

Efecto de la tolbutamida sobre la actividad transglutaminasa

M. J. Coves, A. Casanovas, A. Sarto, R. Casamitjana, R. Gomis* y E. Vilardell

Servicio de Endocrinología y Diabetes
Laboratorio Hormonal
Hospital Clínico
Universidad de Barcelona
08036 Barcelona (España)

(Recibido el 22 de diciembre de 1986)

M. J. COVES, A. CASANOVAS, A. SARTO, R. CASAMITJANA, R. GOMIS and E. VILARDELL. *Effect of Tolbutamide on Transglutaminase Activity*. Rev. esp. Fisiol., 44 (1), 7-12, 1988.

Five obese patients were studied during 7 days, 750 mg of tolbutamide, *per os*, was given. Blood samples were drawn at basal state and at 3, 5, 7 days during the treatment and 6 days after it. The values of transglutaminase activity (that in the basal state were similar to that in the controls) decreased significantly at the seventh day of treatment (72.3 %). This decrease was transient and rapidly returned to the basal values when the drug was suspended. The results suggest that sulfonylureas exert in part their hypoglucemic effect by modifying the insulin receptor binding through the inhibition of transglutaminase activity.

Key words: Tolbutamide, Transglutaminases, Hypoglucemic effect.

La transglutaminasa (EC 2,3,2,13) es una enzima calcio dependiente que cataliza la formación de puentes de unión entre proteínas (3). Se halla en diversos tejidos y participa en algunos procesos biológicos tales como la coagulación sanguínea (3), la formación del grumo posteyaculación (7), la exocitosis de la insulina (12) y la endocitosis de algunos complejos proteína-receptor (5).

Recientemente se ha descrito que las sulfonilureas hipoglucemiantes ejercen un efecto inhibitor sobre la actividad transglutaminasa *in vitro* (6). Sin embargo,

existe escasa información sobre la acción de estas sustancias *in vivo*.

El presente trabajo tiene por objeto investigar en humanos el efecto de la administración crónica de tolbutamida, sobre la actividad transglutaminasa de los hematíes.

Material y Métodos

Se estudiaron cinco pacientes afectados de obesidad exógena, cuya edad oscilaba entre 32 y 34 años y su peso relativo entre el 150 % y el 180 % del ideal, de acuerdo con las tablas del «Metropolitan Life In-

* A quien debe dirigirse la correspondencia.

surance» (2). Todos ellos dieron su consentimiento por escrito para participar en el proyecto de investigación, que fue aprobado por el Comité de Investigación Clínica del Hospital. Ninguno mostró enfermedad asociada ni relató tomar medicación alguna. Su ingesta calórica fue de 2.200 Kcal, 43 % en forma de carbohidratos desde 3 días antes y durante el estudio.

Después de obtener una muestra de sangre venosa en condiciones basales se inició la administración oral de tolbutamida (750 mg/día, en tres tomas), durante siete días. A los 3, 5 y 7 días del tratamiento y a los seis días de finalizado, se obtuvo una nueva muestra de sangre en condiciones basales.

La sangre se recogió en tubos heparinizados colocados en un baño con hielo y tras centrifugación ($800 \text{ g} \times 10 \text{ min}$ a 4°C) se separó el plasma y los hematíes.

La glucosa plasmática se determinó por un método de glucosa oxidasa (8) y la transglutaminasa de los hematíes de acuerdo con el método que se describe a continuación.

Se tomaron $500 \mu\text{l}$ de hematíes, se lavaron 2 veces con tampón TRIS-ClH (50 mM -pH 7,4) con sacarosa 225 mM de ellos, $200 \mu\text{l}$ se suspendieron en el mismo tampón y se homogenizaron por sonicación (5 veces, 5 s). El homogenado se centrifugó ($2 \text{ min} \times 800 \text{ g}$) y una alícuota ($30 \mu\text{l}$) del sobrenadante se incubó a 37°C durante 30 minutos con $70 \mu\text{l}$ de medio de reacción compuesto en su concentración final (mM) por TRIS-ClH 50 (pH 7,4), sacarosa $67,5$, Ca^{+2} $0,5$ y N-N, dimetilcaseína 1% (peso/volumen; Calbiochem e histamina ($\text{H}^3 - 2,5$) con un contenido de $5 \mu\text{Ci/ml}$. La reacción se paró al añadir $1,0 \text{ ml}$ de ácido tricloroacético (10% peso/volumen). Tras ello, se centrifugó ($4^\circ \text{C} \times 5 \text{ min} \times 800 \text{ g}$) y el precipitado obtenido se lavó 5 veces con ácido tricloroacético (1 ml). Finalizado el lavado, el precipitado se suspendió al añadir $0,5 \text{ ml}$ de NaOH ($0,5 \text{ mM}$) y con 1

ml de H_2O fue transferido a un vial de contaje. El contenido radiactivo se examinó mediante líquido de centelleo.

Todos los resultados se corrigieron respecto a un valor control hallado en presencia de homogenados de hematíes y en ausencia de Ca^{+2} . Los valores de transglutaminasa se expresaron en porcentaje respecto a los valores obtenidos de un control procesado en el mismo experimento. Los datos se presentan como medias $\pm \text{SEM}$.

Para el análisis estadístico se usó la prueba de la t de Student para muestras apareadas.

Resultados

Efecto in vitro de la tolbutamida sobre la actividad transglutaminasa de los hematíes. — Cuando la tolbutamida se añadió al medio de incubación, inhibió la incorporación de la histamina ($\text{H}^3 - 2,5$) a la dimetilcaseína a concentraciones de Ca^{+2} $0,5 \text{ mM}$.

El efecto inhibitorio de la tolbutamida

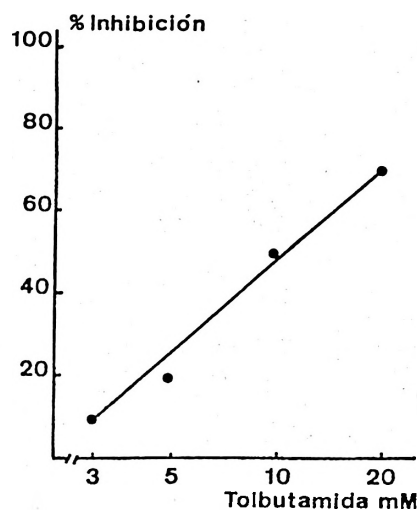


Fig. 1. Efecto in vitro de concentraciones variables de tolbutamida (escala logarítmica) sobre la actividad transglutaminasa en homogenados de hematíes.

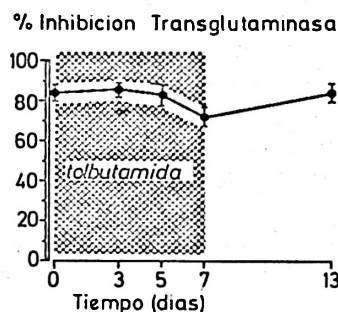


Fig. 2. Efecto de la administración oral de tolbutamida a pacientes obesos sobre la actividad transglutaminasa de hematíes.

está en relación a su concentración en el medio de incubación, siendo más acusado el efecto inhibitorio al añadir concentraciones superiores a 5 mM (fig. 1).

El efecto inhibitorio de la tolbutamida a concentraciones fijas de histamina ($H^3-2,5$) no varió al modificar las concentraciones de Ca^{2+} en el medio (datos no mostrados).

Actividad de transglutaminasa y administración de tolbutamida a pacientes obesos. — La actividad transglutaminasa de los hematíes de pacientes obesos fue de $437,3 \pm 17,1$ pmols/mg Hb/60 min, similar a la referida en individuos con normopeso $432,0 \pm 15,5$ pmols/mg Hb/60 min. Tras la administración de tolbutamida los valores de transglutaminasa disminuye-

ron, siendo de 72,3 %, a los 7 días de tratamiento (valor inicial 86,2 %), descenso con valor estadístico significativo $p < 0,01$ (fig. 2).

Este descenso se detuvo y los niveles de actividad transglutaminasa en hematíes retornaron a los valores iniciales, previos al inicio del tratamiento, a los 6 días de haber suspendido la administración de tolbutamida. Ningún efecto hipoglucémico se observó ni durante ni tras la administración de la tolbutamida (tabla I).

Discusión

Los resultados demuestran que la tolbutamida usada en el tratamiento de la diabetes mellitus tipus II, inhibe la actividad transglutaminasa en homogenados obtenidos de hematíes humanos.

La inhibición de la transglutaminasa por la tolbutamida, estudiada en homogenados de hematíes, ya había sido descrita por SCHRIER y JUNGA (11). Sin embargo, sólo se había referido el efecto a concentraciones de tolbutamida 20 mM sin establecer si había una relación inhibitoria dosis-efecto.

Podría considerarse que la tolbutamida inhibe a la transglutaminasa por un mecanismo competitivo respecto al Ca^{+2} . El hecho de que no hayamos hallado variaciones en el porcentaje de inhibición a distintas concentraciones descarta tal po-

Tabla I. Valores individuales y medios de glucemia (mg %) antes, durante y después del tratamiento con tolbutamida (750 mg/día).

PACIENTE	DIAS				
	0	3	5	7	12
1	95	100	95	98	97
2	93	89	100	92	90
3	99	102	78	78	—
4	91	70	84	83	81
5	180	185	165	195	181
Media $\pm$ SD	98,6 $\pm$ 4,31	109,2 $\pm$ 19,83	104,4 $\pm$ 15,68	109,2 $\pm$ 21,78	112,25 $\pm$ 23, 14

sibilidad. Al no disponer de tolbutamida marcada con un isótopo radiactivo no se ha comprobado si la tolbutamida podría tratarse de un sustrato para el enzima y por tanto su efecto inhibidor ser competitivo respecto a las aminas o poliaminas.

Por otra parte, del análisis de la curva obtenida se desprende que, concentraciones bajas de tolbutamida tales como las que pueden hallarse tras la administración del fármaco en pacientes diabéticos [concentraciones próximas a 40 μ M(13)] no tendrían efecto inhibitorio *in vivo*. Ello es sorprendente, dado que en nuestro estudio la administración de tolbutamida a los obesos objeto de estudio provocó una inhibición significativa de la actividad transglutaminasa de los hematíes. Podría explicarse si admitiéramos que la concentración intracelular de tolbutamida fue superior a la descrita en plasma o que al metabolizarse la tolbutamida se obtuvo un producto con mayor actividad inhibitoria de la transglutaminasa que la referida tolbutamida.

Puede asimismo ser objeto de discusión el considerar si el efecto de la sulfonilurea sobre la enzima es un efecto directo, o mediado por cambios en los niveles plasmáticos de glucosa. Sin embargo, los resultados descartan esta última posibilidad ya que muestran cómo a las dosis de tolbutamida administradas no se observaron cambios en los valores de glucemia.

En conclusión, la inhibición de la transglutaminasa celular por la tolbutamida sugiere que uno de los posibles mecanismos por el que las sulfonilureas ejercen su efecto extrapancreático es a través de la inhibición de la transglutaminasa en determinadas células con receptores diana a la insulina. Así se ha descrito que la transglutaminasa participa en los endocitosis de los ligados proteína-receptor (5). Una inhibición de la transglutaminasa podría llevar a un bloqueo parcial del proceso de endocitosis (2), por ejemplo del complejo insulina-receptor. La lentitud de este proceso podría modificar tanto el

número como la afinidad de los receptores a la insulina (4, 10), como ha sido descrito tras tratamiento crónico por la sulfonilureas (9).

Agradecimientos

Los autores agradecen a R. M. Viaplana su ayuda en la confección del manuscrito y a R. Rosell y A. Gutiérrez su entusiasta colaboración.

Resumen

Se estudia en 5 pacientes obesos el efecto de 1 tolbutamida (750 mg/día, oral, durante 7 días) sobre la actividad transglutaminasa de hematíes, en condiciones basales, a los 3, 5 y 7 días del tratamiento y días después de finalizado éste. Los valores de actividad transglutaminasa disminuyen de forma significativa a los 7 días de tratamiento (72,3 %), pero este descenso es transitorio por normalizarse al suspender la administración del fármaco. Ello sugiere que las sulfonilureas que ejercen en parte su efecto hipoglucemiante al modificar el ligado insulina-receptor podrían modular su acción a través de la inhibición de la transglutaminasa.

Palabras clave: Tolbutamida, Transglutaminasas, Efecto hipoglucémico.

Bibliografía

1. Davies, P. J. A., Davies, D. R., Levitzki, A., Maxfield, F. R., Milhaud, P., Willingham, M. C. y Pastan, I. H.: *Nature*, 283, 162-167, 1980.
2. Documenta Geigy — Tablas científicas, 7.^a edic. 1975, pág. 717.
3. Folk, J. E.: *Ann. Rev. Biochem.*, 49, 517-531, 1980.
4. Koltermen, D. G. y Olefsky, J. M.: *Diabetes Care*, 7, (suppl. 1), 81-88, 1984.
5. Levitzki, A., Willingham, M. y Pastan, I.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77, 2706-2710, 1980.
6. Novak, S. M., Mc. Caleb, M. L. y Lockwood, D. H.: *Metabolism*, 32, 398-401, 1983.

7. Paonessa, G., Metafora, S., Tajana, G., Abrescia, P., De Santis, A., Gentile, V. y Porta, R.: *Science*, 226, 852-855, 1984.
8. Passey, R. B., Gillum, R. L., Fuller, J. B., Urry, F. M. y Gilles, M. L.: *Clin. Chem.*, 23, 131-135, 1979.
9. Pfeifer, M. A., Halter, J. B., Judzewitsch, R. G., Beard, J. C., Best, J. D., Ward, W. K. y Porte, D.: *Diabetes Care*, 7 (suppl. 1). 25-34, 1984.
10. Prince, M. J., Olefski, J. M.: *J. Clin. Invest.*, 66, 608-611, 1980.
11. Schrier, S. L. y Junga, I.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 99, 58-64, 1981.
12. Sener, A., Dunlop, M. E., Gomis, R., Mathias, P. C. F., Malaisse-Lagae, F. y Malaisse, W. J.: *Endocrinology*, 117, 237-242, 1985.
13. Skillman, T. G.: *Diabetes Mellitus* (J. S. Skillman y G. F. Kahill, eds.). Yorke y Medical Books. Nueva York, 1981. pp. 107-118.

