

5. 1. 1956
616(04)

UNIVERSIDAD NACIONAL DE MEXICO
FACULTAD DE QUIMICA BERZELIUS

ANALISIS CUANTITATIVO DE UROPEPSINA

T E S I S

que para su examen profesional de
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

presenta:

ARACELI SANCHEZ GONZALEZ

México, D. F.

1956



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

A. M. D. G.

A la memoria de mi adorado Padre con veneración.

A MI MADRE

Con todo mi cariño y gratitud

A MIS HERMANOS Y TIOS.

Cariñosamente.

A la Facultad de Química Berzelius y a su digno Director
Químico Sr. Dn. Luis M. Vereá.

A la Srta. Q. F. B. Ysabel Escobar Berea
por su definitiva y valiosa ayuda para
la elaboración de ésta Tesis.

Al Sr. Dr. Dn. Salvador Zubirán Director
del Hospital de Enfermedades de la
Nutrición.

Por las facilidades que me brindó para
llevar a cabo éste trabajo.

Cariñosamente a mis tíos Clara y Vicente.

Afectuosamente a todos mis Maestros.

A mis familiares y amigos.

S U M A R I O

- I.—Importancia de la Uropepsina.
- II.—Historia.
- III.—Generalidades.
- IV.—Revisión de Métodos.
- V.—Método usado:
 - a).—Principio.
 - b).—Reactivos.
 - c).—Material.
 - d).—Técnica.
 - e).—Cálculos.
 - f).—Normales.
 - g).—Casos estudiados
- VI.—Conclusiones.
- VII.—Bibliografía.

IMPORTANCIA DE LA UROPEPSINA:

La medida de la cantidad de pepsinógeno en la orina (uropepsinógeno), ha sido recomendada como una prueba cuantitativa para la investigación de la función secretora gástrica.

Clínicamente ha sido aplicada también para el estudio de úlceras: gástrica, duodenal y yeyunal; así como también en algunos casos de cáncer gástrico, ciertos casos de trastornos endocrinos, como la enfermedad de Addison, etc.

El objeto de este trabajo es evidenciar el uso que en la clínica tiene la dosificación de uropepsina en los casos anteriormente expuestos, además de la facilidad que presta su cuanteo en el control de los quimismos gástricos en el estómago post-operado en el cual la succión presenta ciertas dificultades técnicas.

La excreción de uropepsina en la orina, refleja la actividad péptica del estómago, ya que la uropepsina deriva de la secreción de pepsinógeno en la sangre directamente de las células pépticas. Posteriormente es transportado a los riñones y excretado por la orina en forma de uropepsinógeno. Al acidificar la orina (pH comprendido entre 1.5 a 2) este uropepsinógeno es convertido a uropepsina y cuantado como tal.

La cantidad de uropepsina excretada mide la producción de pepsinógeno del estómago y pone de manifiesto la discrepancia de la enzima, antes y después de una gastrectomía total. La uropepsina ha demostrado ser un índice de la secreción de pepsina del jugo gástrico y representa una fracción constante de la secreción gástrica, aproximadamente 1%.

En la presencia de una lesión ulcerativa gástrica, la excreción de uropepsina se encuentra en los límites normales máximos o sobrepasando en algunos cientos de unidades este límite. Si se trata de úlcera duodenal, los valores reportados son superiormente más elevados a los dados por el tipo de úlcera anterior. En el caso de

cáncer gástrico los valores pueden ser normales en el límite mínimo o bien ser cifras de escasas unidades.

La anemia perniciosa da valores mas bajos que los reportados en casos de cáncer gástrico, sin embargo las cifras de uropepsina son perfectamente diferenciadas en el caso de anemia perniciosa, por ser mínimas.

El nivel de uropepsina tiene un valor considerable en la diferenciación de las úlceras duodenales y de las várices de esófago cuando hay ulceraciones masivas del tracto gastrointestinal superior.

La excreción normal de uropepsina varia según la edad, sin embargo no parece tener importancia la diferenciación del sexo.

Esta tesis se orienta al estudio de la uropepsina en pacientes con úlcera gástrica, duodenal y cáncer gástrico únicamente. Los valores normales se obtuvieron de personas sin padecimientos gastrointestinales ni endocrinos y se efectuaron sobre muestras de orina de 24 horas o bien de micciones separadas en periodos de 12 horas cada muestra.

En la mayoría de los casos clínicos estudiados se tomó como dato importante la acidez libre reportada por la succión gástrica del individuo en estudio, a fin de relacionar la excreción de uropepsina con la producción de acidez libre.

II

HISTORIA

La enzima uropepsina fué descubierta alrededor de 1860 por Brücke, el cual pensando que era una pepsina estudió su actividad proteolítica en un substrato altamente ácido. No fué sino hasta 1881 cuando Grutzner (bioquímico de Nashville Tenn.) confirmó su presencia en la orina por medio de su método de fibrina para la determinación de pepsina gástrica y el que adoptó posteriormente para usarlo en orina.

Después de este tiempo, investigadores ocasionales han reportado información concerniente a la naturaleza de ésta enzima, sus principios y factores que rigen su aparición en la orina.

Posteriormente investigadores tales como Farnsworth, Speer y Alt, han presentado trabajos bastante recientes; pero cuya exactitud se presta aún a discusión.

Bucher ha resumido en una excelente obra todos éstos trabajos, muchos de los cuales requieren aún de confirmación.

El nombre de uropepsina se debe a Bendersky y le puso precisamente uropepsina por la identidad tan grande con la pepsina y el prefijo uro, por encontrarse en la orina.

Los primeros investigadores que estudiaron la uropepsina hicieron sus trabajos antes del descubrimiento del pepsinógeno y su posterior conversión a pepsina por medio del ácido y consideraron a la uropepsina como "pepsina libre".

Oppenheimer define a las pepsinas como proteasas que actúan sobre substratos de alto peso molecular a un pH óptimo de 2.0 y en donde el substrato se encuentra casi enteramente disociado como base.

Para cuantearla se idearon varios métodos; pero en la actualidad, casi todos ellos se encuentran en desuso por haber sido refutados como inexactos. Entre éstos métodos se encuentra los usados por Grutzner, cuyo substrato era fibrinógeno, Jacoby Solm

que usaba caseína, etc.

Kolibb y Falk, discutieron en sus trabajos sobre el espécimen de orina que debía usarse para la investigación y cuanteo de la uropepsina, llegando a la conclusión de que lo ideal sería trabajar sobre muestras completas de 24 horas para evitar errores. Los estudios de Bucher y Farnsworth tienen notas relacionadas con éstos puntos.

Frouin y Delezzeno encaminaron sus estudios a investigar en que clase de orinas se encontraba la uropepsina, en cuales estaba ausente y cuando cambiaba su cantidad habitual de excreción.

Ellinger y Scholtz pensaron que la uropepsina era una mezcla compuesta de pepsina y pepsinógeno, porque en sus estudios compararon al alcalinizar levemente el jugo gástrico de perro, la estabilidad de éstas enzimas.

Herriot, más tarde demostró que la "pepsina" de la orina era una enzima proteolítica diferente de la pepsina y del pepsinógeno, sus trabajos se encuentran recopilados en una valiosa obra experimental.

Gottlieb afirmó, en sus trabajos de investigación, que la uropepsina es un pepsinógeno exclusivamente, que es además activa por el substrato ácido en los procedimientos de ensayo porque el pH de la orina normal es reducido raramente más abajo de 5.1

III

GENERALIDADES

La uropepsina es una enzima de actividad proteolítica y de una reacción fuertemente ácida. Se encuentra siempre en la orina del hombre y animales normales donde crecimientos bacterianos y restos celulares están excluidos. Solamente en animales de sangre fría: rana y salamandra se reporta como excreta de uropepsina la orina. No se encuentra tampoco en orinas de perros gastrectomizados o de pacientes con aquilia gástrica o anemia perniciosas, así como en aquellos que han sufrido gastrectomías totales.

Las glándulas pépticas del estómago secretan una proenzima, el pepsinógeno, el cual por una conversión autocatalítica se transforma en pepsina con actividad proteolítica, por medio del HCl existente en el estómago.

Una vez que existe pepsina dentro del estómago, no se reabsorbe y por lo tanto no aumenta el pepsinógeno sanguíneo. Ya que en el órgano normal existe considerable cantidad de ácido, la enzima secretada dentro del estómago es convertida inmediatamente a pepsina, esto tiene lugar en un intervalo de tiempo sumamente corto lo que tiende a demostrar que el pepsinógeno sanguíneo no puede aumentar a expensas de la pepsina contenida en la luz del estómago por no ser posible su reabsorción desde este lugar.

La administración oral de pepsinógeno en el perro con o sin solución buffer no incrementa la secreción de uropepsina en el perro, estos resultados deben ser interpretados desde el punto de vista que tanto el pepsinógeno como la pepsina no pueden ser reabsorbidos desde la luz del estómago para después eliminarse como uropepsina incrementado posteriormente la excreción habitual.

Sobre la materia del modo de originarse la uropepsina se propusieron varias teorías cuya evidencia era relativa y en la que se encontraban aún muchos puntos sin una explicación satisfactoria:

a).—Absorción desde el tracto gastrointestinal.

b).—Secreción directamente dentro de la sangre por células de función endocrina.

De estas dos teorías la que era más aceptada era la segunda por contener mayor número de datos experimentales y solo quedaba por aclarar el sitio de pepsina o pepsinógeno relacionados por las células secretoras y esta es una materia de la cual se sabe muy poco. No se sabía si se trataba de una secreción interna de pepsinógeno, es decir una secreción interna directa de pepsinógeno dentro de la sangre y posteriormente ser secretada como uropepsina. Si una diferencia de activación ocurría en la luz del estómago, una posibilidad de absorción de pepsinógeno dentro de la sangre existía. Actualmente se comprobó que esta suposición está descartada.

La anatomía inaccesible de las glándulas gástricas ha hecho estas experimentaciones muy difíciles por lo que se desconoce si su secreción interna ocurre antes de su liberación desde las células productoras o antes de su activación por las secreciones parenterales.

El transporte de pepsina en la sangre es necesariamente una ascensión, pero su modo de trasladarse ha sido muy deficiente en las explicaciones dadas por medio de los estudios llevados a cabo.

Sin embargo se habían sugerido que podían existir tres posibilidades de transporte:

a).—Incorporado a los glóbulos blancos.

b).—Como un inhibidor de pepsina complejo en el plasma

c).—Como pepsinógeno libre en el plasma.

La primera sugestión ha recibido muy poca atención y por lo tanto no ha sido estudiada a fondo.

Las otras dos teorías son mas o menos apoyadas por los diferentes estudios realizados en los laboratorios de investigación, estas observaciones fueron constituidas como soporte a la teoría de que la sangre contiene una anti-pepsina la cual ayuda a la pepsina en una combinación inactiva hasta que es liberada durante la formación de la orina. La incidencia de un inhibidor de pepsina específico en la sangre ha sido negada, por numerosos trabajos muy recientes.

El pepsinógeno ha sido considerado como el transporte más a propósito, por su estabilidad al pH de la sangre, pero su baja concentración adicionado de las dificultades en su demostración es

lo que ha retardado la afirmación neta de su presencia. Después de ganada su entrada a la sangre la enzima es aparentemente eliminada por el riñón así como otros productos de desperdicio. La talla molecular no tiene problemas de filtración glomerular ya que el pepsinógeno es probablemente una molécula más pequeña que la de la albúmina de huevo o la de la hemoglobina (42.000; 44.500; 69.000 respectivamente).

En resumen, si la uropepsina es originada en el estómago, debe ser transportada al riñón por la sangre. El modo de entrada de la enzima a la circulación se desconoce aún y sólo se han emitido teorías que tienden a demostrar este punto de un modo u otro.

Es concebible que el pepsinógeno pueda ser reabsorbido dentro de la corriente sanguínea después de su secreción por medio de las células pépticas dentro de la cavidad estomacal. Entonces la enzima puede ser absorbida por la sangre directamente desde las células secretoras sin una previa secreción dentro del lumen. La prueba de ésta hipótesis es que la enzima se encuentra en hombres alimentados sanamente, los pacientes que no tienen secreción de uropepsina es debido a un elemento patológico como por ejemplo en los enfermos con anemia perniciosa.

Cuando se ha dado pepsina a sujetos normales inmediatamente excretan cantidades apreciables de uropepsina; esta administración se hace por vía oral. En repetidas ocasiones, varios pacientes con anemia perniciosa ingirieron 5 gr. de una potente preparación de pepsina, si una cantidad tan pequeña de pepsina como 0.1% dada adicionalmente a una dieta da origen a excreciones en gran cantidad de uropepsina, se hace indispensable que los pacientes anémicos que no excretaron uropepsina a pesar de lo fuerte de la preparación se debió a que para que exista la formación de uropepsina es necesaria la actividad integral del estómago y secreciones gástricas, por lo tanto se puede afirmar que la uropepsina es derivada de la secreción directa de pepsinógeno dentro de la corriente sanguínea por las glándulas de secreción de la proenzima y no desde la reabsorción de pepsina desde la luz del estómago.

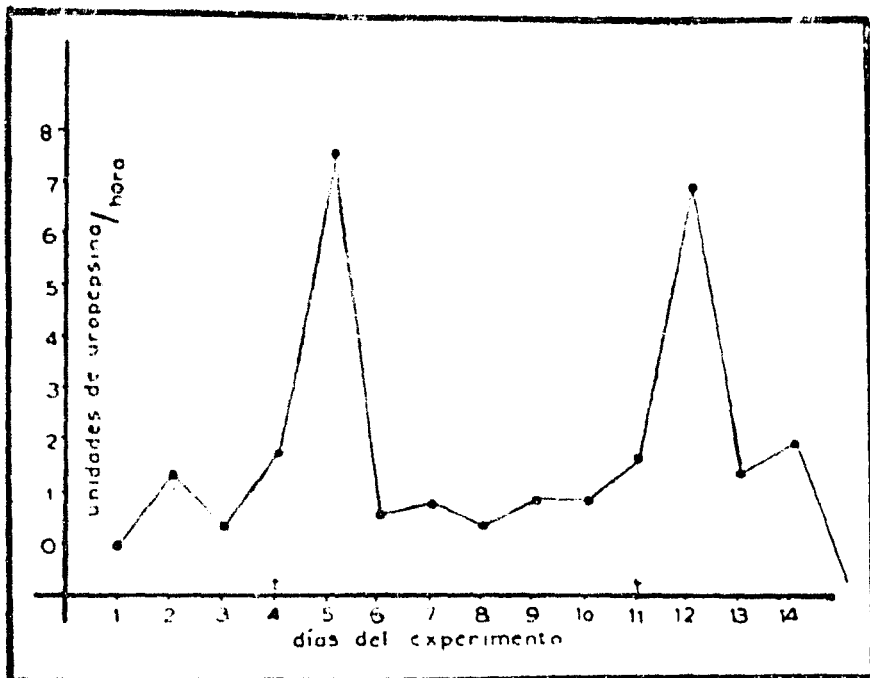
En el hombre revela un aumento de uropepsina en orinas recogidas de varios días, después de una administración dosificada de pepsina. En el perro no sucede lo mismo, perros que han sido inyectados intravenosamente con 80 mg. de pepsina por kilogra-

mo de peso corporal, se observa en las orinas colectadas después del experimento un incremento nulo en la excreción de uropepsina. En vista de tales resultados es razonable pensar que la pepsina de ellos no es absorbida desde el estómago, dentro de la corriente sanguínea o tal vez es inactivada en la circulación y se excreta por el riñón en forma inactiva.

Una muestra cruda de pepsinógeno ha sido preparada de mucosa gástrica de puerco, una cantidad de esa preparación ha sido inyectada a perros, ya que el perro como se demostró anteriormente omite resultados en la excreción de uropepsina con la pepsina, la inyección intravascular de pepsinógeno en tales animales se ha considerado como la prueba ideal para dilucidar el problema.

Los resultados obtenidos con estos experimentos (gráfica N° 1) demuestran marcado incremento de excreción de uropepsina después de la inyección de pepsinógeno intravenosa, tales resultados confirman la hipótesis de que el pepsinógeno puede ser excretado en la orina como uropepsina una vez ganada su entrada al torrente circulatorio.

EFFECTO DE LA INYECCION INTRAVENOSA DE PEPSINOGENO SOBRE LA EXCRECION DE UROPEPSINA EN UN PERRO.



La diferencia fundamental entre uropepsinógeno y uropepsina se basa en que la primera se puede encontrar en orinas alcalinas y en cambio la uropepsina es inactiva en tales orinas.

ESTABILIDAD DE LA UROPEPSINA:

Las observaciones hechas sobre los trabajos llevados a cabo para evidenciar la estabilidad de la uropepsina en la orina han sido confirmados por numerosos experimentos hechos en muestras de orinas, humana y de gato, llegando a los siguientes resultados:

1.—Cuando se mantiene la muestra de orina a temperatura ambiente (más o menos de 20 a 26 grados centígrados) la actividad de la uropepsina sube a los 4 días si el pH es estable y no ocurre turbidez bacteriana.

2.—Cuando se guardan en refrigerador ambas orinas, humana y de gato, retienen su actividad de 2 a 3 semanas a lo más.

3.—Adicionando a la muestra de orina de una cantidad equivalente al volumen de orina de toluol y manteniéndola a una temperatura de 3 a 5 grados centígrados se asegura su perfecto almacenamiento sin alterar ninguna de sus propiedades y sin menoscabo en lo que se refiere a la cantidad de la uropepsina.

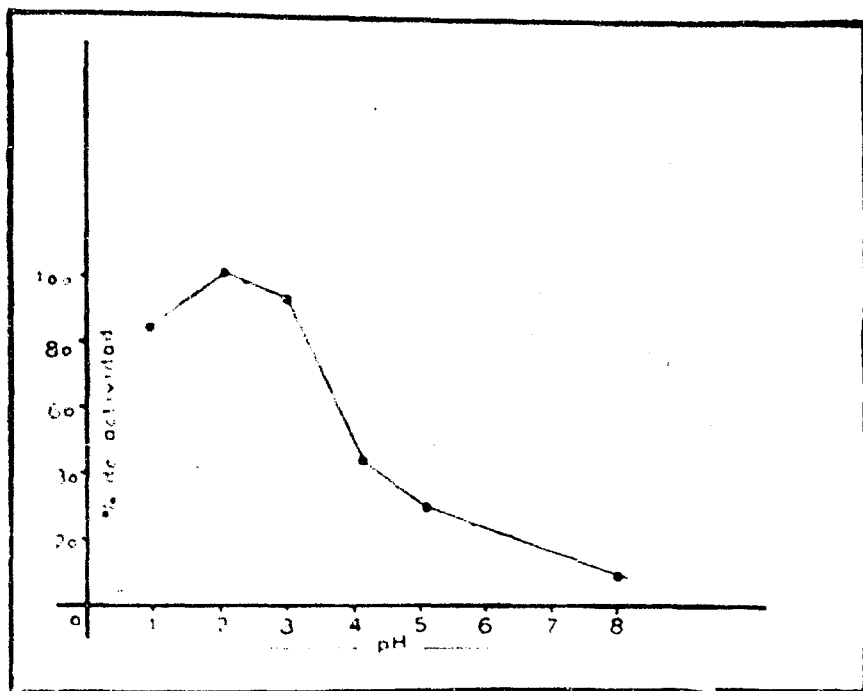
ESTABILIDAD DE LA UROPEPSINA

Duración de la prueba Días	Temperatura del cuarto 21° C	Refrigerador (3 a 5°C)	Adición de Toluol	Actividad mg. tirosina
0			No	78
0			No	74
1	×		Si	83
1			Si	75
7	×		Si	78
14			Si	73
28		×	Si	74

EFEECTO DEL pH SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA UROPEPSINA:

Estudios previos sobre uropepsina han asumido que la actividad proteolítica de la uropepsina y sus reacciones fuertemente ácidas es una prueba de su naturaleza parecida a la de la pepsina.

Se ha demostrado que el máximo de actividad proteolítica de la enzima es evidente en un bajo pH cuando la orina y el substrato son incubados a un pH de 3.5. Este pH ha sido designado como el apropiado para la determinación de la actividad "péptica" en los diversos pH. Su actividad de 100% la tiene entre los pH de 1.5 a 2.5 decayendo después rápidamente hasta tener un mínimo de actividad al alcanzar un pH alcalino comprendido entre 7 y 8.



INFLUENCIA DE LA DIETA SOBRE LA EXCRECION DE UROPEPSINA :

Una dieta especial puede alterar los resultados en cuanto a excreción de uropepsina se refiere. Es necesario saber qué dieta y especialmente qué proteínas alteran esta excreción.

Durante la noche la excreción de uropepsina es significativamente baja en el hombre. El incremento en la excreción de uropepsina aparece totalmente constante y característico en los individuos de dieta regular, sin embargo hay que tener en cuenta las condiciones de reposo.

Su incremento incurre subsecuentemente al ingreso de gran cantidad de proteínas en la dieta. Se ha encontrado que cambiando la alimentación de un perro de pan a carne, causa un incremento 1 veces mayor que la cifra habitual de uropepsina excretada en 24 horas.

Un incremento correspondiente en concentración de pepsina

en el jugo gástrico humano, cambia de alto a bajo los valores de la dieta proteica y por lo tanto la excreción de uropepsina.

Se ha seguido un estudio con tres dietas estrictamente seguidas. Las experiencias sacadas de este estudio son:

1.—Sobre un menú uniforme diariamente por tres días, la uropepsina excretada es relativamente constante, tal como se observó en 13 sujetos sometidos a una alimentación rica en proteínas.

2.—Una dieta en la cual las proteínas eran sumamente altas, favorecieron un aumento en la excreción de uropepsina.

3.—Una dieta constituida únicamente por jugo de naranja por tres días seguidas contribuyeron a bajar la excreción de uropepsina en el segundo y tercer día de su estudio.

Aparte de estas tres dietas se ha demostrado además que una dieta constituida únicamente por leche no altera la excreción habitual de uropepsina.

En estos ensayos la dieta y regularidad del sueño debe ser estrictamente considerada.

EFEECTO DE LA INGESTION ORAL DE PEPSINA SOBRE LA EXCRECION DE UROPEPSINA:

Para esto se sigue el siguiente procedimiento:

A cada sujeto de estudio se le administraron 5 gr. de pepsina por vía oral; después se recogió la orina a los tres días y en ella se dosificó la cantidad de uropepsina. Se comparó este resultado con el dado por la excreción habitual de uropepsina antes de la ingestión de pepsina.

El cuadro siguiente nos grafica este estudio para dar una idea más clara de los resultados:

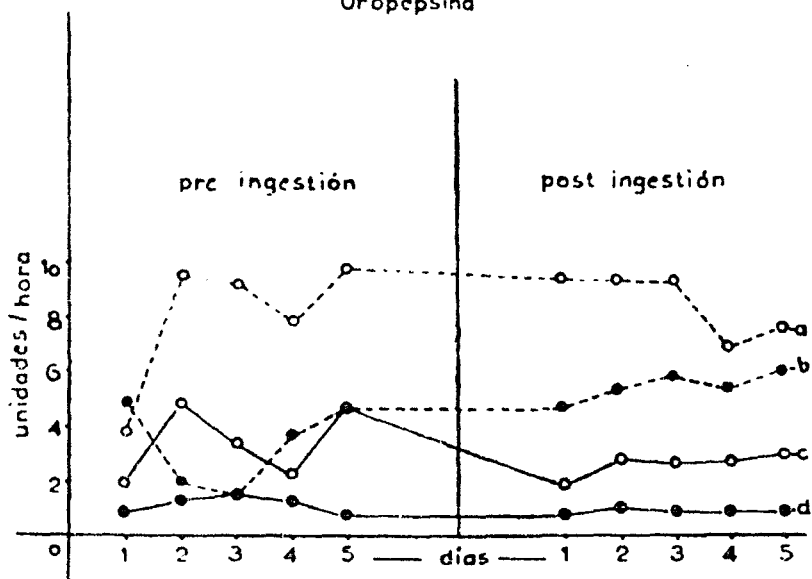
A, B, y C, excreción de uropepsina en tres sujetos masculinos normales.

D, excreción de uropepsina de un paciente con anemia perniciosa.

Sobre la línea ordenada se toman en unidades por hora la excreción de uropepsina.

En la línea absisa, se colocan el número de días que duró la experimentación.

Efecto de la ingestión de pepsina sobre la excreción de la Uropepsina



VALORES MAXIMOS Y MINIMOS DE pH EN LA MEZCLA DE DIGESTION A LA HIDROLISIS OPTIMA DEL SUBSTRATO POR LA UROPEPSINA EN CINCO MUESTRAS DE ORINA

Máxima hidrólisis.

MUESTRA	ESPECIE	pH DE LA MUESTRA	pH DE LAS MEZCLAS DE DIGESTION
1	humana	5.27	2.02 — 3.0
2	„	„	2.76 — 3.15
3	„	„	2.18 — 3.30
4	„	6.44	2.02 — 2.80
5	gato	5.52	? — 3.00

Algunos pacientes con úlcera péptica demostrada clínicamente, excretan uropepsina a un valor aproximadamente dos veces del valor del hombre sano.

Pacientes con síntomas gástricos; pero sin úlcera péptica tienden a semejarse a los hombres sanos, es decir, tienden a tener su excreción normal habitual de uropepsina.

La relación de excreción de uropepsina con la hiperacidez gástrica no es fortuita, ha sido asentado, este estudio lo ha confirmado, que es notable el aumento de uropepsina cuando aumenta la acidez libre de los quimismos gástricos.

Hombres sanos excretan cantidades apreciables de uropepsina

a un valor constante enteramente, de día a día y dentro del día. Este valor no es afectado por el volumen, densidad o acidez de la orina, pero sí por el ejercicio o algunas fluctuaciones en la dieta habitual.

La ingestión de comida no parece estimular grandemente la excreción de uropepsina, el valor de la excreción es característica en cada sujeto individualmente.

Evidentemente se deduce que la excreción de la uropepsina depende de la actividad funcional endócrina de las glándulas pépticas del estómago.

IV

DIVERSOS METODOS USADOS EN EL CUANTEO DE UROPEPSINA EN LA ORINA:

El primer método usado y que fué vigente hasta 1914 es el que utilizaba como sustrato una solución de fibrina.

Esencialmente consiste en colocar fibrina especialmente conservada con una muestra de orina fría de 3 a 4 horas. Se consideraba que la uropepsina se absorbe sobre la fibrina la cual es removida con intervalos de tiempo cronometrados.

Después se calienta en baño de agua tibia y se pone después de esta incubación, con 5 c.c. de HCl al 1% a una segunda incubación en una temperatura de 38 a 40 grados centígrados. Este paso dura de 20 a 120 horas.

El método como se discute actualmente, es muy inexacto debido a que la muestra usada de orina no se toma de un tiempo determinado, ni se exige la recolección de una cantidad previamente estipulada.

Posteriormente se ha apoyado la idea de usar para el cuanteo de uropepsina toda la orina emitida en 24 horas a fin de que los resultados sean más exactos. En caso de no poder usar la micción de 24 horas, se acepta como último recurso la orina de la mañana y la de la tarde, es decir, una muestra de 12 horas.

La extensión de la digestión de este método fué juzgada por la cantidad de color liberada del digerido de fibrina. Los valores del color fueron estandarizados en términos de un extracto de estómago de conejo en glicerina, necesarios para producir el mismo color.

Otros de los métodos empleados necesitaba 10 c.c. de edestina (1% de edestina para orina o jugo gástrico y uno por mil para ensayos de sangre) a completar un volumen de 11 c.c. y se digería.

La reacción se efectúa a un pH de 1.6 a 1.7, las orinas se digirieron 20 horas; el suero o plasma 120 horas, finalmente el jugo

gástrico de una a dos horas a una temperatura de 37 a 40 grados centígrados. La edestina quedaba en los digeridos cuando eran triturados con cloruro de sodio y sulfato de amonio, los cuales la precipitaban.

El punto final de la reacción se determina por igualamiento de la turbidez en el digerido activado y en el inactivado. Este trabajo adolece de muchos defectos que dan lugar a objeciones principalmente en lo que se refiere a pH ya que es una acidez demasiado alta a la que se trabaja, debe ser en estas condiciones a un pH de 2.8 a 3.1, según se explicó anteriormente.

Métodos más actuales y que se acercan mucho entre ellos en lo que se refiere a normales son los siguientes:

METODO 1:

Se necesita una muestra de orina de 24 horas.

Dos porciones de un c.c. cada una, colocados en 2 tubos de ensaye marcados como "A" y "B".

El tubo "A" se pone a baño maría de 37 grados C. por espacio de una hora.

La orina contenida en el tubo "B" se inactiva por la adición de 10 c.c. de ácido tricloroacético 0.3 N. Se hace uso de un substrato hemoglobínico del que se tiene una solución concentrada (al 10%) y del que se hacen las diluciones en la proporción de 2 c.c. del concentrado y 3 c.c. de HCl 0.125 N a 0.145 N (pH final de 1.75-2.0).

Cinco c.c. de este substrato diluido se calientan a 38 grados centígrados, se adiciona a ambos tubos "A" y "B" y el tubo "A" se pone a digerir, siguiendo la técnica usada en el micro Kjeldhal.

Después de una hora de digestión al tubo "A" se le adiciona 10 c.c. de ácido tricloroacético 0.3 N, mezclando todo perfectamente.

El contenido de cada tubo se filtra y se guarda el filtrado.

Los aminoácidos como tirosina o de estructura reductora, producen una coloración azulada de mayor o menor intensidad con los reactivos de fenol, según sea su concentración en tirosina o sustancias afines.

Este color puede ser cuanteadado dentro de los límites colorimétricos en esos filtrados de la manera siguiente:

En un matraz de 50 c.c. se adicionan 2 c.c. de cada filtrado en sendos recipientes, 12 c.c. de agua destilada, 8 c.c. de NaOH 0.5

N y 3 c.c. de reactivo de fenol diluido al tercio con agua destilada.

Después de 30 minutos que se esperan para el total desarrollo de color se lee en fotocolorímetro Klett Summerson o en espectrofotómetro Coleman Jr. en filtro 54 ó 540 respectivamente en cada uno, poniendo el 0 ó el 100 con agua destilada según se use Klett Summerson o el espectrofotómetro Coleman Jr.

Las lecturas se anotan r "A" y r "B" y la diferencia colorimétrica entre estas dos lecturas se interpretan como microgramos de tirosina después de haber hecho la conversión necesaria de acuerdo con la curva estandard.

Este valor representa 1/8 del digerido por lo cual hay necesidad de multiplicar el resultado por 8 para obtener el equivalente en mg. de tirosina relacionados con el digerido completo.

Este dato se multiplica por los c.c. de orina emitidos en 24 horas.

El desarrollo de color de la curva estandard se hace en frascos que contienen 0, 1 y 2 c.c. de una solución estandard de tirosina (0.150 mg. c.c.), a cada frasco se le adicionan 4 c.c. de una solución de HCl 0.1 N, 8 c.c. de NaOH 0.5 N, agua destilada a 22 c.c. y 3 c.c. de reactivo de fenol diluido al tercio.

Se lee en las condiciones anotadas anteriormente.

METODO 2:

Su uso es más posterior al anterior, tiene mayor exactitud puesto que no se somete a digestión y por lo tanto no hay riesgo de perder por calentamiento excesivo parte del filtrado que se digiere. Se lleva a cabo como sigue:

En 2 tubos marcados "a" e "i" (activado e inactivado) se pone un c.c. de la muestra de orina de 24 horas. Se anota el pH de la orina en el momento de comenzar el método, si la muestra está muy alcalina se acidula con unas gotas de HCl N.

El tubo "a" se pone a incubar a 38 grados centígrados. Mientras se prepara una dilución del subs' to hemoglobínico en las mismas condiciones en que se usa para el método anteriormente citado y se añade en proporción de 5 c.c. al tubo "a" e "i", dejando la mezcla incubar a 37 grados C por espacio de 30 minutos. Después de transcurridos éstos, se añade a los tubos incubado y sin incubar, 10 c.c. de ácido Tricloroacético 0.3 N.

Se agita perfectamente el contenido de ambos tubos y se filtra con papel filtro Whatmann N° 50.

En un matraz aforado de 25 c.c se ponen 2 c.c. de filtrado -0 c.c. de agua destilada, 10 c.c. de NaOH 0.5 N y después 3 c.c. de reactivo de fenol diluido al tercio.

Lo mismo se hace con el filtrado del tubo que no se incubó y sirve como control.

Se lee después de 30 minutos con filtro 540 del espectofotómetro Colleman Jr.

Tomar las lecturas r "a" y r "i", sacar la diferencia de ambas y transferirlas de acuerdo con la curva de calibración hecha en papel semilogarítmico.

El resultado se multiplica por las diluciones hechas y finalmente por los c.c. de la orina de 24 horas.

El valor normal está comprendido entre 1000 y 3000 unidades pépticas en 24 horas.

La escala de color se hace por medio de una serie de diluciones, sacadas de una solución de tirosina en HCl patron previamente titulada, agregando los reactivos para desarrollar el color y se lee en las mismas condiciones que las explicadas para el método.

Se toma como uropepsina, los miligramos de tirosina liberados por un c.c. de orina, actuando en 5 c.c. de substrato acidificado, calentado a 38 grados C^o, espacio de una hora.

Sobre estos dos últimos métodos que son los más exactos y usados se pueden encontrar otros; pero en principio todos son variaciones de éstos, ya sea en volumen de reactivos, pH, tiempo de digestión, etc.

V

MÉTODO USADO:

- a).—Principio.
- b).—Reactivos.
- c).—Material.
- d).—Técnica
- e).—Cálculos.
- a).—PRINCIPIO:

Este método se basa en la coloración azul que desarrollan los compuestos como aminoácidos reductores (tirosina, triptofano, histidina, cisteina, etc) con el reactivo de fenoles. Dicho color es directamente proporcional a la concentración y puede ser leído colorimétricamente, expresando el resultado en mg de tirosina.

b).—REACTIVOS:

HCl	0.3 N
HCl	1.15 N
HCl	3.5 N
NaOH	0.5 N
Acido tricloroacético	0.3 N

Solución concentrada de hemoglobina:

Para preparar esta solución, hago uso de la hemoglobina producida por la Casa Difco, es un producto ya estandarizado, se presenta como un polvo y está adicionado de urea. Se disuelve en un frasco de 500 c.c. 10 gr. de hemoglobina, se le añade 100 c.c. de HCl 0.130 (PH final de 1.80), se introducen unas perlititas de vidrio y se agita vigorosamente hasta perfecta disolución de los grumos, si es necesario se afora al volumen con el mismo HCl y se guarda en refrigerador, de preferencia en el congelador a fin de que solidique, esto es con el objeto de evitar una descomposición de la solución.

De esta solución concentrada se toma para hacer la mez-

ela diluida, 2 c.c. de la solución al 10% se diluye con 3 c.c. de HCl 0.3 N.

Reactivo de fenol:

Preparado según la siguiente técnica:

En un frasco de 1,500 c.c. colocar 100 gr. de tungstato de sodio, 25 gr. de molibdato de sodio, 700 c.c. de agua destilada, 50 c.c. de ácido fosfórico al 85% y 100 c.c. de HCl concentrado.

Poner a refluja la mezcla durante 10 horas. Después de este tiempo, agregar 150 gr. de sulfato de litio y una gotas de bromo, se hierva la mezcla por 15 minutos sin condensador a fin de quitar el exceso de bromo. Se enfría la solución a fin de tener un aforo perfecto, diluyendo con agua destilada. Se filtra y el reactivo no debe presentar tinte verdoso. Guárdese protegido del polvo y en frasco obscuro.

c).—MATERIAL:

Potenciómetro Beckman.

Gradillas con suficientes tubos de ensaye de 13 por 175 (8 tubos para cada determinación).

Embudos de 5 c.c. de diámetro.

Papel filtro Whatman N° 50.

Matraces de 125 c.c.

Pipetas de 5 c.c. volúmetricas.

Pipetas de 10 c.c.

Celdilla para Espectrofotómetro Coleman Jr.

Baño de agua de 37 Grados centígrados.

d).—TECNICA:

Preparación del material:

Preparar una solución de substrato homoglobínico diluyendo 2 c.c. del concentrado con 3 c.c. de HCl 0.1 N. Ponerlo en baño maría a 37 grados C.

Numerar los tubos de ensaye necesarios para la cantidad de determinaciones que se lleven a cabo, poniendo en un gradilla los tubos que se incuben y en otra aquellos que no se lleven a incubación.

Distinguirlos por medio de números. Los que se incuben por medio de números primos y con número únicamente los que no se lleve a baño marí: .

Registrar nombre, fecha, volumen y horas en que se recolectó la muestra total de orina enviada al laboratorio.

Estandarizar el potenciómetro Beckmann con una solución buffer conocida.

Anotar la temperatura del cuarto y hacer la corrección correspondiente en el potenciómetro.

Procedimiento:

Medir 20 c.c. de la muestra de orina.

Anotar el PH de la orina.

Acidificar la muestra según convenga a PH 1.5 con HCl 1.15 N. Tomar este PH en el potenciómetro. Si 5 c.c. de HCl 1.15 N no llevar el PH de la muestra de orina a 1.5, descártese esta muestra y vuélvase a medir 20 c.c. de la misma muestra de orina y acidificarla con unas gotas de HCl 3.5 N (gotero de 0.25 c.c. por gota).

Se vuelve a tomar el PH en el potenciómetro y ya puesto a PH de 1.5 se prosigue el método.

Llevar el volumen total de esa parte de orina a 25 c.c. con agua destilada. Téngase en cuenta el HCl añadido al acidificar la orina.

Pipetear un c.c. de la muestra de orina diluida dentro de 2 tubos de ensaye marcados con los números 1 y 1'.

Acidificar el sustrato con HCl 0.3 N.

Añadir 5 c. c. de sustrato hemoglobínico acidificado, a cada tubo, mezclar bien y poner los tubos marcados con números a incubar a 37 grados C. por espacio de 30 minutos.

Después de la incubación añadir 10 c.c. de ácido tricloroacético 0.3 N a la muestra incubada y a la que no se incubó, mezclar perfectamente regresando el contenido del tubo entre éste y otro varias veces.

Se filtra el contenido de los tubos incubado y sin incubado después de haberlos agitado, con filtro Whatmann N° 50, recogiendo los filtrados en tubos respectivos. El precipitado se deshecha.

La parte incubada y sin incubar se trabajan igual enteramente desde el momento de añadir el ácido tricloroacético como precipitante.

Añadir después 5 c.c. de cada filtrado (tubo 1 y tubo 1') en sendos tubos de ensaye.

Adicionar a cada uno de éstos filtrados marcados, 10 c.c. de NaOH 0.5 N.

Añadir 3 c.c. de reactivo de fenoles diluido, a cada tubo.

Este reactivo se prepara diluyendo un c.c. de reactivo de fenoles concentrado, con 2 c.c. de agua destilada.

Esperar 5 minutos antes de leer, aforar el espectrofotómetro Coleman Jr. a 100 con agua destilada.

Leer los tubos con filtro 540 en espectrofotómetro Collemann Jr. o con filtro verde en fotocolorímetro Klett Sumerson (longitud de onda de 500 a 570 mm).

La diferencia de color azul entre los filtrados de las muestras incubadas, es equivalente al incremento en tirosina soluble y en sustancias afines a ésta, liberada de la molécula de hemoglobina durante la incubación.

Los tubos sin incubar sirven como control.

Este incremento de la tirosina es directamente proporcional a la cantidad de pepsina presente en la orina (uropepsina) acidificada y esta cantidad puede ser utilizada como medida indirecta para investigar la actividad péptica en la muestra original de orina.

Si la concentración de color en las muestras ya adicionadas de reactivo de fenoles diluido es demasiada alta por comparación de las lecturas de calibración colorimétricas, se diluye el filtrado dos veces y media con 3 c.c. de ácido tricloroacético 0.3 N; si esta dilución aún no es suficiente, se diluye el filtrado 5 veces usando solamente un c.c. de filtrado y 4 c.c. de ácido tricloroacético 0.3 N.

Se registran las lecturas y se transforman de acuerdo con las tablas hechas a propósito con la curva standard de tirosina.

e).—CALCULOS:

Ya que la orina original ha sido diluida 4 veces, antes de la lectura final la cantidad de tirosina en 5 c.c. de filtrado representa la actividad péptica de solamente 0.25 c.c. de orina original.

Para obtener la actividad péptica de un c.c. de orina se debe multiplicar el resultado por 4.

Sólo empíricamente para evitar usar mg. de tirosina como la medida o unidad de fuerza péptica, el mg. de tirosina por un c.c. de orina es convertido en Unidades Pépticas (U.P.).

Una unidad, péptica ha sido definida como: "la cantidad de pepsina que pueden liberar 0.04 mg. de tirosina de un substrato hemoglobínico al 2.5% en 30 minutos de incubación en nuestras

condiciones de experimentación".

Ejemplo:

Diferencia colorimétrica entre las lecturas dadas por el filtrado sin incubar y el incubado es igual a 25.

De la curva de tirosina estandard está diferencia representa 0.01 mg. de tirosina en c.c. de filtrado, ya que esta cantidad representa la tirosina liberada por 0.25 c.c. de la orina original, entonces un c.c. de la orina puede producir 4 por 0.01 o sea 0.04 mg. de tirosina.

Para convertir el mg de tirosina a Unidades Pépticas simplemente se dividen los mg. de tirosina encontrados entre 0.04. En este ejemplo particular, la orina contiene una Unidad Péptica por c.c. de orina, multiplicando este resultado por los c.c. de la muestra total de orina en 24 horas se obtienen las Unidades Pépticas totales.

Supongamos que el volumen total de orina en 24 horas fue de 1000 c.c. multiplicando la Unidad Péptica por el volumen se obtiene las U. P. que en este caso fueron de 1000 U.P. en 24 horas.

f).—NORMALES:

Se ha establecido como límites normales de uropepsina de 1000 a 3000.

ESTANDARIZACION DEL SUBSTRATO HEMOGLOBINICO:

Una curva estandard de tirosina puede ser hecha con cantidades conocidas de tirosina en 5 c.c. de volumen, esta curva es proporcional a las lecturas colorimétricas.

Para hacer estas soluciones de concentraciones incrementadas gradualmente, se disuelve en HCl 0.1 N, 0.16 mg de tirosina, 0.032 mg. de tirosina, etc, a llegar a la dilución 0.64 mg. por c.c. y se afora a un c.c.

Un c.c. de cada una de estas diluciones, se incuba en 5 c.c. de substrato hemoglobínico acidificado a 37 Grados C. por 30 minutos, usando como blanco una mezcla sin incubar de HCl 0.1 N y 5 c.c. de substrato.

Desde este punto se sigue el mismo procedimiento que el descrito en el método y se lee también en las mismas condiciones.

La concentración conocida en 5 c.c. de filtrado es de 5/16 de la concentración del c.c. de la solución estandard de tirosina añadida al substrato, ya que un c.c. de la solución conocida de tirosina, 5 c.c. de substrato y 10 c.c. de ácido tricloroacético hacen

un total de 16 c.c. de filtrado. Utilizando esta curva estandar cada diferencia colorimétrica obtenida por la orina desconocida puede ser directamente convertida a mg. de tirosina por 5 c.c. de filtrado.

El método anteriormente descrito, lo realicé sobre 80 casos. hechos la mayoría de ellos con su correspondiente estudio de jugo gástrico, a fin de tener una relación de la acidez libre con la excreción de uropepsina.

Entre esos casos, los hay de individuos normales, que reportaron resultados comprendidos entre 1050 a 2215 U.P., como cifra menor y mayor respectivamente.

Enfermos con úlcera gástrica o duodenal o ambas reportaron datos que se especificarán en las conclusiones posteriormente.

CASO	VOLUMEN	HORAS	ACIDEZ DEL UROPEPSINA EN		UROPEPSINA EN	OBSERVACIONES
			QUIMISMO	12 HORAS		
Nº 1	350 c.c.	8 a 20	0	1467	2167	Úlcera gástrica.
.. 2	950 c.c.	8 a 20	0	774	—	Estenosis pilórica.
.. 3	450 c.c.	20 a 8	0	870	—	Cáncer gástrico.
.. 4	2000 c.c.	24	68	—	987	Cáncer gástrico.
.. 5	450 c.c.	20 a 8	0	756	—	Úlcera duodenal.
.. 6	1350 c.c.	24	0	—	2335.5	Úlcera gástrica.
.. 7	1500 c.c.	24	0	—	2670	Normal.
.. 8	1300 c.c.	24	0	—	1940	Úlcera gástrica.
.. 9	450 c.c.	12	56	2000	—	Úlcera duodenal.
.. 10	600 c.c.	12	68	1800	—	Úlcera gástrica, prob. úlcera duode- (denal.)
.. 11	700 c.c.	20 a 8	0	800	—	Úlcera gástrica.
.. 12	600 c.c.	8 a 20	52	2998	3792	Úlcera duodenal.
.. 13	700 c.c.	8 a 20	80	900	—	Úlcera gástrica.
.. 14	1050 c.c.	20 a 8	86	2020	2920	Úlcera gástrica.
.. 15	770 c.c.	12	80	730	—	Úlcera duodenal.
.. 16	900 c.c.	12	80	600	3330	Úlcera duodenal.
.. 17	450 c.c.	12	0	—	1600	Úlcera gástrica, prob. úlcera duode- (denal.)
.. 18	700 c.c.	12	0	1170	—	Cáncer gástrico.
.. 19	700 c.c.	24	0	434	—	Úlcera gástrica, prob. úlcera duode- (denal.)
.. 20	650 c.c.	12	0	1080	3514	Úlcera duodenal.

CASO	VOLUMEN	HORAS	ACIDEZ DEL QUIMISMO	UROPEPSINA EN 12 HORAS	UROPEPSINA EN 24 HORAS	OBSERVACIONES
Nº 21	1020 c.c.	24	68	—	3478	Úlcera duodenal.
„ 22	450 c.c.	20 a 8	52	1434	—	Estenosis pilórica.
„ 23	600 c.c.	8 a 20	52	1080	3514	Úlcera duodenal.
„ 24	1200 c.c.	24	70	—	3200	Úlcera duodenal.
„ 25	1300 c.c.	24	56	—	1860	Probable úlcera duodenal.
„ 26	1350 c.c.	24	23	—	1560	Normal.
„ 27	1500 c.c.	24	20	—	1560	Cáncer gástrico.
„ 28	450 c.c.	20 a 8	0	—	915	Leucemia aguda.
„ 29	1350 c.c.	8 a 20	0	756	—	Úlcera gástrica.
„ 30	2000 c.c.	24	40	1044	1800	Úlcera duodenal.
„ 31	1400 c.c.	24	104	—	2860	Úlcera gástrica.
„ 32	1300 c.c.	24	67	—	2900	Leucemia aguda.
„ 33	1210 c.c.	8 a 20	0	1251	—	Úlcera duodenal.
„ 34	325 c.c.	20 a 8	0	692	—	Úlcera duodenal.
„ 35	985 c.c.	20 a 8	0	1015	—	Úlcera duodenal.
„ 36	415 c.c.	20 a 8	12	2093.5	—	Úlcera gástrica.
„ 37	1150 c.c.	8 a 20	0	575.25	—	Úlcera duodenal.
„ 38	325 c.c.	20 a 8	24	1753	2328.25	Úlcera duodenal.
„ 39	465 c.c.	8 a 20	0	884.45	—	Úlcera duodenal.
„ 40	1050 c.c.	20 a 8	0	1930	2814.45	Úlcera duodenal.

CASO	VOLUMEN	HORAS	ACIDEZ DEL QUIMISMO	UROPEPSINA EN 12 HORAS	UROPEPSINA EN 24 HORAS	OBSERVACIONES
Nº 41	650 c.c.	12	0	1200	—	Úlcera duodenal sangrante.
.. 42	1150 c.c.	12	0	—	2035.5	Neoplasia antro pilórica estenosada
.. 43	1200 c.c.	24	86	—	3400	Úlcera duodenal.
.. 44	200 c.c.	12	0	700	—	Úlcera duodenal.
.. 45	600 c.c.	12	46	1400	—	Anemia normocítica normocromica. (II)
.. 46	800 c.c.	24	0	—	2200	Normal.
.. 47	1700 c.c.	24	0	—	2100	Normal.
.. 48	650 c.c.	12	16	1600	—	Anemia normocítica normocromica (II)
.. 49	300 c.c.	12	0	600	—	Estenosis pilórica.
.. 50	300 c.c.	20 a 8	80	2492	3792	Úlcera duodenal.
.. 51	440 c.c.	20 a 8	60	1600	—	Úlcera gástrica.
.. 52	400 c.c.	8 a 20	80	1300	3798	Úlcera duodenal.
.. 53	300 c.c.	20 a 8	23	1080	—	Úlcera duodenal.
.. 54	1020 c.c.	20 a 8	20	1557.6	—	Úlcera duodenal.
.. 55	350 c.c.	20 a 8	0	1200	—	Úlcera duodenal.
.. 56	360 c.c.	20 a 8	0	1062	2145	Úlcera duodenal, prob. Úlcera gástrica. (trica.)
.. 57	360 c.c.	8 a 20	0	3478	3962	Úlcera duodenal.
.. 58	300 c.c.	20 a 8	0	630	—	Úlcera duodenal.
.. 59	200 c.c.	8 a 20	0	612	—	Leucemia aguda.
.. 60	435 c.c.	8 a 20	0	648	—	Úlcera duodenal.

CASO	VOLUMEN	HORAS	ACIDEZ DEL QUIMISMO	UROPEPSINA EN 12 HORAS	UROPEPSINA EN 24 HORAS	OBSERVACIONES
Nº 61	900 c.c.	24	20	—	3855	Posible úlcera duodenal sangrante.
.. 62	1200 c.c.	24	23	—	3408	Úlcera duodenal.
.. 63	1150 c.c.	24	26	—	2300	Colecistitis crónica.
.. 64	1940 c.c.	24	25	—	3401	Coledocolitiasis.
.. 65	695 c.c.	12	25	1779.2	4448	Úlcera duodenal.
.. 66	980 c.c.	12	43	2048	2798.4	Úlcera duodenal.
.. 67	1060 c.c.	12	32	1705	4086	Probable gastritis.
.. 68	1170 c.c.	24	36	—	4980	Úlcera duodenal.
.. 69	1200 c.c.	24	20	—	3980	Úlcera duodenal.
.. 70	1550 c.c.	24	65	—	4800	Úlcera duodenal.
.. 71	1650 c.c.	24	34	—	3700	Úlcera gástrica.
.. 72	1500 c.c.	24	26	—	3700	Úlcera duodenal.
.. 73	1200 c.c.	24	24	—	2300	Normal.
.. 74	1640 c.c.	24	24	—	2010	Normal.
.. 75	1200 c.c.	24	34	—	2100	Normal.
.. 76	1000 c.c.	24	32	—	1700	Normal.
.. 77	1150 c.c.	24	32	—	2600	Normal.
.. 78	1200 c.c.	24	—	—	1530	Normal.
.. 79	1000 c.c.	24	—	—	2100	Normal.
.. 80	1200 c.c.	24	—	—	2100	Normal.
.. 81	1600 c.c.	24	83	—	8000	Úlcera duodenal.

COMPARACION DE LA EXCRECION DE UROPEPSINA EN SUJETOS NORMALES Y EN PACIENTES CON ULCERA DUODENAL, ULCERA GASTRICA Y CANCER GASTRICO:

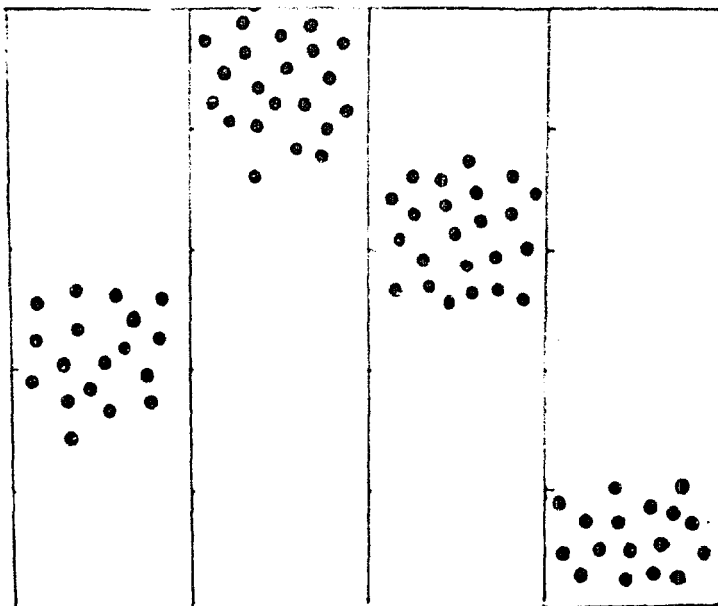
Excreción de Uropepsina U.P. 24 horas.

4 000

3 000

2 000

1 000



Sujetos Normales

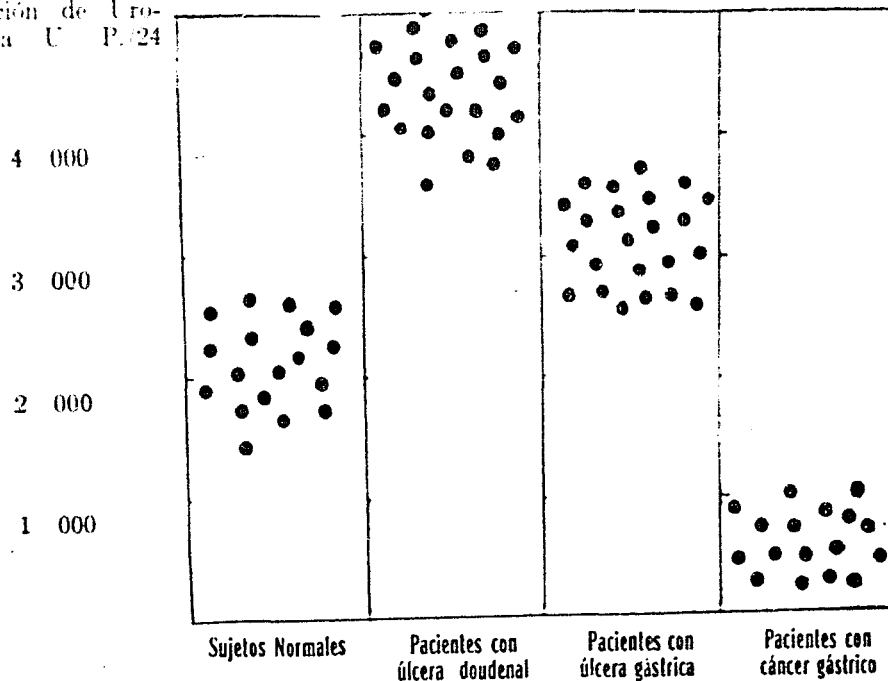
Pacientes con
úlcera duodenal

Pacientes con
úlcera gástrica

Pacientes con
cáncer gástrico

COMPARACION DE LA EXCRECION DE UROPEPSINA EN SUJETOS NORMALES Y EN PACIENTES CON ULCERA DUODENAL, ULCERA GASTRICA Y CANCER GASTRICO:

Excreción de Uropepsina U P/24 horas.



VI

CONCLUSIONES

1.—Cuando trabajé sobre muestras de orina de 24 horas, fraccionadas en porciones de 12 horas cada una, encontré siempre mayor la excreción de uropepsina en la muestra de las 8 a las 20 horas que la de las 20 a las 8 horas.

2.—Los enfermos con úlcera gástrica dieron resultados comprendidos dentro de los límites normales a 4,000 U.P. en lo que a excreción de uropepsina se refiere.

3.—Pacientes con úlcera duodenal diagnosticada clínicamente, reportaron valores que sobrepasaron los límites máximos de la normalidad, alcanzando cifras hasta de 8,000 U.P. en 24 horas.

4.—La orina de enfermos a los que se les había practicado quimismo gástrico y se encontró en éste una acidez libre normal o casi normal, reportaron una excreción de uropepsina normal.

5.—Aquellos enfermos cuya acidez libre en su examen de jugo gástrico demostró valores altos, reportaron en un examen de orina, excreción de uropepsina también alta.

6.—Los casos de cáncer gástrico estudiados dieron escasas cifras en excreción de uropepsina, éstas estuvieron comprendidas entre los límites normales mínimos o disminuídos en algunos cientos de unidades.

VII

BIBLIOGRAFIA

- 1.—Gladys R. Bucher: Uropepsin: Review of Literature and Report of some experimental findings. *Gastroenterology*; 627-647 1947.
- 2.—Gladys R. Bucher, M.I. Grossman. A Pepsin Method. The role of dilution in the determination of Peptic Activity. *Gastroenterology*; 5: 501-517, 1945.
- 3.—Folin O. and Ciocalteu. On Tyrosine and Tryptophase determinations in Proteins. *J. Biol. Chem.* 72: 627-631, 1927.
- 4.—Anson M.L. in Northrop J. H. *Crystalline Enzymes*. Columbia Univ. Press. 152 y siguientes. 1949.
- 5.—Rudolph M., Tomarelli Jesse Charney. The use of azoalbumin as a substrate in the colorimetric determination of Peptic Activity. *J. of Lab. and Clin. Med.* 34: Jan-Dec, 1949.
- 6.—Bendersky J. *Virchow's Arch. Physiol.* Pepsin Article. 1: 46, 1930.
- 7.—Gottlieb E. *Okand. Arch. Physiol. Enzymes.* 121: 554, 1930.
- 9.—Bucher and Ivy. Cessation of Uropepsin Excretion following gastrectomy in the cat. *Gastroenterology*; 5: 618, 1945.
- 10.—Summer J. B. And Summer G. F. *Chemistry and Methods of Enzymes*. Academic Press. N° 48, 1945.
- 11.—Gladys R. Bucher. Uropepsin. *Gastroenterology*; 8: 627 y sig. 1947.
- 12.—Northrop J. H. y Colaboradores. Determination of Peptic Activity. *J. Lab. and Clin. Med.* 34: y Sig. March, 1949.
- 13.—Farnsworth E. B. Notas sacadas del artículo publicado por Gladys R. Bucher en *Gastroenterology*, 8: 632, 1947.
- 14.—Speer and Alt. Gastric Activity. *Lab. Med. and Clin.* 36: 657, 1946.
- 15.—Harold Harper. *Review of Physiological Chemistry*, 1953.
- 16.—Seymour J. Colin G. and Robert W. Reifenshtein. Clinical Use of the urinary Uropepsin Determination in Medicine and Surgery. *New England Journal of Medicine.* 251: 835-843, 1954.
- 17.—Mirsky I. A. Block S. Uropepsin Excretion by the man. *J. Clin. Invest.* 27: 818-824, 1948.
- 18.—Anson M. D. and Mirsky I. A. Estimation of Pepsin with Hemoglobin. *J. Gen. Physiol.* 16: 59-63, 1943.