

Proteasas gástricas. Identificación y aislamiento, Método directo en gel de agarosa

Por los Dres.:

ELSI PEREZ MARTINEZ,¹² JORGE FERNANDEZ COSTA,¹³ TROADIO L. GONZALEZ PEREZ¹⁴ y la
Téc. NELIA L. GONZALEZ SORET¹⁵

Pérez Martínez, E. y otros. *Proteasas gástricas. Identificación y aislamiento. Método directo en gel de agarosa.* Rev Cub Med 17: 2, 1978.

Se hace una revisión del tema "Proteasas gástricas: su identificación y aislamiento", y se describe un nuevo método directo de separación electroforética de las mismas en gel de agarosa.

Consideraciones históricas acerca de la pepsina

Ya desde mediados del siglo XVIII comenzaron a realizarse estudios en relación con los efectos del jugo gástrico sobre los alimentos. Así encontramos que *Reamur* (1752),¹ utilizando un milano domesticado el cual había tragado y después regurgitado pequeños tubos de metal que contenían alimentos o de pequeños fragmentos de esponjas, obtuvo de estos últimos, por compresión, jugo gástrico prácticamente puro, con el cual pudo demostrar después, in vitro, su capacidad para digerir parcialmente la carne sin putrefacción alguna.

Stevens (1777)- y *Spallanzani* (1783)³ encontraron resultados similares en el hombre, es decir, demostraron un fuerte poder o acción disolvente del jugo gástrico diferente a las fermentaciones dulce, acética o pútrida.

Prout en 1824 demostró la existencia de ácido clorhídrico en el jugo gástrico, lo que fue confirmado por *Beaumont*² en 1833, quien demostró, además, que el referido ácido no era el único responsable de la capacidad disolvente del jugo gástrico sobre los alimentos en el estómago.

Eberle (1834)⁴ hizo la observación de que el jugo gástrico neutro era completamente inactivo, mientras que si se acidificaba convenientemente mostraba un notable efecto disolvente sobre la carne y otros alimentos de naturaleza proteica, por lo que sugirió la existencia en el jugo gástrico y en extractos de mucosa gástrica, de un fermento específico al cual *Schwann*,⁵ en 1836, le dio el nombre de pepsina.

¹² Profesora asistente de fisiología humana normal. Centro de Ciencias Básicas "Victoria de Girón", ISCMH.

¹³ Profesor titular de fisiología humana normal. Centro de Ciencias Básicas "Victoria de Girón", ISCMH.

¹⁴ Profesor auxiliar de fisiología humana normal. Centro de Ciencias Básicas "Victoria de Girón", ISCMH.

¹⁵ Técnica de laboratorio de Investigación de fisiología humana normal. Centro de Ciencias Básicas "Victoria de Girón", ISCMH.

Pepsinógeno y su transformación en pepsina

En las principales células de las glándulas gástricas es sintetizada primero y secretada después una proteína de peso molecular del orden de 42 000 a la cual se le ha dado el nombre de pepsinógeno y que es susceptible de convertirse en pepsina (de peso molecular aproximadamente de 35 000) por acción de la propia pepsina libre, y que actúa en presencia del ácido clorhídrico del jugo gástrico (transformación autocatalítica del pepsinógeno, la cual transcurre en forma muy eficiente a valores de pH menores de 5) (*Lheninger, 1974*;^s *Taylor, 1968*).⁹

En el proceso de acidificación del pepsinógeno son separados 42 aminoácidos del extremo aminoterminal de su molécula (*Lheninger, 1974*),* los cuales constituyen a su vez una serie de poli- péptidos (hasta seis descritos), entre los que figura uno que es capaz de inhibir la acción de la pepsina a pH 5,5 y que se denomina inhibidor de la pepsina (*Herriott, 1962*).¹⁰ La referida mezcla de péptidos contiene la mayor parte de los 16 residuos aminoácidos básicos del pepsinógeno, lo que explica que el mismo posea su máxima estabilidad a pH aproximadamente neutro y un punto isoeléctrico relativamente elevado (pH 3,8); mientras que la pepsina solamente es estable y más activa en regiones de pH de 1,0 a 1,5 y su punto isoeléctrico es 1 [*Lheninger, 1974*].⁸

En relación con la estabilidad y la actividad de la pepsina en función del valor del pH del medio en que se encuentran, *Piper y Fenton (1965)* demostraron que a un valor de pH 4,5 se conserva aún, aproximadamente el 70% de la actividad péptica; mientras que la pepsina resulta irreversiblemente inactivada a pH 8,0, lo que tiene importantes implicaciones en la práctica gastroenterológica, mediante el empleo de bloqueadores de la secreción gástrica y de antiácidos capaces de neutralizar la secreción residual.

La pepsina inicia la hidrólisis de las proteínas originales en el estómago por escisión de los enlaces peptídicos de los cuales forman parte aminoácidos aromáticos y ácidos que aportan su función amino (*Lheninger, 1974*).⁸

El inhibidor de la pepsina

Herriott,² en 1941, lo aisló en forma cristalina, y determinó, al mismo tiempo, su peso molecular de aproximadamente 3 242. El inhibidor de la pepsina está constituido por 29 residuos de aminoácidos dispuestos linealmente, y está constituido su extremo aminoterminal por un residuo de leucina, combinándose reversiblemente con la pepsina a valores de pH comprendidos entre 5 y 6 (*Herriott, 1938*).¹³ A un pH por debajo de 5 tiene lugar la disociación del complejo pepsina-inhibidor de la pepsina, y es a partir de entonces destruido lentamente este último (*Herriott, 1962*).¹⁰ La reacción de disociación muestra su velocidad máxima a pH 4 (*Herriott, 1962*).¹⁰ El inhibidor de la pepsina no inhibe la tripsina cristalina, la renina comercial, ni la quimotripsina cristalina (*Taylor, 1968*).⁹

Existencia de más de una pepsina

En 1974, *Ebstein y Grütznér*¹⁴ descubrieron la existencia de un fermento digestivo que ellos consideraron específico, en la porción profunda de las glándulas pilóricas del estómago del perro; mientras que *Glaessner (1902)*¹⁵ concluyó acertadamente que la referida pepsina pilórica, a la cual denominó pseudopepsina, era diferente de la hasta ese momento conocida pepsina, de origen fúndico. *Northrop (1932)*¹⁶ describió la existencia de una enzima proteolítica gástrica, la cual podía obtenerse libre de contaminación con pepsina, a la que denominó gelatinasa, la cual se diferencia de la pepsina gástrica, por su mayor habilidad o

capacidad para hidrolizar la gelatina, mientras que su poder hidrolítico sobre la hemoglobina y otras proteínas era mucho menor y se manifestaba con mayor intensidad a un valor de pH de 4,7 y no a un pH 2,0 como la pepsina. En 1940, *Freudenberg*⁷ demostró que en determinadas condiciones experimentales el jugo gástrico era capaz de digerir substratos apropiados con dos máximos de actividad, y se obtuvieron, uno a un valor de pH muy cercano a 2,0 y el otro a un valor de pH de 3,5, lo que hizo pensar a otros autores en la existencia de una proteína a la cual se denominó catepsina gástrica [*Buchs*, 1947;¹⁸ *Milhaud y Epiney*, 1951;¹⁹ *Ramer*, 1950].²⁰

Taylor (1959)²¹ ha demostrado que si bien la referida catepsina gástrica posee algunas similitudes con la renina del ternero, el máximo de actividad proteolítica encontrado a pH 3,5 también puede ser observado cuando se emplea pepsina cristalina, y propuso que el mismo sea considerado parte de la actividad endopeptidásica de la pepsina, lo que explica por qué muchos autores no han podido aislar la anteriormente referida catepsina gástrica (*Milhaud y Epiney*, 1951;¹⁹ *Ramer*, 1954,²⁰ y *Taylor*, 1959).²¹

Después de los trabajos de *Taylor* (1959),²² de *Tang y colaboradores* (1959)²³ y de *Ryle y Porter* (1959),²⁴ pudo decirse que existían dos o más pepsinas, las cuales se han logrado hacer evidentes mediante empleo de diferentes técnicas de fraccionamiento en otros tipos de jugo gástrico y en homogeneizados de mucosa gástrica.

MÉTODOS PARA EL AISLAMIENTO DE LAS PROTEASAS GASTRODUODENALES

1. Fraccionamiento por precipitación salina (salting-out)

Philpot y Small (citado por *Taylor*, 1968)⁹ y *Desreaux y Herriott* (1939)²⁵ demostraron

encontraron que cuando se utilizaba la disolución de sulfato de magnesio en forma concentrada en la proporción de un 60% a pH 5,0, precipitaba una fracción soluble y cristalina de pepsina; mientras que cuando empleaban la referida solución en la proporción de un 45% a un valor de pH semejante, obtenían una fracción menos soluble no cristalina y de menor actividad específica que la primera, por lo que debe señalarse que los experimentos realizados por los referidos autores fueron llevados a cabo con mezclas de muestras de pepsina provenientes de diferentes animales, por cuanto, de los resultados obtenidos por ellos, no se puede inferir que ambas fracciones se encuentren en un mismo animal.

2. Electroforesis de zona y de papel

Tiselius y colaboradores (1938),²¹ demostraron la presencia de dos componentes de pepsina en una muestra obtenida de una mezcla de diferentes pepsinas, en forma cristalina, de origen porcino, uno de los cuales emigraba con un frente agudo y preciso, y el otro lo hacía en forma mucho más difusa. Este último se demostró que era inactivo, y que al eliminarlo del medio se incrementaba la actividad específica del primero. Los trabajos de *Tiselius y colaboradores* (1938)²⁶ confirmaron la observación hecha por *Ringer* (1915)²⁷ de que la pepsina no estaba cargada positivamente a valores de pH tan bajos como 1,08. *Hoch* (1950)-¹⁸ demostró que el componente principal de la pepsina porcina obtenido mediante una electroforesis prolongada en el dispositivo de *Tiselius*, estaba constituido por dos componentes mayores y dos menores, y que representaba el 96% del total de la pepsina separada por el referido procedimiento electroforético. Los componentes mayores y menores no pudieron ser ulteriormente aislados, por lo que no pudo evidenciarse la existencia de

más de una fracción proteolíticamente activa. *Taylor* (1959)²¹ demostró, trabajando con muestras de jugo gástrico humano, la existencia de dos fracciones con actividad proteolítica, con movilidad anódica, a pH 2,5. Mediante el empleo de la técnica electroforética de papel a pH 4,0 *Taylor* y *Fisher* (citado por *Taylor*, 1968)^o demostraron la existencia de dos proteinasas con movilidad anódica en muestras obtenidas de un extracto de mucosa gástrica, ambas proteasas al ser estudiadas ulteriormente mostraron máximos de actividad proteolítica a valores de pH cercanos a 2,0 y 3,5. Asimismo, en mezclas de jugo gástrico humano, *Tang* y *colaboradores* (1959)²¹ demostraron la presencia de dos proteinasas, también con movilidad anódica a valores de pH por debajo de 5,0, las que fueron identificadas con los nombres de pepsina y gastricsina.

3. Cromatografía de intercambio iónico

Ryle y *Porter* (1959)²⁹ demostraron mediante elución de gradiente sobre dietilaminoetil-celulosa la existencia de dos componentes menores, con actividad proteolítica ambos, en muestras de pepsina cruda porcina y a las cuales denominaron parapepsina I y parapepsina II, respectivamente. Ambas fracciones enzimáticas fueron obtenidas por estos investigadores en un estado homogéneo, lo cual comprobaron mediante técnicas de electroforesis y ultracentrifugación. A diferencia de la pepsina cristalina, ninguna de las fracciones señaladas contenía grupos fosfatos, mediando la parapepsina, I la hidrólisis rápida del oligopéptico acetil-DL-fenilalanil-L-diidotirosina con un máximo de actividad a pH 1,8, hidrolizando al mismo tiempo la gelatina mucho más fácilmente que la hemoglobina y la albúmina plasmática. En relación con la parapepsina II encontraron que la misma mediaba la hidrólisis rápida, tanto de la hemoglobina como de la albúmina plasmática, con una peque

ña actividad hidrolítica sobre el acetil-DL-fenilalanil-L-diidotirosina. Ninguna de las dos fracciones de parapepsina era capaz de hidrolizar los dipéptidos cisteil-tirosina y tirosilcisteína, y solamente era inhibida por el inhibidor de pepsina, la parapepsina

II. *Ryle* (1960)³⁰ demostró también la existencia en la porción fúndica de la mucosa del estómago del cerdo, los pepsinógenos correspondientes a las dos parapepsinas descritas. Más tarde, *Lee* y *Ryle* (1963)³¹ encontraron

lo que ellos denominaron el pepsinógeno D también a nivel de la porción fúndica de la mucosa gástrica del cerdo, el cual, si bien tenía semejanza con los otros pepsinógenos descritos, no poseía grupos fosfatos y contaba con un grupo aminoterminal diferente.

Tang y *colaboradores* (1959P) lograron separar dos fracciones con actividades de proteinasa de muestras de jugo gástrico humano usando amberita IRC-50-XE64, una de las cuales era muy parecida a la pepsina del cerdo (pepsina humana propiamente dicha); mientras que la otra, con una escasa movilidad anódica, la denominaron gastricsina. Ulteriormente *Tang* y *Tang* (1963)³² lograron aislar un nuevo cimógeno de muestras de mucosa gástrica de pacientes portadores de úlcera duodenal, el cual demostraron que era homogéneo mediante procedimientos electroforéticos y de ultracentrifugación y que una vez activado a pH 2,5 mostraba dos máximos de actividad proteolítica, los cuales se correspondían con los máximos de la pepsina y de la gastricsina. *Seiffers* y *colaboradores* (1963)³³ lograron separar dos proteinasas, con las mismas propiedades de la pepsina del jugo gástrico humano, mediante la cromatografía sobre epiclorohi-drintrietanol-aminocelulosa. Ulteriormente con el empleo de la dietilaminocetil-celulosa, en muestras de extractos de mucosa gástrica obtenida de individuos portadores de úlcera péptica lograron la obtención de tres proteínas que después

de ser activadas en medio ácido, reaccionaban como pepsinas, y a las cuales se denominaron pepsinógenos I, II y III, respectivamente. Estos investigadores demostraron también, que cuando los extractos de mucosa eran acidificados antes de la elución cromatográfica, mostraban tres máximos de actividad proteolítica, y postularon la existencia de las pepsinas I, II y III. Es interesante señalar que cuando estos autores acidificaban por separado los diferentes pepsinógenos, si bien obtenían del I y del III las correspondientes pepsinas I y III, del pepsinógeno II obtenían dos fracciones con actividad proteolítica: las pepsinas II A y II B (las cuatro pepsinas así obtenidas no fueron purificadas ni fueron estudiadas mediante electroforesis en papel o almidón).

4. Electroforesis en gel de agar, gel de almidón e inmunoelectroforesis

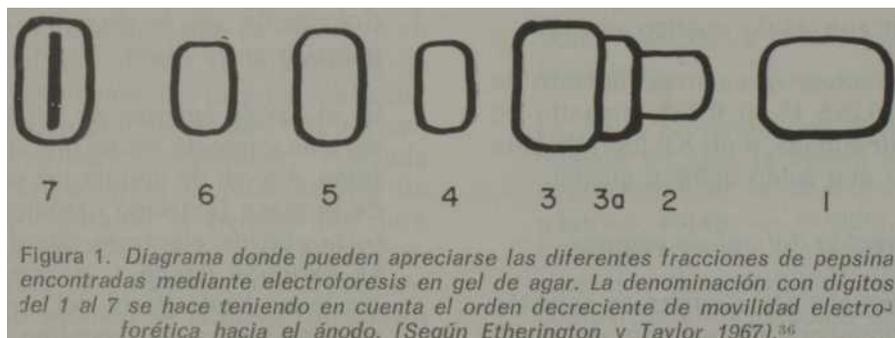
La aplicación de la electroforesis en gel de agar al estudio de extractos de mucosa gástrica humana la realizaron por primera vez, *Kushner y colaboradores* (1964).^u Mediante este procedimiento se demostró la existencia de cuatro pepsinógenos (PI-PII-PIII-PIV) que después de ser activados en medio ácido generaban cinco fracciones con actividad proteolítica parecida a la de la pepsina a pH 2,0 o a valores cercanos a éste. En estudios

similares realizados en muestras de jugo gástrico obtenidos de individuos portadores de diferentes afecciones gástricas, también se demostró la presencia, al menos de cuatro fracciones con actividad proteolítica (*Hirsch-Marie y colaboradores*, 1965).¹⁵ Estos autores realizaron asimismo estudios inmunoelectroforéticos, con los que demostraron que los pepsinógenos PII-PIII y PIV eran antígenos y que se diferenciaban inmunquímicamente del PI, el cual no poseía propiedades inmunogénicas por los métodos por ellos empleados.

Por los resultados obtenidos de los estudios electroforéticos de esta naturaleza realizados hasta ahora, puede decirse que en el hombre existen al menos siete fracciones de pepsina (*Etherington y Taylor*, 1967).^{3,i}

Nomenclatura de las pepsinas

Como fue expresado en la sección anterior, hasta el momento actual han sido descritas siete fracciones de pepsina presentes en el jugo gástrico humano, mediante la electroforesis en gel de agar (*Etherington y Taylor*, 1967),^{3B} las que fueron denominadas mediante dígitos del 1 al 7, en orden decreciente de movilidad electroforética hacia el ánodo (figura 1). Es preciso señalar que si bien con la electroforesis en gel de agar se obtiene una buena resolución de las fracciones de pepsina del jugo gástrico hu



mano, *Tárano y González (1973)* " demostraron que con el empleo de agarosa las referidas fracciones pueden hacerse evidentes con mayor nitidez.

AISLAMIENTO DE PROTEASAS POR ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA (método directo). METODO DE FERNANDEZ Y GONZALEZ (1973)³⁸

1. *Obtención de la muestra*

La muestra de jugo gástrico es obtenida por intubación gástrica mediante el método denominado de Kay o prueba de gastroacidograma con estímulo máximo de histamina (*Bockus, 1973*).³⁰

2. *Preparación de la muestra*

Al jugo recolectado se le mide el pH, y es desechado cuando el valor de éste último es superior a 2,0. La muestra de jugo gástrico es entonces filtrada a través de papel de filtro Whatman No. 1 en frío, y se ajusta el valor de pH del recobrado a 3,5, con el objetivo de evitar la autodigestión de las fracciones de pepsina en él presentes (*Taylor, 1960*) ;⁴⁰ se puede conservar la muestra en estado de congelación por largo tiempo (en el caso particular de este trabajo, las muestras objeto de estudio fueron concentradas al 50%).

3. *Preparación de las soluciones amortiguadoras*

Para la cubeta: acetato de sodio 0,1 M, fuerza iónica (fi) 0,1 disuelto en agua destilada, a pH 5,0 logrado este último con ácido acético glacial.

Para disolver la agarosa: acetato de sodio 0,025 M, fi 0,025, disuelto en agua destinada, a pH 5,0 logrado este último con ácido acético glacial.

4. *Preparación del gel de agarosa*

Agarosa al 1,5% disuelta en solución amortiguadora de acetato de sodio

0, 025 M a pH 5,0 y a la temperatura de 85°C aproximadamente, con agitación constante (manual) en un erlenmeyer de 250 ml de capacidad con tapón de gasa para evitar en lo posible la evaporación. La agitación se mantendrá hasta que la disolución de agarosa se haya transparente y homogénea.

5. *Preparación de las placas de vidrio*

En placa de vidrio de 10X21 cm colocada sobre una superficie a nivel, se depositan 42 ml de la disolución de agarosa; se procura que la misma llegue hasta los bordes de la placa (la placa de vidrio debe limpiarse cuidadosamente con detergente y agua abundante y después con acetona, con el objetivo de eliminar cualquier residuo posible de grasa). La placa cubierta con la disolución de agarosa se deja enfriar a temperatura ambiente hasta que ésta se solidifique; después es enfriada en un refrigerador a 5° ó 6°C durante 15 minutos con el objetivo de lograr una mayor dureza y homogeneidad del soporte de la electroforesis.

6. *Preparación de la cubeta*

En cubeta de electroforesis apropiada se depositan 1 000 ml de la disolución amortiguadora de acetato de sodio 0,1 M a pH 5,0, y se cubre con tapa de vidrio revestida de papel de filtro húmedo con el objetivo de lograr una atmósfera saturada de vapor de agua.

7. *Colocación de la muestra de jugo gástrico en la placa*

En el gel de agarosa se hace una ranura de 2 mm de ancho por 70 mm de largo, a 5 cm de uno de los extremos de la placa (extremo catódico durante la corrida electroforética), la que se extiende desde 1 cm de uno de los lados hasta 2 cm del otro. En la referida ranura se depositan 1 ml del



Figura 2. Diagrama donde se señalan las diferentes franjas de agarosa que son desechadas después de la corrida electroforética.



Figura 3. Diagrama donde se señalan las diferentes franjas transversales de 0,5 cm de ancho que se obtienen después de la corrida electroforética para la separación ulterior de las diferentes fracciones de pepsinas contenidas en el jugo gástrico.

jugo gástrico objeto de estudio. En el espacio de 2 cm de uno de los lados de la placa se hace un pequeño orificio circular de 3 mm de diámetro en el cual se colocan 15 microlitros de una disolución de pepsina estándar de origen porcino al 0,001 % en ácido clorhídrico milimolar, marcada con bromofenol, la cual servirá de control durante el tiempo que dure la corrida. Cuando la mancha de bromofenol se encuentre a 6 cm del extremo anódico de la placa (en cuatro

horas aproximadamente), termina la corrida.

8. *Colocación de la placa de vidrio en la cubeta*

La placa se coloca en la cubeta de manera tal, que la ranura en la cual está contenida la muestra de jugo gástrico, objeto de estudio, y el orificio que contiene la muestra de pepsina estándar queden ubicados en el compartimiento catódico de la cube-

ta. Se colocan entonces puentes dobles de papel de filtro Whatman No.

1 de 25,2 cm por 5,04 cm de ambos extremos de la placa, cuidando que queden sobre la placa 2 cm del papel haciendo buen contacto con la agarosa. El resto del papel quedará sumergido en la disolución amortiguadora contenida en la cubeta, y entonces se procederá a tapar esta última y a conectar a la fuente de poder en la cual el voltaje se fija en 180 voltios.

Transcurrido el tiempo de corrida electroforética (aproximadamente 4 horas) se saca la placa de vidrio de la cubeta y se procede a separar, mediante corte longitudinal, una franja de 2 cm de ancho en la cual corrió el bromofenol unido a la pepsina estándar, que se desecha; en el otro borde de

la placa, también mediante corte longitudinal se obtiene una franja de agarosa de 1 cm de ancho, la que es desechada al igual que la anterior (figura 2). Del resto del gel de agarosa, y a partir de la ranura de aplicación de la muestra de jugo gástrico, objeto de estudio, se cortan franjas transversales de 0,5 cm de ancho hasta alcanzar la distancia recorrida por el bromofenol (figura 3). Cada franja es colocada en un tubo de ensayo que contiene 2 ml de disolución amortiguadora de acetato de sodio 0,025 M, fi 0,025, pH 5,0 para ser después homogeneizada y centrifugada.



Figura 4. Enzimoforetograma donde aparecen fracciones de pepsina (3 y 5) separadas por el método de Fernández y González, 1973.³⁵

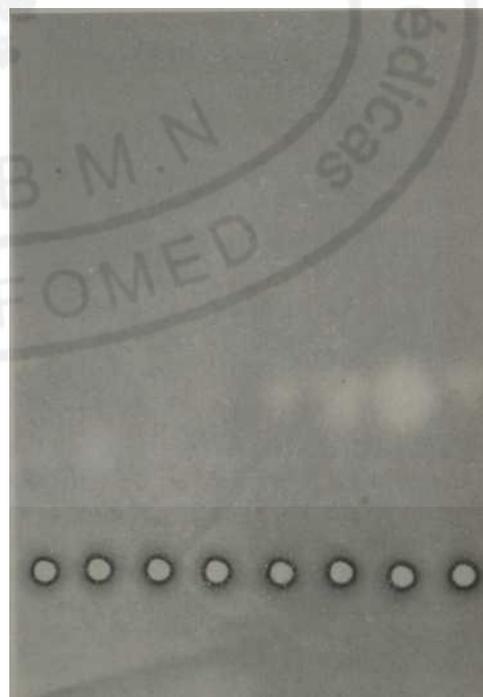


Figura 5. Enzimoforetograma donde aparecen fracciones de pepsina (3 y 5) prácticamente aisladas de las restantes fracciones de pepsina del jugo gástrico.

En la homogeneización de cada franja de agarosa se empleó un homogeneizador tipo Potter, a 3 500 rpm durante 5 a 10 segundos, y fue mantenida durante todo el tiempo de homogeneización del tubo de ensayo introducido en un medio que contenía agua y hielo. Una vez homogeneizada cada muestra, se procedió a centrifugarla durante 15 minutos a

2 500 rpm, se le extrajo el sobrenadante y se procedió a la comprobación electroforética de cada una por separado con el objetivo de determinar el grado de pureza u homogeneidad de la fracción de pepsina contenida en ella.

9. Comprobación

La comprobación de la pureza u homogeneidad de la fracción de pepsina aislada en cada franja de agarosa procesada se lleva a cabo mediante el método propuesto por *Uriel* (1960)⁴¹ modificado por *Tárano* y *González* (1973)³⁷ (figuras 4 y 5).

Consideraciones finales

El método descrito para el aislamiento de proteasas gástricas por electroforesis en gel de agarosa en forma directa, es sólo en apariencia complejo, por cuanto una vez alcanzada la experiencia necesaria, su

realización transcurre en forma mecánica, lo que no obstante ello, permite la obtención de las diferentes fracciones de pepsina presentes en el jugo gástrico humano con un grado de "pureza" aceptable, teniendo en cuenta la naturaleza de la técnica utilizada.

Con el empleo de la agarosa se logra una mayor resolución en la separación de las distintas fracciones de pepsina del jugo gástrico, aunque tiene el inconveniente económico respecto al agar, de ser más cara que éste.

Con el método propuesto pueden obtenerse cantidades apreciables de las diferentes fracciones de pepsina, ya que el tamaño de las placas puede ser variado a conveniencia, lo que aumenta el número de orificios donde colocar las muestras de los homogeneizados de gel de agarosa obtenidos después de la corrida electroforética; al mismo tiempo, puede ser desarrollado en prácticamente cualquier laboratorio debido al número reducido de equipos y accesorios de todo tipo que se requieren.

Con esta técnica se logran resultados similares a los obtenidos mediante la cromatografía con resinas de intercambio iónico, pero en un tiempo mucho más breve, y queda eliminada la necesidad de emplear un colector de fracciones y un cuarto refrigerado, por lo que resulta mucho más sencilla y económica.

SUMMARY

Pérez Martínez, E. et al. *Gastric proteases. Identification and isolation through the direct agarose gel method.* *Rev Cub Med* 17: 2, 1978.

Gastric proteases, their Identification and Isolation are reviewed. A new direct method for their electrophoretic separation in agarose gel is described.

RESUME

Pérez Martínez, E. et al. *Protéases gastriques. Identification et isolement. Méthode directe en gel d'agarose.* *Rev Cub Med* 17: 2, 1978.

Une revue du thème "Protéases gastriques: identification et Isolement" est réalisée, et une nouvelle méthode directe de séparation électrophorétique de celles-ci en gel d'agarose est décrite.

BIBLIOGRAFIA

1. *féamur*. Citado por Taylor, W. H. en "Biochemistry of pepsins", Handbook of Physiology-Alimentary Canal. Chapter 120, pp 2567. The Williams and Wilkins Co., 1968.
2. *Stevens*. Citado por Taylor, W. H. en "Biochemistry of pepsins", Handbook of Physiology-Alimentary Canal. Chapter 120, pp. 2567. The Williams and Wilkins Co., 1968.
3. *Spallanzani*. Citado por Taylor, W. H. en "Biochemistry of pepsins", Handbook of Physiology-Alimentary Canal. Chapter 120, pp. 2567. The Williams and Wilkins Co., 1968.
4. *Prout*. Citado por Taylor, W. H. en "Biochemistry of pepsins", Handbook of Physiology-Alimentary Canal. Chapter 120, pp. 2568. The Williams and Wilkins Co., 1968.
5. *Beaumont, W.* Experiments and observations on the gastric juice and physiology of digestion. Plattsburg N. Y.: Alien, 1833.
6. *Eberle*. Citado por Taylor, W. H. en "Biochemistry of pepsins", Handbook of Physiology-Alimentary Canal. Chapter 120, pp. 2568. The Williams and Wilkins Co., 1968.
7. *Schwann, T.* Über das Wesen des Verdauungssporzen. Müller's. Arch Anat Physiol, pp. 90, 1836.
8. *Lheninger, A. L.* Bioquímica. Cuarta Reimpresión. Ediciones Omega, SA, 1974.
9. *Taylor, W. H.* "Biochemistry of pepsins". Handbook of Physiology Alimentary Canal. Chapter 120, pp. 2568. The Williams and Wilkins Co., 1968.
10. *Herriott, R. M.* Pepsinogen and pepsin. J Gen Physiol 45: 57, 1962.
11. *Piper, D. W.,- Fenton, D. H.* pH stability and activity curves of pepsin with special preference to their clinical importance, Gut 6: 506, 1965.
12. *Herriott, R. M.* Isolation, crystallization and properties of pepsin inhibitor. J Gen Physiol 24: 325, 1941.
13. *Herriott, R. M.* Kinetics of the formation of pepsin from swine pepsinogen and identification of an intermediate compound. J Gen Physiol 22: 65, 1938.
14. *Ebstein, W.; Grützner.* Über pepsinbildung un Magen. Arch Ges Physiol 8: 122, 1874.
15. *Glaessner, K.* Über die örtliche. Verbiutung der profermente In der Magenschleimhaut. Beltr Chem Physiol Pathol 1: 24, 1902.
16. *Northrop, J. H.* Presence of gelatin liqueying enzyme in crude pepsin preparations. J Gen Physiol 15: 29, 1932.
17. *Freudenberg, E.* Über das kathepsin des magens. Enzymologia 8: 385, 1940.
18. *Buchs, S.* Die biologie des Magenkathepsins. New York: Karger, 1947.
19. *Milhaud, D.; Epiney, J.* Etude physico-chimique et clinique des deux proteases du suc gastrique. Gastroenterology 77: 193, 1951.
20. *Ramer, Z.* Activation of pepsin and cathepsin by potassium cyanide and hydrogen sulphide. Z Physiol Chem 296: 73, 1954.
21. *Taylor, W. H.* Studies on gastric proteolysis. II The nature of the enzyme-substrate interaction responsible for gastric proteolysis pH-activity curves with two maxima. Biochem J 71: 373, 1959.
22. *Taylor, W. H.* Studies on proteolysis III. The secretion of different pepsins by fundic and pyloric glands of the stomach. Biochem J 71: 384, 1959.
23. *Tang, J. et al.* Isolation and crystallization of gastricsin from human gastric juice. J Biol Chem 234: 1174, 1959.
24. *Ryle, A. P.; Porter, R. R.* Parapepsins two proteolytic enzymes associated with porcine pepsin. Biochem J 73: 75, 1959.
25. *Desreux, V.; Herriott, R. M.* Existence of several active components in crude pepsin preparations. Nature 144: 287, 1939.
26. *Tiselius, A. et al.* Electrophoresis of pepsin. Biochem J 32: 1814, 1938.
27. *Ringer, W. E.* Weitere Studien au Pekingharingschen Pepsin X. Physiol Chem 95: 195, 1915.
28. *Hoch, H.* Electroforetic heterogeneity of crystallized pepsin. Nature 165: 278, 1950.
29. *Ryle, A. P.; Porter, R. R.* Parapepsins, two proteolytic enzymes associated with porcine pepsin. Biochem J 73: 75, 1959.
30. *Ryle, A. P.* Parapepsinogen II: the zymogen of parapepsin II. Biochem J 75: 145, 1960.
31. *Lee, D.; Ryle, A. P.* Pepsinogen D, a zymogen from pig gastric mucosa. Biochem J 87: 44, 1963.
32. *Tang, J.; Tang, K. I.* Purification and properties of a zymogen from human gastric mucosa. J Biol Chem 238: 606, 1963.
33. *Seiffers, M. J. et al.* Separation of pepsin I, pepsin II A, pepsin II B and pepsin III from human gastric mucosa. Am J Physiol 205: 406, 1963.

34. *Kushner, I.* Electrophoretic and immunochemical demonstration of existence of four human pepsinogens. *J Clin Invest* 43: 1983, 1964.
35. *Hirsch-Marie, H. et al.* Etude électrophoretique et immuno-électrophorétique des enzymes protéolytiques du suc gastrique normal et pathologique. *Acta Gastroenterol Belg* 28: 373, 1965.
36. *Etherington, D. J.; Taylor, IN. H.* Nomenclature of the pepsins. *Nature* 216: 279, 1967.
37. *Tárano, 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. Libro Resumen, 1973.
38. *Fernández, J.; González, T.* Aislamiento de proteasas por electroforesis en gel de agarosa (método directo). IV Seminario Científico del CNIC. Libro Resumen, 1973.
39. *Bockus, H. L.* Gastroenterología, Tomo I. Salvat Editores S.A., Segunda edición 1968, reimpresión 1973.
40. *Taylor, YJ. H.* Aspects of the mechanism of action of gastrointestinal proteinases. *Bull Soc Chlm Biol* 42: 1313, 1960.
41. *Uriel, J.* The direct detection of proteolytic enzymes after electrophoresis in agar gel. *Nature* 188: 853, 1960.

