

R. 14931

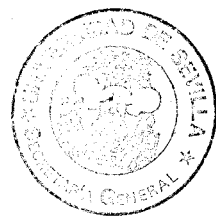
T.D.
5/44

INVESTIGACIONES SOBRE LA CATEPSINA DEL JUGO GASTRICO.
SU PAPEL EN LA DIGESTION ESTOMACAL.

Trabajo que presenta

FRANCISCO SEGOVIA GARCIA.

Para aspirar al Grado de Doctor en Farmacia



UNIVERSIDAD DE SEVILLA

Depositado en
de la
de esta Universidad desde el día
hasta el día

Sevilla de de 19

EL DIRECTOR DE

50
1001K

Sevilla Mayo 1987

UNIVERSIDAD DE SEVILLA
SECRETARIA GENERAL



Queda registrada esta Tesis Doctoral
al folio 211 número 20 del libro
correspondiente

Sevilla, 3 MAR. 1988

El Jefe del Negociado de Tesis,

F. Jaffite



UNIVERSIDAD AUTONOMA DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE MEDICINA SOCIAL
Y PREVENTIVA

D. JUAN DEL REY CALERO, CATEDRATICO DE MICROBIOLOGIA Y PARASITOLOGIA E HIGIENE Y SANIDAD; DIRECTOR DEL DEPARTAMENTO DE MEDICINA PREVENTIVA Y SALUD PUBLICA

H A C E C O N S T A R :

Que el trabajo titulado "Investigaciones sobre la Catepsina del Jugo gástrico, su papel en la digestión estomacal," realizado por D. FRANCISCO SEGOVIA GARCIA, ha sido realizado bajo mi dirección para pretender aspirar al Grado de Doctor en Farmacia.

Y para que conste, firmo la presente en Madrid, a dieciseis de Febrero de mil novecientos ochenta y ocho.

ILMO, SR. PRESIDENTE DE LA COMISION DE DOCTORADO DE LA UNIVERSIDAD DE SEVILLA.-

INVESTIGACIONES SOBRE LA CATEPSINA DEL JUGO GASTRICO.

SU PAPEL EN LA DIGESTION ESTOMACAL.

Resume este trabajo la labor de varios años. Iniciado en el Laboratorio de Investigaciones Bioquímicas de la cátedra del Profesor M. Díaz Rubio (Laboratorio que tuve el honor de dirigir), enfocó como primer objetivo, el conocimiento de la enzima para ulteriores trabajos de índole clínica. Estos primeros ensayos se hicieron sobre jugo gástrico humano, y no obstante haber llegado a algunas conclusiones, plasmadas en sendas comunicaciones, encontramos, como era lógico suponer, ciertas limitaciones inherentes unas, al material humano empleado y otras al conocimiento, bastante limitado, que teníamos y tenían los autores, de los aspectos físico-químicos de la enzima.

Es cierto que la inocuidad de las técnicas empleadas y el considerable número de alumnos y enfermeras voluntarias (así como de enfermos), nos permitían un amplio campo de acción; pero a pesar de ello, tuvimos que recurrir al animal de experimentación, siendo de elección en nuestro caso, el perro, por su docilidad ante las intervenciones que se practicaron, y por la analogía de su comportamiento gástrico.

Más tarde, en el curso de nuestros trabajos, pudimos comprobar que no era este el animal ideal para tales ensayos. Tenía algunos inconvenientes, entre ellos, la constancia con que se manifestaba el pH de ayunas y si bien esto, desde el punto de vista fisiológico, era normal, nos cerraba el paso para una serie de especulaciones en torno a la actividad de la catepsina cuando era segregada en estómagos con pH de variada acidez. Por ello de nuevo volvimos al material humano, máxime, al comprobar en el perro, que los tamponamientos de estómagos a diversos pH (incluso alcalinos) eran totalmente inocuos con los tampones de citrato-fosfato que empleamos.

Otra de las ventajas de material humano era la posibilidad de hacer estudios en torno a la influencia de moco gástrico, el cual se encuentra a veces con abundancia en estómagos irritados por los sondajes en sujetos de constitución nerviosa. Esto lejos de ser un inconveniente, nos permitió hacer interesantes observaciones y hasta sugerir la posibilidad de una técnica analítica para valorar la influencia de este componente en la actividad gástrica.

Como hemos dicho, estos trabajos los iniciamos en el Laboratorio de Investigaciones Bioquímicas de la Cátedra del Profesor M. Díaz Rubio. Por su traslado a la Universidad Central y subsiguiente desaparición de nuestro específico Laboratorio, hubimos de instalarnos para continuar nuestros trabajos en el Laboratorio de Análisis de la Facultad (en el Hospital de las Cinco Llagas), hasta que dicho edificio fue clausurado.

Ulteriormente y ante la decisión personal de orientar nuestra actividad profesional, hacia la especialidad de "Análisis Bioquímico-Clinicos" decidimos la creación de los llamados "Laboratorio Reunidos de Análisis Clínicos" con sus tres especialidades: Bacteriología (a cargo del Prof. J. Rey Calero), Histo-Patología (Dr. D. Calvente), y Bioquímica (yo, personalmente). Montada mi sección con los requerimientos de material inherente a estas técnicas, me permitió llevar a ella las específicas de mis trabajos de investigación, con la gran comodidad para mí de tener instalados los Laboratorios Reunidos en mi propio domicilio, lo que significaba un gran ahorro de tiempo.

Y así, hasta la terminación de este proyecto de Tesis Doctoral.

Consta este trabajo de dos partes: en la Parte Teórica exponemos los fundamentos y antecedentes de los distintos puntos desarrollados. En la Parte Experimental, presentamos los protocolos experimentales correspondientes.

En una y otra parte, tocamos los siguientes puntos:

- 1º.- Técnica personal de valoración de la catepsina del jugo gástrico y establecimiento de una UNIDAD DE CATEPSINA.
 - 2º.- Estudios sobre la cinética de la catepsina gástrica.
 - 3º.- Activadores e inactivadores de la enzima.
 - 4º.- Experiencias con pepsina cristalizada.
 - 5º.- Ensayos para la identificación de un inactivador natural de la enzima.
-

PARTE TEORICA

Empezamos por impugnar el vocable "catepsina" ya que segun se desprende de nuestras experiencias, la enzima proteolitica asi llamada y segregada por el jugo gastrico, no responde enteramente a las características de fermento catéptico. Preferimos llamarla, como algunos autores, "segunda proteasa gástrica". Sin embargo, el nombre "catepsina" es tan general, que no podemos prescindir de su uso; por lo cual, en el curso de nuestro trabajo, emplearemos indistintamente ambas denominaciones.

Constituye tambien un error (aqui un error de concepto) con el consiguiente perjuicio para el conocimiento de la fisiopatologia gástrica, considerar como coexistentes, la hiperacidez y la hiperfermencia por un lado y la hipoacidez y la hipofermencia por otro. De esta consideracion parti6 una de las directrices de nuestras determinaciones.

Por ello, entre otros motivos, y dado que en última instancia lo que nos interesa, desde el punto de vista fisiológico, es la capacidad digestiva o agresora del jugo gástrico en su relacion con la acidez (libre y combinada), este es un analisis parcial e insuficiente, dado que la proteolisis es una accion genuinamente enzimatica, que se realiza en funcion de un determinado pH y que no va necesariamente ligada a aquella.

Tal accion habia sido adjudicada a la pepsina, fermento que requiere para su accion un pH muy bajo, del orden de $\text{pH} = 1,9$ con substrato de hemoglobina y de $\text{pH} = 2,2$ con substrato de edestina.

La pepsina no es, sin embargo, la única proteasa gástrica. Aunque ya en 1929 WILLSTAETTER y BAMANN (1) demostraron que los extractos de mucosa gástrica tenian actividad enzimatica semejante a la catepsina de otros 6rganos, no consiguieron encontrar dicha actividad en el jugo gástrico y la consideraron ligada a las células. La escasa actividad catéptica del jugo, la interpretaron como procedente de leucocitos extravasados.

Por esta razon, dichos autores titularon su publicacion "Ensayos sobre enzimas de los leucocitos". Tal fermento proteolitico lo identificaron

a la beta-proteasa de Hedin. Creyeron además que el fermento sería una endoenzima y que solo actuaría en forma de gránulos o suspensiones en la pared del estómago y que no pasaba al jugo. De esta forma establecen una oposición entre la catepsina como endoenzima y la pepsina como exoenzima.

Dichos autores han buscado pepsina, tripsina y erepsina en el jugo gástrico, neutralizado en parte por el jugo duodenal de reflujo, pero creyeron innecesario investigaciones sobre catepsina, perdiéndose la oportunidad de llevar alguna luz al mecanismo, muy confuso entonces, de la digestión de las proteínas en el estómago.

Las curvas obtenidas por WILLSTAETTER y BAMANN con extractos de mucosa, son muy parecidas a las nuestras, hechas con jugo gástrico. Encontraron a pH = 4,0 un efecto hidrolítico superior al conseguido a pH = 2,0. Las actuaciones residuales vistas por ellos a pH = 5,0 las interpretan como impurezas de erepsina.

A partir de los trabajos de FREUNDENBERG y BUCHS en 1940, estudiando el proceso digestivo de los niños, es cuando se comienza a prestar atención a la catepsina del jugo gástrico, cuya importancia se deduce de considerar el pH óptimo a que se verifica la escisión de los prótidos. En efecto, en gran número de niños normales (y en adultos) rara vez se logra, después de la comida, un pH óptimo para la pepsina a pesar de que la actividad proteolítica del jugo sigue muy alta. Tal sucede también en los ancianos y en ciertos estados clínicos.

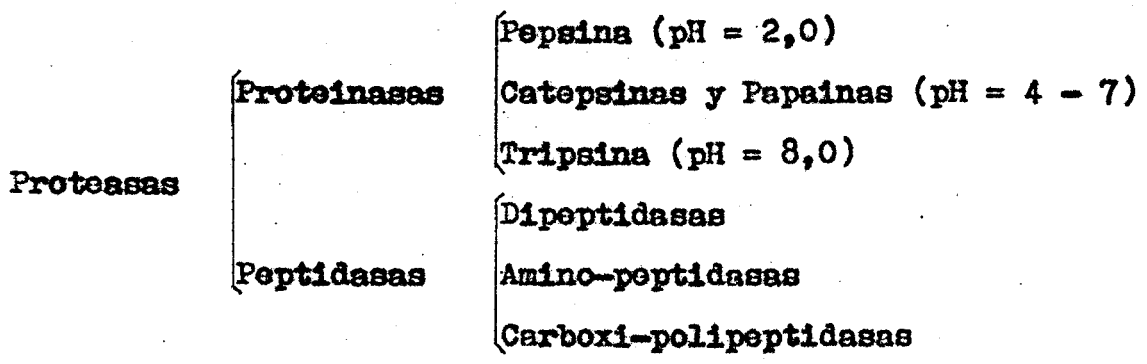
A dichos autores se debe la plena confirmación de que la enzima es segregada por la mucosa gástrica y que se encuentra en el jugo en notable cantidad. Completaron sus investigaciones con series de experiencias en las que llegan a las siguientes conclusiones:

- 1º.- Pobreza de leucocitos en la mucosa gástrica normal.
- 2º.- Pobreza de catepsina en exudados ricos en leucocitos, en comparación con la riqueza de catepsina de los jugos pobres en leucocitos.
- 3º.- Relación constante entre la pepsina y la catepsina en todos los jugos normales examinados.

4ª.- Igualdad de la relacion pepsina/catepsina en jugos y extractos de mucosa. Si la catepsina estuviera unida solamente a las células, se tendria que dar en los preparados comerciales, una diferencia a su favor; lo cual no ocurre.

5ª.- Imposibilidad de separar la pepsina de la catepsina.

GRASSMANN (3) ha preconizado una nomenclatura de las proteasas que ha sido universalmente aceptada y define como tales: las enzimas cuya accion se basa en el desdoblamiento de péptidos por hidrólisis, tanto de los enlaces CO-NH como de los enlaces CO-N . La clasificacion es la siguiente:



El medio debilmente acido en que se situa la segunda proteasa gástrica (pH = 3,4 con substrato de edestina, pH = 3,7 con sustrato de gliadina y pH = 4,5 con substrato de gelatina) presta a este asunto particular interes. A pesar de ello ha sido pequena la atencion que se le ha prestado.

Aparte del trabajo de FREUNDENBERG y BUCHS sobre cinética del fermento que les indijo a considerarlo como una catepsina por su activacion por el SH₂ y el CNH mas otros caracteres, Ha sido MERTEN (4) y MILHAUD y EPINEY (5) los unicos que se han interesado por el problema.

No obstante el reducido número de trabajos sobre este tema, los resultados obtenidos por los autores son discordantes. Asi: MILHAUD y EPINEY trabajando con pepsina cristalizada (que tiene ambas proteasas) no han visto inactivacion por CNH ni por SH₂ , ni tampoco por la cistina, por lo que niegan la presencia de radicales SH-; o sea, niegan que se trata de una catepsina. Por otro lado, MERTEN, empleando hemoglobina como substrato, en vez de edestina, no ve tampoco inactivacion por SH₂ o por CNH, lo cual puede atribuirse, considerando los datos de BUCHS (6), a que, conteniendo la hemoglobina activadores naturales, antuarian estos directamente antes o al liberarse en el curso de la hidrolisis enmascarando la accion de aquellos.

Por todo esto y pensando en investigaciones futuras, hemos creído interesante, revisar la cinética de dicha proteasa catéptica para así formar un juicio propio y conocer el modo de acción en las condiciones experimentales que juzgamos más adecuadas (7).

Hemos establecido una técnica personal de valoración de la catepsina, que juzgamos de suficiente exactitud, así como la correspondiente UNIDAD DE CATEPSINA (8).

Las experiencias fueron hechas simultáneamente con jugos de perro y humano, aunque después se siguiera solamente con este último por sus grandes ventajas en todos los aspectos. Hemos estudiado el comportamiento de la enzima en función de la temperatura, tiempo de hidrólisis, concentración de enzima y del sustrato, así como de la concentración de hidrogeniones. Además, se ha ensayado el efecto de la alcalinización, del SH_2 y del CNH como datos más importantes en el estudio de la cinética.

Paralelamente al jugo gástrico, hemos empleado la pepsina cristalizada que está al margen de la posible influencia de los componentes normales del jugo y hemos confrontado los resultados. Empleamos para ello pepsina cristalizada MERCK en solución al 0,42 % en ClH N/33 . Se eligió tal concentración para obtener hidrólisis cuantitativamente comparables a las obtenidas con jugo gástrico.

El concepto de especificidad de la enzima, debemos vincularlo a la especificidad del sustrato así como a su comportamiento ante las distintas concentraciones de hidrogeniones y a la acción de los efectores (activadores e inactivadores).

Respecto al primer factor, la catepsina debe clasificarse como una proteínasa, puesto que actúa sobre proteínas de alto peso molecular; hidroliza también numerosos derivados de di- y tri-péptidos. A este respecto debemos recordar que las enzimas proteolíticas se han clasificado en proteasas y peptidasas. Las primeras incidían las proteínas así como las proteasas, peptonas y polipéptidos. Estos a su vez son hidrolizados por las peptidasas dando una mezcla de aminoácidos. El concepto de especificidad en este caso, parece que va vinculado al peso molecular del sustrato. Las primeras actúan sobre sustratos de alto peso molecular y las segundas

sobre substratos de menor peso molecular. Pero ninguna base química respalda esta concepción.

Se han clasificado también las proteinasas en tres grupos. Así:

1º.- Catepsinas y pepsina que actúan sobre proteínas cationes.

2º.- La tripsina, que actúa sobre proteínas aniones.

3º.- Las papainas que actúan como anfólitos.

O sea; las primeras actúan sobre el grupo amino de los enlaces peptídicos; las segundas, sobre el grupo carboxílico; las terceras sobre ambos indistintamente.

Este concepto de especificidad está universalmente aceptado, pero varios autores han encontrado acciones enzimáticas con liberación de una considerable cantidad de aminoácidos. La teoría es por otra parte insatisfactoria porque deja sin aclarar, si los puntos de ataque han sido elegidos al azar o si la acción va dirigida hacia puntos concretos y cual es su naturaleza específica.

Una molécula proteica contiene varios centenares de residuos que representan unos 20 aminoácidos diferentes. Cada aminoácido se repite periódicamente a lo largo de la cadena proteica, lo cual marca su característica biológica. La influencia de estas secuencias encuentra también expresión en la conducta enzimática ante la ligadura peptídica sobre la que actúa. La sensibilidad de esta ligadura está determinada principalmente por la naturaleza de los grupos aminos adyacentes.

Sin embargo; se han usado péptidos de síntesis sobre los cuales se ha probado la acción hidrolizante de algunos fermentos. Así; se ha hecho actuar la pepsina sobre la glicil-1-glutamil-1-tirosina y la carbobenzoxi-1-glutamil-1-tirosina. Ambos substratos se comportan igualmente, separando un resto de 1-tirosina.

La catepsina del bazo del buey también actúa sobre la carbobenzoxi-1-glutamil-1-tirosina, liberando tirosina, aunque también lo hace sobre la benzoil-1-arginina, liberando el resto amídico y sobre la carbobenzoxi-1-leucin-glicil-glicina, liberando un resto de glicina. Actúan por tanto sobre tres substratos distintos con hidrólisis igualmente diferentes.

También de estas experiencias podemos sacar la conclusión de que siendo la pepsina y la catepsina dos proteasas que actúan sobre substratos de

alto peso molecular, tambien actuan sobre substratos, como los citados de peso molecular bajo.

Naturaleza de las ligaduras incididas por las proteinasas.

GRASSMANN (9) postuló, que despues de la hidrolisis, el número de restos amínicos y carboxílicos, era el mismo, pero despues se comprueba que incidia tambien el grupo imínico de la prolina.

LINDERSTRON-LANG y JOHEN (10) aventuraron una interesante hipótesis segun la cual las proteinas nativas no contenian ligaduras "atacables" directamente por las proteinasas. La forma desnaturalizada de las proteinas, es presumible, contienen mayor número de enlaces peptídicos, susceptibles de ser atacados. Cuando la proteinasa digiere un substrato parcialmente desnaturalizado, aumenta el número de enlaces "atacables". Es presumible que las cantidades de proteina nativa y desnaturalizada, lleguen a un estado de equilibrio. Se trata sin duda de dos formas desmotrópicas como se ha podido comprobar por los trabajos de BERGMANN (11).

En esta propiedad de las proteinas desnaturalizadas se basa ANSON (12) para emplear hemoglobina desnaturalizada como substrato de su tecnica de valoracion de la catepsina.

Numerosos trabajos fueron hecho posteriormente con pepsina cristalizada con substratos de péptidos cristalinos, conteniendo grupos de tirosina y fenilalanina. En ellos se demuestra que la hidrolisis se efectua en la ligadura peptídica que une el aminoácido con el grupo aromático.

Nosotros empleamos un substrato de edestina, tanto cristalizada como amorfa, basandose nuestra tecnica de valoracion en la determinacion de los grupos de tirosina liberados (13).

El pH.

Otro aspecto a considerar en lo relativo al concepto de especificidad, es el comportamiento enzimático frente a la concentracion de hidrogeniones del medio. A este tenor, hemos dispuesto experiencias "in vitro"; pero como los estados de acidez del estómago (medio natural) crea condiciones especiales, hemos tenido necesidad de emplear el animal de experimentacion

(perro) hasta probar que nuestro proceder era inocuo. Despues hemos vuelto al material humano. Los perros suelen tener un pH de ayunas muy constante; no asi el hombre que aun en los normales varia sensiblemente y mas aun en estados gástricos que sin ser enteramente patologicos, se apartan un poco de las condiciones corrientes de la secrecion del jugo, lo cual permite utilizar muestras de catepsina que han sido segregada a pH diferentes y este es un aspecto cuyo estudio es de gran interes.

Los conceptos de pH y de actividad enzimatica van estrechamente ligados. Pero cuando llevamos esta consideracion al medio estomacal, encontramos estados de hiper e hipoacidez en parte relacionados con otros de hiper e hipofermencia. En fisiopatologia gástrica, ya dijimos que constituye un error de concepto considerar como coexistentes la hiperacidez con la hiperfermencia por un lado y la hipoacidez o anacidez con la hipofermencia por otro. Pero en realidad, lo que fisiologicamente interesa es la capacidad digestiva del jugo gástrico o sea la actividad proteolitica y esta viene condicionada por la altura del pH del medio.

Esta actividad proteolitica se viene adjudicando de una manera casi exclusiva a la pepsina cuyo pH óptimo es extremadamente bajo (pH = 1,9) (actuando sobre substrato de hemoglobina y pH = 2,2 actuando sobre edestina). Nosotros tratamos de demostrar en los protocolos experimentales que se acompañan, el papel predominante de la pepsina sobre la pepsina del jugo gástrico.

Aunque ya WILLSTAETTER y BAMANN (14) demostraron la accion catalitica de los extractos de mucosa gástrica y la asimilaron a la catepsina de los órganos, no consiguieron encontrarla en el jugo gástrico, considerando la actividad de este ligada a los elementos celulares que pudiera contener.

El medio debilmente ácido en que actua la segunda proteasa gástrica (pH = 3,3 para la edestina, pH = 3,7 para la gliadina, pH = 4,0 para la caseina y pH = 4,5 para la gelatina BUCHS (15)), presta a este asunto un gran interes. A pesar de ello ha sido muy escasa la atencion que los autores le han prestado.

Nosotros hemos estudiado las curvas de actividad enzimatica en función del pH del medio, empleando tampones diversos y enzima de distinta pro-

cedencia: jugo gástrico obtenido en circunstancias distintas y pepsina cristalizada. El substrato fue siempre edestina. Confirmamos la existencia de un óptimo para la pepsina en $\text{pH} = 2,2$ y otro $\text{pH} = 3,3$ óptimo para la proteasa catéptica. Entre ambos óptimos la curva de actividad presenta una depresión, aproximadamente a $\text{pH} = 2,8$ (16).

Hacemos además un amplio estudio de la influencia de los distintos pH en la inactivación enzimática y su irreversibilidad. En las experiencias nº 6 y 7 resumimos dos series de ensayos tendientes a probar la influencia de la alcalinización en la actividad enzimática y probamos que si aquella llega a ser franca, se produce una inactivación de carácter irreversible. Para ello, después de someter el sistema a la alcalinización durante un espacio de tiempo, lo llevamos a $\text{pH} = 3,3$ y observamos que ambas acciones (catéptica y péptica) resultan inactivadas en más o menos grado según la altura del pH a que se sometió el sistema. Estas experiencias se hicieron simultáneamente con pepsina cristalizada y con jugos gástricos.

Ampliamos estas experiencias empleando jugos gástricos con pH de ayunas distintos y extraídos en distintas condiciones. Los resultados pueden verse en el Cuadro VI. También en estos casos los sistemas fueron sometidos a diversos grados de alcalinización y devueltos después al $\text{pH} = 3,3$ para la prueba de hidrólisis.

Las razones para tal inactivación deben ser complejas; en primer lugar es preciso pensar en una desnaturalización de la proteína enzimática. Por otro lado MILHAUD y EPINEY (17), admiten como probable que la pepsina contenga un radical fuertemente ácido, quizás el ácido fosfórico, el cual se liberaría en la proximidad de la neutralidad.

Respecto a la actividad enzimática del jugo de ayunas nos hicimos una pregunta un tanto teórica: ¿influye en dicha actividad el pH al cual se segrega la enzima?. Esta pregunta convertida en hipótesis de trabajo, nos llevó a hacer tamponamientos de estómagos con tampones inofensivos (de citrato-fosfato disódico). Los primeros ensayos fueron en perros para asegurarnos de su absoluta inocuidad; después, en personas voluntariamente prestadas así como enfermos. No obstante el considerable número de experiencias realizadas, no llegamos a ninguna conclusión firme, por eso no las consig-

namos en la parte experimental. No obstante, continúan nuestros ensayos al respecto. A pesar de la ausencia de conclusiones, pudimos entrever la posibilidad de alguna técnica analítica para valorar, aunque sea groseramente la cantidad de moco segregado y también para estudiar la evacuación gástrica mediante el empleo del azul de metileno. Los obstáculos que encontramos en este camino fueron grandes y hubo necesidad de variar todo el método. Por ello no queremos hacer en este trabajo de tesis más que una simple referencia.

Decíamos al principio de la Parte Teórica, que el pH de la acción enzimática es uno de los criterios que tenemos que seguir en torno al concepto de especificidad. A este respecto debemos considerar dos cuestiones: 1ª, que la catepsina de los órganos es cinéticamente diferente de la del jugo gástrico y 2ª, que la pepsina y la catepsina son dos fermentos, aunque diferentes, íntimamente ligados entre sí; son dos grupos activos sobre el mismo soporte proteico. Los intentos de separación han sido infructuosos, cuando tratamos de purificarlos restandole lastre proteico. Llevado este tratamiento a su último extremo, se inactivan las dos enzimas simultáneamente. Nosotros hemos intentado la separación por vía electroforética, sin el menor resultado.

Todo esto revela que estas enzimas tienen un comportamiento original y por tanto hablar de pepsina y de catepsina es hablar de pH distintos (18) No obstante, ambas tienen caracteres cinéticos diferentes lo que nos obliga a considerarlas como enzimas distintas. Pero aun así ¿cómo podemos aplicar a ellas el concepto de especificidad? Ciertamente, que la pepsina es de una sensibilidad superior a la catepsina, lo cual nos da la pauta para inactivarla conservando el jugo cierta actividad catéptica. Estas circunstancias y las que se deducen de la comparación de ambas cinéticas, nos plantean dos problemas: el primero, ya mencionado, de si se trata de dos enzimas con acciones diferentes o de una con distintas acciones dependientes del medio (principalmente del pH); el segundo, de si la segunda proteasa gástrica es o no una catepsina genuina. Por otro lado, identificadas como iguales las enzimas proteolíticas del jugo gástrico y la pepsina cristalizada (según se desprende de nuestras experiencias) y análogas también en su comportamiento frente a efectores como el SH_2 y el CNH , queda pendiente de

análisis y discusión la conducta variable de la enzima del jugo ante la alcalinización de este, al menos en determinadas circunstancias. Ante este hecho debemos considerar muy especialmente el medio en que se encuentra entre los restantes componentes de la secreción estomacal, los cuales pueden influir en las características de la enzima. De este punto volveremos a ocuparnos más adelante.

En los jugos primitivamente alcalinos y de un pH incompatible con la actividad enzimática, se observa todavía un efecto proteolítico que parece contradecir lo que se desprende de nuestras experiencias de inactivación por pH. Esta consideración es importante desde el punto de vista fisiológico y nos lleva a pensar que el proceso es más complejo que una simple desnaturalización proteica. MILHAUD y EPINEY (19) admiten como probable, según hemos dicho, la presencia de un radical fosfórico que haría su aparición como ion libre al llegar a pH = 7,0.

De todas formas, siempre queda en el aire las razones de por qué pueden inactivarse selectivamente ambas enzimas por el calor y otras acciones, hechos que tal vez puedan explicarse, admitiendo que los grupos atómicos específicos de los grupos activos, fueran diferentes.

Acción de efectores sobre la actividad catéptica del jugo gástrico.

Este estudio tiene lógicamente que basarse en las investigaciones llevadas a cabo por los autores con la catepsina de los órganos, estudios que nos marcaron la pauta a seguir en nuestras investigaciones sobre jugo gástrico.

Aquella enzima mostraba una considerable activación ante la cistina, el glutatión, el cianuro y el SH_2 , los cuales eran, en cambio, inactivadores de las peptidasas y de la tripsina pancreática.

La activación que dichos efectores ejercen sobre la catepsina de los tejidos (y sobre la papaina) se puede explicar admitiendo que actúan como "formadores de complejos" con los indicios de metales inhibidores existentes en la solución y que resultan separados por este mecanismo.

WILLSTAETTER Y BAMANN (20) son los primeros en descubrir la propiedad activante del CNH sobre la pepsina, alcanzando su máximo al cabo de una hora de contacto. Los extractos purificados por adsorción y elución,

se comportaron ante el CNH como preparaciones impuras, no siendo comprobada a este respecto la hipótesis de los "formadores de complejos" pero las curvas de actividad en función del pH no son teóricamente diferentes en las preparaciones de papaina y de papaina + CNH. Además, la acción de este efector resulta ser de activación ante ciertos substratos y de inactivación ante otros.

WALDSCHMIDT-LEITZ (21) encuentra por primera vez un activador natural de la catepsina de los tejidos el cual es separable por técnicas de adsorción. La enzima, según sus trabajos, solo actuaría sobre ciertos productos de la descomposición proteolítica, mientras que la presencia del activador la haría capaz de actuar sobre las proteínas (albumina de huevo, gelatina, etc.,). Sospechan además los autores, que alguna relación debe existir entre la acción inhibitoria del SH_2 y CNH sobre la respiración celular y su poder activador de la proteólisis.

GRASSMANN (22) sostiene que la cisteína activa la papaina de la misma manera que el SH_2 y el CNH, confiriéndole la actividad de hidrolizar la peptona. Iguales resultados se obtienen con la catepsina de riñón. Pero en cambio, la dipeptidasa de la levadura (y también la polipeptidasa) son inhibidas por la cisteína así como por el SH_2 y CNH. Cree, que el activador natural se combina con la enzima formando un complejo de nuevas propiedades, pero también admite como probable que actúe reteniendo sustancias inhibitorias pues comprueba que los tres efectores expresados, forman compuestos insolubles con las sales de Fe.

WALDSCHMIDT-LEITZ (23) purifica este activador extraído del hígado y llega a un tripéptido cristalizado idéntico al glutatión en forma reducida. Estos resultados concuerdan con los de GRASSMANN (24) sobre inactivación de la catepsina por el glutatión. Es notable el hecho de resultar este tripéptido inalterable ante la aminopeptidasa (KENDALL (25)) y la carboxi-polipeptidasa (GRASSMANN (26)) tan abundantemente repartidas en los tejidos.

SCHAFFNER y cols. (27) admiten un paralelismo entre la proteinasa cáptica de ciertos órganos (hígado y riñón) y la proteinasa de la levadura en presencia del activador SH_2 o CNH. Establecen también que el ac-

ativador natural (zooquinasa) es homologo al encontrado en las plantas (fitoquinasa),

Catepsina y activador pueden ser separados adsorbiendo el extracto de los órganos con kaolin en presencia de ácidos; la elucion del adsorbato contiene el activador libre, mientras que la solución residual contiene catepsina exenta de activador. Investigan tambien los citados autores el poder activador del SH_2 en extractos puros e impuros, resultando ser iguales; tambien, sobre substratos diferentes, aunque aqui el efecto sea mas ostensible sobre la gelatina que sobre la caseina.

KREBS (28) despues de estudiar cuantitativamente la influencia de ciertos metales sobre la catepsina y papainas, han demostrado la identidad de ambas enzimas. Resultaron ser inhibidores los iones de Cu, Ag, Au, Zn, Hg y Cd. La vitamina C inhibe la acción de la papaina sobre la gelatina pero la vitamina C + Fe, resultó ser un buen activador. El Fe no es reemplazable por el Cu o el Mn.

MASCHMANN y cols. (29) explican la activacion como consecuencia de hacer posibles nuevos puntos de ataque en el substrato; por ejemplo, la reduccion de los grupos $-\text{S}-\text{S}-$ y $-\text{SH}$.

MASCHMANN y HELMET (30) emplean el SO_4Fe y creen que el cation tendría efecto, acortar el periodo de introducción.

LAGRIN (31) cree que la activacion de la catepsina de los organos, seria debida a la reduccion de los grupos $-\text{S}-\text{S}-$ y $-\text{SH}$ en el complejo enzima-proteina. Ademas de los activadores estudiados (SH_2 , cisteina, glutatión, CNH), comprueba el autor la influencia positiva de otros reductores como el SO_2 y el ácido succínica + hidrogenasa. La luz ultravioleta tambien demostró ser activa al comprobarse su influencia sobre la reduccion de la cisteina a cistina. Esto explica el incremento de la proteolisis en la piel y sangre despues de la irradiación.

Los trabajos de GREENBERG y MIN (32) sobre bromelina y las asclepainas n y s, demostraron comportamiento analogo a la catepsina y papaina.

Finalmente WISS (33) demuestra que el CNK y los pirofosfatos se conducen como activadores de la catepsina y papaina, las cuales considera esencialmente iguales diferenciandose unicamente en el tipo de complejo en-

zimático que forman "in vitro".

Pasemos ahora a considerar lo que se deduce de nuestras experiencias sobre la catepsina del jugo gástrico y de la acción sobre ella de los efectores SH_2 y CNK. El interés de este estudio es grande por las siguientes razones: primero, por los resultados discordantes obtenidos por los pocos autores que se han ocupado de este tema; segundo, porque debemos afirmar o negar la naturaleza catéptica de esta segunda proteasa gástrica y tercero, por la trascendencia que tiene este estudio para el conocimiento de la secreción estomacal.

Es un hecho al parecer cierto, la existencia en la pepsina de grupos amino libres y en especial, su riqueza en tirosina. Los trabajos de HERRIOT (34) y los de LI (35), han demostrado que aunque la molécula de pepsina contiene uno o dos restos de histidina que pueden ser halogenados y por tanto capaces de reaccionar, este papel en la práctica le corresponde en su totalidad a la tirosina; 12 de los 17 grupos tirosínicos pueden ser halogenados cuando la pepsina está sin desnaturalizar. De ello concluye LI, que serían los grupos fenólicos superficiales, los que entrarían en reacción. La desnaturalización de la proteína rompería las cadenas de péptidos, lo cual permitiría entrar en reacción grupos tirosínicos centrales. El papel de la acidez del medio es también de gran interés, ya que si la integridad de los grupos tirosínicos es indispensable para la acción "pepsínica" y "catéptica" de la enzima, las investigaciones de MILHAUD y EPINEY (36) permiten concluir que la tirosina es más necesaria para la actividad de esta última que para la de aquella. En cambio, los grupos alfa-aminados e imidazólicos no serían indispensables para la proteólisis.

El punto de discusión en torno a estos aspectos, radica en la existencia de grupos $-\text{SH}$ o de grupos $-\text{S}-\text{S}-$ en la molécula de pepsina y de cuya presencia depende el considerar como una catepsina, la acción enzimática de la pepsina colocada a $\text{pH} = 4,0$ con sustrato de ovoalbúmina o caseína y de $\text{pH} = 3,3$ cuando el sustrato es de destina. La presencia de tales grupos y por tanto el carácter catéptico es afirmado por FREUNDENBERG y BUCHS (37) así como por WISS y RAMER (38); en cambio es negada por MERTEN (39) y por MILHAUD, DELOME y EPINEY (40) basados ante

todo en la conducta frente al CNH, el ácido monoiodoacético y el SH₂. El modo de conducirse este último y el CNH constituye una parte de nuestros trabajos sobre los efectores de la enzima.

Influencia del pH.

Para su estudio se hizo pasar una corriente de SH₂ a través del jugo gástrico durante 20 minutos, investigando después la actividad catéptica junto a los correspondientes testigos. Como se ve en el Cuadro IX (Parte Experimental), en todos los casos, excepto en uno, se apreció una activación aunque de grado distinto en los jugos de ayunas y los segregados por estímulo.

Tal resultado, similar a los de BUCHS (41) y WISS y RAMER (42), está en oposición a lo observado por MILHAUD y EPINEY (43). Es posible que la diferencia de resultado no estribe sino en las condiciones de trabajo; así: el jugo de la experiencia 16 el cual se activó intensamente cuando fue expuesto durante 48 horas a la acción del SH₂ en tubo cerrado, se condujo exactamente igual que el testigo, sin modificación alguna en la acción enzimática. Incluso en estas condiciones puede inactivarse, aunque sea en ligero grado, como ocurre en algunas de nuestras experiencias, quizás por desnaturalización de la proteína enzimática.

Por tanto, el efecto que debemos considerar como normal y constante es el de activación cuya razón creemos que debe encontrarse en la reducción de los grupos -S-S- y -SH; ~~éstos~~ últimos, activadores naturales de la enzima. No obstante, la diferente intensidad en la activación de los jugos, unos respecto a otros, nos indica que el proceso debe ser algo más complejo, actuando sobre la enzima directamente, pero también a través de los distintos componentes del jugo. En efecto, ello contrasta con la uniformidad de los resultados cuando el sistema enzimático está constituido por pepsina cristalizada en lugar de jugo gástrico.

Influencia del cianuro potásico.

Mientras WISS (44) así como RAMAN (45) señalan que este efector activa la pepsina, activación que según BUCHS (46) existiría también cuando la enzima actúa a pH = 3,3 sobre sustrato de edestina (lo que conferiría carácter catéptico a la segunda proteasa gástrica), tal activación no se



observa por MERTEN (47) ni por MILHAUD (48).

Para aclarar este punto montamos una primera experiencia; en ella y actuando con un jugo de actividad, 2,3 Unidades de catepsina se hizo una exposicion de aquel durante 20 minutos ante 0,05 cc y 0,15 cc de Sol. M/10 de CNK. Se observó una inactivacion de 12 y 52 % respectivamente. Tal resultado, contradictorio con lo señalado por los citados autores, exigia una conformación y un estudio detallado en distintos aspectos.

En primer lugar, para descartar la posible influencia del CNK sobre las restantes partes del sistema enzimático, se monto otra experiencia cuyo resultado comparamos con experiencias posteriores. En ella se hizo: una exposicion previa del jugo solo, durante 20 minutos (tubo J); igualmente del sustrato (tubo E) y del sistema enzimático completo (tubo SC) empleando en todos los casos 0,15 cc de la Sol. M/10 de CNK. Como es lógico, se acompañó el testigo correspondiente de una muestra sin exposición alguna (tubo T). Los resultados se expresan en el cuadro correspondiente de la Parte Experimental.

Con estas experiencias queda demostrado que si bien el CNK puede actuar sobre distintas partes del sistema enzimático. su acción fundamental la ejerce sobre el jugo.

Dicha inactivacion, que confirmamos en una gran cantidad de jugos, no se dá, empleando soluciones muy diluidas de CNK, de aqui, nuestra discordancia con los resultados de MERTEN y MILHAUD, que en realidad solo es aparente. En efecto; empleando soluciones de concentracion baja, como las empleadas por dichos autores, no se aprecia acción alguna, en un sentido o en otro. Tal influjo de las distintas concentraciones de CNK lo estudiamos estudiando sistemas enzimáticos distintos; en ellos, la enzima era unas veces el jugo gástrico y en otras la pepsina cristalizada. La metodología fue la misma de las experiencias anteriores; la acción previa fue de 10 minutos a 40° ante 0,1 cc de Sol. M/10 de CNK. En el correspondiente Cuadro de la Parte Experimental puede apreciarse la influencia de las concentraciones distintas de una solución de CNK sobre el sistema enzimático. La inactivacion ocurre, como vemos en el Cuadro, cuando empleamos soluciones de CNK a concentraciones M, M/10 y hasta M/100, pero no a diluciones

mayores, las cuales, por otro lado, tampoco producen activación.

Un estudio complementario se hizo empleando diluciones crecientes cuyos resultados figuran en el Cuadro correspondiente. Estas diluciones fueron desde la M, hasta la M/1.000.000. También aquí, cuando se trabaja con pepsina cristalizada, la inactivación es completa a concentraciones M y M/10; es despreciable a concentraciones M/100 y M/1.000 y nula a diluciones mayores. Como complemento se hizo otra experiencia con diluciones intermedias entre M y M/100, las cuales quedan detalladas en la Parte Experimental.

La desaparición de la acción inactivadora del CNK, se verifica, por tanto de forma lenta, trazando una curva de escaso declive entre concentraciones M y M/100. En otros ensayos modificamos las condiciones del sistema, tratando previamente el jugo con cantidades distintas de Sol. M/10 de CNK. Se emplearon 0,1 , 0,2 , 0,3 , 0,6 cc de aquella, observándose casi siempre una inactivación, la cual, difiriendo en su grado de unos jugos a otros, era habitualmente mayor al elevar la cantidad empleada de la Sol. de CNK. Tal diferencia de conducta de unos jugos a otros esta en oposición a la monotonía del comportamiento de la pepsina cristalizada, en la que el grado de inactivación fué siempre el mismo.

Con el fin de encontrar el efecto activador señalado por WISS, RAMER, y BUBHS, montamos otras experiencias haciendo actuar dicho efector sobre diluciones crecientes del fermento. Siguiendo esta vía es como, el primero de dichos autores, ha visto aparecer una activación tras un efecto inhibitor transitorio. Un hallazgo de esta índole sería un apoyo firme a la naturaleza catéptica de la enzima, ya que, como KLEIMANN y WERR (49) señalan, las catepsinas de los órganos se activan notablemente con la dilución de la enzima. Con tal objeto hicimos una experiencia actuando 0,10 cc de la Sol. M/10 de CNK sobre diluciones crecientes de pepsina cristalizada, hechas a partir de una solución madre de 0,42 % en CLH N/23 (pH = 3,9) De tal forma, la cantidad de pepsina tratada y sin tratar era 0,00042 gramos. La técnica de trabajo fue la misma que en experiencias anteriores considerando siempre los valores de los testigos de cada una de las partes del sistema. El resultado de esta experiencia confirma todo lo anterior,

ya que siempre mientras el tubo testigo deparó una proteólisis de 0,428 mgrs. de tirosina, la inhibición fue absoluta, con un resultado de cero en todas las muestras, con las diluciones de pepsina siguientes: 1, 1/5, 1/10, 1/50, 1/100, 1/500, 1/1.000, 1/5.000.

Complemento de la anterior experiencia fue la que se hizo seguidamente en la que la enzima era jugo gástrico en lugar de pepsina. Las distintas diluciones de jugo, tratadas durante un tiempo de media hora con la dilución ya conocida de CNK dieron los resultados que se expresan en el cuadro correspondiente de la Parte Experimental. La inhibición aquí, es también manifiesta, sin apreciarse en ningún momento ni una activación, sino persistencia de actividad. Solo se observa, curiosamente, una tendencia a recobrarla en las diluciones de jugo gástrico entre 1/50 y 1/500, por lo que se hizo una nueva con diluciones entre ambas. Por lo demás, el resultado se expresa en el cuadro correspondiente, siendo el sistema empleado análogo a los anteriores, confirmandose una vez más la ausencia de activación, existiendo sin embargo, una zona, entre las diluciones señaladas, en que la inactivación no es absoluta.

Ante la imposibilidad de una influencia de la temperatura sobre el grado de inactivación producida por el CNK, se estudió esta actuando sobre el jugo durante media hora a temperatura ambiente y a 60°. Como ejemplo, señalamos en el Cuadro correspondiente, los resultados de dos experiencias en las que se estudió tal acción sobre el jugo segregado en ayunas y el procedente de estímulos con histamina.

En esta experiencia como en las posteriores, se demostró que el grado de inactivación por cianuro aumenta con la temperatura consiguiéndose en algunos jugos que la inactivación fuera total al elevarla a 60°. Sin embargo, esto no sucede siempre lo que indica las peculiaridades de ellos.

En otros ensayos hemos investigado el influjo que pudiera tener el tiempo de exposición a la acción del cianuro, demostrándose que tal influjo es nulo. Para ello se montó una prueba en la que se estudió, aparte el testigo sin cianuro, el mismo sistema tras la exposición del jugo a la acción del CNK a la temperatura ambiente durante 37 minutos y otros tubos a 60° pero a distintos tiempos de exposición (5, 13, 25, 37 minutos). El grado

de inactivación fue igual; de 73 % en los cuatro últimos y de 71 % en el primero.

Como se observa muchas veces, según hemos dicho anteriormente, el grado de inactivación por el CNK suele ser diferente en los distintos jugos, a diferencia de la constancia observada en el comportamiento de la pepsina cristalizada. Era, pues, preciso analizar las causas responsables. En tal sentido estimamos conveniente considerar el pH previo que el jugo segregado pudiera tener y su posible influencia. Como se ve en el Cuadro correspondiente, la inactivación por el CNK es nula en los jugos con pH alcalinos, sin duda por la desnaturalización de la proteína motivada por la alcalinización y encontrarse por ello inactivados, como ya hemos señalado. En cambio, en los jugos de pH ácidos (aunque haya casos en que la inactivación no tiene lugar) la acción del CNK es franca en el sentido que hemos indicado. No obstante, la inactivación es de grado variable, sin que pueda establecerse paralelismo ni relación alguna, entre su intensidad y el grado de acidez previa del jugo.

Con el fin de aclarar las posibles influencias capaces de modificar el grado de inactivación y, en última instancia, la acción del CNK, dado los resultados tabulados en el Cuadro correspondiente, se investigó la acción de aquel sobre jugo tamponado previamente a pH diferentes. Para ello dispusimos de un sistema de la composición siguiente: enzima (1,5 cc de jugo), cianuro (0,3 cc de la solución habitual), tampón (2,4 cc); este, a los pH siguientes; 1,8 , 3,3 , 6,6. Tiempo: 30 minutos. Posteriormente se tomó 1,4 cc para la prueba de hidrólisis siguiendo la técnica habitual. Los resultados quedan expresados en la Parte Experimental.

Como puede apreciarse, la presencia del tampón impide prácticamente la inactivación, tanto más cuanto más ácido es el pH. Ello prueba, como lo hace sospechar todo lo expuesto hasta ahora, los datos de cinética señalados al principio y en las experiencias correspondientes, la importancia que tiene en la acción de la enzima y en la de sus distintos efectores, las partes restantes del jugo, medio en el cual se encuentra y actúa aquella, y que hace que su dinámica sea distinta de la de la pepsina cristalizada. Tiene por tanto interés considerar el grado de inactivación de

la muestra de jugo de ayunas en comparacion con el segregado por el estimulo de alcohol (aunque hay en estos casos un aumento de catepsina) y el de la histamina. La inactivacion es igual o menor que en los jugos de ayunas salvo una excepcion (vease el cuadro de valores). Considerese en este sentido, como señala BUCHS, y nosotros hemos comprobado, que la histamina no modifica la secrecion del fermento el cual permanece cuantitativamente invariable. En cambio, en los jugos segregados tras la cafeina, la cual aumenta la cantidad de enzima, son inactivados por el cianuro con una intensidad mayor que los de ayunas, exepcto en un caso. Dada esta conducta y para eliminar una posible accion directa de la cafeina sobre la enzima o el cianuro, se montaron dos tipos de experiencias: en una se expuso el jugo previamente durante 30 minutos a la accion de la cafeina sola; en otro tubo, a la de esta juntamente con cianuro y un tercer tubo como testigo. Parte del tubo asi tratado fue llevado al sistema hidrolitico sobre edestina a pH = 3,3 para estudiar su actividad catéctica. El resultado fué el siguiente:

Tubo testigo.....	liberó	0,436 mgrs.	de tirosina		
Tubo cafeina-jugo....	"	0,438 "	"	= 0 %	de inactivación
Tubo cafeina-jugo-CNK	"	0,132 "	"	= 67 %	"

Con ello quedo demostrada la ausencia de una influencia directa de la cafeina sobre la accion enzimática, asi como no existir una interferencia entre ella y la accion inhibidora del CNK.

Como a pesar de todo, podria esta accion estar disminuida en su grado, se montó el otro tipo de experiencia a que antes nos referimos. Se trató previamente en un tubo el jugo con CNK y solucion de cafeina; en otro tubo con aquel solo y el correspondiente complemento de agua. El resultado fue igual en los dos casos: 0,132 mgrs. de tirosina.

Tal accion inactivante del CNK cuando obra sobre la enzima en Sol. M y M/10 en las condiciones expuestas y el hecho de no haberse observado una activacion del formento, deniega hasta cierto punto el que la accion proteolitica gástrica actuando a pH = 3,3 sobre edestina, corresponda por su caracter y naturaleza a una accion catéctica. Pero decimos, "hasta cierto punto" ya que debemos considerar las condiciones en que la enzima se encuentra. El mismo BUCHS reconoce, dado el mecanismo de accion del CNK en la



activacion de la catepsina de los órganos, que esta puede no tener lugar cuando actua sobre la pepsina cristalizada. En efecto, segun KLEIMAN y STERN (50) y KLEIMAN y RONA (51), la purificacion de la catepsina de los órganos por adsorcion y elucion, lleva consigo la perdida de la capacidad activadora del cianuro. Por ello, consideran MIRBAECK y KREBS (52), que la causa de tal activacion de las catepsinas de órganos por CNK, se deberian a la eliminacion, por este, de cuerpos inhibidores de aquellas. Seria por tanto, mas que un activador, un anti-inhibidor. De esta forma seria comprensible que el fermento aislado, no tendria por que activarse. No obstante, queda en pie esta inhibicion que nosotros hemos encontrado y que pone en tela de juicio la naturaleza catéptica de la segunda proteasa gástrica.

Pero de una o de otra forma, queda siempre firme nuestra observacion respecto a la constancia de accion de la pepsina cristalizada ante la inactivacion por el CNK, frente a la accion variable sobre la onzima del jugo gástrico. Esto nos hace concebir su accion en un doble sentido: una directa sobre la enzima misma, evidentemente inhibidora en nuestras condiciones de trabajo (cuya mejor expresion la tenemos en la ejercida sobre la pepsina cristalizada); la otra indirecta, actuando sobre el medio que rodea al fermento, tal y como se encuentra naturalmente en el jugo, con los muy diversos componentes de él, al margen del grado de acidez y de la accion de moco gástrico, eliminado que fué este en nuestros sistemas enzimáticos "in vitro". Asi pues, la inhibicion debia actuar interfiriendo la accion de activadores naturales de la enzima, presentes en el jugo, o exaltando la accion de los inactivadores existentes en él. Todo esto nos conduce a un aspecto de maximo interes: los posibles factores existentes en el jugo gástrico. Su transcendencia para la accion digestiva y por tanto para la fisiopatologia gástrica, debe ser grande.

En su consecuencia, hemos perseguido la caracterizacion de un factor inhibidor de la catepsina segregado por la mucosa gástrica. (53).

En una serie de experiencias hemos estudiado la accion conjunta, dentro del sistema enzimático, del jugo gastrico y de la pepsina cristalizada, asi como la accion sobre esta, del jugo inactivado por la ebullicion.

Para ello se montaron en cada caso sistemas distintos: unos como testigos, otros, como probandos de la experiencia. Los primeros fueron: 1º, testigo de pepsina (TP), constituido por 0,1 cc de solución de pepsina al 0,42 % mas tampon; 2º, testigo de substrato (TE), formado por 1 cc de solución de edestina al 1 %, mas tampon y agua; 3º, testigo de jugo activo (TJA), integrado por 0,1 cc de este mas tampon; 4º, testigo de jugo inactivo (TJI) análogo al anterior pero con jugo inactivado por el calor, mas solución de edestina. Los probandos fueron: 1º, sistema completo formado por solución de pepsina cristalizada, edestina y tampon (SP); 2º, sistema enzimático, formado por jugo activo, edestina y tampon (SJA); 3º, sistema mixto formado por jugo activo, solución de pepsina cristalizada, edestina y tampon (SJAP); y finalmente, 4º, igual al anterior pero con jugo inactivado por ebullición (SJIP). El tiempo de hidrólisis, grado de calefacción y técnica seguida, quedan expuestos en la Parte Experimental. Los datos reflejados en el correspondiente Cuadro, se obtuvieron sobre la base de considerar los valores de los tubos testigo en cada uno de los sistemas enzimáticos.

Observando dichos valores, un hecho llama inmediatamente la atención: en ningún caso se advierte una sumación de efectos enzimáticos al conjuntar dentro del sistema "in vitro", el jugo gástrico y la solución de pepsina cristalizada. Y hay mas: el grado de hidrólisis de este sistema es inferior al del sistema en que actúa solo el jugo activo con el substrato. Si lo primero era de esperar, puesto que el grado de hidrólisis aunque se incrementa con la concentración de la enzima no lo hace en forma lineal, en cambio, lo segundo, o sea, una hidrólisis inferior, no tiene aparentemente razón de ser y a pesar del gran interés que este hecho tiene, parecía quedar sin explicación. Cabe suponer que en el jugo existe algún factor capaz de frenar aquella enzima en su acción hidrolítica, sobre todo cuando la concentración es elevada. Como en el cuadro podemos ver, tal disminución fue muy acentuada en dos de las experiencias.

En tal sentido, tenía un gran interés hacer obrar el jugo inactivado por ebullición, sobre el sistema enzimático constituido por pepsina cristalizada y substrato. En tales condiciones se apreció siempre, salvo en un caso

una inactivación de la actividad de la pepsina, que llegó a ser muy intensa en uno de los casos.

Para analizar con más detención estos aspectos, se montó otro tipo de experiencia estudiando en ella la influencia de una cantidad constante de jugo activo sobre la acción hidrolítica de cantidades crecientes de pepsina cristalizada. Para ello dispusimos dos series de tubos: una, con concentraciones crecientes de la solución de pepsina más el sustrato (tubos P-1, P-2, P-3 y P-4) correspondientes respectivamente a una, dos, tres, y cuatro décimas de centímetro cúbico de la solución de pepsina; la otra, igual a la anterior pero añadiendo a cada uno de los tubos una cantidad constante de jugo activo.

Los resultados se expresan en el Cuadro correspondiente de la Parte Experimental, donde se comprueba la falta de suma de la actividad del jugo y la pepsina a pesar de la posible mayor hidrólisis, lógica del aumento de la cantidad de enzima, análogo a lo que se observa en la experiencia anterior al comparar la conducta de los sistemas SP, SJA, y SJAP. Ello hace que la curva que representa gráficamente esta acción, tenga menor declive que cuando se trabaja solo con soluciones de pepsina a distintas concentraciones. Mas aquí ocurre el hecho sumamente interesante de que al aumentar la cantidad de pepsina dentro del sistema en presencia de jugo activo, disminuye la actividad enzimática de aquella siendo menor que cuando actúa sola, sin la coincidencia del jugo. Ello se ~~aparta~~ ^{aparta} al comparar la conducta de P-3 y P-4 con los correspondientes adicionados de jugo gástrico. De aquí que ambas curvas se crucen. Si tales curvas y tal conducta pudieran tal vez explicarse en parte por la acción inhibitoria de los productos de hidrólisis según la Ley de acción de las masas, es evidente que esto no explica la conducta de los últimos tubos. Todo ello parece afirmar la idea de la presencia de sustancias inhibidoras específicas de la acción de la pepsina.

Para aclarar este punto se montó otro tipo de experiencia: trabajar con cantidad constante de pepsina (0,1 cc de la solución) dentro del sistema enzimático y añadiendo cantidades distintas de jugo inactivado (0,1 , 0,2 , 0,3 y 0,4 cc) y estudiar posteriormente el grado de actividad en cada sistema. El cuadro de valores correspondiente pone de relieve los

resultados alcanzados trabajando con jugos de distinta procedencia. En todos se ha deducido el valor de los correspondientes testigos. En dicho cuadro, la notacion **JI**, significa jugo inactivo y la cifra que lo sigue expresa las decimas de centimetro cubico que se les ha añadido.

Podemos por tanto afirmar que el grado de proteolisis producido "in vitro" por la pepsina cristalizada, obrando sobre un substrato de edestina a pH = 3,3 (característico de la acción catéptica) disminuye al añadir al sistema jugo inactivado por ebullición. Tal inactivación depende paralelamente de la cantidad de jugo añadido.

Como era de esperar, la cantidad de inactivador contenida en jugos de distintas procedencias, fue distinta. En cambio, llama la atención, las cantidades casi constantes que se encuentran en jugos de procesos patológicos similares.

(Llegado a este punto queremos señalar que nuestros trabajos sobre catepsina del jugo gástrico no quedan en los aspectos fisiológicos que aquí consignamos; la directa relación que la fisiología tiene con la patología, nos ha llevado a continuar nuestras experiencias en el campo de la clínica digestiva. En este terreno fueron interesantes los resultados que obtuvimos en procesos que pudieramos llamar "opuestos" desde el punto de vista de la secreción gástrica: el úlcus y el cáncer. Pero dado el carácter de este trabajo, no consideramos procedente extendernos en estos aspectos.)

Una vez confirmado el efecto inactivador del jugo, debemos pasar a hacer algunas consideraciones en torno a la, posible naturaleza de este efector. No podemos hablar de efectos competitivos entre ambas enzimas porque sabemos que tienen idéntica o parecida cinética. En cambio, todo parece hablar en favor de la existencia de un factor de inhibición de acción específica sobre la actividad catéptica. No deja de tener interés la coexistencia en el jugo de fermento y de inactivador, lo que supone unas especiales condiciones de acción. En este sentido y al igual de lo que sucede en distintos fluidos y estructuras del organismo, el pH del medio no debe ser indiferente, de forma que, pasando un óptimo del mismo, en una u otra

direccion (ácida o alcalina) predominará una u otra acción. De tal modo, no solo su importancia fisiológica sería muy alta, sino que su significación patológica también lo sería, puesto que, desviaciones muy intensas del lado ácido pudiera "desbocar" la acción enzimática. En tal caso, la coexistencia de enzima e inactivador tendría sin duda una finalidad protectora.

(Nuevamente tenemos que hacer alusión a los caminos que a partir de este punto hemos seguido en orden de patología gástrica, estableciendo una interesante comparación entre el fenómeno observado en los ulcerosos y en los cancerosos. Los resultados abonan nuestra suposición del posible papel protector del inhibidor. No tocamos, repetimos, este aspecto de nuestros trabajos por considerarlo fuera del tema de esta tesis doctoral.)

Influencias distintas deben actuar sobre el inactivador, no solo en su producción sino en su acción misma. Prescindiendo de la del moco gástrico insoluble (que eliminamos para llevar a cabo nuestras experiencias), actuarían los distintos efectores enzimáticos, no solo sobre la enzima sino también sobre el inactivador. En la inactivación que produce la alcalinización, es probable que intervenga una acción de esta índole, no debiéndose solo a la desnaturalización de la proteína enzimática. La existencia de jugos, si bien sea una excepción, en los que la alcalinización no produce una inactivación y el grado variable de esta que se produce sometiendo jugos distintos al mismo pH, quizás dependa de ello, por lo menos, a nosotros nos parece probable.

La presencia de un factor inhibidor de la acción catéptica puede explicar también (dentro de la constante activación de la catepsina por el SH_2 sus diferentes grados cuando se comparan varios jugos entre sí y también el distinto porcentaje de inactivación que produce el CNK en jugos distintos, que contrasta con la respuesta, siempre constante, de la pepsina cristalizada.

Aunque no es posible definir químicamente la naturaleza del factor inhibidor de la catepsina gástrica, tiene interés el que diversos mucopolisacáridos conteniendo azufre en su molécula, posean un marcado efecto in-

hibidor de la pepsina. Así; BABKIB y KOMAROV (54) señalan que el ácido condroitinsulfúrico reduce la acción proteolítica del jugo gástrico de los perros y ZAUS y FOSTER (55) vieron una acción similar sobre la digestión de la gelatina por la pepsina comercial. Mas recientemente LEVEY y SHEINFELD (56) han demostrado el acusado efecto inhibitor que tiene la heparina y el ácido condroitinsulfúrico (ambos mucopolisacaridos) sobre la pepsina. Tanto uno como otro se encuentran esterificados con el ácido sulfúrico, mientras que el ácido hialurónico (carente de él) no posee tal acción e igualmente el sulfato sódico.

Todo ello no puede dejar de tener relación con el contenido del jugo en mucoproteínas, cuyo mecanismo de secreción es similar al de otros productos de la actividad glandular, como la pepsina y el CLH. De aquí, como ha demostrado JERZY, GLASS y BOYD (57) que haya una relación entre la acidez gástrica y su contenido en mucoproteínas, de forma que (al igual que sucede con el factor de inhibición que hemos señalado) se encuentre una elevada cantidad de aquellas en los jugos hiperácidos (entre ellos los casos de úlcus) frente a una cantidad mínima en los anácidos (neoplasias). Ello nos hace sospechar que el factor inhibitor de la pepsina y catepsina gástrica, no sea sino un mucopolisacarido esterificado con ácido sulfúrico, contenido en las mucoproteínas gástricas disueltas, segregadas por las células parietales del estómago.

Por tanto, cuando se estudia la acción enzimática del jugo gástrico, tanto en condiciones fisiológicas como patológicas, es preciso considerarla dentro de su medio natural. Estos hallazgos nuestros encuentran parangón, en cierto modo, con la demostración hecha por KALSER y GRASSMANN (58) de la presencia en el jugo pancreático de un factor inhibitor de la tripsina, íntimamente relacionado con el factor aislado y cristalizado por NORTHROP, KUNITZ y HERRIOT (59) en el tejido pancreático.

P A R T E E X P E R I M E N T A L

TECNICA PERSONAL DE VALORACION DE LA SEGUNDA PROTEASA GASTRICA.-- UNIDAD.

Reactivos

1º. Reactivo de fenol.

En un matraz de 1.500 cc de un aparato de calefaccion a reflujo, póngase 100 g. de tungstato sódico ($WO_4Na_2 \cdot H_2O$) químicamente puro. Añádase unos 700 cc de agua, 50 g. de ácido fosfórico al 85 % y 100 cc de ácido clorhídrico concentrado. Hágase refluir durante 10 horas (el aparato debe ser de ajuste esmerilado). Agréguese despues 150 g. de sulfato de litio (SO_4Li) químicamente puro y 50 cc de agua. Cuando esté bien disuelto añádase unas gbtas de bromo. Hiérvase despues sin refrigerante de reflujo para eliminar el exceso de bromo. Déjese enfriar. Dilúyase con agua hasta formar un litro. Filtrese si es necesario. El reactivo no debe tener ningun tinte verdoso ni azulado y tiene que conservarse perfectamente protegido del polvo.

2º. Solucion de edestina al 1 por 100.

Se dispersan 0,5 g. de edestina en 50 cc de solucion de ClH de pH = 3,3 y se agita constantemente mientras se calienta con suavidad. Llevar despues a ebullicion. Enfriar.

3º. Tampon.

Solucion A: Acido cítrico 0,1 M. En un matraz aforado se disuelven 21,014 g. de acido cítrico químicamente puro, recristalizado y seco, en agua destilada. Completese hasta hacer 1 litro.

Solucion B: Fosfato disódico 0,2 M. En un matraz aforado, disuélvase en agua destilada 28,396 g. de fosfato disódico anhidro químicamente puro y completese hasta formar 1 litro.

Para preparar el tampon de pH = 3,3 se mezclan 28,60 cc de la Solucion A y 11,40 cc de la Solucion B. Debe comprobarse potenciométricamente y co-

regir en caso necesario.

4º. Solución de Hidróxido sódico al 10 por ciento.

5º. Solución de ácido tricloracético al 20 por ciento.

Valoración

1º. En un tubo de ensayo de 18-20 mm de diámetro se coloca el sistema enzimático completo y los correspondientes testigos de edestina y de jugo gástrico, ya que ambos en mayor o menor grado, pueden dar color con el reactivo por contener grupos fenólicos libres.

La composición de los tres sistemas es la siguiente:

Tubo A	Tubo B	Tubo C
<u>Sistema enzimático completo</u>	<u>Testigo de jugo</u>	<u>Testigo de edestina</u>
5 cc tampon pH = 3,3 1 cc sol. edestina 0,2 cc jugo gástrico	5 cc tampon pH = 3,3 1 cc agua destilada 0,2 cc jugo gástrico	5 cc tampon pH = 3,3 1 cc sol. edestina 0,2 cc agua destilada

2º. Los tubos se emplazan en un termostato a 40º durante 10 minutos. (Como quiera que la hidrólisis empieza a temperatura ordinaria, es conveniente tener preparado el sistema a falta de la adición de jugo; el termostato también estará a punto y los tubos serán emplazados en él, inmediatamente después de agregar el jugo).

3º. Sacar los tubos y colocarlos sobre hielo o introducirlos en agua muy fría para detener la actividad de la enzima.

4º. Desproteínizar, añadiendo a cada tubo 6 cc de la solución de ácido tricloracético al 20 por 100. Invertir los tubos dos o tres veces y esperar unos minutos para que el precipitado se congrese.

5º. Filtrar.

6º. En un matraz aforado de 50 cc (a ser posible contrastado) se coloca 5 cc del filtrado. Con el frasco lavador se arrastran que hayan podido quedar en el cuello del matraz y se continúa la adición de agua hasta unos 12 o 15 cc. (Como puede darse el caso de hidrólisis altas por existir gran

cantidad de enzima en el jugo, conviene, cuando esto se sospeche, tomar una menor cantidad de filtrado a fin de que el color conseguido pueda leerse en el fotocolorimetro, sin bajar del 20 por ciento de trasmision. Este proceder es imprescindible, pues tratar de disolver el color conseguido hasta una dilucion que lo haga dosificable, es practica totalmente desechable por errónea).

7º. Añadir 6 cc de la solución de NaOH al 10 por ciento y lavar nuevamente el cuello del matraz con el chorro del frasco lavador.

8º. Se agrega despues, lentamente y agitando, 2 cc de reactivo de fenol.

9º. Completar con agua destilada hasta el enrase. (Es frecuente, sobre todo en dias frios, la aparicion de un precipitado blanco o turbidez, debido al sulfato de litio. Recomendamos para evitar este incidente, llevar los matraces antes de la adicion del reactivo, a un baño de agua a 50º durante 10 minutos. Se extraen los matraces y antes de que se enfríe se añade el reactivo.)

10º. Esperar 5 minutos y llevar una parte del liquido azul a los tubos del colorimetro para su lectura.

11º. Del valor obtenido para el tubo A, réstense los testigos B y C.

Curva de calibracion

Prepárese una solución madre de tirosina disolviendo exactamente en un matraz aforado de 100 cc, 20 mgrs. de tirosina en ClH 0,1 N y llevar hasta en enrase.

En matraces de 10 cc poner respectivamente 0, 1, 2, 3, 4, y 5 cc de la solución madre. Los matraces contienen entonces 0, 0,2 , 0,4 , 0,6 , 0,8 y 1,0 mgrs. de tirosina. Añádase a cada uno de ellos 20 cc de agua, 6 cc de la solución de NaOH y 2 cc del reactivo de fenol (este último, lentamente y agitando) Diluir con agua hasta enrasar. Dejar reposar 5-10 minutos.

Pásese despues a los tubos del fotocolorimetro y léase con filtro verde (530) el porcentaje de trasmision contra un blanco de agua a 100 por 100.

Los valores obtenidos llévense a una grafica en papel semilogarítmico y si la calebracion esta bien hecha, dara una recta que corta al eje de ordenadas a 100 de trasmision.

Fórmula para la colorimetria

La necesidad de evitar tantas operaciones aritméticas como se requiere para llegar al dato final, nos llevó a estudiar una formula que simplifi-
cara los cálculos.

Aplicamos la siguiente:

$$x = \frac{h \cdot b}{a} \cdot 2,5$$

dónde,

h = mgrs. de tirosina por 100

b = cc de liquido enzimatico

a = cc de filtrado tomado para la colorimetria

x = Unidades de proteasa en 1 cc de jugo gastrico

Si se sigue al pie de la letra nuestra tecnica y sobre todo, si empleamos las mismas cantidades y diluciones, la formula anterior se reduce a la siguiente:

$$x = 6,1 \cdot h$$

Nuestra Unidad de Proteasa

Siendo nuestra tecnica diferente a la emplada por los distintos autores, tenemos necesidad de emplear otra UNIDAD.

Definimos como UNIDAD DE PROTEASA O UNIDAD DE CATEPSINA:

La cantidad de enzima que libera un miligramo de tirosina de un substrato de edestina tamponado a pH = 3,3 en las condiciones de la experiencia.

Valores normales

En el estado actual de nuestros conocimientos, nos es imposible hablar de valores normales y patológicos.

Nuestra experiencia en tamponamiento de estómagos y el estudio de las curvas de secreción de catopsina, nos ha permitido comprobar que la mayor o menor actividad de la enzima depende principalmente del pH inicial del estómago, o sea, del jugo de ayunas, estableciéndose una relación de actividades que decrece a medida que el pH asciende.

Como resultado de este aspecto de nuestras investigaciones y hablando siempre de jugos de ayunas, podemos establecer tres grupos de actividades:

	Media de los valores obtenidos <u>UNIDADES</u>
pH entre 1,5 y 3,8	2,26
pH entre 4,6 y 6,9	1,6
pH entre 7,3 y 8,55	0,57

(Estos datos se basan en una casuística de 55 jugos gástricos)

PRUEBAS DE SECRECIÓN DE JUGO GÁSTRICO MEDIANTE ESTÍMULOS

En el curso de nuestros trabajos hemos empleado los siguientes estímulos de secreción de jugo gástrico:

- Desayuno de BOAS
- Estímulo por alcohol (desayuno de EHRLMANN)
- Estímulo por cafeína
- Estímulo por histamina

Omitimos la descripción de estas técnicas por ser de uso general y encontrarse descritas en todos los libros de fisiología gástrica.

Por igual razón omitimos la técnica de sondaje gástrico.

TAMPONES EMPLEADOS EN NUESTRAS EXPERIENCIAS

Al describir nuestra técnica de valoración de la segunda proteasa gástrica, hemos dado la composición de las soluciones madre para la preparación de tampones a los distintos pH que interesan. Vamos ahora a detallar la composición de ellos para cada uno de dichos pH.

Además de aquellos tampones de citrato-fosfato sódico, se han empleado en nuestras experiencias tampones de ClH-citrato.

Tampon ácido clorhídrico-citrato sódico

Solución ácido clorhídrico 0,1 N

Solución citrato sódico. Se disuelve 21,008 g. de ácido cítrico en 200 cc

de Sol N de NaOH. Diluir a 1 litro.

<u>pH</u>	<u>citrato</u>	<u>ClH 0,1 N</u>
1,08	0,0	100,0
1,2	11,0	89,0
1,4	19,8	80,2
1,6	24,5	75,5
1,8	28,2	71,8
2,0	30,9	69,-

Tampon ácido cítrico-fosfato sodico

Solucion de ácido cítrico.

Solucion fosfato disodico. (Ambas descritas anteriormente)

<u>pH</u>	<u>Sol. a. citrico</u>	<u>Sol. fosfato Na</u>
2,2	39,20	0,80
2,4	37,52	2,48
2,6	35,64	4,35
2,8	33,66	6,34
3,0	31,78	8,22
3,2	30,12	9,88
3,4	28,60	11,40
3,6	27,12	12,88
3,8	25,80	14,20
4,0	24,58	15,42
4,2	23,44	16,56
4,4	22,36	17,64
4,6	21,30	18,70
4,8	20,28	19,52
5,0	19,40	20,60
5,2	18,56	21,44
5,4	17,70	22,30
5,6	16,80	23,20
5,8	15,82	24,18
6,0	14,74	25,26
6,2	13,56	26,44
6,4	12,30	27,70
6,6	10,90	29,10
6,8	9,10	30,90
7,0	7,06	32,94
7,2	5,52	34,78
7,4	3,66	36,34
7,6	2,54	37,46
7,8	1,70	38,30
8,0	1,10	38,90

Mezclando cantidades correspondientes de ambas soluciones se tendrá 40 cc de una solución tampon al pH indicado.

Todos los pH que fueron preparados en el curso de nuestros trabajos se comprobaron y rectificaron potenciométricamente.



EXPERIENCIAS DE CINETICA

Como muestra enzimática se empleó jugo gástrico privado del moco por centrifugación. Paralelamente se hacen experiencias con pepsina cristalizada Merck, disuelta en ClH N/33 al 0,42 %. (Se emplea esta concentración para obtener hidrólisis cuantitativamente comparables a las que se obtienen con jugo gástrico).

El sustrato empleado fué de Edestina Merck en solución al 1% o sea en la misma concentración que en nuestra técnica de valoración de la catepsina.

Los tampones fueron de a. cítrico-fosfato disódico a pH = 3,3 (donde situamos el pH óptimo de acción de la catepsina) salvo en las experiencias destinadas a probar la influencia del pH en la actividad enzimática.

1ª.- Influencia de la temperatura

Experiencia nº 1. (Resume los resultados de un grupo de experiencias.)

Condiciones experimentales:

- Enzimas: 0,2 cc de jugo gástrico y 0,2 cc de sol. pepsina.
- Sustrato: Sol. de edestina al 1 por 100.
- pH = 3,3
- Temperaturas: 15°, 30°, 40°, 50°, 60°, 70°, 80°.
- Tiempo de calefacción: 10 minutos.
- Se preparan testigos de edestina y de ambas enzimas.

Sistemas

Tubo J (jugo)

Tampon 5 cc
Sol. edestina 1 cc
Jugo 0,2 cc

Tubo P (pepsina)

Tampon 5 cc
Sol. edestina 1 cc
Sol. pepsina 0,2 cc

Testigo J

Tampon 5 cc
Agua 1 cc
Jugo 0,2 cc

Testigo P

Tampon 5 cc
Agua 1 cc
Sol. pepsina 0,2 cc

Testigo E (edestina)

Tampon 5 cc
Sol. edestina 1 cc
Agua 0,2 cc

Resultados:

Cuadro I

<u>Temperatura</u>	Miligramos de tirosina	
	Sistema con: <u>Jugo gástrico</u>	<u>Pepsina crist.</u>
15º	0,216	0,256
30º	0,260	0,290
40º	0,340	0,380
50º	0,380	0,420
60º	0,408	0,448
70º	0,320	0,360
80º	0,252	0,285

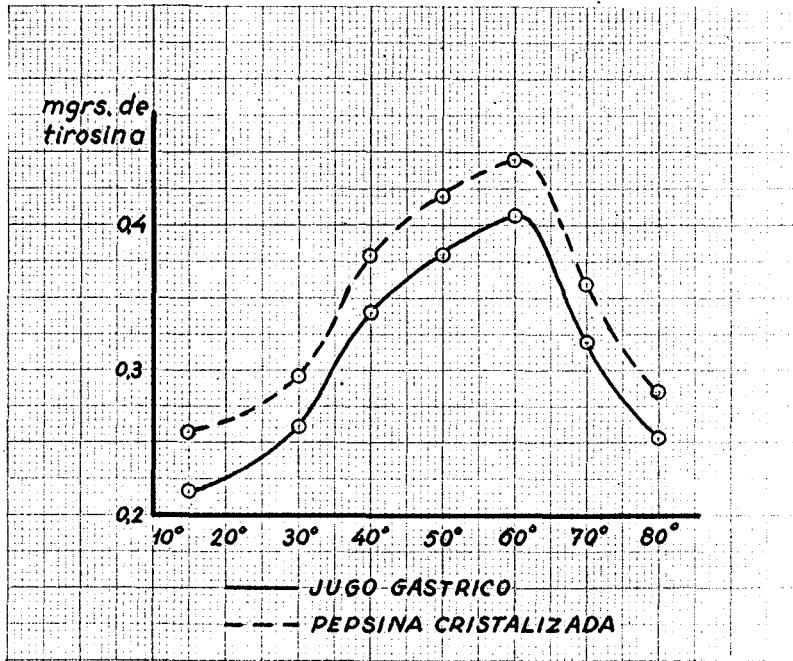


Fig. 1.

Experiencia nº 2. (Resume un grupo de experiencias).

Las condiciones experimentales fueron las de la experiencia anterior pero en lugar de usar pH = 3,3 (óptimo de la catepsina) lo hacemos a pH = 2,2 (óptimo de la pepsina).

Resultados:

Cuadro II

<u>Temperatura</u>	<u>Miligramos de tirosina.</u>	
	<u>Sistema con:</u> <u>Jugo gástrico</u>	<u>Pepsina crist.</u>
15º	0,210	0,235
30º	0,245	0,275
40º	0,325	0,345
50º	0,365	0,375
60º	0,320	0,350
70º	0,275	0,310
80º	0,220	0,290

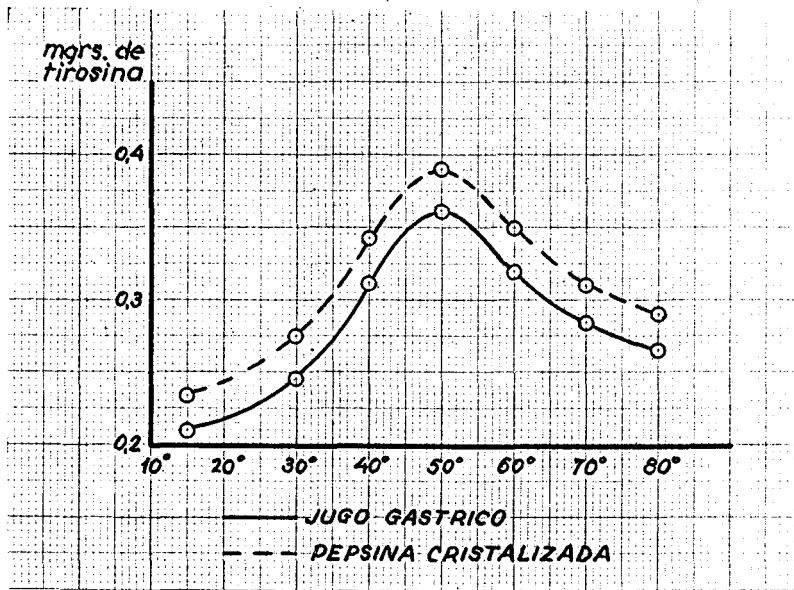


Fig. 2.



Conclusiones de las Exp. nº 1 y nº 2.

1º.- El óptimo de actividad enzimática tanto para el jugo gástrico como para la pepsina cristalizada, está a 60º cuando se trabaja a pH = 3,3 (Fig. 1.) y a 50º cuando se trabaja a pH = 2,2 (Fig. 2.)

2º.- El paralelismo de los resultados de ambas experiencias es absoluto.

2º.- Influencia del tiempo de calefaccion

Experiencia nº 3.

Condiciones experimentales.

-Las mismas anteriores, salvo tiempos de calefaccion

Sistemas

Los mismos que se emplearon en las experiencias nº 1 y nº 2.

Resultados:

Cuadro III

<u>Tiempos</u>	<u>Miligramos de tirosina.</u>	
	<u>Jugo gástrico</u>	<u>Pepsina crist.</u>
5'	0,260	0,060
10'	0,300	0,120
20'	0,350	0,189
33'	0,390	—
40'	—	0,263
45'	0,435	—
60'	0,472	0,285

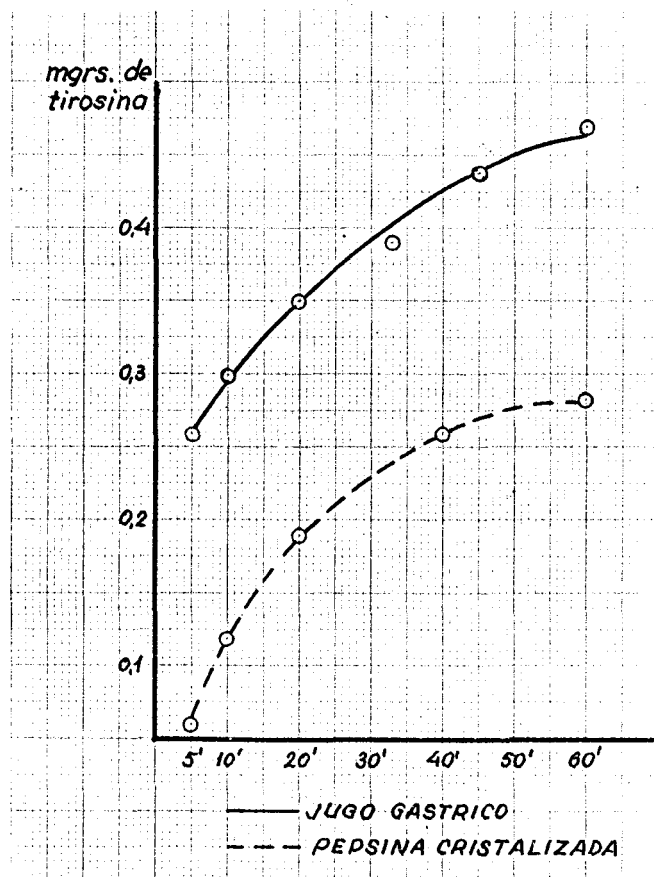


Fig. 3.

Conclusiones:

1ª.- La hidrólisis se acentua al aumentar el tiempo de calefaccion siguiendo las curvas un perfil parabólico.

2ª.- La curva de actividad de la proteasa natural y la de la pepsina cristalizada son casi paralelas.

3ª.- Influencia de la concentracion de la enzima

Experiencia nº 4. (Resume un grupo de experiencias).

Condiciones experimentales:

-Las mismas que en experiencias anteriores salvo la concentracion de la enzima.

-Todos los tubos fueron llevados a 7 cc con el tampon.

Resultados:

Cuadro IV

<u>Jugo</u>	<u>Mars. tirosina</u>		<u>Sol. pepsina</u>	<u>mars. tirosina</u>
0,1 cc	0,224		0,2 cc	0,373
0,2 cc	0,270		0,4 cc	0,528
0,3 cc	0,320		0,8 cc	0,678
0,5 cc	0,396		1,2 cc	0,710
0,75 c	0,442		1,6 cc	0,723
1,0 cc	0,484			

Ver la Fig. 4 en la pagina siguiente.

Conclusiones:

1ª.- La hidrólisis aumenta con la concentracion de la enzima tomando las curvas un perfil parabólico.

2ª.- Ambas curvas son casi paralelas.

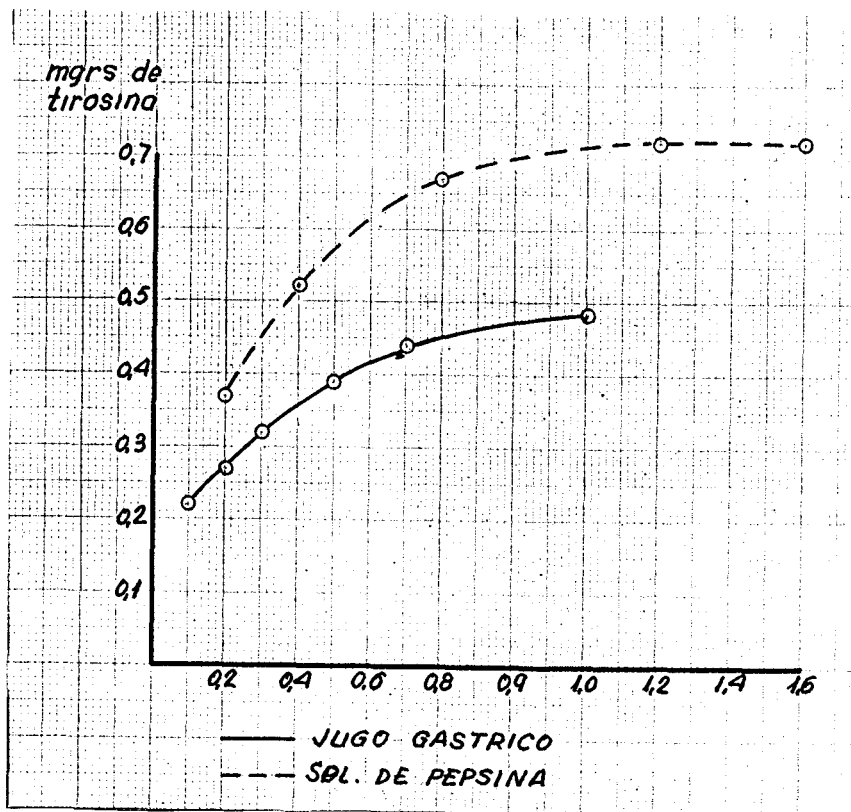


Fig. 4

4ª.- Influencia de la concentración del sustrato

Experiencia nº 5. (Resume un grupo de experiencias)

Condiciones experimentales:

- Las mismas que en experiencias anteriores, excepto la concentración de la solución de pepsina.

Resultados:

Cuadro V

<u>Concentración del sustrato</u>	<u>Miligramos de tirosina</u> <u>Sistema con:</u>	
	<u>Jugo gástrico</u>	<u>Pepsina crist.</u>
0,96 por 1.000	0,260	0,300
1,6 " "	0,328	0,368
3,2 " "	0,460	0,499
6,4 " "	0,656	0,596

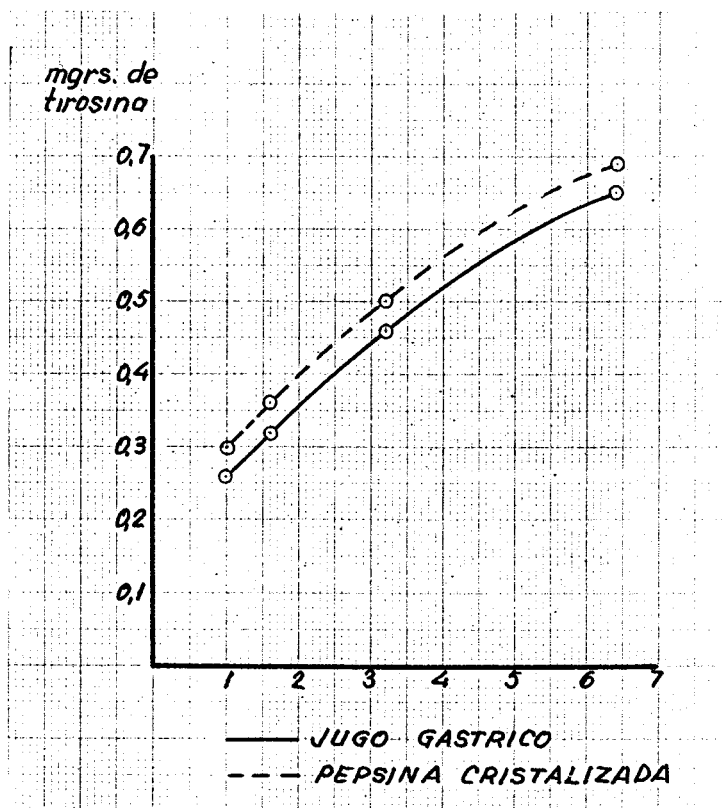


Fig. 5

Conclusiones:

- 1º.- La hidrólisis aumenta con la concentración del sustrato, tanto para la pepsina cristalizada como para el jugo gástrico.
- 2º.- El paralelismo de ambas curvas es absoluto.

5º.- Influencia del pH

Experiencia nº 6. (Resume un grupo de experiencias)

Condiciones experimentales:

- Las mismas que en experiencias anteriores salvo pH.
- Se prepara un solo sistema: jugo gástrico. La comparación con el comportamiento de la pepsina cristalizada, se hace en las siguientes experiencias sobre influencia de la alcalinización.



Resultados:

Cuadro VI

<u>pH</u>	<u>mgrs. de tirosina</u>
1,0	0,202
1,5	0,280
1,8	0,310
2,2	0,341
2,5	0,335
2,8	0,315
3,1	0,350
3,3	0,362
3,7	0,300
4,0	0,225

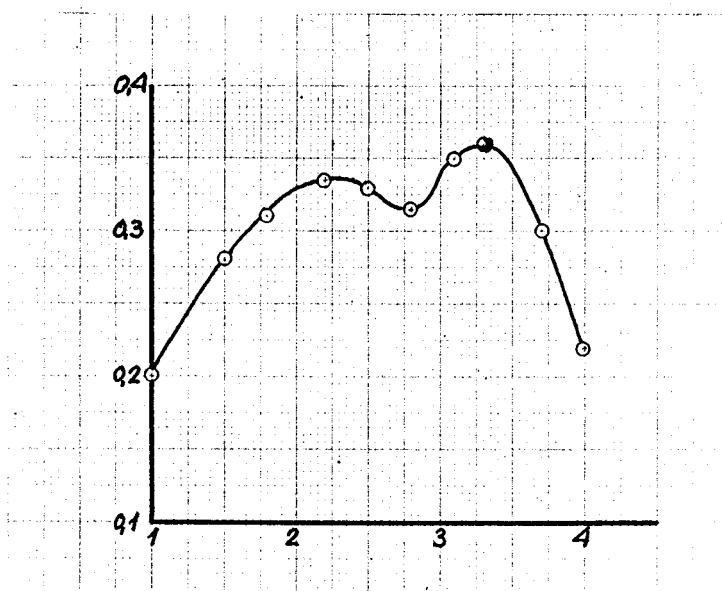


Fig. 6.

Conclusiones:

- 1ª.- Se confirma la existencia de un maximo a pH = 2,2 con sustrato de edestina, correspondiente a la accion propiamente pepsinica.
- 2ª.- Siguiendo la curva en sentido ascendente, se encuentra otro maximo a pH = 3,3 correspondiente a la accion catepsinica del jugo.
- 3ª.- Entre ambos maximos hay una depresion a pH = 2,8.

68.- Influencia de la alcalinidad

Experiencia nº 7.

Condiciones experimentales:

- Se sigue la misma metódica.
- Sol. pepsina, 1 cc
- Sol. edestina 1 cc
- Jugo gástrico, 0,2 cc
- pH del jugo de ayunas = 2,8
- Tiempo de calefacción 10 minutos.
- Temperatura, 40°
- Una serie de tubos de esta composición y a distintos pH, actuaron como sistemas patrones y produjeron la curva consignada en la experiencia anterior, de la que tomamos algunos datos para el Cuadro VII.
- Cada uno de estos sistemas se repitió usando sol. de pepsina y jugo gástrico de ayunas, sometiéndolos durante una hora a los siguientes pH: 4,0 , 5,5 , 7,0 , 7,5 y 8,0.

Resultados:

Cuadro VII

Experiencias con pepsina cristalizada

Miligramos de tirosina por 100

pH del sistema enzimatic.	Sin previa inactivac.	Inactivacion previa durante una hora a pH:				
		4.0	5.5	7.0	7.5	8.0
1,0	0,121	0,120	0,105	0,031	0,075	0,031
1,8	0,278	0,251	0,205	0,160	0,095	0,032
2,2	0,320	0,273	0,215	0,171	0,095	0,032
2,8	0,251	0,235	0,189	0,135	0,080	0,032
3,3	0,333	0,300	0,241	0,175	0,100	0,032
4,0	0,153	0,132	0,100	0,062	0,050	0,032

Experiencias con jugo gástrico

1,0	0,202	0,175	0,165	0,150	0,125	0,025
1,8	0,310	0,285	0,255	0,225	0,157	0,025
2,2	0,341	0,310	0,260	0,235	0,170	0,025
2,8	0,315	0,275	0,235	0,202	0,135	0,025
3,3	0,362	0,325	0,275	0,240	0,165	0,025

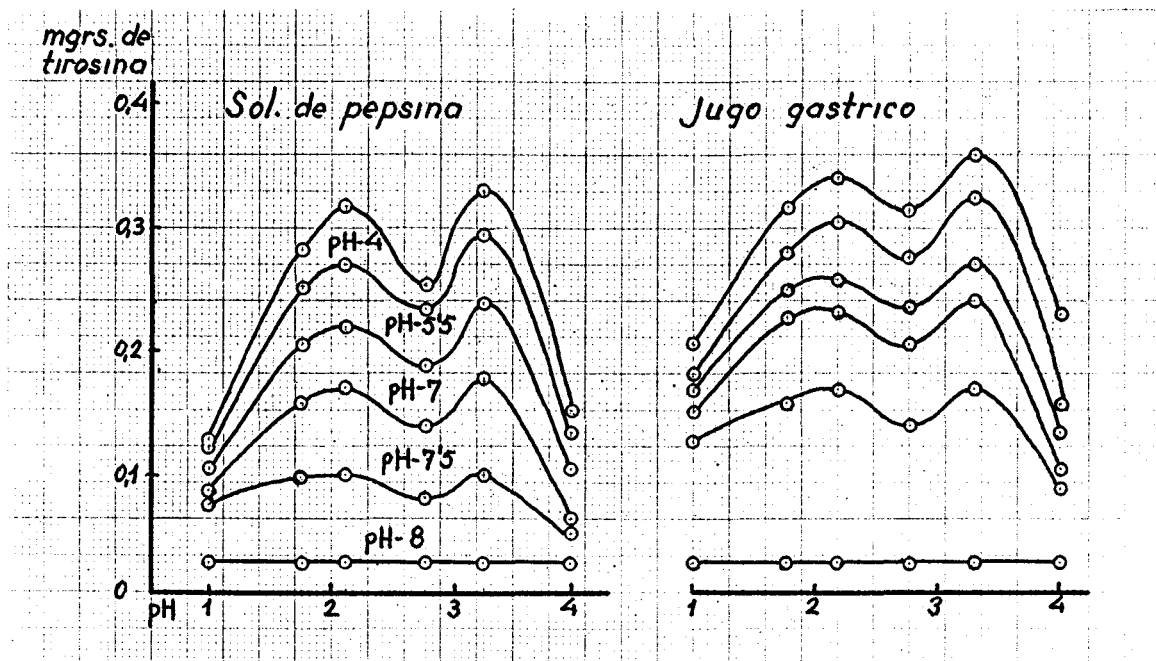


Fig. 7.

Conclusiones:

- 19.- La inactivacion que experimentan ambas enzimas es tanto mayor cuando mas elevado es el pH a que fueron sometidas.
- 28.- La inactivacion llega a ser total a pH = 8,0
- 39.- Las curvas conservan el mismo perfil que las de las experiencias sobre la influencia del pH, pero tienden a allanarse los dos máximos al ser menor la depression que los separa.
- 48.- Siempre mantiene el jugo una actividad superior a la de la pepsina.
- 59.- La actividad catéptica fue siempre superior a la de la pepsina tanto en el jugo como en la pepsina cristalizada.
- 68.- No obstante, la sensibilidad a la alcalinizacion de ambas proteasas fue muy parecida.

Experiencia nº 8

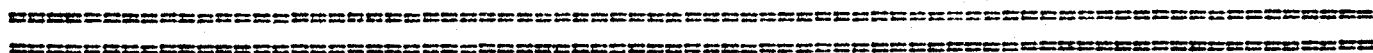
Como complemento de la experiencia anterior se han montado una serie de ellas con jugos gástricos diferentes y extraídos en distintas condiciones.

Cuadro VIII

<u>Caso</u> <u>núm.</u>	<u>pH</u> <u>inicial</u>	<u>Unidades</u> <u>catepsin</u>	<u>Inactiv.</u> <u>a pH</u>	<u>Unidades</u> <u>catepsin</u>	<u>% de</u> <u>inactiv.</u>	<u>Observaciones</u>
6	3,2	3,7	7,5	1,4	62	Jugo de ayunas
6	3,2	2,4	7,5	1,3	45,7	" conservado 8 días
10	7,95	2,1	8,0	2,1	0	Jugo de ayunas
11	7,35	2,7	8,0	2,7	0	" "
12	3,3	2,6	8,0	2,5	4	Jugo de 2 horas despues desa. cafe-leche pan.
13	8,4	0	8,0	0	0	Jugo de ayunas
13	7,4	0	8,0	0	0	30' despues desayuna de alcohol (Ehrmann).
14	3,35	2	7,6	1,8	10	Jugo de ayunas
14	1,5	1,8	6,8	1,6	11,1	30' despues desayuno de alcohol (Ehrmann).
15	1,5	2	8,3	1,5	25	Jugo de ayunas.

Conclusiones:

- 1ª.- El caso nº 6 fue estudiado con jugo reciente y con jugo de 8 días de conservacion a temperatura ambiente. En este segundo caso, la inactivacion fue inferior por perdida expontanea de la actividad.
- 2ª.- En el caso nº 14 se observan inactivaciones casi identicas en el jugo de ayunas y en el extraído 30' despues del desayuno de alcohol.
- 3ª.- El caso nº 13 con jugos de ayunas alcalinos, no experimenta inactivacion, sin duda por ausencia de actividad catéptica.
- 4ª.- Los casos nº 10 i 11 con actividad catéptica, a pesar de sus pH alcalinos, no experimentan inactivacion. Son casos de difícil interpretación.



ACCION DE LOS EFECTORES

1º.- Influencia del SH₂

La metodica seguida fue la misma que en experiencias anteriores. Las variantes de cada una de las siguientes, se indican en cada caso. Cuando se trabajó con pepsina cristalizada, la solucion fue hecha en el momento. Cuando se trabajó con jugo gástrico, se hizo inmediato a su extraccion y tras de desposeerle del moco por centrifugacion.

Experiencia nº 9

Condiciones experimentales:

- Se hizo pasar una corriente de SH₂ a través del jugo gástrico, durante 20 minutos investigando seguidamente su poder catéptico frente a los correspondientes testigos.
- Se emplean exclusivamente jugos de pH ácidos.
- Se estudian jugos de ayunas y jugos segregados por estímulos de histamina y cafeína.

Resultados:

Cuadro IX



Miligramos de tirosina					
<u>Experiencia</u>	<u>Testigo</u>	<u>Jugo tras la accion de SH₂</u>	<u>% de activacion</u>	<u>pH inicial del jugo</u>	<u>Condiciones</u>
16	0,390	0,639	63	1,5	Jugo de ayunas
23	0,260	0,340	30	1,5	" "
25	0,216	0,260	20	2,1	" "
25	0,188	0,180	0	2,0	" tras histamina
26	0,282	0,328	12	1,9	" de ayunas
26	0,292	0,328	12	1,35	" tras histamina
44	0,752	1,650	110	2,05	" de ayunas
44	0,604	1,450	140	2,2	" tras cafeína

Conclusiones:

- 1º.- En todos los casos se encontró una franca activacion.
- 2º.- La intensidad de la accion fue casi igual en la mayoria de los casos, tanto en los jugos de ayunas como en los segregados mediante estímulos

3º.- El distinto grado de activacion en jugos diferentes, indica la presencia de algun factor desconocido presente en el jugo.

2º.- Influencia del CNK

Experiencia nº 10.

Condiciones experimentales:

- Se emplearon cantidades de 0,05 y 0,15 cc de sol. M/10 de CNK.
- Como fuente enzimática se empleo Jugo de ayunas de pH ácido.
- Tiempo de exposicion, 30 minutos.
- El Tubo J, contiene jugo gastrico tratado por CNK.
- El Tubo E, es el testig@ de edestina el cual se expone tambien 30 minutos a la accion del CNK.
- El Tubo SC es del sistema completo con igual exposicion al efector.
- El Tubo T es el testigo de jugo sin exposicion.

Resultados:

Cuadro X

<u>Tubo</u>	<u>Unidades de catepsina</u>	<u>Porcentaje de inactivacion</u>
T	3,2	-----
J	1,6	50
E	2,8	12
SC	2,8	12

Conclusion:

Queda demostrado el poder inactivador del CNK, sobre la enzima, no obstante su accion sobre las demas partes del sistema.

Experiencia 11ª.

Tomamos esta experiencia entre un grupo de ollas con resultados analogos o parecidos.

En ellas tratamos de demostrar el poder inactivador del CNK sobre una solucion de pepsina cristalizada.

Condiciones experimentales:

- Las mismas que en experiencias anteriores.
- Se emplean soluciones de CNK de dilucion creciente tomando en cada caso 0,1 cc.

Resultados:

Cuadro XI

<u>Sistema</u>	<u>Miligramos de tirosina</u>
Sin CNK.....	0,118
Con CNK sol. M	0,0
" " sol. M/10	0,0
" " sol. M/100	ligero color, indosificable.
" " sol. M/1.000	0,119

Conclusion:

Se observa una inactivacion total de la enzima frente a las diluciones M y M/10; parcial, para la dilucion M/100 y nula para diluciones superiores.

=====

Experiencia nº 12.

Se repite la experiencia anterior empleando jugo gástrico en lugar de pepsina cristalizada.

Resultados:

Cuadro XII

Sistema	Miligramos de tirosina
Sin CNK	0,408
Con CNK sol. M	0,000
" " sol. M/10	0,000
" " sol. M/100	0,380
" " sol. M/1.000	0,380
" " sol. M/10.000	0,408
" " sol. M/100.000	0,408
" " sol. M/1.000.000	0,408

Conclusion:

La inactivación es completa a concentraciones M y M/10 ; despreciable, entre concentraciones M/100 y M/1.000 y nula en diluciones superiores.

Experiencia nº 13.

Como complemento de las experiencias anteriores, se montó la siguiente para estudiar el efecto de la Sol. de CNK a concentraciones intermedias entre M/10 y M/100. Enzima: pepsina cristalizada.

Resultados:

Cuadro XIII

Sistema	Miligramos de tirosina
Sin CNK	0,420
Con CNK sol. M/10 ...	0,000
" " sol. M/20 ...	0,070
" " sol. M/30 ...	0,200
" " sol. M/40 ...	0,325
" " sol. M/50 ...	0,389
" " sol. M/60 ...	0,421
" " sol. M/70 ...	0,421
" " sol. M/80 ...	0,421
" " sol. M/90 ...	0,421

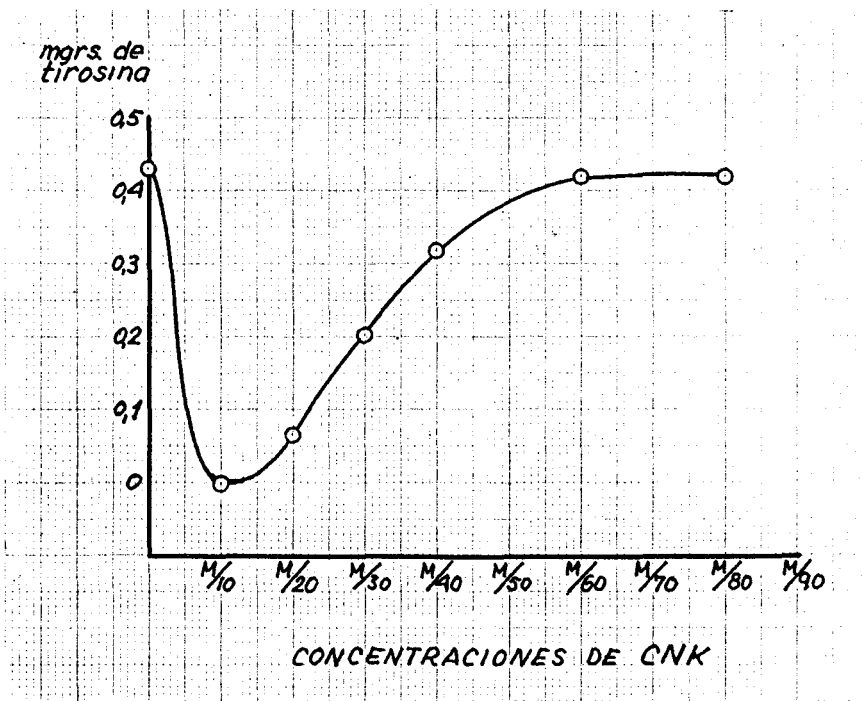


Fig. 8.

Conclusion:

La actividad enzimática se anula a concentración M/10 y se recupera rápidamente en concentración próxima a M/50.

Experiencia nº 14.

En otra serie de ensayos, modificamos las condiciones experimentales, tratando previamente la pepsina cristalizada en solución, a concentración habitual, con diluciones crecientes de la solución N/10 de CNK.

Condiciones experimentales:

- Pepsina + CNK a diluciones crecientes.
- Tiempo de exposición: 10 minutos
- Se adiciona después el tampón y la edestina

Sistema

Tampón	5 cc
Sol. edestina ...	1,5 cc
Sol. pepsina	0,1 cc
Sol. CNK	0,1 cc

Resultados: Los testigos fueron indosificables.

Cuadro XIV

Diluciones de la Sol. M/10 de CNK	Miligramos de tirosina
1	0,0
1/5	0,0
1/10	0,0
1/50	0,0
1/100	0,0
1/500	0,0
1/1.000	0,0
1/5.000	0,0
Sin tratar con CNK	0,428

Conclusión:

La inactivación de la pepsina cristalizada es completa a todas las diluciones de CNK.

Experiencia nº 15.

Se repita la anterior experiencia empleando jugo gástrico en vez de pepsina cristalizada.

Resultados:

Cuadro XV

Diluciones	Cantidad de jugo	Miligramos de tirosina
1	0,1 cc (testigo).....	0,398
1/50	0,002 cc Tratado con CNK	Color mínimo. Indosificable.
1/75	0,0015 cc " "	idem idem
1/100	0,001 cc " "	0,112
1/200	0,0005 cc " "	0,114
1/300	0,00033 cc " "	Color mínimo. Indosificable.
1/400	0,00025 cc " "	idem idem
1/500	0,0002 cc " "	idem idem

Conclusiones:

La inhibición es aquí también muy manifiesta. Se observa, sin embargo, una cierta tendencia a recobrar la actividad enzimática en las disoluciones de jugo entre 1/100 y 1/200.

=====

Experiencia nº 16.

Ante la posibilidad de una influencia de la temperatura en el grado de inactivación producido por el CNK, se estudió esta acción sobre jugos a temperatura ambiente y a 60°. En esta experiencia englobamos los datos de otra para investigar si, a este respecto, había diferencia, entre los jugos de ayunas y los segregados bajo estímulo de histamina.

Resultados:

Cuadro XVI

Experiencia nº	Jugo procedente de ayunas (A). Jugo tras histamina (H).	Temperatura	% de inactivación
28	A	60 grados	35,7
		T. ambiente	20,0
	H	60 grados	12,5
		T. ambiente	12,5
29	A	60 grados	100,0
		T. ambiente	51,0
	H	60 grados	100,0
		T. ambiente	55,0

Conclusiones:

- 1ª.- El grado de inactivación del CNK aumenta con la temperatura. En algún caso la inactivación llega al 100 %.
 - 2ª.- Dentro de esta afirmación el comportamiento cuantitativo de ambos jugos fue distinto.
- =====

Experiencia 17.

Se repite la experiencia anterior con tiempos de exposicion distintos.

Condiciones experimentales:

- Jugo de ayunas de pH = 4,5
- Exposicion a 60°
- Tiempos: 5', 13', 25', 37'.
- Testigos a temperatura ambiente.
- Testigo sin CNK
- Cantidad de jugo empleada: 0,5 cc

Resultados:

Cuadro XVII

<u>Tiempos a 60°</u>	<u>Miligramos de tirosina</u>	<u>% de inactivacion</u>
5'	0,124	73
13'	0,116	73
25'	0,124	73
37'	0,132	73
T. ambiente	0,145	71
T. ambiente sin CNK	0,12	

Conclusion:

La influencia del tiempo de exposicion a la temperatura de 60° con un jugo de ayunas , fue practicamente nula.

=====

Experiencia nº 18.

Para tratar de explicarnos el diferente grado de inactivación del jugo, hemos considerado la influencia que pudiera tener el pH de ayunas y tras el estímulo.

Cuadro XVIII

Caso nº	pH inicial	Jugo procedente de	% de inactivación
9	7,95	Ayunas	0
12	3,2	Tras estímulo, desayuno de Boas	12
26	1,9	Ayunas	64
"	1,35	Tras estímulo de histamina	3
27	1,75	Ayunas	100
"	3,0	Tras estímulo de histamina	100
28	3,8	Ayunas	20
"	3,0	Tras estímulo de histamina	12,5
29	3,2	Ayunas	51
29,	2,8	Tras estímulo de histamina	55
30,	4,5	Ayunas	71
13	8,4	Ayunas	0
"	7,4	Tras estímulo de alcohol	0
14	3,35	Ayunas	100
"	1,5	Tras estímulo de alcohol	100
32	4,6	Ayunas	69
35	4,8	Ayunas	69
"	2,8	Tras estímulo de cafeína	63
36	6,5	Ayunas	35
"	2,8	Tras estímulo de cafeína	64
37	2,0	Ayunas	27
"	2,0	Tras estímulo de cafeína	66
38	6,5	Ayunas	49
"	2,5	Tras estímulo de cafeína	78
41	1,8	Ayunas	68
"	1,4	Tras estímulo de cafeína	10
42	1,6	Ayunas	0
"	2,3	Tras estímulo de cafeína	10
43	1,4	Ayunas	0
"	2,5	Tras estímulo de histamina	16
44	2,05	Ayunas	23
"	2,5	Tras estímulo de cafeína	20
57	3,2	Ayunas	100
62	2,5	Ayunas	100

Conclusiones:

- 1ª.- La inactivación del jugo por CNK es nula cuando se trata de jugos alcalinos.
- 2ª.- En jugos ácidos la inactivación suele ser franca; excepciones: los casos 43 y 42.

Experiencia nº 19.

Con el fin de ensayar la posible influencia del CNK en previa exposicion a distintos pH, montamos la siguiente experiencia.

Condiciones experimentales:

- Enzima: 1,5 cc de jugo.
- Cianuro: 0,3 cc de la Sol. M/10
- Tampon: 2,4 cc
- pH : 1,8 , 3,3 , 6,6
- Tiempo de exposicion: 30'
- Posteriormente, para la prueba hidrolitica se tomó 1,4 cc
- Se prepararon los correspondientes testigos.
- La tecnica analitica fue la habitual.

Resultados:

Cuadro XIX

<u>Tubo</u>	<u>Miligramos de tirosina</u>
Tubo testigo	0,580
Tubo pH = 1,8	0,560
Tubo pH = 3,3	0,540
Tubo pH = 6,6	0,512

Conclusiones:

- 1ª.- El tamponamiento previo, impide practicamente la inactivacion, tanto mas, cuanto mas ácido es el pH.
 - 2ª.- Como en experiencias anteriores, puede sospecharse la presencia de posibles efectores entre los restantes componentes normales del jugo gástrico.
- =====

PRESENCIA EN EL JUGO GASTRICO DE UN INACTIVADOR NATURAL

Experiencia nº 20.

Condiciones experimentales:

- Temperatura de calefaccion: 45°
- Tiempo: 15'
- Sol. edestina al 1%, 1cc
- Sol. pepsina 0,42 %, 1 cc
- La inactivacion se hace por ebullicion prolongada.

Sistemas Testigos

Tubo TP
Testigo de Pepsina

Tampon 5 cc
Sol. pepsina 0,1 cc
Agua 1 cc

Tubo TE
Testigo de Edestina

Tampon 5 cc
Agua D,1 cc
Sol. edestina 0,1 cc

Tubo TJA
Testigo jugo activo

Tampon 5 cc
Jugo activo 0,1 cc
Agua 1 cc

Tubo TJI
Testigo jugo inactivo

Tampon 5 cc
Jugo inactivo 0,1 cc
Agua 1 cc

Sistemas Probandos

Tubo SP
Sistema pepsina

Tampon 5 cc
Sol. pepsina 0,1 cc
Sol. edestina 1 cc

Tubo SJA
Sistema jugo activo

Tampon 5 cc
Jugo activo 0,1 cc
Sol. edestina 1 cc

Tubo SJAP
Sistema jugo activo mas pepsina

Tampon 5 cc
Jugo activo 0,1 cc
Sol. pepsina 0,1 cc
Sol. edestina 1 cc

Tubo SJIP
Sistema jugo inactivo mas pepsina

Tampon 5 cc
Jugo inactivo 0,1 cc
Sol. pepsina 0,1 cc
Sol. edestina 1 cc

Resultados:

Cuadro XX

Las hidrolisis se expresan en mgrs. de tirosina

Caso nº	SP	SJA	SJAP	SJIP	Observaciones
49	0,233	0,374	0,362	0,219	Normal
50	0,198	0,384	0,309	0,111	Normal
51	0,099	0,189	0,162	0,078	Gastritis
52	0,189	0,276	0,257	0,186	Gastritis
53	0,170	0,378	0,176	0,162	Ulous

Conclusiones:

- 1º.- Al conjuntar ambas acciones enzimáticas no se advierte la sumacion de efectos, antes al contrario, hay una hidrolisis inferior a la que se observa cuando actúa el jugo solo sobre el substrato.
- 2º.- Se pone de manifiesto que en el jugo hay un factor capaz de frenar la hidrolisis, sobre todo, cuando esta es muy elevada.
- 3º.- La accion inhibidora del jugo inactivado por ebullicion, se aprecia siempre salvo en un caso que fue indiferente. En el caso nº 50, en cambio, fue muy intensa.
- 4º.- Parece confirmarse la presencia de un inactivador en el jugo gástrico y que este es de naturaleza termoestable.



Experiencia n° 21.

Para analizar con mas precision las conclusiones de la experiencia anterior, montamos otra para estudiar la influencia de una cantidad constante de jugo activo sobre la accion hidrolitica de cantidades crecientes de pepsina cristalizada.

Condiciones experimentales:

- Los tubos P-1, P-2, P-3 y P-4 contienen respectivamente 0,1 , 0,2 , 0,3 y 0,4 cc de de solucion de pepsina mas tampon y sustrato.
- Los tubos P-1 mas jugo, P-2 mas jugo, P-3 mas jugo y P-4 mas jugo, contienen el mismo sistema anterior al cual se le ha añadido 0,1 cc de jugo activo.

Resultados:

Cuadro XXI

Tubo	Mgrs. de tirosina	Tubo	Mgrs. de tirosina
-	-	Jugo solo	0,560
P-1	0,580	P-1 + jugo	0,532
P-2	0,732	P-2 + jugo	0,750
P-3	0,828	P-3 + jugo	0,800
P-4	0,856	P-4 + jugo	0,833

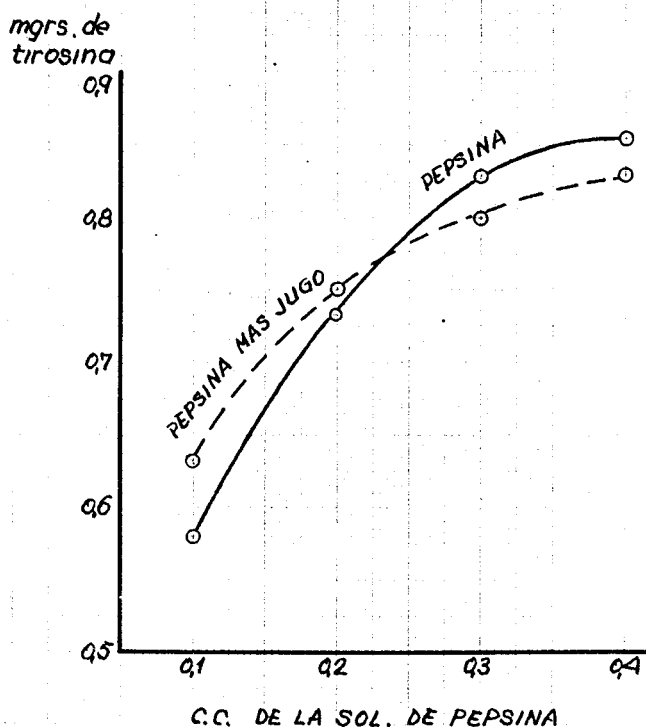


Fig. 9.

Conclusiones:

- 1ª.- Una vez mas se comprueba la falta de sumacion de efectos enzimáticos, no obstante haber una hidrolisis mayor.
 - 2ª.- La curva parabólica correspondiente al sistema pepsina + jugo, es mas inclinada que la del sistema pepsina.
 - 3ª.- Al aumentar la cantidad de pepsina dentro del sistema pepsina + jugo, disminuye la hidrolisis llegando a ser inferior que cuando actua la pepsina sola, probandose asi la presencia del inactivador.
-

Experiencia nº 22.

Para confirmar las conclusiones anteriores se montó otro tipo de experiencia en las condiciones que a continuación se indican.

Condiciones experimentales:

- Se preparan sistemas con cantidades constantes de pepsina. (0,1 cc de la solución habitual).
- Se añade cantidades progresivas de jugo gástrico el cual se ha inactivado mediante una ebullición prolongada.
- Se deducen en todos los casos el valor de los correspondientes testigos.
- La expresión "JI" usada en el siguiente cuadro de valores, significa "jugo inactivado" y la cifras que le siguen (por ejemplo: JI-2) indican décimas de centímetro cúbico añadidas en cada caso.

Resultados:

Cuadro XXII

<u>Exp. nº</u>	<u>Sistema digestivo constituido por</u>	<u>Mgms. de tirosina</u>	<u>% de inactivacion</u>	<u>Procedencia del jugo</u>
56	Pepsina (sola)	0,364	—	Ulcus duodenal
"	P mas JI-1	0,280	24	
"	P mas JI-2	0,240	32	
"	P mas JI-3	0,234	37	
"	P mas JI-4	0,224	40	
59	P sola	0,500	—	Ulcus duodenal
"	P mas JI-1	0,450	10	
"	P mas JI-2	0,365	27	
"	P mas JI-3	0,310	38	
"	P mas JI-4	0,285	43	
63	P sola	0,525	—	Ulcus duodenal
"	P mas JI-1	0,473	10	
"	P mas JI-2	0,390	26	
"	P mas JI-3	0,341	35	
"	P mas JI-4	0,310	40	
65	P sola	0,440	—	Ulcus gástrico
"	P mas JI-1	0,390	11	
"	P mas JI-2	0,305	31	
"	P mas JI-3	0,250	43	
"	P mas JI-4	0,225	49	
58	P sola	0,424	—	Cancer gástrico
"	P mas JI-1	0,408	4	
"	P mas JI-2	0,360	15	
"	P mas JI-3	0,340	20	
"	P mas JI-4	0,324	24	
66	P sola	0,450	—	Cancer gástrico
"	P mas JI-1	0,444	1	
"	P mas JI-2	0,386	14	
"	P mas JI-3	0,360	18	
"	P mas JI-4	0,350	22	

Conclusiones:

1ª.- El grado de proteolisis producida por la pepsina sobre edestina a pH = 3,3, disminuye al añadir al sistema jugo gástrico inactivado.

2ª.- Tal inactivacion aumenta con la cantidad de jugo añadido.

3ª.- La cantidad de inactivador contenido en los distintos jugos es variable.

(Nos abstenemos de sacar las conclusiones de caracter clinico que de esta esperiencia se deducen.)

CONCLUSIONES FINALES

- 1ª.- Se establece una técnica original para la valoración de la catepsina del jugo gástrico con la cual hacemos todas nuestras experiencias.
- 2ª.- Definimos nuestra UNIDAD DE CATEPSINA como la cantidad de enzima que libera un miligramo de tirosina de un sustrato de edestina, tamponado a pH = 3,3 en las condiciones de la experiencia.
- 3ª.- Se fijan como valores normales de catepsina los siguientes:
2,26 UNIDADES, para jugos con pH entre 1,5 y 3,8
1,60 UNIDADES, para jugos con pH entre 4,6 y 6,9
0,57 UNIDADES, para jugos con pH entre 7,3 y 8,55
- 4ª.- Se estudia la cinética de la catepsina a través de
 - a).- Influencia de la temperatura.
 - b).- Influencia del tiempo de calefacción.
 - c).- Influencia de la concentración de la enzima.
 - d).- Influencia de la concentración del sustrato.
 - e).- Influencia del pH.
- 5ª.- Se precisa a través de las curvas de acción en función del pH, un máximo para la pepsina a pH = 2,2 ; un máximo para la catepsina a pH = 3,3 y una depresión entre ambas actividades con un punto mínimo a pH = 2,8.

- 6^a.-- Dado que el proceso digestivo de los péptidos discurre mas tiempo en zonas de pH superior a 2,2 , deducimos el papel preponderante de la segunda proteasa gástrica (catepsina) respecto a la pepsina. Esta actuaría en la última fase de la proteolisis.
- 7^a.-- Se estudia el poder inhibitor de la alcalinización resultando ser irreversible. Es total a pH = 3,0. La sensibilidad de ambas proteasas a este respecto, es análoga.
- 8^a.-- Se comprueba el poder activador del SH₂ tanto en los jugos de ayunas como en los segregados mediante estímulos.
- 9^a.-- No se ha comprobado el poder activador del cianuro potásico sino un efecto opuesto de inactivación, por lo cual, no podemos conceptuar a la enzima como una catepsina verdadera; mas bien, como la "segunda proteasa gástrica".
- 10^a.-- El poder inactivante del CNK es máximo para concentraciones M y M/10, disminuyendo con las sucesivas diluciones hasta desaparecer a M/100.
- 11^a.-- La acción del CNK es constante para la pepsina cristalizada, en cambio varia de unos jugos gástricos a otros.
- 12^a.-- Se comprueba la acción inhibitora del jugo gástrico activo y del jugo inactivado por la ebullición, sobre la proteolisis determinada por la pepsina cristalizada, lo que revela la presencia de un inhibidor termoestable entre los restantes componentes del jugo gástrico.
- =====
- =====

B I B L I O G R A F I A

- (1).-- WILLSTAETTER R. y BAMANN E. Z. physiol. chem. 180, 127-43, 1929.
- (2).-- FREUNDENBERG E. y BUCHS S. Schweiz. med. Wochschr. 70, 249-50
1940.
- (3).-- GRASSMANN W. Erg. Enzinforschung, 1, 128, 1932.
- (4).-- MERTELIN R. Klin. Wochschr. 24/25, 401-4, 1947.
- (5).-- MILHAUD y EPINEY, Gastroenterology, 77, 193, 1951.
- (6).-- BUCHS A. "Die Biologie des Magankathepsins", S. Karger, Basel
1947.
- (7).-- DIAZ RUBIO M., SEGOVIA F. y MILLAN A. Rev. Clin. Esp. 7,
t LXIII, nº 1, Octubre, 1956.
- (8).-- SEGOVIA F. Rev. Diag. Biol. 5, vol. VII, Enero-Febrero, 1958.
- (9).-- GRASSMANN W. loc. cit.
- (10).-- LINDERSTRON-LANG K. y JOHASEN, Comp. rend. trav. lab. Carlsberg
Ser. Chim. 23, 143-6, 1940.
- (11).-- BERGMANN M. y ZERVAS L. Ber. dtch. Chem. 65 B, 1747-50, 1932.
- (12).-- ANSON M.L. Science, 81, 467, 1935.
- (13).-- SEGOVIA F. loc. cit.
- (14).-- WILLSTAETTER R. y BAMANN E. Z. physiol. chem. 186, 85, 1929.
- (15).-- BUCHS S. loc. cit.
- (16).-- DIAZ RUBIO M., SEGOVIA F. y MILLAN A. loc. cit.
- (17).-- MILHAUD y EPINEY, loc. cit.
- (18).-- DIAZ RUBIO M., SEGOVIA F. y MILLAN A. loc. cit.
- (19).-- MILHAUD y EPINEY, loc. cit.
- (20).-- WILLSTAETTER R. y GRASSMANN W. Z. physiol. chem. 151, 286, 1927.
- (21).-- WALDSCHMIDT-LEITZ E. y SIMON E. Z. physiol. chem. 156, 114, 1928.
- (22).-- GRASSMANN W. y WILLSTAETTER R. Z. physiol. chem. 18, 307, 1926.
- (23).-- WALDSCHMIDT-LEITZ E. loc. cit.
- (24).-- GRASSMANN W. y WILLSTAETTER R. loc. cit.
- (25).-- KENDALL A.I. y KEITH H.R. J. Infec. Dis, 38, 193-9, 1926.

- (26).- GRASSMANN W. loc. cit.
- (27).- SCHAFFNER y cols. Ber. 58, 1356-60, 1925.
- (28).- KREBS H.A. Biochem. Z. 222, 298-303, 1930.
- (29).- MASCHMANN E. y HELMER E. Z. physiol. chem. 216, 141-60, 1933.
- (30).- MASCHMANN E. y HELMER E. Z. physiol. chem. 222, 215-19, 1933.
- (31).- LAGRIN A. Citado por BUCHS.
- (32).- GREENBERG H.L. J. Amer. Pharm. Assoc. 20, 1032-6, 1931.
- (33).- WISS O. Biochem. J. 95 (1), 1p-2p, 1965.
- (34).- HERRIOT R.M. J. Gen. Physiol., 31, 19-26, 1949.
- (35).- LI L. Amer. Soc. 67, 1065, 1945.
- (36).- MILHAUD y EPINEY, loc. cit.
- (37).- FREUNDENBERG E. y BUCHS S. loc. cit.
- (38).- WISS O. y RAMER A. Helv. Chim. Acta, 29, 237, 1946.
- (39).- MERTEN R. Gastroenterology, 74, 193, 1951.
- (40).- MILHAUD, DELOME y EPINEY, Gastroenterology, 77, 190, 1951.
- (41).- BUCHS A. loc. cit.
- (42).- WISS O. y RAMER A, loc. cit.
- (43).- MILHAUD y EPINEY, loc. cit.
- (44).- WISS O. loc. cit.
- (45).- RAMER A. Citado por BUCHS.
- (46).- BUCHS A. loc. cit.
- (47).- MERTEN R. Gastroenterology, 76, 244, 1949.
- (48).- MILHAUD, loc. cit
- (49).- KLEIMAN H. y WERR W. Biochem. Z. 241, 108, 140 y 181, 1931.
- (50).- KLEIMAN H. y STERN, Biochem Z. 222, 31 y 43, 1930.
- (51).- KLEIMAN H. y RONA P. Biochem. Z. 228, 6 y 76, 1930.
- (52).- KREBS E. Advances Enzimal, 24, 263, 1962.
- (53).- DIAZ RUBIO M. y SEGOVIA F. Rev. Clin. Esp. t LXIII, nº 2
Octubre, 1956.
- (54).- BABKIB y KOMAROV, citados por BUCHS.
- (55).- ZAUS y FOSTER, Am. J. Digest. Dis. Nutr. 1, 177, 1935.

(56).- LEWEY y SHEINFELD, Gastroenterology, 27, 625, 1954.

(57).- JERZY, GLASS y BOYD, Gastroenterology, 29, 821, 835 y 849, 1949

(58).- KALSEN Y GRASSMANN, Gastroenterology, 12, 35, 1955.

(59).- NORTHROP, KUNITZ y HERRIOT, "Cristaline Enzimas", Columbia,
University Press. New York, 1948.

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

Reunido el Tribunal integrado por los abajo firmantes en el día de la fecha, para juzgar la Tesis Doctoral de D. FRANCISCO SEGOVIA GARCÍA titulada "Investigaciones sobre la catensina del jugo gástrico. Su papel en la digestión estomacal".

acordó otorgarle la calificación de Apto "Cum laude"

Sevilla, 8 de Julio 1988

El Vocal,

Josefina Carr

El Presidente

El Vocal,

[Signature]

El Secretario,

El Vocal,

[Signature]

El Doctorado,

Juan Bautista Pardo

[Signature]

