

ESTUDIOS SOBRE LA FOSFATASA RENAL (*)

1a. COMUNICACION: EXTRACCION Y PURIFICACION

POR EL

Dr. Alberto Marsal

(De la Cátedra de Química Biológica — Facultad de Medicina de Córdoba
Rep. Argentina)

En estos últimos años, el estudio de los compuestos orgánicos del fósforo ha tomado un considerable interés biológico por haberse logrado aislar una serie de productos que intervienen en diversos mecanismos funcionales. Tales compuestos fosforados juegan un importante papel en el metabolismo de los glucidos, contracción muscular, acción de algunas vitaminas, etc.

Los mecanismos de fosforilización y desfosforilización de tales compuestos orgánicos son relativamente poco conocidos, pero posiblemente son gobernados por las diversas fosfatasas existentes en los órganos y tejidos. El estudio racional de los procesos de fosforilización debe ser iniciado por el de las fosfatasas.

Pocos estudios se han efectuado hasta la fecha para el aislamiento y purificación de las fosfatasas y careciéndose por lo tanto de ideas claras sobre su constitución, no es posible avalorar exactamente los numerosos trabajos publicados sobre las pro-

(*) El presente estudio fué iniciado bajo la dirección del profesor J. B. Sumner de Ithaca (N. Y.), en una época en que el autor poseía la Beca Latina de la John Simon Guggenheim Memorial Foundation. Durante el año 1938 los gastos originados fueron sufragados con el "Fondo para Investigaciones" de la Facultad de Medicina de Córdoba (R. Argentina).

preparados biológicos de los preparados enzimáticos sumamente puros, actualmente en uso. La esterasa fosfórica que actúa especialmente sobre la hidrólisis de los glicerofosfatos fué descubierta en el riñón y otros tejidos por Grosser y Husler (1) en el año 1912, posteriormente Plimmer (2) confirmó su existencia y estudió sus propiedades. Kay (3) obtuvo por extracción con agua cloroformada una preparación de fosfatasa renal proveniente de riñones de cerdo, que le permitió estudiar las principales propiedades de la enzima. Ehrensvärd (4) mejorando el método descrito anteriormente por Erdtman (5) consiguió preparados mucho más potentes. Martland y Robinson (6) obtuvieron un preparado de fosfatasa ósea cuya potencia equivalía a 5.7 unidades por milígramo del residuo sólido del preparado: Lora Tamayo y Rodríguez Blanco (7) mejoran el método. H. E. Albers (8) obtuvieron los preparados más puros registrados en la literatura y que llegan a poseer una potencia de 50 unidades por milígramo de peso, pero cuando los preparados eran sometidos a técnicas especiales para eliminar las sales inertes, llegaban a poseer una potencia de 150 unidades por milígramo de proteína del producto.

Describiremos en este trabajo el procedimiento que nos ha permitido obtener preparados de fosfatasa renal (1) muy purificados.

TECNICAS USADAS PARA VALORAR LAS PREPARACIONES

La valoración de la fosfatasa fué efectuada usando un sustrato semejante al propuesto por Bodansky (9) que lleva veronal como buffer según el consejo de Michaelis (10) y compuesto de: 1.25 gr. beta glicerofosfato sódico Eastman, 1.06 gr. veronal sódico Merck, 0.1522 gr. cloruro magnésico con 6 moléculas de agua de cristalización Schering - Kahlbaum, agua redestilada en alambique de vidrio hasta completar 250 ml. El pH del sustrato era determinado potenciométricamente y fijado en 9-9.1 mediante la adición de HCl 1/10 normal o una base diluida. Todas las

(1) Nos referimos en este trabajo únicamente a la beta glicerofosfatasa que actúa en medio alcalino.

determinaciones de pH las efectuamos con el electrodo de vidrio de Mac Innes, usando el potenciómetro de Leeds and Northrop modelo 7660; como patrón de pH usamos una solución de ftalato ácido de potasio del National Bureau of Standards de Washington y con un pH de 3.974.

Los extractos enzimáticos y el sustrato de glicerofosfato fueron conservados en refrigerador eléctrico de 3 a 5 grados. Para efectuar las mediciones se esperaba que los líquidos adquiriesen la temperatura ambiente, pues nuestras pipetas de Ostwald-Folin son calibradas a 20 grados. Las reacciones de hidrólisis enzimáticas fueron efectuadas en tubos de ensayo tapados, conteniendo 10 ml. del sustrato y 0.5 ml. de la solución enzimática; luego eran mantenidos a 37 grados en baño de agua e interrumpida al cabo de una hora mediante la introducción en hielo machacado.

Para las determinaciones del fósforo usamos el método de Fiske y Subba-Row (11), empleando ligeras modificaciones que nos fueron enseñadas personalmente por el Dr. Subba-Row. Como nuestros extractos poseen un contenido sumamente bajo de proteínas, pudimos omitir generalmente la desproteínización con ácido tricloroacético.

Hemos usado la nomenclatura para unidades de fosfatasa empleada por Albers (8): Unidad de fosfatasa es la cantidad de enzima que en una hora y a la temperatura de 37 grados libera 0.1 mgr. de fósforo (2) del sustrato de beta glicerofosfato sódico y a pH de 9. La cantidad de fósforo liberado no debe ser mayor del 10 % del contenido de fósforo total de la cantidad de sustrato usado; cuando los resultados nos indicaban una hidrólisis mayor, repetíamos la determinación usando una solución más diluída de la enzima. En toda determinación efectuamos simultáneamente los controles de fosfatos inorgánicos preexistentes en el tejido, testigo de la no hidrólisis espontánea del sustrato y un testigo de la ausencia de reacción con los demás reactivos. Las determinaciones las efectuamos por duplicado y solo aceptamos los resultados cuando coincidan.

(2) Se sobrentiende que este fósforo se encuentra al estado de fosfato inorgánico, por hidrólisis del glicerofosfato sódico. En las páginas siguientes usaremos esta acepción.

Las proteínas de los extractos fueron dosadas por gravimetría, previa precipitación con acetona (mét. Bierry y Vivarros modificado por Guillaumin, Wahl y Laurencin) (15) o por precipitación con ác. tricloroacético y acetona. En los extractos diluidos, usamos el foto-nefelómetro de Leifo previamente calibrado con soluciones conocidas de proteínas renales y mediante la técnica de Looney y Walsh (12). Con los datos obtenidos por la valoración de la fosfatasa y el contenido de proteína del extracto, calculamos el contenido de unidades de fosfatasa por miligramo de proteína de la preparación purificada; en todo este trabajo adoptamos como expresión de la potencia enzimática esa relación:

$$\frac{\text{Fosfatasa}}{\text{Proteína}} \text{ que abreviaremos Unid./mgr.}$$

A) EXTRACCION DE LA ENZIMA DE LOS RIÑONES

Empleamos como material de salida, riñones congelados de cerdo provistos por el Frigorífico Swift; en la preparación N° 34 usamos órganos recogidos en el Matadero Municipal de Córdoba y provenientes de animales porcinos recientemente faenados. Los riñones —unos 5 kilos en cada preparación— eran triturados en máquina especial y sometidos a la extracción.

Como material de extracción usamos en un principio diversos solventes: soluciones acuosas de acetona al 10 %, solución de para dioxidi-etileno en diferentes proporciones, de glicerol, etc.; pero los resultados no fueron todo lo satisfactorios, que se deseaban. El empleo de una mezcla de un litro de etanol a 50 grados, 50 ml. de tolueno Merck y 50 ml. de acetato de etilo Merck (3), ya preconizada por Albers nos resultó muy conveniente por lo cual adoptamos definitivamente el método.

Los riñones triturados eran macerados durante 96 horas con

(3) En nuestros ensayos usamos tolueno, acetato de etilo y propanona de calidad comercial, previamente purificados en nuestro Laboratorio por destilación y que respondían a los ensayos de pureza de los reactivos químicos. En la preparación N° 32 empleamos productos E. Merck de Darmstádt, para dar como referencia reactivos universalmente conocidos.

un volumen de la mezcla citada igual al peso de los riñones. La extracción se efectuó a la temperatura ambiente (que osciló entre 19 y 37 grados) y con agitación ocasional. Se filtra por gasa y luego por papel mojado previamente en agua, obteniéndose un líquido perfectamente límpido y de color oro, que presenta una intensa fluorescencia verde a la luz blanca y mayor aún con la ultravioleta y que según von Euler y Adler (13) es atribuible a las flavinas del riñón. El contenido de proteínas de este extracto es bastante bajo y relativamente rico en fosfatasa.

B) PRECIPITACION DE LA FOSFATASA

La enzima se encuentra en el extracto crudo en solución muy diluída, es por lo tanto necesario precipitarla para reducirla a una solución más concentrada. Martland y Robinson (6) usaron una mezcla de etanol y éter etílico; Albers, etanol a la concentración de 65 %, obteniendo buenos resultados.

Nosotros ensayamos los precipitantes antes mencionados igualmente que el para dioxi-dietileno. Con alcohol obtuvimos los buenos resultados mencionados por Albers, pero nuestros preparados con una riqueza máxima de 194 unidades por miligramo de proteína, no representaban un gran adelanto sobre los resultados de tales autores.

Decidimos usar la acetona como agente de precipitación, empleándola en proporciones que variaron desde el 28 al 33 %. La precipitación de la enzima no es completa cuando se usan concentraciones bajas, pero no conviene aumentar la cantidad de acetona pues precipitan muchas proteínas no específicas y por lo tanto la preparación resulta con un título $\frac{\text{Fosfatasa}}{\text{Proteína}}$ muy bajo.

La mezcla de extracto crudo y acetona, perfectamente homogeneizada era dejada durante 12 horas en el refrigerador eléctrico a 3-5 grados para la sedimentación del precipitado y luego por decantación y centrifugación se recogen la proteínas precipitadas.

El residuo de proteínas era suspendido en un buffer de borato sódico (Sørensen) a pH 9 a 9.1, se centrifuga y se separa el

extracto mientras que el residuo es tratado con nueva cantidad de buffer de borato. Los líquidos obtenidos constituyen el extracto acetónico, que posee un intenso color marrón y produce una reacción de fluorescencia verde oscura.

C) PURIFICACION DE LA FOSFATASA

Nuestros extractos acetónicos poseen una potencia enzimática máxima de 202 unidades por milígramo de proteína, es decir son muy ligeramente más ricos en fosfatasa que los productos obtenidos hasta la fecha, con ellos decidimos iniciar una purificación de la enzima.

El color intenso y la fluorescencia de los extractos acetónicos nos hacían creer que eran ricos en productos extraños tales como derivados flavínicos y proteínas no enzimáticas. Era necesario encontrar un agente que eliminara tales sustancias sin perjudicar el contenido de fosfatasa.

En los ensayos preliminares estudiamos la acción del metanol que abandonamos pronto por no poder regular bien su acción. Posteriormente estudiamos la acción del para dioxo-dietileno (4) como agente de purificación de la fosfatasa habiendo observado que precipita bien la enzima sin disminuir su potencia hidrolizante. Estudiaremos en diferentes cuadros la concentración del p. dioxo-dietileno, la temperatura, el pH y el tiempo óptimos para la acción del reactivo.

Cuadro N° 1

Se estudia la acción de diferentes concentraciones de p. dioxo-dietileno sobre el extracto acetónico de la preparación N° 30, a pH y 9 y a la temperatura de 35 grados.

Ext. acetónico N° 30. Valor fosfatásico Unid. / mgr.	Acción de 1 vol. p. dioxo-dietilo durante 1 hora Unid. / mg.	1 1/2 vol. dioxana 1 hora Unid. / mgr.	2 vol. dioxana 1 hora Unid./mgr.
150	750	484	457

(4) Usamos el producto 1.4 dioxana Eastman que purificamos por destilación a 102 grados y neutralización posterior con sol. N. Na OH.

* Resulta que la concentración óptima es la de un volumen de p. dioxidietileno y un volumen del extracto acetónico. Se observa que al precipitar con 1 1/2 a 2 volúmenes de reactivo, el extracto purificado presenta una fluorescencia, lo cual no sucede cuando actúa solamente un volumen. Interpretamos este fenómeno como que el p. dioxidietileno a alta concentración precipita conjuntamente con las proteínas a los derivados flavínicos; por otra parte era dable observar la disminución de la potencia fosfatásica de las preparaciones con esos caracteres organolépticos, planteándose la cuestión de si estos productos extraños, actuaban inhibiendo la acción enzimática o si el p. dioxidietileno a altas dosis desnaturalizaba la enzima. Creemos que las dos hipótesis son exactas, pues siempre que las preparaciones poseían fluorescencia intensa, el valor enzimático era relativamente bajo. Para dilucidar la segunda hipótesis sometimos extractos purificados (sin fluorescencia), a la acción del p. dioxidietileno a concentraciones altas y observamos una disminución de la actividad fosfatásica.

Cuadro N° 2

Se estudia la temperatura óptima para la acción del p. dioxidietileno sobre el extracto acetónico de la preparación N° 29, a pH 9 y durante una hora.

Ext acetónico N° 29. Valor fosfatásico en Unid./mgr.	Acción 1 vol. dioxana duran- te 1 hora y a temp. 3° a 5°	Acción 1 vol. dioxana duran- te 1 hora y a temp 25°
202	642	300

Resulta que es necesario atemperar la acción desnaturalizante del p. dioxidietileno sobre la enzima trabajando a una temperatura baja; para ello conviene tener todo el material bien refrigerado y como desgraciadamente carecemos de comodidades para efectuar las centrifugaciones a temperatura baja, es recomendable hacer sesiones cortas de no más de 10 minutos y volver inmediatamente el extracto al refrigerador; esta acción de la tempe-

ratura baja protectora de la acción desnaturalizante del p. dioxidi-etileno la hemos observado también trabajando con otras enzimas y especialmente con la catalasa del hígado. (14) .

Cuadro N° 3

Se estudia el pH. óptimo para la acción del p. dioxidi-etileno sobre el extracto acetónico de la preparación N° 29 tratada con un volumen de reactivo a la temperatura de 3° - 5° y durante una hora.

Tratamiento a pH 9 (buffer de borato) Unid./mgr 642	Tratamiento a pH 8.5 (borato) Unid./mgr 550	Tratamiento a pH 8 (borato) Unid./mgr. 495
--	---	--

Cuadro N° 4

Se estudia el tiempo óptimo para la acción del p.dioxidi-etileno sobre el extracto acetónico de la preparación N° 30, a la temperatura de 3° - 5°, concentración de un volumen de reactivo y al pH. de 9.

Valor enzimático del extracto acetónico Unid./mgr. 150	Acción de dioxana 1/2 hora Unid./mgr. 726	Acción durante 1 hora Unid./mgr. 750	Acción durante 2 horas Unid./mgr. 635	Acción durante 3 horas Unid./mgr. 558
--	---	--	---	---

Se deduce entonces que después de la primera hora el reactivo ejerce una acción destructora sobre la potencia enzimática de la preparación. Posteriormente observamos que era más conveniente reducir aún más el tiempo de acción de la dioxana.

Conocidos los principales factores que intervienen en la acción del p. dioxidi-etileno sobre el extracto acetónico, decidimos modificar algo la técnica procurando hacer más breve el tiempo

de contacto del extracto con la dioxana. Adoptamos finalmente la siguiente técnica: El extracto acetónico disuelto en un buffer de borato a pH 9 era fuertemente refrigerado y mezclado con p. dioxi-dietileno ligeramente enfriado (para evitar la cristalización) y el todo era mantenido en el refrigerador eléctrico a temperatura 3° -5° durante 10 a 15 minutos. La proteína es precipitada en ligeros copos blancos; centrifugación en tubos refrigerados previamente en la heladera y durante 5 minutos. El líquido sobrenadante que poseía un fuerte color oscuro era desechado y el precipitado rápidamente suspendido en solución de dioxana en buffer de borato mezclados a partes iguales y previamente refrigerada. Nueva centrifugación y desecho del líquido de lavado. Es necesario desembarazar a la preparación de todo rastro de dioxana, para lo cual aconsejamos invertir el tubo de centrífuga y lavar con un chorro de agua las paredes del tubo, este detalle es de gran importancia pues la presencia de reactivo haría que se siguiera la desnaturalización sin control. El precipitado de proteína es suspendido en buffer de borato y filtrado constituyendo lo que llamamos extracto purificado.

Con el auxilio de esta técnica mejorada, hemos podido aumentar notablemente la potencia de las preparaciones Nros. 33, 34 y 35 y creemos firmemente que aún será posible mejorar los resultados adoptando en el futuro pequeños detalles para regular la acción de los reactivos precipitantes y desnaturalizantes.

D) RESULTADOS DE LAS PREPARACIONES

La mayor parte de nuestras primeras preparaciones, fueron efectuadas con criterio de investigación preliminar y hemos tenido que cambiar muchos detalles de técnica; por tal motivo desechamos para nuestros resultados tales preparaciones y solo fundamos la experiencia para este trabajo en los preparados 29, 30, 31, 32, 33, 34 y 35 de los cuales solo los Nros. 33, 34 y 35 constituyen la técnica definitiva.

Cuadro N°. 5

RESUMEN DE LAS PREPARACIONES DE FOSFATASA

Prep. N°.	Extracto crudo Unid./mgr.	Precipitado acetónico Unid./mgr.	Purificación final Unid./mgr.
29	38.6	202.4 (31.5 %)	642 (1 hora con 1 vol. dioxana)
30	38.5	150 (28 %)	726 (idem)
31	31.8	106.9 (33 %)	744 (idem)
32	27.3	92.9 (32 %)	755 (idem)
33	23	170.6 (32 %)	1161 (1 vol. dioxana durante 15' y lavado)
34	28	194 (33 %)	1458 (1 vol. dioxana durante 15' y lavado 2 veces)
35	29.5	181.6 (33 %)	1242 (1 vol. dioxana durante 10' y lavado 2 veces)

Las cifras entre paréntesis en la tercera columna indican la concentración de acetona usada para la precipitación. En la cuarta columna se indica el método usado para la purificación.

E) DISCUSION

Hemos descripto un método de purificación de la fosfatasa renal basado especialmente en la acción del p. dioxi-dietileno sobre las preparaciones de enzima. Consideramos que el reactivo tiene una doble acción: Eliminar las materias no proteicas que quizás juegen un rol inhibitor de la acción enzimática (2). Disminuir el contenido de proteínas renales pero no enzimáticas. Al hacer actuar el p. dioxi-dietileno obtenemos un residuo de proteínas desnaturalizadas, insolubles aún en los buffers de borato; suponemos que la desnaturalización recaerá tanto sobre las proteínas no específicas como sobre la enzima pero es lógico suponer que las primeras se desnaturalizan más selectivamente pues la riqueza de fosfatasa por milígramo de preparado aumenta casi al décuplo.

Es muy interesante que el p. dioxi-dietileno requiere para actuar la presencia de proteínas no específicas desnaturalizables. En nuestros primeros ensayos, cuando empleábamos el etanol al

65 % como precipitante de la fosfatasa según la técnica de Albers, observamos que el p. dioxi-dietileno precipitaba también esos extractos alcohólicos, pero sin desnaturizar aparentemente las proteínas; al disolver el precipitado en el buffer de borato observamos que la solución era muy buena, pero que el preparado poseía poca actividad fosfatásica.

A iguales conclusiones llegamos cuando un extracto purificado —que por lo tanto había sido tratado ya con p. dioxi-dietileno— volvía a ser precipitado por la misma concentración de reactivo o por una muy ligeramente mayor. En ambos casos no había nueva desnaturización de proteína, pero la potencia del preparado disminuía. Por todos estos hechos suponemos que las proteínas no específicas al desnaturizarse rápidamente protegen la fosfatasa de la acción del reactivo, cuando faltan tales proteínas la enzima es destruida.

S U M A R I O

Se describe un método de purificación de la beta glicero-fosfatasa alcalina del riñón. Se extrae de los riñones de porcino mediante una mezcla de etanol-tolueno-acetato de etilo. Se precipita con acetona y posteriormente se purifica con p. dioxi-dietileno. Los extractos obtenidos con esta técnica poseen hasta 1458 unidades de fosfatasa por cada milígramo de proteína. Constituyendo por lo tanto un producto 10 veces más purificado que los actualmente descriptos en la literatura.

Este trabajo fué presentado a la Sociedad de Biología de Córdoba en la sesión del 13 de junio de 1940.

LITERATURA CITADA

- (1) Grosser P. und Husler J. — Bioch. Zeits. B. 39 (1912) 1.
- (2) Plimmer R. H. — Bioch. Journal Vol. 7 (1913) 43.
- (3) Kay H. D. — Bioch. Journal Vol. 20 (1926) 791.
Physiol. Reviews Vol. XII (1932) 384.

- (4) **Ehrensward G.** — Hoppe Seyler's Zeits. f. Physiol. Ch. B. 217 (1933) 274.
- (5) **Erdtman.** — Hoppe Seyler's Zeits. f. Physiol. Ch. B. 172 (1927) 182 y B. 177 (1928) 211.
- (6) **Martland and Robinson.** — Bioch. Journal Vol. 23 (1929) 237.
- (7) **Lora Tamayo y Rodríguez Blanco.** — Ann. Soc. Española de Física y Química. Tomo 34 (1936) 376.
- (8) **H. und E. Albers.** — Hoppe Seyler's Zeits. f. Physiol. Ch. B. 232 (1935) 165 y 189.
H. Albers, Beyer E., Batmenkamp A. und Müller G., Berd. d. C. D. Chem. Gesellschaft. J. LXXI (1938) 1913.
- (9) **Bakwin H. and Bodansky O.** — The Jour. of Biol. Chem. Vol. 101 (1933) 641.
- (10) **Michaelis L.** — Bioch Zeits. B. 234 (1931) 139.
- (11) **Fiske C. and Subba-Row Y.** — The Journal of Biol. Chem. Vol 66 (1925) 375.
- (12) **Looney and Walsh.** — The Journal of Biol. Chem. Vol. 127 (1939) 117.
- (13) **von Euler und Adler.** — Hoppe Seyler's Zeits. f. Physiol. Ch. B. 223 (1934) 105.
- (14) **Sumner J. B. and Dounce A.** — The Journal of Biol. Chem. Vol. 121 (1937) 417.
- (15) **Guillaumin Ch. O., Wahl R. et Laurencin M. L.** — Bull. Soc. Chimie Biol. Vol. 11 (1929) 387.