

POLIPEPTIDOS ACTIVOS*

Dr. A. VALLS CONFORTO

La primitiva reacción de Abderhalden y sus espectaculares fracasos, es conocida de todos ustedes. Abderhalden hijo la perfeccionó y preparó otros antígenos, además del placentario, proponiéndose el diagnóstico de afecciones de órganos y glándulas endocrinas.

Un estudio sistemático, me demostró la sólo discreta utilidad de esta reacción, y el peligro de confiar en ella, para establecer planes terapéuticos.

Abderhalden prepara sus antígenos cortando un órgano en finos trozos, y luego diseca con cuidado y elimina vasos y conjuntivo.

Sivori, a partir de este «antígeno puro», prepara unos lisados enzimáticos que son los que utiliza como antígeno. Además, lo rodea de reacciones paralelas a base de antígenos de coágulo y de tejido conjuntivo. También en vez de usar una terminología vaga de «positivo débil o fuerte», o «indicios». Establece una escala cromática y así los resultados son numéricos, y de las cifras dadas por el antígeno «bruto» resta los valores dados por los antígenos «coágulo» y «conjuntivo», obteniendo cifras

más en consonancia con la realidad.

Así, pues, Abderhalden utiliza como antígenos albúminas completas, y Sivori utiliza agrupaciones polipeptídicas, sosteniendo que la especificidad de órgano no se detiene en las albúminas y albumosas, sino en grupos polipeptídicos.

Químicamente, ¿dónde se halla este límite? Según Sivori, está en los antígenos, que dando intensa reacción al biuret, den sólo indicios a la nihidrina.

Esta afirmación la hallo totalmente inaceptable. La reacción a la nihidrina cuando quiere usarse cuantitativamente, depende de un gran número de factores, así: grado de temperatura, tiempo de actuación de la temperatura, velocidad con que se ha alcanzado, pH, relación de masas entre reactivos y problema, solvente de la nihidrina, agitación, etc., etc.

Satisfecho Sivori en lo referente a especificidad, es lógico pensar en qué respuestas inmunológicas podría obtener con sus antígenos.

Halló que los animales tratados enflaquecían rápidamente, entrando en caquexia. Si las dosis eran más débiles, el cuadro se alargaba,

* Comunicación presentada como Académico Corresponsal en la Sesión del día 23-III-65.

y a una fase congestiva de los órganos correspondientes al antígeno inyectado, sucedía una fase degenerativa.

El mismo antígeno, usado por vía oral, no mostraba toxicidad y, es más, parecía estimular el retorno a la normalidad de órganos deficientes.

Sólo se ha hallado una corta «nota previa» de estos trabajos de Sivori, y supongo que no los continuó por fracasos en la estandarización de antígenos. Revisé estos trabajos y deduje que la toxicidad vía parenteral era debida, de un lado, a la actividad específica, y de otro, a sustancias liberadas durante la hidrólisis. Según el grado de lisis, así se obtiene una gama de respuestas inmunológicas, desde desviación del complemento, a lisinas y precipitinas, hasta que finalmente sólo se obtienen respuestas a órganos «in vivo» de tipo específico. Cuando se llega a este punto, en nuestras manos, los antígenos dejan ya de ser utilizables para la reacción diagnóstica de Sivori.

Según Abderhalden me comunicó personalmente, los antígenos de endocrinas deben pertenecer a la misma especie animal con cuyos fermentos urinarios deseen ser probados. En cambio, los antígenos de órganos pueden pertenecer a otra especie animal, lo más afín posible.

No me pareció bien esta diferencia, ya que ¿dónde empieza y dónde acaba lo endocrino? Un ri-

ñón, un corazón, una parótida, son exocrinos u órganos para Abderhalden, pero bien sabemos que producen sustancias de tipo hormonal.

Por mi parte, creo que cada célula, cada agrupación tisular, es productora de sustancias que van a estimular unidades o agrupaciones más o menos próximas dentro del todo orgánico.

Sin embrago, quise observar experimentalmente lo que hubiera de cierto en mi hipótesis, y hallé que antígeno tiroideo, procedente de hombre, toro y perro, se comportaron exactamente igual frente a orina humana.

El conjunto de resultados obtenidos con los antígenos de Sivori, me llevaron a ensayar la producción de lesiones inmunitarias. De todas ellas voy únicamente a exponer las de mayor interés práctico.

La inyección de antígeno intestinal a perros, les provoca lesiones intestinales. La administración por vía bucal, no las produce, al contrario, frecuentemente parece acelerar la restitución a la normal.

Intoxiqué el hígado de ratones, manteniéndoles en una atmósfera conteniendo tetracloruro de carbono y alimentándolos exclusivamente con leche. Cada día eran necropsiados algunos animales para observar su estado hepático. Cuando éste fue francamente patológico se dividió la población en tres lotes de 20 animales cada uno. Dejé de intoxicárseles con tetracloruro y

recibieron una alimentación normal. Un lote se guardó como testigo, otro recibió antígeno vía parenteral y otro lo recibió por vía bucal.

Los testigos murieron en un plazo de 8 a 15 días. Los parenterales en 3 a 5 días. Los vía bucal, unos murieron en el mismo plazo de los testigos, pero otros sobrevivieron hasta las tres semanas.

El comportamiento de los vía parenteral me pareció lógico, no así los de vía bucal.

Supuse que, cuando el hígado estaba muy lesionado, quizás dejaba pasar a la circulación parte del antígeno que normalmente hubiera retenido. Por otra parte, cada animal responde con intensidad variable al tetracloruro, y lo mismo ocurre si se utiliza el fósforo amarillo o el arsénico.

No hay otra solución que trabajar con gran número de animales de la misma raza y en iguales condiciones y, a ser posible, agruparlos por reacciones bioquímicas. En la imposibilidad de hacerlo con pequeños animales, hemos trabajado con lotes no menores de 20 y repitiendo la experimentación en distinto tiempo un mínimo de tres veces. No hemos considerado aceptables desviaciones en las respuestas superiores al 20 %.

Habiendo observado el efecto favorable de la especificidad de órgano por vía oral, sobre las lesiones experimentales de intestino de perro, intenté saber si la especifi-

cidad de órgano iba acompañada de especificidad animal.

Pues, sí, la especificidad de órgano es conservada dentro de ciertos límites de degradación enzimática, más lejos que las posibilidades que la reacción de Sivori permitirían creer, pero en cambio no es necesaria la especificidad animal, y así, lesiones en rata pueden ser tratadas con lisados de órganos de perro, de toro y de cerdo.

En posesión de estos datos, intenté el tratamiento de hombres afectados de colitis ulcerosa con lisados enzimáticos intestinales, por vía oral.

No obtuve ninguna curación y sí sólo ligeras mejorías que podían ser obtenidas con otros medios terapéuticos. Atribuí la causa del fracaso a que las lesiones tenían otro origen que las experimentales, su profundidad, antigüedad, etc.

Si desde este punto de vista fue un fracaso, en cambio pude observar que, siendo los pacientes probados 18, había 10 de ellos que eran hemorroidales crónicos; de éstos, cuatro habían obtenido una gran mejoría de esta afección, y los demás, mejorías evidentes, si bien menos marcadas.

Atribuí este hecho a que los antígenos administrados no habían sido confeccionados con el extremo cuidado con que se preparaban los antígenos destinados a pruebas de reacciones «in vitro» y que el intestino había conservado trozos de vasos sanguíneos.

¿Cuál sería el resultado si estos

pacientes fueran tratados con li-
sados de venas de la pelvis menor?

Suspendí el tratamiento de los
pacientes, dejé que con el tiempo
volvieran a hacer una crisis he-
morroidal para tratarlos con el
nuevo antígeno, y el resultado fue
satisfactorio, mejor que el ante-
rior, pero se presentaron cefaleas,
pruritos, descensos tensionales y
aumentos del tiempo de coagula-
ción con carácter pasajero. Atri-
buí estos hechos a sustancias li-
beradas durante la lisis enzimática
y que quizás no tendrían que ver
con la actividad terapéutica.

Había, pues, que tratar de eli-
minar estas sustancias conservan-
do la actividad específica. No exis-
tiendo animales con manifestacio-
nes hemorroidales, tuve que recu-
rrir a la clínica humana.

No es fácil obtener pacientes que
se presten a la experimentación si
son hemorroidales activos, pero
afortunadamente para el experi-
mentador, hay un gran número de
hemorroidales latentes. Los detec-
té invitando a un numeroso lote
de sujetos a consumir diariamente
durante una semana, sabrosos em-
paredados bien aderezados con pi-
menta y mostaza. Cuando empe-
zaban a notar molestias proseguían
el régimen dos días más. Al sus-
penderlo, no les administré medi-
cación general ni local, y observé
que la restitución a lo normal os-
cilaba entre 10 y 20 días. Unas
cuantas pruebas en un mismo pa-
ciente permiten establecer su «per-
sonal tiempo de recuperación».

Consideré *substantia activa*
aquella que permitía acortar este
«tiempo» por lo menos a la mitad.

En la purificación de la substan-
cia activa tuve numerosos frac-
sos, especialmente al intentar una
alta purificación. Me fueron muy
útiles los trabajos del sueco Per-
now con su «*substantia X*» que es
también un polipéptido, éste aisla-
do del intestino delgado. Esta sub-
stancia está formada por dos poli-
péptidos, uno activo pero que pa-
ra actuar necesita la presencia del
otro, el cual puede ser substituido
por algunos otros polipéptidos dis-
tintos a él.

El polipéptido activo, cuando lle-
va tiempo separado de su activa-
dor, va perdiendo actividad.

Los polipéptidos con actividad
farmacológica, son conocidos ya
de tiempo, pero su comportamien-
to exacto, su composición, sólo
han empezado a esclarecerse desde
que son de uso corriente las téc-
nicas cromatográficas y espectro-
gráficas. Pese a todos estos avan-
ces, sólo un cortísimo número de
estos polipéptidos han llegado a ser
conocidos.

Así la bradikinina, formada por
nueve aminoácidos; la kallidina,
por diez. Ambas derivan de la lisis
enzimática de las seudoglobulinas
del plasma por algunos fermentos
proteolísicos, p. ej. la tripsina, el
veneno de serpiente, los fermentos
enzimáticos de orina humana...

Ambas sustancias, bradikinina
y kallidina, tienen parecida cons-
titución, sólo que la kallidina tie-

ne de más un grupo Lysina. Es interesante que en ambas la arginina ocupe posición terminal.

Las dos sustancias han llegado a sintetizarse a partir de los ésteres de paranitrofenol de los aminoácidos. Es en extremo interesante que para obtener actividad fisiológica hay que respetar el orden de secuencia de los aminoácidos.

Otros polipéptidos son más complejos, así la «sustancia P». También en ella ocupa la arginina una posición terminal en la molécula, pero en vez de los 5-6 aminoácidos (algunos repetidos) que se hallan en las dos sustancias anteriores, aquí hay siete más, distintos.

Esta sustancia y otras, aún no se han logrado sintetizarlas. A medida que se alarga la cadena de aminoácidos aumentan las dificultades de síntesis y no siempre el método de los ésteres de paranitrofenol es utilizable.

Otro método muy interesante es el de la reconstitución de polipéptidos, usando bajas temperaturas, grandes presiones en medios con tampones especiales que conservan a los reactivos en un estado parecido al que precedió a su escisión ezimática.

He recurrido a este método para, aún no poseyendo la sustancia químicamente pura, ensayar de obtener derivados más activos. Sobre los resultados obtenidos nada puedo decir aún; necesito una más larga experimentación. Espero que próximamente podré operar a presiones de mil atmósferas y

lograr éxitos superiores a los actuales.

Nuestra sustancia activa igual que las precedentes descritas contiene arginina. Cuando la pierde, deja de ser activa.

Por cromatografía se demuestra la presencia de: Alanina, Arginina, Asparaguina, Glucocola, Leucina, Metionina, Treonina, Tyrosina, y Valina. Hay además dos manchas de elementos no identificados.

Si sometemos la sustancia a hidrólisis más avanzada (entonces deja ya de ser activa en poco tiempo), estas manchas desaparecen y en cambio aparecen Aspártico, Fenil-alanina, Glutámico e Histidina, y algunas de las manchas de los anteriores aminoácidos aparecen más intensas al haberse liberado del complejo que las unía. Entre las reforzadas destaca la Arginina.

Como caracteres generales de la sustancia, destacaré su gran poder higroscópico, que no cede ni en el vacío sulfúrico y sólo en gran parte en el de anhídrido fosfórico. Su nitrógeno total es de 14,5 y el amínico de 3,6.

En posesión ya de una sustancia activa y libre de otras capaces de provocar reacciones secundarias, faltaba precisar la dosis a usar en experimentación de carácter clínico-terapéutico.

Inicié el tratamiento con los voluntarios del «equipo provocado» a la dosis de 1.000 gammas repetida tres veces al día.

Lo mismo se hizo con dosis de

250 gammas, 100 gammas y 25 gammas y de 5 gammas.

Las dosis de mil, doscientas cincuenta y cien gammas repetidas tres veces al día, dieron resultados igualmente buenos. No se observó que las dosis de mil gammas dieran una más pronta respuesta que las de 100 gammas.

Las dosis de 25 gammas tres veces al día dieron sólo buen resultado en la mitad de los pacientes.

Las dosis de cinco gammas tres veces al día no dieron ningún resultado favorable.

Establecí, pues, como dosis mínima útil, la de 100 gammas repetida tres veces al día, pero como margen de seguridad en la práctica adopté la de 180 gammas repetida tres veces al día, o sea aproximadamente $3/4$ superior a la mínima útil.

Escogí el plexo venoso del cerdo, por ser el más fácil de obtener en mis condiciones de trabajo, pero he experimentado con material procedente de toro, perro y oveja con iguales buenos resultados.

Aunque ninguno de los gérmenes y virus actualmente conocidos resiste los procesos fisico-químicos utilizados en la preparación de la substancia activa, someto los plexos venosos recogidos en el matadero, al serodiagnóstico frente a diversas salmonellas y brucellas y a la siembra de sus filtrados sobre huevo embrionado.

En una planta piloto totalmente aislada, contaminé plexos venosos con esporas de *B. antracis*,

brucella suis y virus vacunal. Estos plexos fueron utilizados para una elaboración, y al final de ella ninguno de los gérmenes vivía o era capaz de reproducirse.

Aunque la substancia activa es estable, su mezcla con hidratos de carbono en medio húmedo y en presencia de algunos metales, puede dar lugar a pérdidas de actividad. Precisa, pues, gran cuidado en la elaboración en gran escala, y es posible el uso de substancias «coating» que impidan los procesos de degradación que químicamente son de difícil detección, pero que hacen disminuir la actividad terapéutica.

Pruebas farmacológicas

Inocuidad: El ratón tolera 37,5 miligramos por kg. de peso.

Pirógenos: 30 mg. vía venosa y 100 mg. vía intramuscular en el conejo demostraron su ausencia.

Teratología: Un lote de 20 ratas hembras divididas en grupos de 4 con un macho cada grupo, recibieron diariamente aproximadamente 3,6 miligramos de preparado. No hubo diferencias de nacimientos frente a otro grupo patrón del mismo número de animales y no tratado. Los animales nacidos de esta experiencia, al llegar a adultos fueron acoplados otra vez y tratados como sus progenitores. Tampoco se observaron diferencias en su descendencia.

Acción sobre la presión sanguínea

En conejos no anestesiados no se observan variaciones con dosis de 20 mg. por kg. de peso. Si los conejos están anestesiados con uretano, ligera hipotensión con 100 gammas.

En el perro anestesiado, la adrenalina y la histamina ven aumentada su acción por la previa administración de 400 gammas de preparado. En cambio, no se observa modificación a la respuesta a la acetil-colina.

El tiempo de recuperación en animales tratados con adrenalina y acetil-colina como estímulos, era más rápido si los animales habían sido sometidos previamente a la substancia problema.

Acción frente a la hipotensión provocada

La hipotensión inducida por la luteoskyrina vuelve a la normal por perfusión del lisado. Esta acción es reproducible en el mismo animal varias veces.

Acción sobre el ventrículo izquierdo artificial

200 gammas no modifican la presión venosa pero aumentan el retorno sin modificar la presión periférica.

Mesoapéndice

El tratamiento previo con lisa-

do disminuye la dosis de adrenalina necesaria para la vasoconstricción.

Intestino aislado

A concentración 10^{-4} , ligera disminución de la amplitud de movimientos.

El lavado recupera la amplitud previa.

A la concentración de 10^{-5} un corto período de contacto no antagoniza la acción de la adrenalina, acetil-colina, histamina y cloruro bórico, pero si dicha concentración actúa un mínimo de 12 minutos, antagoniza las respuestas a la acetil-colina y a la histamina a concentración 10^{-7} .

Acción local: Un lote de 10 conejos fue tratado diariamente durante 5 días con supositorios de mostaza a 1 %, produciéndose intensa hiperemia rectal con lesiones ulcerosas. El tratamiento de estos animales por vía oral, permitió una recuperación en la mitad del tiempo que los testigos.

Estado actual de nuestros trabajos

a) Estudio de la acción del preparado sobre cultivos de tejidos.

b) Estudio de su acción sobre la inflamación «in vivo» y en cultivos integrales de órganos.

c) Obtención de substancias

semisintéticas que permitan mejorar aún la actuación y también hallar las agrupaciones de aminoácidos actuantes.

Hipótesis de la actuación del preparado

Existe la posibilidad de que sean suministradas agrupaciones que actuarían como «modelos» útiles a la regeneración tisular, encaminándolas por vías útiles.

Son bastantes las substancias empleadas en terapéutica cuya actuación intentamos explicar y valorar por la de alguno de sus com-

ponentes o acompañantes, pero vemos que la actuación de la substancia cruda es muy superior y quizás más compleja que los patrones; así sucede, p. ej., con la vitamina B₁₂ y los extractos hepáticos, el complejo B y sus componentes, los extractos cardíacos y el adenosín fosfórico, etc.

Tenemos por delante mucho desconocido; los hombres estamos contentos de lo que hoy sabemos, pero no debemos estar satisfechos, para acercarnos más a la verdad, que cuanto más cercana le parece al profano, más lejana ve el científico.
