

Estudio *in vitro* de la inhibición de la Adenosín-desaminasa por el dipiridamol

M. Sopena, J. Viña, J. Calderón, F. Pallardó, F. Rodrigo,
J. Canós y J. Cabo

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

(Recibido el 20 de marzo de 1970)

M. SOPENA, J. VIÑA, J. CALDERON, F. PALLARDO, F. RODRIGO, J. CANOS and J. CABO. *In vitro* Inhibition of the Adenosine-Desaminase by Dipyridamol. R. esp. Fisiol., 26, 303-306, 1970.

It has been studied *in vitro* the antagonism of dipiridamol and adenosin-desaminase. It's concluded that dipiridamol is a competitive inhibitor of adenosin-desaminase. The value of K_i obtained relating the reciprocal value of inicial velocity of the enzymatic reaction with the concentration of dipiridamol is of 0.16 mM. With the concentration of enzyme employed we obtain an inhibition of 46 and 56 % of its activity in presence of concentrations of dipiridamol of 0.3 and 0.6 mM.

Entre los factores que intervienen en la regulación metabólica del flujo coronario, se le ha concedido recientemente una gran importancia a la adenosina y sus derivados nucleotídicos, al comprobarse que están dotados de una marcada acción coronariodilatadora. Como consecuencia de ello, se atribuye a estas sustancias un papel importante como mediadores en la vasodilatación provocada por diversas drogas antianginosas.

De los fármacos que actúan sobre el fisiologismo de las coronarias, el Dipyridamol (DPD) es uno de los mejor estudiados en lo que se refiere a su mecanismo de acción. Como expresión de las investigaciones realizadas hasta ahora sobre los efectos observados tras la administración del DPD, puede deducirse que esta droga está dotada de una doble acción metabólica. Por un lado, es probable que actúe

como un aceptor de hidrógenos de los coenzimas reducidos integrantes de la cadena respiratoria, puesto que se ha demostrado que disminuye el consumo de oxígeno por el miocardio (6) y que protege frente a la intoxicación cianhídrica (3). Por otro lado, se ha demostrado que el DPD tiene un efecto coronariodilatador, puesto que normaliza las alteraciones electrocardiográficas inducidas por la ligadura coronaria (11) y por la previa administración de vasopresina (5). Este efecto parece estar mediado por la adenosina y sus derivados nucleotídicos, puesto que inhibe la adenosín-desaminasa (4, 7, 8) y potencia el aumento del flujo coronario provocado por la adenosina y sus derivados nucleotídicos (1, 2, 10, 12-14).

En el presente trabajo se pretende profundizar en el conocimiento del mecanismo de acción del DPD, estudiando su ac-

ción inhibitoria *in vitro* sobre la hidrólisis enzimática de la adenosina determinada por la adenosindesaminasa.

Material y métodos

El enzima (EC 3.5.4.4) y la adenosina fueron obtenidos de Boehringer Mannheim y el DPD de Boehringer Sohn Ingelheim, respectivamente.

La actividad enzimática ha sido determinada mediante espectrofotómetro Hitachi, modelo 101, persiguiendo el descenso de la absorbancia a $265\text{ m}\mu$, siguiendo a KALCKAR (9). En una cubeta de 1 cm de espesor se colocaron $2,9\text{ ml}$ de una solución 15 a $150\text{ }\mu\text{M}$ de adenosina en tampón fosfato sódico $0,1\text{ M}$ a $\text{pH } 7$ y se añadieron $0,27\text{ }\mu\text{g}$ de enzima por ml .

Para investigar la inhibición del enzima por el DPD se incubaron durante 5 minutos, a la temperatura ambiente, mezclas conteniendo $40\text{ }\mu\text{g}$ de adenosín-desaminasa, $0,3$ a $0,6\text{ mM}$ de DPD y tampón fosfato sódico $0,1\text{ M}$ a $\text{pH } 7$ por mililitro. Muestras de $20\text{ }\mu\text{l}$ fueron tomadas tras el mencionado período de incubación y añadidas a las cubetas del espectrofotómetro conteniendo $2,9\text{ ml}$ de una solución 15 a $150\text{ }\mu\text{M}$ de adenosina en tampón fosfato sódico $0,1\text{ M}$ a $\text{pH } 7$. De esta forma, el enzima añadido a la cubeta quedaba a la misma concentración que en las experiencias testigo ($0,27\text{ }\mu\text{g/ml}$).

Resultados

En la figura 1 se expresa la cinética de la reacción catalizada por la adenosín-desaminasa, en ausencia y presencia de DPD, siguiendo la representación de Lineweaver-Burk y tomando como velocidad inicial de reacción el incremento negativo de la densidad óptica a $265\text{ m}\mu$ (9). El valor de K_m obtenido para la cantidad de enzima empleada ($0,27\text{ }\mu\text{g/ml}$) es de $7,1 \times 10^{-5}\text{ M}$. Este valor queda fuerte-

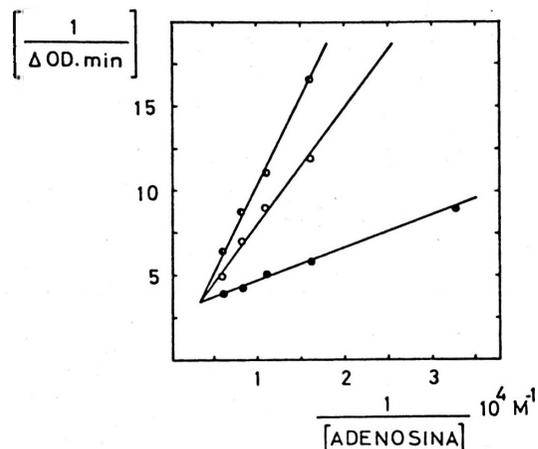


Fig. 1. Relación entre los valores recíprocos de la velocidad de reacción y de la concentración del sustrato.

$V = -\Delta\text{OD. min.}$ ●—● sin DPD; ○—○ $0,3\text{ mM}$ DPD; ◐—◐ $0,6\text{ mM}$. Enzima: $0,27\text{ }\mu\text{g/ml}$.

mente reducido cuando el enzima se ha incubado previamente con diferentes concentraciones de DPD, como corresponde a una inhibición de tipo competitiva.

Las determinaciones de las velocidades iniciales de la reacción enzimática se realizaron empleando una concentración límite de adenosina $150\text{ }\mu\text{M}$ (valor de $0,6 \times 10^4\text{ M}^{-1}$ de la figura 1), puesto que con concentraciones superiores a ésta se observa una inhibición del enzima por el sustrato. Si se expresa la cinética reaccional por el procedimiento de Lineweaver-Burk, a partir de esta concentración límite la representación deja de ser rectilínea para transformarse en curva, debido a una disminución de la velocidad inicial de la reacción que es expresión de la inhibición por el sustrato. No nos ocupamos de este aspecto, puesto que ello será el objetivo fundamental de una publicación posterior.

En la figura 2 puede observarse que si se expresa el valor recíproco de la velocidad inicial de la reacción en función de la concentración del inhibidor (DPD), empleando dos concentraciones del sustrato

próximas al valor de K_m (6×10^{-5} M y 9×10^{-5} M), el valor de K_i hallado es de 0,16 mM.

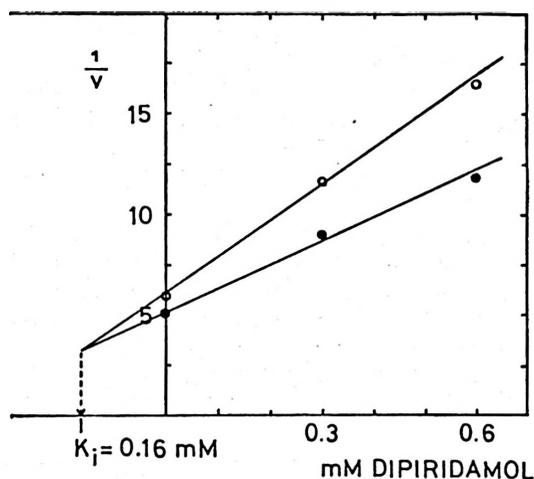


Fig. 2. Inhibición de la adenosin-desaminasa por el DPD.

Relación entre el valor recíproco de la velocidad de reacción y la concentración de DPD. ●—● 90 μ M sustrato; ○—○ 60 μ M sustrato. Enzima: 40 μ gr/ml de mezcla de incubación.

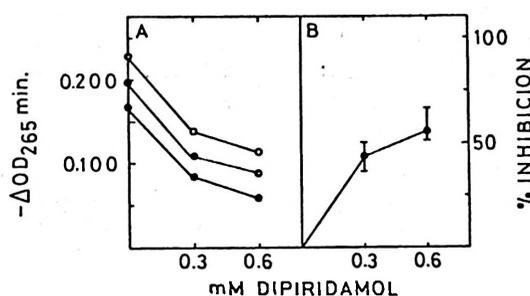


Fig. 3. Inhibición de la adenosin-desaminasa por el dipiridamol.

A. Relación entre el descenso de la densidad óptica a 265 $m\mu$ por min. y la concentración de DPD. ●—● 60 μ M sustrato; ○—○ 90 μ M sustrato; ○—○ 120 μ M sustrato. Cantidad de enzima en mezcla de incubación: 40 μ gr/ml. B. Inhibición en tanto por ciento de la actividad enzimática en función de la concentración de DPD. Mismas condiciones que en A.

En la figura 3 A se puede observar la inhibición enzimática ocasionada por el DPD cuando se expresa el descenso de la densidad óptica a 265 $m\mu$ en función de la concentración del inhibidor, empleando varias concentraciones del sustrato. En 3 B queda expresada esta inhibición en porcentaje de la actividad enzimática desarrollada en ausencia de inhibidor.

Discusión

Los resultados obtenidos confirman la acción del DPD como inhibidor competitivo de la adenosin-desaminasa. Para la cantidad de enzima empleado en nuestras experiencias se consigue una inhibición del 46 y 56 % con concentraciones de 0,3 y 0,6 mM de DPD, respectivamente.

Puesto que actualmente se postula el papel mediador de la adenosina en la vasodilatación coronaria determinada por numerosas drogas antianginosas, no cabe la menor duda de que el DPD interfiere de forma notable en la degradación enzimática de dicha sustancia y que su efecto vasodilatador sea mediado por ella. No obstante, las concentraciones, relativamente elevadas, de DPD que se han empleado hacen presumir que el efecto vasodilatador de este fármaco exija dosis del mismo superiores a las necesarias para conseguir las regeneraciones de los coenzimas reducidos de la cadena respiratoria, efecto éste que consideramos como primario y se pretende demostrar en ulteriores investigaciones.

Por otro lado, el haberse realizado todas las experiencias a un pH 7, no permite sacar conclusión alguna acerca de las variaciones de la actividad enzimática y su inhibición por el DPD en función de las variaciones del pH en que se desarrolla la reacción. Este extremo podría tener un gran interés siempre que el metabolismo miocárdico en situaciones de anoxia va a determinar un acúmulo de metabolitos ácidos. Además, en estas

condiciones, existe una alteración de la permeabilidad de la membrana celular a los electrólitos, constituyendo igualmente este aspecto una hipótesis digna de ser investigada, en el sentido de una modificación de la actividad enzimática y su inhibición por el DPD en presencia de diversos electrólitos.

Finalmente, en sucesivos trabajos se pretende profundizar en el mecanismo de esta inhibición enzimática de la adenosin-desaminasa por el DPD, investigando la posible fijación del mismo sobre los grupos sulfhidrúlicos del enzima o la posibilidad de que dicha droga determine un cambio en la estructura terciaria de la proteína enzimática.

Resumen

Se estudia *in vitro* el antagonismo entre el Dipiridamol (DPD) y la adenosin-desaminasa. El DPD es un inhibidor competitivo de la adenosin-desaminasa. El valor de K_i calculado al relacionar gráficamente el valor recíproco de la velocidad inicial de reacción enzimática con la concentración de DPD es de 0,16 mM. Con las concentraciones de enzima empleadas se obtiene una inhibición del 46 y 56 % de su actividad en presencia de concentraciones de DPD de 0,3 y 0,6 mM.

Bibliografía

1. AFONSO, S., O'BRIEN, G. S.: *Physiologist.*, **9**, 129, 1966.
2. AFONSO, S., O'BRIEN, G. S.: *Circulation Res.*, **20**, 403, 1967.
3. BEDATE, H., SAINZ, C., BRUGGER, A., ESPLUGUES, J.: *R. esp. Fisiol.*, **22**, 1, 1966.
4. BONATI, F.: Conferencia pronunciada en el Congreso Farmacológico. Praga, 1963.
5. BRUGGER, A., SÁINZ, C., SOTO, L.: *Rev. Clín. Esp.*, **107**, 217, 1967.
6. BRUGGER, A., LLUCH, S., MARCO, V., ESPLUGUES, J.: *Rev. Clín. Esp.*, **98**, 401, 1965.
7. BUNAG, R. D., DOUGLAS, C. R., IMAI, S., BERNE, R. M.: *Fed. Proc.*, **22**, 642, 1963.
8. DEUTICKE, B., GERLACH, E.: *Arch. Pharm. Exp. Path.*, **225**, 107, 1966.
9. KALCKAR, H. M.: *J. Biol. Chem.*, **167**, 445, 1947.
10. KUBLER, W., BRETSCHEIDER, H. J., GREBE, D., ORELLANO, L. E.: *Pflug. Arch. Ges. Physiol.*, **297**, 61, 1967.
11. MORATÓ, F. BELLIDO, J., SOPENA M.: *Med. Clín. (Barc.)*, **48**, 154, 1967.
12. SPIECKERMANN, P. G., BRETSCHEIDER, H. J., GREBE, D., KUBLER, W., ORELLANO, L. E.: *Pflug. Arch. Ges. Physiol.*, **297**, 62, 1967.
13. STAFFORD, A.: *Brit. J. Pharmacol.*, **28**, 218, 1966.
14. STAFFORD, A.: *Nature*, **214**, 390, 1967.