

Cátedra de Fisiología Animal Aplicada. Facultad de Farmacia de Madrid.
Sección de Fisiología Comparada del Instituto Español
de Fisiología y Bioquímica.

Las d-peptidasas en el cáncer

por

J. Lucas-Gallego

(Recibido para publicar el 3 de noviembre de 1956)

A partir de los trabajos de KÖGL y ERNLEBEN (29) de 1938 y de CHINALI (13), GRAFF (22) y DITTMAR (14) sobre la existencia en los tejidos cancerosos de d-aminoácidos se realizaron por la escuela de WALDESCHMIDT-LEITZ numerosos trabajos para demostrar la existencia de d-peptidasas en el suero de los enfermos de cáncer y en los animales injertados con cáncer experimental.

EMILIO FISCHER (21), en sus investigaciones sobre las albúminas, llegó a dos consideraciones importantes, una de ellas se refiere a la composición de las proteínas por aminoácidos y otra a la presencia en las mismas de átomos de carbono ópticamente activos. Numerosas investigaciones realizadas en los últimos años conducen a la posibilidad de que existan, en ciertas albúminas, aminoácidos antípodas de la serie de l-aminoácidos. Estas investigaciones también preveen la especificidad de enzimas proteolíticos para las albúminas que contienen d-aminoácidos.

El origen de la investigación de las d-peptidasas tiene su punto de partida en las experiencias de F. KÖGL y H. ERNLEBEN sobre la etiología de los tumores malignos, los que publicaron sus impresiones sobre la existencia de d-aminoácidos en los cuerpos albuminoideos de los tumores malignos y desarrollaron una nueva teoría del cáncer. Los citados autores dedicaron en la época citada sus trabajos al estudio de la química de las albúminas y especialmente al estudio de sus propiedades ópticas en los tejidos afectos de cáncer. De sus investigaciones

dedujeron la existencia en las células cancerosas de d-aminoácidos y de aminoácidos racémicos o desnaturalizados, con predominio entre ellos del ácido glutámico.

Para KÖGL y ERNLEBEN la célula cancerosa ha perdido la susceptibilidad en su estructura albuminoidea y la capacidad para la formación de las albúminas naturales y en su consecuencia desaparecería en la célula la síntesis albuminoidea por el sistema enzimático. Perdería la célula su configuración y adquiriría una estructura extraña que no sería detenida por los fermentos de las células normales o del suero sanguíneo. Por este hecho explicó KÖGL la causa de las infiltraciones y el crecimiento de las células cancerosas. Posteriores experiencias de estos autores llevan el problema a comparar el grado de malignidad del tumor con la racemización de las células cancerosas. Describen la existencia, en el suero sanguíneo de los enfermos cancerosos, de d-peptidasas que desintegran al leucil-glicina racémico. En un gran número de ensayos WALDSCHMIDT-LEITZ y colaboradores (34) observan la coincidencia de la demostración de d-peptidasas en los sueros de enfermos con diagnóstico de cáncer, por lo cual despierta desde entonces un gran interés el estudio de las d-peptidasas en el suero de enfermos de cáncer. La comprobación de d-peptidasas en el suero de enfermos no cancerosos hace que su investigación carezca de especificidad en el diagnóstico del cáncer, aunque tiene indudable valor para el estudio de la célula neoplásica.

H. BAYERLE y F. H. PODLOUCKY (7) en ninguno de los casos investigados han encontrado peptidasas racémicas ni d-peptidasas puras; sin embargo comprobaban la desintegración por el suero de cancerosos de dipéptidos y tripéptidos.

En una serie de investigaciones posteriores, J. BERGER, M. J. JOHNSON y C. A. BAUMANN (11) pudieron demostrar una acción evidente de las d-peptidasas del suero de enfermos cancerosos sobre aminoácidos dextrógiros.

En el campo de estas investigaciones, según E. R. ABDERHALDEN (1), se debe tener en cuenta los siguientes puntos de vista: 1.º Investigar en los tejidos tumorales fermentos que hidrolicen a los d-aminoácidos contenidos en los péptidos. Tales fermentos se llamarían d-peptidasas, se encontrarían en el suero sanguíneo y serían fermentos defensivos formados en el organismo para desintegrar a los d-aminoácidos de las células cancerosas. 2.º La administración a los animales de d-péptidos conduciría a la aparición de d-péptidasas e influiría produciendo inhibición del crecimiento con evolución desfavorable de los tejidos tumorales. WALDSCHMIDT-LEITZ y colaboradores (35) resumen los casos estudiados con intención de aclarar tales pro-

blemas. Estos autores encuentran en el suero de enfermos de cáncer d-peptidasas, en tanto que en el suero de otros enfermos no cancerosos o de sujetos sanos no comprueban tales fermentos. Por inyección de péptidos racémicos a las ratas observan d-peptidasas y por administración de dl-dipéptidos a los ratones impiden el desarrollo de tumores por pincelaciones con benzopireno.

Los trabajos realizados por E. R. ABDERHALDEN, BAYERLE y colaboradores V. EULER y los suyos, no han conseguido comprobar los resultados de las investigaciones de WALDSCHMIDT-LEITS y su escuela.

Presencia de d-peptidasas

a) SUERO SANGUÍNEO HUMANO

Sobre la existencia de d-peptidasas en el suero sanguíneo de enfermos de cáncer, en otras enfermedades y en sanos se han realizado numerosos trabajos. Se comprende fácilmente la importancia que el desarrollo de este problema tiene en Biología, aumentado como consecuencia de los nuevos métodos terapéuticos que se utilizan basados en las propiedades de los isótopos radioactivos, los que, por razones de los modernos métodos empleados para su obtención, son cada vez de más fácil adquisición y manejo. Las observaciones de KÖGL y las primeras comunicaciones de WALDSCHMIDT-LEITZ y MAYER (35) sobre d-peptidasas en el suero abrigan la esperanza de que su observación permita comprobar los efectos de los isótopos radioactivos en el tratamiento del cáncer.

WALDSCHMIDT-LEITZ y MAYER (35) utilizaron en sus primeras investigaciones como sustrato dl-leucil-glicina, dl-glutaminil-glicina y etilester de dl-glutaminil-glicil. Por la acción del suero de cancerosos sobre tales sustratos encontraron una desintegración del 66 a 102 % ; en tanto que por la acción del suero de personas no cancerosas no observaron efectos superiores al 50 %. En un segundo trabajo emplean WALDSCHMIDT-LEITZ, HATCHEK y HAUSMANN sustrato d-leucil-glicil-glicina y determinan el grado de desintegración por métodos colorimétricos. El número de sueros investigados asciende a 100, de los cuales 59 son enfermos de cáncer. En éstos la desintegración oscila entre 0,2 y 7,5 %. Sólo 5 casos tienen reacción negativa. El método, según estos autores, es específico y salvo en algunas excepciones sería específico para la comprobación del cáncer. H. HERTLEN y R. MERTEN (24) emplearon para

sus investigaciones el método manométrico, por medio de aminoácidos obtuvieron resultados favorables para demostrar la acción de d-peptidasas, pero no comprobaron la especificidad, porque en algunos casos de cáncer el resultado fué negativo y positivo en otros de sueros no cancerosos.

Todas estas investigaciones y otras posteriores no han permitido dar a la reacción un carácter de especificidad por las diferencias en los resultados. Las experiencias sobre d-peptidasas utilizando polipéptidos como sustrato han demostrado en los trabajos efectuados con sueros normales un contenido considerable en aminopolipeptidasas y dipeptidasas.

WALDSCHMIDT-LEITZ, HATCHEK y R. HAUSMANN aprecian en el suero de la mayoría de las ratas con carcinoma de WALHER, d-peptidasas que actuaban sobre el sustrato de d-leucil-glicil-glicina sin poderse precisar la relación entre el contenido en d-peptidasas y el estadio del desarrollo del tumor.

La existencia de d-peptidasas en el suero de cancerosos ha sido considerada por WALDSCHMIDT-LEITZ (36) como reacción defensiva, ya que son provocados por la inyección intravenosa de péptidos racémicos en animales normales y puesto que también en el hombre la acción enzimática se puede producir artificialmente.

De la formación de d-peptidasas en el suero como una reacción defensiva deducen WALDSCHMIDT-LEITZ el poder provocar un aumento de las defensas en los casos de cáncer por la inyección de d-péptidos o de péptidos racémicos. En sus investigaciones observaron que la acción cancerígena de la pincelación con benzopireno en el ratón desaparece por la inyección intravenosa de péptidos racémicos y en igual forma deducen que por la administración de extractos de sistema retículo endotelial conducirá a la defensa contra el cáncer.

Piensen los autores citados que la inyección de péptidos en el organismo canceroso, animal o humano, conduciría a que se comportarse como no canceroso por desaparecer la reacción positiva a consecuencia de la falta de acción de las d-peptidasas; una aclaración exacta del fenómeno no ha podido realizarse.

ROTHLIN y GEHLEN (31) demuestran que en los animales tratados con inyección de péptidos disminuía la mortalidad como consecuencia de la acción del benzopireno.

H. BAYERLE y G. BORGER (8) en gran número de casos encontraron desintegración de d-tripéptidos por el suero de cancerosos, en tanto que no observaron desintegración de d-dipéptidos. Así como estos autores encontraron d-peptidasas en la orina de cancerosos que en algunos casos habían dado también resultado positivo en el suero. En posteriores investigaciones

H. BAYERLE y G. BORGER (9) en gran número de casos aprecian la desintegración de d-tripéptidos por el suero de cancerosos y no observaron desintegración de d-dipéptidos. De estas experiencias deducen la existencia de d-peptidasas en el suero de cancerosos irregularmente.

Estos métodos también han sido puestos en práctica por H. BAYERLE y F. H. PODLOUCKY (7) en conejos con tumores y por H. V. EULER y B. SKARRZYNSKI (15). H. BAYERLE y F. H. PODLOUCKY (10), en una serie de investigaciones, encontraron desintegración de d-componentes y de dl-leucil-glicina por el suero de conejos con tumores. H. V. EULER y colaboradores (16) aprecian desintegración de d-leucil-glicina empleada como sustrato. Con la utilización de d-leucil-glicil-glicina observaron regularmente hidrólisis con el suero de conejos con tumor, en tanto que con el suero de animal sano no encontraron ninguna d-peptidasas, H. HERKEN y ERNLEBEN (25).

H. BAYERLE y colaboradores repitieron iguales experiencias y obtuvieron resultados irregulares. Es notable en este conjunto de experiencias una observación de H. HERKEN (26) sobre la desintegración de d-alanil-glicil-glicina por el suero de conejos injertados con tumor experimental.

E. ABDERHALDEN y G. CASAR (2) no pudieron demostrar ningún fermento en la investigación de tres sueros cancerosos que desintegraran al dl-glicil-norleucina o glicil-isoleucina. E. y R. ABDERHALDEN realizan un total de 90 investigaciones en sueros de cancerosos y no cancerosos. En estas experiencias emplean como sustrato d-leucil-glicil-glicina, d-alanil-glicil, glicil-d-leucina y en varios casos también d-alanil-l-triptófano. En tanto que no pudieron demostrar en ningún caso d-peptidasas, encontraron en un 25 % de los sueros de cancerosos d-poli-peptidasas. En un segundo trabajo (3) con los mismos sustratos no encontraron d-peptidasas y sí sólo d-poli-peptidasas. Con el empleo de métodos colorimétricos observaron mayor sensibilidad, pues el número de casos positivos en el suero de cancerosos y de no cancerosos era mayor.

De estos resultados deducen los citados autores que existen d-peptidasas en el suero, que estas enzimas no son características del suero de cancerosos, pues también se encuentran en el suero de no cancerosos sanos o enfermos y de sus experiencias deducen que también se pueden investigar d-peptidasas en la orina.

A los mismos resultados de E. y R. ABDERHALDEN llegan las investigaciones de BAYERLE y PODLOUCKY (7), BAYERLE y BORGER, los que utilizan como sustrato dl-tripéptidos en vez de d-leucil-glicina y l-leucil-glicil-glicina.

V. EULER, con sus colaboradores HALSTRÖN, HÖGBERG, LILJA y SKARZINSKI (17, 18), que trabajaron con d-leucil-glicina como sustrato, encontraron igualmente d-peptidasas, que han observado tanto en el suero de cancerosos como en el suero de no cancerosos. En consecuencia, no demuestran sean específicas para el cáncer. HENKEN y ERXLEBEN observaron en 2/3 de los casos de cáncer desintegración de d-leucil-glicil-glicina de 1,3 hasta 6,6 %. El suero de personas con enfermedades no cancerosas hidrolizaron en pocos casos a dicho tripéptido y cuando se producía acción el grado era de 0,5 a 1,2 %.

URA (33), que trabajó con 41 casos de cáncer y 51 no cancerosos, demostró que la desintegración de péptidos por el suero de no cancerosos asciende al 41 % y por el suero de cancerosos asciende a 53,5 %. Después de la extirpación de los tumores observó una disminución de la actividad del suero para la desintegración de dl-leucil-glicina. BERGER, JOHNSON y BAMANN (11) resumen que operando con suero de cancerosos se produce desintegración de d-leucil-glicina y d-leucil-glicil-glicina.

b) SUERO SANGUÍNEO DE CONEJOS Y RATONES NORMALES
E INOCULADOS DE CÁNCER

E. y R. ABDERHALDEN (l. c.) no encontraron d-peptidasas en el suero de ratas con carcinoma de WALTER o sarcoma de FLESNER. BERGEN, JAHUSON y BAUMANN en el suero de ratas con tumores de FLESNER JOBLING tampoco observaron d-peptidasas. BAYERLE, PODLOUCKY y BORGER, en el suero de conejos inoculados con tumores de BROWN-PEARCE, estudiados en diferentes períodos de su desarrollo, sólo en algunos casos encontraron pequeñas cantidades de d-peptidasas. En el suero de conejos con papilomas no pudieron BAYERLE y colaboradores demostrar ningún fermento que desintegrara a los d-péptidos. En su consecuencia estos autores no pudieron comprobar la importancia de las d-peptidasas en el crecimiento de los tumores.

V. EULER y colaboradores, en el suero de ratas con sarcoma de JENSEN no encontraron ningún fermento que desintegrara a los dipéptidos racémicos por encima de 50 % o atacasen al leucil-glicina o al d-ácido glutámico (32). Con el suero de conejo con tumor de BROWN-PEARCE obtuvieron resultados unas veces positivo y otras negativo.

E. y R. ABDERHALDEN y BAYERLE y colaboradores en el suero de conejos normales no pudieron demostrar peptidasas. V. EULER AHLSTROM y HOGBER observaron alguna desinte-

gración en conejos normales y en los injertados con tumor de BROWN-PEARCE.

Material y métodos

a) DEMOSTRACIÓN DE LAS D-PEPTIDASAS

La determinación de la desintegración de péptidos puede realizarse por la determinación del aumento del grupo carboxilo libre por los métodos de titración en el alcohol según WILLSTATTER, por la formolfiltración según SORENSEN o por la determinación de los grupos aminos libres según los métodos gasométricos de VAN SLYKE.

El más cómodo y en su consecuencia también el método empleado con preferencia es el de titración según WILLSTATTER.

V. EULER y SKARZINSKI (20) y R. ABDERHALDEN (5) consideran como límites de error valores entre 0,1 y 0,15 c. c. Las desintegraciones de péptidos entre 5- 7,5 % y aún hasta 10 % deben ser consideradas, según V. EULER, con prevención y también se ha de considerar con gran cuidado, puesto que por casi todos los autores ha sido observada, una disminución del valor de la titración en el suero control por el método de titración de WILLSTATTER.

También la formoltitración y el método de V. SLYKE tienen errores por lo cual, V. EULER y BAYERLE han empleado diferentes métodos para excluir en sus investigaciones todos los errores posibles.

BAYERLE, en una parte de sus ensayos, emplea la titración según WILLSTATTER y el método de Van SLYKE. V. EULER emplea el método de Van SLYKE y la formoltitración con la modificación de NORTHROP y en una parte de los ensayos empleó también la titración de WILLSTATTER. La concordancia entre los métodos resultó poco satisfactoria, pues mientras en un caso con ambos métodos de titración no encontró desintegración, con la determinación de N. amino obtuvo 12 %. En otro caso con el método de Van SLYKE demostró una desintegración de 19,4 % y con el de formoltitración un 5 %.

WALDSCHMIDT-LEITZ, HATSCHKE y HAUSMANN, así como HERKEN y ERXLEBEN (27), abandonaron los métodos de la titración por los errores que daban en la determinación de la desintegración de péptidos. Con estos métodos observaron que la velocidad de la desintegración de los d-péptidos por suero canceroso era la misma que la encontrada para los l-péptidos.

La determinación colorimétrica ha sido utilizada por E. ABDERHALDEN y A. NEUMAN con la glicocola y con algunos pépti-

CUADRO N.º 1

Sueros de enfermos de cáncer

N.º	Resultados de las pruebas	
	d-l-g-g	dl-leucina
1	1,37	48,20
2	1,67	62,66
3	1,52	69,89
4	3,20	65,07
7	1,98	43,38
10	1,52	48,23
11	2,59	55,43
12	2,74	55,02
17	2,44	19,28
18	1,52	115,27
19	2,28	45,79

CUADRO N.º 2

Sueros de enfermos sin cáncer

N.º	Resultados de las pruebas	
	d-l-g-g	dl-leucina
5	0,15	38,56
6	0,15	72,32
8	0,30	43,38
9	0,00	45,79
12	0,15	38,56
13	0,30	91,58
14	0,15	103,63
16	0,15	101,22
20	0,15	38,56
21	0,15	21,73
22	0,15	50,61
23	0,30	69,89

dos para demostrar la existencia de grupos aminos. De sus trabajos dedujeron estos autores que podría ser utilizada la reacción para la investigación de la desintegración sólo de d-péptidos.

Los errores en este método colorimétrico no deben sobrepasar de 0,5 %. La desintegración realizada debe ser comprobada con soluciones de leucil-glicil-glicina, de leucina y glicil-glicina en las mezclas correspondientes.

E. y R. ABDERHALDEN (4), que buscaban la utilidad del método de investigación, llegaron al resultado de que con su empleo se puede demostrar la desintegración cualitativa de los péptidos, pero no la cuantitativa. Comprueban que tanto en los controles como en las pruebas existen diferentes tonalidades de color y que éstas se alteran muy rápidamente. En cuanto a la sensibilidad son iguales las determinaciones realizadas con la titración de WILLSTATTER y los métodos colorimétricos. HERKEN y HERXLEBEN demuestran esto en la desintegración de d-leucil-glicil-glicina y d-leucina con d-aminoácido oxidasas y por eso utilizan para la determinación del N procedente de la deseminación el método de WARBURG.

Este método manométrico tiene la gran ventaja de que los d-aminoácidos desintegrados se investigan por una reacción específica, pues la hidrólisis de los d-componentes se compara también con el empleo de péptidos racémicos; sin embargo, para d-aminoácidos que reaccionan lentamente, como, por ejemplo, el ácido glutámico destrogro, es menos adecuado este método.

E. y R. ABDERHALDEN emplean para realizar la investigación de d-peptidasas el d-alanil-l-triptófano y comprueban la desintegración del triptófano por la reacción con agua de bromo. Según estos autores el tri péptido no se hidroliza en ningún caso, en tanto que se desintegra el l-alanil-l-triptófano.

b) PREPARACIÓN DE LOS SUSTRATOS

Las primeras investigaciones sobre d-peptidasas se realizaron en gran parte con dipéptidos racémicos (d-leucil-glicina, dl-glutaminil) y se deducía que cuando los dl-dipéptidos eran desintegrados en más del 5 %, entonces existía una acción de las d-peptidasas.

Con el empleo de l-dipéptidos en ensayos breves no siempre se obtenía desintegración del 100 %, sino que observaban hidrólisis por debajo de 50 %, lo que permite deducir la existencia de l-peptidasas. Si los l-dipéptidos son desintegrados en un 30 % y el d-dipéptido en un 15 %, supone una desintegración total de dipéptidos racémicos de 45 %, por lo cual las d-polipeptidasas no pueden ser demostradas con dl-polipéptidos, pues se encontró hidrólisis por encima del 50 %, debido a la presencia de polipéptidos racémicos.

Se ha de contar en todo caso con la inhibición de las d-peptidasas cuando se verifica una desintegración rápida de los d-péptidos.

De este fundamento se pasó pronto al empleo de d-dipéptidos y d-polipéptidos. Los péptidos más utilizados son d-leucil-glicina, d-leucil-glicil-glicina, así como d-alanil-glicil-glicina y glicil-d-leucina, que pueden ser fácilmente desintegrados por la acción de las d-peptidasas.

Por V. EULER se empleó en algunos ensayos un polipéptido del ácido glutámico que fué aislado por BRUCKNER e IVANOVIES (12, 28) de la cápsula de bacilo del carbunco y del bacilo mesentérico.

E. y R. ABDERHALDEN dicen que en estas pruebas es importante conocer la cantidad absoluta de d-péptidos y que se debe conocer el giro óptico de los preparados utilizados.

Con la existencia de pequeñas cantidades de cuerpos racémicos han demostrado también HERKEN y ERNLEBEN la inhibición de la desintegración de los d-péptidos.

Sobre la composición de los péptidos empleados, E. y R. ABDERHALDEN, WALDSCHMIDT-LEITZ y colaboradores han comprobado que la pureza de los péptidos influye considerablemente en la reacción y estos últimos comprueban que el máximo de impurezas racémicas no deben sobrepasar de 2,5 %.

c) CONDICIONES DE LAS PRUEBAS

La clase de sustrato, la concentración en los fermentos de hidrogeniones y la temperatura, se deben tener en cuenta por la influencia que tienen en los resultados, así como es de tener en cuenta el tiempo de observación. WALDSCHMIDT-LEITZ y colaboradores trabajan en un tiempo de ataque de 24 horas. BAYERLE y colaboradores, 72 horas. E. y R. ABDERHALDEN con 24 horas y V. EULER y colaboradores con 100 horas.

El tiempo de duración del ataque es muy importante, pues durante la permanencia en la nevera de los ensayos, se producen importantes alteraciones debidas a los lipoides, albúminas y globulinas, según HUC (30).

V. EULER y SKARZYNSKI realizaron diferentes determinaciones con d-leucil-glicina en horas diferentes y después de realizar iguales pruebas con tiempos diferentes deducen que son comparables entre sí. En cuanto a la duración de los ensayos E. y R. ABDERHALDEN, así como V. EULER y SKARZYNSKI consideran que el tiempo de permanencia en la nevera no debe ser largo para evitar que las alteraciones del suero modifiquen el resultado de las experiencias y calculan que no debe sobrepasar las 48 horas.

El tiempo de permanencia en la nevera ha de ser igual para todas las pruebas al objeto de que cursen en igual forma y puedan ser comparables.

V. EULER y SKARZYNSKI también han deducido de sus observaciones que el d-leucil-glicina se desintegra lentamente y que después de transcurridas 48 horas se producen fenómenos secundarios que alteran los resultados, cualquiera que sea el método empleado.

d) FUNDAMENTOS GENERALES DEL MÉTODO

Para la determinación de los gases en temperaturas constantes, existen en particular dos métodos, el volumétrico y el manométrico; en éste el cálculo depende de las alteraciones de la presión. En cuanto al tipo de manómetro con volumen constante (manómetro de WARBURG y HALDANE BARCROFT) se determina el volumen del gas por acción de las presiones de un nivel constante y se calcula el volumen de los gases desarrollados o absorbidos por la ley de gases teniendo en cuenta la medición del aparato, la temperatura, el volumen relativo del líquido y del gas y el coeficiente de absorción de los gases formados.

La descripción del método exige el conocimiento de los apartados siguientes:

1.º El aparato empleado en estas determinaciones consta de un manómetro de volumen constante que fué utilizado por HALDANE y BARCROFT para la medición de los gases. O. WARBURG mejoró su construcción así como el mecanismo de su empleo y consiste en un manómetro capilar en forma de U que una de sus ramas está en comunicación con las atmósfera y la otra rama se comunica por una llave con el vaso manométrico o depósito de ataque. Este se adapta al tubo correspondiente del manómetro por presión utilizando una grasa consistente o vaselina y se sujeta esta unión por medio de unos muelles metálicos en los salientes del vaso y manómetro.

La parte inferior del manómetro se continúa con un tubo saliente de cristal y éste con otro de goma que se puede unir con un depósito de goma que contiene el líquido manométrico o el mercurio que se ha de emplear para determinar la constante del manómetro.

El tubo de goma por medio de un tornillo se pone en comunicación con el depósito últimamente referido cuando se abre, o se interrumpe la comunicación cuando se cierra.

El manómetro capilar tiene un diámetro de 0,8 a 1,2 mm.

y una graduación en milímetros de 0 a 300 en cada una de sus ramas que se lee de abajo hacia arriba. Este manómetro se apoya sobre un estativo de madera que tiene en la parte anterior un espejo que es la que corresponde a la colocación del manómetro y en la posterior tiene un dispositivo para su colocación en el mecanismo de agitación del termostato.

2.º El líquido que se emplea en el manómetro para hacer la lectura de los resultados es la solución de BRODIE que se prepara de la forma siguiente : se disuelven 23 gr. de Cl Na y 5 gr. de ácido colínico sódico en 500 c. c. de agua y después se agregan unas gotas de una solución alcohólica concentrada de timol. A esta mezcla se agrega eosina para dar coloración a la solución. El peso específico de esta solución de BRODIE en la temperatura de la habitación es de 1,034 y 10,000 mm. BRODIE es igual a la presión normal de 760 mm.

3.º Existen diferentes modelos de vasos de ataque.

4.º Dispositivo de agitación y termostato. Consta de un baño de agua de gran capacidad (aproximadamente 200 l.) agitadas por el sistema de paletas que se mueven por un motor de 500 revoluciones por minuto. El dispositivo de agitación lleva dos conexiones, una A para el agua y otra B para el mecanismo de movimiento de los manómetros que ha de tener de 90 a 100 oscilaciones por minuto. Este dispositivo de agitación para los manómetros consta de 7 ajustes que se pueden utilizar a un tiempo, en cuyo caso se pueden colocar tres pares de manómetros para la prueba y el control y el 7.º se utiliza como termomanómetro. El termostato funciona por un termorregulador que puede ser eléctrico o de gas.

5.º El termomanómetro tiene por objeto comprobar la regulación de la temperatura y su influencia sobre la presión, considerándose aquella constante cuando tiene oscilaciones no superiores a 0,5 mm. de presión.

6.º El vaso de ataque unido al termorregulador se carga con una solución «puffer» de fosfato que se prepara en la forma siguiente : Partiendo de una solución de fosfato potásico primario 1/15 M y de una solución de fosfato sódico secundario 1/15 M. se hacen diferentes mezclas de la primera y de la segunda hasta conseguir un pH aproximado de 7,347 para lo cual se preparan 10 c. c. de la mezcla total y conseguido el pH deseado, se preparan 100 c. c. de la solución. A continuación se esteriliza duran-

te treinta minutos y ha de desarrollarse ésta en tal forma que la concentración sea la misma que la de la solución, para lo cual al hacer la esterilización se ha de emplear un tubo de refrigeración. Las pipetas empleadas en su preparación han de estar esterilizadas y secas.

e) CÁLCULOS DEL METABOLISMO

Para calcular el recambio en un manómetro que trabaja en un volumen a temperatura constante y con un volumen de líquido conocido (V_f), se tiene en cuenta las alteraciones de la presión producida (h) y la cantidad de gas formado o absorbido. Los valores de V_f y de h son positivos en el caso de formación de gases y negativo cuando hay absorción. Los volúmenes se expresan en mm^3 y las presiones en mm. de líquido manométrico

En las fórmulas empleadas a continuación.

P , representa la presión empleada o sea la presión atmosférica.

V_g , es el volumen del espacio del gas en mm^3 .

V_f , volumen del líquido empleado en la determinación en mm^3 .

T , la temperatura absoluta del ensayo.

X , coeficiente de la absorción de BRUSEN de los gases formados.

P_0 , es la presión de una atmósfera expresada en mm. del líquido manométrico (1 at = 10.000 mm. de la solución de BRODIE).

Hemos de tener en cuenta que si se desarrollan $x \text{ cm}^3$ de gases aumenta la presión en el manómetro en : $P + h$.

Si el volumen inicial del gas en el espacio de gases que se deduce de la presión y de la temperatura normal es al comienzo

del ensayo $\frac{P}{P_0} \times \frac{273}{T} \times V_g$; al final del ensayo el volumen de

los gases 0° y 730 mm. será $\frac{P + h}{P_0} \times \frac{273}{T} \times V_g$. y en conse-

cuencia, el aumento de volumen de los gases en el espacio está dado por la diferencia entre la segunda y la primera fórmula, o

sea por $\frac{h}{P_0} \times \frac{273}{T} \times V_g$.

Una parte de los gases formados no estará en el espacio de gases sino que queda disuelto en el líquido. Por mm^3 de líquido y por mm. de solución de BRODIE está disuelto el gas bajo condiciones normales en la forma de $\frac{Po.}{h}$. Así pues, para h mm. de BRODIE y Vf c. c. de líquido asciende la cantidad de gas a $\frac{h}{Po} \times Vf \times x$.

De la suma de esta fórmula con la anterior, se deduce la cantidad total de gases formados a 0° y 760 mm. de Hg. o sea

$$X = h. \left(\frac{Vg \times 273 \times Vf}{T} \right)$$

X, es pues proporcional a h y la expresión entre paréntesis queda constante para las condiciones de los ensayos.

El valor de X es determinado por tablas para cada uno de los diferentes gases, así como para soluciones acuosas.

La expresión porque se multiplica h para obtener el volumen del gas se designa constante, se representa por K, dada por los vasos de Vf. Vg. T y X y es independiente de la presión inicial P.

f) VALORACIÓN DE LA CONSTANTE DE LOS MANÓMETROS

Depósito de ataque

En la reacción ha de utilizarse el manómetro único al vaso de ataque por ajuste directo mediante el empleo de una grasa consistente o vaselina y sujetado uno a otro en la forma que hemos dicho anteriormente.

Como el volumen comprendido entre el depósito y manómetro interesan desde el punto de vista de conocer los resultados de hidrólisis, que buscamos, y dicho volumen es distinto para cada acoplamiento de los manómetros y de los vasos, exponemos a continuación el método para conocer la constante de cada acoplamiento.

Se llena el vaso de ataque de mercurio y se ajusta al manómetro con lo cual pasa Hg. a la rama correspondiente del manómetro que ha de llegar al 15 de la otra rama, si en esta rama sobrepasa el mercurio de 15 se abre la llave para dejar salir el mercurio hasta que se envase exactamente con el 15, si no llegara

a dicha graduación se adapta al manómetro en una pera de goma con mercurio que por presión sube el mercurio en la rama izquierda hasta 15 y se cierra la llave. El mercurio ha de ocupar todo el espacio comprendido por el depósito de ataque, rama del manómetro unida a aquel y de la otra hasta el 15, la primera es la que ha de utilizarse en la prueba para apreciar los resultados. El mercurio no debe contener partícula alguna de gas, estará destilado y sin impurezas.

Realizada esta prueba sobre una cápsula tarada se vacía todo el mercurio utilizado y se pesa. A continuación se deduce el volumen por la fórmula $V = \frac{P}{D}$ de donde para el caso particular del mercurio si el peso obtenido es de 27,567, por ejemplo, su volúmen = $\frac{27,567}{13,52}$ la densidad del mercurio.

Una vez determinado el volumen del espacio dicho (V_g) y conocido el volumen del líquido que se utiliza en la reacción así como el coeficiente de absorción de los gases formados por el líquido, se puede determinar la constante del acoplamiento manómetro y vaso de ataque por la siguiente fórmula :

$$K = \frac{V_g \times \frac{273}{T} \times V_f \times x}{P_o}$$

en donde

K = es la constante que se busca.

V_g = el volumen obtenido.

V_f = el volumen del líquido.

T = $t - 273$.

X = coeficiente de absorción de los gases formados.

P_o = presión normal de 760 mm. de Hg. o 10.000 mm. de BRODIE.

Cuanto más pequeño sea el valor de K tanto más sensible es el método por lo que sólo deben utilizarse aquellos acoplamientos cuyas constantes estén comprendidos entre 0,3 y 2, inferiores acoplamientos a 0,3 supondría el empleo de capilares como manómetros de diámetro inferior a 0,5 mm. que daría lugar a que la tensión superficial modificara los resultados de la lectura.

g) MARCHA DE LA REACCIÓN

Se extraen 10 c. c. de sangre por punción venosa con aguja y jeringa seca y estéril, y separando el suero se procede a hacer

la determinación para lo cual se emplean tres tubos de ensayo esterilizados procediendo en la forma siguiente :

Tubo 1. — 1 c. c. de suero + 2 c. c. de solución «puffer».

Tubo 2. — 1 c. c. de suero + 2 c. c. de solución «puffer» + 2 c. c. de solución de d-leucil-glicil-glicina.

Tubo 3. — 1 c. c. de suero + 2 c. c. de solución «puffer» + 2 c. c. de solución d-leucina.

Se tapan los tubos con algodón estéril y se colocan en la estufa a 37,5° durante tres días.

Transcurridas las 72 horas se toman de cada tubo de ensayo 2 c. c. que se colocan en los 3 depósitos de ataque correspondientes espacio 1, en el espacio 2 se colocan 0,2 c. c. de una solución de sosa y en el espacio 3, 0,5 c. c. de la solución preparada de d-aminoácido oxidasa.

Se emplea la solución de sosa en la proporción de 100 por 100, para lo cual se disuelven 100 grs. de sosa en 100 c. c. de agua esterilizada y destilada. Una vez hecha la solución se conserva en la nevera para su uso a 0° para que no se contamine.

Por último se ajustan los depósitos perfectamente al manómetro correspondiente que ha de ser con el que se ha graduado por medio de una grasa.

A continuación a cada uno de los manómetros en su rama derecha se ajusta la bomba de oxígeno y se abre la llave de ésta hasta que queda la rama derecha del manómetro con el líquido coloreado que hemos dicho anteriormente en 15 o menos, se tiene abierta la llave del depósito de ataque teniendo aun adaptada la bomba de oxígeno abierta para que la rama derecha del manómetro quede aproximadamente en quince. En este momento se cierra la llave del manómetro y a la vez la llave del depósito de ataque. Esta maniobra se va realizando sucesivamente en cada uno de los tres manómetros. De estos manómetros adaptados a los depósitos de ataque, el que contiene la solución «puffer» sirve de termomanómetro como hemos dicho anteriormente. Es de tener en cuenta que los manómetros montados con sus correspondientes depósitos de ataque han de estar ya sobre el termostato del aparato de WARBURG y que todos los manómetros estén regulados de tal forma que la rama derecha quede en 15. Acto seguido se pone en marcha el mecanismo del WARBURG, y cuando salta el «relais» del mismo lo que quiere decir que la temperatura es de 37,5°, como se comprueba en el termómetro, se hace la lectura de los manómetros en la rama izquierda y se anota en la casilla correspondiente de un cuadriculado adaptado al fin propuesto; al hacer esta primera lectura la rama derecha de cada manómetro ha de marcar 15. Se continúa el movimiento hasta que salte de nuevo el «relais» y se procede a hacer nueva lectura

de los manómetros cuyo resultado se anota en las casillas correspondientes y a su derecha las diferencias entre la primera y la segunda lectura.

En igual forma se continúa el movimiento hasta que de nuevo salte el «relais» y se hacen las lecturas que se anotan en la forma dicha, así como sus diferencias. Cuando las diferencias entre los resultados del manómetro es de 0,5 entonces la temperatura es constante y se procede en consecuencia a continuar la metódica. Si sucediese que la rama izquierda sobrepasa la graduación estando la derecha en 15, se abre y cierra rápidamente ésta con lo cual la lectura es factible.

Terminada la anterior operación o sea regulada la temperatura se pone en contacto las tres soluciones del recipiente de ataque, se agita y se continúa el movimiento del WARBURG durante media hora, anotando los resultados (o cuando salte el «relais») y se hace la lectura procediendo en igual forma que en los casos dichos. Las anotaciones y lecturas se han de hacer con rapidez. En las anotaciones se han de expresar además las diferencias entre los resultados alcanzados con los manómetros y con el termomanómetro en otros caracteres distintos de escritura, o en tinta roja. Las diferencias en la lectura de cada manómetro lleva el signo — cuando el manómetro baje y el + cuando sube.

Resultados

Para obtener resultados con el WARBURG se procede en la forma siguiente :

1.º Se averigua la diferencia entre las anteriores lecturas y la nueva que se verifica como queda dicho en la determinación de la d-l,g,g.

2.º Se averigua asimismo las diferencias en el termomanómetro.

3.º Se resta de la primera diferencia la segunda y se anota en rojo el resultado con el signo correspondiente.

4.º En igual forma se procede con la dl-leucina.

5.º Se verifica otra segunda lectura cuando salta de nuevo el «relais» y se procede en igual forma.

6.º Se verifica otra 3.ª y 4.ª lectura anotando en todo caso los tiempos entre cada lectura hasta que las diferencias entre los resultados de la d-l,g,g y el termomanómetro y la dl-leucina y el termomanómetro no sean superiores a 0,5.

7.º A continuación se suman las cifras negativas de las casillas rojas de las determinaciones realizadas, el resultado de estas sumas indica la desintegración de la d-leucil-glicil-glicina

c de la dl-leucina, cuando es superior a 0,5. Por debajo de esta cifra no hay desintegración y el resultado es, por lo tanto, negativo.

8.º Después se procede a determinar la cantidad por ciento de sustancias desintegradas con arreglo a la fórmula siguiente :

$$a) \text{ Para la d-leucil-glicil-glicina } \% : \frac{x (k \times 0,0025 \times 100)}{0,56}$$

$$b) \text{ Para la dl-leucina } \% : \frac{x' (k \times 0,0025 \times 100)}{0,028}$$

En estas fórmulas,

x, es la cantidad de d-leucil-glicil-glicina y x' la de dl-leucina obtenida en las sumas de las diferencias negativas rojas.

k, es la constante del manómetro-depósito de ataque empleado en la determinación.

0,00125, es la cantidad de N pesada en mgr. correspondiente a 1 c. c. de la solución de aminooxidasa.

0,56, es la cantidad de N en mgr. por c. c. contenido en la solución de d-leucil-glicil-glicina.

0,028, es la cantidad de N en mgr. por c. c. contenido en la solución dl-leucina.

Expuesto todo lo que se refiere al fundamento del método, preparación y desarrollo de la técnica, pasamos a describir las experiencias realizadas y resultados de éstas.

Las pruebas realizadas corresponden a los dos grupos siguientes :

- I. Sueros sanguíneos de enfermos de cáncer.
- II. Sueros sanguíneos de otros enfermos.

Grupo I.

El cuadro número 1 recoge los resultados en los enfermos correspondientes a este grupo.

La desintegración del sustrato de d-leucil-glicil-glicina por el suero de los enfermos oscila entre 1,37 y 3,20 % ; la desintegración del sustrato dl-leucina alcanza cifras que varían entre 19,28 y 115,27 %. La desintegración del sustrato d-leucil-glicil-glicina es menor con los sueros de enfermos no cancerosos.

Grupo II.

En el cuadro número 2 se presentan las pruebas en enfermos no cancerosos.

La hidrólisis del sustrato d-leucil-glicil-glicina oscila entre 0 y 0,30 % y en el sustrato dl-leucina entre 21,73 y 103,63 %. La actividad de las d-peptidasas es pequeña y la de las dl-peptidasas alta.

Discusión

De la comparación entre los resultados obtenidos con el suero de los enfermos cancerosos y de los sueros procedentes de no cancerosos, se deduce claramente que la hidrólisis del sustrato d-leucil-glicil-glicina es mayor por los sueros de enfermos de cáncer que sobrepasa en todos los casos la cifra de 1,37. En los sueros no cancerosos la cifra máxima alcanzada es de 0,30 %. Los resultados de la hidrólisis del sustrato dl-leucina son similares para unos y otros sueros. En los primeros oscila entre 19,28 y 115,27 y en los segundos varía de 21,73 a 101,27. Existe una inestabilidad evidente de la hidrólisis para el resultado dl-leucina por unos y otros sueros.

La comprobación de las d-peptidasas en los sueros sanguíneos nos ofrece las siguientes conclusiones:

1.^a El suero sanguíneo tiene la propiedad de hidrolizar los sustratos sintéticos de d-leucil-glicil-glicina en pequeña proporción.

2.^a El poder de desintegración del mismo sustrato es mayor con el suero de enfermo de cáncer. A estos fermentos por actuar sobre los dextroaminoácidos se llaman d-peptidasas.

3.^a Por la escasa actividad que tienen los sueros sanguíneos frente al sustrato d-leucil-glicil-glicina, así como por los errores que tiene el método, la valoración de la acción de las d-peptidasas no es útil para el diagnóstico del cáncer.

Resumen

La hidrólisis del sustrato d-leucil-glicil-glicina es mayor por los sueros de enfermos de cáncer que sobrepasa en todos los casos la cifra de 1,37. En los sueros no cancerosos la cifra máxima alcanzada es de 0,30 %. Los resultados de la hidrólisis del sustrato dl-leucina son similares por unos y otros sueros. En los primeros oscila entre 19,28 y 115,27 y en los segundos varía de 21,73 a 101,27. Existe una inestabilidad evidente de la hidrólisis para el resultado dl-leucina por uno y otros sueros.

El suero sanguíneo tiene la propiedad de hidrolizar sustratos sintéticos de d-leucil-glicil-glicina en pequeña proporción.

El poder de desintegración del mismo sustrato es mayor con el suero de enfermos de cáncer.

Por la escasa actividad que tienen los sueros sanguíneos frente al sustrato d-leucil-glicil-glicina, así como por los errores que tiene el método, la valoración de la acción de las d-peptidasas no es útil para el diagnóstico del cáncer.

Summary

D-peptidases in cancer

To demonstrate d-peptidases the Warburg manometric method has been used.

This method has the great advantage that the desintegra-

ted d-aminoacids are investigated by a specific reaction, as the hydrolysis of the d-components is also compared with the employment of racemic peptides.

The class of substrate, the hydrogen ion concentration in the ferments and the temperature, just as the observation time, should be taken into account for their influence on the results.

The substrates employed are the peptides d-leucil-glycil-glycine and dl-leucine and d-amino acid oxidases, which can be easily hydrolysed by enzyme action.

To calculate the exchange in a manometer which works at a constant temperature and with a volume of known liquid (Vf), the change in pressure produced (h) and the quantity of gas formed and absorbed are noted. The values Vf and h are positive in case of gas formation and negative when there is absorption. The volumes are expressed in cubic millimeters and the pressures in millimeters of manometer liquid.

In the reaction the manometer must be united to the reaction flask by direct adjustment by means of a consistent fat or vaseline and supported one to the other in the form we have already described.

As the volume between reaction flask and manometer are necessary in order to know the results of the hydrolysis which we seek, and as this volume is different for each joining of manometers and flask, the constant of each joining is previously evaluated.

Progress of the reaction. — 10 c. c. of blood are extracted intravenously with a dry sterile syringe and needle, and having separated the serum the determination is made using three sterile test tubes in the following manner :

Tube 1. — 1 c. c. serum + 4 c. c. buffer solution.

Tube 2. — 2 c. c. serum + 2 c. c. buffer solution + 2 c. c. solution of d-leucil-glycil-glycine.

Tube 3. — 1 c. c. serum + 2 c. c. buffer solution + 2 c. c. d-leucine solution.

The tubes are closed with sterile cotton and put in the incubator at 37.5° C. for three days.

After 72 hours, 2 c. c. is taken from each test tube and placed in the three corresponding reaction flask space 1, in space 2, 0.2 c. c. of a solution of soda is placed and in space 3, 0.5 c. c. of a prepared solution of d-aminoacid oxidase.

A 100 % soda solution is employed, by dissolving 100 g. of soda in 100 c. c. of distilled sterile water. Once the solution has been prepared it is kept in the refrigerator at 0° until its use to avoid contamination. Lastly the flasks are joined per-

fectly each one to its corresponding manometer which must be that to which it has been graduated by a fat.

Now the oxygen cylinder is attached to the right arm of each manometer and its stopper opened until the right arm of the manometer containing coloured liquid reaches fifteen or less. The stopper of the approach deposit is left open at the same time as the oxygen cylinder so that the right arm of the manometer remains at approximately fifteen. At this point the stopper of the manometer is closed at the same time as that of the reaction flask (4). This manoeuvre is performed successively in each of the three manometers. Of these manometers attached to the reaction flask the one containing the buffer solution is used as a thermomanometer. It should be noted that the manometers mounted with their corresponding reaction flask must be over the Warburg apparatus thermostat and that all the manometers must be regulated so that the right arm is at 15. Immediately the Warburg mechanism is started and when the «relais» of this jumps, which means that the temperature is at 37.5°C ., as checked on the thermometer, the manometer, reading in the left arm is taken and noted in the corresponding square of a quadricle adapted for this purpose; for this first reading the right arm of each manometer must mark 15. The movement is continued until the «relais» jumps again and a new reading is taken of the manometers, noting the result in the corresponding squares and to their right the differences between the first and second reading.

In the same way the movement is continued until once again the «relais» jumps and the readings are made and noted as above, with their differences. When the differences between the results of the manometer is 0.5 then the temperature is constant and as a consequence the method may be continued. If the left arm passes the graduation while the right is at 15, the latter is opened and closed rapidly thus enabling the reading to be taken.

Having finished the previous operation, that is having regulated the temperature, the three solutions of the reaction flasks are put into contact with each other and shaken, the movement of Warburg is continued for a half an hour, noting the results (or the jumping of the «relais»), and the reading is made as previously. The annotations and readings must be made rapidly. In the annotations the differences between the results obtained with the manometers and with the thermomanometer must be also expressed in different writing characters or in red ink. The differences in the reading of each manometer is marked —when the manometer descend and — when it ascends.

To obtain results. — To obtain results with the Warburg the following method is used.

1° The difference between the previous readings and the new one is calculated and verified as previously stated in the determination of the d-l-g, g.

2° In the same way the differences are ascertained in the thermomanometer.

3° The second difference is subtracted from the first and the result is noted in red with the corresponding sign.

4° In the same way the dl-leucine is treated.

5° A second reading is taken when the «relais» again jumps, and the same procedures are carried out.

6° Another 3rd and 4th reading are obtained noting in each case the time between each reading until the differences between the results of the d-l-g-g and the thermomanometer and the dl-leucine and the thermomanometer are not greater than 0.5.

7° Then the negative figures in the red squares of the determinations made are added, the result of these sums indicate the disintegration of d-leucil-glycil-glycine or of dl-leucine when it is greater than 0.5. Below this figure there is no disintegration and the result is therefore negative.

8° Afterwards the percentage of substance disintegrated is determined according to the following formula :

$$a) \text{ for d-leucil-glycil-glycine } \% : \frac{x (k \times 0.0025 \times 100)}{0.56}$$

$$b) \text{ for dl-leucine } \% : \frac{x' (k \times 0.0025 \times 100)}{0.028}$$

In these formulas,

x , is the quantity of d-leucil-glycil-glycine and x' , that dl-leucine obtained in the sums of the red negative differences.

k , is the constant of the manometer reaction flask employed in the determination.

0.00125, is the quantity of N weighed in mg. corresponding to 1 c. c. of the amino-oxidase solution.

0.56, is the quantity of N in mg. per c. c. contained in the solution of d-leucil-glycil-glycine.

0.028, is the quantity of N in mg. per c. c. contained in the solution dl-leucine.

The tests realised correspond to the two following groups.

1. Blood serums of cancer patients.

2. Blood serums of other patients.

The disintegration of the substrate of d-leucil-glycil-glycine by the serum of patients oscillates between 1.37 and 3.20 per cent ; the disintegration of the substrate of dl-leucine reaches figures which vary between 19.28 and 115.27 %. The disinte-

gration of the substrate of d-leucil-glycil-glycine is less in the serum of non-cancerous patients.

The hydrolysis of substrate d-leucil-glycil-glycine oscillates between 0 and 0.30 % and in the substrate dl-leucine between 21.73 and 103.63 %. The activity of d-peptidases is slight and that of dl-peptidases is high.

Because of the slight activity possessed by the blood serums on the substrate d-leucil-glycil-glycine, and also the errors in the method, the evaluation of d-peptidase action is not of use for the diagnosis of cancer.

Bibliografía

- (1) ABDERHALDEN, E. R. : *Z. physiol. Chem.*, **265**, 253, 1940.
- (2) ABDERHALDEN, E. y GASAR, G. : *Fermentf.*, **16**, 299, 1940.
- (3) ABDERHALDEN, E. R. : *Fermentf.*, **16**, 339, 1940.
- (4) ABDERHALDEN, E. R. : *Z. physiol. Chem.*, **270**, 1, 1941.
- (5) ABDERHALDEN, E. R. : *Fermentf.*, **16**, 339, 1941.
- (6) ABDERHALDEN, E. y NEUMANN, A. : *Z. Physiol. Chem.*, **238**, 177, 1936.
- (7) BAYERLE, H. y PODLOUCKY, F. H. : *Z. physiol. Chem.*, **264**, 189, 1940.
- (8) BAYERLE, H. y BORGER, G. : *Biochem. Z.*, **307**, 159, 1941.
- (9) BAYERLE, H., BORGER, G. y PODLOCKY, F. H. : *Biochem. Z.* **307**, 303, 1941.
- (10) BAYERLE, H. y PODLOUCKY, F. H. : *Biochem. Z.*, **304**, 259, 1940.
- (11) BERGER, J., JOHNSON, M. J. y BAUMANN, C. A. : *J. Biol. Chem.*, **137**, 389, 1941.
- (12) BRUCKNER, V. y IVANOVICS, G. : *Z. physiol. Chem.*, **247**, 281, 1937.
- (13) CHINALL, y MITARB : *Nature*, **144**, 71, 1939.
- (14) DITTMAR : *Z. Krebsforsch.*, **49**, 397, 442, 1939.
- (15) EULER, H. v. y SKARZYNSKI, B. : *Hoppe-Seylers, Z.*, **265**, 133, 1940.
- (16) EULER, H. v. y MITT. : *Z. Krebsforsch.*, **51**, 248, 1941.
- (17) EULER, H. v. y SKARZYNSKI : *Sr. Vet. Akad. Archiv. Kemi.*, **14**, B. Nr. 2, 1940.
- (18) EULER, H. v., AHLSTRÖM, L. y HÖGBERG : *Z. Krebsforsch.*, **51**, 1941.
- (19) EULER, H. v., AHLSTRÖM, L. y HÖGBERG, B. : *Z. Krebsforsch.*, **5**, 248, 1941.
- (20) EULER, H. v. y SKARZYNSKI, B. : *Z. physiol. Chem.*, **265**, 133, 1940.
- (21) FISCHER, E. : *Untersuchungen über Aminosäuren, Polipeptide Proteine* 2 Bande, Berlín, Julius, Springer, 1906 y 1923.
- (22) GRAFF : *J. biol. Chem.*, **130**, 13, 1939.
- (23) HALDAME, J. S. : *J. physiol.*, (Brit.), **28**, 232, 1902.
- (24) HERKEN, H. y MERTEN, R. : *Hoppe-Seylers, Z.*, **270**, 201, 1941.
- (25) HERKEN, H. y ERKLEBEN : *Hoppe-Seylers, Z.*, **264**, 251, 1940.
- (26) HERKEN, H., SHMITZ, A. y MERTEN : *Naturwiss.*, **29**, 670, 1941.

- (27) HERKEN, H. y ERXLEBEN, H. : *Z. physiol. Chem.*, **269**, 47, 1941.
- (28) IVANOVICS, G. y BRUCKNER, V. : *Z. Immun.forsch.*, **90**, 304, 1937.
- (29) KÖGL y ERXLEBEN : *Z. physiol. Chem.*, **258**, 57, 1939. KÖGL : *Klin. Woch.*, **18**, 801, 1939.
- (30) MOUSSERON y HUC, H. : *C. r. Soc. Biol. Paris*, **132**, 151, 1939.
- (31) ROTHLIN, E. y GEHLEN, W. : *Schweiz. Med. Wschr.*, **71**, 303, 1941.
- (32) SKARZYNSKI, B. y EULER, H. v. : *Sv. Vet. Akad. Archiv. Kemi.*, **14**, B. Nr. 3, 1940.
- (33) URA, SETSUO : *Jap. Jour. Cancr, Rev.*, **35**, 29, 1941.
- (34) WALDSCHMIDT-LEITZ, E., HARSCHKE, R. y HAUSMANN : *Hoppe-Seylers, Z.*, **267**, 79, 1940-41.
- (35) WALDSCHMIDT-LEITZ, E. y MAYER, K. : *Z. physiol. Chem.*, **262**, IV, 1939.
- (36) WALDSCHMIDT-LEITZ, E. y MIT. : *Hoppe-Seylers*, **263**, 1, 1940.