

Discurso impreso Dr Calvet

REVISTA
DE LA
REAL ACADEMIA DE FARMACIA
DE
BARCELONA

N.º 8 - Noviembre 1963

c/8

Artículo 45 del Reglamento

La Academia no se hace solidaria de las opiniones científicas expuestas en sus publicaciones, especificándose esta norma en la contraportada de las mismas.

**TRIPSINA Y α -QUIMOTRIPSINA:
ACCIONES ESTERÁSICAS Y DESMOLÁSICAS,
E INHIBICIONES DE LAS PROTEOLÍTICAS**

Discurso de Ingreso leído en la Real Academia de Farmacia
por el

M. I. Sr. Dr. D. Fernando Calvet Prats

el 5 de Noviembre de 1963

Exmo. Sr. Presidente,

Muy Ilustres Sres. Académicos:

Señoras y Señores:

Constituye para mí un gran honor la decisión que habéis tomado de invitarme a formar parte de esta Real Academia de Farmacia como académico numerario. Considero que soy objeto de una especial distinción inmerecida, cuya notificación me produjo gran sorpresa, singularmente al tomar en cuenta que no poseo ningún título oficial otorgado por la Facultad de Farmacia. Posteriormente he aprendido que lo que se me ofrece es ocupar un puesto único que, según el artículo 2.^o de los Estatutos de la Academia, tenéis reservado para un Doctor o Licenciado en Ciencias Químicas. Podéis creerme que estoy invadido por la preocupación y por el sentido de la responsabilidad, pues no sé si acertaré a cumplir debidamente con el cometido que se me asigne.

Es verdad que siempre he profesado a las Ciencias Farmacéuticas una especial devoción, y que constantemente me he sentido atraído por el estudio y la investigación de nuevos fármacos y agentes terapéuticos, así como por su fabricación en la escala indispensable para hacerlos económicamente asequibles al público doliente. Me es muy grato poder manifestar que desde el año 1932 hasta nuestros días, he venido prestando mi colaboración ininterrumpida a la Industria Farmacéutica española, bien como Director Técnico como Jefe de Investigación, como Colaborador Científico o como Químico Consejero. Y fruto de mis esfuerzos, son varios trabajos originales publicados en revistas especializadas, así como el desarrollo de distintas técnicas de fabricación que actualmente vienen utilizándose en la preparación de diversos productos farmacéuticos.

Os ruego sepáis perdonar la inmodestia de haberme permitido aludir a una pequeña labor realizada, y espero comprendáis que si lo he hecho es, solamente, para tratar de animarme a creer que, tal vez, con mi devoto esfuerzo y sincera dedicación, pueda atreverme e intentar hacerme digno de la confianza que en mí habéis depositado.

Señores Académicos:

Os agradezco profundamente el acuerdo de elegirme académico numerario de esta Real Academia de Farmacia de Barcelona, que tomásteis en el Pleno del dia 29 de diciembre de 1961; os prometo solememente que haré todo lo posible para corresponder a designación, para mí, tan lisonjera, contribuyendo con el máximo interés a cumplir fielmente los cometidos y finalidades de la Academia, y dedicándome con ahínco a la labor de investigación y de estudio de las Ciencias Farmacéuticas.

Durante largo tiempo he estado perplejo ante la idea de tener que seleccionar un tema apropiado para desarrollar en este Discurso de Ingreso en la Academia. Mi duda se concretó recientemente en un claro dilema: o tratar de un tema de actualidad, de interés y trascendencia científica reconocidas, escogido entre los muchos que ofrece el constante progreso de la Química Farmacéutica, o prescindir del interés general y renunciar a la amenidad, a cambio de ofrecer el fruto de mi esfuerzo investigador durante los últimos años.

Mi decisión por hacer lo segundo está más de acuerdo con mis íntimos convencimientos y creo que con mi personal idiosincrasia, más debo presentar mis excusas por utilizar la feliz circunstancia de tener que redactar este Discurso y aprovecharla para exponer, en forma resumida, los resultados más sobresalientes de mis trabajos experimentales, recientemente realizados con la colaboración eficaz prestada por un grupo de jóvenes bioquímicos.

Si observáis en su contenido las imperfecciones de que adolecen las cosas interminadas, os pido sepáis disculparlas en atención a que mis actuales desvelos tienden a proseguir en la tarea comenzada, con la esperanza de poder llegar a conclusiones mejor perfiladas.

TRIPSINA Y α -QUIMOTRIPSINA:

ACCIONES ESTERÁSICAS Y DESMOLÁSICAS, E INHIBICIONES DE LAS PROTEOLÍTICAS

Consideraciones previas.

El atractivo que ofrece el estudio de las diversas acciones catalíticas inducidas por los dos enzimas pancreáticos, la tripsina y la α -quimotripsina, sobre distintos substratos, se pone de relieve al observar la creciente aplicación terapéutica que encuentran ambos, y la influencia ejercida, en general, por las proteasas sobre los fenómenos típicos de la inflamación hística.

Las complicadas biorreacciones que tienen lugar en los tejidos de los seres vivos y que, conjuntamente, constituyen su metabolismo intermediario, están regidos por múltiples sistemas operantes en maravillosa coordinación, la cual, si experimenta alguna alteración, provoca acusados trastornos y efectos morbosos.

Los enzimas se hallan en los citoplasmas en estados de actividad condicionada, en gran parte, por encontrarse en sus formas inactivas zimógenas, y también porque la presencia de variables cantidades de coenzimas, de activadores y de inhibidores, modifica cuantitativamente sus efectos catalíticos.

Parece razonable admitir que los buenos resultados terapéuticos que se consiguen con la administración, de los mencionados enzimas proteolíticos, por un lado, o la de diversos fármacos inhibidores de sus específicas acciones hidrolíticas, por otro, se deban a que con su incorporación exógena al ser vivo, se contribuya a restablecer ciertos desequilibrios característicos de los estados patógenos.

Nuestras investigaciones sobre las acciones esterásicas y desmolásicas de la tripsina y de la α -quimotripsina, así como las de sus inhibiciones proteolíticas por parte de algunos fármacos antiflogísticos de reconocida utilidad médica, se iniciaron, hace algunos años, y se prosiguen en la actualidad, con el intento de aportar alguna contribución al conocimiento de los mecanismos por los que se ejercen los beneficiosos efectos curativos de los mencionados enzimas, así como los de algunos de sus agentes inhibidores.

Aplicaciones terapéuticas de ambos enzimas.

Los usos clínicos de que son actualmente objeto la tripsina y la α -quimotripsina se deben, principalmente, a sus capacidades trombolíticas y anti-inflamatorias, a sus actividades fibrinolíticas y a las catalizadoras de las hidrólisis de otras proteínas, más o menos desnaturalizadas, presentes en los tejidos lesionados o enfermos.

La bibliografía sobre sus diversas acciones terapéuticas es muy extensa y profusa, pero aquí nos limitaremos a citar cuatro publicaciones que, de modo resumido, permiten adquirir algunas ideas orientadas sobre la creciente aplicación médica que se hace de los enzimas proteolíticos:

GREENBERG & HARPER, Enzymes in Health and Disease, Chap. 12, p. 212, Historical Review of Clinical Use of Enzymes, Thomas, Springfield, (1960).

VALDECASAS & PERE MUSET, L'alpha-chymotrypsine en thérapeutique, Medicine et Higiène, 18, 821, (1960).

J. J. D., Rôle thérapeutique des enzymes protéolytiques, Medicine et Higiène, 18, 537, (1960).

SHERRY & FLETCHER, Clinical Pharmacology & Therapeutics, Washington, I, 202, (1960).

La tripsina pura cristalizada y liofilizada, en forma de polvo o de pomada, se utiliza como agente de desbridamiento de lesiones externas, debido a su acción hidrolítica sobre las proteínas, que se ejerce preferentemente sobre las desnaturalizadas (fibrina, gelatina, metahemoglobina). Se aplica para la limpieza de tejidos necrosados y acumulaciones protéicas, especialmente de fibrina y metahemoglobina, depositada por diversas causas, en tegumentos, cavidades internas o en el sistema circulatorio. Posee acción antinflamatoria, si bien todo administrada en forma de inyección intramuscular, y también se manifiesta como trombolítica.

La α -quimotripsina pura también se emplea para el desbridamiento de llagas infectadas, aprovechando que posee un amplio espectro de actividad hidrolítica sobre las proteínas, igual o superior que el de la tripsina, si bien al actuar sobre una misma proteína, desliga específicamente otros enlaces péptidos que aquélla. Es sabido, que la tripsina, al ejercer su acción sobre la macromolécula de una proteína o de un polipéptido, rompe precisamente aquellos enlaces péptidos a los que contribuyen con su carboxilo los aminoácidos básicos lisina y arginina; por otra parte, la α -quimotripsina desliga específicamente los enlaces en que intervienen, principalmente, los carboxilos de los aminoácidos aromáticos tirosina, fenilalanina y triptofano, así como los de la leucina y de la metionina.

Sus acciones fibrinolítica, antinflamatoria y antiedematosa, han hallado para la α -quimotripsina numerosas aplicaciones clínicas, entre las que me-

recen destacarse, en Reumatología el tratamiento de la periartritis escapulohumeral, en Oftalmología la práctica de la denominada "zonulolisis enzimática" (listurí enzimático) en cirugía de la catarata, así como otras diversas utilizaciones interesantes en Otorrinolaringología y Ginecología.

La inflamación hística.

El mecanismo reaccional productor de la inflamación y del edema en los tejidos es, actualmente, desconocido. Se admite generalmente que se trata de una alteración cuantitativa de las proteolisis normales provocadas, principalmente, por la plasmina y por la tromboplastina; pero entre las diversas interpretaciones que se han dado se acusan marcadas diferencias, sino contradicciones.

Por un lado UNGAR (1952) sugirió que se trataba de una proteolisis (fibrinolisis) exacerbada, que conducía a la liberación de péptidos inflamatorios, afirmando que la inflamación hística puede combatirse: 1) bloqueando la conversión del plasminógeno en plasmina, y 2) inhibiendo la actividad proteolítica de la plasmina; el efecto beneficioso conseguido con la administración de corticosteroides y de varios fármacos antiinflamatorios (antirreumáticos, antipiréticos, analgésicos, etc.) lo atribuye a su poder inhibidor de las proteolisis (actividad antifibrinolítica). Según el autor citado, los productos de una hidrólisis proteica exagerada (concentraciones anormalmente elevadas de péptidos y tal vez de histamina) serían los responsables de la inflamación local y del edema.

Por otra parte, INNERFIELD (1956), clínico reconocido como el introductor de la terapéutica por los enzimas proteolíticos (Enzimoterapia), ante los hechos observados de que la administración de tripsina (la α -quimotripsina, se ha visto posteriormente que también actúa de modo semejante) reduce la inflamación y el edema experimentales, así como los provocados por traumas, quemaduras, gérmenes, virus u otras causas, sugiere que el enzima administrado acelera ciertos fenómenos proteolíticos marcadamente retardados por la lesión, hidrolizando los grandes polipéptidos inflamatorios a otros más sencillos o a aminoácidos, contribuyendo así a aumentar la permeabilidad de los tejidos y a reducir las barreras proteicas vasculares.

Tal vez las aparentemente dispares interpretaciones de estos dos autores puedan armonizarse si se considera que, los péptidos liberados por una incrementada acción fibrinolítica, que serían los responsables de la fenomenología típica de la inflamación y del edema, resultan completamente hidrolizados por la superior acción proteolítica del enzima administrado, la tripsina o la α -quimotripsina.

Más recientemente MARTÍN (1957) atribuye el proceso inflamatorio, en parte, a una anormal deposición de fibrina en los tejidos, con formación de barreras mecánicas en los espacios tisulares y alrededor de los vasos linfá-

ticos y capilares sanguíneos, lo que disminuye la permeabilidad de sus paredes y provoca así la formación de edema y de los demás fenómenos típicos de la reacción inflamatoria. La administración de un enzima proteolítico produciría, según el autor citado, la disolución de la fibrina depositada y así contribuiría al restablecimiento de una situación normal.

Sin embargo, o más precisamente JANCSEK (1961) ha aportado considerable evidencia experimental en favor del papel importante que juegan los sistemas de la coagulación sanguínea, tromboplastina, trombina y plasmina o fibrinolisis, en el mecanismo de producción de la inflamación local y del edema. Según este investigador, los fenómenos inflamatorios son consecuencia de un anormal depósito de fibrina, monómero y discontinuo, en las paredes internas de los capilares sanguíneos ("angiotaxis"), el cual es el causante de una mayor formación de grandes poros en la pared vascular, con los consiguientes aumentos de su permeabilidad y extravasación; este síntoma es, según el autor, el más característico de la inflamación.

A pesar de la inseguridad que caracteriza a las distintas interpretaciones que se han intentado resumir, lo que parece fuera duda es que la inflamación hística está íntimamente relacionada con alteraciones de proteólisis (pudiera estarlo también con variaciones de actividades esterásicas, amidásicas y desmolásicas), y todo ello pone de relieve el interés que presenta el tratar de aumentar nuestro incipiente conocimiento de las distintas características de actuación, por un lado, de los enzimas tripsina y α -quimotripsina, y por otro, de los fármacos antiflogísticos que modifican sus actividades en el sentido de inhibirlas.

Acción esterásica de la α -quimotripsina.

Las acciones hidrolíticas de enlaces péptidos catalizadas por la tripsina y por la α -quimotripsina han sido estudiadas por numerosos investigadores, ensayándolas tanto sobre verdaderas proteínas nativas y desnaturadas, como sobre péptidos naturales y sintéticos.

Entre las actividades extraproteolíticas de la α -quimotripsina, la esterásica es tan potente y característica que, el método analítico que para determinarla se acepta internacionalmente se funda, precisamente, en su capacidad de catalizar las hidrólisis de los esteres etílicos de la tirosina y de la N-acetiltirosina (SCHWERT y TAKENAWA) (1955).

De la actividad esterásica de la α -quimotripsina se han ocupado modernamente dos escuelas norteamericanas, la de NEURATH en la Universidad de Duke, North Carolina, y la de NIEMANN del Instituto de Tecnología de Pasadena, California, aparte de otros investigadores.

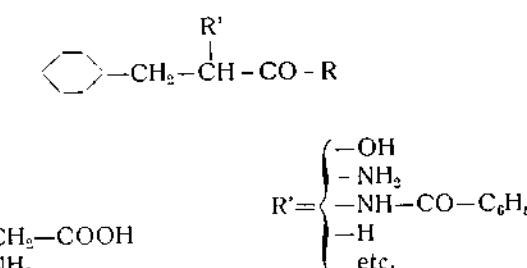
NEURATH (1950) después de consultar todos los datos experimentales publicados, postuló unos requerimientos estructurales que debían cumplir los

sustratos (esteres) para poder experimentar una profunda hidrólisis por la acción catalítica de la α -quimotripsina:

1. Los sustratos, deben poseer uno o más anillos aromáticos condensados, los cuales deben estar enlazados, como mínimo, por un grupo metíleno, al átomo de carbono α con respecto al carboxilo esterificado a hidrolizar;

2. como sustituyente unido a dicho átomo de carbono α debe existir un grupo polar capaz de formar enlaces de hidrógeno, siendo la L- su configuración estérica preferente (el grupo polar puede estar constituido, sencillamente, por dos átomos de hidrógeno);

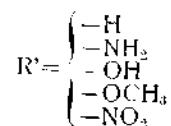
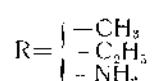
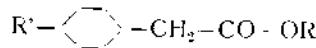
3. el enlace hidrolizable puede ser el de un ester, amida, hidroxiamida, glicilamida, glicil-glicilamida u otro enlace péptido, etc., etc.



Si bien es cierto que los sustratos escogidos y aceptados en el método analítico (antes citado) de determinación de la α -quimotripsina, esto es, los esteres etílicos de la tirosina y de la N-acetil-tirosina, cumplen con los postulados de NEURATH, no lo es menos que, diversos investigadores han aportado varios resultados experimentales que están en abierta contradicción con ellos. Por ejemplo, NIEMAN y HUANG (1952) demostraron que el hipurato de metilo $\text{C}_6\text{H}_5\text{-CO-NH-CH}_2\text{-CO-OCH}_3$, que no posee grupo bencílico alguno unido al carbono α , es uno de los sustratos preferentes de la acción esterásica de la α -quimotripsina; también NIEMAN y JENNINGS (1953) comprobaron que son excelentes sustratos substancias sin núcleo aromático, con el anillo bencénico completamente hidrogenado, como la N-acetil-hexahidrofenilalanilamida.

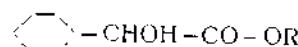
Nuestras investigaciones acerca de la acción esterásica de la α -quimotripsina sobre algunos substratos sintéticos, CAROL y CALVET (1958), han aclarado que se ejerce eficazmente sobre fenilacetatos p-substituidos que no cumplen con el primer postulado de NEURATH, esto es, carecen de grupo metílico entre el núcleo aromático y el carbono α respecto del carboxilo, los lénicos.

cuales pueden representarse conjuntamente mediante la siguiente fórmula general:

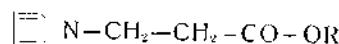


Tomando como tipo de referencia la acción hidrolítica del enzima sobre el fenilpropionato etílico (NEURATH), pudimos comprobar que la magnitud del ataque del ester depende de cual sea la naturaleza del substituyente en posición "para" del núcleo aromático. Los esteres metílicos son más fácilmente hidrolizables que los etílicos y, entre ellos, el p-metoxifenilacetato de metilo constituye un substrato de la α -quimotripsina tan excelente que los porcentajes de hidrólisis observados son, incluso, superiores que los del propio fenilpropionato. Por la acción del enzima, también resulta fácilmente hidrolizable el p-nitrofenilacetato metílico, siéndolo en menor grado el p-anino- y el p-hidroxifenilacetato.

Los esteres metílico y etílico del ácido amigdalico, que contienen un substituyente no polar -OH en el carbono α , a pesar de no tener ocupada la posición "para" del núcleo, son muy buenos substratos de la actividad esterásica de la α -quimotripsina:



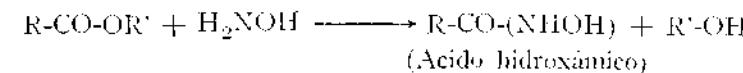
Los N-pirrolylpropionatos metílico y etílico son también eficazmente hidrolizados por el enzima, apesar de que en vez del núcleo bencénico p. seen el pirrólico, y las magnitudes de hidrólisis observadas son del mismo orden que las del propio fenil-propionato de etilo. Con ello se pone de manifiesto que tampoco es imprescindible la existencia de un núcleo bencénico para que el substrato sea sensible a la acción catalítica del enzima:



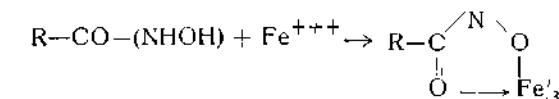
El ester metílico del ácido fenacetúrico $\text{C}_6\text{H}_5-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{OCH}_3$ es también fácilmente hidrolizable por la α -quimotripsina.

Todas las determinaciones de actividad esterásica se practicaron midiendo la disminución de concentración de los substratos en función del tiempo; la valoración de las cantidades de esteres no hidrolizados se estableció mediante la microtécnica colorimétrica de FEIGL adaptada a la Enzimología por HESTRIN (1949), la cual está basada en la formación de ácidos hidroxámicos,

por reacción de los esteres con un exceso de hidroxilamina, reacción que, en medio alcalino fuerte, transcurre a gran velocidad y cuantitativamente,



Los ácidos hidroxámicos formados producen, en medio ácido, una coloración rojo vinosa, por la adición de cloruro férrico, que se atribuye a la formación de complejos férricos:



lo que permite su determinación fotocolorimétrica. El método produce excelentes resultados y está exento de interferencias, por lo menos, en las condiciones utilizadas por nosotros.

Las digestiones quimotripticas se llevaron a cabo en tampón fosfato M/15 de pH 8.0, utilizando un medio acuoso o hidrometanólico, según la solubilidad de los esteres ensayados, y operando a 37° ó 25° C., respectivamente; las concentraciones de substrato fueron variables de 2.5 a 12.5×10^{-3} M, las de enzima, generalmente, de 50 a 250 U./c.c., y los tiempos de incubación oscilaron entre 2 y 8 horas, prolongándose hasta 24 horas en algunos casos.

El establecimiento de los tantos por ciento de hidrólisis se hizo utilizando curvas patrón preconstruidas representando cantidades crecientes de cada uno de los substratos frente a las extinciones leidas en un fotocolorímetro, de las coloraciones desarrolladas por los complejos férricohidroxámicos respectivos.

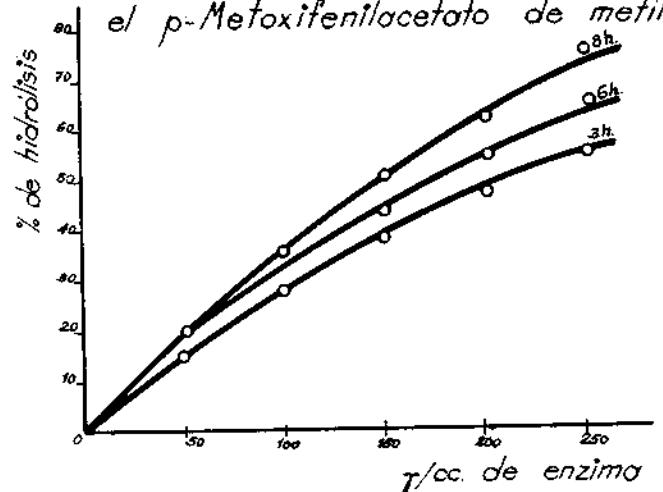
Citaremos como ejemplo las curvas de actividad obtenidas en la hidrólisis del p-metoxifenilacetato metílico, utilizando el sustrato a la concentración de 2.5×10^{-3} M, las concentraciones enzimáticas que se indican en el eje de abscisas y prolongando las digestiones durante 3, 6 y 8 horas. Véase Gráfica I.

Actividad esterásica débil de la tripsina.

La tripsina, que exhibe alguna acción esterásica sobre determinados substratos, por ejemplo, el hipurato de metilo NIEMANN & JENNINGS (1953), no muestra poseer capacidad hidrolítica alguna cuando se ensaya frente a los esteres sintéticos anteriormente mencionados (contraste con la α -quimotripsina).

Gráfico I

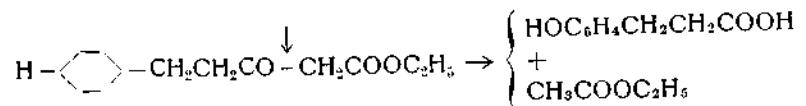
Acción de la α -Quimotripsina sobre el p-Metoxifenilacetato de metilo.



Acciones desmolásicas de la α -quimotripsina y de la tripsina.

Además de sus actividades proteolíticas y esterásicas, la α -quimotripsina posee la capacidad de catalizar la rotura de enlaces C-C en determinados substratos sobre los que se ha ensayado, aunque para ello es preciso experimentar con concentraciones enzimáticas muy superiores, del orden de unas 100 veces más.

La primera observación de hidrólisis enzimática de enlaces carbono-carbono fue publicada por DOHERTY & THOMAS (1954) y seguida por un estudio más detallado del primer autor (1955), en el que se investigó la acción ejercida por la α -quimotripsina sobre el 5-(p-hidroxifenil)-3-oxo-valerianato de etilo y sobre el ácido libre correspondiente: la acción causaba la rotura de los enlaces CO-CH₂ de las respectivas cadenas laterales, con liberación de ácido p-hidroxifenilpropiónico, como producto principal de la hidrólisis.



DOHERTY & SHAPIRA (1956) extendieron a la tripsina la observación de su capacidad desmolásica, al comprobar que actuaba eficazmente sobre el 8-amino-3-oxo-octanoato de etilo, en el que provoca la rotura del enlace entre los carbonos 2 y 3 de su cadena; los tres substratos mencionados cumplen con los requerimientos estructurales postulados por NEURATH en la acción esterásica, a lo que ya nos hemos referido anteriormente.

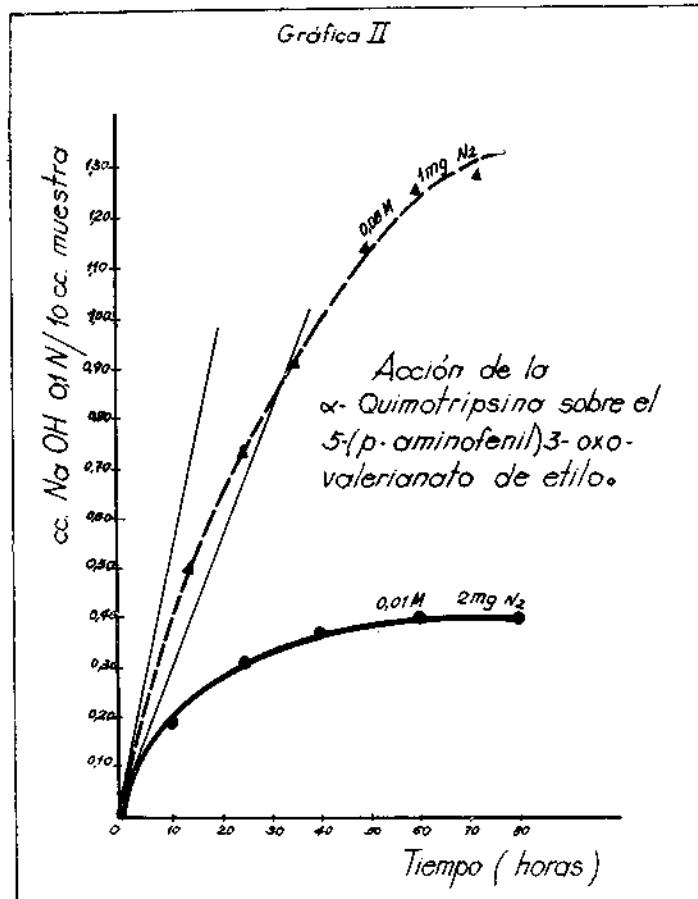
Dada la importancia fisiológica y terapéutica de ambos enzimas pancreáticos, nosotros hemos investigado sus respectivas acciones desmolásicas sobre diversos substratos sintéticos, cuyos resultados han sido objeto de publicaciones por ROGET & CALVET (1960 y 1961).

La α -quimotripsina hemos comprobado que actúa enérgicamente sobre el 5-(p-aminofenil)-3-oxo-valerianato de etilo, substrato que también reúne las exigencias estructurales propuestas por NEURATH: la acción se manifiesta por la rotura del enlace C-C que liga el grupo carbonilo y el metileno en α respecto del carbetoílo, dando lugar a la liberación de ácido p-aminofenilpropiónico, que se ha identificado perfectamente por cromatografía de papel, revelando el cromatograma por diazotación con nitrito y copulando con β -naftol, con lo que las manchas aparecen de color rojo anaranjado. La digestión se llevó a cabo a 26°C, se trabajó con concentraciones de substrato 0.02 M, y de enzima 2 mg. N₂ proteico/c. c., y utilizando como vehículo un medio hidroalcohólico agua : etanol = 9 : 1, tamponado a pH 8.0; el progreso de la hidrólisis se estableció potenciométricamente, valorando con NaOH 0.1 N los carboxilos liberados en la incubación (ácido p-aminofenilpropiónico). Los resultados obtenidos se resumen en la Gráfica II.

En cambio, la α -quimotripsina no actúa sobre el 5-(p-nitrofenil)-3-oxo-valerianato etílico, puesto que no se observa descenso alguno de pH durante el ensayo de digestión (no hay liberación de carboxilos): el enzima no ejerce la menor acción desmolásica ni esterásica sobre este substrato, ni aún después de un periodo de hasta 22 horas; obsérvese como la diferencia estructural entre esta substancia y el aminoester anterior consiste en la calidad del substituyente en "para" del núcleo hencénico, pues mientras el -NH₂ es de 1.^a clase y cede electrones a la cadena lateral, el -NO₂ es de 2.^a y tiende, por el contrario, a arrebatálos.

Por otra parte, se observa que tampoco el enzima ejerce acción desmolásica sobre los correspondientes ácidos libres de los substratos anteriores, el ácido 5-(p-amino)- y el 5-(p-nitro)-3-oxo-valeránico: la menor polarización de los grupos carboxilos terminales de estos ácidos, comparada con la de los carbetoílos de los esteres correspondientes, puede inducir una menor labilidad del enlace CO-CH₂ de sus cadenas laterales.

El 4-(p-aminofenil)-3-oxo-butirato de etilo, compuesto que contiene una cadena lateral más corta (un grupo metileno menos) que los anteriores subs-



tratos, es también hidrolizado por la α -quimotripsina, con liberación de ácido p-aminofenilacético; la acción es, sin embargo, mucho menos eficaz puesto que hacen falta unas seis horas de digestión para conseguir una magnitud de hidrólisis comparable con la que se obtiene en unos treinta minutos de actuación del enzima sobre el correspondiente 5-(p-aminofenil)-3-oxo-valerianato: este resultado parece estar en armonía con el primer postulado de NEURATH, ya que el butirato que nos ocupa carece de grupo metilénico en β respecto al carbonilo. Sin embargo, la existencia de dicho grupo $-\text{CH}_2-$ no es absolutamente imprescindible puesto que, de hecho, se ha observado una clara hidrólisis con el anterior butirato substituido, lo que también ocurre cuando se en-

saya el correspondiente nitroderivado, el 4-(p-nitrofenil)-3-oxobutirato como substrato, en cuya acción se caracteriza por cromatografía (inspección del chromatograma bajo luz ultravioleta) el resultante ácido p-nitrofenilacético (recuérdese que el correspondiente 5-(p-nitrofenil)-3-oxo-valerianato no experimenta la menor hidrólisis por semeparación acción enzimática).

El 4-(p-metoxifenil)-3-oxo-butirato etílico, en cambio, no sufre degradación alguna apreciable por la catálisis enzimática de la quimotripsina.

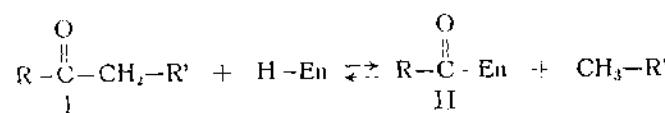
El ácido libre 4-(p-aminofenil)-3-oxo-butírico (al igual que el aminofeniloxovaleránico) no es hidrolizable por el enzima, mientras que el ácido 4-(p-nitrofenil)-3-oxo-butírico, por el contrario, resulta sensiblemente hidrolizado, habiéndose caracterizado perfectamente el ácido p-nitrofenilacético (por cromatografía) como producto resultante de la desmolisis.

La α -quimotripsina también ejerce una enérgica acción hidrolítica sobre el 3-(p-aminofenil)-3-oxo-propionato etílico (a pesar de que este substrato carece de grupo metilénico alguno entre el núcleo bencénico y el carbonilo); que permite evidenciar claramente el consumo de álcali correspondiente a los carboxilos liberados durante la incubación. Actuando sobre el correspondiente 3-(p-nitrofenil)-3-oxo-propionato etílico, el enzima induce una menor, pero clara, degradación desmolásica.

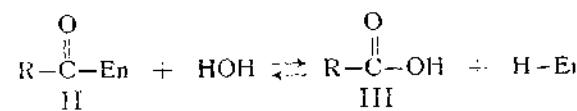
Aunque sería deseable poder disponer de una interpretación adecuada a los distintos hechos experimentales que anteceden, se comprende la dificultad del conseguirlo, si se tiene en cuenta la multiplicidad de factores que intervienen en estos fenómenos, los cuales, además de depender de las diversas estructuras electrónicas específicas de cada uno de los substratos, también son consecuencia de sus magnitudes moleculares, de sus configuraciones estereas y de la mayor o menor estabilización del grupo carbonilo por conjugación (HINE, 1956), conjunto de variables que deben influir decididamente en la mayor o menor facilidad de "anclaje" de los grupos funcionales de los substratos ensayados, a los centros activos de la macromolécula enzimática.

DOHERTY (loc. cit.) interpreta que la reacción enzimática transcurre por medio de una doble substitución nucleofílica, análoga a la observada en la hidrólisis del éster acetoníctico por el OH^- del agua y que, por tanto, podrían considerarse las desmolisis que nos ocupan, como casos particulares de los mecanismos de BENDER & KEMP (1927) y de CUNNINGHAM (1957), propuestos para la interpretación de diferentes procesos enzimáticos hidrolíticos:

la molécula del sustrato (I) experimentaría un ataque nucleofílico por parte de la molécula del enzima (H-En), mecanismo que se indica a continuación.



y posteriormente, el compuesto formado (II), al reaccionar con el ión OH⁻ del agua, gracias un segundo desplazamiento nucleofílico, daría lugar a la formación del correspondiente ácido (III).



Nuestros ensayos efectuados con tripsina, haciéndola actuar sobre los distintos sustratos antes mencionados, nos han conducido a resultados en todo paralelo a los previamente descritos para la α -quimotripsina; por este motivo y por razones de brevedad, omitimos su detalle, después de haber comprobado que su acción desmolásica es muy similar a la de su enzima hermano (n.s remitimos a los trabajos originales previamente publicados, ROGET & CALVET, 1960).

En la actualidad tenemos en curso la prosecución de estos estudios, extendiéndolos a otros substratos.

En la actualidad tenemos en curso la prosecución de estos estudios, extendiéndolos a otros substratos.

Inhibiciones de las proteólisis tríptica y α -quimotriptica inducidas por algunos fármacos.

El estudio de las acciones inhibidoras provocadas por diversas sustancias sobre las hidrólisis proteolíticas catalizadas por la tripsina y por la α -quimotripsina, se inició con objeto de averiguar las posibles relaciones existentes entre dichas inhibiciones y las cualidades terapéuticas de algunos de los productos ensayados (fármacos antinflamatorios, antirreumáticos, analgésicos e antipiréticos), en unos casos, y las estructuras y grupos funcionales característicos de varias especies químicas (fenoles, reductores, ácidos y aminas aromáticas, detergentes, reactivos de los grupos carbonilo, etc.), en otros.

Las experiencias se llevaron a cabo utilizando, principalmente, los sistemas enzimáticos tripsina-caseína o α -quimotripsina-caseína (también se estudiaron la ovoalbúmina, la seroalbúmina, la gelatina y la fibrina, como substratos); pero las interferencias secundarias con los métodos analíticos

corrientes de determinación de magnitudes de hidrólisis (reactivos Folin, ninhidrina, biuret, Willstaetter y alcalimetría con forma I), provocadas por varios de los presuntos inhibidores investigados, nos obligaron bien al empleo de técnicas de valenciación acidimétrica por potenciómetria, o a recurrir a un método colorimétrico basado en el uso de fenilaz-caseinas como substratos.

La técnica colorimétrica a que hemos aludido, fue desarrollada por nosotros, DEÑACIL & CALVET (1961), y se basa en el empleo de una p-nitrofenilaz-caseína como sustrato de los enzimas, así como en medir por colorimetría la concentración de los péptidos coloreados, no precipitables por el ácido trieloracético, liberados en las hidrólisis.

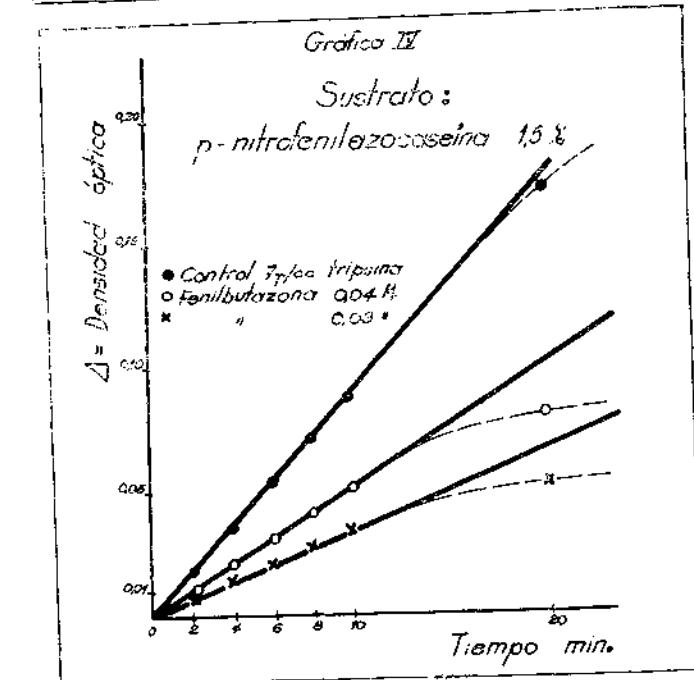
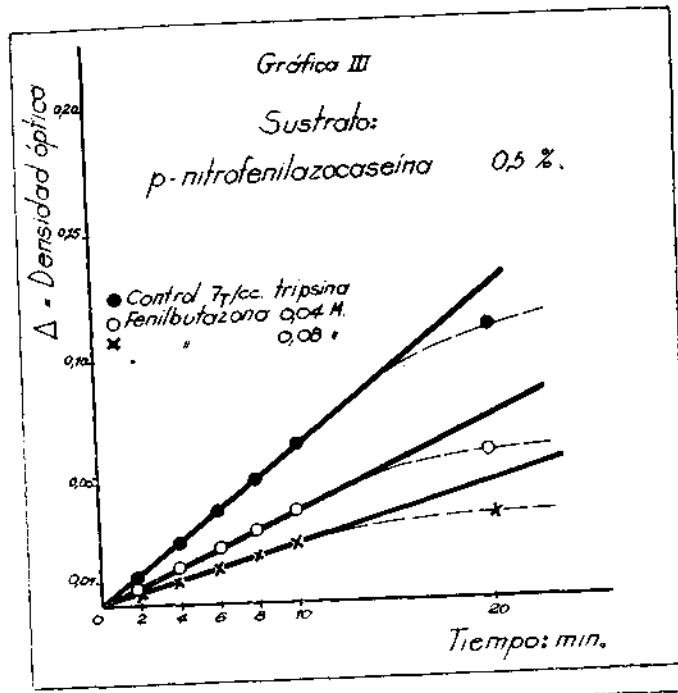
Así pudimos comprobar que los fármacos antirreumáticos, ácidos salicílico, acetilsalicílico y p-aminobenzoico, y también la fenilbutazona (pirazolina), son enérgicos inhibidores de las proteólisis de la azocaseína provocadas por la tripsina y por la α -quimotripsina. Las incubaciones se realizaron a 17° C y el medio empleado fue tampón fosfatos M/15 de pH 8.0; las concentraciones de enzima oscilaron entre 7 y 15 mg/c.c., y las de substrato entre 0.5 y 2.5 %. En cada caso se establecieron los índices de inhibición (I) respectivos, según KRISTIANOWSKY & SAW (1953):

$$I = \frac{V - V_i}{V_i}$$

siendo V = velocidad de la reacción sin inhibidor, y V_i = velocidad de la reacción con inhibidor.

Con la fenilbutazona se observaron disminuciones de la velocidad de hidrólisis provocada por la α -quimotripsina (en las condiciones ensayadas) hasta de un 70 %, y con los ácidos salicílico y acetilsalicílico desde un 65 hasta un 20 %; el p-aminosalicílico muestra índices de inhibición ligeramente inferiores.

Como ejemplo, citaremos con detalle los resultados experimentales obtenidos al trabajar con fenilbutazona como inhibidor del sistema tripsina-p-nitrofenilaz-caseína. Véanse Gráficas III y IV.



Indices de inhibición de la fenilbutazona, operando con tripsina a la concentración de 7 γ / c. c.

Concentración de substrato	Concentración de inhibidor	
	0,04 M.	0,08 M.
0,5 %	0,77	1,38
1,5 %	0,80	1,57

Indices de inhibición del ácido acetilsalicílico, trabajando con tripisina a 7 γ / c. c.

Concentración de substrato	Concentración de inhibidor			
	0,025 M	0,05 M	0,075 M	0,10 M
0,5 %	0,25	0,66	1,5	2,33
1,0 %	0,18	0,30	1,38	1,95
1,5 %	0,15	0,50	0,87	2,00
2,0 %	0,31	0,72	1,37	2,16

Con la α -quimotripsina se obtuvieron resultados análogos, es decir, los cuatro fármacos ensayados inducen sendas inhibiciones de la acción hidrolítica del enzima sobre la *p*-nitrofenil-azocaseína.

De la inspección general de los resultados conseguidos se puede deducir que los índices de inhibición, provocados por las substancias ensayadas, crecen al aumentar las concentraciones de inhibidor, mientras que permanecen sensiblemente constantes a las variaciones de concentración de sustrato (para una misma concentración enzimática). Los efectos observados, por tanto, no pertenecen a ninguna de los tipos sencillos de inhibición conocidos, y si bien presentan cierta analogía con las "no competitivas", los datos obtenidos no permiten generalizar tal simplificación; más bien parece que su mecanismo sea más complicado, y que se trate de inhibiciones no específicas de tipo "acompeticitivo", con la formación intermedia de complejos enzima-sustrato-inhibidor (recuérdese que los índices de inhibición hallados no varían, sensiblemente, con los cambios de concentración del sustrato), pero los resultados experimentales de que actualmente disponemos, no nos permiten hacer esta afirmación con seguridad.

Como ya se ha indicado anteriormente, para estudiar las inhibiciones provocadas por las substancias precedentes, resulta inutilizable el método de valoración potenciométrica de grupos ammonium en presencia de formol, porque este reactivo produce precipitaciones con los salicílico, acetilsalicílico y p-aminobenzoico, y también con la fenilbutazona, lo que invalida los resultados por adsorciones de los geles que se separan. Este método, practicado por nosotros como una modificación del de SOERENSEN, nos ha permitido, sin embargo, obtener resultados satisfactorios, con distintos grupos de substancias ensayadas como inhibidores.

La técnica utilizada (BOZAL & CALVET, 1959, 1960) consiste, en resumen, en efectuar las digestiones a 37° C en presencia del supuesto inhibidor, en medio del tampón fosfatos M/15 de pH 7,6, y después de un tiempo, por lo general, de treinta minutos, se adiciona una disolución de formol al 40 % del aldehído, efectuado lo cual se valora con NaOH 0,1 N hasta pH 9,0, con el auxilio de un potenciómetro: de esta manera se determinan, por diferencia, los grupos amino liberados en las hidrólisis, y así se establece la magnitud de las proteolisis y de las inhibiciones inducidas por la presencia de los diversos productos ensayados.

El fenol, el o- y el p-cresol, los díenoles (pirocatequina, resorcina e hidroquinona), el pirogalol y la floroglucina, actúan como potentes inhibidores de la hidrólisis triptica; también provocan definidas inhibiciones los m- y

Acción inhibidora de los fenoles sobre la hidrólisis triptica de la caseína

Caseína: 0,5 %

Tripsina: 5 γ / c. c.

Inhibidor	Concentración de inhibidor	Tanto por ciento de inhibición
Fenol	0,05 M	42
"	0,10 M	53
o-Cresol	0,05 M	100
Pirocatequina	0,025 M	65
Resorcina	0,05 M	74
Hidroquinona	0,05 M	No
"	0,10 M	75
Pirogalol	0,05 M	57
Floroglucina	0,02 M	32
o-Nitrofenol	0,05 M	No
"	0,10 M	No
m-Nitrofenol	0,05 M	76
p-Nitrofenol	0,05 M	27
"	0,10 M	59
2-4-Dinitrofenol	0,025 M	No
"	0,05 M	16
"	0,10 M	63
Ácido picrico	0,02 M	No
"	0,04 M	31
p-Clorofenol	0,05 M	71
"	0,10 M	100
o-Aminofenol	0,05 M	22
m-Aminofenol	0,05 M	25
p-Aminofenol	0,05 M	No

p-nitroenoles, el 2,4-dinitrofenol y el ácido píérico; los resultados experimentales obtenidos indican que una mayor disociación del hidroxilo fenólico, significa una disminución en el porcentaje de inhibición ejercido por el compuesto. El *c*-nitro fenol no se comporta como inhibidor de la proteólisis de la caseína, de la fibrina o de la gelatina, atribuyéndose este fenómeno a su escasa capacidad de unirse a las moléculas proteicas (impedimento estérico del NO_2).

Los reactivos del grupo carbonilo, la hidroxilamina, la hidrazina, la fenilhidrazina, la fenilsemicarbacida, el cianuro potásico y el sulfito sódico, inhiben la hidrólisis de la caseína por la tripsina, y también la de la gelatina y de la fibrina. Varios autores, entre ellos SITATES (1949 y 1952) y RONA (1920), han publicado estudios de las acciones inhibitorias de alguno de los reactivos mencionados, sobre las acciones de las proteasas, pero sus respectivos resultados son, en varios casos, contradictorios.

Inhibiciones de la proteólisis trópica provocadas por reactivos del grupo carbonilo

Tripsina : 5 γ / c.c.

Inhibidor	Concentración de inhibidor	Porcentajes de inhibición		
		Caseína 5 %	Gelatina 2,5 %	Fibrina 0,5 %
Hidracina	0,10 M	45 %	38 %	65 %
Fenilhidrazina	0,10 M	42 %	32 %	72 %
"	0,05	18 %	—	—
Fenilsemicarbacida	0,10 M	30 %	37 %	53 %
Hidroxilamina	0,10 M	34 %	20 %	63 %
Cianuro	0,10 M	33 %	50 %	66 %
"	0,02 M	8 %	—	—
Sulfito	0,10 M	28 %	26 %	42 %

En cambio, no muestran carácter inhibidor de la hidrólisis trópica de la caseína o de la gelatina, los ácidos benzoico, *o*-, *m*- y *p*-hidroxibenzoicos, *p*-aminobenzoico, *p*-nitrobenzoico, fenilacético, fenilpropiónico, *p*-nitrofenilacético, cinámico, amigdalílico, ftálico, ftálico díclorado, sulfosalicílico e hipúrico. Tampoco exhiben carácter inhibidor la benzamida, la cumarina, el ácido sulfánilico y la sulfanilamida. En las condiciones de trabajo, a pH 7,6, es probable que los aniones de las substancias mencionadas, sean repelidos por los aniones proteinicos, evitando la formación de complejos con la molécula proteica del enzima e impidiendo que se ejerza inhibición.

Por otra parte, actúan como inhibidores de las proteólisis trópicas de los substratos mencionados, los ácidos *o*- y *p*-nitrofenilpropiónicos, el ácido 2,4-dinitrofenilacético, el *p*-hidroxibenzoico y el naftalenacético, de suerte que, parece ser la estructura específica del compuesto y no, exclusivamente, ciertos grupos funcionales, la responsable de la acción inhibitoria.

Mientras las aminas aromáticas, anilina y toluidina, *p*-nitroanilina y 2,5-dicloranilina, no poseen carácter inhibidor, las *o*-, *m*- y *p*-fenilenodiaminas, inhiben la proteólisis trópica de la caseína, y con mayor potencia el isómero "para".

La α -aminopiridina, el ácido nicotínico y la nicotinamida, son inhibidores, pero ni el isonicotínico ni su hidracida lo son. En cambio, ejercen acción inhibitoria la hidracida cianacética y la malonil-dihidracida.

También son inhibidores las substancias poseedoras de anillos heterocíclicos como la piperacina, piperidina y piridina, pero en sus derivados carbonílicos se observa que desaparece o disminuye considerablemente el carácter inhibitor.

La isatina y el ácido indolil-3-acético inhiben la acción hidrolítica del enzima, mientras que no lo hacen el indol, el triptófano, la histidina y la histamina.

Son potentes inhibidores los jabones de los ácidos esteárico, palmitíco, oleico, elaidínico, linoleico y undecilénico, carácter que debe estar relacionado, se ha dicho, con la acción tensioactiva característica de las sales sódicas de los ácidos grasos de largas cadenas.

También ejercen energicas acciones inhibitorias varios detergentes aniónicos, constituidos por alcoholes y ácidos grasos sulfatados de más de 10 átomos de carbono y, entre ellos, merece especial mención el dodecilsulfato sódico (laurilsulfato).

Estudios semejantes realizados para averiguar la influencia de las distintas substancias mencionadas, sobre el sistema enzimático α -quimotripsina-caseína nos han producido resultados que observan un gran paralelismo con los expuestos en el precedente caso de la tripsina. BOZAL & CALVET (1960).

Resulta difícil, por el momento, interpretar adecuadamente el mecanismo de las inhibiciones de substancias tan misceláneas, y averiguar que grupos funcionales o estructuras puedan ser las principales responsables de los fenómenos. Nosotros suponemos que, por lo menos en el caso de los fenoles, de los reactivos del grupo carbonilo y de los detergentes aniónicos sintéticos, se deba, posiblemente, a la formación de complejos del inhibidor con la proteína enzimática o con el substrato.

En el caso del potente inhibidor dodecilsulfato sódico, SDS, (laurilsulfato), poseemos bastantes elementos de juicio, y a continuación se expone el

estado actual del estudio iniciado para tratar de comprender su acción sobre los sistemas tripsina-caseína y α -quimotripsina-caseína.

Acción del dodecilsulfato sobre la tripsina y la α -quimotripsina.

Se sabía que algunos detergentes sintéticos reaccionan con determinadas proteínas, PUTNAM & NEURATH (1944), pudiendo provocar su desnaturализación, ANSON (1939), así como la inhibición de ciertas enzimas como la catalasa, KUHN (1940), la pepsina, SHOEN & FOGELSON (1942), KRUSNER & SUTZER (1944), y la amilasa del malte, IKEMIYA, (1957).

Por todo ello supusimos, primeramente, que las acciones inhibidoras provocadas por ínfimas concentraciones de dodecilsulfato sódico (SDS), sobre los sistemas enzimáticos tripsina-caseína y α -quimotripsina-caseína, BOZAL & CALVET (loc. cit.), podrían ser el resultado de un fenómeno de desnaturización de la proteína enzimática inducido por el detergente aniónico, el cual modificara la estructura fina de la molécula enzimática.

Pero nuestras observaciones de que un potente detergente no iónico como el laurilo-polioxietilado (LPO), incluso a elevadas concentraciones, no ejerce la menor inhibición sobre las proteolisis de la caseína catalizadas por la tripsina o por la α -quimotripsina, no estaban de acuerdo con la interpretación adelantada de que fuera una acción tensoactiva desnaturizadora, la causante de los efectos antes referidos.

Además se percibió que al mezclar disoluciones medianamente concentradas de tripsina, o de α -quimotripsina, y de SDS, a un pH comprendido entre 3 y 7, aparecía un enturbiamiento, más o menos intenso, lo cual nos pareció una indicación de que entre la proteína enzimática y el detergente se producía una combinación.

En efecto, pudimos comprobar que el SDS es un detergente aniónico que se combina con los enzimas que nos ocupan, produciendo unos compuestos de carácter salino (ión electrostática), los cuales, por su escasa solubilidad en agua, se separan en forma de precipitados microcristalinos.

En estas combinaciones seguramente intervienen, por una parte, los grupos amino e imino de los aminoácidos básicos contenidos por dichas proteínas y, por otra, el anión DS⁻, dando origen a unos compuestos estables, de composición sensiblemente definida, los cuales, hemos comprobado analíticamente que contienen unos 18 a 20 restos de dodecilsulfato por mol de proteína; estas cifras coinciden bastante bien, precisamente, con el número de aminoácidos básicos que, en total, se admite que contiene la tripsina (P. M. 24.000; 2 mols de arginina, 3 de histidina y 14 de lisina, en total 19), y la α -quimotripsina (P. M. 25.000; 4 de arginina, 2 de histidina y 12 de lisina, en total 19, según GREEN & NEURATH, 1954).

Tanto el polidodecilsulfato de tripsina como el de α -quimotripsina son prácticamente insolubles en agua a pH 7, pero se disuelven perfectamente en exceso de disolución de SDS o de otros detergentes aniónicos, así como en una disolución del no iónico LPO. También son solubles en medio alcalino, de pH superior a 8.

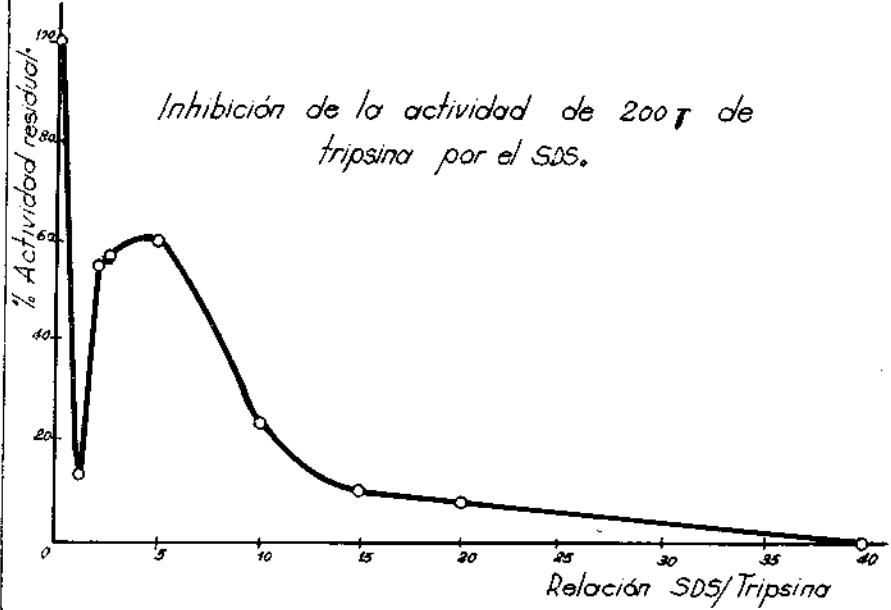
Los hechos experimentales parecen estar en favor de que las inhibiciones de las digestiones tripticas y α -quimotripticas de la caseína, observadas cuando los enzimas se han puesto previamente en contacto con el SDS, sean consecuencia del bloqueo de los grupos amino libres de las proteínas enzimáticas, efectuado por los dodecilsulfato: seguramente es indispensable que los grupos amino del enzima (posibles centros activos) se encuentren libres, sin bloquear, para que el catalizador pueda ejercer su acción proteolítica típica.

Las inhibiciones de las hidrólisis triptica y α -quimotriptica de la caseína a pH 7,6, inducidas por cantidades crecientes de SDS (el detergente puesto en contacto previo con el enzima) pasan por un valor máximo cuando la relación ponderal SDS/Enzima está comprendido entre 0,6 y 0,9, aproximadamente, en el caso de la tripsina, y es 0,125 al tratarse de α -quimotripsina, disminuyendo en magnitud al aumentar la proporción de detergente; en ambos casos, las inhibiciones disminuyen al seguir aumentando la proporción de detergente, y con la tripsina, ello tiene lugar hasta que el valor del cociente está próximo a 4, a partir de cuya concentración, las inhibiciones vuelven a aumentar hasta hacerse totales.

Los experimentos realizados parecen indicar que dichos fenómenos de inhibición pudieran ser consecuencia de la formación de compuestos de carácter salino entre el enzima y el ión dodecilsulfúrico, DS⁻, (combinación electrostática entre los grupos amino e imino de los aminoácidos básicos integrantes de la molécula proteica, y el mencionado anión), compuestos que se han podido aislar trabajando en condiciones modificadas (véase más adelante); al aumentar la concentración de SDS se manifiesta nuevamente una mayor actividad proteolítica (fenómeno cuya explicación tal vez reside en un mecanismo de tensoactividad, gracias al cual, resultan asequibles nuevos tipos de actividad en la superficie de la proteína enzimática), hasta que superiores cantidades de SDS provocan una creciente y definida inhibición que llega a hacerse prácticamente total, como indican las Gráficas V, VI, VII y VIII.

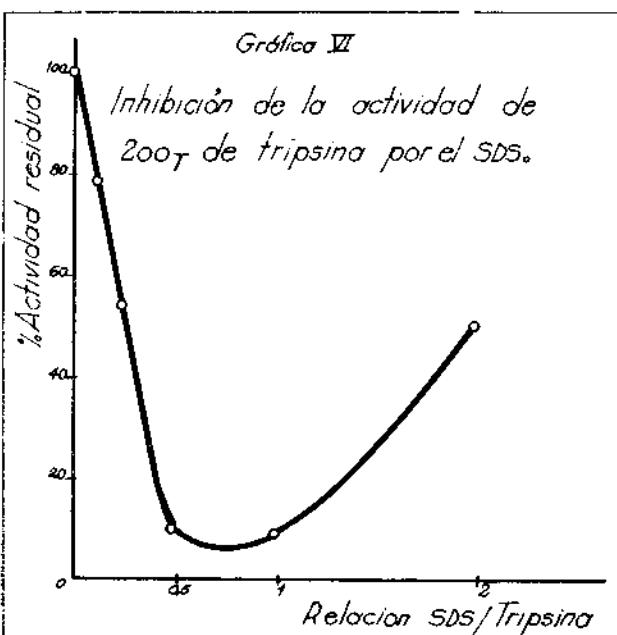
Gráfica V

Inhibición de la actividad de 200_T de tripsina por el SDS.



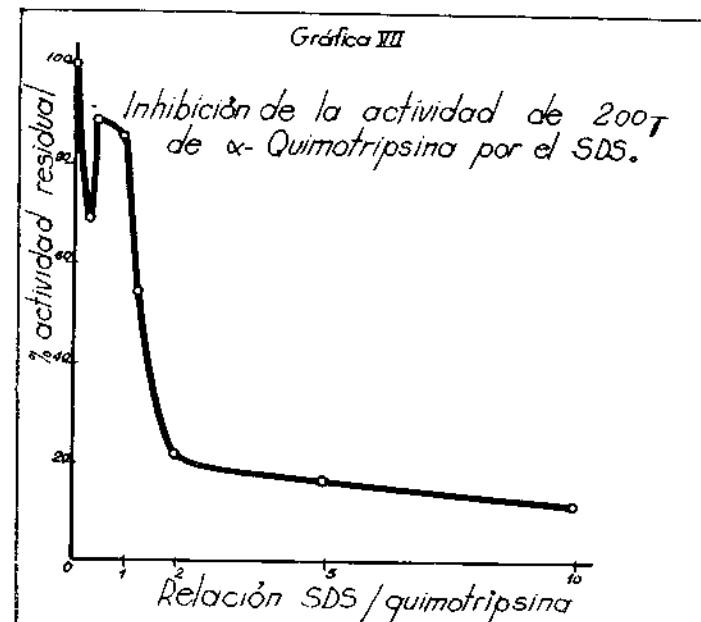
Gráfica VI

Inhibición de la actividad de 200_T de tripsina por el SDS.



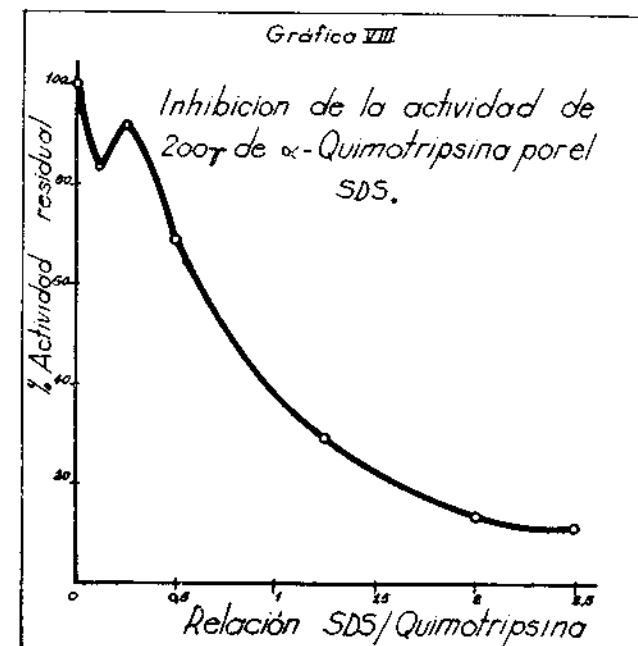
Gráfica VII

Inhibición de la actividad de 200_T de α -Quimotripsina por el SDS.



Gráfica VIII

Inhibición de la actividad de 200_T de α -Quimotripsina por el SDS.



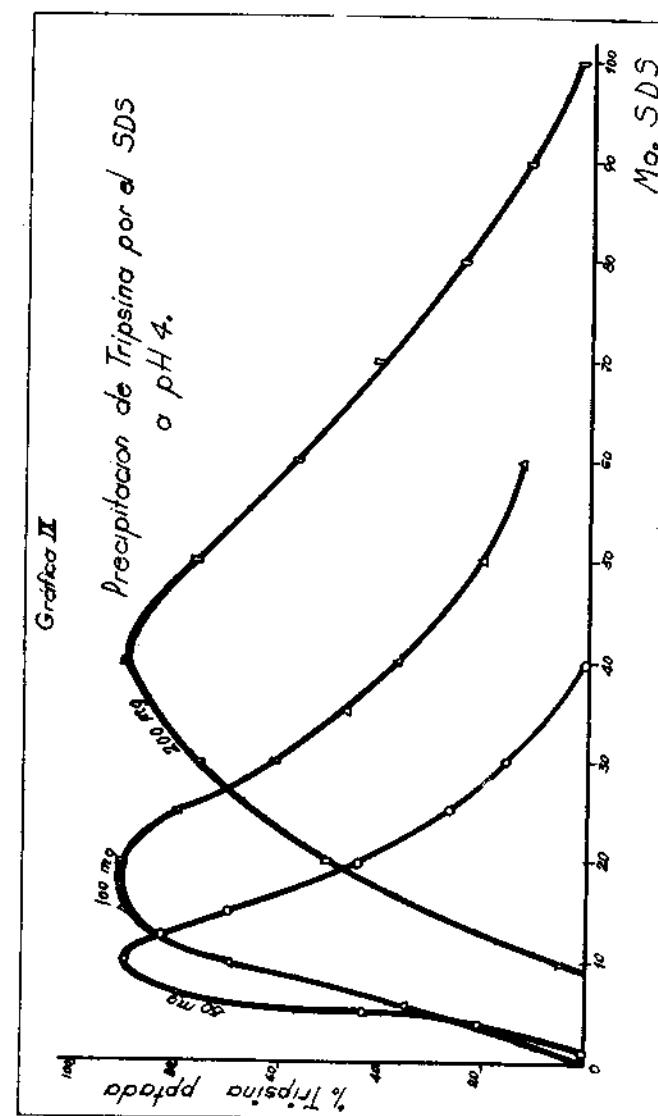
Trabajando a pH 4.0 se ha conseguido la obtención de los compuestos DS-tripsina y DS- α -quimotripsina, los cuales se separan en forma de precipitados microcristalinos cuando se mezclan sendas disoluciones de SDS y del correspondiente enzima. Ambos productos, como ya se ha aludido, son solubles en un exceso de disolución de SDS o de LPO.

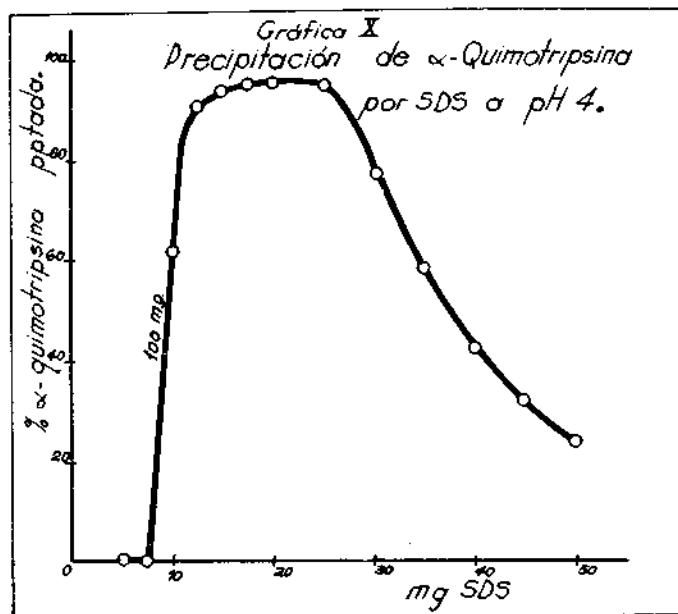
Las precipitaciones a pH 4.0, se verifican en las mejores condiciones y con el máximo rendimiento, cuando la relación estéquiométrica entre las cantidades de SDS y de proteína, no se apartan mucho del valor 1:5 (relaciones de valor superior ocasionan una redissolución parcial o total del precipitado).

La relación SDS/Enzima = 1/5 que provoca la máxima precipitación de ambos compuestos, corresponde a unos 18 mols de SDS por mol de proteína enzimática, cifra que, por una parte, no discrepa del valor hallado por análisis elemental del compuesto aislado (determinaciones de N y de S) que es de unos 20 grupos DS, y por otra, tampoco difiere de los valores teóricos calculados (tomando en cuenta el número conocido de grupos básicos presentes en las moléculas de ambos enzimas) como 19 para la tripsina y 17 para la α -quimotripsina.

En las gráficas IX y X se representan las curvas de precipitación de disoluciones de tripsina y de α -quimotripsina, obtenidas estableciendo las cantidades residuales de proteína, que permanecen en disolución (no precipitadas), mediante el reactivo de FOLIN, después de haber separado previamente el precipitado de polidodecilsulfato de enzima formado, bien por centrifugación o por filtración.

La facilidad con que ambos polidodecilsulfatos de tripsina y de α -quimotripsina se redissuelven en exceso de SDS o de LPO, es un efecto típico de detergencia (acción tensoactiva) que facilita la dispersión micelar de los productos insolubles en agua pura. Si una disolución transparente de poli-DS-tripsina en exceso de SDS a pH 4.0, se somete a una dialisis prolongada, en saco de celofana, frente a cantidades renovadas de tampón fosfato de pH 4.0, al cabo de unos días, aparece un enturbiamiento creciente en el interior del saco, y por centrifugación se puede recuperar, prácticamente, toda la cantidad original del DS-tripsina intransformado.





Una disolución de poli-DS-tripsina en un exceso moderado de SDS (hasta del orden de 4 : 1) exhibe una cierta actividad enzimática, frente a caseína como substrato, y un fenómeno análogo se ha comprobado trabajando con poli-DS- α -quimotripsina. Esta actividad es, sin embargo, mucho menor que la que corresponde a la cantidad de enzima contenida por el compuesto.

El LPO no parece combinarse ni formar compuestos poco solubles con la tripsina ni con la α -quimotripsina, a ninguno de los pH ensayados (de 3 a 8), ni provoca la menor inhibición de la digestión tríptica de la caseína, incluso a elevadas concentraciones (40 mg. LPO/ml., utilizando el enzima a 20 γ /ml.).

La caseína, por su parte, es una proteína que también se combina con el SDS, pero sin que al mezclar ambas disoluciones concentradas se observe que se produzca enturbiamiento o precipitación alguna, que constituya indicación de poca solubilidad en el compuesto formado: sin embargo, una disolución de caseína que contenga suficiente SDS, no coagula bien al intentar precipitarla por ácido tricloracético (observaciones análogas a las que hicieron ANSON con la hemoglobina y PUTNAM con la seroalbúmina).

Las marcadas inhibiciones de proteólisis observadas al trabajar con concentraciones de tripsina comprendidas entre 20 y 40 γ /ml. y con pequeñas

cantidades de SDS (relaciones SDS/Enzima comprendidas entre 0,6 y 0,9), siempre que el detergente haya sido previamente puesto en contacto con el enzima, no tienen efecto, en cambio, cuando la disolución de SDS y la caseína se han mezclado en primer lugar, probablemente, porque en este caso, el anión DS⁻ se ha combinado totalmente con el gran exceso de la proteína substrato (sin embargo, cantidades substanciales de SDS añadidas en primer lugar a la caseína, provocan considerables inhibiciones de su digestión tríptica).

Consideraremos que los compuestos poli-DS-tripsina y poli-DS- α -quimotripsina, por sus escasas solubilidades, pueden constituir nuevas formas terapéuticas de administración de ambos enzimas: inyectadas en forma de suspensión acuosa, o implantadas en los tejidos en forma de comprimidos, pueden actuar en una forma "retardada" y progresiva (por su lenta disolución en los líquidos intersticiales) lo que permitiría, de una sola vez, administrar dosis masivas, ya que su actuación lenta se prolongaría a lo largo de amplios períodos. Nos proponemos realizar los oportunos ensayos clínicos, por si de este modo, se pudiera hacer más cómoda la aplicación terapéutica de ambos enzimas proteolíticos, (recuérdese, por ejemplo, que el mecanismo de actuación de las insulinas "depot" o retardadas, está basado en la disolución lenta de compuestos insulinicos poco solubles, en lo que son parecidos a los polidodecilsulfatos de los enzimas que hemos descrito).

RESUMEN.

La aplicación creciente que se hace de la tripsina y de la α -quimotripsina en Enzimoterapia, por un lado, y el reconocimiento de que la inflamación hística debe obedecer a una desorganización de ciertos sistemas proteolíticos, por otro, nos han inducido a investigar las acciones específicas menos conocidas de dichas proteinasas pancreáticas, esto es, sus actividades esterásicas y desmolásicas, así como a estudiar los efectos inhibidores ejercidos por varios fármacos (entre ellos, varios agentes antinflamatorios) sobre las proteólisis catalizadas por dichos enzimas.

Las actividades esterásicas y desmolásicas de la tripsina y de la α -quimotripsina se han ensayado sobre múltiples substratos sintéticos que, estructuralmente difieren entre sí, y se han determinado comparativamente las magnitudes de las hidrólisis producidas en cada caso; se ha podido comprobar de un modo general que, para experimentar las hidrólisis catalizadas por los enzimas, no es necesario que dichos substratos cumplan con los requerimientos de estructura postulados por NEURATH.

Por otra parte, se han investigado las acciones inhibidoras ejercidas por varios productos, cuando se hallan presentes en las proteólisis catalizadas por la tripsina o la α -quimotripsina, de substratos naturales como la caseína, la fibrina, la gelatina, y la ovalbúmina, entre otros. Se ha comprobado que varios de ellos —los fenoles, los reactivos del grupo oxo, los detergentes aniónicos, etc.— exhiben un positivo poder inhibidor que contrasta con la nula influencia de otros fármacos ensayados. Agentes antinflamatorios como los ácidos salicílico, acetilsalicílico, p-aminobenzoico y la fenilbutazona, son potentes inhibidores de las proteólisis triptica y quimiotriptica de la p-nitrofenilazocaseína, substrato de elección que permite rápidas y precisas determinaciones colorimétricas.

La energética inhibición que sobre las proteólisis ejerce el laurilsulfato sódico, no se debe principalmente a una desnaturalización de las proteínas enzimáticas experimentada bajo la influencia del detergente, sino que es el resultado de la formación de definidas combinaciones de carácter salino entre los grupos básicos (centros activos) de la tripsina y de la α -quimotripsina, y los aniones dodecilsulfúrico: los productos de las combinaciones han sido aislados y obtenidos al estado de pureza analítica, y sus composiciones perfectamente establecidas. Consideramos que la poca solubilidad en agua, a pH 7.0, de dichas combinaciones, pueda hacerlas útiles en Enzimoterapia, permitiendo la administración parenteral de grandes dosis de los enzimas, para actuar en forma retardada o gradual, a lo largo de prolongados períodos de tiempo.

B I B L I O G R A F í A

- ANSON, J. Gen. Physiol. 23, 239, (1949).
BENDER & KEMP, J. Amer. Chem. Soc. 79, 11, (1957).
BOZAL & CALVET, Anales Soc. Esp. Fís. Quím. 55, B, 231, (1959).
BOZAL & CALVET, Anales Soc. Esp. Fís. Quím. 54, B, 803, (1960).
CAROL & CALVET, Anales Soc. Esp. Fís. Quím. 54, B, 349, (1958).
CUNNINGHAM, Science 125, 1145, (1957).
DOHERTY, J. Am. Chem. Soc., 77, 4887, (1955).
DOHERTY & SHAPIRA, Fed. Proc. 15, 352, (1956).
DOHERTY & THOMAS, Fed. Proc. 13, 200, (1954).
DUÑACH & CALVET, Rev. Esp. Fisiol. 16, Suppl. II, 201, (1960).
FEIGL, Mikrochemie 15, 9, (1934).
GREEN & NEURATH, The Proteins, Vol. II, 1057, Academic Press, (1954).
GREENBERG & HARPER, Enzymes in Health & Disease, Chap. 12, Historical Review of Clinical Use of Enzymes, Thomas, Springfield (1960).
HESTRIN, J. Biol. Chem. 180, 249, (1949).
HINE, Phys. Org. Chem. 274, (1956).
IKEMIYA, Bull. Inst. Chem. Res. Kyoto Univ. 35, 81, (1957).
INNERFIELD, Surgery 29, 426, (1956).
J. J. D., Rôle thérapeutique des enzymes protéolytiques, Medicine et Higiène, Genève, 18, 573, (1960).
JANCÓ, J. Pham. Pharmacol. 13, 577, (1961).
KFISTIAKOWSKY & SJAW, J. Amer. Chem. Soc., 75, 866, (1953).
KEUSNER & SPITZER, Gastroenterology, 2, 348, (1940).
KUHN, Ber. Deutsch. Chem. Ges. 73, B, 1080, (1940).
MART N, Ann. New York Acad. Sc. 68, 1, (1957).
NEURATH, Chem. Rev. 46, 116, (1950).
NIEMANN & HUANG, J. Amer. Chem. Soc. 74, 4634, (1952).
NIEMANN & JENNINGS, J. Amer. Chem. Soc., 75, 4687, (1953).
PUTNAM & NEURATH, J. Am. Chem. Soc. 66, 692, (1944).
ROGET & CALVET, Anales Soc. Esp. Fís. y Quím. 56, B, 1015, (1960).
ROGET & CALVET, Anales Soc. Esp. Fís. y Quím. 58, B, 357, (1962).
RONA, Biochim. Z. 109, 279, (1920).
SCHALES, Arch. Bioch. 19, 119, (1948); 22, 366, 1949; Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 79, 75, (1952).
SHERRY & FLETCHER, Clinical Pharmacology & Therapeutics, Washington, I, 202, (1960).
SHOCH & FOGELSON, Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 50, 304, (1942).
SCHWERT & TAKENAWA, Biochim. Biophys. Acta 16, 570, (1955).
SORENSEN, Comp. rend. trav. lab. Carlsberg, Ser. chim. 7, 1, (1907).
UNGAR, Inflammation and its Control, A Biochemical Approach, Lancet 2, 742, (1952).
VALDECASAS & PUIG-MUSET, L'alphachymotrypsine en thérapeutique. Médecine et Higiène, Genève, 18, 821, (1960).

DISCURSO DE CONTESTACIÓN

por el

M. I. Sr. Dr. D. Francisco Hernández-Gutiérrez

Académico Numerario

Excelentísimo Sr. Presidente,
Muy Ilustres Señores Académicos,
Señoras y Señores:

Nos ha honrado sobremanera la Junta de Gobierno designándonos para contestar el discurso de recepción del Profesor FERNANDO CALVET PRATS, elegido para ocupar una vacante de nueva creación, reservada a especialistas no farmacéuticos, de esta Real Academia que, aunque todavía incompleta, se va adscribiendo a la actividad científica del Distrito Universitario.

Acepté gustoso y recogiédo el mandato, aunque con la preocupación de no acertar en el debido cumplimiento de la misión encomendada, no sólo por razón de la natural disciplina a que nos obligan nuestros Estatutos y Reglamento por precepto tradicional, sino por el honor que supone el representar a la Academia en una ceremonia trascendental de su vida corporativa cuando es la de recibir en su seno un nuevo académico con el que además, y esto hace más grato el encargo, me une sincera y entrañable amistad desde hace ya mucho tiempo. Este motivo excluye otros como el de tener el convencimiento de que cualquier otro de nuestros compañeros lo habría hecho con mejor acierto permitiéndonos la disculpa por haberlo aceptado; sin embargo, pondremos nuestra mejor voluntad para que el intento resulte digno de esta detta Corporación.

Antes de contestar el interesantísimo discurso del Profesor CALVET PRATS, permitidme que dedique, por ser costumbre establecida en estos actos actos, unas palabras a la personalidad y méritos de nuestro recipiendario que, como decía el farmacéutico Profesor LORA TAMAYO en ocasión recordada hace poco por el Académico Dr. SAN MARTÍN, viene a enriquecer la heráldica corporativa con cuarteles propios.

En este momento solemne, especialmente para mí, he de acudir al archivo de la memoria, que se dice guarda celosamente lo que el corazón ama, y no ha de extrañar, por tanto, que este discurso sea más familiar que académico, recordando la época y circunstancias que contribuyeron a modelar la recia personalidad del recipiendario, cuyos rasgos biográficos trataremos de dibujar.

Nacido en Villafranca del Panadés en 22 de Enero de 1903, FERNANDO CALVET PRATS adquirió su formación técnica que años más tarde le facultaría para proyectar industrias químico farmacéuticas de gran importancia, en el Instituto de Química Aplicada de Barcelona, centro fundado por el ilustre farmacéutico, Académico electo, D. José AGELL y AGELL, figura señera de la industria química nacional a quien rendimos homenaje en esta ocasión evocando la Escuela en que tuvimos la fortuna de conocer, coincidiendo en muchas horas de trabajo experimental, a nuestro Académico de hoy.

En dicho centro se cursaban las enseñanzas de Directores de Industrias Químicas, dato significativo por cuanto implicaba nada menos que atender a la urgente necesidad de preparar personal apto que dominase la teoría científica y la técnica, posibilitando la implantación y desarrollo de nuevas fuentes de riqueza y la modernización y mejora de las existentes; a este propósito transcribimos algunos párrafos publicados durante la primera guerra mundial:

"Ante las críticas circunstancias por que atraviesa Europa, hemos aprendido que las naciones más fuertes son las que mejor se bastan a sí mismas y que para ello tienen mejor organizadas sus industrias químicas. Tales naciones cuentan con numeroso y competentísimo personal de investigadores y técnicos gracias a los que han podido obtener productos variadísimos y en las cantidades necesarias para su normal consumo o para aplicaciones nuevas hasta hoy no sospechadas. El estado de los medios con que cuenta hoy nuestro país para subvenir a la insuficiencia de algunos productos indispensables, lleva al ánimo la impresión más penosa: numerosas materias primas, riquezas en embrión, se encuentran en nuestro subsuelo o las produce nuestra agricultura, transportándolas en bruto al extranjero para allí ser transformadas y volver, fuertemente encarecidas, en forma de materias fecundantes o de productos farmacéuticos. Al pasar del estado bruto al de producto elaborado, tales sustancias no añaden nada a la economía nacional, impidiéndonos, en cambio, una relación de dependencia respecto a los que las adquieren para transformarlas. Es pues urgentísimo remediar tal estado de cosas y salir de una dependencia que más semeja esclavitud, preparándonos para significar algo en el mundo el día en que, terminado el actual conflicto, se proceda a una colossal revisión de valores aquilatando el de cada uno de los pueblos de la tierra".

Los hechos han probado la importancia excepcional de aquella contribución al desarrollo de nuestra limitada industria química en la segunda década del siglo. En aquel ambiente se formaron personalidades como CALVET, que han prestigiado y acrecentado nuestra economía, por profesores a los que únicamente guibia la ambición de una España mejor: Ingeniero José M. TALLADA PAULÍ, luego director de una institución bancaria de ámbito nacio-

nal, que nos enseñaba matemáticas y mecánica racional. El Sr. AGELL exponía las teorías más recientes de la Química General y Analítica, haciéndolo en lo relativo a la Química Orgánica el Ingeniero GALLARD. Los Dres. ESTEBAN TERRADAS y RAMÓN JARDÍ, Catedráticos de nuestra Facultad de Ciencias, nos introducían en los arcanos entonces casi insoslayables de la Físico-Química. Con gracia sin igual, sazonada con vocablos de uso poco frecuente, el Dr. CLAUDIO SALA PONS, colaborador del Dr. RAMÓN Y CAJAL y descubridor de las células de Clausius, exponía, creemos que por primera vez en España, los fundamentos y aplicaciones de la Microbiología Industrial y D. LEONARDO LEPREVOST, Ingeniero impulsor de la Metalurgia en España, se refería a una materia a la que no hemos dado importancia hasta hace p' quizás tiempo, la Organización y Dirección del Trabajo.

Se dedicaban de 4 a 5 horas diarias al trabajo de laboratorio que se consideraba de importancia fundamental y en el que, aparte de demostraciones como la repetición de algunas de las experiencias de Aloissian, se estudiaban en pequeñas instalaciones —de las llamadas ahora piloto— la obtención de celulosa a partir de múltiples residuos agrícolas, la fabricación de tulios sin madura, la síntesis de colorantes, esencias artificiales y medicamentos orgánicos, muchos de ellos por primera vez en España y en procesos que más de una vez exigieron la permanencia en el lugar de trabajo, por turnos naturalmente, de hasta diez días con sus noches. El examen práctico de final de carrera de CALVET PRATS, versó sobre la síntesis de la vainillina por descomposición del ozónido del isoeugenol, con resultado que según manifestación del interesado, "sorprendió a la misma empresa".

Los cursos normales se complementaban con otros extraordinarios, monográficos, sobre temas entonces de actualidad que nos eran presentados por eminentes profesores españoles, Dres. ENRIQUE MOLES y BLAS CABRERA, Catedráticos de la Facultad de Ciencias de Madrid y Director el último del Laboratorio de Investigaciones Físicas de la Junta para Ampliación de Estudios, Dres. GONZALO CALAMITA y de GREGORIO ROCASOLANO, de la Universidad de Zaragoza, el P. VITORIA, Director del Instituto Químico de Sarriá o procedentes de Centros extranjeros como el Prof. PAUL SABATIER, decano de la Facultad de Ciencias de Tolouse, por quien fuimos felicitados por nuestros trabajos sobre hidrogenación de aceites de pescado por vía electroquímica, Prof. WOLFGANG OSTWALD, Profesor de Coloidoquímica de la Universidad de Leipzig, Prof. CHARLES MOUREAU, del Collège de France, Profesor GABRIEL BERTRAND, de la Facultad de Ciencias de París, etc.

Simultáneamente, con la ayuda de una Beca Antonio de Gimbernat concedida por nuestro Ayuntamiento, CALVET PRATS cursó la Licenciatura en Químicas en la que, conducido por la mano del Prof. GARCÍA BANUS, verdadero Maestro a quien nos fue dado tratar durante algunos años, se despertó en nuestro recipiendario el gusto por la investigación científica que ya no

habría de dejar. Se licenció en Junio de 1923, con la calificación de Sobresaliente y Premio Extraordinario, ingresando en la Facultad como Ayudante de Clases Prácticas en el Laboratorio de Química Orgánica para iniciarse en las técnicas de la investigación, colaborando en el estudio de la constitución de los difenilisocromanos que ocupaban la atención de la escuela del Prof. GARCÍA BANUS, en la que la discusión e interpretación de los resultados obtenidos —no siempre identificados con los que se esperaban— en un ambiente de desinteresado espíritu tanto habían de influir y decidir la vocación de FERNANDO CALVET PRATS.

En 1925, la Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales de Madrid le adjudicó la Pensión correspondiente a España de la Ramsay Memorial Fellowship Trust, trasladándose a Oxford para trabajar en el Queen's College bajo la dirección del Prof. F. D. CHATTAWAY, aprovechando la oportunidad para inscribirse en la Universidad como doctoranda, por convalecerle los estudios de Licenciatura. La pensión fue renovada por otros dos cursos que fueron de trabajo intenso reflejado en una serie de memorias originales sobre el mecanismo de las reacciones de condensación entre el cloral y los fenoles como caso particular del general de condensación fenol-aldehido, interesante por sus aplicaciones técnicas a la fabricación de bakelitas y otras resinas plásticas. Identificó los productos obtenidos cuando la oposición para del fenol se hallaba ocupada, sugiriendo un mecanismo hipotético para explicar la reacción observada, en una tesis que le valió el grado de Doctor of Philosophy in Chemistry en la Facultad de Ciencias Físicas de la Universidad Oxfordiana.

Completando los estudios mencionados con otros experimentales en nuestra Facultad de Ciencias, prepara su Doctorado que consiguió en 1929 en la Universidad Central con su tesis "Una nueva reacción de condensación de fenoles y aldehídos; la condensación del cloral con los fenoles para-sustituidos" que fue publicada por la Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales de Madrid.

Su primera experiencia docente, con carácter oficial fue el ejercicio de la Auxiliaria de la Cátedra de Química Orgánica de la Facultad de Ciencias, encargándose del trabajo de laboratorio al mismo tiempo que proseguía el de investigación. Estas tareas confirmaron al novel profesor en su orientación hacia la enseñanza superior.

Con una beca de la Fundación Rockefeller obtenida en 1929 trabajó en Munich durante más de un año con el Profesor H. WIELAND sobre el estudio de las estructuras y propiedades de los alcaloides, especialmente sobre la estricnina, brucina y vomicina, participando en coloquios y reuniones científicas en las que se trató, entre otros, a los Profs. H. FISHER y R. WILLETTTER. Sus trabajos se publicaron en los Liebigs Annalen der Chemie, interpretando en uno de ellos la reacción coloreada de oxidación por el ión

férrico o el ácido crómico de algunos derivados de la estricnina y la vomicina, confirmando la existencia de un anillo lactámico en la estructura de los alcaloides de partida, interpretación que aclaró la doble estructura del ácido aislado por LÉGÜIS después de la oxidación intensa de la tetrahidroestriénina. En otra memoria comprobó que la metilación del ácido vomicínico no es del mismo orden que la realizada por otros investigadores de la escuela del Prof. WIELAND sobre el ácido estríenico.

En Enero de 1930 ganó, por oposición, la Cátedra de Química Orgánica de la Facultad de Ciencias de la Universidad Compostelana en la que su primer cuidado fue la organización de un servicio de semimicroanálisis elemental para conseguir el rápido conocimiento de las sustancias aisladas que, de otro modo, habría de recibirse del exterior y del que se beneficiaron en primer término los laboratorios españoles; a poco, introdujo modificaciones en el método original de SUCHARDY y BOBRANSKI que fueron objeto de una publicación en "Anales de la Real Sociedad Española de Física y Química". Entre otros trabajos resulta para nosotros de interés el relativo a la preparación de 2,7-diaminofluoreno que aplicaba a la separación analítica del cobre y cadmio y a la determinación gravimétrica del cine.

En Santiago dictó CALVET PRATS varios cursos de Química General para los estudiantes de las Facultades de Farmacia y Medicina y actuó como asesor científico en la elaboración de varios productos entre los que destacan los alcaloides del curuzuelo.

En 1935 una segunda Pensión Rockefeller le lleva a trabajar al Instituto Bioquímico de Estocolmo durante más de un año con el Prof. VON EULER al que debe su actual especialización bioquímica, incorporándose al estudio del papel de la coenzima en la fermentación alcohólica con los Profesores F. ADLER y K. MYRBAEK, con los que colaboró en estudios sobre el equilibrio coenzima-dihidrocoenzima en los sistemas fermentativos y la influencia del glicerilaldehído como inhibidor de la glucólisis de los carbohidratos no fosforilados como el glucógeno y la glucosa, pero no de la de sus esteres mono o difosfóricos.

De regreso a España contribuye a impulsar la industria químico-farmacéutica beneficiando el curuzuelo de canteno, preparando extractos hepáticos y elaborando numerosas formas farmacéuticas en una empresa que alcanzó preponderante lugar en la actividad químico-farmacéutica nacional.

Entre sus trabajos de aquella época figura el descubrimiento de la insulina, enzima proteolítico que inactivaba en muy poco tiempo la insulina en medio acuoso; a este tema dedicó el Dr. CALVET PRATS el discurso inaugural de 1946 de la Universidad de Salamanca a la que se había trasladado un año antes.

Dos años más tarde se desplaza a Estados Unidos, pensionado por la Junta de Relaciones Culturales del Ministerio de Asuntos Exteriores, para

perfeccionar sus técnicas bi-químicas bajo la dirección del Prof. K. STERN del Instituto Politécnico de Brooklyn, con el empleo auxiliar del microscopio electrónico, estudiando la morfología de la cromatina nuclear de los linfocitos del ternero. El examen cuidadoso de las fotoanicrografías le permitió diferenciar ultrafibrillas nucleoproteínicas a lo largo de las cuales apreció bandas equidistantes que bien pudieran corresponder a hélices de desoxirribonucleico, observación dada a conocer en 1948 por "Nature".

Trabajando en la Universidad de Nueva York en un "Investigation Project of the U. S. A. Public Health Service" bajo la dirección y en colaboración con el Prof. MARSHAK, cuyo laboratorio coincidaba con el del Profesor SEVERO OCIOA, tuvo la oportunidad de asistir a coloquios científicos en los que se afianzó su amistad con el futuro Premio Nobel; dedicó su actividad al estudio del metabolismo de nucleoproteínas y de ácidos nucleoproteicos marcados con isotopes radiactivos que publicó en 1949.

Trasladado como Profesor Agregado de Bioquímica para doctorandos a la Facultad de Ciencias de nuestra Universidad, se integra en la Sección de Farmacología del C. S. I. C. que dirige nuestro Académico Prof. GARCÍA VALDECASAS, dando a conocer varias notas sobre la síntesis del decametonio, poderoso curarizante, y de antihistamínicos bromados.

En el XXVII Congreso de la Sociedad de Química Industrial de Barcelona presentó una nueva técnica para la determinación colorimétrica de la actividad triptica fundada en el empleo, como sustrato, de azoproteínas solubles. De sus trabajos sobre la tripsina, la alfaquimotripsina, la ribonucleasa, la catalasa y sus medios de valoración, dan fe sus intervenciones en la III Reunión de la Sociedad Española de Ciencias Fisiológicas celebradas en Madrid en 1956.

En 1958 publicó un resumen de su estudio sobre la capacidad hidrolítica de la alfa-quimotripsina sobre sustratos sintéticos, comprobando que algunos esteres fenilacetáticos, caretes de un puente metilénico entre el carbono en posición α del núcleo, indispensable según NEURATH, constituyen un sustrato mejor que el fenilpropiónato de etilo que cumple aquella condición para la acción esterásica.

En el IV Congreso Internacional de Bioquímica de Viena apuntó los resultados de su labor sobre la inhibición de la digestión triptica por varios fármacos, con la que completa la investigación iniciada años atrás. Una ampliación de la misma fue dada a conocer en las Jornadas Bioquímicas Latinoamericanas celebradas en nuestra ciudad en 1959, dando cuenta de las propiedades de la ribonucleasa extraída de plantas forrajeras, de la potenciación por el peróxido de hidrógeno de la actividad de la tripsina y de la alfa-quimotripsina sobre macromoléculas proteicas, como la caseína, fibrina, ovoalbúmina, seroalbúmina y de un nuevo método adecuado para la valoración de la hidrólisis triptica y quimotriptica fundado en el uso, como sustrato, de la p-nitro-

fenil-azo-caseína, de cuya degradación resultan péptidos e intermedios de bajo peso molecular no precipitables por el ácido tricloracético y que por cumplir la ley de Beer son el fundamento de una colorimetría.

En 1960 se ocupa de la actividad recién descubierta de la alfa-quimotripsina de desligar enlaces carborados, comprobada sobre numerosos sustratos de síntesis y que publica con el título "Sobre la actividad desmolásica de la alfa-quimotripsina" en la Revista Española de Fisiología.

Al año siguiente gana por oposición la Cátedra de Bioquímica de la Facultad de Ciencias de Barcelona, primera en España, que regenta en la actualidad junto con la Jefatura del Laboratorio de Bioquímica del Instituto de Química del Patronato Juan de la Cierva del C. S. I. C. en Barcelona.

Como resumen de su actividad científica de una deusidat como hemos visto, realmente considerable, diremos que desde 1923 hasta 1957 publicó 26 trabajos originales sobre síntesis orgánica y química de los alcaloides y, desde que inició su labor investigadora en bioquímica hasta la fecha han aparecido otras 37 memorias, conjunto bibliográfico que damos al final.

Aparte la labor docente y de investigación tan succinctamente expuesta, ha traducido la "Química Orgánica para estudiantes de Medicina" de BARBER, libro de valor didáctico editado en Barcelona en 1935 y dos volúmenes de "Síntesis Orgánicas" de GILMAN BLATT, y es autor de una "Bioquímica para Químicos, Médicos y Farmacéuticos" de la que se han publicado dos ediciones, en 1956 y 1961.

Y pasamos al comentario del discurso de nuestro amigo, a quien rogamos excuse nuestro atrevimiento includible, en cuanto a su trabajo experimental de una parte y a la enzima terapia en último lugar.

Se manifiesta el mérito del Profesor CALVET PRATS al adaptar, creemos que por primera vez la microtécnica de FEIGL a la determinación de la alfa-quimotripsina, aplicando la caseína marcada químicamente, y al señalar las diferencias existentes entre este enzima y la tripsina en los que las actividades esterásica y desmolásica no son correlativas respecto a los nuevos sustratos.

En cuanto al estudio de la actividad de la alfa-quimotripsina, parte importante de la labor experimental del Dr. CALVET PRATS, son notables las particularidades que muestra como esterasa sobre diversos sustratos, por ejemplo, la influencia de la naturaleza del sustituyente en para soportado por el arilo de los fenilacetatos; es curioso que el nitróderivado se hidrolice con velocidad mayor que el producto de su reducción y que constituya en sustrato más susceptible el derivado metoxilado que el compuesto con el hidroxilo fenólico libre.

Por lo que se refiere a la actividad desmolásica, ésta ha sido estudiada sobre sustratos aromáticos con cadenas laterales de 3 a 5 eslabones, con el núcleo sustituido en para y, también, sobre los esteres y ácidos libres. Si se

trata de compuestos con cadenas de cinco carbonos, parece que los dos extremos de la molécula se influyen mutuamente, favoreciendo o inhibiendo, según los casos, la actividad desmolásica; en efecto, en tanto que el p-hidroxiacido libre y su ester son degradados, el p-aminoderivado sólo experimenta la acción desmolásica si su grupo carboxilo se halla esterificado, permaneciendo inalterado, frente al enzima, el ácido libre. Es evidente que uno de ambos grupos —aminoico o carboxílico— inhibe la actividad desmolásica. Por otra parte, la inhibición se manifiesta siempre sobre los p-nitroacidos, libres o esterificados.

Es curioso que al acortarse la cadena, pasando por ejemplo del fenil-oxo-valerianato al oxo-butirato, la acción inhibitoria que acabamos de mencionar, atribuida al ristrol, desaparece, siendo escindidos tanto el nitro ácido como sus esteres. En cuanto a los p-amino sustituidos, lo son si el enzima actúa sobre el ester pero no si se hallan como ácido libre. Si la cadena se acorta en otro eslabón, pasando al fenil-oxo-propionato, la escisión tiene lugar tanto sobre el p-nitro- somo sobre el p-amino-derivado.

En una segunda parte, el Profesor CALVET PRATS estudia experimentalmente la acción sobre el poder proteolítico de la tripsina y de la α -quimotripsina, de casi un centenar de sustancias diversas, inorgánicas unas, orgánicas la mayor parte y, entre ellas, algunos medicamentos. Aunque la obligada brevedad nos veda el comentar este trabajo, no por carecer de interés, sino precisamente por todo lo contrario, nos permitiremos destacar la particular circunstancia de que mientras el hipurato de metilo es desdoblado por la α -quimotripsina, el ácido hipúrico inhibe la capacidad proteolítica del enzima sobre la caseína. Posiblemente la acción inhibitoria pueda interpretarse a través de un proceso de desnaturalización del enzima.

La última parte del interesantísimo trabajo del Dr. CALVET PRATS se refiere a la acción entre los enzimas que nos ocupan y los tensioactivos de síntesis, con formación de compuestos poco solubles cuando se hallan en presencia cantidades determinadas de enzima y detergente.

Los progresos de la Bioquímica y especialmente los avances en el campo de la Enzimología han demostrado la relación existente entre el estado patológico, en general, y el desequilibrio y falta de coordinación de los sistemas enzimáticos del organismo, relación comprobada experimentalmente.

Al alterarse un tejido, por una agresión de cualquier tipo, se vierten al torrente circulatorio enzimas que alcanzan muchas veces niveles séricos anormalmente altos. En la actualidad, la determinación del contenido en glutámico-oxalacético-transaminasa en el suero en el que se hallan hasta veinte veces la cantidad normal, favorece el diagnóstico precoz del infarto de miocardio, aún antes de que en los electrocardiogramas aparezcan los signos típicos de la cardiopatía; el curso clínico de la misma puede seguirse valorando la deshidrogenasa láctica del suero. Las hepatitis víricas agudas se recogen de la deshidrogenasa láctica del suero. Las hepatitis víricas agudas se reco-

nocen, cuando no se acusa todavía la disfunción hepática, por el considerable aumento de la concentración en glutámico-piruvico-transaminasa que puede alcanzar una concentración sérica de hasta cien veces la normal.

Del conocimiento de estos fenómenos y de muchos otros de naturaleza idéntica, relacionados con estados morbosos, derivan los fundamentos de los métodos enzimoterápicos que consisten en la aportación exógena de enzimas, o coenzimas, para compensar su deficiencia, para cuyo fin se hallan ya preparados en el arsenal terapéutico, o la administración de inhibidores que modifican o limitan la actividad exaltada de ciertos sistemas enzimáticos. Son muchos los fármacos sintéticos que muestran poder inhibitorio útil, como analgésicos, antipiréticos (ácido acetilsalicílico, los 4-alcoholes derivados de la 1,2-difenil-3,5-dioxo-pirazolidina, la salicilamida, el ácido gentisico después de su bioamidación, etc.). También actúan de modo parecido los tensioactivos de carácter aniónico, de cadenas lineales de 11 a 18 átomos de carbono, saturados o no, como los jabones sódicos o las sales del ácido dodecilsulfúrico, dependiendo, al parecer, la actividad, de la longitud de las cadenas.

Los efectos de los últimos sobre la acción de la tripsina y la α -quimotripsina han sido investigados por el nuevo Académico, quien ha comprobado la formación de combinaciones estables de tipo salino (unión electrostática) en las que intervienen los ácidos con carga negativa y los grupos básicos —aminoicos o iminoicos— de los aminoácidos básicos que se integran en la molécula enzimática (lisina, arginina) que quedan bloqueados impidiendo, seguramente, la acción típica del biocatalizador, tal vez por pérdida de su ordenación terciaria característica. Tales productos, prácticamente insolubles en medio neutro, los propone, como nuevas formas farmacéuticas, para la administración parenteral de los enzimas en suspensión acuosa o como comprimidos para su implantación.

La tripsina y la α -quimotripsina son proteasas cristalizadas del páncreas bovino que se administran por sus propiedades proteolíticas y antiflogísticas, para combatir la inflamación y el edema. El mecanismo de la inflamación local parece deberse a un desequilibrio enzima-proteolítico en los tejidos, con deposición anormal de fibrina y otras proteínas en las paredes de los capilares, cuya permeabilidad reducida puede recuperarse por redissolución de la fibrina y metahemoglobina depositadas. La acción de cada uno de ambos enzimas no es idéntica —ya lo hemos dicho— por lo que resulta muy efectiva la administración simultánea de los dos. Se emplean también para la eliminación de mucosidades bronquiales desbridamiento de adherencias pleurales y peritoneales, en heridas infectadas, quemaduras, úlceras varicosas, tromboflebitis y en la periartritis escapulo-humeral. La α -quimotripsina se emplea en cirugía de la catarata para disolver las fibrillas que sostienen el cristalino (zonulolisis enzimática).

La acción directa de la tripsina sobre la fibrina en la que, aparte su carácter proteolítico específico, interviene un efecto activador sobre la profibrinolisin, se reduce o llega a anularse si se inyecta por vía parenteral como consecuencia de la presencia de inhibidores plasmáticos. Sin embargo, la modificación de la tripsina, o de la α -quimotripsina, por formación de complejos con la heparina, por ejemplo, abre en estos casos nuevas posibilidades en el campo terapéutico. El complejo tripsina-heparina anula la actividad de dichos inhibidores hasta el punto de conseguirse intensos efectos fibrinolíticos "in vivo", netamente superiores a los de la tripsina aislada con activación de la lipasa sérica, capacidad de que carece el enzima puro.

La desoxiribonucleasa pancreática escinde hidrolíticamente el ácido desoxiribonucleico y las nucleoproteínas, siendo de aplicación, asociada a la tripsina, para facilitar el desbridamiento enzimático de heridas, aun careciendo de actividad proteolítica o antiinflamatoria. En Veterinaria se utiliza en el tratamiento de la mastitis bovina, abscesos, sinusitis y otitis externas.

La hialuronidasa o factor de difusión del Prof. DURÁN REYNALS, al que nos habíamos referido anteriormente en este mismo lugar, aumenta la permeabilidad del tejido conectivo por hidrolizar el ácido hialurónico, mejorando la difusión de los fármacos que se administran con el enzima. Se emplea asociada a la hormona adrenocorticotrópica ACTH y los corticoides y, si hay que recurrir a la vía intramuscular, con anestésicos locales y la penicilina.

Los efectos secundarios de este antibiótico pueden contrarrestarse con la penicilinasa, enzima de considerable especificidad que lo escinde por hidrólisis, liberando ácido peniciloico, de anillo lactámico abierto, sin actividad alergénica.

Son interesantes los resultados que se van registrando con el empleo de la hepatocatalasa, enzima de acción peroxidásica y, al parecer, colesterolítica, en el tratamiento de la arteriosclerosis por reducir el nivel hemático del colesterol —además de tanta significación en dolencias digestivas y de tipo dermatológico— aun cuando algunos bioquímicos atribuyen esta acción a interferir los sistemas enzimáticos responsables de la biosíntesis del esteroide. También se manifiesta de interés la catalasa en el tratamiento de la gota por suponérsele actividad uricolítica.

Hace ya años se utiliza la cocarboxilasa, coenzima fundamental en el metabolismo del ácido pirúvico y otros oxoácidos del ciclo de Krebs que juegan papel importantísimo en el coma diabético, descompensaciones cardíacas, neuritis y polineuritis, consecuencias todas de la disfunción metabólica de los glucidos.

Son también conocidos los efectos de la nicotinamida, parte esencial de la molécula de las coleshigogenas, de las riboflavinas (Vitamina B₂) que actúan como coenzimas de las oxidases flavin-enzimáticas, del ácido tetrahidro-

fólico y de la cianocobalamina, coenzimas del metabolismo monocarbonado y es de esperar la aplicación terapéutica de otros cofactores como el fosfato de piridoxal y el coenzima A de la activación de los ácidos grasos.

La última parte del discurso del Prof. CALVET PRATS sobre la formación de compuestos poco solubles, que ya hemos comentado, es de interés excepcional por descubrir nuevos horizontes al campo enzimoterápico que nos recuerdan los que aparecieron con el descubrimiento de las insulinas retardadas. Confiamos, esperanzados, teniendo siempre en cuenta que los preparados enzimáticos, como proteínas extrañas al organismo, pueden actuar como alergenos, que las nuevas formas de administración prolongada propuestas por el recipiendario contribuyan al porvenir de los métodos enzimoterápicos cuyo estudio deseamos prosiga en el seno de nuestra Corporación para beneficio de la humanidad doliente. ¡Bienvenido FERNANDO CALVET PRATS!

He dicho.

PUBLICACIONES ORIGINALES

DEL

DR. FERNANDO CALVET

- 1 — The Condensation of p-Hydroxybenzoic Acid with Chloral, Journal of Chemical Society, London, 1927.
- 2 — La condensación del ácido p-hidroxibenzoico con el cloral. Ann. R. Soc. Española Fís. Quím., Madrid, 1927.
- 3 — Las reacciones de condensación del cloral con los fenoles substituidos, Ann. R. Soc. Española Fís. Quím., 1927.
- 4 — La condensación del cloral con la 2,6-diclorohidroquinona, con el ácido anísico y con el p-nitroanisol, Ann. R. Soc. Española Fís. Quím., 1928.
- 5 — La obtención de la 1,3 benzodioxina, Ann. R. Soc. Española Fís. Quím., (1928).
- 6 — Una nueva reacción de condensación entre fenoles y aldehidos, Tesis doctoral, Madrid, 1928.
- 7 — The Condensation of Chloral with Substituted Phenols, Journ. Chem. Soc., 1928.
- 8 — The Condensation of Chloral with Anisic Acid, with p-Nitroanisol and with 2,6-Dichloroquinol, Jour. Chem. Soc., 1928.
- 9 — Estudios sobre los α - y β -difenilindenos, Ann. Soc. Española Fís. Quím., 1929.
- 10 — Zur Kenntnis der typischen Farbreaktionen in der Gruppe der Strychnos Alkaloide, Ueber Strychnos Alkaloide VI, Liebigs Annalen, 1931.
- 11 — Die Methylierung der Vomicinsäure, Ueber Strychnos Alkaloide, VII, Liebigs Annalen, 1931.
- 12 — Contribución al esclarecimiento de las acciones coloreadas típicas de los alcaloides del Strychnos, Ann. R. Soc. Española Fís. Quím., 1932.
- 13 — La metilación del ácido vomicínico y descripción de algunos derivados de la vomicina. (Los alcaloides del Strychnos VII), Ann. R. Soc. Española Fís. Quím., 1932.
- 14 — Las dioxinas 1,3. II. Propiedades y derivados de la benzo-1,3-dioxina, Ann. R. Soc. Española Fís. Quím., 1932.
- 15 — Las dioxinas 1,3. III. La condensación del p-nitroanisol con el formaldehido y el mecanismo de formación de la 6-nitrobenzo-1,3-dioxina, Ann. R. Soc. Española Fís. Quím., 1932.
- 16 — Aportaciones al semimicrométodo de análisis elemental orgánico de Surcharda y Bobranski, Ann. R. Soc. Española Fís. Quím. 1932.
- 17 — La nitración del 2,2'-dioxidifenilo. Descripción de un nuevo derivado dinitrado, Ann. R. Soc. Española Fís. Quím., 1963.

- 18 — Las dioxinas I-3. IV. La condensación del 3,3'-, 3,5'- y 5,5'- dinitro-2,2'-dioxidoftenilo con el formaldehido, Ann. R. Soc. Española Fis. Quím., 1933.
- 19 — Sobre la preparación del 2,7-diaminofluoreno y alguna aplicación analítica del mismo, Ann. R. Soc. Española Fis. Quím., 1934.
- 20 — Las dioxinas I-3. V. La obtención de la α - β nafto-1,3-dioxina y su estudio comparado con el éter metilénico cíclico del peridioxinaftaleno, Ann. R. Soc. Española Fis. Quím., 1934.
- 21 — Las dioxinas I-3. VI. La condensación del ácido p-hidroxibenzoico con el formaldehido a baja temperatura, Ann. R. Soc. Española Fis. Quím., 1934.
- 22 — La transformación de los aceites de pescado en aceites lubricantes. Discurso Inaugural, Universidad de Santiago, 1934.
- 23 — La nitración del 1,8-dihidroxinaftaleno, Boletín Universidad de Santiago, 1935.
- 24 — Traducción española de la obra inglesa, Barger, Organic Chemistry for Students of Medicine, Ed. Bosch, Barcelona, 1935.
- 25 — The Condensation of Chloral with Salycilic Acid, Journ. Chem. Soc., 1936.
- 26 — The Nitration of 1,8-Dihydroxynaphthalene, Journ. Chem. Soc., 1936.
- 26 — Zur Kenntnis des Gleichgewichtes Cozymase-Dihydrocozymase, Arkiv för Kemi, Stockholm, 1937.
- 28 — Zur Kenntnis der Glycerinaldehyd-Hemmung des glykolitischen Kohlenhydrateabbaues, Zeit. Physiol. Chem., 1937.
- 29 — Phosphorylierung und Oxidorreduktion beim Glucosabbau im Gehirn. Naturwissenschaften, 1937.
- 30 — Contribución a la farmacología de las insulinas retardadas, Rev. Clínica Española, 1941.
- 31 — La investigación farmacológica de la ergometrina, Rev. Clin. Esp., 1943.
- 32 — La presencia de una nueva proteinasa de origen pancreático en muestras comerciales de insulina. Discurso Inaugural, Universidad de Salamanca, 1946.
- 32 — Electron optical observations on chromosome structure in resting cells, Nature, 1948.
- 34 — Specific activity of P³² in cell constituents of rabbit liver, Journal of Cell and Comp. Physiol., 1949.
- 35 — Acerca de la síntesis del di-ioduro de decacetonio, Ann. R. Soc. Española Fis. Quím., 1951.
- 36 — Antihistamínicos bromados: Obtención de la N'-fenil-N'-p-bromobencil-, de la N'-p-bromofenil-N'-bencil-, y de la N'-p-bromofenil-N'-p-bromobencil-N,N-dimetil-ctilenodiamina, Ann. R. Soc. Española Fis. Quím., 1952.
- 37 — El carbono radioactivo ¹⁴ en la datación de objetos arqueológicos, Ampurias, 1952.
- 38 — La estructura químico-física de las substancias medicamentosas y su acción terapéutica, Conferencia en la Facultad de Medicina, Avances en Terapéutica, Barcelona, 1954.
- 39 — Determinación colorimétrica de actividades trípticas empleando azoproteínas solubles como substrato, Comunicación al Congreso de Química Industrial, 1955, Barcelona.
- 40 — Relaciones entre las actividades antiflogísticas de algunas drogas y su acción inhibidora de la tripsina, Congreso Química Industrial, Barcelona, 1955.
- 41 — Activation de la digestion tryptique de la caseine par le peroxyde d'hydrogène, Arch. Internat. Pharmacodyn. et Therap., Bruselas, 1955.
- 42 — Determinación de actividades ribonucleásicas por el método de difusión en placas de agar, Revista Española de Fisiología, 1955.
- 43 — Variaciones normales de la catalasa hepática en el ratón, ciclo nictaminal, III Reunión Soc. Esp. Ciencias Fisiológicas, Barcelona, 1955.
- 44 — Determinación de la hepatocatalana y crítica de los métodos, III Reunión Ciencias Fisiológicas, Barcelona, 1955.
- 45 — Acción esterásica de la quimotripsina. I. Sobre ésteres fenilacéticos. III Reunión Ciencias Fisiol., 1955.
- 46 — Acción esterásica de la quimotripsina. II. Sobre ésteres pirrol propiónicos y amigdalicos, III Reunión Soc. Esp. Cien. Fisiol., 1955.
- 47 — Acción potenciadora sobre la adrenalina de diversas substancias psiconactivas, III Reunión Soc. Esp. Cienc. Fisiol., 1955.
- 48 — Die Potenzierende Wirkung verschiedener psychoaktiven Substanzen auf Adrenalin und Serotonin, Arzneimittelforschung, 1956.
- 49 — Bioquímica para médicos, químicos y farmacéuticos, 1 Tomo de 450 páginas, Editorial Alhambra, Madrid, 1956, 2.^a Ed. 500 pp., 1961.
- 50 — Constitución química general de los enzimas, Conferencia en la Facultad de Medicina, Curso monográfico sobre Enzimoterapia, Monografías de Terapéutica, Ed. Paz-Montalvo, 1957.
- 51 — Las actividades esterásica y amidásica de la α -quimotripsina sobre substratos bifuncionales sintéticos, Ann. R. Soc. Española Fis. Quím., 1957.
- 52 — Título como el anterior, Tesis doctoral de Alfonso M. Carol, dirigida por el autor, Secretaría de Publicaciones, Universidad de Barcelona, 1957.
- 53 — Las acciones inhibidoras de algunas substancias sobre la hidrólisis tríptica. Discusión y selección de un método adecuado para el estudio de aquéllas. Tesis doctoral de Jorge Bozal, dirigida por el autor, Secretaría de publicaciones, Universidad de Barcelona, 1958.
- 54 — Inhibition of Tryptic Digestion by Certain Drugs, Rev. Esp. Fisiol. 1958. Trabajo presentado al IV Congreso Internacional de Bioquímica, Viena, Septiembre, 1958.
- 55 — Las acciones inhibidoras de la digestión tríptica realizadas por ciertas drogas, Ann. R. Soc. Española Fis. Quím., 1959.
- 56 — Acciones inhibidoras de algunas substancias sobre la digestión α -quimotriptica, Trabajo presentado a las V Jornadas Bioquímicas Latinas, Barcelona, Rev. Esp. Fisiol., 1960, Anales 1960.
- 57 — Ribonucleasas vegetales: extracción y purificación de las presentes en la alfalfa y en el barsim, V. Jornadas Bioquímicas Latinas 1960, Ann. R. Soc. Española Fis. Quím., 1961.

- 58 — Potenciación por el peróxido de hidrógeno de las acciones proteolíticas de la tripsina y de la α -quimotripsina, V Jornadas Bioquím. Lat. 1960, Ann. R. Soc. Española Fís. Quím 1960.
- 59 — Influencias inhibidoras de ciertas drogas en la hidrólisis proteolítica de la p-nitrofenil-azocaseína, V Jornadas Bioquím. Lat. 1960, Ann. R. Soc. Española Fís. Quím., 1962.
- 60 — Sobre la actividad desmolásica de la tripsina, V Jornadas Bioquím. Lat. 1960, Ann. R. Soc. Española Fís. Quím, 1962
- 61 — Sobre la actividad desmolásica de la α -quimotripsina, Ann. R. Soc. Española Fís. Quím., 1962.
- 62 — Acción del dodecilsulfato sódico sobre el sistema tripsina-caseína, Ann. R. Soc. Española Fís., Quím. (en prensa).