

Laboratorio de Fisiología Animal
Facultad de Ciencias
Universidad de Barcelona

Inhibición de la fosfatasa alcalina renal por benzotiadiazinas

por

J. M. Llinás y F. Ponz

(Recibido para publicar el 17 de enero de 1963)

En un trabajo anterior (4), dábamos cuenta del efecto inhibitor que pudimos comprobar ejercían varias benzotiadiazinas diuréticas sobre la cetohecoquinasa hepática (ATP: D-fructosa 1-fosfotransferasa) y que, según indicábamos, no presentaba paralelismo con las acciones observadas sobre la anhidrasa carbónica (5), ni tampoco podía relacionarse directamente con la actividad natriurética (5) de dichos fármacos.

De acuerdo con la hipótesis de que el mecanismo de acción de estas tiazidas diuréticas debe tener lugar a través de la inhibición de algún proceso enzimático implicado en el aporte de la energía necesaria para la reabsorción de sodio en el túbulo renal (2, 3, 5, 6), se consideró de interés investigar su efecto sobre la fosfatasa alcalina (ortofosfórico monoéster fosfohidrolasa), presente en gran cantidad en el tejido renal.

Material y métodos

El preparado enzimático utilizado se obtuvo a partir de riñones de rata, tratados aproximadamente como se indica en el primer paso de la purificación de la fosfatasa alcalina renal de cerdo, descrita por ALVAREZ y LORA-TAMAYO (1). Los riñones, procedentes de ratas blancas, se extraían poco después de muerto el animal, privándolos a continuación de las cápsulas y conjuntivo. Después de cortados longitudinalmente, se eliminaba toda la grasa posible y se lavaba varias veces con agua fría. Cantidades de 3 a 4 g se homogenizaban en un Potter con 4 ml de

acetona acuosa al 25 %, añadiendo luego 0,2 ml de tolueno, 0,2 ml de acetato de etilo y suficiente solución al 5 % de carbonato sódico para llegar a pH 8. Se dejaba autolizar a temperatura ambiente durante 24 horas, repitiendo a menudo las adiciones de carbonato sódico, a fin de mantener el pH que, de otro modo, descende rápidamente. Por centrifugación durante 10-12 minutos a 4500 xg, se obtenía un extracto concentrado, que se conservaba a 2-4° C, no utilizándolo más que dentro de los 10-12 días siguientes a su preparación. Se comprobó que, durante este período, la actividad enzimática se mantenía sin descenso apreciable. Estos extractos contenían entre 0,9 y 1 mg de N proteico por ml (micro-Kjeldahl, antes y después de precipitar con ácido tricloracético) y exhibían una actividad específica entre 200 y 225 $\mu\text{g P/mg N prot./min}$.

La actividad enzimática se valoró siguiendo la técnica descrita por ALVAREZ y LORA-TAMAYO (1), utilizando como sustrato, β -glicerofosfato 20 mM (Merck), en presencia de acetato magnésico 10 mM y en un medio tamponado a pH 9,9 con veronal sódico 50 mM. El fosfato inorgánico, liberado en 20 minutos a 38° C, se determinó según el método de Fiske-SubbaRow. La reacción se interrumpía con ácido tricloracético al 25 %.

La investigación del poder inhibitor se hizo por series, cada una de las cuales suponía un ensayo a igual concentración para cada una de las benzotiadiazinas. La actividad del preparado se mantuvo constante en todas las series.

Se han utilizado la hidroflumetiazida (6-trifluormetil-7-sulfamil-3, 4-dihidro-1, 2, 4-benzotiadiazina-1, 1-dióxido), hidroclorotiazida (6-cloro-7-sulfamil-3, 4-dihidro-1, 2, 4-benzotiadiazina-1, 1-dióxido) y clorotiazida (6-cloro-7-sulfamil-1, 2, 4-benzotiadiazina-1, 1-dióxido), que procedían de Juva (Milán) (*).

Resultados

La hidroflumetiazida, la hidroclorotiazida y la clorotiazida ejercen una clara acción inhibitora sobre la reacción catalizada por la fosfatasa alcalina renal.

Se ha ensayado el efecto de cada inhibitor a las concentraciones de 5×10^{-4} M, 10^{-3} M y $1,5 \times 10^{-3}$ M. Los resultados se expresan en tanto por ciento de actividad residual (Fig. 1).

Se han representado las tres curvas en una misma figura, dado que las condiciones de trabajo eran perfectamente comparativas. Puede, así, observarse que la clorotiazida manifiesta el

(*) Estos diuréticos nos fueron gentilmente cedidos por Laboratorios Medea (Barcelona).

mayor poder inhibidor a todas las concentraciones, siguiéndole en efectividad la hidroclorotiazida. La hidroflumetiazida es, de las tres, la que menos actúa sobre la fosfatasa alcalina renal.

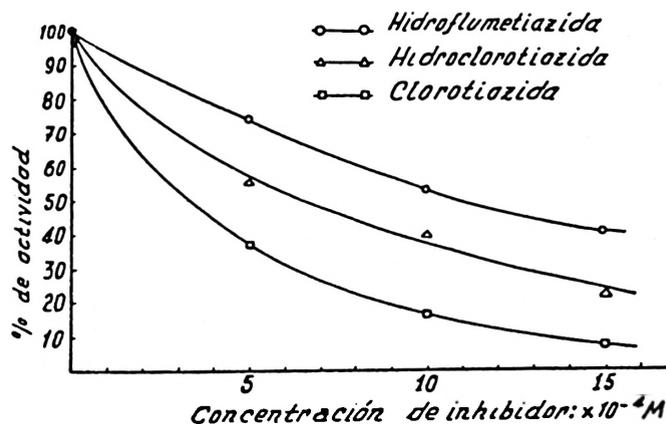


FIG. 1. Inhibición de la fosfatasa alcalina renal por benzotiadiazinas. Incubación (20 minutos a $38^{\circ} C$): 0,5 ml de solución diluida de enzima y 4,5 ml conteniendo β -glicerofosfato Na 20 mM, acetato magnésico 10 mM y veronal Na 50 mM, a pH 9,9, con o sin tiazida.

Discusión

Las inhibiciones que ejercen las tres benzotiadiazinas estudiadas sobre la fosfatasa alcalina renal, pueden considerarse situadas dentro de un orden de intensidad comparable con el manifestado por estos mismos efectores sobre la cetohecoquinasa hepática (4).

Es curioso observar que, en el caso de la fosfatasa, la gradación de efectividad entre los tres inhibidores: clorotiazida, hidroclorotiazida, hidroflumetiazida, se establece en orden inverso al que pudo comprobarse frente a la cetohecoquinasa.

La seriación de efectividad manifestada por estas tiazidas sobre la fosfatasa es la misma que se ha indicado frente a la anhidrasa carbónica (5), aun cuando en el caso de esta última las diferencias son mucho más acusadas, puesto que el efecto de la clorotiazida sobre ella es 100 veces mayor que el de la hidroflumetiazida, mientras que dicha proporción es tan sólo del doble, aproximadamente, al tratarse de la fosfatasa alcalina.

También es distinto el orden de eficacia de estos preparados sobre la fosfatasa y respecto de la natriuresis. Esto hace poco verosímil que el efecto diurético pueda explicarse por la inhibición de la fosfatasa alcalina renal.

Resumen

Se preparan extractos de tejido renal ricos en fosfatasa alcalina. Utilizando como sustrato el β -glicerofosfato, se estudia el efecto de tres benzotiadiazinas sobre la actividad fosfatásica. Las inhibiciones observadas son, en conjunto, del mismo orden de magnitud que las anteriormente comprobadas sobre la cetohecoquinasa hepática, aunque el orden de eficacia inhibidora es distinto y, para la fosfatasa, es : clorotiazida > hidrociorotiazida > hidroflumetiazida.

Summary

Inhibition of the kidney alkaline phosphatase by benzothiadiazines

Extracts from the renal tissue of rats were prepared, rich in alkaline phosphatase (orthophosphoric monoester phosphohydrolyase) by homogenization, autolysis at pH 8, and centrifugation. Using sodium β -glycerophosphate as substrate, in presence of Mg^{++} , a study was made of the effect of three benzothiadiazines (hydroflumethiazide, hydrochlorothiazide and chlorothiazide) on the phosphatasic activity at pH 9.9. The inhibitions observed are, taken together, of the same order of magnitude as those formerly verified on the liver ATP: D-fructose 1-phosphotransferase, although the order of inhibiting efficacy is different and, for the phosphatase, is : chlorothiazide > hydrochlorothiazide > hydroflumethiazide.

Bibliografía

- (1) ALVAREZ, E. F. and LORA-TAMAYO, M. : *Biochem. J.*, **69**, 312, 1958.
- (2) FORD, R. V. : *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **88**, 809, 1960.
- (3) FUCHS, M., MOYER, J. H. and NEWMAN, B. E. : *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **88**, 795, 1960.
- (4) LLINÁS, J. M. y PONZ, F. : *R. esp. Fisiol.*, **18**, 109, 1962.
- (5) RENNICK, B. : *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **88**, 785, 1960.
- (6) TALSO, P. J. and CARBALLO, A. J. : *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **88**, 822, 1960.