

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

Estudios sobre carboxilasas

IX. — Inhibición enzimática de la carboxilasa pirúvica por los antibióticos del grupo glucídico

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

(Recibido para publicar el 24 de mayo de 1956)

Desde el descubrimiento de la acción bacteriostática de los antibióticos, los farmacólogos han tratado de interpretar el mecanismo de su intervención en los fenómenos vitales. Se ha insistido particularmente en el aspecto bioquímico del problema, estudiándose con interés la influencia inhibidora de estos medicamentos sobre un proceso metabólico determinado o sobre la actividad de un sistema enzimático aisladamente considerado.

En vista de la gran importancia biológica de los enzimas que contienen funciones sulfhidrúlicas activas, nosotros elegimos a la carboxilasa pirúvica, cuyo interés hemos hecho resaltar en una publicación previa (1), para realizar una serie de trabajos en este sentido.

Se trata de un sistema enzimático que posee grupo prostético (pirofosfato de tiamina) común a una serie de enzimas clave del metabolismo de glúcidos, tanto por vía aerobia como anaerobia.

En la presente nota nos proponemos estudiar la inhibición causada por los antibióticos pertenecientes al grupo de aminosas.

* Becario del Patronato S. Ramón y Cajal.
** Becaria del Patronato J. de la Cierva.

Materiales y métodos

Las preparaciones del enzima, sustrato y activadores se ha hecho con las características descritas en el correspondiente apartado de nuestras comunicaciones anteriores (1).

Para los demás reactivos empleados en este trabajo y para la descripción del método manométrico nos remitimos también a lo dicho en nuestras publicaciones previas (1).

Resultados

EXPERIMENTOS CON CLORANFENICOL.

El cloranfenicol inhibe a la carboxilasa pirúvica irreversiblemente en cuanto al sustrato, pues los valores hallados para las inhibiciones en presencia de concentraciones de sustrato de 0,0045 M son sensiblemente iguales a las que resultan cuando las concentraciones del sustrato son 0,015 y 0,045 molares (véase la tabla I).

TABLA I

Inhibición de la carboxilasa pirúvica por cloranfenicol. Efecto de la concentración del antibiótico a diferentes concentraciones de piruvato

Concentración de piruvato en M/l.	Concentración de cloranfenicol en M/l.	Velocidad de descarboxilación en $\mu\text{l/h. cm}^2$.	Tanto por ciento de inhibición
0,0045	0	$4,2 \times 10^2$	—
	> 0,00058	$3,8 \times 10^2$	10
	> 0,0013	$3,4 \times 10^2$	20
	> 0,0023	$2,4 \times 10^2$	44
	> 0,0034	$1,8 \times 10^2$	59
0,015	0	$5,3 \times 10^2$	—
	> 0,00058	$4,8 \times 10^2$	10
	> 0,0013	$4,3 \times 10^2$	19
	> 0,0023	$2,9 \times 10^2$	44
	> 0,0034	$2,4 \times 10^2$	55
0,045	0	$5,4 \times 10^2$	—
	> 0,00058	$4,9 \times 10^2$	10
	> 0,0013	$4,3 \times 10^2$	19
	> 0,0023	$3,5 \times 10^2$	36
	> 0,0034	$2,6 \times 10^2$	59

Condiciones experimentales:

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

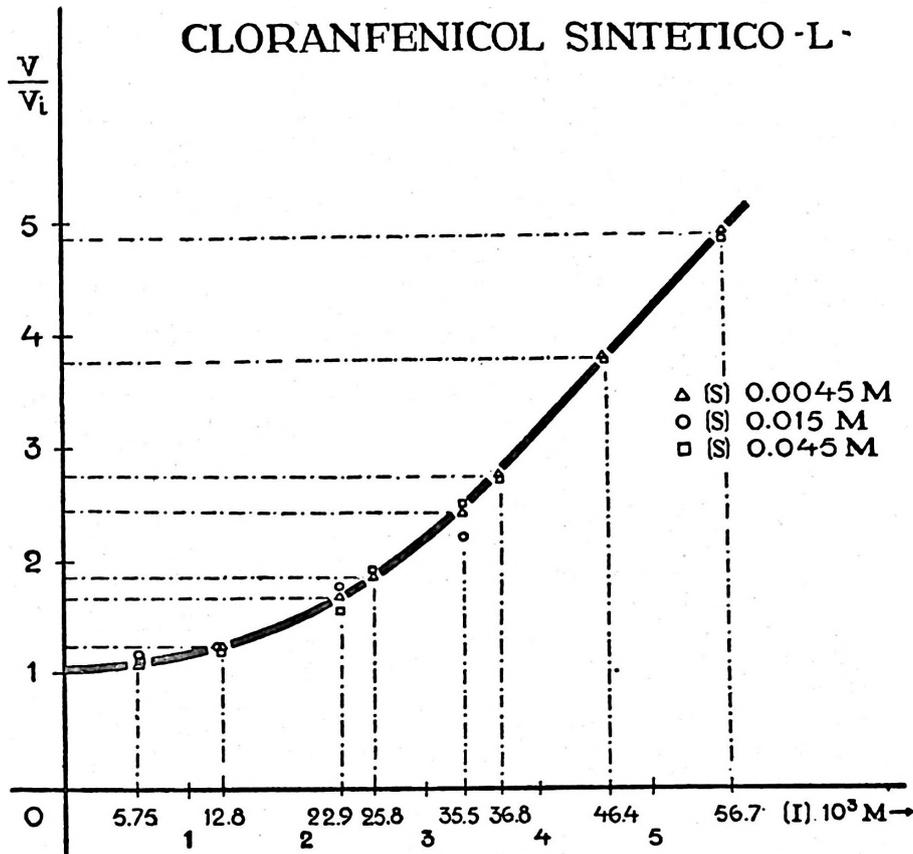


Figura 1

Estudiando la tabla II puede observarse que la adición de cocarboxilasa disminuye considerablemente la inhibición y esto podría interpretarse como que el cloranfenicol se une al enzima en los mismos puntos en que lo hace el coenzima, el cual le desplaza cuando está en exceso. Esta hipótesis no es fácil de admitir porque, al pH a que se opera, la unión del cofermento es muy sólida para la carboxilasa pirúvica y el enzima está prácticamente saturado de su coenzima. Mayor probabilidad hay para que el antibiótico se combine con la cocarboxilasa precisamente por los radicales difosfóricos de su molécula, pues la adición de tiamina nos ha demostrado que no hace disminuir el grado de inhibición (fig. 1).

Las pruebas en presencia de triptofano y sarcosina, sustancias de las que se ha dicho que modifican la acción del cloranfenicol sobre las bacterias, demuestran que no posee la menor inhibición de la carboxilasa pirúvica.

La adición de efedrina duplica el grado de inhibición para concentraciones iguales a las del cloranfenicol.

Si la acción tóxica del cloranfenicol se debiera a su combinación con la cocarboxilasa en el organismo animal, inactivando este coenzima múltiples funciones en la economía celular, sería interesante averiguar hasta qué punto la administración de difosfato de tiamina disminuye la toxicidad de este antibiótico «in vivo».

La adición de cisteína no afecta el grado de inhibición y esto refuerza la hipótesis de que el cloranfenicol no ejerce acción sobre las funciones sulfhidrúlicas del apoenzima, sino que actúa sobre el cofermento.

TABLA II
Inhibición de la carboxilasa pirúvica por cloranfenicol.
Efecto de diversas adiciones

Substancia añadida	Concentración de la substancia añadida	Concentración de cloranfenicol en M/l.	Tanto por ciento de inhibición
Cocarboxilasa	0	0,0026	49
>	100 gammas/cm ³	0,0026	20
>	0	0,0013	15
>	100 gammas/cm ³	0,0013	9
Triptofano	0	0,004	63
>	0,0045 M/l.	0,004	72
Tiamina	0,0045 M/l.	0,004	63
Indol	0,0045 M/l.	0,004	71
Sarcosina	0,0045 M/l.	0,004	63
Efedrina	0	0,0006	10
>	0,0008 M/l.	0,0006	19
>	0	0,0013	15
>	0,0004 M/l.	0,0013	40
>	0	0,0023	36
>	0,008 M/l.	0,0023	77
Cisteína	0	0,0026	47
>	0,045 M/l.	0,0026	53

Condiciones experimentales:

Tampón citratos pH = 6,0.

Volumen final = 3,0 ml.

Atmósfera = aire.

Temperatura = 30° C.

Concentración de piruvato = 0,045 M/l. excepto para los experimentos con cisteína que fué igual a 0,0045 M/l.

EXPERIMENTOS CON DIHIDROESTREPTOMICINA (SULFATO).

La tabla II indica que se necesitan concentraciones considerables del antibiótico para obtener inhibiciones apreciables, lo que hace suponer que a las concentraciones en que se encuentra en la sangre de los individuos tratados, la inhibición sobre este sistema enzimático sería reducidísima.

La acción protectora que ejerce el sustrato sobre el enzima es muy poco marcada y la adición de cocarboxilasa no modifica en absoluto el grado de inhibición. Tampoco varía la inhibición con la incubación previa del inhibidor con el sustrato ni con el enzima (fig. 2).

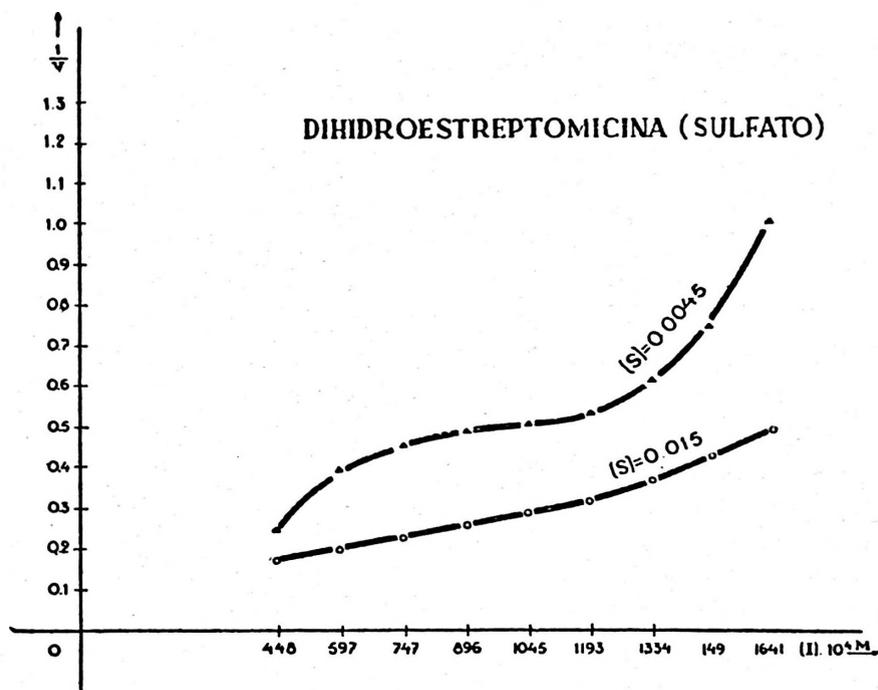


Figura 2

Nuestros resultados los consideramos un dato más a favor de la hipótesis de que la acción tóxica de la dihidroestreptomicina sobre el sistema vestibular no es de interferencia general con el piruvato ni con la cocarboxilasa, sino específica con un enzima determinado del ciclo tricarboxílico.

Para concentración 0,0045 M. de piruvato, la dihidroestrep-

tomocina en concentración de 0,090 M. produce un 70 % de inhibición, mientras que estreptomocina sólo inhibe 28 % al sistema enzimático estudiado (tablas VII y VIII).

TABLA III

Inhibición de la carboxilasa pirúvica por dihidroestreptomocina (sulfato)
Efecto de la concentración de antibiótico a diferentes concentraciones de piruvato

Concentración de piruvato en M/l.	Concentración de dihidroestreptomocina en M/l.	Velocidad de descarboxilación en $\mu\text{l/h. cm}^3$.	Tanto por ciento de inhibición
0,0045	0	$7,2 \times 10^2$	—
>	0,045	$4,2 \times 10^2$	42
>	0,060	$2,5 \times 10^2$	65
>	0,120	$1,9 \times 10^2$	73
>	0,150	$1,3 \times 10^2$	81
>	0,160	$1,0 \times 10^2$	86
0,015	0	$8,3 \times 10^2$	—
>	0,045	$5,7 \times 10^2$	29
>	0,060	$5,5 \times 10^2$	32
>	0,120	$3,2 \times 10^2$	60
>	0,150	$2,3 \times 10^2$	71
>	0,160	$2,0 \times 10^2$	75

Condiciones experimentales:

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

EXPERIMENTOS CON ERITROMICINA.

La eritromicina inhibe a concentraciones débiles a la carboxilasa pirúvica, sin que la concentración del substrato afecte considerablemente al grado de inhibición (véase tabla IV).

Del estudio de la figura 3 demuestra que el mecanismo de inhibición es aparentemente acoplador, siendo por esta razón muy probable que el antibiótico se acople solamente al complejo enzima-substrato y no actúe directamente sobre el enzima libre.

EXPERIMENTOS CON FRAMICETINA.

La tabla V indica que este antibiótico inhibe a la carboxilasa pirúvica y que la concentración del substrato afecta al grado de inhibición.

TABLA IV

Inhibición de la carboxilasa pirúvica por eritromicina
Efecto de la concentración del antibiótico a diferentes concentraciones
de piruvato

Concentración de piruvato en M/l.	Concentración de eritromicina en M/l.	Velocidad de descarboxilación en $\mu\text{l/h. cm}^2$.	Tanto por ciento de inhibición
0,0045	0	$4,7 \times 10^2$	—
>	$0,20 \times 10^{-4}$	$4,2 \times 10^2$	10
>	$0,25 \times 10^{-4}$	$4,0 \times 10^2$	13
>	$0,28 \times 10^{-4}$	$3,8 \times 10^2$	18
>	$0,30 \times 10^{-4}$	$3,7 \times 10^2$	21
0,045	0	$5,6 \times 10^2$	—
>	$0,20 \times 10^{-4}$	$4,6 \times 10^2$	17
>	$0,25 \times 10^{-4}$	$4,5 \times 10^2$	20
>	$0,28 \times 10^{-4}$	$4,4 \times 10^2$	21
>	$0,30 \times 10^{-4}$	$4,3 \times 10^2$	23

Condiciones experimentales:

Tampón citratos pH = 6,0.
 Volumen final = 3,0 ml.

Temperatura = 30° C.
 Atmósfera = aire.

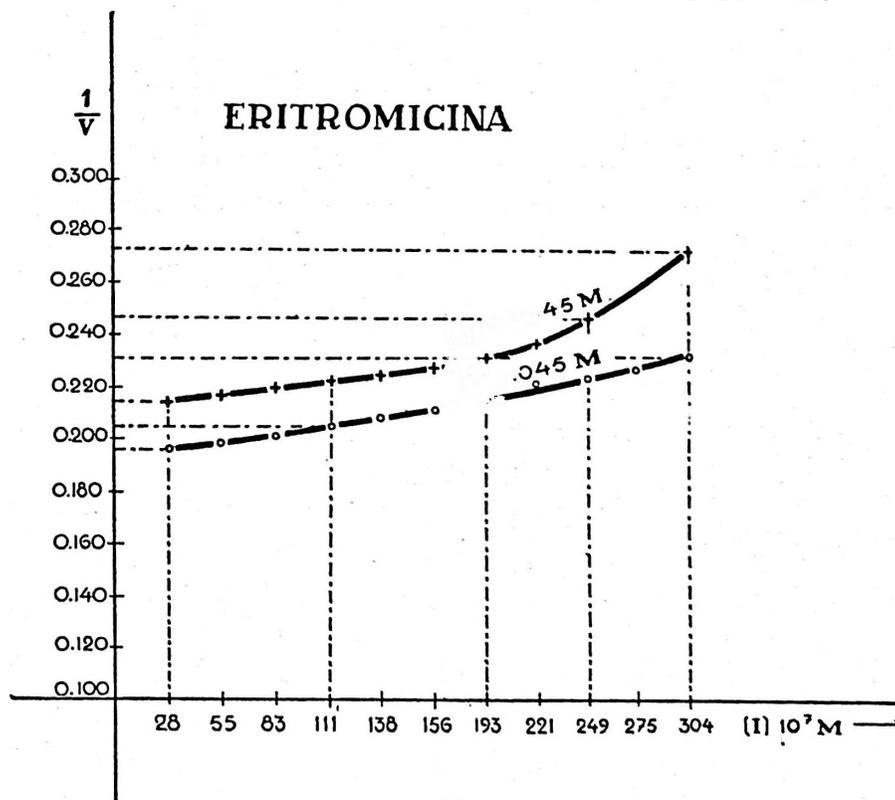


Figura 3

TABLA V

Inhibición de la carboxilasa pirúvica por framicitina (sulfato)
Efecto de la concentración del antibiótico a diferentes concentraciones
de piruvato

Concentración de piruvato en M/l.	Concentración de framicitina en M/l.	Velocidad de descarboxilación en $\mu\text{l/h. cm}^2$.	Tanto por ciento de inhibición
0,0045	0	$5,6 \times 10^2$	—
>	24	$4,8 \times 10^2$	14
>	48	$4,2 \times 10^2$	24
>	84	$3,3 \times 10^2$	40
>	132	$2,0 \times 10^2$	64
0,015	0	$6,5 \times 10^2$	—
>	24	$6,3 \times 10^2$	5
>	48	$5,9 \times 10^2$	10
>	84	$4,7 \times 10^2$	28
>	132	$3,2 \times 10^2$	51

Condiciones experimentales:

Tampón citratos pH = 6,0.

Volumen final = 3,0 ml.

Atmósfera = aire.

Temperatura = 30° C.

TABLA VI

Inhibición de la carboxilasa pirúvica por neomicina (sulfato)
Efecto de la concentración del antibiótico a diferentes concentraciones
de piruvato

Concentración de piruvato en M/l.	Concentración de neomicina en M/l.	Velocidad de descarboxilación en $\mu\text{l/h. cm}^2$.	Tanto por ciento de inhibición
0,0045	0	$3,8 \times 10^2$	—
>	$0,5 \times 10^{-3}$	$3,2 \times 10^2$	15
>	$0,5 \times 10^{-2}$	$2,9 \times 10^2$	22
>	$0,25 \times 10^{-2}$	$2,5 \times 10^2$	34
>	$0,05 \times 10^{-1}$	$2,0 \times 10^2$	46
0,015	0	$5,4 \times 10^2$	—
>	$0,5 \times 10^{-3}$	$5,2 \times 10^2$	5
>	$0,5 \times 10^{-2}$	$5,0 \times 10^2$	10
>	$0,25 \times 10^{-2}$	$4,7 \times 10^2$	14
>	$0,05 \times 10^{-1}$	$4,3 \times 10^2$	20

Condiciones experimentales:

Tampón citratos pH = 6,0.

Volumen final = 3,0 ml.

Atmósfera = aire.

Temperatura = 30° C.

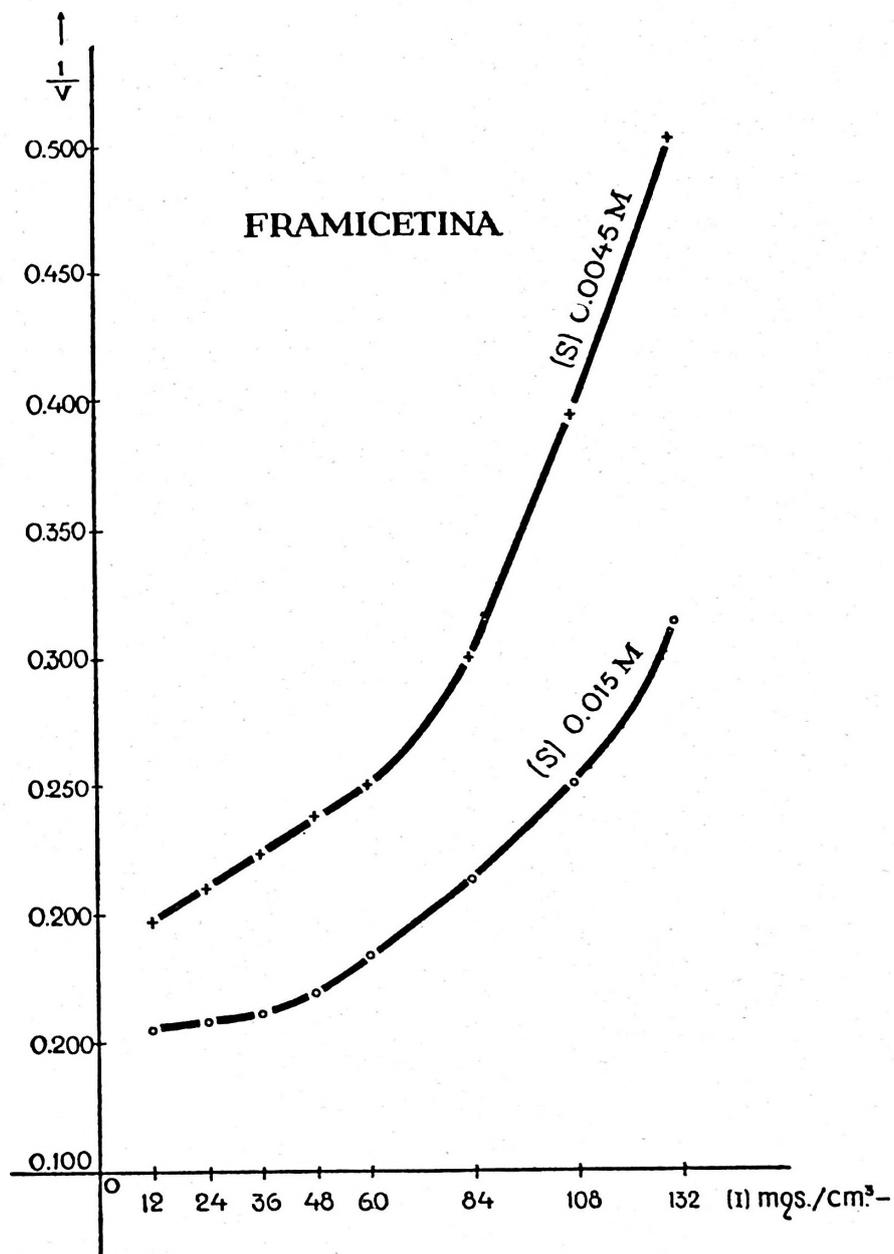


Figura 4

El estudio gráfico de la inhibición (fig. 4) causada por la framycetina no conduce a ninguno de los tipos clásicos, atribuyéndose a la posibilidad de que sea originada por varios grupos

funcionales de su molécula, cuya estructura desconocemos actualmente.

EXPERIMENTOS CON NEOMICINA.

La inhibición que origina la neomicina sobre la carboxilasa pirúvica es análoga a la que produce la estreptomina (dihidro), si bien aquí el substrato tiene acción protectora más marcada sobre el enzima (véase tabla VI).

El estudio de la gráfica 5 pone de manifiesto la competencia entre el antibiótico y el enzima, hecho que podría tener intervención en la toxicidad de esta substancia, aunque no queden excluidos otros mecanismos respecto de otros enzimas.

Por el método gráfico se ha calculado el valor $4,5 \times 10^{-2}$ M. para la constante de inhibición.

TABLA VII

Inhibición de la carboxilasa pirúvica por dihidroestreptomina (sulfato) ()*

a) Efecto de la adición de cocarboxilasa		
para concentración de piruvato.	0,0125 M/l.	
de antibiótico	0,1 M/l.	
y de cocarboxilasa	40 gammas/cm ³ .	
		Tanto por ciento de inhibición
Antibiótico solo		66
Antibiótico con carboxilasa		70
b) Efecto de la incubación del antibiótico con el substrato		
para concentración de piruvato.	0,0125 M/l.	
y del antibiótico	0,07 M/l.	
Antibiótico sin incubar		59
Antibiótico incubado		57

(*) *Condiciones experimentales:*
 Tampón citratos pH = 6,0.
 Volumen final = 3,0 ml.
 Atmósfera = aire.
 Temperatura = 30° C.

EXPERIMENTOS CON CARBOMICINA.

A las concentraciones usualmente utilizadas se ha podido comprobar que la carbomicina no ejerce acción alguna inhibidora sobre la carboxilasa.

TABLA VIII

Inhibición de la carboxilasa pirúvica por estreptomycin (sulfato) (*)
Para concentración de piruvato 0.0045 M.

Concentración del antibiótico en M/l.	Tanto por ciento de neomicina
0,06	19
0,075	24
0,090	28

(*) *Condiciones experimentales:*
Tampón citratos pH = 6,0.
Volumen final = 3,0 ml.
Atmósfera = aire.
Temperatura = 30° C.

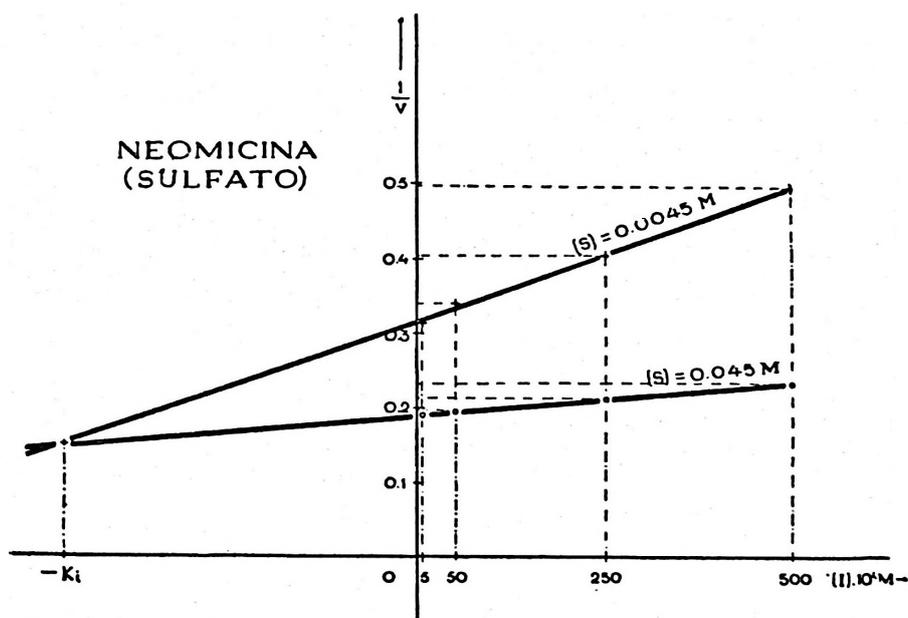


Figura 5

Agradecimiento. — Expresamos nuestro agradecimiento a las casas Abbot Laboratories (Chicago); Antibióticos, S. A. (Madrid); Diamant (Paris); E. Boizot (Madrid); Lederle; Llorente (Madrid); Pan Química Farmacéutica (Madrid); Pfizer; L. Reunidos, S. A. (Madrid); y Roussel (Francia), por habernos facilitado generosamente muestras de antibióticos puros, y muy especialmente a Laboratorios Alter, S. A., que nos ha proporcionado multitud de muestras, algunas de ellas costosamente adquiridas en mercados extranjeros.

Resumen

Empleando la técnica manométrica de WARBURG se ha estudiado el efecto inhibitor de los antibióticos del grupo de aminosas sobre el sistema enzimático de la carboxilasa pirúvica purificada. En el caso del cloranfenicol se ha encontrado un curioso antagonismo con la cocarboxilasa.

Summary

Studies on carboxylases. — IX Enzymatic inhibition of pyruvic carboxylase by antibiotics of the glucidic group

Continuing the study of enzymatic inhibition of pyruvic carboxylase by the therapeutically important antibiotics, the antibiotics streptomycin and dihydrostreptomycin, erythromycin, neomycin and carbomycin have been tested with the following results:

- 1) Inhibition by cloranphenicol is irreversible with respect of the substrate, on the other hand, addition of cocarboxylase markedly reduces inhibition; addition of thiamine has not the same effect.
- 2) Streptomycin. Very high concentrations (from 0.05 M) are needed to obtain appreciable inhibitions. At concentrations in which the organisms treated are usually encountered, it has no inhibitory action on pyruvic carboxylase.
- 3) Dihydrostreptomycin. Its inhibitory action is much more marked than that of streptomycin. At equal concentrations, inhibition with dihydrostreptomycin is triple that with streptomycin.
- 4) Cocarboxylase added to the system does not modify the inhibitory action of dihydrostreptomycin.
- 5) Erythromycin is a strong inhibitor of pyruvic carboxylase. The substrate has no protective action on the enzyme. Theoretical treatment would suggest that the mechanism of inhibition can be the formation of enzyme-substrate-inhibitor complexes more than the action of inhibitor on the free enzyme.
- 6) Framycetin produces has a inhibition power on pyruvic carboxylase varying with substrate concentration.
- 7) Neomycin. Inhibits moderately and the substrate has a marked protective action. A competition between the antibiotic and the enzyme for the substrate is suggested, inhibition constant is 4.5×10^{-3} M.
- 8) Carbomycin, in the concentrations usually used, has no action on carboxylase.

Bibliografía

- (1) MARTÍN, D. H., DE LA FUENTE SÁNCHEZ, G., y SANTOS RUIZ, A.: *R. esp. Fisiol*, 12, 91, 1956.