

Inhibición de la ureasa por fármacos hipoglucemiantes derivados de la sulfonilurea

J. Herrera, J. Sabater y J. Molina

Sección de Regulación Humoral
Departamento de Bioquímica Clínica
Ciudad Sanitaria «Virgen del Rocío»
Sevilla

(Recibido el 20 de julio de 1976)

J. HERRERA, J. SABATER and J. MOLINA. *Inhibition of Urease by Hypoglycaemic Drugs*. Rev. esp. Fisiol., 33, 37-40. 1977.

The effect of oral hypoglycaemic drugs (derived from sulphonylurea) on urease activity in the quantitative determination of urea has been studied. These compounds have been found to produce a competitive inhibition of enzyme activity with respect to substrate. Possible interference of these antidiabetic agents upon urea analysis is discussed.

El fundamento de la determinación enzimática de urea por la ureasa consiste en la transformación de aquélla en carbonato amónico. Los iones amonio reaccionan con fenol e hipoclorito y forman un color azul de diclorofenol-indofenol cuya intensidad es proporcional a la concentración de urea.

En 1913, MARSHALL (10) empleó por primera vez la ureasa para la determinación cuantitativa de urea en sangre. Desde entonces, esta reacción se ha venido utilizando ampliamente para el cálculo de este parámetro y, en la actualidad, se lleva a cabo incubando el suero en presencia de ureasa según el procedimiento basado en el método de FAWCETT y SCOTT (5) y, posterior, determinación de amoníaco por la reacción de Berthelot (3). Ulteriormente, este método ha sido revisado por CHANEY y MARBACH (4) con resultados excelentes.

Es bien conocido el hecho de que la ureasa se inhibe por la acción de agentes químicos tales como los metales pesados (6-8) y los fluoruros (1), sustancias que pueden interferir en la determinación de urea de muestras biológicas.

El presente trabajo describe la inhibición de la ureasa por drogas relacionadas químicamente con la urea (tolbutamida y clorpropamida, derivados de la sulfonilurea), y, al mismo tiempo, se analiza la posible interferencia de estas sustancias en su determinación.

Material y métodos

El experimento se ha realizado añadiendo tolbutamida, de 9 a 54 mM, al suero y determinando posteriormente la urea.

Tanto la medida de la actividad enzi-

mática de ureasa, como la determinación cuantitativa de urea en suero humano se han realizado según el método de FAWCETT y SCOTT (5), modificado por CHANEY y MARBACH (4). La actividad enzimática se ha expresado en función de la concentración de amoníaco como incremento de absorbancia a 560 nm. El amoníaco se ha calculado mediante la reacción de Berthelot (3) midiendo la absorbancia en cubetas de 1 cm de paso de luz a 560 nm, en un Spectronic 70.

La concentración de proteína se ha calculado según la metodología recomendada por LOWRY *et al.* (9).

La ureasa y urea, así como los reactivos de Berthelot (fenol, hipoclorito sódico, nitroprusiato sódico e hidróxido sódico), se han adquirido de Boehringer-Mannheim. Los compuestos antidiabéticos orales han sido suministrados por los laboratorios Pfizer (clorpropamida) y Hoechst (tolbutamida).

Resultados

La inhibición de la ureasa por la tolbutamida, *in vitro*, es prácticamente total a partir de una concentración 40 mM (fig. 1).

La inhibición producida por la tolbutamida se presenta en la gráfica de los inversos de la velocidad enzimática en función de los inversos de la concentración de sustrato (fig. 2), comprobándose una típica inhibición competitiva de la tolbutamida respecto a la urea.

Tabla I. Efecto de la tolbutamida en la determinación de urea usando la ureasa.

A) Concentración normal de urea en suero (30 mg %). B) Concentración alta de urea en suero (162 mg %).

Tolbutamida en suero mM	Urea en suero (mg %)	
	A	B
—	30	162
9	22	105
18	19	98
36	16	83
54	11	67

La tabla I muestra los valores de urea en suero, obtenidos en presencia de diversas concentraciones de tolbutamida, para una concentración normal de urea en sangre (A), y para una concentración supe-

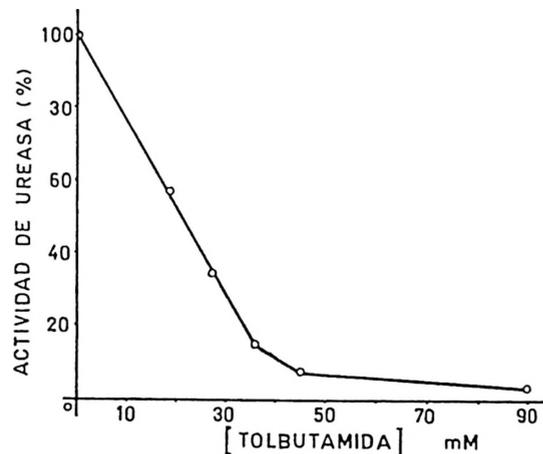


Fig. 1. Inhibición de la actividad enzimática de la ureasa por la tolbutamida.

El enzima se ha incubado durante un minuto con tolbutamida a las concentraciones indicadas y se ha determinado posteriormente su actividad. Ureasa, 0,25 mg/ml de proteína.

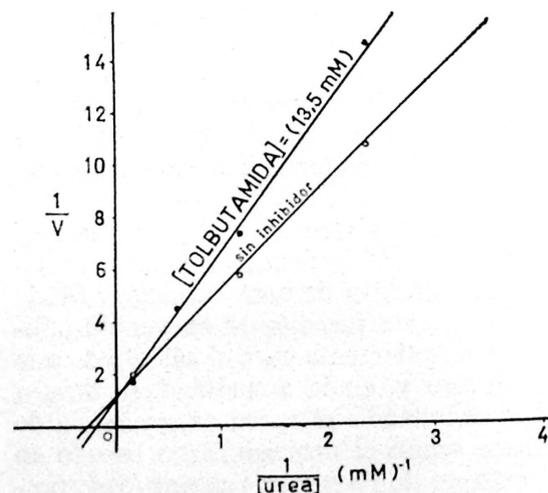


Fig. 2. Representación inversa de la inhibición competitiva de la actividad de la ureasa frente a la urea por tolbutamida 13,5 mM. Ureasa, 0,25 mg/ml de proteína.

rior a los valores normales de esta sustancia en sangre (B). La determinación cuantitativa de urea se afecta de una manera acusada en presencia de tolbutamida, aun para concentraciones relativamente bajas de este compuesto.

Resultados similares a los anteriormente descritos para la tolbutamida se han obtenido con clorpropamida, otro hipoglucemiante oral, derivado, asimismo, de la sulfonilurea.

Discusión

En unas revisiones recientes (2, 11, 12) se estudian las numerosas interferencias que pueden afectar las determinaciones analíticas en Bioquímica clínica, describiendo con respecto a la determinación de urea por la ureasa, que los antibióticos cloranfenicol y estreptomocina inhiben el desarrollo de color (reacción de Berthelot). Por otra parte, se pone de manifiesto que el ácido acetohidroxámico, el timol y el formaldehído son inhibidores de la ureasa por lo que pueden afectar el análisis cuantitativo de urea de muestras biológicas.

En este trabajo se pone de manifiesto que los agentes antidiabéticos orales derivados de la sulfonilurea, tolbutamida y clorpropamida, producen una inhibición competitiva respecto al sustrato del enzima debido a la relación estructural entre la urea y estos agentes hipoglucemiantes. Sin embargo, la inhibición *in vitro* de la ureasa por estos compuestos, podría no ser de gran trascendencia práctica, debido a que las dosis normalmente usadas en la aplicación clínica no suelen ser superiores a los 2 g (7,5 mmoles) de tolbutamida en 24 horas. No obstante, la experiencia *in vivo*, actualmente en fase de investigación, dará la respuesta satisfactoria a esta cuestión.

Resumen

Se ha estudiado el efecto de fármacos hipoglucemiantes derivados de la sulfonilurea sobre la actividad de la ureasa en la determinación cuantitativa de urea. Se ha observado que estas sustancias producen una inhibición de carácter competitivo frente al sustrato de dicho enzima. Se discute la posible interferencia de estas drogas antidiabéticas en el análisis de urea de muestras biológicas.

Agradecimientos

Los autores agradecen a la Dra. M. Atienza, Jefe de Sección de Farmacia de la Ciudad Sanitaria «Virgen del Rocío», de Sevilla, su colaboración en el suministro de las drogas antidiabéticas.

Bibliografía

1. CARAWAY, W. T.: *Amer. J. Clin. Pathol.*, **37**, 445-464, 1962.
2. CARAWAY, W. T. y KAMMEYER, C. W.: *Clin. Chim. Acta*, **41**, 395-434, 1972.
3. CLOTTEN, R.: En «Clinical laboratory», E. Merck, Darmstadt, 1974, p. 98.
4. CHANEY, A. L. y MARBACH, E. P.: *Clin. Chem.*, **8**, 130-132, 1962.
5. FAWCETT, J. K. y SCOTT, J. E.: *J. Clin. Path.*, **13**, 156-159, 1960.
6. GORIN, G. y CHIN, C. C.: *Anal. Biochem.*, **17**, 49-59, 1966.
7. HUGHES, R. B., KATZ, S. A. y STUBBINS, S. E.: *Enzymologia*, **36**, 332-334, 1969.
8. KATZ, S. A. y COWANS, J. A.: *Biochim. Biophys. Acta*, **107**, 605-607, 1965.
9. LOWRY, O. H., ROSEBROUGHT, N. J., FARR, A. L. y RANDALL, R. J.: *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275, 1951.
10. MARSHALL, E. K.: *J. Biol. Chem.*, **14**, 283-290, 1913.
11. REITHEL, F. J.: En «The Enzymes», Volumen 4 (Boyer, P. D., ed.). Academic Press, Nueva York, 1971, p. 1.
12. YOUNG, D. S., PESTANER, L. C. y GIBBERMAN, V.: *Clin. Chem.*, **21**, 371-373 D, 1975.

