

UNIVERSIDAD IBERO AMERICANA

Incorporada a la U. N. A. M.

FACULTAD DE QUIMICA BERZELIUS

ALGUNOS ASPECTOS CINÉTICOS
DE LA
ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA EN SANGRE

TESIS

Para obtener el título de
Químico Farmacéutico Biólogo
SANTIAGO SANCHEZ RODRIGUEZ

México, D. F.

1 9 5 9



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 mis Padres
A quienes debo la culminación de
mis estudios.*

A mis abuelitos.

A mis tios.

A mis hermanos.

*Al Dr. Jesús Torres Gallardo,
por sus acertadas orientaciones para
la realización de este trabajo.*

A mis Maestros.

A mis compañeros y amigos.

Este trabajo fué realizado en el Departamento de Bioquímica del Instituto Nacional de la Nutrición, bajo la dirección del Dr. Guillermo Soberón Jefe del Departamento, por lo cual hago presente mi agradecimiento.

Deseo agradecer la valiosa ayuda al personal del Departamento.

I N D I C E

- I.- CONSIDERACIONES GENERALES
- II.- MATERIAL Y METODOS
- III.-
 - a) RESULTADOS
 - b) DISCUSION
- IV.- RESUMEN
- V.- BIBLIOGRAFIA.

I.- CONSIDERACIONES GENERALES.

CONSIDERACIONES GENERALES.

El estudio de las enzimas proteolíticas fué de gran importancia para el desarrollo de la enzimología; los fundamentos reales de la fisiología gástrica moderna fueron establecidos en 1833 cuando William Beaumont publicó los estudios realizados en un enfermo con fístula gastrocutánea (1). En el curso de sus experimentos Beaumont estableció conclusivamente el poder solvente y la acidez de la secreción gástrica.

El nombre de pepsina fué asignado por Schwam - en 1836 (1) y esta enzima fué una de las primeras en ser cristalizada lo cual fué logrado por Northrop en 1930 (2). Conceptos tan diversos y tan importantes como son la teoría de la diafinidad propuesta en 1926 -- por Von Euler y Josephsen (3); el de unión múltiple entre enzima y substrato propuesto en 1935 por Bergmann y colaboradores (3) y los de especificidad relativa y absoluta son unos de los muchos que se han derivado -- del estudio de las enzimas proteolíticas.

Proteasas o enzimas proteolíticas, son enzimas que atacan las uniones peptídicas de proteínas y péptidos. Se han clasificado (4) como sigue:

1) Proteinasas o endopeptidasas; que son las que actúan sobre las uniones peptídicas del interior de las proteínas, sin embargo, pueden también hidrolizar uniones peptídicas de péptidos simples apropiados.

a) Extracelulares como Tripsina, Pepsina, Quimotripsina en animales; que actúan fuera de las células que las producen y que habitualmente son secretadas como zimógenos.

b) Intracelulares o catepsinas que se encuentran en muchos tejidos animales y en mayor concentración en el hígado, el riñón y el bazo. Muchas de estas últimas son activas solamente en presencia de ciertas -- sustancias reductoras tales como cisteína, glutatión, -- ácido cianhídrico, ácido sulfhídrico y ácido ascórbico. -- (5)(6).

2) Peptidasas o exopeptidasas; que son aquellas que hidrolizan el enlace peptídico en los extremos de -- las cadenas.

a) Carboxipeptidasas, requieren la presencia de un carboxilo libre en el substrato y atacan la -- unión peptídica adyacente a este grupo liberando un aminoácido libre. Ejém: son la carboxipeptidasa del páncreas

del mamífero y de otros tejidos (figura 1).

b) Aminopeptidasas, actúan sobre la unión peptídica adyacente al grupo amino libre de péptidos -- simples. Un ejemplo la aminotripeptidasa encontrada en muchos tejidos animales la cual ataca tripeptidos como-L-alanilglicilglicina transformándola a L-alanina y glicilglicina (figura 1).

c) Dipeptidasas que específicamente actúan sobre ciertos dipeptidos, por ejemplo la glicilglicina-dipeptidasa la cual requiere Co^{++} o Mn^{++} para su acción.

Se ha demostrado la existencia de enzimas con capacidad proteolítica en todos los tejidos examinados (7). Se ha dicho que las catepsinas son capaces de hidrolizar y también sintetizar uniones peptídicas (8) -- (9)(10).

De esta manera la actividad proteolítica es de primordial importancia no solo en la conversión de proteínas no absorbibles en aminoácidos que si traspasan fácilmente la mucosa intestinal, sino que también parece jugar un papel importante en la síntesis y degradación de los tejidos. (Transpeptidación) (11)(figura 2).

Algunas de estas actividades son modificables -

SITIO DE ACCION DE LAS EXOPEPTIDASAS.

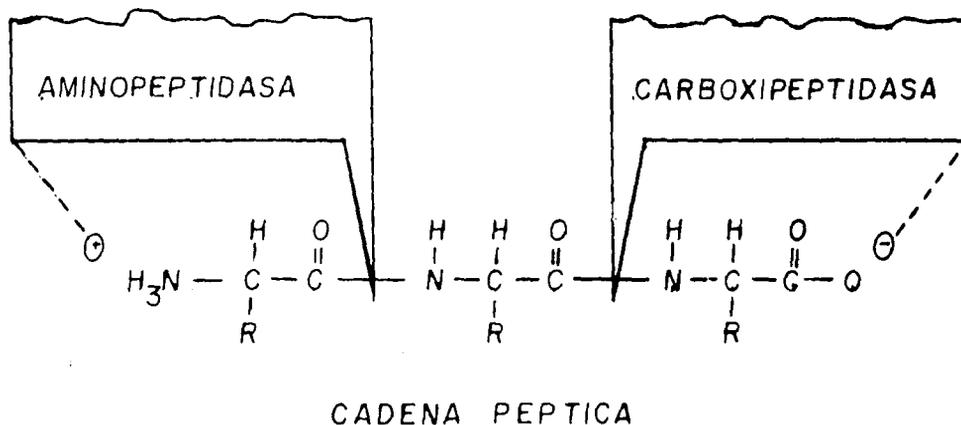


figura N^o 1

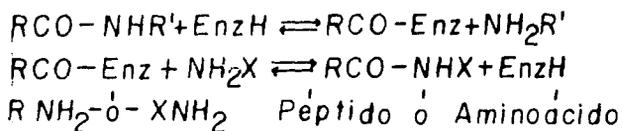


figura N^o 2

Las figuras 1 a 5 fueron proporcionadas gentilmente por el Dr. Carlos Gitler, del Depto. de Bioquímica del Hospital de Enfermedades de la Nutrición.

bajo influencia endócrina y así se sabe que hormonas de corteza suprarrenal determinan hasta cierto punto la -- cuantía de las secreciones proteolíticas de aparato digestivo y que también aumentan la velocidad de degradación de proteínas tisulares. Asimismo la hormona adrenocorticotrófica tal vez a través de su influencia sobre corteza suprarrenal tiene una influencia similar; -- las hormonas sexuales masculinas y femeninas por el contrario parecen tener efectos opuestos sobre las actividades enzimáticas anteriormente señaladas (12)(13).

Las enzimas proteolíticas han sido útiles para establecer la estructura aproximada de una proteína, -- así como para establecer las partes de una molécula que son esenciales para que esta tenga actividad biológica, así carboxipeptidasas pueden quitar la alanina terminal de la cadena B de la insulina sin pérdida alguna de la actividad hormonal de esta molécula, por lo tanto la -- actividad biológica debe residir en cualquier otro sitio de esta substancia: de la misma manera la pepsina-- puede quitar una parte del extremo C-terminal de la molécula de la adrenocorticotrofina sin destruir su actividad. En contraste con esto la separación de unos cuan-

tos residuos del extremo N-terminal por la leucina aminopeptidasa destruye su acción hormonal (14).

Se sabe que todas estas enzimas en mayor o menor grado pasan a la circulación sanguínea para ser excretadas por riñón, por lo tanto, algunas de ellas pueden ser determinadas en suero y orina, esto ha sido hecho fundamentalmente en las actividades péptica y trípica (15) -- (16)(17) cuyas modificaciones fácilmente demostrables han tenido la importancia de proporcionar una ayuda en el diagnóstico de las enfermedades del aparato digestivo (18).

La determinación de enzimas en torrente circulatorio ha venido recibiendo atención creciente desde hace 50 años ya que su cuantificación representa una importante ayuda para el diagnóstico de diversos padecimientos. Así por ejemplo se ha reconocido la primordial importancia en la cuantificación de las fosfatasas ácida y alcalina para la elucidación de padecimientos óseos, prostáticos y de la glándula hepática: (19) la determinación de transaminasas por otro lado en la actualidad es obligada para la clarificación de cardiopatías, miopatías y hepatopatías (19)(20).

Enfermedades congénitas del tipo de la enfermedad de Von Gierke, la fenil-cetonuria y otros padecimientos -

de gran trascendencia en patología humana como las neoplasias, reciben cada vez más atención desde el punto de vista de la cuantificación y estudio de posibles alteraciones de algunas enzimas indispensables para el metabolismo normal (21). En el caso de leucemias se han encontrado anormalidades en la actividad del suero para las reacciones catalizadas por fosfatasa alcalina, hexoquinasa y deshidrogenasa isocítrica (22).

Se ha observado también que en algunos padecimientos gastrointestinales aparecen o aumentan actividades catalíticas correspondientes a enzimas que en condiciones normales son vertidas al tracto digestivo ya que participan en el proceso de la digestión y es así que se observan valores altos de pepsina tanto en sangre como en orina en la úlcera duodenal (23), amilasa y lipasa se encuentran elevadas en padecimientos inflamatorios del páncreas lo mismo que la actividad triptica en procesos agudos de este órgano (17)(24)(25).

Para medir la actividad de pepsina y tripsina es necesario buscar substratos adecuados para estas enzimas, pues existen especificidad de las enzimas con respecto a los aminoácidos que forman el enlace peptídico

co que se hidroliza.

Es así que la tripsina es capaz de romper uniones peptídicas en las que participa el grupo carboxilo de leucina y arginina (figura 3); en cambio la pepsina hidroliza uniones peptídicas formadas por tirosina, fenil-alanina y ácido glutámico cuando este último aminoácido no está separado de fenil-alanina y tirosina por más de dos -- aminoácidos (26)(27)(28)(29)(figura 4).

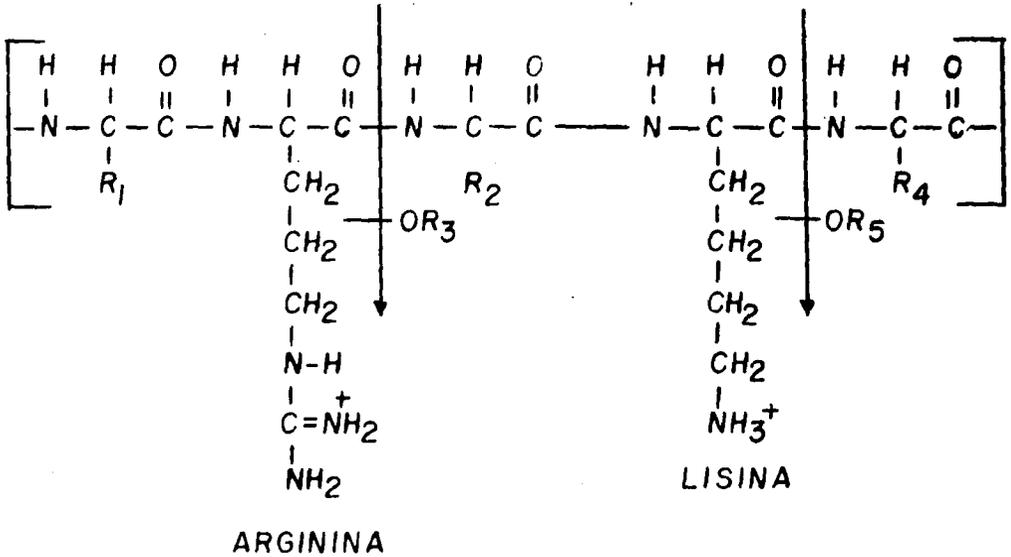
Otros aminoácidos del tipo de la cisteina y leucina aumentan la velocidad de hidrólisis de las uniones citadas.

Un substrato útil por lo tanto, para medir ambas actividades es la hemoglobina desnaturalizada ya que esta molécula tiene las uniones peptídicas susceptibles de ser atacadas; desde luego en el caso de la pepsina el pH deberá ser ajustado a 1.8, que permite la transformación del pepsinógeno (forma en la que se encuentra la enzima en -- sangre y orina) a pepsina; este proceso consiste en el -- rompimiento de nueve uniones peptídicas del pepsinógeno -- con la liberación de la molécula de la pepsina activada -- de un péptido básico con un peso molecular de 3,000 y de ocho aminoácidos más (30).

Esta activación por el pH adecuado del medio con-



 TRIPSINA



pH OPTIMO ± 8

HIDROLIZA UNIONES TIPO AMIDA, PEPTIDICA Y ESTER

figura N^o 3

tinua después autocatalíticamente es decir, que la pepsina formada actúa sobre el pepsinógeno para producir mayor cantidad de pepsina; esto hace suponer que las uniones peptídicas que son atacadas en el proceso de transformación del precursor a la forma activa de la enzima son uniones en las cuales interviene algún aminoácido aromático del tipo de la fenil-alanina y tirosina.

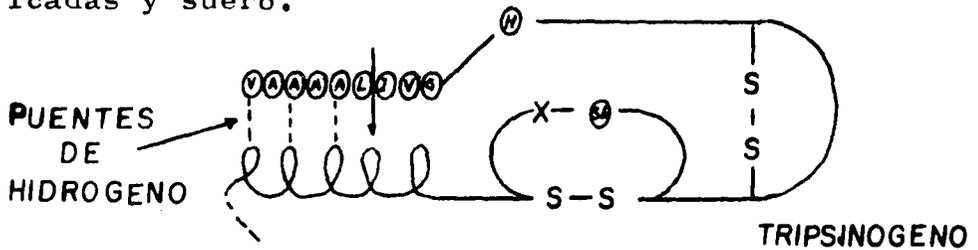
Este proceso de autodigestión puede continuar hasta obtener fragmentos de peso molecular de 10.000 que aún conservan actividad proteolítica (14).

De modo similar para medir actividad trípica el pH debe ajustarse por arriba de 7 con lo cual la molécula de tripsinógeno, se transforma a la enzima activa por liberación de un péptido con cinco aminoácidos (rompimiento de una unión en la que participa lisina)(31)(figura 5).

Puesto que variaciones en la actividad péptica y trípica en suero ocurren en enfermos con padecimientos del aparato gastrointestinal y ya que estas dos enzimas actúan sobre un substrato común, que reúna las condiciones de especificidad de ambas, como es la hemoglobina desnaturalizada pareció interesante explorar la posibilidad de discriminar entre las actividades de trip

sina y pepsina al variar fundamentalmente el pH en el que se incuba el suero con el substrato.

Para este propósito se hace necesario estudiar el comportamiento cinético de las enzimas mencionadas, utilizando como fuente de las mismas preparaciones purificadas y suero.



RECTIDO DE
ACTIVACION

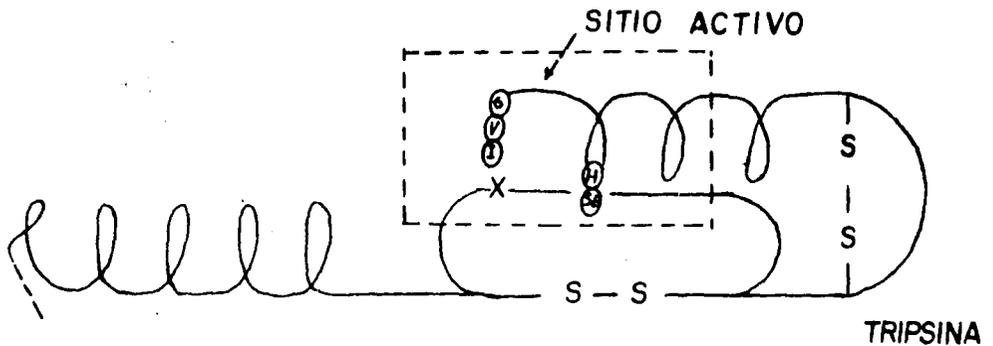


figura N^o 5

II.- MATERIAL Y METODOS

MATERIAL Y METODOS.

Como fuente de enzima se usaron preparados comerciales que son extracto de mucosa gástrica⁺ y de tejido pancreático⁺⁺, además se empleó también suero de personas normales.

ACTIVIDAD PEPTICA (32)

FUNDAMENTO DEL METODO.-

El método descrito por Anson se basa en la digestión de proteína desnaturalizada por pepsina bajo condiciones establecidas después de la cual, proteína no digerida se precipita con ácido tricloroacético y se elimina por filtración. La cuantía de la digestión que constituye la medida de la acción proteolítica se determina en el filtrado con la ayuda del reactivo de fenoles. El color azul producido por la reacción con la tirosina y el triptofano se mide a 660 m μ y se convierte a unidades de pepsina en curva standard.

REACTIVOS EMPLEADOS:

1.- Substrato de Hemoglobina:

La solución del substrato contiene hemoglobina al 2% en HCl 0.06 N. el pH es 1.8 y esto desnaturaliza la hemoglobina.

+ Acidol-Pepsina (Merck) ++ Panteric (Park-Davis)

Se debe tener la precaución de disolver perfectamente la hemoglobina con muy poca solución de HCl 0.06 se afora y se guarda en refrigerador. Esta solución es útil hasta 15 días después de su preparación.

2.- Acido Tricloroacético al 5% (0.3M)

3.- Hidróxido de Sodio 0.5 N.

4.- Reactivo de Folin y Ciocalteu. (33)

PROCEDIMIENTO.

Cinco ml. de substrato se añaden a 1 ml. de solución enzimática se incuba 24 horas a 37°C, se para la reacción con 10 ml. de Acido Tricloroacético al 5% y se filtra; de este filtrado se toma 5 ml. y se les añade - 10 ml. de Hidróxido de Sodio 0.5 N y 3 ml. de reactivo-Folin y Ciocalteu diluído con dos volúmenes de agua, se agita continuamente; y se lee después de 5 minutos.

UNIDAD.

Se define como unidad de actividad proteolítica como la cantidad de enzima necesaria para liberar 1 microgramo de tirosina en 24 horas.

Ya que se demuestra, como se verá más adelante en los resultados, que la curva de progreso es lineal - por lo menos durante 24 horas para las actividades habi

tualmente encontradas en suero, se escoge un tiempo de incubación de 6 horas aunque se expresa las unidades - como si la incubación fuera a 24 horas.

ACTIVIDAD TRIPTICA (15)

FUNDAMENTO DEL METODO.-

Es el mismo que para la pepsina.

REACTIVOS EMPLEADOS.-

1.- Substrato de Hemoglobina

2.2 g. de hemoglobina, se pasan a un matraz volumétrico de 100 ml. con la mitad de agua, se añade 36 g. de urea y 8 ml. de sosa 1N se afora con -- agua destilada, se deja reposar a la temperatura ambiente por 30 ó 60 minutos para desnaturalizar la hemoglobina; posteriormente se le añade 10 ml. de una solución de fosfato monopotásico 1 M y 4 g. de urea; el pH final debe ser 7.5.

2.- Acido Tricloroacético al 5%

3.- Hidróxido de Sodio 0.5 N.

4.- Reactivo de Folin y Ciocalteu (33)

PROCEDIMIENTO.

A 5 ml. del substrato pH 7.5 se añade 1 ml. de solución enzimática y se incuba a 37°C en baño maría -

por espacio de 10 minutos se para la reacción con 10 ml. de ácido tricloroacético al 5% y se deja reposar a temperatura ambiente por 30 minutos; posteriormente se filtra a través de papel Whatman #1 y se desarrolla color como en la determinación de la pepsina; las densidades ópticas se refieren a la curva estandard.

UNIDAD.-

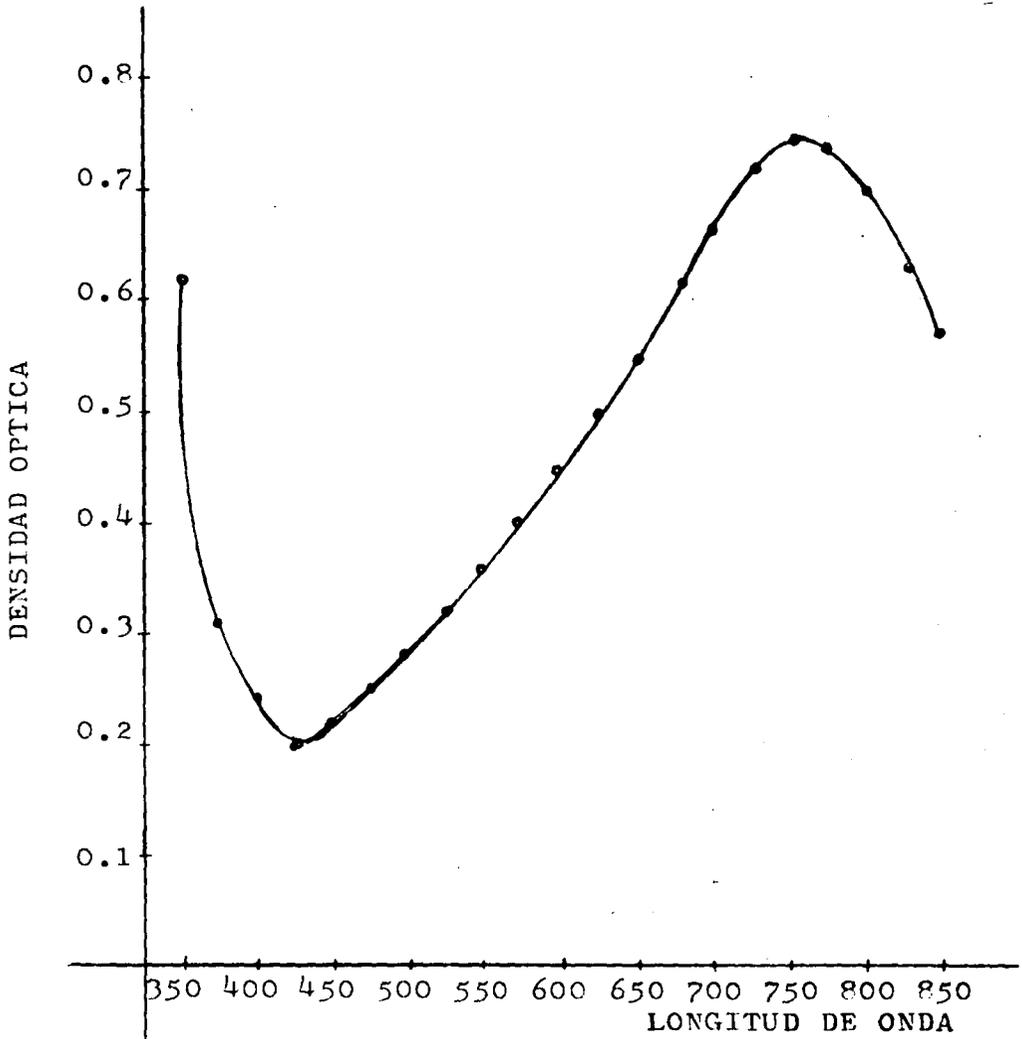
La unidad es equivalente a la unidad de actividad péptica.

DESARROLLO DE COLOR DE LA TIROSINA.

La velocidad de las dos reacciones enzimáticas se determina mediante la cuantificación de la tirosina liberada como producto, se hizo una exploración de las condiciones de desarrollo de color a fin de precisar los factores de la reacción que influyen en la intensidad del mismo.

III.- a) RESULTADOS

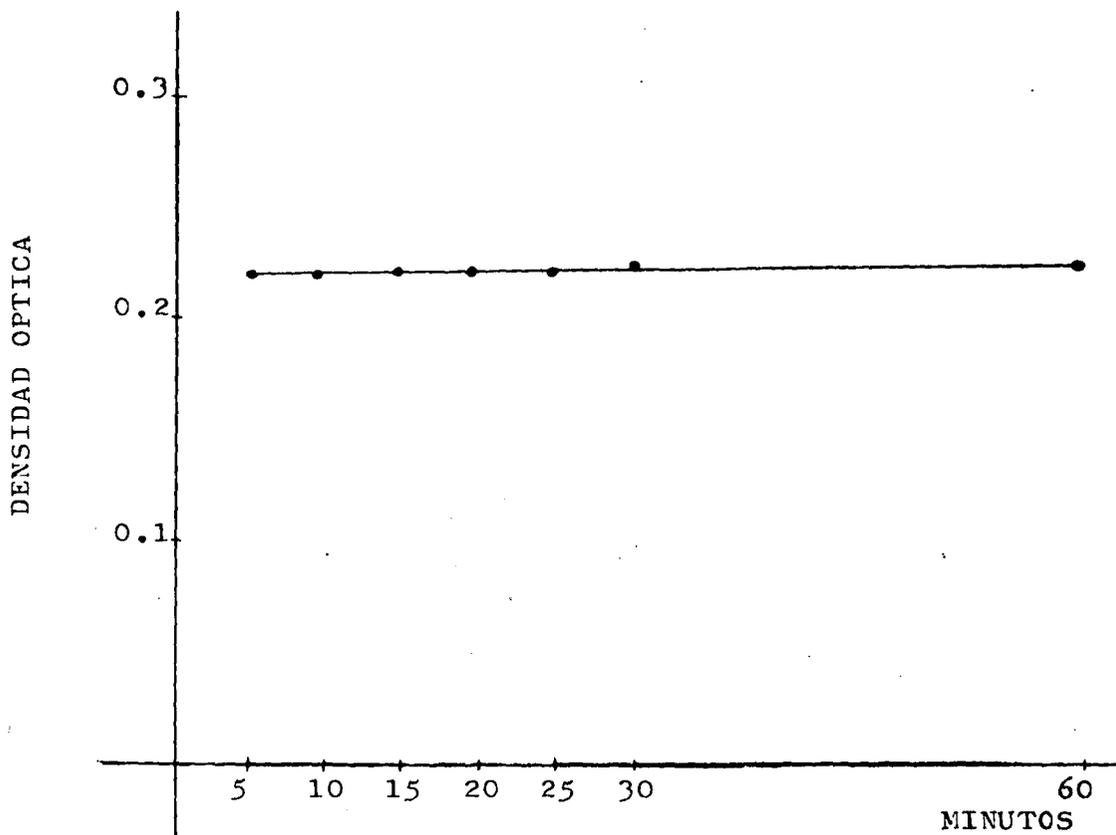
Figura No. 1



ESPECTRO DE ABSORCION.

Con una solución de 60 microgramos de tirosina en 18 ml. se determina la densidad óptica a las longitudes de onda señaladas en la gráfica.

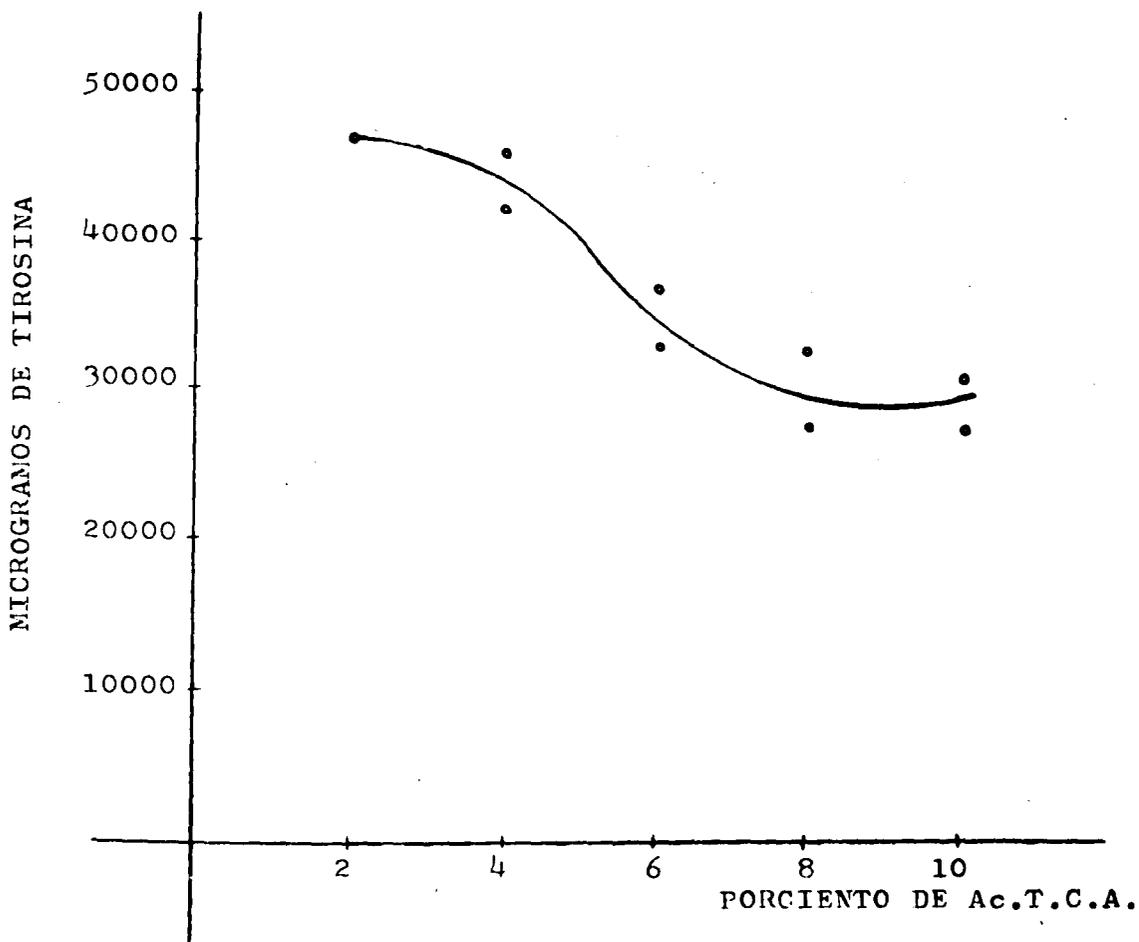
Figura No. 2



ESTABILIDAD DEL COLOR

Se usa la misma concentración de tirosina que en el experimento correspondiente a la gráfica anterior.

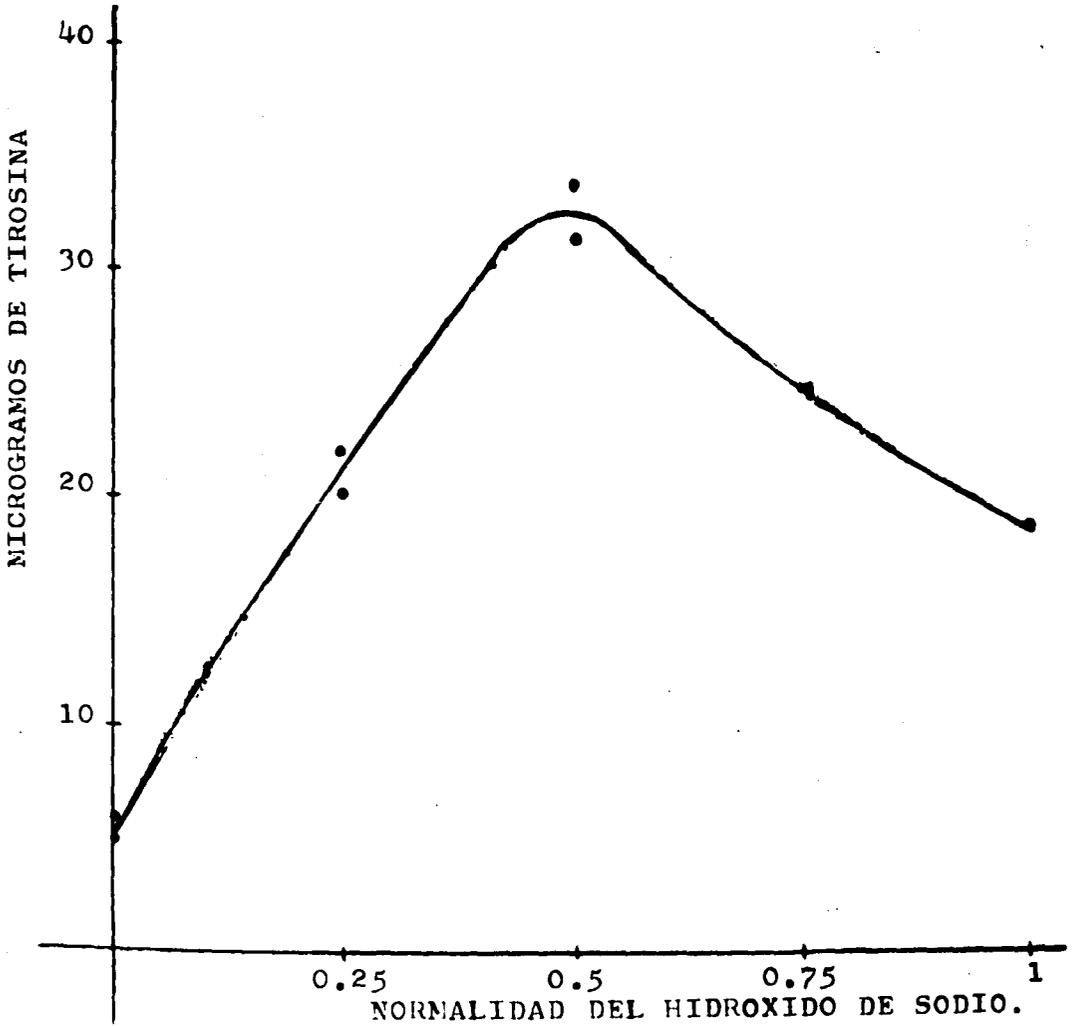
Figura No. 3



VARIACION EN LA CONCENTRACION DE
ACIDO TRICLOROACETICO.

Se usan las concentraciones de substrato y reactivos consignados en la técnica general y las concentraciones de ácido tricloroacético señalados en la gráfica.

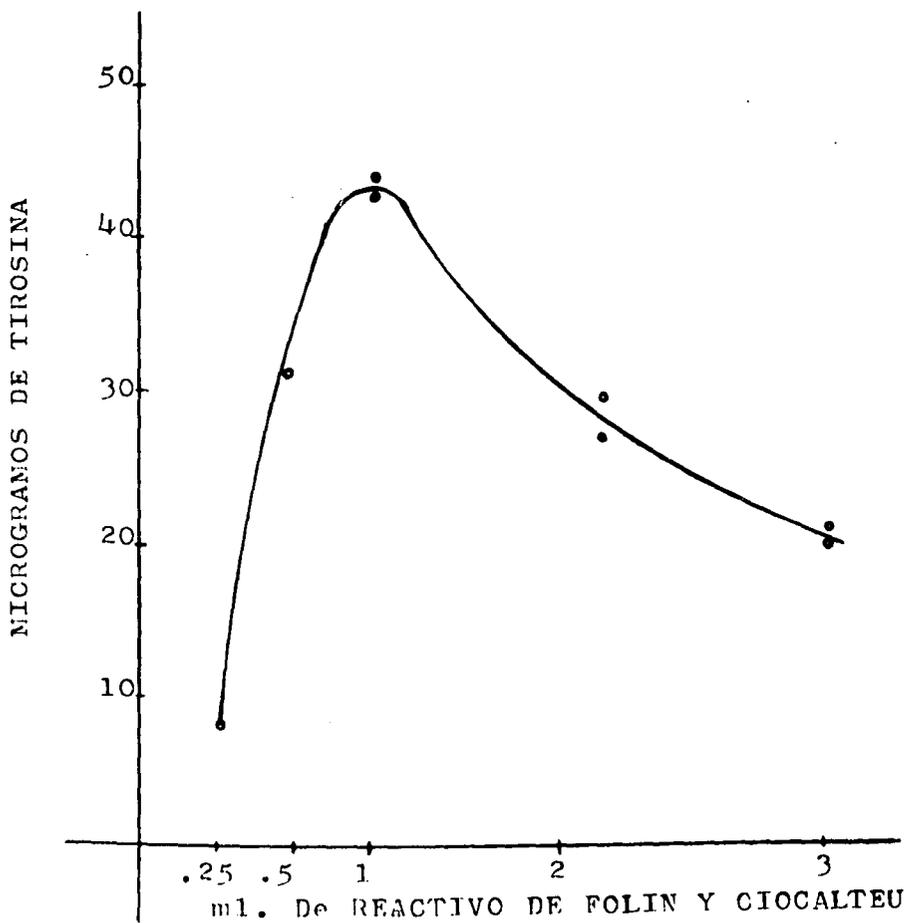
Figura No.4



VARIACION EN LA CONCENTRACION DE HIDROXIDO DE SODIO.

Se sigue el procedimiento general y se varía la concentración de Hidróxido de sodio.

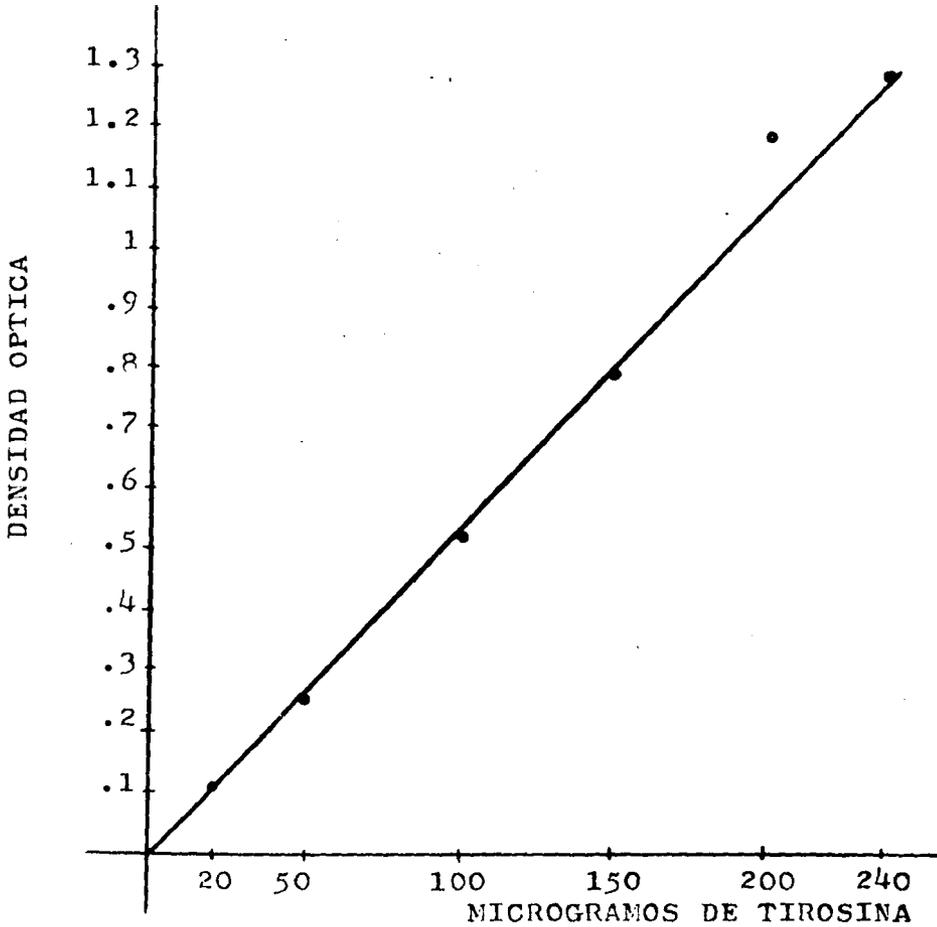
Figura No. 5



VARIACION EN LA CONCENTRACION DEL REACTIVO DE FOLIN Y CIOCALTEU.

Condiciones generales y la cantidad del reactivo de Folin y Ciocalteu señaladas en las abscisas.

Figura No. 6



CURVA ESTANDAR DE TIROSINA.

Se usan las cantidades de tirosina señaladas en las abscisas y se desarrolla el color con el reactivo - de fenoles ya señalada.

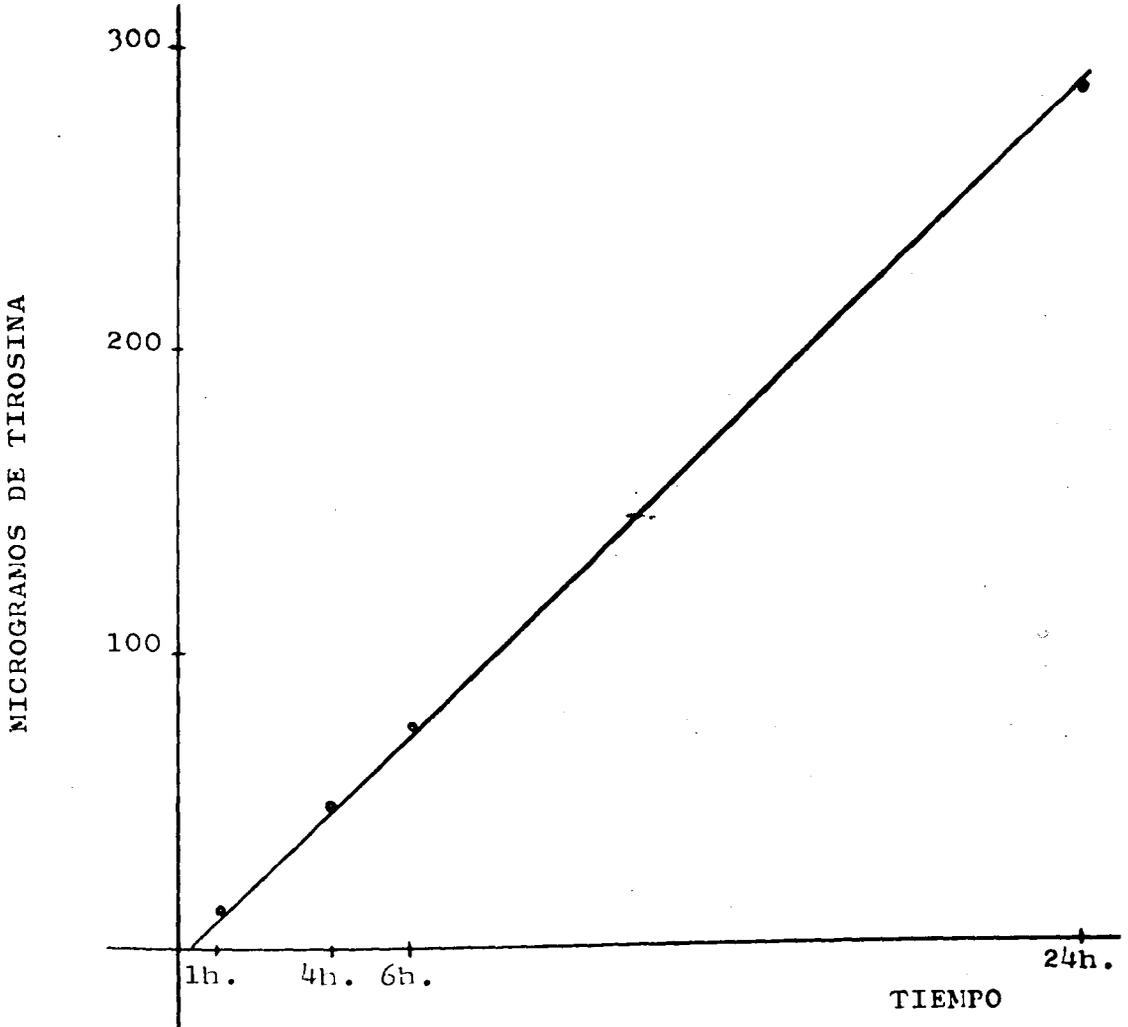
Los experimentos anteriores demuestran que pequeña variación en la longitud de onda, la cantidad de hidróxido de sodio, la cantidad de ácido tricloroacético y el reactivo de Folin y Ciocalteu introducan modificaciones importantes en la intensidad de color, el cual por lo demás es estable por lo menos por 60 minutos; se puede ver que la longitud de onda no corresponde al máximo de absorción.

Es pues necesario ajustarse estrictamente a las cantidades de reactivo, que participen en el desarrollo de color.

Los experimentos anteriores demuestran que poca variación en la longitud de onda, la cantidad de hidróxido de sodio, la cantidad de ácido tricloroacético y el reactivo de Folin y Ciocalteu introducen modificaciones importantes en la intensidad de color, el cual por lo demás es estable por lo menos por 60 minutos; se puede ver que la longitud de onda no corresponde al máximo de absorción.

Es pues necesario ajustarse estrictamente a las cantidades de reactivo, que participan en el desarrollo de color.

Figura No. 7



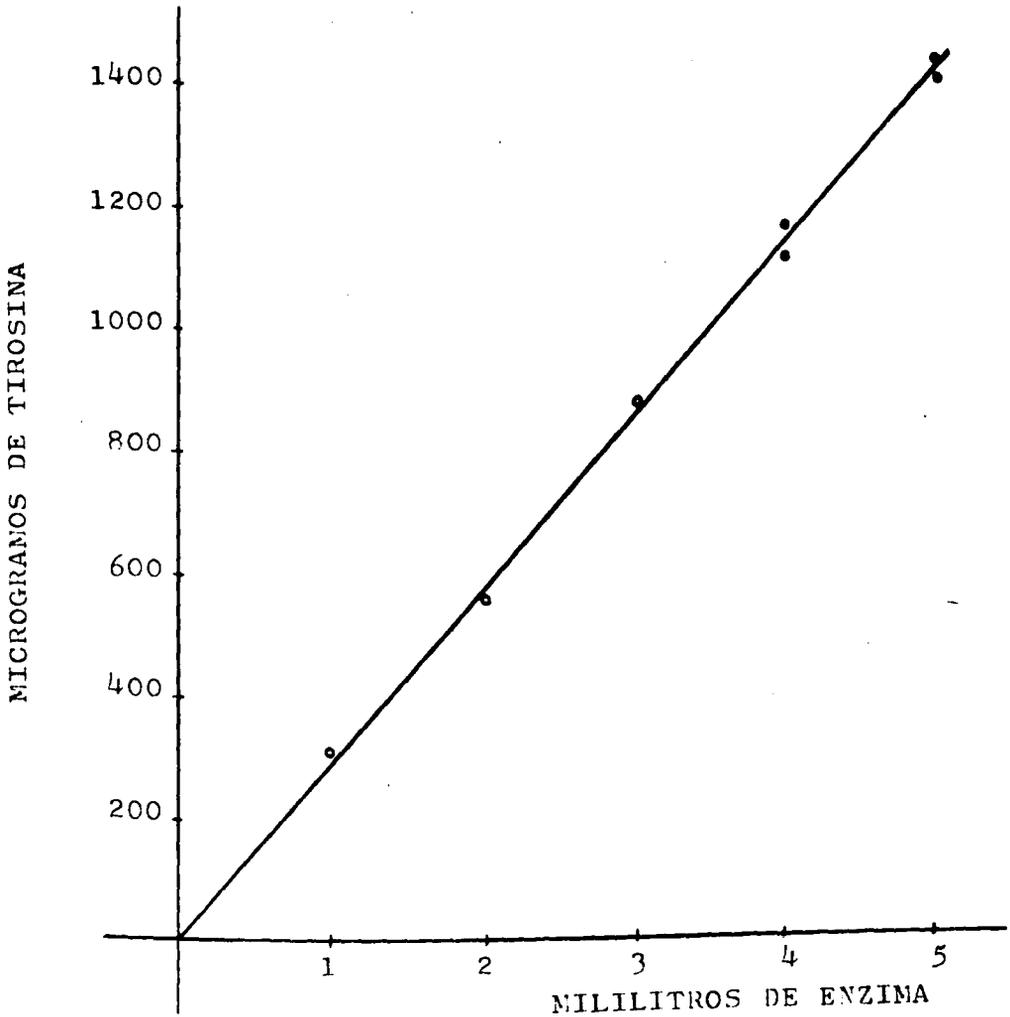
+ ACTIVIDAD PEPTICA.

CURVA DE PROGRESO.

Cada tubo contiene 5 microgramos de enzima y los demás reactivos consignados en el método general. Se incuba los tiempos indicados en la gráfica anterior.

A. B. ... Comercial.

Figura No. 8

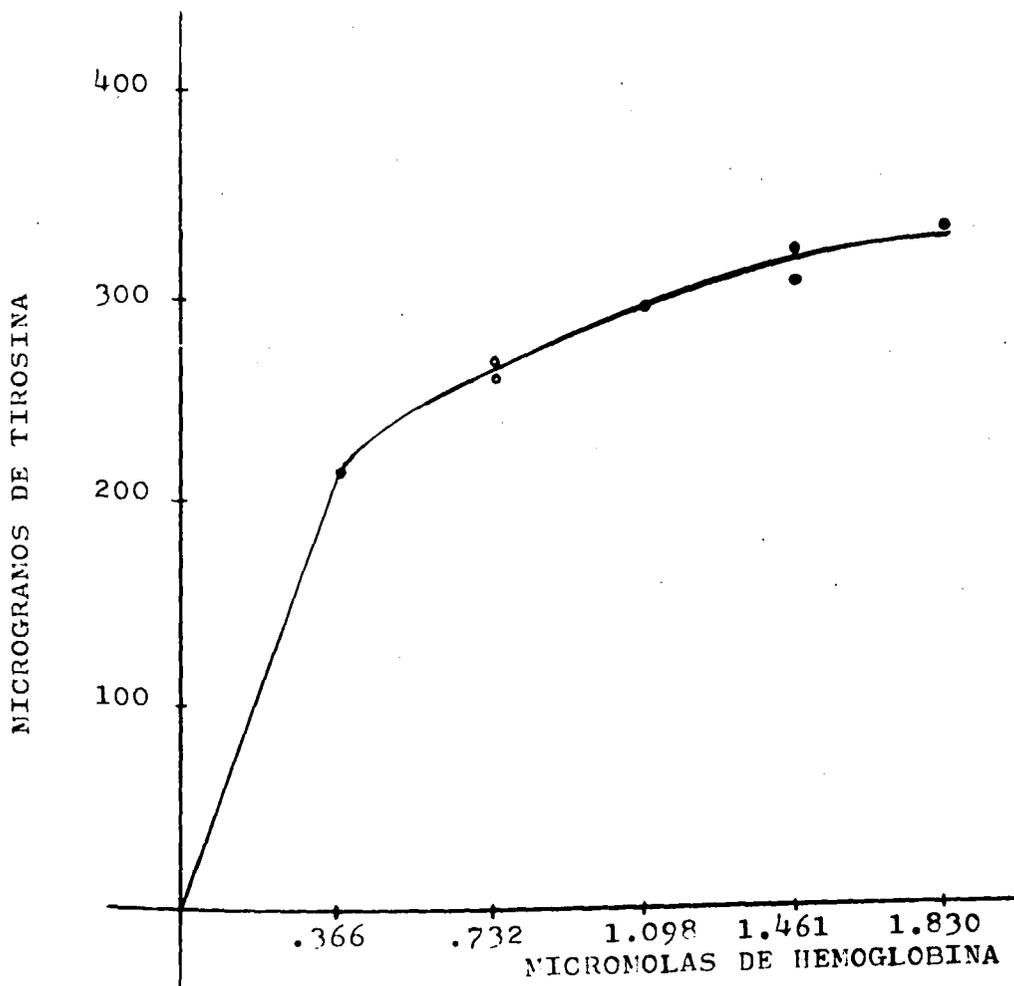


+ ACTIVIDAD PEPTICA

VARIACION EN LA CONCENTRACION DE ENZIMA.

Hidrólisis de hemoglobina en cantidad constante por diferentes concentraciones de enzima.

Figura No. 9

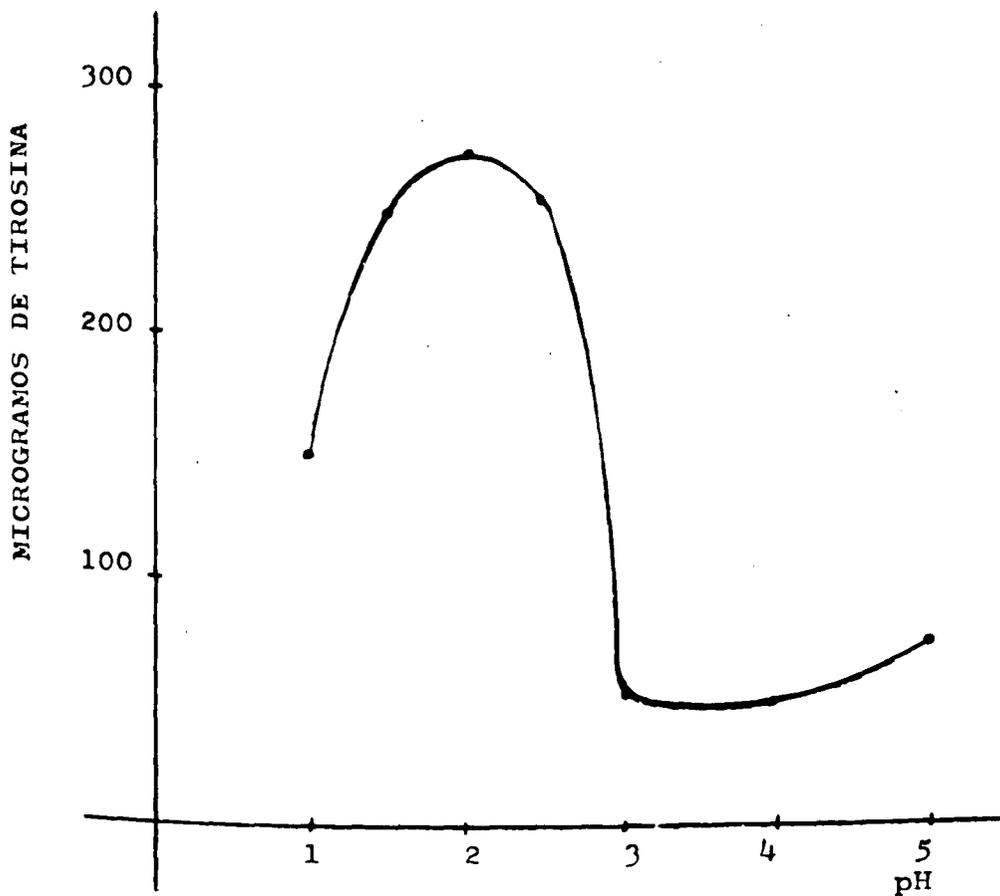


+ ACTIVIDAD PEPTICA

VARIACION EN LA CANTIDAD DE SUBSTRATO.

Se usan las cantidades de substrato señaladas en la gráfica; las concentraciones de enzima y reactivos -- son las indicadas en el método general y en la curva de progreso.

Figura No. 10



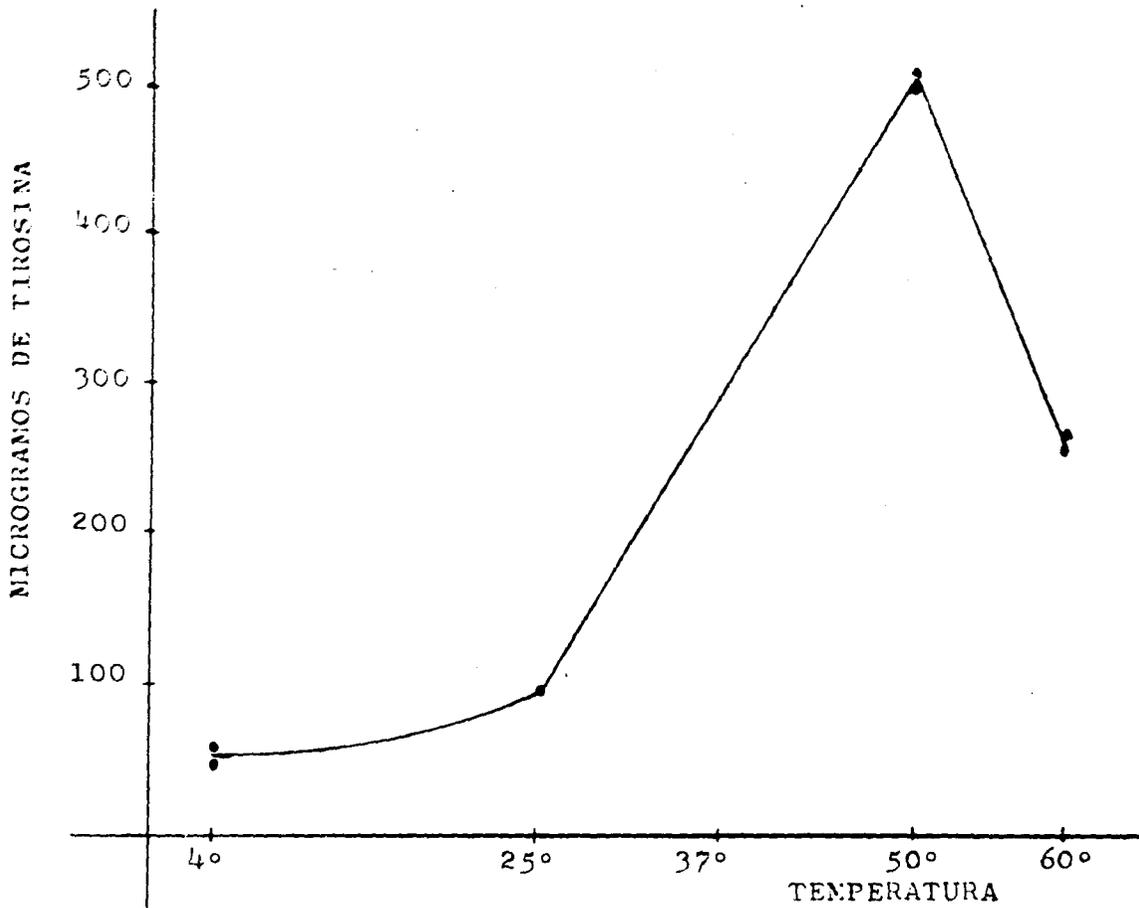
+ ACTIVIDAD PEPTICA

VARIACION DE pH

Se variaron los pH(s) señalados en la gráfica.

+ Preparado Comercial

Figura No. 11



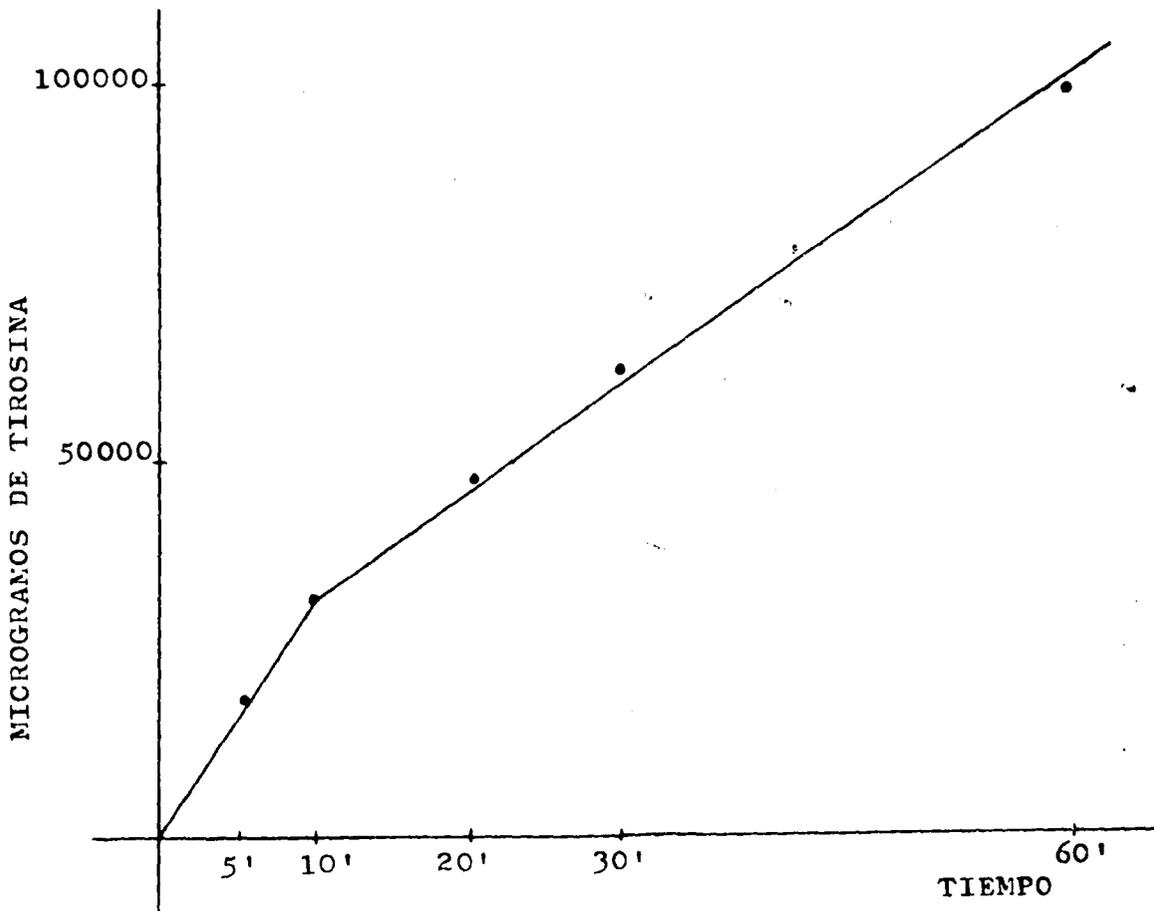
+ ACTIVIDAD PEPTICA

VARIACION DE TEMPERATURA.

Se determina actividad a diferentes temperaturas en las condiciones señaladas.

+ Preparado Comercial (5 ug. en cada tubo)

Figura No. 12



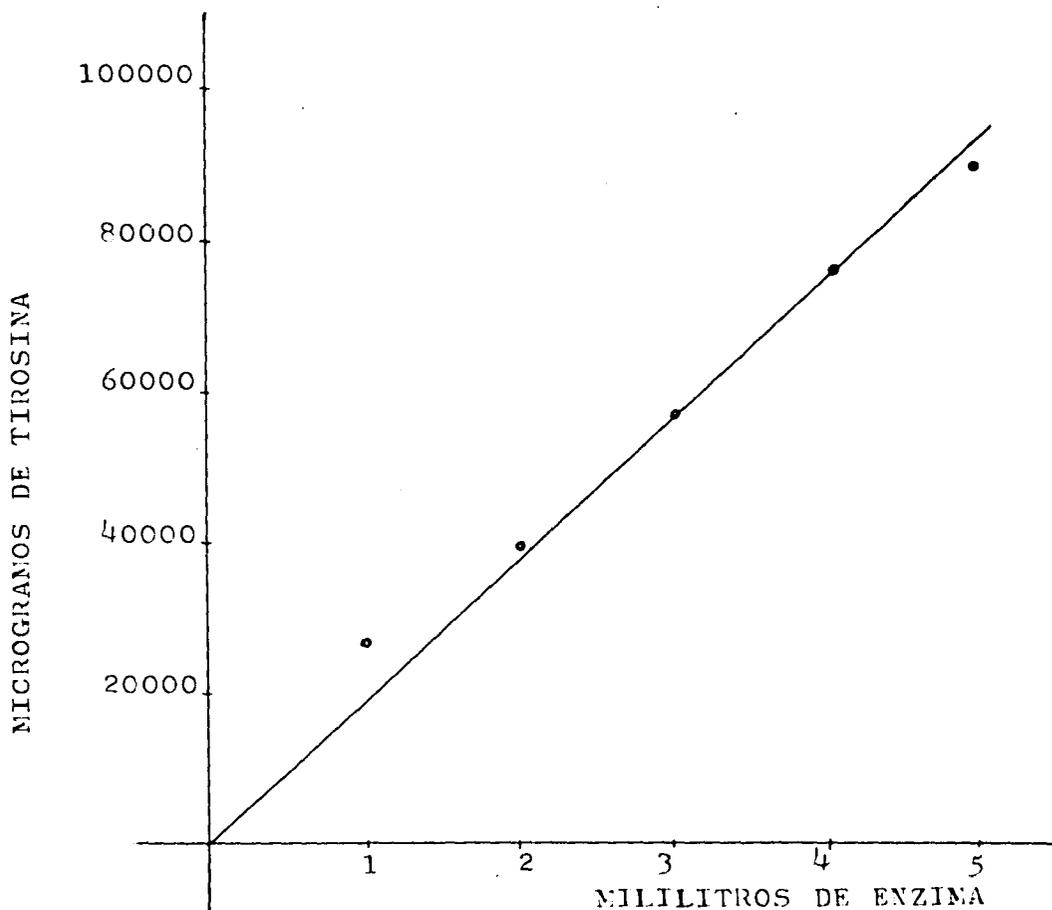
↓ ACTIVIDAD TRIPTICA.

CURVA DE PROGRESO.

Se usan cuatro microgramos de preparado comercial y se determinan las actividades a los tiempos señalados.

Comercial

Figura No. 13

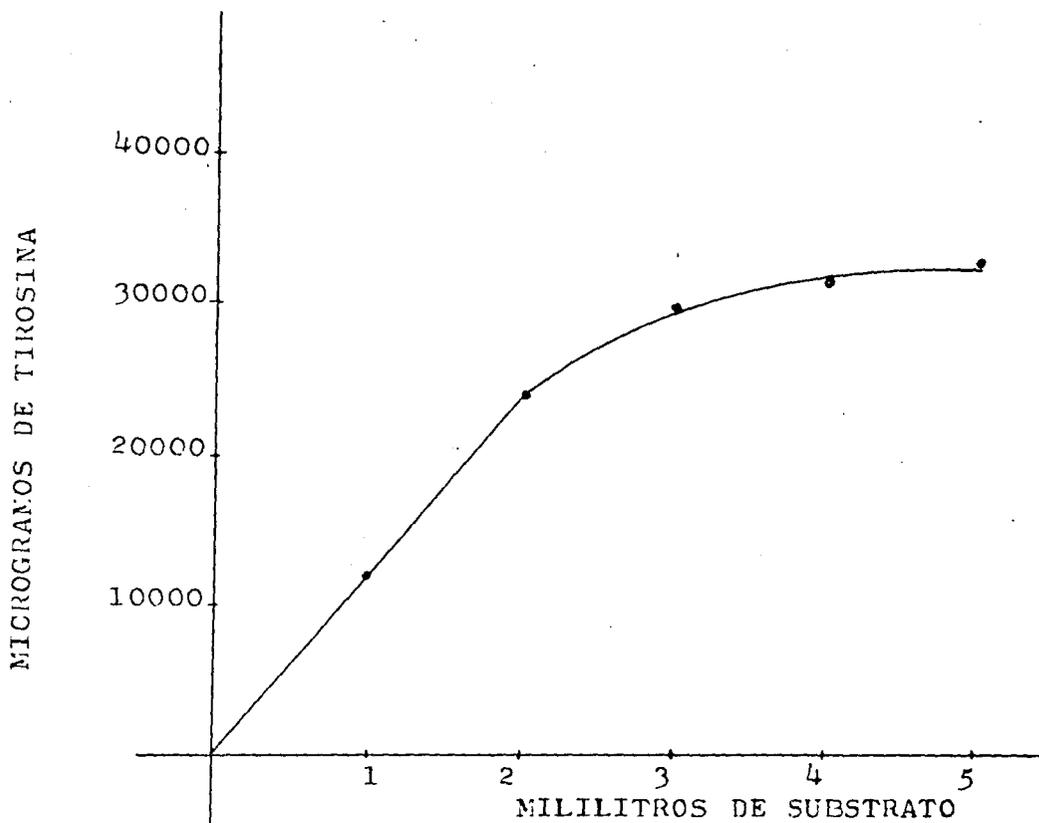


4 ACTIVIDAD TRIPTICA.

CURVA DE CONCENTRACION DE ENZIMA

Se usan las concentraciones de enzima señaladas y se mantienen constante los otros factores de la reacción. Un mililitro de la solución es equivalente a 2 - microgramos de tripsina.

Figura No. 14



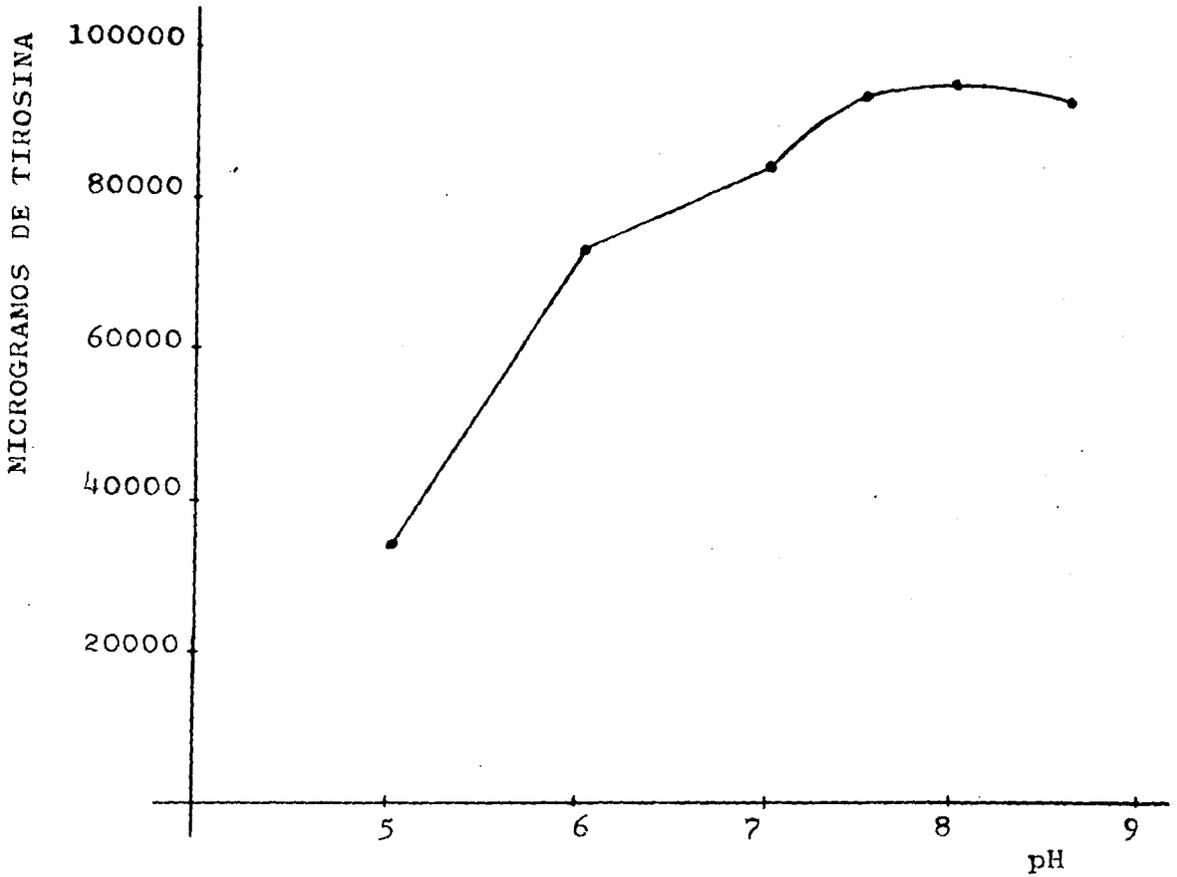
+ ACTIVIDAD TRIPTICA.

VARIACION EN LA CANTIDAD DE SUBSTRATO

Se usan los mililitros de substrato señaladas en la gráfica, un mililitro es equivalente a 0.322 micromolas de hemoglobina.

+ Preparado Comercial

Figura No. 15



+ ACTIVIDAD TRIPTICA

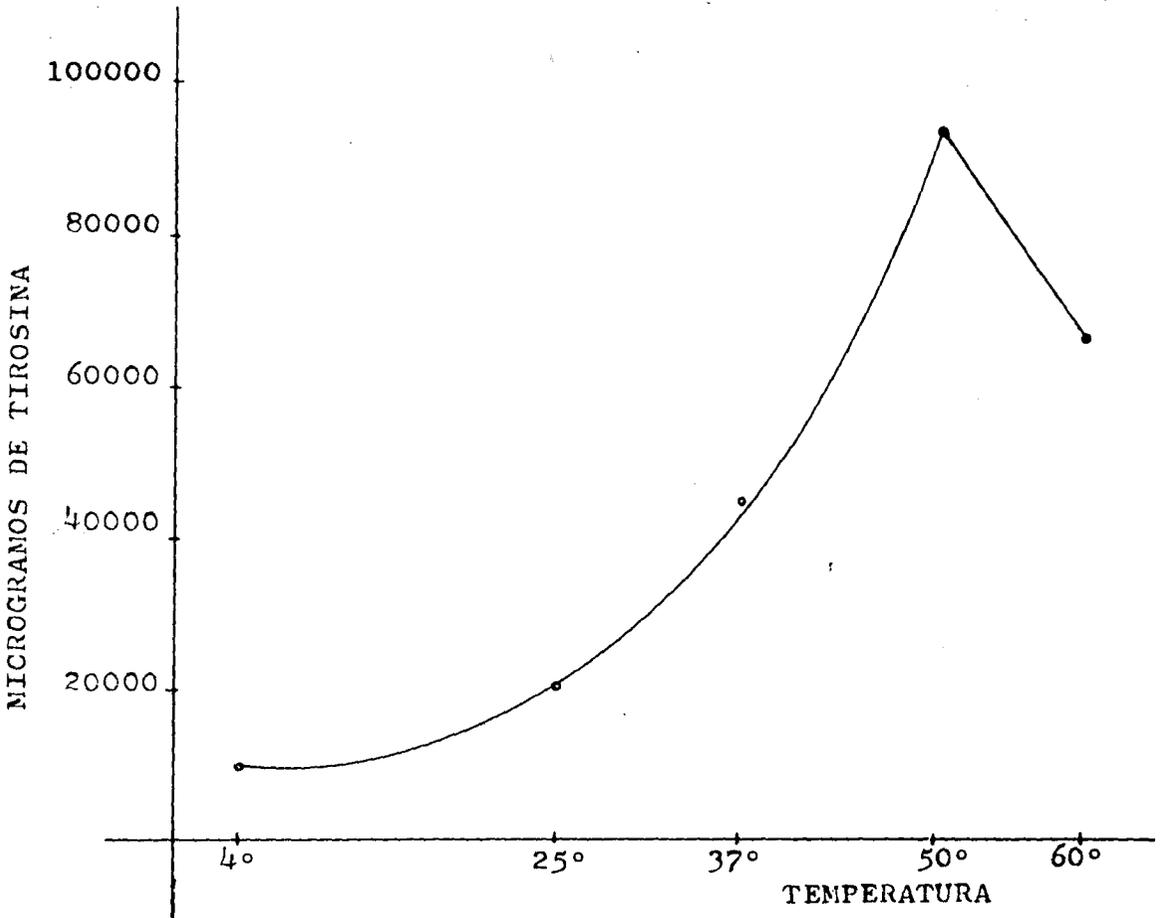
VARIACION DE pH

Se usan amortiguadores de citrato y fosfatos -

0.2N.

+ Preparado Comercial

Figura No. 16



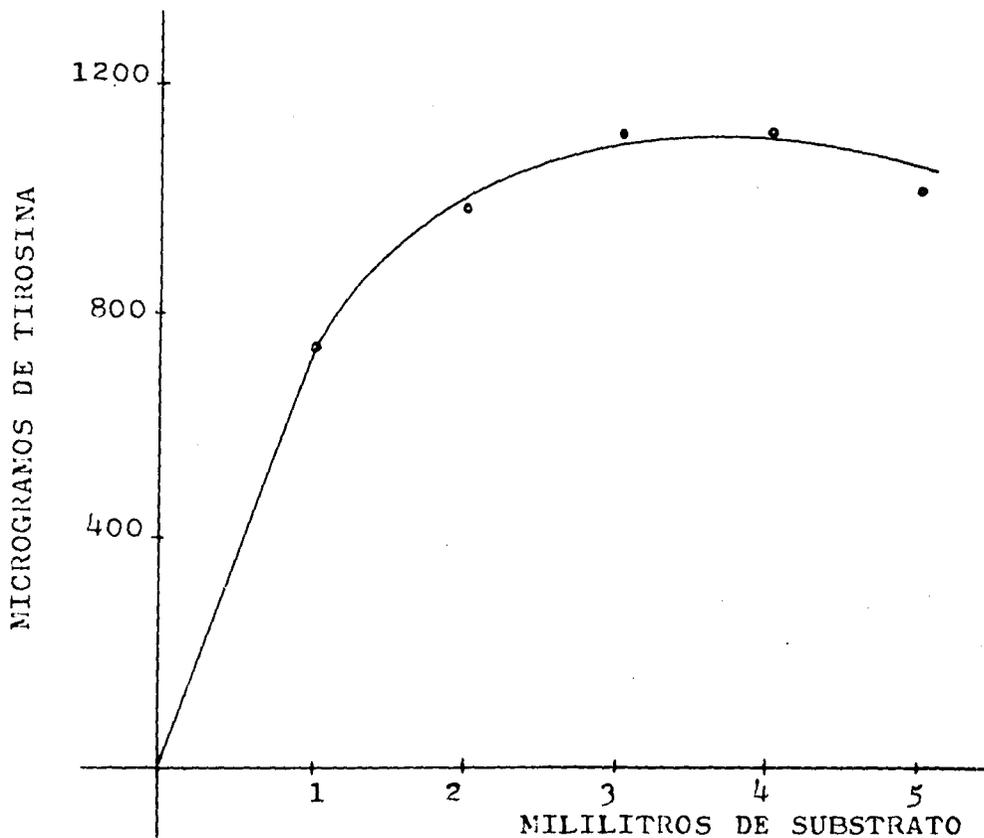
+ ACTIVIDAD TRIPTICA.

VARIACION DE TEMPERATURA.

Se preincuban enzima y reactivos a la temperatura señalada y se sigue el procedimiento general.

+ Preparado Comercial.

Figura No. 17

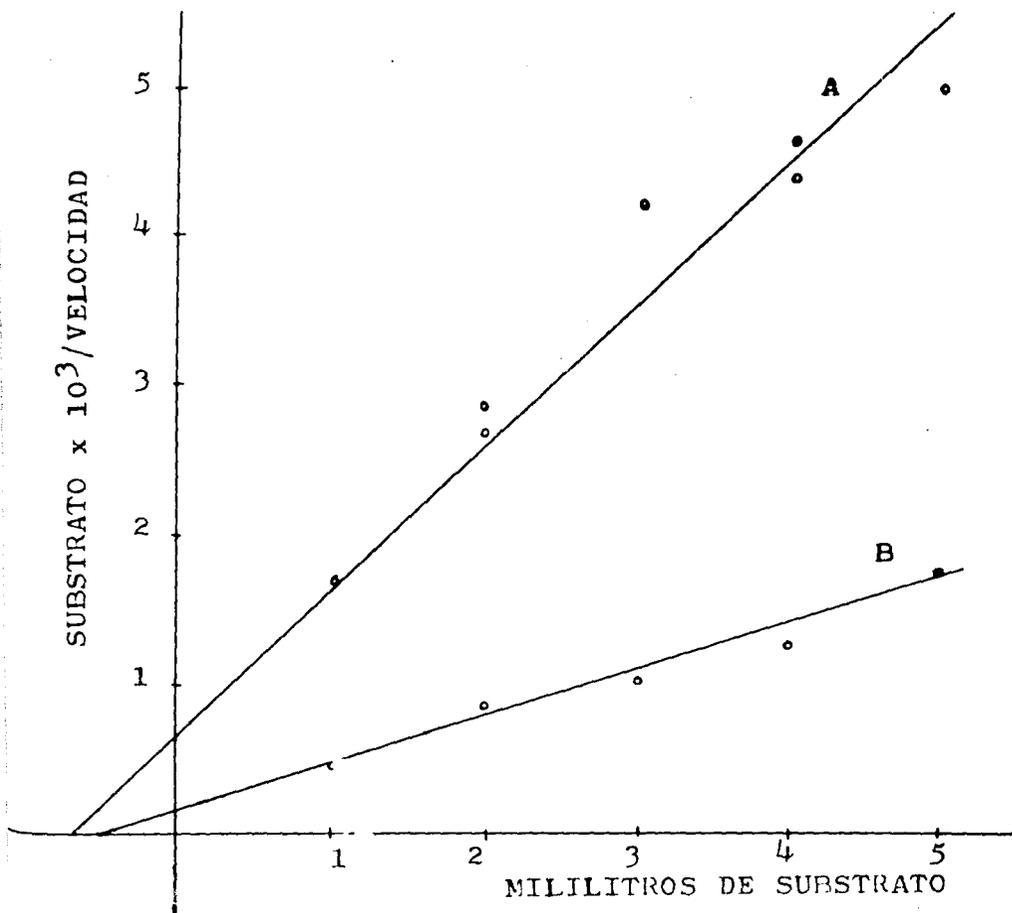


ACTIVIDAD "PEPTICA" EN SUERO

VARIACION DE SUBSTRATO.

Se usa un mililitro de suero y las otras condiciones como en la figura No. 9

Figura No. 18

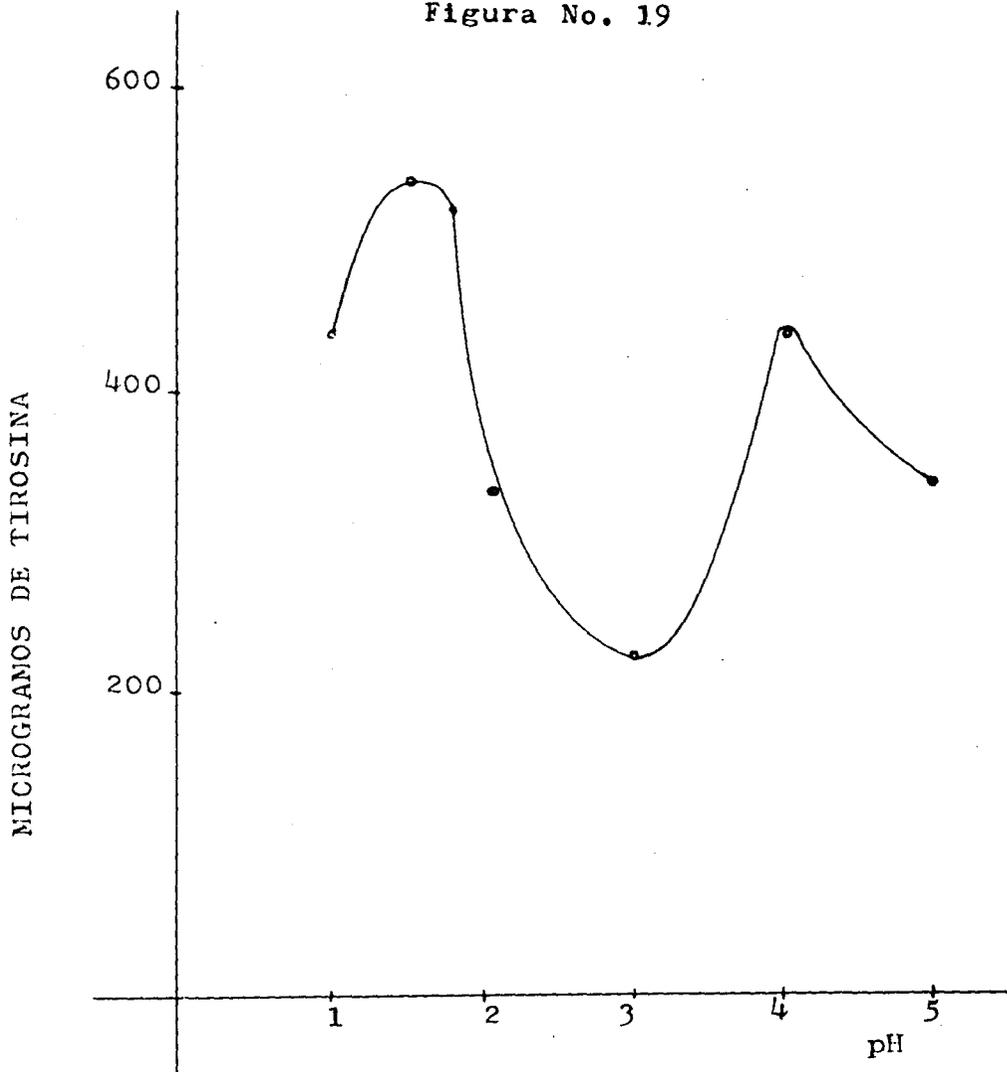


GRAFICA PARA CALCULAR LA CONSTANTE DE MICHAELIS.

A.- Preparado Comercial

B.- Suero.

Figura No. 19

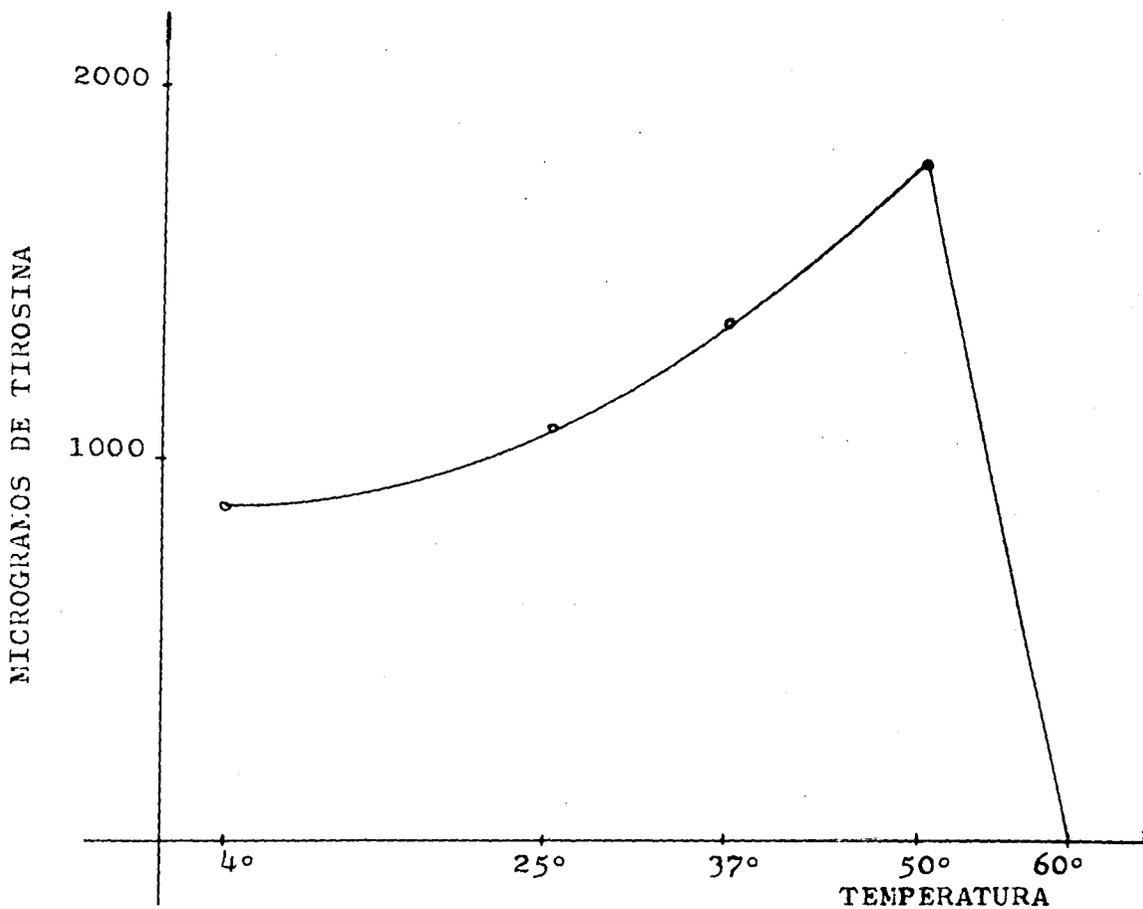


ACTIVIDAD "PEPTICA" EN SUERO

VARIACION DEL pH

Condiciones generales como en la figura No.10

Figura No. 20

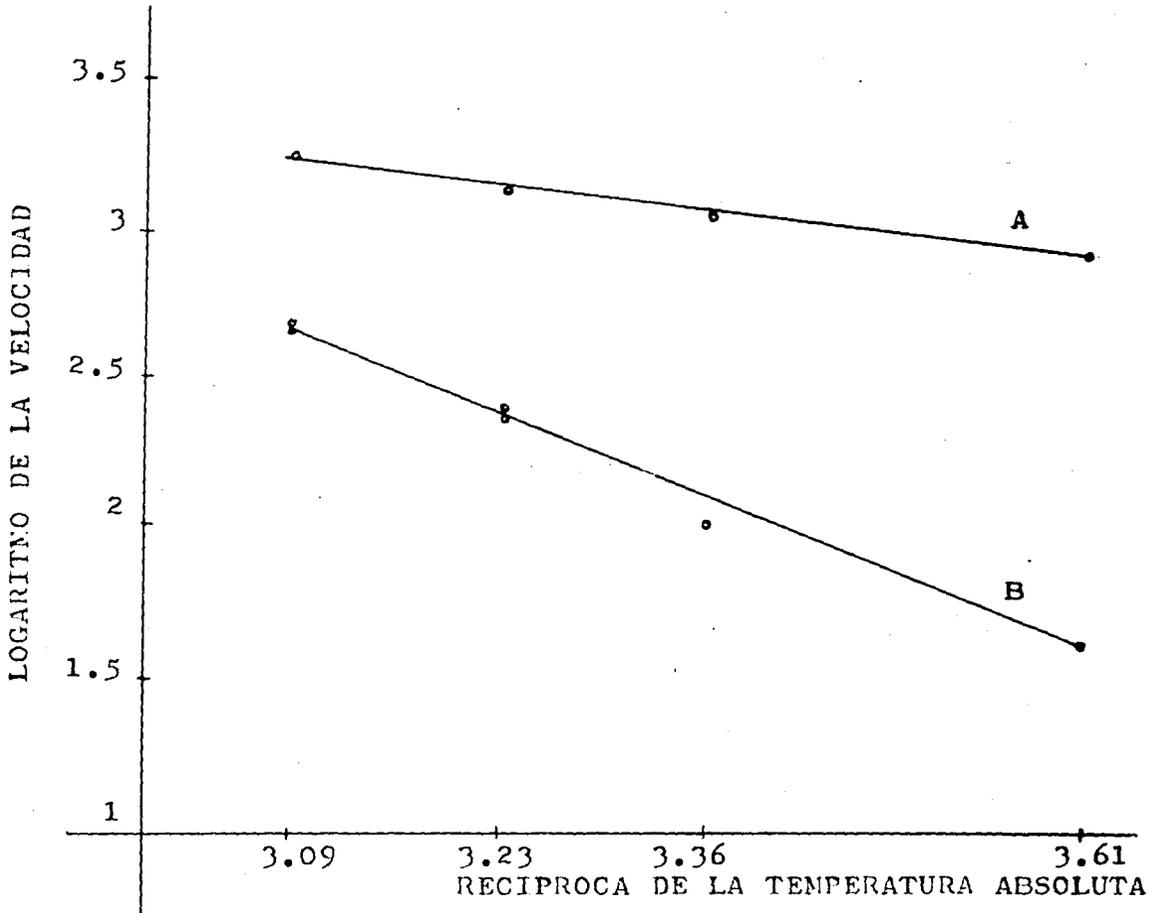


ACTIVIDAD "PEPTICA" EN SUERO

INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA.

Condiciones como en la gráfica No. 11

Figura No. 21

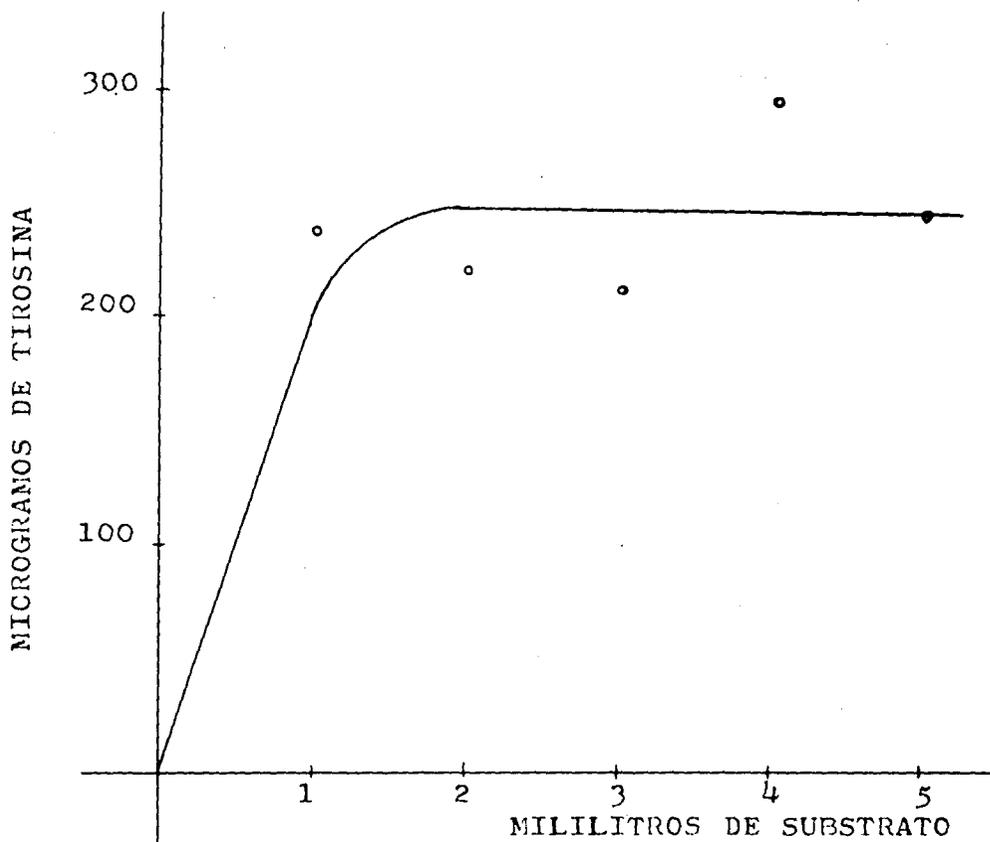


ENERGIA DE ACTIVACION

A.- Actividad peptica en suero

B.- Preparado Comercial

Figura No. 22

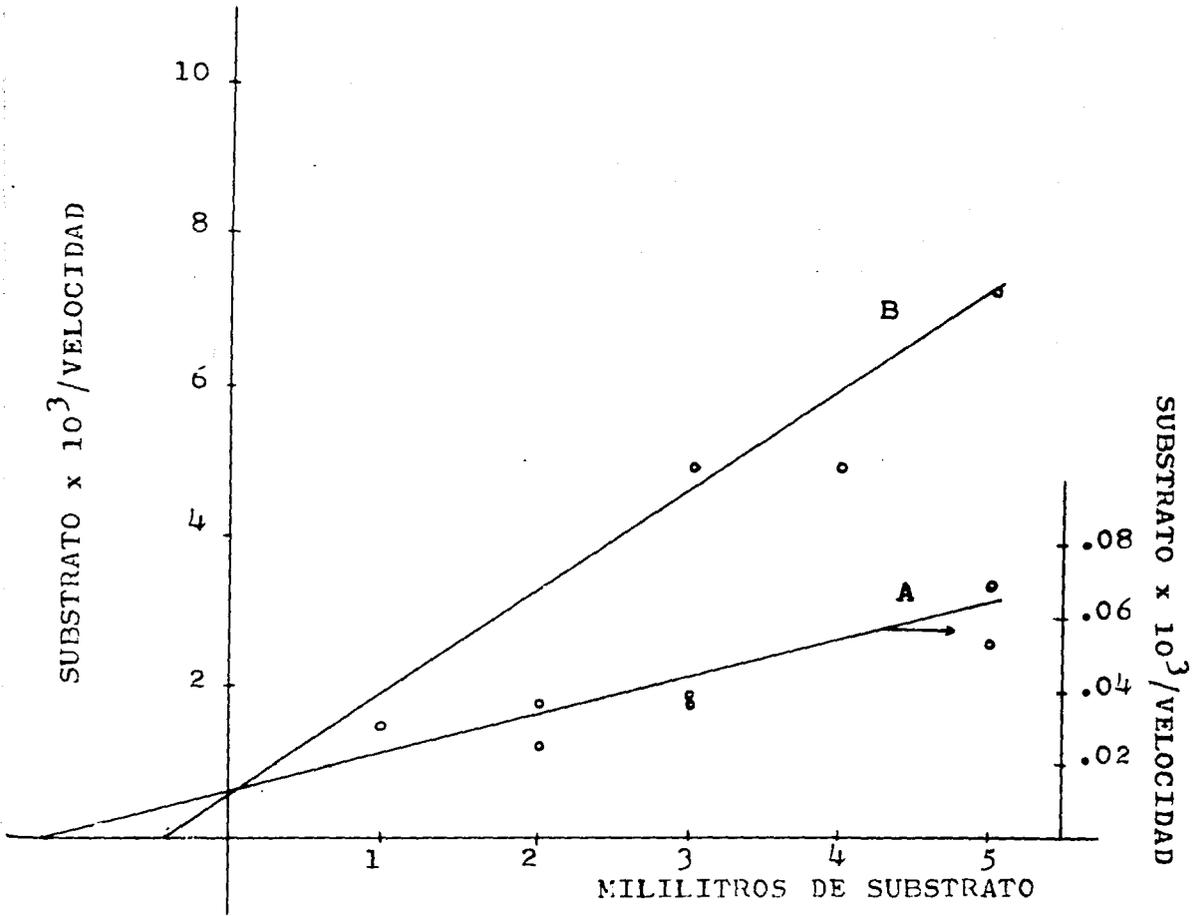


ACTIVIDAD "TRIPTICA" EN SUERO

VARIACION DE SUBSTRATO.

Mismas condiciones que las usadas en la gráfica No. 14

Figura No. 23

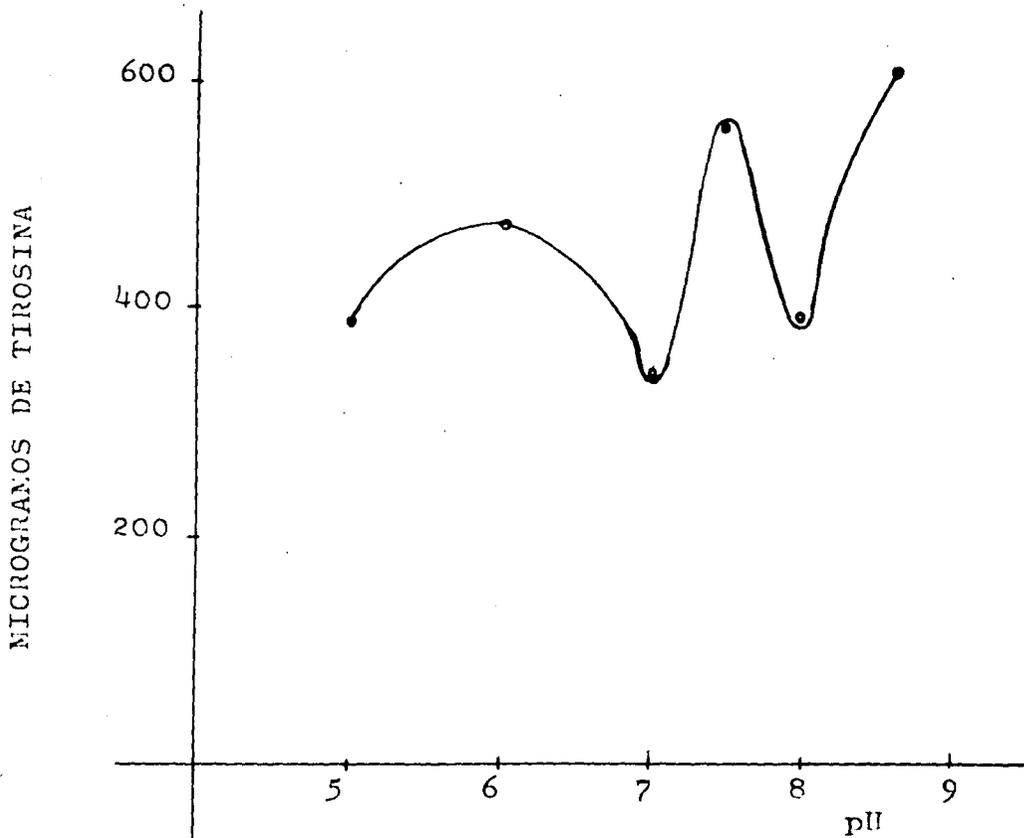


GRAFICA PARA CALCULAR LA CONSTANTE DE MICHAELIS.

A.- Preparado Comercial

B.- Suero

Figura No. 24

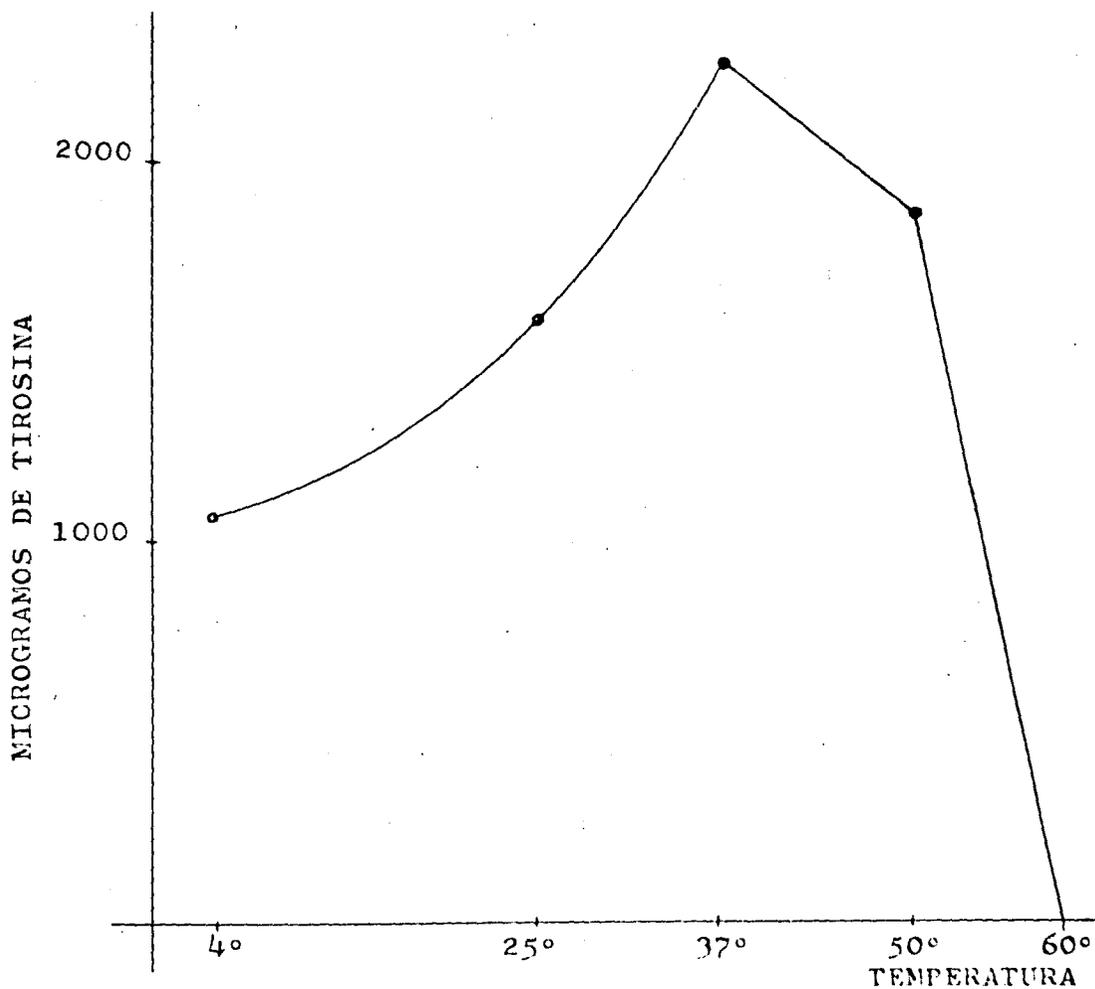


ACTIVIDAD "TRIPTICA" EN SUERO.

VARIACION DEL pH

Se usan las mismas condiciones generales que pa
ra la figura No. 15.

Figura No. 25

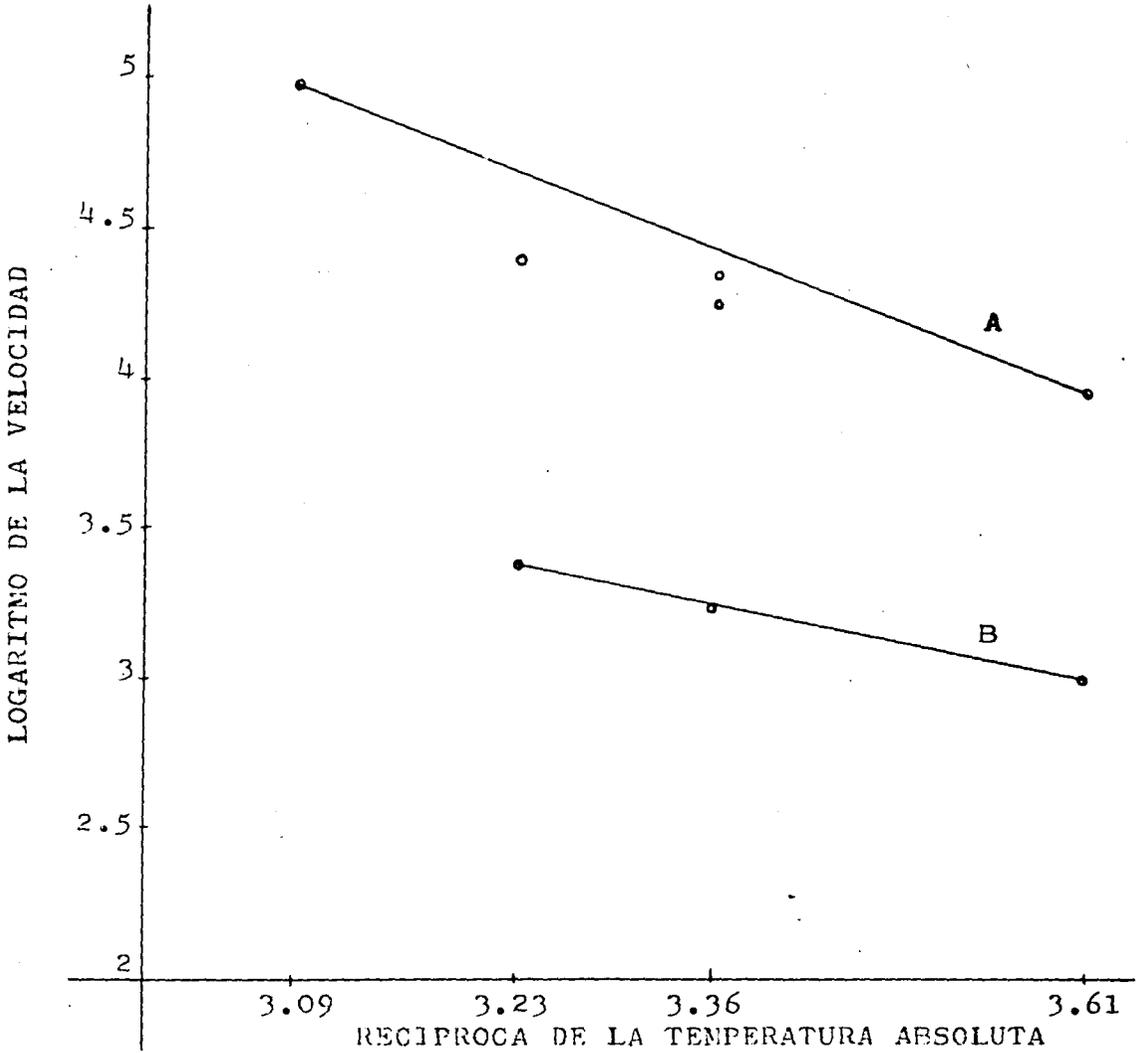


ACTIVIDAD "TRIPTICA" EN SUERO

INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA.

Las mismas condiciones que las usadas en la
figura No. 16

Figura No. 26



ENERGIA DE ACTIVACION.

A.- Preparado Comercial

B.- Actividad triptica en suero.

III.- b) DISCUSSION

Cualquier estudio orientado hacia la función catalítica de las enzimas debe basarse en la cuantificación de la velocidad de la reacción correspondiente. La modificación de cualquiera de los factores que intervienen en la reacción produce alteraciones en la velocidad de la catalisis y ciertas consecuencias que orientan al mejor entendimiento del mecanismo de la acción enzimática.

Algunas de las características del comportamiento cinético de las enzimas estudiadas podrían servir como norma para juzgar si las actividades proteolíticas -- que se miden en sangre en condiciones específicas se deban a la presencia de pepsina y tripsina respectivamente.

La curva de progreso para la pesina es una línea recta y por lo tanto cualquier determinación será cierta si se verifica a cualquier tiempo entre 30 minutos y 24 horas, sin embargo debe notarse que la curva no pasa por el origen y esto es probablemente debido a que la cantidad de producto producida no es la suficientemente grande para poder ser cuantificada por el método utilizado.

La curva de progreso de la tripsina es recta únicamente de cero a 10 minutos, las determinaciones deberían efectuarse por lo tanto en esta zona. La desviación de la curva como se señala en la gráfica es difícil de analizar pero probablemente se debe a agotamiento en la concentración de substrato.

EFECTO DE LA CONCENTRACION DE ENZIMA

Bajo las mismas condiciones n moléculas de enzima cuando actúan independientemente en solución transforman n veces más substrato en la unidad de tiempo que una sola molécula; la velocidad por lo tanto es proporcional a la concentración de enzima y esto se indica habitualmente -- por la siguiente ecuación:

$$v = k (E)$$

v = Velocidad

k = Constante

(E) = Concentración de enzima.

De hecho nuestras dos enzimas siguen esta sencilla ecuación. Esto nos indica que no existe limitación en la capacidad del método, que estas enzimas actúan sin ningún marcapaso añadido, la ausencia de impurezas tóxicas en la preparación enzimática puede asegurarse; la ---

presencia de inhibidores es poco probable y por último puede pensarse que existen todos los cofactores que se necesitan para la reacción enzimática siga un progreso lineal.

EFECTO DE LA CONCENTRACION DE SUBSTRATO.

La concentración de substrato es uno de los -- factores más importantes en la determinación de la velocidad de las reacciones enzimáticas. En casi todos los casos en que se grafica la velocidad inicial contra la concentración de substrato se puede obtener como en el caso de las dos enzimas estudiadas un segmento de una hipérbola rectangular. Resultados similares se obtienen siempre que un proceso depende de una sola disociación; la teoría de Michaelis y Menten postulada 1913 (34) se basa en procesos con disociación de este tipo y es sin duda alguna la base más importante de la mayoría de la cinética enzimática. La determinación de la constante de Michaelis es fundamental ya que constituye una característica primordial para la actividad de una enzima cuando se considera substrato y temperaturas particulares. La constante de Michaelis para la pepsina determinada por el método de Dixon y Webb es -

igual a 3.25 por 10^{-7} y para tripsina es de 5.1 por 10^{-7} esto nos indica que la afinidad de pepsina por la hemo--globina es ligeramente superior a la de la tripsina por tal enzima ya que la constante de Michaelis nos indica la concentración de substrato necesaria para que la velocidad de la reacción enzimática sea la mitad de la velocidad máxima. Esta afirmación se demuestra si se parte de la ecuación que relaciona la concentración de substrato a la velocidad de la reacción enzimática:

$$v = \frac{V}{1 + \frac{K_m}{S}}$$

v = Velocidad cuando la concentración de substrato es S.

V = Velocidad máxima cuando la concentración de substrato es suficientemente alta para saturar la enzima.

K_m = La constante conocida como constante de -- Michaelis.

s = Concentración de substrato.

Si en la ecuación anterior K_m es igual a s tene-

mos:

$$v = \frac{V}{2}$$

Entonces, constante de Michaelis es la concentración de substrato cuando se cumplen las condiciones de la ecuación anterior.

La ecuación (2) puede transformarse después de varios pasos a la siguiente:

$$\frac{S}{v} = \frac{K_m}{V} + \frac{1}{V} S$$

Esta ecuación es la gráfica de una línea recta cuya inclinación es $1/V$ el intercepto en el eje vertical es K_m/V y $-K_m$ se obtiene prolongando la gráfica para cortar el eje de las abscisas. Estos dos métodos: - definición en el caso de la tripsina y ecuación (4) en el de la pepsina se utilizaron para calcular las constantes correspondientes.

EFEECTO DE pH

En general las enzimas son activas solamente en cierto rango de pH y en la mayoría de los casos se puede observar cierto pH al cual la actividad enzimática es máxima este punto particular es el pH óptimo.

En el caso de la pepsina el rango de pH en el cual la actividad de esta enzima es máxima se extiende desde 1.4 a 3 aproximadamente y este resultado probablemente se deba a que la disociación del grupo carbo-

xilo distal del ácido glutámico es máxima en este rango en cuanto a la fenil alanina y la tirosina que se supone forman parte del centro activo de esta enzima probablemente juegan un papel secundario ya que su ionización a este pH es prácticamente nula.

El rango de mayor actividad que se obtiene para la tripsina se extiende desde 7.0 hasta 9.0 aproximadamente esto puede explicarse si se recuerda que la estructura del centro activo de la tripsina intervienen cinco aminoácidos, todos los cuales tienen $pK(s)$ que hacen suponer su disociación en esta zona de pH contribuyendo pues todas ellas a la carga neta del centro activo de esta enzima.

EFFECTO DE LA TEMPERATURA.

El efecto de la temperatura sobre la velocidad de la reacción enzimática puede deberse a diferentes causas. Puede afectar la estabilidad de la enzima; la velocidad de rompimiento del complejo enzima sustrato, lo que se determina por el calor de activación de la reacción; puede influenciar también la afinidad enzima-sustrato o afectar las funciones pH de cualquiera, o de todos los componentes que entran en la reacción por-

modificación de los $pK_{(s)}$ lo que puede ser investigado -- cuando se calcula los calores de ionización, puede tam-- bién producirse un cambio en la afinidad de la enzima -- por activadores e inhibidores o puede haber un cambio de marcapazo cuando dos ó más con diferente coeficiente de temperatura toman parte en la reacción enzimática.

Los resultados que se obtienen para pepsina y -- tripsina a partir del cálculo de la energía de activa--- ción y de la gráfica misma de la variación de temperatu-- ra contra actividad sugieren que el efecto primordial en este caso es sobre la velocidad del rompimiento del com-- plejo.

La energía de activación se calcula utilizando -- la ecuación empírica de Arrhenus.

$$\frac{d \log k}{dT} = \frac{E}{RT^2}$$

Transformando a \log_{10} se obtiene:

$$d \log_{10} k = \frac{E}{2.303XR} \times d \frac{1}{T}$$

Entonces cuando se grafica la recíproca de la -- temperatura contra el $\log_{10}k$ en unidades arbitrarias se-- obtiene la gráfica de una recta cuya tangente es igual a -- $E/2.303 \times R$ de donde se puede despejar E cuyo valor es

igual al de la tangente multiplicada por 2.303 y por el valor de R que es 1.99. La energía de activación para pepsina es de acuerdo con este método es $9031 \text{ cal mol}^{-1}$ y para tripsina es de $8614 \text{ cal mol}^{-1}$.

La temperatura óptima es la señalada en la gráfica y la disminución de la actividad a temperatura más elevada probablemente se deba a desnaturalización de la enzima.

En estas condiciones el comportamiento cinético cuando se introducen las variables de pH, temperatura, y la obtención de la constante de Michaelis proporcionan indicaciones acerca de que si la actividad determinada en suero en las condiciones establecidas deba atribuirse a la presencia de pepsina y de tripsina.

Se pudo observar que para el caso de la pepsina aunque la constante de Michaelis encontrada en suero es muy semejante a la del extracto de mucosa gástrica, la curva de pH es diferente y la energía de activación es completamente distinta es de $9031 \text{ cal. mol.}^{-1}$ para el preparado comercial y de $2616 \text{ cal. mol.}^{-1}$ para el suero.

En lo que se refiere a la tripsina la curva de pH es distinta, la constante de Michaelis es diferente-

y la energía de activación es de 2614 cal. mol.⁻¹ para el preparado comercial y 2927 cal. mol.⁻¹ para el suero; es decir, y estos datos son sugestivos de que la actividad "trípica" encontrada en suero no corresponde a la tripsina del extracto pancreático.

Es pues de suponerse que las actividades "péptica y trípica" del suero medidas en las condiciones descritas son representativas además de otras enzimas proteolíticas presentes en suero.

Es pues esto que se ha indicado que para el caso de la tripsina se usen substratos con una especificidad absoluta para esta enzima como el clorhidrato de alfa benzoyl-L-arginina amida (17).

Esto indica necesariamente que muchos datos -- informados en la literatura de actividad péptica y --- trípica en diferentes padecimientos gastro intestinales no son representativos de las actividades mencionadas.

IV.- RESUMEN

RESUMEN.

Se estudiaron condiciones cinéticas de extracto de estómago y páncreas y de suero a fin de establecer si las actividades tríptica y péptica, que se estudian en este último son representativas de las actividades de pepsina y tripsina purificadas.

Los resultados obtenidos permiten afirmar que las actividades que se determinan en suero no corresponden exclusivamente a la presencia de tripsina y pepsina ya que la constante de Michaelis la energía de activación y las curvas de pH son muy diferentes.

Se confirma la necesidad de usar substratos específicos para medir las actividades en suero representen las de tipo tripsina y pepsina.

V.- BIBLIOGRAFIA.

- 1.- Fruton J.S. y Simmonds S.; General Biochemistry -
pág. 685 Second Edition, John Wiley & Sons Inc. -
New York (1958).
- 2.- Northrop J.H.; Kunitz M y Herriott R.M.; Crystalline Enzymes 2 nd. Ed. Columbia University Press, --
New York (1948).
- 3.- White A. y Col.; Principles of Biochemistry pág. -
261 Mc. Graw-Hill Book Company Inc. New York, ---
Toronto, London (1959).
- 4.- Bergman M.; Advances in Enzymology 2,49 (1942).
- 5.- Tallan H.H. y Col.; J. Biol. Chem. 194, 793 (1952).
- 6.- Greenbaum H.M. y Fruton J.S.; J. Biol. Chem. 226 -
173 (1957).
- 7.- Fruton J.S. y Simmonds S.; General Biochemistry -
pág. 700 Second Edition John Wiley & Sons Inc. -
New York (1958).
- 8.- Johnston R.B. et al.; J.Biol. Chem. 185,629; 187,
205 (1950).
- 9.- Waley S.G. y Watron; J. Biochem J. 57, 629 (1954).
- 10.- Waley S.G. y Blau K.; Biochem. J. 57, 538 (1954).
- 11.- Fruton S.J. et al.; J. Biol. Chem. 204, 891 (1953).
- 12.- White A. y Col.; Principles Biochemistry, pág. -
923, Mc Graw-Hill Book Company Inc. New York --
Toronto, London (1959).
- 13.- Gray S.J. y Ramsey C. y Adrenal Influences upon -
the stomach and the gastric responses to stress;-
Recent Progr. Hormone Research 13 583-617, (1957).

- 14.- Neurath, H y Bailey K eds.; "The Proteins Chemistry, Biological Activity and Methods" vol. 1 part. A y B (1953) Vol. II parts. A y B (1954) Academic Press Inc. New York.
- 15.- Anson M.L.; J. Gen. Physiol 22 79 (1938).
- 16.- Mirsky I.A. Futherland P. Kaplan y Brok.-Kahn R.H. Blood Plasma Pepsinogen Source Properties and -- Assay of Proteolytic Activity of Plasma at Acid - Reactions; J. Lab. & Clin. Med. 40, 17 (1952).
- 17.- Narde G.G. Serum Trypsin Determination in Pancreatic Disease J. Lab. & Clin. Med. 52, 66 (1958).
- 18.- Van Goidsenhoven G. Wilkoff y L. Kironer J.B. --- Serum and Urine Pepsinogen and Gastric Pepsin --- Gastroenterology 34, 421 (1958).
- 19.- The Lancet No. 7071 pág. 506 (Editorial).
- 20.- Ginde S. A comparison between the Enzyme patterns In serum and tissue Extracts in Cardiac and Hepatic Diseases; The Scandinavian Journal of Clinical & Laboratory Investigation 10 303 (1958).
- 21.- Mend. E. Análisis de Laboratorio en las leucemias; Clínicas Médicas de Norteamérica, pág. 579 Marzo (1959).
- 22.- Annals of the New York Academy of Sciences, Enzymes in Blood (1958).
- 23.- Palmer W.I. y Col. Clínicas Médicas de Norteamérica, pág. 347 Marzo (1959).
- 24.- Popper H.L. y Selinger A. Diagnostic Significance of Amylase Determinations in Blood; Wien Klin -- Wochensh, 41 109 (1928).
- 25.- Popper H.L. y Col. Pathways of Enzymes into Blood in Acute Damage of Pancreas; Proc. Soc. Exper. - Biol. & Med. 43, 220 (1940).

- 26.- Hofmann K. y Bergmann; J. Biol. Chem. 130, 81 -- (1939) 138, 243 (1941).
- 27.- Katchalshi E.; Advances in Protein Chem. 6, 123, (1951).
- 28.- Fruton J.S. y Bergmann N.; J. Biol. Chem. 127, -- 627 (1939).
- 29.- Herington C.R. y Pett-Rivero R.V.; Biochem. J. 38, 417 (1944).
- 30.- Neurath. H. The Activation of Zymogens; Advances in Protein Chem. 12, 319-386 (1957).
- 31.- Pechere J.F. y Neurath H.; Symposium in Protein - Structure 169 (1958).
- 32.- Herriott R.M.; Methods in Enzymology 2, 3 (1955).
- 33.- Folin O. y Ciocalteu V.; J. Biol. Chem. 73627 -- (1927).
- 34.- Michaelis L. & Nenten M.L.; Biochem. Z. 49, 333, (1913).