

Efecto del etanol sobre las actividades de ATPasas de Na^+ y de Na^+ , K^+ de membranas plasmáticas laterobasales de células de túbulo proximal de riñón de ratas viejas

Effect of ethanol on the Na^+ and Na^+ , K^+ ATPase activities of basolateral plasma membranes of kidney proximal tubular cells of old rats

.....
*José Rubén Elvir Mairena**, *Teresa Proverbio†* y *Fulgencio Proverbio‡*

RESUMEN. Existen dos ATPasas estimuladas por sodio en las membranas de células de túbulo proximal renal: La ATPasa de Na^+ , K^+ y la de Na^+ . La actividad de ambas enzimas disminuye con el envejecimiento. **OBJETIVO.** Comparar el efecto del alcohol (etanol) sobre las enzimas mencionadas en ratas jóvenes y viejas. **MATERIALES Y METODOS.** Se prepararon homogenizados de corteza renal y fracciones enriquecidas en membranas plasmáticas laterobasales de células de túbulo proximal renal procedentes de ratas macho Sprague-Dawley jóvenes y viejas. Se determinó las actividades ATPásicas respectivas en las preparaciones mediante un método espectrofotométrico tanto en ausencia como en presencia de etanol. **RESULTADOS.** Se encontró que, mientras la ATPasa de sodio,

potasio era menos sensible al etanol, la ATPasa de sodio era más sensible al etanol en ratas viejas comparadas con jóvenes. **CONCLUSIONES.** Los hallazgos indican una clara diferenciación entre las dos ATPasas y permiten especular que la ingestión continua de etanol podría influenciar con más fuerza el funcionamiento de la ATPasa de sodio en personas viejas que en jóvenes.

Palabras clave: Alcohol. Etanol. ATPasa de sodio. Potasio. ATPasa de sodio. Envejecimiento.

ABSTRACT. There are two sodium-stimulated ATPases in basolateral plasma membranes of kidney proximal tubular cells: The Na^+ , K^+ ATPase and the Na^+ ATPase. The activity of these enzymes decrease with aging. **OBJECTIVES.** To compare the effect of alcohol (ethanol) on these enzymes in young and old rats. **MATERIALS AND METHODS.** Sprague-Dawley male young and old rats were killed and the kidneys were removed. The outermost slices of the

* PhD en Fisiología y Biofísica

† Investigadora IVIC

‡ PhD en Fisiología y Biofísica

Enviar correspondencia a: Fulgencio Proverbio, Centro de Biofísica-Bioquímica, Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC), Apartado Postal 1020-A, Caracas, Venezuela, o a José Rubén Elvir Mairena, Depto. de Fisiología, 2do. Piso Facultad de Ciencias Médicas, UNAH, detrás de Hospital Escuela, Tegucigalpa, Honduras.

kidney cortex were homogenized to obtain basolateral plasma membrane enriched fractions. The ATPase activities in all preparations were determined by a spectrophotometric method in the presence or absence of ethanol. RESULTS: It was found that, while the sodium, potassium ATPase was less sensitive to ethanol, the sodium ATPase was more sensitive to ethanol in old rats than in young ones. CONCLUSIONS: The features indicates a clear differentiation between two ATPases and permits to speculate that the continuous ingestion of ethanol could influence with more force the functioning of the sodium ATPase in old persons that in young persons.

Keywords: Alcohol. Ethanol. Sodium, potassium ATPase. Sodium ATPase. Aging

INTRODUCCIÓN

Dos ATPasas estimuladas por Na^+ están presentes en membranas plasmáticas laterobasales de células de túbulo proximal de riñones de mamíferos y en otras membranas biológicas: la ATPasa de Na^+, K^+ , la cual es estimulada por Na^+ y K^+ , es inhibida por ouabaína, es parcialmente inhibida por ácido etacrínico y es insensible a la furosemida; y la ATPasa de Na^+ , la cual es estimulada por Na^+ , es insensible a la ouabaína y es totalmente inhibida por ácido etacrínico y furosemida.¹⁻³ De manera semejante, dos mecanismos activos de expulsión de Na^+ (bombas) están presentes en células de túbulo proximal de riñón de mamífero: la bomba de Na^+, K^+ , la cual expulsa Na^+ en intercambio por K^+ , y la bomba de Na^+ , la cual expulsa Na^+ acompañado por Cl^- y agua.⁴ El primer sistema es totalmente inhibido por ouabaína, es parcialmente inhibido por ácido etacrínico y es insensible a la furosemida. El segundo sistema es insensible a la ouabaína y es totalmente inhibido por ácido etacrínico y furosemida.⁵

La ATPasa de Na^+, K^+ es fundamental para la vida y se encuentra en la membrana plasmática de todas las células humanas y de mamíferos, así como de otros organismos.⁶⁻¹² La ATPasa de Na^+ se ha encontrado en la membrana plasmática de células de varios órganos, y se ha asociado con la regulación del volumen celular.^{2,3} Por otro lado, el proceso de envejecimiento está asociado con disminución de las actividades de varias enzimas; así las

actividades de las ATPasas de Na^+ y de Na^+, K^+ de membranas plasmáticas laterobasales de células de túbulo proximal de riñón de ratas viejas (24 meses de edad), están disminuidas.¹ Esta disminución parece estar asociada con un aumento en el contenido de colesterol de las membranas celulares y, por ello, con una disminución en el grado de fluidez de ellas. El etanol, contenido en la mayoría de las bebidas alcohólicas, aumenta la fluidez de las membranas biológicas^{13,14} y también inhibe la actividad de varias enzimas asociadas con ellas, particularmente, las ATPasas de Na^+ y de Na^+, K^+ .¹⁴⁻¹⁸ El efecto del etanol sobre las actividades de las ATPasas de Na^+ y de Na^+, K^+ en membranas plasmáticas laterobasales de células de túbulo proximal de riñón ha sido estudiado en ratas jóvenes.¹⁸

El presente trabajo fue realizado para comparar el efecto del etanol, *in vitro*, sobre las actividades de las ATPasas de Na^+ y de Na^+, K^+ de membranas plasmáticas laterobasales de células de túbulo proximal de riñón de ratas jóvenes y viejas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Ratas macho sanas de 3 y 24 meses de edad de la cepa Sprague-Dawley fueron anestesiadas con éter e inmediatamente sacrificadas por decapitación. Los riñones fueron removidos, descapsulados, y colocados en un medio conteniendo sacarosa 250 mM y Tris-HCl 20 mM (pH 7.2) a 0°C. Se obtuvo rebanadas de la parte más externa de la corteza renal (ricas en túbulos proximales), las cuales fueron homogenizadas y luego sometidas a un proceso de centrifugación diferencial de acuerdo a un método antes descrito,^{19,20} para obtener las fracciones enriquecidas en membranas plasmáticas laterobasales. El precipitado final fue resuspendido en el medio sacarosa/Tris, congelado, y mantenido a -20°C hasta el momento de ser usado.

Las actividades de las ATPasas de Mg^{2+} , de Na^+ y de Na^+, K^+ fueron determinadas siguiendo el método ya descrito.^{21,22} Todos los ensayos de la ATPasa de Na^+ fueron llevados a cabo en un medio libre de K^+ en la presencia de 2 mM de ouabaína (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO). Las actividades ATPásicas fueron expresadas como nanomoles de fosfato inorgánico (Pi) por miligramo de proteína por minuto. Las tres actividades enzimáticas,

para todas las concentraciones de etanol examinadas, fueron determinadas para seis preparaciones separadas las cuales fueron ensayadas en cuadruplicado en cada punto. Cada una de las preparaciones consistió de membranas almacenadas procedentes de riñones de seis ratas. El contenido de proteína fue determinado por el ensayo de fijación del colorante azul de Coomassie (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA).²³ Los datos son expresados como los promedios \pm el error estándar de las determinaciones. Las diferencias entre los resultados fueron analizadas de acuerdo a la prueba de t de Student y al análisis de varianza de comparaciones múltiples, siguiendo la prueba LSD de Fisher. La significancia fue aceptada a una $p < 0.05$.

RESULTADOS

El cuadro No. 1 muestra que las actividades de la ATPasa de Na^+ y de la ATPasa de Na^+, K^+ de homogenizados preparados a partir de rebanadas de corteza renal de ratas viejas (24 meses de edad) fueron más bajas que las actividades de homogenizados procedentes de ratas jóvenes (3 meses de edad). Por otro lado, las figuras No. 1, 2 y 3 muestran el efecto de la presencia de cantidades relativamente altas de etanol en el medio de incubación sobre las actividades de las ATPasas de Mg^{2+} , de Na^+, K^+ y de Na^+ , respectivamente, de fracciones de membranas plasmáticas laterobasales procedentes de células tubulares proximales de riñones de ratas viejas y jóvenes. La figura No. 4 muestra el efecto de concentraciones pequeñas de etanol sobre la actividad de la ATPasa de Na^+ de fracciones de membranas plasmáticas laterobasales procedentes de células de túbulo proximal de riñones de ratas viejas y jóvenes.

DISCUSIÓN

Los resultados mostrados en el cuadro No. 1 con los que se concluye que las actividades de las ATPasas de Na^+ y de Na^+, K^+ de homogenizados de rebanadas de corteza renal de ratas viejas fueron más bajas que las actividades de homogenizados de ratas jóvenes coinciden con resultados encontrados en estudios previos.^{1,19,20} En las figuras No. 1 y 2 se observa que, las actividades de las ATPasas de Mg^{2+} y de Na^+, K^+ disminuyen cuando el etanol está presente en el medio de incubación de manera dependiente de la con-

Figura No. 1. Actividad ATPásica de Mg a distintas concentraciones de etanol

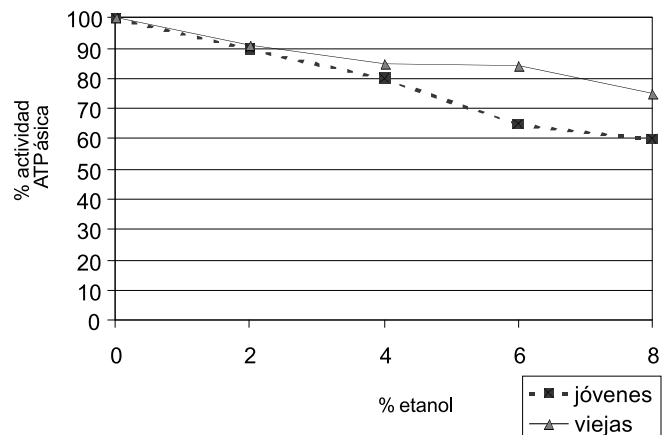


Figura No. 2. Actividad ATPásica de Na,K a distintas concentraciones de etanol

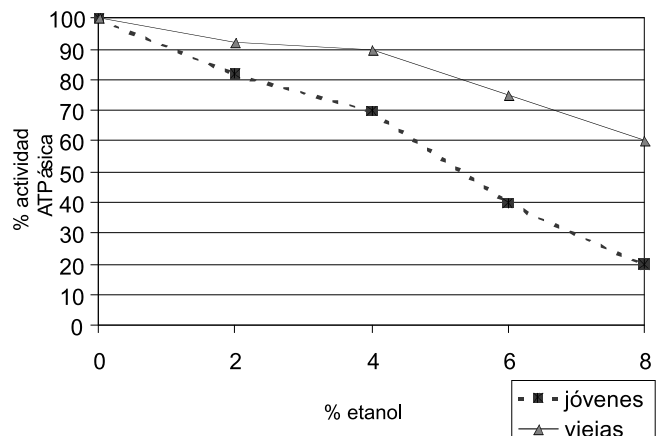


Figura No. 3. Actividad ATPásica de Na a distintas concentraciones de etanol

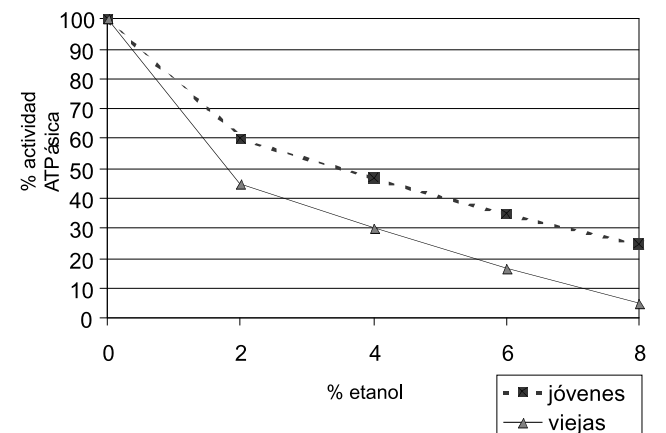
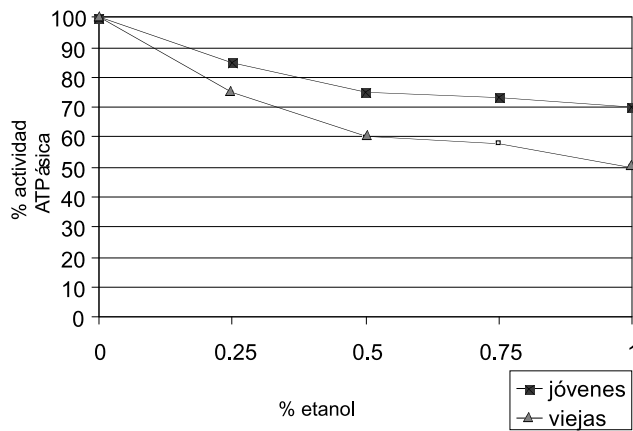


Figura No. 4. Actividad ATPásica de Na a concentraciones bajas de etanol



Cuadro No. 1. Actividades ATPásicas de Mg²⁺, Na⁺ y Na⁺,K⁺ de homogenizados de células de túbulo proximal de riñón de ratas jóvenes comparadas con ratas viejas.

ATPasa ensayada	Actividad ATPásica en nmoles Pi/ mg prot. min		Relación
	Ratas jóvenes	Ratas viejas	
Mg ²⁺	423 ± 1	414 ± 12	1.02
Na ⁺	16 ± 1	8 ± 1	2.00
Na ⁺ ,K ⁺	86 ± 4	47 ± 2	1.83

Valores expresados como las medias ± los errores estándar, para n = 6. Los errores en el caso de las ATPasas de Na⁺ y de Na⁺,K⁺ fueron calculados por datos pareados.

centración del mismo, y que este efecto inhibitorio producido por el etanol es mayor en las ratas jóvenes que en las ratas viejas. Estos resultados pueden ser explicados por el aumento en la viscosidad o rigidez de la membrana el cual se conoce que se produce con el envejecimiento, debido a un aumento en el contenido de colesterol y/o a cambios en la proporción fosfolípidos/colesterol.²⁴

Al contrario de lo que sucede con las ATPasas de Mg²⁺ y de Na⁺,K⁺, la Figura No. 3 muestra que el efecto inhibitorio del etanol, en las mismas fracciones, sobre la actividad de la ATPasa de Na⁺ es mayor en las ratas viejas comparado con las ratas jóvenes, indicando un efecto específico del etanol sobre esta ATPasa, además del efecto general sobre las enzimas de la membrana celular.

Más aún, estos resultados nos permiten especular que la ingestión intensa y/o continua de bebidas alcohólicas podría ser más perjudicial en individuos viejos comparados con jóvenes. Así que, en una persona vieja es posible que el efecto del envejecimiento se combine con el efecto del etanol.²⁵⁻²⁸ La figura No. 4 muestra que a concentraciones pequeñas de etanol *in vitro*, las cuales pueden estar presentes *in vivo* durante una ingestión intensa o continua de alcohol, también el efecto inhibitorio del etanol es mayor en ratas viejas que en jóvenes. A concentraciones pequeñas, el etanol prácticamente no tiene efecto sobre la actividad de la ATPasa de Na⁺,K⁺. Si se considera que la ATPasa de Na⁺ participa en la regulación activa del volumen celular,^{2,3} su inhibición podría resultar en un aumento del volumen celular con todas las consecuencias que esto implica.

NOTA: El presente estudio se realizó en el Centro de Biofísica y Bioquímica del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC).

REFERENCIAS

1. Marín R, Proverbio T, Proverbio F. Incidencia del envejecimiento sobre los mecanismos de expulsión de Na⁺ en células de túbulo proximal de riñón de rata. *Acta Cient Venez* 1983; 34: 46-55.
2. Proverbio F, Marín R, Proverbio T. The second sodium pump and cell volume. In *Current Topics in Membranes and Transport*. Academic Press. New York. Chapter 6, 1989; 34: 105-120.
3. Proverbio F., Marín R, Proverbio T. Mini-review: The ouabain-insensitive sodium pump. *Com Biochem Physiol* 1991;99A: 279-283.
4. Whittembury G, and Proverbio F. Two modes of Na⁺ extrusion in cells from guinea-pig kidney cortex slices. *Plügers Arch.* 1970;316: 1-25.
5. Whittembury G. Sodium extrusion and potassium uptake in guinea-pig kidney cortex slices. *J Gen Physiol* 1961;48: 699-717.
6. Shimura M, Tamai M, Zushi I, Akaike N. Characterization of the electrogenic Na⁺-K⁺ pump in horizontal cells isolated from the carp retina. *Neuroscience* 1998;86: 233-240.
7. Dobretsov M, Hastings SL, Stimers R. Functional Na⁺/K⁺ pump in rat dorsal root ganglia neurons. *Neuroscience* 1999;93: 723-729.
8. Blanco G, Sanchez G, Mercer RW. Comparison of the enzymatic properties of the Na,K-ATPase $\alpha 3\beta 1$ and $\alpha 3\beta 2$ isozymes. *Biochemistry* 1995;34: 9897-9903.
9. Glitsch, HG. Electrophysiology of the sodium-potassium-ATPase in cardiac cells. *Physiol. Rev.* 2001;81: 1791-1826.
10. Semb SO, Lunde PK, Holt E, Tonnessen T, Christensen G

- and Sejersted OM. Reduced myocardial Na⁺,K⁺ -pump capacity in congestive heart failure following myocardial infarction in rats. *J Mol Cell Cardiol* 1998;30: 1311-1328.
11. Geering K. Topogenic motifs in P-type ATPases. *J Membr Biol* 2000;174: 181-190.
 12. Munzer JS, Daly SE, Jewell-Motz EA., Lingrel JB, Blostein R. Tissue- and isoform- specific kinetic behavior of the Na,K-ATPase. *J Biol Chem* 1994;269: 16668-16676.
 13. Taraschi TE, Rubin E. Biology of disease: Effects of ethanol on the chemical and structural properties of biologic membranes. *Lab. Invest.* 1985;52: 120-131.
 14. Elvir Mairena JR, Efecto del etanol sobre las membranas biológicas. *Rev Med Hondur* 1993;61: 20-24.
 15. Elvir Mairena JR, Proverbio, T, y Proverbio, F. Efecto in vitro del alcohol sobre la actividad de las ATPasas de Na,K y de Na de riñón de ratas jóvenes y viejas (Resumen). *Rev Med Hondur* 2003;71: S63-S64.
 16. Elvir Mairena JR., Proverbio T y Proverbio F. Efecto de la ingestión crónica de alcohol sobre las actividades de ATPasa de Na y de Na,K en ratas (Resumen). *Rev Med Hondur* 2003;71: S64.
 17. Swann AC. Membrane effects of ethanol in excitable cells. *Rev Clin Basic Pharmacol.* 1987;6: 213-248.
 18. Rothman A, Proverbio T, Fernández E Proverbio F. Effect of ethanol on the Na⁺- and the Na⁺, K⁺-ATPase activities of basolateral plasma membranes of kidney proximal tubular cells. *Biochem. Pharmacol.* 1992;43: 2034-2036.
 19. Marin R, Proverbio T Proverbio F. ATPases activities in kidney basolateral plasma membranes of young and old rats. *Biochem Pharmacol* 1985;34: 2275-2279.
 20. Marin R, Proverbio T, Proverbio F. Characterization of the Na⁺,K⁺ -ATPase activity of basolateral plasma membranes of kidney proximal tubular cells from young and old rats. *Biochem. Pharmacol* 1985;34: 4197-4201.
 21. Marin R, Proverbio T, Proverbio F. Inside-out basolateral plasma membrane vesicles from rat kidney proximal tubular cells. *Biochim Biophys Acta* 1986;858: 195-210.
 22. Proverbio F, Proverbio T, Marin R. Na⁺-ATPase is a different entity from the Na⁺,K⁺-ATPase in the rat kidney basolateral plasma membranes. *Biochim Biophys Acta* 1986;858: 202-205.
 23. Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;72: 248-254.
 24. Tanaka Y, Ando S. Synaptic aging as revealed by changes in membrane potential and decreased activity of Na⁺, K⁺-ATPase. *Brain Res* 1990;506: 46-52.
 25. Lee J M Ross ER, Gower A, Paris JM, Martensson R. Lorens S A. Spatial learning deficits in the aged rat: neuroanatomical and neurochemical correlates. *Brain Res Bull* 1994;33: 489-500.
 26. Woods J, Druse MJ. Effects of chronic ethanol consumption and aging on dopamine, serotonin, and metabolites. *J Neurochem* 1996;66: 2168-2178.
 27. Coll O, Colle A, García-Ruiz C., Kaplowitz N Fernández-Checa JC. Sensitivity of the 2-oxoglutarate carrier to alcohol intake contributes to mitochondrial glutathione depletion. *Hepatology* 2003;38: 692-702.
 28. Tomás M, Durán JM, Lázaro-Diéguez F, Babia T, Renau-Piqueras J, Egea G. Fluorescent analogues of plasma membrane sphingolipids are sorted to different intracellular compartments in astrocytes. Harmful effects of chronic ethanol exposure on sphingolipid trafficking and metabolism. *FEBS Letters* 2004;563: 59-65.

LAS SOCIEDADES VIVEN, CRECEN Y SE PERFECCIONAN
BAJO LA INFLUENCIA DE LAS IDEAS.

RAMÓN ROSA