

12. Fernández, F., Rapado, A. y De la Barreda, P.: Consideraciones sobre síndrome de Martorell. *Rev Clin Esp* 117: 331-338, 1970.

13. Danaraj, T. J., Wong, H. O. y Thomas, M. A.: Primary arteritis of aorta causing renal artery stenosis and hypertension. *Brit Heart J* 25: 153-165, 1963.

## TRIPSINA, ALFA-QUIMOTRIPSINA Y CARBOXIPEPTIDASA EN EL JUGO INTESTINAL DE PACIENTES DESNUTRIDOS<sup>1,2</sup>

Erland C. Gjessing, Ph. D.<sup>3</sup> y Luis G. Mayoral, M. D., M. S.<sup>4</sup>

### EXTRACTO

Se determinaron las concentraciones de tripsina, quimotripsina y carboxipeptidasa-A en muestras de jugo intestinal de pacientes desnutridos antes y después de repleción proteica, así como en pacientes controles normalmente nutridos. Las concentraciones de quimotripsina y carboxipeptidasa-A se hallaron reducidas en los pacientes al compararlos con los controles. Se encontró una correlación estrecha concentraciones de tripsina y quimotripsina en las muestras tanto de pacientes como de controles. La relación tripsina/quimotripsina fue menor en los controles que en los pacientes durante la dieta basal. Se encontró una correlación negativa entre los niveles de albúmina, proteína, colesterol séricos, hemoglobina y coeficiente de creatinina con la relación tripsina/quimotripsina. Finalmente, las concentraciones de tripsina y quimotripsina en los controles fueron inferiores a las descritas de controles en otros países.

### INTRODUCCION

Son pocos los estudios hechos en pacientes desnutridos respecto a la capacidad secretora del páncreas exocrino para producir enzimas proteolíticas. En algunos de los estudios publicados<sup>1-3</sup> se emplearon sustratos no específicos, que no distinguían entre las diferentes enzimas proteolíticas elaboradas por el páncreas. Sólo una investigación en niños con desnutrición proteico-calórica en Africa del Sur<sup>3</sup>, empleó sustratos específicos para 2 de las enzimas, tripsina y quimotripsina.

En el presente trabajo se informan las concentraciones en el jugo intestinal de las 3 enzimas proteolíticas pancreáticas, tripsina, quimotripsina y carboxipeptidasa-A, empleando

sustratos altamente específicos. Los pacientes eran adultos desnutridos hospitalizados en la Unidad Metabólica del Hospital Universitario del Valle (HUV), en quienes se llevaron a cabo análisis de concentraciones enzimáticas en los jugos intestinales antes y después de repleción proteica, así como en los controles.

En el presente trabajo no se intentó obtener datos sobre secreción total de enzimas, lo que hubiera implicado mediciones difíciles y poco fidedignas de volumen de secreción y concentraciones en ella de las enzimas.

### PACIENTES Y METODOS

**Pacientes:** Se investigaron 14 adultos con desnutrición proteica primaria severa, como se ha definido en comunicaciones anteriores<sup>4,5</sup>. Tras su hospitalización recibieron una dieta basal con contenido de 20 g de proteína por 24 horas, similar a la dieta habitual en su casa, por períodos que oscilaron entre 2 y 4 semanas. Después de las observaciones basales se les suministró una dieta de repleción proteica (100 g de proteína por 24 horas) por períodos de 2-3 meses, hasta lograr una recuperación nutricional comprobada. Las muestras de jugo intestinal se tomaron inicialmente, en el estado de desnutrición en que llegaban los pacientes y luego al final del período de recuperación nutricional, cuando ésta se había comprobado clínica y bioquímicamente. El contenido de la dieta y los métodos para las evaluaciones clínicas y bioquímicas se han descrito en otras comunicaciones<sup>4,5</sup>. El grupo control se constituyó con 7 adultos bien nutridos. Tanto los 14 pacientes como los 7 controles procedían del área rural, siendo la mayoría trabajadores del campo.

**Métodos:** Las muestras del jugo intestinal se aspiraron per-oralmente tras un ayuno nocturno. La localización del tubo que permitía la colección de jugo intestinal se verificó radiológicamente en cada caso. Se obtuvo la mayoría de las muestras de las primeras asas yeyunales, pero unas pocas procedían del duodeno. Se midió pH de todas las muestras inmediatamente después de su obtención y osciló entre 5.5 y 7.2. Luego las muestras se almacenaron a -20°C hasta el momento del análisis enzimático, pero algunas se estudiaron inmediatamente después de su colección.

Las actividades enzimáticas se determinaron en un pH-Stat (titulador automático) de la Radiometer Corp, equipado con microelectrodos, siguiendo el método descrito por

1. Investigación auspiciada por la División de Salud de la Universidad del Valle, el Centro Internacional de Investigaciones Médicas (CIDEIM), Cali, Colombia y las donaciones 9R07-TW00103 y 5R22-AM15242-02-04 de los Institutos Nacionales de Salud de los Estados Unidos.
2. Trabajo llevado a cabo (1973-1975) en la Unidad Metabólica del Hospital Universitario del Valle, HUV.
3. Profesor de Bioquímica, Universidad de Tulane.
4. Profesor, Departamento de Medicina Interna, División de Salud, Universidad del Valle, Cali, Colombia.

Neuras y Schwerz<sup>6,7</sup>. Los sustratos\* y las enzimas cristalinas que se emplearon como estándares se adquirieron de la Sygma Chemical Corp. y de la Nutritional Biochemical Corporation.

Se prepararon soluciones acuosas estandar de HPLA y de TAME\*. Debido a la escasa solubilidad de ATEE\* en agua, las soluciones de este sustrato se hicieron en metanol al 7.5% con una concentración de ATEE igual a 0.015. Todas las soluciones fueron ajustadas a un pH en 7.5 y mantenidas a una temperatura de 3°C, a la cual permanecieron estables. Para los 3 tipos de mediciones, el volumen de la mezcla de reacción fue 3.0 ml; el pH de la reacción fue 7.5; la temperatura de 37°C y se empleó como titulador el hidróxido de sodio NaOH 0.0234 M. Las condiciones finales en las mezclas de reacción fueron como sigue: HPLA, 0.004 M; TAME, 0.01 M y 0.01 M de cloruro de calcio CaCl<sub>2</sub>; ATEE, 0.01 M y 0.01 M de CaCl<sub>2</sub> y 5% metanol. Las actividades se calcularon empleando las tasas iniciales (0-2 minutos). Para calcular las cantidades de quimotripsina y tripsina en 1 ml de los jugos intestinales se prepararon soluciones cristalinas patrón de estas 2 enzimas en HCl 0.005 normal y se construyeron curvas de

Loz zimógenos para estas 3 enzimas en los jugos intestinales estudiados parecieron estar completamente activados. No hubo ninguna evidencia durante las mediciones de muestras llevadas a cabo en diferentes momentos y almacenadas a temperatura ambiente, de que los zimógenos no hubieran estado completamente activados. Debido a las diferencias en la variancia, y al número de sujetos en la comparación de pacientes y controles, la parte estadística ha sido expresada como diferencia de promedios ( $\pm 95\%$ , límite de confianza) según Blitz<sup>9</sup>.

## RESULTADOS

Se encontraron grandes variaciones en las concentraciones de las 3 enzimas proteolíticas determinadas tanto en los pacientes antes y después de repleción proteica, como en los controles. Los promedios y rangos aparecen en el Cuadro 1. El análisis estadístico indica que las concentraciones de quimotripsina y carboxipeptidasa-A fueron significativamente mayores en los controles que en los pacientes cuando estaban recibiendo una dieta basal.

Más significante que la concentración de enzimas es la rela-

**Cuadro 1. Concentración en ug/ml de Enzimas Pancreáticas en Jugos Intestinales de Pacientes y Controles (Unidad Metabólica, HUV, Cali)**

	Tripsina			Quimotripsina			Carboxipeptidasa-A		
	Promedio	Rango	N	Promedio	Rango	N	Promedio	Rango	N
D <sup>a</sup> - B	126	6-564	(14)	84	3-272	(14)	123	8-363	(14)
D - R	88	11-260	(10)	153	4-652	(11)	181	30-387	(10)
Controles	171	15-625	(7)	249	72-613	(7)	509	147-1600	(7)

a D - B = dieta basal, D - R = dieta de repleción

Diferencia entre controles y dieta basal  $\pm 95\%$  límite de confianza: para quimotripsina  $165 \pm 131$ , carboxipeptidasa-A  $386 \pm 325$ .

calibración para tripsina y quimotripsina empleando las condiciones de ensayo descritas arriba. Las soluciones de carboxipeptidasa cristalina obtenidas en los Estados Unidos fueron poco satisfactorias como modelo, pues se observó que tenían actividades bajas si se las comparaba con los datos que aparecen en algunas publicaciones de la literatura. Para determinar las concentraciones de carboxipeptidasa en los jugos intestinales se emplearon los resultados publicados por Whittaker et al.<sup>8</sup> para la enzima cristalina. Las actividades específicas pudieron calcularse de estos datos porque las condiciones de las mezclas de reacción fueron iguales a las que se describen en esta experiencia, así como las concentraciones de carboxipeptidasa-A cuantificada en las muestras aspiradas del intestino.

ción hallada en las muestras individuales entre tripsina y quimotripsina. Se observó una correlación significativa entre las concentraciones de estas 2 enzimas en ambos grupos de pacientes y de controles como se presenta en el Cuadro 2. Sin embargo, no se encontró esta correlación para la carboxipeptidasa-A respecto a tripsina y quimotripsina. Los pro-

**Cuadro 2. Coeficiente de Correlación entre Concentraciones de Quimotripsina (Y) y Tripsina (X) en Jugos Intestinales de Pacientes y Controles (Unidad Metabólica, HUV, Cali)**

	r	Inclinación <sup>a</sup>	P
D - B	.86	.46	>0.01
D - R	.67	1.58	>0.05
Control	.87	.87	>0.01

<sup>a</sup> Regresión lineal

\* Los sustratos empleados, con sus respectivas abreviaciones, fueron los siguientes: Etil éster de la N-acetil-N-tirosina (ATEE), para la alfaquimotripsina. Metil éster de p-tosil-L-arginina (TAME), para la tripsina. Acido hipuril-D, L-fenilacetico (HPLA) para la carboxipeptidasa-A.

**Cuadro 3. Relación de Concentraciones de Enzimas Pancreáticas en Jugos Intestinales de Pacientes y Controles (Unidad Metabólica, HUV, Cali)**

	Tripsina/Quimotripsina			Tripsina/Quimotripsina-A		
	Promedio	Rango	N	Promedio	Rango	N
D - B	1.50 <sup>a</sup>	.63-2.38	14	1.21	.30-3.70	14
D - R	1.06	.21-3.03	11	0.74	.07-3.13	11
Control	0.69	.28-1.04	7	0.51	.07-1.85	7

<sup>a</sup> Diferencia entre promedio  $\pm$  95% límite de confianza para D-B y control (tripsina/quimotripsina) solamente .81  $\pm$  .54

medios y rangos de las relaciones para los pacientes antes y después, y para los controles aparecen en el Cuadro 3. La relación para el grupo control es menor que la de ambos grupos de pacientes (antes y después de repleción) y es significativamente diferente de la obtención durante la dieta basal para la relación tripsina/quimotripsina.

Se llevaron a cabo en forma rutinaria 5 determinaciones de laboratorio en el suero de estos pacientes, a saber, albúminas, proteínas, colesterol, hemoglobina y coeficiente de creatinina. Se conoce como coeficiente de creatinina el número de miligramos de nitrógeno de creatinina (más creatina) excretado por kg de peso en 24 horas. Todas mostraron valores de correlación negativos en respecto a la relación tripsina/quimotripsina.

Con excepción de los valores de hemoglobina, los valores "r" fueron significantes (t menor de 0.05). Las Figuras 1 y 2 muestran la proporción inversa entre la relación enzimática y la albúmina sérica, y entre la relación enzimática y el coeficiente de creatinina, respectivamente.

El Cuadro 4 ofrece algunos datos de la literatura compilados de trabajos en sujetos controles, de países no tropicales que pueden compararse con los resultados del grupo de controles colombianos. No se hallaron datos en la literatura para comparar con los resultados en carboxipeptidasa-A que aquí se informan.

## DISCUSION

Las muestras de jugo intestinal que se examinaron en este estudio eran muestras basales recolectadas tras una noche de ayuno. No hay datos en la literatura sobre el análisis de enzimas proteolíticas en el jugo intestinal en muestras basales de sujetos controles, porque la mayoría de estudios se han efectuado tras estimulación del páncreas con secretina o pancreozimina, o ambas. La hormona secretina es una potente estimuladora de la secreción de agua y electrolitos, y relativamente posee escaso efecto sobre la secreción de enzimas y proteínas, mientras que la pancreozimina afecta directamente la producción de las enzimas pancreáticas. En otros estudios se han hecho análisis de los contenidos intestinales tras comida de prueba de composición variable. Los datos recopilados en el Cuadro 4 indican que en Colombia la concentración promedio de tripsina y quimotripsina en los jugos intestinales de controles está por debajo de los valores para las mismas concentraciones en países no tropicales.

Golderbg y Wormsley<sup>10</sup> en Inglaterra, hallaron que la relación de las concentraciones de tripsina y quimotripsina en los aspirados duodenales era independiente del tipo de estímulo o de las características del páncreas. También encontraron una buena correlación entre las concentraciones de tripsina y quimotripsina e informaron relaciones de 1.5 a 3.0 en sujetos con páncreas normales estimulados por in-

**Cuadro 4. Datos de la Literatura para Concentraciones de Tripsina y Quimotripsina (ug/ml) en Jugos Intestinales de Adultos Controles**

Localización	Estímulo	Tripsina		Quimotripsina		Referencias
		Promedio	Rango	Promedio	Rango	
Yeyuno	Ninguno	171	(15-625)	249	(72-613)	
Conducto pancreático	Ninguno	245	(234-257)	—	—	(11)
Duodeno	Ninguno	391	(289-492)	674	(648-699)	(12)
Duodeno y yeyuno	Comida prueba	310	(161-612)	—	—	(13)
Yeyuno proximal	Comida prueba	318	(120-670)	490	(225-840)	(14)
Duodeno	Secretina	725	(304-1565)	373	(130-1043)	(10)

<sup>a</sup> Demasiado bajo para 20-45% debido a inhibidores pancreáticos, según los autores.

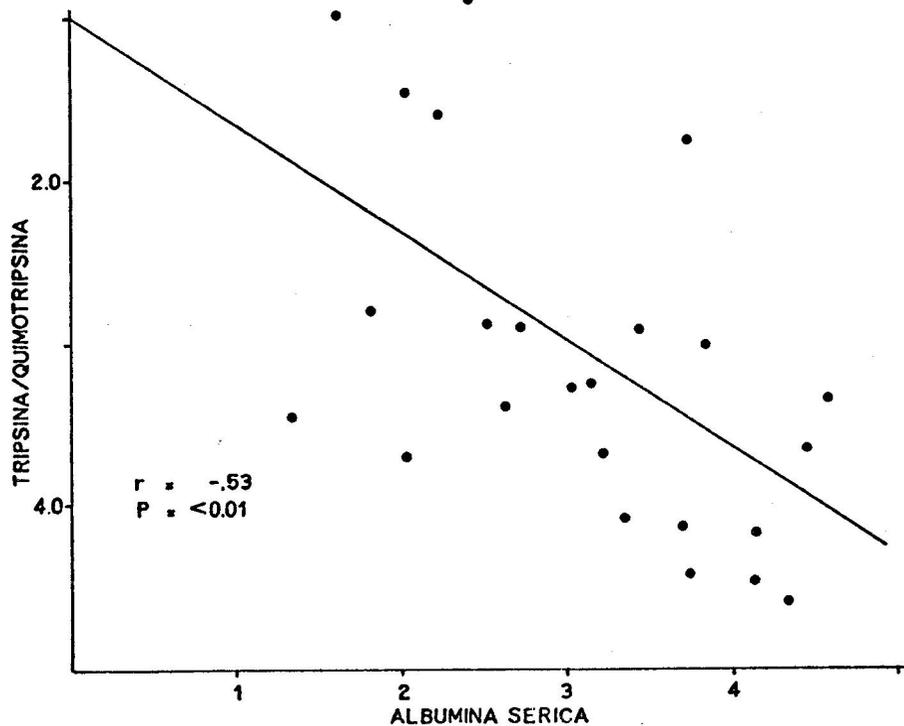


Figura 1. Correlación entre la relación tripsina-quimotripsina con los niveles de albúmina sérica, calculada por mínimos cuadrados. (Datos de pacientes y controles).

fusiones endovenosas de secretina sola, o de secretina más pancreozimina. En el presente estudio también se halló una buena correlación entre las concentraciones de este par de enzimas; sin embargo la relación promedio para los controles fue menor que 1 y para los pacientes, de 1.0 a 1.5 Cuadro 3. Una revisión de la literatura, y un análisis de los datos de otros investigadores<sup>11-14</sup> muestran que la relación tripsina/quimotripsina está por debajo de 1.5, y en muchos casos por debajo de 1.0, en sujetos controles.

Tandon et al.<sup>2</sup> hicieron un estudio en adultos con desnutrición protéico-calórica donde se empleó caseína como sustrato para determinar la actividad proteolítica de los jugos duodenales. Hallaron una actividad proteolítica total reducida en los pacientes al compararlos con controles y con pacientes tras la recuperación con una dieta alta en proteína por 12-14 semanas. La diferencia se encontró tanto en las muestras basales como en las muestras recolectadas después de administrar secretina y pancreozimina.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo parecen guardar relación con los estudios de Barbezant y Hanzen<sup>3</sup> en niños con desnutrición proteico-calórica en Africa del Sur, se analizaron muestras tanto basales como tras estimulación en pacientes con marasmo, en pacientes con Kwashiorkor, y en controles normales. Se halló que tanto la tripsina como la quimotripsina estaban reducidas cuando se compararon los valores de los pacientes con las de los

controles o con los valores en los mismos pacientes después de recuperación nutricional. La enzima menos afectada por la desnutrición proteico-calórica fue la tripsina, mientras que la quimotripsina mostró grandes variaciones y en algunos pacientes su concentración fue tan baja que no se pudo medir. La relación tripsina/quimotripsina en los pacientes oscila entre 3.0 y 7.0 mientras que en los controles y en los pacientes recuperados las relaciones en todos los casos, con una excepción, fueron menores que 1.0. Los resultados en el estudio presente parecen mostrar la misma tendencia que los de Barbezant y Hanzen<sup>3</sup>. De las 2 enzimas tripsina y quimotripsina, la última parece alterarse en un grado mayor por los estados de desnutrición, como reflejan las relaciones estudiadas (Cuadro 1 y Figuras 1 y 2). La determinación de carboxipeptidasa-A sugiere que esta enzima sufre aún mayores cambios que la quimotripsina en la desnutrición proteica severa.

#### SUMMARY

Trypsin, chymotrypsin and carboxypeptidase-A were determined in intestinal aspirates of severely protein malnourished patients before and after protein repletion, as well as in control patients. The concentrations of chymotrypsin and carboxypeptidase-A were reduced in the patients as compared to controls. Both in patients and in controls there was a high correlation between trypsin

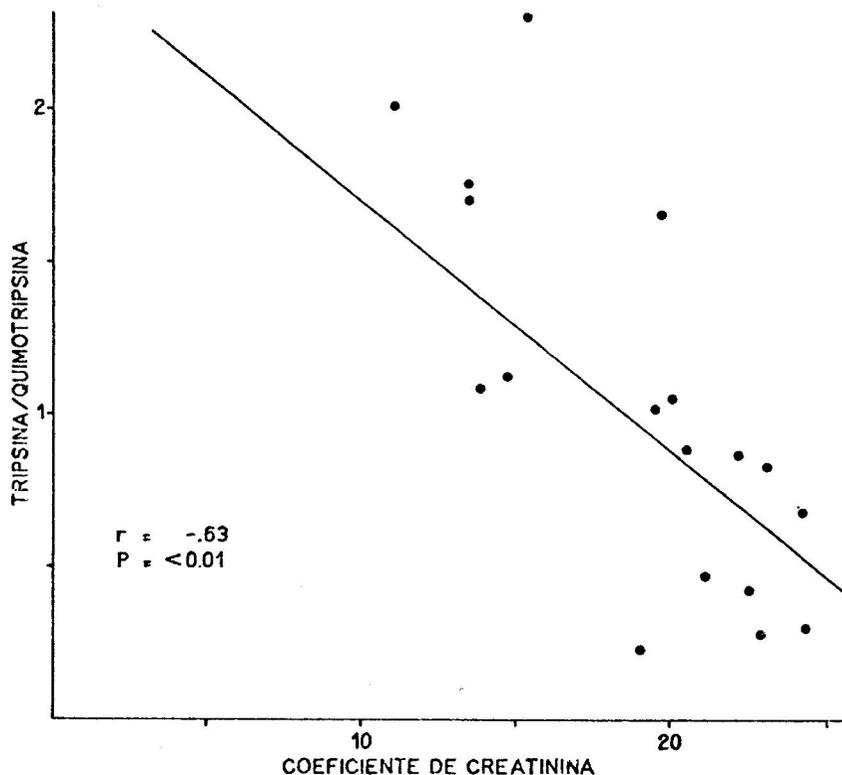


Figura 2. Correlación entre la relación tripsina-quimotripsina y el coeficiente de creatinina, calculada por mínimos cuadrados. (Datos de pacientes y controles)

and chymotrypsin. The ratio trypsin/chymotrypsin was less in the controls as compared to patients in the malnourished state. Serum albumin, serum protein, serum cholesterol, serum hemoglobin as well as the creatinine coefficient all had a negative correlation coefficient with respect to the trypsin/chymotrypsin ratio. Concentrations of trypsin and chymotrypsin in the controls were less than those reported from other countries.

#### REFERENCIAS:

- Gómez, F., Galván, R. R., Gravioto, J. y Frenk, S.: Enzymatic activity of the duodenal contents in children affected with third degree malnutrition. *Pediatrics* 13: 548-552, 1954.
- Tandon, B. M., Banks, P. A., Sma, S. K., Ramachandra, K. y Ganchi, P. C.: Recovery of exocrine pancreatic function in adult protein-calorie malnutrition. *Gastroenterology* 58: 358-362, 1970.
- Barbezat, G. O. y Hansen, J. D. L.: The exocrine pancreas and protein-calorie malnutrition. *Pediatrics* 42: 77-92, 1968.
- Mayoral, L. G., Tripathi, K., García, F. T., Bolaños, O., Klahr, S., y Ghitis, J.: Malabsorption in the tropics: a second look. I The role of protein malnutrition. *Amer J Clin Nutr* 20: 866-883, 1967.
- Mayoral, L. G., Bolaños, O., Lotero, H. y Duque, E.: Enteropathy in adult protein malnutrition: a review of the Cali experience. *Amer J Clin Nutr* 28: 894-900, 1975.
- Schwert, G. W., Neurath, H., Kaufman, S. y Snoko, J. E.: The specific esterase activity of trypsin. *J Biol Chem* 172: 221. 1948.
- Neurath, H. y Schwert, G.: Mode of action of crystalline pancreatic proteolytic enzymes. *Chem Rev* 46: 69-153, 1960.
- Whitaker, J. R., Menger, F., y Bender, M. L.: The kinetics of some carboxypeptidase-A and acetyl-carboxypeptidase-A catalyzed hydrolyses. *Biochemistry* 5: 386-392, 1966.
- Bliss, C. I.: *Statistics in Biology*. McGraw-Hill Book Company, New York, 1967. Vol. 1, 215.
- Golberg, D. M. y Wormsley, K. G.: The interrelationships of pancreatic enzymes in human duodenal aspirate. *Gut* 11: 859-866, 1970.
- Haverback, B. J., Dyce, B., Bundy, H. y Edmondson, H. A.: Trypsin, trypsinogen and trypsin inhibitor in human pancreatic juice. *Amer J Med* 29: 424-433, 1960.
- Townes, P. L.: Trypsinogen deficiency disease. *J Pediat* 66: 275-285, 1965.
- Lundh, G.: Pancreatic exocrine function in neoplastic and neoplastic and inflammatory disease; a simple and reliable new test. *Gastroenterology* 42: 275-280, 1962.
- Borgstrom, B. A., Dahlqvist, A., Lundh, G. y Sjoval, J.: Studies of intestinal digestion and absorption in the human. *J Clin Invest* 36: 1521-1536, 1957.