

Anal. Real Acad. Farm. 2000, 66:

---

## **Nuevos fármacos antiasmáticos : inhibición selectiva de isoenzimas de la fosfodiesterasa**

JULIO CORTIJO GIMENO

*Departamento de Farmacología.- Facultad de Medicina.-  
Universitat de Valencia.- Avd. Blasco Ibáñez n° 15.- 46010-  
Valencia.- ☎/fax 963864622*

### **RESUMEN**

La identificación de la fosfodiesterasa de nucleótidos cíclicos (PDE), enzima responsable de la destrucción del AMPc y el GMPc intracelular, como punto de acción para las metilxantinas ha originado una creciente actividad investigadora en este campo. Esto ha tenido como resultado la caracterización de múltiples isoenzimas de PDE (PDE1 a PDE 9), su distribución tisular específica, y el descubrimiento y desarrollo de fármacos inhibidores selectivos para algunos de estos isoenzimas.

La disponibilidad de los fármacos inhibidores selectivos de isoenzimas de PDE ha permitido estudios experimentales *in vitro* e *in vivo*, cuyo fin era determinar su valor potencial como fármacos antiasmáticos. Aunque la investigación básica está siendo muy importante, la mayoría de los fármacos inhibidores selectivos de PDE están empezando a someterse a ensayos clínicos para valorar su utilidad en el tratamiento de esta patología. La investigación futura debe dirigirse a conocer mejor la distribución tisular de la PDE y su papel en la fisiopatología, así como para desarrollar mejores (mas selectivas) moléculas inhibidoras de la fosfodiesterasa.

**Palabras clave :** Asma.- Isoenzimas fosfodiesterasa.- Músculo liso vías aéreas.- Células inflamatorias.

## SUMMARY

**Phosphodiesterase inhibitors: antiasthmatic drugs of the future**

The identification of cyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE), the enzyme responsible for the intracellular degradation of cAMP and cGMP, as the target for methylxanthines has given rise to a research effort resulting in the characterization of multiple PDE isoenzymes (PDE 1 to PDE 9), their specific tissular distribution and development of selective inhibitors for some of these isoenzymes.

This bioavailability of these selective PDE isoenzyme inhibitors has permitted studies with regard to their potential value as antiasthmatic drugs. Although the basic research is being intensive, most of the selective PDE isoenzyme inhibitors are beginning to be subjected to clinical trials to assess their usefulness in the treatment of this pathology. Future research should be aimed at ascertaining the tissular distribution of the PDEs and their role in physiopathology, as well as at developing supraselective phosphodiesterase inhibitors.

**Key words :** Asthma.- Phosphodiesterase isoenzymes.- Airways smooth muscle.- Inflammatory cells.

## INTRODUCCIÓN

El asma bronquial es una enfermedad crónica que afecta a todos los grupos de edad constituyendo un importante problema socio-sanitario en los países industrializados, calculándose que alrededor del 6% de la población adulta y el 10% de la pediátrica padece esta patología. En nuestro país la prevalencia de asma se sitúa muy próxima al millón de pacientes siendo posible que exista una cifra similar no diagnosticada y en 1989 presentamos una tasa bruta de mortalidad de 2.8 / 100.000 habitantes (Baos, 1994). Es preocupante la existencia de datos que indican el desarrollo de un incremento en la incidencia, morbilidad y mortalidad por asma, a pesar del elevado consumo de medicación antiasmática.

## ISOENZIMAS DE LA FOSFODIESTERASA

Las diferentes poblaciones que integran los organismos pluricelulares son capaces de coordinarse de una manera integrada mediante, fundamentalmente, señales químicas. En la superficie externa de la célula se encuentran receptores específicos que detectan la llegada de un mensajero y activan una ruta de transmisión que regula, en última instancia, procesos celulares como la contracción, la secreción, el metabolismo o el crecimiento. En la membrana plasmática celular se encuentran los mecanismos que traducen las señales externas en otras internas, transportadas estas por los llamados “segundos mensajeros”.

El AMPc y el GMPc son dos segundos mensajeros intracelulares cuya función es la de regular una gran variedad de procesos fisiológicos y bioquímicos de importancia fundamental en la coordinación de la actividad celular. Dado su papel central en la transmisión de información desde el exterior hasta el interior celular, la alteración patológica de los niveles intracelulares de alguno de dichos segundos mensajeros conducirá a profundas modificaciones funcionales en prácticamente la totalidad de órganos o sistemas. Así, se han descrito alteraciones patológicas en el sistema de transmisión de información en enfermedades cardiovasculares, asma, diversos procesos inflamatorios, depresión, diabetes y cáncer (Torphy, 1991; Beavo, 1995).

Las células eucarióticas contienen múltiples formas de fosfodiesterasa. Las isoenzimas de la fosfodiesterasa (PDE) son un grupo heterogéneo de isoenzimas que catalizan la reacción de hidrólisis de la unión del 3'-fosfoester sobre el AMPc o el GMPc transformando estos segundos mensajeros en sus metabolitos inactivos 5'-nucleótidos (AMP o GMP) controlando así el grado de caída de los mismos (Teixeira, 1997; Torphy, 1998).

Estos isoenzimas difieren en sus características cinéticas y físicas, selectividades por el sustrato (AMPc o GMPc), sensibilidad a activadores e inhibidores endógenos, susceptibilidad y respuesta a la fosforilación por las proteinkinasa, distribución tisular y localización subcelular (Torphy, 1991; Thompson, 1991; Nicholson, 1994; Beavo, 1995; Manganiello, 1995; Teixeira, 1997; Torphy, 1998).

## 1. ESTRUCTURA

Los isoenzimas de la PDE contienen en su estructura tres dominios funcionales:

1) *Cuerpo catalítico* (estable): en la secuencia de las regiones catalíticas de las diferentes familias de PDE existe una considerable similitud (identidad  $\geq 50\%$  a nivel de aminoácidos (aa)).

2) *Extremo N-terminal* (variable): tiene un papel regulador en varias familias de PDE, v.g., posee un dominio de unión a calmodulina en la PDE 1, sitios de unión a GMPc en la PDE 2, lugares de fosforilación para varias proteinkinasa en PDE 1, 3, 4 y 5, dominio de unión a la transducina en PDE 6 y en algunas PDE tiene también un dominio dirigido a la membrana que es importante determinando la compartimentación celular y funcional.

3) *Extremo C-terminal* (variable): su papel funcional específico no está claro todavía, aunque Kovala T. y col. (1997) sugieren que este dominio es importante para la dimerización de PDE 4D1. Al igual que para los extremos N-terminal, las secuencias de aa de estas regiones entre las diferentes familias de PDE son altamente heterólogas (Bolger, 1994; Conti, 1995; Torphy, 1998).

Estos tres dominios están conectados por regiones “bisagra” cuya flexibilidad permite que los dominios N- o C-terminales se plieguen sobre la región catalítica modulando, de este modo, el acceso del sustrato a esta porción. Esto proporciona un mecanismo por medio del cual reguladores alostéricos pueden incrementar o disminuir la actividad enzimática alterando la estructura terciaria del enzima (Conti, 1995; Torphy, 1998)

## **2. CARACTERÍSTICAS Y CLASIFICACIÓN**

Actualmente se reconocen 9 familias de isoenzimas de la PDE, algunas de las cuales poseen múltiples subtipos, que han sido agrupadas de acuerdo a su especificidad por el sustrato y sus características reguladoras:

TABLA 2.

ISOENZIMAS DE LA PDE				
Familia (Inhibidores)	Mecanismos de regulación			Subtipos
	Moleculares	Hormonales	Km ( $\mu$ M)	
<b>PDE 1</b> Ca <sup>2+</sup> /CaM activada (Vinpocetina)	Ca <sup>2+</sup> /calmodulina Fosforilación	Agonistas muscarínicos colinérgicos	AMPc $\geq$ GMPc (1-30) (3)	3
<b>PDE 2</b> GMPc estimuladas (EHNA)	GMPc	ANF Óxido nítrico	GMPc < AMPc (50) (50)	1
<b>PDE 3</b> GMPc inhibida (Milrinona)	GMPc Fosforilación	Insulina Glucagón Dexametasona	GMPc $\sim$ AMPc (0.3) (0.3)	2
<b>PDE 4</b> AMPc específica (Rolipram, RO 20-1724)	AMPc (expresión génica) Fosforilación	TSH FSH Agonistas $\beta$ - adrenérgicos	GMPc $\gg$ AMPc ( $>3000$ ) (4)	4
<b>PDE 5</b> GMPc específica (Zaprinast, Sildenafil)	GMPc Fosforilación	ANF	AMPc $\gg$ GMPc (150) (1)	1
<b>PDE 6</b> GMPc específica	Transducina (proteína G)	Luz	AMPc $\gg$ GMPc (2000) (60)	4
<b>PDE 7</b> AMPc específica no inhibida por rolipram (IBMX)	Mg-independiente	No se conocen	GMPc $\gg$ AMPc ( $>1000$ ) (0.2)	1
<b>PDE 8</b> AMPc específica (Dipiridamol)	No se conocen	No se conocen	AMPc $\gg$ GMPc (0.05) ( $>1000$ )	1
<b>PDE 9</b> GMPc específica (SCH1866)	No GMPc Fosforilación	No se conocen	GMPc $\gg$ AMPc (0.1) ( $>1000$ )	1

(\*) Modificada de Schudt, 1999.

## ***2.1. Clase 1***

Denominadas también PDE  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulina estimuladas porque su actividad hidrolítica sobre los nucleótidos cíclicos es estimulada o incrementada por el  $\text{Ca}^{2+}$  y la calmodulina (Nicholson, 1994; Torphy, 1998). Estos reguladores aumentan la  $V_{\max}$  (velocidad máxima de reacción en reacciones enzima-sustrato: en cinética enzimática, es la velocidad de reacción obtenida en condiciones de saturación del enzima por el sustrato para unas condiciones determinadas de pH, temperatura y fuerza iónica) de hidrólisis de los nucleótidos cíclicos o reducen el  $K_m$  (constante de Michaelis-Menten: concentración de sustrato para la que la velocidad de una reacción enzimática es la mitad de la máxima. Es una medida de la afinidad del enzima por el sustrato) o simultáneamente incrementan la  $V_{\max}$  y reducen el  $K_m$ , determinando diferencias cinéticas entre las diferentes isoformas (Nicholson, 1994).

La actividad de la PDE 1 también está modulada por la fosforilación proteinkinasa-inducida AMPc-dependiente (PDE 1A) y por la calmodulinkinasa 3 (PDE 1B), lo cual disminuye la afinidad de la PDE 1 por la  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulina y consecuentemente atenúa la actividad enzimática (Nicholson, 1994; Torphy, 1998)).

## ***2.2. Clase 2***

Se caracterizan porque su actividad hidrolítica sobre los nucleótidos cíclicos es estimulada alostéricamente por la presencia de otros nucleótidos cíclicos, así la hidrólisis de GMPc por los isoenzimas PDE 2 es incrementada por la presencia de AMPc y recíprocamente la hidrólisis de AMPc es aumentada por la presencia de GMPc (Nicholson, 1994; Torphy, 1998).

A concentraciones fisiológicas estos isoenzimas de PDE 2 parece que actúan más como PDE AMPc-estimulada por GMPc: esta estimulación de la hidrólisis del AMPc es consecuencia de un

incremento en la afinidad por el sustrato con pequeños cambios en  $V_{\max}$  (Nicholson, 1994).

### **2.3. Clase 3**

La característica principal de las isoenzimas de la PDE 3 es la de poseer una alta afinidad ( $\downarrow K_m$ ) tanto para AMPc como para GMPc y que el GMPc actúa a concentraciones muy bajas como un inhibidor competitivo, uniéndose al centro activo del enzima, de la hidrólisis del AMPc: tanto AMPc como GMPc son sustratos para estas isoenzimas pero la  $V_{\max}$  para la hidrólisis del AMPc es mucho mayor que la del GMPc. El GMPc actúa como sustrato para la hidrólisis mediada por PDE 3 y como un inhibidor de la caída del AMPc por estas isoformas sobre el mismo rango de concentración (Nicholson, 1994; Torphy, 1998).

La actividad fosfodiesterasa está también regulada por la fosforilación por las proteínquinasas: los dos subtipos de PDE 3 son sustratos para la proteínquina-A (PKA), siendo además PDE 3B también sustrato para las proteínquinasas insulín-sensibles. La fosforilización de estos isoenzimas por estas kinasas aumenta su actividad enzimática (Nicholson, 1994; Schudt, 1995; Torphy, 1998).

### **2.4. Clase 4**

Poseen una elevada actividad para la hidrólisis del AMPc. El GMPc ni modula la hidrólisis del AMPc ni es un sustrato para estos isoenzimas y solamente seleccionados subtipos de PDE 4D, aquellos que contienen un lugar consensuado para la fosforilación por PKA dentro del dominio N-terminal, son activados a través de la vía de la PKA (Nicholson, 1994; Schudt, 1995; Torphy, 1998).

### **2.5. Clase 5**

Hidrolizan específicamente el GMPc aunque no todas las isoenzimas de esta familia tienen una elevada afinidad por este nucleótido cíclico, pero todas tienen baja actividad hidrolítica para el AMPc (Nicholson, 1994).

Este isoenzima es fosforilado tanto por la PKA como por la proteínkinasa GMPc-dependiente (PKG) (Thomas, 1990a, 1990b), siendo la PDE 5 el primer sustrato fisiológico descrito para la GMPc-kinasa (Nicholson, 1994); aunque la relevancia funcional de esta fosforilación es desconocida, podría conducir a incrementar su actividad enzimática (Burns, 1992; Torphy, 1998).

### **2.6. Clase 6**

Hidrolizan selectivamente el GMPc. En un principio los tipos PDE 5 y 6 se agruparon en una única familia, pero tras el esclarecimiento de la estructura primaria de la PDE 5 en pulmón (Francis, 1988; McAllister, 1993) se puso de manifiesto que la PDE 5 y la PDE 6, que se expresa fundamentalmente en la retina (Li, 1990; Collins, 1992; Khramsov, 1993) son estructuralmente distintas y, por lo tanto, se separaron en dos familias diferentes.

### **2.7. Clase 7**

Son enzimas que hidrolizan el AMPc específicamente y, como en el caso de la PDE 4, el GMPc no tiene ningún efecto. Todavía no se han identificado inhibidores selectivos de este isoenzima, siendo resistente a todos los inhibidores estándar de las PDE como la milrinona o el rolipram, que son inhibidores específicos de la PDE 3 y PDE 4 respectivamente o como 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX) que es un inhibidor no selectivo (Michaeli, 1993; Torphy, 1998). Se expresa abundantemente en músculo esquelético, lo cual sugiere una posible implicación en el control de la contracción (Michaeli, 1993).

### **2.8. Clase 8**

Son enzimas que hidrolizan el AMPc específicamente y, como en el caso de la PDE 4, no presenta ningún actiador/inhibidor bioquímico. Se han identificado inhibidores selectivos de esta isoenzima, el dipiridamol, siendo resistente al IBMX (Schudt, 1999).

### **2.9. Clase 9**

Son enzimas que hidrolizan el GMPc específicamente y, pero al contrario que la PDE 5, no presenta ninguna unión al cGMP. Se han identificado inhibidores selectivos de esta isoenzima, el SCH1866 (Schudt, 1999).

## **3. DISTRIBUCIÓN TISULAR**

En estas nueve familias de isoenzimas de la PDE se reconocen más de 25 isoformas distintas, muchas de las cuales se encuentran diferentemente distribuidas en diferentes tipos celulares.

Es importante tener presente esta distribución tisular de las isoenzimas de la PDE a la hora de ensayar fármacos inhibidores, selectivos o no selectivos, de la PDE en el sentido tanto de la persecución de acciones terapéuticas sobre enfermedades específicas como en el de la posible aparición de efectos secundarios o colaterales. Así hay numerosos estudios que documentan la presencia de isoenzimas de la PDE I en corazón y SNC; PDE 2 en hígado, corazón, SNC, plaquetas, piel, etc; PDE 3 en corazón, músculo liso, hígado, adipocitos, etc; PDE 4 en SNC, células inflamatorias, sistema reproductivo, piel, etc; PDE 5 en retina, tejido pulmonar, músculo liso vascular, etc. (Beavo, 1990; Nicholsson, 1991; McAllister, 1993); PDE 6 se expresa fundamentalmente en retina (Li, 1990; Collins, 1992; Khramsov,

1993) y PDE 7 que se expresa abundantemente en músculo esquelético (Michaeli, 1993).

TABLA 1

ISOENZIMA PDE	DISTRIBUCIÓN TISULAR
1	Corazón, SNC, hígado, riñón, adipocitos.
2	SNC, corazón, hígado, músculo liso vía aérea, riñón, etc.
3	Corazón, plaquetas, músculo liso, riñón hígado, etc.
4	Músculo liso, células inflamatorias, cerebro, hígado, etc.
5	Retina, músculo liso, plaquetas, etc.
6	Retina
7	Músculo esquelético

#### 4. LOS NUCLEÓTIDOS CÍCLICOS EN LAS VÍAS AÉREAS

Estudios realizados con diferentes inhibidores de isoenzimas de la PDE aportan datos indicativos de que éstos poseen el potencial de interferir con las funciones de casi todos los tipos celulares presentes en el tejido de las vías aéreas, demostrando que el AMPc y la PKA están implicados en la regulación de la activación celular. Estos estudios nos indican, además, que las células inflamatorias, células inmunes o células del músculo liso reaccionan diferentemente a inhibidores selectivos de la PDE y estarían, por lo tanto, diferentemente equipadas con isoenzimas de la PDE 1-5 (Schudt, 1995).

##### 4.1 Músculo liso

*Los nucleótidos cíclicos a nivel del músculo liso de las vías aéreas median una relajación o disminución de su tono muscular.*

Así pues, podemos perseguir esta acción última a través de un aumento en el contenido intracelular de los nucleótidos cíclicos bien incrementando su velocidad de formación o bien disminuyendo su velocidad o rango de degradación: los activadores de la adenilatociclasa (como los agonistas  $\beta$ -adrenérgicos,  $\text{PGE}_2$ ,  $\text{PGI}_2$ ), uniéndose a receptores celulares de superficie y a través de una proteína de unión guanina-nucleótido, y los activadores de la guanilatociclasa (como los nitrovasodilatadores y el factor relajante derivado del endotelio), activando directamente una guanilatociclasa sin interactuar con ningún receptor de superficie celular, aumentan la velocidad a la que el  $\text{Mg}^{2+}$ -ATP es convertido a AMPc; mientras que los inhibidores de isoenzimas de la PDE actuarían disminuyendo el rango de degradación de los nucleótidos cíclicos por estas isoenzimas hacia sus metabolitos inactivos 5'-nucleótidos. Los nucleótidos cíclicos, AMPc y GMPc, actúan sobre sus enzimas diana intracelulares (PKA y PKG) las cuales una vez activadas median las respuestas fisiológicas a los nucleótidos cíclicos fosforilando y cambiando de esta manera la actividad de los substratos llave (como enzimas y sistemas de transporte de iones) implicados en la regulación del tono del músculo liso (Torphy, 1991, 1998).

Los incrementos en el contenido de AMPc y GMPc producirán, pues, la relajación del músculo liso de las vías aéreas por dos mecanismos generales:

- 1) El aumento de las concentraciones de nucleótido cíclico AMPc conduce a una disminución del  $\text{Ca}^{2+}$  libre citosólico: por disminuir la movilización del  $\text{Ca}^{2+}$  desde depósitos intracelulares, inhibiendo la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular, estimulando la salida de  $\text{Ca}^{2+}$ , estimulando el secuestro de  $\text{Ca}^{2+}$  dentro de los lugares de depósito intracelulares.
- 2) La activación por AMPc y GMPc de las cascadas de fosforilación de proteínas puede inhibir directamente la activación de las proteínas contráctiles.

Varias de estas vías bioquímicas parecen ser activadas simultáneamente y actúan de una forma coordinada para reducir el

tono del músculo liso de la vía aérea (Torphy, 1991; Nicholson, 1994).

Además hay datos recientes que sugieren que el AMPc puede relajar el músculo liso vía activación de la PKG. Todavía no se sabe claramente la relativa importancia de los diferentes mecanismos de acción del AMPc sobre la maquinaria contráctil, y el mecanismo por el cual el GMPc atenúa la contracción en el músculo liso de las vías aéreas todavía está menos claramente definido (Nicholson, 1994; Torphy, 1998).

La distribución o presencia de los diferentes *isoenzimas de la PDE* en el músculo liso de las vías aéreas humanas varía ligeramente según el tejido considerado: en el *tejido bronquial* encontramos isoenzimas de la PDE tipo I, 3, 4 y 5, mientras que en el *tejido traqueal* se han encontrado las isoenzimas I<sub>α</sub>, I<sub>β</sub>, 2, 3, 4 y 5 (Torphy, 1991).

#### **4.2. Células inflamatorias**

Las células inflamatorias más claramente asociadas con el asma son los mastocitos (en los primeros estadios del ataque asmático); neutrófilos, macrófagos y eosinófilos (en las fases tardías del ataque asmático); y los linfocitos-T (en el asma crónico). También hay comunicaciones que señalan que basófilos, monocitos, plaquetas y células endoteliales, juegan un papel en la inflamación asmática (Nicholson, 1994; Torphy, 1998).

*En las células inflamatorias humanas los nucleótidos cíclicos tienen una generalizada influencia supresiva.*

El AMPc actúa como un mensajero inhibitorio de la producción y liberación del mediador inflamatorio, además de inhibir otras funciones que incluyen quimiotaxis, citotoxicidad y agregación celular (Torphy, 1991; Nicholson, 1994; Moore, 1995; Teixeira, 1997; Torphy, 1998). Aunque hay poca información acerca del mecanismo específico que media este efecto, parece ser debido a mecanismos múltiples: al igual que en el músculo liso, uno

de los mecanismos implicados aquí sería un efecto inhibitorio sobre el aumento en el  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico, el cual es un disparador para algunas actividades celulares, incluyendo la producción y liberación de mediadores. Sin embargo, también hay evidencias de que el AMPc puede inhibir la liberación del mediador en ausencia de grandes cambios en las concentraciones citosólicas de  $\text{Ca}^{2+}$ : en el caso de la biosíntesis de eicosanoides, se ha sugerido que la activación de la cascada del AMPc puede causar directamente inhibición de uno o más enzimas en la vía biosintética -v.g. fosfolipasa  $\text{A}_2$ - (Torphy, 1991; Nicholson, 1994; Al-Essa, 1995; Schudt, 1995).

Todavía se conoce mucho menos del papel del GMPc en la regulación de la célula inflamatoria y su efecto parece ser modesto en comparación con el profundo efecto inhibitorio del AMPc (Torphy, 1991; Nicholson, 1994; Schudt, 1995; Torphy, 1998).

Parece que el *isoenzima de la fosfodiesterasa* responsable de la hidrólisis del AMPc *dominante en todas estas células* es la PDE 4, con *excepción de las plaquetas* en las cuales predominan PDE 3 y PDE 5 (Nicholson, 1994; Schudt, 1995, 1999) (Tabla 3).

TABLA 3

ISOENZIMA PDE PREDOMINANTE	CELULA HUMANA
4	EOSINÓFILO, NEUTRÓFILO
4	MONOCITO
4 = 3 = I	MACRÓFAGO LAVADO BRONCOALVEOLAR
4 = 3	MASTOSCITO
4 = 3	LINFOCITO T
4	LINFOCITO B
1 = 4	CÉLULAS EPITELIALES
5	PLAQUETAS
3 = 4 = 5	MÚSCULO LISO BRONQUIAL

*En resumen, al menos dos efectos terapéuticamente beneficiosos podrían, potencialmente, resultar de la inhibición de la actividad fosfodiesterasa y la consecuente elevación en las concentraciones intracelulares de AMPc o GMPc en células llave interesadas en la patología del asma: efecto broncodilatador y antiinflamatorio.*

## 5. INHIBIDORES SELECTIVOS

Se han desarrollado un gran número de inhibidores de isoenzimas de la PDE con diferente grado de selectividad por las mismas: *inhibidores de primera generación*, son inhibidores no selectivos (v.g. teofilina); *inhibidores de segunda generación*, son fármacos capaces de inhibir selectivamente una determinada familia de isoenzimas, algunos de ellos son de tipo mixto ya que inhiben con potencias similares a dos isoenzimas; *inhibidores de tercera generación*, serían fármacos suprselectivos capaces de inhibir isoformas o subfamilias de un determinado isoenzima de la PDE. Recientemente, la aplicación de la biología molecular para la identificación de nuevas PDE presenta tanto una oportunidad sin precedentes como una desconcertante complejidad para el descubrimiento de nuevos fármacos (Villagrasa, 1995; Torphy, 1998).

A la hora de valorar el efecto de estos inhibidores selectivos, hay una serie de factores que hay que tener en cuenta: muchos de estos agentes poseen sitios de acción adicionales; un determinado inhibidor selectivo puede incidir, al aumentar los niveles de un nucleótido cíclico, sobre la actividad de isoenzimas de la PDE distintos al primitivamente inhibido; *in vivo*, la velocidad de recambio de los nucleótidos cíclicos está aumentada y los efectos de los inhibidores de isoenzimas de la PDE son mucho mayores sobre sus niveles que en los experimentos realizados *in vitro* (Hall, 1993; Torphy, 1991)

### **5.1. Tipo 1**

El número de comunicaciones sobre estudios centrados en inhibidores selectivos de la PDE I es muy escaso, por tanto no son todavía bien conocidos. Entre ellos podemos citar al KS-505a, W-7, fenotiacinas (Torphy, 1998) y vinpocetina (Nicholson, 1994; Torphy, 1998).

La vinpocetina muestra alguna selectividad, pero es poco potente y su mecanismo de acción múltiple reduce su utilidad para analizar la función de la PDE I (Nicholson, 1994).

### **5.2. Tipo 2**

Igualmente que en el caso anterior, los inhibidores selectivos de la PDE 2 están poco referenciados; Podzuweit y col. (1992) comunicaron la inhibición de PDE 2 con MEP-1, pero no aportaron datos sobre su estructura química ni sobre sus efectos fisiológicos y Torphy (1998) señala al erythro-9-(2-hydroxy-3-nonyl)adenine (EHNA) como inhibidor selectivo de PDE 2.

### **5.3. Tipo 3**

Se han sintetizado muchos inhibidores de la PDE 3, entre los que cabría citar al siguazodan, Org 9935, cilostazol, cilostamide, (f)enoximone, milrinona y trequinsin (Nicholson, 1994; Torphy, 1998).

Su potencial terapéutico se presenta fundamentalmente por su acción vasodilatadora, inotrópica y antiagregante plaquetaria, debido al aumento de AMPc que producen en vasos sanguíneos, miocardio y plaquetas (Kereiakes, 1984; Jaski, 1985; Murray, 1990; Villagrasa, 1995).

En la vía aérea, los inhibidores de la PDE 3 han mostrado poseer efectos relajantes del músculo liso. Estudios realizados en distintas especies animales sugieren que la PDE 3 sería más

importante en tejidos en los que predominan los receptores  $\beta_1$  - adrenérgicos (músculo liso traqueal de cerdo), mientras que la PDE 4 predomina en tejidos con una mayor población de receptores  $\beta_2$  - adrenérgicos (músculo liso de vía aérea bovino y humano). Otros estudios realizados sobre tráquea canina muestran que los  $\beta$ -agonistas potencian las acciones de los inhibidores de la PDE 3 y 4, pero esta sinergia de acción no está tan clara en el músculo liso de la vía aérea humana ya que el efecto es pequeño y variable debido probablemente a efectos de los  $\beta$ -agonistas independientes del AMPc (Torphy, 1998).

Los efectos de la administración a corto plazo de inhibidores de la PDE 3 se han examinado en pacientes con EPOC, notándose un ligero descenso en la resistencia pulmonar (Leeman, 1987). Sin embargo no parece que constituyan una alternativa razonable al uso de estimulantes  $\beta$  - adrenérgicos en la terapéutica del asma bronquial ya que carecen de actividad antiinflamatoria y tampoco afectan la permeabilidad microvascular en modelos animales (Torphy, 1998).

#### **5.4. Tipo 4**

Numerosos estudios, tanto *in vitro* como *in vivo*, demuestran que los inhibidores de la PDE 4 poseen efectos antiinflamatorios y broncodilatadores, lo que les confiere un potencial terapéutico por el cual son y han sido ampliamente estudiados, disponiendo actualmente de un gran número de estos compuestos como BRL-61063, CP-80633, denbufilina, Ro 20-1724, rolipram (pertenecientes a la primera generación) y CDP-840, RP 73401, SB 207499 (representantes de la segunda generación) (Teixeira, 1997; Torphy, 1998).

*El hecho de que la PDE 4 sea la enzima predominante en las células inflamatorias, y que, además, participe en la relajación del tono muscular de la vía aérea, sugiere que los inhibidores de la PDE 4 pueden ser de utilidad en la terapéutica del asma.*

Entre los inhibidores de 1º generación de la PDE 4 contamos con el rolipram, el cual produce una relajación del tono espontáneo e inducido por histamina y metacolina en el músculo liso de la vía aérea humana (Cortijo, 1993a), y además parece que juega un papel funcional importante en células inflamatorias (Dent, 1990; Nielson, 1990); en experimentación *in vivo* se ha mostrado efectivo para prevenir el aumento de la permeabilidad microvascular, inducido por diversos agentes, en cobayos tanto por vía intravenosa como inhalatoria (Ortiz, 1992, 1993; Cortijo, 1994).

Aunque se han realizado estudios clínicos con inhibidores de la PDE 4 de 1º generación, (v.g. ensayo de la actividad antidepressiva de rolipram), no se ha podido evaluar adecuadamente su potencial actividad terapéutica por la aparición de efectos secundarios (náuseas, vómitos, hipersecreción ácida gátrica) a dosis inferiores a las necesarias para la obtención de los efectos terapéuticos (Teixeira, 1997; Torphy, 1998). Recientes estudios de biología molecular sobre la estructura de la PDE 4 sugieren que coexisten dos conformaciones distintas de PDE 4 catalíticamente activas, una de las cuales une al rolipram a la porción catalítica con alta afinidad (HPDE 4) y por tanto su actividad es inhibida por bajas concentraciones de rolipram, y otra que se une al rolipram con baja afinidad (LPDE 4) y por tanto sólo es inhibida con concentraciones muy elevadas de este compuesto; los efectos terapéuticos de los inhibidores de la PDE 4 parecen relacionados con la inhibición de LPDE 4, mientras que los efectos secundarios estarían relacionados con la inhibición de HPDE 4 (Jacobitz, 1996; Rocque, 1997; Souness, 1997; Torphy, 1998).

Así pues, de acuerdo con todo esto, la 2ª generación de inhibidores de la PDE 4 se ha sintetizado buscando disminuir su afinidad por HPDE 4 o aumentar su afinidad por LPDE 4 o ambas (Torphy, 1998), y actualmente contamos con algunos de estos inhibidores que ya se están ensayando clínicamente como posibles agentes antiastmáticos, en concreto RP73401 y SB207499 se

encuentran en la fase 2 y LAS31205 en la fase 3 del estudio clínico (Teixeira, 1997).

### **5.5. Tipo 3 / 4**

Estos compuestos inhiben ambas isoenzimas a concentraciones similares, y entre ellos tenemos zardaverina, benzafertrina (AH 21-132) y Org 30029 (Torphy, 1998).

Los inhibidores duales 3 / 4 se han mostrado relajantes del músculo liso de vías aéreas muy potentes y efectivos (tanto sobre tono basal como inducido por agonistas histamínicos o muscarínicos) y en macrófagos alveolares humanos, donde se han identificado isoenzimas de la PDE 3 y 4, produjeron una inhibición casi total de esta actividad enzimática. Parece pues, que los inhibidores 3 / 4 podrían ser también de utilidad en el asma bronquial (Dent, 1994), pero desgraciadamente cualquier ventaja derivada de su actividad broncodilatadora se ve contrarrestada por sus profundas acciones cardiovasculares (Torphy, 1998).

### **5.6. Tipo 5**

Entre los inhibidores selectivos de la PDE 5 podemos mencionar el zaprinast y el dipiridamol (los cuales también inhiben al menos una isoforma de PDE 6 (Torphy, 1998).

El zaprinast se caracteriza por su poca penetrabilidad en la célula y necesita prolongados periodos de incubación para elevar los niveles de AMPc; relaja los anillos bronquiales de forma más efectiva sobre tono inducido con histamina o metacolina que sobre tono basal, pero en general, es poco potente (quizá por su poca penetrabilidad). El dipiridamol ha sido estudiado en pacientes como potencial agente antitrombótico, sin embargo no hay resultados concluyentes acerca de su potencial terapéutico. Los inhibidores selectivos de la PDE 5 no modifican la liberación de mediadores en respuesta al antígeno (Sdudt, 1999).

## BIBLIOGRAFÍA

- (1) BAOS V, SEOANE F.J. Asma bronquial. *MEDIFAM*, (1994); **4** (6): 266-275.
- (2) TORPHY T.J, UNDEM D.J. Phosphodiesterase inhibitors: New opportunities for the treatment of asthma. *Thorax*, (1991); **46**: 512-523.
- (3) BEAVO J.A.. Cyclic nucleotide phosphodiesterases: functional implications of multiple isoforms. *Physiol. Rev.*, (1995); **75**: 725-748.
- (4) TEIXEIRA M.M, GRISTWOOD R.W, COOPER N, et al.. Phosphodiesterase (PDE) 4 inhibitors: anti-inflammatory drugs of the future?. *TiPS*, (1997); **18**: 164-170.
- (5) TORPHY T.J. Phosphodiesterase isozymes. Molecular targets for novel antiasthma agents. *Am J Respir Crit Care Med*, (1998); **157**: 351-370.
- (6) THOMPSON W.J. Cyclic nucleotide phosphodiesterases: pharmacology, biochemistry and function. *Pharmacol Ther*, (1991); **51**: 13-33.
- (7) NICHOLSON C.D, SHAHID M. Inhibitors of cyclic nucleotide phosphodiesterase isoenzymes— their potential utility in the therapy of asthma. Review. *Pulmonary Pharmacology*, (1994); **7**: 1-17.
- (8) MANGANIELLO V.C, MURATA T, TAIRA M, et al.. Diversity in cyclic nucleotide phosphodiesterase isoenzyme families. *Arch Biochem Biophys.*, (1995); **322**: 1-13.
- (9) BOLGER G.B. Molecular biology of the cyclic AMP-specific cyclic nucleotide phosphodiesterases: a diverse family of regulatory enzymes. *Cell Signal.*, (1994); **6**: 851-859.
- (10) CONTI M, NEMOZ G, SETTE C, et al.. Recent progress in understanding the hormonal regulation of phosphodiesterases. *Endocr. Rev.*, (1995); **16**: 370-389.
- (11) SCHUDT C, TENOR H, HATZELMANN A. PDE isoenzymes as targets for anti-asthma drugs. *Eur Respir J*, (1995); **8**: 1179-1183.
- (12) THOMAS M.K, FRANCIS S.H, CORBIN J.D. Characterization of a purified bovine lung cGMP-binding cGMP phosphodiesterase. *J Biol Chem*, (1990a); **265**: 14964 -14970.
- (13) THOMAS M.K, FRANCIS S.H, CORBIN J.D. Substrate- and kinase-directed regulation of phosphorylation of a cGMP-binding phosphodiesterase by cGMP. *Biol Chem*, (1990b); **265**: 14971-14978.

- (14) BURNS F, RODGER W, PYNE N.J. The catalytic subunit of protein kinase A triggers activation of the type 5 cyclic GMP-specific phosphodiesterase from guinea-pig lung. *Biochem J*, (1992); **283**: 487-491.
- (15) FRANCIS S.H, CORBIN J.D. Purification of cGMP-binding protein phosphodiesterase from rat lung. *Methods Enzymol*, (1988); **159**: 722-729.
- (16) McALLISTER-LUCAS L.M, SONNENBURG W.K, KADLECEK A, et al.. The structure of a bovine lung cGMP-binding, cGMP-specific phosphodiesterase deduced from a cDNA clone. *J. Biol. Chem.*, (1993); **268**: 22863-22873.
- (17) LI T S, VOLPP K, APPLEBURY M L. Bovine cone photoreceptor cGMP phosphodiesterase structure deduced from a cDNA clone. *Proc Natl Acad Sci USA*, (1990); **87**: 293-297.
- (18) COLLINS C, HUTCHINSON G, KOWBEL D, et al.. The human beta-subunit of rod photoreceptor cGMP phosphodiesterase: complete retinal cDNA sequence and evidence for expression in brain. *Genomics*, (1992); **13**: 698-704.
- (19) KHRAMTSOV N.V, FESHCHENKO E.A, SUSLOVA V.A, et al.. The human rod photoreceptor cGMP phosphodiesterase beta-subunit. Structural studies of its cDNA and gene. *FEBS Lett*, (1993); **327**: 275-278.
- (20) MICHAELI T, BLOOM T.J, MARTINS T, et al.. Isolation and characterization of a previously undetected human cAMP phosphodiesterase by complementation of cAMP phosphodiesterase-deficient *Saccharomices Cerevisiae*. *J Biol Chem*, (1993); **268**: 12925-12932.
- (21) BEAVO J.A, REIFSNYDER D.H. Primary sequence of cyclic nucleotide phosphodiesterase isozymes and the design of selective inhibitors. *TiPS*, (1990); **11**: 150-155.
- (22) NICHOLSON C.D, CHALLISS R.A.J, SHAHID M. Differential modulation of tissue function and therapeutic potential of selective inhibitors of cyclic nucleotide phosphodiesterase isoenzymes. *TiPS*, (1991); **12**: 19-27.
- (23) MOORE A.R, WILLOUGHBY D.A. The role of cAMP regulation in controlling inflammation. *Clin Exp Immunol.*, (1995); **101**: 387-389.
- (24) AL-ESSA L.Y, NIWA M, KOHNO K, et al.. Heterogeneity of circulating and exudated polymorphonuclear leukocytes in superoxide-generating response to cyclic AMP and cyclic AMP-elevating agents. *Biochemical Pharmacology*, (1995); Vol. **49** (3): 315-322.

- (25) HALL I.P. Isoenzymes selective phosphodiesterase inhibitors: potential clinical uses. *Br J Clin Pharmacol*, (1993); 35: 1-7.
- (26) PODZUWEIT T, MÜLLER A, NENNSTIEL P. Selective inhibition of the GMP-stimulated cyclic nucleotide phosphodiesterase from pig and human myocardium (abstract). *J Mol Cell*, (1992); 24 (suppl V): 102.
- (27) KEREIAKES D, CHATTERJEE K, PARMLEY W.W, et al. Intravenous and oral MDL 17043 (a new inotrope-vasodilatador agent) in congestive heart failure: haemodynamic and clinical evaluation in 38 patients. *J Am Coll Cardiol*, (1984); 4: 884-889.
- (28) JASKI B.E, FIFER M.A, WRIGHT R.F, et al. Positive inotropic and vasodilatador actions of milrinone in patients with severe congestive heart failure. Dose-response relationships and comparison to nitroprusside. *J Clin Invest*, (1985); 75: 643-649.
- (29) MURRAY K.J, ENGLAND P.J, HALLAM T.J, et al. The effects of siguazodan, a selective phosphodiesterase inhibitor on human platelet function. *Br J Pharmacol*, (1990); 99: 612-616.
- (30) LEEMAN M, LEJEUNE P, MEOT C, et al. Reduction in pulmonary hypertension and in airway resistance by enoximone (MDL 17043) in descompensated COPD. *Chest*, (1987); 91: 626-666.
- (31) CORTIJO J, BOU J, BELETA J, et al. Investigation into the role of phosphodiesterase 4 in bronchorelaxation, including studies with human bronchus. *Br J Pharmacol*, (1993); 108: 562-568.
- (32) DENT G, RABE K, GIEMBYCZ M.A, et al. Inhibition of eosinophil respiratory burst activity by type 4 but not type 3 selective cyclic AMP phosphodiesterase inhibitors. *Am Rev Respir Dis*, (1990); 141: A478.
- (33) NIELSON C.P, VESTAL R.E, STURM R.J, et al. Effect of selective phosphodiesterase inhibitors on the polymorphonuclear leukocyte respiratory burst. *J Allergy Clin Immunol*, (1990); 86: 801-808.
- (34) ORTIZ J.L, CORTIJO J, VALLÉS J.M, et al. Rolipram inhibits PAF-induced airway microvascular leakage in guinea-pigs: a comparison with milrinone and teophylline. *Fundam Clin Pharmacol*, (1992); 6: 247-249.
- (35) ORTIZ J.L, CORTIJO J, VALLÉS J.M, et al. Rolipram inhibits airway microvascular leakage induced by platelet-activating factor, histamine and bradykinin in guinea-pigs. *J Pharm Pharmacol*, (1993); 45: 1090-1092.
- (36) CORTIJO J, ORTIZ J.L, VALLÉS J.M, et al. Inhaled rolipram and zaprinast inhibit airway microvascular leakage produced by inhaled platelet-activating factor in the guinea-pig. *Br J Pharmacol*, (1994); 112: 592P.

- (37) JACOBITZ S, McLAUGHLIN M.M, LIVI G.P, et al.. Mapping the functional domains of human recombinant phosphodiesterase 4A: structural requirements for catalytic activity and rolipram binding. *Mol Pharmacol.*, (1996); **50**: 891-899.
- (38) ROCQUE W.J, HOLMES W.D, PATEL I.R, et al.. Detailed characterization of a purified type-4 phosphodiesterase, HSPDE4B2B: differentiation of high-affinity and low-affinity (R)-rolipram binding. *Protein Express. Purification*, (1997); **9**: 191-202.
- (39) SOUNESS J.E, RAO S. Proposal for pharmacologically distinct conformers of PDE4 cyclic-AMP phosphodiesterases. *Cell. Signal*, (1997); **9**: 227-236.
- (40) DENT G, MAGNUSSEN H, RABE K.F. Cyclic nucleotide phosphodiesterases in the human lung. *Lung*, (1994); **172**: 129-146.
- (41) SCHUDT C, GANTNER, F., TENOR H, HATZELMANN A. Therapeutic potential of selective PDE inhibitors in asthma. *Pulm. Pharm. Ther.*, (1999); **12**: 123-129.