

Estudios cinéticos sobre la glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa. II. Inhibición por el dipiridamol

M. Sopena, J. Viña, F. Pallardó y J. Cabo

Cátedra de Bioquímica y Fisiología
Facultad de Medicina
Valencia (España)

(Recibido el 28 de mayo de 1971)

M. SOPENA, J. VIÑA, F. PALLARDO and J. CABO. *Inhibition of glucose-6-phosphate-dehydrogenase by Dipyridamole. II.* R. esp. Fisiol., 27, 317-320, 1971.

We have studied the kinetics of the reaction catalyzed by the glucose-6-phosphate-dehydrogenase, in relation to the variations of the concentrations of substrate and cofactor, in order to get a better knowledge of the mechanism of the inhibitory effect produced by Dipyridamole (DPD) and described in a previous paper (3). It has been seen that the DPD modifies the value of the Hill «n» coefficient, in dependence of the substrate concentrations, from 1.26 in absence of DPD to 0.94 and 0.80 in presence of DPD 0.1 and 0.5 mM, respectively. It shows that DPD behaves as a competitive inhibitor of the glucose-6-phosphate-deshidrogenase in function of the substrate, and at the same time it causes a change in the apparent order of the reaction.

On the other side, when we have studied the enzymatic kinetics in function of the cofactor, the DPD behaves as a non-competitive inhibitor, without altering the apparent order of the reaction («n» = 1.22 in absence and presence of DPD).

En una serie de trabajos anteriores (1, 2, 3) se inició el estudio de las acciones metabólicas del dipiridamol (DPD). Así se ha demostrado que dicha droga se comporta como un inhibidor de tipo competitivo de la adenosín-desaminasa, enzima encargado de la desaminación hidrolítica de la adenosina. Como consecuencia de ello se sugirió que el mecanismo de la acción coronario-dilatadora de dicha droga sería el resultado del acúmulo de adenosina así determinado. Igualmente se demostró que la acción inhibitoria sobre dicho enzima era de mayor intensidad cuando las incubaciones del enzima con el inhibidor, así como las reacciones enzimáticas, eran desarrolladas en un me-

dio ácido, lo cual tenía, además, como traducción una disminución del valor del K_i en relación con el hallado a un valor de pH de 7 (1, 2).

Por otro lado se ha estudiado (3) la influencia del DPD sobre la actividad de los enzimas implicados en la degradación de la glucosa. De esta forma se ha podido comprobar que el DPD se comporta como un inhibidor de la glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa, de tipo competitivo cuando se estudia la cinética enzimática en función de la concentración de sustrato (glucosa-6-fosfato) y de tipo no competitivo cuando se estudia en función de la concentración del cofactor (NADP).

En el presente trabajo se investiga el

mecanismo de dicha inhibición enzimática, estudiando la modificación, por el DPD, del orden aparente de la reacción catalizada por la glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa así como las variaciones del coeficiente de interacción «n» de Hill.

Material y métodos

El enzima (G6PD (EC 1.1.1.49), la glucosa-6-fosfato (G6P) y el NADP han sido obtenidos de Boehringer-Manheim. El dipiridamol (DPD), en su forma pura, ha sido suministrado por Boehringer Sohn.

La actividad enzimática ha sido investigada espectrofotométricamente, persiguiendo el incremento en la absorbancia a $340\text{ m}\mu$, correspondiente a la reducción del NADP. Como velocidad inicial de la reacción enzimática se ha tomado el valor de dicho incremento en la absorbancia ocurrido en el primer minuto de la reacción.

Se ha procedido con la misma sistemática experimental que la descrita en un trabajo anterior (3), sin más variación que las modificaciones de las concentraciones de sustrato y de cofactor, necesarias para poder estudiar ampliamente la cinética enzimática (figs. 1 y 3).

Las incubaciones del enzima con el inhibidor (DPD), así como las reacciones enzimáticas, se han efectuado en tampón fosfato sódico $0,1\text{ M}$ a $\text{pH } 6,5$, por los motivos citados en otro trabajo (3). Todas las incubaciones se han realizado a la temperatura ambiente durante un tiempo de cinco minutos.

La concentración de enzima empleada en todas las experiencias ha sido de $80\text{ }\mu\text{g/ml}$ en las incubaciones, equivalente a una concentración en las cubetas del espectrofotómetro de $0,53\text{ }\mu\text{g/ml}$.

Resultados

En la figura 1 se expresa la cinética enzimática relacionando los valores del co-

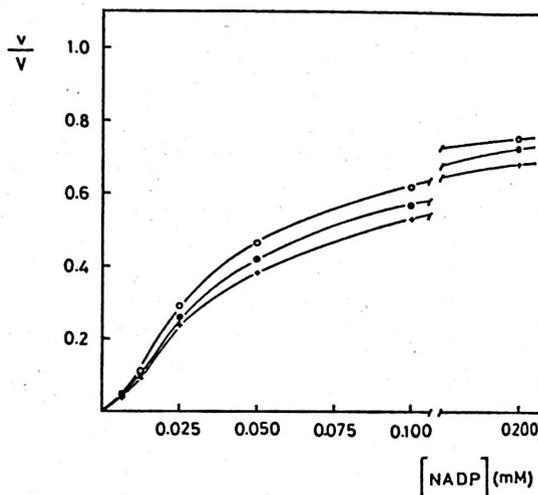


Fig. 1. Relación del coeficiente v/V frente a las concentraciones de cofactor (NADP). Concentración de glucosa-6-fosfato: $0,5\text{ mM}$. Concentración de enzima en las incubaciones: $80\text{ }\mu\text{g/ml}$ de tampón fosfato-Na, $0,1\text{ M}$ a $\text{pH } 6,5$. \circ sin DPD; \bullet DPD $0,05\text{ mM}$; $+$ DPD $0,1\text{ mM}$.

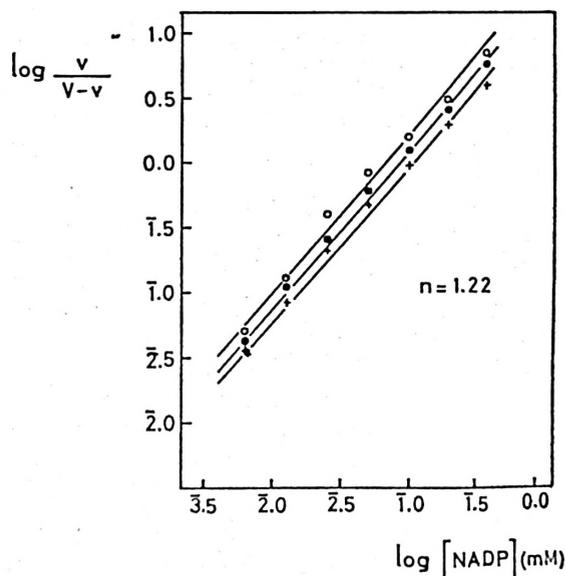


Fig. 2. Representación de Hill. Mismas condiciones experimentales que en la figura anterior. Valor del coeficiente «n» de Hill: 1,22.

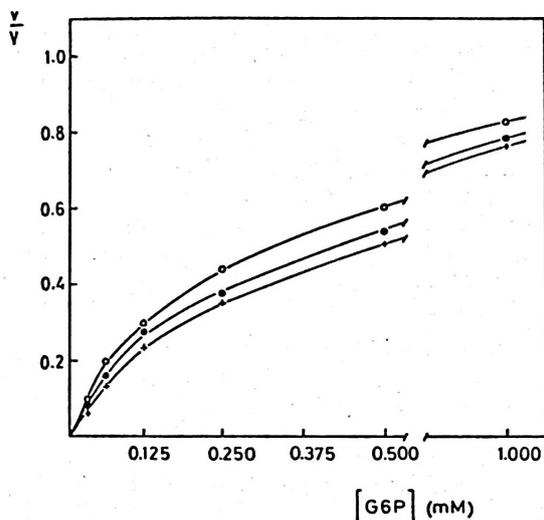


Fig. 3. Relación del cociente v/V frente a las concentraciones de sustrato (G6P).
Concentración de NADP: 0,1 mM. Concentración de enzima en las incubaciones: 80 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de tampón fosfato Na, 0,1 M a pH 6,5. \circ sin DPD; \bullet DPD 0,1 mM; + DPD 0,5 mM.

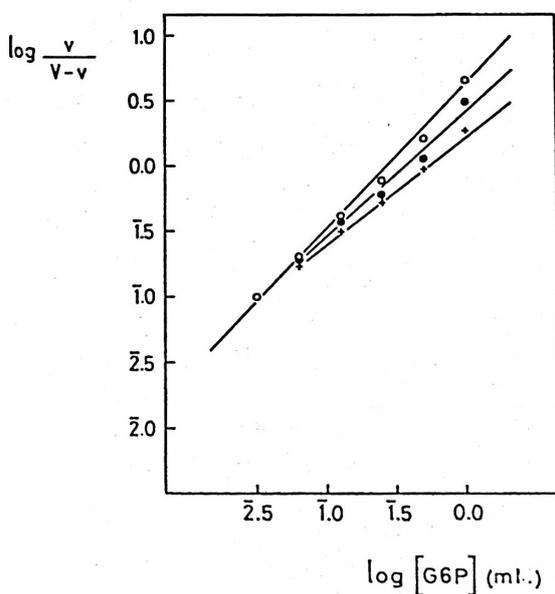


Fig. 4. Representación de Hill.
Mismas condiciones experimentales que en la figura anterior. Valores del coeficiente «n» de Hill: 1,16 en ausencia de DPD, 0,94 en presencia de DPD 0,1 mM y 0,80 en presencia de DPD 0,5 mM.

ciente v/V (obtenidos al dividir los valores de las velocidades iniciales de la reacción por el valor de la velocidad máxima) frente a las concentraciones empleadas de cofactor (NADP). En ella puede comprobarse que las curvas obtenidas son sigmoideas, tanto en ausencia como en presencia de dos concentraciones inhibitoras de DPD.

En la figura 2 se utiliza la representación de Hill con el fin de determinar el valor del coeficiente «n» de interacción. Puede comprobarse que, tanto en ausencia como en presencia de DPD, el valor de «n» no se modifica ($n = 1,22$).

Al representar gráficamente el valor de la relación v/V frente a las concentraciones de sustrato (G6P) se puede observar que la curva obtenida en ausencia de DPD es sigmoidea, pero se hace hiperbólica en presencia de concentraciones 0,1 y 0,5 mM de DPD (fig. 3).

La figura 4, correspondiente a la representación de Hill, demuestra que, en función de las concentraciones de sustrato (G6P), el valor del coeficiente «n» varía desde 1,16, en ausencia de DPD, a 0,94 y 0,80 en presencia de DPD 0,1 y 0,5 mM, respectivamente.

Discusión

Como se deduce de las experiencias anteriormente reseñadas, el DPD no modifica la forma sigmoidea de la curva que expresa la cinética enzimática en función de la concentración de cofactor (NADP), ni altera el valor del coeficiente de interacción «n» de Hill, por lo que parece que dicha droga no modifica el orden aparente de la reacción, a pesar de determinar una inhibición de tipo no competitivo en dichas condiciones experimentales (3).

Por el contrario, cuando se ha estudiado la cinética enzimática en función de las concentraciones de sustrato (G6P), la forma sigmoidea de la curva obtenida en ausencia de DPD se transforma en hiperbólica en presencia de dos concentraciones

nes inhibidoras de DPD y, al propio tiempo, el valor del coeficiente «n» de Hill desciende proporcionalmente a la concentración de DPD. Ello sugiere que el DPD, que se comporta como un inhibidor competitivo en estas condiciones experimentales, determina un cambio en el orden aparente de la reacción.

Resumen

Se estudia la cinética de la reacción catalizada por la glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa en función de las concentraciones de sustrato y del cofactor, con el fin de profundizar en el mecanismo de la acción inhibidora ejercida por el dipiridamol. Se demuestra que, en función de la concentración de sustrato (inhibición de tipo competitivo), el DPD modifica el valor del coeficiente «n» de Hill desde 1,16, en ausencia de él, hasta 0,94 y 0,80 en presencia de

concentraciones del mismo de 0,1 y 0,5 mM, respectivamente; se deduce de ello que el DPD determina un cambio en el orden aparente de la reacción.

Por el contrario, cuando la cinética enzimática ha sido estudiada en función de la concentración de cofactor, el DPD se comporta como un inhibidor de tipo no competitivo y no modifica el orden aparente de la reacción («n» de Hill = 1,22, tanto en ausencia como en presencia de DPD).

Bibliografía

1. SOPENA, M., VIÑA, J., CALDERÓN, J., PALLARDO, F., RODRIGO, F., CANÓS, J. y CABO, J.: *R. esp. Fisiol.*, **26**, 303, 1970.
2. SOPENA, M., VIÑA, J., CALDERÓN, J., PALLARDO, F., RODRIGO, F., CANÓS, J. y CABO, J.: *R. esp. Fisiol.*, **27**, 49, 1971.
3. SOPENA, M., VIÑA, J. y PALLARDO, F.: *R. esp. Fisiol.*, **27**, 217, 1971.