

Departamento de Bioquímica
Facultad de Farmacia. — Barcelona

Localización de enzimas en las fracciones proteínicas de la sangre.

I. Leucinaminopeptidasa

por
E. Concustell-Bas y V. Villar-Palasi

(Recibido para publicar el 11 de octubre de 1962)

El interés actual por las diversas formas moleculares de las proteínas activas nos indujo al estudio de las fracciones cromatográficas de una serie de sueros normales, con el fin de aportar nuevos datos sobre la distribución de los enzimas que han sido caracterizados en el suero sanguíneo. En la presente nota se exponen los resultados obtenidos en la localización de la leucinaminopeptidasa. En trabajos sucesivos se dará cuenta de los datos alcanzados en el estudio de otros enzimas.

Las cifras de actividad de este enzima son elevadas, en una amplia gama de enfermedades que se relacionan con el páncreas y el sistema hepatobiliar, así como en metástasis ósea y hepática (5). También debe ser tenido en cuenta el aumento en el embarazo avanzado (1) y en los procesos cutáneos inflamatorios extensos (2).

El aumento de actividad en el suero es ocasionada, según las opiniones más generalizadas, al ser liberado el enzima de los tejidos que lo contienen, después de la lesión correspondiente, así como por la obstrucción de las vías biliares.

Material y métodos

Se han cromatografiado sueros normales mediante columna de DEAE-celulosa, según los métodos descritos por SOBER

y PETERSON (6), empleando para la separación un gradiente de molaridad creciente desde 0,01 M a 0,3 M de fosfatos mono y disódico y de *pH* 7,0 constante, óptimo para la determinación de la actividad enzimática LAP. La medición de dicha actividad se ha efectuado siguiendo, en líneas generales, la técnica desarrollada por GOLDBARG y RUTENBURG (3) para suero total, si bien ha tenido que ser modificada con el fin de apreciar la actividad enzimática en las fracciones del cromatograma, en las que es lógico suponer una distribución mucho más diluida de leucinaminopeptidasa.

Esta técnica se fundamenta en la siguiente reacción, catalizada por la leucinaminopeptidasa :



Se determina, por tanto, la actividad midiendo la cantidad de naftalina formada después del período de incubación necesario, combinando la β -naftilamina liberada con 3-cloro-4-nitranilina diazotada.

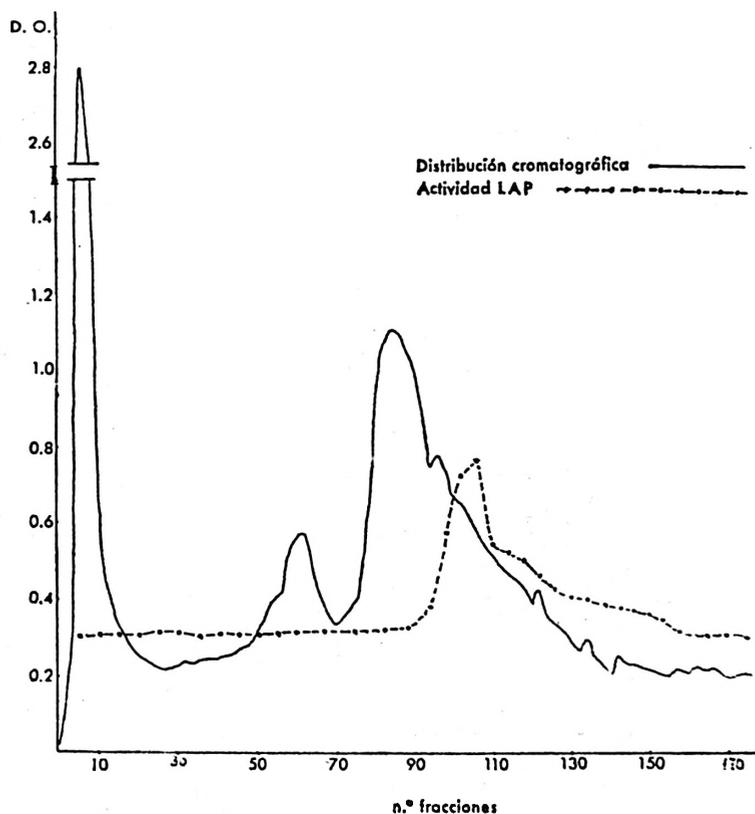
En tubos de ensayo, o mejor de centrífuga, de unos 20 ml de capacidad, se pipetea 0,1 ml de cada una de las fracciones problema a ensayar. Se colocan en un baño regulado a 37° y cuando han adquirido la temperatura del mismo se añade a cada uno de los tubos 0,3 ml de solución de clorhidrato de L-leucil- β -naftilamida $2,73 \times 10^{-4}$ M en solución amortiguadora de fosfatos 0,05 M y *pH* 7,2, previamente calentada a la temperatura del baño con el fin de no alterar la del conjunto ; se mezcla bien y se deja una hora exactamente en el baño. Transcurrido este tiempo se añaden 0,3 ml de ácido perclórico al 6 % (p/v), con lo cual se detiene la reacción ; en la práctica el precipitado de proteínas es ínfimo debido a la gran dilución a que se encuentran las mismas, por lo que no es estrictamente necesario centrifugar, o, en todo caso, sólo aquellos tubos que presenten una ligera opalescencia. Se toma la totalidad del líquido resultante después de la adición del ácido perclórico y se añaden 0,75 ml de solución al 1 % de Eçhtrot GL (3-cloro-4-nitranilina diazotada), se mezcla bien y se dejan transcurrir 10 minutos a la temperatura ambiente, adicionando a continuación 4 ml de acetato de etilo ; se cierran los tubos con tapón de corcho y se agita fuertemente centrifugando a continuación los tubos cerrados para facilitar la separación del acetato de etilo del medio acuoso. Con cubetas secas, o bien limpias con alcohol, se determina la D.O. del acetato de etilo sobrenadante con espectrofotómetro Beckman a 492 $m\mu$ o en su defecto, si se emplea un fotocolorímetro ordinario, utilizando el filtro que proporcione la longitud de onda más similar

a la arriba indicada, leyendo contra el valor en blanco, el cual contiene todos los reactivos excepto el problema.

Previo a todo cromatograma se han efectuado determinaciones de la actividad enzimática en suero total, obteniéndose valores que oscilan entre los límites de normalidad siguientes: 150-350 Unidades LAP por ml de suero. También se ha comprobado la normal distribución proteínica en cada suero antes de proceder a su separación cromatográfica, mediante la aplicación rutinaria de electroforesis y determinación de proteínas totales.

Resultados

En cinco sueros sanguíneos correspondientes a individuos normales, en los que se realizó la distribución cromatográfica de proteínas, se halló la actividad LAP concentrada en un solo pico, tal como se expresa en la gráfica adjunta. Este máximo corresponde precisamente a la región cromatográfica que abar-



ca la postalbúmina y las alfa globulinas, como puede apreciarse en la gráfica adjunta.

La presencia de un solo máximo de actividad en sueros normales contrasta con los resultados hallados con sueros patológicos, en los que se observa una distribución de la actividad LAP en uno, dos y hasta tres picos diferentes de diversa localización.

Discusión

Los resultados obtenidos establecen claramente que en sujetos normales sólo existe una forma activa de leucinamino-peptidasa entre las fracciones cromatográficas séricas. Por el contrario, en diversos trastornos patológicos se aprecia una pluralidad de distribución de esta actividad enzimática.

Utilizando métodos electroforéticos, KOWLESSAR y HAEFFNER (4) también han localizado la actividad LAP, en sueros normales, en una sola zona comprendida entre la postalbúmina y la globulina alfa-2. Asimismo destacan la diversidad de zonas en que se localiza en sueros patológicos de distinta índole.

Existe, por tanto, una completa concordancia entre los resultados obtenidos por procedimientos electroforéticos y las técnicas cromatográficas de mayor precisión utilizadas por nosotros.

Con los datos actualmente disponibles no se puede precisar en forma concluyente, si las distintas fracciones que se aprecian en circunstancias patológicas, corresponden a auténticas formas isoenzimáticas. En este sentido apunta, sin embargo, el hecho de que la aparición y localización de formas heterólogas está en íntima dependencia del tipo de afección (hepática, pancreática, etc.).

Resumen

Mediante cromatografía en columna con DEAE-celulosa, se ha llevado a cabo la separación de proteínas en una serie de sueros pertenecientes a individuos normales.

Efectuada la determinación sistemática de actividad LAP entre las fracciones cromatográficas, ésta se ha localizado en un solo pico, situado precisamente en la región cromatográfica posterior a la albúmina y simultánea con las alfa globulinas, lo que hace presumir la existencia de una sola forma molecular activa de leucinaminopeptidasa en sueros normales.

Por otra parte, en sueros patológicos diversos, se ha observado una distribución de la actividad LAP en dos y hasta tres picos diferentes.

Summary

Enzymes localization in serum protein fractions. — I. Leucine aminopeptidase

Chromatographic separation of proteins by DEAE-cellulose in a number of normal sera has been performed. Tested the LAP activity in the different fractions, it has been localized in only one pick, placed in the region of the post-albumin and alpha globulins; it shows the presence of an unic active molecular form of leucine aminopeptidase in normal sera.

On the other hand, it has been observed a LAP activity distribution in two and even three picks in different pathological sera.

Bibliografía

- (1) BRAUN-FALCO, O. and SALFELD, K. : *Klin. Wschr.*, **37**, 231. 1959.
- (2) BRAUN-FALCO, O. and SALFELD, K. : *Arch. Klin. exp. Derm.*, **205**, 1149. 1957.
- (3) GOLDBARG, J. A., and RUTENBURG, A. M. : *Cáncer*, **11**, 283. 1958.
- (4) KOWLESSAR, O. D., HAEFFNER, L. J. and RILEY, E. M. : *Ann. N. Y. Ac. Sc.*, **94**, 655. 1961.
- (5) PINEDA, E. P., GOLDBARG, J. A., BRANKS, E. M. and RUTENBURG, A. M. : *Gastroenterology*, **38**, 696. 1960.
- (6) SOBER, H. A., GUTTER, F. J., WYCKOFF, M. M. and PETERSON, E. A. : *J. Am. Chem. Soc.*, **78**, 756. 1956.