

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

M. Sopena, J. Viña y F. Pallardo

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

(Recibido el 3 de abril de 1971)

M. SOPENA, J. VIÑA and F. PALLARDO. *Kinetics Studies on Glucose-6-phosphate-dehydrogenase. I. Inhibition by Dipyridamol*. R. esp. Fisiol., 27, 217-224. 1971.

It has been investigated the modifications of the activity of the G6PD by DPD; the study of the enzymatic kinetics in function of the substrate concentrations (G6P) has shown that it's a competitive inhibitor.

In the experimental conditions we worked, the value of K_i obtained for DPD is 7×10^{-4} M and the grade of inhibition caused by DPD is 15 % for 0.1 mM and 20 % for 0.5 mM.

When we study the kinetics of the reaction in function of various NADP concentrations, DPD behaves as a non-competitive inhibitor of the G6PD. The obtained values of V_{max} are $0.163 \Delta A_{340} \text{ min}^{-1}$ in absence of DPD, $0.147 \Delta A_{340} \text{ min}^{-1}$ in presence of DPD 0.05 mM and $0.135 \Delta A_{340} \text{ min}^{-1}$ in presence of DPD 0.1 mM.

When the enzymatic kinetics is studied in function of NADP, the value of K_i for DPD is 5.8×10^{-4} M, the grade of inhibition is 10 and 16 % for DPD 0.05 and 0.1 mM respectively.

From these experiences it's concluded that one of the metabolic actions of DPD may be to induce a deviation of glucose degradation into the glucolytic pathway, increasing ATP synthesis.

Present findings are related to that obtained with this drug which acts also as a competitive inhibitor of adenosin-desaminase.

En trabajos realizados sobre corazones normales y corazones sometidos a anoxia experimental, ha sido demostrado que el dipiridamol (DPD) tiene una marcada acción coronario-dilatadora aumentando el flujo sanguíneo a través de dicho sistema arterial (1, 5-7, 15-17). Igualmente se ha comprobado que dicha droga previene las alteraciones electrocardiográficas inducidas por la vasopresina (6) y la ligadura coronaria (4).

Por otro lado, uno de nosotros (11) ha demostrado que el DPD está dotado de una intensa acción bradicardizante, que no está mediada por el bloqueo de los receptores beta-adrenérgicos, sino en parte por un efecto vagal reflejo y, en parte, por un efecto de tipo quinidínico.

Los efectos metabólicos del DPD comenzaron a sospecharse a raíz de la demostración de que protege frente a la intoxicación cianhídrica (2, 3) y de la posi-

bilidad de una acción regeneradora de los coenzimas reducidos de las cadenas respiratorias celulares (4).

Desde el punto de vista metabólico hace algún tiempo que viene atribuyéndose a la adenosina y sus derivados nucleotídicos el papel de mediadores de la vasodilatación provocada por la anoxia, así como por diversas drogas antianginosas. En este sentido, hemos demostrado (9, 12, 13) que el DPD es un inhibidor competitivo de la adenosindesaminasa, formulando la hipótesis de que la acción coronario-dilatadora sea mediada por el acúmulo de adenosina así ocasionado. El papel de mediadores, que se venía atribuyendo igualmente a los nucleótidos adenílicos, hay que referirlo a la adenosina, pues aquéllos se comportan también como inhibidores competitivos de la adenosindesaminasa (8, 14).

Pensando que el DPD pudiese manifestar una influencia sobre la actividad de otros enzimas, se pretende en el presente trabajo iniciar una serie de estudios acerca de las modificaciones de la actividad de los enzimas implicados en la degradación de la glucosa. El motivo de que se haya comenzado por la glucosa-6-fosfatodeshidrogenasa (G-6-P-D), no es otro que la función reguladora que ejerce dicho enzima en las rutas catabólicas de la glucosa, máxime si se tiene en cuenta que la finalidad primordial de la vía glucolítica es la producción de ATP, con todas las implicaciones energéticas, metabólicas y fisiológicas que ello supone.

Material y métodos

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

La actividad enzimática se ha determinado espectrofotométricamente, persiguiendo el incremento de la absorbancia o densidad óptica a 340 m μ , correspon-

diente a la reducción del NADP en NADPH₂. Como velocidad inicial de la reacción enzimática se ha tomado el valor de dicho incremento en la absorbancia ocurrido en el primer minuto de reacción.

Se han realizado tres series de experiencias. En una primera serie (testigos), se han colocado en cinco cubetas del espectrofotómetro, en un volumen final de 3 ml: 2,58 ml de tampón Tris-HCl 0,1 M a pH 7,4; 0,20 ml de una solución 0,1 M de Cl₂Mg y 0,10 ml de una solución de NADP tal que, al añadir la mencionada cantidad a la cubeta, quedaba a una concentración final de 0,1 mM. A cada una de las cinco cubetas se le añadieron 0,1 ml de soluciones de G6P de manera que quedaba, respectivamente, a una concentración de 1; 0,5; 0,25; 0,125, y 0,0625 mM. La reacción ha sido desencadenada en todos los casos, por la adición a cada cubeta de 20 μ l de una solución de enzima que contenía 40 μ g/ml de tampón Tris-HCl 0,1 M a pH 7,4. De esta forma, la cantidad de enzima presente en la cubeta del espectrofotómetro era de 0,26 μ g/ml.

Para investigar la modificación de la actividad enzimática en presencia de DPD, se han realizado incubaciones conteniendo por mililitro: 40 μ g de enzima, DPD a una concentración 0,1 mM y tampón Tris-HCl 0,1 M a pH 7,4. Las incubaciones se han efectuado durante 5 minutos a la temperatura ambiente. Muestras de 20 μ l han sido tomadas de esta incubación, y añadidas a 5 cubetas del espectrofotómetro con igual contenido que en las testigos.

En la segunda serie de experiencias se ha procedido de una forma similar a la descrita pero realizando diversas variaciones en lo que se refiere al tampón, a la concentración del enzima y a la del DPD. Se ha empleado tampón fosfato-Na 0,1 M a pH 6,5, con el fin de favorecer la solubilidad de las pequeñas concentraciones de DPD utilizadas, basándose en los estudios de espectroscopia ultravioleta y visi-

ble realizados con dicha droga (10). Dado que el nuevo pH se desvía del pH óptimo de actuación del enzima, se ha intentado subsanar este defecto aumentando la concentración del enzima en las incubaciones a 80 $\mu\text{g/ml}$. La concentración de DPD ha sido de 0,1 y 0,5 mM en las incubaciones.

Finalmente, en la tercera serie de experiencias, se ha procedido a investigar la cinética enzimática en función de la concentración de NADP así como las modificaciones ocasionadas por el DPD. Para ello, se ha colocado en cinco cubetas del espectrofotómetro en un volumen final de 3 ml: 2,58 ml de tampón fosfato-Na 0,1 M a pH 6,5; 0,20 ml de una solución 0,1 M de Cl_2Mg y 0,10 ml de una solución de G6P tal que, al añadir dicha cantidad, quedaba a una concentración final de 0,5 mM. A cada una de las cubetas se ha añadido 0,10 ml de una solución de NADP tal que éste quedaba, respectivamente, a una concentración final de 0,4; 0,2; 0,1; 0,05, y 0,025 mM. La reacción enzimática se ha desencadenado añadiendo a cada cubeta 20 μl de una solución de enzima, en el mismo tampón, que contenía 80 $\mu\text{g/ml}$. En las incubaciones con DPD se encontraba igualmente a la concentración mencionada y el DPD a las concentraciones de 0,05 y 0,1 mM.

En todas las experiencias se han empleado como blanco cubetas con el mismo contenido que los problemas pero sin enzima.

Resultados

En la figura 1 se representa, por el método de Lineweaver-Burk, la cinética enzimática en función de la G6P, así como la modificación inducida por la previa incubación del enzima con el DPD a una concentración 0,1 mM. El valor de K_m para la G6P es de $7,2 \times 10^{-5}$ M y el valor de la $V_{\max}$ de $0,230 \Delta A_{340} \text{ min}^{-1}$. Puede comprobarse que el DPD se comporta como un inhibidor competitivo, ya que no modifica el valor de $V_{\max}$ pero sí el de K_m .

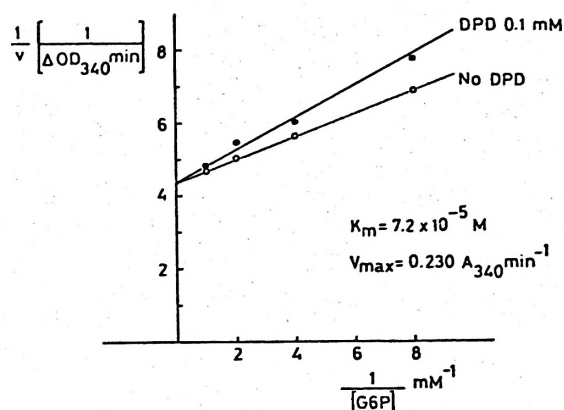


Fig. 1. *Ginética de la reacción catalizada por la G6PD en función de la concentración de G6P.*

Las concentraciones de G6P son las indicadas en la figura. Concentración de NADP = 0,1 mM. La reacción fue desencadenada con 0,26 $\mu\text{g/ml}$ de enzima. En las incubaciones se empleó DPD a una concentración 0,1 mM. Tanto las incubaciones como la reacción han sido realizadas en tampón Tris-HCl 0,1 M a pH 7,4. Para otros detalles, ver Métodos.

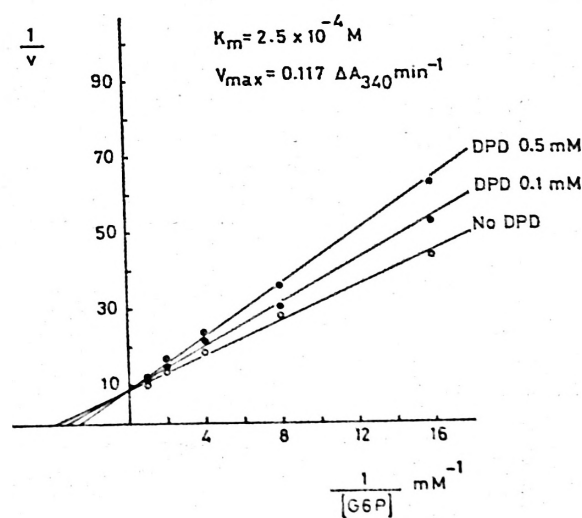


Fig. 2. *Inhibición de la G6PD por el DPD en función de la concentración de G6P.*

Mismas condiciones experimentales que en la figura anterior pero empleando tampón fosfato-Na 0,1 M a pH 6,5. Las concentraciones de DPD en las incubaciones han sido de 0,1 y 0,5 mM.

Estas experiencias se han realizado en tampón Tris-HCl 0,1 M pH 7,4.

Por el mismo método de Lineweaver-Burk, se indica la cinética enzimática en función de la G6P (fig. 2), y la inhibición competitiva determinada por el DPD, utilizando tampón fosfato-Na 0,1 M a pH 6,5. La menor actividad enzimática en esta circunstancia queda reflejada en el valor de K_m para la G6P ($2,5 \times 10^{-4}$ M), mayor que el anteriormente calculado, y en

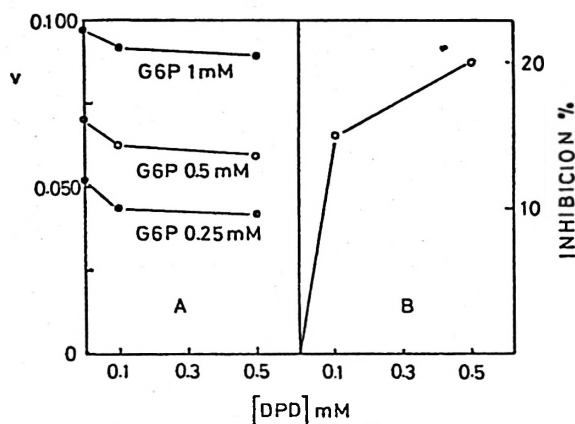


Fig. 3. Inhibición de la G6PD por el DPD. Mismas condiciones experimentales que en la figura anterior. El grado de inhibición alcanzada ha sido del 15 y 20 % para concentraciones de DPD de 0,1 y 0,5 mM.

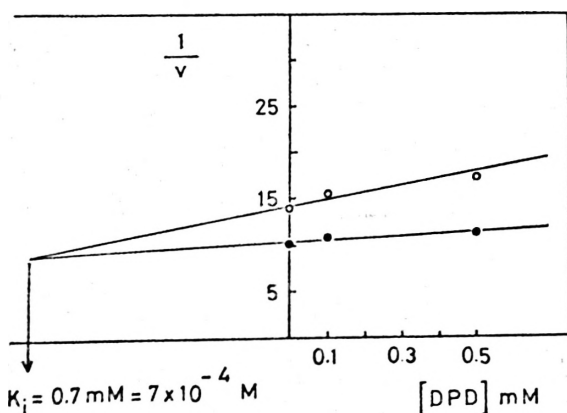


Fig. 4. Representación del valor del K_i del DPD en función de la concentración de G6P, por el método de Dixon.

El valor hallado es de 7×10^{-4} M.

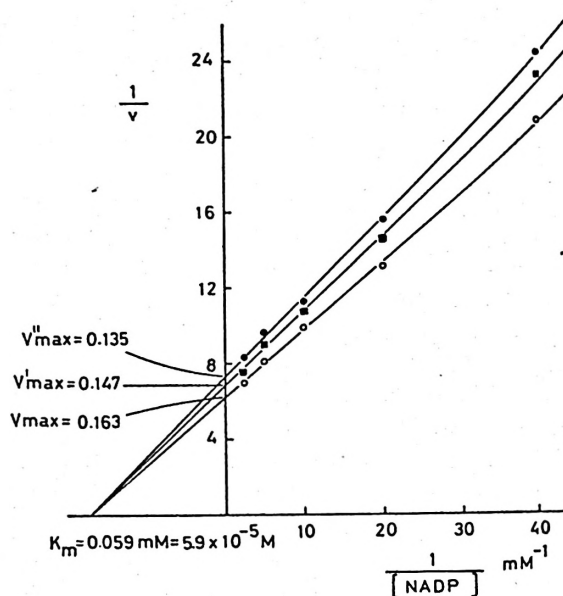


Fig. 5. Inhibición de la G6PD por el DPD en función de la concentración de NADP, representada por el método de Lineweaver-Burk. Las concentraciones de NADP son las expresadas en la figura. Concentración de G6P = 0,5 mM. La reacción ha sido desencadenada por la adición de 0,26 $\mu\text{g/ml}$. ● en ausencia de DPD; ■ DPD 0,05 mM; ○ DPD 0,1 mM. Tanto las incubaciones como la reacción han sido realizadas en tampón fosfato-Na 0,1 M a pH 6,5.

el menor valor de la V_{max} ($0,117 \Delta A_{340} \text{ min}^{-1}$).

En la figura 3, se expresa la inhibición enzimática ocasionada por el DPD, al relacionar la concentración de éste (abscisas) con la velocidad de reacción (ordenadas), utilizando tres concentraciones de G6P. Igualmente queda expresada la inhibición en porcentaje de la actividad enzimática en ausencia de DPD, habiéndose encontrado cifras del 15 y 20 % para las concentraciones de DPD de 0,1 y 0,5 mM, respectivamente.

Utilizando el método de Dixon para el cálculo de K_i del DPD se ha encontrado el valor de 7×10^{-4} M, al estudiar la cinética en función de la G6P (fig. 4).

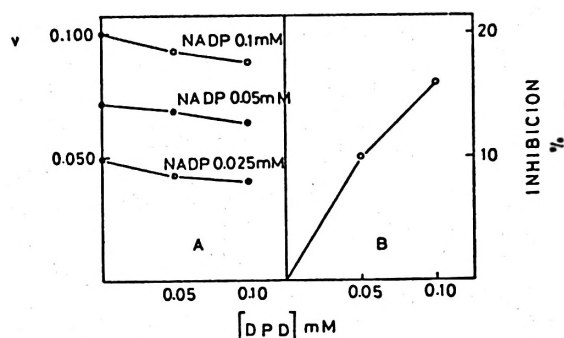


Fig. 6. Inhibición de la G6PD por el DPD en función de la concentración de NADP.

Mismas condiciones experimentales que en la figura 5. La inhibición alcanzada ha sido del 10 y 16 % para concentraciones de DPD de 0,05 y 0,1 mM.

La figura 5 expresa la cinética enzimática por el método de Lineweaver-Burk, en función de la concentración de NADP, así como la modificación ocasionada por el DPD. El valor de K_m hallado para el NADP es de $5,9 \times 10^{-5}$ M y el valor de V_{max} de $0,163 \Delta A_{340} \text{ min}^{-1}$. El DPD se comporta como un inhibidor de tipo competitivo, puesto que no modifica el valor de K_m pero sí el de V_{max} ($0,174 \Delta A_{340} \text{ min}^{-1}$ para una concentración de DPD 0,05 mM y de $0,135 \Delta A_{340} \text{ min}^{-1}$ para DPD 0,1 mM).

La figura 6 muestra la inhibición ocasionada por el DPD, al relacionar al concentración de éste con la velocidad de reacción, utilizando tres concentraciones

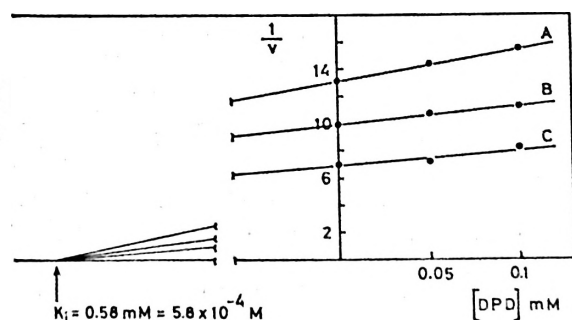


Fig. 7. Cálculo del K_i del DPD en función de la concentración de NADP, por el método de Dixon.

El valor hallado es de $5,8 \times 10^{-4}$ M.

de NADP. Igualmente, queda expresado que, para concentraciones de DPD 0,05 y 0,1 mM, se obtienen inhibiciones del 10 y 16 %, respectivamente.

Utilizando el método de Dixon para el cálculo del K_i , para estudiar la cinética en función del NADP, se obtiene un valor de $5,8 \times 10^{-4}$ M (fig. 7).

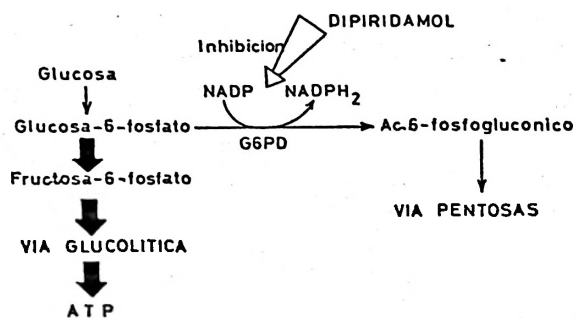
Discusión

De los resultados descritos en el apartado anterior se deduce que el DPD se comporta como un inhibidor de la G6PD, tanto cuando la reacción se estudia en función de la concentración de sustrato como de la concentración de NADP. Sin embargo, en el primer caso, la naturaleza de la inhibición es de tipo competitivo, mientras que en el segundo es de tipo no competitivo.

Estos resultados abren un nuevo campo en el estudio del mecanismo de acción de las diversas drogas antianginosas, y más concretamente del DPD, droga con la que hemos realizado nuestras experiencias. En efecto, la idea hasta ahora apuntada por muchos autores acerca de la acción metabólica de todas estas drogas, como un efecto importante de las mismas, parece desprenderse de estas experiencias.

El hecho de que el DPD determine una inhibición de la G6PD, significaría, desde el punto de vista metabólico, una desviación de la degradación de la glucosa fundamentalmente por la vía glucolítica, cuya finalidad no es otra que la síntesis de ATP (esquema 1).

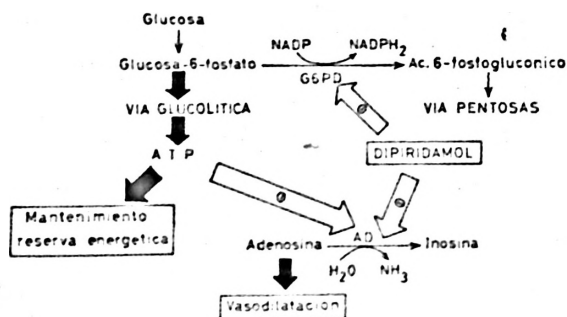
Ello quiere decir que, además de la acción inhibidora de la adenosindesaminasa demostrada por varios de nosotros (9, 12, 13) — como consecuencia de lo cual se produciría un acúmulo de adenosina responsable de la vasodilatación ocasionada por el DPD —, esta droga determinaría un acúmulo de ATP debido a la mencionada desviación de la degradación de la glucosa por la vía glucolítica. Este



Esquema 1. Inhibición de la G6PD por el DPD y de la desviación de la degradación de la glucosa por la vía glucolítica así determinada.

aumento de ATP tendría, a su vez, una doble e importante repercusión: por un lado, el mantenimiento de la reserva energética en zonas sometidas a una situación de anoxia y, por otro, una inhibición de la adenosindesaminasa, como ya ha sido demostrado, igualmente, por varios de nosotros (8, 14), colaborando así a la vasodilatación (esquema 2).

Sin embargo, hemos hallado un valor de K_i para el DPD como inhibidor de la G6PD a pH 6,5 de 7×10^{-4} M. Relacionando dicho valor con el obtenido para dicha droga (9, 12) como inhibidora de la adenosindesaminasa a pH 7 ($1,6 \times 10^{-4}$ M), podemos comprobar que la afinidad del DPD por la G6PD es menor que por la adenosindesaminasa, por lo que se considera la inhibición de este último enzima mencionado como el efecto fundamental de la droga.



Esquema 2. Efectos metabólicos del DPD sobre la G6PD y la adenosindesaminasa (AD).

Resumen

Se han investigado las modificaciones de la actividad de la G6PD por el DPD, demostrándose que se comporta como un inhibidor de tipo competitivo cuando se estudia la cinética enzimática en función de la concentración de sustrato (G6P). El valor del K_i hallado para el DPD en las circunstancias experimentales mencionadas, es de 7×10^{-4} M, y el grado de inhibición ocasionado por el DPD es del 15 % a una concentración 0,1 mM y del 20 % a una concentración de 0,5 mM.

El DPD se comporta, igualmente, como un inhibidor de tipo no competitivo de la G6PD, cuando se estudia la cinética de la reacción en función de la concentración de NADP. Los valores de la V_{max} obtenidos en dichas circunstancias experimentales son: $0,163 \Delta A_{340} \text{ min}^{-1}$ en ausencia de DPD; $0,147 \Delta A_{340} \text{ min}^{-1}$ en presencia de una concentración 0,05 mM de DPD y $0,135 \Delta A_{340} \text{ min}^{-1}$ en presencia de una concentración de 0,1 mM de DPD. El valor de K_i para el DPD, cuando se estudia la cinética enzimática en función de la concentración de NADP, es de $5,8 \times 10^{-4}$ M. El grado de inhibición, a su vez, ha sido del 10 y 16 %, en presencia de concentraciones de DPD de 0,05 y 0,1 mM, respectivamente.

Se deduce de las experiencias citadas, que una de las acciones metabólicas del DPD sería provocar una desviación de la degradación de la glucosa a la vía glucolítica, cuya finalidad es la producción de ATP. Se relacionan estos resultados con los obtenidos con dicha droga como inhibidor de tipo competitivo de la adenosindesaminasa.

Bibliografía

1. AFONSO, S. y O'BRIEN, G. S.: *Physiologist*, 2, 129, 1966.
2. BEDATE, H.: Tesis doctoral, Valencia, 1967.
3. BEDATE, H., SÁINZ, C., BRUGGER, A. y ESPLUGUES, J.: *R. esp. Fisiol.*, 22, 1, 1966.
4. BELLIDO, J., MORATO, F., SOPENA, M.: *Med. Clin.*, 48, 154, 1967.
5. BRUGGER, A., LIUCH, S., MARCO, V. y ESPLUGUES, J.: *Rev. Clin. Esp.*, 98, 401, 1965.
6. BRUGGER, A., SÁINZ, C. y SOTO, L.: *Rev. Clin. Esp.*, 107, 217, 1967.
7. DEUTICKER, B. y GERLACH, E.: *Arch. Pharm. Exp. Path.*, 225, 107, 1966.

8. PALLARDO, F.: Tesis doctoral. Valencia (pendiente de lectura).
9. RODRIGO, F.: Tesina de licenciatura. Valencia, 1971.
10. SOPENA, M.: (Datos no publicados).
11. SOPENA, M., BRUGGER, A. y SALVÁ, J. A.: *Rev. clin. Esp.*, **114**, 473, 1969.
12. SOPENA, M., VIÑA, H., CALDERÓN, J., PALLARDO, F. y RODRIGO, F.: *R. esp. Fisiol.*, **26**, 303, 1970.
13. SOPENA, M., VIÑA, J., CALDERÓN, J., PALLARDO, F., CANOS, J. y CABO, J.: *R. esp. Fisiol.*, **27**, 49, 1971.
14. SOPENA, M., VIÑA, J. y PALLARDO, J.: (Experiencias no publicadas).
15. SPIECKERMANN, P. G., BRETSCHNEIDER, H. J., GREVE, D., KUBLER, W. y ORELLANO, L. E.: *Pflug. Arch. Ger. Physiol.*, **297**, 62, 1967.
16. STAFFORD, A.: *Brit. J. Pharmacol.*, **28**, 218, 1966.
17. STAFFORD, A.: *Nature*, **214**, 390, 1967.

