

## Inhibición de la fosfodiesterasa del AMPc por la glipentida y otros antidiabéticos orales

J. García-Rafanell y J. Morell-Mestre

Departamento de Farmacología  
Laboratorios J. Uriach y Cía.  
Barcelona - 13

(Recibido el 24 de junio de 1974)

J. GARCIA-RAFANELL and J. MORELL-MESTRE. *Inhibition of Cyclic 3',5'-Nucleotide Phosphodiesterase by Glypentine and Other Oral Antidiabetic Agents*. Rev. esp. Fisiol., 30, 277-282. 1974.

The effect of nine sulfonylureas and a biguanide on the ox heart and rat brain phosphodiesterase activity has been studied. Enzymatic activity was determined spectrophotometrically at 265 nm, combining alkaline phosphatase and adenosine desaminase, both in higher concentrations than that of phosphodiesterase.

The sulfonylureas studied and the biguanide, show a competitive inhibition on heart and brain PDE. There is a clear relationship between the chemical structure of this compounds and its inhibitory potency, being this inhibition more pronounced for the group of substituted arylamidoethyl sulfonylureas. In this group both the substitution of cyclopentane by cyclohexane on the ureic end of the molecule and/or the m-chloro substitution on the terminal benzene ring increase the inhibitory potency.

No specific inhibitory activity of the studied compounds, on both PDEs has been observed. The greater inhibitory potency always corresponds to glibenclamide; fenformine and tolbutamide are the less active, whereas glypentine, a new oral hypoglycaemic agent, has an intermediate inhibitory effect.

Algunas de las acciones extrapancreáticas atribuidas a las sulfonilureas pueden explicarse a través de la inhibición de la fosfodiesterasa (PDE) de diversos tejidos. Citemos como ejemplos el efecto de la cloropropamida en la reducción de la poliuria en la diabetes insípida (1, 8) y la posible implicación de la tolbutamida en el incremento de la mortalidad cardíaca de los pacientes tratados con esta droga (12).

Se ha descrito que el AMPc y la tolbutamida provocan un incremento de la

contractibilidad de la aurícula aislada de cobaya (4) y de conejo (5), respectivamente; se postula que la tolbutamida al activar la adenilciclase y/o inhibir la fosfodiesterasa del miocardio origina un aumento del AMPc intracelular que sería el responsable del efecto inotrópico positivo antes mencionado. Ello explicaría el incremento de mortalidad cardíaca en diabéticos tratados con sulfonilureas, según se indica en el informe del University Group Diabetes Program (UGDP) (12).

En el presente trabajo se ha realizado

un estudio del poder inhibitor de diversas sulfonilureas y de una biguanida sobre las fosfodiesterasas de corazón de buey y de cerebro de rata, estableciendo una relación estructura-actividad entre ellas y comparando su comportamiento con el de la glipentida (UR-661), hipoglucemiante oral de la serie de las sulfonilureas, sintetizado y estudiado en nuestro Departamento (7, 10). La estructura química de los fármacos en estudio se indica en la tabla I.

Se han empleado dos fosfodiesterasas de procedencias muy distintas al objeto de conocer la posible especificidad de acción de estas drogas y se discuten los resultados obtenidos con la PDE de corazón en relación con la controversia establecida por el informe del UGDP.

### Material y métodos

Se utilizó adenosín-3',5'-monofosfato cíclico (AMPC), adenosín desaminasa (actividad específica: 200 U/mg), fosfatasa alcalina (actividad específica: 300 U/mg) y fosfodiesterasa de corazón de buey purificada (actividad específica: 0,1 U/mg), todos ellos de C. F. Boehringer.

La obtención de la PDE de cerebro de rata se llevó a cabo de acuerdo con el método descrito por HESS *et al.* (3), empleando ratas Sprague-Dawley, machos, de 200-250 g y tampón tris-ClH 0,05 M de pH 7,4. La actividad específica del purificado parcial fue de 85 U/mg P; 1 U corresponde a la cantidad de enzima que provoca la transformación de 1  $\mu$ mol de sustrato (AMPC)/min/ml en las condiciones experimentales descritas. Dicho preparado fue estable a 4° C durante varias semanas. Todas las determinaciones de proteína se llevaron a cabo por el método de LOWRY (6).

La actividad enzimática se determinó de acuerdo con el método descrito por MENAHAN *et al.* (9), combinando la fosfatasa alcalina y la adenosín desaminasa, ambas en exceso con respecto a la PDE.

Este método se basa en la determinación espectrofotométrica de la actividad enzimática, midiendo las variaciones de densidad óptica a una longitud de onda de 265 nm. Las medidas de actividad se llevaron a cabo en un espectrofotómetro Perkin-Elmer, modelo Hitachi 124, provisto de inscriptor automático. Todos los ensayos se realizaron en cubetas de cuarzo de 3 ml de capacidad y de 1 cm de paso de luz, a una temperatura de  $37^{\circ} \pm 0,1^{\circ}$  C y en presencia de tampón tris-ClH 0,05 M de pH = 7,4.

La mezcla en incubación contenía AMPC a concentraciones comprendidas entre  $2 \times 10^{-5}$  M y  $1 \times 10^{-4}$  M, MgSO<sub>4</sub>  $2,7 \times 10^{-4}$  M y el hipoglucemiante en estudio, solubilizado con KOH 0,1 M y posterior dilución con tampón tris-HCl 0,05 M de pH = 7,4, excepto en el caso de la fenformina, que se disolvió directamente con dicho tampón. Las concentraciones finales de los fármacos en estudio estaban comprendidas entre  $3,3 \times 10^{-5}$  M y  $3,3 \times 10^{-3}$  M. La reacción se iniciaba al adicionar 0,3 ml del preparado enzimático correspondiente.

### Resultados

Los valores de  $K_m$  obtenidos para ambas fosfodiesterasas (PDE de corazón de buey:  $K_m = 5,2 \times 10^{-5}$  M; PDE de cerebro de rata:  $K_m = 1 \times 10^{-4}$  M), están en concordancia con los obtenidos por otros autores (3) y corresponden, en el caso del enzima de corazón de buey, a la forma de baja  $K_m$  y, en el caso del enzima de cerebro de rata, a la de elevada  $K_m$ .

La representación gráfica de las inversas de las velocidades frente a las inversas de la concentración del sustrato AMPC, muestran que la fenformina y las sulfonilureas que se han estudiado inhiben a ambas fosfodiesterasas de forma competitiva. En los resultados obtenidos con glipentina (fig. 1) se observa que dicha sulfonilurea y el AMPC compiten por el mismo centro activo del enzima; con los

Tabla I. Constantes de Inhibición ( $K_i$ ) de una biguanida y nueve sulfonilureas \* hipoglucemiantes sobre las fosfodiesterasas de corazón de buey y de cerebro de rata.

	DENOMINACION	ESTRUCTURA QUIMICA	$K_i \times 10^4$ M	
			CORAZON	CEREBRO
BIGUANIDA	FENFORMINA		78	13
BENCENO-SULFONIL-UREAS	TOLBUTAMIDA		21	26
	CLOROPROPAMIDA		17	14
	GLIBORNURIDA		16	11
	GLICAZIDA		14	24
ARIL-AMIDO-ETIL-BENCENO-SULFONIL-UREAS	UR-662		5.80	5.30
	GLIPENTIDA (UR-661)		1.70	3.00
	UR-608		1.30	1.80
	UR-668		0.40	0.45
	GLIBENCLAMIDA		0.25	0.48

(\*) Los compuestos correspondientes a las siglas UR- han sido sintetizados por el Laboratorio de Síntesis de J. Uriach y Cía. S. A.

demás fármacos estudiados se obtuvieron representaciones gráficas del mismo tipo que las obtenidas con glipentida, aunque los valores de  $K_i$  correspondientes son característicos para cada droga.

Existe una estrecha relación entre la estructura química de las sustancias ensayadas y la potencia inhibidora sobre las fosfodiesterasas en estudio (tabla I). La fenformina y las benzenosulfonilureas presentan una acción inhibidora poco acusada y, en el caso de la fenformina, dicha

inhibición es todavía menor al considerar la PDE de corazón de buey. La mayor actividad inhibidora corresponde a los compuestos del grupo arilamidoetilbenzenosulfonilureas, en el que la naturaleza y posición de los sustituyentes en el anillo benzeno terminal, así como la estructura del radical unido al extremo ureico, determinan variaciones considerables en la potencia inhibidora de este grupo de fármacos.

Así, la sustitución de un ciclopentano

por un ciclohexano en el extremo ureico y/o la m-cloro sustitución en el anillo bencénico terminal, incrementan la acción inhibitoria del compuesto sobre ambas PDE; sin embargo, la m-cloro sustitución en el anillo bencénico terminal tiene un efecto más relevante que la sustitución en el extremo ureico.

En el grupo de las bencenosulfonilureas las diferencias en el poder inhibitorio no son tan acusadas como se deduce de los valores de  $K_i$  obtenidos (tabla I), por lo que la relación estructura-actividad es menos evidente.

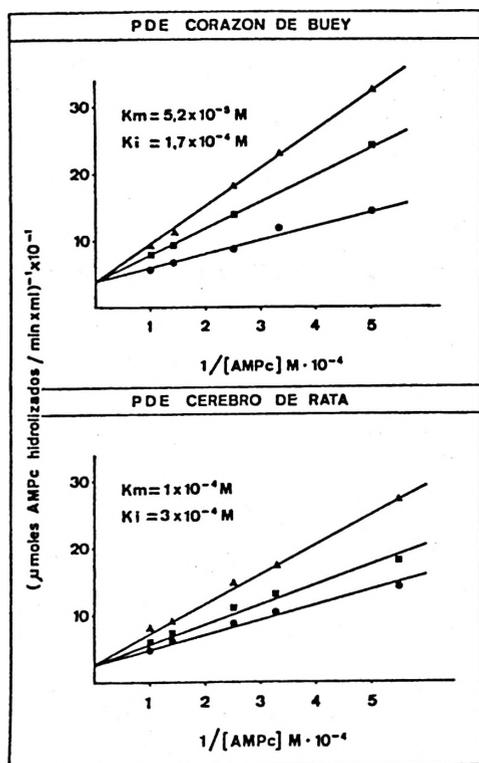


Fig. 1. Representación gráfica de la actividad fosfodiesterásica de corazón de buey y cerebro de rata (Lineweaver-Burk). Inhibición por glipentida.

●: control; ■: glipentida  $1,3 \times 10^{-4}$  M;  
▲: glipentida  $2,6 \times 10^{-4}$  M.

## Discusión

Las experiencias realizadas indican que la inhibición de las fosfodiesterasas en estudio por lo biguanida y las sulfonilureas transcurre, en todos los casos, por competencia del fármaco con el sustrato AMPc.

La inhibición de cada fármaco sobre el enzima de corazón de buey (baja  $K_m$ ) y sobre el enzima de cerebro de rata (alta  $K_m$ ) fue análoga, lo cual sugiere que estos fármacos carecen de propiedades inhibitorias específicas sobre una determinada fosfodiesterasa.

Los estudios sobre la relación estructura-actividad muestran una potencia inhibitoria más acusada en el grupo de las arilamidoetilbencenosulfonilureas, en el que la presencia de un átomo de Cl en su molécula incrementa el poder inhibitorio de forma considerable.

De acuerdo con el informe del UGDP (12), en el que se indica una mayor incidencia de mortalidad cardíaca en pacientes tratados con tolbutamida, y de acuerdo con la sugerencia de que estas alteraciones cardíacas podrían explicarse a través de la inhibición de la PDE del corazón por las sulfonilureas (2, 5, 11), sería deseable que los antidiabéticos orales presentaran una acción inhibitoria mínima sobre dicha PDE. En este sentido, el mayor poder inhibitorio corresponde a la glibenclamida; la toltubamida y la fenformina son las menos activas y la glipentida ocupa un lugar intermedio.

## Resumen

Se ha estudiado la influencia de nueve sulfonilureas y de una biguanida sobre la actividad de las fosfodiesterasas de corazón de buey y de cerebro de rata. La actividad enzimática se determinó espectrofotométricamente a 265 nm, combinando la acción de la fosfatasa alcalina y la adenosín desaminasa, ambas en exceso respecto a la fosfodiesterasa.

Las sulfonilureas estudiadas y la biguanida inhiben de forma competitiva la PDE de co-

razón y de cerebro. Existe una estrecha relación entre la estructura química de las sustancias ensayadas y su potencia inhibidora, que es más acusada en el grupo de las sulfonilureas arilamidoetil sustituida, en las cuales la sustitución de un ciclopentano por un ciclohexano en el extremo ureico y/o la m-cloro sustitución en el anillo bencénico terminal incrementan dicha potencia.

No se ha observado una especificidad de acción de las sustancias estudiadas sobre ambas PDEs. El mayor poder inhibidor corresponde siempre a la glibenclamida; la fenformina y la tolbutamida son las menos activas, mientras que la glipentida, nuevo hipoglucemiante oral, ocupa un lugar intermedio.

### Bibliografía

1. ARDUNIO, F., FERRAZ, F. P. J. y RODRIGUES, J.: *J. Clin. Endocr.*, **26**, 1325, 1966.
2. BROOKER, G. y FICHMAN, M.: *Biochem. Biophys. Res. Com.*, **42**, 824, 1971.
3. CHASIN, M., HARRIS, D. N., PHILLIPS, M. B. y HESS, S. N.: *Biochem. Pharmacol.*, **21**, 2443, 1972.
4. KUKOVETZ, W. R. y POCH, G.: «Advances in Cyclic and Nucleotide Research». Vol. I, Raven Press., New York, 1972, pág. 261.
5. LEVEY, G. S., PALMER, R. F., LASSETER, K. C. y MC. CARTHY, J.: *J. Clin. Endocr.*, **33**, 371, 1971.
6. LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, N. J., FARR, A. L. y RANDALL, R. J.: *J. Biol. Chem.*, **193**, 265, 1951.
7. MARÍN, A., MORELL, J. y URIACH, J.: *Quim. e Ind.*, **17**, 53, 1971.
8. MEINDERS, A. E., TOUBER, J. L. y DE VRIES, L. A.: *Lancet*, n.º 2, 544, 1967.
9. MENAHAN, L. A., HEPP, K. D. y WIELAND, O.: *Eur. J. Biochem.*, **8**, 435, 1969.
10. MORELL, J., SÁNCHEZ, M. S., MENGUAL, V. y URIACH, J.: *XIV Reun. Nat. Soc. Esp. Cien. Fisiol.*, Sevilla, 1973, 22, 3.
11. SIDNEY, M. W., GRANER, L. E., MELKIN, L. M.: *Ann. Inter. Med.*, **75**, 607, 1971.
12. THE UNIVERSITY GROUP DIABETES PROGRAM: *Diabetes*, **19** (Suppl.), 747, 1970.

