

ACCION DE ALGUNOS METALES DIVALENTES SOBRE LA INHIBICION DE LA LIPASA PANCREATICA POR TETRACICLINA Y 4-EPI-TETRACICLINA

Por F. Salto
D. Ordóñez
J. G. de la Peña

INTRODUCCION

Es un hecho conocido la facilidad con que las tetraciclinas forman quelatos con iones metálicos. ALBERT¹ ha calculado las constantes de estabilidad por la interacción de varios iones metálicos con los clorhidratos de tetraciclina, oxitetraciclina y clorotetraciclina, comprobando que la quelación juega un papel semejante en todos los casos. DOLOUISIO y MARTIN² estudian la acción complejante de varios iones metálicos con las tetraciclinas terapéuticamente activas y algunos de sus análogos inactivos, encontrando que las primeras formaban complejos de relación 2 : 1 con la misma avidez para todos los iones estudiados. Igualmente encuentran que las tetraciclinas inactivas forman solamente complejos de relación 1 : 1 con los mismos metales.

Los antibióticos del grupo de la tetraciclina difieren de la mayoría de los otros antibióticos por su acción inhibidora «in vitro», a concentraciones relativamente bajas sobre varios sistemas enzimáticos. El mecanismo de la inhibición no está suficientemente claro; sin embargo, algunos autores³⁻⁴ sugieren el mecanismo de la acción inhibidora de la tetraciclina por sus propiedades quelantes sobre algunos iones del sistema. J. ROKOS, P. MALEK, y col.⁵ han demostrado que la clorotetraciclina inhibe la acción de la lipasa y de la amilasa en presencia de calcio. Los mismos autores⁶ han investigado la influencia de varios metales y el pH sobre el efecto inhibidor de la clorotetraciclina en la hidrólisis del «tributirín» por la lipasa pancreática, y demuestran que un cierto número de metales divalentes llevan a una inhibición de la acción enzimática en presencia del antibiótico.

El plan general de este trabajo es estudiar, a través de la inhibición enzimática de la lipasa pancreática producida por la tetraciclina activa y uno de sus análogos inactivos en presencia de iones Mn^{2+} , CO^{2+} , y Ni^{2+} , la posible formación del sistema ternario enzima-metal-antibiótico, tanto para la tetraciclina activa como para su análogo biológicamente inactivo, 4-epi-tetraciclina.

PARTE EXPERIMENTAL

Reactivos.—Todos los productos químicos utilizados fueron de grado analítico.

a) *Sales inorgánicas.*—Los cloruros de manganeso, níquel y cobalto, empleados, han sido de la firma «Merck» AG. DARMSTADT.

b) *Hidróxido sódico 0'1M «standard».*—Se preparó por dilución de una disolución saturada de hidróxido sódico decantada y clara. La valoración se realizó frente a ftalato ácido de potasio.

c) *Lipasa pancreática.*—El producto utilizado fue suministrado por la casa «Fluka» AG. CH. F. BUCHS, SG.

d) *«Tributirín» (Triburato de glicerilo).*—El producto utilizado fue suministrado por la firma «Fluka». Se eliminó el ácido butírico libre mediante neutralización con hidróxido sódico y extracción con agua.

e) *Tetraciclina.*—La tetraciclina empleada por nosotros ha sido el producto clorhidrato de tetraciclina, libre de metales y de estabilizantes; suministrado por Antibióticos, S. A.

f) *4-epi-tetraciclina (sal amónica).*—Ha sido preparada por nosotros siguiendo la técnica de McCORNICK y col.⁷ El producto obtenido ha sido identificado por cromatografía de papel, resultando ser de elevada pureza, tanto por método espectrofotométrico como microbiológico.

Medida de la actividad enzimática.—La actividad enzimática fue seguida mediante valoración potenciométrica. El pH se mantiene constante entre un límite de $\pm 0,05$. Para la medida del pH se utilizó el pH-metro «Radiometer» 3, equipado con electrodos G K 102 A.

Control de la temperatura.—En todas las experiencias la temperatura se mantiene constante a $27^{\circ}\text{C} \pm 0,1$ mediante un termostato de la firma «Herman Weber», equipado con un termorregulador provisto de un agitador.

Microbureta.—Microbureta «Afora» con certificado de garantía número 106.245, de 10 c.c., graduada en centésimas, con error máximo de 0,01 c.c. y contrastada por pesada en este laboratorio a 20°C .

Método analítico.—167 mg. del enzima se suspenden en 100 ml. de una mezcla de glicerina-agua al 80% v/v, manteniéndose en agitación a temperatura ambiente durante 1 hora. La suspensión se filtra, quedando en disposición de ser utilizada.

La disolución enzimática se mantiene estable durante una semana a la temperatura de 5°C . La actividad decrece aproximadamente un 10% durante este tiempo.

En cada experiencia se ponen 2 ml. de «tributirín» y las cantidades correspondientes de metal y antibiótico, llevándose siempre el volumen final a 60 ml. A cada una de las soluciones así preparadas se les ajusta al pH apropiado y seguidamente se comienza a contar el tiempo, añadiendo las cantidades suficientes de hidróxido sódico standard para mantener el pH constante. Cada 2 minutos se hacen lecturas de las cantidades de hidróxido sódico añadidas.

La actividad enzimática se calcula mediante la pendiente de las curvas obtenidas al representar gráficamente ml de hidróxido sódico frente al tiempo en minutos.

RESULTADOS:

Debido a la variación de la actividad enzimática con el pH, las experiencias han sido realizadas a dos pH distintos. Por encima de pH 7,0, en las concentraciones de nuestro trabajo, tanto la tetraciclina como su epímero precipitan, habiéndose elegido como pH de trabajo 6,1 y 7,0, ambos dentro del intervalo del pH fisiológico.

Para cada antibiótico y su pH correspondiente se realizan primeramente tres experiencias: a) actividad del enzima solo; b) actividad del enzima en presencia de la máxima concentración de antibiótico empleada; c) actividad enzimática en presencia de dos milímoles del metal correspondiente. A continuación, manteniendo fija la cantidad de metal, se realizan las distintas experiencias a concentraciones variables de tetraciclina y 4-epi-tetraciclina.

Resultados a pH 6,1.—La gráfica I representa el conjunto de curvas obtenidas para una experiencia dada. La curva (I) representa la actividad enzimática de la lipasa pancreática en presencia del sustrato en las condiciones de la experiencia. La curva (II) representa la actividad del enzima en presencia de dos milímoles de manganeso. La curva (III) expresa la actividad enzimática cuando la mezcla de reacción contiene 167 ug/ml. de tetraciclina, y la curva (IV) la actividad enzimática cuando la mezcla de reacción contiene dos milímoles de manganeso + 167 ug/ml. de tetraciclina.

Para concentración de tetraciclina y 4-epi-tetraciclina manteniendo constantemente la concentración de metal correspondiente se obtiene un conjunto de representaciones análogas. A la actividad de la lipasa pancreática en presencia de dos milímoles de metal, se le asignó arbitrariamente el valor de 100. Las actividades de enzima en presencia de cantidades variables de tetraciclina y 4-epi-tetraciclina se refieren siempre a dicho valor. La Tabla I recoge los resultados hallados para las actividades enzimáticas en presencia de dos milímoles del metal divalente correspondiente y cantidades variables de tetraciclina y 4-epi-tetraciclina en la mezcla de reacción.

Resultados a pH 7,0.—Tanto la tetraciclina como la 4-epi-tetraciclina, en ausencia de metales, no producen prácticamente inhibición alguna. El conjunto de curvas para cada experiencia a este pH es análogo al correspondiente en la gráfica I.

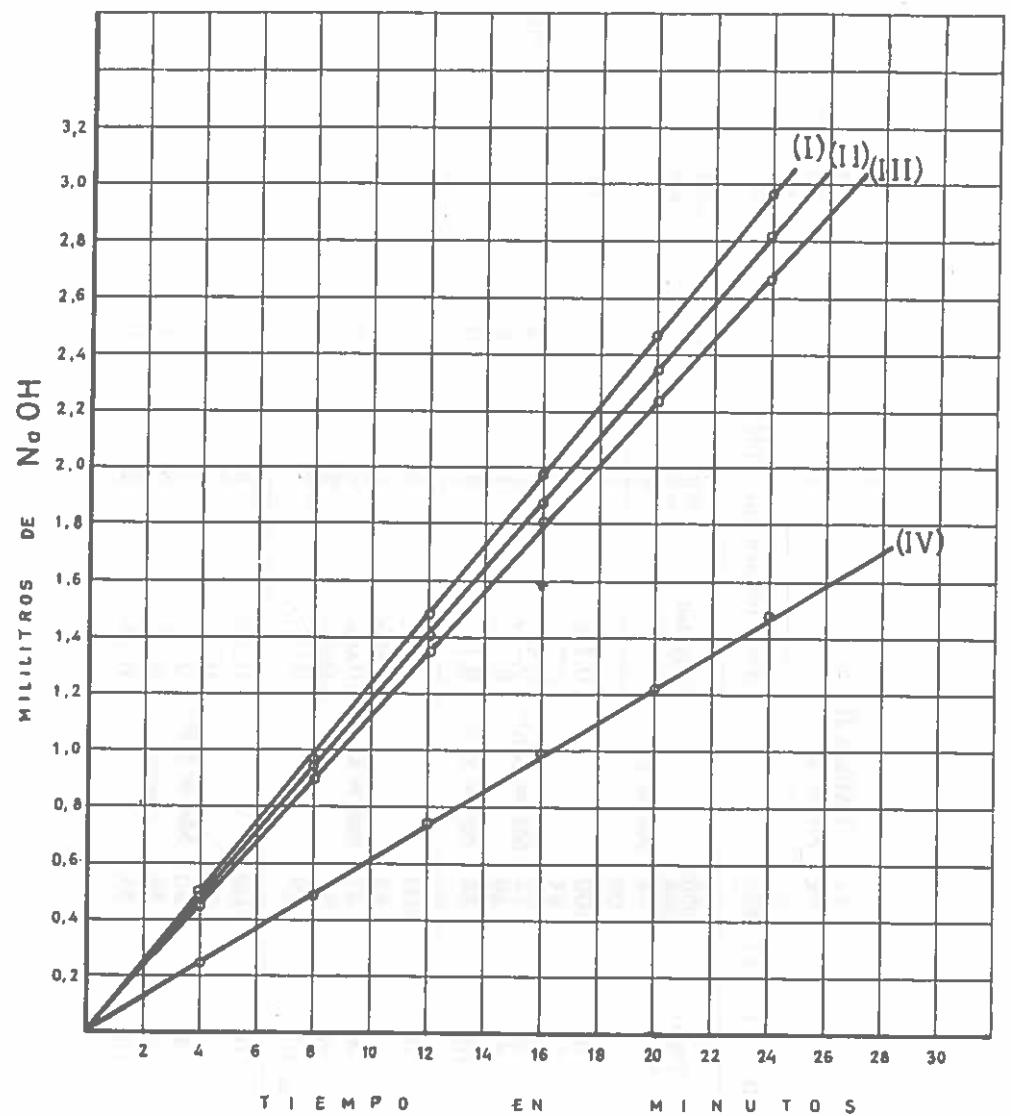
La Tabla II recoge los resultados hallados en las experiencias realizadas a pH 7,0.

TABLA I

Tetraciclina			pH = 6,1 t = 27 °C.			4-epi-tetraciclina			pH = 6,1 t = 27 °C.		
Velocidad ml/min.	Mili-moles Me	Tetra-ciclina mg	Inhibi-ción: %			Velocidad ml/min.	Mili-moles Me	4-epi-tetrac.	mg.	Inhibi-ción: %	
0,22 ₀	2	0	100			0,20 ₂	2	0	100		
0,20 ₂	2	2	95	Me = Mn ²⁺		0,19 ₅	2	2	96		
0,18 ₀	2	4	82	Me = Mn ²⁺		0,17 ₀	2	4	87	Me = Mn ²⁺	
0,15 ₄	2	6	70	Me = Mn ²⁺		0,16 ₂	2	6	77	Me = Mn ²⁺	
0,12 ₄	2	10	54	Me = Mn ²⁺		0,14 ₇	2	1,0	70	Me = Mn ²⁺	
0,09 ₆	2	0	100			0,11 ₀	2	0	100		
0,09 ₆	2	2	100	Me = Co ²⁺		0,11 ₀	2	2	100		
0,08 ₂	2	4	87	Me = Co ²⁺		0,10 ₇	2	4	96	Me = Co ²⁺	
0,06 ₅	2	8	69	Me = Co ²⁺		0,09 ₇	2	6	88	Me = Co ²⁺	
0,06 ₀	2	10	63	Me = Co ²⁺		0,09 ₁	2	1,0	82	Me = Co ²⁺	
0,28 ₄	2	0	100			0,27 ₃	2	0	100		
0,26 ₃	2	2	91	Me = Ni ²⁺		0,26 ₆	2	2	96		
0,20 ₃	2	4	68	Me = Ni ²⁺		0,25 ₃	2	4	92	Me = Ni ²⁺	
0,14 ₆	2	6	47	Me = Ni ²⁺		0,23 ₀	2	6	85	Me = Ni ²⁺	
0,11 ₂	22	10	40	Me = Ni ²⁺		0,22 ₁	2	1,0	77	Me = Ni ²⁺	

TABLA II

Tetraciclina			pH = 7,0 t = 27 °C.			4-epi-tetraciclina			pH = 7,0 t = 27 °C.		
Velocidad ml/min.	Mili-moles Me	Tetra-ciclina	Inhibi-ción: %			Velocidad ml/min.	Mili-moles Me	4-epi-tetrac.	mg.	Inhibi-ción: %	
0,25 ₆	2	0	100			0,26 ₀	2	0	100		
0,24 ₃	2	2	95	Me = Mn ²⁺		0,25 ₁	2	2	97	Me = Mn ²⁺	
0,18 ₀	2	4	72	Me = Mn ²⁺		0,20 ₀	2	4	73	Me = Mn ²⁺	
0,21 ₂	2	6	49	Me = Mn ²⁺		0,17 ₆	2	6	66	Me = Mn ²⁺	
0,09 ₅	2	10	38	Me = Mn ²⁺		0,15 ₂	2	1,0	59	Me = Mn ²⁺	
0,09 ₀	2	0	100			0,09 ₂	2	0	100		
0,07 ₅	2	2	83	Me = Co ²⁺		0,08 ₅	2	2	92	Me = Co ²⁺	
0,04 ₂	2	4	47	Me = Co ²⁺		0,06 ₆	2	4	72	Me = Co ²⁺	
0,03 ₂	2	6	34	Me = Co ²⁺		0,05 ₈	2	6	63	Me = Co ²⁺	
0,02 ₆	2	10	29	Me = Co ²⁺		0,05 ₁	2	1,0	55	Me = Co ²⁺	
0,25 ₀	2	0	100			0,24 ₀	2	0	100		
0,20 ₈	2	2	83	Me = Ni ²⁺		0,21 ₃	2	2	89	Me = Ni ²⁺	
0,12 ₅	2	4	50	Me = Ni ²⁺		0,17 ₅	2	4	73	Me = Ni ²⁺	
0,09 ₇	2	6	39	Me = Ni ²⁺		0,14 ₉	2	6	62	Me = Ni ²⁺	
0,08 ₇	2	10	35	Me = Ni ²⁺		0,13 ₇	2	1,0	57	Me = Ni ²⁺	



Gráfica 1

DISCUSION:

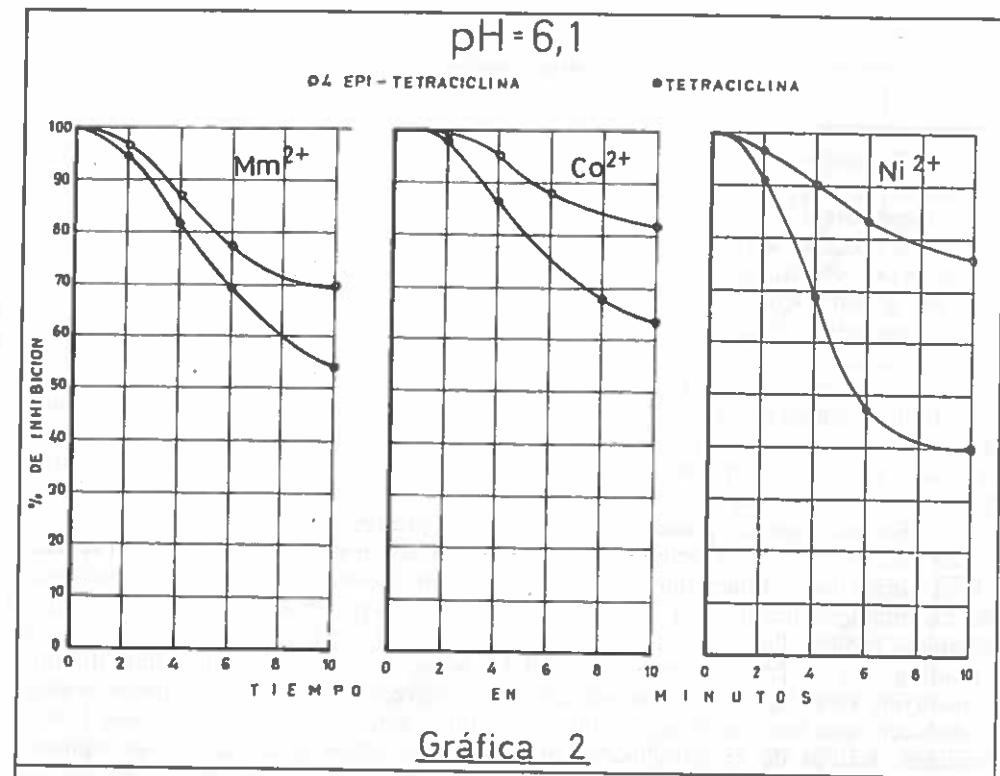
El estudio del efecto de la tetraciclina y 4-epi-tetraciclina sobre enzimas «in vitro», puede contribuir en cierto modo a dilucidar el mecanismo de acción de estos compuestos. El efecto bactericida y bacterostático de las tetraciclinas activas ha sido a menudo explicado por la acción quelante de estos antibióticos. DOLOUISIO y MARTIN² estudian la acción complejante de los compuestos activos e inactivos de la tetraciclina con algunos metales. Encuentran que las tetraciclinas con valor terapéutico tienen propiedades similares en su unión con el metal, formando todas ellas complejo de relación 2:1 con iones cúprico, níquel y cinc. No ocurre igual con sus análogos 4-epi-tetraciclinas, los cuales tienen solamente un 5 % de la actividad antibacteriana de sus compuestos de origen. Las propiedades de unión de estos compuestos con los metales difieren marcadamente de las tetraciclinas activas.³ Para los 4-epi-análogos encuentran que la relación antibiótico-metal es de 1:1 con los iones cúprico, níquel y cinc.

En un trabajo posterior⁴ los mismos autores investigan el «binding» de varios análogos de la tetraciclina a la conalbúmina a través de la formación de complejos ternarios y relacionan estas investigaciones con la actividad antibacteriana de los análogos inactivos. La incapacidad de las 4-epi-tetraciclinas para formar un complejo ternario la explican por la alteración del lugar donde se efectúa el referido «binding», es decir, la epimerización del carbono cuatro del grupo dimetil-amino. Concluyen esta hipótesis relacionando los resultados hallados en ambos trabajos y deducen que los complejos metal-tetraciclinas activas-proteína se forman con los análogos activos de la tetraciclina, indicando que la incapacidad de los epímeros inactivos para formar el complejo ternario era debida a la relación 1:1 de sus quelatos con el metal.

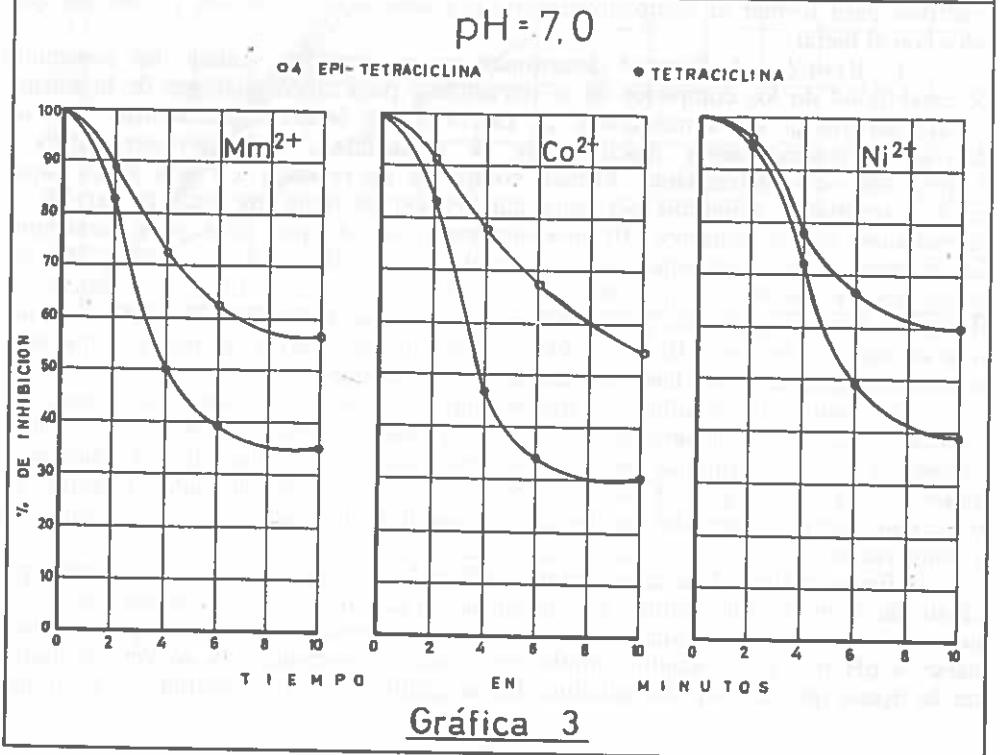
L. BENET y J. GOYAN⁵ determinan en un excelente trabajo las constantes de estabilidad de los complejos de la tetraciclina para cinco análogos de la misma. Contrariamente a las conclusiones de DOLOUISIO y MARTIN, encuentran que los derivados biológicamente inactivos de la tetraciclina, 4-epi-clorotetraciclina y 4-epi-anhidro-clorotetraciclina, forman complejos de relación 2:1 con iones cúprico. Los resultados expuestos por estos autores son de suma importancia para la interpretación de los nuestros. El procedimiento seguido por ellos para determinar las constantes de estabilidad de los complejos ha sido el de CALVIN y WILSON rederivado. El hecho de que DOLOUISIO y MARTIN hayan empleado el método de BJERRUM (AKOH) y de que este método sea sólo una aproximación, como demuestran en sus conclusiones BENET y GOYAN, nos ha inducido a reconsiderar nuestros resultados, tomando como base los hallados por estos autores.

Mediante los resultados experimentales hallados por nosotros, hemos encontrado que tanto la tetraciclina como su análogo inactivo (4-epi-tetraciclina) inhiben la acción enzimática de la lipasa pancreática en presencia de los iones manganeso, cobalto y níquel. Esta inhibición está sujeta a determinados factores, tales como concentración del antibiótico, concentración y naturaleza del metal, pH y temperatura.

En la gráfica 2 se representan a pH 6.1 y temperatura 27°C el tanto por ciento de la inhibición frente a la concentración del antibiótico en presencia de metal, en las condiciones indicadas en la Técnica Experimental. Como puede observarse, a pH 6.1, la tetraciclina inhibe en un mayor porcentaje la acción enzimática de la lipasa que la 4-epi-tetraciclina. En la gráfica 3 se representan los resultados



Gráfica 2



Gráfica 3

de las experiencias a pH 7,0. Se observa que existe a este pH una mayor inhibición que a pH 6,1, siendo especialmente significativa en el caso de ión Co^{2+} .

Debemos resaltar el hecho encontrado en nuestras experiencias, según las cuales, la 4-epi-tetraciclina inhibe en presencia de los iones divalentes la acción enzimática de la lipasa, lo que presupone una interacción del complejo inactivo metal-4-epi-tetraciclina-enzima. DOLOUSIO y MARTIN postulan que el complejo ternario sólo es posible con los análogos de la tetraciclina que forman quelatos con metales en la relación 2:1, adoptando este criterio para todos los análogos activos. A la vista de nuestros resultados podemos asegurar que existe para las dos tetraciclinas estudiadas una interacción metal-antibiótico-enzima. Esto ocurre a pH 6,1 y en mayor grado a pH 7,0, tanto en la tetraciclina activa como para su isomero activo 4-epi-tetraciclina. La inhibición aumenta, por tanto, con el aumento del pH, existiendo probablemente una relación logarítmica entre el pH y la concentración del análogo correspondiente.

Es generalmente aceptado que para la formación del complejo ternario los análogos de la tetraciclina deben de formar quelatos de relación 2:1 con el metal, explicándose a menudo las propiedades bacteriostáticas y bactericidas de los productos activos por la acción quelatante de estos antibióticos. En este sentido DOLOUSIO y MARTIN⁸ exponen los resultados encontrados para el cobre-tetraciclina-conalbúmina y concluyen que las 4-epi-tetraciclinas que forman solamente quelatos de relación 1:1 con iones cúpricos, no deberán formar este sistema ternario. Sorprendentemente nuestras experiencias demuestran que hay una marcada interacción entre el complejo metal-4-epi-tetraciclina-proteína y que si bien la interacción depende de algunos factores ya considerados, es indudable su existencia. El hecho de que BENET y GOYAN⁹ hayan encontrado que tanto la tetraciclina como sus análogos biológicamente inactivos formen complejos de relación 2:1 con cationes divalentes corrobora nuestras aseveraciones. Esto nos obliga a reconsiderar el «binding» de los análogos a la tetraciclina al «modelo receptor» proteína libre-ión metálico. Si este «binding» ocurre muy probablemente a través de la formación del complejo ternario, no hay duda que este complejo se forma en el caso del metal-4-epi-tetraciclina-lipasa en nuestras condiciones experimentales. Pese a que algunos trabajos¹⁰⁻¹¹ resaltan la importancia del complejo ternario en el mecanismo de acción de las tetraciclinas, nosotros participamos de la opinión de otros investigadores, quienes como HAHN¹² consideran esta hipótesis posible, pero ciertamente sólo como un modo de acción muy primario.

RESUMEN

La liberación del ácido butírico del tributirato de glicerilo por la acción de la lipasa pancreática ha sido utilizada como sistema enzimático en el estudio de la acción inhibidora de la tetraciclina y de la 4-epi-tetraciclina.

En las condiciones del trabajo los metales aislados Mn^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} o la tetraciclina y la 4-epi-tetraciclina solas no inhiben prácticamente el enzima. Tanto la tetraciclina como la 4-epi-tetraciclina, en presencia de metales (Mn^{2+} , Co^{2+} y Ni^{2+}) inhiben la acción de la lipasa pancreática. Esta inhibición depende del pH de la mezcla de la reacción, aumentando aquélla al elevarse ésta.

Los resultados encontrados por los autores son aplicados al estudio del mecanismo de acción de las tetraciclinas.

RESUME

La libération de l'acide butyrique du tributyrate de glycérol par l'action de la lipase pancréatique a été utilisée comme un système enzymatique dans l'étude de l'action inhibitrice de la tétracycline et de la 4-épi-tétracycline.

Dans les conditions de notre travail, ni les métaux Mn^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , ni la tétracycline, ni la 4-épi-tétracycline, n'inhibent pratiquement l'enzyme s'ils sont employés seuls. La tétracycline, ainsi que la 4-épi-tétracycline, inhibent l'action de la lipase pancréatique si elles sont employées en présence de métaux tels que Mn^{2+} , Co^{2+} et Ni^{+} . Cette inhibition dépend du pH du mélange de la réaction; elle augmente à mesure que cette réaction augmente.

Les résultats trouvés par les auteurs sont appliqués à l'étude du mécanisme d'action des tétracyclines.

SUMMARY

The liberation of butyric acid from glyceryl tributyrate through pancreatic lipase action has been utilized as an enzymatic system in the study of tetracycline and 4-epi-tetracycline inhibitory action.

Under our work conditions metals such as Mn^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , or tetracycline and 4-epi-tetracycline do not practically inhibit the enzyme if they are used alone. Tetracycline and also 4-epi-tetracycline inhibit the action of pancreatic lipase in presence of metals such as Mn^{2+} , Co^{2+} and Ni^{2+} . This inhibition depends on the pH of the mixture of the reaction; it increases as the reaction is higher.

The results found by the authors are applied to the study of the mechanism of action of tetracyclines.

BIBLIOGRAFIA

- 1) A. ALBERT, *Nature*, 172, 201 (1953).
- 2) J. T. DOLOUISIO y A. N. MARTIN, *J. Med. Chem.* 6, 16 (1963).
- 3) J. H. ZIMMERMAN y F. L. HUMOLLER, *Am. J. Physiol.* 175, 468 (1953).
- 4) F. L. HUMOLLER y J. H. ZIMMERMAN, *Am. J. Physiol.* 177, 279 (1954).
- 5) J. ROKOS, M. BURGER y P. PROCHAZKA, *Nature* 181, 1.201 (1958).
- 6) J. ROKOS, P. MALEK y col., *Antibiotics and Chemotherapy* 9, 600 (1959).
- 7) J. T. DOLOUISIO y A. N. MARTIN, *J. Med. Chem.* 6, 20 (1963).
- 8) L. Z. RENET y J. E. GOYAN, *J. Pharm. Sciens.*, 54, 983 (1965).
- 9) F. E. HUNTER y O. H. LOWRY, *Pharmacol. Revs.* 8, 89 (1956).
- 10) R. C. WARNER, *TRANS. N. Y. Acad. Sci.* 16, 182 (1954).
- 11) F. E. HAHN, «Proceeding of the Fourth International Congress of Biochemistry». Vienna 1958. Symposium V, Pergamon Press. New York N. Y. 1959, p. 104-120.