

AAP6125.

TESIS  
ED 2001  
R4

UNIVERSIDAD CATÓLICA ANDRÉS BELLO  
FACULTAD DE HUMANIDADES Y EDUCACIÓN  
ESCUELA DE EDUCACIÓN  
ESPECIALIDAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



"ESTUDIO SOBRE POSIBLE EFECTO GENERAL DEL INHIBIDOR  
ULTRADIANO DE LA ATPASA DE Na,K DESCRITO PARA  
TEJIDO RENAL DE RATA, EN PARTICULAR SOBRE TEJIDO  
CARDIACO"

Trabajo Especial de Grado para optar al título de Licenciado en Educación,  
Mención Ciencias Biológicas.

Autor: Addis Andrés Reyes Mairone  
Tutor: Dr. Fulgencio Proverbio  
Cotutor: Dr. Reinaldo Marín

Caracas, Octubre de 2001.

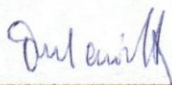


Este Trabajo de Grado ha sido realizado en el Laboratorio de Bioenergética Celular del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC), bajo la tutoría del Dr. Fulgencio Proverbio y del Dr. Reinaldo Marín.

En mi carácter de Tutor del Trabajo Especial de Grado titulado: "Estudio sobre posible efecto general del inhibidor ultradiano de la ATPasa de Na,K descrito para tejido renal de rata, en particular sobre tejido cardiaco", realizado por el bachiller Addis Andrés Reyes Mairone para optar al Título de Licenciado en Educación, Mención Ciencias Biológicas, considero que dicho trabajo reúne los requisitos y méritos suficientes para ser sometido a su defensa oral y evaluación por parte del Jurado examinador designado.

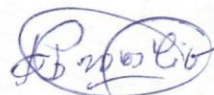
En Caracas al 1er día del mes de Octubre de 2001

Conforme



---

Dr. Reinaldo Marín  
Cotutor  
C.I. 4245480



---

Dr. Fulgencio Proverbio  
Tutor  
C.I. 4.812.508

RESUMEN DEL TRABAJO ESPECIAL DE GRADO PRESENTADO PARA  
OPTAR AL TÍTULO DE LICENCIADO EN EDUCACIÓN MENCIÓN  
CIENCIAS BIOLÓGICAS.

ESTUDIO SOBRE POSIBLE EFECTO GENERAL DEL INHIBIDOR  
ULTRADIANO DE LA ATPASA DE Na,K DESCRITO PARA TEJIDO RENAL  
DE RATA, EN PARTICULAR SOBRE TEJIDO CARDIACO

Por

ADDIS ANDRÉS REYES MAIRONE

Universidad Católica Andrés Bello

Dr. Fulgencio Proverbio

Tutor del trabajo

IVIC

Dr. Reinaldo Marín

Cotutor del trabajo

IVIC

Caracas, Octubre de 2001

- I. El presente trabajo se realizó con la siguiente finalidad:
1. Determinar la posible influencia del inhibidor responsable de la variación ultradiana de la actividad ATPásica de Na,K descrito para tejido renal de rata, sobre homogenizados de hígado, y de corazón de rata, así como fantasmas de glóbulos rojos de los mismos animales, evaluando así si estamos frente a un fenómeno local o, más general.
  2. Investigar sobre la posibilidad de la existencia de un fenómeno similar en humanos, estudiando la actividad de ATPasa de Na,K de fantasmas de glóbulos rojos de sangre de hombres, obtenida a las 0900h y a las 1500h.

Para cumplir con los objetivos del estudio se trabajó con:

- a. Ratas macho de la cepa Sprague-Dawley, de 3 ½ meses de edad, de 200 a 300 g de peso, utilizando tejido cardíaco, hepático y glóbulos rojos.
- b. Glóbulos rojos de sangre de personas del sexo masculino, con edades comprendidas entre los 20 y 30 años.

En todos los casos, las muestras eran tomadas a las 0900h y 1500h.

II. Se encontró que:

- a) Existe una diferencia en la actividad ATPásica de Na,K de homogenizados de hígado y de corazón, así como de fantasmas de glóbulos rojos de rata entre las muestras obtenidas a las 0900h y a las 1500h, siendo la actividad menor para las muestras de las 1500h.
- b) Existe una diferencia en la actividad ATPásica de fantasmas de glóbulos rojos humanos entre las muestras obtenidas a las 0900h y 1500h, siguiendo aparentemente el mismo patrón de inhibición que para homogenizados de corazón, hígado y glóbulos rojos de rata, es decir, una actividad ATPásica de Na,K menor para las muestras obtenidas a las 1500h, con respecto a las obtenidas a las 0900h
- c) En todos los casos, la actividad ATPásica de las muestras obtenidas a las 1500h, fue aumentando con el tiempo de preparación, dirigiéndose hacia valores similares a los de las muestras obtenidas a las 0900h, los cuales se mantuvieron iguales a lo largo de todo el tiempo de experimentación.

III. De los resultados encontrados, podemos hipotetizar que el factor inhibitorio descrito como responsable de las oscilaciones de la actividad ATPásica de Na,K de membranas celulares de corteza renal de rata, tiene una influencia general en el organismo, ya que produce también variación en la actividad ATPásica de membranas de glóbulos rojos, tejido cardiaco y hepático del mismo animal. Un fenómeno inhibitorio con semejantes características parece presentarse también en humanos, como encontrado para membranas de glóbulos rojos de sangre de hombre, lo cual, por similitud a lo encontrado para los diferentes tejidos de rata ensayados, pudiera reflejarse en todo el organismo.

## AGRADECIMIENTOS

- Al Dr. Fulgencio Proverbio, a quien admiro y respeto por su elevadísima calidad humana y científica, cuya dedicación, entusiasmo y trabajo es vivo ejemplo para mí y para muchos. Por dirigir con tanta paciencia, comprensión y sabiduría este trabajo.
- Al Dr. Reinaldo Marín, por su gran ayuda, apoyo, agudísima orientación e interés en todo momento.
- A la Sra. Teresa Proverbio, por su trato amable y dulce, su enorme paciencia y comprensión. Por su invaluable ayuda en el trabajo de laboratorio.
- Al profesor Rafael Muñiz, por haber influido de manera tan notable en mi formación científica y humana, por su interés incondicional, generosa amistad, ejemplo de trabajo y pasión por la ciencia.

- A mis padres, por su invaluable apoyo, cariño, comprensión y, por supuesto, por brindarme la oportunidad de estudiar y superarme tanto humana como profesionalmente.
- A mi hermana Daniela, por su preocupación, generosidad y cariño, por reírse conmigo y brindarme su compañía en tantas ocasiones.
- A María Mercedes, sin cuyo apoyo y ayuda diaria hubiese sido imposible la realización de este trabajo, por compartir e intercambiar conmigo risas, cariño, ideas y trabajo. Por tu bondad y limpieza espiritual.
- A la familia Galindo Pérez, por brindarme de manera generosa y cordial su ayuda, apoyo y amistad en todo momento.
- A Cilia y Nashdalish, por su trato amable, su ayuda desinteresada, y sus aportes en tiempo, amistad y trabajo.
- A Néstor, por su amistad y valiosa ayuda.

- Al Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC), por haberme permitido realizar mi trabajo de grado.
- Al laboratorio de Bioenergética Celular del Centro de Biofísica y Bioquímica, por permitir entrenarme y realizar las experimentaciones.
- Al Departamento de Biología Estructural, por permitir mi entrenamiento. En especial al Dr. Leonardo Mateu, al Dr. Rodolfo Vargas y a la Dra. Eva Vonasek, por su ayuda, paciencia y amplia comprensión.
- A la Universidad Católica Andrés Bello, por promover mi formación científica y humana.
- Al personal de la Biblioteca Marcel Roche del IVIC, por su eficiente y amable ayuda en la búsqueda de bibliografía.
- Al personal del CEA, por su trato cordial, diligencia y eficiencia en su trabajo.

- Al Bioterio del IVIC, por facilitarme los animales de experimentación y en especial a la Sra. Maria Guinle por su amable ayuda.

## ÍNDICE GENERAL

|                                                                                                                             | Página |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| RESUMEN.....                                                                                                                | iv     |
| AGRADECIMIENTOS.....                                                                                                        | viii   |
| LISTA DE TABLAS.....                                                                                                        | xiv    |
| LISTA DE FIGURAS.....                                                                                                       | xv     |
| INTRODUCCIÓN.....                                                                                                           | 1      |
| MATERIALES Y MÉTODOS.....                                                                                                   | 16     |
| 1. Individuos de experimentación.....                                                                                       | 16     |
| 2. Obtención de sangre de rata.....                                                                                         | 16     |
| 3. Obtención de sangre de seres humanos.....                                                                                | 17     |
| 4. Preparación de fantasmas de glóbulos rojos.....                                                                          | 18     |
| 5. Preparación y homogenización de rebanadas de corteza renal de<br>rata.....                                               | 19     |
| 6. Preparación y homogenización de rebanadas de hígado de rata....                                                          | 20     |
| 7. Preparación y homogenización de rebanadas de corazón de rata...                                                          | 20     |
| 8. Determinación de la actividad de la ATPasa de Na,K para<br>homogenizados de corteza renal, hígado y corazón de rata..... | 21     |

|                                                                                              |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 9. Determinación de la actividad de la ATPasa de Na,K en<br>fantasmas de glóbulos rojos..... | 24 |
| 10. Determinación de proteínas.....                                                          | 26 |
| 11. Análisis estadístico.....                                                                | 27 |
| RESULTADOS.....                                                                              | 28 |
| DISCUSIÓN.....                                                                               | 46 |
| BIBLIOGRAFÍA.....                                                                            | 56 |

## LISTA DE TABLAS

| TABLA                                                                                                                                                                                                                                       | Página |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| 1. Actividad ATPásica de Na,K de homogenizados de hígado de rata obtenidos a las 0900h y a las 1500h.....                                                                                                                                   | 31     |
| 2. Actividad ATPásica de Na,K de homogenizados de corazón de rata obtenidos a las 0900h y a las 1500h.....                                                                                                                                  | 33     |
| 3. Actividad ATPásica de Na,K de fantasmas de glóbulos rojos de rata obtenidos a las 0900h y a las 1500h.....                                                                                                                               | 38     |
| 4. Actividad ATPásica de Na,K de fantasmas de glóbulos rojos de rata obtenidos a las 0900h y a las 1500h y centrifugados luego por tres veces en solución de hemólisis o en solución de resuspensión, luego de su procesamiento normal..... | 41     |
| 5. Actividad ATPásica de Na,K de fantasmas de glóbulos rojos humanos obtenidos a las 0900h y a las 1500h.....                                                                                                                               | 43     |

## LISTA DE FIGURAS

| FIGURA                                                                                                                                                                                             | Página |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| 1. Actividad ATPásica de Na,K de homogenizados de corteza de riñón de ratas, mantenidas por 2 semanas dentro de un esquema de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad.....                         | 29     |
| 2. Actividad ATPásica de Na,K de homogenizados de corteza de riñón de ratas sacrificadas a las 0900h o a las 1500h, en función del tiempo transcurrido después de preparación de las muestras..... | 34     |
| 3. Actividad ATPásica de Na,K de homogenizados de corazón de ratas sacrificadas a las 0900h o a las 1500h, en función del tiempo transcurrido después de preparación de las muestras.....          | 35     |
| 4. Actividad ATPásica de Na,K de homogenizado de hígado de rata obtenido a las 0900h o a las 1500h, en función del tiempo transcurrido después de preparación de las muestras.....                 | 36     |

5. Actividad ATPásica de Na,K de fantasmas de glóbulos rojos de rata obtenidos a las 0900h o a las 1500h, en función del tiempo transcurrido después de preparación de las muestras..... 39
6. Actividad ATPásica de Na,K de fantasmas de glóbulos rojos humanos obtenidos a las 0900h o a las 1500h, en función del tiempo transcurrido después de preparación de las muestras..... 45

En 1957, el bioquímico danés Jens Skou descubrió una enzima que hidroliza ATP, que sólo se activa en presencia de iones sodio, potasio y magnesio, actuando este último como cofactor. Skou propuso que esta enzima, capaz de hidrolizar ATP, era la misma que actuaba en el transporte activo de los dos iones mencionados, denominándola por ello ATPasa de sodio y potasio. Numerosos estudios indican que la proporción de sodio y potasio bombeado por la ATPasa en condiciones fisiológicas es de 3:2. En otras palabras, por cada ATP hidrolizado, se bombean 3 iones sodio hacia afuera y dos iones potasio hacia adentro de las células (Karp, 1998).

El mantenimiento de una concentración alta de potasio dentro de la célula es necesario para procesos como la síntesis proteica en los ribosomas; además, varias enzimas de la glicólisis requieren potasio, por ejemplo, la piruvato quinasa (Ripol, Septiembre 2001).

El establecimiento de gradientes de concentración como los de sodio, potasio y protones, permiten el almacenamiento de energía potencial en la célula, para la realización de trabajos, como el transporte de solutos. Por ejemplo, el movimiento de glucosa a través de la membrana plasmática, ocurre mediante cotransporte con iones sodio, aprovechando el gradiente de

tejidos, además del tejido renal, teniendo entonces efecto sobre otros procesos fisiológicos, que dependen del gradiente de sodio.

Existen algunas consideraciones de tipo energético relacionadas con el funcionamiento de la ATPasa de sodio-potasio que se deben tomar en cuenta, sobre todo si se admite ritmicidad en su actividad. El transporte activo de sodio y potasio es uno de los principales consumidores de energía en el organismo y probablemente es la parte más importante del metabolismo basal. Así, existe una relación directa entre el transporte de sodio y potasio y el metabolismo: cuanto mayor sea la actividad de la bomba, mayor cantidad de ADP se forma y, la cantidad de este disponible, determina la tasa a la cual se forma el ATP por fosforilación oxidativa (Ganong 1988).

El corazón, órgano encargado de garantizar el suministro de los sustratos necesarios para la dotación energética a todas las células del cuerpo, debería presentar una actividad rigurosamente adecuada a estos requerimientos que dependen de las actividades de los seres vivos.

En este particular, existen una serie de factores que tienen un importante rango de influencia en la ritmicidad de la función cardíaca. Por ejemplo, la

secreción de cortisol presenta un pico de concentración a primeras horas de la mañana, y desciende hasta valores próximos a cero al comienzo de la noche. La acción vasoconstrictora de las catecolaminas sobre las arteriolas, ocurre normalmente en presencia de cortisol, existiendo una estrecha correlación entre los momentos de secreción de estos dos compuestos. Un aumento de los valores plasmáticos de cortisol, se ve acompañado de un aumento de los valores de las catecolaminas, preparando al organismo para una respuesta al estrés, tanto en el metabolismo de la glucosa, como en la acción del sistema vascular. De esta forma, estas hormonas preparan al organismo para el inicio de las actividades matutinas (Fernández y col., 2000).

Debido a las funciones de las catecolaminas, existe una importante relación entre su secreción y otras respuestas que tienen una importancia adaptativa. Estas sustancias son las responsables de la respuesta simpática necesaria en situaciones ergotrópicas, en las que una mayor necesidad de nutrientes y oxígeno para el organismo, exige un mayor esfuerzo al corazón. Así, después del despertar, el organismo pasa por una situación de estrés debida a la rápida transición de un estado de bajo metabolismo a uno de metabolismo más alto, el cual requiere, necesariamente de una respuesta neuroendocrina adecuada. La noradrenalina liberada por las terminaciones simpáticas actúa sobre las fibras

musculares cardíacas, aumentando la fuerza contráctil, la frecuencia y la rapidez de contracción (Fernández y col., 2000).

La bomba de sodio y potasio tiene un papel preponderante en el corazón. En reposo, la célula cardíaca está polarizada, es decir, su interior está cargado negativamente con respecto al exterior, con un potencial transmembrana de  $-80$  a  $-100$  mV. La concentración de calcio extracelular es muy superior a la concentración de calcio libre intracelular y, gracias a la bomba, pasa igual para las concentraciones de sodio. En el músculo cardíaco en reposo, los canales de calcio en el sarcolema están cerrados y el calcio intracelular se almacena en el retículo sarcoplásmico. Con la excitación y la despolarización de la membrana, los canales de sodio sensibles a cambios de voltaje y los canales de calcio del sarcolema se abren, para permitir la entrada rápida de sodio y calcio extracelulares. Se cree que la entrada de calcio produce la liberación del calcio del retículo sarcoplásmico. El calcio liberado por éste difunde luego en el sarcómero, se combina con la Troponina C y, al reprimir la acción de este inhibidor, se activan los miofilamentos, se constituye el complejo actina-miosina-ATP y, se produce la contracción (Fauci, 1998).

Una vez producida la contracción, la recaptación de calcio por el retículo sarcoplásmico en contra de un gradiente de concentración por una bomba de calcio dependiente de ATP, es esencial para la relajación del corazón. Un hecho importante, es que la contracción se activa principalmente por el flujo pasivo de calcio desde el retículo sarcoplásmico. Por el contrario, durante la relajación, el calcio debe ser bombeado activamente fuera del citosol. De esta manera, a menos que el retículo sarcoplásmico sea activado para liberar calcio, este sistema de transporte activo rápidamente secuestra la mayoría del calcio que entra en las células (Fauci, 1998).

La actividad de la bomba de sodio-potasio sarcolémica da lugar al gradiente de sodio, que es en gran parte responsable del transporte activo de calcio fuera de la célula durante la relajación, a través del intercambiador sodio-calcio (Fauci, 1998). Este intercambio (contratransporte), es llevado a cabo por una proteína, que en la membrana de las células del músculo cardíaco intercambia calcio intracelular por sodio extracelular, 1 calcio por 3 sodios. La velocidad de este intercambio, es proporcional al gradiente de concentración de sodio a través de la membrana (Ganong, 1988).

Considerando los efectos de un posible inhibidor de la bomba de sodio y potasio, podemos decir que, en primera instancia, se afectarían los gradientes de sodio a través de la membrana, lo que influiría notablemente sobre el cotransporte sodio-calcio, aumentando en algún grado la concentración de calcio citoplásmico. Como ya se mencionó, la mayor parte del calcio intracelular es secuestrado en el retículo sarcoplásmico en contra de un gradiente de concentración. Un aumento del calcio citoplásmico, se traduciría en un incremento importante de los depósitos de calcio sarcoplásmico. Este calcio adicional almacenado, estaría luego disponible para su liberación, siempre que las células sean activadas y los depósitos de calcio sarcoplásmico sean movilizados. Debido a esto, todos los procesos dependientes de calcio en la célula serían aumentados o amplificados, incluyendo por supuesto, la contractilidad del músculo cardíaco (Blaustein, 1999).

El efecto estimulatorio de los esteroides cardiotónicos o digitales en el corazón es conocido desde hace tiempo, pero su mecanismo de acción no fue establecido sino hasta los años 50. Uno de los clásicos más importantes al respecto, fue la demostración por Cattell y Gold (1938) de que los esteroides cardiotónicos directamente incrementaban la fuerza de contracción del corazón, en el llamado efecto inotrópico positivo. Unos años después Wood y Moe (1942),

mostraron que este efecto cardiotónico estaba asociado con la pérdida de potasio intracelular. Luego, en 1953, Schatzmann, realiza la primordial observación de que los esteroides cardiotónicos eran selectivos y potentes inhibidores de la bomba de sodio y potasio.

Entre los digitales o esteroides cardiotónicos más conocidos está la ouabaína. Para ejercer su efecto inhibitorio sobre la bomba de sodio y potasio, la ouabaína se une a una de las dos subunidades de que consta la proteína, específicamente a la subunidad  $\alpha$  de la misma. El receptor para los esteroides cardiotónicos en la bomba de sodio, está ampliamente distribuido en el reino animal. De hecho, ha sido identificado en animales que están muy abajo en la escala filogenética, como la hidra. Numerosos estudios, han establecido el hecho de que virtualmente todas las células de los animales superiores tienen bombas de sodio y potasio, con receptores para esteroides cardiotónicos (Blaustein, 1993).

Es difícil imaginar que este receptor, tan universalmente presente, sirva primaria o exclusivamente como el sitio de acción de compuestos exógenos presentes en ciertas plantas. Este dilema promueve la especulación acerca de si un ligando endógeno para estos receptores, una sustancia parecida a los

digitales, por ejemplo, pudiese también estar presente en los animales superiores, regulando así el funcionamiento de la bomba de sodio y potasio en todos los tejidos, incluyendo al corazón. Un precedente al respecto fue establecido con el descubrimiento en el cerebro de mamíferos de las endorfinas, y de la morfina como los ligandos endógenos para los receptores opiáceos (Blaustein, 1993).

A este respecto, se ha descrito la síntesis de un glucocorticoide muy similar a la ouabaína en riñón, glándulas adrenales, cerebro y corazón de animales como rata y vaca. La producción de esta ouabaína endógena ha sido asociada con aumento del volumen plasmático del animal, sin implicaciones sobre sus variaciones ultradianas o circadianas (Hamlyn y col., 1991).

Los esteroides cardiotónicos fueron formalmente introducidos en el arsenal de los médicos, para la enfermedad conocida como "Dropsy", (insuficiencia cardíaca con edema), en 1785. Mucho antes, sin embargo, los digitales eran usados en varios medicamentos tópicos. Pero fueron las pruebas clínicas sistemáticas de extractos de *Digitalis purpurea*, los que claramente establecieron la utilidad de los esteroides cardiotónicos en el tratamiento de la insuficiencia cardíaca congénita (Blaustein, 1993).

Desde el punto de vista clínico, la insuficiencia cardiaca puede considerarse como la situación en la que una alteración en la función cardíaca es la responsable de la incapacidad del corazón para bombear sangre de forma adecuada a las necesidades del metabolismo tisular, o cuando esta función sólo puede llevarse a cabo con una presión de llenado anormalmente elevada, o cuando ocurren ambas cosas. En la insuficiencia cardíaca pueden haber alteraciones, durante la sístole, durante la diástole o en ambas. El aumento de la contractibilidad miocárdica mediante la administración de glicósidos cardíacos, es un componente importante en el control de la insuficiencia cardiaca (Fauci, 1998).

Además del efecto mecánico, la administración de glicósidos cardíacos da lugar a una serie de efectos electrofisiológicos, los cuales se producen en el organismo intacto por una mezcla de acciones directas e indirectas. Tiene consecuencias sobre las concentraciones de los iones sodio, potasio y calcio en el exterior o en el interior celular, afectando el potencial de reposo y afectando la velocidad de despolarización inicial, lo cual disminuye la velocidad de conducción. También se ve disminuida la duración del potencial de acción. Indirectamente, los glicósidos cardíacos disminuyen la automaticidad e incrementan el potencial de membrana en reposo, de los tejidos auricular y del

nodo aurículo ventricular, como consecuencia de un aumento del tono vagal y a la disminución de la actividad del sistema nervioso simpático. Así mismo, existe prolongación del período refractario efectivo y disminución en la velocidad de conducción en el tejido del nodo aurículo ventricular. Por esto, algunos digitales se usan también como antiarrítmicos (Padrón-Nieves, 2000).

Sin embargo, los esteroides cardiotónicos pueden presentar más de un efecto tóxico cardíaco o extracardíaco. A altas concentraciones, los efectos eléctricos sobre el corazón pudiesen dar lugar a bradicardia o paro sinusal, bloqueo auriculo-ventricular o una combinación de ellos. También a concentraciones altas, producen un aumento desproporcionado de la actividad del sistema nervioso simpático, produciendo despolarizaciones oscilatorias. La generación de estos potenciales retardados se relaciona con la sobrecarga de las reservas de calcio, así como con la oscilación en su concentración intracelular. De este modo, cada potencial se sigue de un postpotencial, que si llega al umbral produce una extrasístole y luego, tal vez una arritmia sostenida, que puede desencadenar una fibrilación ventricular (Padrón-Nieves, 2000).

Aparte del corazón, las vías gastrointestinales son el sitio más común de los efectos tóxicos de los digitales. De manera menos frecuente, a nivel del sistema

nervioso central, se presenta desorientación, alucinaciones y trastornos visuales (Padrón-Nieves, 2000).

Por lo expuesto anteriormente, se hace preponderante la dilucidación de la presencia e influencia de ligandos endógenos inhibidores de la bomba de sodio-potasio, en tejidos como el corazón, debido a las implicaciones fisiológicas y terapéuticas que involucran el uso más adecuado en dosis y régimen para la administración de glicósidos cardíacos en el tratamiento de la insuficiencia cardíaca. Es decir, si existiese una oscilación en la actividad de la bomba de sodio-potasio del tejido cardíaco, causada por ligandos endógenos circulantes que la hiciese significativamente distinta, por ejemplo, en la mañana y en la tarde, la administración de glicósidos cardíacos, a distintas horas del día, debería ser en cantidades coherentes con el grado de inhibición causado endógenamente.

La presencia de ligandos endógenos, inhibidores de la bomba de sodio-potasio, pudiese estar relacionada con la existencia de mecanismos adaptativos en los seres vivos, vinculados a sus ciclos de actividad, teniendo influencia sobre la ocurrencia de algunas enfermedades. Así por ejemplo, se sabe que existe tres veces más riesgo de muerte por ataques cardíacos en las seis horas antes del

mediodía que tarde en la noche, aparentemente debido a que el pulso y la presión sanguínea comienzan a aumentar rápidamente cuando el cuerpo se prepara para un nuevo día.

Además, su presencia rítmica a nivel del organismo, pudiese tener implicaciones como la de una recuperación energética luego de un período de intensa actividad, generalmente desarrollado en las primeras horas de la mañana.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### 1.- INDIVIDUOS DE EXPERIMENTACIÓN

Los experimentos se realizaron con ratas macho de la cepa Sprague-Dawley, de 3 ½ meses de edad. Los animales eran sacrificados en grupos de tres, a las 0900h y a las 1500h.

También se trabajó con personas del sexo masculino, con edades comprendidas entre los 20 y 30 años, a quienes se extraía sangre a las 0900h y a las 1500h.

### 2.- OBTENCIÓN DE SANGRE DE RATA

Las ratas eran anestesiadas con pentotal sódico. Luego, se les practicaba una incisión ventral media y se les extraía sangre directamente desde el ventrículo izquierdo, con inyectoras de 10 ml previamente heparinizadas. La sangre heparinizada se centrifugaba a 12000xg por 10 segundos a 4°C, con una

centrífuga marca Sorvall RC-5B (rotor SS-34).

Luego, se succionaba cuidadosamente el sobrenadante de cada tubo, que corresponde al plasma. El precipitado se trataba posteriormente para obtener los fantasmas de glóbulos rojos.

### 3.- OBTENCIÓN DE SANGRE DE SERES HUMANOS

A los sujetos se les extraía la sangre por punción venosa, con inyectoras de 10 ml previamente heparinizadas. La sangre heparinizada se centrifugaba a 12000xg por 10 segundos a 4°C, con una centrífuga marca Sorvall RC-5B (rotor SS-34).

Luego, se succionaba cuidadosamente el sobrenadante de cada tubo, que corresponde al plasma. El precipitado se trataba posteriormente para obtener las membranas de glóbulos rojos.

#### 4.- PREPARACIÓN DE FANTASMAS DE GLÓBULOS ROJOS

La preparación de fantasmas se llevaba a cabo mediante una modificación del método de Heinz y Hoffman (1965).

Después de separar el suero sanguíneo, se aspiraba la capa de glóbulos blancos y los glóbulos rojos empaquetados eran resuspendidos en una solución salina isosmótica de NaCl (150 mM) y Tris-HCl (10 mM), a pH 7,5 a 0°C. Posteriormente, se realizaban dos lavadas consecutivas con la misma solución (relación 1:2), removiendo cada vez el sobrenadante y, junto con él, aquellos glóbulos blancos que pudiesen haber quedado luego de la primera centrifugación.

Los eritrocitos eran hemolizados durante 20 min a 0°C en una solución hipoosmótica: Tris-HCl (17 mM) a pH 7,5, manteniéndose en agitación constante durante ese tiempo. La relación para la hemólisis es de 1 volumen de glóbulos rojos empaquetados por 9 volúmenes de solución de hemólisis. La resuspensión se centrifugaba a 48.000xg durante 20 min a 4°C. El sobrenadante era aspirado, el precipitado se volvía a resuspender en la misma solución de hemólisis y se procedía a centrifugar de nuevo, hasta obtener los fantasmas de

glóbulos rojos libres de hemoglobina. Esto es, un precipitado color crema, constituido por fantasmas de glóbulos rojos. La preparación así obtenida contiene menos de 0,1% de hemoglobina, con respecto a la muestra original de glóbulos rojos intactos (Dodge, 1963).

#### 5.- PREPARACIÓN Y HOMOGENIZACIÓN DE REBANADAS DE CORTEZA RENAL DE RATA

Luego de extraída la sangre, se extraían los riñones a cada rata, se decapsulaban y se colocaban a 4°C en la siguiente solución de resuspensión (mM): Sacarosa, 250mM; Tris-HCl (pH 7.2), 20mM; Ditioneitol (DTT), 0,5mM y Fluoruro de fenil-metil-sulfónico (FFMS), 0,2mM.

Con la ayuda de una hojilla, se cortaban rebanadas de la parte más externa de la corteza renal (rica en túbulos proximales), se pesaban y se les adicionaban tres volúmenes de la solución arriba indicada. Esta suspensión se homogenizaba con ocho golpes, en un homogenizador de émbolo de teflón del tipo "Potter-Elvehjem", a 2.500 rpm. De esta forma, se preparaban los homogenizados totales de las rebanadas de la corteza renal de rata. Luego, estos homogenizados eran

centrifugados, filtrándose el precipitado obtenido, a través de una capa de gaza.

#### 6.- PREPARACIÓN Y HOMOGENIZACIÓN DE REBANADAS DE HÍGADO DE RATA

Se extraían, además, el hígado a cada rata y se colocaba a 4°C en la misma solución de resuspensión usada para los riñones.

Con la ayuda de una hojilla, se cortaban rebanadas, se pesaban y se les adicionaba tres volúmenes de la solución de resuspensión. Esta suspensión se homogenizaba con ocho golpes en el homogenizador de émbolo de teflón. Luego, estos homogenizados eran filtrados, a través de una capa de gasa.

#### 7.- PREPARACIÓN Y HOMOGENIZACIÓN DE REBANADAS DE CORAZÓN DE RATA

También se extraía el corazón a cada rata, y se colocaba a 4°C en la solución de resuspensión usada anteriormente.

Con la ayuda de una hojilla, se cortaban rebanadas del pericardio ventricular, se pesaban y se les adicionaban tres volúmenes de la solución de resuspensión. Esta suspensión se homogenizaba con cinco golpes, en un homogenizador de cuchilla Ultra-Turrax T25, setting N°5 y con ocho golpes en el homogenizador de émbolo de teflón. Luego, estos homogenizados eran filtrados, a través de una capa de gasa.

Todos los homogenizados preparados en los pasos 4, 5 y 6 se almacenaban a  $-70^{\circ}\text{C}$ , hasta la realización de los ensayos ATPásicos.

#### 8.- DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA ATPasa DE Na,K PARA HOMOGENIZADOS DE CORTEZA RENAL, HÍGADO Y CORAZÓN DE RATA

La determinación de la ATPasa de Na,K, se realizaba siguiendo el método descrito por Proverbio y col. (1981). El fosfato inorgánico liberado durante la reacción, era determinado según el método descrito por Marín y col. (1986).

El medio donde se efectuaba la reacción enzimática constaba de 180  $\mu\text{l}$  de medio de incubación y 20  $\mu\text{l}$  de la suspensión de membranas (con una

concentración de proteínas de 0,2 - 0,5 mg/ml), para obtener un volumen final de 200  $\mu$ l.

Composición de los medios:

| MEDIO 1           |        | MEDIO 2           |        |
|-------------------|--------|-------------------|--------|
| MgCl <sub>2</sub> | 5 mM   | MgCl <sub>2</sub> | 5mM    |
| NaCl              | 100 mM | NaCl              | 100 mM |
| KCl               | 20 mM  | KCl               | 20 mM  |
| Tris-ATP          | 2 mM   | Tris-ATP          | 2 mM   |
| Ouabaína          | 0      | Ouabaína          | 5 mM   |
| Tris-Hcl          | 50 mM  | Tris-Hcl          | 50 mM  |

El procedimiento era el siguiente: 180  $\mu$ l del medio de incubación se preincubaban por dos minutos a 37°C, y la reacción se iniciaba añadiendo 20  $\mu$ l de la fracción de membranas. La reacción se finalizaba a los 10 minutos, agregando 300  $\mu$ l de una solución mantenida en frío (solución A), la cual contenía (%):

dodecil sulfato de sodio (SDS), 0,72; ácido molíbdico, 0,48; ácido ascórbico, 2,86 y HCl, 2,18. Los tubos de incubación se colocaban, luego, en hielo durante 10 minutos. Después de transcurrido este tiempo, se le añadía a cada uno de los tubos 0,5 ml de la siguiente solución (solución B), la cual contenía (%): 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 Spectronic 1201 a 705 nm.

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.

La actividad específica de la ATPasa de Na,K, se calcula como la diferencia entre la actividad ATPásica medida en el medio 1, menos la medida en el medio 2; es decir, como la actividad ATPásica medida en presencia de Na<sup>+</sup> y K<sup>+</sup>, sensible a ouabafina.

## 9.- DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA ATPasa DE Na,K PARA FANTASMAS DE GLÓBULOS ROJOS

El medio donde se efectuaba la reacción enzimática constaba de 400  $\mu$ l de medio de incubación y 100  $\mu$ l de la suspensión de membranas (con una concentración de proteínas de 0,5 - 0,7 mg), para obtener un volumen final de 500  $\mu$ l.

Composición de los medios:

| MEDIO 1           |         | MEDIO 2           |         |
|-------------------|---------|-------------------|---------|
| MgCl <sub>2</sub> | 5 mM    | MgCl <sub>2</sub> | 5 mM    |
| NaCl              | 100 mM  | NaCl              | 100 mM  |
| KCl               | 20 mM   | KCl               | 20 mM   |
| ATP               | 2 mM    | ATP               | 2 mM    |
| Ouabaína          | 0       | Ouabaína          | 5 mM    |
| Tris-HCl          | 10 mM   | Tris-HCl          | 10 mM   |
| EGTA              | 0,24 mM | EGTA              | 0,24 mM |

El procedimiento era el siguiente: 400  $\mu$ l del medio de incubación se preincubaban por dos minutos a 37°C, y la reacción se iniciaba añadiendo 100  $\mu$ l de la fracción de membranas. La reacción se finalizaba a los 30 minutos, agregando 300  $\mu$ l de una solución mantenida en frío (solución A), la cual contenía (%): dodecil sulfato de sodio (SDS), 0,72; ácido molíbdico, 0,48; ácido ascórbico, 2,86 y HCl, 2,18. Los tubos de incubación se colocaban, luego, en hielo durante 10 minutos. Después de transcurrido este tiempo, se le añadía a cada uno de los tubos 0,2 ml de la siguiente solución (solución B), la cual contiene (%): arsenito de sodio, 5; ácido acético, 5 y citrato de sodio, 5. Los tubos de incubación se recalentaban a 37°C por 10 minutos. Transcurrido este tiempo, se procedía a medir la absorbancia en el espectrofotómetro a 705 nm.

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  $\mu$ l de la solución A.

La actividad específica de la ATPasa de Na,K, se calcula, al igual que para las actividades de homogenizado de hígado y corazón, como la diferencia entre la actividad ATPásica medida en el medio 1 menos la medida en el medio 2.

## 10.- DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS

La determinación del contenido proteico de las muestras, se realizaba según el método de Bradford, (Bradford 1976). Para ello, se utilizaba el reactivo concentrado de azul brillante de coomasie (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA, U.S.A). Este reactivo debe mantenerse almacenado a 5 °C, hasta el momento de su uso a temperatura ambiente.

El procedimiento es el siguiente: se prepara una curva de calibración usando 100, 200 y 400 µl de albúmina 25 µg/ml, llevando luego a un volumen final de 800 µl con agua destilada. Se preparan cuatro blancos para calibrar el espectrofotómetro, los cuales llevan 790 µl de agua destilada y 10 µl del medio de resuspensión. Las muestras se preparan por cuadruplicado, y llevan 10 µl de la suspensión de membranas y 790 µl de agua destilada. Tanto a las muestras como a los blancos, se les añade 200 µl del reactivo, se agitan y, se dejan a temperatura ambiente durante 5 min. Luego, se mide la absorbancia en un espectrofotómetro a 595 nm. La densidad óptica es lineal para un rango de concentración de proteínas entre 0,07 mg/ml y 2,7 mg/ml.

## 11.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todos los ensayos se hicieron por cuadruplicado 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. Comparaciones entre los resultados de los distintos experimentos, se realizaron utilizando la prueba  $t$  de Student.

## RESULTADOS

En nuestro laboratorio (Segura, 1997), se demostró la existencia de variaciones significativas en la actividad ATPásica de Na,K de homogenizados de túbulo proximal de riñón de rata, en función de la hora del día. Esto se ilustra en la Figura 1, donde se muestra la actividad ATPásica de Na,K a lo largo de las 24 horas del día, del tejido renal mencionado, proveniente de ratas mantenidas por dos semanas en un esquema de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. Nótese la presencia de dos picos: a las 0900h y a las 2100h y, dos valles: a las 0300h y a las 1500h.

También en el laboratorio (Galindo 2001), se demostró que la variación ultradiana en la actividad ATPásica de Na,K no se debe a un estado de activación de la enzima a las 0900h y a las 2100h, sino a un estado de inhibición de la misma a las 0300h y a las 1500h. Este estado es causado por un inhibidor, que se encuentra adherido a las membranas, y que es fácilmente desprendido de las mismas por centrifugación.

Más aún, Galindo en el mismo trabajo demuestra en forma clara que existe un elemento inhibidor de la actividad ATPásica de Na,K en el plasma

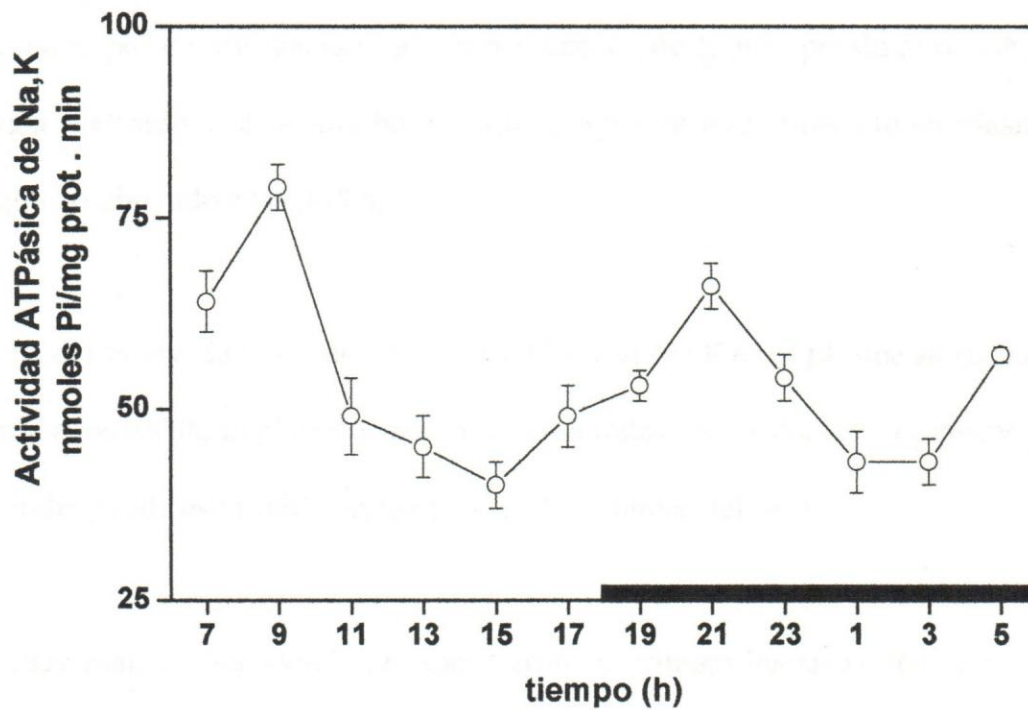


FIGURA 1

Actividad ATPásica de Na,K de homogenizados de corteza renal de riñón de ratas, mantenidas por 2 semanas dentro de un esquema de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. Pasadas las 2 semanas, se sacrificó un animal cada 12 horas, hasta completar las 24 horas. Los resultados son presentados como las medias  $\pm$  el error estándar, para  $n = 6$ .

Tomado de Segura, D. Trabajo de Grado de Maestría. Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas, julio 1997.

TABLA 1

ACTIVIDAD ATPásica DE Na,K DE HOMOGENIZADOS DE HÍGADO DE  
RATA OBTENIDOS A LAS 0900h Y A LAS 1500h

| Muestra | Actividad ATPásica de Na,K:<br>nmoles Pi/mg prot . min | p       |
|---------|--------------------------------------------------------|---------|
| 0900h   | $31 \pm 2$                                             |         |
| 1500h   | $19 \pm 1$                                             | < 0,001 |

Valores expresados como las medias  $\pm$  el error estándar, n = 6

de homogenizados de corazón de ratas sacrificadas a las 0900h y, de ratas sacrificadas a las 1500h. Los resultados del experimento pueden observarse en la Tabla 2: la actividad ATPásica de Na,K de homogenizados de corazón de ratas sacrificadas a las 0900h resultó ser significativamente mayor que la actividad ATPásica de homogenizados de corazón de ratas sacrificadas a las 1500h.

Si nos encontramos frente al mismo fenómeno descrito por Galindo (2001), entonces pudiera esperarse que el inhibidor unido a las membranas de células hepáticas o cardíacas, también se despreque o degenere con el tiempo, de tal modo que la actividad de la enzima, semejante a lo que sucedió con el tejido renal, mostrado en la Figura 2, se recupere con el paso del tiempo de preparación.

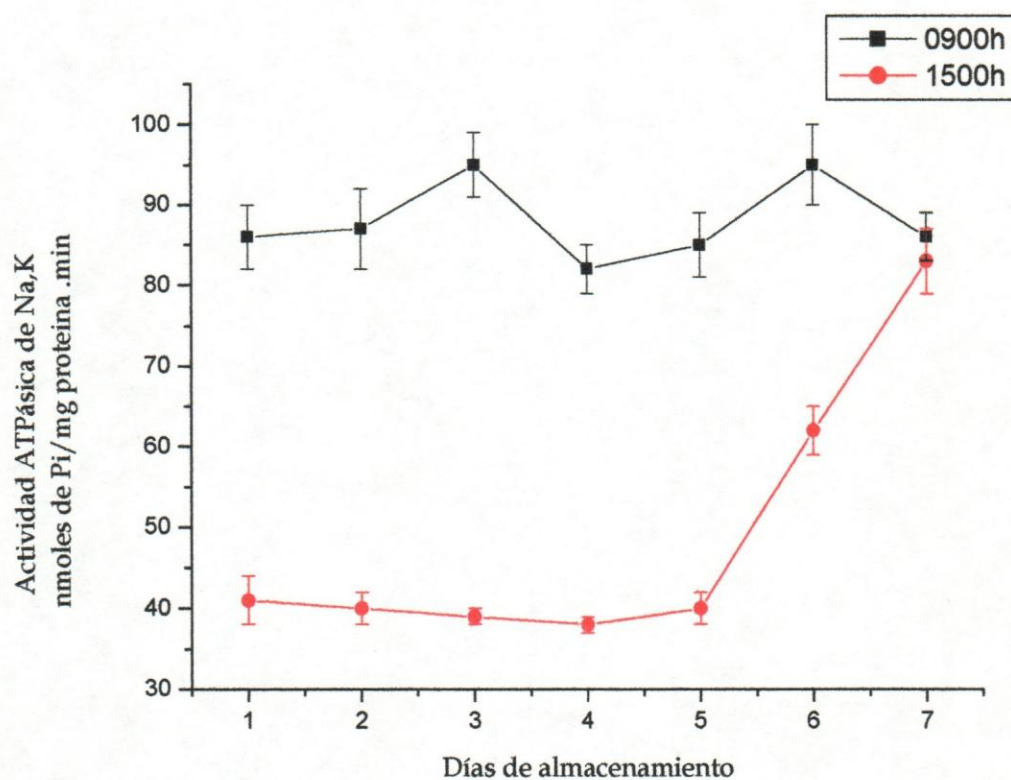
El experimento se realizó con ambos tejidos. Para ello, se prepararon homogenizados de corazón e hígado de ratas sacrificadas a las 0900h y a las 1500h, se almacenaron a  $-70^{\circ}\text{C}$  y, diariamente se determinaba la actividad ATPásica de Na,K para todas las muestras. Los resultados de este experimento, se muestran en las Figuras 3 y 4, respectivamente. Obsérvese en ambos casos que, a semejanza de lo ya demostrado para tejido renal, mientras la actividad de la enzima del material obtenido a las 0900h permanece prácticamente constante

TABLA 2

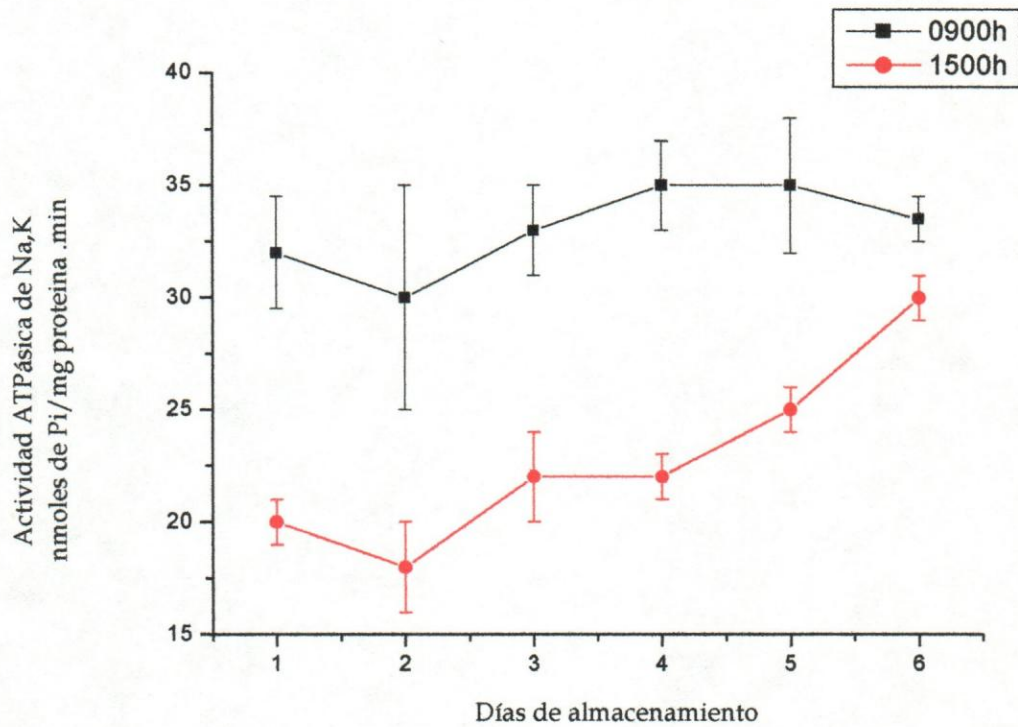
ACTIVIDAD ATPásica DE Na,K DE HOMOGENIZADOS DE CORAZÓN DE  
RATA OBTENIDOS A LAS 0900h Y A LAS 1500h

| Muestra | Actividad ATPásica de Na,K:<br>nmoles Pi/mg prot . min | p      |
|---------|--------------------------------------------------------|--------|
| 0900h   | $35 \pm 2$                                             |        |
| 1500h   | $25 \pm 1,5$                                           | < 0,01 |

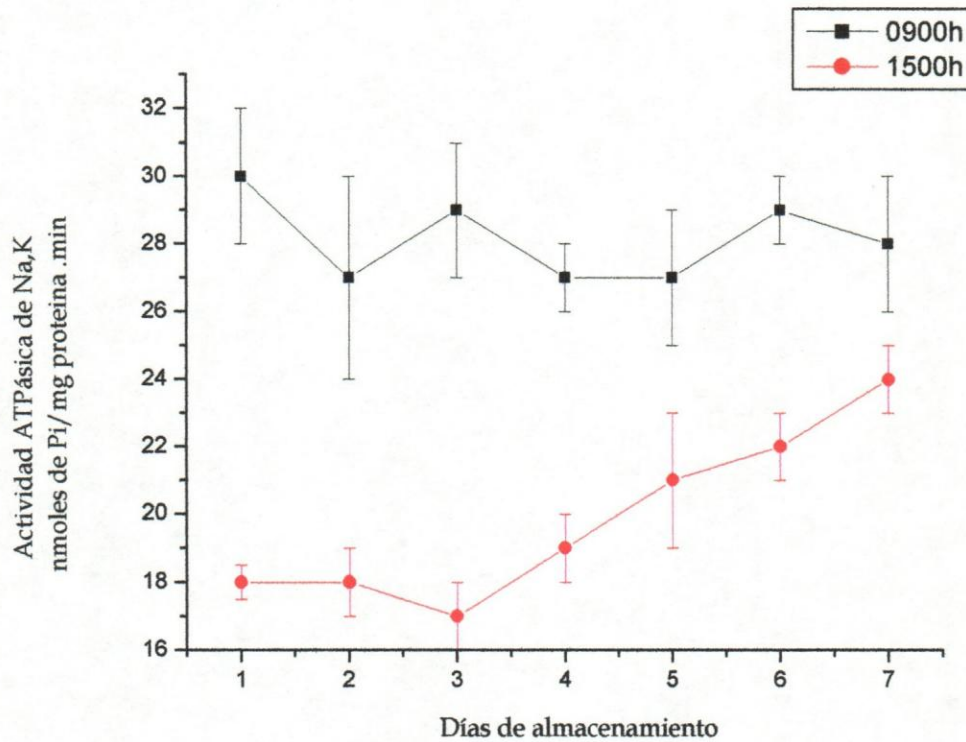
Valores expresados como las medias  $\pm$  el error estándar, n = 6

**FIGURA 2**

Actividad ATPásica de Na,K de homogenizados de corteza de riñón de rata obtenido a las 0900h o a las 1500h, en función del tiempo transcurrido después de preparación de las muestras. Los resultados son presentados como las medias  $\pm$  el error estándar, para  $n = 6$ .

**FIGURA 3**

Actividad ATPásica de Na,K de homogenizados de corazón de ratas sacrificadas a las 0900h o a las 1500h, en función del tiempo transcurrido después de preparación de las muestras. Los resultados son presentados como las medias  $\pm$  el error estándar, para  $n = 6$ .

**FIGURA 4**

Actividad ATPásica de Na,K de homogenizados de hígado de rata obtenidos a las 0900h o a las 1500h, en función del tiempo transcurrido después de preparación de las muestras. Los resultados son presentados como las medias  $\pm$  el error estándar, para  $n = 6$ .

a lo largo del tiempo de preparación, la actividad de la enzima del material preparado a las 1500h va aumentando con el paso del tiempo, hasta hacerse prácticamente igual a la del material obtenido a las 0900h.

Una vez en la seguridad de que no estamos frente a un fenómeno local sino mas bien general, decidimos estudiar la posibilidad de que se pudiera ver también en células que pueden ser obtenidas con facilidad y en abundancia, como es el caso para los glóbulos rojos. Para ello, se sacó sangre de ratas a las 0900h y a las 1500h, se prepararon fantasmas o membranas celulares de los mismos, y se ensayaron para actividad ATPásica de Na,K. Los resultados de este experimento se muestran en la Tabla 3: como esperado, la actividad ATPásica de los fantasmas de glóbulos rojos de las muestras tomadas a las 1500h, presenta un valor que es significativamente más bajo que el de las muestras tomadas a las 0900h.

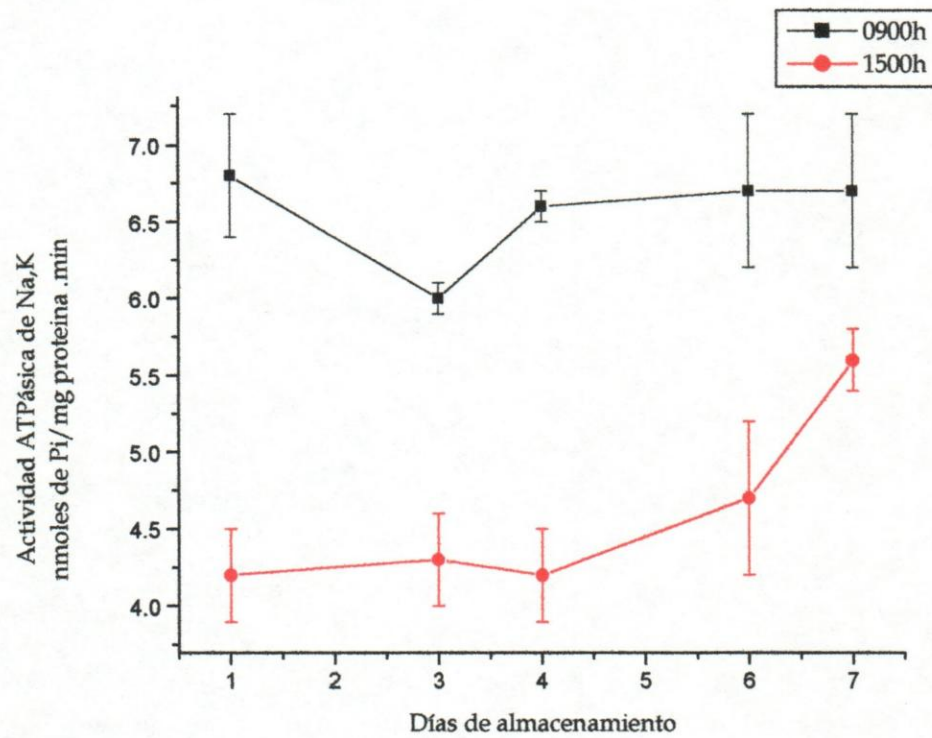
De nuevo se procedió a estudiar la característica de desaparición del efecto inhibitorio con el tiempo de preparación, para lo que se prepararon fantasmas de glóbulos rojos de ratas sacrificadas a las 0900h y a las 1500h y se ensayaron para Na,K ATPasa en el tiempo de almacenamiento de las muestras. Como se presenta en la Figura 5, con el paso del tiempo se fue perdiendo el poder

TABLA 3

ACTIVIDAD ATPásica DE Na,K DE FANTASMAS DE GLÓBULOS ROJOS DE  
RATA OBTENIDOS A LAS 0900h Y A LAS 1500h

| Muestra | Actividad ATPásica de Na,K:<br>nmoles Pi/mg prot . min | p      |
|---------|--------------------------------------------------------|--------|
| 0900h   | $6,4 \pm 0,3$                                          |        |
| 1500h   | $4,2 \pm 0,4$                                          | < 0,01 |

Valores expresados como las medias  $\pm$  el error estándar, n = 6

**FIGURA 5**

Actividad ATPásica de Na,K de fantasmas de glóbulos rojos de rata obtenidos a las 0900h o a las 1500h, en función del tiempo transcurrido después de preparación de las muestras. Los resultados son presentados como las medias  $\pm$  el error estándar, para  $n = 6$ .

inhibitorio del factor, siendo ya para el día 7 de almacenamiento, las actividades de la enzima muy parecidas entre sí.

Un detalle que llama la atención en este momento, estriba en el hecho de que los fantasmas de glóbulos rojos se prepararon por centrifugaciones sucesivas, técnica esta que es capaz de despegar el inhibidor unido a las membranas de tejido renal (Galindo 2001), pero que evidentemente no lo hace en el caso de los fantasmas de los glóbulos rojos. Como sea que la diferencia fundamental en la preparación de ambas muestras es el medio utilizado: 250mM Sacarosa, 20mM Tris-HCl (pH 7.2 a 0°C) para tejido renal y 17 mM Tris-HCl (pH 7,5 a 0°C) para glóbulos rojos, decidimos, para indagar sobre este particular, centrifugar fantasmas de glóbulos rojos de sangre obtenida a las 0900h y a las 1500h, por tres veces, resuspendiendo los precipitados en cada caso, bien con la misma solución de hemólisis, bien con el medio de resuspensión del tejido renal. Al final, las muestras eran congeladas para luego ser ensayadas para actividad ATPásica de Na,K. Los resultados de este experimento, se muestran en la Tabla 4: nótese que, aparte del hecho de que las centrifugaciones en el medio de resuspensión renal introducen un cierto grado de purificación de la ATPasa, los dos valores, material 0900h y 1500h, son iguales, lo cual no fue el caso cuando las centrifugaciones se realizaron en el mismo medio de hemólisis.

TABLA 4

ACTIVIDAD ATPásica DE Na,K PARA FANTASMAS DE GLÓBULOS ROJOS DE RATA OBTENIDOS A LAS 0900h Y A LAS 1500h Y CENTRIFUGADOS LUEGO POR TRES VECES EN SOLUCIÓN DE HEMÓLISIS O EN SOLUCIÓN DE RESUSPENSIÓN, LUEGO DE SU PROCESAMIENTO NORMAL.

| Actividad ATPásica de Na,K:<br>nmoles Pi/mg prot . min |           |          |       |
|--------------------------------------------------------|-----------|----------|-------|
| Muestra                                                | 0900h     | 1500h    | p     |
| Centrifugada en hemólisis                              | 3.9 ± 0.1 | 2 ± 0.03 | <0,01 |
| Centrifugada en resuspensión                           | 7.6 ± 0.4 | 7.1 ± 1  | n.s.  |

Valores expresados como las medias ± el error estándar, n = 6

La existencia de una inhibición rítmica de carácter ultradiano sobre la actividad ATPásica de Na,K para diferentes órganos y células de un mamífero, sobre todo en tejido cardíaco, tiene serias implicaciones regulatorias. Por esto, se consideró de alta relevancia intentar evaluar la ocurrencia de este fenómeno en otros seres vivos, específicamente en seres humanos, aprovechando el detalle de la facilidad para obtener muestras de sangre de los mismos.

Se decidió trabajar con personas del sexo masculino, para lo cual se extrajo sangre a 6 individuos, con edades comprendidas entre los 20 y 30 años, tomándose en cada caso muestras a las 0900h y a las 1500h. Se prepararon fantasmas de glóbulos rojos, se congelaron, y luego se ensayaron para actividad ATPásica de Na,K. Los resultados de esta experiencia, se presentan en la Tabla 5. Sumamente interesante, las muestras tomadas a las 1500h presentan una actividad ATPásica significativamente más baja que las muestras tomadas a las 0900h. En otras palabras, el fenómeno también se presenta en humanos.

A continuación, procedimos a estudiar el comportamiento de las muestras inhibidas a lo largo del tiempo de preparación. Para ello, realizamos el mismo tipo de experimento ya indicado para los otros tejidos probados: se prepararon

TABLA 5

ACTIVIDAD ATPásica DE Na,K DE FANTASMAS DE GLÓBULOS ROJOS  
HUMANOS OBTENIDOS A LAS 0900h Y A LAS 1500h

| Muestra | Actividad ATPásica de Na,K:<br>nmoles Pi/mg prot . min | p       |
|---------|--------------------------------------------------------|---------|
| 0900h   | 3,5 $\pm$ 0,17                                         |         |
| 1500h   | 1,9 $\pm$ 0,11                                         | <0,0001 |

Valores expresados como las medias  $\pm$  el error estándar, n = 6

fantasmas de glóbulos rojos humanos tomados a las 0900h y a las 1500h, se almacenaron a  $-70^{\circ}\text{C}$  y se les determinó diariamente la actividad ATPásica de Na,K. Los resultados se muestran en la Figura 6: de la misma manera que para los tejidos de rata, la actividad de la enzima, que aparece inhibida al momento de la preparación, se iguala a la del control, después de un cierto tiempo de almacenamiento.

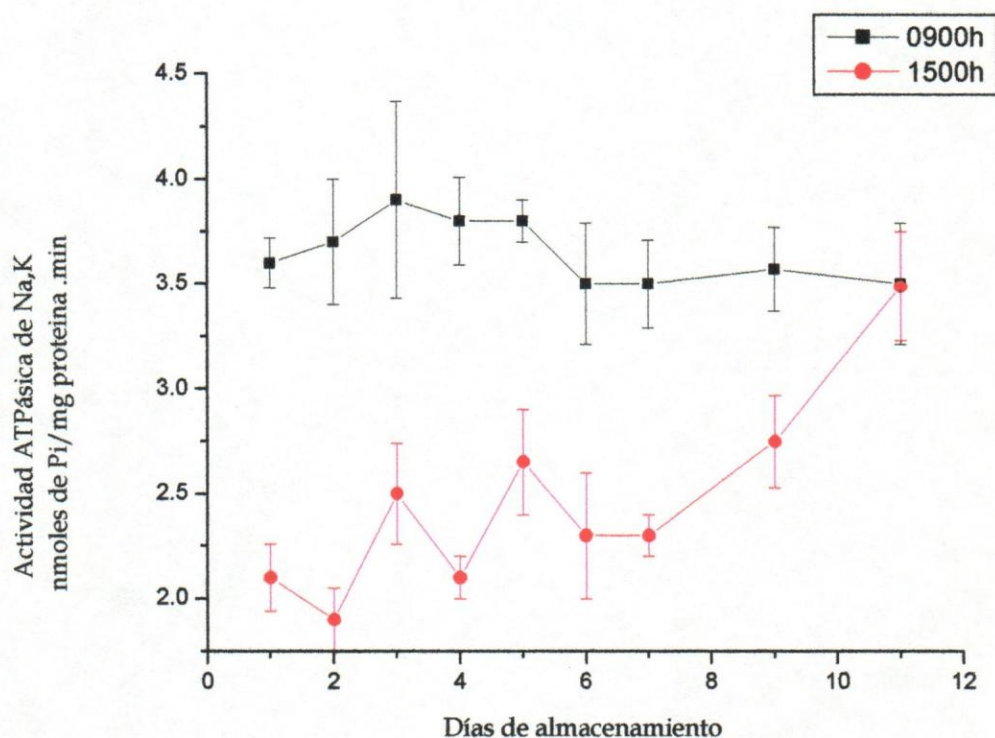


FIGURA 6

Actividad ATPásica de Na,K de fantasmas de glóbulos rojos humanos obtenidos a las 0900h o a las 1500h, en función del tiempo transcurrido después de preparación de las muestras. Los resultados son presentados como las medias  $\pm$  el error estándar, para  $n = 6$ .

## DISCUSIÓN

La generación de gradientes de sodio y potasio tiene una altísima relevancia para los seres vivos, y está asociada a actividades motoras, neurológicas y secretoras. Así por ejemplo, el gradiente de sodio y potasio es esencial para garantizar la excitabilidad de las neuronas y la recaptación de neurotransmisores por parte de las mismas, fenómenos de los cuales depende el funcionamiento de todo el sistema nervioso. También, el funcionamiento del sistema contráctil en los músculos, depende íntimamente de los gradientes de sodio y potasio asociados a los del ion calcio. El establecimiento de estos gradientes, depende en gran parte del transporte activo realizado por la bomba de Na,K en las membranas celulares.

Energéticamente, es importante considerar que en todo proceso de transporte activo la entropía disminuye y por ello, es necesaria una fuente de energía para dirigir el transporte. La bomba de Na,K utiliza ATP como molécula energética, hidrolizando una molécula por ciclo funcional (Horton y col., 1995).

En 1997, Segura demuestra oscilación ultradiana en la actividad de la Na,K ATPasa en homogenizado de corteza renal de rata (Figura 1).

Recientemente Galindo (2001), comprueba que estas oscilaciones son causadas por un estado de inhibición de la enzima a las horas de menor actividad (0300h y 1500h) y no por un estado de activación a las horas de máxima actividad (0900h y 2100h). La inhibición es causada por efecto de un factor inhibitorio, presente en altas concentraciones en el plasma sanguíneo cuando la actividad ATPásica se encuentra inhibida y en muy bajas concentraciones o, incluso ausente, cuando la actividad ATPásica es máxima.

La presencia de dicho factor en plasma sanguíneo, circulando por el organismo a determinadas horas del día, permite suponer su influencia sobre la actividad ATPásica de Na,K en otras células, tejidos y órganos, con importantes implicaciones regulatorias.

En ese sentido, se demostró en este trabajo la existencia del fenómeno oscilatorio en el hígado de rata, ya que los ensayos para actividad ATPásica para homogenizado de rebanadas de hígado reportaron un valor mayor en el material obtenido a las 0900h comparado con el obtenido a las 1500h (Tabla 1). La actividad ATPásica de Na,K en este órgano con importantes funciones fisiológicas, también se ve regulada siguiendo aparentemente el mismo patrón de ritmicidad observado para homogenizados de corteza renal de rata.

De la misma forma, se realizaron estudios sobre la actividad ATPásica de Na,K para tejido cardíaco de rata. Los homogenizados de corazón obtenidos a las 0900h presentaron una mayor actividad ATPásica comparado con el material extraído a las 1500h (Tabla 2). Este resultado fortalece la suposición de que el inhibidor de la ATPasa de Na,K pueda tener una influencia general en todo el organismo.

Esta influencia, podría también manifestarse en un tipo celular, de fácil obtención y de relativa abundancia, como son los glóbulos rojos de la sangre. Se verificó entonces, la posible influencia del elemento inhibidor en fantasmas de glóbulos rojo de rata. Los ensayos para actividad ATPásica reportaron una menor actividad para las muestras extraídas a las 1500h, comparado con la actividad del material obtenido a las 0900h (Tabla 3).

En función de verificar si el fenómeno inhibitorio responde a las mismas características de lo ya estudiado, es decir, si se trata de un factor inhibitorio que se deteriora o se desprende de las membranas celulares con el tiempo, como sucede con el tejido renal cuya actividad ATPásica de Na,K se recupera después de unos 7 días de preparación de las membranas (Figura 2), se ensayó diariamente la actividad ATPásica de homogenizados de corazón y de hígado,

así como de glóbulos rojos de rata, obtenidos a las 0900h y 1500h. Los resultados muestran, al igual que para tejido renal, que mientras la actividad ATPásica de las muestras obtenidas a las 0900h se mantiene estadísticamente constante, la actividad ATPásica de las muestras extraídas a las 1500h aumenta progresivamente, hasta igualarse a la actividad de las muestras no inhibidas (Figuras 3-5).

La existencia de un inhibidor de la la ATPasa de Na,K en plasma sanguíneo de rata que fluctúa dentro de un ciclo ultradiano, y que aparentemente tiene un efecto general en el organismo del animal, incluyendo los glóbulos rojos sanguíneos, nos animó a llevar nuestra búsqueda de un tipo de fenómeno parecido en el ser humano.

Los resultados de la actividad ATPásica de Na,K ensayada para fantasmas de glóbulos rojos humanos, muestran actividad disminuida para el material obtenido a las 1500h, cuando es comparado con la actividad del material obtenido a las 0900h (Tabla 5), lo que verifica la extensión del fenómeno estudiado hasta los seres humanos.

Se evaluó diariamente la actividad ATPásica de muestras de fantasmas de glóbulos rojos de sangre humana obtenidas a las 0900h y 1500h, obteniéndose resultados similares a los ya observados en los homogenizados de hígado y de corazón, así como en los fantasmas de glóbulos rojos de rata. La actividad ATPásica de las muestras obtenidas a las 1500h, aumenta progresivamente al pasar los días, hasta igualarse a la actividad que presentan las muestras obtenidas a las 0900h, la cual permaneció constante a lo largo del experimento (Figura 6).

La presencia de un factor inhibitorio responsable de una variación rítmica ultradiana de la actividad ATPásica de Na,K de los glóbulos rojos humanos que, al igual que para rata, muy probablemente tenga una influencia general en el organismo, da pie para esbozar una serie de implicaciones:

La regulación de la actividad ATPásica de Na,K en el corazón, tiene importante influencia sobre la función cardíaca, la cual depende fundamentalmente de los rangos de actividad de la bomba de Na,K en referencia a dos funciones, como son, la conducción del impulso nervioso y la contracción muscular.

La inhibición, dentro de ciertos límites de la actividad de las bombas de Na,K a nivel del tejido cardíaco tiene un efecto estabilizante, que se traduce en una disminución de la frecuencia cardíaca y en un aumento de la fuerza con la que se contrae el corazón, garantizando la perfusión y la satisfacción de los requerimientos básicos a todos los tejidos.

Por otra parte, a nivel de organismo, los requerimientos energéticos de la bomba de Na,K son muy altos, siendo uno de los principales consumidores de energía. Su inhibición a una escala general y sobre todo, en tejido cardíaco, derivaría entonces en una reducción del gasto energético. Este planteamiento pudiera tener cierta relación con la variación ultradiana de la actividad de la ATPasa de Na,K reportada en este trabajo. Según ello, períodos de alta actividad metabólica, se continuarían con períodos de baja actividad metabólica, lo cual promovería una recuperación energética, preparando al organismo para el siguiente período de actividad.

Otro aspecto a considerar es el siguiente: la inhibición de la bomba de Na,K a nivel del tejido cardíaco se constituye en la finalidad primordial de la terapia con glicósidos cardíacos, como la ouabaína y la digoxina en el tratamiento de la insuficiencia cardíaca, enfermedad caracterizada por la incapacidad del corazón

para bombear sangre de forma adecuada a las necesidades del metabolismo tisular. La inhibición, como se mencionó anteriormente, aumenta la fuerza con la que se contrae el corazón, disminuye la velocidad de despolarización inicial y, por lo tanto, la velocidad de conducción, estabilizando y mejorando de esa manera la función cardíaca.

Sin embargo, la administración de estos compuestos debe estar siempre limitada a ciertos rangos, pues los efectos tóxicos cardíacos como extracardíacos pueden hacerse presentes.

Por esta razón, es esencial la consideración rigurosa de fenómenos como el estudiado en el presente trabajo, que involucran una oscilación en la actividad ATPásica de Na,K, con el fin de realizar una coordinación más adecuada en la administración de glicósidos cardíacos, y así minimizar cualquier efecto adverso.

Otro detalle interesante relacionado con el presente estudio es el siguiente: hay evidencia que indica que la ocurrencia de una serie de eventos cardiovasculares tiene características rítmicas, la incidencia de infartos al miocardio según estudio realizado en 1.209 pacientes (Biol. Rhythms, Marzo

2001) presenta dos picos, uno de ellos a las 0900h y el otro a las 2100h, presentándose en dos valles aproximadamente a las 0300h y a las 1500h. Esta secuencia temporal concuerda de forma sorprendente con la ritmicidad de la actividad ATPásica de Na,K encontrada en el presente trabajo, para tejido de rata y posiblemente para glóbulos rojos de humano. Por extrapolación, bien pudiera estar sucediendo también para tejido cardíaco humano.

Existe una compleja y dinámica relación entre las fluctuaciones en algunos procesos biológicos y los patrones rítmicos en la función cardiovascular. La mayoría de los marcadores de la función cardiovascular, como la frecuencia cardíaca, la presión sanguínea, el tono vasomotor, la agregación plaquetaria y la viscosidad de la sangre muestran distintos patrones de actividad en función del tiempo. Al realizar un estudio angiográfico, Yasue y colegas (1976), encontraron que el diámetro de las grandes arterias coronarias era menor en la mañana que al atardecer. También se ha encontrado una relación funcional directa en la variación circadiana de la actividad renina-angiotensina-aldosterona y la presión sanguínea, además de una correlación inversa con el péptido natriurético atrial. Aunque existe una significativa variabilidad en la actividad renina-angiotensina-aldosterona, se reporta que la misma está usualmente aumentada durante el día, y alcanza sus niveles más bajos durante la noche. Los

niveles aumentados durante las primeras horas de la mañana, se relacionan con el observado aumento de la presión sanguínea en el mismo período. (Cooke-Ariel, 1998).

El tono simpaticovagal, por su parte, varía en ciclos de 24 horas, con la actividad simpática más alta durante el día y la actividad parasimpática más pronunciada durante la noche. (Cooke-Ariel, 1998). Se ha reportado que compuestos como el cortisol y la adrenalina tienen valores plasmáticos aumentados en las primeras horas de la mañana. La adrenalina induce un aumento de la fuerza, frecuencia y rapidez de contracción del corazón por lo que es, en parte, responsable del pico matinal en la presión arterial. (Fernández y col., 2000). Estos dos compuestos preparan al organismo, antes de empezar un ciclo de actividad física y metabólica más alto.

Todos estos efectos e interacciones, bien pudiesen estar relacionados con un aumento en la incidencia de los eventos cardiovasculares, en estrecho vínculo con una actividad cardíaca acelerada con riesgo de inestabilidad y una actividad ATPásica significativamente aumentada, por la exigencia del sistema en cuestión.

Desde otro punto de vista, la demanda energética para el corazón cuando la frecuencia cardíaca es alta, puede llegar a ser muy significativa debido al abundante consumo de ATP por parte de la bomba de Na,K y otros sistemas que hidrolizan la molécula energética para ejercer su función. Esta situación incrementa, por supuesto, los requerimientos de oxígeno y glucosa para el músculo cardíaco aumentando el riesgo de que estos sean insatisfechos, sobre todo en seres con sistemas cardiovasculares que no se encuentran en buenas condiciones.

Por supuesto que todo lo referido al tejido cardíaco es totalmente especulativo, pero es una posibilidad que bien pudiera ser cierta. Es evidente que se requiere mucha más investigación al respecto, lo cual se recomienda muy especialmente, dada la particular relevancia que el punto pudiera tener.

## BIBLIOGRAFÍA

- Blaustein, M. P., 1993. Physiological effects of endogenous ouabain: control of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  stores and cell responsiveness. *Am. Physiol. Soc.* 264 (Cell Physiol. 33): C1367-C1387.
- Blaustein, M.P., Lederer W.J, 1999. Sodium/calcium exchange: Its physiological implications. *Physiol. Rev.* 79: 763-854.
- Biologic Rhythms: The rhythms of life. Marzo 2001.  
<http://www.chronotherapy.com/>
- Bradford, M. M., 1976. A rapid sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analyt. Biochem.* 72, 248-254.
- Cattell, M., Gold, H., 1938. Influence of digitalis glycosides on force of contraction of mammalian cardiac muscle. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 62: 116-125.

- Cooke-Ariel, H., 1998. Circadian Variations in cardiovascular function and their relation to the occurrence and timing of cardiac events. *Am. J. Health-Syst Pharm.* Vol 55, Nov 15. Suppl 3: S5 - S11.
- Dodge, J.T, Mitchell C, Hanahan D. The preparation and chemical characteristics of hemoglobin-free ghost of human erythrocytes. *Archiv Biochem Biophys* 1963; 100: 119-131.
- Fauci, S.A, 1998. Harrison. Principios de Medicina Interna. Vol 1. 14<sup>va</sup> ed, México 1602 pp.
- Fawcett, D,W. 1997. Tratado de Histología. 12<sup>va</sup> ed, España, 1044 pp.
- Fernández, E., Coelho, D., Missel, J.R., Kumpinski D., 2000. Alteraciones circadianas del sistema cardiovascular. *Rev. Esp. Cardiol.*; 53, 117-122.
- Galindo, M.M.,2001. Estudio sobre posible efecto general del inhibidor ultradiano de la ATPasa Na,K descrito para tejido renal de rata, en particular sobre tejido cardíaco. Trabajo especial de grado para optar al título de licenciado en Educación mención Ciencias Biológicas. UCAB.

- Ganong, W.H., 1988 .Fisiología Médica. 16<sup>a</sup> ed, Manual Moderno, México, 981 pp.
- Hamlyn, J.M., Blaustein, M.P., Bova, S., DuCharme, D.W., Harris, F., Mandel, F., Mathews, W.R., Ludens, H. 1991. Identification and characterization of a ouabain-like compound from human plasma. Proc Natl Acad Sci USA 81: 6259-6263.
- Heinz, E., Hoffman, J.F. Phosphate incorporation of Na,K ATPase activity in human red blood cell ghost. J. Cell. Comp. Physiol. 1965; 54:31-44.
- Horton, H.R., Moran, L.A., Ochs, R.S., Rawn, J.D., Scrimgeour, K.G, 1995. Bioquímica. Edit. Prentice Hall. México.
- Karp, G.1998. Biología celular y molecular. 1<sup>ra</sup> ed, México, 805 pp.
- Marín, R., Proverbio, T., Proverbio, F., 1986. Inside-out basolateral plasma membrane vesicles from rat kidney proximal tubular cells. Biochim. Biophys. Acta. 858, 195-201.

- Moore-Ede, M., Herd, A., 1977. Renal electrolyte circadian rhythms: independence from feeding and activity patterns. *Am. J. Physiol.* 232: F128-F135.
- Padrón-Nieves, M., 2000. Determinación de la actividad de la Na,K ATPasa en fantasmas de glóbulos rojos humanos como una alternativa de la medición del efecto clínico de los glicósidos cardíacos. Trabajo de ascenso para optar a la categoría de Profesor Asistente. UCV.
- Proverbio, F., del Castillo, J. R., 1981. Na<sup>+</sup> - stimulated ATPase activities in kidney basal-lateral plasma membranes. *Biochim. Biophys. Acta.* 646, 99-108.
- La Repolarización. Septiembre 2001.  
<http://www.dietaweb.it/Spanish/ripolarizzazioneESP.html>.
- Schatzmann, H. J. 1953. Herzglycoside als Hemmstoffe für den aktiven Kalium and Natrium Transport durch die Erythrocyten-membran. *Helv. Physiol. Pharmacol. Acta* 11:346-354

- Segura, 1997. Oscilaciones en la actividad ATPásica de Na,K de homogenizados de corteza renal de rata. Tesis de grado como requisito para optar al título de Magister Scientiarium en Biología, mención Bioquímica. CEA, IVIC.
- Yasue, H., Touyama M., Kato, H et al. 1976. Prinzmetal's variant form of angina as a manifestation of alpha-adrenergic receptor-mediated coronary artery spasm: documented by coronary arteriography. Am. Heart J. 91: 148-55.
- Wood, E. H., and G. K. Moe. 1942. Electrolyte and water content of the ventricular musculature of the heart-lung preparation whit special reference to the effects of cardiac glycosides. Am. J. Physiol. 136: 515-522.