

Efecto protector de grupos sulfhidrilos en la inhibición de la ureasa por agentes hipoglucemiantes derivados de la sulfonilurea

J. M.^a García, J. Molina y J. Herrera

Sección de Regulación Humoral
Departamento de Bioquímica Clínica
Ciudad Sanitaria «Virgen del Rocío»
Sevilla

(Recibido el 11 de agosto de 1977)

J. M.^a GARCIA, J. MOLINA y J. HERRERA. *Specific Protection by Sulfhydryl Groups Against Inhibition of Urease by Hypoglycaemic Drugs*. Rev. esp. Fisiol., 34, 145-148. 1978.

The effect of oral hypoglycaemic drugs, derivatives of sulphonylurea, upon urease has been studied. These compounds, structurally connected to urea, produce a competitive inhibition of enzyme activity with respect to substrate. Glutathione (reduced form) and cysteine prevent inactivation of enzyme by sulphonylurea, whereas oxidized glutathione and cysteine do not. The same phenomenon occurs in enzyme preparations inhibited by p-hydroxymercuribenzoate. The role of sulfhydryl groups in the formation of enzyme-substrate complex is discussed.

Es bien conocido el hecho de que la ureasa se inhibe por la acción de agentes químicos, tales como los metales pesados (5, 8, 9) y los fluoruros (1), sustancias que pueden interferir en la determinación cuantitativa de urea de muestras biológicas. En un trabajo previo (7) se ha puesto de manifiesto que los hipoglucemiantes orales derivados de la sulfonilurea, tales como la tolbutamida y clorpropamida, producen una inhibición de carácter competitivo frente al sustrato de la ureasa.

Por otra parte, a lo largo de los últimos años, han sido varios los autores (6, 10, 12, 13), que han especulado acerca de la presencia de grupos sulfhidrilos ($-SH$)

en la ureasa; algunos de ellos serían fundamentales para la actividad catalítica del enzima.

El presente trabajo describe la protección por agentes portadores de grupos $-SH$ (glutación reducido y cisteína) frente a la inhibición de la ureasa por los compuestos derivados de la sulfonilurea, tolbutamida y clorpropamida, sustancias estructuralmente relacionadas con la urea. Al mismo tiempo, se analiza el posible papel de grupos $-SH$ presentes en el centro activo del enzima, en la formación del complejo enzima-sustrato y esenciales, por tanto, para la actividad catalítica de la ureasa.

Material y métodos

La medida de la actividad enzimática de ureasa se ha realizado según el método de FAWCETT y SCOTT (4), modificado por CHANEY y MARBACH (3). La actividad enzimática se ha expresado en función de la concentración de amoníaco como incremento de absorbancia a 560 nm. El amoníaco se ha determinado mediante la reacción de Berthelot (2) midiendo la absorbancia en cubetas de 1 cm de paso de luz a 560 nm, en un Spectronic 70.

La concentración de proteína se ha determinado según la metodología recomendada por LOWRY *et al.* (11).

La ureasa y urea, así como los reactivos de Berthelot (fenol, hipoclorito sódico, nitroprusiato sódico e hidróxido sódico), se han adquirido de Boehringer-Mannheim. Los compuestos antidiabéticos orales han sido suministrados por los laboratorios Pfizer (clorpropamida) y Hoechst (tolbutamida). Los demás reactivos empleados han sido de grado analítico y agua bidestilada.

Resultados

La tabla I muestra la inhibición prácticamente total de la ureasa en presencia de tolbutamida y la protección de esta inhibición por los agentes portadores de grupos —SH, glutatión reducido y cisteína. Sin embargo, el glutatión en forma oxidada y la cistina no ejercen ningún efecto protector frente a la inactivación enzimática por la sulfonilurea.

La tabla II presenta la inhibición de la ureasa por el compuesto bloqueante de grupos sulfhidrilos p-hidroximercuribenzoato y, al mismo tiempo, la protección que frente a esta inhibición ejercen el glutatión reducido y la cisteína, respectivamente. El glutatión oxidado o la cistina no protegen frente a la inactivación por el p-hidroximercuribenzoato.

Resultados similares a los anteriormente descritos para la tolbutamida se han

Tabla I. *Inhibición de la ureasa por tolbutamida (50 mM) y protección por glutatión reducido y cisteína.*

El experimento se ha realizado incubando el enzima (0,25 mg/ml de proteína) con cada una de las sustancias, a las concentraciones indicadas, durante tres minutos y determinando, posteriormente, la actividad enzimática (expresada en actividad relativa porcentual), según se describe en Material y métodos.

Tlb: Tolbutamida; G-SH: Glutatión reducido; G-G: Glutatión oxidado; C-SH: Cisteína; C-C: Cistina.

Adición	Actividad relativa %
Ninguna	100
Tlb	7
Tlb + G-SH (0,3 mM)	97
Tlb + G-G (0,1 mM)	10
Tlb + C-SH (1,5 mM)	95
Tlb + C-C (0,1 mM)	6

Tabla II. *Inhibición de la ureasa por p-hidroximercuribenzoato (0,1 mM) y protección por glutatión reducido y cisteína*

El experimento se ha realizado incubando el enzima (0,25 mg/ml de proteína) con cada una de las sustancias, a las concentraciones indicadas, durante tres minutos y determinando, posteriormente, la actividad enzimática (expresada en actividad relativa porcentual), según se describe en Material y métodos.

pCMB: p-hidroximercuribenzoato; G-SH: Glutatión reducido; G-G: Glutatión oxidado; C-SH: Cisteína; C-C: Cistina.

Adición	Actividad relativa %
Ninguna	100
pCMB	2
pCMB + G-SH (1,0 mM)	129
pCMB + G-G (0,1 mM)	10
pCMB + C-SH (1,0 mM)	90
pCMB + C-C (0,1 mM)	5

obtenido con clorpropamida, otro hipoglucemiante oral derivado, asimismo, de la sulfonilurea.

Discusión

En un trabajo anterior (7) se ha demostrado que el tipo de inhibición que producen los derivados de la sulfonilurea sobre la ureasa es de carácter competitivo respecto al sustrato de la reacción. Por otra parte, la presencia de grupos sulfhidrilos en este enzima ha sido objeto de diversos estudios (6, 10, 12, 13), sugiriéndose la posibilidad de que uno o más de tales grupos tioles sean esenciales para la actividad dinámica de la proteína. Tal es el caso de GORIN y CHIN (6), quienes afirman que la ureasa posee ocho grupos —SH fundamentales para su actividad como catalizador biológico. Sin embargo, para otros investigadores como KOBASHI *et al.* (10) sólo son dos grupos —SH los esenciales, presentes en el centro activo del enzima. No obstante, REITHEL (14) en su reciente revisión sobre la ureasa deja esta cuestión como un tema de investigación más profundo, aunque manifiesta que sobre la presencia de un cierto número de grupos —SH en el centro activo no hay ninguna duda entre todos los autores consultados.

En el presente trabajo se pone de manifiesto que la inhibición producida por los derivados de la sulfonilurea sobre la ureasa queda protegida por la presencia de grupos —SH, parece desprenderse de estos resultados una aportación más e inequívoca de la presencia de radicales —SH en el centro activo del enzima, hecho confirmado por la inhibición del enzima por el p-hidroximercuribenzoato y su protección por los agentes químicos portadores de radicales —SH, glutatión reducido y cisteína. Por otra parte, parece que estos reactivos constituyen un medio excelente para abordar el estudio completo de la composición del centro activo del enzima.

Agradecimientos

Los autores desean expresar su agradecimiento al Dr. F. RECIO por su constante discusión

crítica a lo largo del desarrollo del presente trabajo.

A la Dra. M. ATIENZA, Jefe de Sección de Farmacia de la Ciudad Sanitaria «Virgen del Rocío», de Sevilla, por su colaboración en el suministro de los fármacos hipoglucemiantes.

Resumen

Se ha estudiado el efecto protector de compuestos químicos portadores de grupos sulfhidrilos (glutatión reducido y cisteína) en la inactivación de la ureasa por los derivados de la sulfonilurea. Se ha puesto de manifiesto que estos agentes portadores de radicales —SH, pero no sus formas oxidadas (glutatión oxidado y cistina), protegen frente a la inhibición del enzima por la sulfonilurea. Asimismo, la inhibición del enzima por p-hidroximercuribenzoato se protege por glutatión reducido y cisteína, pero no por las formas oxidadas respectivas. Se discute el papel de grupos —SH en la actividad catalítica de la ureasa.

Bibliografía

1. CARAWAY, W. T.: *Amer. J. Clin. Pathol.*, **37**, 445-464, 1962.
2. CLOTTEN, R.: En «Clinical laboratory», E. Merck, Darmstadt, 1974, pág. 98.
3. CHANEY, A. L. y MARBACH, E. P.: *Clin. Chem.*, **8**, 130-132, 1962.
4. FAWCETT, J. K. y SCOTT, J. E.: *Clin. Path.*, **13**, 156-159, 1960.
5. GORIN, G. y CHIN, C. C.: *Anal. Biochem.*, **17**, 49-59, 1966.
6. GORIN, G. y CHIN, C. C.: *Biochim. Biophys. Acta*, **99**, 418-426, 1965.
7. HERRERA, J., SABATER, J. y MOLINA, J.: *Rev. esp. Fisiol.*, **33**, 37-40, 1977.
8. HUGHES, R. B., KATZ, S. A. y STUBBINS, S. E.: *Enzymologia*, **36**, 332-334, 1969.
9. KATZ, S. A. y COWNS, J. A.: *Biochim. Biophys. Acta*, **107**, 605-607, 1965.
10. KOBASHI, K., HASE, J. y KOMAI, T.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **23**, 34-38, 1966.

11. LOWRY, O. H., ROSEBROUGHT, N. J., FARR, A. L. y RANDALL, R. J.: *J. Biol. Chem.*, 193, 265-275, 1951.
12. LYNN, K. R.: *Biochim. Biophys. Acta*, 146, 205-218, 1967.
13. NEIMS, A. H., COFFEY, D. S. y HELLERMAN, L.: *J. Biol. Chem.*, 241, 3036-3040, 1966.
14. REITHEL, F. J.: En «The Enzymes», vol. 4 (Boyer, P. D., ed.). Academic Press, Nueva York, 1971, pág. 1.