

Cátedra de Farmacología de la Facultad de Medicina y Departamento
de Investigación de Laboratorio P. E. V. Y. A.
Barcelona

Acciones de la lipoxidasa sobre la presión arterial

III. Acción hipotensora y actividad anti-hipertensínica

por

F. G. Valdecasas, J. Laporte, N. Fernández y P. Puig-Muset

(Recibido para publicar el 14 de octubre de 1960)

Tal como hemos descrito en un trabajo anterior (1), a partir de varios preparados de lipoxidasa, extraída de la soja, hemos podido obtener — gracias al empleo de un nuevo procedimiento de separación cromatográfica — diversas fracciones, dotadas de diferentes acciones. Interesados especialmente por la notable acción hipotensora que los preparados ensayados por nosotros ejercen en diversas especies de animales (2) y en el hombre (3) hemos estudiado con especial interés la actividad que poseen las citadas fracciones desde este punto de vista.

Esta investigación perseguía, en primer lugar, el objetivo de comprobar si la acción hipotensora podía ser asignada específicamente a alguna fracción. Por otra parte, pretendíamos establecer la relación que podía tener la hipotensión con la acción propiamente enzimática — lipoxidásica — del preparado y aclarar, dentro de lo posible, su mecanismo de acción.

Con dichas finalidades como objetivo se nos ofrecían a nuestra consideración varias posibilidades especulativas. Podría admitirse, por ejemplo, que se actuara destruyendo los productos humorales importantes para la regulación de las resistencias periféricas. Holz (4) considera, hace ya algún tiempo, la posibilidad de que las alteraciones enzimáticas fueran la causa de

la hipertensión. La descarboxilación sin desaminación oxidativa de algunos aminoácidos (tirosina, fenilalanina, DOPA, etc.) podría producir la acumulación de aminas presoras y actuar éstas como causa de la hipertensión por anoxia renal o de otros órganos.

SCHROEDER encontró que la aminoxidasa disminuye la presión arterial de los animales con hipertensión experimental y también la de los animales normales. Además, observó que incubando la aminoxidasa con hipertensina o tiramina desaparece el efecto presor de estas sustancias (5).

Parecía lógico, por consiguiente, investigar si la acción hipotensora se localizaba en alguna de las fracciones obtenidas, y si al mismo tiempo eran capaz de inhibir el efecto presor de la hipertensina y de las aminas simpaticométicas.

Parte experimental

a) ACCIÓN HIPOTENSORA

Tal como hemos señalado en otros lugares (1-3 y 6) la fracción 40-100 % obtenida por precipitación con sulfato amónico a partir de las proteínas de la soja, dotada de fuerte actividad lipoxidásica, ejerce una marcada acción hipotensora en el perro o en el gato cloralosados. Esta acción se manifiesta con dosis de 2-10 mg/Kg de producto, es de instauración lenta, y de considerable duración. Por otra parte, va acompañada de un aumento de la sensibilidad a la adrenalina y de una disminución — a veces incluso inversión — del reflejo de hipertensión por oclusión carotídea (fig. 1).

Estudiando, en iguales condiciones experimentales las fracciones 0-35 y 35-40 % procedentes de la misma extracción de proteínas de la soja, descritas en una anterior comunicación (1), hemos podido comprobar su escasa o nula acción en este sentido. Por el contrario, las fracciones 40-50 y 50-100 se han mostrado altamente activas en el perro a dosis de 2 mg/Kg, observándose con la última de las citadas, a las dos horas de su administración, un notable descenso tensional y una marcada inhibición del reflejo de oclusión carotídea (fig. 2).

Ahora bien, la totalidad de las fracciones 40-50 % y 50-100 % fue sometida a un nuevo procedimiento de separación cromatográfica, descrito en el ya citado trabajo, obteniéndose diversas fracciones, en las que ha sido posible localizar selectivamente algunas de las acciones descritas por nosotros al trabajar con la fracción total. Desde el punto de vista de la activi-

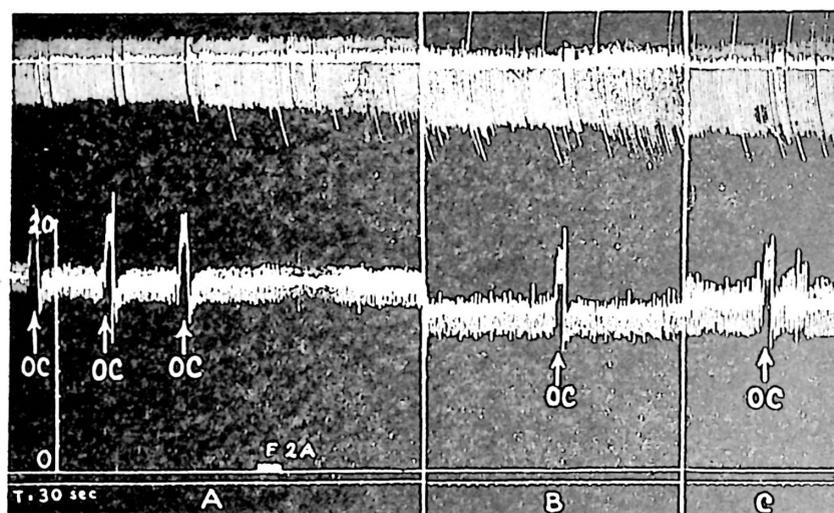


Figura 3
Perro cloralosado. Registro respiración y presión arterial. OC = oclusión carotídea. 30 sec.: F 2 A = Fracción 2 A, 2 mg/kg, vía I. V.; B = a los 60 min.; C = a las 2 horas

dad hipotensora, la fracción 1 se ha mostrado prácticamente desprovista de actividad. La fracción 2 A ejerce en el perro, a dosis de 2 mg/Kg, por vía intravenosa, una acción hipotensora muy ligera, sin que apenas se modifique el reflejo de oclusión carotídea (fig. 3). Análogos efectos se observaron en el gato con dosis de 10 mg/Kg (fig. 4). Con la fracción 3 A hemos observado una notable hipotensión en el gato a dosis de 10 miligramos/Kg y una falta de acción en el perro a dosis de 2 mg/Kg. La máxima actividad hipotensora se encuentra en las fracciones 3 B y especialmente 4. En el gato, con la administración de 10 mg/Kg de fracción 4 hemos observado un descenso tensional del orden del 50 % acompañado de una inhibición casi total del reflejo carotídeo (fig. 5). Empleando el mismo producto en el perro, a dosis de 2 mg/Kg, hemos observado, al cabo de unas dos horas, una hipotensión del orden del 50 % de instauración lenta y progresiva, acompañada de una muy marcada inhibición del reflejo de oclusión carotídea que puede llegar a invertirse, y seguida de recuperación posterior (fig. 6).

b) PRUEBAS CON INCUBACIÓN PREVIA

Tal como hemos dicho, con el fin de contribuir a dilucidar el mecanismo de la acción hipotensora de estas sustancias,

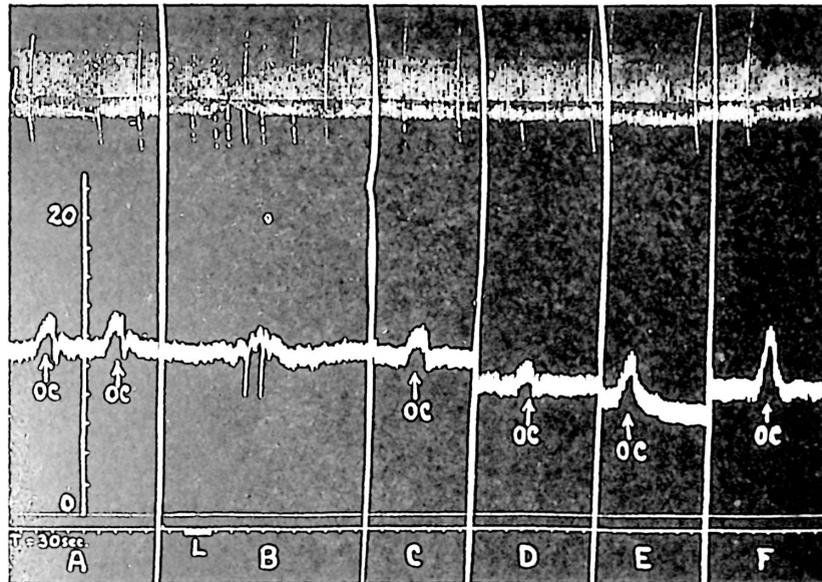


Figura 4
Gato cloralosado. Registro respiración y presión arterial. OC = oclusión carotídea, 30 sec.;
L = Fracción 2 A, 10 mg/kg, vía i. v.; C = a los 30 min.; D = a los 60 min.;
E = a los 90 min.; F = a las 2 horas.

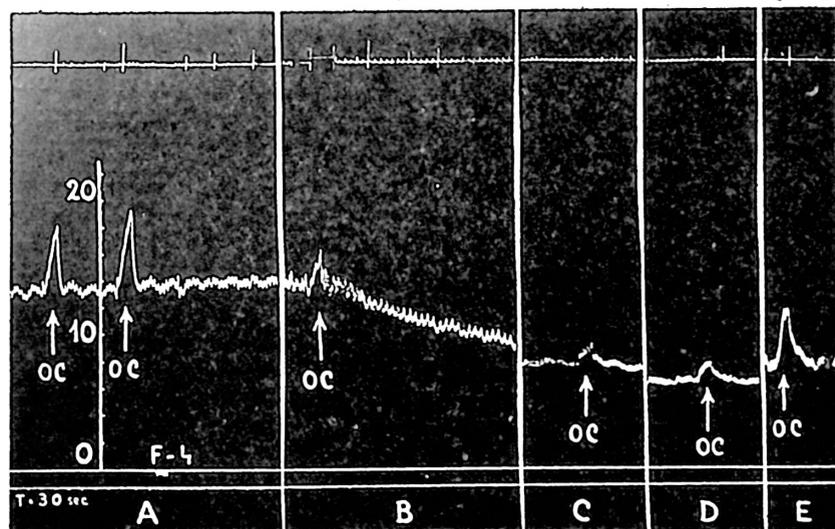


Figura 5
Gato cloralosado. Registro respiración y presión arterial. OC = oclusión carotídea, 30 sec.;
F 4 = Fracción 4, 10 mg/kg, vía i. v.; B = a los 30 min.; C = a los 60 min.;
D = a los 90 min.; E = a las 3 horas.

hemos ensayado su acción «in vitro» frente a diversos productos que intervienen en el proceso fisiológico de la regulación de la presión arterial.

Según hemos señalado en otro trabajo (6) una solución de lipoxidasa, tanto obtenida por nosotros como la de otras procedencias (NBC), a la concentración de 1 mg/ml, contrarresta la acción de la hipertensina cuando se pone en contacto con una

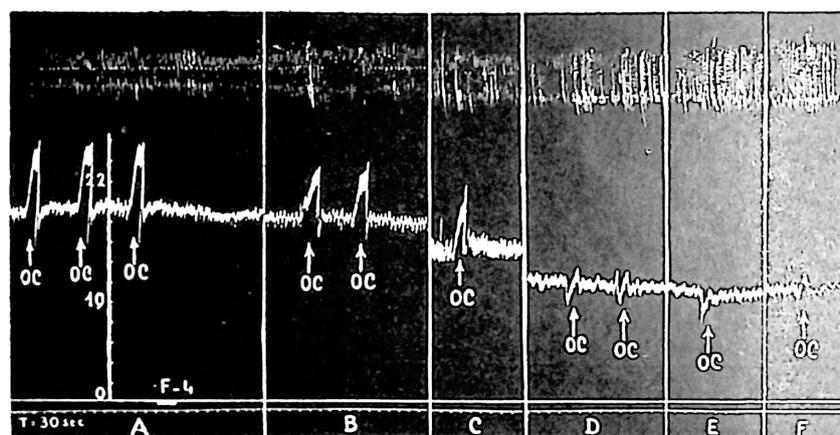


Figura 6
Perro cloralosado. Registro respiración y presión arterial. OC = oclusión carotídea, 30 sec.; F 4 = Fracción 4, 2 mg/kg, vía I. V.; B = a los 15 min.; C = a los 30 min.; D = a los 60 min.; E = a los 90 min.; F = a los 105 min.

solución de este polipéptido. La inhibición de la actividad biológica de la hipertensina — ensayada en el gato cloralosado y atropinizado — es ya muy manifiesta al cabo de 5 minutos de incubación. A los 30 minutos de incubación la destrucción de la actividad hipertensínica alcanza el orden del 99 por ciento. Señalemos que esta acción inhibitoria no requiere la presencia de un sustrato de ácido linoleico. En la figura 7 puede observarse la curva dosis-efecto de la hipertensina en el gato y los resultados de la valoración, en el mismo animal, de una hipertensina incubada durante 30 minutos en presencia de lipoxidasa obtenida por nosotros. Se observa claramente que 5 gammas de esta hipertensina incubada ejercen una actividad inferior a la de 0,05 gammas de hipertensina patrón que ha sido sometida al mismo proceso de incubación, aunque, naturalmente, sin lipoxidasa en el medio. En otra experiencia análoga, efectuada empleando lipoxidasa NBC, el grado de inhibición de la actividad hipertensínica observado ha sido del 80 por ciento.

Al estudiar, en las mismas condiciones, la acción inhibitoria

de la actividad hipertensínica de las diversas fracciones proteicas, obtenidas a partir de la soja, hemos obtenido los resultados expuestos en la Tabla I. Como puede observarse esta acción antihipertensínica se localiza especialmente en las fracciones 3 A y 4.

En ensayos efectuados paralelamente hemos podido poner de manifiesto que la aminoxidasa ejerce también una cierta ac-

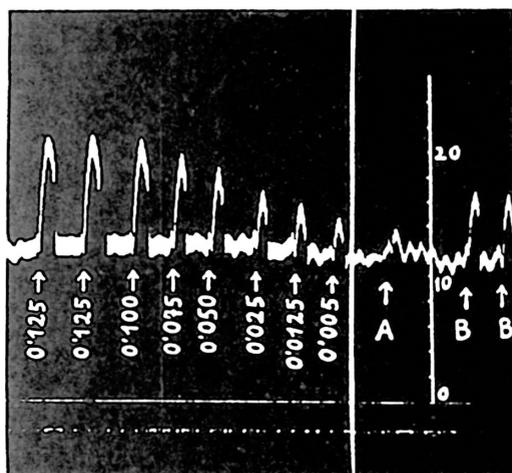


Figura 7

Valoración de hipertensina en gato cloralosado y atropinizado. Curvas de aumento de presión arterial por inyección de dosis sucesivas de hipertensina expresadas en gammas. En A 1,25 γ y en B, 5 γ de hipertensina incubada con lipoxidasa 30 min.

ción inhibitoria, si bien para que ésta se manifieste se precisa el empleo de dosis diez veces superiores de producto. Por otra parte, tanto la tripsina como la quimotripsina, como era de esperar, inactivan totalmente la actividad hipertensínica, mientras que la ribonucleasa, empleada como proteína pura, que ya «a priori» se suponía desprovista de actividad, se muestra carente de acción.

En análogas condiciones hemos estudiado la acción de algunas de estas sustancias frente a la *adrenalina*. Ni la lipoxidasa de otros laboratorios ni ninguna de las fracciones proteicas de la soja obtenidas por nosotros ejercen acción inhibitoria alguna de la actividad hipertensora de la adrenalina cuando se ponen en contacto con la misma sin más aditamento que la solución tampón de citrato. Ahora bien, cuando se añade al medio ácido linoleico se produce una evidente destrucción de la adrenalina, apreciable tanto por el color rojizo que toman las soluciones como por la notable disminución de sus efectos hiper-

tensores en el gato cloralosado y atropinizado. Los resultados pueden verse en la Tabla II. En este caso la máxima actividad se encuentra localizada en las fracciones 1 y 2 A.

TABLA I

Acción inhibidora de la actividad hipertensínica, ejercida por diversos preparados de lipoxidasa y fracciones proteicas obtenidas a partir de la soja

Preparado	Acción inhibidora por 100
Lipoxidasa NBC	80
Lipoxidasa obtenida por nosotros	99
Fracción 0-35	10
Fracción 35-40	50
Fracción 40-50	90
Fracción 50-100	99
Fracción 1	0
Fracción 2 A	0
Fracción 3 A	> 99
Fracción 4	> 99

Al ensayar la acción de diversos preparados sobre la adrenalina, hemos podido comprobar que la aminoxidasa tiene sobre ella una acción inhibidora relativamente pequeña, menor que la que ejerce sobre la hipertensina. Esta lentitud de destrucción de la adrenalina por parte de la aminoxidasa coincide con los datos comunicados por BURN y ROBINSON (7). Finalmente, señalemos que tampoco aquí la ribonucleasa ha mostrado acción alguna sobre la adrenalina al ser estudiada por nosotros en análogas condiciones.

TABLA II

Acción inhibidora de la actividad hipertensora de la adrenalina ejercida por diversos preparados de lipoxidasa y fracciones proteicas obtenidas a partir de la soja

Preparado	Acción inhibidora por 100	
	Sin ácido linoleico	Con ácido linoleico
Lipoxidasa	0	92
Fracción 1	0	40
Fracción 2	0	40
Fracción 3 A	0	25
Fracción 4	0	—

Discusión

El estudio farmacológico de las fracciones obtenidas — mediante el procedimiento de separación cromatográfica descrito en el anterior trabajo — a partir del conjunto de las proteínas de la soja, dotadas de actividad lipoxidásica, nos ha proporcionado resultados que consideramos de gran interés.

El primer hecho que salta a la vista es que la actividad hipotensora máxima es independiente de la actividad lipoxidásica. Ciertamente es, con todo, que la fracción 2 A ejerce una ligera acción hipotensora en los animales estudiados, acción que prácticamente no va acompañada de modificaciones en el reflejo hipertensor de respuesta a la oclusión carotídea. Pero es en la fracción 4, desprovista de acción enzimática lipoxidásica, donde observamos la máxima actividad hipotensora, tanto en el perro como en el gato. Resultan notables las características de esta hipotensión. En efecto, en todos los animales estudiados no se observa modificación alguna durante los primeros 30 minutos consecutivos a la administración del producto, apareciendo entonces un descenso suave y progresivo de la tensión, que llega a su máximo entre una y dos horas — llegando a un 50 % de los valores iniciales — y que se recupera también de forma prolongada y progresiva. Por otra parte, a medida que desciende la tensión se inhibe el reflejo de hipertensión por oclusión carotídea, que en algunos casos llega incluso a una inversión, para recuperarse después. Señalemos que no siempre coincide el momento de la máxima hipotensión con el de la máxima inhibición del reflejo.

La independencia entre la actividad lipoxidásica y la acción hipotensora viene a demostrarnos que esta última no es consecuencia de un proceso de peroxidación, tal como pensamos al principio, al observar que preparados con actividad lipoxidásica ejercen acción hipotensora. Viene a corroborar este hecho el que esta acción hipotensora no sea modificada en ningún sentido por la hepatocatalasa, enzima que tanto puede facilitar el transporte del O peroxídico (acción peroxidásica) como destruir el peróxido en oxígeno y agua (acción catalásica) según el sustrato y medio en que actúe. Por lo tanto, la hepatocatalasa puede modificar en uno u otro sentido los procesos influidos por la lipoxidasa, tal como hemos tenido ocasión de demostrar (8). El que esta acción hipotensora no era originada por procesos de modificar en uno u otro sentido los procesos influidos por influencia de la hepatocatalasa sobre la misma.

Ahora bien, resulta, por otra parte, difícilmente explicable el mecanismo bioquímico en la evidente acción hipotensora ejer-

cida por la Fracción 4. Sin embargo, los resultados de las pruebas de incubación que hemos efectuado con hipertensina y con adrenalina vierten una cierta luz sobre algunos de los procesos sobre los que puede intervenir esta sustancia en el interior del organismo humano u animal. Según hemos visto, la acción inhibidora de la adrenalina va evidentemente ligada a la propia actividad lipoxidásica: en primer lugar requiere la presencia de ácido linoleico para que se manifieste y, además, se encuentra preferentemente localizada en la fracción 2 A, dotada de la máxima actividad lipoxidásica. Esta acción antiadrenálica podría explicar la ligera acción hipotensora de la fracción 2 A. Pero, a la vista de nuestros resultados, mayor interés parece poseer la actividad antihipertensínica. A pesar de que la intervención de la hipertensina en la génesis de los procesos hipertensivos, sigue siendo discutida, en nuestra experimentación resulta evidente que en los preparados y fracciones obtenidas por nosotros existe una marcada correlación entre acción hipotensora y actividad inhibidora de la hipertensina «in vitro».

Actualmente estamos investigando las características bioquímicas de la fracción 4, así como sus otras acciones de tipo farmacológico. La muy escasa toxicidad de este producto en el animal de experimentación (DL₅₀ en el ratón, superior a 1000 mg/Kg) nos ha permitido iniciar su ensayo en enfermos hipertensos (8).

Resumen

Se estudian farmacológicamente las fracciones obtenidas por separación cromatográfica a partir de un preparado de lipoxidasa extraído de la soja. La acción hipotensora e inversora del reflejo de oclusión carotídea, ejercida por diversos preparados existentes de lipoxidasa, se encuentra localizada en la que denominamos fracción 4, atóxica y desprovista de actividad enzimática lipoxidásica. Esta fracción produce asimismo una marcada inhibición de la actividad biológica de la hipertensina. Por otra parte, la fracción 2 A, ligeramente hipotensora en el animal y dotada de notable actividad lipoxidásica, inhibe la acción hipertensora de la adrenalina, pero sólo en presencia de ácido linoleico. Se hace resaltar que esta marcada acción hipotensora tiene posibilidades terapéuticas.

Summary

Some actions of «Lipoxidase» upon blood pressure. III. Hypotensive action and anti-Hypertensine activity

The pharmacologic study of the fractions obtained by a chromatographic procedure from the lipoxidase proteins obtained from the soybean, has yielded interesting results.

The outstanding one is that their hypotensive action is independent from the lipoxidase action proper.

Although fraction 2a shows a slight hypotensive action on test animals without any sensible influence on the reflex hypertensive response to carotideal occlusion, it is fraction 4 which on the one hand is devoid of any lipoxidase power while on the other shows to possess the greatest hypotensive action both on the dog and the cat.

Hypotension induced in test animals by the action of fraction 4 shows peculiar features. In the first place, in none of the animals treated (f. 3 B) is there any alteration whatsoever detectable during the first 30 minutes after the injection; then, and only then, there appears a slow and progressive lowering of the animal blood pressure which reaches its maximum between one hour and two hours after the injection thus reaching a 50 % decrease as compared with the initial values. After that, hypotension begins to decrease also slowly and steadily until it fades away. On the other hand, parallel with the appearance of hypotension, the hypertensive reflex response to carotideal occlusion is progressively weakened, reaching in some cases an inverse response, to recover slowly and progressively its original intensity of normal response. It is to be remarked that not in all cases the acme of the hypotension coincides with the greatest inhibition of the carotideal reflex.

The fact that hypotensive action and enzyme lipoxidasic activity appear independently from each other seems to imply that the hypotensive effect is not the result of a peroxidative process. This is corroborated by the fact that the hypotensive action is in no way modified by hepato-catalase, an enzyme capable of causing the transport of peroxidasic oxygen (peroxidic action), and the decomposition of peroxides into oxygen plus water (catalase action) depending on the identity of the substrata and media upon which it acts. Thus, hepato-catalase may change in one or another sense the processes influenced by lipoxidase. This we were able to demonstrate.

That the hypotensive action is not the result of peroxidase processes could have been inferred a priori from the fact that hepato-catalase has no effect on it.

Now, it is quite difficult to explain the biochemical mechanism by which fraction 4 induces hypotension. However the results of experimental research in vitro, incubating the fractions together with hypertensine and with epinephrine throw some light into some of the organic processes involved. As we have seen, its inhibited effect on epinephrine is evidently linked with the lipoxidase action; in the first place, because

it requires the presence of linoleic acid to take place; secondly, because this inhibitive effect is mainly manifest in the action of fraction 2a. But, in view of our results, the anti-hypertensive action is more interesting. In spite of the fact the intervention of hypertensine in the hipertensive processes is still a matter of discussion, our experimental researches point out that in the substances employed and fractions obtained by us there is a marked correlation between their hypotensive activity in the animal and their hipertensine-inhibiting activity *in vitro*.

We are at present engaged in the investigation of the biochemical and pharmacological characteristics and properties of fraction 4. Since this substance is of a very low toxicity (DL50 in the mouse is more than 1000 mg/kg) we are beginning to test it in some human patients suffering from blood hypertension.

Bibliografía

- (1) MARTÍN, J., VALDECASAS, F. G., LAPORTE, J., PUIG MUSET, P.: «Some actions of Lipoxidase upon blood pressure II.—About the fractionation of soya proteins». *Méd. Exper.* (Basel), en prensa.
MARTÍN-ESTEVE, J., VALDECASAS, F. G., LAPORTE, J. y PUIG MUSET, P.: «Acciones de la Lipoxidasa sobre la presión arterial. II. Sobre el fraccionamiento de las proteínas de la soja». *Rev. esp. Fisiol.*, (en prensa).
- (2) VALDECASAS, F. G., LAPORTE, J., y PUIG MUSET, P.: «Some actions of Lipoxidase upon blood pressure I.» *Méd. Exper.* (Basel), 2, 30, 1960.
VALDECASAS, F. G., LAPORTE, J. y PUIG MUSET, P.: «Acciones de la Lipoxidasa sobre la presión arterial. I.» *Rev. esp. Fisiología*, 16, 91, 1960.
- (3) PUIG MUSET, P., TORNER, M., MORATO, J. M., VALDECASAS, F. G., LAPORTE, J., y BUSQUETS, J.: «Lipoxidase and blood pressure.» *Lancet* II, 51, 1960.
- (4) HELTZ, P., CREDNER, K., y WATTER, H.: «Über die spezifität der Aminosauuredecarboxilasen.» *Ztechr. Physiol. Chem.*, 262, III, 1939.
- (5) SCHROEDER, H. A.: «The effect of a preparation of amine oxidase on experimental hypertension.» *Science*, 95, 306, 1942.
SCHROEDER, H. A.: «Monoamine Oxidase and Hypertension.» *Moyer Hypertension*, Sounders Co., 180-185, 1959.
- (6) PUIG MUSET, P., LAPORTE, J., y VALDECASAS, F. G.: «Etude pharmacologique sur la Lipoxidase. Action sur la tension artérielle.» *Premier Symposium Européen d'Enzymologie médicale*. Milán, 28-29 marzo 1960.

- (7) BURN, J. H., ROBINSON, L.: «Noradrenaline and adrenaline in vessels of the rabbit ear in relation to the action of amineoxidase.» *Brit. J. Pharmacol.*, 6, 101, 1951.
- (8) PUIG MUSET, P.: «Etude pharmacologique sur la lipoxidase.» *Thérapie*, 16, 199, 1960.
BARCELÓ, P., PUIG MUSET, P., SANS SOLÁ, L., LAPORTE, J., y VALDECASAS, F. G.: «Premieres études pharmacologiques sur l'hépatocatalase et son emploi thérapeutique.» *Premier Symposium européen d'Enzymologie médicale*, Milán, 28-29 marzo 1960.
BARCELÓ, P., PUIG MUSET, P., y SANS SOLÁ, L.: «L'epatocatalasi, nuovo trattamento della gotta.» *Il Reumatismo*, en prensa.