Tomo XLIII 1940 Nº 1

Anales

DE LA

ASOCIACION DE QUIMICA Y FARMACIA DEL URUGUAY

(REVISTA)

DIRECCION Y ADMINISTRACION
CALLE EJIDO, 1589
MONTEVIDEO (Uruguay)

Editorial Médica J. GARCIA MORALES - Uruguay, 1379

Acción de la Vitamina B1 sobre la fosfatasa sanguínea

Por

EDUARDO J. MIGUEL

Químico Farmacéutico

Robison en el año 1923, identificó un fermento que actúa sobre los esteres fosfóricos, y por un mecanismo de hidrólisis libera ácido fosfórico. Esta enzima por su acción recibió el nombre de fosfatasa.

Robison la puso en evidencia en el tejido óseo, pero posteriormente se le ha encontrado también en el hígado, riñón, mucosa intestinal, etc., y finalmente en la sangre, donde primero Kay, y luego Bodansky han ideado métodos de dosificación que permiten determinar cuantitativamente el fermento; ya sea en plasma (Kay) o en suero sanguineo (Bodansky).

En estudios posteriores se han determinado los factores que intervienen en la acción de la fosfatasa y que resumimos a continuación: en lo referente al pH, para la fosfatasa sanguínea, operando con sustrato formado por β glicerofosfato de sodio, adicionado de una solución tope, el pH óptimo varía entre 8,8 y 9,1 (Kay y Roche); para la fosfatasa renal el valor es de 9,9 (Akasawa); para la fosfatasa ósea 8,2 (Martland y Robison); para la fosfatasa de glóbulos rojos 6 (Roche y Latrille).

Otro factor estudiado por Kay es el efecto de los iones Mg; a concentraciones bajas el Mg se comporta como activador de la fosfatasa, mientras que a mayores concentraciones tiene una acción claramente inhibitoria.

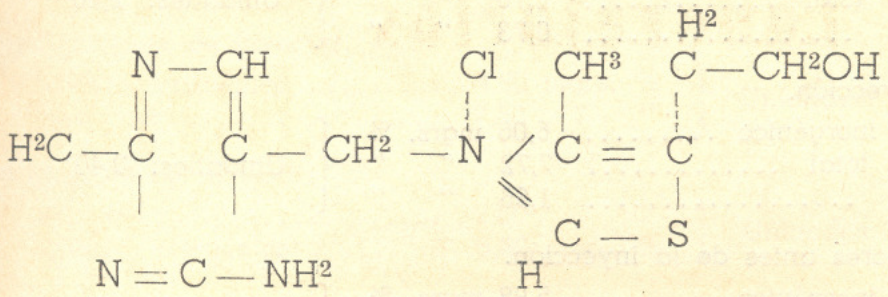
Son débilmente activadores los iones Ca, y presentan muy escasa actividad los iones K, Na y Cl. Es inhibidor el ión F aún en bajas concentraciones.

En el transcurso de nuestras experiencias tendientes a poner en evidencia otros agentes inhibidores y activadores de la fosfatasa sanguínea, hemos constatado una clara acción inhibitoria ejercida por la vitamina B_1 administrada en inyecciones subcutáneas a cobayos, conejos y perros.

Hemos usado la solución de clorhidrato de vitamina B_1, sintética cristalizada, que circula en el comercio con el nombre de Benerva y que nos proporcionó gentilmente la casa Roche.

Esta vitamina que corresponde al grupo de las hidro-solubles, tiene una molécula formada por un núcleo pirimidínico y un anillo

o ciclo de tiazol, lo que demostró Williams en 1936, y confirmaron luego, Windaus en el mismo año, Andersag y Westphal con la primera síntesis, y últimamente Todd en 1937, que publicó su método de síntesis con el que aclaró definitivamente la estructura de esta vitamina. Su fórmula es:



PARTE PRACTICA

Hemos usado cobayos adultos, a los cuales les extrajimos sangre por punción cardíaca, en el suero sanguíneo de estos animales determinamos la actividad fosfática. Luego les inyectamos por vía subcutánea 0,25 centímetro cúbico de solución de clorhidrato de vitamina B_1, lo que corresponde a 0,5 de miligramo.

Luego de inyectados se dejan los animales 24 horas en las condiciones habituales inclusive su alimentación. Se hace entonces nueva punción cardíaca y en el suero se determina de nuevo la actividad fosfática, observándose en este momento disminución de dicha actividad, lo que no sucede con los animales testigos, que han sido sometidos a las mismas operaciones, excepto la inyección de vitamina.

La acción inhibitoria descrita, la hemos logrado también trabajando sobre la fosfatasa sanguínea de los perros, usando para eso la solución concentrada de 5000 unidades de clorhidrato de B_1 por c. c.

En perros normalmente alimentados, hacemos una extracción de sangre, en cuyo suero determinamos la actividad fosfática. Inyectamos luego por vía subcutánea 1 cc. de Benerva Forte Roche; a la media hora extraemos sangre nuevamente y determinamos en el suero la actividad fosfática. Hacemos una nueva toma a la hora, otra a las 24 horas y otra a las 48 horas.

En los conejos los valores siguen el descenso observado, como se ve en la parte experimental.

RESULTADOS OBTENIDOS

Cobayo Nº 1. Valores hallados antes de la inyección.

Fórforo inorgánico	6,94 mgrs. %	Unidades: 1,89
Fósforo total	9,56 " "	
Testigo	0,73 " "	

Valores después de la inyección.

Fósforo inorgánico	7,04 mgrs. %	Unidades: 0,43
Fósforo total	8,20 " "	
Testigo	0,73 " "	

Cobayo Nº 2. Antes de la inyección.

Fórforo inorgánico	5,87 mgrs. %	Unidades: 2,10
Fósforo total	8,70 " "	
Testigo	0,73 " "	

Después de la inyección.

Fósforo inorgánico	6,06 mgrs. %	Unidades: 0,40
Fórforo total	7,72 " "	
Testigo	1,26 " "	

Cobayo Nº 3. Valores antes de la inyección.

Fósforo inorgánico	5,98 mgrs. %	Unidades: 1,06
Fósforo total	8,10 " "	
Testigo	1,06 " "	

Después de la inyección.

Fósforo inorgánico	5,80 mgrs. %	Unidades: 0,26
Fósforo total	7,12 " "	
Testigo	1,06 " "	

Perro Nº 1. Antes de inyectar.

Fósforo inorgánico	6,26 mgrs. %	Unidades: 5,10
Fosfatasa	11,36 " "	
Testigo	trazas	

Media hora después de inyectar.

Fósforo inorgánico	4,68 mgrs. %	Unidades: 3,72
Fosfatasa	8,40 " "	

24 horas después de inyectar.

Fósforo inorgánico	4,74 mgrs. %	Unidades: 4,58
Fosfatasa	9,32 " "	

48 horas después de inyectar.

Fósforo inorgánico	3,54 mgrs. %	Unidades: 4,62
Fosfatasa	8,16 " "	

Perro Nº 2. Antes de inyectar.

Fósforo inorgánico	5,60 mgrs. %	Unidades: 6,04
Fosfatasa	11,64 " "	

Media hora después de inyectar.

Fósforo inorgánico	5,52 mgrs. %	Unidades: 3,48
Fosfatasa	9,00 " "	

1 hora después de inyectar.

Fósoro inorgánico	5,68 mgrs. %	Unidades: 3,38
Fosfatasa	9,56 " "	

Perro Nº 3. Antes de inyectar.

Fósforo inorgánico	3,60 mgrs. %	Unidades: 5,48
Fosfatasa	9,08 " "	

Media hora después de inyectar.

Fósforo inorgánico	3,26 mgrs. %	Unidades: 4,26
Fosfatasa	7,72 " "	

1 horas después de inyectar.

Fósforo inorgánico	2,64 mgrs. %	Unidades:	4,80
Fosfatasa	7,74 " "		

Conjo Nº 1. Antes de inyectar 1 cc. de clorh. de B_1.

Fósforo inorgánico	5,10 mgrs. %	Unidades:	3,30
Fosfatasa	8,40 " "		

Media hora después de inyectar.

Fósforo inorgánico	4,90 mgrs. %	Unidades:	2,40
Fosfatasa	7,30 " "		

Una hora después de inyectar.

Fosfatasa	7,50 " "	Unidades:	2,20
Fósforo inorgánico	5,30 mgrs. %		

Para la determinación de la fosfatasa hemos usado la técnica de Bodansky. Por esta técnica se hacen dos determinaciones de fosfato inorgánico; una directamente en el suero, que nos revela la cantidad preexistente en el suero, y la segunda se hace luego de incubar el suero cno el sustrato, durante 1 hora en un baño de 37º. Si llamamos A la cantidad de fosfato total, después de la incubación, y B la cantidad preeixstente en el suero, la diferencia entre A - B nos da la cantidad de fosfato liberado, es decir la actividad fosfatásica del suero.

La técnica de dosificación de fosfato inorgánico es la de Kuttner y Lichtenstein, modificada por Bodansky, en la que se adiciona al fosfato 4 cc. de reactivo molíbdico y 1 cc. de cloruro estañoso diluído. Se produce una coloración azul que se compara al colorímetro con la solución tipo de fosfato, la altura leída la transformamos en fosfato, por lectura en la tabla confeccionada por Bodansky.

Admás como el sustrato libera espontáneamente en la incubación, pequeñas cantidades de osfato, ponemos un tubo con sustrato sin suero, para restar esta cantidad, a la total liberada por el fermento.

Hemos trabajado con la solución de vitamina B_1 in vitro, es decir adicionándola al sustrato en el momento de incubarlo con el suero, y en estas condiciones no hemos observado ninguna acción inhibidora.

La interpretación de los hechos descritos, nos lleva a admitir una intervención importante de la vitamina B_1 en el equilibrio enzimático.

$$\text{Fosfatasa} \rightleftharpoons \text{Fosforilasa}$$

comportándose como activador de los fenómenos de fosforilación.

Como confirmación de nuestro punto de vista encontramos la fosfaturia que se observa en la avitaminosis B_1, y por último un trabajo pde Kick, Sure y Buchanan (Am. J. Digestive Diseases Nutrition. 3.490-2. 1936) que han encontrado en la avitaminosis B_1 un apreciable aumento en la concentración de la fosfatasa del suero.

CONCLUSIONES

1º La vitamina B_1 por vía subcutánea se comporta como inhibidora de la fosfatasa sanguínea.

2º In vitro la vitamina B_1 no presenta dicha actividad.

3º De los resultados obtenidos puede deducirse como sugestión, que la vitamina B_1 es probablemente un agente activador de los procesos de fosforilación,

TRABAJO DEL DEPARTAMENTO DE NUTRICION, ALIMENTACION Y VITAMINOLOGIA DEL MINISTERIO DE SALUD PUBLICA

BIBLIOGRAFIA

BODANSKY, A. — J. Biol. Chem. 1932, 99 200.
BODANSKY, A. — J. Biol. Chem. 1932, 101, 96.
KAY, H. D. — J. Biol. Chem. 1930, 89, 239.
MICHAELIS, L. — J. Biol. Chem., 1930, 89, 33.
BODANSKY, A y JAFFE, H. — J. Biol. Chem. 1935, 109, 2.
BO DANSKY, A. — J. Biol. 1933, 101, 93.
BODANSKY, A. — J. Biol. Chem. 1937, 120, 167.