

98
24



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**ESTUDIO DE LOS EFECTOS METABÓLICOS
EFECTUADOS POR DERIVADOS DEL
GLUTATION EN CELULAS MAMÍFERAS**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

P R E S E N T A

GUSTAVO PACHECO RODRIGUEZ

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

MEXICO, D. F.

1991



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

CONTENIDO

| | Pag. |
|---|------|
| ABREVIATURAS | 1 |
| 1) RESUMEN | 3 |
| 2) GENERALIDADES | 5 |
| 2.1 El sistema de Glioxilasas-Definición | |
| 2.2 Reacciones del sistema de glioxilasas. | |
| 2.3 Historia | |
| 2.4 Generalidades del sistema de glioxilasas e importancia. | |
| 2.5 Metilglioxal. | |
| 2.6 Glutación. | |
| 2.7 Hemimercaptal. | |
| 2.8 Glioxilasa I | |
| 2.9 Glioxilasa II. | |
| 2.9.1 Sitio activo de Glo II. | |
| 2.10 S-D-lactoilglutación. | |
| 2.10.1 Propiedades conferidas a SLG. | |
| 2.11 Acido D-láctico. | |
| 2.12 Inhibidores de glioxilasa II. | |
| 3) HIPOTESIS | 16 |
| 4) OBJETIVOS | 16 |
| 4.1 Objetivo general | |
| 4.2 Objetivos particulares | |

| | | |
|----|--|----|
| 5) | MATERIALES | 17 |
| | 5.1 Material biológico | |
| | 5.2 Materiales químicos | |
| | 5.3 Equipo | |
| 6) | MÉTODOS | 19 |
| | 6.1 Preparación y purificación de GMEE | |
| | 6.1.1 Síntesis | |
| | 6.1.2 Preparación y deshidratación de la resina Dowex-1-X8. | |
| | 6.2 Síntesis y purificación de S-PNCBGMEE | |
| | 6.2.1 Síntesis | |
| | 6.2.2 Purificación | |
| | 6.3 Síntesis y purificación de S-FMOCGMEE | |
| | 6.3.1 Síntesis | |
| | 6.3.2 Purificación | |
| | 6.4 Extracción y purificación de Glo II | |
| | 6.4.1 Obtención del extracto de Glo II. | |
| | 6.4.2 Purificación de Glo II. | |
| | 6.5 Medición de la actividad de Glo II. | |
| | 6.6 Cálculo de las constantes de inhibición. | |
| | 6.7 Cultivos celulares. | |
| 7) | RESULTADOS | 34 |
| | 7.1 Síntesis de GMEE | |
| | 7.2 Síntesis de los pro-inhibidores | |
| | 7.3 Obtención y purificación de Glo II. | |

7.4 Cultivos celulares

| | | |
|------------|---------------------|-----------|
| 8) | DISCUSION | 40 |
| 9) | CONCLUSIONES | 46 |
| 10) | BIBLIOGRAFIA | 47 |

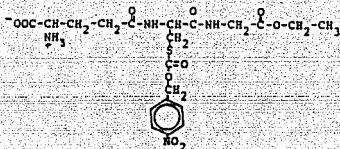
ABREVIATURAS

| | |
|---------------------------|--------------------------------------|
| D-l | ácido D-láctico |
| Arg | arginina |
| Asp | ácido aspártico |
| DTNB | ácido 2-nitrobenzoico 5,5'-ditiobis |
| DME | medio modificado de Dulbecco-Eagle |
| EtOH | Etanol |
| FMOCCl | Cloruro de 9-fluorenilmetoxicarbonil |
| γ-GT | γ-glutamiltanspeptidasa |
| Glo I | glioxilasa I |
| Glo II | glioxilasa II |
| GSH | glutación |
| GMEE | glutación monoetil éster |
| His | histidina |
| Lis | lisina |
| MG | metilglioxal |
| MeCOCHO | Metilglioxaal |
| MeCH(OH)CO-SG | S-D-lactoilglutación |
| MeCH(OH)CO ₂ H | ácido D-lactico |
| HPLC | cromatografía líquida a alta presión |
| p-NCBCl | cloruro de paranitrocarbобензоxilo |
| pMSF | fluoruro de metilfenil sulfonilo |
| SLG | S-D-lactoilglutación |
| S-pNCBG | S-paranitrocarbобензоxil glutación |

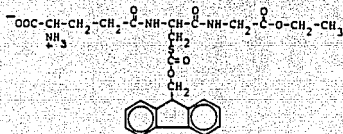
| | |
|------------|--|
| S-FMOCGMEE | S-(9-fluorenilmetoxicarbonil)glutación monoetil ester |
| S-pNCBGMEE | S-(4-nitrocarbобензоxil)glutacion monoetil ester |
| CCF (TLC) | cromatografía en capa fina |
| UV | luz ultravioleta |

RESUMEN

En el presente estudio se realizó la síntesis de S-(4-nitrocarboboxyzil)glutación monoetil éster (S-pNCBGME) y S-(9-fluorenilmetoxicarbonil)glutación monoetil éster (S-FMOCGME).



S-pNCBGME



S-FMOCGME

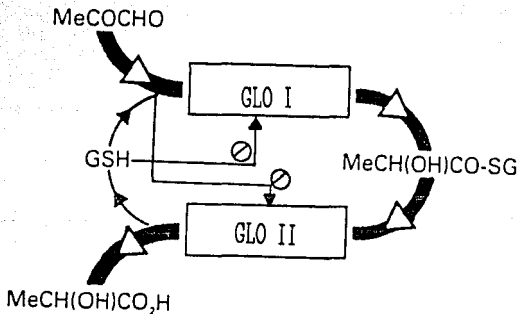
Se prosiguió con el estudio de sus efectos en cultivos celulares en la línea celular de leucemia monocítica U-937.

La esterificación del residuo de glicina en el tripéptido γ -glutamilcisteinilglicina (glutación, GSH) fue efectuado siguiendo el procedimiento de esterificación

2. GENERALIDADES

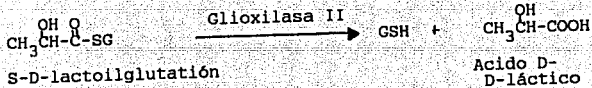
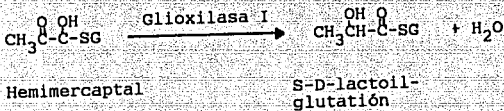
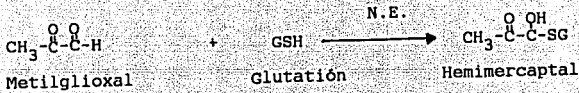
2.1 EL Sistema de Glioxilasas-Definicion.

S-D-lactoilglutación (SLG) es el intermediario en la conversión de metilglioxal en ácido D-láctico usando como cofactor el glutatión (GSH) (1). El proceso es mediado por las enzimas glioxilasa I (Glo I, E.C. 4.4.1.5..lactoilglutación liasa) y glioxilasa II (Glo II, E.C. 3.1.2.6 hidroxil-acilglutación hidrolasa), las cuales catalizan el proceso mostrado en el esquema 1 (2,3). A este conjunto de reacciones se les conoce como Sistema de Glioxilasas.



ESQUEMA 1

2.2 Reacciones del sistema de glioxilasas.



N.E. = Reacci3n no enzim3tica.

2.3 Historia.

Dadkin y Dudley en 1913 descubrieron el sistema de glioxilasas al estudiar el metabolismo de fenilglioxal el cual es convertido a ácido mandélico (22,23). Al mismo tiempo encontraron que el metilglioxal era convertido en ácido láctico. A la enzima responsable la denominaron glioxilasa (no se conocían las dos enzimas responsables) (23). Años más tarde, en 1951 Racker, basado en experimentos previos realizados por otros investigadores, llegó a la conclusión de que metilglioxal es convertido en ácido láctico por un mecanismo de dos etapas (1).

Racker asimismo llamó glioxilasa I y glioxilasa II a las enzimas responsables. Subsecuentemente se conoció que el sustrato de glioxilasa I es formado no enzimáticamente (4).

El establecimiento del conocimiento del sistema de glioxilasas se desarrolló en la primera mitad de este siglo. Durante ese tiempo recibió el interés de los más prominentes bioquímicos de la época. Esto fue debido a su posible intervención en glicólisis (4,5). Sin embargo, pese a que su estudio continúa, sus funciones permanecen siendo un enigma (4,5).

2.4 Generalidades del sistema de glioxilasas e importancia.

El sistema de glioxilasas está presente en el citosol y la mitocondria de una amplia variedad de organismos procariotes y eucariotes; de esto se deriva que es un sistema ubicuo (2,21). Además, en tejidos cancerosos, su actividad es de gran importancia (21,52).

De las dos enzimas participantes, glioxilasa II es la responsable de la eficiencia del sistema (3). El sistema exhibe inhibición propia por el glutatión y el hemimercaptal sobre Glo I y Glo II, respectivamente.

Anteriormente se citó que las funciones del sistema no son conocidas con certeza, pero las siguientes actividades le son atribuidas:

- a) Como marcador durante la embriogénesis; éste es uno de los primeros fenotipos expresados (2).
- b) Importancia durante el desarrollo de la vida, a nivel de crecimiento y maduración celular (4,24).
- c) Como activador en los procesos cancerosos (5).
- d) La proliferación celular, el crecimiento celular y el movimiento y movilización vesicular de neutrófilos parecen ser afectados por este sistema (8,4,24).
- e) El metilglioxal y algunos inhibidores de las enzimas participantes podrían ser considerados como posibles agentes antitumorales (25).
- f) Participación en la agregación de los microtúbulos y consecuente formación del citoesqueleto (10).

- g) En complicaciones diabéticas (11,12).
- h) Detoxificación de α -oxaldehídos (5,6).

2.5 Metilglioaxal.

Metilglioaxal (MG) es formado a partir de diferentes fuentes: acetona (26,27), aminoacetona (28-31), fosfato 3-gliceraldehído (32), y fosfato de dihidroacetona (33, 34).

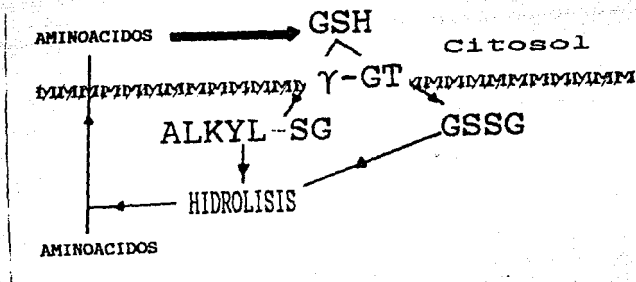
Por otro lado, el metabolismo de metilglioaxal en mamíferos es efectuado por tres diferentes vías: vía el sistema de glioaxilasas, la enzima lactaldehído: NAD oxidorreductasa, y dos enzimas α -cetoaldehído deshidrogenasas; de éstas, una es NAD^+ dependiente y la otra NADP^+ dependiente (35).

Dentro de las funciones propuestas para metilglioaxal, destacan la de ser un agente antitumoral, lo cual se basa en el argumento de Szent-György (5).

2.6 Glutación (GSH).

El glutatión es el cofactor del sistema de glioaxilasas. Este participa en importantes funciones tales como metabolismo, transporte y protección celular (36, 37).

El GSH extracelular es producto de la excreción del glutatión intracelular; ésto es debido a que la γ -glutamyltranspeptidasa lo hidroliza y los productos son conjugados extracelularmente, generando así glutatión y derivados de este mismo (esquema 2) (37). El GSH presenta efecto inhibitorio sobre la glioxilasa I (3). Cabe mencionar que la enzima γ -glutamyltranspeptidasa esta embebida en la membrana citoplasmática.



M= Membrana citoplasmática

ESQUEMA 2

2.7 Hemimercaptal.

El hemimercaptal es producido por la reacción no enzimática entre glutatión y metilglioxal (4). El hemimercaptal causa inhibición de la glioxilasa II al mismo tiempo que constituye el sustrato de glioxilasa I (3).

2.8 Glioxilasa I (Glo I).

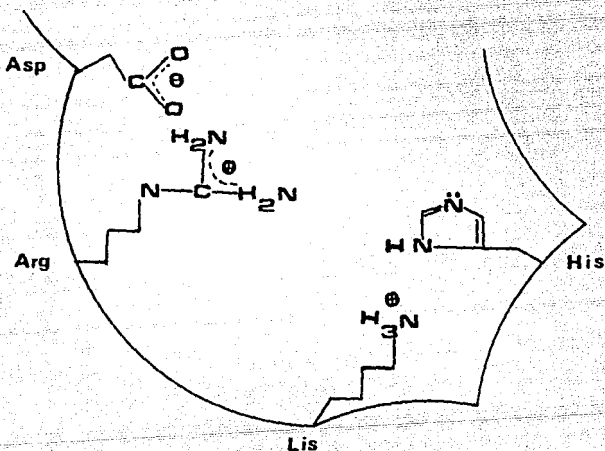
La enzima Glo I, obtenida de células de mamíferos, ha sido purificada y caracterizada. Es un dímero de dos subunidades idénticas con una masa molecular de 43-46 KDa (39). Cada una de las subunidades contiene el ion Zn^{2+} , el cual permanece inactivo (2). Diferentes inhibidores para Glo I se han producido y a éstos se les ha considerado como agentes antitumorales (40).

2.9 Glioxilasa II (Glo II).

La enzima glioxilasa II purificada ha sido extraída de diversas fuentes: citosol y mitocondria del tejido hepático de ratas, eritrocitos y cerebro de rata, entre otras (3,4,41-43). La Glo II está presente en forma monomérica y oligomérica en el tejido hepático de la rata (44) y es responsable de la etapa limitante del sistema (6,2).

2.9.1 Sitio activo de Glo II.

El sitio activo de la enzima Glo II está integrado por los aminoácidos: ácido aspártico (Asp), arginina (Arg), lisina (Lis) e histidina (His) (45,2). El aminoácido histidina es el responsable del efecto catalítico; este es producido por el mecanismo de imidazoles (46,2). El esquema 3 muestra el sitio activo de la enzima.



ESQUEMA 3

2.10 S-D-lactoilglutación (SIG).

S-D-lactoilglutación es el sustrato de Glo II e intermedio del sistema en general (1). Su importancia radica en su naturaleza: es un tioéster de relativamente alta energía y además, es el sustrato de la enzima que conduce la etapa limitante en el sistema (47).

2.10.1 Propiedades reconocidas en SIG.

- a) Potenciar la liberación de histamina (13).
- b) Promover el ensamble de microtúbulos (13).
- c) Intervenir en complicaciones diabéticas (11,12).
- d) Influir en el movimiento de neutrófilos y estimular la degranulación (49).

2.11 Acido D-láctico.

El ácido D-láctico es el producto neto del sistema de glioxilasas. Este es metabolizado escasa o nulamente por células eucarióticas. El ácido L-láctico es el isómero más abundante en humanos y su producción deriva de la glicólisis; sin embargo, el D-lactato es presumiblemente un intermediario en la glicólisis cuando la vía normal es inhibida (4).

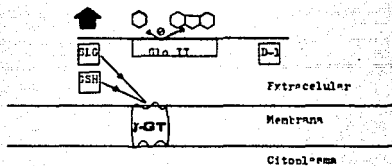
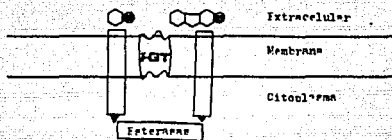
2.12 Inhibidores de glioxilasa II.

Estudios recientes muestran que los monoésteres del glutatión tienen la propiedad de ingresar en el citosol sin ser degradados por la enzima γ -glutamyltranspeptidasa (37). Esta capacidad puede ser atribuida a la hidrofobicidad de estos compuestos. Los monoésteres, después de haber ingresado, son hidrolizados por esterases intracelulares que generan glutatión.

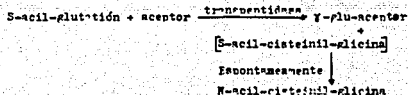
En este laboratorio; han sido sintetizados inhibidores potentes y específicos para glioxilasa II; entre ellos: S-(4-nitrocarbonyloxil) glutatión (S-pNCEG) y S-(9-fluorenylmetoxycarbonyl) glutatión (S-FMOCG) (14, 15). El establecimiento de nucleótidos como inhibidores de Glo II es de interés; el trifosfato de guanósina (GTP) es el más potente (datos no publicados).

Compuestos como S-pNCEG son incapaces de atravesar la membrana citoplasmática como S-pNCEGMEE y S-FMOCGMEE y posiblemente permearán la membrana citoplasmática; por ende, la actividad de esterases producirá los correspondientes inhibidores a los cuales hemos denominado pro-inhibidores; el término pro-inhibidor se le ha asignado a compuestos que, después de sufrir modificaciones por mecanismos intracelulares, producirá los correspondientes inhibidores de Glo II. Con esto inicia una nueva etapa en la producción de inhibidores de Glo II.

El esquema 4 muestra el marco teórico de los pro-inhibidores.



Reacción catalizada por γ -glutamyltranspeptidase sobre derivado S-acílico del glutatión (20).



ESQUEMA 4

3. HIPOTESIS

Se propone como hipótesis de trabajo que: compuestos como S-pNCBGMEE y S-FMOCGMEE son capaces de atravesar la membrana citoplasmática; si esto es así, las hidrolasas intracelulares generarán los correspondientes inhibidores de glioxilasa II.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo General.

Sintetizar inhibidores de glioxilasa II capaces de cruzar la membrana citoplasmática y estudiar sus efectos en células de mamíferos.

4.2 Objetivos Particulares.

- a) Efectuar la síntesis de glutatión monoetil éster (GMEE).
- b) Realizar la síntesis de los pro-inhibidores, S-(4-nitrocarboboxyzil) glutatión monoetil éster (S-pNCBGMEE) y S-(9-fluorenilmetoxicarbonil) glutatión monoetil éster (S-FMOCGMEE).
- c) Estudiar los efectos de estos pro-inhibidores en células de mamíferos. Estos efectos serán analizados a nivel de proliferación celular.

5. MATERIALES

5.1 Material biológico.

La línea celular de leucemia monocítica U-937 fue proporcionada por el Dr. Ming-chi Wu. Esta línea celular es cultivada en DME con 10 % de suero fetal bovino.

Las ratas usadas para la extracción y purificación de Glo II fueron ratas Sprague-Dawley.

5.2 Materiales químicos.

El glutatión y el p-NCECl fueron adquiridos en Sigma Chemical Co. FMOCCl y el papel para cromatografía fueron obtenidos de Aldrich (West Germany). Los laboratorios Bio-Rad nos abasteció la resina Dowex-1-X8, la resina Affi-Gel 10 y azul de tripano. DME fue obtenido de Gibco Eurone.

Diversos compuestos químicos fueron productos comerciales de grado analítico:

éter etílico
ácido acético glacial
hidróxido de sodio
bicarbonato de sodio
cloruro de sodio
fosfato de sodio
ácido sulfúrico

sulfato de sodio
pentóxido de fósforo
ácido clorhídrico
etanol
glicerol
acetona
cloruro de paranitrocarbenezoxil
cloruro de 9-fluorenilmetoxicarbonil
para-nitrocarbenezoxil-glutación
fluoruro de metilfenil sulfonilo
propanol
butanol
DTNB

Buffer de extracción:

| | |
|------------------|---------|
| Fosfato de sodio | 50 mM |
| glicerol | 20 % |
| pH | 7.0-7.2 |

El agua que se utilizó fue bidestilada y para los cultivos se utilizó agua estéril.

5.3 Equipo.

En todos los experimentos se usó equipo convencional de laboratorio, tal como espectrofotómetros, micropipetas,

centrífugas, homogenizadores, microscopio óptico, incubadoras, refrigeradores, bombas para vacío, rotavapor, cuarto de refrigeración y refrigeradores. El material de vidrio que se utilizó siempre fue enjuagado con agua bidestilada.

6. METODOS

6.1 Preparación y purificación de Glutatió Monoetil éster.

6.1.1 Síntesis.

A 200 ml de etanol absoluto con agitación continúa se le añade la mezcla catalizadora (10 ml de eter etílico y 2.7 ml de H_2SO_4 conc. previamente enfriados). Después de algunos minutos de agitación, 5 g de GSH son añadidos y la mezcla es agitada hasta obtener una solución cristalina. A la mezcla anterior se le añaden 20 g de Na_2SO_4 .

La reacción se lleva a cabo a temperaturas entre los 28-34°C por 5-7 horas. El progreso de la reacción fue seguida por cromatografía en capa fina usando como solvente 1-propanol-ácido acético glacial-agua, 10:1:5. La reacción se detuvo cuando no se detectó GSH en cantidades apreciables por CCP. La muestra se trató con 5 gramos de la resina de intercambio iónico Dowex-1-X8. Esta operación fue repetida varias veces hasta que el sobrenadante

de la mezcla mostró reacción negativa con BaCl_2 2 %. Bajo estas condiciones la mezcla está lista para ser filtrada. El filtrado se deja en reposo durante 24 horas a -20°C . Subsecuentemente, aparecen cristales ligeros, los cuales son filtrados y lavados con 20 ml de etanol frío y 15 ml de éter etílico. En seguida, el producto es secado in vacuo bajo acción de P_2O_5 . $R_f = 0.65$.

6.1.2 Preparación y deshidratación de la resina Dowex-1-XP.

500 g de la resina Dowex-1-XP son suspendidos en agua bidestilada; después son empacados en una columna de 5 cm de diámetro. A continuación, la resina es lavada con 2.5 l de HCl 2.5 M, 1 l de agua bidestilada y 5 l de NaOH . Una vez tratada la resina es expuesta a aereación para, posteriormente, ser suspendida varias veces en etanol absoluto hasta sequedad completa. La resina puede ser continuamente usada después del tratamiento con NaOH 1 M; ésto es hasta que el líquido eluyente de reacción sea negativo con BaCl_2 al 2 %, lo cual indicará que la resina está libre de iones sulfato.

6.2 Síntesis y purificación de S-(4-nitrocarbобензоxil) glutación monoetil éster (S-DNCBGMEE).

6.2.1. Síntesis.

El glutatión monoetil éter purificado (502.5 mg) fue disuelto en 6 ml de agua previamente enfriada. Por otro lado, 282 mg de p-NCBCl fueron disueltos en 3 ml de éter etílico. En seguida, ambas soluciones se mezclaron. la reacción se llevo a cabo a 4 C, durante seis días con agitación continua. El pH continuamente ajustado a 7.4-7.7 con NaH_2CO_3 . Después, el material producido fue lavado con éter etílico hasta que la fase etérea mostró respuesta negativa a la luz ultravioleta (UV). El material es filtrado, lavado con éter etílico y secado al vacío con P_2O_5 . Por cromatografía en capa fina (CCF), usando como eluyente 1-butanol:ácido acético:agua, (4:1:1), se observaron los siguientes resultados:

| R_f | UV | Ninhidrina |
|-------|----|------------|
| 0.16 | - | + |
| 0.38 | - | + |
| 0.63 | + | + |
| 0.95 | + | - |

El producto de interés con R_f 0.63 aproximadamente representó un 40 % del material obtenido.

6.2.2 Purificación.

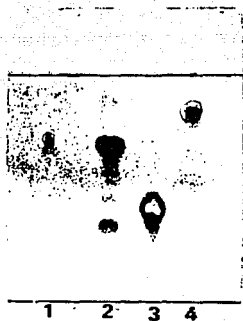


Figura 1 Cromatografía en capa fina del S-pNCBGMEE
comparado con p-NCBG, GMEE, GSH.

Eluyente (1-propanol:ácido acético glacial:agua,
10:1:5) 1)p-NCBG, 2)GMEE, 3)GSH, 4)S-pNCBGMEE.

El sólido obtenido fue disuelto en 2 ml de ácido acético caliente. En seguida, se añadió acetato de etilo (6ml). La mezcla se dejó a 4°C durante 24 horas. Después se filtró. La cromatografía en capa fina del filtrado mostró los productos de R_f 0.63 y 0.95. Este filtrado fue tratado con éter etílico hasta que la fase etérea fue UV (-). El producto remanente fue recristalizado con 1 ml de agua. En seguida de haber decantado el sobrenadante, el sólido fue secado con P_2O_5 in vacuo. El sólido mostró ser un solo producto por medio de cromatografía de papel, usando como eluyente 1-propanol:ácido acético glacial:agua, 10:1:5, R_f 0.85, reacción positiva con ninhidrina, UV (+), grupo SH (-), y por medio de hidrólisis básica el glutatión fue generado.

Los resultados se muestran en la figura 1.

6.3 Síntesis y purificación de S-(9-fluorenilmetoxicarbonil) glutatión éster (S-FMOCGMEE).

6.3.1 Síntesis.

El GMEE (335 mg) disuelto en agua fría (2.5 ml) fue mezclado con 219.3 mg de FMOCCl disuelto en éter etílico. Esto constituyó la mezcla de reacción. La reacción se llevó a cabo a 4°C durante cuatro días. El bicarbonato de sodio fue usado continuamente para ajustar el pH entre 7.6-7.8. Después del tiempo antes mencionado, la mezcla fue lavada con éter etílico hasta que la fase

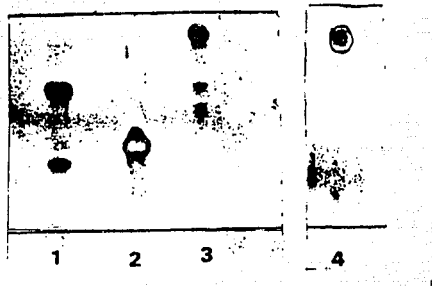


Figura 2. Cromatografía en capa fina del S-FMOCGMEE comparado con GMEE (1), GSH (2), S-FMOCGMEE (3), S-FMOCGMEE purificado (4). Eluyente (1-butanol:Ácido acético glacial: agua, 4:1:1).

etérea no produjera respuesta positiva a la luz ultravioleta. El sólido formado fue filtrado y secado con P_2O_5 al vacío. La cromatografía en capa fina (1-butanol:ácido acético glacial:agua, 4:1:1) mostró los siguientes resultados:

| R_f | UV | Ninhidrina |
|-------|----|------------|
| 0.18 | - | + |
| 0.46 | - | + |
| 0.85 | + | + |

La muestra de interés es aquella con $R_f = 0.85$.

6.3.2 Purificación.

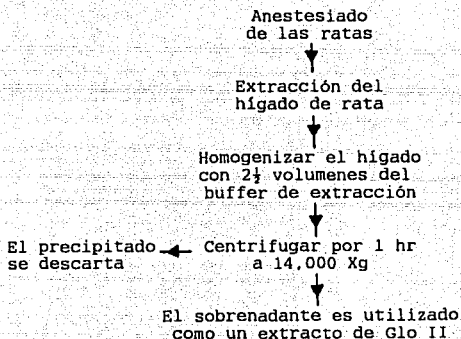
El material fue agitado con 1 ml de agua por 30 minutos a pH=5 y a una temperatura de 28°C. Después de filtrado todo el material, el sólido obtenido fue secado bajo P_2O_5 in vacuo. La CCF mostró un solo producto con R_f 0.85 (el mismo eluyente), reacción con ninhidrina y UV positiva. La reacción con el reactivo de Ellman para SH fue negativa. La figura 2 muestra la pureza del producto.

6.4 Extracción y purificación de Glo II.

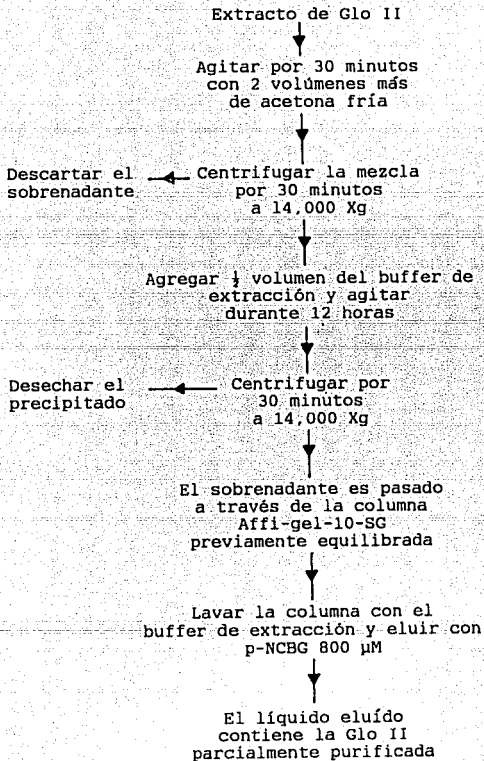
La preparación y purificación de Glo II proveniente

de hígado de rata fue llevada a cabo por métodos desarrollados en este laboratorio (15). La preparación y purificación de Glo II son esquematizados a continuación.

6.4.1 Obtención del extracto de glioxilasa II.



6.4.2 Purificación de Glo II.



6.5 Medición de la actividad de Glo II.

La actividad de Glo II fue determinada por medio de la hidrólisis de SIG, la cual produce GS^- que reacciona con DTNB formando el complejo $GS-DTNB$, medible colorimétricamente a una longitud de onda de 412 nm.

Los ensayos de Glo II y los estudios de inhibición se llevaron a cabo a 20°C usando el buffer de reacción (fosfato de sodio 50 mM, DTNB 0.2 mM). Para cada ensayo, la cubeta contuvo SIG (0.4 mM) y las concentraciones de los inhibidores se ajustaron a un volumen final de 1 ml. Las concentraciones de S-pNCBGMEE fueron ajustadas a 20, 40, 80, 160, 240 μM mientras que, para S-FMOCGMEE, fueron 86, 172, 344 y 688 μM .

6.6 Cálculo de las constantes de inhibición.

Las constantes de inhibición para S-pNCBGMEE y S-FMOCGMEE se han caracterizado por el método de Dixon-Webbs; esto fue asumiendo que son inhibidores competitivos. Consultar figuras 3 y 4.

6.7 Cultivos celulares.

Se utilizó la línea celular de leucemia monocítica U-937. La concentración de células se ajustó a $5.0-7.5 \times$

10^5 células/ml en cultivos de 2 ml. La incubación se efectuó en las siguientes condiciones: 37°C, DME con 10 % de suero fetal bovino, 10 % de CO₂, y con 100 % humedad.

Las células fueron desarrolladas a diferentes concentraciones de S-pNCBGMEE (500, 100 y 10 µM) y S-FMOCGMEE (500, 375, 250, 100, 20, 1.0, 0.3 µM). Los compuestos se disolvieron en acetona al 75 %; las concentraciones de acetona no excedieron al 2 %. Los cultivos fueron efectuados en duplicado y la concentración celular de cada uno fue determinada tres veces. La viabilidad celular fue medida por medio del colorante azul de tripano al 2 %.

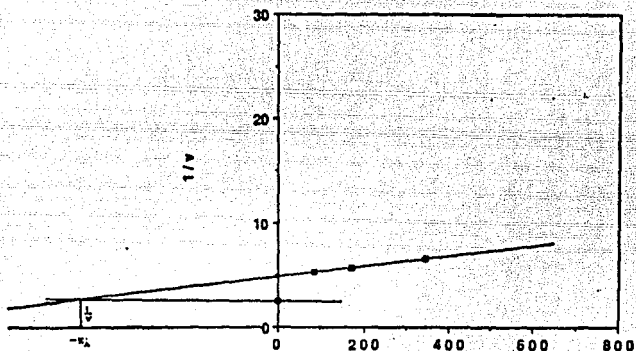


Figura 3 Gráfica para la determinación de K_i . S-FMOCGMEE
 (al cual se le consideró como inhibidor com-
 petitivo). Método de Dixon-Webbs.

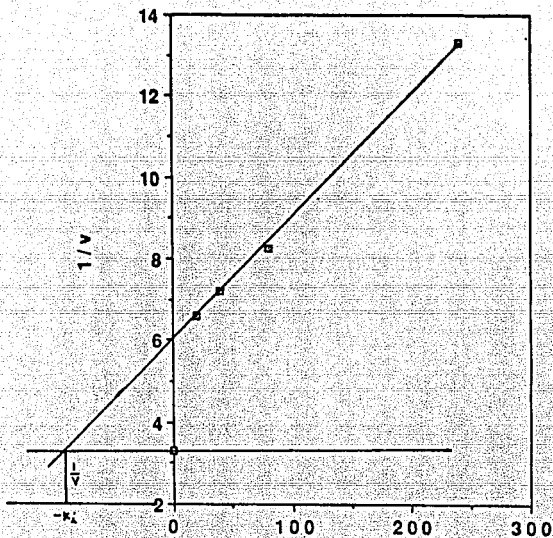
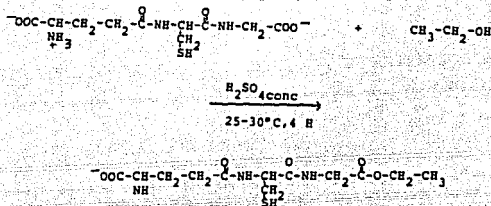


Figura 4 Gráfica para la determinación de K_i . S-PNCEGMEE

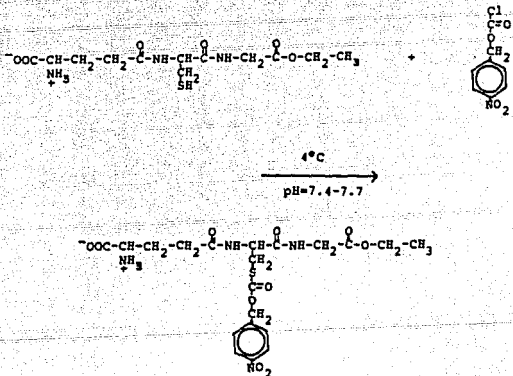
La K_i fue determinada por el método de Dixon-Webbs. El procedimiento fue basado en que los compuestos similares son inhibidores competitivos.

Síntesis de S-(4-nitrocarbencil) glutatión monoetil éster (S-PNCBGMEE).

ETAPA a Esterificación del residuo glicina (Fisher).



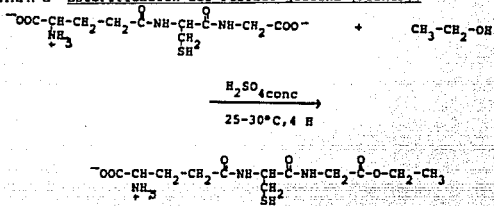
ETAPA b Síntesis del pro-inhibidor S-PNCBGMEE.



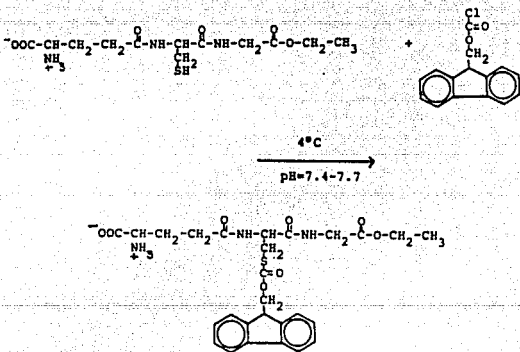
ESQUEMA 5

Síntesis de S-(9-fluorenilmetoxycarbonyl) glutatión monoetil éster (S-FMOCGMEE).

ETAPA a Esterificación del residuo glicina (Fisher).



ETAPA b Síntesis del pro-inhibidor S-FMOCGMEE.



ESQUEMA 6

7. RESULTADOS

7.1 Síntesis de GMEE.

La esterificación del residuo de glicina en el glutatión fue efectuada de acuerdo al método de Bergman y Zervas adaptado por Campbell (5). El protocolo fue modificado en algunas etapas de la purificación.

Consideraciones a tomar durante la síntesis:

El progreso de la reacción debe ser seguido, ya sea por CCF u otros métodos; se utilizó este método por ser económico y fácil de efectuar. La razón del seguimiento de la reacción es para poder detectar la formación de otros derivados que no son deseados.

Una vez que la reacción es negativa para sulfatos, en el sobrenadante del matraz de reacción se debe proseguir inmediatamente a la filtración o, en caso contrario, el producto precipitará en el matraz de reacción, lo cual causa la pérdida del producto.

Los esquemas 5a y 6a muestran la reacciones llevadas a efecto. Se prepara una mezcla de ácido sulfúrico con éter etílico y se enfría, mientras que el glutatión se disuelve en etanol absoluto; en seguida, las mezclas se combinan y ésto constituye la mezcla de reacción.

7.2 Síntesis de los pro-inhibidores.

Por lo que concierne a la síntesis y purificación de S-PNCEGMEE y S-FMOCCGMEE, los métodos son similares. Se disuelve el GMEE en agua fría y es mantenido en hielo, por otro lado, los compuestos como p-NCECl y FMOCCl son disueltos en éter etílico para después ser continuamente el pH. Las reacciones son mostradas en los esquemas 4b y 5b. La comprobación de la estructura química se realizó por medio de características físicas y químicas: luz ultravioleta, reacción con DTNB, cromatografía, hidrólisis básica.

Cuidados durante el proceso de síntesis y purificación:

En la reacción, el control del pH es de suma importancia.

Los lavados con éter etílico durante la purificación deben ser exhaustivos para evitar que los productos deseados queden contaminados con p-NCECl o FMOCCl, los cuales son difíciles de extraer una vez que el producto ha secado.

Los productos no son totalmente solubles en agua.

Los compuestos son conservados a -20°C y libres de humedad, puesto que a temperatura ambiente mostraron cierto grado de descomposición. Después de ensayar una

variedad de solventes, la mezcla acetona-agua mostró ser el mejor solvente para los compuestos.

7.4 Cultivos celulares.

S-FMOCGMEE y S-PNCRGMEE mostraron resultados interesantes en los cultivos; éstos se resumen en las figuras 5,6 y la tabla I. Ambos compuestos producen efectos inhibitorios y estimulatorios de la proliferación celular. El uso de la línea U-937 se debió a su fácil adquisición. El S-FMOCGMEE a concentraciones de $1.0 \mu\text{M}$ produce aumento en la proliferación celular a concentraciones cercanas a $10 \mu\text{M}$. Contrariamente, se observó inhibición o detenimiento de la proliferación cuando las concentraciones de S-FMOCGMEE y S-PNCRGMEE llegaron a ser $20 \mu\text{M}$ y $\geq 100 \mu\text{M}$, respectivamente.

No se detectó ningún efecto de la acetona sobre los cultivos a las concentraciones utilizadas; es decir que, la acetona es inocua a estas concentraciones.

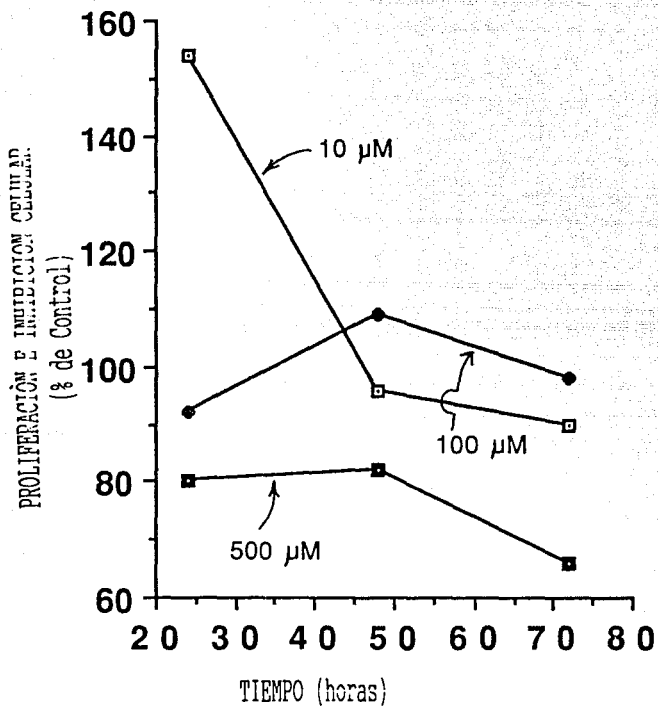


Figura 5 Efectos de S-PNCBGMEE en la línea celular de leucemia monócítica U-937. Los efectos fueron medidos con azul de tripano. Las concentraciones usadas fueron 500, 100, 10 µM.

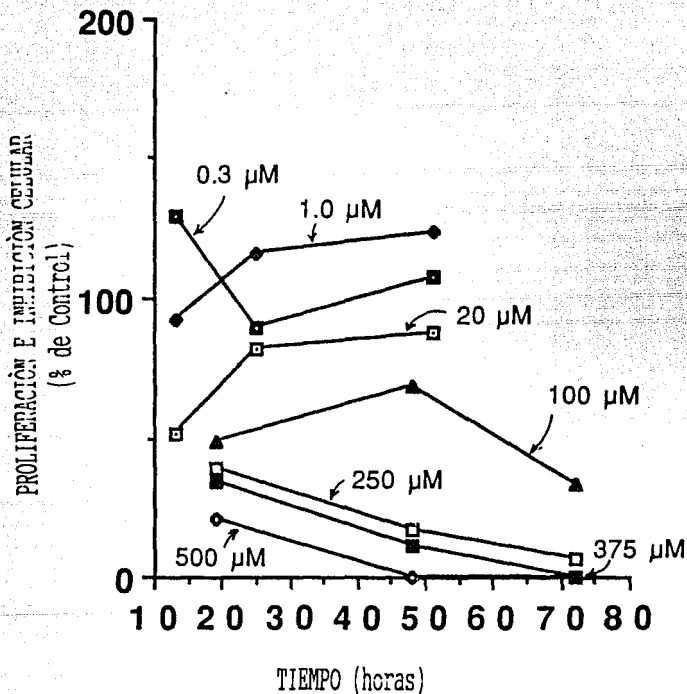


Figura 6 Efectos de S-FMOCGMEE en la línea celular de leucemia monocítica U-937. Los efectos fueron determinados de acuerdo a materiales y métodos. Concentraciones finales de 500, 375, 250, 100, 20, 1.0, 0.3 μM .

Tabla I. Efectos de S-pNCBGMEE en la línea celular de leucemia monocítica U-937.

| Compuesto | Concentración*, μM | Efecto |
|------------|-------------------------------|--------|
| S-pNCBGMEE | 500 | I |
| | 100 | I |
| | 10 | E |
| S-FMOCGMEE | 500 | I |
| | 100 | I |
| | 20 | I |
| | 1.0 | E |
| | 0.3 | E |

*Concentraciones finales en los cultivos celulares.

I= Inhibitorio

E= Estimulador de la proliferación

8. DISCUSION

La síntesis de GMEE se efectuó usando como catalizador H_2SO_4 , ya que se ha demostrado que éste es el método óptimo. El uso de Dovex-1-X8 garantiza que el producto sea libre de sales que representan un problema por ocasionar hidrólisis de los ésteres (16). Estas sales contaminantes dificultan el uso en células y animales. Con este método se puede obtener GMEE purificado y seco en 48 horas. Posteriormente, se efectuó la preparación de S-FMOCGMEE y S-PNOCGMEE; en esta síntesis el control de pH no mayor a 8 garantiza que el grupo sulfhidrilo de la cisteína se encuentre ionizado. Por otro lado, a pH arriba de 8, el GMEE se hidroliza completamente y a pH 7.5 dicha hidrólisis sólo es parcial. Por lo anterior los reactivos limitantes (p-NBCCl y FMOCCL) se emplearon en bajas cantidades y en consecuencia, se obtuvieron bajos rendimientos.

Después de haber obtenido la enzima parcialmente purificada y los pro-inhibidores, se prosiguió a estudios inhibitorios in vitro. Contrario a lo esperado, se observó inhibición de Glo II. No era de esperarse nuestro que la esterificación del residuo de glicina no favorece a la atracción entre el compuesto pro-inhibidor y grupos ionizados del sitio activo de la enzima. De

ésto se deduce que la interacción con el residuo de glicina no es necesario para la inhibición. El hecho de que S-FMOCGMEE y S-PNCGMEE tuvieran un efecto inhibitorio sobre Glo II se debió a su analogía con los potentes inhibidores S-FMOCG y S-PNCG; se ha demostrado que éstos son inhibidores competitivos de Glo II (Consultar tablas II y III).

En los cultivos celulares:

El uso de acetona como solvente de los productos fue inocuo ya que se efectuaron controles para cada concentración del compuesto. Cuando S-pNCBGMEE y S-FMOCGMEE se incubaron con la línea celular U-937 mostraron que a concentraciones $\geq 100 \mu\text{M}$ y $\geq 20 \mu\text{M}$, respectivamente, inhibieron la proliferación celular hasta en un 100 %.

Según datos reportados (50), altas concentraciones de SIG producen inhibición de la proliferación. De acuerdo a la hipótesis presentada, una vez que los pro-inhibidores cruzaran la membrana citoplasmática y fueran hidrolizados, la inhibición de Glo II produciría que aumentara la concentración de SIG intracelular. Bajo estas condiciones, los compuestos sintetizados en el laboratorio producirían los efectos correspondientes. Jerzykowski

postuló que los procesos neoplásicos exhiben baja o nula actividad de G10 II. De los experimentos realizados observamos que existen un aumento de la proliferación celular cuando las concentraciones de los pro-inhibidores fueron $\leq 10 \mu\text{M}$ o $\leq 1.0 \mu\text{M}$ para S-pNCEGMEE y S-FMOCGMEE, respectivamente. De lo anterior, podemos inferir que la proliferación celular es modificada por SIG. El hecho de que el ingreso de los pro-inhibidores sea posible, es debido a su hidrofobicidad y a su carga neta de cero. El que S-pNCEGMEE sea más potente inhibidor in vitro que S-FMOCGMEE y que éste presente mayores efectos inhibitorios in vivo que S-pNCEGMEE se puede explicar con base en su hidrofobicidad.

El estudio de los niveles intracelulares de SIG después del tratamiento con los pro-inhibidores representa un desafío, debido a su efecto en la notenciación de la polimerización de tubulina (10) la cual es esencial para la mitosis (53). El SIG podría estar relacionado a polimerización-disrupción de los polímeros de tubulina; la disrupción de los polímeros se ha visto que es necesaria para la replicación de ADN (51).

De acuerdo a lo anterior y según la hipótesis del cáncer presentada por Szent-György-en la cual declara que una célula cancerígena es aquella que ha perdido su

habilidad para regular su propio sistema de α lloxilasas-
podemos sugerir que S-pNCBGMEE y S-FMOCOMEK podrían re-
sultar excelentes agentes terapéuticos en el tratamiento
del cáncer.

Tabla II. Efectos inhibitorios de S-pNCBGMEE y S-FMOCGMEE en Glo II parcialmente purificada.

| Compuesto | Concentración, μM | %Inhibición |
|------------|------------------------------|-------------|
| S-pNCBGMEE | 20 | 25 |
| | 40 | 35 |
| | 80 | 39 |
| | 160 | 62 |
| | 240 | |
| | | 62.5 |
| S-FMOCGMEE | 86 | 27 |
| | 172 | 46 |
| | 344 | 50 |

Tabla III. Inhibición de Glo II obtenida de hígado de rata. Muestra relación de inhibidores y pro-inhibidores.

| Compuesto | Ki, uM |
|------------|--------------------|
| S-pNCBG | 6.5 |
| S-PMOCC | 8.0 |
| S-PNCBGMEE | 91.0 ⁺ |
| S-PMOCCMEE | 460.0 ⁺ |

+ Valores obtenidos en caso de que los pro-inhibidores fueran "inhibidores competitivos", lo cual no pudo ser estudiado en este trabajo.

9. CONCLUSIONES

- Se ha desarrollado un método para la síntesis química de glutatión monoetil éster.
- La producción de los pro-inhibidores S-pNCBGMEE y S-FMOCGMEE se efectuó basada en métodos generales desarrollados en este laboratorio.
- La inhibición de Glo II por los compuestos sintetizados demuestra que la interacción del grupo $-COO^-$ de la glicina no es necesario para efectos inhibitorios.
- Los grupos con mayor volúmen molecular que son unidos al átomo de azufre del glutatión parecen producir mejores efectos inhibitorios.
- In vivo, los estudios mostraron que a ciertas concentraciones, los compuestos sintetizados en el laboratorio pueden producir efectos inhibitorios o estimulantes de la proliferación celular.
- De los experimentos realizados surge una gran variedad de posibles estudios tendientes a conocer mejor las funciones de S-D-lactoilglutatión.

10. BIBLIOGRAFIA

- (1) Racker, E. The mechanism of action of glyoxalase. J. Biol. Chem. 190:685-696, (1951).
- (2) Thornalley, P.J. The glyoxalase system: new developments towards functional characterization of a metabolic pathway fundamental to biological life. Biochem. J. 269:1-11, (1990).
- (3) Rae, Caroline and et al. Kinetic analysis of the human erythrocyte glyoxalase system using ¹H NMR and a computer model. Eur.J. Biochem. 193:83-90, (1990).
- (4) Carrington, Simon J. and Kenneth T. Douglas. The glyoxalase enigma-The biological consequences of a ubiquitous enzyme. IRCS Med Sci. 14,763-768, (1986).
- (5) Szent-Gyorgyi, Albert. Bioelectronics. Science 161:988-990, (1968).
- (6) Creighton, D.J., et al. Optimization of efficiency in the glyoxalase pathway. Biochemistry 27:7376-7384, (1988).
- (7) Thornalley, P.J. et al. S-D-lactoylglutathione in resting and activated human neutrophils. Biochim. Biophys. Resch. Comm. 98:463-470, (1987).
- (8) Thornalley, P.J. and M.J. Tisdale. Inhibition of proliferation of human promyelocytic leukaemia HL60

- cells by S-D-lactoylglutathione in vitro. Leukaem. Res. 12:897-904, (1988).
- (9) Gillespie, E. The tumor promoting phorbol diester, 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) increases glyoxalase I and decreases glyoxalase II activity in human polymorphonuclear leukocytes. Biochem. Biophys Res. Comm. 98:463-470, (1981).
- (10) Gillespie, E. Cell-Free microtubule assembly: Evidence for control by Glyoxalase. Biochemistry, Fedn. Proc. Am. Soc. Exp. Biol. 34:541 (1975).
- (11) Thornalley, P.J. Modification of the glyoxalase system in human red blood cells by glucose in vitro. Biochem. J. 254:751-755, (1988).
- (12) McLellan, A.C., and P.J. Thornalley. Glyoxalase activity in human red blood cells fractionated by age. Mech. Ageing Dev. 48:63-71, (1989).
- (13) Gillespie, E. Effects of S-D-lactoylglutathione and inhibitors of glyoxalase I on histamine release from human leukocytes. Nature. 277:135-137, (1979).
- (14) Bush, P.E. and S.J. Norton. S-(nitrocarbonyloxy) glutathiones: Potent competitive inhibitors of mammalian glyoxalase II. J. Med. Chem. 28:826-830, (1985).

- (15) Norton, S.J., et al. Glyoxalase I and Glyoxalase II from Aloe vera; purification, characterization and comparison with animal glyoxalases. Biochem. Inter. 22:411-418, (1990).
- (16) Cambell, E.B., and Owen, W.G. Glutathione monoethyl Ester: High-Performance Liquid Chromatographic Analysis and direct preparation of the free base Anal. Biochem. 183:21-25, (1989).
- (17) Anderson, M.E., and A. Meister. Glutathione monoesters. Anal. Biochem. 183:16-20 (1989).
- (18) Tsan, M., et al. Modulation of endothelial GSH concentrations: effect of exogenous GSH and GSH monoethyl ester. J. Appl. Physiol. 66:1029-1034, (1989).
- (19) Wellner, V.P., et al. Radioprotection by glutathione ester into human lymphoid cells and fibroblasts. Proc. Natl. Acad. Sci. 81:4732-4735, (1984).
- (20) Tate, S.S. Interaction of γ -Glutamyltranspeptidase with S-acyl derivatives of glutathione. FEBS letters 54:319-322, (1975).
- (21) Jerzykowski, T., et al. A reevaluation of studies on the distribution of glyoxalases in animal and tumor tissues. Int. J. Biochem. 9:853-860, (1978).

- (22) Dakin, H.D., and H.W. Dudley. In enzyme concerned with the formation of hydroxy acids from ketonic aldehydes. J. Biol. Chem. 14:155-157, (1913).
- (23) Dakin, H.D. and H.W. Dudley. On glyoxalase. J. Biol. Chem. 14:423-431. (1913).
- (24) Principato, G.B., et al. Glyoxalases and Glutathione reductase activity changes in chicken liver during embryo development and after hatching. Acta Embr. Morph. Exp. 3:173-179, (1982).
- (25) Oray, B. and S.J. Norton. Inhibitors of glyoxalase enzymes. Biochem. Biophys Res. Comm. 95:624-629, (1980).
- (26) Argilés, J. M. Has acetone a role in the conversion of fat to carbohydrate in mammals? Trends Biochem. Sci. 11:61-63, (1986).
- (27) Landau, B.R. et al. The role of acetone in the conversion of fat to carbohydrate. Trends Biochem. Sci. 12:113-114, (1987).
- (28) Ray, S and M. Ray. Formation of methylglyoxal from aminoacetone by amino oxidase from goat plasma. J. Biol. Chem. 26:3461-3462, (1983).
- (29) Ray, M. and S. Ray. Aminoacetone oxidase from goat liver. J. Biol. Chem. 262:5974-5977, (1987).

- (30) Reichard, G.A., Jr. et al. Acetone metabolism in humans during diabetic ketoacidosis. Diabetes, 35:668-674, (1986).
- (31) Casazza, J.P., et al. The metabolism of acetone in rat. J. Biol. Chem. 259:231-236, (1984).
- (32) Richard, J.P. Reaction of triosephosphate isomerase with L-glyceraldehyde 3-phosphate and triose 1,2-enediol 3-phosphate. Biochemistry, 24:949-953, (1985).
- (33) Sato, J. et al. Methyl formation in rat liver cells. J. Biol. Chem. 255:2046-2050, (1980).
- (34) Riddle, V. and F.W. Lorenz. Nonenzymatic, polyvalent anion-catalyzed formation of methylglyoxal as an explanation of its presence in physiological systems. J. Biol. Chem. 243:2718-2724, (1968).
- (35) Ray, M and S. Ray. Purification and partial characterization of a methylglyoxal reductase from goat liver. Biochem. Biophys. Acta, 802:119-127, (1984)
- (36) Meister, A. Selective modification of glutathione metabolism. Science, 220:472-477, (1983).
- (37) Meister, A. Glutathione metabolism and its selective modification. J. Biol. Chem. 263:17205-17208, (1988).

- (38) Vander Jagt, D.I., et al. Kinetic evaluation of substrate specificity in the glyoxalase I catalyzed dispropotionation of α -ketoaldehydes. Biochemistry. 11:3735-3740, (1973).
- (39) Kester, M.V. and S.J. Norton. The isolation and characterization of mouse liver glyoxalase I. Biochem. Biophys. Acta. 391:212-221, (1975).
- (40) Kester, M.V., et al. Mouse liver glyoxalase I inhibition by S-substituted glutathione. J. Med. Chem. 17:413-416, (1974).
- (41) Ball, J.C., and D.L. Vander Jagt. Purification of S-2-hydroxyacylglutathione hydrolase (Glyoxalase II) from rat erythrocytes. Anal. Biochem. 98:472-477, (1979).
- (42) Principato, G.B., et al. Purification and characterization of two forms of glyoxalase II from the liver and brain of Wistar rats. Biochem. Biophys Acta. 911:349-355, (1987).
- (43) Uotila, L. Purification and characterization of S-S-2-hydroxyacylglutathione hydrolase (glyoxalase II) from human liver. Biochemistry. 12:3944-3951, (1973).
- (44) Hsu, Y.R. and S.J. Norton. Multimeric forms of rat

- liver glyoxalase II. Enzyme. 30:259-264, (1963).
- (45) Ball, J.C., and D.L. Vander Jagt. S-2-hydroxyacyl-glutathione hydrolase (Glyoxalase II): Active-site mapping of a nonserine thiolesterase. Biochemistry 20:899-905, (1981).
- (46) Jencks, W.P. and J. Carriulo. Imidazole catalysis: III. General base catalysis and the reactions of acetyl imidazole with thiols and amines. J. Biol. Chem. 234: 1280-1285, (1959).
- (47) Hooper, N.I., et al. Modification of the glyoxalase system during the differentiation of human promyelocytic leukaemia HL60 cells in vitro. Biochem. Biophys. Acta. 966:362-364, (1988).
- (48) Mbalum, M. M.S. thesis. University of North Texas., Denton, TX. (1988).
- (49) Thornalley, P.J. Handbook on Glutathione, CRC press, Boca Raton, Fl. (1989).
- (50) Hooper, N.I., Ph. D. Thesis, Univ. Aston, Birmingham, B47ET, U. K. (1988).
- (51) Shinohara, T., et al. Initiation of DNA synthesis by microtubule disruption in quiescent rat 3Y1 cells. Eur. J. Biochem. 183:275-280, (1989).