

Actividad proteolítica y proteasas gástricas en ratas tratadas con clorpromacina

Por los Dres.:

TROADIO L. GONZALEZ PEREZ,⁸ JORGE FERNANDEZ COSTA,⁹ ELSI PEREZ MARTINEZ¹⁰ y la Téc.
MARIA ELENA IDUATE CALVERA¹¹

González Pérez, T. L. y otros. *Actividad proteolítica y proteasas gástricas en ratas tratadas con clorpromacina*. Rev Cub Med 17: 1, 1978.

Se plantea que la administración de clorpromacina a ratas albinas machos, por vía intramuscular, en dosis de 10 mg por kg de peso corporal, durante veinte días, no cambia en forma importante el perfil de la curva de actividad proteolítica obtenida en homogeneizados de mucosa gástrica, aunque sí se observa un estrechamiento y un aumento de su amplitud. La actividad proteolítica gástrica total, reflejada por el valor del área debajo de la curva de actividad proteolítica, se incrementa en forma significativa con la administración del fármaco. La enzimoforesis de homogeneizados de mucosa gástrica demuestra, que todas las fracciones de pepsina acentúan su intensidad.

INTRODUCCION

La adición de clorpromacina, derivado fenotiacínico, al baño de incubación de una muestra de intestino delgado cuando tiene lugar la absorción de glucosa, trae como consecuencia una sensible disminución de la intensidad de la misma [Campos, 1972].¹ Asimismo Radwan y West (1971)- demostraron que la clorpromacina inhibe la descarboxilasa de histidina (inespecífica) de la región pilórica de estómago. Hano y Bugajsky (1969)¹ encontraron que cuando inyectaban clorpromacina se producía una disminución

significativa del ácido clorhídrico presente en el jugo gástrico de la rata, así como de la actividad proteolítica del mismo.

González y Fernández (1976)⁴ encontraron en estudios de pilotaje realizados por ellos, que administrando clorpromacina por vía intramuscular a ratas, se provocaba un incremento significativo del valor promedio del área por debajo de la curva de actividad proteolítica, determinada esta última en homogeneizados de mucosa gástrica. Está demostrado que la clorpromacina posee propiedades anestésicas locales siendo este efecto consecuencia de una acción estabilizadora de la misma sobre la membrana celular [García 1976].⁵

Hipótesis de trabajo y objetivos

Teniendo en cuenta lo expuesto anteriormente, se pensó en la posibilidad de que la clorpromacina interfiera los mecanismos

⁸ Profesor auxiliar de fisiología humana normal del centro de ciencias básicas "Victoria de Girón". ISCMH.

⁹ Profesor titular de fisiología humana normal del centro de ciencias básicas "Victoria de Girón". ISCMH.

¹⁰ Profesora asistente de fisiología humana normal del centro de ciencias básicas "Victoria de Girón". ISCMH.

¹¹ Técnica de laboratorio de investigación de fisiología humana normal del centro de ciencias básicas "Victoria de Girón". ISCMH.

mediante los cuales el producto del trabajo biológico de síntesis de las células principales: el pepsinógeno, se secreta (exocitosis) hacia el conducto excretor de las glándulas gástricas, lo cual daría lugar a un acumulo del mismo en el citoplasma celular, lo que se reflejaría por un incremento de la amplitud de la curva de actividad proteolítica sin modificaciones importantes de su perfil. En la enzimoforesis, tal situación se reflejaría por un incremento o acentuación de las manchas correspondientes a las distintas fracciones de pepsinas.

Otra alternativa podría ser la de un incremento de la síntesis enzimática con una población de células principales normal, o la situación inversa: síntesis proteica normal con un incremento de la población de células principales.

El objetivo de este trabajo fue estudiar los efectos sobre la actividad proteolítica de homogeneizados de mucosa gástrica y sobre el comportamiento enzimofórico también de homogeneizados de mucosa gástrica en ratas tratadas con clorpromacina.

MATERIAL Y METODO

Se emplearon un total de 10 ratas albinas machos, de la variedad *Wistar*, de peso comprendido entre 240 y 250 g, a las cuales se les administró clorpromacina a razón de 10 mg por kg de peso corporal, por vía intramuscular, hasta completar 20 dosis en días consecutivos. Estos animales tuvieron libre acceso al agua y a los alimentos. El grupo control fue de 10 animales sometidos al mismo régimen de vida, manipulación y alimentación que los animales experimentales, de los cuales sólo se diferenciaron en que no recibieron la administración de clorpromacina.

Una vez concluida la administración de clorpromacina, se procedió al sacrificio de los animales, procurándose primero un sueño anestésico con la administración de fenobarbital sódico a razón de 40 mg por kg de peso corporal. Alcanzado el mismo se realizó una amplia incisión en la línea media del abdomen hasta penetrar en la cavidad peritoneal, procediéndose

entonces a la resección del estómago, el cual se abrió a lo largo de la curvatura menor, lavándose suave mente su superficie mucosa con una solución de cloruro de sodio al 0,85% y a 37°C. De inmediato, se procedió a la obtención de 150 mg de mucosa gástrica por raspado, congelándose luego la muestra para obtener un homogeneizado por trituración en un mortero en frío (temperatura de equilibrio hielo-agua). Una vez homogeneizada la muestra se le añadieron 6 ml de agua destilada acidificada con ácido clorhídrico a pH 2,0 con la finalidad de activar el pepsinógeno, centrifugándose a 4°C durante 15 minutos a 3 000 rpm, siendo separado el sobrenadante para las determinaciones de actividad proteolítica y enzimofóricas.

Determinación de la actividad proteolítica

^ A un ml de sustrato de hemoglobina al 0,66% en ácido clorhídrico 0,1 N, se le añade 0,1 ml del sobrenadante obtenido al final de la centrifugación del homogeneizado de mucosa gástrica, ajustándose inmediatamente después el pH de la mezcla reaccionante al valor apropiado (1,0-1,5-2,0-2,5-3,0-3,5-4,0-4,5-5,0) con hidróxido de sodio o ácido clorhídrico. El ajuste de pH se hace en frío a la temperatura de equilibrio hielo- agua.

Una vez hecho el ajuste del valor de pH de la mezcla reaccionante, la misma es depositada en tubos de centrífuga graduados, siendo los mismos colocados inmediatamente en un recipiente que contiene agua fría (temperatura de equilibrio hielo-agua), manteniéndose los mismos introducidos en el mismo recipiente hasta completar el ajuste del pH de los nueve tubos.

Una vez concluido este paso de la técnica se completa cada tubo hasta 2 ml con la solución amortiguadora correspondiente, la cual se prepara de la siguiente manera: glicina 0,2 M y cloruro de sodio 0,1 M a partes iguales mezcladas con volúmenes apropiados de ácido clorhídrico 0,1 N de manera tal que los nueve valores de pH anteriormente señalados sean alcanzados finalmente.

Seguidamente, los tubos de centrífuga son extraídos al unísono del baño frío en que se encuentran para ser incubados a 37°C durante 1 hora. Una vez transcurrido el tiempo de incubación referido, los tubos son introducidos simultáneamente en baño frío [temperatura de equilibrio hielo-agua) añadiéndosele a cada uno 2 ml de una disolución de ácido tricloroacético al 10% con el objetivo de detener irreversiblemente la reacción enzimática y de precipitar las proteínas presentes en el medio.

Inmediatamente después, los tubos son extraídos del baño frío y centrifugados a 3 000 rpm durante 15 minutos. De cada tubo se toma 1 ml de sobrenadante el cual se deposita en tubos de ensayos a los que se le añaden 2,5 ml de una disolución de carbonato de sodio al 4%, diluido en hidróxido de sodio 0,1 N, y se añade a continuación 0,5 ml de reactivo de *Folin-Ciocalteu* (el reactivo de *Folin-Ciocalteu* es previamente diluido en agua destilada en proporción una parte del reactivo y tres partes de agua). Inmediatamente después se agita de manera enérgica en un agitador eléctrico (dispositivo Mixomat de la Boskamp GmbH modelo 1711-1065) durante 5 segundos, procediéndose después a una incubación durante 30 minutos a 37°C

Transcurrido el tiempo referido el contenido de cada tubo es leído a 500 nm en un Spekol modelo ER-1 No. 398935 de la Carl-Zeiss Jena, contra un blanco preparado sustituyendo la muestra de homo geneizado de mucosa gástrica por agua destilada, con un procedimiento técnico ulterior igual al de los tubos problemas.

El blanco se completa con solución amortiguadora a pH 5,0, aunque el completamiento pudiera hacerse con la solución amortiguadora a cualquier valor de pH; debe utilizarse siempre el mismo valor.

Enzimoforesis

El pH del sobrenadante obtenido de la

centrifugación del homogeneizado de mucosa gástrica, se ajusta a 3,5 con hidróxido de sodio, procediéndose entonces según el método de Uriel (1960)⁶; modificado por *Etherington* y *Taylor* (1967)⁷ y por *Tárano* y *González* (1973).¹

El método estadístico utilizado en el análisis de los valores obtenidos en relación con la actividad proteolítica fue el de la comparación de medias a través del *test* "t" de *Student*, previo estudio de la homogeneidad de la varianza.

RESULTADOS

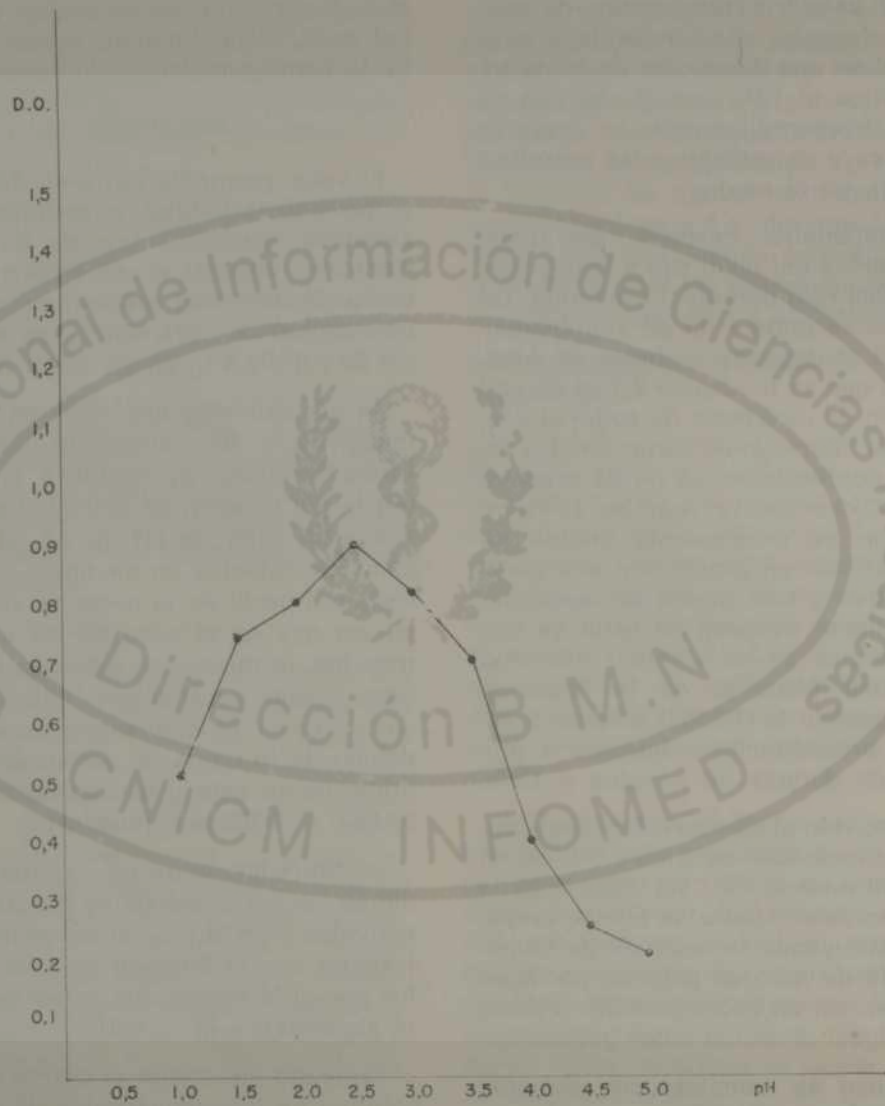
El valor promedio del área debajo de la curva de actividad proteolítica en los animales controles fue de $49,028 \pm 5,845$ cm⁻ (cuadro), encontrándose que la curva de actividad proteolítica muestra un máximo de actividad a un valor de pH de 2,0 ó 2,5 (gráficos 1, 2 y 3).

En los animales que recibieron la administración de clorpromacina en la forma señalada, se encontró la persistencia del máximo de actividad proteolítica a un valor de pH de 2,5, sin otros cambios notables en cuanto a la morfo-logía del perfil de la curva se refiere, a no ser que en el caso de los animales tratados, la misma se estrecha hacia la base y gana en amplitud (altura) (gráficos 4, 5 y 6). El valor promedio del área debajo de la curva de actividad proteolítica fue en este grupo de animales de $57,554 \pm 2,873$ cm⁻ (cuadro).

La diferencia entre los valores promedio de las áreas debajo de las curvas de actividad proteolítica en los animales no tratados con el fármaco en relación con los que sí lo fueron, fue estadísticamente significativa ($p < 0,01$).

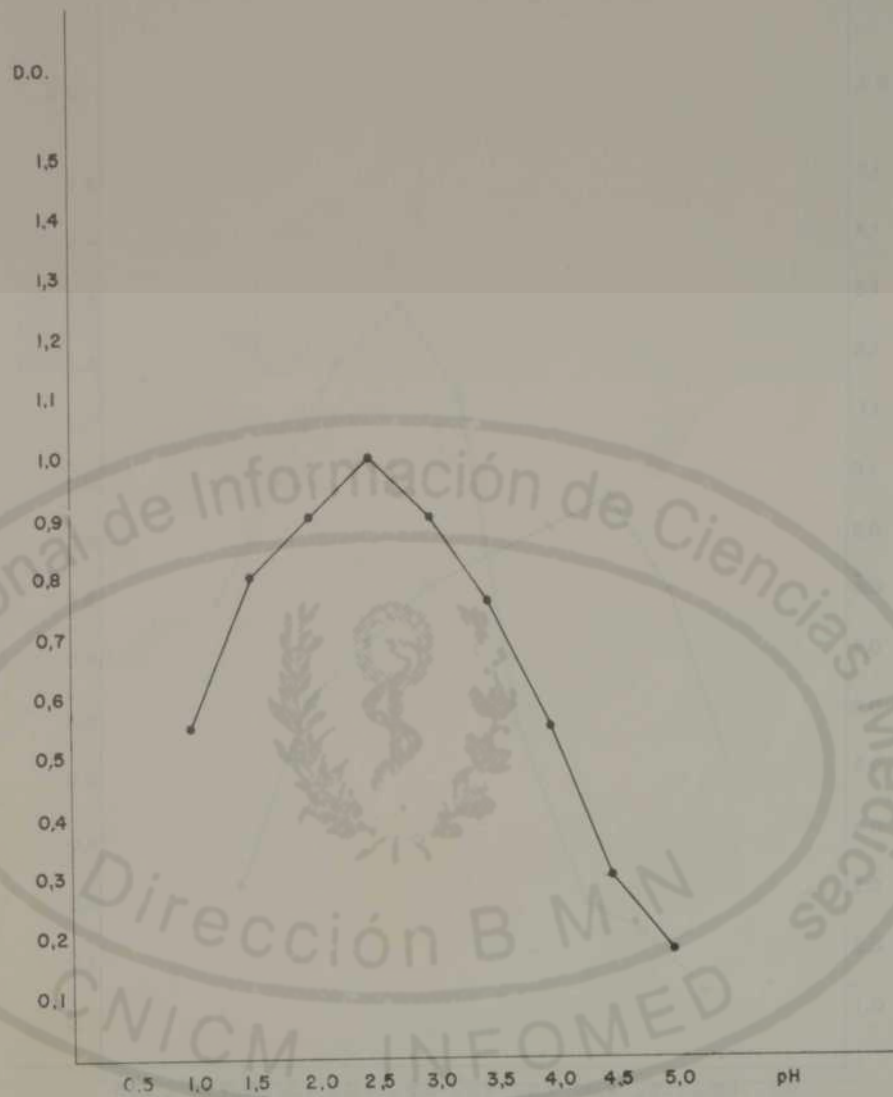
Teniendo en cuenta el patrón enzimo- forético en homogeneizados de mucosa gástrica de ratas establecido por *Fernández* y *González* (1973),⁹ se encuentra que en los animales tratados con clorpromacina, todas las fracciones de pepsina acentúan su intensidad sobre todo la del complejo anódico, es decir, las fracciones A, B y C, sin la aparición de otras nuevas (figuras 1 y 2).

Gráfico 1



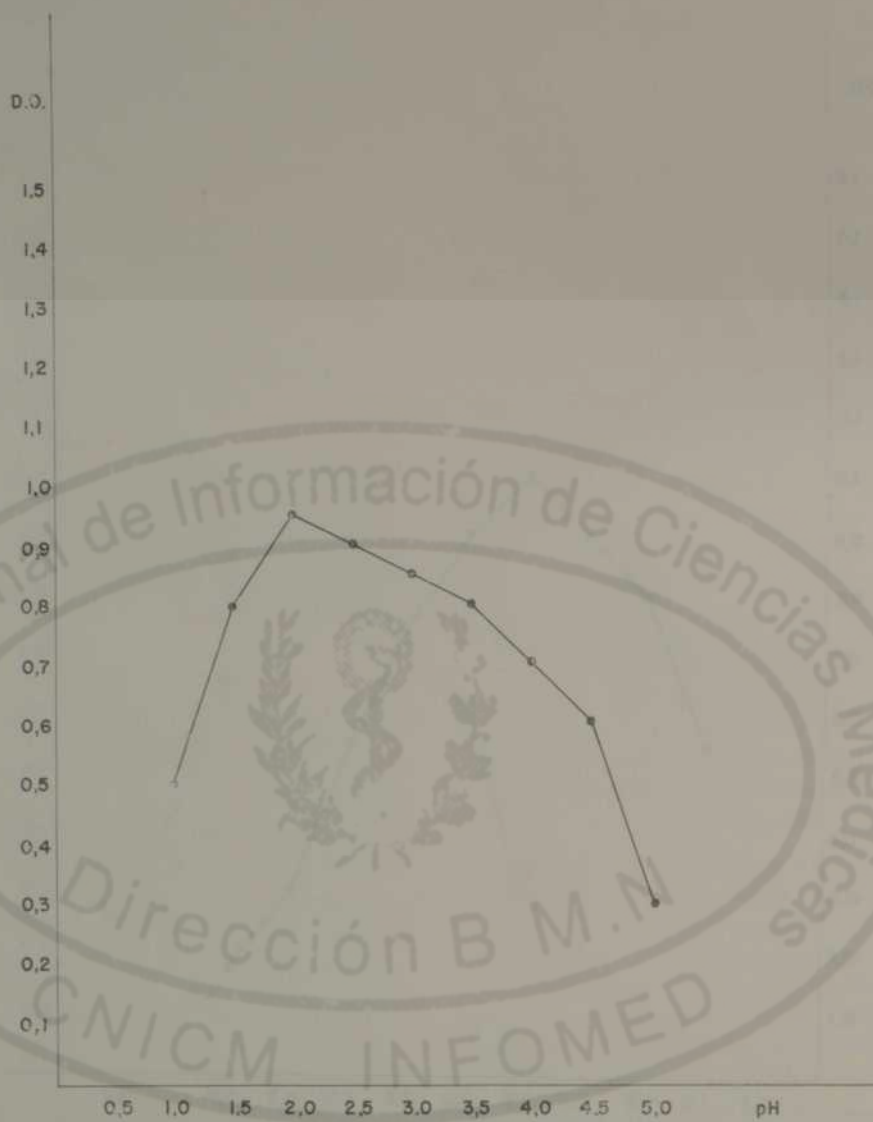
Curva de actividad proteolítica normal obtenida de un homogeneizado de mucosa gástrica de rata.

Gráfico 2



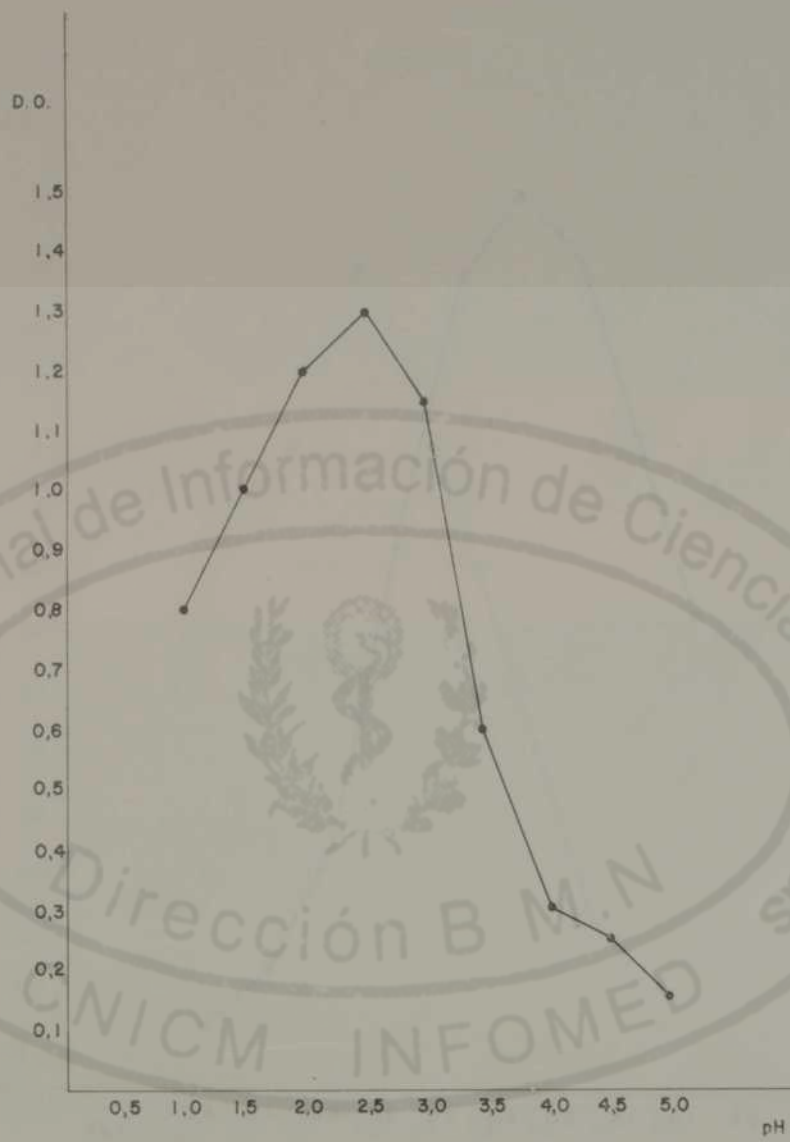
Curva de actividad proteolítica normal obtenida de un homogeneizado de mucosa gástrica de rata. Obsérvese el máximo de actividad sobre un valor de pH de 2,5.

Gráfico 3



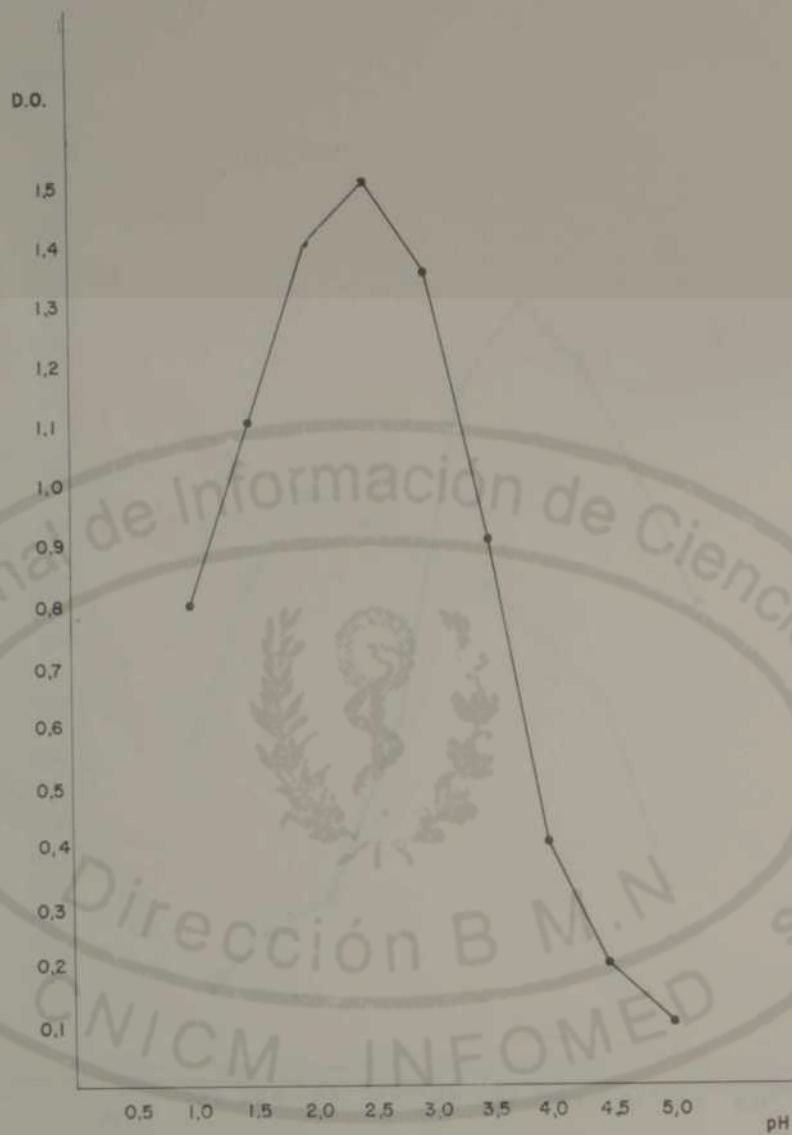
Curva de actividad proteolítica normal obtenida de un homogeneizado de mucosa gástrica de rata. Obsérvese su amplitud y su ancho.

Gráfico 4



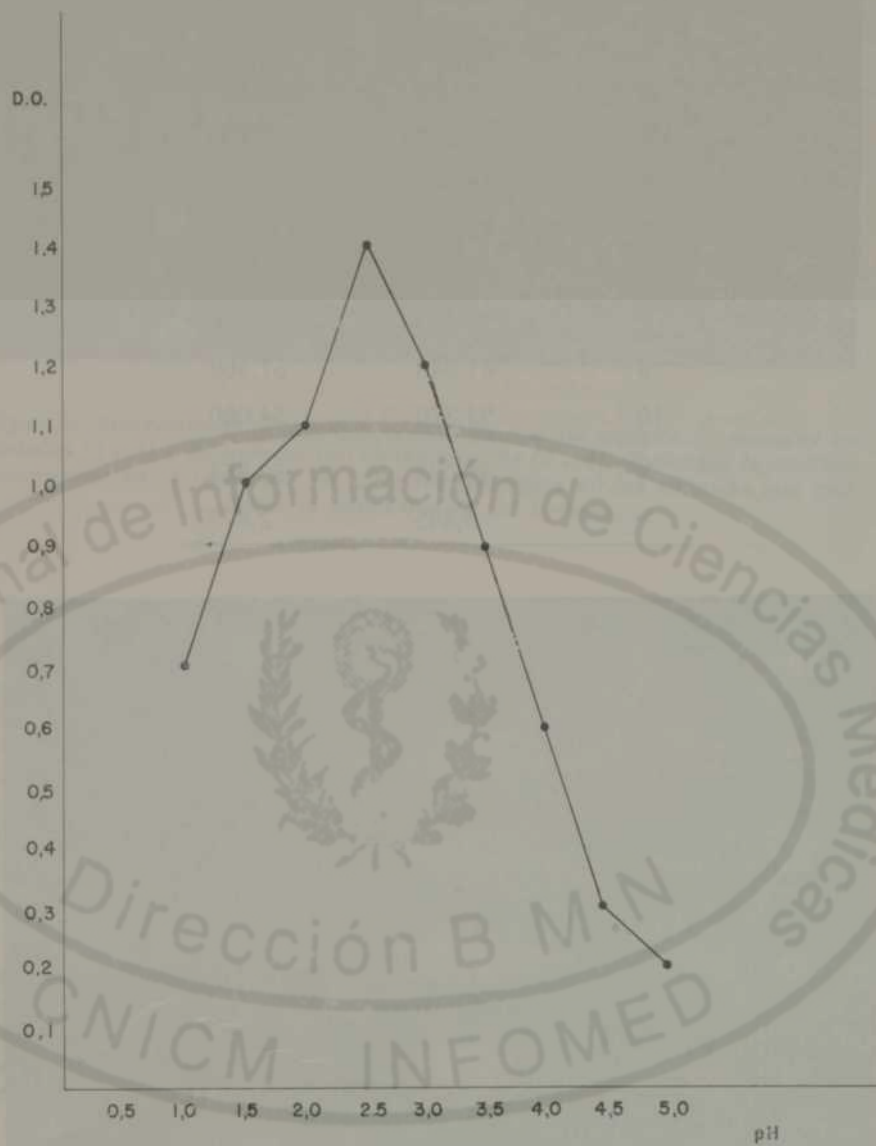
Curva de actividad proteolitica obtenida de un homogeneizado de mucosa gástrica de rata tratada con clorpromacina.

Gráfico 5



Curva de actividad proteolítica obtenida de un homogeneizado de mucosa gástrica de rata tratada con clorpromacina. Obsérvese el máximo de actividad sobre un valor de pH de 2,5.

Gráfico 6



Curva de actividad proteolítica obtenida de un homogeneizado de mucosa gástrica de rata tratada con clorpromacina. Obsérvese su amplitud y su ancho.

CUADRO

AREAS DEBAJO DE LAS CURVAS (En cm-)

| Animal número | No tratados | Tratados |
|---------------|-------------|----------|
| 1 | 53,230 | 59,150 |
| 2 | 46,850 | 61,680 |
| 3 | 55,090 | 57,460 |
| 4 | 48,370 | 59,990 |
| 5 | 56,390 | 55,020 |
| 6 | 45,630 | 53,240 |
| 7 | 49,540 | 60,840 |
| 8 | 38,870 | 56,620 |
| 9 | 41,940 | 57,460 |
| 10 | 54,370 | 54,080 |
| X | 49,028 | 57,554 |
| S | 5,845 | 2,873 |

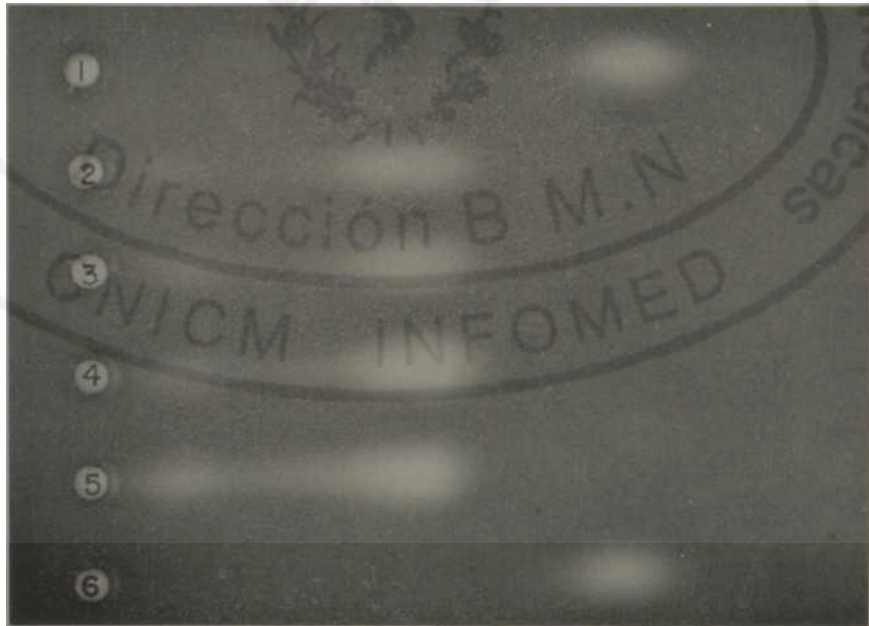


Figura 1. Enzimoforesis de homogeneizados de mucosa gástrica de animales no tratados (2 y 3) y de tratados con clorpromacina (4 y 5). Obsérvese la acentuación más intensa de todas las fracciones en los animales que recibieron la administración del fármaco.

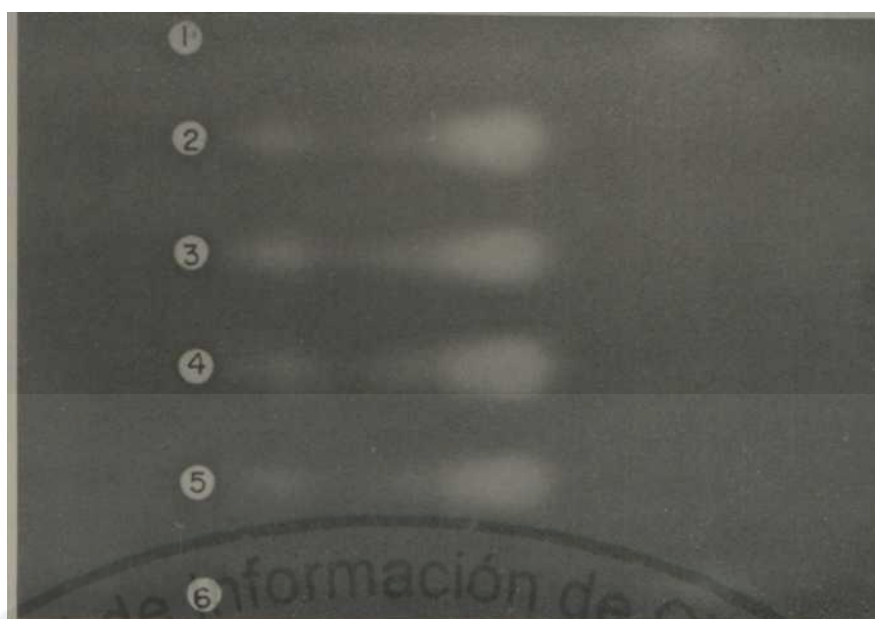


Figura 2. Enzimoforesis de homogeneizados de mucosa gástrica de animales no tratados (3 y 5) y de tratados con clorpromacina (2 y 4). Obsérvese la marcada acentuación de la intensidad de todas las fracciones en los animales que recibieron la administración del fármaco.

DISCUSION

Los resultados obtenidos a juicio de los autores se corresponden con la hipótesis inicial de trabajo, es decir, con la administración de la clorpromacina, se dificulta la exocitosis a nivel de las células principales de las glándulas gástricas, con incremento de la cantidad de pepsinógeno a nivel del citoplasma de las mismas.

Estudios histológicos colaterales realizados por González y colaboradores (1975),¹⁰ demostraron que no se produce un incremento de la población de células principales ni del ARN de éstas, ni de los mucopolisacáridos ácidos y neutros a nivel de la mucosa gástrica de ratas tratadas con clorpromacina; hallazgos estos que sugieren igualmente que el incremento observado en relación con la actividad proteolítica gástrica y la mayor intensidad de las distintas fracciones de pepsina en la enzimoforesis de homogeneizados de mucosa que elevan el pH del jugo gástrico tantáneamente, 1×3 pérdida de toda actihasta valores cercanos o superiores a vida proteolítica de la pepsina (P/per 8,0 en cuyo momento tiene lugar, ins- y Fenton, 1965).'-

gástrica se deban al referido entorpecimiento de la exocitosis del pepsinógeno.

Los resultados enzimoforéticos obtenidos con la administración de clorpromacina son semejantes a los encontrados cuando se administra hidrocortisona a ratas, pero en este caso se puede demostrar por estudios histológicos un aumento significativo de la población de células principales, del ARN de éstas y de la reacción para mucopolisacáridos ácidos y neutros a nivel de la mucosa gástrica González y colaboradores 1976.¹¹

El hecho de que la clorpromacina interfiera con la exocitosis del pepsinógeno podría tener importancia en el tratamiento de la enfermedad ulcerosa gastroduodenal, sobre todo en aquellos pacientes donde el referido derivado fenotiacínico se asocie con fármacos capaces de aumentar la velocidad de cicatrización del epitelio dañado y con antiáci-

SUMMARY

González Pérez, T. L. et al. *Proteolytic activity and gastric proteases in chlorpromazine- treated rats.* Rev Cub Med 17: 1, 1978.

The intramuscular administration of chlorpromazine (10mg/kg body weight) to male white rats during twenty days did not induce significant changes of the proteolytic-activity curve profile obtained from gastric mucosa homogenates, though a narrowing and a widening of its amplitude were found. The total gastric proteolytic activity measured as the extent of the area below the proteolytic activity curve increased significantly with drug administration. The enzymophoresis of gastric mucosa homogenates disclosed an increased intensity in all pepsin fractions.

RESUME

González Pérez, T. L. et al. *Activité protéolytique et protéases gastriques chez des rats traités avec chlorpromazine.* Rev Cub Med 17: 1, 1978.

Les auteurs signalent que l'administration de chlorpromazine chez des rats albinos males, par voie intramusculaire, en doses de 10 mg par kg de poids corporel, pendant 20 jours, ne change pas significativement le profil de la courbe d'activité protéolytique obtenue en homogénéisés de muqueuse gastrique, bien que l'on observe un rétrécissement et une augmentation de son ampleur. L'activité protéolytique gastrique totale, marquée par la valeur de l'aire au-dessous de la courbe d'activité protéolytique, augmente significativement avec l'administration du médicament. L'enzymophorèse d'homogénéisés de muqueuse gastrique démontre que toutes les fractions de pepsine augmentent son intensité.

PE3KME

roHcajiec llepec, T. JI. h np. IlpoTeojuiTKHeCKaH aKTMBHocTB h- racTDM^eckHe npoTea3bi y Kpuc, jiemimux xJiopnpoma3Hiiom.Rev Cub Med 17:1,1978.

yKa3UBaeTCH, hto Bie.aeHMe xJi0np0Ma:mHa caMuaM oé/iiix Kpuc bhjit pHMHueMHUM nyTéM, b j^03ax no 10 Mujuiurpaiviiv; Ha ojimh Kr. ij^M3WMec **Koro** Beca, na npoTHseHHH flBajmaTH üHeU, He weHneT b 3Ha^wTejlb- HOÍ CTeneHM KOHTyp KpMBOti nOTeOJLHKTMHeCKOÛ aKTiBHOCK, nOJiy - ^eHHoM npw roMoreHii3np0BaHMn racTpHHHoK cjiü3h, HecMOTpa Ha to, mto HadJüonaeTCH HeKOTopoe cyKeHHe h neKOTopoe noBbiueHHe eé Be- JIH^HHH. Oómafl raCTpilHHa npOTMOJIHHTMHeCKafl, aKTHBHOCKTL, OTpaKéHHajl b Husmeé cq>epe KpKBOii npoTeojimTMMeckOii aKTMBHOCK, noBhiuaeTCH—

b 3Ha<MTeJIBHOvi CTeneHM npM BBe%eñm Kpucam JieKapCTB. 3h3mivkxi:o- pe3HH roMoreHM3np0BaHHaH racTpimHOii cjiw3m rioKa3UBaeT, ^to Bce- jipocúemiH nencnaa yKa3UBaioT Ha ero HHTeHCiBHOCKTB.

BIBLIOGRAFIA

1. Campos, F. Absorción intestinal de glucosa en la rata y cloropromacina. Trabajo no publicado, 1972.
2. Radwan, A. G.; West, G. B. Effect of aminoguanidine, chlorpromazine and NSD-1055 on gastric secretion and ulceration in the Shay rat. Br Pharmac 41: 167, 1971.
3. Hano, J.; Bugajsky. The inhibition of spontaneous gastric secretion in rat by some centrally active drugs. Dis Pharm Pharma- col 21: 4, 289, 1969.
4. González, T.; Fernández, J. Actividad proteolítica gástrica y ratas tratadas con cloropromacina. VIII Jornada Científica Estudiantil ICBP. "Victoria de Girón", 1976.
5. García, M. Comunicación personal, 1976.
6. Uriel, J. The direct detection of proteolytic enzymes after electrophoresis in agar gel. Nature 188: 853, 1960.
7. Etherington, D. J.; Taylor, W. H. Nomenclature of de pepsins. Nature 216: 279, 1967.
8. Táramo, G.; González, N. Demostración de pepsinas del jugo gástrico humano por electroforesis en gel de agarosa. Primera Jornada Científica de la Facultad de Ciencias Médicas, 1973.
9. Fernández, J.; González, T. Enzimoforesis de homogenizados de mucosa gástrica de ratas. IV Seminario Científico del CNIC. Libro resumen, 1973.
10. González, T. y otros. Datos no publicados, 1975.
11. González, T. y otros. Datos no publicados, 1976.
12. Piper, D. W.; Fenton, B. H. pH stability and activity curves of pepsin with special reference to their clinical importance. Gut 6: 506, 1965.