

ORIGINALES

CINETICA DE LA CATEPSINA DEL JUGO GASTRICO

I. Caracteres generales.

M. DÍAZ-RUBIO, F. SEGOVIA y A. MILLÁN.

Clínica Médica Universitaria de Sevilla.
Catedrático: Doctor M. DÍAZ-RUBIO.

Constituye un error de concepto, con el consiguiente perjuicio para un buen conocimiento de la fisiopatología gástrica, considerar siempre como coexistente la hiperacidez y la hiperfermencia por un lado, y la hipo- y la anacidez y la hipo- y afermencia por otro, ya que si tal sucede con frecuencia no es en todos los casos. Por ello, entre otros motivos, y dado que lo que en última instancia nos interesa es la capacidad digestiva o agresora del jugo gástrico, el que el estudio de la acidez libre y combinada, aun con todas las precauciones de rigor, suponga un análisis muy parcial e insuficiente, y más dado que la proteolisis, acción genuinamente enzimática, se realiza en función de un determinado pH, el cual no va paralelo siempre con aquéllas. Tal acción enzimática ha sido adjudicada en forma exclusiva a la pepsina, fermento que requiere para su acción un pH óptimo acusadamente bajo, como es, a título de ejemplo, el de 1,9 si el substrato es hemoglobina y el 2,2 si es edestina.

La pepsina no es, sin embargo, la única proteasa gástrica. Aunque ya en 1929 WILLSTÄTTER y BAMANN demostraron la existencia en los extractos de mucosa gástrica de un fermento con actividad catéptica, semejante a la catepsina de otros órganos, no consiguieron encontrarle en el jugo gástrico, considerándole por ello ligado a la célula. Es a partir de los trabajos de FREUDENBERG y BUCHS, en 1940, estudiando el proceso digestivo en niños, cuando se comienza a prestar atención a este enzima 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 normales, tanto niños como adultos, sólo rara vez se logra después de una comida el pH óptimo de la pepsina, a pesar de lo cual no sufre la actividad proteolítica. Tal sucede también en los ancianos y en muy diversos estados clínicos.

El medio débilmente ácido en que actúa la segunda proteasa gástrica—de 3,3 para la edestina, de 3,7 para la gliadina, de 4 para la caseína y la ovoalbúmina y de 4,5 para la gelatina,

según BUCHS—la presta gran interés. A su pesar, ha sido pequeña la atención que se le ha dedicado. Aparte del trabajo de este autor, al que el estudio de su cinética le induce a considerarla como una catepsina, a favor ante todo de su activación por el SH₂ y el cianuro, entre otros caracteres, han sido MERTEN y MILHAUD y EPINEY los únicos que se han interesado por este problema.

Sin embargo, a pesar del limitado número de trabajos sobre ello, los resultados obtenidos son discordantes. Así, MILHAUD y EPINEY, trabajando con pepsina cristalizada, la cual contiene ambas proteasas, no han visto activación por el cianuro potásico, ni por el SH₂, ni por la cisteína, por lo que niegan la presencia de radicales—SH interviniendo en la actividad de dicha proteasa y por ello el que se trate de una genuina catepsina. Por otro lado, MERTEN, empleando hemoglobina como substrato en lugar de edestina, no ve tampoco tal activación por el SH₂ ni el cianuro, lo que atribuye, considerando los datos de BUCHS, a que conteniendo la hemoglobina activadores naturales, actuarían éstos directamente o al liberarse en el curso de la hidrólisis, enmascarando la acción de aquéllos.

Por todo ello, y pensando en investigaciones futuras, hemos creído de interés hacer algunos ensayos sobre la cinética de dicha proteasa catéptica para formarnos así juicio propio y conocer su modo de acción en las condiciones experimentales que juzgamos más adecuadas, al fin de establecer una técnica de valoración que dé suficiente exactitud en trabajos de investigación, no fuese de excesiva complejidad para utilizarla en la clínica. A este respecto estudiamos el influjo de la temperatura, tiempo de hidrólisis, concentración de la enzima y del substrato, así como la de hidrogeniones. Como complemento se examinó el de la alcalinización, el del cianuro potásico y el del SH₂ como datos los más interesantes de su cinética.

METÓDICA.

Para ello se empleó, en primer lugar, la edestina Merck como substrato y como muestra enzimática *jugo gástrico* privado de moco, haciendo en todas las pruebas determinaciones testigo con cada uno de éstos solos. El grado de digestión del substrato se valoró por el reactivo de Folin y Ciocalteu, empleando para la curva de calibración una solución de tirosina de 20 mg. por 100 y como disolvente una solución 0,1 normal de ClH. Las lecturas se hicieron por fotocolorimetría.

La constitución de los tres sistemas utilizados en la valoración fué: 5 c. c. del tampon—ácido cítrico-fosfato disódico—de pH de 3,3, 1 c. c. de solución de edestina y 0,2 c. c. de jugo gástrico. En uno, el sistema completo, y en los dos restantes faltando la edestina o el jugo, siendo

sustituidos por agua destilada para así obtener los testigos correspondientes.

Al objeto de fines comparativos, y para el análisis de la cinética del enzima, al margen de la posible influencia del medio en que se encuentra, o sea el resto de los componentes del jugo gástrico, se estudió en sistemas análogos una solución de *pepsina cristalizada* Merck en ClH N/33 al 0,42 por 100, en lugar del jugo gástrico.

RESULTADOS.

I. Influencia de la temperatura.—Siguiendo las condiciones experimentales señaladas, se sometió el sistema enzimático completo, tanto el constituido por el jugo gástrico como el formado por la solución de pepsina, a las temperaturas de 15, 30, 40, 50, 60, 70 y 80 grados. El grado de digestión logrado se expresa en el cuadro y figura 1.

CUADRO I

GRADO DE DIGESTION A DISTINTAS TEMPERATURAS

Temperatura	Miligramos de tirosina	
	Sistema con jugo gástr.	pepsina crist.
15°	0,216	0,256
30°	0,260	0,299
40°	0,340	0,380
50°	0,380	0,420
60°	0,408	0,448
70°	0,320	0,360
80°	0,252	0,285

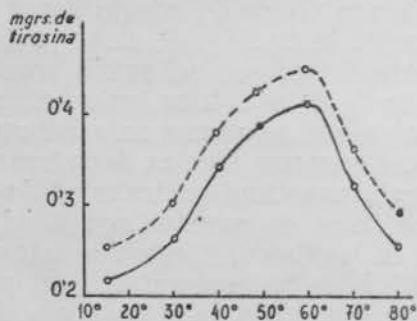


Fig. 1.

Como puede verse, el óptimo de temperatura fué de 60 grados dentro de las estudiadas, lo que se corresponde con el de 63 que señala BUCHS. Tal óptimo es el mismo para la pepsina cristalizada que para la proteasa del jugo cuando ambas actúan a pH 3,3, o sea, digámoslo así de momento, en acción catéptica, y muy distinto del de 50 grados que es el correspondiente a dicho proteasa, tanto cristalizada como del jugo, cuando se estudia al pH de 2,2, en el que como veremos se manifiesta una acción pura y genuinamente pepsínica.

Además del llamativo paralelismo que presentan ambas curvas, la obtenida utilizando la solución de pepsina cristalizada y la lograda empleando jugo, tiene interés la diferente conduc-

ta de las curvas de ascenso y de descenso; suave la primera y brusca en su caída la segunda, de forma que a los 80 grados está muy disminuida, y próxima a su desaparición, la actividad del enzima. Tal conducta, que hace que incluso a los 70 grados se manifieste una actividad pálida cuando actúa a pH 3,3, es tanto más llamativa, dada la gran sensibilidad de la pepsina a la elevación de temperatura, cuando actúa a pH 2,2, para este sustracto, en acción genuinamente pepsínica, y que hace que pasados los 65 grados esté prácticamente inactivada en su efecto. Si del análisis de las curvas puede deducirse una acción aceleradora de la reacción al elevarse la temperatura, también hace pensar en el sentido de una actuación directa sobre la enzima, como ya se ha expresado MERTEN, aumentando primero su molécula activa para originar a la larga su desnaturización.

II. Influencia del tiempo de calefacción.—En el cuadro y figura 2 se expresan los datos correspondientes al tiempo de hidrólisis:

CUADRO II

GRADO DE DIGESTION A DISTINTOS TIEMPOS DE CALEFACCION

TIEMPOS	Miligramos de tirosina	
	Sistema con jugo gástr.	pepsina crist.
5'	0,260	0,060
10'	0,300	0,120
20'	0,350	0,189
33'	0,390	—
40	—	0,263
45'	0,436	—
60'	0,472	0,285

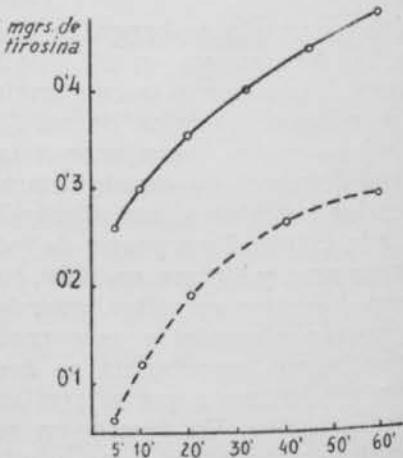


Fig. 2.

Como era de esperar, y como corresponde a toda acción enzimática, la hidrólisis se acentúa al aumentar el tiempo de calefacción sin trazarse una línea recta, sino una curva de perfil parabólico. Aquí son también paralelas la producida por la acción de la proteasa natural del jugo y la de carácter cristalino.

III. *Influencia de la concentración de enzima.*—El paralelismo que existe también aquí entre las curvas trazadas empleando pepsina cristalizada y jugo gástrico es elocuente. Ello queda expresado en el cuadro y figura 3. Tales curvas se obtuvieron empleando, en sistemas distintos, cantidades crecientes de jugo gástrico en uno, y de pepsina cristalizada en otro, agregando a todos un 1 c. c. de la solución de edestina y tampón hasta 7 c. c. Como puede apreciarse, el grado de hidrólisis aumenta al hacerlo la cantidad empleada de jugo y por lo tanto la concentración de enzima; sin embargo, no existe tampoco aquí una relación directa, ofreciendo la curva un perfil parabólico. Una conducta totalmente análoga existe al emplear, en lugar de jugo, soluciones de pepsina cristalizada a distintas concentraciones.

CUADRO III

GRADO DE DIGESTION PRODUCIDO SEGUN LA CONCENTRACION DE ENZIMA

Cantidad de jugo	Miligramos de tirosina	Cantidad de sol. pepsina	Miligramos de tirosina
0.1 c. c.	0,224	0.2 c. c.	0,373
0.2 c. c.	0,270	0.4 c. c.	0,528
0.3 c. c.	0,320	0.8 c. c.	0,678
0.5 c. c.	0,396	1.2 c. c.	0,710
0.75 c. c.	0,442	1.6 c. c.	0,723
1.00 c. c.	0,484		

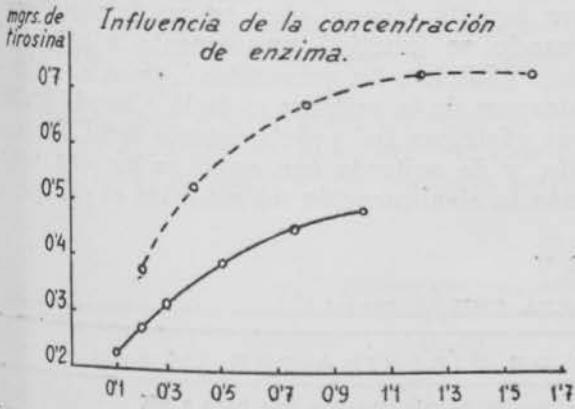


Fig. 3.—Influencia de la concentración de enzima.

IV. *Influencia de la concentración del substrato.*—El grado de hidrólisis, y por tanto la cantidad en miligramos de tirosina liberados, aumenta al hacerlo dentro del sistema la concentración del substrato, tanto si forma parte de éste la enzima cristalizada como el jugo gástrico. En el cuadro IV y figura correspondiente se expresa el grado de proteolisis empleando concentraciones distintas de edestina. La superposición de ambas curvas es como se ve abajo, y su perfil, como era de esperar, más recto.

CUADRO IV

GRADO DE DIGESTION VARIANDO LA CONCENTRACION DEL SUBSTRATO

Concentración del substrato	Miligramos de tirosina	
	Sistema con jugo gástr.	pepsina crist.
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	0,696

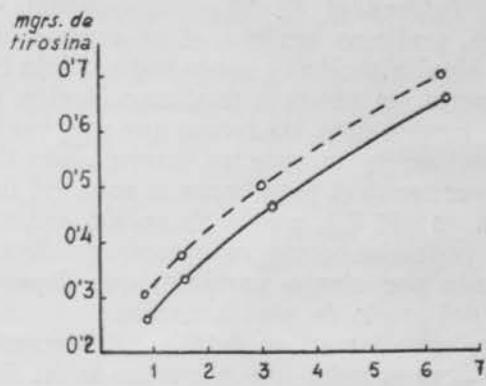


Fig. 4.

V. *Influencia del pH.*—Como aparato de registro se utilizó el ionómetro de Lautenschafer. Y para su estudio se emplearon tampones de pH distintos, confirmándose la existencia de un óptimo de acción a pH 2,2, con la edestina como substrato, correspondiente a la acción pepsinica propiamente dicha. Continuada la curva a pH superiores, se ve, de acuerdo con lo hallado por BUCHS empleando este substrato, una elevación posterior y de altura mayor a pH 3,3, con una depresión intermedia, como se aprecia en la gráfica 5. Analizada ésta se ven, pues, dos óptimos de acción: el uno, a 2,2, corresponde a la clásica acción de la pepsina en el sentido más estricto, y el otro, momento de actividad aún mayor que tiene lugar a pH 3,3, debido a la misma enzima en acción de proteasa catéptica. Entre ambos hay una depresión, de menor acción proteolítica, a pH 2,8 (fig. 5).

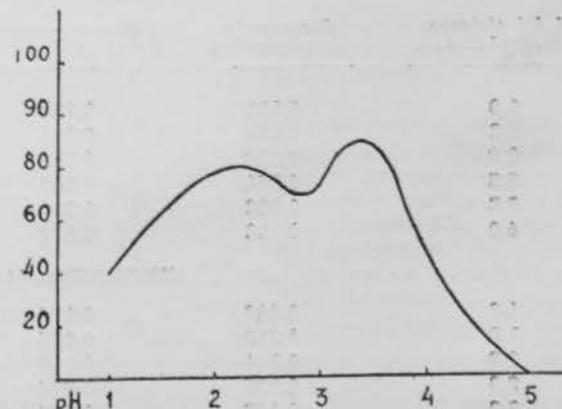


Fig. 5.—Influjo del pH sobre la actividad enzimática del jugo gástrico.

Tal tipo de curva tanto se ofrece cuando se utiliza el jugo gástrico como fuente de enzima como cuando lo es la pepsina cristalizada comercial. Tiene interés el que mientras la línea de ascenso de la curva, a partir de pH de 1, es lenta, su caída a poco de sobrepasarse el óptimo de acción catéptica es brusca y muy acusada, descendiendo notablemente y casi en forma vertical, a partir de pH de 4, para ser casi nula al de 5. Sin embargo, una vez alcanzado este pH, una nueva acidificación hace recobrar la actividad enzimática.

VI. Influencia de la alcalinización. — En cambio, pudimos ver que si se somete el jugo a una alcalinización, y sobre todo si ésta llega a ser franca, se produce una inactivación de carácter irreversible, de forma que una vez lograda, y actuando durante un determinado tiempo, al volver tanto el jugo como la solución de pepsina a un pH 3,3, queda su acción enzimática, tanto pepsinica como catéptica, inactivada en un tanto por ciento variable, que depende en parte del grado de alcalinización.

Para estudiar en su detalle este aspecto dispusimos el estudio que a continuación detallamos, llevándole a cabo por separado, empleando pepsina cristalizada y jugo gástrico, este último obtenido en ayunas y de pH 2,55. Para ambos hicimos previamente una experiencia patrón, empleando el sistema señalado en la metódica y preparado empleando 1 c. c. de la solución de edestina al 1 por 100 y un 1 c. c. de la solución de pepsina en 1 y 0,2 c. c. de jugo gástrico en el otro, sometido ello a temperatura de 40 grados durante un tiempo de diez minutos. Tales condiciones son, a nuestro juicio, las más adecuadas, en razón de los resultados que hemos expuesto en los apartados anteriores. Tales experiencias patrón las realizamos empleando tampones distintos de pH 1,0, 1,8, 2,2, 2,8, 3,3 y 4. Con sus resultados, los cuales constan en el

cuadro V, se construyó la gráfica del mismo número. Todo esto se complementó con las experiencias de inactivación. Cada una de éstas era una repetición de la anterior, pero con la diferencia de someter previamente, durante una hora, a la solución de pepsina a los pH de 4,0, 5,5, 7,0, 7,5 y 8. Igualmente se hizo en experiencias paralelas con el jugo gástrico, lo que multiplicó enormemente el total de las llevadas a cabo.

Como se ve en el cuadro V y en la figura 6, la inactivación que experimenta la enzima, tanto en su acción pepsinica como catéptica, es tanto mayor cuanto más elevado es el pH a que fué sometida previamente para llegar a ser prácticamente total al actuar durante una hora un pH de 8. Tales efectos se logran, como puede apreciarse, lo mismo si la fuente de enzima es el jugo gástrico como si lo es la pepsina cristalizada. Señalan MILHAUD y EPINEY la mayor sensibilidad de la catepsina a la alcalinización comparada con la pepsina, así como la desviación que experimenta con aquélla el pH óptimo de la acción de la pepsina hacia cifras por bajo del que es normal para ella. Nuestras observaciones, sin embargo, sólo confirman esto en parte; ciertamente que el perfil de la curva trazada empleando sistemas enzimáticos a distintos pH tiende a perderse, al ser menor su depresión central, conforme la inactivación previa se llevó a cabo a pH más altos. Sin embargo, siempre prevalece, o al menos es de igual intensidad, el grado de proteólisis por vía catéptica comparada con la conseguida por la acción pepsinica. Unicamente llegó a ser aquélla menor, pero en grado muy ligero, cuando se inactivó previamente a pH 7,5 el jugo gástrico. La sensibilidad, pues, a la alcalinización de la primera y de la segunda proteasas gástricas fué prácticamente igual. En cambio, y de acuerdo con aquellos autores, mientras la alcalinización no modifica el pH óptimo

CUADRO V
EXPERIENCIAS CON PEPSINA CRISTALIZADA

pH del sistema enzimático	Sin previa inactivación	MILIGRAMOS DE TIROSINA POR 100				
		4,0	5,5	7,0	7,5	8,0
1,0	0,121	0,120	0,105	0,081	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					
		0,175	0,165	0,150	0,125
1,0	0,202	0,285	0,255	0,225	0,155
1,8	0,310	0,310	0,260	0,235	0,170
2,2	0,341	0,275	0,235	0,202	0,135
2,8	0,315	0,325	0,275	0,240	0,165
3,3	0,362	0,150	0,132	0,100	0,090
4,0	0,225				

de acción de la catepsina, es evidente la tendencia a desviarse hacia un pH ligeramente más bajo, la acción pepsínica. Todas las peculiaridades señaladas tienen lugar tanto cuando se trabaja con jugo gástrico como con pepsina cristalizada.

Mientras la conducta expuesta se observa con absoluta constancia cuando se trabaja con pep-

sina cristalizada, sometido a un pH de 7,5, al volverle a situar al de 3,3 se observa una notable disminución de ésta, que valorada se traduce en una inactivación que llega al 62 por 100. Algo similar se ve en otra muestra del mismo jugo, estudiada tras conservación a la temperatura ambiente durante ocho días; la inactivación es, sin embargo, ahora menor, cosa que hay que po-

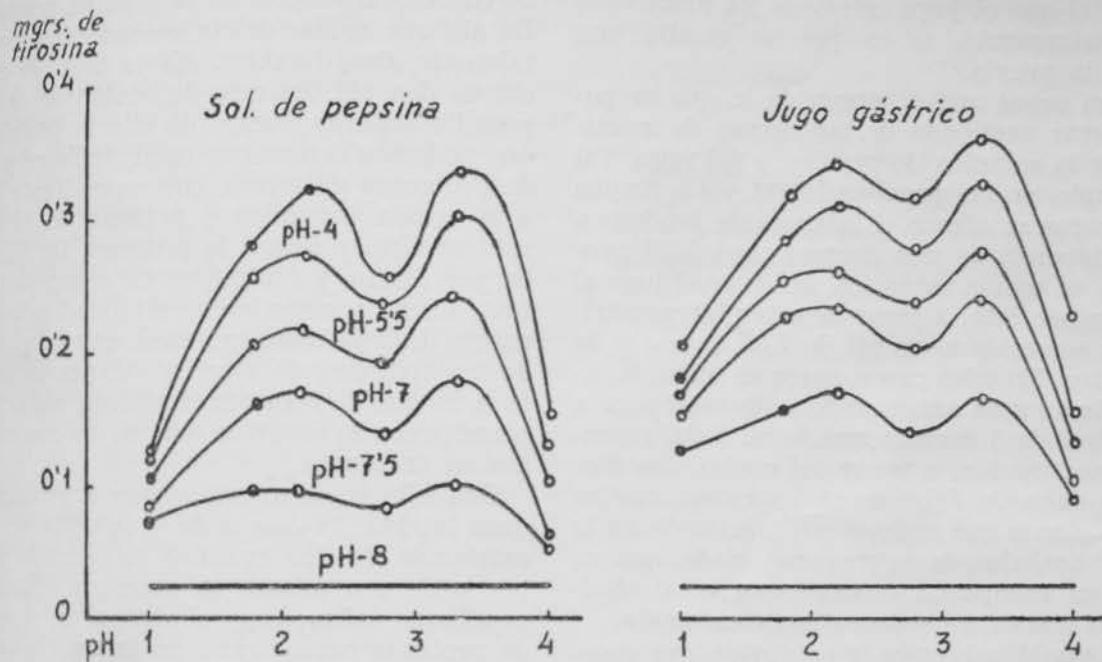


Fig. 6.—Influencia de la alcalinización.

sina cristalizada, se observan en cambio algunas divergencias del máximo interés cuando se hace con jugo gástrico, sobre todo si es extraído en diversas circunstancias. En el cuadro VI exponemos algunos resultados que merecen mención.

El caso número 6 sirve como un ejemplo más de lo antes expuesto; en él el jugo de ayunas, de franco carácter ácido y con marcada activi-

dad en conexión con la pérdida espontánea que sufre su actividad enzimática durante dicha conservación. En los casos números 14 y 15 se aprecia también una inactivación; sin embargo, su grado es pequeño, ante todo en aquél, y más si se tiene en cuenta el pH a que estuvieron sometidos, sobre todo la muestra de ayunas. La inactivación es en él de similar intensidad en el jugo de ayunas y en el obtenido tras el es-

CUADRO VI
INACTIVACION POR pH (JUGO GASTRICO)

Caso n.º	pH inicial	Unidades catepsin.	Inactiv. a pH	Unidades catepsin.	Grado % inactiv.	CONDICIONES
6	3,2	3,7	7,5	1,4	62	Jugo de ayunas.
6	3,2	2,4	7,5	1,3	45,7	Idem id. conservado 8 días.
10	7,95	2,1	8	2,1	0	Jugo de ayunas.
11	7,35	1,7	8	2,7	0	Idem id.
12	3,3	2,6	8	2,5	4	Jugo de 2 horas después desayuno café-leche y pan.
13	8,4	0	8	0	0	Jugo de ayunas.
13	7,4	0	8	0	0	30' después desayuno 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' después desayuno de alcohol (EHRMANN).
15	1,5	2	8,3	1,5	25	Jugo de ayunas.

Consideraremos como unidad de catepsina la cantidad de enzima que libera 1 mg. de tirosina de un substrato de estina tamponado a pH 3,3 en las condiciones de la experiencia. La cantidad de unidades señalada en la tabla se refiere a 1 c. c. de jugo gástrico.

tímulo del alcohol. En concordancia con todo está lo visto en las dos muestras estudiadas del caso número 13, ya que si aquí no se observó ninguna inactivación se debía a la ausencia de actividad catéptica, tanto del jugo de ayunas como del extraído tras el estímulo; el hecho de que el pH inicial de las muestras fuese, respectivamente, de 8,4 y de 7,4 lo explica, ya que por ello cabe el que el jugo estuviese ya inactivado intragástricamente, si es que no existía una afermencia previa.

Existen casos que divergen de lo que se podría esperar partiendo de las curvas de inactivación de la solución de pepsina y del jugo. Tal por ejemplo, en las pruebas 10, 11 y 12. En las dos primeras se ofrece el interesante fenómeno de la existencia de una normal capacidad proteolítica, en acción catéptica, al llevar el jugo al pH óptimo de ésta, a pesar de estar intragástricamente sometido a un pH de 7,35 el uno y de 7,95 el otro. En tales casos, como es justo, la inactivación es nula aun cuando se lleve el jugo a un pH final de 8 durante una hora. Esta ausencia de inactivación, a pesar del medio, nos dice que ello debe de deberse a una característica del jugo y no a que el fermento contenido en la muestra acababa de segregarse, dado que es preciso un tiempo de actuación de la alcalinidad para que ésta produzca la inactivación.

Tiene también interés la excepción que constituye la prueba 12, dado que aquí, a pesar de poseer el jugo un pH inicial de 3,3, la elevada capacidad catéptica que poseía queda prácticamente inmodificada, a pesar de llevar la alcalinización hasta un pH de 8. La circunstancia de que este jugo, a diferencia de los anteriores, procediera de la fase digestiva de un desayuno normal—de café con leche y pan—, presta interés y hace pensar en la probable influencia de otros elementos del jugo sobre las acciones que estudiamos, ya que ello no depende del simple hecho de la respuesta al estímulo secretor, como se desprende de lo antes señalado.

El influjo de la temperatura sobre el grado de inactivación producida por la alcalinización era nula, como hemos visto en nuestras experiencias, pero no así el tiempo de actuación de ésta. La importancia de esto es fundamental, como también ha visto MERTEN, así como la diferencia de tiempo que media desde la obtención del jugo y el momento de la investigación (pruebas 6).

CONSIDERACIONES.

Aunque en otro trabajo estudiamos aspectos de la cinética de esta proteasa, de importancia aún mayor, se deducen datos de gran interés de lo ya analizado. En primer lugar, es evidente la existencia en el jugo gástrico, al igual que en la pepsina cristalizada, de dos proteasas, o mejor, de dos acciones proteolíticas, cuyo momento de actuación es diferente como corresponde al tan distinto pH óptimo de cada una. Actuan-

do ambas dentro del campo de la acidez, la acción de la pepsina se realiza a un pH mucho más bajo que el de la segunda proteasa. En este sentido, al igual que en lo que se refiere a otros datos de cinética, como la influencia de la temperatura, del tiempo de hidrólisis, de la concentración de la enzima y de la del substrato, la conducta de la enzima del jugo se corresponde en absoluto con la de la pepsina cristalizada. De ahí que ambas deban considerarse como totalmente identificables. Ahora bien, la existencia de dos pH óptimos de acción de la misma permite separar dentro de ella la debida a las que podemos denominar como primera y segunda proteasas gástricas, correspondiente aquélla a la acción pepsínica o pepsina en el sentido más estricto y ésta a la proteasa II, identificada por BUCHS y FREUDENBERG como una catepsina. La muy superior sensibilidad a la temperatura de la primera proteasa, que hace que quede inactiva cuando aquélla alcanza cierta altura a la que la segunda despliega su actividad, permite con lo anterior separar en sus efectos a ambas proteasas.

Con ello se plantean algunos problemas de gran interés: el uno, el de si se trata en sí de la existencia de dos enzimas totalmente diferentes, o de una misma en acciones distintas dependiendo del medio, y el otro, el de si la segunda proteasa constituye o no una genuina catepsina. Por otro lado, identificadas como iguales la enzima proteolítica del jugo gástrico y la pepsina cristalizada, como lo prueban los datos de cinética aducidos, y lo confirman como veremos en otro trabajo, su conducta ante el SH₂ y el CNK, queda pendiente de análisis y discusión la conducta variable que presenta en ocasiones la enzima del jugo ante la alcalinización, al menos en ciertos sujetos y circunstancias. Este punto hace considerar muy especialmente el medio en que se encuentra la enzima dentro del jugo, y que no es otro sino los restantes componentes del mismo en cuanto pueden influir su actuación. Este punto merece, a nuestro juicio, una atención especial y es motivo de otro trabajo.

Como hemos visto, y salvo excepción, produce la alcalinización en los jugos de pH ácido una inactivación franca e irreversible, la cual si trabajando con pepsina cristalizada depende en su grado del alcanzado con aquélla y del tiempo que actuó entre otros factores, todos ellos intervienen, más algunos inherentes al jugo mismo, cuando es con éste con el que se trabaja. Ello explica también el que, aunque no sea la norma observar diferencias ostensibles entre los tantos por ciento de inactivación de los jugos de ayunas y de los segregados tras el estímulo, se aprecie tal diferencia en algunas ocasiones.

Los jugos espontáneamente alcalinos no se inactivan; en unos casos, por estarlo ya sin duda en el momento de la prueba, lo más probablemente por una inactivación intragástrica,

si es que no hubo una falta de secreción. Mas en otros casos, a pesar de ser ésta correcta, tal inactivación no se produce ni espontáneamente ni provocada. Si esto exige una aclaración, además de poseer gran interés desde el ángulo de la patología, la importancia de lo primero no es menor, ya que nos pone en evidencia el que una actividad catéptica débil tanto puede deberse a una hipó- o afermencia como a una inactivación intragástrica, a pesar de una secreción correcta.

Las razones de tal inactivación deben de ser complejas. En primer lugar, es preciso pensar en una desnaturización de la proteína base, constituyente de la enzima, de carácter en cierta forma similar a la que se produce espontáneamente en virtud de la conservación del jugo a la temperatura ambiente. Por otro lado, MILHAUD y EPINEY admiten como probable el que la pepsina contenga un radical fuertemente ácido, quizás el ácido fosfórico, el cual se liberaría en las proximidades de la neutralidad. De uno u otro modo, siempre quedan en pie las razones del por qué pueden inactivarse selectivamente ambas proteasas, por el calor o por otras acciones, hecho que puede explicarse si se piensa que los radicales que determinarían la acción serían distintos para cada caso. Su destrucción, el cambio físico-químico y, a la larga, la desnaturización, serían los responsables de la inactivación.

Finalmente, todo lo anterior hace pensar en la posibilidad de una actuación sobre activadores e inactivadores naturales del jugo, problema que a nuestro juicio puede revestir el mayor interés.

RESUMEN.

Se hace resaltar la importancia que tiene para la digestión en el estómago, junto a la pepsina, la II proteasa gástrica correspondiente a la catepsina del jugo o acción catéptica de aquélla. Con tal motivo se estudia la cinética de ésta empleando pepsina cristalizada y jugo gástrico actuando sobre un sustrato de edestina. Se demuestra en ambos casos que aquélla es idéntica, en cuanto atañe a la influencia de la temperatura, tiempo de hidrólisis, concentración de la enzima y concentración del sustrato. La influencia del pH queda patente en la existencia de un óptimo de 2,2 para la acción pepsinica frente al de 3,3 para la catepsina; entre ambas existe una depresión de la acción enzimática a pH 2,8. Pasado un pH de 5 disminuye intensamente la actividad de la enzima para recobrarse al acidificar. En todos estos aspectos es totalmente superponible la conducta del jugo gástrico y la de la pepsina cristalizada. No así cuando se estudia el influjo de la alcalinización; aunque ésta produce en ambos casos una inactivación de la pepsina y de la catepsina, mayor cuantitativamente a la enzima, de forma que una vez so-

brepasado el de 8 es la norma que la inactivación sea irreversible, tal sensibilidad a la alcalinización no es igual en todos los jugos, hecho que se interpreta como debido a peculiaridades distintas de éstos al margen de su cantidad de enzima. Tal influjo de la alcalinización es responsable de la falta de capacidad enzimática de no pocos jugos, por lo que ésta tanto puede deberse a una genuina afermencia como a una inactivación intragástrica.

BIBLIOGRAFIA

- BUCHS.—"Die Biologie des Magenkathepsins". S. Karger. Basel, 1947.
FREUDENBERG y BUCHS.—Schweiz. Med. Wschr., 1, 249, 1940.
MERTEN.—Gastroenterologia, 76, 63, 1949.
MILHAUD, DEMOLE y EPINEY.—Helvet. Med. Acta, 16, 244, 1949.
MILHAUD y EPINEY.—Gastroenterologia, 77, 193, 1951.

SUMMARY

Emphasis is laid on the importance that, together with pepsin, gastric protease II (corresponding to the cathepsin of the juice) has in digestion in the stomach. On this basis, the kinetics of this enzyme was studied by using crystalline pepsin and gastric juice acting on an edestin substrate. There was no difference in the cathepsin specimens used in both cases in relation to temperature, hydrolysis time, enzyme concentration and substrate concentration. The optimum pH for pepsin action was 2,2, and that for cathepsin 3,3; between both values there was a depression of enzyme action at pH 2,8. When the pH rose above 5, enzymic activity was remarkably decreased; it was restored on acidification. In so far as the aspects outlined above are concerned, the behaviour of gastric juice and that of crystalline pepsin were absolutely identical. On the other hand, when alkalinisation was induced, inactivation of both pepsin and cathepsin took place; it became more marked as the pH rose; when the pH rose above 8, inactivation became irreversible. Such a sensitivity to alkalinisation was not constant for all the juices. It is responsible for the lack of enzymic activity of juice in many cases, which may be due to genuine enzyme lack or to intragastric inactivation.

ZUSAMMENFASSUNG

Es wird die Bedeutung der II Magenprotease, welche dem Kathepsin des Magensaftes entspricht, nebst der des Pepsins, für die Verdauung im Magen hervorgehoben. Aus diesem Anlass wird die Kinetik dieses Enzyms mit Hilfe von Einwirken von kristallisiertem Pepsin und von Magensaft auf ein Edestinsubstrat untersucht. In beiden Fällen ist das Kathepsin hinsichtlich des Einflusses der Temperatur, Hydrolysezeit, Konzentration des Enzyms und Konzentration des Substrates das gleiche: das

für die Wirkung des Pepsins optimale pH ist 2,2 und für Kathepsins 3,3; bei einem pH von 2,8 kommt es bei beiden zu einer Depression der enzymatischen Wirkung. Ueber ein pH von 5 hinaus fällt die enzymatische Aktivität stark ab, erholt sich aber wieder bei Ansäuerung. Bei allen diesen Vorgängen deckt sich das Verhalten des Magensaftes vollständig mit dem des kristallisierten Pepsin. Alkalisert man hingegen, dann kommt es zu einer Inaktivierung des Pepsins und Kathepsins, welche umso ausgeprägter ist je höher das pH ansteigt; bei Ueberschreiten von 8 ist die Inaktivierung nicht mehr umkehrbar. Diese Empfindlichkeit der Alkalisierung gegenüber ist nicht bei allen Säften dieselbe; sie ist bei vielen Säften für das Nichtvorhandensein der enzymatischen Fähigkeit verantwortlich und ist möglicherweise auf eine genuine Afermentia oder eine intra-gastrische Inaktivierung zurückzuführen.

RÉSUMÉ

On fait ressortir l'importance que pour la digestion dans l'estomac représente, unie à la

pepsine, la II protéase gastrique, qui correspond à la catépsine du jus. A ce sujet, on étudie la cinétique de cet enzyme, en employant de la pepsine cristallisée et du jus gastrique, agissant sur un substratum d'édestine. Dans les deux cas, la catépsine est la même, en ce qui concerne l'influence de la température, temps d'hydrolyse, concentration de l'enzyme et concentration du substratum. Le pH optime pour l'action de la pepsine est de 2,2 et pour la catépsine de 3,3; il existe entre les deux une dépression de l'action enzymatique à pH 2,8. Passé un pH de 5 l'activité enzymatique diminue sensiblement pour se récupérer à l'acidification. Dans tous ces aspects, la réponse du jus gastrique et de la pepsine cristallisée est totalement superposable. Par contre, au moment de l'alcalinisation il se produit une inactivation de la pepsine et de la catépsine d'autant plus forte que le pH soit élevé; en passant de 8 l'inactivation est irreversible. Cette sensibilisation à l'alcalinisation n'est pas pareille dans tous les jus et est responsable du manque de capacité enzymatique de bien de jus, ce qui est peut-être dû à une afermence naturelle ou à une inactivation intragastrique.

CINETICA DE LA CATEPSINA DEL JUGO GASTRICO

II. *Influencia del SH₂ y del CNK sobre su actividad.*

M. DÍAZ-RUBIO, F. SEGOVIA y A. MILLÁN.

Clinica Médica Universitaria de Sevilla.
Catedrático: Doctor M. DÍAZ-RUBIO.

Como complemento de nuestro trabajo anterior sobre cinética de la II proteasa gástrica, hemos estudiado la influencia del SH₂ y del CNK sobre su actividad. Su interés estriba en diversos motivos: primero, por los resultados discordantes obtenidos por los autores, que en muy escaso número se han ocupado de este aspecto; segundo, para precisar o denegar la naturaleza catéptica de tal acción enzimática y, finalmente, por la trascendencia que su conocimiento tiene para la fisiología y fisiopatología gástrica.

Es un hecho, al parecer cierto, la existencia en la pepsina de grupos aminados libres y en especial su riqueza en tirosina. Trabajos de HERRIOT, así como de LI, han demostrado que aunque la molécula de pepsina contiene una o dos histidinas que pueden ser halogenizadas y, por tanto, reaccionar, este papel le incumbe prácticamente en su totalidad a la tirosina, de la que 12 de sus 17 grupos tirosínicos pueden ha-

logenizarse cuando la pepsina está sin desnaturarizar. De ello concluye LI el que serían los grupos fenólicos superficiales de su molécula esférica los que entrarían en reacción. Su desnaturalización rompería las cadenas de péptidos, lo que permite reaccionar a los grupos tirosínicos centrales. El papel de la acidez del medio es también de gran interés, ya que si es indispensable la integridad de los grupos tirosínicos, tanto para la acción de la enzima en función "pepsínica" como "catéptica", las investigaciones de MILHAUD y EPINEY permiten concluir en que la tirosina es más necesaria para la actividad de esta última que la de aquélla. En cambio, los grupos alfa-aminados e imidazólicos no serían indispensables para la proteolisis.

El punto de discusión alrededor de estos aspectos radica en la existencia o no de grupos thiólicos -SH o de grupos -S-S- en la molécula de la pepsina, y de cuya presencia depende el considerar como una catépsina la acción enzimática de la pepsina desplegada al pH de 4 cuando el sustrato es la ovoalbúmina y la caseína y de 3,3 cuando lo es la edestina. La presencia de tales grupos, y por ello tal carácter catéptico, es afirmada por BUCHS y FREUDENBERG, así como por WISS y RAMER, y en cambio denegada por MERTEN y por MILHAUD, DEMOLE y EPINEY, basados ante todo en su conducta frente al CNH, el ácido monoyodoacético y el SH₂. Es el modo de conducirse ante éste y el primero lo que estudiamos en este trabajo.