

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

## Estudios sobre carboxilasas

### XI. — Inhibición enzimática de la carboxilasa pirúvica por penicilinas y otros antibióticos no incluidos en los grupos ya estudiados

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

(Recibido para publicar el 12 de agosto de 1956)

Las interferencias que los antibióticos originen en las reacciones enzimáticas particulares de una célula puede ser, en último término, la causa de sus propiedades bacteriostáticas y tóxicas.

Cuando una de estas sustancias inhibe un determinado proceso enzimático de la célula viva, sea bacteriana o animal, los defectos pueden transmitirse a lo largo de una cadena completa de sistemas relacionados entre sí, originando aberraciones importante de su metabolismo normal.

Los enzimas que son inhibidos por los antibióticos en los microorganismos han de tener grupos esenciales diferentes de los que poseen los del huésped, o puede suceder también que los enzimas sensibles en las bacterias estén ausentes en los tejidos en que actúan estos medicamentos en el animal tratado, o sean para él de escasa importancia biológica.

El estudio de la acción de los antibióticos sobre los sistemas enzimáticos aislados constituye actualmente el procedimiento más fructífero para la elucidación del mecanismo de acción de estos medicamentos.

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

En comunicaciones (1, 2, 3) anteriores nosotros hemos dado a conocer el efecto que clorotetraciclina, oxitetraciclina, tetraciclina, bacitracina, polimixina B, tirotricina, viomicina, argicilina, actinomicina C, cloranfenicol, dihidroestreptomicina, estreptomicina, eritromicina, frameticina, neomicina y carbomicina ejercen sobre el sistema enzimático de la carboxilasa pirúvica, cuya importancia bioquímica hemos hecho resaltar oportunamente.

En el presente trabajo nos proponemos estudiar la influencia de penicilina G, sódica y potásica, yodhidrato de dietil-aminoetil-penicilina G, neoflavorizina, funagilina y fungicidina sobre este sistema clave de funciones sulfhidrúlicas activas.

### Material y métodos

Las preparaciones del enzima, substrato y activadores se han hecho de acuerdo con lo descrito en nuestra primera publicación (1).

Para la descripción del método manométrico utilizado, y otros pormenores, nos remitimos a nuestras publicaciones anteriores (1).

### Resultados

#### EXPERIMENTOS CON PENICILINA G.

Se ha utilizado penicilina G sódica y potásica y se ha comprobado que no existe ninguna diferencia entre estas dos sales del antibiótico en lo relacionado con su acción inhibitoria del sistema enzimático de la carboxilasa pirúvica.

En la tabla I se observa que la concentración del substrato tiene influencia en el grado de inhibición.

Aplicando el método de LINEWEAVER y BURK, representando los valores de  $V/V_i$  frente a los de las concentraciones de inhibidor no se obtienen líneas rectas, sino parabólicas, lo que sugiere una de estas dos hipótesis (véase figura) :

- a). La relación entre inhibición y concentración de inhibidor no es lineal, es decir, cada molécula de enzima fija más de una molécula del antibiótico. Si esto es así, la representación logarítmica debe conducir a una línea recta de pendiente igual al número de moléculas de inhibidor que se unen con una molécula del enzima.

TABLA I

*Inhibición de la carboxilasa pirúvica por Penicilina G, sódica o potásica  
Efecto de la concentración del antibiótico a diferentes concentraciones  
de piruvato*

Concentración de piruvato en M/l.	Concentración de Penicilina en M/l.	Velocidad de descarboxilación en $\mu$ l/h. ml.	Tanto por ciento de inhibición
0,004	0	$3,7 \times 10^2$	—
»	0,0075	$2,3 \times 10^2$	38
»	0,010	$1,9 \times 10^2$	51
»	0,015	$1,4 \times 10^2$	64
»	0,030	$0,3 \times 10^2$	93
0,015	0	$5,3 \times 10^2$	—
»	0,0075	$3,4 \times 10^2$	35
»	0,010	$2,9 \times 10^2$	46
»	0,015	$2,2 \times 10^2$	58
»	0,030	$0,7 \times 10^2$	88
0,045	0	$5,4 \times 10^2$	—
»	0,0075	$4,0 \times 10^2$	26
»	0,010	$3,3 \times 10^2$	38
»	0,015	$2,5 \times 10^2$	53
»	0,030	$0,8 \times 10^2$	87

*Condiciones experimentales:*

Tampón citratos pH = 6,0.

Volumen final = 3,0 ml.

Atmósfera = aire.

Temperatura = 30° C.

- b) Se trata de una inhibición debida a la asociación del inhibidor con el sustrato y no con el enzima. Esto explicaría que, al elevar la concentración del sustrato, disminuyera la inhibición por quedar mayor cantidad de sustrato libre para unirse con el enzima; podría decirse que el enzima y el inhibidor compiten por el sustrato.

Como la representación logarítmica da lugar a una línea recta de pendiente sensiblemente igual a dos y, en cambio, la representación de los valores de  $1/V$  frente a los de las concentraciones del inhibidor se aparta bastante de la gráfica teórica que se obtiene para una combinación inhibidor-sustrato, se concluye admitiendo como más probable la primera de las hipótesis enunciadas.

Se han realizado ensayos con penicilina G inactivada, desprovista de acción antibiótica, y se ha encontrado que inhibe

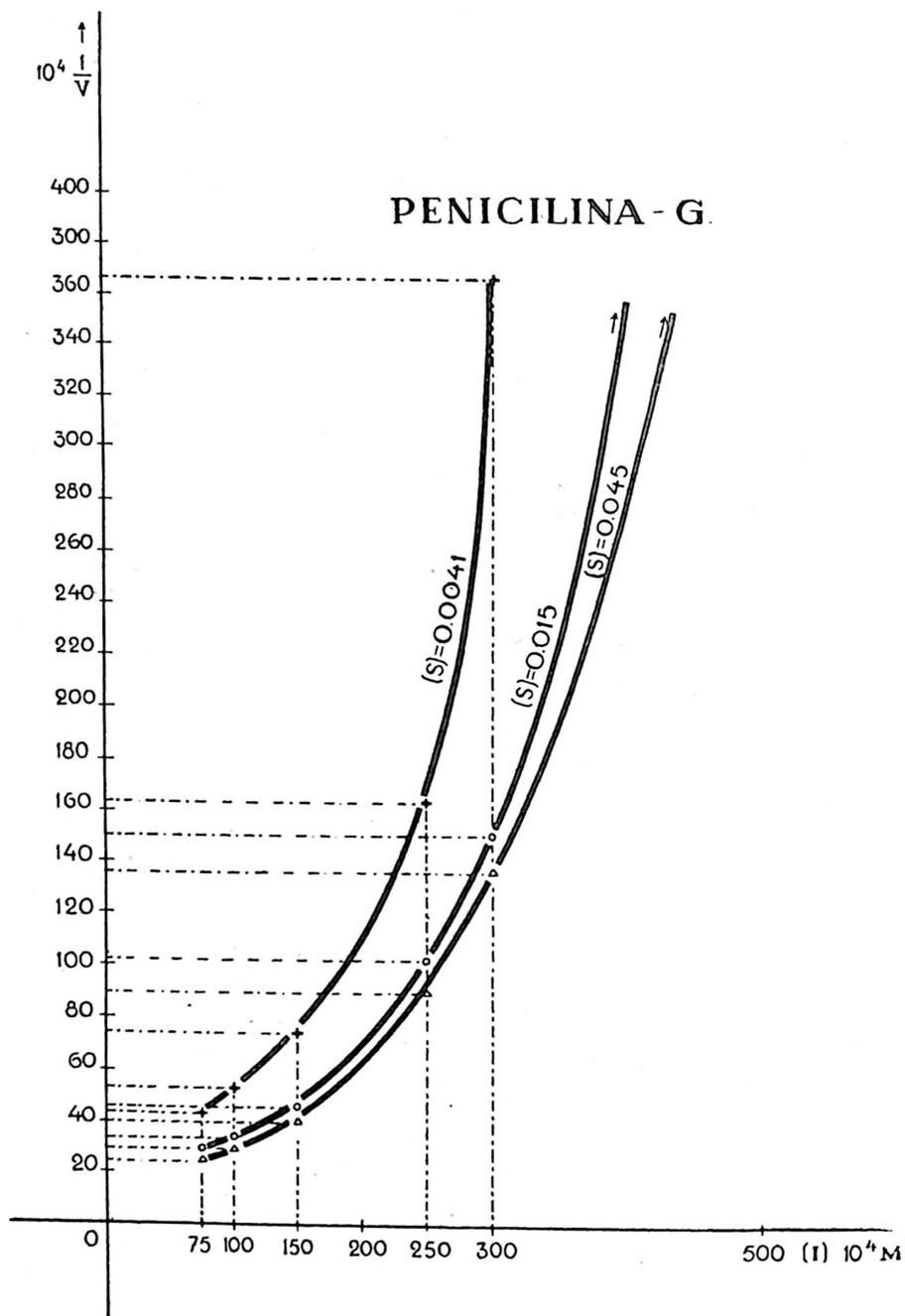


Figura 1

más fuertemente al sistema enzimático de la carboxilasa pirúvica, y que en este caso la concentración de piruvato no ejerce influencia en el grado de inhibición (tabla III).

TABLA II

*Inhibición de la carboxilasa pirúvica por Dietil-amino-etil-penicilina G (Yohidrato)*

*Efecto de la concentración del antibiótico a diferentes concentraciones de piruvato*

Concentración de piruvato en M/l.	Concentración del antibiótico en M/l.	Velocidad de descarboxilación en $\mu$ l/h. ml.	Tanto por ciento de inhibición
0,0045	0	$3,4 \times 10^2$	—
»	0,0075	$2,6 \times 10^2$	37
»	0,015	$2,1 \times 10^2$	48
»	0,010	$1,6 \times 10^2$	60
0,015	0	$5,3 \times 10^2$	—
»	0,075	$3,9 \times 10^2$	27
»	0,015	$3,6 \times 10^2$	32
»	0,025	$2,2 \times 10^2$	57
0,045	0	$5,4 \times 10^2$	—
»	0,0075	$4,4 \times 10^2$	18
»	0,015	$4,0 \times 10^2$	26
»	0,25	$2,4 \times 10^2$	57

*Condiciones experimentales:*

Tampón citratos pH = 6,0.

Volumen final = 3,0 ml.

Atmósfera = aire.

Temperatura = 30° C.

Teniendo en cuenta que el plasma sanguíneo disminuye la actividad de la penicilina, en un grupo de determinaciones se ha adicionado seroalbúmina y ovoalbúmina (15 mgs. por vaso, en ambos casos), comprobándose que la inhibición no varía (tabla III), lo que hace suponer que la acción de este antibiótico sobre las moléculas proteicas presenta cierta especificidad, pues si la penicilina se uniese indistintamente a la carboxilasa y a otras proteínas, hubiera resultado una disminución de la inhibición. También este hecho sugiere que, si el transporte de la penicilina en la sangre se hace a base de la formación de complejos con las proteínas del plasma, una vez introducidos en los tejidos y células como unidades estructurales, allí se disocian por mecanismos especiales para actuar como antibiótico; estos complejos proteicos no se forman con las proteínas en general, sino que su formación obedece a una determinada especificidad.

La adición de cisteína no hace variar el grado de inhibición, probándose con ello que no sucede aquí como con otros casos

de inhibiciones de sistemas enzimáticos de grupos sulfhidrúlicos esenciales.

TABLA III

*Inhibición de la carboxilasa pirúvica por penicilina G, sódica o potásica (\*)*

a) Efecto de la inactivación del antibiótico		
para concentración de piruvato.	0,045 M/l.	
y de penicilina . . . . .	0,0075 M/l.	
		Tanto por ciento de inhibición
Penicilina con acción antibiótica . . . . .		26
Penicilina inactivada . . . . .		53
b) Efecto de la adición de proteínas		
para concentración de piruvato.	0,045 M/l.	
y de penicilina . . . . .	0,020 M/l.	
Penicilina sola . . . . .		67
Penicilina + 5 mgs. de seroalbúmina/m. . . . .		67
Penicilina + 5 mgs. de ovoalbúmina/m. . . . .		67
c) Efecto de la adición de cisteína		
para concentración de piruvato.	0,045 M/l.	
penicilina 0,012 M. y de cisteína.	0,0045 M.	
Penicilina sin adición . . . . .		44
Penicilina con cisteína . . . . .		51

(\*) *Condiciones experimentales*

Tampón citratos pH = 6,0.

Volumen final = 3,0 ml.

Atmósfera = aire.

Temperatura = 30° C.

#### EXPERIMENTOS CON YODHIDRATO DE DIETIL-AMINO-ETIL-PENICILINA G.

Con el fin de comparar los resultados obtenidos con la penicilina G sódica y potásica con los de otros derivados del mismo antibiótico, hemos realizado una serie de experiencias empleando el yodhidrato del ester dietil-amino-etílico de la penicilina G, cuyos resultados se reflejan en la tabla II. Se observan menores inhibiciones y las concentraciones del substrato no ejercen influencia marcada en el grado de inhibición, lo que significa que se trata de un mecanismo de inhibición distinto que el presentado por las sales alcalinas del antibiótico.

#### EXPERIMENTOS CON OTROS ANTIBIÓTICOS.

Los experimentos realizados con penicilina G-benzatina, neo-flavorizina, fumagilina y fungicidina nos han demostrado que

estos antibióticos no ejercen acción sobre el sistema enzimático de la carboxilasa pirúvica a las concentraciones y en las condiciones habituales en esta serie de trabajos que llevamos publicados.

### Resumen

Utilizando el método manométrico de WARBURG se ha estudiado el efecto causado por algunos antibióticos sobre el sistema enzimático de la carboxilasa pirúvica.

Se ha encontrado que la penicilina G sódica o potásica, indistintamente, inhiben por mecanismo no competitivo. El yodhidrato de dietil-amino-etil penicilina G inhibe por distinto mecanismo. La penicilina G-benzatina, fumagilina y fungicidina no inhiben apreciablemente.

*Agradecimiento.* — Expresamos nuestro agradecimiento a las casas Abbot Laboratories (Chicago) ; Antibióticos, S. A. (Madrid) ; Lederle (U. S. A.) ; Laboratorios Reunidos, S. A. (Madrid) ; E. R. Squibb and Sons (U. S. A.), y muy especialmente a Alter, S. A., de Madrid, por habernos facilitado numerosas muestras de productos puros.

Igualmente, agradecemos al doctor COMENGE GERPE la ayuda prestada para la adquisición de antibióticos.

### Summary

#### Studies on carboxylases. — XI. Enzymatic inhibition of pyruvic carboxylase by the penicillins and other antibiotics not included in the groups already studied

Continuing the study of enzymatic inhibition of pyruvic carboxylase by antibiotics of therapeutic importance the penicillins and other antibiotics not included in the groups previously dealt with were studied.

For the penicillins, it is observed in the first place that there is no difference between the sodium and potassium salts. Secondly, substrate concentration has an influence on the amount of inhibition. Application of the principles of Lineweaver and Burk, and graphical representation of  $v/v_0$  against the concentration of inhibitor suggests that penicillin forms with the enzyme complexes in which the relative proportions are two molecules of antibiotic for one of enzyme. Inactive penicillin is even more inhibiting than the active form. The addition of inert globular proteins (ovoalbumin, seroglobulin, etc.) does not reduce inhibition which indicates a certain specificity of action. Addition of cysteine does not reduce inhibition which indicates that the interaction is not with the sulphhydryl groups of the enzyme. Diethyl-amino-ethyl ester is less inhibiting and the inhibition responds to a mechanism evidently different from that which corresponds to penicillin G.

Franycetin inhibits through a complex mechanism. Fumagillin and fungicidin have no marked action on the enzyme which is object of our study ; the same applies to neo-flavoricin.

### Bibliografía

- (1) MARTÍN-HERNÁNDEZ, D., DE LA FUENTE-SÁNCHEZ, G., y SANTOS-RUIZ, A. : *Rev. esp. Fisiol.*, **12**, 93, 1956.
- (2) MARTÍN-HERNÁNDEZ, D., DE LA FUENTE-SÁNCHEZ, G., y SANTOS-RUIZ, A. : *Rev. esp. Fisiol.*, **12**, 117, 1956.
- (3) MARTÍN-HERNÁNDEZ, D., DE LA FUENTE-SÁNCHEZ, G., y SANTOS-RUIZ, A. : *Rev. esp. Fisiol.*, **12**, 143, 1956.

