoésteres del ácido ortofosfórico, incluidos los nucleóticos (glicerofosfato, fenilfosfato, etc.).
2. — Fosfodiesterasas . . . Diésteres del ácido ortofosfórico.
3. — Pirofosfatasas . . . Compuestos del ácido pirofosfórico.

4. — Metafosfatasa Sales del ácido metafosfórico.
5. — Fosfoamidasa Ácidos amidofosfóricos.
6. — Varias no bien clasificadas. Lecitinasas, fitasas, adenilpirofosfatasa y exosadifosfatasa.

Con frecuencia, el término fosfatasa se utiliza en sentido restringido, para designar las fosfomonoesterasas. En este sentido lo tomamos nosotros, ya que nuestro trabajo estudia solamente las fosfomonoesterasas que deben ser, con mucho, las más importantes en la fisiología intestinal.

FOLLEY y KAY propusieron también subdividir las fosfomonoesterasas en cuatro grupos caracterizados por otros tantos *pH* óptimos de acción: A I, II, III y IV, de *pH* óptimos 9-10, 4,5-5,0, 3-4 y 6 respectivamente; considerándose a la fosfatasa intestinal como genuino representante de las fosfomonoesterasas I.

Esta última clasificación, aunque útil en la práctica, dista mucho de basarse en verdaderas constantes, ya que el *pH* óptimo para una fosfatasa depende, no sólo de ella, sino de otros factores entre los que destaca la naturaleza del substrato. Por ello estudiamos nosotros fosfomonoesterasas intestinales sin el exclusivismo de un determinado *pH*.

Antes de exponer nuestras experiencias, haremos un breve resumen de la cuestión.

Fosfatasa de la mucosa intestinal. — Ya en 1912 GROSSER y HUSLER encuentran una glicerofosfatasa en muchos tejidos animales, dando los valores más altos de hidrólisis el intestino y el riñón. Para FORRAY (1923) es el intestino el tejido más rico en fosfatasa, con un poder hidrolítico frente al glicerofosfato casi doble que el riñón. ROBISON y SOAMES (1924) encuentran también la fosfomonoesterasa en el intestino delgado de conejos, ratas y cobayos, establecido que el *pH* óptimo para su actividad está comprendido entre 8,4 y 9,4. Datos más completos ofrecen los trabajos de KAY (año 1928), que opera ya a un *pH* determinado (sobre 9): la mucosa intestinal sigue siendo la más rica, con cifras máximas en el yeyuno, tanto en conejo como en gato; en el hombre serían ligeramente superiores las del íleon. El propio KAY comprueba que los extractos de intestino, no sólo tienen acción hidrolítica sobre el glicerofosfato, sino que pueden sintetizar ésteres fosfóricos de alcohol etílico, glicerina, y otros. Las síntesis de ésteres hexosafosfóricos a partir de azúcares en presencia de extracto glicerínico de mucosa y solución amortiguadora de fosfatos (*pH* 7), fué demostrada por WILBRANDT y LASZT (1933), y LASZT (1935) observa su inhibición por el ácido monoyodoacético. El contenido de fosfatasa del intestino de rata fué estudiado por KAY (1932) y por MAC-

FARLANE, PATTERSON y ROBISON (1934). Más detenidamente WESTENBRINK (1935 y 1936) estudia el contenido a lo largo del intestino de rata, confirmando un máximo en el yeyuno al que sigue una caída paulatina hasta el ciego; no encuentra relación entre *la absorción de glucosa y el contenido en fosfatasa*, aunque precisamente *sigan paralelas* la actividad fosfatásica intestinal y su capacidad para absorber glucosa. Una serie de trabajos de BELLINI y CERA (1940) y CERA y BELLINI (1940) hablan en favor de una disminución de fosfatasa en la mucosa tras la absorción de glicerofosfato o glucosa y un aumento después de absorber grasa neutra.

La *demonstración histoquímica* de fosfatasa alcalina en la mucosa intestinal la debemos a KABAT y FURTH (1941) y a GOMORI (1941): el epitelio del intestino delgado y las células endoteliales de la submucosa contienen considerable cantidad.

La influencia de *factores vitamínicos y hormonales* sobre el contenido fosfatásico del intestino ha sido estudiado entre otros por GRIMM y STRAYER (1936) — dosis tóxicas de vitaminas A y D —, AUSTONI y COGGI (1934) — extirpación de suprarrenales y tiroides, KUTSCHER y WÜST (1941) — suprarrenalectomía — y PONZ (1945) — intoxicación tiroxínica. De alteraciones en condiciones patológicas ha informado HEYMANS (1930) encontrar disminución de fosfatasa en niños raquíticos.

Fosfatasas en el contenido intestinal. — Los primeros datos sobre una liberación de ácido fosfórico en el intestino como consecuencia de una acción fermentativa sobre ésteres fosfóricos, corresponden a la digestión de ácidos nucleínicos por las nucleasas. NAKAYAMA (1904) y luego ABDERHALDEN y SCHITTENHELM (1906) encuentran nucleasas en los extractos de mucosa intestinal. WAKABAYASHI y WOHLGEMUTH (1911) hablan ya de una nucleasa en la secreción del intestino delgado y aun en la del grueso. Pero son LEVENE y MEDIGRECEANU (1911) quienes estudiando la degradación de los ácidos nucleínicos por el quimo recogido de una fístula intestinal establecen la existencia de tres fermentos distintos que intervienen en ella: *la nucleinasa, nucleotidasa y nucleosidasa*; de éstas la segunda separaría el ácido fosfórico transformando el nucleótido en nucleósido. A partir de entonces se va profundizando el conocimiento de la composición química de ácidos nucleínicos a la vez que se estudian las propiedades de las nucleotidasas y su distribución en el organismo. DEUTSCH y RÖSSLER (1929), LEVENE y DILLON (1930), KLEIN (1932), TAKAHASHI (1932), MAKINO (1934), etc., la encuentran en la mucosa intestinal de cerdo, res vacuna, conejo, etc.

Entretanto y separadamente, se descubre la actividad fos-

fatásica del contenido y jugo intestinal sobre los substratos clásicos de la fosfomonoesterasa, sin pensar al principio en una identidad de fermentos. Así SCHMIDT (1914) investiga cualitativamente y «por vez primera» la glicero-fosfatasa en el contenido intestinal del recién nacido, encontrando fuerte positividad. Y CLEMENTI (1923), que establece la existencia de «un nuevo fermento del jugo entérico: la fosfoglicerasa», contenida en la secreción recogida mediante fístula de Thiry-Vella, del intestino delgado de perro, a la que atribuye la misión de terminar la digestión de los fosfátidos, iniciada por la lecitinasa del jugo pancreático. Como estímulos secretores utiliza la glicerina al 40 ó 50 %, la sacarosa al 40 % o la peptona al 45 %. Los resultados fueron confirmados más tarde por el propio CLEMENTI (1930).

Trabajos posteriores dicen mucho en favor de una identidad de las fosfomonoesterasas alcalinas encontradas en distintos tejidos y medios orgánicos y las nucleotidasas, como ya sugirió KAY (1928). Ambas se encuentran en los mismos extractos y tejidos, tienen semejantes inhibidores, las concentraciones de una y otra son proporcionales; se influyen de parecida forma por el magnesio y además los preparados más puros de nucleotidasa intestinal y hepática hidrolizan el glicero-fosfato y otros ésteres fosfóricos al igual que la fosfomonoesterasa alcalina es activa frente a los nucleótidos, teniendo ambas un pH óptimo alrededor de 9. (LEVENE y DILLON, 1930 y 1932, REIS, 1924). Este último autor (1937) ha podido aislar sin embargo, del tejido nervioso, una nucleofosfatasa libre de la fosfatasa ordinaria, específica sobre los nucleótidos que tienen esterificado el ácido fosfórico en el quinto carbono de la ribosa. Con esto la 5—nucleotidasa existiría como tal. Recientemente LEHMANN-ECHTERNACHT (1941) ha purificado mucho los extractos de mucosa hasta alcanzar gran poder desfosforilante sobre el ácido ribonucleínico y que poseían también actividad frente al glicero-fosfato, monofenilfosfato, etc.; pero, con todo, la identidad entre la 3—nucleotidasa y la glicero-fosfatasa no está suficientemente demostrada, pues las semejanzas encontradas pueden explicarse (BREDERECK, 1938) con ser solamente igual el cofermento pudiendo diferir el apofermento.

Fosfatasa en heces. — Las fosfatasas, vertidas a la luz in-

testinal, se encuentran todavía — al menos en parte — en las heces. En las humanas las ha estudiado HEYMANN (1933) en relación con el raquitismo. ARMSTRONG, KING y HARRIS (1934) *la observan en el perro con pH óptimo a 9,6 y gran actividad, dando después ARMSTRONG (1935) una técnica para purificarla: el pH óptimo es 9,6 y por debajo de 6 ya no hay prácticamente hidrólisis, activándose mucho por el magnesio por lo que sus propiedades coinciden con la de la fosfatasa ósea e intestinal.* KOSTER (1939) da un método de determinación y observa sus variaciones en distintas afecciones.

Plan de trabajo

Nuestras experiencias han recaído, como hemos dicho, sobre las fosfomonoesterasas, valorándolas frente al β — glicero-fosfato sódico (Merck) a pH 9.4. Nos proponíamos los siguientes puntos:

1. — Confirmar la secreción de fosfatasa a la luz intestinal y su origen entérico.
2. — Investigar cuantitativamente la relación entre la secreción de fosfatasa y la naturaleza de la sustancia ingerida.
3. — Observar las diferencias en la cantidad de fosfatasa segregada en las diferentes porciones del intestino, ante un mismo estímulo.
4. — Seguir en lo posible el curso de la secreción de la fosfatasa.
5. — Estudiar las relaciones entre fosfatasas de pared y luz intestinal, incluyendo las variaciones de su actividad dependientes del pH y la acción sobre ambas de un buen número de activadores e inhibidores, en busca de las diferencias que pudiera haber entre ellas y su más precisa clasificación.

Parte experimental

Material y métodos. — La mayoría de las experiencias se han hecho con el conejillo de indias *Cavia cobaya* de 200 a 600 gramos de peso. En algunas hemos utilizado la rata blanca criada en nuestro laboratorio, o el conejo; en otras se ha hecho uso del perro.

En una serie de experiencias hemos seguido el *método de*

CORI (1925) para el estudio de la absorción, determinando la actividad fosfatásica del contenido intestinal después de un cierto tiempo. En otra hemos acudido al *método de VÉRZAR* de asas aisladas, lavando hasta eliminación prácticamente total de las fosfatasa existentes y determinando las que se encontraban en la luz después de la absorción de diferentes sustancias. Las particularidades de la aplicación de estas técnicas se verán al exponer las respectivas experiencias.

Extracción de fosfatasa de pared. — Se ha seguido en líneas generales la técnica de KAY (1928) como sigue: porciones de intestino lavadas con suero fisiológico se pesan en balanza aperiódica para suprimir en lo posible las diferencias por desecación. *Trituradas en mortero*, con arena lavada, son *autolizadas* en cien veces su peso de agua clorofórmica, a la temperatura del laboratorio ($17-22^{\circ}$), durante unas 22 horas y pasado este tiempo se *filtra por algodón*, conservando el filtrado en la nevera hasta su utilización. En unos casos se partía de la totalidad del intestino delgado, del que después de fragmentado finamente con tijeras se tomaba una muestra homogénea; y en otros, cuando interesaba comparar el contenido a distintos niveles, se utilizaban pequeños segmentos del delgado tomados a diferentes distancias del píloro, o del ciego o colon. Para determinación de fosfatasa se *diluye* el autolizado *obtenido a 1/2* para llevar la concentración del fermento a condiciones óptimas de acción.

El tiempo de autólisis se adoptó tras la siguiente experiencia: tras agitación, se tomaron muestras de un autolizado preparado en la forma descrita, a las 15, 18, 22, 24 y 48 horas, obteniendo respectivamente 44.0, 46.5, 47.2, 48 y 45 mg. de fósforo liberados por 100 c. c.; sobre las 22 horas hay constancia suficiente.

Determinación de la fosfatasa y el fósforo inorgánico. — Se sigue el método de SORESEN, en la forma siguiente:
Reactivos:

1. — Substrato. β -Glicerofosfato sódico (MERCK) m/22,22.
2. — Soluciones amortiguadoras:
 - a) Glicocola-sosa 0,1 N (según SÖRENSEN) para pH 9,4 a 37 grados.
 - b) Acetato-veronal (MICHAELIS) para la serie de pH 9,6 a 3.
3. — Ácido tricloracético al 30, 20 y 6 %.
4. — Reactivo molibdico. Molibdato amónico al 2,5 % en ácido sulfúrico aproximadamente 3 N.
5. — Reductor: clorhidrato de 2-4-diaminofenol (MERCK) al 0,5 % en sulfito sódico al 5 % (MÜLLER, 1935). Renovada cada 4-6 días según la temperatura de la estación.
6. — Soluciones de fósforo:
 - a) Solución madre: 1,2 g. de P por mil c. c. (5,2714 g.

de $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$, MERCK p. a. desecado sobre sulfúrico, disueltos y llevados hasta 1.000 c. c. con agua destilada acidulada con 4 c. c. de ácido sulfúrico).

- b) Soluciones tipo 1, 2, 6 y 12 mg. % de P preparadas a partir de la solución madre, conservadas con toluol y renovadas cada mes.

Técnica :

Se utilizan 3 tubos por cada determinación : 2 para duplicar la de fosfatasa y 1 para el fósforo inorgánico. Además, 2 tubos para tipos de P en cada serie.

En cada tubo se ponen 4 c. c. de sustrato y 4 c. c. de solución amortiguadora. Los que han de servir para *las fosfatasas* se llevan al baño a 37° y pasados unos 5 minutos se añade a cada uno un c. c. del líquido problema. A los tubos para determinación de *fósforo inorgánico* se les añade 3 c. c. de ácido tricloroacético al 20 % y 1 c. c. de líquido problema, filtrando a los 10 minutos. A los reservados para *los tipos* se les añade 1 c. c. de solución tipo de P de 6 y 12 mg. % respectivamente y 3 c. c. de tricloroacético al 20 %, para poder utilizar el sistema colorimétrico de SOLS (1945).

A los 60 minutos de permanencia de *los problemas* en el baño se les saca de éste añadiendo inmediatamente 3 c. c. de ácido tricloroacético al 20 % que interrumpe la hidrólisis y precipita las proteínas. 10 minutos después, se filtra.

De cada uno de los filtrados de *fósforo* y *fosfatasas* se pasan 6 c. c. a otros tubos y se les añade 1 c. c. de reactivo molibdico y 0,8 c. c. de reductor. Al mismo tiempo se habrá añadido a los tubos con soluciones *tipo P*, 2 c. c. de molibdico y 1,6 de reductor. Después de 15 minutos se efectúa la colorimetría utilizando para comparación el tipo de 6 mg. %. Preferentemente a 20 mm. (colorímetro de inmersión tipo Duboscq). La lectura del tipo de 12 mg. por 100 sirve de base para el cálculo colorimétrico.

La actividad fosfatásica — medida por el fósforo liberado — viene dada por la diferencia entre el P inorgánico inicial del líquido problema y el final, después de la hidrólisis. Se expresa, en principio, en mg. de P liberados por 100 c. c. de líquido problema, correspondiendo, pues, a unidades BOBANSKY. Según los casos, estas unidades se refieren a g. de tejido o a cm. de intestino.

Determinación de azúcares. — Las determinaciones de glucosa, galactosa, fructosa y xilosa se hicieron por el método de HAGEDORN-JENSEN, aplicando los coeficientes de equivalencia de poder reductor para los tres últimos.

Las determinaciones de fósforo inorgánico en contenido intestinal se hacían del siguiente modo : Se arrastraba el contenido del asa con unos 20 c. c. de suero fisiológico, mediante jeringa, a un matraz aforado de 25 c. c., y se completaba luego

hasta el enrase. Se homogeneizaba bien el contenido del matraz y se filtraba, determinando el fósforo en 5 c. c. de este filtrado, de la forma siguiente: Se trasladan los 5 c. c. a un tubo de ensayo en el que hay 1 c. c. de ácido *tricloroacético* al 30 %. Mezclar y pasados unos diez minutos filtrar por papel de filtro p. á. (lavado a los ácidos). Tomar 6 c. c. de este filtrado y añadir 1 c. c. de *molibdato* y 0,8 c. c. de *amidol*. Preparar dos tipos con soluciones de fósforo tipo 1 y 2 mg., 1 c. c., más 5 c. c. de tricloroacético al 6 %, más 1 c. c. de molibdato más 0,8 c. c. de amidol, calculando como si el tipo fuera de 0,2 mg. ya que hay 5 veces más problema. Se empleaba esta técnica para obtener resultados con garantía, dado el bajo contenido de P en asa.

Experiencias

I. — FOSFATASAS EN CONTENIDO INTESTINAL

A. *Durante la digestión.* — Varios animales en plena digestión de alimentación mixta ordinaria fueron sacrificados, extrayéndose la papilla que fluía espontáneamente del intestino delgado después de seccionarlo alrededor de su punto medio. Se diluye 50 veces con suero fisiológico, se filtra por algodón y se determina la actividad fosfatásica del filtrado. Los resultados fueron:

TABLA I

Actividad fosfatásica (pH 9,4) del contenido de intestino delgado durante la digestión.

Animal	Peso g	Fosfatasa Unidades por 100 c. c.
Cobayo	420	845
íd.	640	1250
íd.	480	915
Conejo	1450	180
íd.	700	250

Tres cobayos alimentados con la dieta mixta ordinaria, fueron sacrificados en plena digestión; tras laparotomía, se ligó el intestino delgado por debajo de la desembocadura del colé-

doco y al final del íleon. Extraído lo comprendido entre ambas ligaduras, se lavó exteriormente con suero fisiológico y se arrastró el contenido intestinal con unos 80 c. c. de suero fisiológico a un matraz aforado a 100 c. c. completando luego hasta el enrase y filtrando después de homogeneizar el contenido. Se determina la actividad fosfatásica del filtrado. Se mide la longitud del intestino utilizado.

TABLA II

Unidades de fosfatasa presentes en el contenido total del intestino delgado de cobayo durante la digestión.

Peso gr.	Longitud intestino cm.	Fosfatasas	
		Totales	Por cm
325	118	18	0,153
320	125	34	0,272
375	123	28	0,227
		media	0,217

Como se ve en las Tablas I y II el contenido intestinal es considerablemente rico en fosfatasa alcalina; unas 100 a 300 veces la media habitual en suero de mamíferos.

Los posibles orígenes de esta fosfatasa son:

- a) Los alimentos.
- b) Secreciones digestivas no entéricas (saliva, jugo gástrico, bilis y jugo pancreático).
- c) Secreción entérica.

DEMUTH (1925) había encontrado ya en bilis humana bastante actividad fosfatásica; sus datos son más bien cualitativos pero se desprende de ellos que los valores obtenidos son del orden de los que encontraba en el suero de niños raquíticos. En saliva encontraba mucha menos y en el *jugo gástrico* nada. También U'MEXO (1931) da bastante actividad a la bilis y nada al jugo gástrico; tampoco habría en saliva; sin embargo la mucosa gástrica sí que contiene fosfatasas; la del *jugo pancreático* no llegaría a la mitad de la biliar. ARMSTRONG, KING y HARRIS (1924) observaron un elevado contenido en la bilis que era, por otra parte, muy variable: la suponen excreción de la producida en el hueso. El mismo año GREENE, SHATTUCK

y KAPLOWITZ confirman la existencia de fosfatasa biliar, pero la suponen secreción hepática. FREEMAN y CHEN (1938) dan entre pocas y varios cientos de unidades Bodansky por 100 c. c. de bilis de perro, según la fuente de procedencia.

Para dilucidar la cuantía en que podían participar estos distintos orígenes en nuestras experiencias procedimos a la determinación de actividad fosfatásica de contenido gástrico y bilis.

1. *Contenido gástrico. Engloba las fuentes alimenticia, salivar y gástrica.* — Así se llega a conocer qué fosfatasa puede llegar a la luz intestinal por el píloro; dado el objetivo de nuestro estudio carece de interés la consideración aislada del aporte inicial alimenticio y del correspondiente a la secreción salivar, pues ambos deben sufrir inactivación considerable durante su estancia en el estómago ya que es general a las fosfatasas alcalinas la disminución de actividad por permanencia temporal en reacción ácida.

TABLA III

Fosfatasa alcalina del contenido gástrico de cobayo durante la digestión.

Peso	Fosfatasas Unidades por 100 c. c.
453	37,4
463	10,9
252	17,2
270	14,2
	media 20,0

2. — *Fosfatasas de bilis:* Los mismos animales utilizados para las determinaciones en contenido gástrico y algunos más sirvieron para la de bilis. Se recogía ésta de la vesícula y se diluía al 1/5. Los resultados aparecen en la tabla IV.

TABLA IV

Fosfatasa alcalina (pH 9,4) de bilis vesicular de cobayo

Peso	Fosfatasa Unidades por 100 c. c.
453	6,3
463	6,5
252	5,0
270	8,5
420	15,0
310	5,9
365	13,4
	media 8,6

Como se ve, las concentraciones en bilis de cobayo son de un orden *cien veces inferior* a las que encontramos en el contenido intestinal.

Estos resultados nos indujeron a prescindir de determinar la actividad fosfatásica del *jugo pancreático* que, según los datos de la bibliografía es mucho más baja que la de bilis. Con ello queda descartado que las fosfatasa que nosotros encontramos en el contenido intestinal procedan de fuentes extra-intestinales; por el contrario, tan elevadas concentraciones en fosfatasa deben proceder fundamentalmente de la misma pared intestinal.

B. En el ayuno. — Se determinan las fosfatasa presentes en la luz intestinal entre duodeno y final del íleon, en cobayos sometidos a ayuno de 48 ó 72 horas, arrastrando el contenido con suero fisiológico.

TABLA V

Fosfatasa en la luz intestinal de cobayos en ayuno

Horas de ayuno	Peso	Longitud de intestino delgado	Fosfatasa	
			Totales	Por cm.
48	235	110	3,2	0,029
48	340	120	4,5	0,037
72	246	124	8,0	0,064
72	270	130	11,1	0,085
			media	0,054

De estos datos se deduce que por la digestión aumenta considerablemente (unas cuatro veces) la cantidad de fosfatasa presente en la luz intestinal.

Dada la gran diferencia entre ayuno y digestión quisimos averiguar el efecto estimulante de diferentes sustancias sobre la secreción de fosfatasa intestinal, utilizando el método de CORI.

II. — FOSFATASAS EN LUZ INTESTINAL TRAS INGESTIÓN DE DIFERENTES SUSTANCIAS (*Método de CORI*).

Tras ayuno de 48 horas, los cobayos recibían mediante sonda gástrica la solución de la sustancia a investigar. Al cabo de cierto tiempo (90-150 minutos) se les daba muerte por golpe en la nuca o decapitación. Tras amplia laparatomía, se liga el intestino delgado en sus cabos pilórico — por debajo del colédoco — y cecal y se extrae lo comprendido entre las ligaduras, cuidando de no desgarrar la mucosa. Se lava exteriormente con suero fisiológico y se aboca a un embudo sobre un matraz aforado a 100 c. c. Se abren con tijera los extremos inferior y superior del intestino y se arrastra todo el contenido con 80 centímetros cúbicos de suero fisiológico tibio, lavando el embudo y completando hasta el enrase. Inmediatamente se homogeneiza y se filtra. Se determina la actividad fosfatásica del filtrado (en unidades totales del contenido).

En algunos pocos casos hemos encontrado buena parte del íleon ocupado por abundantes restos alimenticios antiguos que no habían alcanzado todavía el ciego, a pesar de tratarse de animales con ayuno de 48 horas. Preferimos entonces hacer la ligadura inferior antes de la porción sucia y lavar sólo la parte ligada. En todo caso se mide la longitud de intestino lavada.

Hemos hecho determinaciones de fosfatasas antes y después de filtrar, así como después de centrifugar el filtrado. De ello dedujimos la conveniencia de filtrar y que la centrifugación era innecesaria.

La existencia de restos alimenticios y elementos de descomposición puede hacer que el líquido no sea homogéneo y las muestras tomadas no resulten equivalentes. En la tabla VI se comprueba esta alta variabilidad en los resultados de determinaciones de fosfatasa antes de filtrar; recoge uno de los muchos casos en que lo vimos. Para eliminar al máximo todo

resto celular procedimos a centrifugar energicamente el filtrado por si encontrábamos diferencia antes y después de esta operación; no vimos sedimento apreciable y como también se ve en la tabla, no hay diferencias dignas de consideración,

TABLA VI

Fosfatasas segregadas por el intestino delgado de cobayo durante la absorción de glucosa. Determinaciones antes de filtrar, después y tras centrifugación.

Peso	Substancia	Tiempo	Líquido de partida	Unidades	Fosfatasas Totales en intestino	Media
435	Glucosa	90 min.	Sin filtrar	1	37,5	35,3
				2	32,9	
				3	35,6	
			Filtrado	1	23,2	23,0
				2	23,1	
				3	22,7	
			Filtrado y centrifug.	1	22,9	23,1
				2	23,3	
				3	23,3	

En su vista los datos incluidos en las tablas que siguen se refieren siempre a las determinaciones en el filtrado.

Como el contenido intestinal se lleva a un volumen de 100 centímetros cúbicos las unidades de actividad fosfatásica (mg. de fósforo liberados por 100 c. c. de líquido problema) corresponden al total de unidades presentes en la luz intestinal lavada. Para obtener resultados comparativos, dadas las diferencias de longitud del intestino utilizado, referimos también los valores hallados a unidades de fosfatasas por centímetro de intestino.

1. — Azúcares

Se ha dado a cada animal 10 c. c. de solución de hexosa (glucosa o fructosa) hipertónica (21,6 %). Tiempo de absorción, 90 minutos. La tabla VII reúne los resultados de 11 animales.

TABLA VII

Fosfatasa en luz de intestino delgado de cobayo tras administración de azúcares.

Peso g.	Substancia administrada	Tiempo	Longitud intestino delgado	Unidades de fosfatasa	
				Total	Por cm.
637	Glucosa	90	125	30,9	0,247
603	»	»	135	22,1	0,164
547	»	»	120	28,3	0,236
435	»	»	118	23,0	0,195
			media	26,1	0,210
(de la 1.ª mitad del intestino delgado)					
400	»	»	60	22,4	0,375
446	»	»	63	15,7	0,249
325	»	»	58	18,5	0,319
			media	18,9	0,314
227	Fructosa	»	45	19,6	0,436
253	»	»	62	16,4	0,264
505	»	»	64	23,1	0,361
			media	19,7	0,354

2. — Cloruro sódico y glicocola

Se administra a los animales 10 c.c. de solución de ClNa al 3,6 % ó glicocola al 9,6 %. Duración de la prueba 90 minutos.

TABLA VIII

Fosfatasa alcalina en luz de intestino delgado de cobayo tras administración de cloruro sódico y glicocola.

Peso g.	Substancia administrada	Tiempo	Longitud intestino delgado	Unidades de Fosfatasa	
				Total	Por cm.
510	Cloruro sódico	90	127	10,5	0,083
480	»	»	120	13,3	0,111
463	»	»	121	7,4	0,061
427	»	»	127	6,8	0,054
			media	9,5	0,077
512	Glicocola	»	125	14,3	0,114
210	»	»	105	44,2	0,421
405	»	»	140	18,3	0,131
310	»	»	125	20,2	0,162
			media	24,2	0,207

3. — Peptona y aceite de olivas

Se dan 10 c. c. de peptona al 10 % ó 2 c. c. de aceite de olivas. Con peptona duraba la prueba 90 minutos; con aceite, para dar tiempo al vaciamiento gástrico se prolongaba hasta las 2 horas y media; este tiempo mostró ser suficiente para que la mayor parte del aceite administrado se encontrara ya en el intestino.

TABLA IX

Fosfatasa alcalina en luz de intestino delgado de cobayo tras administración de peptona y aceite de olivas.

Peso g.	Substancia administrada	Tiempo	Longitud intestino delgado	Unidades de Fosfatasa	
				Total	Por cm.
252	Peptona	90	120	32,1	0,267
270	»	»	130	23,0	0,177
245	»	»	133	18,2	0,137
268	»	»	128	20,6	0,161
			media	23,5	0,185
350	Aceite olivas	150	150	28,4	0,156
300	»	»	130	32,1	0,247
420	»	»	131	26,0	0,199
			media	28,8	0,200

Los resultados de las experiencias precedentes con el método de CORI dan una idea de la secreción de fosfatasas ante los diversos estímulos empleados. Sin embargo, el hecho que más arriba señalamos de existir aún en el ayuno de 48 y 72 horas restos alimenticios y de 0,03 a 0,08 unidades por centímetro hacen poco precisas las determinaciones de lo segregado y restan valor a las conclusiones. También las diferencias en la progresión del líquido administrado a lo largo del intestino pueden ser motivo de diversidad de resultados. De hecho, la variabilidad que se encuentra en las pruebas con un mismo estímulo es bastante grande. Estas consideraciones nos llevaron a estudiar la secreción en asas aisladas, según la técnica de VERZAR y su escuela, lo que permite un lavado previo eficaz y condiciones experimentales más iguales, aun cuando el procedimiento sea menos fisiológico.

III. — SECRECIÓN DE FOSFATASAS A LA LUZ INTESTINAL EN ASA AISLADA DE INTESTINO DELGADO DURANTE LA ABSORCIÓN DE DISTINTAS SUBSTANCIAS.

Hemos utilizado en líneas generales la técnica de VÉRZAR para determinaciones de capacidad de absorción. Las experiencias se han hecho en cobayos y en ratas.

Ayuno 24 horas. Anestesia con uretano al 25 % (1,2 mg/kg de peso), operando a la hora y media de inyectarlo. Tras laparatomía se hace una ligadura en el yeyuno a unos 12 cm. del píloro, para evitar en lo sucesivo cualquier aflujo de bilis a la porción siguiente. Se liga también a unos 50 ó 70 cm. de la primera (según se quieran preparar dos o tres asas) y se abre el intestino en un punto inmediatamente superior. Se lava la porción aislada; para ello se introduce una jeringa sin aguja cargada de solución fisiológica, unos 2 cm. por debajo de la primera ligadura y se hace fluir a presión suave hasta 40 ó 60 c. c. de suero fisiológico (para los 50 ó 70 cm. de intestino respectivamente), que van saliendo por la incisión inferior; se pasan con suavidad los dedos a lo largo de la porción lavada de manera que no quede líquido tras ellos. Dentro de este tracto se aíslan dos o tres asas, según las experiencias, de longitudes variables sobre 20 cm. que se llenan con las soluciones que se deseen; se liga al efecto a unos 20 cm. de la primera incisión, se hace un nudo sin apretar a nivel de ésta y por ella se introduce una jeringa de 2 c. c. graduada en 0,01 c. c.; se aprieta ahora el nudo sobre el extremo de la jeringa, se inyecta la cantidad de solución que se quiera y mientras se retira la jeringa se aprieta definitivamente la ligadura, quedando el líquido comprendido entre las dos

que limitan el asa. De modo semejante se preparan a continuación las asas segunda o tercera. Las soluciones introducidas y el suero fisiológico se mantienen previamente en baño a 38°. Las incisiones de la pared intestinal se practican en los puntos menos vascularizados para evitar hemorragias. Hechas las asas se cierra el vientre con pinza de Pean y se deja el animal cubierto y caliente durante todo el tiempo de la prueba. Se ha comprobado la temperatura rectal, vigilando que estuviera siempre entre 35,5 y 37°. Pasado el tiempo de absorción correspondiente se cortan las asas, se lavan exteriormente con suero fisiológico y se aboca cada una de ellas a un matraz aforado de 25 c. c., arrastrando el contenido del asa con 20 c. c. de suero fisiológico mediante jeringa y completando luego hasta el enrase. Se homogeneiza el líquido del matraz y se filtra inmediatamente, procediendo en seguida a la determinación de fosfatasa con 1 c. c. de filtrado. Un estudio comparativo análogo al expuesto en la parte II, nos indicó la conveniencia de filtrar y la no necesidad de la centrifugación. Las determinaciones de fósforo inorgánico se hacían a partir de 5 c. c. de filtrado. Las de azúcar no absorbido a partir de 0,1 c. c.

En las tablas se expresa la fosfatasa en unidades totales y unidades por centímetro. Como unidades entendemos el total de unidades contenidas en el asa; como las unidades son miligramos de fósforo inorgánico liberado por 100 c. c. de problema y el contenido intestinal se ha llevado a 25 c. c.; basta dividir por 4 las unidades halladas en el filtrado. Para tener datos comparativos en las distintas experiencias preferimos referir los valores encontrados a centímetro de asa.

Las asas se medían después de vaciadas y liberadas de los restos de mesenterio, colgándolas verticalmente de un extremo para que fuese aproximadamente constante el grado de estiramiento.

El fósforo inorgánico lo incluimos solamente en aquellas tablas en que nos ha parecido de interés: glucosa-xilosa y glicero-fosfato-glucosa. Se expresa en gammas totales de filtrado y refiriendo esta cantidad a centímetro de asa.

Las cantidades absorbidas no se han determinado más que en el caso de tratarse de glucosa y xilosa, en que presentaba interés investigar las posibles relaciones entre la secreción de fosfatasa y la absorción selectiva. En las respectivas tablas se incluyen solamente la absorción de cada asa en tanto por ciento; también aquí se refieren estos valores a centímetros de longitud.

Comprobamos que los lavados con 40 ó 60 c. c. de suero fisiológico eran suficientes para arrastrar casi totalmente la

fosfatasa que previamente hubiera en el intestino. De los varios casos de nuestros protocolos escogemos dos ejemplos: uno en el que se lavan unos 50 cm. de intestino y otro de unos 70 cm. Se recogían muestras del líquido que fluía por incisión inferior del trozo correspondiente al final de lavar con 20 c. c.; después de volver a lavar con otros 20 y así sucesivamente hasta un lavado total de 80 c. c., determinando en aquéllas la actividad fosfatásica.

TABLA X

Actividad fosfatásica de las últimas porciones de líquido de lavado, recogido tras lavados lentos con cantidades repetidas de suero fisiológico.

Animal	Peso	Longitud lavada	Unidades de fosfatasa al final de lavar con			
			20 c. c.	40 c. c.	60 c. c.	80 c. c.
Cobayo	285	52	10,3	2,1	1,8	—
»	320	74	4,3	1,4	0,9	0,8

Las cantidades de líquido de lavado que pueden quedar en el asa son muy pequeñas y desde luego no llegan nunca a un centímetro cúbico; aun suponiendo quedase esta cantidad, tras los 40 ó 60 c. c. de lavado respectivamente se habrán retenido en el asa valores de 0,021 y 0,009 unidades, cifras despreciables cuando se comparan con los resultados obtenidos en las experiencias con la sola excepción de los encontrados en el caso de inyectar en el asa suero fisiológico.

1. — Glucosa y suero fisiológico

Se inyectan en asa 2 c. c. de glucosa al 5,4 % (isotónica) o de suero fisiológico. En las tablas se indican con G y SF respectivamente. Experiencias de 30, 45 ó 60 minutos de duración. La posición del asa expresa si ocupan el primero, segundo o tercer lugar a partir del píloro. En unos casos se ha puesto suero fisiológico en las dos asas del mismo animal; en otros, se han puesto en asas distintas del mismo animal sustancias diferentes.

TABLA XI

Secreción intestinal de fosfatasa en asa aislada de cobayo durante la absorción de glucosa y suero fisiológico

Peso g.	Asas Posición	Longitud cm.	Substancia en asas	Tiempo	Fosfatasa segregada	
					Total	Por cm.
235	1. ^a	20	SF	30	1,2	0,060
	2. ^a	19	SF	"	1,0	0,052
250	1. ^a	15,5	G	"	3,7	0,339
	2. ^a	16,5	SF	"	0,8	0,048
295	1. ^a	18	SF	"	1,1	0,06
	2. ^a	22,5	SF	"	1,6	0,07
285	1. ^a	17,0	SF	"	1,4	0,08
	2. ^a	20,0	SF	"	1,0	0,05
208	1. ^a	18	G	"	4,2	0,23
	2. ^a	17	SF	"	1,2	0,09
252	1. ^a	21	G	"	5,0	0,24
	2. ^a	19	G	"	5,2	0,27
	3. ^a	18	SF	"	0,9	0,05
315	1. ^a	23	SF	"	1,0	0,04
	2. ^a	20	SF	"	1,1	0,055
187	1. ^a	20	G	"	5,0	0,25
	2. ^a	17	SF	"	0,9	0,05
200	1. ^a	19	SF	45	1,4	0,07
	2. ^a	21	G	"	5,3	0,25
355	1. ^a	22	G	"	5,8	0,26
	2. ^a	19	SF	"	1,2	0,06
403	1. ^a	21	SF	"	1,3	0,06
	2. ^a	23	G	"	6,3	0,27
277	1. ^a	18	SF	60	1,4	0,08
	2. ^a	17	G	"	6,1	0,36
290	1. ^a	21	G	"	6,2	0,30
	2. ^a	19	SF	"	1,3	0,07

De los datos anteriores se deduce claramente que en las asas que han contenido suero fisiológico los valores de fosfatasa segregada son unas 4 veces más bajos que los correspondientes a las asas con glucosa.

Es interesante notar cómo la secreción de fosfatasa tiene lugar precisamente en el asa que contiene la glucosa, no influyendo en absoluto este estímulo en el resto de la mucosa intestinal; las asas con suero fisiológico contienen aproximadamente la misma cantidad de fosfatasa, tanto si se encuentran junto a un asa también con suero fisiológico como junto a otra que contenga glucosa.

2. — *Glucosa, galactosa y fructosa*

Se introducen en cada asa 2 c. c. de solución isotónica de hexosa. Galactosa y fructosa se representan en la tabla por Gal. y Fr. respectivamente. Las experiencias duran 30 ó 45 minutos. En un mismo animal, se ponen todas las asas con glucosa y otra hexosa en asas distintas, invirtiendo también la posición del asa que se llena con glucosa. La tabla XII reúne los resultados :

TABLA XII

Secreción intestinal de fosfatasa en asa aislada de cobayo durante la absorción de glucosa, galactosa y fructosa.

Peso g.	Asas		Substancia en asas	Tiempo	Fosfatasa segregada	
	Posición	Longitud			Total	Por cm.
245	1. ^a	19	G	30	4,2	0,22
	2. ^a	20	G	"	5,0	0,25
240	1. ^a	17	G	"	3,7	0,22
	2. ^a	16	G	"	4,0	0,25
275	1. ^a	15,5	G	"	4,0	0,26
	2. ^a	17	G	"	3,5	0,21
320	1. ^a	18	G	30	4,3	0,24
	2. ^a	20	G	"	4,6	0,23
202	1. ^a	18,5	G	"	4,6	0,25
	2. ^a	18	G	"	4,2	0,23
172	1. ^a	19	G	"	4,4	0,23
	2. ^a	23	G	"	5,3	0,16
198	1. ^a	17	G	"	3,9	0,23
	2. ^a	16	G	"	4,3	0,27
270	1. ^a	25	G	"	5,9	0,24
	2. ^a	23	G	"	6,0	0,26
125	1. ^a	18,5	Gal	45	3,0	0,16
	2. ^a	17,0	SF	"	1,0	0,06
	3. ^a	20,0	G	"	4,8	0,24
347	1. ^a	20,5	G	"	5,4	0,26
	2. ^a	19,0	Gal	"	3,9	0,21
297	1. ^a	18,5	Fr.	"	4,8	0,26
	2. ^a	21,0	G	"	5,0	0,24
	3. ^a	17,5	SF	"	1,2	0,07
263	1. ^a	20,0	G	"	4,7	0,23
	2. ^a	21,0	Fr.	"	4,5	0,21

Las cantidades de fosfatasa segregada en las asas con glucosa son bastante regulares, dentro de la variabilidad típica de los valores fosfatásicos de los más distintos orígenes. Con galactosa se encuentran cantidades parecidas, aunque quizá algo inferiores; con fructosa no puede hablarse de diferencias.

Destaca, en cambio, que en los animales con tres asas de las que en una de ellas se ha puesto para comparar suero fisiológico, permanece en ésta la fosfatasa tres a cuatro veces por debajo de las de asas con hexosa.

No se aprecian diferencias constantes en la secreción de fosfatasa por la posición de las asas en primero o segundo lugar en el yeyuno.

3. — Glucosa, peptona y glicocola

Se han utilizado glucosa al 5,4 %, peptona al 10 % y glicocola al 2,2 %, de cuyas soluciones se introducían en asa 2 c. c. En la tabla se representan por G., P. y Glic., respectivamente. La duración de la experiencia ha sido en todos los casos 60 minutos.

En cada animal se preparan tres asas, alternando el orden en que se ponen las distintas soluciones, para evitar diferencias por la posición del asa. En un caso, se ha puesto en una de las asas suero fisiológico para comparar.

Como se ve en la tabla XIII, glucosa, peptona y glicocola se comportan, respecto a la secreción de fosfatasa, de modo semejante; sólo pueden sospecharse valores ligeramente más bajos para la peptona, lo que podría explicarse por la marcada hipotonía de la solución. Con suero fisiológico se han encontrado cifras mucho más bajas.

TABLA XIII

Secreción intestinal de fosfatasa en asa aislada de cobayo durante la absorción de glucosa, peptona y glicocola.

Peso g.	A s a s		Substancia en asas	Tiempo	Fosfatasa segregada	
	Posición	Longitud			Total	Por cm.
509	1. ^a	26,5	G	60	6,1	0,23
	2. ^a	22	P	»	4,0	0,18
	3. ^a	24,5	Glic.	»	6,4	0,26
480	1. ^a	23	P	»	4,8	0,21
	2. ^a	21	Glic.	»	5,0	0,24
	3. ^a	22	G	»	5,5	0,25
496	1. ^a	26	G	»	6,8	0,26
	2. ^a	19	P	»	3,6	0,19
	3. ^a	15	SF	»	1,0	0,07
405	1. ^a	21	Glic.	»	4,8	0,23
	2. ^a	19	G	»	5,1	0,27
	3. ^a	22	P	»	4,8	0,22

4. — *Glucosa, glicerofosfato, ácido oleico y ácido levonucleínico.*

Las soluciones inyectadas han sido: glucosa al 5,4 %, glicerofosfato sódico al 9,2 % (de sal cristalizada), ácido oleico puro y ácido levonucleínico al 2 %. En todos los casos se han puesto en asa 2 c. c. de solución, excepto en el ácido oleico del que se introdujo solamente 1 c. c. En la tabla se representan por G., Glicf.; Ol. y Ncl, respectivamente.

Tampoco hay aquí diferencias de consideración de fosfatasa por estímulos tan diversos.

Puede observarse en el caso de asas con glicerofosfato la acción fuertemente hidrolizante de la fosfatasa segregada en la propia luz intestinal, comparando el fósforo inorgánico presente al final de la experiencia con el correspondiente a las de glucosa u otras sustancias. La diferencia hay que atribuirla a la hidrólisis del glicerofosfato: el fósforo inorgánico final es sobre el 20 % del puesto en el asa como éster, aun cuando debe tenerse en cuenta la simultánea secreción y reabsorción de fósforo por la mucosa.

TABLA XIV

Secreción intestinal de fosfatasa en asa aislada de cobayo durante la absorción de glucosa, glicerofosfato, ácido oleico y ácido nucleínico.

Peso g.	Asas		Subs. en asa	Tiempo	Fosfatasa		Pinorg.	
	posi.	long.			total	por cm.	total	por cm.
530	1. ^a	13	G	60	5,2	0,4	70	5,4
	2. ^a	17,5	Glicf.	"	5,9	0,34	400	23,0
480	1. ^a	23	Glicf.	"	6,0	0,26	400	18,0
	2. ^a	12	G	"	2,4	0,20	72	6
400	1. ^a	15	Ol.	"	3,1	0,2		
	2. ^a	12	G	"	4,85	0,4		
600	1. ^a	19	G	"	4,35	0,23		
	2. ^a	13	Ol.	"	2,7	0,21		
250	1. ^a	18	G	"	3,8	0,21		
	2. ^a	13	Ncl.	"	3,1	0,24		
250	1. ^a	19	Ncl.	"	4,7	0,25		
	2. ^a	15	G	"	4,3	0,29		

5. — Glucosa y xilosa en cobayos

Tenía especial interés ver si la secreción de fosfatasa intestinal tenía relación con la selectividad de absorción; para ello hicimos una serie de experiencias con glucosa y xilosa. Hemos utilizado soluciones isotónicas (glucosa al 5,4 % y xilosa (MERCK) al 4,5 %) de las que inyectábamos 2 c. c. Se tomaban tres asas en cada animal, de las que dos eran destinadas a glucosa y una a xilosa, alternando de manera que la de esta última ocupase todas las posiciones posibles. Determinábamos el azúcar que quedaba en el asa después de 45 minutos de absorción y de este valor dedujimos el tanto por ciento absorbido. Dadas las diferencias señaladas por LASZT en el curso de la secreción de fósforo según se tratara de uno u otro azúcar, incluimos en la tabla nuestras determinaciones de fósforo.

TABLA XV

Secreción intestinal en asa aislada de cobayo durante la absorción de xilosa y glucosa.

Peso g.	Asas		Subs. en asa	Tiempo	Fosfatasa		Pinorg.		Absorción %	
	posi.	long.			total	p/cm.	total	p/cm.	total	p/cm.
630	1. ^a	21	G	45	6,0	0,286	55	2,6	76	3,62
	2. ^a	18	G	"	6,4	0,350	77	4,3	66	3,67
	3. ^a	20,5	X	"	8,1	0,390	43	2,1	4	2,24
475	1. ^a	17	X	"	6,2	0,365	50	3,0	38	2,23
	2. ^a	22	G	"	8,0	0,364	95	4,3	63	3,5
	3. ^a	18	G	"	4,8	0,266	65	3,6	52	2,8
522	1. ^a	22	G	"	6,6	0,30	53	2,4	80	3,65
	2. ^a	19	X	"	6,1	0,32	55	2,9	46	2,4
	3. ^a	18	G	"	5,2	0,28	47	2,6	56	3,1

Como en la tabla XV se expresa, las secreciones de fosfatasa en ambas clases de asas son de un orden semejante; puede apreciarse sin embargo valores un poco más altos para las asas con xilosa.

El fósforo inorgánico en luz después de los 45 minutos oscila bastante y no cabe deducir diferencias en favor de unas u otras asas.

La absorción es mayor en las asas con glucosa que en las de xilosa. Se comprueba para la glucosa que la capacidad de absorción selectiva se va reduciendo al alejarse las asas del píloro. La relación entre la media de absorción de glucosa y la de xilosa es alrededor de 1,5 (100/66), lo que demuestra que en nuestras condiciones experimentales la selectividad de la absorción es de menor importancia en el cobayo que en la rata.

6. — *Glucosa y xilosa en rata.*

Dada la pobre selectividad de absorción encontrada en el cobayo, creímos necesario repetir las experiencias con glucosa y xilosa en la rata. Usamos de la misma técnica y soluciones. Se hicieron dos asas en cada animal: una con 2 c. c. de glucosa y otra con 2 c. c. de xilosa cambiando el orden de posición de ambas sustancias. Hicimos experiencias de treinta y sesenta minutos de duración. En la tabla XVI se da junto con la fosfatasa segregada, el fósforo inorgánico y la absorción, así como la relación encontrada en cada caso entre la absorción de ambas sustancias.

TABLA XVI
*Secreción intestinal de fosfatasa en asa aislada de rata durante
 la absorción de glucosa y xilosa.*

Peso g.	Asas		Subs. en asa	Tiempo	Fosfatasa segregada		Fósforo inorgánico		Absorción %		G/X
	Pos.	Long.			total	p/cm.	total	p/cm.	total	p/cm.	
160	1. ^a	16	X	60	5,5	0,34	60,5	3,8	23	1,44	4,1
	2. ^a	12,5	G	"	2,0	0,16	35	2,8	75	6,0	
120	1. ^a	16	G	"	2,0	0,13	22	1,4	88	5,5	3,3
	2. ^a	12	X	"	3,7	0,31	51,7	4,3	20	1,67	
75	1. ^a	16	X	"	3,6	0,22	32	2,0	21	1,3	3,6
	2. ^a	15,5	G	"	1,7	0,11	45	2,9	70	4,7	
171	1. ^a	14	G	"	2,1	0,15	29,4	2,1	86	6,1	3,8
	2. ^a	16	X	"	4,5	0,28	56,0	3,5	25	1,6	
145	1. ^a	19	G	30	1,15	0,05	55,1	2,9	63	4,12	5,1
	2. ^a	17	X	"	1,36	0,08	61,2	3,6	13,6	0,8	
165	1. ^a	18	X	"	1,08	0,06	45	2,5	18	1,0	3,7
	2. ^a	19	G	"	1,14	0,06	60,8	3,2	70,3	3,7	
129	1. ^a	15	X	"	1,05	0,07	33	2,2	13	0,87	5,1
	2. ^a	13	G	"	0,7	0,05	40	3,0	58	4,46	
125	1. ^a	16	G	"	0,9	0,056	43	2,7	65	4,06	4,6
	2. ^a	12,5	X	"	0,8	0,064	100	8,0	11	0,88	

Azúcar absorbido y P inorgánico presente:

En las experiencias de 30 minutos no se aprecian diferencias en cuanto a fosfatasa segregada en las asas con glucosa y xilosa. El fósforo inorgánico es también parecido y variable, salvo un solo caso en que el asa con xilosa está aumentada casi tres veces.

La absorción de glucosa es francamente mayor que la de xilosa, con relaciones G/X entre 3,7 y 5,1.

En experiencias de sesenta minutos puede reconocerse en las asas con xilosa una cantidad de fosfatasa segregada constantemente mayor (media 0,24) que en las de glucosa (media 0,14). En todas las asas, las cantidades presentes son sobre dos veces más altas que las encontradas en experiencias de 30 minutos. El fósforo inorgánico es asimismo mayor en las asas con xilosa que en las de glucosa (medias 3,4 y 2,3, respectivamente). La absorción es mayor para la glucosa que para la xilosa (G/X entre 3,3 y 4,1).

7. —Diferente concentración de la glucosa

Quisimos ver si el estímulo secretor de la glucosa dependía en algún grado de su concentración. Para ello, en el mismo animal se preparaban dos asas de las que en una se inyectaba glucosa isotónica (5,4 %) y en la otra una solución isotónica preparada mezclando volúmenes iguales de solución de glucosa al 5,4 % y suero fisiológico: en ésta, siendo isotónica, la glucosa queda a concentración mitad (2,7 %).

Los resultados, que se reúnen en la tabla XVII, demuestran que la secreción es inferior en las asas con glucosa a concentración mitad.

TABLA XVII

Secreción intestinal de fosfatasa en asa aislada de cobayo, durante la absorción de soluciones isotónicas con glucosa al 5,4 y al 2,7 %

Peso	Posición del asa	Longitud del asa	Concentración %	Tiempo	Fosfatasa	
					Total	Por cm.
279	1. ^a	17,5	5,4	30	3,67	0,21
	2. ^a	19,5	2,7	30	2,15	0,11
327	1. ^a	18,0	2,7	30	2,5	0,14
	2. ^a	20,5	5,4	30	4,9	0,24
295	1. ^a	21,0	2,7	30	2,1	0,10
	2. ^a	20,0	5,4	30	4,2	0,22

IV. — SECRECIÓN DE FOSFATASA EN DISTINTOS NIVELES DE INTESTINO.

Demostrada la secreción de fosfatasa en las primeras porciones del intestino delgado, hemos realizado una serie de experiencias para averiguar si tal proceso se daba también en otros tractos intestinales. Hemos determinado en unos casos las fosfatasas de contenido intestinal de animales en digestión. En otros, hemos hecho experiencias en asa aislada a los niveles deseados.

1. — *Actividad fosfatásica del contenido intestinal durante la digestión.*

Se han utilizado varios cobayos y conejos en alimentación mixta ordinaria. Se recogía la papilla que fluía espontáneamente del intestino delgado abierto en el yeyuno; de la porción final del íleon, ciego y colon, se extraía una parte del contenido semisólido que se pesaba inmediatamente y desleía con cincuenta veces su peso de suero fisiológico, filtrando luego y determinando la actividad fosfatásica del filtrado. Los resultados de las tablas se refieren a 100 g. ó 100 c. c. de contenido intestinal.

TABLA XVIII

Fosfatasa de contenido intestinal a distintos niveles durante la digestión.

Animal	Peso	Porción de intestino	Fosfatasa ‰
Cobayo	425	1.ª porción yeyuno	345
		Final íleon	1150
		Ciego	1425
		Colon	125
ídl.	352	1.ª porción yeyuno	275
		Final íleon	1045
		Ciego	928
		Colon	98
Conejo	1640	1.ª porción yeyuno	50
		Final íleon	340
		Ciego	1100
		Colon	110
ídl.	1450	1.ª porción yeyuno	63
		Final íleon	470
		Ciego	824
		Colon	85

La tabla revela resultados semejantes en cobayo y conejo: la papilla intestinal a lo largo del intestino delgado se va enriqueciendo en fosfatasa y los valores máximos corresponden generalmente al ciego, mientras que en el colon el contenido fecal es ya mucho más pobre. Esto podría ser debido a la acumulación de fosfatasa segregada a lo largo del delgado junto con la reabsorción de agua que hace se vaya concentrando la papilla; durante la permanencia en el ciego debe tener lugar una inactivación o destrucción parcial de fosfatasa con lo que en el colon los valores encontrados son mucho más bajos que en el ciego.

También se ve aquí la caída en el ciego. El hecho de tomar las muestras de contenido cecal en una región a la que corresponde una larga permanencia en grueso puede explicar las cifras relativamente bajas encontradas en el ciego. Las asas de colon lavadas, no tenían apenas heces: el no encontrar casi actividad en este caso hace pensar en la falta de secreción en

esa región con lo que las únicas fosfatasa fecales serían de origen extraño al colon.

2. — *Secreción de fosfatasa en asas aisladas a distintos niveles del intestino, durante la absorción de glucosa.*

Para diferenciar juntamente la secreción de fosfatasa a distintos niveles, con independencia de los otros factores (acumulación de la segregada en otras porciones y reabsorción de agua), practicamos experiencias en asas aisladas en la primera porción de yeyuno, al final del íleon y en el colon a unos 10 cms. del ciego. El lavado de las asas de íleon y colon requería un lavado más prolongado (100 c. c. de suero fisiológico) para poder arrastrar bien los residuos alimenticios o heces. Se inyectaban en todas 2 c. c. de glucosa isotónica. La duración de las pruebas era de una hora. Se determinaba además de la fosfatasa en luz, el fósforo inorgánico y la glucosa no absorbida.

Los resultados, de cobayos, se recogen en la tabla XX.

TABLA XX

Secreción intestinal de fosfatasa en asas aisladas de yeyuno, íleon y colon de cobayo, durante la absorción de glucosa. Azúcar absorbido y P inorgánico presente

Peso	Posición del asa	Longitud cm.	Tiempo m.	Fosfatasa		Pinorg.		Absorción %	
				total	por cm.	total	por cm.	total	por cm.
485	Yeyuno	23	60	6,0	0,26	52,9	2,3	80,5	3,5
	Final íleon	16	"	2,4	0,15	27,2	1,7	36,8	2,3
480	Yeyuno	14,5	"	3,3	0,23	56,5	3,9	45,0	3,1
	Final íleon	18,5	"	2,2	0,12	44,4	2,4	37,0	2,0
407	Yeyuno	19,0	"	4,56	0,24	58,9	3,1	70,3	3,7
	Final íleon	17,5	"	2,45	0,14	40,2	2,3	49,0	2,8
460	Yeyuno	21,0	"	4,4	0,21	77,7	3,7	60,9	2,9
	Colon	25,5	"	0,—	0,—	2,5	0,1	20,4	0,8
180	Yeyuno	20	"	5,4	0,27	56,0	2,8	60,0	3,0
	Colon	18	"	0,2	0,01	3,6	0,2	19,5	1,1
220	Yeyuno	23,5	"	6,1	0,26	58,7	2,5	84,6	3,6
	Colon	18,5	"	0,1	vest.	1,8	0,1	16,6	0,9
400	Yeyuno	15,5	"	3,56	0,23	58,9	3,8		3,4
	Colon	11,0	"	0,—	0,—	1,1	0,1	11,2	1,0

Los datos precedentes ponen bien de manifiesto cómo la secreción de fosfatasa es menor en íleon que en yeyuno y es prácticamente nula en el colon. El fósforo inorgánico segregado — el presente en luz, más exactamente — es también más alto en yeyuno que al final del íleon en colon es insignificante.

La absorción está ya bastante disminuída en el final del íleon y mucho más lo está en el colon. Refiriendo a la absorción de glucosa en yeyuno, la relación es 1 : 0,7 : 0,3.

V. — RELACIONES ENTRE CONTENIDO EN FOSFATASAS DE LA PARED INTESTINAL Y LA SECRECIÓN DE FOSFATASA.

Operando tal como se describe en la técnica, hemos determinado el contenido en fosfatasa de la pared intestinal en cobayos y ratas, después de autolizado de las muestras en agua clorofórmica durante unas 22 horas.

1. — *Cobayos*

En dos animales se ha estudiado la distribución de las fosfatasa a lo largo del intestino delgado, tomando muestras de 10 en 10 centímetros, la primera de ellas inmediata al píloro.

Se han hecho determinaciones asimismo en autolizados de ciego y primera porción del colon.

Los resultados obtenidos se reúnen en la tabla XXI y se representan en la gráfica 1. Se expresan en mg. de fósforo liberados por gramo de tejido fresco.

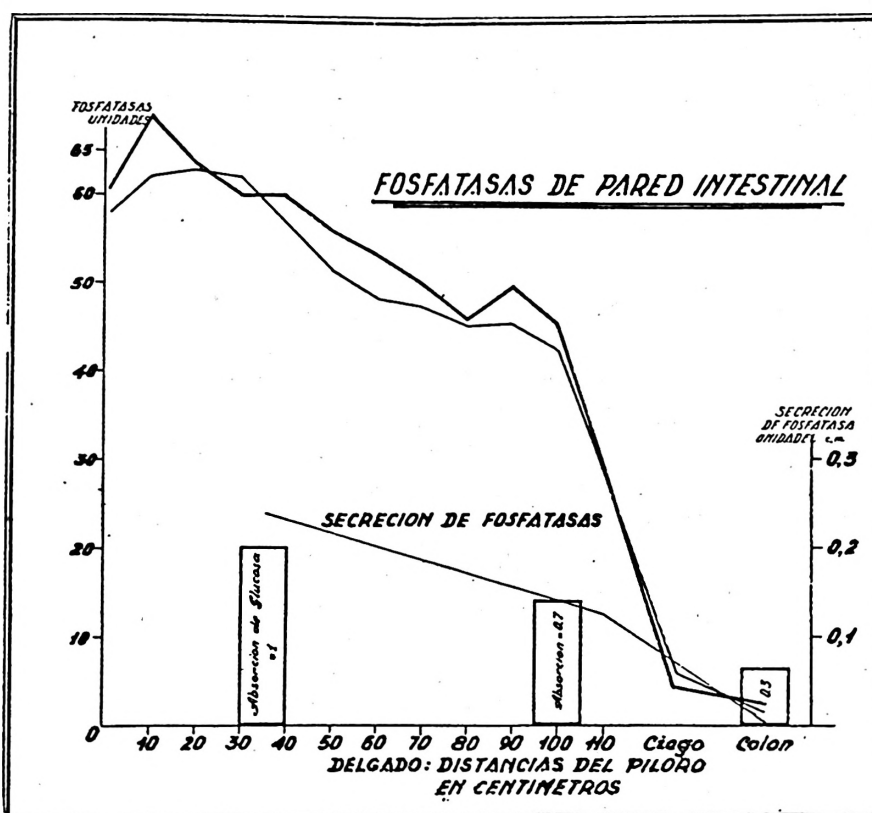
TABLA XXI

Distribución de las fosfatasas de pared a lo largo del intestino de cobayo.

Peso	Muestras de intestino delgado, de 10 en 10 cm.											Color	
	1.ª	2.ª	3.ª	4.ª	5.ª	6.ª	7.ª	8.ª	9.ª	10.ª	11.ª		Ciego
780	61,2	69,3	64,2	60,1	59,6	56,2	53,7	50,1	46,0	49,2	45,5	4,7	2,0
695	58,3	62,1	63,6	62,2	53,8	51,2	48,4	47,6	44,7	45,0	42,4	5,1	1,7

La distribución es, pues, tal que la fosfatasa presenta un máximo en la primera porción del yeyuno y luego decrece a lo largo del intestino delgado; el grueso es muy pobre en fermento; el ciego tiene valores diez o más veces menores que el delgado; el colon, treinta veces más pequeño.

Un cálculo aproximado permite comparar el contenido del intestino en fosfatasas y las cantidades de ésta segregada.

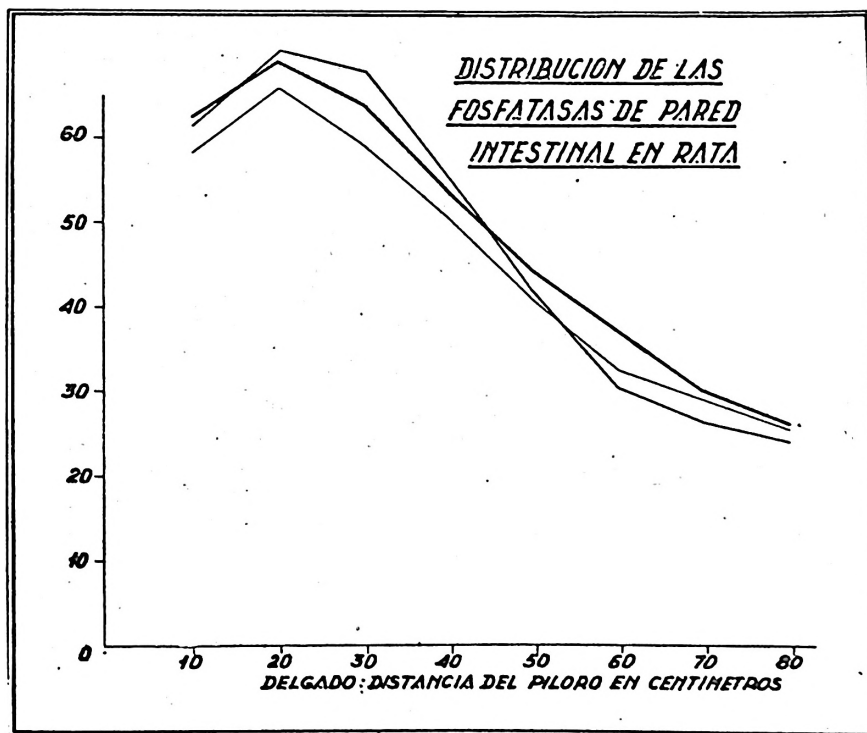


Gráfica 1

Hemos pesado y medido muchas porciones de intestino de cobayo a lo largo de nuestros trabajos y sacamos la consecuencia de que por término medio corresponden doce cm. de intestino delgado por gramo de peso fresco; o lo que es igual, cada centímetro de intestino pesa alrededor de 0,08 g. A las asas de delgado que hemos solido utilizar en las experiencias que

antes se han descrito, corresponden zonas que liberarían unos 60 mg. de fósforo por gramo de peso. Nos entretuvimos en varias ocasiones en que trabajábamos con dos o tres asas en «reconstruir» todo el intestino delgado después de vaciadas las asas para saber con cierta precisión la posición de éstas en el conjunto del intestino. Por ello podemos establecer ahora esa correspondencia aproximada. Los 0,08 g. de tejido contienen fosfatasa suficiente para liberar unos 5 mg. de fósforo. Los datos de fosfatasa segregada vienen a indicar que 1 cm. de longitud de intestino segregan unas 0,2 a 0,3 unidades por hora con estímulo de glucosa, lo que equivale a decir que pueden liberar 0,2 a 0,3 mg. de P. El contenido en fosfatasa de la mucosa intestinal de cobayo — contando sólo las lioenzimas — es, pues, solamente, unas 20 veces mayor que las segregadas por ella en una hora.

2. — Ratas



Gráfica 2

Experiencias planteadas de modo análogo a las de cobayos dieron los resultados incluidos en la tabla XXII y representados en la gráfica 2.

TABLA XXII

Distribución de las fosfatasas de pared a lo largo del intestino delgado de rata

Peso g.	Longitud intestino delgado	Muestras tomadas de 10 en 10 cm.							
		1.º	2.º	3.º	4.º	5.º	6.º	7.º	8.º
82	74	58,3	66,5	59,2	50,4	41,7	33,1	29,2	25,1
91	80	61,1	70,3	60,8	55,2	42,0	30,5	26,4	23,5
75	72	62,6	69,4	63,7	53,6	44,1	37,2	30,0	26,0

En las ratas se encuentran valores de fosfatasas en pared intestinal muy parecidos a los de cobayo. Más acusado es aquí el descenso de fosfatasa a medida que nos acercamos al ciego. Un cálculo aproximado semejante al que hicimos con los cobayos da análogos resultados: la mucosa intestinal contiene fosfatasa suficiente para unas veinte horas de secreción por estímulo de glucosa.

Por lo demás, el curso de distribución de fosfatasa encontrado es muy semejante al que dan WESTENBRINK (1936) y PONZ (1945) para las ratas: alta al principio del duodeno, un máximo en las primeras porciones del yeyuno y una caída progresiva hasta el grueso.

Se observa clara correlación entre contenido intestinal de fosfatasas, secreción del fermento y absorción de glucosa: a lo largo del intestino delgado van decreciendo todos estos valores; en el grueso no hay secreción de fosfatasas y la pared la contiene en muy escasa proporción; la absorción de glucosa se mantiene aunque con valores muy bajos, quizá por simple difusión.

VI. — CURSO DE LA SECRECIÓN INTESTINAL DE LA FOSFATASA Y FÓSFORO.

1. *En perros.* — Se realizó en perros (de 7 y 8,5 kg. de peso) por ofrecer mejores condiciones, ya que se podía introducir una cantidad de líquido tal, que no fuese afectada considerablemente por las extracciones seriadas y parecía más factible la homogeneización previa del contenido del asa.

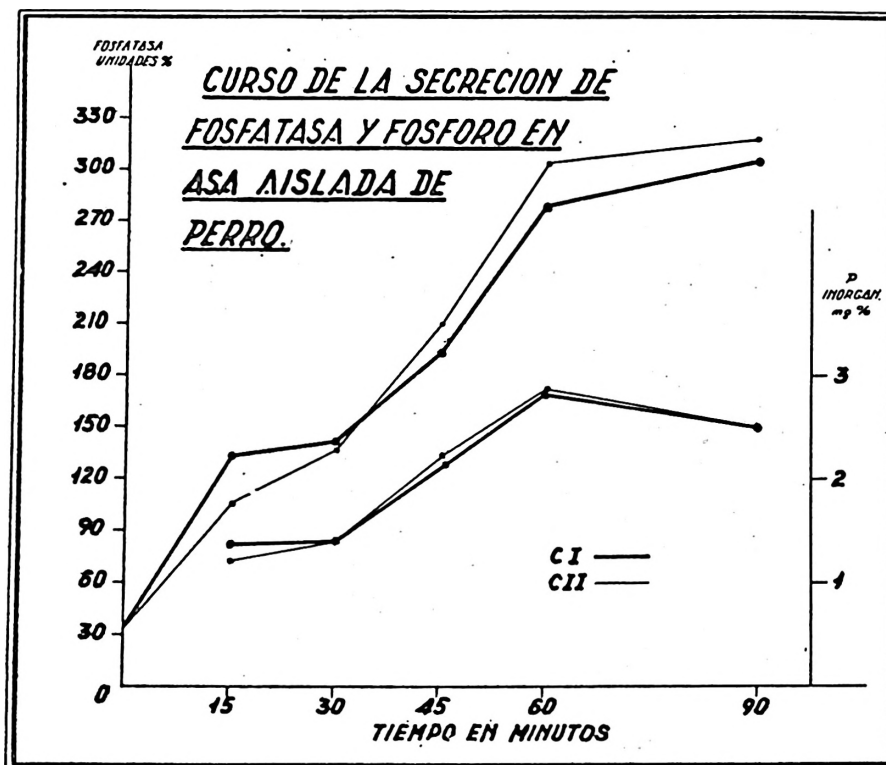
Anestesiado con dial, se practicó la laparotomía y se escogió un segmento del yeyuno de unos 40 cm. de longitud que se aisló entre dos ligaduras. Inmediatamente por encima de la distal se introdujo un tubo de goma con un racord de jeringa dentro, ligando el intestino a nivel de éste. Por otro orificio en el extremo superior del asa se lavaba ésta introduciendo suero fisiológico a 37° que salía libremente por el tubo en cantidad de 100 c. c. recogiendo una muestra del último líquido que fluía. Vacuada el asa por expresión suave se pinchaba el tubo de goma y se introducían 20 c. c. de glucosa al 10 % ligando inmediatamente por debajo del orificio de entrada. A continuación, con una jeringa de 20 c. c. ajustada al tubo de goma, se extraía — después de soltar la pinza — la mayor parte del contenido del asa (unos 15 c. c.); la jeringa contenía ya algo de aire lo que permitía agitar el líquido extraído antes de reintroducirlo, reservándose una muestra de unos 2 c. c. Pinzado el tubo y retirada la jeringa, se cerraba el abdomen con pinzas de Kocher, dejando una estufa junto al animal. A los 15, 30, 45, 60 y 90 minutos a contar desde la introducción inicial de la glucosa, se repetía la toma de muestras previa homogeneización. A los 90 minutos, se arrastraba todo el contenido del asa lavando su interior con suero fisiológico y reuniendo contenido y líquido de lavado para determinar la totalidad de fosfatasa y fósforo restantes en el asa.

Para las determinaciones de fosfatasa se diluía y filtraba una parte de cada muestra, teniendo preparados tubos con sustrato y tampón para llevar al baño cada muestra según se obtenía y filtraba. Para las de fósforo se desalbuminizaba inmediatamente con tricloracético una parte de cada muestra. Los resultados se expresan en la Tabla XXIII y se representan en la figura 3.

TABLA XXIII

Curso de la secreción de fosfatasa y fósforo en asa aislada de perro.

Muestra	Perro I (7 kg)		Perro II (8,5 kg)	
	Unidades %	mg. %	Unidades %	mg %
Último lavado	13,9	—	10,5	—
Tiempo 0	33,2	—	29,4	—
15 minutos	132,0	1,34	105,7	1,2
30 "	143,4	1,38	139,1	1,4
45 "	193,8	2,11	210,5	2,21
60 "	281,4	2,79	304,2	2,85
90 "	307,6	2,49	320,1	2,50
Restantes en asa	30,8 unidades		25,4 unidades	



Gráfica 3

Las concentraciones de fosfatasa en las muestras de contenido del asa van creciendo con el tiempo, lentamente al principio, rápidamente luego y relativamente poco al final de la experiencia. El fósforo inorgánico presente en luz crece también con el tiempo, pero inicia un descenso a partir de los 60 minutos.

2. — *Curso de la secreción de fosfatasa en cobayos*

En cobayos no resultaba práctico hacer experiencias como las indicadas en perros. Para tener en la luz intestinal líquido suficiente para extraer periódicamente las muestras en que determinar las fosfatasas, habría que tomar asas muy largas — todo el intestino delgado —; ello acarrearía serios inconvenientes para la homogeinización del contenido en cada extracción y dificultades de orden teórico al ocupar zonas de intestino con secreción de fosfatasa bastante diferente. Preferimos seguir dos procedimientos distintos: a) estudiar la fosfatasa segregada en asas de varios animales durante la prueba con tiempos diversos, y b) determinar en un mismo animal la fosfatasa segregada en varias asas mantenidas en el cuerpo tiempos diferentes. El primero de ellos tiene la ventaja de provocar menos trastornos operatorios que el segundo, y el inconveniente de la variabilidad que suele haber en el comportamiento de animales distintos. El segundo permite seguir en un mismo animal la secreción en asas mantenidas tiempos diferentes, pero la técnica es mucho más cruenta.

a) *Experiencias de distinta duración*

Utilizamos cobayos aislando asas en la forma ya descrita en las que se introducen 2 c. c. de glucosa isotónica, variando el tiempo de la prueba. Los datos de 30, 45 y 60 minutos proceden de la media de los obtenidos en experiencias anteriores. Se aportan además los de experiencias de 15 minutos.

TABLA XXIV

Fosfatasa segregada en asa intestinal aislada de cobayo durante la absorción de glucosa en tiempos diferentes

Duración de la prueba	Peso	Posición del asa	Longitud	Fosfatasas		Medias por cm.
				Total	por cm.	
15	352	1. ^a	19,0	1,57	0,08	0,08
		2. ^a	18	1,08	0,06	
	421	1. ^a	21,5	2,15	0,10	
		2. ^a	19	1,14	0,06	
	285	1. ^a	17	1,87	0,11	
		2. ^a	18,5	1,29	0,07	
30	—	—	—	—	—	0,24
45	—	—	—	—	—	0,276
60	—	—	—	—	—	0,29

A los 15 minutos la fosfatasa segregada es todavía muy escasa. Pero a partir de entonces la secreción es rápida y se estabiliza a los 45 minutos, quizá por haberse ya absorbido casi toda la glucosa estímulo.

b) *Experiencias extrayendo periódicamente las asas aisladas*

Las hemos practicado en cinco cobayos. Preparábamos asas algo más cortas que de ordinario con sólo 1 c. c. de solución isotónica de glucosa, para reducir en lo posible las diferencias por niveles distintos de intestinos; a este mismo fin cambiábamos también el orden de extracción de las asas. Se extraían las asas después de 15, 30 y 45 minutos de inyectar la solución. Previa ligadura en bloque de los vasos mesentéricos que irrigaban el asa respectiva, se extraía ésta y se volvían a introducir las asas restantes en la cavidad abdominal.

La Tabla XXV da los resultados obtenidos.

TABLA XXV

Secreción de fosfatasa en asas aisladas de cobayo, durante la absorción de glucosa, extraídas en tiempos diferentes.

Peso	Longitud	Tiempo	Fosfatasa	
			Total	por cm.
460	14,5	45	3,6	0,25
	12	30	2,5	0,21
	12	15	1,1	0,09
410	12	45	2,9	0,24
	11	30	2,5	0,23
	15,0	15	2,4	0,16
345	15	15	1,9	0,13
	10	30	1,9	0,19
	12	45	3,1	0,26
215	11	45	2,4	0,22
	17	30	2,5	0,15
	16,5	15	1,8	0,11
230	11,5	30	2,1	0,18
	17	15	1,4	0,08

Las medias respectivas son 0,11, 0,19 y 0,24 unidades por centímetro para 15, 30 y 45 minutos. El asa se va enriqueciendo en fosfatasa con el tiempo. Si comparamos estos datos con los de la tabla XXIV, se ve que las cantidades de fosfatasa segregada son allí un poco más altas; puede explicarse el hecho por las peores condiciones experimentales.

VII. — FOSFATASAS DE PARED Y LUZ INTESTINAL DE EMBRIONES DE COBAYO.

KAY (1923-26 y 32) y MARTLAND y ROBISON (1924) estudiaron el contenido fosfatásico de riñón y hueso, deduciendo consecuencias teleológicas. Hemos querido ver nosotros las fosfatasa de pared y luz intestinal de embriones de cobayo para conocer si *existían ya antes del nacimiento* y su *cuantía relativa al adulto*.

Se han utilizado dos hembras de cobayo en período semejante de gestación, próximas a término. Se determinaban las fosfatasa intestinales de la madre y de los embriones.

Bajo anestesia de éter se extraían *los embriones* (dos en cada caso) del cuerpo materno y *se pesaban rápidamente*; operando en atmósfera húmeda para evitar desecaciones, se extraía el *intestino* del embrión; se medía y *se pesaba* en balanza aperiódica; comprobamos variaciones insignificantes de peso en un trozo cuando se le pesaba de tiempo en tiempo, lo que nos aseguró la eficacia de la cámara húmeda. En un caso determinamos las fosfatasas totales del intestino delgado de los embriones, autolizando con 100 veces su peso de agua clorofórmica. En el otro lavamos previamente con suero fisiológico la luz del intestino delgado para determinar las fosfatasas que pudiera haber allí presentes y después de escurridos se llevaron a la balanza pesando muestras de yeyuno, íleon y colon, para autolizar después como se ha dicho. En la tabla XXVI se dan los resultados obtenidos.

TABLA XXVI

Fosfatasas de pared y luz intestinal de embriones de cobayo

Animal	Peso	Longi. int. delg.	Peso int. delg.	Fosfatasas de pared Por gr.				Fosfatasas de luz	
								total	por cm.
MADRE	810	170	17,3				58,4		
Embrión	24,2	31	0,34				63,7		
Embrión	25,6	34	0,37				55,2		
				Yeyun.	íleon distal	ciego	colon		
MADRE	780	145	13,2	69,3	45,5	4,7	2,0		
Embrión	28,3	34	0,38	48	41	—	0,00	1,5	0,04
Embrión	29,1	37,5	0,41	52	40	—	0,0	1,7	0,04

El intestino de embrión próximo al nacimiento, posee ya cantidades de fosfatasas (por gramo de tejido fresco) muy semejantes al animal adulto. En luz intestinal se encuentra también fosfatasa en proporción parecida a la de animales adultos en ayuno.

VIII. — INFLUENCIA DEL PH SOBRE LA ACTIVIDAD DE LAS FOSFATASAS INTESTINALES DEL COBAYO.

Utilizamos la serie de tampones de acetato-veronal de MICHAELIS para los pH de 9,5 a 3 en la forma adoptada de SOLS.

En cuanto a los tipos y tubos correspondientes a fósforo inorgánico inicial, los preparábamos en los primeros tanteos con agua en sustitución de los tampones. A la vista de los primeros resultados, procedimos a prepararlos en forma análoga a los tubos de fosfatasa a pH 4, es decir, con tampón 4 y 0,8 c. c. de acético normal. No encontramos diferencias, pero preferimos continuar así las experiencias.

I. — Fosfatasa de la secreción intestinal

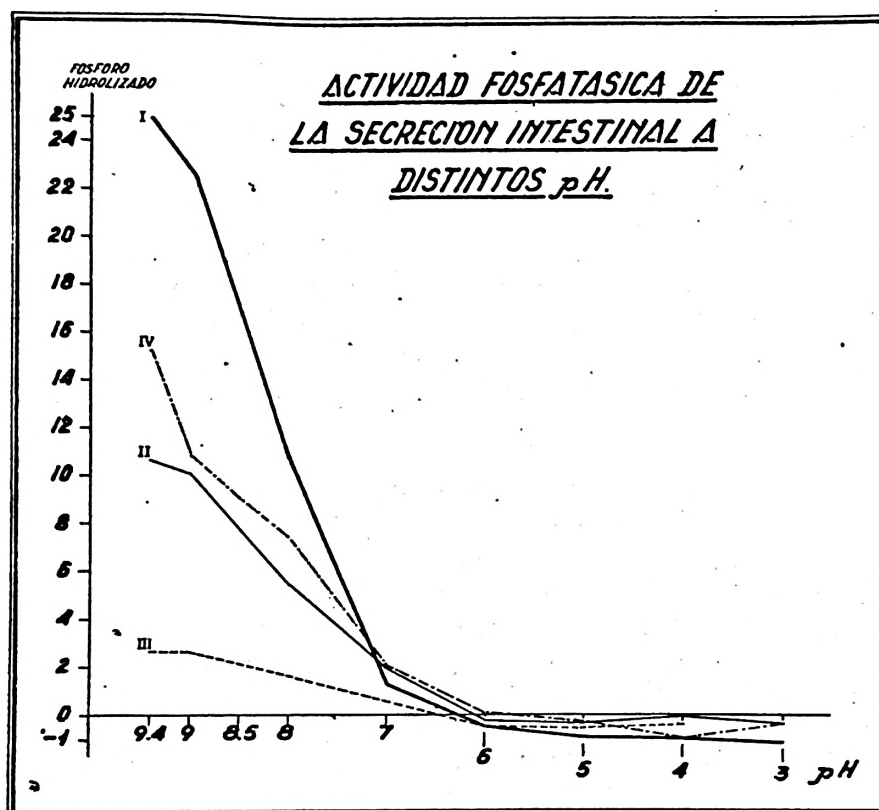
Después de lavar el intestino delgado en la forma acostumbrada, se introducía una solución isotónica de substancia de las que hemos visto que provocan secreción de fosfatasa a la luz intestinal en una gran asa que abarcaba todo el intestino delgado lavado. Pasada una hora, se separaba el asa del cuerpo y, lavada exteriormente, se abría para recoger su contenido arrastrándolo con suero fisiológico. En vista del resultado de la primera experiencia, se redujo en las siguientes la cantidad de suero fisiológico utilizado en el arrastre del contenido del asa con el fin de obtener una mayor concentración de fermento que realizase más las diferencias de actividad encontradas a los distintos pH.

Los resultados obtenidos en cuatro experiencias se incluyen en la tabla XXVII y se representan gráficamente a continuación (gráf. 4).

TABLA XXVII

Actividad a distintos pH de la fosfatasa segregada por asa aislada de intestino de cobayo ante el estímulo de glucosa y glicocola.

Estímulo secretor	pH	9,4	9	8,5	8	7	6	5	4	3
Glucosa	I	24,5	22,6	—	11,8	1,6	-0,5	-0,9	-0,9	-1,1
Id.	II	10,6	10,1	—	5,4	1,9	-0,4	-0,3	-0,1	-0,4
Id.	III	2,74	2,7	—	1,7	—	-0,4	-0,5	-0,5	—
Glicocola	IV	15,2	10,8	8,9	7,4	—	0,0	-0,3	-0,9	-0,5



Gráfica 4

2. — Fosfatasa de pared intestinal

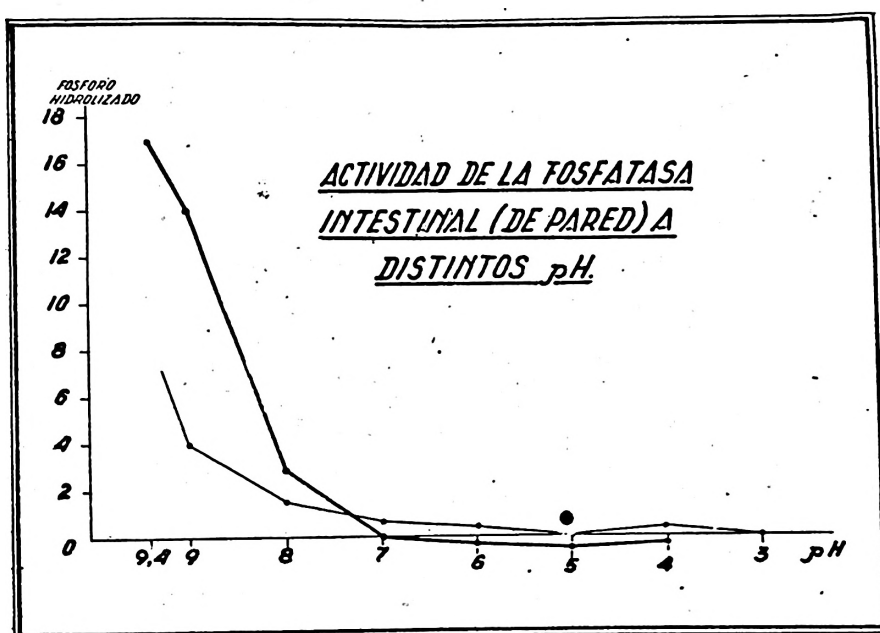
Se obtenía autolizando una porción de intestino delgado de cobayo triturado con arena, con cien veces su peso de agua clorofórmica durante unas 22 horas, filtrando por algodón y diluyendo a $1/3$ en la forma descrita.

La tabla XXVIII reúne los resultados conseguidos, que se representan gráficamente (5) también.

TABLA XXVIII

Actividad a distintos pH de la fosfatasa de intestino de cobayo.

pH	9,4	9	8	7	6	5	4	3
I	8,9	4,1	1,51	0,63	0,39	-0,1	0,4	0,0
II	17,0	13,0	2,8	0,0	-0,2	-0,4	-0,1	—



Gráfica 5

Las experiencias precedentes arrojan los siguientes resultados. Las fosfatasas de pared y luz presentan un pH óptimo francamente alcalino, alrededor de 9,4; en un tanteo con tampón glicocola-sosa, a pH 10 encontramos ya una fuerte inactivación de ambos fermentos. La actividad hidrolítica decrece rápidamente llegando a anularse entre los pH 7 y 6. En medio ácido se observa una actividad constante inestimable de la fosfatasa de pared, mientras que la de luz da sistemáticamente, en estas condiciones, valores negativos de fósforo, es decir, como si parte del fósforo inorgánico inicialmente presente hubiera sido esterificado.

IX. — ACTIVADORES E INHIBIDORES DE LAS FOSFATASAS INTESTINALES.

Falta por completo un estudio sistemático de la influencia sobre las fosfatasas intestinales de distintas sustancias que puedan tener acción activadora o inhibidora sobre las mismas. Claro es que hay datos sueltos, pero son tan escasos que aun reuniéndolos todos — lo que por otra parte no sería nada fácil, dadas las distintas condiciones en que se ha investigado — distaría mucho de resultar un cuadro de conjunto. Esta escasez de datos se debe a que *la mayoría de los estudios sobre activación e inhibición de fosfatasas alcalinas se han realizado sobre fosfatasas ósea, hepática y renal* entre las fosfatasas animales y sólo de vez en cuando se encuentra referencia también a la intestinal; y aun esto, casi siempre solo en medio alcalino.

También aquí hallamos entre los primeros hallazgos algunos referidos a las nucleasas. OKAMURA en 1928 y 1930, es decir, poco después del descubrimiento de ERDTMAN de la activación por el magnesio de fosfatasas de múltiples orígenes, encontró que *los ácidos biliares activaban las nucleasas del intestino*. Este hallazgo fué confirmado por KURAMOTO en 1932, precisando que a concentraciones elevadas se convierten en inhibidores. En cambio, resultaron los ácidos biliares *inhibidores de fosfatasas de múltiples orígenes* (TAKATA, 1931-1932: hepática, renal y ósea; ARCURI, 1942: sérica).

En el mismo año de 1928, encuentra KAY inhibición de la fosfomonoesterasa de intestino por el *fluoruro* (a pH 8,4).

De los activadores generales de fosfatasas alcalinas, se ha ido encontrando que también lo eran de la intestinal el *magnesio, manganeso y calcio*. Y de los inhibidores el cianuro.

Mención especial merece el caso de los *aminoácidos*, que para BAKWIN y O. BODANSKY (1933) eran inhibidores, así como la peptona, mientras que el mismo O. BODANSKY encontró en 1936 que, al igual que para la fosfatasa ósea, eran activadores para la fosfatasa intestinal dializada. El mismo efecto, generalizado para fosfatasas alcalinas, encuentran recientemente ROCHE, THOAI y ROGER (1944) y THOAI, ROCHE y DANZAS (1945).

Por el mismo camino de estudiar la fosfatasa en estado de máxima pureza posible, han encontrado HOVE, ELVEHJEM y

HART (1940) que el Zinc tiene influencia inhibidora sobre extractos de intestino dializados, mientras que activa los no dializados o adicionados de alanina. CLOETENS atribuye (1941) a la fosfatasa alcalina II — fundamental componente de la intestinal (1939) — una estructura en que entra el zinc, pero por otra parte (1942) le considera inhibidor.

En cuanto al poder esterificante del extracto de mucosa intestinal, es inhibido (LASZT, 1935) por el *monoyodacetato sódico* a concentración 1/5000.

Nos propusimos realizar un examen sistemático del comportamiento, frente a un gran número de sustancias y a diferentes pH, de las fosfatasas intestinales: la segregada a luz y la total de pared — esta última, la clásica fosfatasa «intestinal» — persiguiendo un doble objetivo: acumulación de datos y posible hallazgo de diferencias entre ambas, como la ya esbozada en las curvas de dependencia del pH.

Con un criterio fisiológico nos interesaba conservar en lo posible el estado «ambiental» de estas fosfatasas, lo que imponía un camino diametralmente opuesto al de quienes estudian fosfatasas después de aislarlas todo lo posible del medio de procedencia, criterio representado por ALBERS, quien ha obtenido los preparados más activos de fosfatasa y sostiene (1940) que el concepto de activador de un fermento debe aplicarse solo si lo es siempre sobre fermentos «lo más puros posible».

Así pues, procedimos a efectuar las experiencias sobre *contenido intestinal tras estímulo de glucosa o glicocola* sobre asa aislada y sobre el *simple autolizado de intestino* con agua clorofórmica.

La técnica consistía en líneas generales en disponer series de tubos preparados para los pH deseados, con tampón acetato-veronal y acético en la forma descrita, y en los que se ponía la solución de sustancia problema en cantidad y concentración tales que viniese a quedar en la mezcla hidrolizante a concentraciones M/20, M/50, etc. El tiempo de hidrolisis en medio alcalino fué como habitualmente de una hora. Para las experiencias en medios ácidos la prolongábamos hasta tres horas con lo que se encontraba con frecuencia cantidades apreciables — aunque pequeñas — de hidrolisis.

Cada sustancia utilizada era ensayada previamente en su posible influjo sobre la determinación de fósforo inorgánico,

preparando dos soluciones tipo de fósforo, uno de los cuales contenía la substancia a la concentración más elevada que pensábamos utilizar. En los casos en que la coloración difería más de los límites de variabilidad accidental se repetía el ensayo con las demás concentraciones a utilizar. En todos los casos en que había influencia se preparaban tantos pares de tipos de 6 y 12 mg. por 100 adicionados de la substancia en cuestión como concentraciones de la misma habíamos encontrado interferir, comparando con cada tipo de 6 mg. los problemas de igual concentración de substancia interferente y calculando los resultados en función de la desviación de su correspondiente tipo de 12 mg., según las fórmulas de SOLS.

Dado caso que por no influir en la determinación de fósforo no se utilizasen tipos especiales, cuando aparecían aumentos de actividad fosfatásica, ensayábamos la posible acción catalítica propia de tal substancia manteniendo en el baño dos tubos con glicerofosfato tamponado al pH al que apareció la activación, uno de los cuales llevaba el activador. Después de un tiempo similar al utilizado para la hidrolisis fosfatásica, se determinaba fósforo inorgánico en ambos. Si aparecía liberación de fósforo (comprobada posteriormente) se restaba su cuantía del inicialmente atribuido a la fosfatasa activada. Así se convirtió en un caso una aparente activación en inhibición.

El número de observaciones está en relación con el interés que estimábamos ofrecía cada substancia o con el que despertaban las primeras. Los protocolos que siguen corresponden a experiencias precedidas de los tanteos indicados.

En las tablas que siguen se indica siempre la actividad fosfatásica del líquido de partida en ausencia de substancia a investigar; y a continuación, según la concentración en que ésta se encuentra, el grado de activación o inhibición en tanto por ciento. Representamos las activaciones precedidas del signo + y las inhibiciones del —.

TABLA XXX

Acción del magnesio sobre las fosfatasas intestinales del cobayo

pH	Fosfatasa	Concentraciones				
		0	m/20	m/100	m/500	m/1000
		unidades %	activación o inhibición %			
9,4	intestinal	12,3	+ 57	+ 95	—	+ 68
"	"	15,8	+ 66	+ 71		+ 50
	medias		+ 61	+ 83	+ 71	+ 59
"	segregada	29,6	+ 12	+ 12	—	+ 6
4	segregada	indicios	—	indicios	—	—
"	intestinal	"	—	"	—	—

Resultados :

Activación manifiesta de ambas fosfatasas en medio alcalino a concentraciones m/20 a m/1000 con óptimo poco destacado a m/100 y bastante mayor sobre la fosfatasa de pared que sobre la segregada.

Ausencia de influjo apreciable en medio ácido a la concentración encontrada óptima para medio alcalino (m/100).

Dada la posibilidad de que el uretano utilizado para anestesiar los animales influyese sobre las fosfatasas intestinales procedimos a dilucidarlo. Utilizamos el uretano etilo Gehe.

TABLA XXXI

Acción del uretano sobre la fosfatasa de intestino de cobayo.

Concentraciones:	0	5 %	0,5 %	0,05 %
Actividad %	22,7	inhibición %	10	nula

Resulta, pues, *ausencia de influjo* a concentraciones de 0,5 % e inferiores y una inhibición poco acentuada a la de 5 %, que ya queda muy por encima de la que puede sospecharse alcance en el intestino de los animales anestesiados.

Investigamos el influjo de la florricina, clásico inhibidor de fosforilizaciones, y de la glicocola de que ya hemos hablado.

TABLA XXXII

Acción de la florricina y glicocola sobre las fosfatasas intestinales del cobayo.

pH	Fosfatasa	Concentraciones				
		0	m/20	m/100	m/500	m/1000
		unidades %	activación o inhibición %			
<i>Florricina</i>						
9,4	intestino	4,2	—80	—66	—50	—
<i>Glicocola</i>						
9,4	intestino	24,2	—44	—20	—	nula
»	segregada	12,0	—56	—40	—	—
4	intestino	inaprec.	—	inaprec.	—	—
»	segregada	»	—	»	—	—

Resultados: *La florricina inhibe fuertemente la fosfatasa de intestino en medio alcalino a concentraciones m/20, m/100 y m/500.*

La glicocola ejerce sobre ambas fosfatasas en medio alcalino acción francamente inhibidora a concentraciones m/20 y m/100, careciendo de acción a la de m/1000. En medio ácido no se aprecia influjo a concentración m/100.

Con el taurocolato sódico, dada su importancia fisiológica y el interés que presentaron las primeras experiencias, hemos extendido la investigación a una serie de pH que comprende además de los extremos alcalino y ácido otros neutro y débilmente ácido. Las determinaciones ofrecían particular dificultad, ya que el taurocolato a concentraciones altas inhibe el desarrollo del azul de molibdeno y enturbia el líquido. Los protocolos se consignan en la tabla XXXIII.

TABLA XXXIII

Acción del taurocolato sódico sobre las fosfatasa intestinales del cobayo

pH	Fosfatasa	Concentraciones				
		0	m/25	m/100	m/500	m/1000
		unidades %	activación o inhibición %			
9,4	segregada	6,0	—	—4	nula	nula
»	»	29,6	—22	—6	—	—5
»	»	13,2	—28	nula	—	nula
	medias		—25	—3	nula	—1
»	intestino	12,3	—31	—3	—	+8
»	»	30,1	—	nula	—	nula
»	»	23,0	—26	»	—	»
	medias		—28	—1		+3
7	segregada	2,8	—	+6	+6	+4
6,5	segregada	3,7	—	nula	—	—8
4,5	segregada	1,6	—	+17	—	+30
4,0	intestino	inaprec.	inaprec.	—	—	(1,2 unid.%)
4,0	segregada	1,2	—	+55	—	+35

Resultados: *El taurocolato* en medio alcalino necesita una concentración m/25 para llegar a inhibir marcadamente las fosfatasa intestinales.

A concentraciones m/100 a m/1000 carece de acción en medios alcalino y neutro, mientras que *en medio ácido activa hasta 50 %*.

El cianuro, inhibidor tipo de la fosfatasa II de CLOETENS, mostró también ofrecer especial interés en medio ácido, por lo que se extendió también su estudio al de su comportamiento a pH 6,5. Los resultados se expresan en la tabla XXXIV.

TABLA XXXIV

Acción del cianuro potásico sobre las fosfatasas intestinales del cobayo.

pH	Fosfatasa	Concentraciones				
		0	m/20	m/100	m/1000	m/10 000
		unidades %	activación o inhibición %			
9,4	segregada	29,6	—100	—97	—48	—
"	intestino	15,8	—	—	—31	—3
6,5	segregada	3,7	—	+103	nula	—
"	"	2,3	—	+100	—	—
4,5	segregada	1,6	—	+37	+18	—
"	"	inaprec.	—	1,3 unid.	—	—
4,0	"	1,1	—	+170	—	—

Resultados: *el cianuro inhibe fuertemente las fosfatasas intestinales en medio alcalino.* A concentraciones M/100 y superiores la inhibición es prácticamente completa. A m/1000 todavía inhibe alrededor de un 40 %. A m/10000 la inhibición es ya insignificante.

Por el contrario, *activa marcadamente a concentración m/100 en medios ácidos.* Ligeramente también, a veces, a concentración m/1000.

Este hallazgo de la activación en medio ácido de las fosfatasas intestinales por el cianuro recuerda por el hecho de ser ya considerable a pH 6,5, la reciente comunicación de KING, WOOD y DELORY (1945) de que el cianuro activa la fosfatasa eritrocítica, representante fundamental de las fosfatasas A IV de FOLLEY y KAY, cuyo pH óptimo es precisamente de 6 — 6,5.

El resto de las sustancias examinadas en cuanto a su influencia sobre la actividad de las fosfatasas intestinales los reunimos en la tabla XXXV.

TABLA XXXV
Comportamiento de las fosfatasa intestinales de cobayo y rata frente a diversas sustancias.

Sustancia	pH	Fosfatasa	Animal	Concentraciones				
				0 unidades %	m/20	m/50	m/100 activación o inhibición %	m/10000
Manganeso (SO ₄ Mn)	9,4	segregada	Cob.	29,5	—43	—	—21	—
	4,0	id.	id.	inaprec.	—	—	inaprec.	—
Fluoruro (FNa)	9,4	id.	id.	9,6	—	—25	—21	—
	4,0	id.	id.	1,2	—	—	—100	—
Níquel (SO ₄ Ni)	9,4	id.	id.	9,4	—83	—	—47	—
	4,0	id.	id.	inaprec.	—	—	inaprec.	—
Cobre (SO ₄ Cu)	9,4	id.	id.	29,4	—	—	—73	—13
	4,0	intestino segregada	Rat. Cob.	28,2	—	—	—96	—
Uranio	9,4	id.	id.	29,4	—	—	—89	—
	4,0	intestino id.	Cob. id.	15,8	—	—	—	—24
Cadmio (SO ₄ Cd)	9,4	segregada	Cob.	7,1	—	—97	—	—
	4,0	id.	id.	inaprec.	—	—	inaprec.	—
Cobalto (Cl ₂ Co)	9,4	segregada	Cob.	28,9	—87	—	—42	—6
	4,0	intestino id.	Cob. Rat.	4,2	—90	—	—43	—
	9,4	intestino	id.	28,2	—93	—	—70	—
	4,0	segregada	Cob.	12,6	—95	—	—67	+67
	9,4	id.	id.	5,5	—83	—	—21	+17
	4,0	id.	id.	inaprec.	—	—	inaprec.	—

Resultados: El manganeso inhibe a concentraciones $m/20$ y $m/100$ y activa a $m/1000$ en medio alcalino la fosfatasa segregada por intestino de cobayo. En medio ácido no se apreció influjo.

El fluoruro inhibe discretamente en medio alcalino y totalmente en medio ácido a concentración $m/100$ la fosfatasa segregada por intestino de cobayo.

El níquel inhibe marcadamente a concentraciones $m/20$ y $m/100$ y activa, también marcadamente a $m/1000$ en medio alcalino la misma fosfatasa. En medio ácido no se apreció influjo.

El cobre inhibe fuertemente las fosfatasas de secreción intestinal de cobayo e intestino de rata en medio alcalino. A concentración $m/1000$, la inhibición importa de 50 a 60 %, y a $m/10000$ aun es francamente acusada. En medio ácido no se apreció influencia sobre la fosfatasa de secreción intestinal de cobayo.

El uranio inhibe aún más intensamente las fosfatasas de pared y luz de intestino de cobayo. A concentración de $m/1000$ la inhibición es de alrededor del 70 % y a $m/10000$ todavía inhibe una cuarta parte. En medio ácido tampoco se apreció influjo sobre la fosfatasa de luz.

El cadmio inhibe fuertemente a concentraciones $m/20$ y $m/100$ las fosfatasas de luz y pared de intestino de cobayo y de intestino de rata. A concentración $m/1000$ la inhibición es ya muy poco acusada.

El cobalto presenta en función de la concentración desde una intensa inhibición hasta una activación considerable sobre fosfatasa de secreción intestinal de cobayo. A concentración de $m/100$ inhibe todavía bastante, mientras que a $m/1000$ activa ya considerablemente. En medio ácido no se encontró influjo.

Este tipo de exploración sistemática ha permitido, no sólo el acúmulo de un buen número de datos cuantitativos, sino encontrar cosas insospechadas, como, por ejemplo, la activación por las sales biliares a pH ácido de las fosfatasas intestinales.

El generalizar la acción de una sustancia a fosfatasas de distintos orígenes por estar incluídas en la misma casilla de un sistema de clasificación, está expuesto a errores considera-

bles y conviene, como han indicado LORA TAMAYO y TALLADA (año 1944), repetir las experiencias con cada fosfatasa de origen diferente.

DISCUSION

Desde que SUZUKI, YOSHIMURA y TAKAISHI (1907) descubrieron la primera fosfatasa (fitasa), pasaron muchos años sin que se dispusiera de técnicas apropiadas para su determinación, con lo que los valores obtenidos no eran comparativos. Es a partir de 1928 (KAY) cuando se van dando métodos más uniformes; pero aun hoy no existe un procedimiento universal y se siguen varios con condiciones de trabajo muy distintas.

Hemos pasado mucho tiempo eligiendo métodos y detalles de técnica hasta encontrar una constancia de resultados. Las principales dificultades estriban en la falta de garantía de los métodos *colorimétricos para determinar el fósforo*, en las múltiples influencias sobre la hidrólisis del substrato, en utilizar concentraciones apropiadas de fermento, substrato y amortiguador y en encontrar un modo adecuado de referir los resultados por unidades. Creemos haber resuelto muchas de estas dificultades con las técnicas expuestas. La colorimetría ha sido simplificada y revalorada con el sistema de SOLS. La unidad escogida, análoga a la de BODANSKY para fosfatasas séricas, constantemente utilizada, es muy propia para nuestros trabajos. El tiempo de hidrólisis, fijado en 60 minutos, resulta cómodo y suficiente. El autolizado en agua clarofórmica para la determinación de fosfatasas de tejido es el más eficaz y sencillo procedimiento para solubilizar las lienzimas y ofrece garantías de homogeneidad como ninguno.

Claro está que no puede esperarse una constancia absoluta en las diferentes experiencias. Los más distintos trabajos científicos coinciden en la *amplia variabilidad fisiológica* e individual de los valores de fosfatasas en flúidos y tejidos orgánicos. Un dato curioso es la experiencia de BODANSKY (1934), por la que vió cómo ascendía considerablemente la fosfatasa sérica de perros recién nacidos en el espacio de pocas horas, por el simple hecho de ingerir alimento. La obstrucción de colédoco, patológica o experimental, determina en el hombre y perro (BODANSKY y JAFFE, 1933-34) una alteración de la fosfatasa sérica, KING y HARRIS, l. c.), mientras que el gato, FODD,

GUTMAN y GUTMAN, 1937) no se modifica apreciablemente y en la rata (WEIL y RUSSELL, 1942) sufre un marcado descenso. Desde KAY (1930) se sabe la alta influencia de la edad en el contenido de fosfatasa renal y ósea.

Hubiera sido de desear, sobre todo por estos últimos datos, poder trabajar con *cobayos de una edad y peso semejante*. El gran número de animales sacrificados y el mucho tiempo que han requerido las diferentes experiencias, junto con las dificultades para mantener un abundante criadero en el laboratorio, ha hecho imposible conseguirlo.

No obstante, la constancia encontrada en las experiencias permite deducir conclusiones correctas; son mucho más semejantes las cifras obtenidas de fosfatasas intestinales que las de muchos tejidos; la edad influye muy poco en esos valores.

Sería ilógico pretender dar un carácter de cifras rigurosamente absolutas a las que se encuentran en nuestros protocolos, o valor estadístico a pequeñas diferencias apreciadas. Nos limitaremos a destacar una porción de hechos indiscutibles y señalar acusadas diferencias de comportamiento. Es interesante haber podido comprobar en géneros animales distintos varios de nuestros resultados, pues invita a generalizarlos.

Para la discusión, seguiremos el orden de las experiencias. Siempre que podemos se prefiere comparar los resultados expresados en unidades por gramo de tejido o por centímetro de intestino.

1. — *Fosfatasas en contenido intestinal*. — Tomando las medias de todas las experiencias se obtiene el siguiente cuadro resumen:

Unidades	Intestino 100 c. c.	E n d i g e s t i ó n			En ayuno Intestino delgado U/cm.
		delgado U/ cm.	Estómago Unid. 100	Bilis U/ 100	
Cobayos	1013	0,22	20	8,6	0,046
Conejos	215	—	—	—	—

Durante la digestión la papilla intestinal es, pues, extraordinariamente rica en fosfatasas. Los cobayos poseen casi cinco veces más que los conejos. La actividad fosfatásica de contenido gástrico (unas 20 unidades) y la de bilis (8,6) no pueden explicar las 1000 unidades propias de la papilla en el intestino. La bilis de cobayo es muy pobre en actividad fosfatásica

a pH 9,4; insistimos en esto al ver la curva de dependencia del pH.

En cobayos en ayuno se sigue encontrando fosfatasa, aunque en cuantía mucho menor (0,046 unidades/cm.; frente a 0,217 en digestión). Es sumamente difícil encontrar enteramente vacío el intestino delgado. Restos alimenticios que pueden continuar como estímulo, falta de vaciado completo de la fosfatasa segregada durante la última digestión y aun una continua aunque ligera secreción de ayuno, pueden aducirse como explicaciones a las cifras de fosfatasas halladas.

2. — *Fosfatasas en luz intestinal tras administración intragástrica de distintas substancias.* — El método de CORI permite trabajar en condiciones fisiológicas. Con los datos de contenido de fosfatasas en la luz intestinal de animales en ayuno, ya conocidos, se puede tener idea aproximada de las que se vierten a la luz durante el tiempo de la experiencia. Puede llegar al intestino fosfatasa biliar y gástrica (la pancreática puede suponerse a los efectos despreciable), pero sabida su concentración aproximada no resulta difícil calcular su posible participación en las totales recogidas.

En los líquidos de lavado sin filtrar hay más fosfatasa que después de haber filtrado; por esta operación se pierde casi un 30 por 100 de actividad. Lo atribuimos a posibles descamaciones de la mucosa retenidas por el filtro, o a quedar también en él parte de la fosfatasa englobada en los grumos de mucina segregados o adherida en los restos alimenticios; estas mismas causas deben ocasionar la gran variabilidad en determinaciones paralelas a partir de un mismo líquido de lavado. Por esta razón preferimos siempre determinar las fosfatasas en el filtrado que se mostraba mucho más homogéneo. Ya explicamos que la centrifugación es innecesaria.

Reunimos las medias de todos los resultados obtenidos según esta técnica en el siguiente cuadro:

Substancia	Fosfatasas de luz intestinal en unidades /cm.	
	Lavando todo el intestino	Lavando solo la 1. ^a parte
Glucosa	0,210	0,314
Fructosa	—	0,354
Glicocola	0,207	—
Peptona	0,185	—
Aceite de olivas	0,200	—
Cloruro sólido	0,077	—

Las soluciones de glucosa, glicocola y ClNa eran aproximadamente isotónicas entre sí, aunque francamente hipertónicas para el organismo (cuatro veces más concentradas). Los resultados hablan en favor de una secreción de fosfatasa ante todos los estímulos empleados, excepción hecha del ClNa. En este último caso los valores encontrados son sólo poco o nada más altos que los correspondientes al ayuno. No pueden establecerse diferencias en el poder estimulante de las demás sustancias: escapan demasiados factores para hacer caso a ligeras variaciones.

También aquí hay que pensar en un origen fundamentalmente intestinal de la fosfatasa de luz. *Harian falta unos 100 centímetros cúbicos de bilis* para poder suministrar al intestino la fosfatasa que allí se encuentra.

Hemos observado que las cifras de fosfatasa referidas a centímetro de intestino, eran más altas cuando se lavaba sólo una parte que cuando se arrastraba el contenido de todo el delgado. Había de ser así, lógicamente, pues el líquido administrado no alcanza en el tiempo de la experiencia las últimas porciones del delgado y con ello esta parte no sufre el correspondiente estímulo: la misma cantidad de fosfatasa referida a la longitud total del intestino resulta así inferior a la que se obtendría refiriéndola solamente a las porciones alcanzadas por la solución.

La exclusión completa de los factores extraintestinales, así como más precisión para saber la cantidad de fosfatasa realmente segregada a la luz en un cierto tiempo, se consiguió utilizando las técnicas de asa aislada.

3. — *Secreción de fosfatasa en asa aislada.* — Los resultados son suficientemente constantes para convencernos de las buenas condiciones experimentales en que trabajábamos. Las soluciones de ClNa, glucosa, fructosa, galactosa, xilosa, glicocola y glicerofosfato sódico, aproximadamente isotónicas con la sangre. Por su elevado peso molecular, las soluciones de peptona y ácido levonucleínico quedaron hipotónicas. El ácido oleico se administró puro.

Incluimos un cuadro resumen de los resultados en cobayos, tomando las medias de todas las experiencias, sin tener en cuenta la posición de orden del asa en el yeyuno.

Tiempo:	Unidades de fosfatasa de luz por cm. de intestino			
	15 minutos	30 minutos	45 minutos	60 minutos
Suero fisiológico	—	0,06	0,064	0,075
Glucosa	0,08	0,24	0,276	0,29
Galactosa	—	—	0,185	—
Fructosa	—	—	0,23	—
Xilosa	—	—	—	0,36
Glicocola	—	—	—	0,24
Peptona	—	—	—	0,20
Glicerofosfato sódico	—	—	—	0,30
Acido oleico	—	—	—	0,21
Acido nucleínico de la levadura	—	—	—	0,24

Como se ve en este cuadro, hay una diferencia marcadísima en las experiencias de media hora o más de duración, entre la fosfatasa presente en luz de asas *en las que se ha puesto suero fisiológico* y las otras; en el primer caso hay valores unas cuatro veces más bajos que en el segundo, no difiriendo mucho de los encontrados en ayuno, en asas sin estímulo químico ninguno. A pesar de la *eficacia del lavado* que se hace patente en la tabla X, estamos lejos de creer que se haya arrastrado absolutamente toda la fosfatasa que hubiera. En las criptas de la mucosa, entre las vellosidades intestinales, puede quedar una parte de la fosfatasa que difícilmente se disuelva y arrastre; esto podría explicar, sin necesidad de nueva secreción, que en las asas con suero fisiológico aparezca después de 30 minutos cierta actividad fosfatásica, ya que durante todo ese tiempo ya es más probable se disuelva la fosfatasa residual en el suero fisiológico. Nada habla, sin embargo, en contra de una ligera secreción por la simple repleción del asa.

Hicimos ya ver en la parte experimental el hecho notable de que *el estímulo secretor provoca respuestas estrictamente locales*, de modo que la secreción de fosfatasa tiene únicamente lugar en el asa aislada que contiene la substancia inyectada. Resulta aparente en efecto cuando se observa que en asas con suero fisiológico no aumenta prácticamente en nada la secreción de fosfatasa por el hecho de estar junto a ellas otras asas con solución de glucosa por ejemplo. Hay que desechar, por tanto, en el mecanismo de la respuesta secretora, todo proceso hormonal o nervioso que, lógicamente pensando, habría de extenderse a otras porciones intestinales, cuando menos a las más inmediatas. Debe tratarse, en nuestro parecer, de una

respuesta directa de las células de la mucosa al estímulo químico de la sustancia puesta en luz; el estímulo mecánico del lavado previo del asa así como la distensión de la pared intestinal por la introducción del líquido, como se deduce de la comparación con suero fisiológico, o no tienen acción o es inapreciable dentro de la respuesta al estímulo químico: la mucosa «distingue» bien el suero fisiológico de las otras sustancias utilizadas.

Poco puede decirse sobre las *diferencias de comportamiento de la secreción de fosfatasas según las sustancias utilizadas* distintas del suero fisiológico; las escasas desviaciones sólo podrían establecerse con un número mucho mayor de animales. Lo único que sugieren las tablas es una secreción ligeramente mayor con la glucosa y glicero-fosfato que con la galactosa, fructosa y peptona; pero esto, repetimos, no tiene suficiente fundamento.

Más claro está el *aumento de secreción cuando se trata de la xilosa*: las medias con glucosa, tras sesenta minutos son de 0,29, mientras las de pentosa son (cobayos) de 0,36. Particular interés han tenido las experiencias con glucosa y xilosa al relacionar conjuntamente la absorción de azúcar, la secreción de fosfatasa y el fósforo inorgánico presente en la luz. En cobayos anestesiados con uretano no hemos encontrado una gran absorción selectiva (glucosa; xilosa: 100; 65); todavía menos encontraban DAVIDSON y GARRY (1940) en gatos. No aparece claro en cobayos el diferente curso de secreción de fósforo que observaron LASZT y DALLA TORRE (1941) en las ratas según se absorbiera glucosa o xilosa.

Son en cambio mucho más claros los resultados de experiencias análogas practicadas en ratas. Aquí la absorción selectiva tiene ya gran importancia. En experiencias de 30 minutos no hay más diferencias relevantes que las de absorción; *en las de 60 las asas con xilosa tienen en su luz alrededor del doble cantidad de fosfatasa y un 50 % más de fósforo inorgánico que las de glucosa*. No tenemos datos suficientes para aventurar una hipótesis que explique estos hechos; la más simplista sería, al menos en lo referente a la fosfatasa segregada, que la más lenta absorción de xilosa hace que el estímulo químico sobre la mucosa se prolongue más con lo que ésta responde segregando más fosfatasa y fósforo.

La tabla XVII revela que la *acción estimulante* de la glu-

cosa depende en alto grado de la concentración a que se encuentra en el asa y nos reafirma en la naturaleza química del estímulo; las medias de fosfatasa segregada con soluciones isotónicas con glucosa al 5,4 % y al 2,7 % son respectivamente 0,22 y 0,12 unidades por cm.; casi puede decirse que a concentración mitad corresponde mitad secreción.

4. — *La secreción de fosfatasa a distintos niveles del intestino.* — Se ha discutido ya inicialmente en la parte experimental. Tanto las diferencias de actividad fosfatásica del contenido que fluye o se extrae, como la de lavados de distintas porciones, demuestran que aquélla va aumentando a lo largo del intestino por acumulación sin duda de la que a su paso va segregando la mucosa, hasta llegar al ciego; la reabsorción de agua en éste hace que se concentre todavía más; sin embargo, después de cierto tiempo de permanencia en ciego, la fosfatasa pierde mucha actividad o se degrada, siguiendo por el colon en cantidades relativamente bajas que son las que se encuentran después en las heces.

Las experiencias en asas aisladas a distintos niveles han puesto de manifiesto que la secreción es máxima en yeyuno, descendiendo mucho en íleon y no existe en colon; paralelamente la absorción de glucosa es como 1 : 0,7 : 0,3.

5. — *Relación entre contenido en fosfatasas de la pared intestinal y secreción de las mismas.* — La distribución de fosfatasas a lo largo del intestino decrece al alejarse del yeyuno tanto en cobayos como en ratas. Junto con éste descenso se da la disminución de la respuesta secretora al estímulo de glucosa. En colon, con muy poca fosfatasa, no hay secreción. Relación parecida se aprecia en la decreciente absorción de glucosa. En la gráfica 1 se reflejan claramente estas diferencias.

Los razonamientos expuestos en la parte experimental nos llevan a admitir que la mucosa intestinal del yeyuno dispone en un momento dado de una cantidad de fosfatasa unas veinte veces mayor que la que segrega en una hora bajo estímulos alimenticios. Hay que pensar en que diariamente la mucosa ceda a la luz grandes cantidades de fosfatasa para lo que se hace imprescindible la renovación de la fosfatasa celular; esto puede conseguirse a partir de otras fuentes del organismo a través de la sangre o por la propia capacidad sintetizadora de sus célu-

las; más fisiológico nos parece, a la vez que más verosímil, este origen autóctono.

6. — *Curso de la secreción intestinal de fosfatasa y fósforo.*

— Las curvas de secreción obtenidas en perro son muy interesantes. El inyectar glucosa hipertónica tendía a conseguir cierto grado de constancia en el volumen de líquido, en el asa.

Las determinaciones no pueden proporcionarnos, en realidad, el curso preciso, cuantitativo, de la secreción. Habría sido preciso conocer, al practicar cada toma de muestra el volumen exacto de líquido en el asa, lo que presenta en la práctica grandes dificultades. Lo único que nos dicen las determinaciones es la concentración actual de la fosfatasa en el líquido presente en la luz. *No se trata, pues, de cursos de secreción, sino de cursos de concentraciones de fosfatasa.* Es evidente que éstas dependen de aquélla y de las variaciones de la cantidad de líquido en el asa. Lo mismo puede argüirse para el fósforo inorgánico.

En nuestras dos experiencias, hemos encontrado al final unos 10 c. c. de líquido y como se han hecho seis extracciones no han debido ser grandes las modificaciones de volumen. De un modo grosero, puede establecerse cierto paralelismo entre concentración y secreción. La manifiesta elevación de la concentración de fosfatasas que tiene lugar en el curso de una hora (de 1 a 10 aproximadamente) no puede en absoluto atribuirse a reducción del volumen inicial a 1/10, sino a la intensa secreción provocada. Además, el hecho que con seguridad podemos afirmar, es que no ha ascendido el volumen del líquido del asa por encima del que inicialmente se puso, cuando menos después de los 15 primeros minutos, como no hay que pensar en que la fosfatasa se reabsorba por la mucosa, las desviaciones por reducción de volumen obligarían a pensar en aumentos de secreción algo inferiores a los que se deducirían de las concentraciones de fosfatasa y no al contrario. Teniendo en cuenta estas consideraciones, admitimos que durante la absorción de glucosa en el asa tiene lugar una fuerte secreción de fosfatasas que tiende a reducirse al final de la experiencia. La concentración de fosfatasa en la luz es creciente dentro de los primeros 60 minutos, y tiende a estabilizarse en la última media hora. La concentración de fósforo inorgánico, en cam-

bio, presenta un aumento rápido hasta un máximo a los 60 minutos, descendiendo luego poco a poco.

Los resultados obtenidos en cobayos (Tablas XXIV y XXV) son similares.

7. — *Fosfatasa de pared y luz intestinal en embriones de cobayo.* — En 1923 KAY estudió la evolución del contenido en fosfatasa del embrión de pollo y lo observó abundante en cuanto se inicia la osificación (KAY 1932). MARTLAND y ROBISON (año 1924) también estudiaron las fosfatasa de fetos de cinco meses y medio y en el recién nacido y dedujeron que no aparecía hasta que se diferencian los centros de osificación independientemente de otras circunstancias; precisamente los máximos de encima, coinciden con los máximos de diferenciación histológica cuando se cultiva «in vitro» fémures embrionarios (FELL y ROBISON, 1929). En cambio hay muy poca fosfatasa renal antes del nacimiento, y a partir de este momento asciende rápidamente para alcanzar en seguida valores semejantes a los del adulto (KAY 1926), en tanto la ósea va decreciendo con la edad (KAY, 1932). En la intestinal, hemos encontrado que en embriones de cobayo, de 24 a 29 gm. de peso fresco, próximos ya al nacimiento, poseen tanta fosfatasa por gramo de intestino como el adulto y con una distribución parecida a lo largo del mismo. Bien conocido es que hacia el final del embarazo hay ya una porción de órganos trabajando, entre ellos el hígado que contiene glucógeno y segrega ya la bilis, las glándulas gástricas y las pancreáticas que laboran ya fermentos proteolíticos. Queda por resolver el problema de qué tejido es el primero en poseer fosfatasa determinables y si tienen origen único o independiente las que se encuentran en los distintos órganos. El hecho de que en la luz intestinal de los embriones de cobayo se encuentren actividades fosfatásicas del mismo orden que los adultos en ayuno, concuerda con el ya antiguo trabajo de SCHMIDT (1914) en el meconio.

8. — *Influencia del pH sobre la actividad de las fosfatasa intestinales del cobayo.* — En la zona alcalina el óptimo de actividad es a un pH alrededor de 9,4, tanto en fosfatasa de luz como en las de pared se pierde fuertemente actividad a pH 10 y a pH 8 o más bajo. A pH ácido puede revelarse alguna actividad hidrolítica con incubación bastante más larga (3 horas).

Llama la atención que en todas las experiencias de una hora con fosfatasas segregadas, a pH ácido, se manifiesta al parecer un predominio de acción sintetizadora a expensas del fósforo inorgánico inicialmente presente procedente de las pequeñas cantidades segregadas durante la absorción y del que acompaña al glicerofosfato como impureza inicial del producto o resultado de la hidrólisis espontánea de la solución conservada. Conviene tener presente, que el pH de luz intestinal es, precisamente, alrededor de 6, con lo que puede tener interés esta observación en cuanto a la acción fisiológica de la fosfatasa segregada se refiere.

Investigaciones más profundas se requieren para determinar las causas de esta diferencia de comportamiento de las fosfatasas de pared y de luz a pH ácido.

9. — *Activadores e inhibidores de la fosfatasa intestinal.* — Casi todos los resultados han sido ya discutidos en la parte experimental. Queremos aquí, nada más, llamar la atención sobre algunos hechos de interés fisiológico.

Las fosfatasas de luz se activan mucho menos por el magnesio que las de pared; es un dato en favor de la posible dualidad de las fosfomonoesterasas alcalinas intestinales.

El uretano no ha podido influir en las determinaciones de fosfatasas, por cuanto no presenta poder inhibitor más que a concentraciones mucho más altas que las que verosíblemente puedan alcanzarse en pared y luz intestinal con las dosis utilizadas para la anestesia.

Los ácidos biliares, representados en nuestras experiencias por el taurocolato, no sólo carecen de acción inhibitor (excepto a elevadas concentraciones, desde luego no fisiológicas) en contra de lo que ocurre con fosfatasas de otros orígenes, como ya se sabía, sino que en medio ácido tienen una franca acción activadora; lo que hay que tener en cuenta dado que el pH de luz intestinal es ácido.

Conclusiones

Se realiza un estudio detenido de la secreción de fosfatasas por la mucosa intestinal y del comportamiento de la fosfatasa segregada, frente a muchos factores. Se han utilizado cobayos, ratas, conejos y perros.

I. — En digestión, el contenido intestinal es considerablemente más rico en fosfatasas que en ayuno, y el origen fundamental del fermento es la mucosa intestinal.

II. — La presencia de glucosa, galactosa, levulosa, xilosa, glicocola, peptona, glicerofosfato sódico, ácido oleico y ácido nucleico en la luz intestinal por introducción con sonda intragástrica o ser inyectadas en asas aisladas, actúa como estímulo para la secreción de fosfatasa por la mucosa. Con suero fisiológico no se da tal secreción o es muy escasa.

III. — El estímulo secretor es de tipo químico y alcanza exclusivamente a las células de la mucosa directamente en contacto con la sustancia estimulante. La respuesta secretora está limitada, asimismo, a la superficie de mucosa estimulada. El grado de secreción depende de la concentración de la sustancia estímulo.

IV. — La secreción de fosfatasa por la mucosa intestinal de cobayos y ratas, ante los estímulos empleados es de 0,2 a 0,35 unidades BODANSKY por cm. de intestino (yeyuno) y hora. No hay diferencias importantes entre el efecto de las distintas sustancias empleadas. Sólo la xilosa, especialmente en ratas, provoca mayores secreciones en experiencias de una hora. Se relaciona la absorción selectiva con la secreción de fosfatasa.

V. — A lo largo del intestino, se hace menor la capacidad secretora de la mucosa; la relación en yeyuno: íleon: colon es como 0,3 : 0,12 : 0 (fosfatasa un cm.). Se estudia la distribución de fosfatasa a lo largo de la pared de intestino en ratas y cobayos: el máximo corresponde a las primeras porciones de yeyuno y desciende progresivamente hasta el extremo cecal del íleon; ciego y colon son muy pobres en fosfatasa. Desciende paralelamente la capacidad para absorber azúcar.

VI. — La cantidad de fosfatasa segregada en una hora por el intestino delgado bajo un estímulo alimenticio, es del orden de 1/20 de la contenida en el mismo.

Al paso de la papilla alimenticia a lo largo del intestino, se provoca una gran secreción de fosfatasa, que se va acumulando con los restos alimenticios hasta el ciego; allí, antes de que entren en colon, sufren una fuerte inactivación o degradación y las residuales se encuentran en las heces. Es, pues, imprescindible la renovación casi diaria del contenido de la mucosa en fosfatasa.

VII. — El curso de secreción frente al estímulo alimenticio es rápido en la primera media hora y se hace luego más lento. En perros, la fase rápida se prolonga durante una hora. Simultáneamente, se sigue la secreción de fósforo inorgánico.

VIII. — La concentración — referida a peso fresco — de fosfatasa de intestino de embriones de cobayo, próximos a término, es ya de un orden semejante al del adulto. También hay ya fosfatasa segregada en la luz intestinal.

IX. — Se estudia la actividad de las fosfatasas de luz y pared a pH, comprendidos entre 3 y 10. El óptimo es alrededor de 9,4. Las fosfatasas segregadas difieren de las de mucosa en su comportamiento a pH ácido: en las segregadas hay una ligera, pero bien demostrada actividad sintetizadora, que domina sobre la hidrolítica.

X. — Se dan los resultados de la acción activadora o inhibidora

del magnesio, uretano, florricina, glicocola, taurocolato sódico, cianuro potásico, manganeso, fluoruro sódico, níquel, cobre, uranio, cadmio, cobalto y estroncio sobre las fosfatasas de mucosa y la segregada. El magnesio activa menos las fosfatasas segregadas que las de mucosa intestinal, lo que habla en favor de una dualidad de fosmonoesterasas alcalinas del intestino.

El taurocolato sódico, no sólo carece de acción inhibidora — salvo a concentraciones muy elevadas, no fisiológicas — en medio alcalino, sino que es francamente activador en medio ácido.

XI. — La acción sintetizadora de la fosfatasa segregada y la activación de fosfatasas por el taurocolato, todo ello a pH ácido, debe tenerse en cuenta en el estudio del papel fisiológico de tal fosfatasa, dado que el pH del medio intestinal es también ácido.

Resumen

Se estudia la secreción intestinal de fosfatasas en diferentes animales de laboratorio, especialmente en cobayos.

Ante los estímulos de materias nutritivas que se encuentran presentes en el contenido intestinal, hay una elevada secreción fosfatásica por las células de la mucosa. Este hecho se observa con la alimentación mixta ordinaria y diversas hexosas: xilosa, glicocola, peptona, glicerofosfato y ácidos oleico y nucleico. Lo mismo en el animal intacto (sonda gástrica) que en los trozos intestinales aislados «in situ». Consiste en un estímulo químico local muy poco específico. No existen diferencias apreciables entre las secreciones provocadas por diferentes sustancias empleadas, aunque aumenten con su concentración en el contenido intestinal. La cantidad de secreción provocada por disoluciones isotónicas de glucosa en el intervalo de una hora, es aproximadamente de un vigésimo de la fosfatasa total de la mucosa intestinal.

El contenido de la mucosa en fosfatasas, la secreción de este fermento y la absorción selectiva de azúcares disminuye proporcionalmente a lo largo del intestino. En el colon no hay secreción fosfatásica.

El autor estudia también la acción estimulante o inhibidora de Mg. uretano, florricina, glicocola, taurocolato, cianuro, Mn, fluoruro, Ni, Cu, U, Cd, Co y Sr, sobre la mucosa y las fosfatasas segregadas.

La activación por el magnesio sobre éstas es menos importante que la que se determina sobre las otras, lo que hace pensar en una dualidad de las fosfomonoesterasas alcalinas del intestino.

El autor llama la atención especialmente sobre la acción sintetizadora de las fosfatasas segregadas y la activación por el taurocolato, lo que tiene lugar a un pH poco ácido, en relación con su posible significación fisiológica.

Résumé

L'auteur étudie la sécrétion phosphatasique intestinale dans des différents animaux de laboratoire, principalement des cobayes.

Par les stimulés des matières nutritives présentes dans le contenu intestinal, prends lieu une forte sécrétion phosphatasique par les cellules de la muqueuse. Ce fait est observé avec les mélanges des aliments courants et différentes hexoses, xylose, glicocolle, peptone, glicerophosphate et acides oleique et nucleique. Dans le même sens dans l'animal intact (sonde gastrique) que dans les traits intestinaux isolés «in situ». Il consiste en un stimule chimique locale très peu spécifique: Ne doivent pas exister des differences appreciables entre les secretions provoquées par différentes substances employées, quoi que elles augmentent avec leur concentration dans le contenu intestinale. La quantité de sécrétion provoquée par des solutions isotoniques du glucose dans le delai d'une heure, est d'environ le vingtième de la phosphatase totale de la muqueuse intestinale.

Le contenu en phosphatases de la muqueuse, la sécrétion de ce ferment et l'absorption selective des sucres, est diminué proportionnellement au long de l'intestine. Dans le colon il n'existe pas de sécrétion phosphatasique.

L'auteur étudie aussi l'action stimulante ou inhibitrice du Mg. uretane, floridine, glicocolle, taurocholate, cyanur, Mn, fluorure, Ni, Cu, U, Cd, Co et Sr. sur la muqueuse et les phosphatases segreguées.

L'activation par le magnésium sur celles-ci, est moins importante que celle qu'il determine sur les autres, ce qui permet envisager une dualité de la phosphomonoesterase alcaline de l'intestin.

L'auteur remarque spécialement l'action synthétique des phosphatases segreguées et l'activation au moyen du taurocholate, tout ce qui a lieu à un pH pastres acide, en relation avec sa possible signification physiologique.

Summary

We study the phosphatasic intestinal secretion in several laboratory animals, principally in guinea pigs.

By means of stimulation of nutritive matters present on the intestinal content, occurs a stark phosphatasic secretion by mucose cells. This fact is observed with the ordinary mixed aliments and several hexoses, xylose, glicocolle, peptone, glicerophosphate, oleic acid and nucleic acid. In the same way on the intact animal (gastric sond) than in isolated intestinal loops «in situ». It consists in a local chemical stimulation, very sparringly specific: it does not exist appreciable differences between the provoked secretions by the different substances employed, although then increased with their concentration on the intestinal content. The quantity of the

provocated secretion by isotonic solutions of glucose in an hour amounts approximately the twentieth part of total phosphatase of the intestinal mucose.

The mucose content on phosphatases, the secretion of this ferment and the selective absorption of sugars decreased proportionally though the long of intestine. In the colon no phosphatase secretion exists.

We study the variation of phosphatasic richness of the intestinal content during the digestion and formation of feces.

The guinea pig phœtus nearer to the end of development, haven't just the phosphatase in their intestinal content and the concentration of the ferment on the mucose is of a similar order which corresponds to the adult.

The most favourable pH of the secreted phosphatase is of 9,4 : to a different manner of the mucose phosphatase presents the first at acid pH a little predominant sintetical activity.

We study the stimulating or inhibitory action of magnesium, urethane, florricine, glicocolle, taurocolate, cianur, magnese, fluorure. Ni, Cu, U, Cd, Co and Sr on the mucose and secreted phosphatases. The magnesium activation on this ones is less important than on the other ones, which permits to suspect a duality of alkaline phosphomonoesterase of intestine.

We evidence specially the syntetical action of secreted phosphatases and the activation by means of taurocolate, all of this at a not very acid pH in relation with his possible physiological signification.

Bibliografía

- ABDERHALDEN, E. y SCHITTENHELM (1906). — Der Abbau und Aufbau der Nucleinaäure im tierisches Organismus. Zeitschr. f. physiol. Chem. 47, 452.
- ALBERS, D. (1940). — Über sogenannte aktivatoren der alkalischen Phosphatasen. Hoppe-Seylers Z., 266, 1.
- ARCURI, F. (1942). — La fosfatasi del siero negli itteri. Ricerche in vitro sull'azione dei sali biliari e dell'acido ascorbico sulla fosfatasi del siero. Arch. Fisiopatologia, 10, 173.
- ARMSTRONG, A. R., E. J. KING y R. I. HARRIS (1934). — Canad. Med. Ass. 1, 31, 14.
- ARMSTRONG, A. R. (1935). — Purification of the active phosphatase found in dog faeces. Biochem. J., 29, 2020.
- AUSTONI, B. y COGGI, C. (1934). — Arch. ital. Chir., 37, 313.
- BAKWIN, H. y O. BODANSKY (1933). — Factors influencing the Measurement of the phosphatase activity of tissue extracts. J. Biol. Chem., 101, 641.
- BELLINI, L. y B. CERA (1940). — Comportamento della glicerofosfatasi intestinale durante l'assorbimento intestinale di glicerofosfato. Biochimica e Ter. sper., 27, 146.
- BELLINI, L. y B. CERA (1940). — La fosfatasi intestinale durante

- l'assorbimento di grasso neutro in ratti normali e rachitici. *Pathologica*, 32, 195.
- BODANSKY, A. (1933). — Phosphatase studies II. Determination of serum phosphatase. Factors influencing the accuracy of the determination. *J. Biol. Chem.*, 101, 93.
- BODANSKY (1934). — Phosphatase studies VII. Inorganic phosphorus and phosphatase of the serum in new born puppies. *J. Biol. Chem.*, 104, 717.
- BODANSKY y H. C. JAFFE (1933). — Phosphatase studies. IV. Serum phosphatase of non-osseous origin. Significance of the variations of serum phosphatase in jaundice. *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.*, 31, 107.
- BODANSKY, O (1936). — *J. of Biol. Chem.*, 115, 101.
- BREDRECK (1938). — Nucleasen. *Ergeb. Enzymforsch.*, 7, 105.
- CERA, B. y L. BELLINI. — Comportamento delle betaglicerofosfatasi intestinale durante l'assorbimento di glucosio. *Pathologica (Genova)*, 32, 294, 1940.
- CLEMENTI, A. (1923). — Sur un nouveau ferment propre du suc entérique: la phosphoglicerasa. *Arch. intern. physiol.*, 22, 121.
- CLEMENTI, A. (1930). — Sulla costante presenza della fosfoglicerasi nel succo enterico. *Arch. Farmacod. sper.* 49, 341.
- CLOETENS, R. (1939). — Identification de deux phosphatases «alcalines» dans les organes animaux. *Enzymologia (Den Haag)*, 6, 46.
- CLOETENS (1941). — Reversible Abspaltung des Zweiten Metalles der alkalischen Phosphatase. *Biochem. Z.*, 308, 37.
- CLOETENS (1942). — Die alkalischen phosphomonoesterasen des tierischen Organismus. *Gent. Diss.*
- CORI, C. F. (1925). — The fat of sugar in the animal body. I. The rate of absorption of hexoses and pentoses from the intestinal tract. *J. Biol. Chem.*, 66, 690.
- CRIMM, P. D. y J. W. STRAYER (1936). — Phosphatase content of blood serum and tissues in the rat following administration of vitamins D and A. *J. Biol. Chem.*, 112, 511.
- DAVISON, J. M. y R. C. GARRY (1940). — The absorption of monosaccharides from the distal small intestine of anesthetized cats. *J. Physiol.*, 97, 509.
- DEMUTH, F. (1925). — Über Hexosephosphatasen in menschlichen Organen und Körperflüssigkeiten. *Biochem. Z.*, 159, 415.
- DEUTSCH, W. y K. RÖSSLER (1929). — Experimentelle Studien über den Nucleotidasegehalt einzelner Organe verschiedener Tiere. *Hoppe-Seylers Z.*, 185, 146.
- FELL, H. B. y R. ROBISON. (1929). — The growth, development and phosphatase activity of embryonic evian femora and limb-buds cultivated in vitro. *Biochem. J.* 23, 767.
- FLOOD, CH. A., E. B. GUTMAN, y A. B. GUTMAN (1937). — Serum and urine phosphatase activity in the cat after ligation of the common bile duct. *Am. J. Physiol.* 120, 696.
- FOLLEY S. J. y H. D. KAY (1936). — The Phosphatases. *Erg. Enzymforschung*, 5, 159.

- FORRAL, E. (1923). — Glycerophosphatase in menschlichen Organen. *Biochem. Z.*, 142, 282.
- FREEMAN, S. y Y. P. CHEN (1938). — The effect of jaundiced blood upon normal dogs, with special reference to the serum phosphatase. *J. Biol. Chem.*, 123, 239.
- GOMORI, C. (1941). — The distribution of phosphatase in normal organs and tissues. *J. cell. comp. Physiol.*, 17, 71.
- GREENE, C., H. F. SHATTUCK y L. KAPLOVITZ (1934). — *J. Clin. Invest.*, 13, 1079.
- GROSSER, P. y H. HUSLER (1912). — Über das Vorkommen einer Glycerophosphatase in tierischen Organen. *Biochem. Z.*, 39, 1.
- HEYMANN, W. (1930). — *Z. Kinderh.*, 49, 748.
- HEYMANN, W. (1933). — Untersuchungen über die Phosphatstoffwechselstörung bei Rachitis. VIII Mit. Die quantitativen Verhältnisse der glycerol- und Hexosediphosphatasen in den Faeces des Menschen. *Z. Kinderh.*, 55, 92.
- HOVE, E., C. A. ELVEHJEM y E. B. HART (1940). — The effect of zinc on alkaline phosphatases. *J. Biol. Chem.*, 134, 425.
- KABAT, E. A. y J. FURTH (1941). — A histochemical study of the distribution of alkaline phosphatase in various normal and neoplastic tissues. *Amer. J. Path.*, 17, 303.
- KAY, H. D. (1923). — Cit. por NEEDHAM, J. (*Physiol. Rev.*, 1925, 5, 1).
- KAY, H. D. (1926). — Kidney phosphatase. *Biochem. J.*, 20, 791.
- KAY, H. D. (1928). — The phosphatases of mammalian tissues. *Biochem. J.*, 22, 855.
- KAY, H. D. (1932). — Phosphatase in growth and disease of bone. *Physiol. Rev.*, 12, 384.
- KING, E. J., E. J. WOOD y G. L. DELORY (1945). — Acid phosphatase of the red cells. *Biochem. J.*, 59, XXIV.
- KLEIN, W. (1932). — Experimentelle Studien über den Nucleinstoffwechsel. *Hoppe-Seylers Z.* 207, 125.
- KOSTER, L. (1939). — The presence of glycerophosphatase in human faeces. Stimulation and clinical significance. *Acta Med. Scand.*, 101, 482.
- KURAMOTO, T. (1932). — Über den Einfluss der Gallensäure auf die Nucleinverdauung. I. Bei der Verdauung der Nucleinsäure durch Darmsaft. *J. of Biochem.*, 16, 141.
- KUTSCHER, W. y H. WÜST (1941). — Nebenniere und alkalische Phosphatase. *Naturwiss.*, 319.
- LASZT, L. (1935). — Die Phosphorylierung verschiedener Zucker durch Darmschleimhautextrakte. *Biochem. Z.*, 276, 44.
- LASZT, L. y DALLA TORRE (1941). — *Schweiz. Med. Wschr.*, 1416.
- LEHMANN-ECHTERNACHT, H. (1941). — Zur Kenntnis der Nucleotidase aus Darmschleimhaut. *Hoppe-Seylers Z.*, 269, 169.
- LEVENE, P. A. y R. DILLON (1930). — Intestinal Nucleotidase. *J. Biol. Chem.*, 88, 753.
- LEVENE, P. A. y R. DILLON (1932). — Intestinal Nucleotidase and polynucleotidase. *J. Biol. Chem.*, 96, 461.

- LEVENE y MEDIGRECEANU (1911). — The action of gastrointestinal juices on nucleic acids. *J. Biol. Chem.*, 9, 65, 375.
- LORA TAMAYO, M. y F. TALLADA (1944). — Las sulfonamidas y la actividad de la fosfatasa. *An. Fis. Quim.*, 40, 1322.
- MACFARLANE, PATTERSON y ROBISON (1934). — The phosphatase activity of animal tissues. *Biochem. J.*, 28, 720.
- MAKINO, K. (1934). — Über den Nucleinstoffwechsel. I. Mitt. Über die fermentative aufspaltung der Hefenucleinsäure mit Nucleotidase aus Kaninchendarm. *Hoppe-Seylers Z.*, 225, 147.
- MARTLAND, M. y R. ROBISON. — 1924. The enzyme in the early stages of bone development. *Biochem. J.*, 18, 1354.
- MÜLLER, E. (1935). — Die Phosphatasebestimmung in Kleinen Serum-mengen. *Hoppe-Seylers Z.*, 237, 35.
- NAKAYAMA (1904). — Über das Erepsin. *Zeitschr. f. physiol. Chem.*, 41, 348.
- OKAMURA, T. (1928). — Über den Einfluss der Gallensäuren auf die Nucleasewirkung im Darm und in der Leber. *J. Biochem.*, 8, 321.
- OKAMURA (1930). — Id. id. (II). *Arb. med. Univ. Okayama*, 2, 245.
- PONZ, F. (1945). — Acción de la tiroxina sobre la actividad fosfatásica del intestino delgado de rata. *R. esp. Fisiol.*, 1, 173.
- REIS (1924). — *Bull. Soc. Chim. biol.*, 16, 385.
- REIS (1937-38). — *Enzymología (Den Haag)*, 2, 110.
- ROBISON, R. y K. M. SOAMES (1924). — The possible significance of hexose-phosphoric esters in ossification. *Biochem. J.*, 18, 740.
- ROCHE, J., THOAI, N. y M. ROGER (1944). — *C. r. Soc. Biol.*, 138, 653.
- SCHMIDT, R. (1914). — Weitere Untersuchungen über Fermente im Darminhalt (Meconium) und Mageninhalt menschlicher Foeten und Neugeborener. *Biochem. Z.*, 63, 287.
- SOLS, A. (1945). — Fórmulas y tablas colorimétricas para corregir las aparentes desviaciones a la ley de Beer. *R. esp. Fisiol.*, 1, 355.
- SOLS, A. — Aun no publicado.
- SUZUKI, U., K. YOSHIMURA y M. TAKAISHI (1907). — *Bull. Coll. Agr. Tokio*, 7, 495.
- TAKAHASHI, H. (1932). — Über fermentative Dephosphorierung der Nucleinsäure. *J. Biochem.*, 16, 463.
- TAKATA, H. (1931). — Über den Einfluss der Gallensäure auf Glycerophosphatase. *J. Biochem.*, 14, 61.
- TAKATA, H. (1932). — Id., id., id. II. *J. Biochem.*, 14, 439.
- TAKATA, H. (1932). — Id., id., id. III. *J. Biochem.*, 16, 83.
- THOAI, N., J. ROCHE y DANZAS (1945). *Bull. Soc. Chim. biol.*, 27, 401.
- UMENO, M. (1931). — Über das Vorkommen der Phosphatase in der Galle und in Pankreassaft. *Biochem. Z.*, 231, 345.
- WAKABAYASHI y WOHLGEMUTH (1911). — *Internat. Beitr. z. Pathol. u. Therapie d. Ernährungsstörungen*, 2, 519.
- WEIL, L. y M. A. RUSSELL (1942). — Studies on plasma phosphatase.

- tase activity and on blood phospholipids in rats with obstructive jaundice. *J. Biol. Chem.*, 144, 306.
- WESTENBRINK, H. G. K. (1935). — Beitrag zur Kenntnis der Darmphosphatase. *Arch. néer. Physiol.*, 20, 566.
- WESTENBRINK, H. G. K. (1936). — Über die Beziehungen zwischen der Geschwindigkeit der Glucoseresorption, dem Körpergewicht, der Körperoberfläche, dem Darmgewicht und dem Gehalt an Darmphosphatase bei der weissen Ratte und über einen Versuch zur Beeinflussung des Darmphosphatasegehaltes durch die Zusammenstellung der Nahrung. *Arch. néerl. Physiol.*, 21, 18.
- WILBRANDT, W. y L. LASZT (1933). — Untersuchungen über die Ursachen der selektiven Resorption der Zucker aus dem Darm. *Biochem. Z.*, 259, 398.