

Instituto Español de Fisiología y Bioquímica.
Sección de Fisiología Animal. — Barcelona.
(Prof. F. Ponz)

Sobre la inhibición de la fosfatasa alcalina por el aloxano

por J. Larralde y F. Ponz.

(Recibido para publicar el 3 de febrero de 1949)

Varios autores (3, 4, 13), han investigado la inhibición de la fosfatasa alcalina por el aloxano, "in vivo" o "in vitro". Las características químicas del aloxano hacen en cierto modo paradójico el hablar de una acción del aloxano en medio francamente alcalino, por lo que se ha juzgado necesario revisar el problema.

El aloxano en solución neutra o alcalina se descompone rápidamente dando ácido aloxánico (Lusini, Labes y Freisburger). A pH superior a 3'5, las soluciones de aloxano son inestables. Soluciones concentradas puras, a partir de 0'1 %, tienen pH de 3 ó aún menos y se conservan mejor. Soluciones diluídas (50 γ/100 cc.) han de acidificarse hasta ese pH para estabilizarlas 24 horas (Archibald). Por la acción de álcalis fijos, sin calentar, se forman aloxanatos.

Lazaris y Ugodnikova han comprobado la extraordinaria labilidad del aloxano "in vivo". Inyectado intravenosamente, se puede identificar en sangre y páncreas durante el primer minuto, desapareciendo después muy rápidamente; también se destruye rápidamente al adicionarlo "in vitro" a sangre, suero o plasma a 37°. La gran labilidad del aloxano ha sido también demostrada por muchos otros (11, 8, 2).

De los datos precedentes se deduce que no puede hablarse con rigor de cualquier acción del aloxano en medio alcalino dada su casi instantánea transformación.

Por otra parte, el carácter marcadamente ácido del aloxano puede influir de modo considerable en la reacción del medio. Si su concentración es suficiente, se sobrepasará la capacidad amortiguadora del buffer y las variaciones del pH condicionarán una reducción de la actividad enzimática.

Métodos

Se investiga la actividad fosfatásica de autolizados de intestino de rata blanca en 300 veces su peso de agua clorofórmica. La determinación de fosfatasa se hizo con glicerofosfato sódico M/50 amortiguando a pH 9'4 con acetato-veronal (Michaelis) con hidrólisis de 1 hora a 37°, según una técnica ya descrita (Sols y Ponz). El fósforo inorgánico era valorado por la reacción del azul de molibdeno con fotolorímetro. El pH se determinaba potenciométricamente. El aloxano utilizado era de la B. D. H. y sus soluciones se preparaban inmediatamente antes de su uso. Las concentraciones finales del aloxano estaban comprendidas entre 0'1 M y 0'00005 M.

Resultados

1. Inhibición de la actividad fosfatásica intestinal por el aloxano

Se preparaba una serie de tubos de ensayo conteniendo cada uno 2 cc. de sustrato y 5 de solución amortiguadora, a los que se agregaba solución de aloxano y agua destilada hasta 9 c. c., obteniendo concentraciones finales de aloxano entre 0'00005 M y 0'1 M, al agregar 1 c. c. de solución de fosfatasa.

Refiriendo a 100 la actividad fosfatásica normal, en ausencia de aloxano, los resultados de varias series se resumen en la tabla I.

TABLA I

Inhibición de la actividad fosfatásica alcalina de autolizados de intestino por el aloxano

Concentraciones de aloxano (M)	Actividad	Concentraciones de aloxano (M)	Actividad
0	100	0'0040	35
0'00005	98	0'0050	29
0'00010	92	0'0060	25
0'00025	85	0'0080	19
0'0005	77	0'010	17
0'0010	67	0'025	4'5
0'0020	50	0'040	2'1
0'0025	45	0'05	1'3
		0'1	0'8

2. Variaciones del pH por la adición de aloxano

La acidez del aloxano modifica según su concentración el pH del medio por ser insuficiente la capacidad amortiguadora del buffer

acetato-veronal. Las inhibiciones encontradas podían en parte deberse a no trabajar en el pH óptimo de la fosfatasa y se procedió a investigar con el potenciómetro el pH de la mezcla resultante.

La gráfica 1 expresa la variación del pH en series de tubos preparados como en la experiencia anterior en función de las con-

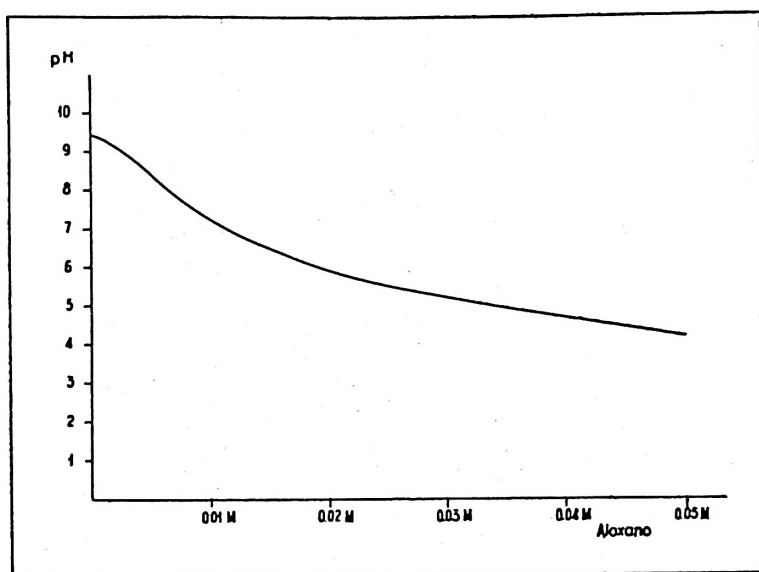


Fig. 1

DESPLAZAMIENTO DEL pH POR EL ALOXANO

5 cc. de tampón acetato-veronal (Michaelis) + 2 cc. glicerofosfato sódico M/10 + 2 cc. solución de aloxano + 1 cc. de autolizado. En abscisas, concentraciones finales de aloxano.

centraciones finales del aloxano. Las determinaciones se hicieron inmediatamente después de la mezcla de las soluciones.

Las concentraciones superiores a 0.0001 M de aloxano van disminuyendo el pH hasta llegar a zonas francamente ácidas, por insuficiencia de la capacidad amortiguadora de la mezcla.

3. Inhibición de la actividad fosfatásica por el desplazamiento del pH

Para diferenciar en lo posible la inhibición específica del aloxano de la propia de operar a pH inferiores al óptimo, se hicieron series de ensayos en los que se iba adicionando ClH a los tubos con sustrato y amortiguador hasta que las lecturas de MV en el potenciómetro eran iguales a las de los correspondientes tubos con aloxano; es decir, llevando a 1 mismo pH con HCl que el obtenido con aloxano. La actividad fosfatásica en los tubos con fuertes concentraciones de

aloxano resultó ser muy semejante a la de los tubos con HCl de igual pH, mientras que aparecían claras diferencias en concentraciones débiles. Un ejemplo de estos resultados se recoge en la tabla II, correspondiente a una de las series.

TABLA II

Aloxano (M)	Actividad %	Actividad % con ClH hasta pH equivalente
0'05	1'3	1
0'025	3'6	2'7
0'01	16'5	15'6
0'005	29	32'2
0'0025	46	62'2
0'001	65	89'3

Para concentraciones más débiles de aloxano resultaba difícil precisar las cantidades de ClH equivalentes con exactitud, ya que la inestabilidad de aquéllas en medio tan alcalino alarga mucho el tiempo de equilibrio.

La actividad fosfatásica en función del pH, variando éste con el uso de diferentes soluciones amortiguadoras acetato-veronal-ClH, sigue la curva de la figura 2, obtenida con valores medios de tres series.

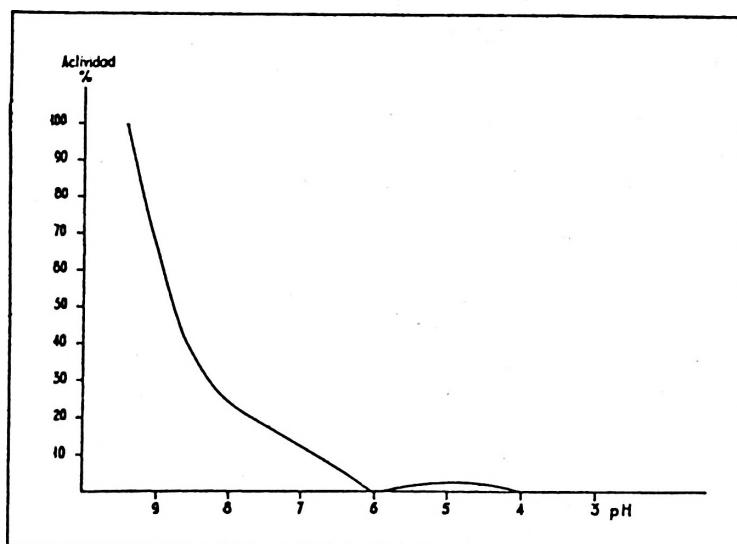


Fig. 2

ACTIVIDAD FOSFATÁSICA DE AUTOLIZADOS DE INTESTINO DE RATA EN FUNCIÓN DEL pH
Soluciones amortiguadoras acetato-veronal-ClH,

4. *Inhibición por aloxano llevado a pH 9'4*

Con independencia de la posible inhibición de la actividad fosfática, el aloxano ejerce una acidificación notable del medio, efecto que no puede separarse del propio del aloxano. Para evitar el desplazamiento del pH se hubieran podido utilizar soluciones amortiguadoras mucho más concentradas; el efecto en todo caso hubiera sido semejante al de llevar la solución de aloxano hasta pH 9'4 con NaOH, inmediatamente antes de la determinación de la actividad fermentativa. Con esta operación, el aloxano debe pasar a aloxanato principalmente, pero siempre que trabajemos con pH alcalino ocurrirá lo mismo dada la gran inestabilidad del aloxano en medio básico. A pesar de esto, llamaremos "aloxano neutralizado" en adelante al resultado de llevarle hasta pH 9'4 con NaOH.

En la tabla III se resumen los resultados obtenidos.

TABLA III

Inhibición de la fosfatasa intestinal por el aloxano a pH 9'4

Concentración molar de aloxano neutralizado	Actividad %
0	100
0'00010	98'5
0'00025	97
0'00050	95
0'0010	91'5
0'0025	84'0
0'005	73'5
0'010	54'5

La inhibición es mucho más débil que en el caso de no neutralizar el aloxano (tabla I); sin embargo, existe.

Utilizando concentraciones mayores de aloxano neutralizado, los tubos que servían para la determinación del P inorgánico presente no debido a la hidrólisis por la fosfatasa, no tomaban coloración alguna; la determinación del P era impedida por el aloxano, lo que aparentaba una inhibición total de la fosfatasa a tales concentraciones. Para precisarlo se realizaron otros ensayos.

5. *Influencia del aloxano sobre la reacción del azul de molibdeno para la determinación del fósforo*

Se estudió en soluciones puras de fosfato y en soluciones con amortiguador y glicerofosfato en las concentraciones utilizadas para

la determinación de fosfatasa, siendo igual el resultado en ambos casos.

La formación del azul de molibdeno se perturba en presencia de concentraciones de aloxano superiores a 0'05 M. Mas si en lugar de aloxano se trata de "aloxano neutralizado", se observa una fuerte inhibición a partir de concentraciones superiores a 0'015 M que llega a impedir toda coloración desde 0'05 M. De 50 γ de fósforo presentes, colorimétricamente sólo se revelan las siguientes:

Concentraciones molares de "aloxano neutralizado"	γ de P
0'010	50
0'015	43
0'020	37
0'025	29
0'03	24
0'05	0
0'10	0

Concentraciones de aloxano inferiores a 0'05 M y de "aloxano neutralizado" por bajo de 0'010 M no influyen en absoluto la reacción.

Este efecto ha de tenerse en cuenta para descartar inactivaciones aparentes de la fosfatasa por concentraciones altas de aloxano neutralizado cuando se investiga su actividad, determinando el fósforo por la reacción del azul de molibdeno.

Discusión

La inhibición encontrada con concentraciones de aloxano 0'010 M y superiores, puede explicarse simplemente por el desplazamiento del pH del medio dada la fuerte acidez del aloxano. La figura 3 recoge las curvas de inhibición de la fosfatasa por el aloxano, por el pH correspondiente a las mismas concentraciones de aloxano y por el "aloxano neutralizado". Por debajo de 0'01 M el aloxano inhibe más fuertemente de lo que cabría esperar si su efecto fuese sólo debido a la variación de pH; concentraciones muy débiles de aloxano, por debajo de 0'0005 M que lo modifican muy poco o inapreciablemente, muestran ya, sin embargo, un notable efecto inhibidor. El aloxano llevado a pH 9'4 con NaOH, que no ocasiona ningún desplazamiento del pH a que se opera, tiene también efecto inhibidor, aun cuando mucho más débil que el aloxano no sometido a dicho tratamiento.

Cabe, pues, pensar en que la inhibición de las fosfatasas alcalinas

in vitro por el aloxano sea debido al doble motivo de acidificación del medio y un efecto "per se"; estos efectos podrían sumarse en tanto no se llegara a grados fuertes de inhibición. El efecto propio del aloxano es prácticamente imposible de valorar: o se conserva el pH 9'4, con lo que se transforma rápidamente en aloxanato (Goldner, Goldner y Gomori, Archibald) o se modifica el pH y ya interfiere esta segunda causa de inhibición.

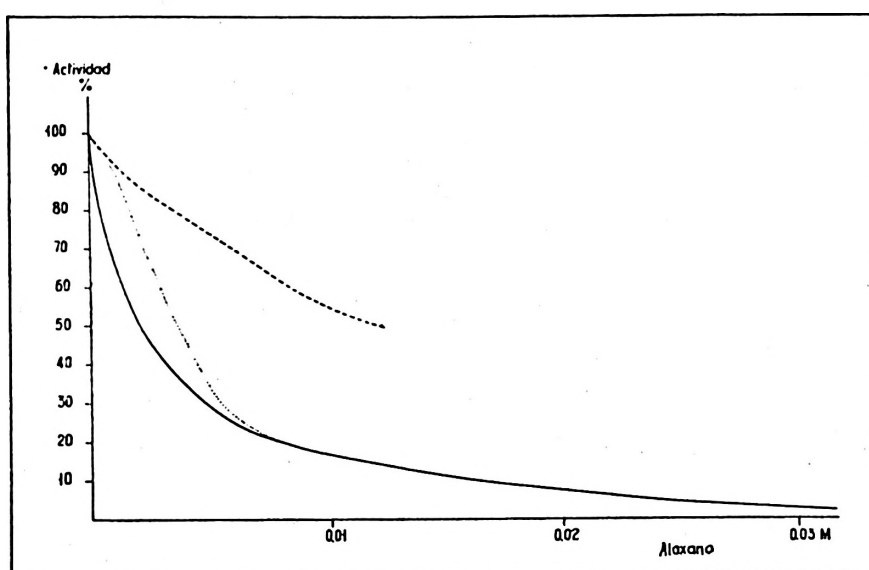


Figura 3

Inhibición de la fosfatasa alcalina por el aloxano (—) "aloxano neutralizado" (----) y por el pH correspondiente al desplazamiento de la reacción de la mezcla hidrolizante por las distintas concentraciones de aloxano (.....)

Burgen y Lorch (1947) han hecho un estudio comparativo de la inhibición de la fosfatasa alcalina por el aloxano y una serie de compuestos íntimamente relacionados con él. Amortiguan también con barbiturato sódico — no dicen su concentración —, pero quizás no fuese tampoco suficiente para conservar el pH 9'4; sería conveniente tener en cuenta en este caso el carácter más o menos ácido de los mismos: no deja de ser significativo el que las diferencias parezcan reducirse al aumentar su concentración hasta valores en los que encontramos ya una franca influencia de la acidificación. La curva de inhibición que dan para el aloxano es muy semejante a la obtenida por nosotros con aloxano no neutralizado y por tanto, muy probablemente, influida también por desplazamiento del pH.

Gemmill (1947) ha comprobado un efecto inhibidor del aloxano sobre la glucólisis muscular, que a concentraciones 0'015 a 0'040 M podía alcanzar un 80 % ó más si agregaba el aloxano antes del extracto muscular; igual inhibición conseguía con concentraciones 0'002 M si lo agregaba después del extracto, atribuyendo estas diferencias a la rápida destrucción del aloxano por la alcalinidad debida al bicarbonato. Por otra parte, observan que la inhibición es reversible por la cisteína, lo que permite relacionar el efecto del aloxano con su acción oxidante, a través, posiblemente, de enzimas con grupos sulfhidrilo. La participación del aloxano en sistemas de óxido-reducción es ya efectivamente conocida de antiguo (Richardson y Cannan, 1929, Wielan y Bergel, 1924). Esto puede explicar también su influencia en la reacción del azul de molibdeno.

Resumen

Se investiga "in vitro" la inhibición de la fosfatasa alcalina intestinal por el aloxano. La marcada inestabilidad del aloxano en medio alcalino no permite hablar de su influencia a pH 9'4, ya que en tales condiciones sufre rápida transformación.

La clara inhibición que se encuentra sobre la actividad fosfatásica puede deberse a una acción propia del aloxano y de sus productos de transformación, junto con el efecto de disminución del pH que se produce por la adición del aloxano dado su carácter francamente ácido, por insuficiencia de la solución amortiguadora.

A concentraciones 0'01M y superiores, la acidificación provocada explica por sí sola la fuerte inhibición encontrada. Entre 0'01M y 0'0005M, la inhibición debida a la acidez no justifica toda la encontrada; y por debajo de ésta última, sin variaciones apreciables de pH, todavía hay claras inhibiciones por el aloxano.

Si se evita el desplazamiento del pH llevando el aloxano hasta pH 9'4 con NaOH inmediatamente antes de las pruebas, se siguen encontrando inhibiciones, pero notablemente más débiles que las obtenidas con soluciones de aloxano sin tal tratamiento.

Summary

The inhibition of intestinal alkaline phosphatase by alloxan in vitro has been investigated. The great lack of stability of alloxan in alkaline medium does not permit us to speak its influence at pH 9'4, as in such conditions alloxan undergoes rapid transformation.

The clear inhibition of phosphatase activity can be due to an action proper of alloxan and its transformation products, together with the effect of decreasing pH which alloxan produces by its acidity, the capacity of the usual buffers being insufficient.

At concentrations 0'01 M and higher, the acidification alloxan produces explains in itself the strong inhibition found. Between 0'01M and

0.0005 M. concentrations the inhibitions by change of pH cannot account for the whole inhibition produced. At lesser concentrations there are no variations of pH and there are still clear inhibitions by alloxan.

If the change of pH is prevented by bringing the alloxan up to pH 9.4 with NaOH just before the tests, inhibitions continue to be found, but markedly lesser than those obtained with untreated alloxan solutions.

Bibliografía

1. ARCHIBALD, R. M.: *J. Biol. Chem.*, **158**, 347, 1945.
2. BRÜCKMANN, G.: *J. Biol. Chem.*, **165**, 103, 1946.
3. BURGEN, A. S. V. y LORCH, J. J.: *Biochem. J.*, **41**, 223, 1947.
4. DRABKIN, D. L. y MARSH, J. B.: *J. Biol. Chem.*, **168**, 777, 1947.
5. GEMMILL, Ch. L.: *Am. J. Physiol.*, **150**, 613, 1947.
6. GOLDNER, M. G.: *Bull. N. Y. Acad. Med.*, **21**, 44, 1945.
7. GOLDNER, M. G. y GOMOSI, G.: *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, **58**, 223, 1945.
8. KARRER, P., KOLLER, F. y STURZINGER, H.: *Helv. Chim. Acta*, **28**, 1529, 1945.
9. LARES, R. y FREISBURGER, H.: *Arch. exper. Path. Pharm.*, **156**, 226, 1930.
10. LAZARIS, Y. A. y UGODNIKOVA, T. G.: *Biull Eksptl. Biol. Med.*, **22**, 49, 1946.
11. LEECH, R. S. y BAILEY, C. C.: *J. Biol. Chem.*, **157**, 525, 1945.
12. LUSINI, V.: *Ann. chim. e farmacol.*, **21**, 241, 1894; **22**, 385, 1895.
13. MENTEN, M. L. y JANOUCH, M.: *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, **63**, 33, 1946.
14. RICHARDSON, G. M. y CANNAN, R. K.: *Biochem. J.*, **23**, 68, 1929.
15. SOLS, A. y PONZ, F.: *R. esp. Fisiol.*, **2**, 283, 1946.
16. WIELAND, H. y BERGEL, F.: *Ann. Chem.*, **439**, 1946, 1924.