

Instituto Español de Fisiología y Bioquímica
Departamento de Bioquímica. Madrid.
(Director: Prof. A. Santos-Ruiz)

Estudios sobre carboxilasas

VIII. — Inhibición enzimática de la carboxilasa pirúvica por los antibióticos derivados del núcleo naftacénico

D. Martín-Hernández*, G. de la Fuente-Sánchez** y A. Santos-Ruiz

(Recibido para publicar el 1 de mayo de 1956)

El componente proteico de un considerable número de sistemas enzimáticos contiene funciones sulfhidrúlicas esenciales que son las responsables de sus correspondientes actividades específicas. Esta clase de enzimas está muy difundida en la Naturaleza y se sabe que participa en el metabolismo de las proteínas, carbohidratos y grasas.

El estudio de la influencia que los medicamentos ejercen sobre el funcionamiento de estos sistemas aislados tiene especial importancia para la elucidación del mecanismo de acción terapéutica de las sustancias quimioterápicas, como se ha demostrado principalmente después que SEVAG (9) y sus colaboradores descubrieron el paralelismo existente entre la acción antibacteriana de las sulfamidas y las inhibiciones causadas por ellas sobre la carboxilasa pirúvica, y entre éstas, y las relaciones estructurales de las sulfamidas con la cocarboxilasa.

Interesa este sistema enzimático por poseer también un coenzima común a una familia de fermentos de importante intervención en el metabolismo celular y que, a la vez, se considera como la forma fisiológicamente activa de la vitamina B₁.

El substrato lo constituye el ácido pirúvico, metabolito importante de los glúcidos y sustancia muy reactiva, centro de

* Becario del Patronato S. Ramón y Cajal.

** Becaria del Patronato J. de la Cierva.

conurrencia de estos principios inmediatos con los lípidos y prótidos, en sus reacciones anabólicas y catabólicas.

Finalmente, el hecho de que las células cancerosas utilicen la glucosa por vía anaerobia, semejante en muchos aspectos a como lo hace la levadura, presta especial interés a los enzimas relacionados con esta vía de utilización de glúcidos.

Por estas consideraciones, y por tratarse de un proceso enzimático respiratorio, cuya interferencia en las bacterias privaría a sus células de las reacciones que proporcionan la energía utilizable en su división celular y en su crecimiento, y en el huésped produciría manifestaciones tóxicas atribuibles al bloqueo de procesos metabólicos dependientes de enzimas con funciones sulfhidrúlicas activas, en el presente trabajo nos proponemos investigar el comportamiento de los antibióticos de importancia terapéutica frente a la carboxilasa pirúvica.

A tal efecto, hemos reunido los resultados obtenidos en cuatro publicaciones, que se inician con la presente. No habiendo un criterio bien definido para la clasificación de los antibióticos, hemos adoptado el intento de ordenación biológica realizado por SANTOS RUIZ (8) y modificado por el mismo autor, como se expone a continuación :

	Ascomycetos y hongos imperfectos	{ Neoflavorina (no identificado) Fumagilina (Derivado de ácido graso) Penicilina	} No encluidos en grupos siguientes		
Antibióticos	Esquizomicetos	{ Bacterias esporuladas	{ Bacitracina Polimixinas Tirotricina	} De naturaleza protídica	
		Actinomicetales	{ Actinomicina Viomicina Cloranfenicol Estreptomicina Neomicina		} De naturaleza glucídica
			{ Eritromicina Framicetina Carbomicina		
	{ Tetraciclina Aureomicina Terramicina				

Los antibióticos a que se refiere cada una de las cuatro publicaciones corresponden a los cuatro grupos en que se clasifican según su naturaleza química.

Material y métodos

FERMENTO. — La preparación del enzima purificado se hizo por el método de GREEN (3, 4), modificado por G. DE LA FUENTE (1).

La cocarboxilasa fué preparada por nosotros según el método de WEIJLARD y TAUBER (14), y analizada cromatográficamente por el método de SILIPRANDI (10).

SUBSTRATO. — El piruvato sódico cristalizado fué obtenido por nosotros según el método de ROBERTSON (7).

ACTIVADORES. — En todas las determinaciones manométricas, cada vaso de reacción contenía 0,2 ml. de una solución de iones Mg^{++} Mn^{++} preparada disolviendo 1,0576 g. de cloruro magnésico anhidro y 0.5106 g. de sulfato de manganeso en 500 ml. de agua tridestilada.

ANTIBIÓTICOS. — Los distintos productos antibióticos utilizados en el trabajo que presentamos, pertenecientes al mercado internacional, han sido substancias puras procedentes directamente de las casas productoras.

Los restantes productos empleados del comercio han sido siempre reactivos analíticos, cuyas disoluciones se han preparado constantemente con agua tridestilada.

TÉCNICA MANOMÉTRICA. — La actividad enzimática se ha determinado por medidas del anhídrido carbónico desprendido, utilizando la técnica manométrica de WARBURG (11, 12, 13).

Las condiciones experimentales fueron las siguientes:

Cada vaso de reacción contenía 0,4 ml. de la solución de substrato en el brazo lateral y en el departamento central 0,4 ml. de la solución del enzima, 0'2 ml. de la solución del activador y volúmenes variables de las soluciones de los antibióticos y de los restantes reactivos que se utilizaron según las experiencias, completando con solución tampón de citrato sódico y ácido cítrico 0,04 M para trabajar a pH 6,0 y con un volumen de líquido final fijo e igual a 3,0 ml.

Las soluciones de los reactivos se ha hecho siempre empleando la solución tampón antes citada de pH 6,0, conservándose este valor constantemente uniforme durante el transcurso de las reacciones.

Todos los experimentos de descarboxilación se han realizado a 30 grados centígrados de temperatura del termostato y en atmósfera de aire.

Los vasos de reacción, con sus correspondientes manóme-

tros, se introdujeron en el termostato, se sometieron a ligera agitación durante 15 minutos para conseguir el equilibrio térmico en su interior, al cabo de los cuales se volcó el substrato sobre el resto del sistema. Inmediatamente, se aumentó la velocidad de agitación para facilitar la liberación del gas. Después de un minuto de tiempo, necesario para restablecerse el equilibrio térmico, se hicieron las lecturas iniciales; las restantes se verificaron a intervalos de uno o de dos minutos, según las series, hasta un total de 10 minutos.

EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS. — Las velocidades iniciales de descarboxilación se determinaron por el procedimiento gráfico descrito en trabajos publicados por este Departamento (2), expresándose en $\mu\text{l.}$ de anhídrido carbónico, en cada hora, por ml. de volumen de mezcla reaccionante.

$$\% I = \frac{V_0 - V_i}{V_0} \times 100$$

siendo V_0 la velocidad de descarboxilación en ausencia de antibiótico y V_i la velocidad en presencia del mismo.

Para hacer comparables los resultados de diferentes series, se utilizó un testigo de composición constante, estableciéndose con él un factor de corrección, figurando en las tablas de resultados las cifras obtenidas multiplicando las velocidades experimentales por el mencionado factor.

En el cálculo de las constantes de inhibición y en la discusión de los tipos de inhibición se han utilizado las teorías de MICHAELIS y MENTEN (6), el tratamiento matemático de HUNTER y DOWNS y de LINEWEAVER y BURK (5).

Resultados

Utilizando la técnica de WARBUG, hemos demostrado que clorotetraciclina, oxitetraciclina y tetraciclina inhiben al sistema enzimático de la carboxilasa pirúvica en grado comparable, para concentraciones molares iguales, y estos resultados se resumen en las tablas I, II y III.

El mecanismo de inhibición por estos antibióticos obedece, probablemente, a más de un mecanismo de acción, como se observa en las figuras 1, 2 y 3, cuyos puntos de inflexión característicos pueden ser producidos por la actuación independiente de tres o más grupos funcionales análogos, presentes en las moléculas de estos antibióticos.

TABLA I
Inhibición de la Carboxilasa pirúvica por Clorotetraciclina
(Clorhidrato)
 Efecto de la concentración del antibiótico a diferentes concentraciones de piruvato

Concentración de piruvato en M/l.	Concentración de clorotetraciclina en M/l.	Velocidad de descarboxilación en $\mu\text{l./h. cm}^2$.	Tanto por ciento de inhibición
0,0045	0	$6,0 \times 10^2$	—
	$0,26 \times 10^{-1}$	$6,0 \times 10^2$	12
	$0,65 \times 10^{-1}$	$5,2 \times 10^2$	23
	$1,3 \times 10^{-1}$	$5,1 \times 10^2$	25
	$1,4 \times 10^{-1}$	$4,7 \times 10^2$	31
0,045	0	$6,8 \times 10^{-2}$	—
	$0,26 \times 10^{-1}$	$6,4 \times 10^2$	7
	$0,65 \times 10^{-1}$	$6,2 \times 10^2$	9
	$1,3 \times 10^{-1}$	$5,7 \times 10^2$	16
	$1,4 \times 10^{-1}$	$5,6 \times 10^2$	18

Condiciones experimentales:

Tampón citratos pH = 6,0. Atmósfera = aire.
 Volumen final = 3,0 ml. Temperatura = 30° C.

TABLA II
Inhibición de la Carboxilasa pirúvica por oxitetraciclina
(Clorhidrato)
 Efecto de la concentración de antibiótico a diferentes concentraciones de piruvato

Concentración de piruvato en M/l.	Concentración de oxitetraciclina en M/l.	Velocidad de descarboxilación en $\mu\text{l./h. cm}^2$.	Tanto por ciento de inhibición
0,0045	0	$4,9 \times 10^2$	—
	$0,7 \times 10^{-3}$	$3,8 \times 10^2$	22
	$1,8 \times 10^{-3}$	$3,4 \times 10^2$	29
	$2,8 \times 10^{-3}$	$2,8 \times 10^2$	43
	$3,9 \times 10^{-3}$	$2,3 \times 10^2$	54
0,015	0	$5, \times 10^2$	—
	$0,7 \times 10^{-3}$	$4,1 \times 10^2$	19
	$1,8 \times 10^{-3}$	$3,8 \times 10^2$	25
	$2,8 \times 10^{-3}$	$3,0 \times 10^2$	40
	$3,9 \times 10^{-3}$	$2,4 \times 10^2$	51
0,045	0	$5,4 \times 10^2$	—
	$0,7 \times 10^{-3}$	$4,8 \times 10^2$	11
	$1,8 \times 10^{-3}$	$4,6 \times 10^2$	16
	$2,8 \times 10^{-3}$	$3,7 \times 10^2$	32
	$3,9 \times 10^{-3}$	$2,9 \times 10^2$	47

Condiciones experimentales:

Tampón citratos pH = 6,0. Atmósfera = aire.
 Volumen final = 3,0 ml. Temperatura = 30° C.

TABLA III

*Inhibición de la carboxilasa pirúvica por tetraciclina. (Clorhidrato.)
Efecto de la concentración de antibiótico a diferentes concentraciones
de piruvato*

Concentración de piruvato en M/l.	Concentración de tetraciclina	Velocidad de descarboxilación en $\mu\text{l./h. cm}^2$.	Tanto por ciento de inhibición
0,0045	0	$5,4 \times 10^2$	—
>	$0,14 \times 10^{-3}$	$5,0 \times 10^2$	8
>	$0,6 \times 10^{-3}$	$4,6 \times 10^2$	15
>	$1,3 \times 10^{-3}$	$4,2 \times 10^2$	23
>	$1,6 \times 10^{-3}$	$3,5 \times 10^2$	37
0,015	0	$5,4 \times 10^2$	—
>	$0,14 \times 10^{-3}$	$4,4 \times 10^2$	19
>	$0,6 \times 10^{-3}$	$4,2 \times 10^2$	22
>	$1,3 \times 10^{-3}$	$3,9 \times 10^2$	28
>	$1,6 \times 10^{-3}$	$3,2 \times 10^2$	40
0,045	0	$3,8 \times 10^2$	—
>	$0,14 \times 10^{-3}$	$3,7 \times 10^2$	4
>	$0,6 \times 10^{-3}$	$3,6 \times 10^2$	6
>	$1,3 \times 10^{-3}$	$3,0 \times 10^2$	22
>	$1,6 \times 10^{-3}$	$2,8 \times 10^2$	28

Condiciones experimentales:

Tampón citratos pH = 6,0.

Volumen final = 3,0 ml.

Atmósfera = aire.

Temperatura = 30° C.

Empleando como enzima extractos crudos de levadura de cerveza ricos en proteínas desprovistas de actividad carboxilásica, se ha comprobado que el grado de inhibición disminuye, reduciéndose al 15 por ciento inhibiciones del orden del 60 por ciento ocasionadas a la carboxilasa pirúvica purificada, lo que demuestra la falta de especificidad de los antibióticos de este grupo de derivados del núcleo naftacénico para unirse a las moléculas proteicas. Este hecho hace suponer la probabilidad de que estos medicamentos, una vez introducidos en el torrente circulatorio sanguíneo de los animales tratados, se unan con las proteínas del plasma y sean transportados en la forma de moléculas complejas, que, por mecanismos especiales,

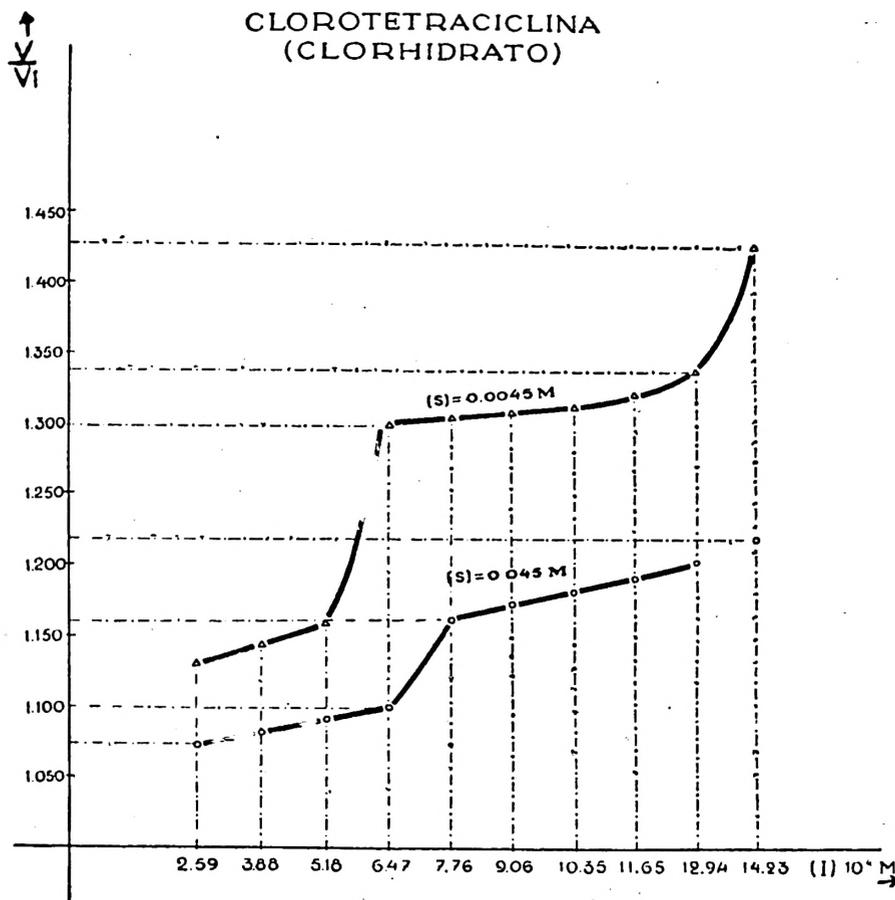


Figura 1

se disocian en las células y tejidos donde actúan como antibióticos.

Se han realizado ensayos adicionando cisteína y se ha visto que, en este caso de los antibióticos naftacénicos, el aminoácido citado no tiene acción restauradora de la actividad enzimática, como se observa en otras inhibiciones (tabla IV).

Teniendo en cuenta la avidez de los antibióticos estudiados por los cationes metálicos divalentes, especialmente por el magnesio y por el manganeso, sobre lo que se citan ya muchos trabajos, y dada la coincidencia de ser estos dos metales utilizados por la carboxilasa pirúvica con el carácter de activadores de su actividad enzimática, hemos realizado una serie de pruebas sin adicionar y adicionando estos iones en exceso. Se ha comprobado que el grado de inhibición sufre una disminución considerable por el efecto de estos iones, siendo suficiente

la adición de 0,005 moles por litro para hacer bajar a 34 por ciento inhibiciones del orden del 61 por ciento (tabla IV).

TABLA IV

Inhibición de la carboxilasa pirúvica por tetraciclina. Efecto la adición de diferentes sustancias (1)

a) Efecto de la adición de proteínas inespecíficas

para concentración de piruvato	0,045 M/l.	
y de tetraciclina (clorhidrato)	0,0052 M/l.	
		Tanto por ciento de inhibición.
Antibiótico sólo		58
Antibiótico en presencia de proteínas		15

b) Efecto de la adición de cisteína

para concentración de piruvato	0,0045 M/l.	
concentración de tetraciclina (cl)	0,0075 M/l.	
y concentración de cisteína	0,045 u	
Antibiótico sólo		78
Antibiótico con cisteína		99

c) Efecto de la adición de iones metálicos

para concentración de piruvato	0,0045 M/l.	
concentración de tetraciclina (cl)	0,005 M/l.	
concentración de iones Mg. y Mn.	0,0005 M/l.	
Antibiótico en ausencia de iones		61
Antibiótico en presencia de iones		35

(1) *Condiciones experimentales:*

Tampón citratos pH = 6,0.
 Volumen final = 3,0 ml.
 Atmósfera = aire.
 Temperatura = 30° C.

Comparando las curvas de inhibición representadas en las figuras 1, 2 y 3, en las que se toman los valores de V/V_0 frente a los de las concentraciones molares del inhibidor, correspondientes a los tres antibióticos del grupo, se observa que las funciones—Cl y —OH no producen variaciones en la naturaleza de la inhibición, causando, en cambio, mayor inhibición la clorotetraciclina que la oxitetraciclina y, a la vez, siendo mayores las causadas por estas dos últimas sustancias que por

OXITETRACICLINA

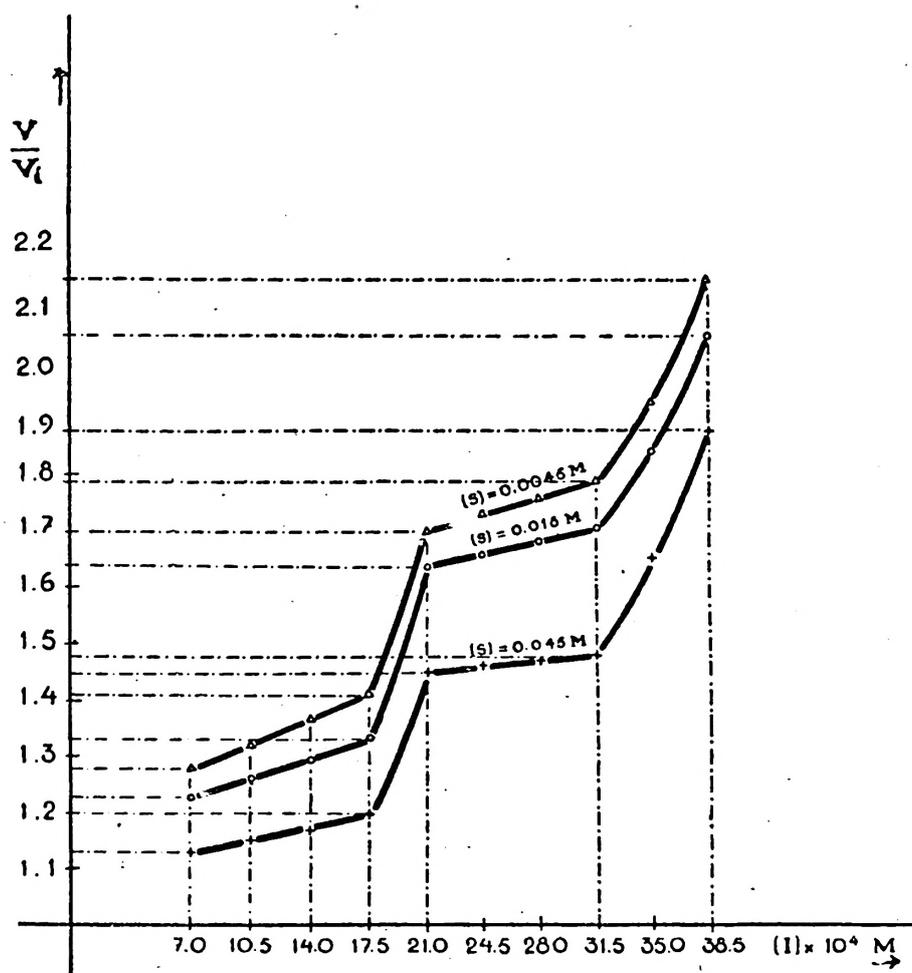


Figura 2

la tetraciclina, para concentraciones iguales de los demás constituyentes del sistema enzimático.

Los puntos de inflexión característicos de las curvas de inhibición mencionadas, en las que se acusan cambios bruscos de los valores V/V_i para pequeñas variaciones de las concentraciones de los antibióticos, se presentan en la tetraciclina para valores mínimos de ésta, mientras que son máximos para la oxitetraciclina.

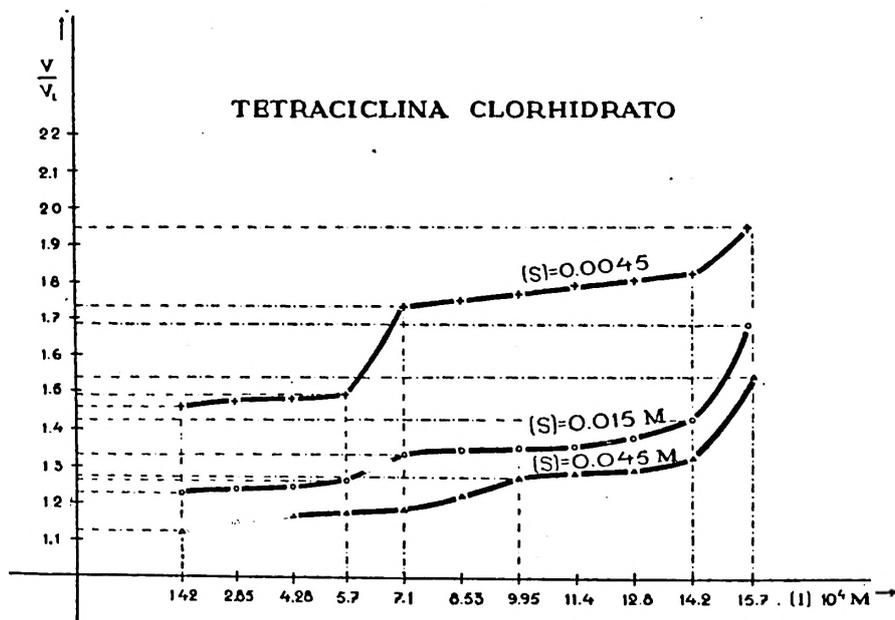


Figura 3

Agradecimiento. — Nos complacemos en expresar nuestro agradecimiento a los laboratorios Alter, S. A.; Antibióticos, S. A.; Laboratorios Reunidos, S. A.; Lederle; Pan-Química-Farmacéutica, S. A., y Pefeizer, por habernos suministrado generosamente productos antibióticos puros, que se han utilizado en este trabajo.

Resumen

Utilizando la técnica manométrica de Warburg se ha estudiado la inhibición de la carboxilasa pirúvica por los antibióticos del grupo de derivados del núcleo naftacénico.

Clorotetraciclina, oxitetraciclina y tetraciclina inhiben, por un mismo mecanismo de acción, el sistema enzimático estudiado, siendo probable que su actuación esté relacionada con tres o más grupos funcionales análogos, presentes en las tres moléculas de estos antibióticos.

Summary

Studies on carboxylases. — VIII Enzymatic inhibition of pyruvic carboxylase by antibiotics derived from the naphthacenic nucleus

A study has been made of the inhibitory action of the antibiotics tetracycline, chlorotetracycline and oxytetracycline on purified pyruvic carboxylase. The velocity of decarboxylation of pyruvic acid by the enzyme preparation at different antibiotic concentrations was determined manometrically.

The graphs which represent v/v_i , as regards the molar concentration

of antibiotic, present two very marked points of inflection in the three derivatives of the naphthacenic nucleus, which indicates that these three compounds behave in a similar way qualitatively and quantitatively.

The substrate has in all cases a protective action on the enzyme activity; in the case of tetracycline and of chlorotetracycline, a ten-fold increase in substrate concentration reduces the inhibition to approximately one half, while in the case of oxytetracycline the protective action of the substrate is less marked.

The addition of inert proteins considerably reduces the inhibition and thus employing crude preparations of the enzyme a much smaller inhibition is reached than with the purified enzyme: this indicates that the three antibiotics mentioned unite with proteins to form non-specific complexes, complexes which may facilitate distribution in the organism through the plasmatic proteins.

The divalent cations magnesium and manganese have a marked effect on the inhibition: the addition of 5×10^{-1} mols by liter of ions reduces the inhibition by half; on the otherhand in the least. These results suggest that the mechanism of inhibition is complex, due to the functional groups common to the three antibiotics studied; part of the inhibition is caused by non-specific interaction with the protein part of the enzyme and another part is due to union with the divalent ions which the enzyme requires for its functioning. Results with cysteine indicate that there is no block nor oxidation of the sulph-hydryl groups of the enzyme.

Bibliografía

- (1) DE LA FUENTE, G. : Tesis doctoral, Facultad de Ciencias, Madrid, 1955.
- (2) DÍAZ CADAVIECO, R., y DE LA FUENTE, G. : *R. esp. Fisiol.*, **10**, 235, 1954.
- (3) GREEN, D. E., y SUBRAHMANYAN, V. : *J. Biol. Chem.*, **135**, 795, 1940.
- (4) GREEN, D. E., y HERBERT, D. : *J. Biol. Chem.*, **138**, 327, 1941.
- (5) LINEWEAVER, H., y BURK, D. : *J. Am. Chem. Soc.*, **56**, 653, 1934.
- (6) MICHAELIS, L., y MENTEN, M. L. : *Biochem. Z.*, **49**, 333, 1913.
- (7) ROBERTSON, W. B. : *Science*, **96**, 93, 1943.
- (8) SANTOS-RUIZ, A. : *Publ. Cient. Aller.*, **6**, 151, 1954.
- (9) SEVAG, M. G. : *J. Gen. Physiol.*, **25**, 805, 1942.
- (10) SILIPRANDI, D., y SILIPRANDI, N. : *Biochem. Biophys. Acta*, **14**, 52, 1954.
- (11) UMBREIT, W. W., BURKIS, R. H., y STAUFFER, J. F. : *Manometric Techniques and Tissue Metabolism*, Burgess Publ. Co.
- (12) WARBURG, O. : *Biochem. Z.*, **142**, 317, 1923.
- (13) WARBURG, O. : *Über den Stoffwechsel der Tumoren*, Berlín, 1926.
- (14) WEIJLARD, K., y TAUBER, H. : *J. Am. Chem. Soc.*, **60**, 2.263, 1938.

