

Departamento de Bioquímica
Facultad de Farmacia. — Barcelona

Localización de enzimas en las fracciones proteínicas de la sangre. II.- Fosfatasas

por

E. Concustell-Bas, J. Torrents-Pont y V. Villar-Palasi

(Recibido para publicar el 1 de febrero de 1963)

En un trabajo anterior (2) se han estudiado las fracciones cromatográficas obtenidas a partir de sueros normales, en relación con la localización en las mismas de la leucinaminopeptidasa y la eventual presencia de formas moleculares múltiples de dicho enzima. En la presente nota, continuando en la línea iniciada anteriormente, se incluyen los resultados obtenidos en la localización de las fosfatasas alcalinas y ácidas.

Dentro del grupo enzimático constituido por las fosfomonoesteerasas y en contraste con enzimas como la glucosa-6-fosfatasa, de elevada especificidad de sustrato, se hallan las genéricamente denominadas fosfatasas que manifiestan su actividad hidrolítica sobre numerosos ésteres fosfóricos. El estudio cromatográfico de estas fosfatasas inespecíficas constituye el objeto del presente trabajo.

Se han investigado separadamente las fosfatasas alcalinas y ácidas, con el fin de proceder a su localización independiente en el cromatograma, así como a la determinación de las posibles formas moleculares múltiples dentro de cada grupo.

Fosfatasas alcalinas. — El suero normal contiene de 3,3 a 12,9 unidades King-Armstrong por 100 ml, encontrándose cifras bastante más elevadas en los niños, especialmente en el período de máximo crecimiento. Se han encontrado tasas elevadas en un buen número de enfermedades; en osteopatías de diversa índole se alcanzan con frecuencia valores de 100 unidades y no es raro sobrepasar en ocasiones las 200; en los tumores óseos, las cifras halladas dependen del tipo de neoformación ósea que se produzca. En muchas ictericias el nivel de las fosfatasas alcalinas tiende a ser paralelo a la bilirrubina, hallándose tasas anormales en diferentes tipos de hepatitis, en cirrosis, ictericia tóxica, etc.

Fosfatasa ácida. — Los niveles normales de fosfatasa ácida en suero oscilan dentro de unos márgenes relativamente restringidos; estos valores están comprendidos entre 0 y 4 unidades King-Armstrong por 100 ml, encontrándose indistintamente en ambos sexos y en todas las edades. Las fosfatasa ácidas, procedentes de diversos tejidos, que constituyen el pequeño nivel normalmente existente en el suero, no son de origen prostático, como se ha demostrado al inactivar la fosfatasa prostática por la acción del alcohol (3), siendo así que la fosfatasa normalmente presente en el suero no se altera frente al mismo. Descartando la posibilidad de que las fosfatasa ácidas determinadas procedan de los eritrocitos, utilizando para los ensayos sueros exentos de hemólisis, cabe preguntarse si la fosfatasa prostática y la normalmente presente en el suero representan dos o más formas moleculares distintas de un mismo enzima.

Material y métodos

Fosfatasa alcalina. — Se ha partido en todos los casos de sueros normales, con valores promedio comprendidos entre 6 y 12 unidades King-Armstrong en suero total. Estos sueros se han cromatografiado con DEAE-celulosa (Serva), empleando la técnica descrita por SOBER y PETERSON (6); se utiliza un gradiente mixto de molaridad y pH. Las soluciones amortiguadoras inicial y final de fosfatos mono y disódico son 0,01 M y 0,3 M y el pH igual a 8,0 y 4,5 respectivamente.

Para la determinación de la actividad fosfatásica en las distintas fracciones se han seguido la técnica que se basa en la medición del fenol liberado por hidrólisis del fenilfosfato disódico empleado como sustrato (4).

El pH óptimo de actividad para las fosfatasa alcalinas está situado en los alrededores de 10. Dada la presencia de amortiguadores en las fracciones procedentes de la separación cromatográfica, ninguna posee este pH óptimo, estando comprendida alguna de ellas incluso en la zona ácida. Es necesario, por tanto, normalizar dichos valores uniformemente a fin de operar en condiciones idénticas. Previamente a toda determinación se han dializado, utilizando saquitos de celofán, todas las fracciones contra solución amortiguadora de carbonato-bicarbonato sódico 0,1 M y pH 9,8 en nevera a 4° C durante 24 horas, cambiando la solución por lo menos tres veces durante este tiempo.

En un baño maría regulado a 37° y en tubos de ensayo o de centrifuga, se pipetea 3 ml de solución 0,01 M de fenilfosfato disódico y 0,2 ml de solución al 4 % de cloruro magnésico; cuando han adquirido la temperatura del baño se añade a cada uno de los tubos 1 ml de la solución problema, se mezcla bien y se

deja en el baño exactamente durante 30 minutos ; transcurrido este tiempo se añaden 2,5 ml del reactivo de fenoles de Folin y Ciocalteu. Paralelamente a estas operaciones se prepara un tubo control agregando 1 ml de agua en lugar de problema.

De cada uno de los tubos se toman 4 ml del líquido sobrenadante, previa centrifugación, y se añade 1 ml de solución de carbonato sódico al 20 %. Se colocan de nuevo los tubos en el baño durante 15 minutos y se efectúa la lectura colorimétrica a 680 m μ o empleando el filtro rojo más adecuado. Como blanco se toman 2,8 ml de agua, 1,2 ml del reactivo de fenoles y 1 ml de solución de carbonato sódico al 20 %.

Fosfatasas ácidas. — En los ensayos efectuados con suero normal se tropezó con la dificultad de hallar sueros que, siendo realmente normales, presentaran un nivel de actividad fosfatásica apreciable, puesto que, si bien los límites normales están comprendidos entre 0 y 4, la mayor parte de los sueros inicialmente investigados presentaron una tasa de actividad excesivamente baja. Se han empleado sueros normales con tasas cercanas al límite máximo establecido y sueros procedentes de individuos afectos de carcinoma prostático con valores superiores a 6 unidades King-Armstrong, corroborando en todos los casos el diagnóstico por el posterior desarrollo clínico de los individuos investigados. Se ha tenido la precaución de trabajar con sueros sin indicio alguno de hemólisis y se ha evitado emplear sueros obtenidos después de palpación prostática o examen rectal.

Previamente a toda determinación se dializaron todas las fracciones sujetas a ensayo contra solución amortiguadora 0,1 M de ácido cítrico-citrato sódico a pH 4,9. El tiempo de incubación fue de dos horas, siendo el proceso subsiguiente idéntico al seguido para las fosfatasas alcalinas.

Resultados

Fosfatasas alcalinas. — De siete sueros sanguíneos examinados, correspondientes a individuos normales, cinco mostraron una actividad fosfatásica alcalina distribuida en dos máximos (Figura 1). El primero de ellos aparece superpuesto a la fracción cromatográfica que corresponde en un 85-90 % de contenido proteico a β -globulina y el resto a γ -globulina. El segundo pico emerge inmediatamente después, estando localizado en la zona cromatográfica inmediatamente anterior a la albúmina. Es de señalar que la actividad esterásica se muestra más patente en este segundo pico, hasta tal punto que dos de los sueros investigados presentaron un solo máximo coincidente con el segundo pico señalado anteriormente.

Fosfatasas ácidas. — Se han cromatografiado cinco sueros

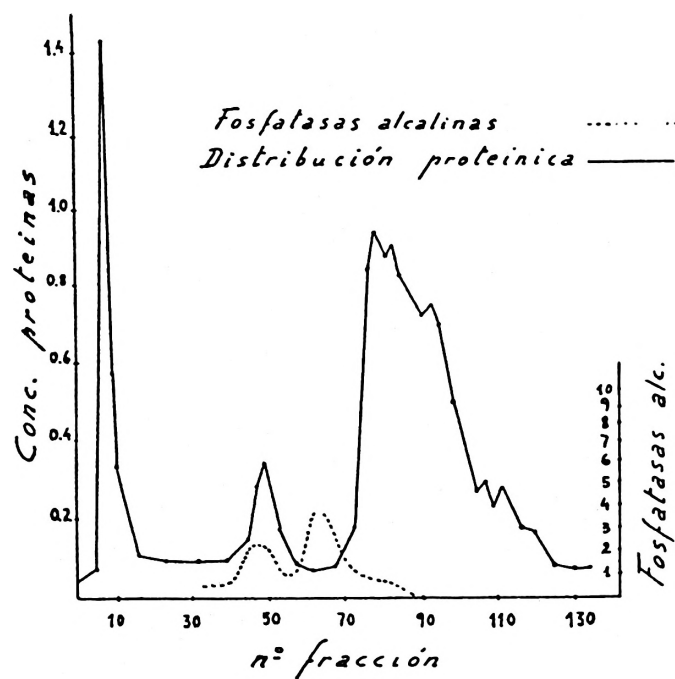


FIG. 1. Cromatograma de suero normal. Localización de las fosfatasas alcalinas.

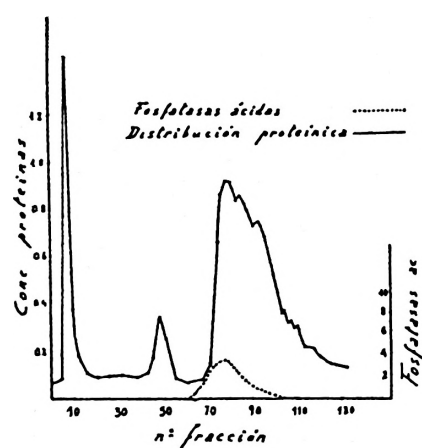


FIG. 2. Localización cromatográfica de las fosfatasas ácidas.

normales y cuatro sueros patológicos procedentes de sujetos afectos de carcinoma prostático. En todos los casos se ha hallado la actividad fosfatásica localizada en un solo pico (fig. 2), correspondiendo éste a un máximo de actividad, presente tanto en sueros normales como patológicos, salvando naturalmente la diferencia cuantitativa observada en ambos casos. Este máximo de actividad ha sido localizado en la zona cromatográfica correspondiente a la aparición de la albúmina y α -globulinas.

Discusión

Los resultados obtenidos permiten establecer claramente una diferenciación cromatográfica entre las fosfatasas alcalinas y ácidas, destacando la diversidad de zonas en que se localizan ambos tipos de enzimas.

La aparición en sueros normales de dos máximos de actividad fosfatásica alcalina, hace presumible la presencia de isoenzimas de distinta procedencia tisular, correspondiendo, por lo menos, a dos formas de distinta estructura en la zona molecular no relacionada con la actividad esterásica.

En concordancia con los datos anteriormente expuestos, AHMED y KING (1), empleando métodos cromatográficos sobre papel, han hallado R_f distintos para fosfatasas alcalinas de diferente origen. Por otra parte, utilizando antisueros específicos frente a las fosfatasas intestinal y ósea, se ha demostrado que ambas poseen diferente estructura antigénica y que una proporción muy considerable de las mismas es de procedencia ósea (5).

Empleando procedimientos electroforéticos, algunos autores han señalado la aparente heterogeneidad de las fosfatasas ácidas prostáticas. Mediante el procedimiento cromatográfico utilizado por nosotros, se ha detectado en todos los casos un solo pico de actividad, el cual probablemente es subfraccionable re-cromatografiando las fracciones en que está incluido. Aún suponiendo un fraccionamiento posterior, es de señalar, no obstante, la localización superpuesta de las fosfatasas ácidas determinadas en sueros normales y patológicos, lo cual parece apuntar la existencia de formas moleculares muy semejantes, sin que se pueda precisar de manera concluyente que correspondan a auténticas formas isoenzimáticas.

Resumen

Se ha llevado a cabo el fraccionamiento de proteínas en una serie de sueros procedentes de sujetos normales y afectos de carcinoma prostático mediante columnas de DEAE-celulosa.

La determinación sistemática de fosfatasa alcalina en las fracciones cromatográficas obtenidas, ha dado por resultado la localización de las mismas

en dos picos, correspondiendo a dos isoenzimas de la misma actividad esterásica. Los máximos de actividad aparecen con la β -globulina y en la zona inmediata anterior a la albúmina.

La localización de la actividad fosfatásica ácida en sueros normales y patológicos, ha correspondido a un solo máximo de actividad en ambos casos, situado en la zona cromatográfica de la albúmina y las α -globulinas.

Summary

Enzymes localization in serum protein fractions. — II Phosphatases

Chromatographic separation of proteins by DEAE-cellulose has been carried out in a number of normal and pathological sera.

Alkaline phosphatases have been localized in two picks, corresponding to isozymes of this enzymatic activity. One of them appears with β -globulin fraction, the other between β -globulin and the first albumin fractions.

The acid phosphatase activity has appeared in normal and pathological sera in only one pick, corresponding in both cases to the albumin and α -globulin region.

Bibliografía

- (1) AHMED, Z., ABUL FADL, M. and KING, E. J. : *Biochim, et Biophys. Acta*, **36**, 228, 1959.
- (2) CONCUSELL-BAS, E. y VILLAR-PALASÍ, V. : *R. esp. Fisiol.*, **18**, 151, 1962.
- (3) HERBERT, F. K. : *Quart. J. Med.*, **15**, 221, 1946.
- (4) KING, E. J. and ARMSTRONG, A. R. : *Canad. Med. Assoc. J.*, **31**, 376, 1934.
- (5) SCHLAMOWITZ, M. : *Ann. N. Y. Ac. Sc.*, **75**, Art. 1, 373, 1958.
- (6) SOBER, H. A., GUTTER, F. J., WYCKOFF, M. and PETERSON, E. A. : *J. Am. Chem. Soc.*, **78**, 756, 1956.