

Cátedra de Farmacología de la Facultad de Medicina y Departamento
de Investigación de Laboratorio P. E. V. Y. A.
Barcelona

Acciones de la lipoxidasa sobre la presión arterial

II. Sobre el fraccionamiento de las proteínas de la soja

por

J. Martín-Esteve, F. G. Valdecasas, J. Laporte y P. Puig-Muset

(Recibido para publicar el 14 de octubre de 1960)

En un anterior trabajo (1) hemos descrito la acción hipotensora ejercida por la lipoxidasa en el gato. Esta hipotensión de instauración progresiva y larga duración, se observa también, de manera muy marcada, en el perro (2). Por otra parte, los primeros ensayos efectuados en clínica humana permiten suponer que dicha sustancia puede resultar de utilidad en el tratamiento de la hipertensión esencial (3).

Para progresar en el conocimiento de esta acción, es preciso aclarar dos puntos fundamentales.

A) Si el efecto hipotensor se debe a la propia acción fermentativa específica de la lipoxidasa o de algún otro factor o factores.

B) Cuál es el mecanismo de acción a través del cual se instaura la hipotensión.

Tanto en la lipoxidasa obtenida por nosotros por el método previamente descrito, como en la de otros orígenes (NBC), hemos observado varias acciones biológicas (4): a) Acción aglutinante sobre los hematíes, especialmente en el conejo; b) Acción peroxidásica; c) Acción antihipertensiva (incubada «in vitro»); d) Acción antiadrenalina (incubada «in vitro»);

e) Acción hipotensora ; f) naturalmente, la acción lipoxidásica determinable frente al ácido linoleico.

Por otra parte, desde un punto de vista bioquímico, la existencia de diferencias entre lipoxidasas obtenidas siguiendo una técnica constante, ya ha sido señalada.

También se ha observado la existencia de hierro en la lipoxidasa, que por otra parte no es esencial para la actividad enzimática (5).

Se ha señalado también que la lipoxidasa necesita de un polipéptido «activador» para desarrollar su acción (6) o dos enzimas (7).

Desde un punto de vista biológico, en anteriores trabajos (8) habíamos señalado las diferencias observadas al determinar la toxicidad experimental de distintos lotes. Sin embargo, al utilizar técnicas de estudio que permiten la determinación cuantitativa de las diversas acciones ya señaladas, ejercidas por los diferentes lotes, pudimos comprobar una clara disociación de acciones en algunos casos. Ello nos confirmó que el producto obtenido era en realidad un complejo constituido por diversas proteínas. Para asegurar esta hipótesis, hemos procedido al fraccionamiento de diversos lotes del preparado de lipoxidasa — obtenidos todos ellos siguiendo la técnica de THEORELL — y al ulterior estudio de las respectivas acciones biológicas de las fracciones obtenidas.

Parte experimental

a) MÉTODO UTILIZADO PARA EL FRACCIONAMIENTO DE LAS PROTEÍNAS DE LA SOJA

La soja, reducida a harina, se extrae inmediatamente con éter etílico para liberarla de las grasas.

20 kilogramos de harina de soja desengrasada se suspenden en 150 litros de tampón acetato 0,1 M de pH 4,5, y se dejan en extracción 20 horas a 5° C. Se separan los líquidos por filtración y se llevan a pH 6,7, adicionando, por cada 100 litros de extracto 7.5 litros de acetato de bario al 20 %, 15 litros de acetona y 3 litros de acetato básico de plomo al 20 %. El precipitado formado se desecha y a los líquidos claros se adicionan 25 Kg. de sulfato amónico. El precipitado formado se separa y del líquido se separan las proteínas activas por adición de 15 Kg. de sulfato amónico. Este precipitado se recoge por decantación y centrifugación se redisuelve en unos 2 litros de agua y se incuba a 63° C durante 5 minutos, tal como se

describe por THEORELL. Se desecha el precipitado inerte y las proteínas de la disolución se fraccionan por el sulfato amónico, separando los precipitados indicados en la Tabla I. En estas fracciones se ensayaron: actividad peroxidásica (método del Guayacol) (9); actividad lipoxidásica frente al ácido linoleico (método de TAPPEL, modificado por HAINING y AXELROD) (10); y la acción antihipertensínica (13). Los resultados se recogen en la Tabla I.

TABLA I

Fracción	Peso proteína por 20 Kg soja	Actividad lipoxidásica U/mg	Actividad peroxidásica U arb.	Inhibición hipertensión
0- 35 % sat	63,4	200	2	10
35- 40 % »	23,8	200	3	50
40- 50 % »	16,5	6400	3	90
50-100 % »	4,0	1800	6	99

Tal como puede verse en la tabla la actividad lipoxidásica mayor se encuentra en la fracción 40-50 % de saturación (en concordancia con THEORELL), si bien también la contiene en notable proporción la fracción 50-100 %. Por otra parte, de acuerdo con los datos que expondremos más adelante, las actividades antihipertensínica e hipotensora se encuentran sobre todo en las fracciones 40-50 % y 50-100 %. Teniendo en cuenta estas consideraciones y ante la imposibilidad de obtener cantidades relativamente grandes de producto más purificado empleando la técnica de separación electroforética preparativa de THEORELL, decidimos proceder al fraccionamiento cromatográfico de la totalidad de la fracción 40-50 % y 50-100 % empleando el nuevo absorbente de celulosa DEAE, que recientemente se ha demostrado de gran poder resolutivo en la separación de fracciones proteicas (11).

b) FRACCIONAMIENTO CROMATOGRÁFICO DE LA FRACCIÓN
40-100 % DE SATURACIÓN

Preparación de la columna. 50 gramos de celulosa DEAE (0,93 meq/gm.) se lavan repetidamente con agua y equilibran a pH 7 con ClH en solución a 0,02 M de ClNa. La suspensión se vierte en pequeñas adiciones a una columna de 4,5 cm. de diámetro y deja sedimentar por la gravedad, en la nevera a 5° C hasta obtener una columna de unos 28 cm. de altura.

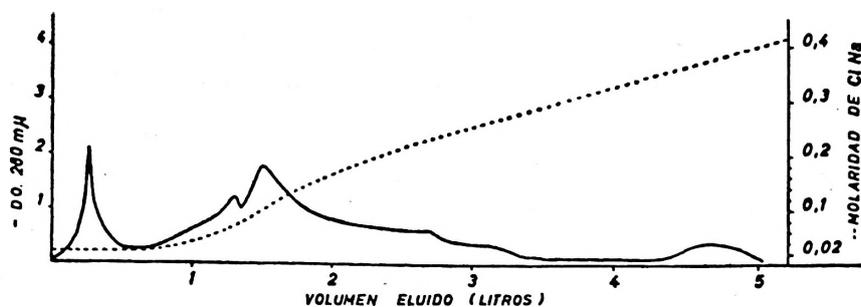


Fig. 1.— Diagrama de la fracción 40-100 obtenida mediante incremento continuo de la concentración en ClNa, que eluye la columna.

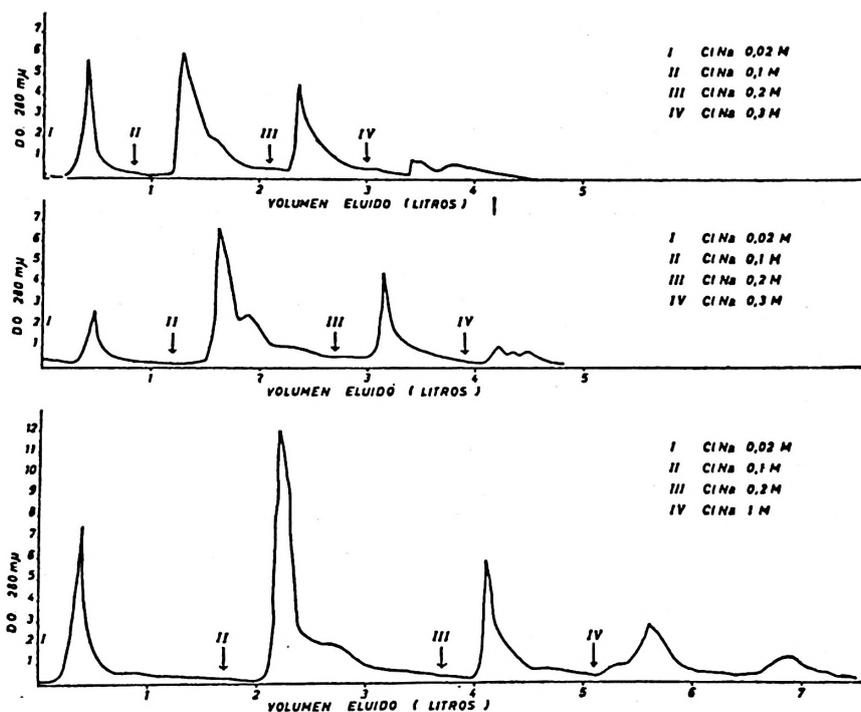


Fig. 2.— Diagramas de la fracción 40-100 obtenidos mediante incremento discontinuo de la concentración en ClNa.

Desarrollo del cromatograma. La fracción 40-100 % de saturación, dializada exhaustivamente (pierde $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ y pigmentos amarillos), se liofiliza. 10 gramos del sólido liofilizado se disuelven en 50 c.c. de ClNa 0,02 M; luego se vierten y aplican cuidadosamente en la columna. El desarrollo de la columna se ha verificado por los procedimientos :

a) Incrementando progresivamente de modo continuo la concentración en ClNa de la disolución, utilizando el método de FABRY (12). La velocidad de flujo fue de 300 ml/hora. La concentración salina se determina por medida conductimétrica de los eluatos. La concentración proteica de los mismos se determina por la D.O. a 280 m μ . El tipo de desarrollo obtenido es el de la figura 1.

b) Incrementando la concentración en ClNa de modo discontinuo, aplicando las disoluciones desde un embudo separador, con una velocidad de caída de 300 ml/hora. Las concentraciones empleadas fueron: 1) 0,02 M; 2) 0,1 M; 3) 0,2 M; 4) 0,3 M o 1,0 M. (Ver cromatogramas de la fig. 2).

Examen bioquímico del eluido. Los eluidos, recogidos en fracciones de 50 ó 100 ml., se examinan por determinación de las D.O. a 280 m μ y los grupos de fracciones constitutivas de las distintas zonas significativas se reúnen, dializando y liofilizándolas para recuperar las proteínas. De las aguas madres de diálisis no se recuperó ningún producto activo. Las diferentes proteínas separadas estaban libres de pigmentos excepto la fracción IV. Todas se sometieron a la electroforesis analítica sobre papel Whattman núm. 1 en tampón veronal pH 8,6 a la temperatura ambiente y 140 V, realizando después las densitometrías de las mismas. La actividad lipoxidásica se determinó por el método indicado frente al ácido linoleico como sustrato. La actividad peroxidásica se determina frente al guayacol.

Los resultados obtenidos se reúnen en las siguientes gráficas (fig. 3).

c) ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LAS FRACCIONES OBTENIDAS

Tal como señalamos al principio de este trabajo, habíamos observado que las diferentes acciones descritas para la fracción 40-100 % de las proteínas de la soja no corrían paralelas en todos los lotes. Al desdoblar nuestro producto en varias fracciones era lógico preguntarse si algunas de tales acciones podían ser asignadas específicamente a alguna de las fracciones.

En un trabajo ulterior (13) nos ocupamos extensamente de la actividad hipotensora relativa de la totalidad del producto y de cada una de las fracciones obtenidas a partir del mismo, así como de los posibles mecanismos de acción bioquímica que pueden explicar su acción.

Estamos investigando actualmente la acción de estos diversos productos sobre el tiempo de supervivencia medio del ratón y otros aspectos metabólicos que son asimismo modificados por

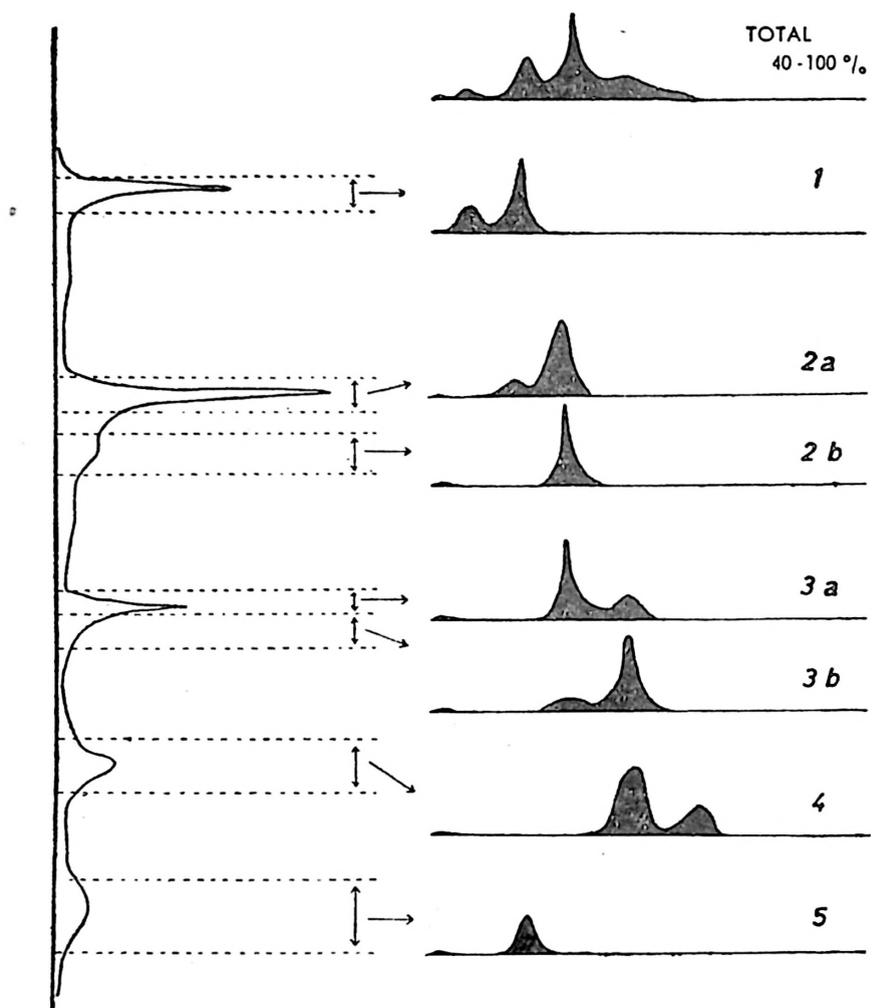


Fig. 3.—Electroforesis de las fracciones cromatografiadas. Los gráficos horizontales corresponden a las fracciones indicadas en el diagrama de los eluidos que figura verticalmente, a la izquierda.

la fracción 40-100. Con todo, a la vista de los resultados de que disponemos en este momento pueden sacarse ya interesantes deducciones que pueden ser resumidas en los puntos siguientes :

1.º) La fracción 1, la más tóxica de todas en el animal de experimentación, tiene gran actividad peroxidásica y aglutinante, destruye la adrenalina y carece de acciones lipoxidásicas, no es destructora de la hipertensión y no es hipotensora en el animal vivo.

2.º) Las fracciones 2 y 3 tienen la máxima actividad lipoxidásica y antiadrenalínica. La subfracción 3b es, además, antihipertensínica e hipotensora «in vivo».

3.º) La fracción 4 tiene acción exclusivamente antihipertensínica e hipotensora.

Discusión

Prosiguiendo nuestros estudios sobre la acción hipotensora que hemos demostrado ejercen diversos preparados de lipoxidasa, tanto obtenidos por nosotros como de otras procedencias, hemos podido observar que existían marcadas diferencias en cuanto se refieren a esta propiedad.

Profundizando en el estudio de este problema desde los puntos de vista bioquímico y farmacológico, pudimos separar varias fracciones proteicas con distintas actividades. Ello ha sido posible gracias a la utilización de la técnica cromatográfica con celulosa DEAE aplicado por vez primera a este preparado enzimático.

Mediante esta técnica se ha separado una fracción con actividad peroxidásica, aglutinante, antiadrenalínica y desprovista de acción hipotensora o antihipertensínica; de una fracción lipoxidásica altamente purificada y de gran actividad específica y otras fracciones con menor o nula actividad lipoxidásica y fuerte actividad antihipertensínica e hipotensora.

Como discutimos más ampliamente en un trabajo posterior, la acción hipotensora no parece deberse específicamente a un proceso de peroxidación, sino que se localiza en una fracción proteica cuya actividad experimental demostrable más evidente es su acción inhibidora del polipéptido hipertensina.

El que esta acción no se deba a un proceso de peroxidación era presumible desde el momento en que pudimos evidenciar que la catalasa no intervenía en ningún sentido en la inmediata aparición de un descenso tensional. Ya que en otros estudios hemos podido observar que la catalasa ejerce siempre alguna acción en aquellos procesos en cuya base se encuentra una formación de peróxidos.

Resumen

Prosiguiendo los estudios sobre la actividad hipotensora que hemos encontrado en varios preparados de Lipoxidasa, se describe un nuevo procedimiento de fraccionamiento de las proteínas de la soja que permite obtener separadamente una fracción con gran actividad hipotensora y prácticamente exenta de toxicidad — lo que hace

prever su posible utilización terapéutica — y una fracción lipoxidásica de gran actividad específica.

Summary

Some actions of «Lipoxidase» upon blood pressure. II. About the fractionation of soybean proteins

We have previously demonstrated the hypotensive effect of soybean lipoxidase preparates. However, as we progressed in our work, it became evident that different lots of our manufacture and samples of lipoxidase of others laboratories exhibited this activity in different degree. There was also evidence that the soybean fraction we had been using all along contained several proteins.

On chromatographing the «soybean lipoxidase» with DEAE-Cellulose we have been able to obtain several proteic fractions with different biological activities. As far as we know, this is the first time that such technique has been used for fractionation of this preparate.

In figures 2 and 3 we show the obtention of the fractions and the paper electrophoresis of each one of them.

One of the new fractions obtained (f. 1) has the peroxidasic, red cell agglutinating and some of the antiadrenalinic activity, but lacks anti-hypertensine and hypotensive activities.

Another one of this fractions (f. 2) is highly specific for lipoxidasic activity and showed little hypotensive activity.

Finally, other fractions (f. 4) carry the bulk of anti-hypertensine and hypotensive activities with little or no lipoxidasic activity.

We leave most of the discussion for next paper (13) where the hypotensive activity of the original products is compared with that of the various fractions. We like to advance here that on the light of this new findings, the hypotensive activity does not seem to depend on a peroxidasic effect, it would rather be identified with a proteic fraction that apparently inhibits the hypertensive polypeptide through a more direct mechanism.

The fact that this activity is not mediated by peroxidation could already be hinted from the observation that catalase does not interfere with the immediate appearance of hypotension, because in other studies we had seen that, usually, catalase interferes with processes that depend on the formation of peroxides.

Work is in progress on the effect of these fractions on the survival time of mice in closed vessel as well as on other metabolic properties of the fractions obtained.

Bibliografía

- (1) VALDECASAS, F. G., LAPORTE, J., y PUIG MUSSET, P.: «Some actions of Lipoxidase upon Blood pressure.» *I. Méd. Exper. (Basel)*, **2**, 30, 1960.
VALDECASAS, F. G., LAPORTE, J. y PUIG MUSSET, P.: «Acciones de la Lipoxidasa sobre la presión arterial. I.» *Rev. esp. Fisiol.*, **16**, 91, 1960.
- (2) PUIG MUSSET, P., LAPORTE, J., y VALDECASAS, F. G.: «Etude pharmacologique sur la Lipoxidase. Action sur la tension artérielle.» Com. at *Premier Symposium Européen d'Enzymologie Médicale*, Milán, 28-29 marzo 1960.
- (3) PUIG MUSSET, P., TORNER, M., MORATO, J. M., VALDECASAS, F. G., LAPORTE, J., y BUSQUETS, L.: «Lipoxidase and blood-pressure.» *Lancet*, **2**, 51, 1960.
- (4) PUIG MUSSET, P.: «Etude pharmacologique sur la lipoxidase.» *Thérapie (Paris)*, **15**, 199, 1960.
- (5) THEORELL, H., HOLMAN, R. H., y AKESON, A.: «Crystalline Lipoxidase.» *Acta Chem. Scand.*, **1**, 571, 1947.
- (6) KIES, M. W.: «Activation of soybean Lipoxidase.» *J. Biol. Chem.*, **170**, 121, 1947.
- (7) KOCH, R. B., STERN, B., y FERRARI, C. G.: «Linoleic acid and Trinolein as substrates for soybean Lipoxidase (s).» *Arch. Bioch. Biophys.*, **78**, 165, 1958.
- (8) PUIG MUSSET, P., LAPORTE, J., VALLS, J., y VALDECASAS, F. G.: «Sobre la toxicidad experimental de la Lipoxidasa.» Com. at *V Reun. Soc. Esp. Ciencias Fisiol.* Madrid, XII, 1959.
- (9) MAEHLY, A. C., y CHANCE, B.: «The assay of catalases and peroxidases.» *Met. Bioch. Anal.* **1**, 358, 1954.
- (10) TAPPEL, A. L., LUNDBERG, W. O., y BOYÉE, P. D.: «Effect of temperature and antioxydants upon the lipoxidase catalized oxidation of sodium linoleate.» *Arch. Bioch. Biophys.*, **42**, 293, 1953.
HAINING, J. L., y AXELROD, B.: «Induction period in the lipoxidase catalyzed oxidation of linoleic acid and its abolition by substrate peroxide.» *J. Biol. Chem.*, **232**, 193, 1958.
- (11) SOBER, H. A., y PETERSON, E. P.: «Chromatographic evaluation of protein mixtures.» *Greenstein Memorial Symposium*. Acad. Press.
MORELL, A. G., y HERBER, L.: «Heterogenety of human ceruloplasmin.» *Science*, **131**, 930, 1960.

- (12) FAHEY, J. L., MCCOY, P. F., y GOULLAN, M.: «Chromatography of serum proteins in normal and pathologic sera.» *J. Clin. Invest.*, **37**, 272, 1958.
- (13) VALDECASAS, F. G., LAPORTE, J., y PUIG MUSET, P.: «Some actions of Lipoxidase upon Blood pressure. III.» *Med. Exper. (Basel)*, en prensa.
- VALDECASAS, F. G., LAPORTE, J., FERNÁNDEZ, N. y PUIG MUSET, P.: «Acciones de la Lipoxidasa sobre la presión arterial. III. Acción hipotensora y actividad anti-hipertensínica». *Rev. esp. Fisiología*, (en prensa).