

Extracción y Purificación de la Fosfatasa de la Glándula Mamaria (*)

POR

Ranwel Caputto y Alberto Marsal

Son relativamente escasos los conocimientos que se poseen actualmente acerca de la fosfatasa de la glándula mamaria; creemos que el primero que la señaló fué Kay, quien conjuntamente con Folley y Kay (1) han establecido las condiciones óptimas para su actividad y algunas constante físico-químicas, pero utilizando un preparado en el cual no se había determinado el grado de pureza. Posteriormente poca atención ha merecido su estudio químico.

El contenido en fosfatasa de la glándula mamaria es inferior al de otros órganos, tales como riñón, intestino o hueso, en los cuales ha sido más intensamente estudiada; pero de ninguna manera su contenido es tan exiguo que pudiera considerarse carente de significación. Trabajando en condiciones similares a las realizadas en este laboratorio por uno de nosotros (2) en estudios con riñón, vemos que los extractos mamaros tienen por centímetro cúbico un contenido de fosfatasa equivalente a la mitad del de los extractos renales. Si se agrega que puede creerse que la fosfatasa de la leche proviene de la mamaria y que los compuestos fosforados lácteos tienen una especial importancia, es posible suponer entonces que la fosfatasa mamaria es, en realidad, acreedora a un mejor estudio.

(*) Los gastos para efectuar este trabajo fueron sufragados con el fondo para investigaciones científicas de la Facultad de Medicina de Córdoba.

Entre los intentos de purificación de fosfatasa realizados hasta ahora en distintos órganos, debemos citar los de Martland y Robinson (3) con tejido óseo, mejorados luego por Lora Tamayo y Rodriguez Blanco (4), Armstrong (5) que estudió la fosfatasa fecal del perro, H. y E. Albers (6) extrayendo la fosfatasa del riñón mediante autolisis del órgano, posteriormente uno de nosotros (2) que mediante el uso de dioxana ha obtenido preparados de fosfatasa renal más purificados.

Técnicas usadas para las valoraciones

En este trabajo hemos seguido técnicas semejantes a las usadas en un trabajo anterior (2), empleando el mismo substracto (g. 1.25 de beta glicerofosfato sódico Eastman, g. 1.06 de veronal sódico Merck, g. 0.1522 de cloruro magnésico con 6 moléculas de agua de cristalización Schering-Kahlbaum, todo disuelto hasta 250 ml. de agua redestilada y ajustado el pH entre 9 á 9.1).

El fósforo fué determinado mediante la técnica de Fiske y Subba-Row (7) ligeramente modificada. Las determinaciones de pH fueron ejecutadas con el potenciómetro de Leeds y Northrop modelo 7660 y el electrodo de vidrio de Mc. Innes, usando como patrón la solución de ftalato ácido de potasio del National Bureau of Standards de Wáshington con un pH de 3.974 a 20 grados.

La técnica de las valoraciones enzimáticas ha sido la misma ya publicada anteriormente, también usamos la misma nomenclatura de unidades: "unidad de fosfatasa es la cantidad de enzima que en una hora y a la temperatura de 37 grados libera 0.1 mg. de fósforo del substrato y a pH de 9 á 9.1. La cantidad de fósforo liberado no debe ser mayor del 10 % del contenido de fósforo de todo el substrato usado". Los testigos fueron dispuestos en la forma ya descrita.

Para valorar las proteínas intentamos al principio hacer determinaciones gravimétricas, pero se nos han presentado dificultades que nos obligaron a abandonar la técnica, pues las proteínas no precipitaban en forma completa y nos quedaban algunas al estado coloidal. Hemos usado, entonces, el método de la determinación

del nitrógeno total de Kjeldahl como índice del contenido de proteínas de nuestro extracto; para mineralizar usamos el perhidrol; la destilación del amoniaco la hicimos de acuerdo a la microtécnica de Michaelis y la titulación final por yodometría según Koefoed (8). Expresamos nuestros resultados por el índice

$$\frac{\text{Unidades de fosfatasa}}{\text{Miligramos de nitrógeno total}}$$

Determinación del pH óptimo de la fosfatasa mamaria

Es conocido el hecho de que en los órganos animales se encuentran por lo menos tres tipos de fosfatasas cuya diferencia más fácil de reconocer es la de los distintos pH requeridos como óptimos para su actividad. En el cuadro siguiente hemos resumido el comportamiento de las fosfatasas de distintos órganos según los datos de la literatura:

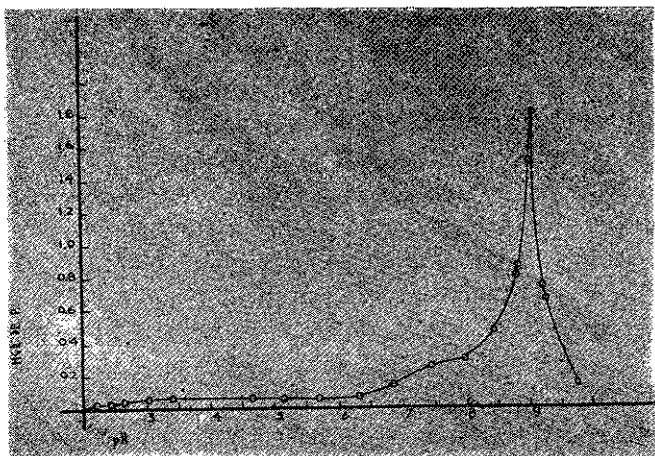
pH óptimo alrededor de 9 —	Dos óptimos alrededor de pH 5 y pH 9 —	Óptimo alrededor de pH 6. —
Plasma sang (Belfanti (9))	Riñón (Baman y Riedel)	Eritrocitos
Hueso (Belfanti (9))	Hígado (Baman y Riedel)	(Roche (13))
	Bazo (Davies (10))	
	Leche (Giri (11))	
	Cerebro (Giri y Datta (12))	

Dada esta diversidad de comportamiento, al iniciar nuestros intentos de purificación de la fosfatasa mamaria hemos sentido la necesidad de determinar el pH óptimo para su actividad; este trabajo previo imponíase con el doble objeto de ajustar la técnica de la determinación cuantitativa y además para conocer si el procedimiento de extracción debía tener en cuenta uno o dos tipos de enzimas.

Hemos usado en las determinaciones del pH óptimo, glándulas mamarias de vacunos y que estaban fuera de períodos de actividad funcional, para evitar la presencia de leche —que, como es conocido, tiene dos tipos de fosfatasa—. También se ha procurado eli-

minar la mayor cantidad posible de sangre para descartar la acción de las fosfatasa de este tejido.

Las extracciones las efectuamos con mezcla de Albers (véase más adelante), con buffer de borato sódico de Sorensen (pH 9.2) y con agua destilada; en el caso de los dos últimos agentes de extracción añadíamos toluol en la proporción del 10 % del volumen. No hemos encontrado diferencias notables según el agente de extracción y en la curva que reproducimos damos los resultados obtenidos con un extracto acuoso, filtrado después de 48 horas de maceración del órgano y con el cual se procedió a determinar la



riqueza en fosfatasa en presencia de substratos cuyo pH era adecuadamente modificado para tener toda la escala necesaria, pero manteniendo la misma concentración iónica total en todos los tubos. Las determinaciones de pH, efectuadas con las precauciones y técnica ya indicadas, eran repetidas después de la incubación de la mezcla de reacción. En experiencias complementarias estudiamos más particularmente algunas zonas de la escala de pH usando muchos tubos para tener menores desplazamientos del pH.

Interpretando la gráfica anterior, podemos concluir que la fosfatasa de la glándula mamaria tiene en las condiciones experi-

mentales en que nosotros trabajamos, un solo pH - óptimo de actividad; que este se encuentra alrededor de 9 y que la actividad enzimática cae bruscamente a ambos lados del óptimo.

Extracción de la fosfatasa mamaria

Partimos de glándulas mamarias de vacunos recientemente faenados en el Matadero Municipal de la ciudad de Córdoba; inmediatamente eran transportadas al laboratorio y libradas de toda grasa perimamaria e interlobulillar y luego groseramente picadas. Si las glándulas eran muy ricas en leche, los trozos eran exprimidos y lavados varias veces con agua común para extraer el máximo posible de leche. Luego el órgano era triturado finalmente en máquina picadora de carne. La extracción de la enzima la hicimos mediante autólisis a la temperatura ambiente (que osciló entre 16 y 26 grados) y con la adición de un volumen igual al peso de la glándula, de una mezcla compuesta de tolueno 50 ml., acetato de etilo 50 ml., etanol a 50 grados 1 litro; esta mezcla ha sido propuesta por Albers (6) y nos ha dado muy buen resultado en todos los trabajos efectuados en este laboratorio con distintos órganos. La autólisis se efectúa durante 2 á 3 días y luego el extracto se filtra por gasa y finalmente por papel de filtro previamente mojado con agua común; cuando el extracto era muy rico en lípidos bastaba enfriarlo fuertemente en el refrigerador eléctrico antes de la última filtración.

Los extractos obtenidos en esta forma tienen un color ligeramente amarillo y solamente dan una tenue fluorescencia verdosa diferenciándose en estos dos detalles de las preparaciones obtenidas del riñón.

El valor enzimático de estos extractos crudos así obtenidos, varía mucho según la actividad de las glándulas usadas y quizá también por otros factores (edad del animal, etc.). En los casos que la mama estaba en el período de secreción láctea, la riqueza en fosfatasa era mucho mayor que las glándulas en reposo funcional. Presentamos en el cuadro siguiente las diferencias obtenidas en diversas preparaciones divididas según el estado funcional:

Glándulas en reposo secretorio		Glándulas en actividad secretoria	
Unid.	Unid.	Unid.	Unid.
mg. N. total	por ml.	mg. N. total	por ml.
2.90	3.60	25 —	27.40
7.80	10.—	48.30	67.20
		23.—	23.—
		11.45	11.30
		9.10	25.—

Se ve, entonces, que en general cabe esperar mejores extractos más concentrados y más fáciles de purificar, partiendo de las glándulas en actividad funcional. Como criterio macroscópico para determinar el estado funcional de la glándula sólo hemos tenido en consideración la presencia o ausencia de leche.

Concentración de las preparaciones

El extracto crudo anteriormente descrito es precipitado con etanol a 95 grados, agregando en la proporción de 1 litro de alcohol por cada 800 ml. del extracto. El conjunto se deja en el refrigerador eléctrico (5 grados) durante toda la noche y al día siguiente se separa por decantación y centrifugación las proteínas precipitadas, mientras que el líquido se desecha por ser muy pobre en fosfatasa.

El precipitado de proteínas se somete a la acción del disolvente, para efectuar la elución de la enzima. Hemos estudiado los siguientes solventes: agua destilada, buffer de borato sódico (Sørensen) a pH 9 y el etanol a 25 grados centesimales; en todos los casos empleamos una cantidad de disolvente que equivalía a 1/10 del volumen primitivo del extracto, de tal modo de tener un aumento de concentración de la enzima de más o menos 10 veces el primitivo. Esta solución de fosfatasa parcialmente purificada la denominaremos El₁ (Elución N°. 1). En el cuadro siguiente presentamos los resultados obtenidos con diferentes solventes de la fosfatasa:

CUADRO N° 3

Agente Elución	Ext. crudo U./mg. N.	Elución U./mg. N.	Relación Purificación	Fosfatasa recuperada
Agua destilada	7.8	10.9	1.4	75.12 %
Agua destilada	10.4	14.2	1.5	—
Buffer borato	4.3	11.—	2.5	80.2 %
Etanol 25°	11.3	275.8	24.4	90.5 %
Etanol 25°	18.02	267.—	14.8	— %
Etanol 25°	23	320.—	14.1	68.— %

Por la comparación de los resultados deducimos que el disolvente más selectivo de la fosfatasa, en las condiciones experimentales en que nosotros hemos trabajado, es el alcohol etílico a 25 grados; sin embargo, no pudimos aumentar la riqueza de nuestros preparados por sucesivas disoluciones en alcohol a diferentes concentraciones. Por tal motivo decidimos buscar otro agente de elución que nos permitiera una mayor concentración por ser más selectivo al disolver la enzima, pero no las proteínas inespecíficas.

Purificación de las preparaciones

Buscando un agente mejor para la elución de la enzima pero que no disolviese las proteínas inespecíficas, iniciamos el estudio con las soluciones concentradas de sulfato de amonio y de sulfato magnésico, pero rápidamente debimos abandonarlas, pues la primera de estas destruía notablemente la fosfatasa y la segunda tampoco nos era de utilidad. Iniciamos luego el estudio de la solubilidad de la fosfatasa en las soluciones concentradas de acetato de magnesio, sal que presenta la ventaja de ser soluble en el etanol y por lo tanto cuando tenemos disuelta la enzima en solución saturada de acetato magnésico, bastará la adición de etanol para precipitar la fosfatasa y dejar en solución la sal magnésica. La solución saturada de acetato magnésico nos ha resultado un buen agente de elución de la fosfatasa.

Preparamos el acetato de magnesio por saturación del ácido acético con óxido de magnesio, el producto es fuertemente concentrado por evaporación y luego adicionado de la suficiente cantidad

de ácido acético para dar una reacción neutra al tornasol; el todo es abandonado hasta la cristalización. La sal es recrystalizada y disuelta luego para formar soluciones saturadas. En algunas ocasiones hemos usado como referencia el producto de Schering - Kahlbaum.

El procedimiento finalmente adoptado para purificar las preparaciones de fosfatasa fué el siguiente: La solución de fosfatasa parcialmente purificada (que anteriormente hemos designado El_1) se precipita con un volumen igual de acetona y se la deja durante una noche en el refrigerador eléctrico. El precipitado de proteínas —que contiene prácticamente toda la fosfatasa— es eluido al día siguiente con la solución saturada de acetato magnésico, empleándola en la proporción de medio volumen de ésta por cada uno de El_1 . Nos queda, entonces, una disolución de fosfatasa en solución saturada de acetato magnésico que llamaremos El_2 .

La solución anterior (El_2) es tratada por un exceso de etanol de 95 que precipita la enzima y deja en solución la sal magnésica. Esta operación se hace rápidamente, manteniendo el preparado en el refrigerador y obteniéndose así un precipitado de proteínas que es centrifugado.

El precipitado es sometido a la tercera elución que puede efectuarse con solución de acetato magnésico o con agua simplemente. Tenemos, así, las preparaciones más puras que actualmente se dispone.

Resultados y comentario

Presentamos en el cuadro número 3 algunos ejemplos de los resultados obtenidos con las mejores preparaciones (en total hemos hecho 28, pero cambiando las técnicas de acuerdo a las circunstancias). En los preparados A - B - C se usó como único agente de elución el etanol a 25 grados y los resultados fueron mediocres.

La preparación D la presentamos por ser uno de los casos en que el acetato de magnesio dió muy buen resultado en una sola solución. Las E y F son ejemplos de la técnica completa.

Una vez obtenidos estos resultados ya definitivos, decidimos hacer unas experiencias en las cuales seguimos la técnica descrita

pero se trabajaba lo más rápidamente posible para evitar la inactivación espontánea de la enzima, y al mismo tiempo haciendo la última elución con agua destilada —evitando un exceso de sales magnésicas—; siguiendo estas ideas se efectuaron las preparaciones G y H que dieron una riqueza de 2309 y 2208 unidades por miligramo de nitrógeno. El ligero aumento de riqueza con respecto al preparado F, posiblemente es debido a nuestra mayor experiencia en el trabajo.

CUADRO N° 3

Preparado	Ext. crudo U./ mg. N.	1ª Pre- cipita- ción	1ª. Elución U./ mg N y agente elución	2ª Pre- cipita- ción	2ª. Elución U./ mg. N. y agente usado	3ª Pre- cipita- ción	3ª. Elución U./ mg N. y agente usado
A	—	Etanol	301.1 Alc.	Acetona	—	Etanol	453.3 Alc.
B	11.3		275.8 Alc.		400.2 Alc.		577.— Alc.
C	18.02		267.— Alc.		389.2 Alc.		477.— Alc.
D	32.2	Etanol	360.— Alc.	Acetona	985.— Mg.	Etanol	—
E	—		247.2 Alc.		716.3 Mg.		1504.— Mg.
F	24.—		307.— Alc.		816.— Mg.		2086.5 Mg.

ABREVIATURAS:

- U./ mg N. = Unidades de fosfatasa por miligramo de Nitrógeno total.
 Alc. = Etanol a 25 grados.
 Mg. = Solución saturada de acetato de magnesio.

S U M A R I O

- 1° — Se ha determinado el pH óptimo de la actividad para la fosfatasa de la glándula mamaria de vacunos y en período de reposo secretorio, resultando ser alrededor de 9. Sólo se ha encontrado un tipo de fosfatasa.
- 2° — Se describe una nueva técnica de purificación de esta clase de fosfatasa, basada especialmente en la precipitación con etanol y acetona y luego solubilización en una solución saturada de acetato magnésico, reprecipitándola con etanol.
- 3° — Las preparaciones más puras contienen 2.309 unidades de fosfatasa por miligramo de nitrógeno total.

B I B L I O G R A F I A

- (1) FOLLEY S. J. y KAY H. D.: *Bioch. Jour.* Vol. 29, 1935, 1837.
- (2) MARSAL A.: *Rev. Soc. Arg. de Biología.* Vol. 15, 1940, 215.
- (3) MARTLAND y ROBINSON: *Bioch. Jour.* Vol. 23, 1929, 237.
- (4) LORA TAMAYO y RODRIGUEZ BLANCO: *Ann. Soc. Española de Física y Química.* Tomo 34, 1936, 376.
- (5) ARMSTRONG A. R.: *Bioch. Jour.* Vol. 29, 1935, 2020.
- (6) ALBERS H. und E.: *Hoppe Seyler's Zeits. f. Physiol. Ch. B.* 232, 1935, 165-89.
- (7) FISKE C. y SUBBA-ROW Y.: *The Jour. of Biol. Chemistry.* Vol 66, 1925, 375.
- (8) KOEFOED R.: *Compt. Rend. Lab. Carlsberg.* Vol. 10, 1911, 52.
- (9) BELFANTI S., CONTARDI A. y ERCOLI A.: *Bioch. Jour.* Vol. 29, 1935, 517.
- (10) DAVIES D. R.: *Bioch. Jour.* Vol. 28, 1934, 529.
- (11) GIRI K. V.: *Hoppe Seyler's Zeits. f. Physiol. Chem. B.* 243, 1936, 57.
- (12) GIRI K. V. y DATTA N CH.: *Bioch. Jour.* Vol. 30, 1936, 1089.
- (13) ROCHE J.: *Bioch. Jour.* Vol. 25, 1931, 1724.

Trabajo presentado a la Sociedad de Biología de Córdoba el 8 de mayo de 1941
