

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

Valoración de las radiaciones por D-peptidasas

por

J. Lucas-Gallego

(Recibido para publicar el 23 de noviembre de 1956)

Las variaciones que experimentan las d-peptidasas por radiaciones, similares a las que se producen sobre los fermentos defensivos de ABDERHALDEN, comprobados por LUCAS GALLEGO (1), nos han inducido a analizar este trabajo, que tiene por objeto comprobar el aumento de su actividad por acción de las radiaciones y su aplicación para valorar biológicamente los efectos de las radiaciones sobre los tejidos y sus funciones.

A pesar del tiempo transcurrido desde el descubrimiento de las radiaciones X y de las α , β y γ del radium, así como del conocimiento de las acciones biológicas de estas radiaciones, la dosificación de las mismas se hace por medios físicos. Las dosificaciones biológicas no han tenido aplicación a consecuencia de la distinta sensibilidad que tienen las células, según el individuo, a la acción de las radiaciones.

El descubrimiento por F. e I. JOLIOT-CURIE, en 1934, de los isótopos radioactivos y la serie de descubrimientos posteriores han puesto en la mano de los biólogos una serie de nuevos elementos radioactivos que se caracterizan por la emisión de radiaciones electromagnéticas γ , radiaciones corpusculares α y β , protones y neutrones, de aplicación en Biología como los anteriores.

Estos radioelementos artificiales son susceptibles de una acción biológica análoga a la de los rayos X o a las radiaciones de los cuerpos radioactivos naturales sobre los tejidos fisiológicos y patológicos y las funciones orgánicas.

Como cada radioelemento tiene un metabolismo especial al introducirlo en el organismo animal, presenta localizaciones electivas, que permiten analizar la función de determinados órganos, como el tiroides con el yodo.

Se puede realizar con ellos una irradiación electiva y homogénea, a veces aun intracelular, de ciertos órganos o sistemas de órganos.

Su dosificación está también en la época actual basada en sus propiedades físicas, y como la sensibilidad de los tejidos a las radiaciones es distinta para cada individuo, se deduce la importancia que tiene conseguir métodos biológicos de valoración.

De los resultados obtenidos por las numerosas investigaciones realizadas hasta hoy puede deducirse que los isótopos radioactivos son útiles en Fisiología experimental, tanto para el estudio de las funciones de órganos y sistemas como para conseguir técnicas terapéuticas que permitan la perfección de su empleo.

Tanto en Terapéutica como en Fisiología es preciso disponer de métodos biológicos que permitan valorar los efectos de las radiaciones procedentes de los medios utilizados, con lo que se evitarían los inconvenientes de las actuales condiciones físicas.

Activación de las D-peptidasas por acción de las radiaciones

Diferentes investigaciones se han realizado para demostrar la acción de los rayos ultravioleta. Se sospecha que los fenómenos de mutación que se producen en las células son debidos a alteraciones químicas de un fermento, y se cree en la actividad de ciertos enzimas para producir la desintegración de los d-péptidos, a los que se cree causantes también de una mutación cancerígena. Existe, según v. EULER, AHLSTRON y HOGBERG (4), la posibilidad de producir, por la irradiación con rayos ultravioleta del suero, un aumento en la acción de las d-peptidasas. Estos autores observaron después de media hora de irradiación, con una lámpara de cuarzo a la distancia de 24 cm., del suero de tres ratas normales, previo enfriamiento, d-peptidasas que desintegran al d-leucil-glicina durante 94 a 113 horas en una proporción aproximada del 16 por 100 hasta el 34 por 100; irradiados los mismos animales, no aparece esta actividad o sólo en pequeñas proporciones. En trabajos posteriores, v. EULER y sus colaboradores (5-6) obtienen resultados negativos en el suero de ratas y en el suero de conejos normales o injertados con tumores de Brown-Pearce.

Los citados autores emplearon también radiaciones Ront-

gent (1.000 r), y en el mayor número de los casos observaron d-peptidasas. Por la irradiación con rayos ultravioleta de leucocitos de caballos no demostraron la aparición de d-peptidasas.

Estos ensayos de v. EULER y sus colaboradores no fueron confirmados por otros. BAYERLE y BORGER (3) irradiaron el suero de un conejo bajo diferentes condiciones como v. EULER con una lámpara de cuarzo, y también con dosis elevadas de radiaciones Rontgen (200, 500, 600 y 5.000 r). Sus experiencias dieron resultados negativos. E. y R. ABDERHALDEN (2) utilizaron cinco sueros humanos, de los que tres eran de cancerosos, que irradiaron con lámpara de cuarzo, sin que en ningún caso comprobasen la aparición de d-di o polipeptidasas, y en los que ya existían no se reforzaba su acción. Tampoco pudieron demostrar una influencia sobre las l-dipeptidasas del suero por irradiación ultravioleta. Los resultados de estas experiencias de E. y R. ABDERHALDEN están en contradicción con las experiencias hechas con fermentos defensivos eliminados por la orina (1). Estos mismos autores han demostrado en la orina de los animales radiados no sólo el aumento de la actividad de las proteinasas defensivas, sino también la aparición de enzimas anespecíficos que desintegran a sustratos diferentes en tanto mayor proporción cuanto mayor es la cantidad de radiaciones. LUCAS GALLEGO (1) demuestra el aumento de actividad de estas proteidasas en los sujetos cancerosos por acción de las radiaciones con dosis terapéuticas de excitación; con dosis elevadas también confirma la aparición de fermentos anespecíficos, que desintegran a sustratos distintos de los tejidos patológicos.

Material y métodos

Técnica de la reacción

En las experiencias realizadas por nosotros para comprobar la desintegración del sustrato d-leucil-glicil-glicina por el suero sanguíneo, y la evolución de la hidrólisis por las radiaciones de corta longitud de onda empleadas en dosis terapéutica, hemos empleado el método manométrico.

Los métodos manométricos, que han sido principalmente utilizados por O. WARBURG (7), se utilizan para la medición de un gran número de reacciones químicas, enzimáticas y en particular para la medición de los fenómenos metabólicos de las células vivas y de los extractos de células.

Preparación de los sustratos

En la reacción se emplean para sustrato de las pruebas la d-leucil-glicil-glicina; para sustrato control, la d-leucina,

y como sustrato que activa la fermentación, d-aminoácido-oxidasa. La preparación de estos sustratos se realizan en la forma siguiente :

I. D-LEUCIL-GLICIL-GLICINA

Se parte de este aminoácido obtenido sintéticamente, y después de haber comprobado en el polarímetro el giro del mismo. Para ello se toman 2 g. de d-leucil-glicil-glicina y 100 c. c. de agua destilada o la proporción correspondiente según la capacidad de los tubos del polarímetro. Si los tubos del polarímetro son de 10-11 c. c. de capacidad, como en nuestro caso, se toman 0,4 g. de polvo de d-leucil-glicil-glicina y 20 c. c. de agua destilada en matraces perfectamente tarados. A continuación, con esta solución se llenan los tubos del polarímetro y, si no ha quedado burbuja alguna de aire en el tubo, se puede comenzar a determinar la desviación que sufre el polarímetro, procediendo después en la forma siguiente :

Se determina tres veces la desviación polarimétrica y se averigua la media de las tres determinaciones. En la d-leucil-glicil-glicina empleada por nosotros obtuvimos los siguientes resultados :

1.^a, 2,10; 2.^a, 2,05; 3.^a, 2,03; Mf, 2,06

Se procede a hacer la proporción siguiente para obtener la desviación polarimétrica y su resultado nos sirve para comprobar si el sustrato es utilizable para la prueba.

$$D = \frac{100}{d p}$$

En esta fórmula tenemos que :

D = media de la desviación obtenida en el polarímetro

d = cantidad de líquido empleado para la lectura

p = concentración en gramos por 100 c. c.

En su consecuencia con la d-leucil-glicil-glicina empleada, obtenemos los siguientes resultados :

$$(X)_D^{20^\circ} = \frac{2,06 \times 100}{2 \times 2} = \frac{206}{4} = 51,5$$

Para comprobar su utilidad hicimos la valoración de un sustrato de d-leucil-glicil-glicina, que dió los resultados siguientes :

$$1.^{\circ}=2,08 ; \quad 2.^{\circ}=2,09 ; \quad 3.^{\circ}=2,07$$

La cantidad de producto empleado por 20 c. c. fué de 0,4002. De donde resulta que, aplicando la fórmula polarimétrica antes descrita, tenemos

$$(X) \frac{20^{\circ}}{D} = \frac{2,08 \times 100}{2,08 \times 2,001} = \frac{208}{4,002} = 51,96$$

De la proximidad de los resultados se dedujo que el producto obtenido fuese perfectamente utilizable para las pruebas.

A continuación se prepara una solución de d-leucil-glicil-glicina con 0,1225 g. de ésta en 10 c. c. de la solución «puffer» antes preparada a un pH de 7,4 y que corresponde a un valor en N de 0,56.

II. DL-LEUCINA

De este aminoácido se toman 0,05244 g. que se disuelven en 100 c. c. de agua destilada y estéril que corresponde a un valor en N de 0,28. Esta solución y la anterior han de hacerse en recipientes pasados por la mezcla crómica, lavados con agua destilada y secados en la estufa a 100°.

III. PREPARACIÓN DE LA D-AMINOÁCIDO-OXIDASA

Se pica un riñón fresco de cerdo hasta que quede reducido a papilla, y a continuación se mezcla con seis veces su cantidad de acetona. El total se filtra por un filtro Buchner ; el resto del filtrado se trata de nuevo con igual cantidad de acetona durante diez minutos y se filtra en igual forma por el filtro de Buchner.

El residuo se lava con una mezcla a partes iguales de acetona-éter, y por último, éter solamente en la cantidad de un litro aproximadamente. Por último se coloca en el desecador de vacío a 0° C. sobre ácido sulfúrico, como adsorbente, hasta que el preparado esté libre de acetona. Este preparado debe ser hecho cada dos meses, y de él se parte para hacer la siguiente solución.

Solución de d-aminoácido-oxidasa : 1,5 g. de d-aminoácido-oxidasa se mezclan con 20 c. c. de la solución «puffer» des-

crita con un pH de 7,4 y se agita en un Erlenmeyer durante diez minutos largos, se centrifuga durante igual tiempo y se filtra con ayuda de un filtro de precipitados. Esta solución se prepara para cada determinación y en cada una de ellas se utiliza, como veremos, 0,5 c. c.

Resultados

Hemos realizado un total de 43 pruebas, distribuidas en los cuatro grupos siguientes :

I. Sueros sanguíneos de enfermos de cáncer tratados por radiaciones, con pruebas antes y después del tratamiento.

II. Sueros sanguíneos de enfermos de cáncer sin tratamiento por radiaciones, con dos pruebas.

III. Sueros sanguíneos de otros enfermos tratados por radiaciones, con pruebas antes y después del tratamiento.

IV. Sueros sanguíneos de otros enfermos sin tratamiento por radiaciones, con pruebas antes y después del tratamiento.

Corresponden : al grupo I, 16 pruebas en 8 casos ; al grupo II, 6 en 3 casos ; al grupo III, 12 en 6 casos ; y al grupo IV, tres ensayos con doble prueba y otro con prueba sencilla, o sea, en total, 43 pruebas.

GRUPO I

Los resultados obtenidos en las pruebas de este grupo, o sea en sueros sanguíneos de enfermos de cáncer tratados por radiaciones con pruebas antes y después del tratamiento, se reúnen en el cuadro número 1.

CUADRO I

Sueros de los enfermos de cáncer tratados por radiaciones

N.º	Dosis en röntgen (r)	Resultado de la prueba antes del tratamiento		Resultado de la prueba después del tratamiento		Diferencia entre ambos resultados	
		d-l-g-g	d-l-leuc.	d-l-g-g	d-l-leuc.	d-l-g-g	d-l-leuc.
1	4.000	1,37	48,20	2,74	91,58	+ 1,37	+ 43,38
2	6.500	1,67	62,66	11,50	81,94	+ 9,83	+ 19,28
3	4.200	1,52	69,89	2,59	96,40	+ 1,07	+ 26,51
4	3.750	3,20	65,07	3,48	115,32	+ 0,28	+ 50,25
5	5.600	1,98	43,38	1,52	40,97	- 0,46	- 2,41
10	2.600	1,52	48,23	1,52	40,97	0,00	- 7,23
11	3.500	2,59	55,43	3,40	89,17	+ 0,81	+ 33,74
12	4.200	2,74	55,02	3,20	124,96	+ 0,43	+ 69,94

Observamos en este grupo que la desintegración del sustrato de d-leucil-glicil-glicina por el suero de los enfermos, antes del tratamiento, oscila entre 1,37 y 3,20 por 100, en tanto que la desintegración del sustrato dl-leucina alcanza cifras que varían entre 43,38 y 69,59 por 100. La desintegración del primer sustrato es escasa, si bien, como veremos más adelante, es mucho menor con los sueros de enfermos no cancerosos. Después del tratamiento se aprecia en seis de los casos una elevación del poder de desintegración de ambos sustratos, oscilando la diferencia para la d-leucil-glicil-glicina de 0,28 a 9,83 y de 19,28 a 69,94 para la dl-leucina. Existe, en efecto, una activación de d-peptidasas y de l-peptidasas, o sea que la acción de las radiaciones es manifiesta sobre ambos fermentos. Sobre la influencia que la cantidad de radiaciones pueda tener sobre la actividad de estos fermentos observamos que el mayor aumento de la actividad de la d-leucil-glicil-glicina es de 9,83 y que corresponde a la mayor cantidad de radiación utilizada, 6.500 r., en el caso número 2. Sin embargo, en el enfermo número 15, tratado con 5.200 r., la actividad sólo aumenta 0,28 por 100 del primer sustrato, en tanto que en el caso número 1, tratado con 4.000 r., hay un aumento de 1,37. De estos resultados se deduce que, si bien en algunos casos la mayor actividad se corresponde con la mayor radiación, en otros casos no existe tal correspondencia. En la desintegración del sustrato dl-leucina observamos que la menor actividad de la hidrólisis corresponde a la mayor cantidad de radiación, y si bien en el caso número 2 sucede que hay mayor aumento en la actividad de d-peptidasas, corresponde el menor aumento de l-peptidasas, y en el número 15, a menor aumento de actividad de d-peptidasas corresponde mayor actividad en l-peptidasas. Existen casos como el 3 y el 11 en los que, con poco aumento en la actividad de d-peptidasas, existe poco aumento también de l-peptidasas.

En este cuadro llama también la atención que los casos 7 y 10, en la segunda prueba, dan disminución en la actividad de la hidrólisis para el sustrato dl-leucina y para el sustrato d-leucil-glicil-glicina en el número 7, sin experimentar variación para este sustrato en el número 10.

Estos resultados hacen pensar que las radiaciones inhiben también en algunos casos la acción de los fermentos.

GRUPO II

Los resultados correspondientes a este grupo se reúnen en el cuadro número 2. Comprende dos pruebas de cada caso, y para cada sustrato, y con un intervalo de 10 días. Aprecia-

mos que la desintegración del sustrato d-leucil-glicil-glicina oscila entre 1,52 y 2,44 por 100, y del dl-leucina, entre 19,28 y 115,27 por 100 en la primera prueba; en la segunda prueba se observa un ligero aumento de la hidrólisis del primer sustrato de 0,11 a 0,31 por 100; en el segundo sustrato aumenta en dos casos y disminuye en el otro. Las diferencias que se acusan en el sustrato de d-leucil-glicil-glicina son escasas, debidas a errores del cálculo o a persistencia del proceso; por tanto, las d-peptidasas experimentan escasas variaciones espontáneamente. Más acusadas son las diferencias en más o en menos sobre el resultado de dl-leucina.

CUADRO II

Sueros de enfermos de cáncer sin tratamiento

N.º	Primer resultado de la prueba		Segundo resultado después de 10 días		Diferencia entre ambos resultados	
	d-l-g-g	d-l-leuc.	d-l-g-g	d-l-leuc.	d-l g-g	d-l-leuc.
17	2,44	19,28	2,55	52,62	+ 0,11	+ 33,34
18	1,52	115,27	1,70	79,53	+ 0,28	+ 45,74
19	2,28	45,79	2,59	76,80	+ 0,31	+ 31,01

Las l-peptidasas experimentan variaciones amplias. Esto demuestra que la interpretación de los resultados de la acción del suero sobre los sustratos de dl-leucina carecen de valor en absoluto.

GRUPO III

El cuadro número 3 corresponde a este grupo, o sea a sueros sanguíneos no cancerosos tratados por radiaciones. En los resultados de este cuadro observamos que la hidrólisis del sustrato d-leucil-glicil-glicina antes del tratamiento oscila entre 0 y 0,30 por 100, y la del sustrato dl-leucina, del 43,38 al 72,32 por 100.

Después de la acción de las radiaciones existen variaciones para el primer sustrato entre - 0,15 por 100 y + 1,68 por 100, y para el segundo entre - 2,43 por 100 y + 38,56 por 100.

Es de notar la evidente influencia que existe entre la cantidad de las radiaciones empleadas y el aumento de actividad de las d-peptidasas. Las cantidades hasta 600 r. no ejercen acción alguna y hasta en algún caso inhibición (caso número 8, tratado con 600 r.). Con dosis superiores a 2.500 r. es

CUADRO III

Sueros de otros enfermos tratados por radiaciones

N.º	Dosis en röntgen (r)	Resultado de la prueba antes del tratamiento		Resultado de la prueba después del tratamiento		Diferencia entre ambos resultados	
		d-l-g-g	d-l-leuc.	d-l-g-g	d-l-leuc.	d-l-g-g	d-l-leuc.
6	300	0,15	72,32	0,15	69,89	0	— 2,43
8	600	0,30	43,38	0,15	45,79	— 0,15	+ 2,41
9	200	0	45,79	0,15	65,07	+ 0,15	+ 19,28
21	300	0,15	21,73	0,15	48,20	0	+ 26,47
22	2.500	0,15	50,61	1,52	89,17	+ 1,37	+ 38,56
23	3.500	0,30	69,89	1,98	96,40	+ 1,68	+ 26,51

clara la acción de las radiaciones sobre el aumento de actividad de la hidrólisis del sustrato de d-leucil-glicil-glicina.

La acción sobre l-peptidasas es igual a la que hemos observado en los grupos anteriores analizados.

GRUPO IV

En el cuadro número 4 se presentan los casos de este grupo. En él se aprecia desintegración del sustrato d-leucil-glicil-glicina, que varía de 0,15 a 0,30 por 100, y del sustrato dl-leucina, que oscila entre 38,36 y 103,63. La actividad de las d-peptidasas es escasa, y alta la de las l-peptidasas. La modificación de la hidrólisis por acción del tratamiento no radiológico para el primer sustrato es de 0,15 a 0 por 100 y para el segundo sustrato, de 21,59 a +12,05 por 100. Son escasas las oscilaciones

CUADRO IV

Sueros de otros enfermos sin tratamiento por radiaciones

N.º	Tratamiento	Resultado de la prueba antes del tratamiento		Resultado de la prueba después del tratamiento		Diferencia entre ambos resultados	
		d-l-g-g	d-l-leuc.	d-l-g-g	d-l-leuc.	d-l-g-g	d-l-leuc.
5	Médico	0,15	38,56	0,15	19,28	0	— 19,28
12	Operada	0,30	91,58				
13	Quirúrgico	0,30	50,61	0,15	28,92	— 0,15	— 21,69
14	Operada	0,15	103,63				
16	Operada	0,15	101,22				
20	Operada	0,15	38,56	0	50,61	— 0,15	+ 12,05

que sufre la actividad de las d-peptidasas y altas las que experimentan las l-peptidasas. También se deduce, para estos casos, que la hidrólisis del sustrato d-leucil-glicil-glicina es baja y la de dl-leucina es elevada. No existe aumento de la actividad de las d-peptidasas por el tratamiento y las l-peptidasas experimentan oscilaciones en ambos sentidos.

Discusión

En cuanto a la acción de las radiaciones, observamos en los cuadros 1 y 2 que las radiaciones aumentan la actividad de las d-peptidasas en los sueros radiados, salvo en los casos 7 y 10. Existe un aumento entre 0,28 por 100 y 9,83 por 100. En los no radiados, la diferencia entre la primera y la segunda prueba hecha con diez días de intervalo sólo existe un aumento de 0,11 a 0,31 por 100. En estos resultados se comprueba un aumento de la actividad de las d-peptidasas por las radiaciones y no se aprecian diferencias de la hidrólisis del sustrato dl-leucina, que no guarda relación alguna en su acción.

El aumento de la hidrólisis del sustrato d-leucil-glicil-glicina por el suero de enfermos de cáncer radiados, es evidente en seis casos de ocho. La cantidad de radiaciones no influye en los resultados negativos. En el cuadro número 3, sin embargo, se comportan los resultados sobre el sustrato de d-leucil-glicil-glicina en relación con la cantidad de radiaciones, pues los sueros radiados con 2.500 y 3.500 r. aumentan la actividad de las enzimas.

Las variaciones en la acción de d-peptidasas de los sueros sanguíneos por acción de las radiaciones nos ofrecen las siguientes conclusiones :

1.^a Las radiaciones elevan la hidrólisis del sustrato de d-leucil-glicil-glicina.

2.^a El aumento de la desintegración espontánea del sustrato por los sueros de enfermos de cáncer no radiados es inferior a la provocada por los sueros de sujetos radiados.

3.^a La determinación de d-peptidasas en los sueros de cancerosos por el método de Warburg son útiles para valorar cualitativamente la acción de las radiaciones sobre los tejidos.

4.^a Por la similitud en el mecanismo de acción sobre los tejidos y sus funciones de las radiaciones procedentes de los rayos X, con las que emanan de los cuerpos radioactivos y de los isótopos radioactivos, deducimos que la determinación de las d-peptidasas constituye un método para hacer una valoración biológica cualitativa de todas las radiaciones.

5.^a Dada la importancia que en la época actual tienen los

isótopos radioactivos, la determinación de d-peptidasas ha de ser útil en la aplicación de estos elementos, tanto en Fisiología como en Terapéutica.

Summary

Evaluation of irradiation by the D-peptidase activity

The object of this work is to test the increase in the activity of d-peptidases under the influence of radiations and its application to the biological evaluation of the effects of irradiation on the tissues and their functions.

In the experiments realised to test the disintegration of the substrate d-leucil-glycil-glycine by blood serum and the evolution of hydrolysis by short-wave irradiations employed in the therapeutic doses, we used WARBURG manometric method.

In the reaction, d-leucil-glycil-glycine is used as test substrate, d-leucine as control substrate and d-aminoacid oxidase as substrate activating the fermentation.

The preparation of these substrates is brought about in the following way.

We have performed a total of 43 tests distributed in the following four groups :

- 1) Blood serums of cancer patients treated by irradiation tested before and after treatment.
- 2) Blood serums of cancer patients untreated by irradiation on which two tests were performed.
- 3) Blood serums of other patients treated by irradiation tested before and after treatment.
- 4) Blood serums of other patients without irradiation treatment tested before and after treatment.

Group 1. — In this group we observe that the disintegration of the substrate d-leucil-glycil-glycine by the serum of patients, before treatment oscillates between 1.37 and 3.20 per 100, while the disintegration of the substrate dl-leucine reaches figures which vary between 43.38 and 69.59 %. Disintegration of the first substrate is slight, although, as we shall see further on, it is much less in the serums of non-cancerous patients. After the treatment, in 6 of the cases an elevation of the disintegration power of both substrates is appreciated, the difference oscillating between 0.28 and 9.83 for d-leucil-glycil-glycine and between 19.28 and 69.94 for dl-leucine. In effect there exists an activation of d-peptidases and of l-peptidases, that is to say the action of irradiation on both ferments is manifest. On the influence which the quantity can have on the activity of these ferments we observe that the greater in-

crease of d-leucil-glycil-glycine activity is from 9.83 and corresponds to the greater quantity of irradiation utilised, 6500 r. in case N.º 2. However in patient N.º 15 treated with 5200 r., activity increased by only 0.28 % on the first substrate, while in case N.º 1 treated with 4000 r. there is an increase of 1.37. From these results it is deduced that although in some cases greater activity corresponds to greater irradiation, in others there is no such correspondence. In the disintegration of substrate dl-leucine we observe that the lesser activity of the hydrolysis corresponds to the greater quantity of irradiation and although case 2 shows a greater increase in d-peptidase activity there is a corresponding smaller increase in l-peptidases and in N.º 15 a greater activity of l-peptidases corresponds to a lesser increase in d-peptidase activity. There exist cases like N.º 3 and N.º 11 in which a slight increase in d-peptidase activity is accompanied by a slight increase in l-peptidase.

In this table it is noteworthy that cases 7 and 10 in the second test give diminution of hydrolysis activity for substrate dl-leucine, and for substrate d-leucil-glycil-glycine in N.º 7 without variation for this substrate in N.º 10.

Group 2.— The results corresponding to this group include two tests of each case for each substrate with an interval of 10 days between each test. It is found that the desintegration of substrate d-leucil-glycil-glycine oscillates between 1.52 and 2.44 % and that of dl-leucine between 19.28 and 115.27 % in the first test, in the second test a slight increase in hydrolysis of the first substrate 0.11 to 0.31 % is noted; and in substrate 2 it is increased in two cases and diminished in the other. The differences noted in substrate d-leucil-glycil-glycine are slight, due to calculation errors or to persistence of the process, therefore the d-peptidases experiment slight variations spontaneously. The differences more or less in the result of dl-leucine are more marked.

The l-peptidases suffer wide variations. This shows that the interpretation of the results of serum action on the substrates of dl-leucine are of absolutely no value.

Group 3.— This group is that of blood serums of non-cancerous but irradiated patients. In the results it is observed that hydrolysis of the substrate d-leucil-glycil-glycine before treatment oscillates between 0 and 0.30 % and that of substrate dl-leucine between 43.38 % and 72.32 %.

After the action of irradiation there exist variations for the first substrate between -0.15 % and $+1.68$ % and for the second between -2.43 % and 38.56 %. It is noteworthy the

evident influence which exists between the quantity of irradiations employed and the amount of activity of the d-peptidasas. Quantities up to 600 r. do not exert any action and even in some cases may cause inhibition, as in case 8 treated with 600 r. With doses greater than 2500 r. it is clear that the irradiation causes increase in hydrolysis activity of the substrate d-leucil-glycil-glycine.

The action on l-peptidasas is the same as that observed in the group previously analysed.

Group 4. — In this group disintegration of the substrate d-leucil-glycil-glycine which varies between 0,15 and 0,30 % and of substrate dl-leucine oscillating between 38,36 and 103,63 is noted. The activity of d-peptidasas is slight and that of the l-peptidasas great. Modification of hydrolysis by action of non-radiological treatment is from 0,15 to 0 % for the first substrate and from 21,59 to +12,05 % for the second. The oscillations suffered by d-peptidase activity are slight and by that of l-peptidase great. Also it is deduced for these cases that the hydrolysis of substrate d-leucil-glycil-glycine is low and that of dl-leucine raised. There is no increase in the activity of d-peptidasas on treatment and the l-peptidasas show oscillations in both directions.

Variations in d-peptidase action of blood serums due to the action of irradiation permits us to draw the following conclusions :

1.^a Irradiation raises the hydrolysis of substrate d-leucil-glycil-glycine.

2.^a Increase in spontaneous disintegration of substrate by the serums of non-irradiated cancer patients is less than that provoked by the serums of irradiated subjects.

3.^a Determination of d-peptidasas in the serum of cancerous patients by the WARBURG method is useful to evaluate qualitatively the action of irradiation on the tissues.

4.^a Due to the similarity in mechanism of action on the tissues and their functions between the irradiation proceeding from X-rays and that emanating from radio-active bodies and radio-active isotopes, we deduce that the determination of d-peptidasas constitutes a method of making a qualitative biological evaluation of all irradiations.

5.^o Given the importance of radioactive isotopes in the present epoch, determination of d-peptidasas should be useful in the application of these elements in Physiology as in Therapeutics.

Bibliografía

- (1) ABDERHALDEN, R. : *Fermentforschung*, **16**, 2, 1940 Cit. por LUCAS GALLEGO, Tesis doctoral, 1942, *Medicina*, 1944.
- (2) ABDERHALDEN, F. : *Z. physiol. Chem.*, **270**, 1, 1941.
- (3) BAYERLE, H., y BOEGER, G. : *Biochem. Z.*, **307**, 159, 1941.
- (4) EULER, H. v., AHLSTROM, L., y HOGBERG, B. : *Dtsch. med. Wschr.* 1078, 1940.
- (5) EULER, H. v., AHLSTROM, L., SKARZYNSKI, B., y HOGBERG, B. : *Z. Krebsforsch.*, **50**, 552, 1940.
- (6) EULER, H. v., AHLSTROM, L., HOGBERG, B., y LIHJA, A. W. : *Z. Krebsforsch.*, **51**, 248, 1941.
- (7) WARBURG, O. : *Biochem. Z.*, **242**, 1, 1931.