

# MECANISMO DE LA INHIBICION DE LA CITOCROMO OXIDASA POR LA AZIDA

por

ANDRES O. M. STOPPANI

Keilin (2) observó que las azidas alcalinas inhiben la respiración celular y la acción catalítica de la citocromo oxidasa. Aparentemente las azidas se combinan con el grupo activo de la oxidasa por un mecanismo similar al cianhídrico. Keilin y Hartree (3), Stannard (5), Armstrong y Fisher (1), Winzler (8) y Stannard y Horecker (6) han estudiado cuantitativamente la acción inhibidora de la azida, tratando de establecer el número de moléculas ( $n$ ) de azida que se combina con cada grupo activo de oxidasa y la constante de disociación del complejo ( $K_i$ ). Dichos estudios han sido realizados en su mayoría (1, 5, 8) con sistemas enzimáticos complicados, como músculo, levaduras, etc., habiéndose comprobado en algunos casos, que la acción inhibidora de la azida es diferente de la del cianhídrico. Como la inhibición de la respiración celular por la azida y el cianhídrico es debida principalmente a la inhibición de la citocromo oxidasa, se ha creído conveniente estudiar la acción de la azida sobre preparaciones purificadas de *oxidasa* para compararla con la acción inhibidora del cianhídrico, la cual se ha estudiado en un trabajo precedente.

## MÉTODOS Y MATERIAL

Las constantes  $n$  y  $K_i$  se calculan mediante la ecuación [1], cuya validez se ha considerado previamente (7). Los símbolos tienen el mismo significado que en el trabajo anterior.

$$[1] \quad \log \left( \frac{v}{v_i} - 1 \right) = n \log [In] + \log K_i$$

DISOCIACION DEL  $N_3H$  Y SUS SALES. — Las concentraciones de  $N_3H$  y  $N_3^-$  son función del pH y se calculan con las expresiones [2] y [3].

$$[2] \quad [N_3^-] = [N_3Na] \frac{\text{antilog (pH-pKa)}}{1 + \text{antilog (pH-pKa)}}$$

$$[3] \quad [N_3H] = [N_3Na] \frac{1}{1 + \text{antilog (pH-pKa)}}$$

La medida de la actividad de la citocromo oxidasa, el análisis estadístico de los resultados y la preparación de las respectivas enzimas, se ha realizado como en el trabajo precedente (7).

## R E S U L T A D O S

### a) INFLUENCIA DEL pH SOBRE LA ACCION INHIBIDORA DE LA AZIDA

La intensidad de la acción inhibidora de la azida aumenta ligeramente cuando el pH, medido con electrodo de vidrio pasa de 7,3 a 5,3. La concentración del ácido hidrazoico aumenta casi 100 veces al disminuir el pH, mientras que el ión hidrazoico disminuye sólo 1,1 veces.

Considerando que una variación en la concentración total

de la azida del orden de 100 determina un cambio importante en la intensidad del efecto inhibitor, se debe admitir que el ión hidrazoico es el inhibidor efectivo (TABLA I).

T A B L A I

ACCION INHIBIDORA DE LA AZIDA SOBRE LA CITOCROMO OXIDASA A DIFERENTE pH

$\mu\text{l O}_2$  consumidos, en 10 minutos (promedio) por una preparación de citocromo oxidasa de hígado (E) en presencia de  $0,5 \cdot 10^{-4}$  M citocromo c, 0,01 M *p*-fenilendiamina (F), amortiguador de fosfato M/20. T. 30°  $[\text{N}_3\text{Na}]$ :  $10^{-3}$  M. Para pH 5,3;  $[\text{N}_3^-]$ :  $0,89 \cdot 10^{-3}$  M;  $[\text{N}_3\text{H}]$ :  $1,06 \cdot 10^{-4}$  M. Para pH 7,3;  $[\text{N}_3^-]$ :  $0,99 \cdot 10^{-3}$  M;  $[\text{N}_3\text{H}]$ :  $1,18 \cdot 10^{-6}$  M;  $[\text{N}_3^-]$  y  $[\text{N}_3\text{H}]$ , se calculan según las ecuaciones [2] y [3].  $K_a$  (\*),  $\text{N}_3\text{H}$ :  $2,5 \cdot 10^{-5}$ .

	pH 5,3	pH 7,3
E + c + F	27,4	109
E + c + F + $\text{N}_3\text{Na}$	10,8	47
Inhibición	61 %	57 %

b) ACCION DE LAS CONCENTRACIONES CRECIENTES DE AZIDA

Cuando se estudia cuantitativamente la acción inhibitora de la azida sobre las preparaciones de hígado y corazón con *p*-fenilendiamina como reductor, se obtienen los resultados referidos en la TABLA II y GRAFICO I y II.

T A B L A I I

INHIBICION DE LA CITOCROMO OXIDASA POR EL ACIDO  
HIDRAZOICO

Reductor: *p*-fenilendiamina. Actividad de la enzima ( $v$  y  $v_i$ ) expresada por  $\mu l$   $O_2$  consumidos por la enzima en 10 minutos (promedio) en presencia de  $4,5 \cdot 10^{-4}$  M citocromo *c* y  $0,01$ M *p*-fenilendiamina; concentración de  $N_3Na$  según detalle T. 38°.

OXIDASA DE HIGADO			OXIDASA DE CORAZON		
$v$ .	$\log \left( \frac{v}{v_i} - 1 \right)$	$\log [N_3Na]$	$v_i$	$\log \left( \frac{v}{v_i} - 1 \right)$	$\log [N_3Na]$
$1,6 \pm 0,2$	$1,44 \pm 0,13$	-2,00	$6,4 \pm 0,5$	$1,05 \pm 0,09$	-2,00
$3,3 \pm 0,2$	$1,16 \pm 0,06$	-2,22	$8,4 \pm 0,5$	$0,92 \pm 0,07$	-2,22
$7,1 \pm 1,5$	$0,79 \pm 0,27$	-2,25	$13,3 \pm 0,9$	$0,69 \pm 0,08$	-2,34
$12,1 \pm 0,9$	$0,50 \pm 0,07$	-3,00	$13,9 \pm 0,9$	$0,67 \pm 0,06$	-2,52
$17,3 \pm 1,8$	$0,28 \pm 0,19$	-3,22	$25,0 \pm 1,0$	$0,33 \pm 0,09$	-3,00
$22,0 \pm 1,0$	$0,11 \pm 0,08$	-3,52	$33,0 \pm 2,0$	$0,14 \pm 0,01$	-3,22
$42,8 \pm 2,2$	$-0,72 \pm 0,05$	-4,22	$34,0 \pm 2,0$	$0,12 \pm 0,01$	-3,34
(v) $50,8 \pm 1,1$	— —	—	$42,7 \pm 5,0$	$-0,08 \pm 0,25$	-3,52
			$59,1 \pm 4,3$	$-0,48 \pm 0,30$	-4,00
			$66,3 \pm 1,5$	$-0,72 \pm 0,16$	-4,22
			(v) $79,0 \pm 1,2$	— —	—
$n = 0,93 \pm 0,03$ ; $\log K_i = -3,26 \pm 0,10$			$n = 0,76 \pm 0,01$ ; $\log K_i = -2,58 \pm 0,03$		

$n$  y  $\log K_i$  se calculan mediante la ecuación (1).

Con la preparación de hígado, puede concluirse que un equivalente de ión hidrazoico se combina con cada grupo activo de la oxidasa. Para la preparación de corazón (gráfico I), los resultados son ligeramente diferentes, pues los valores hallados para  $n$  y  $\log K_i$  son menores.

Cuando el reductor es la hidroquinona (TABLA III), tanto con la preparación de hígado como con la de corazón, se comprueban valores para  $n$  y  $\log K_i$  próximos a los hallados con la preparación de hígado con *p*-fenilendiamina como reductor. El diferente comportamiento de la preparación de corazón se explica por la acción catalítica, azida resistente, del citocromo *b* que sólo se pone de manifiesto cuando  $E'_c$  del reductor es menor de  $-0,04V$ , como ocurre con la *p*-fenilendiamina (7).

T A B L A I I I

INHIBICION DE LA CITOCROMO OXIDASA POR EL ACIDO  
HIDRAZOICO

Reductor: hidroquinona. Actividad de la enzima ( $v$  y  $v_i$ ) expresada por  $\mu l$   $O_2$  consumidos en 10 minutos (promedio) en presencia de  $4,5 \cdot 10^{-4}M$  citocromo *c* y  $0,01M$  hidroquinona. Concentración de  $N_3$  según detalle T.38°.

OXIDASA DE HIGADO			OXIDASA DE CORAZON		
$v_i$	$\log \left( \frac{v}{v_i} - 1 \right)$	$\log [N_3Na]$	$v_i$	$\log \left( \frac{v}{v_i} - 1 \right)$	$\log [N_3Na]$
Blanco $8,3 \pm 0,4$	— —	—	Blanco $7,2 \pm 1,2$	— —	—
$9,6 \pm 0,5$	$1,40 \pm 0,08$	$-2,22$	$9,6 \pm 0,6$	$1,07 \pm 0,61$	$-2,22$
$9,5 \pm 0,1$	$1,16 \pm 0,13$	$-2,52$	$9,7 \pm 0,7$	$1,05 \pm 0,60$	$-2,34$
$13,0 \pm 0,1$	$0,46 \pm 0,11$	$-3,00$	$10,6 \pm 0,2$	$0,90 \pm 0,41$	$-2,52$
$14,0 \pm 0,8$	$0,37 \pm 0,26$	$-3,22$	$17,6 \pm 1,3$	$0,30 \pm 0,29$	$-3,00$
$17,4 \pm 2,0$	$0,01 \pm 0,48$	$-3,52$	$17,8 \pm 1,3$	$0,27 \pm 0,26$	$-3,22$
$21,0 \pm 2,0$	$-0,36 \pm 0,59$	$-4,00$	$23,8 \pm 1,6$	$-0,07 \pm 0,24$	$-3,34$
$22,1 \pm 0,3$	$-0,49 \pm 1,15$	$-4,22$	$32,4 \pm 2,8$	$-0,68 \pm 0,76$	$-4,00$
( <i>v</i> ) $44,4 \pm 1,9$	— —	—	( <i>v</i> ) $37,6 \pm 1,4$	— —	—
$n = 1,02 \pm 0,03 \log K_i = -3,70 \pm 0,11$			$n = 1,02 \pm 0,04 \log K_i = -3,46 \pm 0,11$		

$n$  y  $\log K_i$  se calculan mediante la ecuación (1).

ACCION INHIBIDORA NO COMPETITIVA  
DE LA AZIDA

La azida, de la misma manera que el cianhídrico, inhibe la citocromo oxidasa en forma no competitiva. Lo demuestra el hecho de que el término entre corchetes de la ecuación [4] queda, en presencia de azida (TABLA IV) igual a la constante de Michaelis del complejo *oxidasa-citocromo c* (7).

$$[4] \quad \frac{1}{v} = \frac{1}{V} + \frac{1}{V} \left[ K_m + \frac{K_m [In]}{K_{In}} \right] \left[ \frac{1}{c} \right]$$

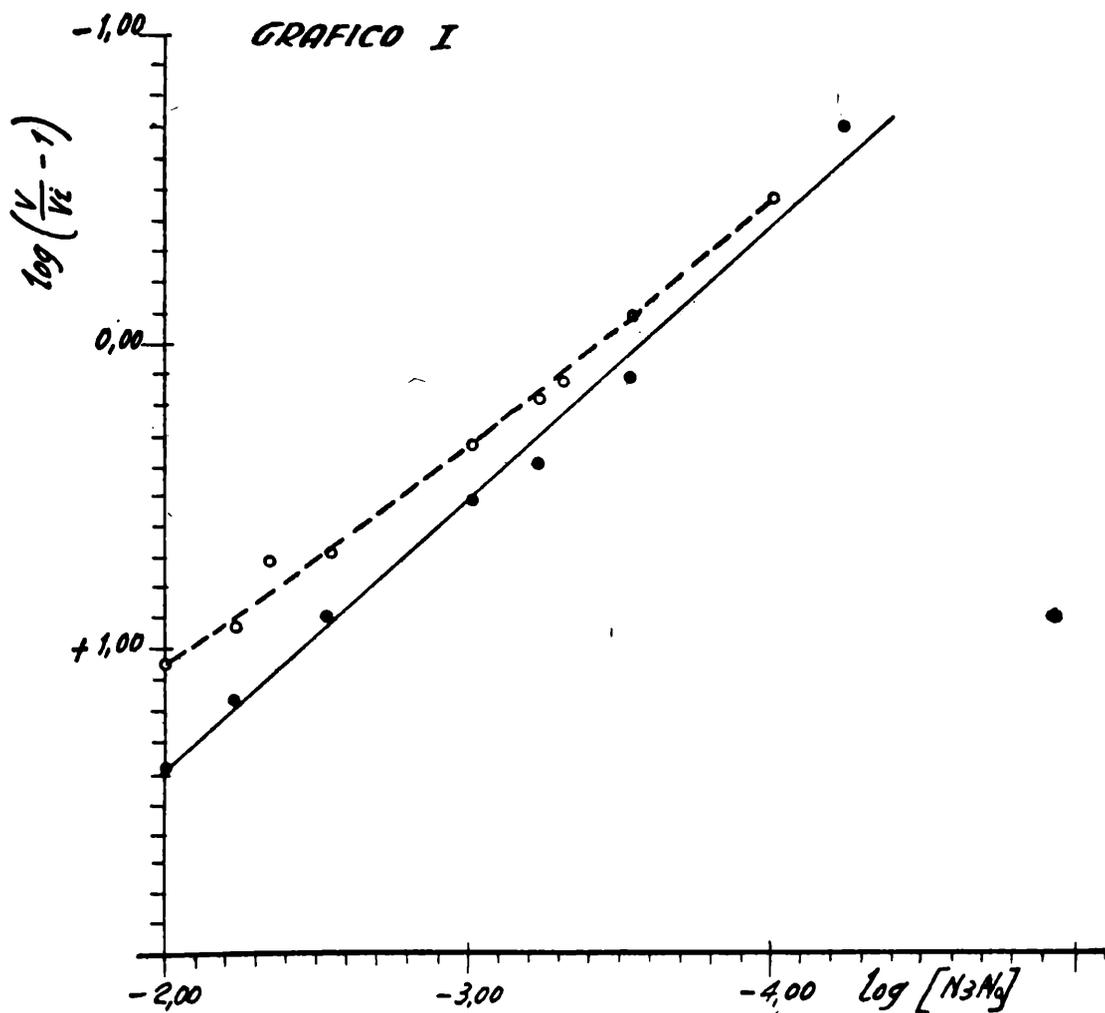


GRAFICO I

$v$ , actividad de la citocromo oxidasa de hígado (línea llena) y corazón (línea punteada), expresada en  $\mu\text{l O}_2$  consumidos en 10 minutos por la enzima en presencia de citocromo  $c$  y  $p$ -fenilendiamina.  $v_i$ , *idem*, con  $\text{N}_3\text{Na}$ , cuya concentración se indica en abscisas.

T A B L A I V

MEDIDA DE LA CONSTANTE DE MICHAELIS EN PRESENCIA  
DE  $N_2Na$

La actividad catalítica  $v$  representa el promedio de los  $\mu l$  de  $O_2$  consumidos en 10 minutos por la citocromo oxidasa (hígado) en presencia de 0,02M  $p$ -fenilendiamina y cantidades de citocromo  $c$  según se detalla.  $V$  (actividad catalítica máxima) = 22,5 para  $c = 5,5 \cdot 10^{-5}M$ . T. 38°.

$[c]$ $\times 10^5$	$v$	$\left[ \frac{1}{v} - \frac{1}{V} \right] [c] V$ $\times 10^6$
0,09	5,6	2,7
0,18	7,3	3,3
0,28	8,3	4,9
0,37	8,1	6,5
0,55	10,5	6,7
0,65	11,4	6,3
0,74	11,6	6,9
0,83	12,3	6,7
0,92	12,2	7,5
1,39	17,4	4,0

$$K_m = 5,5 \pm 0,38 \cdot 10^{-6}$$

D I S C U S I O N

La precisión de los resultados es análoga a la alcanzada en el trabajo precedente (7). Con la preparación de hígado y  $p$ -fenilendiamina como reductor, el error medio probable de  $n$  es  $\pm 0,03$ ; errores del mismo orden se obtienen con las preparaciones de corazón e hígado cuando el reductor es la hidroquinona. Diferencias de  $n$  menores de 0,1 no son entonces significativas. Para  $\log K_i$  los errores medios probables son  $\pm 0,10$  (hígado y  $p$ -fenilendiamina);  $\pm 0,01$  (hígado e hidroquinona);

$\pm 0,11$  (corazón e hidroquinona). Diferencias del orden de 0,4 no son significativas, siendo el valor más probable de  $\log K_i$  alrededor de  $-3,40$ .

La azida, a diferencia del cianhídrico parece combinarse con el grupo activo de la citocromo oxidasa en forma de ión hidrazoico. Nuestros resultados concuerdan con los de Keilin (2), que no comprobó variación en la intensidad de la acción inhibitoria de la azida, cuando el pH pasa de 7,2 a 6,2. Si en leva-

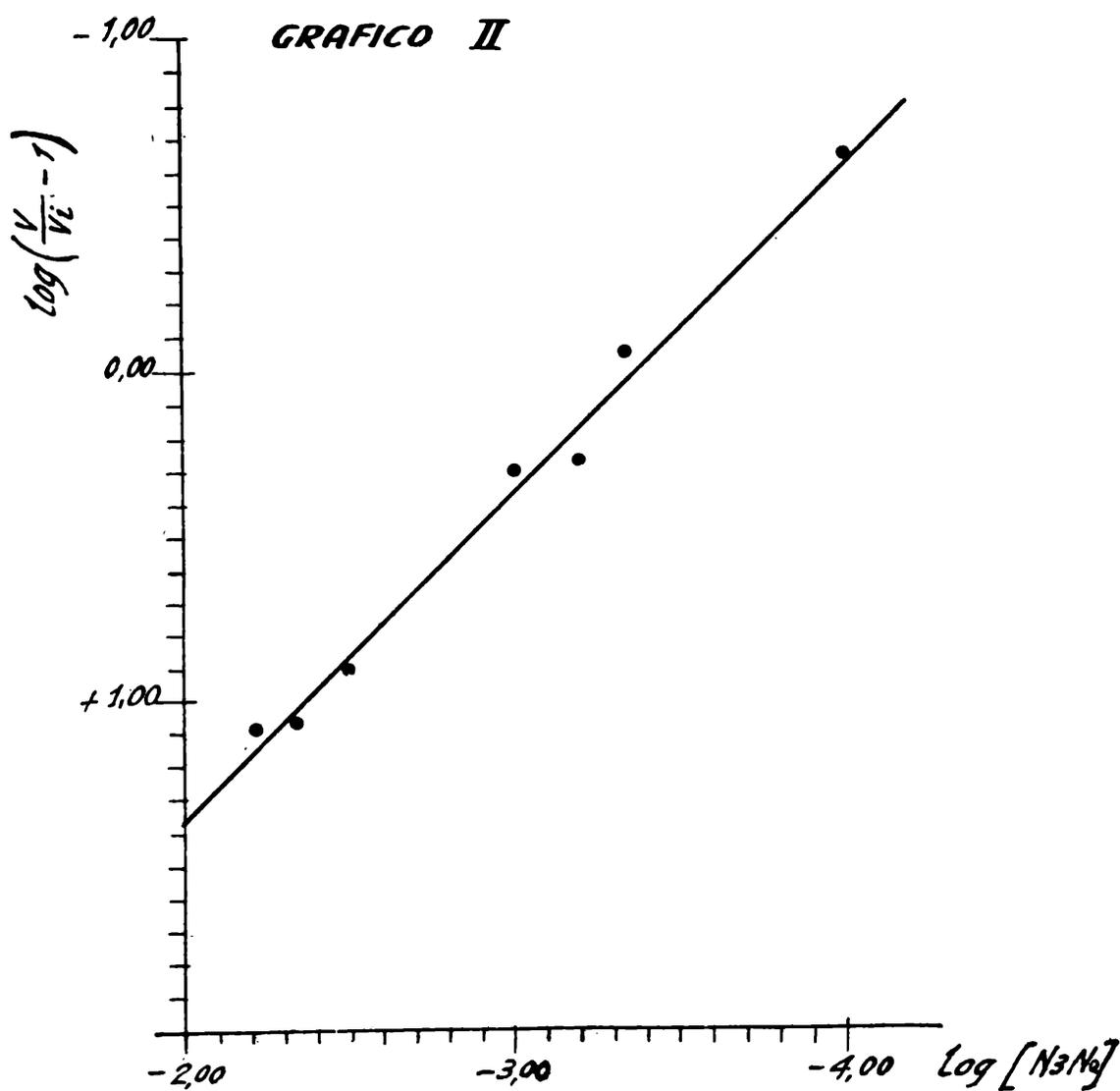


GRAFICO II

$v$ , actividad de la citocromo oxidasa de corazón expresada en  $\mu l$   $O_2$  consumidos en 10 minutos por la enzima en presencia de citocromo  $c$  e hidroquinona.  $v_i$ , *idem*, con  $N_3Na$  cuya concentración se indica en abscisas.

duras, u otras células o tejidos (<sup>1, 2, 6, 8</sup>), se comprueba una variación en la intensidad de la acción de la azida cuando varía el pH, se debe probablemente, a que la superficie exterior de la célula es atravesada más fácilmente por el ácido que por el ión.

El mecanismo de la inhibición de la citocromo oxidasa por el ácido hidrazoico excepto por la función del ión, es similar al del cianhídrico pues se combina un equivalente de inhibidor por grupo activo de enzima. La constante de disociación del complejo es menor para el cianhídrico, lo que puede explicar la menor estabilidad del complejo citocromo oxidasa-azida, en presencia de óxido de carbono, respecto al complejo oxidasa cianhídrico.

#### R E S U M E N

I. — Se ha estudiado el mecanismo de la inhibición de la citocromo oxidasa por la azida.

II. — El ácido hidrazoico inhibe en forma no competitiva, la citocromo oxidasa.

III. — Un equivalente de ácido hidrazoico se combina con un grupo activo de la oxidasa para inhibir la acción catalítica de la misma. El logaritmo de la constante de disociación del complejo es de  $-3,4 \pm 0,11$  y la constante de disociación  $4,0 \pm 0,37 \text{ mol/l } 10^{-4}$ .

#### S U M M A R Y

The cytochrome oxidase inhibition by azides follows a mechanism closely related to that described in a previous paper for cyanides. One molecule hidrazoic acid combines with one enzyme active group, the complex dissociation constant at  $38^{\circ}$  being  $4,0 \pm 0,37 \cdot 10^{-4} \text{ Mol/l}$ . The hidrazoic ion, seems to be the main responsible agent of the inhibition, contrarily to the cyanides which inhibit cytochrome oxidase by the non dissociated acid.

#### R E S U M E

I. — On a étudié le mécanisme de l'inhibition de la cytochrome oxydase par l'azyde.

II. — L'ion hydrazoïque combine avec la cytochrome oxydase.

III. — Un équivalent de l'ion hydrazoïque combine avec le groupe actif de l'oxydase pour inhibir son action catalytique. La logarithme de la constante de la dissociation du complex est de  $-3,4 \pm 0,11$  et la constante de dissociation  $4,0 \pm 0,37 \cdot 10^{-4}$ .

#### B I B L I O G R A F I A

- (1) *Armstrong, C. W. S., Fisher, K. C.* — J. Cellular and Comp. Physiol. 16, 103 (1940).
- (2) *Keilin, D.* — Proc. Roy. Soc., London, B121, 165 (1936).
- (3) *Keilin, D., Hartree, E. F.* — Proc. Roy Soc., London, B 127, 167 (1939).
- (4) *Quintín, M.* — C. R. Acad. Sciences, 210, 625 (1940).
- (5) *Stannard, J. N.* — Am. J. Physiol., 126, 196 (1939).
- (6) *Stannard, J. N., Horecker, B. L.* — J. Biol. Chem., 172, 599 (1948).
- (7) *Stoppani, A. O. M.* — Anales Asoc. Quím. Argentina (en prensa).
- (8) *Winzler, R. J.* — J. Cellular and Comp. Physiol. 21, 229 (1943).