

Departamento de Bioquímica  
Facultad de Farmacia — Barcelona

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

por

E. Concustell-Bas, J. Torrents y V. Villar Palasí

(Recibido para publicar el 3 de agosto de 1964)

Continuando en la línea iniciada con los trabajos anteriormente publicados (1, 2), se incluyen en la presente nota los resultados obtenidos en la distribución cromatográfica de amilasa sérica.

En la literatura correspondiente se halla una verdadera sucesión de trabajos relacionados con la purificación y cristalización de  $\alpha$ -amilasa de páncreas, hígado, microorganismos, etc., pudiendo considerarse el grupo por ellas constituido bastante homogéneo en relación con una serie de propiedades como son: el peso molecular, la solubilidad, la magnitud de su actividad específica. Esto, no obstante, las  $\alpha$ -amilasas de distinto origen difieren entre sí en variados aspectos, encontrándose descritas variaciones en su composición química, en su resistencia a la desnaturalización y en su capacidad de fijación de calcio. Más recientemente, y merced a las técnicas inmunológicas, se han aportado nuevas indicaciones sobre las diferencias estructurales existentes entre ellas (5, 6). Admitida, pues, la heterogeneidad de las  $\alpha$ -amilasas de diverso origen tisular, se ha querido con el presente trabajo estudiar la eventual existencia de isozimas séricas, así como

la posible asociación de la amilasa con otras proteínas séricas bien definidas.

### Material y métodos

*Fraccionamiento cromatográfico.* Se han utilizado columnas de DEAE-celulosa (7), empleando como sistema fluente soluciones amortiguadoras de fosfato mono y disódico, las cuales, mediante el adecuado dispositivo, proporcionan un gradiente de molaridad en sentido ascendente desde 0,01 hasta 0,3 M. El pH se ha mantenido constante e igual a 7. Únicamente se han cromatografiado sueros de individuos normales clínicamente y con tasas de amilasemia comprendidas entre los márgenes establecidos como no patológicos. No se han investigado sueros de enfermos puesto que la presencia de amilasas ocasionales, como respuesta a la inflamación o intoxicación de un determinado órgano, podría modificar los datos de distribución normal que se pretenden alcanzar.

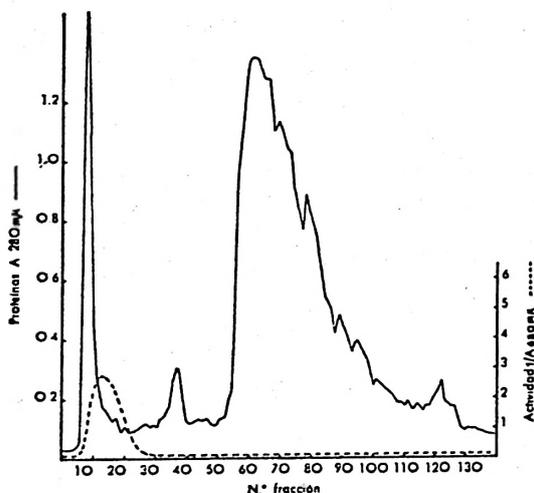
*Determinaciones enzimáticas.* Para la valoración rutinaria de la actividad amilásica en las sucesivas fracciones del cro-

matograma se ha seguido, previa concentración de aquéllas al vacío, la técnica de HUGGINS y RUSSELL (4), basada en la medición del color que se produce al añadir muestras de almidón y problema, antes y después de la digestión, a una solución de yodo.

Los resultados obtenidos se han comprobado asimismo mediante el empleo de la técnica descrita por SOMOGYI (8), más sensible aunque más engorrosa dado el elevado número de tubos en los que debe efectuarse la medición.

### Resultados

De todos los enzimas hasta el presente estudiados, es éste el de aparición más precoz en el desarrollo del cromatograma. En todos los casos investigados



surge la actividad amilásica concentrada exclusivamente en un solo máximo ya en las primeras fracciones. Este máximo surge precisamente en la zona en donde se localiza la  $\gamma$ -globulina. La figura ilustra gráficamente lo indicado, siendo de notar la excentricidad, observada en todos los casos, que existe entre los dos ejes máximos correspondientes a la  $\gamma$ -globulina y a la amilasa.

### Discusión

Los resultados permiten establecer claramente una analogía en el comportamiento cromatográfico de las  $\gamma$ -globulinas y el enzima estudiado. En este sentido, los datos alcanzados por otros autores (3, 19) mediante la aplicación de técnicas electroforéticas, coinciden plenamente con lo anteriormente expuesto. Es también evidente, dada la reiteración de datos que apoyan esta conclusión, que únicamente existe una forma molecular de amilasa en suero normal; el posterior estudio de sueros con elevada amilasemia, pancreatitis aguda y crónica, por ejemplo, puede arrojar nuevos datos y de esta forma permitir establecer una posible vinculación entre la aparición de otras formas activas y un proceso patológico determinado.

### Resumen

Mediante la aplicación de métodos cromatográficos con DEAE-celulosa, se han fraccionado sueros normales e identificado posteriormente la actividad amilásica en las fracciones obtenidas.

Se ha hallado dicha actividad localizada en todos los casos juntamente con las fracciones en las que aparecen las  $\gamma$ -globulinas, no habiéndose apreciado más que la existencia de una sola forma molecular de dicho enzima sérico.

### Summary

Localization of enzymes in the proteinic fractions of the blood. II. Amylases

By application of chromatographic methods with DEAE-celulose, normal serum has been fractionated and the amylasic activity of each fraction evaluated.

In every case said activity was found located together with  $\gamma$ -globulin-containing fractions, no more than one molecular form of this serum enzyme having been appreciated.

**Bibliografía**

- (1) CONCUSTELL-BAS, E. y VILLAR-PALASÍ, V. : *R. esp. Fisiol.*, **18**, 151, 1962.
- (2) CONCUSTELL-BAS, E., TORRENTS PONT y VILLAR-PALASÍ, V. : *R. esp. Fisiol.*, **19**, 25, 1963.
- (3) CHRYSZKIEWYCZ, A. : V International Congress of Biochemistry, Actas, Moscú.
- (4) HUGGINS, C. D. and RUSSELL, P. S. : *Ann. Surg.*, **128**, 668, 1948.
- (5) MCGEACHIN, R. L. and REYNOLDS, J. M. : *J. Biol. Chem.*, **234**, 1456, 1959.
- (6) MCGEACHIN, R. L. and REYNOLDS, J. M. : *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **94**, 996, 1961.
- (7) SOBER, H. A. and PETERSON, E. A. : *J. Am. Chem. Soc.*, **78**, 756, 1956.
- (8) SOMOGYI, M. : *J. Biol. Chem.*, **125**, 399, 1938.
- (9) WILDING, P. : *Clin. Chim. Acta*, **8**, 918, 1963.

