

Actividad adenosín-desaminásica de homogenados de miocardio de ratas normales y pretratadas con dipiridamol

M. Sopena, J. R. Vázquez de Prada y B. Herreros

Departamento de Fisiología y Bioquímica
Facultad de Medicina
(Valladolid)

(Recibido el 29 de marzo de 1972)

M. SOPENA, J. R. VAZQUEZ DE PRADA and B. HERREROS. *Adenosin-desaminase Activity of Myocardium Homogenates in Normal Rats and Pre-treated With Dipiridamol*. R. esp. Fisiol., 28, 189-192. 1972.

It has been studied the adenosin-desaminase activity in myocardium homogenates from normal rats and pre-treated with dipiridamol. The enzyme is inhibited by the drug and it seems to be competitive. At the two concentrations used (50 μg and 100 μg per g weight), the inhibition is 13 % and 27.5 %, respectively. The K_m of the enzyme for the normal rats is 2.2×10^{-4} M. In the treated animals, the K_m is 2.8×10^{-4} M or 4×10^{-4} M.

This inhibitory effect could explain the coronary dilatator action of the dipiridamol.

Finally, these data are related with the results obtained *in vitro* from the previous experiments.

En el curso de una serie de trabajos anteriores, hemos venido investigando la influencia ejercida por el dipiridamol sobre la actividad *in vitro* de la adenosín-desaminasa (10, 11, 15) y de la glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa (14, 14). En el primer sentido apuntado, las conclusiones que pudimos sacar eran que el dipiridamol se comportaba como inhibidor competitivo de la adenosín-desaminasa y que el grado de inhibición por él ocasionado, se incrementaba a medida que se descendía el pH del medio en que se desarrollaban las incubaciones enzima-dipiridamol, así como del medio en que se desarrollaba la reacción enzimática. Ello permitió formular la hi-

pótesis de que la adenosina fuese el mediador químico de la acción coronario-dilatadora de esta droga, tal y como ya había sido demostrado para otras drogas y para los nucleótidos adenílicos (1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 12, 16, 17).

Por otro lado, al estudiar *in vitro* la cinética de la glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa bajo la acción del dipiridamol, encontramos que esta droga inhibía igualmente a este enzima de forma competitiva en función del sustrato y de forma no competitiva en función del cofactor (13, 14). Esta acción del dipiridamol sobre un enzima de oxidorreducción podría estar relacionada con las acciones ya demos-

tradas de que protege frente a la intoxicación cianhídrica (3) y disminuye el consumo de oxígeno por parte del miocardio (6). Por ello, en el presente trabajo, pretendemos estudiar la actividad adenosín-desaminásica en homogenados de miocardio de ratas normales y pretratadas con dipiridamol, con el fin de comprobar si administrando dicha droga *in vivo* se obtienen resultados similares a los ya descritos anteriormente *in vitro*.

Material y métodos

Se han empleado ratas Wistar de ambos sexos, con un peso aproximado de 175-200 gramos. Inmediatamente después del sacrificio se extrae el corazón y se coloca en suero fisiológico a 0-4°. Después de troceado en pequeños fragmentos, se limpia de grasa y conectivo, homogenizándose en buffer fosfato 0,05 M a pH 7, en una proporción de 1:3 (w:c), utilizando un homogenizador Braun. El homogenado se somete a una ultracentrifugación a 0° a $9.500 \times g$ durante 60 minutos, en una ultracentrífuga High Speed 18 MSE. El sobrenadante es el utilizado para la determinación de proteínas y actividad enzimáticas.

La determinación de proteínas se ha realizado por el método de Lowry. La determinación de la actividad adenosín-desaminásica se ha efectuado por el método de KALCKAR (9), consistente en perseguir el descenso de la absorbancia a 265 m μ , correspondiente a la transformación de adenosina en inosina. Como velocidad inicial de la reacción enzimática, se ha utilizado el descenso de la absorbancia en el primer minuto de la reacción.

Este proceder se ha seguido en un primer grupo de 8 ratas testigos y en dos grupos más de igual número de ratas a las que se ha administrado, dos horas antes del sacrificio, 50 y 100 $\mu\text{g/g}$ de peso de dipiridamol por vía intraperitoneal, respectivamente.

Resultados

La figura 1 corresponde a la actividad adenosín-desaminásica de los homogenados de miocardio expresada en descensos de la absorbancia a 265 m μ por minuto, frente a la cantidad de proteínas añadida para desencadenar la reacción. En dicha gráfica, puede comprobarse que la actividad adenosín-desaminásica es menor en los homogenados procedentes de ratas pretratadas con dipiridamol que en los homogenados testigos o controles. Igualmente puede comprobarse que el grado de inhibición alcanzado es proporcional a la dosis de dipiridamol administrada.

La figura 2 corresponde a la actividad adenosín-desaminásica de los homogenados de miocardio en función del tiempo, expresada en descensos de la absorbancia a 265 m μ por mg de proteína añadida para desencadenar la reacción. Los resultados corren paralelos a los descritos en la figura anterior.

Las figuras 3 y 4 corresponden a la ci-

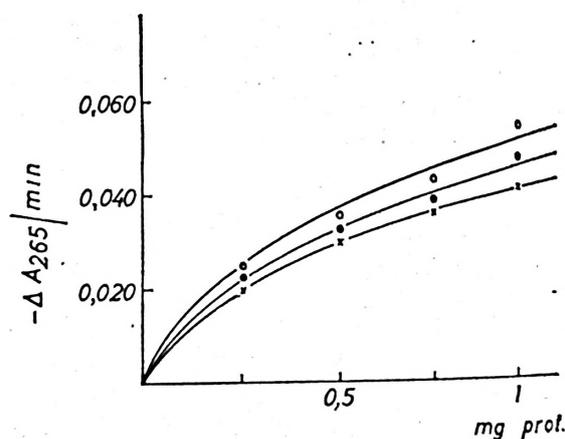


Fig. 1. Relación entre el descenso de la absorbancia a 265 m μ por minuto y la cantidad de proteínas empleada para desencadenar la reacción enzimática.

(○) Homogenados de miocardio de ratas normales. (●) Homogenados de miocardio de ratas tratadas con 50 $\mu\text{g/g}$ de dipiridamol. (x) Homogenados de miocardio de ratas tratadas con 100 $\mu\text{g/g}$ de dipiridamol.

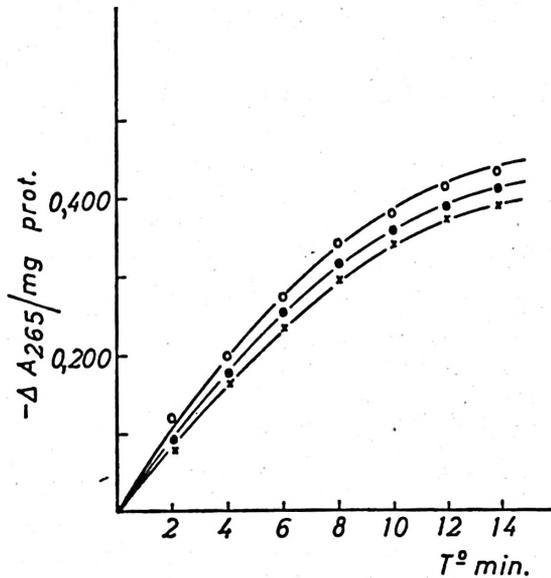


Fig. 2. Relación entre el descenso de la absorbancia por mg de proteína y la duración de la reacción enzimática.

(O) Homogenados de miocardio de ratas normales. (●) Homogenados de miocardio de ratas tratadas con 50 $\mu\text{g/g}$ de dipiridamol. (x) Homogenados de miocardio de ratas tratadas con 100 $\mu\text{g/g}$ de dipiridamol.

nética de la actividad adenosín-desaminásica expresada por los métodos de Michaelis-Menten y Lineweaver-Burk, respectivamente. En dichas gráficas, puede comprobarse la proporcionalidad del grado de inhibición ocasionado por el dipiridamol con la dosis administrada de éste, así como la naturaleza competitiva de la inhibición ocasionada. En efecto, el valor de V_{max} no varía tanto con los homogenados controles como con los homogenados procedentes de ratas pretratadas con dipiridamol. Sin embargo, el valor de K_m se modifica desde $2,2 \times 10^{-4} \text{ M}$ en los homogenados controles hasta $2,8 \times 10^{-4} \text{ M}$ y $4 \times 10^{-4} \text{ M}$ en homogenados procedentes de ratas pretratadas con 50 y 100 μg de dipiridamol por gramo de peso, respectivamente.

Finalmente, la figura 5 revela el grado de inhibición determinado por el dipiridamol en función de la dosis administrada.

Así, la inhibición alcanzada en las ratas inyectadas con 50 μg de dipiridamol por gramo de peso es del 13 %, y la inhibición en las inyectadas con 100 $\mu\text{g/g}$ es del 27,5 %.

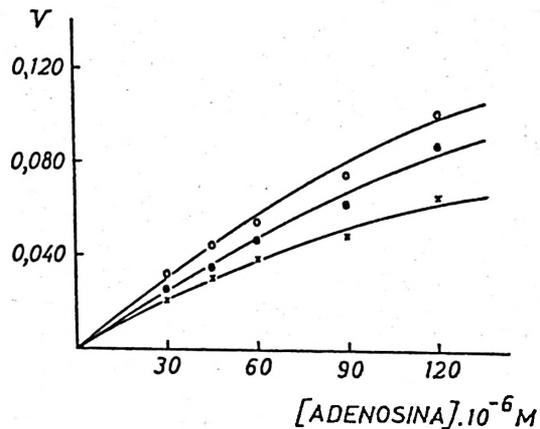


Fig. 3. Cinética de la actividad adenosín-desaminásica expresada por el método de Michaelis y Menten.

(O) Homogenados de miocardio de ratas normales. (●) Homogenados de miocardio de ratas tratadas con 50 $\mu\text{g/g}$ de dipiridamol. (x) Homogenados de miocardio de ratas tratadas con 100 $\mu\text{g/g}$ de dipiridamol.

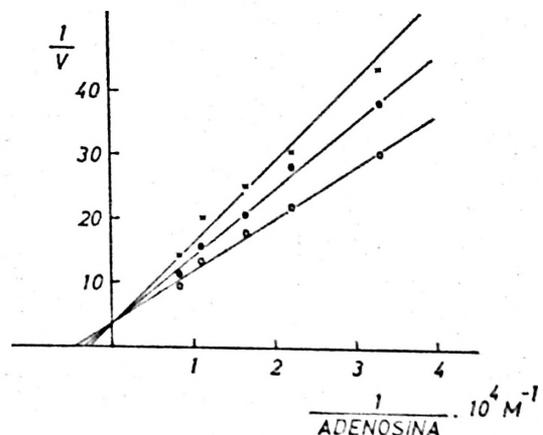


Fig. 4. Cinética de la actividad adenosín-desaminásica expresada por el método de Lineweaver-Burk.

(O) Homogenados de miocardio de ratas normales. (●) Homogenados de miocardio de ratas tratadas con 50 μg g de dipiridamol. (x) Homogenados de miocardio de ratas tratadas con 100 μg g de dipiridamol.

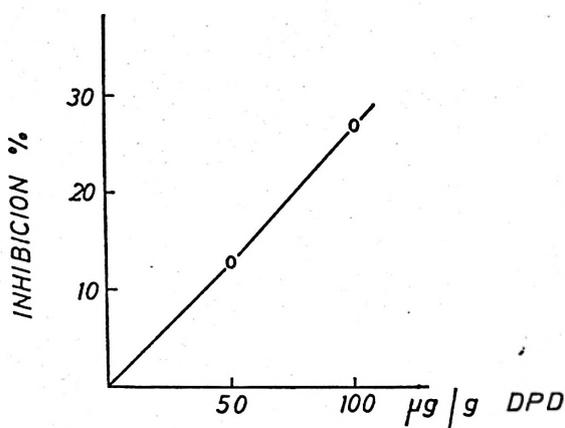


Fig. 5. Inhibición en porcentaje de la actividad adenosín-desaminásica en función de la dosis de dipiridamol administrada.

Para el cálculo de los porcentajes se ha dado el valor de 100 % de actividad a la obtenida en los homogenados de miocardio de ratas testigo no tratadas con dipiridamol.

Discusión

Como apuntábamos anteriormente, desde hace algún tiempo se viene concediendo gran importancia a la adenosina y sus derivados nucleotídicos en la regulación metabólica del flujo coronario, así como en la mediación química de la acción coronario-dilatadora de numerosas drogas antianginosas.

Así, habiendo sido demostrado anteriormente por nosotros que el dipiridamol se comporta *in vitro* como un inhibidor competitivo de la adenosín-desaminasa, hemos pretendido en este trabajo confirmar *in vivo* este efecto, administrando la droga a ratas e investigando la actividad adenosín-desaminásica en homogenados de miocardio. De los resultados descritos en el aparato anterior, puede deducirse la inhibición de tipo competitivo ocasionada por esta droga, atribuyendo a dicho efecto la acción coronario-dilatadora por el acúmulo de adenosina que determinaría.

Resumen

Se estudia la actividad adenosín-desaminásica de homogenados de miocardio de ratas nor-

males y pretratadas con dipiridamol. Esta droga determina una inhibición de tipo competitivo del mencionado enzima, modificando el valor de K_m desde $2,2 \times 10^{-4}$ M en los homogenados controles a $2,8 \times 10^{-4}$ M en los homogenados de ratas tratadas con 50 μ m de dipiridamol por gramo de peso, y a 4×10^{-4} M en los homogenados procedentes de ratas pretratadas con 100 μ g/g. Los valores de inhibición alcanzados son del 13 y 27,5 % en los dos grupos de ratas pretratadas anteriormente mencionados. Se atribuye a este efecto la acción coronario-dilatadora de la droga y se relacionan los resultados con los obtenidos *in vitro* anteriormente en otros trabajos.

Bibliografía

1. AFONSO, S. y O'BRIEN, G. S.: *Physiologist*, **9**, 129, 1966.
2. AFONSO, S. y O'BRIEN, G. S.: *Circul. Res.*, **20**, 403, 1967.
3. BEDATE, H., SÁINZ, C., BRUGGER, A. y ESPLUGUES, J.: *R. esp. Fisiol.*, **22**, 1, 1966.
4. BONATI, F.: Conferencia pronunciada en el Congreso Farmacológico. Praga, 1963.
5. BRUGGER, A., LLUCH, S., MARCO, V. y ESPLUGUES, J.: *Rev. Clín. Esp.*, **98**, 401, 1965.
6. BRUGGER, A., SÁINZ, C. y SOTO, L.: *Rev. Clín. Esp.*, **107**, 217, 1967.
7. BUNAG, R. D. DOUGLAS, C. R., IMAI, S. y BERNE, R. N.: *Fed. Proc.*, **22**, 642, 1963.
8. DEUTICKE, B. y GERLACH, E.: *Arch. Pharm. Exp. Paht.*, **225**, 107, 1966.
9. KALCKAR, H. M.: *J. Biol. Chem.*, **167**, 445, 1947.
10. SOPENA, M., VIÑA, J., CALDERÓN, J. y PALLARDO, F.: *R. esp. Fisiol.*, **26**, 303, 1970.
11. SOPENA, M., VIÑA, J., CALDERÓN, J. y PALLARDO, F.: *R. esp. Fisiol.*, **27**, 49, 1971.
12. SOPENA, M., PALLARDO, F. y CABO, J.: *R. esp. Fisiol.*, **27**, 311, 1971.
13. SOPENA, M., VIÑA, J. y PALLARDO, F.: *R. esp. Fisiol.*, **27**, 217, 1971.
14. SOPENA, M., VIÑA, J., PALLARDO, F. y CABO, J.: *R. esp. Fisiol.*, **27**, 317, 1971.
15. SOPENA, M. y RODRIGO, F.: *Rev. Clin. Esp.*, **123**, 357, 1971.
16. STAFORD, A.: *Brit. J. Pharmacol.*, **28**, 218, 1966.
17. STAFORD, A.: *Nature*, **214**, 390, 1967.