

UNIVERSIDAD DE SEVILLA. FACULTAD DE MEDICINA

Cátedra de Patología Médica.
Profesor: Dr. M. Díaz-Rubio.

T.D.
5/9

I N V E S T I G A C I O N E S S O B R E F O S F A T A S A S .
T E C N I C A D E V A L O R A C I O N . E S T U D I O
D E E F E C T O R E S E N Z I M A T I C O S E N
S U E R O S N O R M A L E S Y P A T O L O G I C O S .

Memoria para aspirar al grado de Doctor en Medicina y Cirugía

por

FRANCISCO SEGOVIA GARCIA

Sevilla, Noviembre 1955.-

R. 10. 585

FACULTAD DE MEDICINA
SEVILLA



DON MANUEL DIAZ RUBIO, CATEDRATICO DE PATOLOGIA Y CLINICA MEDICA,

CERTIFICA que:

Don Francisco Segovia Garcia, Licenciado en Medicina y Cirugia,
ha realizado bajo mi direccion el trabajo experimental y clinico
de su Tesis para aspirar al grado de Doctor y que se titula:

"INVESTIGACIONES SOBRE FOSFATASAS.- TECNICA DE VALORACION.- ESTU-
DIO DE EFECTORES ENZIMATICOS EN SUEROS NORMALES Y PATOLOGICOS."

Sevilla a 5 de Noviembre de 1955

Vº Bº
El Decano

Dr. Canadell Bues

A large, stylized handwritten signature in black ink, likely belonging to Don Manuel Diaz Rubio.

P A R T E T E Ó R I C A

Consta este trabajo de varias partes íntimamente relacionadas entre sí y expuestas siguiendo un orden deductivo, que fué al mismo tiempo el orden cronológico que siguieron los hallazgos que lo jalonan. Así:

1º.- Nuestros trabajos sobre transesterificaciones (1) nos llevaron a establecer los fundamentos de una técnica original para la valoración de glicerina en presencia de sus esteres fosfóricos.

2º.- Esta técnica constituye el fundamento teórico de lo que después llegó a ser nuestra técnica para la valoración de fosfatasa.

3º.- Hubo necesidad de crear nuestra Unidad de fosfatasa, inherente a la nueva técnica.

4º.- Se establecen variantes para aplicarla a la determinación de fosfatasa alcalina y fosfatasa ácida en suero o plasma.

5º.- Se estudian los valores normales de ambas enzimas a la luz de nuestra técnica.

6º.- Dada su gran sensibilidad la convierten en técnica de elección para trabajos de investigación y por ello hemos podido acometer el estudio de los efectores enzimáticos con absoluta regularidad de resultados.

7º.- Hemos hecho una larga serie de experiencias estudiando la acción de los iones cítricos y tartáricos dentro del sistema hemático y discutidos estos resultados frente a los obtenidos por distintos autores con enzimas extraídas del tejido prostático.

8º.- Ensayamos cierto número de funciones orgánicas en su posible papel de efectores enzimáticos para establecer alguna rela-

ción entre su constitución química y las variaciones del poder catalítico de la fosfatasa ácida del suero.

9º.- Se estudia asimismo la acción competitiva de algunos efectores.

10º.- Y por último, nos enfrentamos con el problema tan debatido para otros fermentos, de si el incremento advertido en algunos procesos patológicos (por ejemplo: el cáncer de próstata) lleva consigo cambios en los caracteres fisico-químicos de la enzima.

-- -- --

Nuestros trabajos sobre transesterificaciones, nos llevaron como antes exponíamos, a la necesidad de crear una técnica donde, la valoración de la glicerina liberada en la hidrolisis de un ester glicerofosfórico, no fuera interferida por el ester no hidrolisado.

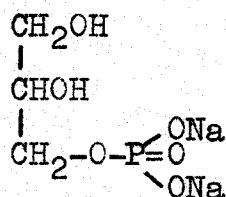
Intentamos soslayar este escollo, empleando técnicas basadas en la oxidación por permanganato potásico, dicromato potásico, periodato potásico, etc. valorando después por colorimetría o volumetría. Todas fracasaron porque siempre se afecta el ester al mismo tiempo que la glicerina. Se ensayaron también técnicas basadas en el índice de acetilo, tratando con anhídrido acético y acetato sódico, saponificando con NaOH y valorando el exceso de éste con ClH. Tampoco obtuvimos éxito.

Se intentó la extracción con eter, alcohol-eter o acetato de etilo, evaporando después y valorando el residuo por pesada. Los resultados no fueron alentadores.

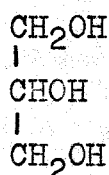
Las técnicas por oxidación afectaban a todo compuesto orgánico en forma más o menos cuantitativa. La determinación del índice de acetilo no resultó adecuada porque la esterificación afectó por igual a los oxhidrilos de la glicerina y del ester. En la ex-

tracción con disolvente seguimos la técnica de TRILLAT (2) con el resultado antes indicado.

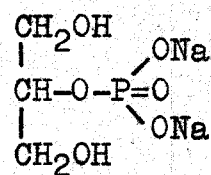
MALAPRADE (3) emplea la oxidación por el ácido periódico para la valoración de glicoles y FLEURY y PARIS (4) la extienden a funciones que tengan oxhidrilos contiguos. Así pues, concebimos la idea de aplicar este criterio a nuestro caso, dado que la glicerina tiene tres oxhidrilos contiguos y el beta-glicerofosfato no tiene ninguno.



Alfa-glicerofosfato sódico.



Glicerina.

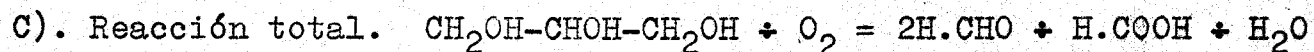
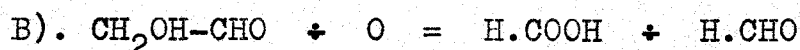
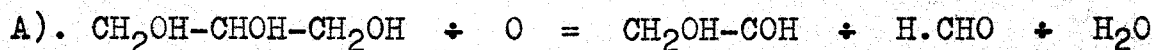


Beta-glicerofosfato sódico.

De ser cierta la teoría de MALAPRADE, el beta-glicerofosfato no debería ser oxidado por el ácido periódico, y sí, en cambio, el isomero alfa y la glicerina.

Nuestras experiencias comprobaron que las ideas de MALAPRADE son aplicables a la valoración de glicerina en presencia del beta-glicerofosfato sódico.

Probablemente la oxidación de la glicerina tendría lugar conforme a las reacciones siguientes:



Las técnicas clínicas para la valoración de la fosfatasa en suero o plasma, tienen su fundamento en la hidrólisis enzimática de algún ester fosfórico y valoración subsiguiente del resto ácido en forma de fósforo inorgánico.

Los substratos más frecuentemente empleados, son glicerofosfato sódicos, alfa o beta, siendo este último de uso más general por su mayor velocidad de hidrolisis.

En nuestros trabajos sobre cinética de la fosfatasa alcalina (5) hemos estudiado la actividad de la enzima en funciones del pH y trazado la curva correspondiente, tanto para el beta-glicerofosfato sódico, como para su isómero alfa. Resultaron para aquel valores más altos con una diferencia muy acusada en la región más alcalina de la curva donde se llega a duplicar el valor de alfa especialmente en la proximidad del óptimo de pH (9,7).

Ambas curvas se cruzan en pH = 7,5 y es aquí donde prácticamente se podría trabajar con ambos esteres indistintamente. Pero la necesidad de situarse en pH más altos para la determinación de fosfatasa alcalina, aconsejan a emplear siempre el beta-glicerofosfato sódico en lugar del alfa.

Dicho ester lo hemos obtenido por síntesis, como máxima garantía de pureza, ya que en muchos productos que se nos han servido como puros, hemos encontrado siempre pequeñas cantidades del isomero alfa.

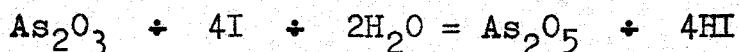
Nuestra técnica de valoración de fosfatasa se basa en estos principios y difiere fundamentalmente de las demás técnicas empleadas en que estas valoran el resto ácido producto de la hidrolisis; nosotros, en cambio, valoramos el resto alcohólico (glicerina). Esta valoración no ha sido posible hasta ahora ya que todas las técnicas conocidas para la determinación de glicerina, afectaban, como hemos visto, tanto a la glicerina como a sus esteres. Resuelto este punto mediante nuestra técnica de valoración de glicerina, quedó abierto el camino para nuestra técnica de valoración de fosfatasa.

Llevados estos estudios al medio biológico y aplicados particularmente a la valoración de glicerina en suero, encontramos un

factor de perturbación en la glucosa y los esteres de exosafosfato de la sangre, y aunque el error es pequeño y puede descartarse mediante la presencia de un testigo, hemos creído conveniente empequeñecerlo en forma relativa, aumentando considerablemente el porcentaje de la hidrólisis del ester, a cuyo efecto operamos en el pH óptimo (fosfatasa alcalin) o sea, pH = 9,7. Más como la curva de actividad en función del pH, según se desprende de nuestros estudios, tiene un ascenso y un descenso rápidos, y solo presenta una pequeña meseta en el pH óptimo, es preceptivo preparar los tampones con gran pulcritud y comprobarlos potenciométricamente. De no hacerlo así, nos exponemos a operar fuera del pH óptimo, en cuyos alrededores las variaciones más pequeñas llevan consigo una ostensible desviación de la actividad enzimática. No ocurre lo mismo en el caso de la fosfatasa ácida pues, como puede verse en la parte experimental, el pH óptimo se encuentra dentro de una amplia meseta.

Para conseguir hidrólisis considerables, hemos establecido la temperatura de 40° C y fijado en 2 horas el tiempo de hidrólisis.

Cuando la acción enzimática ha terminado, se somete el sistema a la acción del ácido periódico, y el que queda en exceso se valora por iodometria, bien empleando el hiposulfito, bien (siguiendo a FLEURY y PARIS) (4) tratando con As_2O_3 el iodo liberado y valorando el exceso de aquel con solución N/10 de I. La reacción es la siguiente:



Ventajas de nuestra técnica.

1ª.- Como no se hace la valoración sobre el resto ácido, permite

el uso de tampones de fosfatos.

2ª.- Es de gran sensibilidad como toda valoración iodométrica.

3ª.- No precisa el empleo de colorímetro o fotocolorímetro, que habitualmente se emplean en las técnicas que valoran el P inorgánico.

4ª.- Es fácil de ejecución no obstante el crecido número de soluciones empleadas.

-- -- --

El estudio de los efectores de la fosfatasa de origen prostático, data de la misma fecha en que aparecieron los primeros trabajos sobre esta enzima por KUTSCHER Y WOLBERGS (6) en 1936, precisando dichos autores a más de las propiedades químico-físicas fundamentales, la inactivación ocurrida con distintos disolventes orgánicos y por los iones de fluor.

Desde este momento empiezan las contradicciones entre los distintos investigadores. Así: KUTSCHER y WORNER (7) fijan un óptimo de acción entre pH 5,2 y 6,2 empleando como substrato beta-glicero-fosfato sódico y entre pH 4,8 y 5,4 con ester fenil-fosfórico. LUNDQUIST (8) asigna un pH = 6,0 para ambos substratos y ABUL FADL y KING (9) obtienen un óptimo entre pH 5,2 y 5,5 para ambos substratos.

Como quiera que todos estos autores trabajan con fosfatasa ácida extraída del tejido prostático y purificadas después, es lógico suponer que tales diferencias de acción son debidas a los distintos grados de pureza del material empleado y como quiera que la enzima arrastra consigo un cierto número de efectores naturales, estos naturalmente, deben sufrir importantes subtracciones, alteraciones o substituciones en el complicado proceso de la extracción

y purificación de la enzima. Sería preciso trabajar siempre con extractos de un grado de pureza definida, lo que equivale a decir con un sistema estabilizado de efectores, para poder sacar conclusiones concordantes.

Nosotros hemos preferido abordar el estudio de la fosfatasa ácida desde un ángulo más fisiológico que físico-químico y nos abstenemos de hacer extractos enzimáticos. Nosotros la consideramos dentro del medio hemático, su medio dispersante natural. Allí vamos a estudiarla asistida de sus efectores naturales, aquellos que cuantitativa y cualitativamente darán a la enzima sus características de acción, tal y como van a manifestarse en el medio fisiológico. Es cierto que la mayor parte de los efectores nos son desconocidos, pero no lo es menos que nuestras investigaciones responderán a un criterio más real que si procediéramos a la extracción y purificación de la enzima ya que estas manipulaciones nos restarían la presencia de iones cuyo papel es todavía desconocido.

Un ejemplo de esto que acabamos de decir lo encontramos en nuestras propias investigaciones sobre la catepsina del jugo gástrico (10) cuyos caracteres cinéticos difieren grandemente de los que caracterizan a la catepsina de los órganos y tan grande es la diferencia que creemos justificado el llamarla con Merten, segunda proteasa gástrica en lugar de catepsina.

Otro problema que nos hemos planteado es el de las fosfatasas de enfermos en que patológicamente la tienen incrementada, especialmente en los casos de cancer prostático cuyo incremento es muy significativo. ¿Se trata de un fermento de características cinéticas distintas o solamente de un incremento de la fosfatasa normal? El estudio de los efectores nos proyecta gran luz ya que el efector constituye el más expresivo exponente de la especifi-

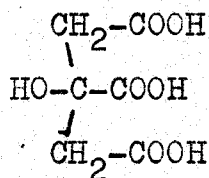
cidad. A este respecto también es necesario estudiar la enzima dentro de su medio dispersante natural.

LUNDQUITS (8) señala en 1947 la acción activadora del ion cítrico sobre los extractos purificados de fosfatasa de próstata, pero únicamente cuando emplea substrato de beta-glicerofosfato sódico; en cambio no encuentra acción alguna sobre la hidrólisis enzimática del ester fenil-fosfórico.

BAMANN y SALZER (11) COURTOIS (12) BACCARI (13) y BELFANTI (14) confirmaron sucesivamente este hallazgo.

ABUL FADL y KING (15) descubren recientemente el poder inhibidor del L-tratato.

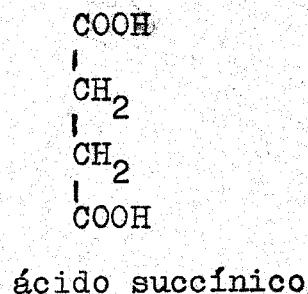
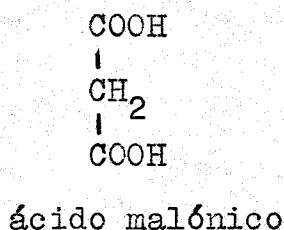
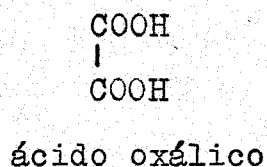
Al tratar de estudiar en detalle el poder activador del ácido cítrico tenemos que considerar el papel que puedan desempeñar el grupo oxhidrilo y los tres grupos carboxilos contenidos en su molécula.



ácido cítrico

Para mejor ordenar el estudio de estas funciones químicas en su posible papel de efectores enzimáticos, tenemos que investigar por separado la influencia de cada una de aquellas en moléculas más simples.

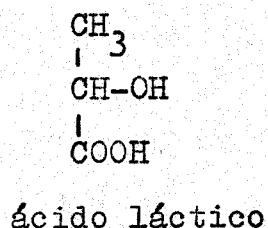
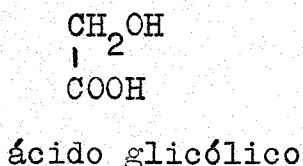
En la serie homóloga de los ácidos bibásicos saturados, hemos ensayado los ácidos oxálicos, malónico y succínico, de dos, tres y cuatro átomos de carbono respectivamente. (Exp. 10, 11 y 12).



Sólo el ácido oxálico se mostró activo ante la enzima con un efecto de inactivación. Los restantes fueron totalmente inactivos.

No encontramos una explicación clara al comportamiento del primer ácido de esta serie homóloga, pero dejamos sentado las diferencias de orden físico y químico que tiene el ácido oxálico respecto a los demás. Con ser todos, ácidos más fuertes que los monobásicos por el hecho de poseer dos grupos carboxílicos, el oxálico lo es en mucho mayor grado debido a la proximidad de ambos grupos. Así; la constante de disociación del ácido oxálico es $K = 7 \times 10^{-2}$, la del ácido malónico es $K = 1,6 \times 10^{-3}$, y la del ácido succínico es $K = 6 \times 10^{-5}$.

Estudiamos a continuación la serie homóloga de los oxiácidos y consideremos en primer lugar aquellos cuyo oxhidrilo va unido al carbono alfa. Son, los ácidos glicólico y alfa-oxi-propiónico (láctico). (Exp. 13 y 14).



Los dos ácidos se mostraron francos activadores de la fosfatasa ácida, siendo en todos la concentración óptima del efector

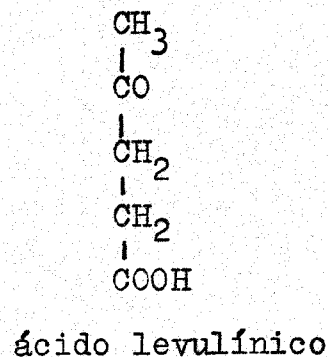
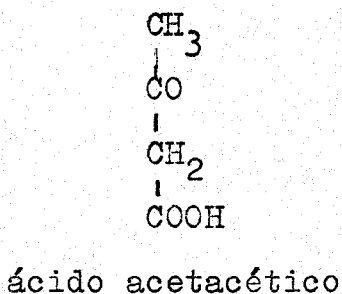
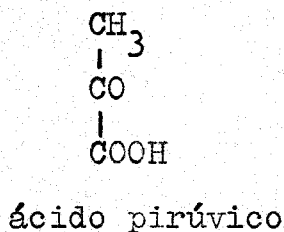
M/10. Esta influencia es más marcada en el ácido láctico.

Hemos montado una experiencia complementaria con ácido beta-xoi-butífico, o sea, oxiácido cuyo oxhidrilo va en el carbono beta, mostrando una completa inactividad sobre la enzima. (Exp. 15).

El ácido málico fué ensayado por su condición de ácido bi-básico. Tiene un oxhidrilo en posición alfa y su acción es por consiguiente francamente activadora (Exp. 20). La prueba se hizo simultáneamente con ácido D-málico y ácido racémico, mostrando éste un poder activante inferior. Esta experiencia confirma el efecto del oxhidrilo en posición alfa en una cadena alifática dicarboxilica.

Por tanto podemos concluir que la presencia del segundo grupo carboxílico no ha interferido la acción activadora del oxhidrilo.

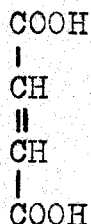
La influencia del grupo cetónico de los ceto-ácidos fué probada en las experiencias 16, 17 y 18, con tres ácidos cuyo grupo cetónico está respectivamente en las posiciones alfa, beta y gamma, o sean, los ácidos pirúvico, acetacético y levulínico.



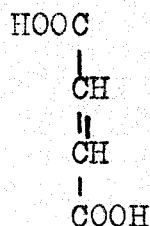
De ellos, sólo resultó activo el ácido pirúvico que tiene el grupo cetónico en posición alfa. El óptimo de concentración resultó M/100 lo mismo que los oxiácidos.

Podemos por tanto dejar firmemente sentado que los grupos oxhidrilo y cetónico de los ácidos monobásicos y bibásicos cuando están en posición alfa, se comportan como activadores de la fosfatasa ácida.

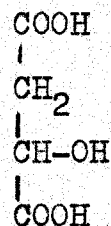
Hemos querido comparar también el comportamiento de los ácidos bibásicos no saturados como los ácidos maleico y fumárico.



ácido maleico



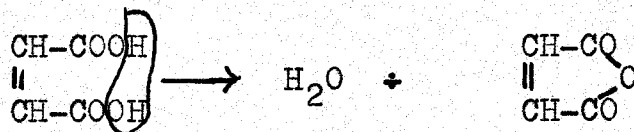
ácido fumárico



ácido málico

Son los ácidos maleico y fumárico un notable caso de isomería cis-trans correspondiendo la posición cis al ácido maleico y la posición trans al ácido fumárico. En la experiencia 18^a hemos comprobado que el ácido fumárico es inactivo, en cambio el ácido maleico se muestra como débil inactivador.

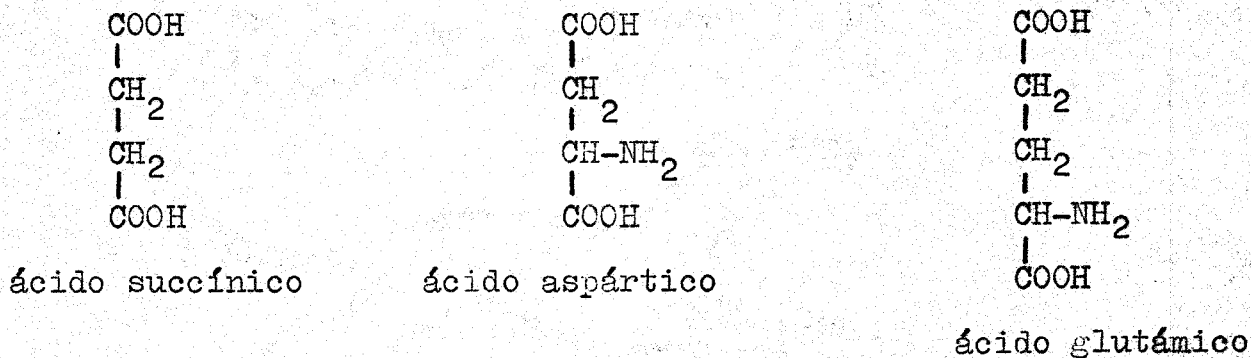
La especial configuración de estos ácidos nos invita a algunas consideraciones respecto al mecanismo químico de esta inactivación. En primer lugar, el ácido maleico es muy soluble en el agua mientras que el fumárico lo hace difícilmente. Por otra parte la constitución especial de la cadena carbonada debida al doble enlace, le da una rigidez tal que impide la libre rotación característica de las cadenas alifáticas saturadas; esto hace que los dos grupos carboxilos del ácido fumárico, nunca puedan llegar a ponerse en contacto mutuamente. En cambio, esto si es posible en el ácido maleico, que no necesita la rotación del eje molecular para poner en contacto los dos grupos carboxilos y determinar la formación del anhídrido correspondiente por deshidratación.



Pensamos, que esta diferente configuración molecular pueda estar vinculada a la acción inactivante del ácido maleico.

Estudiemos ahora la influencia del grupo $-\text{NH}_2$ de los aminoácidos en la actividad de la fosfatasa. A tal efecto, hemos probado la acción del ácido aspártico comparada con la del ácido succínico del cual puede considerarse derivado por sustitución de un H por el grupo $-\text{NH}_2$.

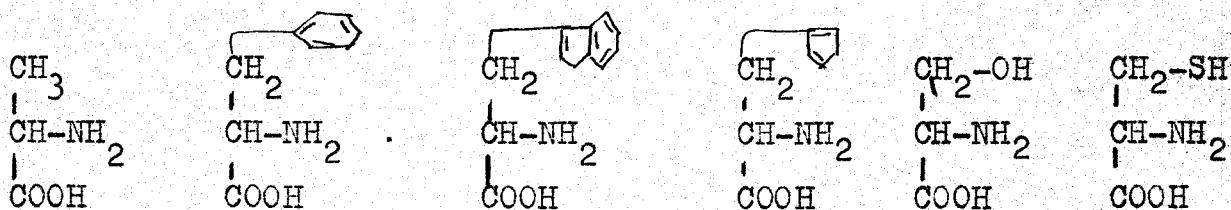
Que el ácido succínico es inactivo nos lo demuestra la experiencia 12^a y como complemento de ella hemos dispuesto la experiencia 22^a en la que confrontamos dicha acción frente a la de los ácidos mono-amino-dicarboxílicos aspártico y glutámico.



Se comprueba un ligero pero evidente poder inactivador motivado por la presencia del grupo amino en la molécula del ácido bibásico, siendo más acentuado en las concentraciones M/10 y M/100.

La presencia de grupos de sustitución fué estudiada en una interesante experiencia en la que, después de demostrar el poder inactivante de los alfa-aminoácidos, se compara con el de los ácidos resultantes de la sustitución de un H del carbono beta por distintos grupos.

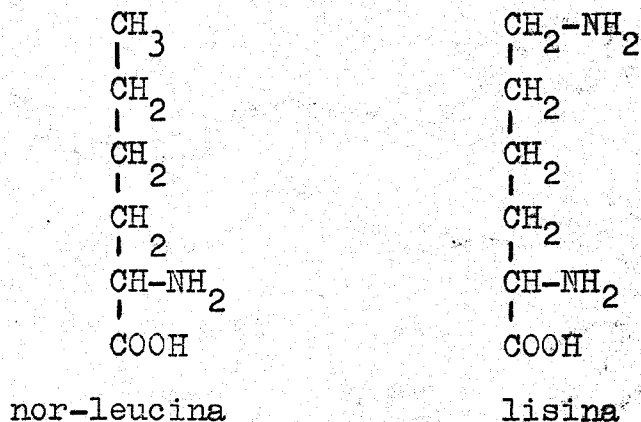
Así pues, se ensayaron los siguientes alfa-aminoácidos:



alanina. fenil-alanina. triptófano. histidina. serina. cisteina

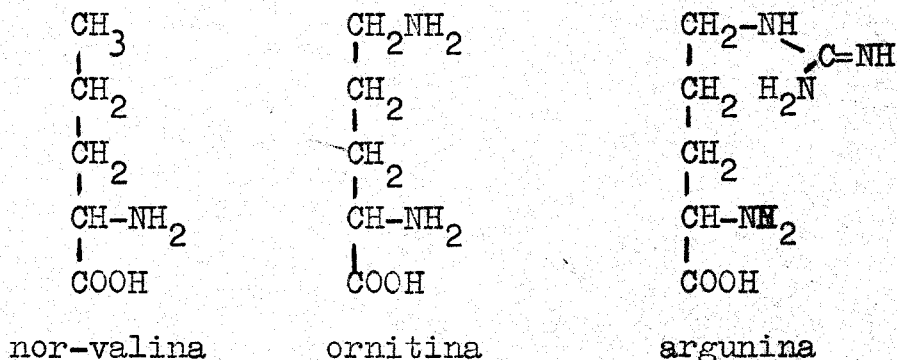
La alanina resultó ser inactivante aunque en menor grado que el ácido aspártico y el ácido glutámico, (Exp. 22) lo que parece indicar que la presencia de dos grupos carboxilos incrementan el efecto inactivador del grupo amino. La entrada en el carbono beta de la alanina, de un grupo fenilo (fenil-alanina), de un grupo indol (triptofano), de un grupo imidazol (histidina) o de un oxhidrilo (serina), no modifican el poder inactivador del grupo amino, obteniéndose los mismos porcentajes de ester hidrolizado que en la alanina. Sin embargo, la entrada del grupo sulfhidrilo para formar la molécula de cisteina produce un efecto activador después de haber anulado el poder inactivante del grupo amino.

Estando como parece, vinculada la inactivación de los aminoácidos en el grupo amino, era lógico estudiar si tal poder se incrementa al aumentar la basicidad de su molécula y a tal efecto hemos probado comparativamente a uellos aminoácidos que sólo se diferencian en el número de grupos amino. En su virtud, hemos comprobado la acción de dos ácidos, uno monoamino-monocarboxílico y otro, diamino-monocarboxílico. Concretamente la nor-leucina y la lisina. (Exp. 24).



El tanto por ciento de inactivación en el caso de la norleucina a concentración M/10, fué de 22 y el de la lisina a igual molaridad fué de 36; o sea, una actividad casi duplicada.

Para la mejor prueba que hemos realizado a este respecto (Exp. 25) fué la comparación de tres aminoácidos de basicidad diferente, derivados todos del ácido valerianico, 1º nor-valina (monoamino-monocarboxílico), 2º ornitina (diamino-monocarboxílico) y 3º arginina (amino-guanidín-monocarboxílico).

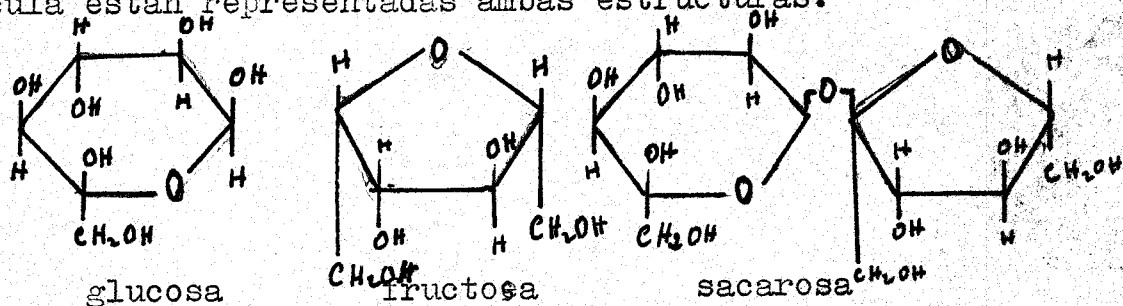


La inactivación de la nor-valina fué del 14%, la de la ornitina del 30%, y la de la arginina de 39.

Se comprueba que el aumento de basicidad de un aminoácido incrementa su poder inactivador sobre la fosfatasa ácida.

Quisimos investigar la posible acción de los oxhidrilos

contiguos y elegimos dos azúcares de constitución distinta: la glucosa (constitución de piranosa) y la fructosa (constitución de furanosa). Además, ensayamos la acción de la sacarosa en cuya molécula están representadas ambas estructuras.

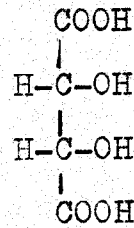
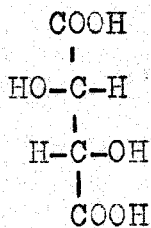
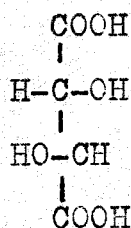


Los ensayos no mostraron acción alguna sobre la hidrólisis enzimática.

-.- -.- -.-

Dedicamos lugar aparte para considerar independientemente, la acción que ejercen los ácidos tartáricos en sus distintas formas estereoisómeras. Los trabajos sobre este efector arrancan de 1949 en que ABUL FADL y KING (16) descubrieron su acción trabajando sobre extractos de prostata. Nosotros hemos seguido estos trabajos empleando la fosfatasa ácida del suero y en condiciones experimentales muy distintas.

Las fórmulas de dichos ácidos son:



ácido L-tartárico. ácido D-tartárico ácido meso-tartárico

Señalemos en primer lugar el hecho de haber en los tres casos dos óxhidrilos contiguos al respectivo grupo carboxílico que

debían haber producido un efecto activador según lo que hemos observado en los oxiácidos bibásicos. Pero el isomero L resultó ser un poderoso inhibidor de la enzima. Los mismos autores (17) han comprobado esta acción en los autolisados diluidos de prostata y en la fosfatasa ácida de los glóbulos rojos, señalando como hecho singular el ser una inhibición reversible, retirando el efector mediante la dialisis.

ANAGNOSTOPOULOS (18) trabajando con extractos prostáticos, señala que ha conseguido inhibiciones a diluciones de 1×10^{-4} y que es total para diluciones de 1×10^{-2} . M. ABUL FALD y KING (19) trabajan con productos más purificados y llegan a conclusiones análogas. Nosotros actuando sobre fosfatasa sérica, llegamos a conclusiones parecidas respecto a las concentraciones pero nunca hemos llegado a la inactivación total. Aquellos autores han comprobado el hecho de capital importancia de que el L-tartrato es inactivo ante las preparaciones de fosfatasa de origen vegetal.

La acción inactivante del tartrato está vinculada solamente en la configuración estereoquímica del isómero L. En cambio el isomero D, manifiesta una activación marcada como corresponde a la presencia de los grupos -OH. El ácido meso-tartárico conserva una pequeña acción inactivante como es lógico, ya que estando representadas en su molécula las dos configuraciones L y D, la preponderancia del efecto de aquel isomero era fácil de presumir.

Nosotros no hemos ensayado el efecto de bloqueo de los grupos carboxílicos, pero ANAGNOSTOPULUS (20) ha empleado el L-tartrato de etilo sobre preparaciones de fosfatasa prostática y comprueba que hay una disminución del efecto inhibidor; lo mismo ocurre con el ácido L-tartranílico. Esto parece revelar que no lo influye la configuración óptica sino también la presencia de

los grupos carboxílicos libres. Si se bloquea un grupo alcohólico juntamente con uno carboxílico (caso del emético de anti-monio) el efecto es sensiblemente el mismo.

Resulta muy difícil explicar la enérgica inactivación provocada por el L-tartrato y más aun si tratamos de relacionar esta acción con la que producen los alfa-oxiacidos y los alfa-aminoacidos ya que había lugar a pensar así, dada la vecindad de estas estructuras químicas. Sólo podemos hoy destacar la extraordinaria especificidad de este inhibidor que no admite en su molécula ni sustituyente alguno, ni la más simple variación isomérica.

Si bien no podemos, a la vista de estos hechos, emitir ninguna hipótesis sobre la naturaleza del agrupamiento sobre el cual se fija el L-tartrato, si, en cambio, cabe considerar la posibilidad de una disposición espacial definida de agrupamientos activos en la superficie de la enzima.

- - - - -

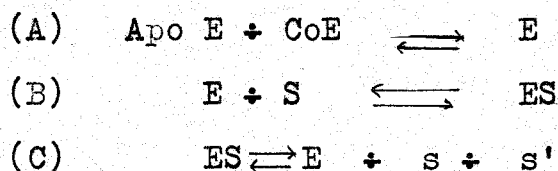
DISCUSION

El punto central del estudio de los efectores de la fosfatasa ácida radica en la acción del citrato y para la mejor comprensión de su comportamiento hemos considerado la acción de sus funciones químicas, en ácidos alcoholes, aminoacidos, etc. La acción de los ácidos cetónicos es fácil de interpretar considerando que su papel de activadores lo deben a la forma enólica en que indudablemente actúan. El efecto inhibidor de la entrada del grupo amino en la molécula de un ácido también se explica con facilidad como acción similar a la de las aminas.

A presencia de un efector como el citrato que aumenta la

afinidad de la enzima por el substrato tenemos que preguntarnos: ¿se trata de un activador o de un anti-inhibidor?

Desde un punto de vista general podemos considerar a la catalisis enzimática, ligada a una sucesión de tres equilibrios:



El primero (Apoenzima + Coenzima Holoenzima) rige la concentración de la enzima. El segundo (Enzima + Substrato Enzima-Substrato), rige la combinación enzima-substrato. Y el tercero, la descomposición del substrato en moléculas más simples s y s'.

Consideramos ante todo, que el citrato es un componente normal del tejido prostático encontrándose en los autolisados diluidos en proporciones del orden de 0,0009 M. Por otra parte los autolisados brutos son menos sensibles a la acción del citrato que los purificados, lo cual se explica por la presencia en los primeros de mínimas cantidades de dicho ion que se pierden en las operaciones de purificación.

También los citratos son abundantes en el espermatozoide, propiedad que relacionada con el amplio margen de pH en que la fosfatasa ácida se muestra activa, nos explica porque se adapta perfectamente a las variaciones de pH en el medio vaginal.

La experiencia de AGNANOSTOPOULOS (18) sobre dialisis, nos enseña que las preparaciones de la enzima tratadas con soluciones concentradas de citrato y dialisadas contra agua bidestilada, no pierden totalmente su contenido de efector aunque la reacción analítica del mismo fuese negativa en las aguas de diálisis

dos días antes. Esto indica que la enzima tiene cierta afinidad para el ion cítrico el cual queda unido de alguna forma a la superficie de la enzima, bien directamente bien por medio de algún intermediario probablemente metálico.

Parece lógico que el papel preponderante que el ácido cítrico tiene como efector ante los demás ácidos orgánicos, depende de contener tres grupos carboxílicos, pero no toda su acción puede atribuirse a esta constitución, porque el ester dimetilico del ácido cítrico (bloqueo de dos grupos carboxílicos) se muestra igualmente activo con un solo grupo carboxílico libre.

Las preparaciones de fosfatasa ácida, conservadas largo tiempo a 0° pierden parte de su poder hidrolítico (18); sin embargo la actividad del citrato frente a estas preparaciones conservadas, es muy superior a la que tiene sobre preparaciones recientes. Esto inclina a pensar en la relación que pueda existir entre efecto activador y posibilidad de cambios estructurales en la molécula proteica que sirve de soporte a la enzima, o a que haya liberado de la enzima conservada, algún inhibidor desconocido que reaccionaría más fácilmente con el citrato. Esta última suposición asignaría al efector un papel de anti-inhibidor.

Los activadores enzimáticos desplazan hacia la derecha alguno de los tres equilibrios químicos antes citados. Los activadores de las hidrolasas suelen actuar sobre el tercero (C) por inhibición de la síntesis, o sea de la reacción inversa. En cambio creemos posible que su acción la ejerza sobre el equilibrio (B) y concretamente sobre la enzima de la que retiraría con formación de complejos, elementos metálicos que actuarían como inactivadores naturales.

A este respecto recordemos las investigaciones de ANAGNOS-

TOPOULOS (20), quien encuentra en las cenizas de autolisados de fosfatasa ácida altamente purificados, cantidades ponderables de los iones metálicos siguientes: Ca, Mg y Fe.

La acción activadora del ácido cítrico podemos concebirla, suponiendo que en la superficie de la enzima tiene lugar la formación de un complejo con inactivadores metálicos naturales, permitiendo una mejor combinación enzima-substrato y desplazando a la derecha el equilibrio químico (B).

Según este nuestro modo de ver, el ácido cítrico no sería un activador sino un anti-inhibidor.

Si consideramos la acción competitiva del citrato respecto al fluoruro, nos puede llevar a una conclusión análoga.

En efecto; la acción competitiva del citrato es evidente después de nuestras experiencias, pero señalemos el hecho de que sólo una alta concentración de citrato puede determinarla. Por otra parte hay que pensar que esta propiedad esté vinculada en los tres grupos carboxílicos ya que la mayoría de los autores niegan este poder a los efectores monocarboxílicos o lo tienen en pequeño grado.

Nosotros consideramos como posible hipótesis que nos explique esta acción de competencia, que el fluoruro se combine con un inhibidor existente en el medio, formando un complejo mucho más activo que el ion fluor solo. Cuando tratamos con citrato el sistema enzimático, estos iones cítricos se combinan con el inhibidor, y eliminándolo del medio, reduciría la acción del fluor a su verdadero valor.

La combinación en presencia del ácido cítrico sería:

Enzima + fluoruro

y en ausencia de él:

Enzima + (inhibidor + fluoruro)

Como prueba de esta hipótesis, alegamos el hecho comprobado por nosotros en nuestras experiencias, de que sólo se verifica esta competencia en presencia de grandes concentraciones de citrato. El inhibidor desconocido, tendría más afinidad por el fluoruro que por el citrato.

La combinación fluoruro-inhibidor, interferiría la aproximación enzima-substrato.

Lo que más verosimilitud da a nuestra hipótesis, es el hecho de explicar no sólo el efecto anti-inhibidor del citrato, sino la acción competitiva de este último sobre el fluoruro.

- = - = - = -

P A R T E E X P E R I M E N T A L

T E C N I C A D E V A L O R A C I O N D E F O S F A T A S A S



1º.- Síntesis del beta-glicerofosfato sódico.

Empleamos la siguiente técnica:

En un matraz de medio litro se calienta en un baño de aceite a 175-180º y a presión reducida 120 g. de $\text{PO}_4\text{H}_2\text{Na}$ y 184 g. de glicerina. Al cabo de tres horas, la esterificación es completa. Se enfría a 70-80º y se disuelve en 300 cc de agua a igual temperatura. Se añade ahora lentamente 50 cc de lejía de sosa al 40 % y se concentra. Con ello pasa el glicerofosfato formado a monoglicerofosfato disódico. La solución cebada con cristales de glicerofosfato comercial, separa producto cristalino y de los líquidos madre, conteniendo glicerina, concentrados hasta la evaporación del agua, se precipita glicerofosfato no cristalino, tratando con un volumen igual de alcohol. Se lava con alcohol. Se disuelve en agua. Por evaporación se separa glicerofosfato alcalino. Rendimiento 45 gramos.

2º.- Precauciones que deben tomarse en la ejecución de la técnica.

- a).- Comprobar el pH del tampon y rectificarlo si es preciso.
- b).- Cerciorarse de que el glicerofosfato empleado no contiene trazas del isomero alfa. Para ello úsese la técnica indicada ya que da igual reacción que la glicerina.
- c).- Usar soluciones recientes de beta-glicerofosfato para eliminar la posibilidad de una hidrólisis espontánea.
- d).- Usar dos testigos, uno de suero y otro de glicerofosfato.
- e).- Cerciorarse de que no hay hiperglicemia.
- f).- Trabajar siempre con suero. Si se emplea plasma, no usar como anticoagulante el oxalato porque interfiere la determinación.

3º.- Técnica.

Reactivos empleados:

- a).- Solución M/10 de beta-glicerofosfato sódico. Disolver 30,6 gramos de la sal ($5\text{H}_2\text{O}$) a un litro de agua en un matraz aforado.
- b).- Solución M/20 de periodato trisódico. ($\text{IO}_6\text{Na}_3\text{H}_2$). Disolver 2,94 gramos de la sal en 30 cc de ácido sulfúrico y completar hasta 200 cc de agua en un matraz aforado. Si se usa el periodato potásico disolver 3,04 gramos.

- c.- Solución N/10 de As₂O₃ bicarbonatada. A 4,984 g. de As₂O₃ se añade para disolver 50 cc de Sol. 2N de HaOH. Agregar una gota de fenoltaleina y después ácido sulfúrico al 20% hasta decolorar. Se añade después una solución de 20 g. de bicarbonato sódico en 500 cc de agua. Filtrar. Completar hasta 1.000 cc.
- d).- Solución N/10 de iodo.
- e).- Solución N de SO₄H₂.
- f).- Solución N de NaOH.
- g).- Solución de IK al 20%.
- h).- Solución de almidón.

Tampones:

Para fosfatasa alcalina.

- a).- Solución de glicocola (N/10 + N/10 de ClNa) 7,505 g. de glicocola pura y 5,85 g. de ClNa. Diluir a un litro.
- b).- Solución de NaOH N/10.

Para 10 cc de tampon, mezclar 7 cc de la solución primera y 3 cc de la segunda.

Para fosfatasa ácida.

Tampón de ácido acético-acetato sódico y ajustar al pH deseado.

Descripción del método:

Se disponen tres matraces de Erlenmeyer de 50 cc de la forma siguiente

<u>Matraz A</u>	<u>Matraz B</u>	<u>Matraz C</u>
10 cc de Sol.M/10 de beta-glicerofosfato sódico.	10 cc de Sol.M/10 de beta-glicerofosfato sódico.	10 cc de agua
10 cc de tampon (pH 9,0 o 5,0).	10 cc de tampon.	10 cc de tampon.
1 cc de suero.	1 cc de agua.	1 cc de suero

Se colocan los tres matraces en un baño de agua a 40°.

Al cabo de dos horas, se saca y se enfría al chorro.

Se añade a cada matraz 10 cc de la solución de periodato y 2 cc de la solución N de SO₄H₂; agitar suavemente.

Dejar pasar 10 minutos a la temperatura de 20 grados aproximadamente.

Añadir a cada matraz 1,5 cc de solución N de NaOH.

Verter cuantitativamente y agitando el contenido de los tres matraces en otros tres de la composición siguiente: 15 cc de solución N/10 de As₂O₃ bicarbonatada y 1 cc de solución al 20% de

IK.

Se esperan 10 minutos, al cabo de los cuales la reacción está terminada.

Se valora el As_2O_3 en exceso con solución N/10 de iodo, usando como indicador el almidón.

Supongamos que el matraz A consume n cc de esta solución; el matraz B, n' cc y el matraz C, n'' . Tendremos que

$$N = n - n' - n''$$

donde N sería el número de cc de solución N/10 de iodo correspondiente a la glicerina presente.

Un cc de solución N/10 de I = 1 cc de solución M/20 de ácido periodico = 1 cc de solución M/10 de glicerina = 0,0046 gramos de glicerina.

4ª.- Cálculo del error.

Hemos ensayado distintas concentraciones de glicerina buscando la concentración óptima. Los resultados fueron los siguientes:

	<u>Cantidad de glicerina en 10 cc</u>	<u>Cantidad encontrada en la valoración.</u>	<u>Error</u>
Experiencia 1ª	0,0514	0,0422	- 17 %
Experiencia 2ª	0,0359	0,0330	- 8 %
Experiencia 3ª	0,0339	0,0335	- 1 %
Experiencia 4ª	0,0334	0,0331	+ 1 %
Experiencia 5ª	0,0308	0,0352	+ 8 %
Experiencia 6ª	0,0257	0,0335	+ 30 %

Las concentraciones de glicerina de las experiencias 3ª y 4ª resultaron óptimas, o sea, aproximadamente M/30.

Estas mismas experiencias las hemos realizado con soluciones alcohólicas encontrando análogo resultado respecto a las concentraciones óptimas.

Preparamos soluciones de glicerina de concentraciones próximas a las obtenidas como óptimas, juntamente con otras a las que se adicionaban soluciones de beta-glicerofosfato sódico a distintas concentraciones, de forma que en ambas series, las concentraciones de glicerina fueron las mismas. Los resultados de estas valoraciones fueron los siguientes:

<u>Glicerina en la solución pura.</u>	<u>Glicerina en la solución con beta-glicerofosfato sódico.</u>	<u>Concentración de beta-glicerofosfato sódico.</u>
0,0445	0,0444	M/20
0,0445	0,0448	M/40

Conclusión:

La valoración de glicerina por la acción del ácido periódico, es correcta en presencia del beta-glicerofosfato sódico, que no se afecta por este reactivo.

5º.- Unidad de fosfatasa.

No existiendo ninguna unidad internacional de esta enzima, es forzoso definirla en función de la técnica empleada. Así pues, nuestra Unidad la definimos como la cantidad de fosfatasa que libera 0,0046 gramos de glicerina de un substrato de beta-glicerofosfato sódico en las condiciones de la experiencia.

- = - = - = -

VALORES NORMALES DE FOSFATASA ALCALINA OBTENIDOS CON NUESTRA
TECNICA Y EXPRESADOS EN NUESTRA UNIDAD

VARONES

<u>Caso</u>	<u>Edad</u>	<u>Unidades</u>	<u>Media</u>
1º	20 años	5,1	
2º	22 "	5,8	
3º	19 "	5,0	
4º	25 "	5,9	
5º	22 "	5,7	
6º	28 "	5,1	5,6
7º	26 "	5,9	
8º	24 "	6,0	
9º	22 "	6,1	
10º	21 "	5,8	

HEMBRAS

<u>Caso</u>	<u>Edad</u>	<u>Unidades</u>	<u>Media</u>
1º	22 años	5,9	
2º	19 "	6,1	
3º	22 "	6,7	
4º	18 "	5,8	
5º	25 "	6,0	6,1
6º	22 "	5,9	
7º	21 "	6,3	
8º	25 "	6,5	
9º	23 "	6,0	
10º	21 "	5,8	

VALORES EN PERIODO MENSTRUAL

<u>Caso</u>	<u>Edad</u>	<u>Unidades</u>	<u>Media</u>
1º	28 años	6,2	
2º	30 "	6,5	
3º	26 "	5,8	6,0
4º	24 "	5,4	
5º	29 "	6,1	

VALORES EN EMBARAZO Y LACTANCIA

<u>Caso</u>	<u>Edad</u>	<u>Mes de embarazo</u>	<u>Unidades</u>	
1º	30	3	6,0	
		4	6,0	
		5	6,1	
		6	6,7	
		7	7,2	
		8	7,2	
		9	7,5	
		<u>Mes de lactancia</u>		
			1	6,5
			2	7,0
			3	7,5
		<u>Mes de embarazo</u>		
		2º	32	3
4	6,1			
5	6,1			
6	7,0			
7	7,4			
8	7,5			
9	7,8			
<u>Mes de lactancia</u>				
	1			6,0
	2			6,2
	3			6,4
	4			6,4
<u>Mes de embarazo</u>				
3º	29	4	6,1	
		5	6,2	
		6	6,7	
		7	7,1	
		8	7,7	
		9	7,9	
		<u>Mes de lactancia</u>		
			1	7,0
			2	7,4
			3	7,4
			4	7,8
			5	7,8
			6	7,8
<u>Termina lactancia</u>				
	1	7,8		
	2	6,6		
	3	6,0		
	4	6,0		
	5	6,2		

<u>Caso</u>	<u>Edad</u>	<u>Mes de embarazo</u>	<u>Unidades</u>	
4º	37	7	7,0	
		8	7,6	
		9	7,9	
		<u>Post partum sin lactancia</u>		
		1	6,9	
		2	6,2	
		3	6,4	
		4	6,2	
		5	6,3	
		6	6,0	
		7	6,2	

Mes de lactancia

5º	35	1	6,5	
		2	6,8	
		3	7,1	
		4	7,5	
		5	7,7	
		6	7,7	
		7	7,8	
		8	7,7	
		<u>Termina lactancia</u>		
		1	7,0	
		2	6,8	
		3	6,6	
		4	6,7	
		5	6,6	

VALORES EN NIÑOS

<u>Edad</u>	<u>Unidades</u>	<u>Media</u>
1 mes	8,5	8,1
" "	7,8	
" "	7,9	
" "	8,5	
2 meses	8,9	8,1
" "	7,8	
" "	7,1	
" "	8,9	
" "	8,1	
3 meses	8,7	8,0
" "	8,0	
" "	7,8	
" "	7,5	
4 meses	7,6	8,1
" "	7,8	
" "	7,9	
" "	8,6	

<u>Edad</u>	<u>Unidades</u>	<u>Media</u>
5 meses	8,9	
" "	8,0	8,0
" "	7,6	
" "	7,5	
6 meses	8,0	
" "	8,1	8,0
" "	8,0	
" "	8,0	
7 meses	8,1	
" "	8,0	8,0
" "	7,9	
8 meses	8,0	
" "	8,0	8,0
" "	8,1	
" "	7,9	
9 meses	8,7	
" "	8,2	
" "	7,9	8,0
" "	7,9	
" "	7,5	
" "	7,9	
10 meses	8,4	
" "	7,5	8,0
" "	8,1	
11 meses	8,0	
" "	8,0	8,0
1 año	8,0	
" "	8,2	8,0
" "	7,8	
2 años	7,8	
" "	7,9	8,0
" "	8,5	
3 años	7,8	
" "	8,2	7,9
" "	7,9	
4 años	8,1	
" "	8,0	7,9
" "	7,7	
5 años	7,6	
" "	8,0	7,8

<u>Edad</u>	<u>Unidades</u>	<u>Media</u>
6 años	7,5	7,8
" "	8,5	
" "	7,4	
7 años	7,8	7,8
" "	7,6	
" "	8,0	
8 años	8,0	7,6
" "	7,2	
" "	7,8	
9 años	7,2	7,4
" "	7,2	
" "	7,8	
10 años	7,0	7,1
" "	7,0	
" "	7,4	
11 años	6,9	6,9
" "	6,8	
" "	7,1	
12 años	6,7	6,6
" "	6,8	
" "	6,5	
13 años	6,1	6,3
" "	6,8	
" "	6,0	
14 años	6,0	6,1
" "	6,2	
" "	6,1	

Conclusiones:

- 1ª.- Los valores normales en adultos fluctúan entre 5 y 7 Unidades. Valor medio en varones, 5,6 Unidades. Valor medio en hembras, 6,1 Unidades.
- 2ª.- Los valores en niños fluctúan entre 8,1 y 6,1 Unidades.
- 3ª.- No hay incremento de fosfatasa alcalina durante el menstruo.
- 4ª.- El incremento que se advierte durante el embarazo desaparece al ocurrir el parto.
- 5ª.- El incremento durante la lactancia cesa al terminar ésta.

VALORES NORMALES DE FOSFATASA ACIDA OBTENIDOS CON NUESTRA TECNICA Y EXPRESADOS EN NUESTRA UNIDAD

<u>Edad</u>	<u>Unidades</u>	<u>Media</u>
1 mes	1,2	1,2
2 meses	1,3	
" "	1,2	1,2
3 meses	1,2	
" "	1,3	1,2
" "	1,2	
4 meses	1,2	1,2
5 meses	1,3	
" "	1,4	
" "	1,5	1,4
" "	1,5	
6 meses	1,3	
" "	1,5	1,5
" "	1,7	
7 meses	1,3	
" "	1,7	
" "	1,2	1,5
" "	1,8	
8 meses	1,7	
" "	1,6	1,6
" "	1,6	
9 meses	1,6	
" "	1,6	1,6
" "	1,6	
10 meses	1,6	1,6
11 meses	1,5	
" "	1,6	1,6
" "	1,6	
1 año	1,7	
" "	1,6	
" "	1,7	1,6
" "	1,6	
" "	1,6	
2 años	1,6	
" "	1,6	1,6
3 años	1,6	
" "	1,6	1,6
" "	1,7	

<u>Edad</u>	<u>Unidades</u>	<u>Media</u>
4 años	1,7	1,7
5 años	1,7	
" "	1,8	
" "	1,7	1,7
" "	1,7	
5-10 años	1,7	
" "	1,7	
" "	1,8	
" "	1,7	1,7
" "	1,6	
" "	1,7	
10-20 años	1,8	
" "	1,9	
" "	1,8	
" "	1,7	
" "	1,7	1,8
" "	1,9	
" "	1,8	
" "	1,7	
" "	1,9	
" "	1,8	
20-30 años	1,8	
" "	1,8	
" "	1,8	
" "	1,9	
" "	1,9	
" "	1,8	1,8
" "	1,6	
" "	1,7	
" "	2,0	
" "	1,8	
" "	1,8	
30-40 años	1,9	
" "	1,9	
" "	1,8	
" "	2,0	
" "	2,1	
" "	1,8	1,9
" "	1,7	
" "	1,8	
" "	1,8	
" "	1,9	
" "	2,0	
" "	2,0	
" "	1,9	
" "	2,0	

<u>Edad</u>	<u>Unidades</u>	<u>Media</u>
40-60 años	1,9	
" "	1,9	
" "	1,9	
" "	2,0	
" "	2,0	
" "	2,1	
" "	1,7	1,9
" "	1,8	
" "	1,9	
" "	1,9	
" "	1,9	
" "	2,0	
" "	2,0	
" "	1,8	
60-80 años	1,9	
" "	2,2	
" "	2,2	
" "	2,0	
" "	2,0	
" "	1,8	
" "	1,8	
" "	1,9	
" "	2,2	2,0
" "	2,1	
" "	2,1	
" "	2,0	
" "	2,0	
" "	2,1	
" "	1,9	
" "	1,9	
" "	2,2	

VARONES

<u>Caso</u>	<u>Edad</u>	<u>Unidades</u>	<u>Media</u>
1º	24	1,8	
2º	22	1,7	
3º	22	1,9	
4º	20	2,0	
5º	28	1,8	1,8
6º	30	1,9	
7º	28	1,8	
8º	23	1,9	
9º	31	1,6	
10º	27	1,7	
11º	24	1,7	
12º	21	1,8	

HEMBRAS

<u>Caso</u>	<u>Edad</u>	<u>Unidades</u>	<u>Media</u>
1º	26	1,7	
2º	20	1,7	
3º	26	1,8	
4º	29	1,9	
5º	20	2,0	
6º	29	1,9	1,8
7º	26	1,6	
8º	23	1,7	
9º	30	1,7	
10º	28	1,8	

VALORES EN PERIODO MENSTRUAL

<u>Caso</u>	<u>Edad</u>	<u>Unidades</u>	<u>Media</u>
1º	19	1,8	
2º	26	1,7	
3º	27	1,9	
4º	18	2,0	
5º	29	1,9	1,8
6º	23	1,8	
7º	21	1,6	
8º	24	1,6	
9º	23	1,9	

VALORES EN EMBARAZO Y LACTANCIA

<u>Caso</u>	<u>Edad</u>	<u>Mes de embarazo</u>	<u>Unidades</u>	<u>Media</u>
1º	25	4	1,9	
		6	2,0	1,9
		8	1,8	
		9	1,9	
		Mes de lactancia		
		1	1,9	
		2	1,7	
		3	1,8	
		4	1,9	
		5	2,0	1,9
		6	2,0	
		7	1,9	
		8	2,0	
		9	1,9	
		10	1,9	

<u>Caso</u>	<u>Edad</u>	<u>Mes de embarazo</u>	<u>Unidades</u>	<u>Media</u>
2ª	23	3	1,9	1,85
		5	1,7	
		7	1,8	
		9	2,0	
		Mes de lactancia		
		1	1,8	1,85
		2	1,9	
		3	1,7	
		4	2,0	
		5	1,6	
		6	1,7	

Conclusiones:

- 1ª.- Los valores normales de fosfatasa ácida en el adulto están alrededor de 1,8 Unidades, tanto en el hombre como en la mujer.
- 2ª.- Las cifras más bajas corresponden a los niños de uno a tres meses y asciende con la edad hasta la senectud donde se alcanza una media de 2,0 Unidades.
- 3ª.- El sexo, el menstuo, el embarazo y la lactancia, no determinan variaciones en el valor medio.

- = - = - = -

INFLUENCIA DE LOS EFECTORES

1º.-Influencia del pH.

a).- Con substrato de beta-glicerofosfato sodico (Exp. 1ª)

Substrato: Solución M/10 de beta-glicerofosfato sodico.
Temperatura: 40º
pH, los indicados.
Se lleva a dichos pH por adiciones de ácido acetico y NaOH.

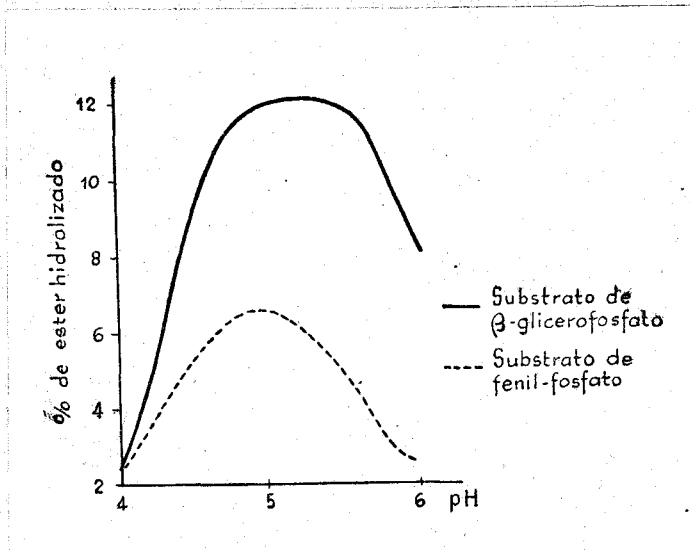
Sistema enzimático

<u>Matraz A.</u>	<u>Matraz B.</u>	<u>Matraz C.</u>
10 cc Sol. M/10 substrato	10 cc Sol.substrato	10 cc agua desti-
10 cc tampon	10 cc tampon	lada.
1 cc suero	1 cc agua destilada.	10 cc tampon
		1 cc suero
<u>pH</u>		<u>% de ester hidrolizado</u>
4,0		2,8
4,2		4,8
4,4		7,4
4,6		10,4
4,8		11,6
5,0		12,0
5,2		12,0
5,4		12,0
5,6		11,6
5,8		9,8
6,0		8,0

b).- Con substrato de fenil-fosfato disodico. (Exp. 2ª)

Análogas condiciones experimentales.

<u>pH</u>	<u>% de ester hidrolizado</u>
4,0	2,4
4,2	3,4
4,4	4,6
4,6	5,6
4,8	6,4
5,0	6,4
5,2	6,0
5,4	5,4
5,6	4,4
5,8	3,2
6,0	2,6



Conclusiones:

- 1ª.- La hidrólisis del beta-glicerofosfato sódico es muy superior a la del fenil-fosfato disódico.
- 2ª.- El óptimo de pH para el beta-glicerofosfato es más amplio y más desplazado hacia la zona alcalina que el óptimo correspondiente al fenil-fosfato.
- 3ª.- Para el primero, el óptimo está entre pH 5,0 y 5,4. Para el fenil-fosfato, entre pH 4,8 y 5,0.

2º.- Influencia del ion cítrico en la hidrólisis enzimática.

a).- Con sustrato de beta-glicerofosfato sódico. (Exp. 3ª).

Efeotor: Sol. M/10 de citrato sódico.
 Tiempo de exposición previa del efeotor: 1 hora.
 pH, los indicados.
 Sustratos: Sol. M/10.

Sistema enzimático

<u>Matraz A.</u>	<u>Matraz CITR.</u>	<u>Matraz B.</u>	<u>Matraz C.</u>
10 cc Sol.sustrato.	10 cc Sol.sustrato.	10 cc Sol.subs-	10 cc agua
10 cc tampon	10 cc tampon	trato.	10 cc tampon
1 cc suero	1 cc suero	10 cc tampon	1 cc agua
1 cc agua	1 cc Sol.efeotor	2 cc agua	1 cc suero

% de ester hidrolizado

<u>pH</u>	<u>sin citrato</u>	<u>con citrato</u>
4,0	2,6	6,2
4,2	4,6	9,8
4,4	7,1	10,8
4,6	9,8	12,4
4,8	11,2	12,6
5,0	11,8	12,8
5,2	11,8	12,8
5,4	11,8	12,8
5,6	11,0	12,8
5,8	9,5	10,8
6,0	8,0	8,8

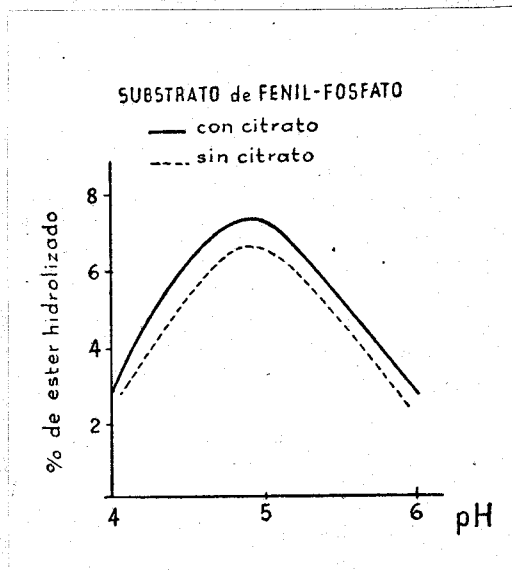
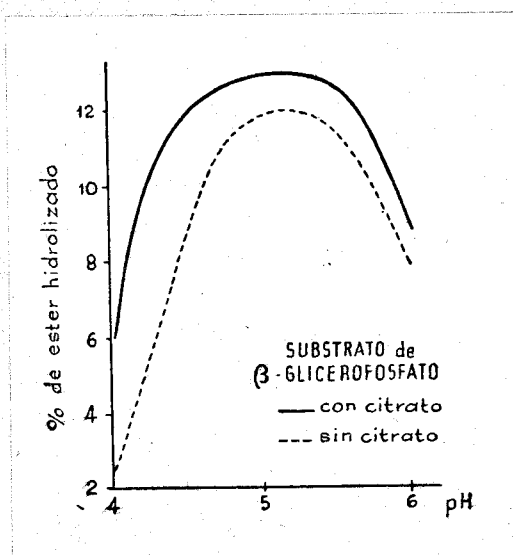
b).- Con substrato de fenil-fosfato disódico. (Exp.ª)

Concentración del substrato: Sol. M/10.

Las restantes condiciones experimentales, son análogas a las de la Exp. 3ª

% de ester hidrolizado

<u>pH</u>	<u>sin citrato</u>	<u>con citrato</u>
4,0	2,6	3,2
4,2	3,6	4,6
4,4	4,8	5,6
4,6	5,8	6,4
4,8	6,5	7,0
5,0	6,5	7,0
5,2	6,1	6,4
5,4	5,3	5,7
5,6	4,4	5,0
5,8	3,0	3,8
6,0	2,4	2,8



Conclusiones:

- 1ª.- El ion cítrico produce una notable activación de la hidrólisis del beta-glicerofosfato sódico y del fenil-fosfato disódico, menor en este último.
- 2ª.- El efecto es más ostensible en la porción más ácida de la curva.

- - - - -

3ª.- Influencia de la concentración del citrato. (Exp. 5ª)

Análogas condiciones experimentales. pH = 5,0
Concentraciones de citrato, las indicadas.

<u>Concentración de citrato</u>	<u>% de ester hidrolizado</u>
sin citrato	15,0
con citrato M.	20,2
" " M/10	25,8
" " M/50	31,5
" " M/100	62,8
" " M/500	48,5
" " M/1.000	16,3

Conclusión:

La concentración óptima de citrato es la M/100.

- - - - -

4ª.- Influencia del tiempo de acción del citrato. (Exp. 6ª)

Análogas condiciones experimentales.
Concentración de citrato M/100
Tiempos, los indicados.

<u>Tiempo</u>	<u>% de ester hidrolizado</u>
sin citrato 1 hora	14,2
con citrato 1 hora	65,0
" " 2 horas	78,2
" " 3 horas	87,5
" " 4 horas	93,2
" " 5 horas	98,5
" " 6 horas	100,0

Conclusiones:

- 1ª.- El tiempo de exposición previa ante el efector, incrementa la hidrolisis en forma regular.
- 2ª.- A las seis horas se consigue la hidrolisis total del ester.

- - - - -

5ª.- Influencia del citrato en la inactivación por fluoruros.

Estas experiencias se han llevado a cabo en ausencia de tampon pero situando al sistema en los pH indicados por la adición de ácido acético y NaOH.

Substrato: beta-glicerofosfato sódico.

Tiempo: 4 horas.

Concentración de fluoruro M/1.000

Disposición del sistema:

- 10 cc de Sol. beta-glicerofosfato. rectificar el pH hasta el deseado y completar hasta 12 cc
- 1 cc Sol. fluoruro.
- 1 cc Sol. citrato.

Se disponen también testigos de beta-glicerofosfato, de suero y de fluoruro.

La calefacción se hace a temperatura ordinaria pero la duración es de 4 horas.

Se disponen tres experiencias para probar la acción competitiva a los pH que interesan: 3,5 , 4,5 , 5,5 .

a).- Influencia a pH = 3,5 (Exp. 7ª)

% de ester hidrolizado

Sistema, sin fluoruro, sin citrato	7,2
" con fluoruro, sin citrato	3,1
" " " con " M/10	7,2
" " " " " M/100	5,8
" " " " " M/1000	3,8

Se advierte, que la inactivación por el fluoruro es superior al 50% pero es anulada totalmente por el citrato M/10. La concentración de citrato M/100 es menos activa y la M/1000 completamente inactiva.

b).- Influencia a pH = 4,5 (Exp. 8)

% de ester hidrolizado

Sistema, sin fluoruro, sin citrato	15,2
" con " " citrato	5,1
" " " con citrato M/10	14,8
" " " " " M/100	20,0
" " " " " M/1000	7,5

La hidrólisis es superior en razón al pH pero el porcentaje de inactivación es también más elevado. Continúa mostrándose inactiva la concentración M/1.000.

c).- Influencia a pH = 5,5 (Exp. 9ª)

						<u>% de ester hidrolizado</u>
Sistema,	sin fluoruro,	sin citrato				21,8
"	con fluoruro,	sin citrato				0,0
"	"	"	con citrato	M/10		20,0
"	"	"	"	"	M/100	12,1
"	"	"	"	"	M/1000	7,5

Conclusiones:

- 1ª.- La acción competitiva del citrato sobre el fluoruro es manifiesta.
- 2ª.- La inactivación por el fluoruro es tanto mayor cuanto más nos acercamos al pH óptimo.
- 3ª.- La acción antiinhibidora del citrato se eleva también con el pH.

- - - - -

6ª.- Acción de los ácidos bibásicos saturados.

a).- Influencia del ácido oxálico. (Exp. 10ª)

Se dispone la experiencia en la forma ordinaria.
Tiempo de exposición previa, 1 hora.

<u>Concentraciones</u>	<u>% de ester hidrolizado</u>
sin oxálico	13,8
con oxálico M.	12,0
" " M/10	11,2
" " M/100	8,5
" " M/1000	12,8

b).- Influencia del ácido malónico. (Exp. 11)

Análogas condiciones experimentales.

<u>Concentración</u>	<u>% de ester hidrolizado</u>
sin ácido	12,2
con ácido M/2	12,3
" " M/10	12,2
" " M/100	12,4

c).- Influencia del ácido succínico. (Exp. 12)

Análogas condiciones experimentales.

<u>Concentración</u>	<u>% de ester hidrolisado</u>
sin ácido	13,8
con ácido M/2	13,6
" ácido M/10	13,8
" ácido M/100	13,7
" ácido M/1.000	13,5

Conclusiones:

1ª.- Se advierte un marcado poder inactivador del ácido oxálico que adquiere su máximo en concentraciones M/100.

2ª.- Los ácidos malónicos y succínico se mostraron inactivos.

- - - - -

7ª.- Acción de los oxiácidos saturados.

a).- Influencia del ácido glicólico. (Exp. 13ª)

Análogas condiciones experimentales.

<u>Concentración</u>	<u>% de ester hidrolisado</u>
sin ácido	14,2
con ácido M	17,2
" " M/10	20,4
" " M/100	22,5
" " M/1.000	15,1

b).- Influencia del ácido D-láctico. (Exp. 14ª)

Análogas condiciones experimentales.

<u>Concentración</u>	<u>% de ester hidrolisado</u>
sin ácido	13,8
con ácido M	25,0
" " M/10	28,0
" " M/100	14,0
" " M/1.000	13,8

c).- Influencia del ácido beta-oxibutírico. (Exp. 15ª)

Análogas condiciones experimentales.

<u>Concentración</u>	<u>% de ester hidrolisado</u>
sin ácido	12,8
con ácido M	12,8
con ácido M/10	12,7
" " M/100	12,6
" " M/1.000	12,8

Conclusiones:

- 1ª.- Los ácidos glicólico y D-láctico tienen un marcado poder activador que adquiere su máximo en concentraciones M/100 y M/10 respectivamente.
- 2ª.- La entrada de un grupo exhidrilo en el carbono alfa de los ácidos alifáticos saturados determina un efecto activador.
- 3ª.- La entrada del oxhidrilo en posición beta no produce efecto alguno.

- - - - -

8ª.- Acción de los ceto-ácidos.

- a).- Influencia de los alfa-cetoacidos. (ácido pirúvico) (Exp. 16).

Análogas condiciones experimentales.

<u>Concentración</u>	<u>% de ester hidrolisado</u>
sin ácido	14,1
con ácido M	17,2
" " M/10	19,5
" " M/100	25,8
" " M/1.000	17,5

- b).- Influencia de los beta-cetoacidos. (ácido acetilacético). (Exp. 17ª).

Se emplea el ester acetilacetico dada la inestabilidad del ácido.

Análogas condiciones experimentales.

<u>Concentración</u>	<u>% de ester hidrolisado</u>
sin ester	14,1
con ester M	14,0
" " M/10	14,2
" " M/100	14,3
" " M/1.000	14,2

c).- Influencia de los gamma-estoacidos. (acido levulinico) (Exp. 18^a).

Análogas condiciones experimentales.

<u>Concentración</u>	<u>% de ester hidrolisado</u>
sin ácido	14,1
con ácido M	14,3
" " M/10	14,5
" " M/100	14,2
" " M/1.000	14,0

Conclusiones:

- 1^a.- Se advierte un considerable efecto activador por parte del ácido piruvico que alcanza su máximo en concentración M/100.
- 2^a.- La entrada del grupo cetónico en la cadena de los ácidos alifáticos saturados, produce un marcado efecto activador, cuando la sustitución se hace en el carbono alfa, siendo inactivos los derivados beta y gamma.

9^a.- Acción de los oxiácidos dicarboxilicos saturados. (ácido fumárico y maleico). (Exp. 19).

Análogas condiciones experimentales.

La escasa solubilidad del ácido fumárico, no permitió la concentración M.

<u>Concentraciones</u>	<u>% de ester hidrolisado</u>	
	<u>a. fumárico</u>	<u>a. maleico.</u>
sin ácido	15,0	15,0
con " M		12,1
" " M/10	15,2	11,2
" " M/100	15,0	10,8
" " M/1.000	15,3	13,5

Conclusiones:

- 1^a.- El ácido maleico tiene un notable efecto inactivador con un máximo a concentración M/100.
- 2^a.- El ácido fumárico permaneció inactivo.

10^o.- Acción de los oxiácidos dicarboxílicos no saturados. (ácido málico) (Exp. 20).

Se emplea la sal sódica del ácido málico y se montan experiencias simultáneas con D-malato y con racémico.

% de ester hidrolisado

<u>Concentración</u>	<u>D-málico</u>	<u>racémico</u>
sin efector	12,8	12,8
con " M	18,2	13,1
" " M/10	31,5	19,5
" " M/100	38,9	21,2
" " M/1.000	20,2	13,0

Conclusión:

El ácido D-málico y en menor grado el racémico producen un gran efecto activador de la hidrólisis enzimática.

11^o.- Acción de los azúcares. (Exp. 21^a)

Se emplean, glucosa, fructosa y sacarosa. Análogas condiciones experimentales.

% de ester hidrolisado

<u>Concentración</u>	<u>glucosa</u>	<u>fructosa</u>	<u>sacarosa</u>
sin efector	13,0	13,0	13,0
con efector M	13,2	13,1	13,0
" " M/10	13,1	13,3	13,2
" " M/100	13,3	13,1	13,4
" " M/1.000	13,4	13,0	13,1

Conclusión:

Todos los azúcares ensayados resultaron inactivos.

12^o.- Acción de los aminoácidos.

a).- Efecto de la entrada de un grupo amino en los ácidos bi-básicos saturados. (Exp. 22^a)

La escasa solubilidad de los tres ácidos empleados.

(succinico, aspartico y glutamico) impide operar con determinadas molaridades.

<u>Concentración</u>	<u>% de ester hidrolisado</u>		
	<u>a. succínico</u>	<u>a. aspártico</u>	<u>a. glutámico</u>
sin efector	12,7	12,7	12,7
con efector M/2	12,7		
" " M/10	12,6	10,1	
" " M/100	12,0	10,5	10,8
" " M/1.000	12,2	11,7	12,0

b).- Ácidos alfa-amino-monocarboxílicos. (Exp. 23^a)

En esta experiencia comparamos el efecto inactivador de la alanina con el de los aminoácidos derivados de ella por sustituciones en el carbono beta. Ensayamos la entrada de los grupos: fenila (fenil-alanina), indol (triptofano), imidazol (histidina), exhidrilo (serina) y sulfhidrilo (cisteina).

Análogas condiciones experimentales.

<u>Concentración.</u>	<u>% de ester hidrolisado</u>					
	<u>alanina.</u>	<u>Fenil-alanina.</u>	<u>Triptofano.</u>	<u>Histidina.</u>	<u>Serina.</u>	<u>Cisteina.</u>
sin efector	15,1	15,1	15,1	15,1	15,1	15,1
con " M	14,2			14,0	14,1	
" " M/10	12,8	12,9	13,0	12,6	12,5	16,8
" " M/100	10,2	11,0	11,1	10,9	9,9	15,9
" " M/1.000	13,5	12,8	14,8	13,9	13,6	15,9

c).- Efecto de la entrada de un segundo grupo básico (Exp. 24^a)

En esta experiencia se establece comparación entre un mono-amino-mono-carboxílico y un diamino-mono-carboxílico.

<u>Concentración</u>	<u>% de ester hidrolisado</u>	
	<u>nor-leucina</u>	<u>lisina</u>
sin efector	12,8	12,8
con efector M		10,5
" " M/10		8,1
" " M/100	10,2	8,7
" " M/1.000	12,2	10,4

d).- Efecto de la entrada de varios grupos básicos. (Exp. 25^a)

Análogas condiciones experimentales.

Se establece comparación entre un ácido mono-amino-mono-carboxílico (nor-valina), un diamino-mono-carboxílico (ornitina) y un mono-amino-guanidino-carboxílico (arginina).

% de ester hidrolisado

<u>Concentración</u>	<u>nor-valina</u>	<u>ornitina</u>	<u>arginina</u>
sin efector	13,3	13,3	13,3
con efector M	12,0	11,2	10,5
" " M/10	11,5	9,3	8,7
" " M/100	10,4	9,3	8,0
" " M/1.000	12,5	11,8	8,7

Conclusiones:

- 1ª.- En la Exp. 22ª se nota un marcado efecto inactivador motivado por la entrada del grupo amino en la molécula de los ácidos bibásicos saturados.
- 2ª.- La entrada de un grupo de sustitución en el carbono beta de la alanina, no altera sensiblemente su poder inactivador. Pero la entrada del grupo sulfhidrilo en la referida posición determina un considerable efecto activador.
- 3ª.- La entrada de nuevos grupos básicos en la molécula de un aminoácido incrementan su poder inactivamente.

13ª.- Influencia de los isómeros estereoquímicos en la activación enzimática. (Exp. 26).

Se han probado como efectores los distintos isómeros del ácido tartárico.

Análogas condiciones experimentales.

% de ester hidrolisado

<u>Concentración</u>	<u>L-tártico</u>	<u>D-tartárico</u>	<u>meso-tartárico</u>
sin efector	14,2	14,2	14,2
con efector M	0,0	27,5	7,6
" " M/10	2,7	24,0	14,5
" " M/100	5,8	20,1	14,7
" " M/1.000	7,1	18,5	14,8

Conclusiones:

- 1ª.-El isómero L- produce una total inactivación a concentración molar y casi total en las demás concentraciones.
- 2ª.- El isómero D- produce en cambio una notable activación.
- 3ª.-El meso-tartrato por contener ambos estereoisómeros en su molécula revela un marcado poder inactivador procedente del carbono L-.

14^a.- Influencia del citrato en la inactivación por oxalato.
(Exp. 27^a)

Se emplea concentración M/100 de oxalato por haber comprobado ser óptima para inactivación.

% de ester hidrolisado

Sistema,	sin oxalato,	sin citrato			14,7
"	con oxalato,	sin citrato			8,0
"	"	"	con citrato	M	8,2
"	"	"	"	M/10	8,7
"	"	"	"	M/100	8,3
"	"	"	"	M/1.000	8,1

Conclusión:

El citrato **no** interfiere la acción inactivante del oxalato.

- = - = - = -

ACCIÓN DE LOS EFECTORES SOBRE LA FOSFATASA ACIDA DE SUEROS
PATOLÓGICOS.

(CANCER DE PROSTATA)

1ª.- Influencia del pH. (Exp. 28ª).

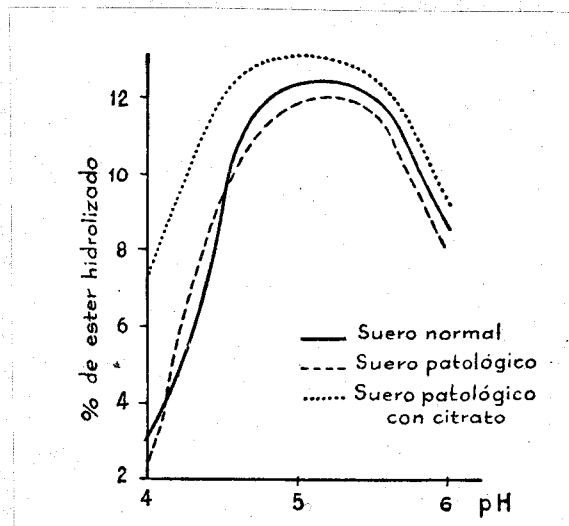
Se emplea sustrato de beta-glicerofosfato sódico.

Se prepara una serie de diluciones del suero patológico y se comprueba su actividad según la técnica usual. Se toma para la experiencia la solución 1/5 que tiene aproximadamente la misma actividad que el suero normal que empleamos como patrón.

Disponemos simultáneamente un sistema análogo con solución de citrato sódico M/10. Tiempo de exposición previa, 1 hora.

% de ester hidrolizado

<u>pH</u>	<u>suero normal</u>	<u>suero patológico.</u>	<u>s.patológico-citrato</u>
4,0	3,0	2,8	7,0
4,2	5,2	5,3	10,2
4,4	7,8	8,0	10,9
4,6	10,8	10,4	13,0
4,8	11,9	11,4	13,0
5,0	12,4	12,0	13,0
5,2	12,3	12,0	13,0
5,4	12,4	12,1	12,8
5,6	11,9	11,5	12,0
5,8	10,2	10,0	11,0
6,0	8,4	8,2	8,8



Conclusiones:

- 1ª.- Las curvas correspondientes a ambos sueros son sensiblemente análogas.
- 2ª.- El citrato incrementa la hidrólisis enzimática en el caso del suero patológico, en el mismo grado que en el caso del suero normal. (Véase Exp. 3).

2º.- Influencia del ácido láctico. (Exp. 29ª)

Condiciones experimentales análogas a las de la Exp. 13ª
Suero patológico, el mismo que en la Exp. 28ª.
Dilusión del suero patológico, 1/5.

% de ester hidrolisado

<u>Concentración</u>	<u>suero normal</u>	<u>suero patológico</u>
sin ácido	13,3	13,8
con ácido M	16,3	16,8
" " M/10	18,0	18,4
" " M/100	20,8	20,0
" " M/1.000	14,2	13,8

Conclusión:

La activación de la fosfatasa ácida por el ácido láctico es del mismo orden en ambos sueros.

- - - - -

3º.- Influencia del ácido piruvico. (Exp. 30ª)

Condiciones experimentales, las mismas.
Suero patológico, el de las experiencias anteriores.
Dilusión del suero patológico, 1/5.

% de ester hidrolisado

<u>Concentración</u>	<u>suero normal</u>	<u>suero patológico</u>
sin ácido	13,6	14,0
con ácido M	16,7	17,0
" " M/10	19,0	19,2
" " M/100	20,0	21,0
" " M/1.000	16,2	17,0

Conclusión:

La actividad del ácido piruvico es del mismo orden en ambos sueros.

- - - - -

4º.- Influencia del ácido málico. (Exp. 31ª)

Todas las condiciones experimentales son las mismas que en las experiencias anteriores.

% de ester hidrolisado

<u>Concentración</u>	<u>suero normal</u>	<u>suero patológico</u>
sin ácido	14,1	13,8
con ácido M	20,0	20,1
" " M/10	32,2	30,9
" " M/100	37,7	34,6
" " M/1.000	21,1	24,0

Conclusión:

El ácido D-málico produce igual efecto activador en ambos sueros.

- - - - -

5º.-Influencia de los aminoácidos. (Exp. 32ª)

Ensayamos únicamente la alanina y la cisteina como ejemplos más representativos.

% de ester hidrolisado

<u>Concentración</u>	<u>alanina</u>		<u>cisteina</u>	
	<u>s.normal</u>	<u>s.patológico</u>	<u>s.normal</u>	<u>s.patológico</u>
sin efector	13,9	14,5	13,9	14,5
con efector M	12,8	13,3		
" " M/10	10,7	11,1	15,0	15,7
" " M/100	8,8	9,7	13,7	15,0
" " M/1.000	12,2	13,0	13,5	14,2

Conclusión:

A este respecto ambos sueros se comportan de igual manera.

- = - = - = -

CONCLUSIONES FINALES

- 1ª.- Presentamos los fundamentos de nuestra técnica original para valoración de glicerina en suero.
- 2ª.- Presentamos nuestra técnica original para determinación de fosfatasa ácida y alcalina en suero.
- 3ª.- Definimos nuestra Unidad de Fosfatasa.
- 4ª.- Se establecen los valores normales de fosfatasa ácida y alcalina en suero en las distintas edades, sexo, periodo menstrual, embarazo y lactancia, determinados con nuestra técnica y expresados en nuestra Unidad.
- 5ª.- Se fija para la fosfatasa ácida el pH óptimo de acción sobre substratos de glicerofosfato sódico y de fenilfosfato disódico.
- 6ª.- Se ha estudiado el papel del ácido cítrico como efector enzimático de la fosfatasa ácida, comprobándose su gran poder como anti-inhibidor.
- 7ª.- Estudiamos también el comportamiento como efector enzimático de la fosfatasa ácida de varias funciones orgánicas, comprobándose:
 - a) Un marcado poder inactivador en los oxiacidos alifáticos saturados cuando el grupo oxhidrilo ocupa la posición alfa.
 - b) Acción francamente inactivante del ácido oxálico siendo en cambio sus homólogos superiores totalmente inactivos.
 - c) Un poder activador de los cetoácidos cuando el grupo cetónico se encuentra en posición alfa.
 - d) Una acción inactivante de los alfa-aminoácidos que se incrementa con la entrada en la molécula de nuevos grupos básicos.
 - e) Notable efecto activador de la cisteína.
 - f) Acción inactivante del L-tartrato y activante del D-tartrato.
- 8ª.- Se ha estudiado la influencia de los citratos frente al poder inactivador de los fluoruros, encontrándose una marcada acción competitiva de aquellos sobre estos.
- 9ª.- Igualmente hemos ensayado la posible acción competitiva de los citratos frente al poder inactivador de los oxalatos, no pudiendo ser comprobada.
- 10ª.- Hemos estudiado las principales características cinéticas de

la fosfatasa ácida en enfermos de cáncer de prostata y la acción específica de algunos efectores frente a determinaciones análogas en suero normal tomado como testigo, comprobándose la absoluta igualdad de ambas enzimas.

- - - - -

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

- (1).- F. SEGOVIA. Tesis doctoral de Ciencias Químicas. Sevilla, 1944.
- (2).- TRILLAT. Bull. Soc. Chim. 22, 245, 1933.
- (3).- MALAPRADE. Bull. Soc. Chim. 1, 833, 1933.
- (4).- FLEURY Y PARIS. J. Pharm. et Chim. 18, 470, 1933.
- (5).- F. SEGOVIA, loc. cit.
- (6).- KUTSCHER Y WOLBERGS. Z. Physiol. Chem. 236, 237, 1936.
- (7).- KUTSCHER Y WORNER. Z. Physiol. Chem. 238, 275, 1936.
- (8).- LUNDQUIST. Acta Phyol. Scand. 14, 263, 1947.
- (9).- ABUL FADL Y KING. Biochem. Z. 45, 51, 1949.
- (10).- M. DIAZ-RUBIO Y F. SEGOVIA. Inédito.
- (11).- BAMANN Y SALZER. Biochem. Z. 286, 143, 1936.
- (12).- COURTOIS. Thèse doc. Sc. phys. París. 1938.
- (13).- BACCARI. Bull. Soc. Ital. Biol. Sper. 26, 596, 1950.
- (14).- BELFANTI. Biochem. J. 29, 842, 1935.
- (15).- ABUL FADL Y KING. Biochem. J. 42, XXVIII, 1948.
- (16).- ABUL FADL Y KING. Biochem. J. 45, 51, 1949.
- (17).- ABUL FADL Y KING. loc. cit.
- (18).- ANAGNOSTOPOULOS. Bull. Soc. Chim. Biol. 35, 595, 1953.
- (19).- ABUL FADL Y KING. Biochem. J. 42, XXVIII, 1948.
- (20).- ANAGNOSTOPOULOS. Bull. Soc. Chim. Biol. 35, 575, 1953.

- - - - -