

Estudios cinéticos sobre la adenosín-desaminasa. Influencia de la concentración de H^+ sobre la actividad enzimática y su inhibición por el dipiridamol

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

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

(Recibido el 29 de septiembre de 1970)

M. SOPENA, J. VIÑA, J. CALDERON, F. PALLARDO, F. RODRIGO, J. CANOS and J. CABO. *Influence of $[H^+]$ on the Enzymatic Activity of Adenosin-Desaminase and its Inhibition by Dipiridamol*. R. esp. Fisiol., 27, 49-54, 1971.

It has been studied *in vitro* the inhibition of the adenosin-desaminase by the action of DPD at different values of pH. The enzymatic inhibition after 45 minutes of incubation at 37° of the enzyme and the inhibitor is 15, 25, 26, 28, 76 and 78 %, for pH values of 8, 7.4, 6.6, 6.2, 5.6 and 5.2, respectively. When the pH of the incubation mixture is modified from 7 to 5.6, the value of K_i obtained in a previous report (12), is considerably descended from 0.16 mM to 0.025 mM. We advance the interpretation of the dependence of this enzymatic inhibition by the DPD, related to the pH, to certain modifications of the electronic structure of the DPD what are been resarched now.

De la multitud de trabajos aparecidos en los últimos años acerca del mecanismo de acción del dipiridamol (DPD) y otras drogas antianginosas, parece desprenderse la posibilidad de que los efectos desarrollados por ellas, se sitúen a dos niveles. Por un lado, existen numerosas pruebas que inducen a pensar en la actuación del DPD sobre algún enzima o coenzima del recambio intermediario de la fibra muscular cardíaca (3, 6). Por otro lado, se ha demostrado plenamente su acción coronario-dilatadora (1, 2, 4-8, 10, 11, 13-15).

Basándonos en la importancia que se ha concedido recientemente a la adenosina y sus derivados nucleotídicos, como mediadores de la vasodilatación coronaria desarrollada por diversas drogas antiangino-

sas, iniciamos en un trabajo anterior (12) una serie de investigaciones destinadas a estudiar la influencia del dipiridamol sobre la actividad de la adenosín-desaminasa, enzima encargado de la desaminación hidrolítica de la adenosina a la que transforma en inosina. En el mencionado trabajo (12) demostramos que el DPD era un inhibidor competitivo de la adenosín-desaminasa, encontrando un valor de K_i de 0.16 mM en las condiciones experimentales allí descritas. Apuntábamos, entonces, posibles modificaciones en dicha inhibición enzimática condicionadas por variaciones del pH en que se desarrolla la incubación del enzima con el inhibidor, así como la reacción enzimática. Ello tendría gran interés si se tiene en cuenta el hecho de que, en

las situaciones de anoxia, la actividad metabólica miocárdica conduce a un acúmulo de metabolitos ácidos.

En el presente trabajo, pretendemos estudiar *in vitro* las modificaciones de la actividad de la adenosín-desaminasa y de su inhibición por el dipiridamol, en función de las variaciones del pH.

Material y métodos

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

La actividad enzimática ha sido determinada mediante espectrofotómetro Hitachi, modelo 101, persiguiendo la absorbancia a 265 m μ (9). En las experiencias controles, se colocaron en una cubeta de 1 cm de espesor, 2,9 ml de una solución 60 μ M de adenosina en diferentes tampones: acetato sódico 0,1 M a pH 5,2 y 5,6; fosfato sódico 0,1 M a pH 6,2 y 6,6; Tris-HCl 0,2 M a pH 7,4 y 8. En las reacciones desarrolladas a pH 5,6 se empleó también una concentración 90 μ M de adenosina, con el fin de poder hallar el nuevo valor de K_i y poder referirlo al obtenido en nuestro trabajo anterior (12). En todos los casos, se inició la reacción enzimática por adición de 0,13 μ gr/ml de adenosín-desaminasa.

Para el estudio de la inhibición enzimática por el dipiridamol, se incubaron durante períodos variables desde 5 a 45 minutos, a la temperatura de 37°, mezclas conteniendo por ml: 20 μ gr de adenosín-desaminasa y 0,15 μ moles de DPD, en los tampones antes mencionados y que abarcan desde un pH de 5,2 a 8. En las experiencias a pH 5,6 se empleó igualmente dipiridamol a una concentración de 0,3 μ moles por ml de incubación. En todos los casos, muestras de 20 μ l fueron tomadas de la incubación a diversos intervalos de tiempo y añadidas a la cubeta del espectrofotómetro conteniendo el sustrato a

las concentraciones indicadas anteriormente y disuelto en los tampones igualmente citados. De esta forma, el enzima añadido a la cubeta quedaba a la misma concentración que en las experiencias controles (0,13 μ gr/ml).

Resultados

En la figura 1 se relaciona el porcentaje de inhibición de la actividad enzimática y el tiempo de incubación del enzima con el inhibidor. Puede observarse que, a pH 5,2, esta inhibición alcanza valores aproximados del 70 % tras 15 minutos de incubación, valor que posteriormente experimenta un incremento muy ligero a pesar de progresar la incubación. Para un valor del

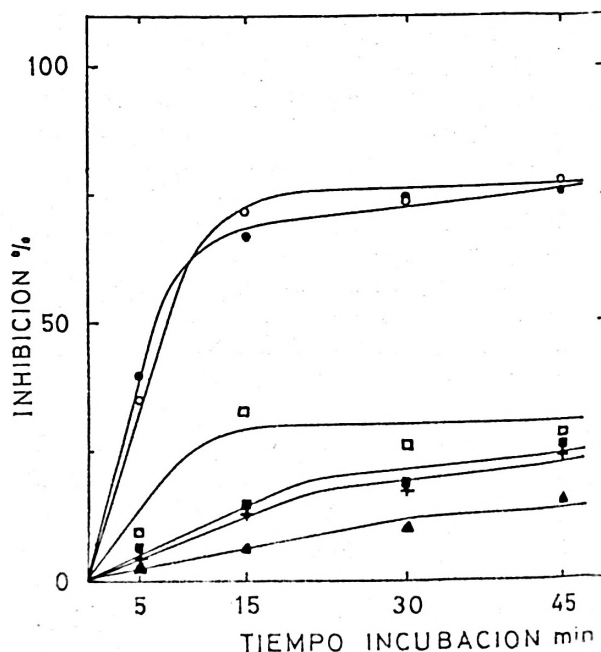


Fig. 1. Inhibición de la adenosin-desaminasa por el DPD a distintos pH.

Las mezclas de incubación contenían por ml.: 20 μ g de adenosin-desaminasa, 0,15 μ moles de DPD y tampón acetato-Na 0,1 M a pH 5,2 y 5,6 o tampón fosfato-Na 0,1 M a pH 6,2 y 6,6 o tampón Tris-HCl a pH 7,4 y 8. Tiempo incubación máximo: 45 minutos a 37° C. Para otros detalles, ver Métodos. Los resultados se expresan en porcentaje de la actividad enzimática sin DPD. ○ pH 5,2; ● pH 5,6; □ pH 6,2; ■ pH 6,6; + pH 7,5 y ▲ pH 8.

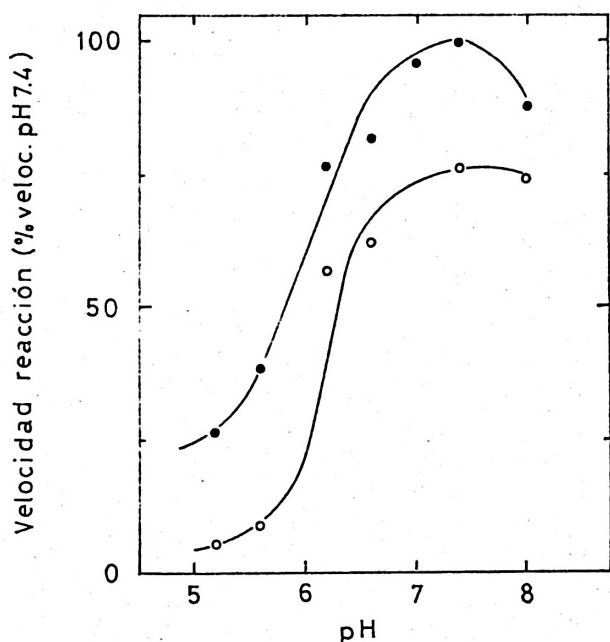


Fig. 2. Curvas de pH-actividad.

Mismas condiciones que las descritas en la figura 1. Las velocidades de reacción están expresadas en porcentajes de la velocidad de pH 7,4, siempre en las mismas condiciones de concentración de enzima, inhibidor y sustrato. ● Sin DPD; ○ Concentración de DPD en incubación: 0,15 μ moles/ml.

pH de 5,6 en la mezcla de incubación, así como en la reacción enzimática, se obtienen resultados muy similares a los descritos, aunque el grado de inhibición alcanzada es algo inferior a medida que avanza el tiempo de incubación.

El perfil de la gráfica de inhibición a pH 6,2 es muy similar al de las dos gráficas precedentes, sin más variación que la inhibición alcanzada tras 45 minutos de incubación, es sólo del 30 %, aproximadamente. El resto de las gráficas de la figura 1 son expresión de la inhibición enzimática investigada a valores de pH de 6,6, 7,4 y 8, observándose cómo el grado de inhibición guarda proporcionalidad con el tiempo de incubación, obteniéndose valores del 26, 25 y 15 %, respectivamente.

La figura 2 corresponde a las curvas de pH-actividad. Habiéndose encontrado el valor de 7,4 como pH óptimo de actua-

ción del enzima, hemos representado en ordenadas las velocidades de reacción enzimática en porcentaje de la velocidad de la reacción a pH 7,4, al que hemos dado el valor del 100 %. Tras la incubación del enzima con el DPD, puede observarse cómo la inhibición ocasionada por éste es notable a valores bajos de pH, correspondientes a los más ácidos, mientras que dicha inhibición va disminuyendo paralelamente con el aumento del pH.

En la figura 3 puede verse igualmente la inhibición enzimática ocasionada por el DPD, en función de la concentración de hidrogeniones. Al relacionar el valor recíproco de la velocidad de reacción con la concentración de H^+ , puede observarse, con mayor claridad que en la figura anterior, que la inhibición determinada por el

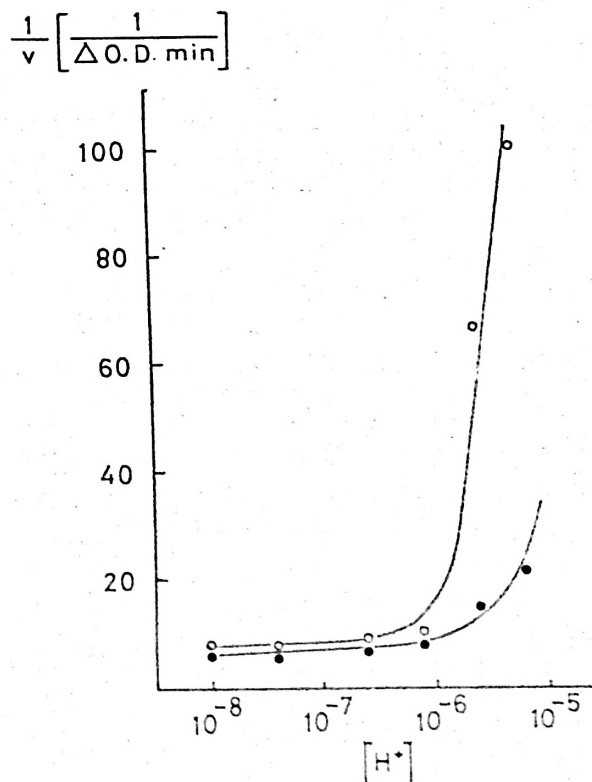


Fig. 3. Relación entre la concentración de hidrogeniones y el valor recíproco de la velocidad inicial de reacción.

Mismas condiciones que en las figuras anteriores. ● Sin DPD. ○ Concentración de DPD en la incubación: 0,15 μ moles/ml.

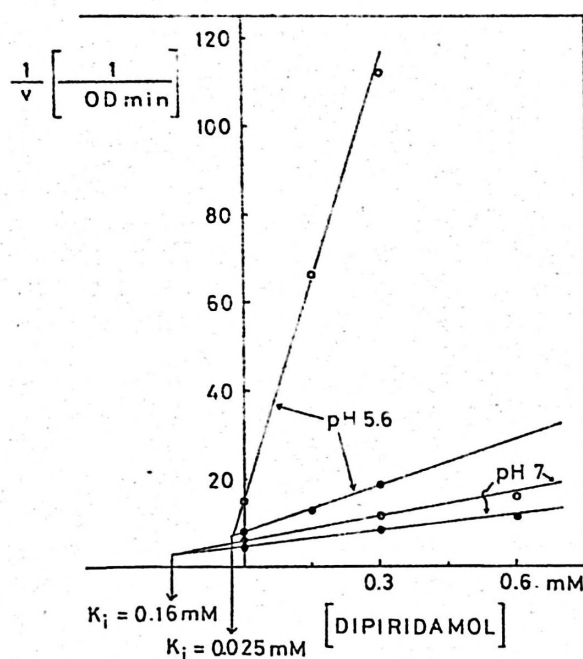


Fig. 4. Relación entre la concentración de inhibidor (DPD) y el valor recíproco de la velocidad inicial de reacción.

Los valores a pH 7 son tomados de un trabajo nuestro anterior (12). Mismas condiciones que en las figuras anteriores. ○ Adenosina 60 μ M; ● Adenosina 90 μ M.

DPD es escasa a concentraciones bajas de H^+ , pero adquiere grandes proporciones al ir haciéndose éstas más elevadas.

En la figura 4 representamos el valor de K_i de 0,16 mM obtenido en un trabajo anterior (12) al realizar la incubación del DPD con el enzima, así como la reacción enzimática, a un pH de 7. En la mencionada figura puede observarse cómo, al descender el valor del pH desde 7 a 5,6, se produce un marcado descenso del valor de K_i hasta 0,025 mM. Este resultado concuerda plenamente con los valores de inhibición enzimática descritos anteriormente.

Discusión

En un trabajo anterior (12) apuntábamos el posible interés del estudio de las

variaciones de la actividad enzimática de la adenosín-desaminasa y su inhibición por el DPD, en función del pH en que se efectúa la mezcla de incubación, así como la reacción enzimática. Este interés nace de la opinión, generalmente admitida, de que la adenosina juega un papel importante en la dilatación coronaria ocasionada por numerosas drogas, máxime si tenemos en cuenta que el metabolismo miocárdico en situaciones de anoxia va a determinar un acúmulo de metabolitos ácidos.

De los resultados descritos en el apartado anterior, se desprende el hecho de que la inhibición enzimática ocasionada por el DPD es mucho más marcada a los valores más bajos de pH correspondientes a las concentraciones más elevadas de H^+ . De hecho, esta inhibición enzimática alcanza valores del 15 al 30 % a pH entre 8 y 6,2 y en las circunstancias experimentales descritas, pero alcanza valores entre 75 y 80 % en las mismas circunstancias, pero a valores de pH comprendidos entre 5,2 y 5,6. Esta manifiesta potenciación de la inhibición enzimática por el DPD, se encuentra en plena concordancia con el hecho expuesto en la figura 4, consistente en un marcado descenso del valor de K_i al modificar el pH de la mezcla de incubación y de la reacción enzimática.

En definitiva, pensamos como mecanismo que nos explique todas estas modificaciones descritas y comentadas, acerca de la actividad de la adenosín-desaminasa y su inhibición por el DPD, una posible variación de la estructura electrónica de algún cromóforo del DPD, dependiente de las variaciones del pH. En la actualidad nos hallamos investigando esta posibilidad aprovechando la intensa absorción que presenta el DPD en las bandas del ultravioleta y visible.

Resumen

Se estudia *in vitro* la inhibición de la adenosín-desaminasa por el DPD a diferentes valores de pH. La inhibición enzimática tras 45

minutos de incubación a 37° del enzima con el inhibidor, es del 15, 25, 26, 28, 76 y 78 %, para valores de pH de 8, 7,4, 6,6, 6,2, 5,6 y 5,2, respectivamente. Al modificar el pH del medio de incubación desde un valor de 7 a 5,6, el valor de K_i obtenido en un trabajo anterior (12) desciende considerablemente desde 0,16 a 0,025 mM. Se atribuye esta dependencia de la inhibición de la adenosín-desaminasa por el DPD, en función del pH, a modificaciones de la estructura electrónica del DPD que se están investigando en la actualidad.

Bibliografía

1. AFONSO, S., y O'BRIEN, G. S.: *Physiologist*, 9, 129, 1966.
2. AFONSO, S., y O'BRIEN, G. S.: *Circulat. Res.*, 20, 403 1967.
3. BEDATE, H., SAINZ, C., BRUGGER, A., y ES-PLUGUES J.: *R. esp. Fisiol.*, 22, 1, 1966.
4. BONATI, F.: Congr. Pharmacol., Praga, 1963.
5. BRUGGER, A., LLUCH, S., MARCO, V., y ES-PLUGUES, J.: *Rev. Clin. Esp.*, 98, 401, 1965.
6. BRUGGER, A., SÁINZ, C., y SOTO, L.: *Rev. Clin. Esp.*, 107, 217, 1967.
7. BUNAG, R. D., DOUGLAS, C. R., IMAI, S., y BERNE R. M.: *Fed. Prof.*, 22, 642, 1963.
8. DEUTICKE, B., y GERLACH, E.: *Arch. Pharm. Exp. Pathol.*, 225, 107, 1966.
9. KALCKAR, H. M.: *J. Biol. Chem.*, 167, 445, 1947.
10. KUBLER, W., BRETSCHNEIDER, H. J., GREBE, D., y ARELLANO, L. E.: *Pflug. Arch. Ges. Physiol.*, 297, 61, 1967.
11. MORATO, F., BELLIDO, J., y SOPENA, M.: *Med. Clin.*, 48, 154, 1967.
12. SOPENA, M., VIÑA, J., CALDERÓN, J., PALLARDO, F., RODRIGO, G., CANOS, J., y CABO, J.: *R. esp. Fisiol.*, 26, 303, 1970.
13. SPIECKERMANN, P. G., BRETSCHNEIDER, H. J., GREBE, D., KUBLER, W., y ORELLANO, L. E.: *Pflug. Arch. Ges. Physiol.*, 297, 62, 1967.
14. STAFFORD, A.: *Brit. J. Pharmacol.*, 28, 218, 1966.
15. STAFFORD, A.: *Nature*, 214, 390, 1967.

