

Laboratorio de Fisiología Animal
Facultad de Ciencias
Universidad de Barcelona

Inhibición de la cetoheixoquinasa de hígado por benzotiadiazinas

por
J. M. Llinás y F. Ponz

(Recibido para publicar el 7 de junio de 1962)

Diferentes benzotiadiazinas se vienen utilizando como eficaces diuréticos, aun cuando su mecanismo dista de ser conocido. Se sospecha sea mediante un efecto sobre procesos enzimáticos que de algún modo condicionen la reabsorción activa de sodio en el túbulo renal. (1, 2, 5, 6)

La posibilidad de interacción de estos preparados con enzimas se ha investigado con respecto a la anhidrasa carbónica renal, que, efectivamente, resulta inhibida. Sin embargo, no hay en absoluto correlación entre el efecto inhibidor sobre esta enzima y la actividad diurética.

Al investigar en nuestro Laboratorio las propiedades de la cetoheixoquinasa hepática (ATP : D-fructosa 1-fosfotransferasa) (3), nos pareció interesante ensayar el comportamiento de las benzotiadiazinas frente a ella, ya que era previsible que estos productos tuvieran un efecto inhibidor inespecífico sobre numerosas enzimas.

Material y métodos

El preparado de cetoheixoquinasa hepática se obtenía según se indica en un trabajo previo (3). La valoración de actividad y otras técnicas analíticas son las mismas que se indican allí. Los preparados tenían una actividad específica de 1600 a 2000 μ g

de fructuosa esterificada por mg. de N proteico, en 20 minutos, a 37° C.

Las benzotiadiazinas utilizadas han sido la hidroflumetiazida, la hidroclorotiazida y la clorotiazida (Juva, de Milán) (*), a las concentraciones que se indican en la parte experimental.

Las soluciones de los efectores se prepararon en tampón de fosfato 0,05 M, a pH 7. Estas soluciones se mezclaban con las de preparado enzimático. Sobre las muestras resultantes, se efectuaba luego la determinación de actividad cetoheixoquinásica.

En todos los casos, la actividad de las muestras con inhibidor se refirió a la de soluciones enzimáticas llevadas paralelamente sin la adición de benzotiadiazina. Los datos que se indican representan siempre, cuando menos, el valor medio de dos determinaciones.

Resultados

1. *Hidroflumetiazida*. (6-trifluormetil-7-sulfamil-3,4-dihidro 1,2,4-benzotiadiazina-1,1-dióxido).

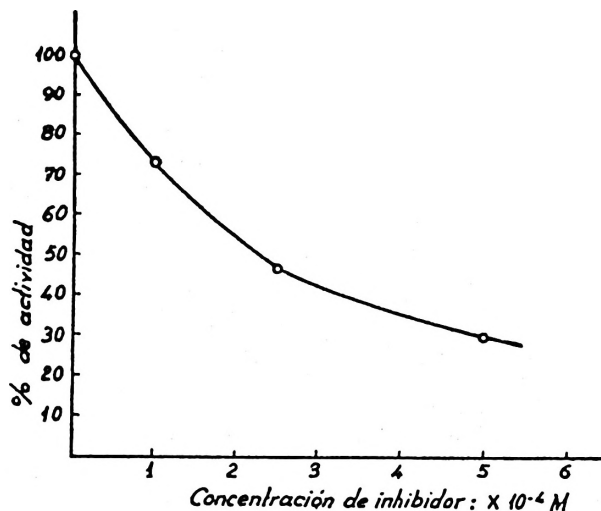


FIGURA 1. — Inhibición de la cetoheixoquinasa en función de la concentración de hidroflumetiazida.

Se ensayaron frente a la enzima diferentes concentraciones de esta sustancia, condicionadas en su límite superior por la reducida solubilidad del diurético en agua, a pH cercano a 7.

(*) Estas sustancias nos han sido amablemente proporcionadas por Laboratorios Medea (Barcelona).

En la figura 1, se expresa la actividad cetoheixoquinásica residual en función de la concentración de inhibidor en el medio de reacción.

En un trabajo previo (4) hemos demostrado la presencia en el enzima de grupos —SH esenciales. Aun cuando la estructura química de la benzotiadiazina no sugería fácilmente posibilidades de interacción con grupos —SH, pareció conveniente investigar si la inhibición era reversible con cisteína.

Se ensayó esta posible reversibilización de la enzima inhibida al 50 % por la hidroflumetiazida, utilizando concentraciones de cisteína hasta diez veces superiores a las del inhibidor. En ningún caso se observó reactivación apreciable.

2. *Hidroclorotiazida* (6-cloro-7sulfamil-3,4-dihidro-1,2,4-benzotiadiazina-1,1-dióxido).

Este diurético fue estudiado en condiciones semejantes a las descritas para la hidroflumetiazida. Su solubilidad en agua a pH 7 es también escasa, por lo que es difícil operar con concentraciones superiores a 6×10^{-4} M en los medios de reacción cetoheixoquinásica.

Los resultados obtenidos se representan gráficamente en la curva de la figura 2.

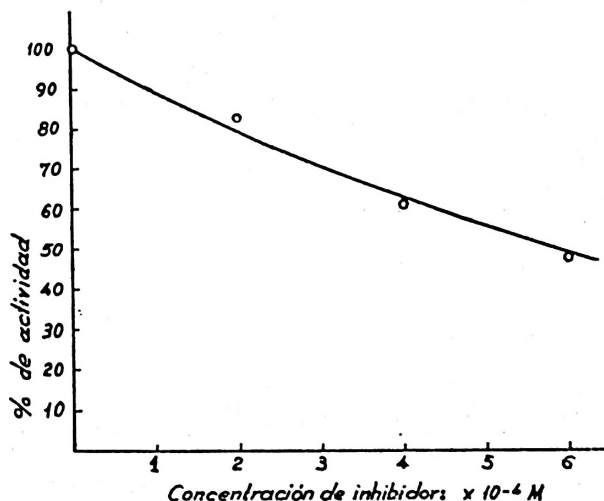


FIGURA 2. — Inhibición de la cetoheixoquinasa en función de la concentración de hidroclorotiazida.

3. *Clorotiazida* (6-cloro-7-sulfamil-1,2,4-benzotiadiazina-1,1-dióxido).

El comportamiento de esta benzotiadiazina frente a la cetoheixoquinasa fue investigado para concentraciones de inhibidor

$2,5 \times 10^{-4}$ M y 5×10^{-4} M en los medios de reacción. En la figura 3 se representan las actividades residuales en función de estas concentraciones.



FIGURA 3. — Inhibición de la cetohecoquinasa en función de la concentración de clorotiazida.

4. Poder inhibitorio relativo de las benzotiadiazinas ensayadas.

El examen de las curvas de inhibición por las tres benzotiadiazinas revela una clara seriación de efectividad en el sentido hidroflumetiazida > hidroclorotiazida > clorotiazida. Sin embargo, dado que las condiciones en que se efectuaron las determinaciones en los tres casos no eran absolutamente comparativas, se llevaron a cabo ensayos determinando simultánea y paralelamente, sobre muestras de un mismo preparado enzimático, los efectos inhibitorios de la hidroflumetiazida, la hidroclorotiazida y la clorotiazida, a concentraciones iguales (en

TABLA I

Eficacia relativa de la hidroflumetiazida, la hidroclorotiazida y la clorotiazida como agentes natriuréticos e inhibidores de la anhidrasa carbónica y de la cetohecoquinasa

Benzotiadiazina	Actividad natriurética (rata)	Inhibición sobre la anhidrasa carbónica	Inhibición sobre la cetohecoquinasa
Hidroflumetiazida		0,1	2,8
Hidroclorotiazida	13	0,7	1,5
Clorotiazida	13	10	1
	1		

los medios de reacción : 5×10^{-4} M.) Los resultados obtenidos sirvieron de base para el establecimiento de los índices que figuran en la tabla I, junto con datos análogos, referentes al poder inhibidor sobre la anhidrasa carbónica y al efecto natriurético, que han sido tomados de la bibliografía (5).

Discusión

Las inhibiciones determinadas sobre la cetohechoquinasa por la hidroflumetiazida, sin alcanzar la profundidad de las ejercidas por los reactivos de grupos sulfhidrilo, estudiadas en otro trabajo (4), son también dignas de tomar en consideración aun cuando, de momento, no podamos ofrecer para ellas ni para las debidas a las otras dos benzotiadiazinas estudiadas, una explicación razonada.

El efecto producido sobre la enzima por la hidroclorotiazida es sensiblemente inferior al ejercicio por la hidroflumetiazida. La clorotiazida es aún menos eficaz, exhibiendo, aproximadamente, un tercio del poder inhibidor de la hidroflumetiazida.

Es evidente que no existe paralelismo entre los efectos de estas benzotiadiazinas sobre la anhidrasa carbónica y sobre la cetohechoquinasa, antes al contrario, se observa una clara divergencia en el sentido de que, la que menor inhibición ejerce sobre la anhidrasa carbónica es la que más actúa sobre la cetohechoquinasa. Tampoco hay buena correlación entre la inhibición de esta última enzima y el efecto natriurético determinado en la rata, aun cuando la discordancia es notablemente inferior a la que se observa entre el efecto natriurético y la inhibición de la anhidrasa carbónica.

Aun prescindiendo de consideraciones puramente fisiológicas, la simple observación de la tabla I hace difícil relacionar, al menos directamente, los efectos sobre la cetohechoquinasa de estas benzotiadiazinas, con sus actividades natriuréticas.

Resumen

Se estudia la acción sobre la cetohechoquinasa hepática de tres benzotiadiazinas diuréticas : hidroflumetiazida, hidroclorotiazida y clorotiazida. La inhibición causada por la hidroflumetiazida es importante, aunque inferior a la ejercida por los reactivos de grupos $-SH$; no es reversible por un exceso de cistefina. Puede establecerse la seriación de efectividad : hidroflumetiazida > hidroclorotiazida. > clorotiazida. No existe paralelismo entre las inhibiciones producidas por estas benzotiadiazinas sobre la anhidrasa carbónica y sobre la cetohechoquinasa. Tampoco puede establecerse una relación directa con las actividades natriuréticas.

Summary

Inhibition of liver ketohexokinase by benzothiadiazines.

The action on the ketohexokinase (ATP : D-fructose 1 phosphotransferase) of three diuretic benzothiadiazines is studied : Hydroflumethiazide (HFM), Hydrochlorothiazide (HCT) and Chlorothiazide (CT). The inhibition produced by HFM is important (70 % at 5×10^{-4} M conc.) though inferior to that exercised by the HS-groups reagents ; and it is not reversible by an excess of cysteine. The inhibitory effectiveness series of three benzothiadiazines (Table I) is HFM>HCT>CT. There is no parallelism between the inhibitions produced by these drugs on the carbonic anhydrase and upon the ketohexokinase. Neither, may a direct relation to their natriuretic activity be established.

Bibliografía

- (1) FORD, R. V. : *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **88**, 809 (1960).
- (2) FUCHS, M., MOYER, J. H. and NEWMAN, B. E. : *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **88**, 795 (1960).
- (3) LLINÁS, J. M. y PONZ, F. : *R. esp. Fisiol.*, **18** (1962).
- (4) PONZ, F. and LLINÁS, J. M. : *Nature*, (en prensa).
- (5) RENNICK, B. : *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **88**, 785 (1960).
- (6) TALSO, P. J. and CARBALLO, A. J. : *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **88**, 822 (1960).