

EFECTO DE INGESTIÓN DE ALCOHOL SOBRE ACTIVIDADES ATPásicas EN ÓRGANOS DE RATA

In vivo effect of alcohol on ATPase activities in rat organs

José Rubén Elvir Mairena¹, Teresa Proverbio¹ y Fulgencio Proverbio²

¹Facultad de Medicina, Universidad Católica de Honduras (UNICAH), Tegucigalpa, Honduras;

²Centro de Biofísica- Bioquímica, Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC),

RESUMEN: Existen dos enzimas que degradan ATP (adenosintrifosfato), estimuladas por sodio, en la membrana celular de muchos tejidos: la ATPasa de Na,(Sodio) K(Potasio) y la ATPasa de Na. La primera es fundamental para la vida, manteniendo los gradientes de Na⁺ y K⁺ a través de las membranas celulares, lo que a su vez es un requisito para una gran cantidad de funciones celulares; y la segunda participa en la regulación activa del volumen celular. **OBJETIVOS:** Estudiar el efecto de ingesta de alcohol en las enzimas mencionadas, para determinar si ésta puede afectar el funcionamiento de ellas y así alterar el funcionamiento del organismo. Determinar si la alteración, en caso de producirse, sucede en varios órganos y si es reversible. **MATERIALES Y MÉTODOS:** Se prepararon homogenizados de órganos de ratas sometidas o no a dieta alcohólica, y se determinaron sus actividades ATPásicas. **RESULTADOS:** Se encontró que la ingestión de etanol tiene un efecto estimulador en la ATPasa de Na, pero no tiene efecto alguno sobre la actividad de la ATPasa de Na,K.; esto ocurrió en varios órganos y fue reversible. **CONCLUSIONES:** La estimulación de la actividad de la ATPasa de Na por la ingesta de alcohol indica una alteración en el funcionamiento de esta enzima, lo que puede producir problemas para el buen funcionamiento de las células y del organismo. La alteración en la ATPasa de Na, por la ingestión de alcohol, sucede en varios órganos y es un fenómeno que va desapareciendo al detener la ingestión de alcohol.

Palabras clave: Etanol. Enzimas.

INTRODUCCIÓN

A nivel de la membrana plasmática laterobasal de células de túbulo proximal de riñón de mamífero, se ha demostrado la existencia de dos enzimas ATPasas dependientes de Mg²⁺ y estimuladas por Na⁺: la ATPasa de Na, K, que es estimulada por la mezcla de Na⁺ más K⁺, inhibida por ouabaína, parcialmente inhibida por ácido etacrínico y prácticamente insensible a furosemida; y la ATPasa de Na, que es estimulada por Na⁺, insensible hasta a 10 mM ouabaína y totalmente inhibida por ácido etacrínico y furosemida.¹⁻³

Estas enzimas están no sólo en las células tubulares proximales renales sino que también en las membranas plasmáticas de células de varios órganos de mamíferos y de otros organismos.⁴⁻⁷

Desde un punto de vista funcional, cada uno de estos mecanismos tiene su particular importancia. Así, la ATPasa o bomba 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, intercambiando sodio, que expulsa de las células, por potasio que introduce a las mismas, siendo su actividad de gran importancia para mantener los gradientes de Na⁺ y de K⁺, lo cual a su vez es necesario para una

gran cantidad de funciones celulares y del organismo. Por su parte, la ATPasa o bomba de Na se ha encontrado en la membrana plasmática de células de diversos órganos de distintos organismos, donde expulsa sodio de las células, acompañado por cloruro y agua, asociándose con la regulación del volumen celular.⁸⁻²¹

El clonaje de DNAs complementarios codificando las subunidades α y β de la bomba de Na,K, ha provisto información acerca de las relaciones estructura- función de esta compleja proteína transportadora desde hace aproximadamente dos décadas.²¹ Recientemente, la purificación y el clonaje de la subunidad α de la ATPasa de Na de cobayos ha confirmado que esta es una entidad bioquímica y molecular diferente a la ATPasa de Na,K, tal como lo han indicado numerosos estudios anteriores.^{22,23}

Los dos sistemas ATPásicos mencionados difieren en cuanto a su comportamiento frente a un aumento del volumen celular: mientras la ATPasa de Na responde aumentando su actividad en aproximadamente 4 veces al aumentar suficientemente el volumen celular, la actividad de la ATPasa de Na,K permanece inalterable frente a este tratamiento.^{12,20}

El alcohol en las membranas biológicas altera la fluidez (lo que a su vez afecta indirectamente el funcionamiento de proteínas ubicadas en la membrana), deshidrata e interactúa directamente con proteínas membranales. Los efectos del alcohol en las membranas podrían explicar, en parte, sus efectos generalizados en el organismo.²⁴⁻²⁶

Recibido para publicación el 02/14, aceptado el 13/14

Dirección para correspondencia: Dr. José Rubén: e-mail: relvirmairena@yahoo.com.mx

Dr. Fulgencio Proverbio: e-mail: fproverb@yahoo.com

Dentro de las proteínas de membranas plasmáticas, cuyo funcionamiento se ha reportado que es afectado por los efectos del etanol, alcohol usualmente contenido en las bebidas alcohólicas, se encuentran: adenilatociclasa, fosfolipasa C, receptores de acetilcolina, canales iónicos, ATPasa de calcio, ATPasa de Na, K y ATPasa de Na. Para algunas de estas proteínas, solamente se ha demostrado efecto *in vitro* pero no *in vivo*.²⁷⁻³⁰

En trabajos anteriores, se demostró, interesantemente, que el etanol *in vitro*, presenta un efecto inhibitorio diferencial sobre los dos sistemas ATPásicos estimulados por Na⁺, inhibiendo con más fuerza a la ATPasa de Na que a la ATPasa de Na,K.^{31,32} Esto es probablemente un efecto inhibitorio derivado de la concentración del alcohol utilizada en esos experimentos ya que, como demostrado en este y en otro trabajo anterior, cuando el alcohol es ingerido por tiempo prolongado, presenta un efecto estimulador de la ATPasa de Na.

Los objetivos centrales del presente trabajo consistieron en: a) tratar de dilucidar si la activación de la ATPasa de Na producida por la ingesta crónica de etanol es un fenómeno particular de las células renales, o es más bien un fenómeno general que se demuestra en otros tejidos, y b) determinar si el fenómeno es o no reversible.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales de experimentación utilizados

Se utilizaron ratas machos de la cepa Sprague- Dawley, con 3 ó más meses de edad según las necesidades experimentales, las cuales eran alimentadas *ad libitum* con alimento estándar para ratas (protinal). Los experimentos fueron realizados de acuerdo a las normas establecidas en el Código de Bioética y Bioseguridad del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICIT) de Venezuela.

Condiciones experimentales

Para la realización de la investigación se siguió un método experimental. Se trabajó con un grupo de ratas sometidas a ingesta de agua (controles) o a ingesta de solución de etanol al 10% (experimentales) por un tiempo de 12 meses. Después de este tiempo se sacrificaban los animales para obtener muestras de varios de sus órganos y preparar con ellas homogenizados. Por otro lado, se seleccionaron otros dos grupos de ratas y se dejaron por 19 meses, o bien bajo condiciones control, es decir, teniendo agua como bebida, o bien teniendo la solución de etanol al 10% como bebida. A los 19 meses, se tomaron muestras de ambos grupos, y se pasaron los animales experimentales a tener agua como bebida. Se volvieron a tomar muestras de estos animales, después de 1 mes y después de 2 meses y medio de desintoxicación.

Preparación de homogenizados totales (HT)

Las ratas se anestesiaban con dietil-éter, se decapitaban y, posteriormente, se les extraían los riñones, el corazón, el cerebro, el intestino delgado y el hígado. Los riñones se descapsulaban y se colocaban a 0°C en una solución "Sacarosa,

Tris-HCl", que contenía (mM): Sacarosa, 250; Tris-HCl (pH 7,2), 20. Luego, con la ayuda de una hojilla, se cortaban rebanadas de la parte más externa de la corteza renal, la cual es rica en túbulo proximales, se pesaban (generalmente 2 g) y se suspendían en 3 volúmenes (ml/g) de la solución "Sacarosa, Tris-HCl". Esta suspensión se homogenizaba con 10 golpes en un homogenizador manual "Potter- Elvehjem", con un émbolo de teflón, a 2500 rpm. De esta forma, se preparaban los HT de las rebanadas de la corteza renal de ratas. De la misma manera se prepararon HT de corteza cerebral y a partir de los otros órganos extraídos.

Determinación de las actividades ATPásicas

El fosfato inorgánico liberado durante las reacciones se determinó según el método de Forbush (33,34). La concentración de proteínas de los HT se determinaba según el método de Bradford (35). Las actividades ATPásicas se determinaron según una modificación del método descrito por Proverbio y colaboradores (36), el cual se describe a continuación:

El medio donde se efectuó la reacción enzimática, constaba de 180 µl del medio de incubación y 20 µl de la suspensión con los HT, a una concentración de proteínas de 0,2-0,5 mg/ml. En el volumen final de 200 µl, los medios contenían (mM):

Medio Mg²⁺(magenesio): MgCl₂, 5; Tris-HCl (pH 7,0), 150; ATP, 2; Ouabaína, 2.

Medio Mg²⁺ + Na⁺: MgCl₂, 5; Tris-HCl (pH 7,0), 50; ATP, 2; Ouabaína, 2 y NaCl, 100.

Medio Mg²⁺ + Na⁺ + K⁺: MgCl₂, 5; Tris-HCl (pH 7,0), 50; ATP, 2; NaCl, 100 y KCl, 20.

180 µl del medio de incubación se preincubaban por dos minutos a 37 °C y la reacción se iniciaba añadiendo 20 µl de la suspensión con el HT. La reacción se finalizaba a los 10 minutos agregando 300 µl de una solución mantenida en frío (solución A), conteniendo (%): Dodecil sulfato de sodio (SDS), 0,72; ácido molíbdico, 0,48; ácido ascórbico, 2,86 y HCl 2,18. Los tubos de incubación eran colocados inmediatamente en hielo durante 10 minutos. Después de transcurridos los 10 minutos en hielo, se le añadía a cada uno de los tubos, 0,5 ml de una solución (solución B) conteniendo (%): Arsenito de sodio, 2; citrato de sodio, 2 y ácido acético, 2. Los tubos de incubación se recalentaban a 37 °C por 10 minutos. Transcurrido este tiempo, se procedía a medir la absorbancia en un espectrofotómetro a 705 nm. En todos los casos había al menos tres réplicas, y el error estándar del método, generalmente, no fue mayor del 5%. La actividad ATPásica se expresa como nanomoles de fosfato liberado por mg de proteína por minuto de incubación, después de sustraer un blanco incubado en paralelo sin proteínas, las cuales eran añadidas después de agregar los 300 µl de la solución A.

Cálculo de las actividades ATPásicas

ATPasa de Mg: La actividad de esta enzima se obtuvo como la actividad presente en el medio que contenía Mg²⁺ + ouabaína.

ATPasa de Na: La actividad de esta enzima se obtuvo restando la actividad medida en el medio conteniendo Mg²⁺ + Na⁺

ouabaína, menos la actividad medida en el medio conteniendo Mg^{2+} + ouabaína.

ATPasa de Na,K: La actividad de esta enzima se obtuvo restando la actividad presente en el medio que contenía Mg^{2+} + Na^+ + K^+ , menos la actividad presente en el medio que contenía Mg^{2+} + Na^+ + ouabaína. La ouabaína, a la concentración de 2 mM, inhibe en un 100% la actividad de la ATPasa de Na,K.³³

Todos los ensayos se hicieron por triplicado para cada muestra. Cada "n" representa una muestra diferente. Los resultados se expresan como las medias \pm el error estándar, para el número de ensayos indicado en cada caso. El análisis estadístico de los datos presentados en este trabajo, fue realizado utilizando la prueba *t* de Student para datos agrupados. Se aceptó como nivel de significancia estadística una probabilidad menor a 0.05.

RESULTADOS

Todos los valores de las actividades ATPásicas, mostradas en los cuadros y figuras, corresponden a nanomoles de fosfato inorgánico (Pi) liberados por cada miligramo de proteína por minuto y son expresados como las medias \pm los errores estándar, para n= 6.

En el Cuadro No.1, se muestran las actividades ATPásicas de Mg, de Na y de Na, K de homogenizados de células de túbulo proximal de riñón de ratas de 3 meses de edad, obtenidos a partir de rebanadas de la parte más superficial de la corteza renal. Los ensayos fueron realizados, tanto en ausencia, como en presencia de 5 mM ouabaína o de 2 mM furosemida. Como puede observarse, la ATPasa de Mg fue prácticamente insensible a estos fármacos. Por otro lado, la actividad de la ATPasa de Na, fue insensible a la presencia de ouabaína y completamente inhibida por furosemida. En cuanto a la actividad de la ATPasa de Na, K, fue totalmente inhibida por la ouabaína y prácticamente insensible a la furosemida.

La Figura 1, muestra las mismas actividades ATPásicas de homogenizados totales de corteza renal de ratas sometidas a ingesta de agua (controles), o a ingesta de solución de etanol al 10 % (experimentales), por 12 meses. Estos resultados muestran que las ATPasas de Mg y de Na, K no sufrieron alteración por la ingesta crónica de etanol, mientras que la actividad de la ATPasa de Na se incrementó, en más de dos veces, por la ingesta crónica de etanol.

Cuadro 1. Actividades ATPásicas de Mg, de Na y de Na,K de homogenizados de corteza renal de rata, ricas en túbulos proximales

ATPasa determinada	Actividad ATPásica: nmoles Pi/mg prot. min		
	control	+ ouabaína	+ furosemida
Mg	423 \pm 14	432 \pm 15	402 \pm 15
Na	16 \pm 1	15 \pm 1	1 \pm 1
Na,K	86 \pm 4	3 \pm 2	73 \pm 4

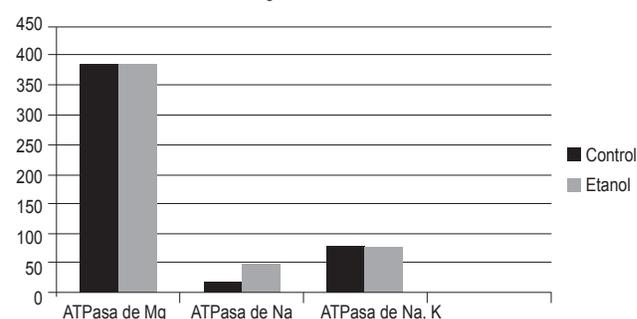
Valores expresados como las medias \pm los errores estándar, para n= 6. Los errores en el caso de las ATPasas de Na y de Na,K, fueron calculados por datos pareados. [ouabaína= 5 mM] y [furosemida= 2mM]

Las Figuras No. 2 a 5, muestran los resultados obtenidos para otros tejidos estudiados: corteza cerebral, tejido hepático, intestino delgado y tejido cardíaco. Como puede observarse en los tejidos estudiados se presentó el mismo comportamiento que en el tejido renal.

La Figura 6 muestra la actividad ATPásica de Na de homogenizados totales de corteza renal de ratas sometidas a ingesta de agua o a ingesta de solución de etanol al 10% por 19 meses, y la actividad de la ATPasa de Na después de ser sometidas a 1 mes o a 2 y medio meses de desintoxicación. Nótese que para las actividades de las ATPasas de Mg y de Na, K, no se produjo cambio alguno entre los diferentes grupos. Por su parte, la actividad de la ATPasa de Na aumentó, como ya demostrado anteriormente, con la ingesta crónica de etanol. Obsérvese también que este efecto fue reversible, ya que la actividad disminuyó con 1 mes de desintoxicación y disminuyó aún más después de 2 ½ meses de desintoxicación, acercándose al valor control.

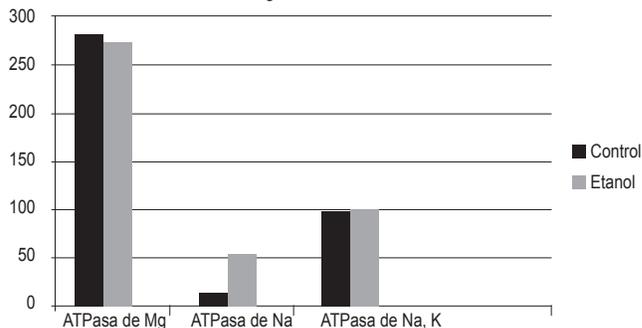
La Figura 7 muestra la actividad ATPásica de Na de homogenizados totales de corteza cerebral de rata tanto de animales ingiriendo agua (control), como sometidos a ingesta de etanol y luego desintoxicados por 1 ó 2 ½ meses. Como puede observarse la reversibilidad del efecto de la ingesta crónica de etanol sobre la actividad de la ATPasa de Na también se presentó en el tejido cerebral.

Figura 1. Efecto de ingesta de solución 10% etanol por 12 meses, sobre las actividades ATPásicas de homogenizados de corteza renal de rata



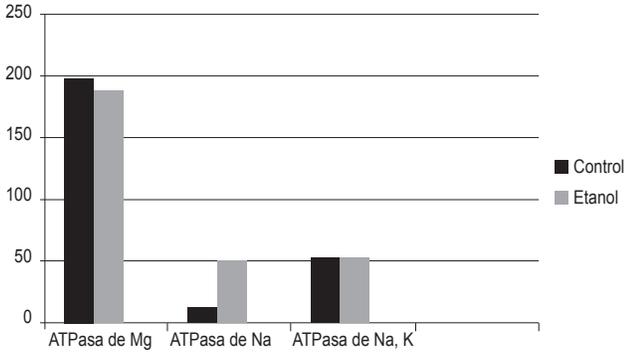
Las actividades ATPásicas son expresadas como nanomoles de fosfato inorgánico liberados por miligramo de proteína x minuto (eje vertical). Los valores son expresados como las medias \pm los errores estándar, para n= 6

Figura 2. Efecto de ingesta de solución 10% etanol por 12 meses, sobre las actividades ATPásicas de homogenizados de corteza cerebral de rata



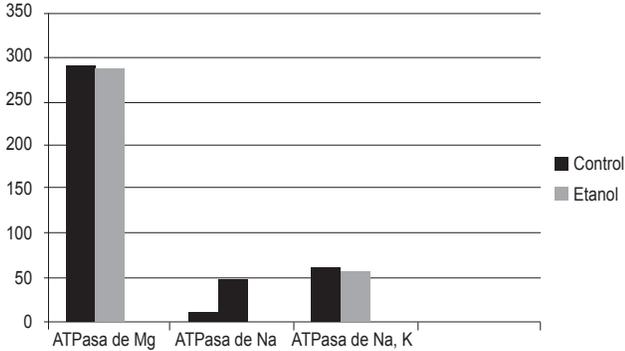
Las actividades ATPásicas son expresadas como nanomoles de fosfato inorgánico liberados por miligramo de proteína x minuto (eje vertical). Los valores son expresados como las medias \pm los errores estándar, para n= 6

Figura 3. Efecto de ingesta de solución 10% etanol por 12 meses, sobre las actividades ATPásicas de homogenizados de tejido hepático de rata



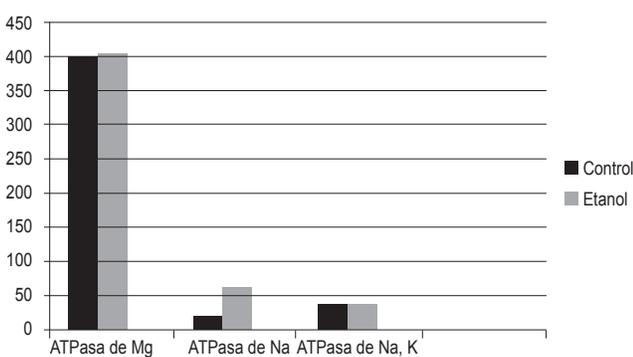
Las actividades ATPásicas son expresadas como nanomoles de fosfato inorgánico liberados por miligramo de proteína x minuto (eje vertical). Los valores son expresados como las medias \pm los errores estándar, para n= 6

Figura 4. Efecto de ingesta de solución 10% etanol por 12 meses, sobre las actividades ATPásicas de homogenizados de intestino delgado de rata



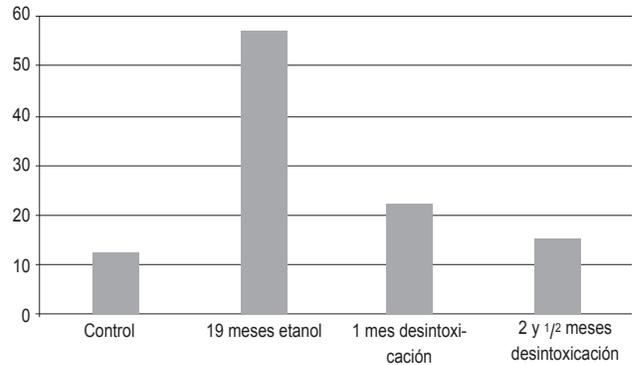
Las actividades ATPásicas son expresadas como nanomoles de fosfato inorgánico liberados por miligramo de proteína x minuto (eje vertical). Los valores son expresados como las medias \pm los errores estándar, para n= 6

Figura 5. Efecto de ingesta de solución 10% etanol por 12 meses, sobre las actividades ATPásicas de homogenizados de tejido cardíaco de rata



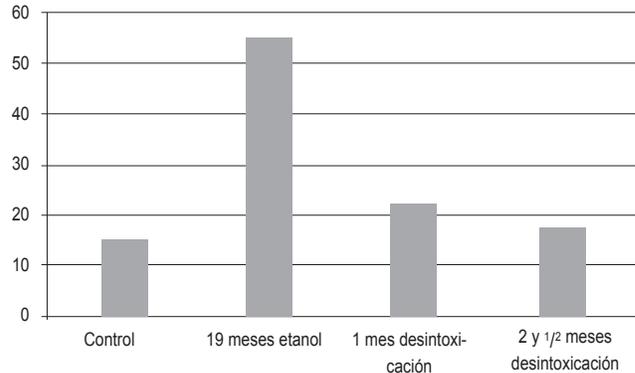
Las actividades ATPásicas son expresadas como nanomoles de fosfato inorgánico liberados por miligramo de proteína x minuto (eje vertical). Los valores son expresados como las medias \pm los errores estándar, para n= 6

Figura 6. Actividad ATPásica de Na de homogenizados de corteza renal de rata: control, ingiriendo etanol, y después de desintoxicación



Las actividades ATPásicas son expresadas como nanomoles de fosfato inorgánico liberados por miligramo de proteína x minuto (eje vertical). Los valores son expresados como las medias \pm los errores estándar, para n= 6

Figura 7. Actividad ATPásica de Na de homogenizados de corteza cerebral de rata: control, ingiriendo etanol, y después de desintoxicación



Las actividades ATPásicas son expresadas como nanomoles de fosfato inorgánico liberados por miligramo de proteína x minuto (eje vertical). Los valores son expresados como las medias \pm los errores estándar, para n= 6

El Cuadro 2, muestra la actividad ATPásica de Na de homogenizados totales de: tejido hepático, intestino delgado y tejido cardíaco en las mismas condiciones mencionadas. Nótese que la reversibilidad del efecto referido de la ingesta crónica de etanol también se presentó en estos otros tejidos estudiados.

Cuadro 2. Actividad ATPásica de Na de homogenizados de tejido hepático, de intestino delgado y de tejido cardíaco de rata: control, ingiriendo etanol, y después de desintoxicación

Tejido	Actividad de ATPasa de Na (nmoles de Pi/mg. prot. min)			
	control	19 meses etanol	1 mes desintoxicación	2 y 1/2 meses desintoxicación
hepático	11 \pm 0.4	38 \pm 2	17 \pm 0.6	13 \pm 0.8
Intestino delgado	14 \pm 1	45 \pm 2	22 \pm 1	17 \pm 0.6
cardíaco	28 \pm 1	69 \pm 3	40 \pm 3	34 \pm 1

Los valores son expresados como las medias \pm los errores estándar, para n= 6

DISCUSIÓN

Como puede observarse en el cuadro 1, la ATPasa de Mg es prácticamente insensible a la ouabaína y a la furosemida. Por su parte, el incremento de actividad que se produce cuando se añade sodio al medio de incubación, es decir, la actividad de la ATPasa de Na, es insensible a la presencia de 5 mM ouabaína en el medio de incubación, mientras que es completamente inhibida por la presencia de 2 mM furosemida. Finalmente, el incremento de actividad que se produce cuando al medio conteniendo $Mg^{2+} + Na^+$, se le añade K^+ , es decir, la actividad de la ATPasa de Na,K, es totalmente inhibida por la presencia de ouabaína en el medio de incubación, mientras que es prácticamente insensible a la presencia de furosemida. Estos resultados fueron acordes con estudios anteriores.^{1,2,31-33}

Los resultados de la figura 1, correspondientes a corteza renal, muestran que, a diferencia de lo observado para las ATPasas de Mg y de Na, K, que no sufren alteración alguna por la ingesta crónica de etanol, la actividad de la ATPasa de Na si sufre un fuerte aumento en las ratas sometidas a la dieta de etanol.

Como puede observarse en las figuras 2 a 5, en los otros tejidos (corteza cerebral, tejido hepático, intestino delgado y tejido cardíaco) se presentó el mismo comportamiento que en el tejido renal.

Una vez demostrada la activación de la ATPasa de Na en varios tejidos por la ingesta crónica de etanol, se investigó la posibilidad de reversión de la misma.

Como se muestra en la figura 6, la actividad de la ATPasa de Na en corteza renal aumenta con la ingesta de etanol al 10%, en este caso después de 19 meses. Se observa también que este efecto es reversible, ya que la actividad de la ATPasa de Na bajó a 22 ± 1 nmoles de Pi/mg prot . min., después de 1 mes de desintoxicación del etanol, y a $15 \pm 0,8$ nmoles de Pi/mg prot . min., después de 2½ meses de desintoxicación del etanol.

En las figuras 7 se observa que, al igual de lo sucedido en tejido renal, en corteza cerebral la actividad de la ATPasa de Na aumenta con la ingesta crónica de etanol al 10%, siendo

este efecto también reversible, ya que la actividad disminuye después de la desintoxicación. Al igual que en el caso del riñón, las actividades de las ATPasas de Mg y de Na,K no se ven afectadas por ninguno de los manejos experimentales (datos no mostrados). En el cuadro 2 se muestra que igual comportamiento se presenta en hígado, intestino delgado y corazón.

Los resultados demuestran que, la presencia de la ATPasa de Na, así como la propiedad de activación de la misma por la ingesta crónica de etanol al 10%, no está consignado solamente a nivel de tejido renal de la rata, sino que también pueden demostrarse a nivel de otros tejidos. Asimismo, los resultados también demuestran que la activación de la ATPasa de Na es un fenómeno dinámico y reversible, en todos los tejidos estudiados.

Estos hallazgos nos conducen a proponer que la ATPasa de Na parece tener un papel fisiológico generalizado, expulsando activamente sodio, cloruro y agua de las células de los tejidos donde se encuentra, con la consecuente regulación activa del volumen celular. La universalidad de la bomba de Na en los diferentes órganos y tejidos del organismo, la colocaría a un nivel de importancia, no solamente para la homeostasis celular, en cuanto a la regulación activa del volumen de las células, sino también a nivel del organismo, en el sentido de un posible potenciador de respuestas a distintas situaciones, como son la estimulación simpática y situaciones crónicas o de emergencia en las que se involucren, por alguna causa, variaciones del volumen celular.

Asimismo, los hallazgos encontrados hacen pensar que la ingestión crónica de alcohol al afectar a la bomba de Na, podría alterar el funcionamiento de las células y contribuir esto, junto con otros mecanismos, a alterar el funcionamiento del organismo. Otra posibilidad es que la ingestión crónica de etanol aumente de alguna forma el volumen celular y que esto sea lo que a su vez aumente la actividad de la ATPasa de Na, ya que esta participa en la regulación activa del volumen celular. Lo anterior sería un aspecto a investigar a futuro. Los resultados también nos indican que por lo menos algunos efectos producidos por la ingesta crónica de alcohol pueden ser reversibles.

REFERENCIAS

1. Proverbio F, Del Castillo JR. Na⁺- stimulated ATPase activities in kidney basal-lateral plasma membranes. *Biochim Biophys Acta* 1981;646:99-108.
2. Proverbio F, Condrescu-Guidi M, Whitttembury G. Oubain-insensitive Na⁺ stimulation of Mg²⁺-dependent ATPase in kidney tissue. *Biochim Biophys Acta*. 1975;394:281-292.
3. Marín R, Proverbio T, Proverbio F. Inside-out basolateral plasma membrane vesicles from rat kidney proximal tubular cells. *Biochim Biophys Acta*. 1986;858: 195-201.
4. Ventrella V, Elvir JR, Borgatti AR, Trigari G, Proverbio T, Pagliarini A, et al. Phosphorylated intermediate of the ouabain-insensitive, Na⁺-stimulated ATPase in rat kidney cortex and rainbow trout gills. *Biochemie*. 2010;92: 128-135.
5. Reyes A, Galindo MM, García L, Segura-Peña D, Caruso-Neves C, Eblen-Zajur A, et al. Oubain-insensitive, Na⁺-stimulated ATPase of several rat tissues: activity during a 24 h period. *Physiol. Res*. 2009;58:693-699.
6. Caruso-Neves, C.; Meyer-Fernandes, J.R.; Saad-Nehme, J., Proverbio, F.; Marín R, Lopes AG. Oubain-insensitive Na⁺-ATPase activity of Malpighian tubules from *Rhodnius prolixus*. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*. 1998;119:807-811.
7. Boldyrev A. Functional activity of tissue Na,K-ATPase in health and in pathology. *Ukr. Biokhim. Zh.* 1992;64:3-10.
8. Blanco G, Mercer RW. Isozymes of the Na-K-ATPase: heterogeneity in structure, diversity in function. *Am J Physiol*. 1998;275: F633-F650.
9. Skou JC, Easmann M. The Na,K ATPase. *J Bioenerg Biomemb*. 1992;24: 249-261.
10. Whitttembury G. Sodium extrusion and potassium uptake in guinea pig kidney cortex slices. *J Gen Physiol*. 1961;48:699-717.
11. Whitttembury G, Proverbio F. Two modes of Na⁺ extrusion in cells from guinea pig kidney cortex slices. *Pflügers Arch*. 1970;316: 1-25.
12. Marín R, Proverbio T, Proverbio F. Mini-review: The ouabain- insensitive sodium pump. *Com Biochem Physiol*. 1991;99:279.283.
13. Kaplan JH. Biochemistry of Na,K-ATPase. *Annu Rev Biochem*. 2002;71: 511-535.
14. Geering K. Functional roles of Na,K-ATPase subunits. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2008;17: 526- 532.

15. Schwartz A, Undermayer G, Allen J. The sodium-potassium adenosine triphosphatase: pharmacological, physiological and biochemical aspects. *Pharmacol Rev.* 1975;27:3-134.
16. Zhang LN, Li JX, Hao L, Sun YJ, Xie YH, Wu SM, et al. Crosstalk between dopamine receptors and the Na⁺/K⁺ -ATPase (review). *Mol Med Rep.* 2013;8:1291-1299.
17. Aronsen JM, Swift F, Sejersted OM. Cardiac sodium transport and excitation-contraction coupling. *J Mol Cell Cardiol.* 2013;61:11-19.
18. Lang F, Hoffmann EK. Role of ion transport in control of apoptotic cell death. *Compr Physiol.* 2012;2: 2037- 2061.
19. 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.
20. Di Campo V, Henríquez LM, Proverbio T, Marín R, Proverbio F. Effect of high Na⁺ diet on cell volume and Na⁺ stimulated ATPase activities of rat kidney membranes. *FEBS Lett.* 1990;274: 96-98.
21. Pressley TA. Structure and function of the Na,K pump: ten years of molecular biology. *Miner Electrolyte Metab.* 1996;22: 264- 271.
22. Rocafull MA, Romero FJ, Thomas LE, del Castillo JR. Isolation and cloning of the K⁺-independent, ouabain-insensitive Na⁺-ATPase. *Biochim Biophys Acta.* 2011;6: 1684-1700.
23. Rocafull MA, Thomas LE, del Castillo JR. The second sodium pump: from the function to the gene. *Plügers Arch.* 2012;463: 755- 777.
24. Taraschi TF, Rubin E. Effects of ethanol on the chemical and structural properties of biologic membranes. *Laboratory Investigation.* 1985;52: 120-131.
25. Elvir Mairena JR. Efecto del etanol sobre las membranas biológicas. *Rev Med Hondur.* 1993;61: 20-24.
26. Tóth ME, Vígó L, Sántha M. Alcohol stress, membranes, and chaperones. *Cell Stress Chaperones.* 2014;19(3):299-309.
27. Conti AC, Lowing JL, Susick LL, Bowen SE. Investigation of calcium stimulated adenylyl cyclases 1 and 8 on toluene and ethanol neurobehavioral actions. *Neurotoxicol Teratol.* 2012;34: 481-488.
28. Wu J, Gao M, Taylor DH. Neuronal nicotinic acetylcholine receptors are important targets for alcohol reward and dependence. *Acta Pharmacol Sin.* 2014;35:311-315.
29. Caliskan AM, Naziroglu M, Uguz AC, Ovey IS, Sütcü R, Bal R, et al. Acamprosate modulates alcohol-induced hippocampal NMDA receptors and brain microsomal Ca²⁺-ATPase but induces oxidative stress in rat. *J Membr Biol.* 2010;237(1):51-58.
30. Maguire EP, Mitchell EA, Greig SJ, Corteen N, Balfour D J, Swinny JD, et al. Extrasynaptic glycine receptors of rodent dorsal raphe serotonergic neurons: a sensitive target for alcohol. *Neuropsychopharmacology.* 2014; 39: 1232-1244.
31. Elvir Mairena JR, Proverbio T, Proverbio F. Efecto del etanol sobre las actividades de ATPasas de Na⁺, K⁺ de membranas plasmáticas laterobasales de células de túbulo proximal de riñón de ratas viejas. *Rev. Med. Hondur.* 2004;72:187-191.
32. 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.
33. Proverbio F, Proverbio T, Marín 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.
34. Forbus B III. Characterization of right-side- out membrane vesicles rich in (Na,K)-ATPase isolated from dog kidney outer medulla. *J Biol Chem.* 1982;257: 12678-12684.
35. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analyt. Biochem.* 1976;72: 248-254.
36. Proverbio F, Marín R, Proverbio T. The second sodium pump and cell volume. *Curr Top Membr Transp.* 1989;34:105-120.

ABSTRACT: There are enzymes that hydrolyze ATP in membrane cells of several tissues: the Na, K ATPase and the Na ATPase. The first is fundamental for life, keeping Na⁺ and K⁺ gradients through cell membranes, something needed for a great quantity of cell functions. The second is involved in active regulation of the cell volume. **OBJECTIVES:** To determine *in vivo* effect of alcohol (ethanol) on the activity of these enzymes, in order to know if this can affect the functioning of the organism. To determine if the alteration occurs in several organs and if it is reversible. **MATERIALS AND METHODS:** Organs homogenates from rats subjected or no to alcoholic diet, were prepared and assayed for their ATPase activities. **RESULTS:** It was found that ethanol, *in vivo*, causes a stimulatory effect on Na-ATPase activity, without showing any effect on Na,K-ATPase activity; this occur in several organs and was reversible. **CONCLUSIONS:** The stimulation of the alcohol intake on the activity of the Na-ATPase occurs in several organs and could result in serious problems for the cell function and the organism. This activation of the enzyme is reversible.

Keywords: Ethanol. Enzymes.