AAP6132

TESIS
ED2001
G37.

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

Universidad Católica Andrés Bello
BIBLIOTECA

FACTOR INHIBITORIO RESPONSABLE DE LAS OSCILACIONES DIARIAS DE LA ACTIVIDAD ATPásica DE Na,K EN MEMBRANAS CELULARES DE RATA

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

Autor: María Mercedes Galindo Pérez
Tutor: Dr. Fulgencio Proverbio
Cotutor: Dr. Reinaldo Marín

Caracas, septiembre 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: "Factor inhibitorio responsable de las oscilaciones diarias de la actividad ATPásica de Na,K en membranas celulares de rata", realizado por la Bachiller María Mercedes Galindo Pérez 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 a los 24 días del mes de septiembre 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.

FACTOR INHIBITORIO RESPONSABLE DE LAS OSCILACIONES DIARIAS DE LA ACTIVIDAD ATPásica DE Na,K EN MEMBRANAS CELULARES DE RATA.

Por
MARÍA MERCEDES GALINDO PÉREZ
Universidad Católica Andrés Bello

Dr. Fulgencio Proverbio
Tutor del trabajo
IVIC

Dr. Reinaldo Marín
Cotutor del trabajo
IVIC

Caracas, Septiembre de 2001

I. El presente trabajo se realizó con la siguiente finalidad:

1. Buscar y caracterizar parcialmente a un agente inhibidor de la Na,K-ATPasa, responsable de las oscilaciones en la actividad de esta enzima en corteza renal de rata.
2. Determinar su posible presencia en plasma sanguíneo de rata.
3. Determinar la naturaleza química del inhibidor, y su peso molecular aproximado.

Se trabajó con rebanadas de corteza renal de ratas macho de la cepa Sprague-Dawley, de 3 $\frac{1}{2}$ meses de edad y 200 a 300 g de peso.

II. Se encontró que:

a) Las variaciones en la actividad de la Na,K-ATPasa observadas a lo largo del día son debidas a una mayor o menor inhibición de la enzima.

b) La inhibición de la actividad ATPásica viene dada por la presencia de un factor inhibitorio en la membrana celular.

c) Este inhibidor se encuentra en altas concentraciones en el plasma a las 1500h y en ínfimas concentraciones o ausente, en el plasma de las 0900h.

d) El inhibidor de la enzima, el cual se encuentra incorporado en las membranas de homogenizado de corteza renal de animales sacrificados a las 1500h, puede ser extraído de las mismas por centrifugación.

e) El inhibidor tiene un peso molecular menor de 3 KDa.

f) El inhibidor no es una proteína ni es de carácter lipídico.

III. De los resultados encontrados, se sugiere que el factor inhibitorio de la Na,K-ATPasa viaja por el plasma sanguíneo a concentraciones variables, dentro de un patrón ultradiano (dos ciclos al día). Si bien se han descrito numerosas hormonas capaces de actuar sobre la Na,K-ATPasa, ellas presentan, en general, un ritmo circadiano (un ciclo por día), lo cual hace pensar que el inhibidor en cuestión sea un agente diferente de las hormonas comúnmente estudiadas.

AGRADECIMIENTOS.

Mi agradecimiento especial es para tres personas increíbles, quienes me han enseñado de la ciencia y de la vida:

Al Dr. Fulgencio Proverbio, una persona de la cual hay mucho que aprender, por haberme permitido ser su alumna: en su paciencia, entrega sencillez, sabiduría, amabilidad, así como el italiano y las respuestas ocurrentes.

Al Dr. Reinaldo Marín, por escuchar y contestar sabia y pacientemente todas mis preguntas, por ayudarme enormemente en la realización y mejoramiento de este trabajo, por enseñarme sobre la exigencia personal y la constancia en el trabajo.

A la Sra. Teresa de Proverbio, por permitirme ser su amiga, por su ayuda y sus cariñosos consejos, por enseñarme a buscar la perfección del trabajo práctico y por hacer mejores los días en el laboratorio.

Quiero también agradecer a mi papá y a mi mamá, por haber sido siempre ejemplo de dedicación y esfuerzo, y por haberme dado todo su apoyo y su cariño.

A mis hermanos, Beatriz, Mónica y Carlos, por haberme brindado su compañía, amistad y cariño.

A Andrés, por ser mi gran compañero, ayudarme a crecer y alegrar mis días; además, por estar conmigo a diario, ayudarme en la búsqueda de bibliografía y en la realización de los experimentos,

A Cilia, Nashdalish y Néstor, por cederme pacientemente su tiempo y ayudarme en cada paso de la experimentación; sin su ayuda, esto no hubiese sido posible.

A Carmela, por su incondicional amistad y apoyo.

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 y al Centro de Química del IVIC, especialmente a Juan Carlos, por su gran ayuda y disposición.

Al personal de la Biblioteca Marcel Roche, por haber orientado y facilitado la búsqueda de bibliografía.

Al Centro de Estudios Avanzados, CEA, por la amabilidad de su personal y diligencia en los trámites realizados.

Al Bioterio del IVIC, por facilitarme los animales de experimentación.

A la Universidad Católica Andrés Bello, por formarme y apoyarme durante toda mi carrera.

A Dios, por haberme dado la vida y las oportunidades.

A todas las personas que por espacio no he podido nombrar, sin quienes este trabajo no hubiese llegado a su fin exitosamente. A todos ustedes, igualmente gracias.

ÍNDICE GENERAL

Página

RESUMEN..... iv

AGRADECIMIENTOS..... vii

LISTA DE TABLAS..... xi

LISTA DE FIGURAS..... xii

INTRODUCCIÓN..... 1

MATERIALES Y MÉTODOS..... 13

1. Animales de experimentación..... 13
2. Obtención de plasma sanguíneo de rata..... 13
3. Preparación y homogenización de rebanadas de corteza renal de rata..... 14
4. Centrifugación de homogenizados de rebanadas de corteza renal de rata..... 15
5. Determinación del peso molecular aproximado del inhibidor..... 16
6. Preparación de fracciones de plasma sanguíneo de rata..... 16
7. Preincubación de homogenizados de corteza renal de rata o precipitados de los mismos..... 18
8. Determinación de la actividad de la ATPasa de Na,K para homogenizados de corteza renal de rata..... 19
9. Determinación de proteínas..... 21
10. Análisis estadístico..... 23

RESULTADOS..... 24

DISCUSIÓN..... 53

BIBLIOGRAFÍA..... 69

LISTA DE TABLAS

TABLA Página

1. Actividad ATPásica de Na,K de homogenizados de corteza renal de rata obtenidos a las 0900h y a las 1500h, y de sus respectivos precipitados después de centrifugación..... 29

2. Efecto sobre la actividad de la ATPasa de Na,K de precipitados obtenidos de centrifugación de material 1500h, al ser preincubados con sobrenadantes resultantes de centrifugación de homogenizados de corteza renal de rata obtenidos a las 0900h y 1500h..... 32

3. Efecto sobre la actividad de la ATPasa de Na,K de precipitado obtenido de centrifugación de material 1500h, preincubado con sobrenadante resultante de centrifugación de homogenizado de corteza renal de rata obtenido a las 0900h y 1500h, cuando se realizó la preincubación en presencia de 5mm de $MgCl_2$..... 34

4. Efecto sobre la actividad de la ATPasa de Na,K de precipitado obtenido de centrifugación de material 0900h, al ser preincubado con sobrenadantes resultantes de centrifugación de homogenizado de corteza reanl de rata obtenido a las 1500h, en presencia o ausencia de 5mm de $MgCl_2$..... 36

LISTA DE FIGURAS

FIGURA Página

1. Actividad ATPásica de Na,K de homogenizados de corteza renal de ratas, mantenidas por 2 semanas dentro de un esquema de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad..... 25

2. Actividad ATPásica de Na,K de homogenizados de corteza renal de ratas sacrificadas a las 0900h o a las 1500h, en función del tiempo transcurrido después de preparación de las muestras..... 27

3. Actividad ATPásica de Na,K de precipitados por centrifugación de homogenizados de corteza renal de ratas sacrificadas a las 1500h, en función del tiempo transcurrido después de preparación de las muestras..... 38

4. Actividad ATPásica de Na,K de homogenizados totales (HT) de corteza renal de ratas sacrificadas a las 0900h y preincubadas con plasma de los mismos animales obtenido a las 0900h y a las 1500h..... 40

5. Actividad ATPásica de Na,K de homogenizados totales (HT) de corteza renal de ratas sacrificadas a las 0900h y preincubadas con plasma de los mismos animales obtenido a las 0900h y a las 1500h..... 41

6. Actividad ATPásica de Na,K de plasma sanguíneo de ratas sacrificadas a las 0900h y a las 1500h..... 42

7. Actividad ATPásica de Na,K de precipitado (Prec) de homogenizado de corteza renal de rata sacrificada a las 1500h y preincubadas con plasma sanguíneo de rata obtenido a las 0900h y a las 1500h..... 44

8. Actividad ATPásica de Na,K de homogenizados totales (HT) de corteza de renal de ratas sacrificadas a las 0900h y preincubadas con extractos ácidos de plasma sanguíneo (EA) de rata obtenido a las 0900h y a las 1500h..... 46

9. Actividad ATPásica de Na,K de homogenizados totales (HT) de corteza renal de ratas sacrificadas a las 0900h y preincubadas con filtrado de extracto ácido de plasma sanguíneo (EA) obtenido a las 1500h, conteniendo sustancias de peso molecular menor de 3KDa (EA<3K)..... 47

10. Actividad ATPásica de Na,K de precipitado (P) por centrifugación de homogenizados totales (HT) de corteza renal de ratas sacrificadas a las 1500h y preincubadas con filtrado de extracto ácido de plasma sanguíneo obtenido a las 1500h, conteniendo sustancias de peso molecular menor de 3KDa (EA<3K)..... 49

11. Actividad ATPásica de Na,K de homogenizados totales (HT) de corteza renal de ratas sacrificadas a las 0900h, preincubadas con fracción lipídica de plasma sanguíneo (FL) obtenido a las 0900 h y 1500h..... 51

12. Actividad ATPásica de Na,K de homogenizados totales (HT) de corteza renal de ratas sacrificadas a las 0900h y preincubadas con fracción acuosa de plasma sanguíneo (FA) obtenido a las 0900 y 1500h..... 52

INTRODUCCIÓN.

En el metabolismo, tanto de seres unicelulares como pluricelulares, muchos procesos son cíclicos, o sea, se repiten continuamente en un período de tiempo (Giese, 1983).

Se han estudiado estos ritmos biológicos en protozoarios, celenterados, platelmintos, artrópodos, aves y mamíferos, además de hongos, algas y plantas superiores (Giese, 1983). En organismos unicelulares, estos ritmos se observan en la velocidad de división celular, fotosíntesis, bioluminiscencia. En plantas, es cíclico el movimiento de las hojas y pétalos. En mamíferos es cíclica la temperatura corporal, los ciclos de vigilia y sueño, la concentración plasmática de ciertas hormonas, la excreción urinaria de potasio (Moore-Ede y col., 1983), sodio y calcio, la síntesis de ácidos nucleicos, el contaje de glóbulos blancos, la sensibilidad celular a toxinas y medicamentos, la división celular, etc. (Giese, 1983).

En los organismos, las actividades cíclicas que muestran un período de 24 ± 4 horas, se denominan ritmos o ciclos circadianos (circadies: próximo a un día) y las que corresponden a los ciclos biológicos menores de 20 horas, son denominados ultradianos. Estas variaciones cíclicas son de carácter endógeno, modificables por factores externos como la luz y la temperatura, y son comúnmente conocidas como el "reloj biológico" (Giese, 1983; Moore-Ede y col., 1977).

Existen mecanismos fisiológicos destinados a regresar al organismo a su estado normal, una vez que éste se ha modificado, lo cual permite mantener la composición del líquido extracelular y por ende las funciones celulares. En conjunto, estos mecanismos constituyen la homeostasis (Ganong, 1988). Del mismo modo, después que el estado normal de un organismo ha sido perturbado por variaciones ambientales, se produce un fenómeno de corrección, destinado a regresar al organismo a su estado inicial (Moore-Ede, 1986).

El ambiente se encuentra en constante cambio, algunos de los cuales son impredecibles. Esto lleva a los individuos a desequilibrios, que el organismo debe compensar rápidamente para mantener la vida. Sin embargo, otras variaciones son constantes, predecibles y cíclicas, como las horas de luz y oscuridad durante el día, las cuales se traducen en períodos de vigilia y sueño, dependiendo de los hábitos de cada especie; también son constantes y predecibles, las variaciones de temperatura durante el año. Las variaciones constantes permiten modificaciones metabólicas en los individuos como preparación para los cambios, antes de que ellos ocurran (Moore-Ede, 1986).

Las oscilaciones que sufre un organismo para su autorregulación en respuesta a los ciclos ambientales, pueden producirse inmediatamente después de que estos ocurren; sin embargo, existen órganos que requieren un lapso de tiempo largo, antes de emitir una respuesta que los regrese a su estado normal. En vista de esta situación, los organismos pueden desarrollar capacidades de autorregulación que les permita anticipar cambios ambientales, de tal modo que puedan reaccionar adecuadamente y a tiempo, cuando éstos se produzcan (Moore-Ede, 1986; Aschoff, 1965).

El hecho de que las variaciones ambientales sean en general cíclicas, ha hecho suponer que los ritmos circadianos son una adaptación evolutiva, lo cual permitiría a los individuos más evolucionados sobrevivir, adelantándose y preparándose para los próximos cambios ambientales (Giese, 1983).

Como consecuencia, surgió el concepto de homeostasis predictiva, o sea, cambios que se van desarrollando en el organismo en preparación a perturbaciones ambientales que están por ocurrir (Moore-Ede, 1986). Esta preparación, se produce para poder responder satisfactoriamente a las variaciones del organismo, anticipándose a ellas (Aschoff, 1965).

Así por ejemplo: Sarelius y Greenway (1975), reportan que ovejas alimentadas cada 24 horas, mostraban un máximo de excreción de sodio justo antes de que fueran alimentadas diariamente, lo que concluyeron se trata de una respuesta "anticipada".

Este tipo de homeostasis es importante, ya que permite que ciertos mecanismos fisiológicos, cuyos efectos demoran en aparecer después de una

perturbación, entren en funcionamiento inmediatamente, al momento de ocurrir cambios ambientales (Moore-Ede, 1986).

En general, a nivel celular, los ritmos circadianos suceden para permitir respuestas continuas ante un ambiente de variaciones también continuas, para que "el organismo haga lo correcto en el momento correcto" (Aschoff, 1965). Segura reporta en su trabajo de grado (1997), una serie de funciones propuestas por otros autores, para los relojes circadianos y ultradianos. Éstas son:

1. Regulación temporal de procesos incompatibles como síntesis y degradación de proteínas, cuando éstos ocurren en un mismo compartimiento espacial (Edwards y Lloyd, 1980).

2. Establecimiento de intervalos de sueño en los vertebrados, lo cual los capacita para optimizar los tiempos de vigilia y sueño, jugando un papel importante en el mantenimiento del equilibrio ecológico (Daan y Aschof, 1982).

3. Optimización del gasto energético, logrado por un proceso oscilatorio, en el cual la relación ATP/ADP aumenta y, por ende, la producción de entropía disminuye (Termonia y Ross, 1981).

4. Daan (1981), Moore-Ede (1986) y Pittendrigh (1993), han sugerido que el reloj circadiano confiere la capacidad de activar mecanismos efectores con tiempos de latencia largos, antes de que ocurra la perturbación del sistema por un estímulo determinado. Moore-Ede (1986), ha definido esta capacidad como homeostasis predictiva, siendo ésta otra de las funciones asignadas al reloj circadiano.

Las funciones vitales de nuestro organismo poseen ritmos de actividad. Por ejemplo, la presión sanguínea, la frecuencia cardiaca, la secreción de algunas hormonas, etc., aumentan durante las primeras horas de la mañana, como una preparación al próximo aumento en la actividad física. Estas variaciones se ven afectadas por el ambiente, ya que una persona que trabaje en la noche, sufrirá estos mismos cambios antes de levantarse a alguna hora de la tarde. (Biol. Rhythms, marzo 2001)

Por otro lado, el estudio de los ciclos circadianos es de gran importancia clínica, ya que la efectividad de una droga cualquiera, puede depender de la hora del día en la cual es administrada (Moore-Ede y col., 1983). Por ejemplo, se conoce que el tratamiento del paludismo responde mejor a momentos determinados, dentro de las 24 h del día. Así mismo, la sensibilidad de los organismos a ciertas toxinas, varía también con la hora del día (Giese, 1983). También es sabido que el asma empeora en la noche, así como las úlceras; la mayor producción de colesterol sucede en la noche y la artritis reumatoidea, empeora en las primeras horas de la mañana. Sería importante considerar que prescribir medicamentos en iguales dosis cada cierto número de horas diarias, quizá no sea tan efectivo como si se tomara en cuenta los ciclos de la enfermedad, y se adaptaran las dosis a éstos. Los ritmos circadianos afectan la absorción, distribución, metabolismo y excreción de los medicamentos (Biol. Rhythms, marzo 2001).

El volumen de orina excretada y su concentración de electrolitos, pueden variar durante el día, según patrones de alimentación y de

comportamiento; sin embargo, siempre sigue un patrón endógeno rítmico de picos diarios, independientemente de las variaciones individuales (Sarelius y Greenway, 1975). La causa de la ritmicidad endógena que gobierna éste y muchos otros procesos, no se conoce; sin embargo, es de suma importancia a nivel evolutivo, porque ha permitido desarrollar mecanismos homeostáticos para el ajuste a variaciones de luz, temperatura, posibilidad de alimentación y de caza, diariamente (Moore-Ede, 1986).

La cantidad de electrolitos en el cuerpo debe mantenerse constante para un adecuado funcionamiento celular; por ende, y debido a que las células no los sintetizan ni los consumen, las cantidades totales ingeridas deben ser iguales a las excretadas, siendo los riñones, en última instancia, los órganos encargados de realizar esta función, a través del proceso de reabsorción (Vander, 1992).

La concentración de potasio intracelular es unas 30 veces mayor que la extracelular, mientras que las concentraciones de sodio se encuentran a la inversa, en una relación de 1:10. El flujo pasivo de estos iones: entrada de

sodio a la célula y salida de potasio de la misma, es contrarrestado por un mecanismo de transporte activo, que se conoce como la bomba de Na,K, la cual introduce potasio y expulsa sodio de las células, en contra de sus gradientes electroquímicos, utilizando para ello energía química depositada en el ATP. Este transporte activo de iones mantiene la diferencia de cargas entre el lado extra e intracelular de la membrana plasmática, lo cual favorece la existencia del potencial de membrana y el transporte de otras sustancias asociadas (Randall y col., 1998).

Además, el funcionamiento de esta bomba es utilizado por el organismo para realizar la reabsorción de sodio a nivel de los túbulos renales, en especial a nivel del túbulo proximal, por lo cual la enzima mantiene la homeostasis de fluidos y electrolitos (Ganong, 1988).

Diariamente se filtran 180 lt de agua a nivel renal. En vista de la alta cantidad de agua extraída de la sangre, es necesaria la reabsorción de gran parte de ella y, de hecho, se reabsorbe casi el 99% de la misma. Este volumen sería totalmente imposible de recuperar por ingestión oral en un

día. Más aún, por los riñones se reabsorben grandes cantidades de diversos metabolitos e iones filtrados. Así por ejemplo, sólo el 1% de alrededor de 500 g de NaCl filtrado en 24h se excreta por la orina, el resto del mismo es reabsorbido en los túbulos renales, captándose por transporte activo aproximadamente el 70% (Randall y col., 1998).

Esta reabsorción se produce de la siguiente manera: el sodio que se encuentra disuelto en el filtrado, penetra pasivamente a las células tubulares a través de las paredes luminales de las mismas, las cuales se han modificado para aumentar su superficie de absorción, mostrando para ello, en el lado apical o luminal "proyecciones digitiformes (microvellosidades)" (Randall y col., 1998). Luego, el sodio es activamente expulsado hacia el espacio intersticial por las bombas Na,K, situadas en las paredes laterobasales de las células. De esta manera, se produce un flujo vectorial de sodio, desde la luz del túbulo hacia el intersticio, siendo así reabsorbidas grandes cantidades de este catión, junto con el cual se reabsorben también agua, aminoácidos, aniones y azúcares (Ganong, 1988).

Como la excreción de iones Na^+ en la orina muestra cierta ritmicidad circadiana y, esta excreción está asociada al mayor o menor funcionamiento de la bomba de Na,K, pudiera esperarse que la actividad de esta enzima presente también una cierta ritmicidad a lo largo del día. En este particular, Segura (1997) demostró la existencia de un ritmo ultradiano en la actividad de la bomba de Na,K, observándose dos ciclos cada 24 horas para células de corteza renal de rata, con actividad ATPásica máxima a las 0900h y 2100h, y mínima a la 0300h y 1500h.

Los valores máximos y mínimos de actividad presentados por la enzima, no son debidos a cambios en la afinidad al Na^+, al K^+, o al complejo Mg:ATP (no hay variación en los Km para ligandos y sustrato a lo largo del día). Tampoco, se deben a variaciones en el número de bombas funcionales. En base a estas observaciones, Segura (1997) concluye que los cambios de actividad son debidos a variaciones en la velocidad de reciclaje de la enzima.

Gracias a experimentos preliminares realizados con plasma por Segura (1997), se supone que el agente causante de este fenómeno sería un

inhibidor, el cual estaría presente en concentraciones máximas en el plasma de los animales a las 0300h y a las 1500h y, ausente o en concentraciones mínimas en el plasma de los animales a las 0900h y a las 2100h.

Por lo anteriormente expuesto, se hace de particular relevancia fisiológica y fisiopatológica buscar y caracterizar, aunque sea parcialmente, al agente inhibidor, así como conocer más sobre su presencia o ausencia en el plasma a distintas horas del día, utilizando para su desarrollo el modelo experimental de homogenizados de órganos y extractos de plasma de rata.

Para el desarrollo de estos objetivos, en el presente trabajo se tratará de demostrar, de manera fehaciente, la presencia de un factor inhibitorio de la ATPasa de Na,K en plasma sanguíneo de rata, cuya concentración o potencia varíe según la hora del día. Conjuntamente, se tratará de determinar la posible naturaleza del inhibidor, así como el peso molecular aproximado del mismo.

MATERIALES Y MÉTODOS.

1. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN.

Se utilizaron ratas machos de la cepa Sprague-Dawley, de 3 $\frac{1}{2}$ meses de edad, de 200 a 300 g de peso. Los animales fueron sacrificados a las 0900h y a las 1500h.

2. OBTENCIÓN DE PLASMA SANGUÍNEO DE RATA.

Las ratas fueron anestesiadas con 1 ml de pentotal sódico. Luego, se les practicó una incisión ventral media y se les extrajo sangre directamente desde el ventrículo izquierdo, con inyectadoras de 10 ml previamente heparinizadas. La sangre heparinizada se centrifugó a 12.000xg por 10 segundos a 4°C, con una centrífuga marca Sorvall RC-5B (rotor SS-34).

Se succionó cuidadosamente el sobrenadante de cada tubo, el cual correspondía al plasma, y se guardó a -70°C hasta el momento de su uso.

3. PREPARACIÓN Y HOMOGENIZACIÓN DE REBANADAS DE CORTEZA RENAL DE RATA.

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

Con la ayuda de una hojilla, se cortaron rebanadas de la parte más externa de la corteza renal (rica en túbulos proximales), se pesaron y se les adicionó tres volúmenes de la solución arriba indicada. Esta suspensión se homogenizó con ocho golpes, en un homogenizador manual del tipo "Potter-Elvehjem", con un émbolo de teflón, a 2.500 rpm. De esta forma, se prepararon los homogenizados totales de las rebanadas de la corteza renal

de rata. Luego, estos homogenizados se filtraron a través de una capa de gasa, y se almacenaron a -70°C hasta el momento de su uso.

4. CENTRIFUGACIÓN DE HOMOGENIZADOS DE REBANADAS DE CORTEZA RENAL DE RATA.

Fracciones de homogenizados de membrana de corteza de riñón de ratas, sacrificadas a las 0900h y a las 1500h, se centrifugaron a 10.000xg por 15 minutos a 4°C. Luego, se separó el precipitado del sobrenadante en cada caso. El precipitado se diluyó con medio de resuspensión, hasta obtener una concentración de 0.2- 0.4 mg/ml de proteína.

Todas las muestras, precipitados y sobrenadantes de 0900h y 1500h, se mantuvieron a -70°C, hasta el momento de realizar los experimentos de preincubación pertinentes y determinar las respectivas actividades ATPásicas.

5. DETERMINACIÓN DEL PESO MOLECULAR APROXIMADO DEL INHIBIDOR.

Muestras de plasma sanguíneo de rata, obtenidas a las 1500h , fueron centrifugadas a 3.000xg por 2 horas a 4°C, en filtros Centriplus (Amicon, Millipore Co., Belford, USA.), para separar sus componentes, según el peso de los mismos.

Las distintas fracciones obtenidas eran colectadas y almacenadas a -70°C. Posteriormente, homogenizados de corteza renal de rata eran incubados con las mismas, y se determinaba su actividad ATPásica.

6. PREPARACIÓN DE FRACCIONES DE PLASMA SANGUÍNEO DE RATA.

El plasma sanguíneo obtenido fue sometido a un proceso de separación, extracción ácida y lipídica, para luego preincubar las membranas

de homogenizado de riñón de rata, con distintas fracciones resultantes.

La desproteinización del plasma se realizó de la siguiente manera: 3 ml de plasma sanguíneo se trataron con 500 μl de ácido sulfosalicílico al 20%, se mezcló bien y se centrífugo durante 15 min. a 48.000xg. El sobrenadante se llevó a pH 7,4 con Tris-OH 1M. Una parte del material resultante, que corresponde al extracto ácido, fue conservada a -70°C para preincubaciones con homogenizados de riñón de rata. La otra parte, fue sometida a un proceso de extracción lipídica, utilizando el método de Folch (Folch y col., 1957). La extracción lipídica se realizó de la siguiente manera:se mezcló 1 ml de extracto ácido con 20 ml de una solución cloroformo:metanol (2:1, v:v) y se agitó bien durante tres minutos. Luego, se añadieron 4 ml de agua destilada y se agitó de nuevo por tres minutos. Esta preparación se centrifugó por cinco minutos a 1.500 rpm en una centrífuga clínica. Se removió con una pipeta Pasteur la fase acuosa superior, se liofilizó durante 24h y finalmente, se resuspendió en 1 ml de solución salina conteniendo 150 mM NaCl y 10 mM Tris-HCl, pH 7,4 a 4°C. Esta resuspensión constituye la fracción hidrosoluble. Los solventes orgánicos de la fase inferior

(Cloroformo-metanol-lípidos), se evaporaron a 40°C en atmósfera de nitrógeno, en un rotavapor Büchi. Los lípidos desecados se resuspendieron de nuevo con 1 ml de una solución igual a la usada para la fracción acuosa, constituyendo la fracción liposolule o lipídica. Ambas fracciones se conservaron a -70°C hasta su uso.

7. PREINCUBACIONES DE HOMOGENIZADOS DE CORTEZA RENAL DE RATA O DE PRECIPITADOS DE LOS MISMOS.

Las preincubaciones se realizaron por 30 min a 37°C. En general, 50 μl de homogenizado concentrado de corteza renal de rata, o de precipitado de centrifugación del mismo, fueron preincubados, tanto con 50 μl de plasma o de fracciones del mismo, como con 50 μl de sobrenadante de centrifugado del homogenizado.

Luego de cada preincubación, las muestras se diluyeron con medio de resuspensión, hasta obtener una concentración de 0.2-0.4 mg/ml de

proteína. Se almacenaron luego a -70°C, hasta el momento de determinar las actividades ATPásicas.

8. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA ATPasa DE Na,K PARA HOMOGENIZADOS DE CORTEZA RENAL DE RATA.

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

El medio donde se efectuó la reacción enzimática constaba de 180 μl de medio de incubación y 20 μl de la suspensión de membranas (con una concentración de proteínas de 0.2 - 0.4 mg/ml), para obtener un volumen final de 200μl.

Composición de los medios:

MEDIO 1		MEDIO 2	
$MgCl_2$	5 mM	$MgCl_2$	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 fue el siguiente: 180 μl del medio de incubación se preincubaron por dos minutos a 37°C, y la reacción se inició añadiendo 20 μl de la fracción de membranas. La reacción se finalizó a los 10 minutos, agregando 300 μl 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 colocaron, luego, en hielo durante 10 minutos. Después de transcurrido este tiempo, se le añadió a cada uno de los tubos 0,5 ml de la siguiente solución (solución B), la cual contiene (%): arsenito de sodio, 2; citrato de sodio, 2 y ácido acético, 2. Los tubos de incubación se recalentaron a 37°C por 10 minutos.

Transcurrido este tiempo, se procedió a medir la absorbancia en un espectrofotómetro Spectronic 1201 a 705 nm.

La actividad ATPásica es expresada como nanomoles de fosfato liberado por miligramo de proteína por minuto de incubación, después de sustraer un blanco incubado en paralelo sin proteínas, las cuales fueron añadidas después de agregar los 300 μl de la solución A.

La actividad específica de la ATPasa de Na,K, se calculó 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^+ y K^+, sensible a ouabaína.

9. DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS.

La determinación del contenido proteico de las muestras, se realizó según el método de Bradford, (Bradford, 1976). Para ello, se utilizó el

reactivo concentrado de azul brillante de coomasie (Bio-Rad Laboratories, Richmond,CA, USA). Este reactivo se mantuvo almacenado a 5°C, hasta el momento de su uso a temperatura ambiente.

El procedimiento fue el siguiente: Se preparó 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 prepararon cuatro blancos para calibrar el espectrofotómetro, los cuales contenían 790 μl de agua destilada y 10 μl del medio de resuspensión. Las muestras se prepararon por cuadruplicado, y contenían 10 μl de la suspensión de membranas y 790 μl de agua destilada. Tanto a las muestras como a los blancos, se les añadió 200 μl del reactivo, se agitaron y, se dejaron a temperatura ambiente durante 5 min. Luego, se midió 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.

10. 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 ± 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 la Figura 1, se muestran los resultados previos obtenidos en el laboratorio (Segura, 1997), con la actividad de la Na,K-ATPasa de homogenizados de túbulo proximal de riñón de rata, en función de la hora del día en la cual fue sacrificado el animal. Para este experimento, un grupo de ratas era sometido a 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad por quince días. Al día 16, se sacrificaba un animal cada dos horas durante 24 horas. Una vez extraídos los riñones, se tomaban rebanadas de la parte más externa de la corteza renal, se homogenizaban y se estudiaba la actividad ATPásica de los homogenizados. Nótese la clara variación de la actividad a lo largo de las distintas horas del día, presentándose dos picos: a las 0900h y a las 2100h y, dos valles: a las 0300 y a las 1500h.

Las variaciones en la actividad de la ATPasa de Na,K observadas a lo largo de las 24 horas del día, pueden ser debidas a una estado de activación de la enzima (valores elevados) o a un estado de inhibición de la enzima

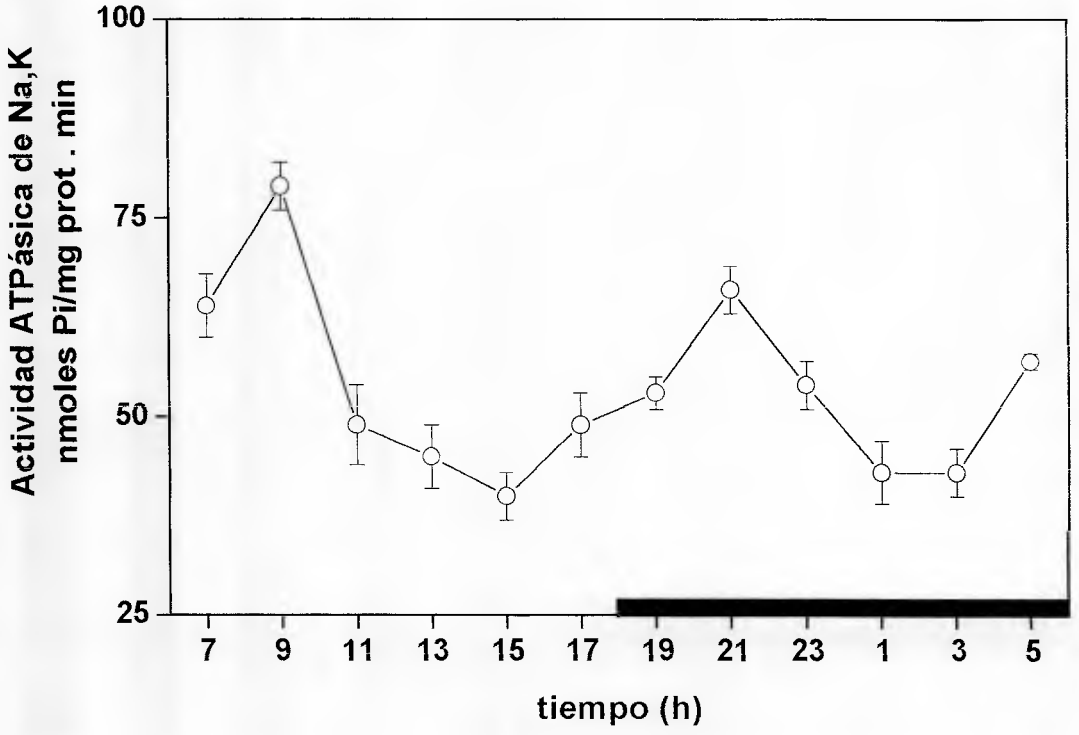

FIGURA 1

Actividad ATPásica de Na,K de homogenizados de corteza renal 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 2 horas, hasta completar las 24 horas. Los resultados son presentados como las medias ± el error estándar, para n = 6.
Tomado de Segura, Trabajo de Grado de Maestría. Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas, julio 1997.

(valores bajos). Para poder discernir entre las dos posibilidades, se realizó el siguiente experimento: se prepararon homogenizados con material proveniente de ratas sacrificadas a las 9 de la mañana (valor pico, 0900h), y homogenizados con material proveniente de ratas sacrificadas a las 3 de la tarde (valor valle, 1500h). Una vez preparados, los homogenizados fueron almacenados en su mismo medio de resuspensión a -70°C, y diariamente, después de descongelados, eran ensayados para actividad de Na,K-ATPasa. Los resultados de este experimento, se presentan en la Figura 2: mientras que la actividad ATPásica del material proveniente de ratas sacrificadas a las 0900h, se mantenía alta y constante a lo largo de todo el tiempo del experimento, la actividad del material proveniente de ratas sacrificadas a las 1500h, fue aumentando paulatinamente con el paso de los días, alcanzando valores altos parecidos a los del otro grupo, hacia el sexto día de preparación del material.

El hecho de que en un momento dado la actividad de una enzima se encuentre inhibida y, después de cierto tiempo de preparada la actividad se normalice, puede ser debido a cambios estructurales de la proteína o de su

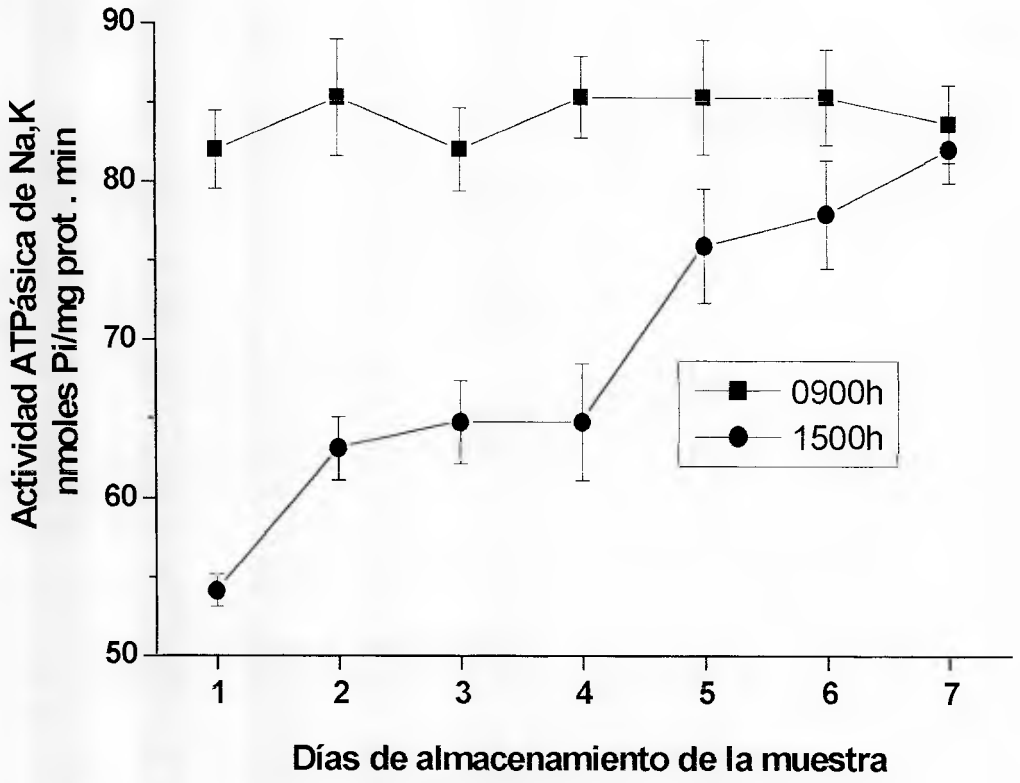

FIGURA 2

Actividad ATPásica de Na,K de homogenizados de corteza renal 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 ± el error estándar, para n = 6.

microambiente, que se revierten a la normalidad con el paso del tiempo o, según sugerido por experimentos preliminares de Segura (1997), a la presencia de algún inhibidor en la membrana celular, que se degenera o desprende de la misma, después de algunos días de almacenamiento.

Para poder discernir entre las posibilidades planteadas, se pensó en someter las membranas a una serie de condiciones experimentales, las cuales incluían tratamiento de las membranas a distintas temperaturas, variaciones del pH del medio de resuspensión y, centrifugación de los homogenizados. Se decidió probar, en primera instancia, esta última posibilidad, lo cual se realizó de la siguiente manera: homogenizados de corteza renal de ratas sacrificadas a las 1500h eran centrifugados a 10.000xg por 15 minutos a 4°C. Se separaba el sobrenadante, y se resuspendía el precipitado en un medio igual al que se encontraba anteriormente. Homogenizados, sobrenadantes y precipitados eran entonces ensayados para actividad ATPásica de Na,K. Conjuntamente, material proveniente de ratas sacrificadas a las 0900h era tratado exactamente de la misma manera, para que sirviera de control. En la Tabla 1 se observan

TABLA 1

ACTIVIDAD ATPásica DE Na,K DE HOMOGENIZADOS DE CORTEZA RENAL DE RATA OBTENIDOS A LAS 0900h Y A LAS 1500h, Y DE SUS RESPECTIVOS PRECIPITADOS DESPUÉS DE CENTRIFUGACIÓN

	Actividad ATPásica de Na,K: nmoles Pi/mg prot . min	
Muestras (h)	Homogenizado Total	Precipitado
0900	80 ± 5	117 ± 7
1500	43 ± 3*	105 ± 9**

* P < 0,001 (1500h vs 0900h)
** P = n.s. (1500h vs 0900h)

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

los resultados de este experimento. Interesantemente, mientras que para el homogenizado total, la muestra 1500h presenta, como ya visto en la Figuras 1 y 2, una actividad de Na,K-ATPasa que es cerca del 50% de la actividad de la muestra 0900h, los precipitados de ambas muestras, presentan una misma actividad Na,K-ATPasa. El sobrenadante, por su parte, mostró una actividad Na,K-ATPasa muy baja en ambos casos (datos no mostrados).

Ahora bien, si estamos entonces frente a la presencia de un inhibidor de la enzima pegado a las membranas, que se desprende de las mismas con el proceso de centrifugación, bien pudiera esperarse que, si se juntan precipitado y sobrenadante de nuevo, se pueda inducir otra vez la inhibición en la actividad de la enzima. El experimento fue realizado con precipitado de material obtenido a las 1500h y sobrenadante de material obtenido a las 0900h y 1500h. Se centrifugaron ambos homogenizados y luego, precipitado de la tarde y sobrenadante fueron preincubados en relación 1:1, a 37°C por 30 minutos y, después de congelación y descongelación, el material fue ensayado para Na,K-ATPasa. Como control se preincubó el mismo precipitado con sobrenadante proveniente de la

centrifugación de homogenizado de material obtenido a las 0900h. Los resultados de este experimento, se muestran en la Tabla 2. Contrariamente a lo esperado, la actividad Na,K-ATPasa fue igual en ambos casos, es decir, que la preincubación del precipitado 1500h con su sobrenadante, no se tradujo en inhibición alguna de la actividad de la Na,K-ATPasa.

Si el inhibidor pasa de las membranas al sobrenadante, al centrifugar los homogenizados y luego, cuando se incuba el precipitado con el sobrenadante producto de la centrifugación, no se obtiene inhibición alguna de la actividad de la Na,K-ATPasa, puede pensarse que la incubación no logra hacer que el inhibidor se integre de nuevo a las membranas. Esto pudiera ocurrir, bien porque la concentración del inhibidor es muy baja, o bien porque es necesaria la presencia de algún cofactor para que la unión se produzca. En primera instancia, se decidió estudiar esta última posibilidad. Para ello, se realizó el mismo experimento de preincubación de precipitado y sobrenadante, cuyos resultados se presentaron en la Tabla 2, añadiendo ahora a la mezcla de preincubación 150 mM NaCl, o 5 mM KCl, o 5 mM $MgCl_2$.

TABLA 2

EFECTO SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA ATPasa DE Na,K DE PRECIPITADOS OBTENIDOS DE LA CENTRIFUGACIÓN DEL MATERIAL 1500h, AL SER PREINCUBADOS CON SOBRENADANTES RESULTANTES DE CENTRIFUGACIÓN DE HOMOGENIZADOS DE CORTEZA RENAL DE RATA OBTENIDOS A LAS 0900h Y 1500h.

Actividad ATPásica de Na,K: nmoles Pi/mg prot. min	
Precipitado 1500h + sobrenadante 0900h	Precipitado 1500h + sobrenadante 1500h
107 ± 8	102 ± 6*

*P = n.s.

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

La adición de NaCl o KCl al medio de preincubación no produjo efecto alguno (datos no mostrados). Por otro lado, basados en el trabajo de Carilli (Carilli y col., 1985), en el cual se describió la presencia de un inhibidor de la Na,K-ATPasa de origen hipotalámico, el cual se une a la enzima a 37°C, estabilizándose en presencia de Mg^{+2} y sodio, sin potasio, se decidió añadir 5 mM $MgCl_2$ al medio de incubación. Según se muestra en la Tabla 3, cuando se añadió $MgCl_2$ al medio de preincubación, los resultados fueron totalmente distintos. Ahora sí, como esperado, se produjo una importante inhibición en la actividad de Na,K-ATPasa. También podemos ver en la misma tabla que preincubación de precipitado de homogenizado de material obtenido en la tarde, junto con sobrenadante proveniente de homogenizado de material obtenido en la mañana, no mostró efecto alguno sobre la actividad de la Na,K-ATPasa, aún cuando la preincubación fuese realizada en presencia de $MgCl_2$.

De igual manera, cabe esperar que preincubación de homogenizado de material obtenido a las 0900h, con sobrenadante de homogenizado de material obtenido a las 1500h, en igualdad de condiciones que el

TABLA 3

EFECTO SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA ATPasa DE Na,K DE PRECIPITADO OBTENIDO DE CENTRIFUGACIÓN DEL MATERIAL 1500h, AL SER PREINCUBADO CON SOBRENADANTES RESULTANTES DE CENTRIFUGACIÓN DE HOMOGENIZADO DE CORTEZA RENAL DE RATA OBTENIDO A LAS 0900h Y 1500h, CUANDO SE REALIZÓ LA PREINCUBACIÓN EN PRESENCIA DE 5 mM DE $MgCl_2$.

Actividad ATPásica de Na,K: nmoles Pi / mg prot. min	
Precipitado 1500h + sobrenadante 0900h	Precipitado 1500h + sobrenadante 1500h
98 ± 6	64 ± 4

$P < 0,001$

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

experimento anterior y en presencia de 5 mM de $MgCl_2$, debiera traducirse en algún grado de inhibición de la actividad de la Na,K-ATPasa. El experimento fue realizado, y los resultados del mismo se muestran en la Tabla 4: efectivamente, como esperado, la preincubación se tradujo en una fuerte inhibición en la actividad de la enzima, demostrándose de nuevo la necesidad de la presencia de $MgCl_2$ en el medio de preincubación para que el efecto se produzca.

Una vez demostrada la presencia de un inhibidor de la ATPasa de Na,K en el sobrenadante resultante de la centrifugación del homogenizado total de material obtenido a las 1500h, se hizo interesante el determinar el comportamiento del mismo, en función del tiempo de preparación. Para ello, rebanadas de riñón de ratas sacrificadas a las 0900h y 1500h se homogenizaron y, los homogenizados fueron centrifugados, obteniéndose en cada caso un sobrenadante y un precipitado, el cual fue resuspendido en un medio igual al utilizado para su homogenización. Cada uno de los sobrenadantes y precipitados fueron congelados y, a partir del primer día de preparación, el precipitado de las 1500h fue ensayado para actividad

TABLA 4

EFECTO SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA ATPasa DE Na,K DE PRECIPITADO OBTENIDO DE CENTRIFUGACIÓN DE MATERIAL 0900h, AL SER PREINCUBADO CON SOBRENADANTES RESULTANTES DE CENTRIFUGACIÓN DE HOMOGENIZADO DE CORTEZA RENAL DE RATA OBTENIDO A LAS 1500h, EN PRESENCIA O AUSENCIA DE 5 mM DE $MgCl_2$.

Condición de preincubación	Actividad ATPásica de Na,K: nmoles Pi / mg prot. min Precipitado 0900h + sobrenadante 1500h
Sin Mg^{+2}	113 ± 2
Con Mg^{+2}	59 ± 8

$P < 0,001$

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

ATPásica de Na,K, la cual fue determinada después de su preincubación en presencia del sobrenadante de la mañana o de la tarde. Los resultados de este experimento, se presentan en la Figura 3. Igual a lo sucedido cuando el inhibidor se encontraba unido a la membrana, su efecto (visible cuando se preincubaba el precipitado con el sobrenadante de la tarde), se fue haciendo menor con el paso de los días de preparación, indicando que se va perdiendo con el paso del tiempo.

La presencia de una sustancia asociada a la membrana de las células renales, capaz de inhibir la actividad de la ATPasa de Na,K, pudiera ser el resultado de un fenómeno local, o pudiera ser indicación de un fenómeno más general, que pudiera incluir todo el organismo. De ser este último el caso, bien pudiera esperarse entonces encontrar esta sustancia en el plasma sanguíneo, el cual debiera presentar una concentración grande del inhibidor a las 1500h y, una concentración pequeña o ínfima del mismo a las 0900h. Para estudiar esta posibilidad, se prepararon homogenizados de corteza renal de ratas sacrificadas a las 0900h y a las 1500h, tomándose al mismo tiempo muestras de plasma sanguíneo de las mismas. Una vez

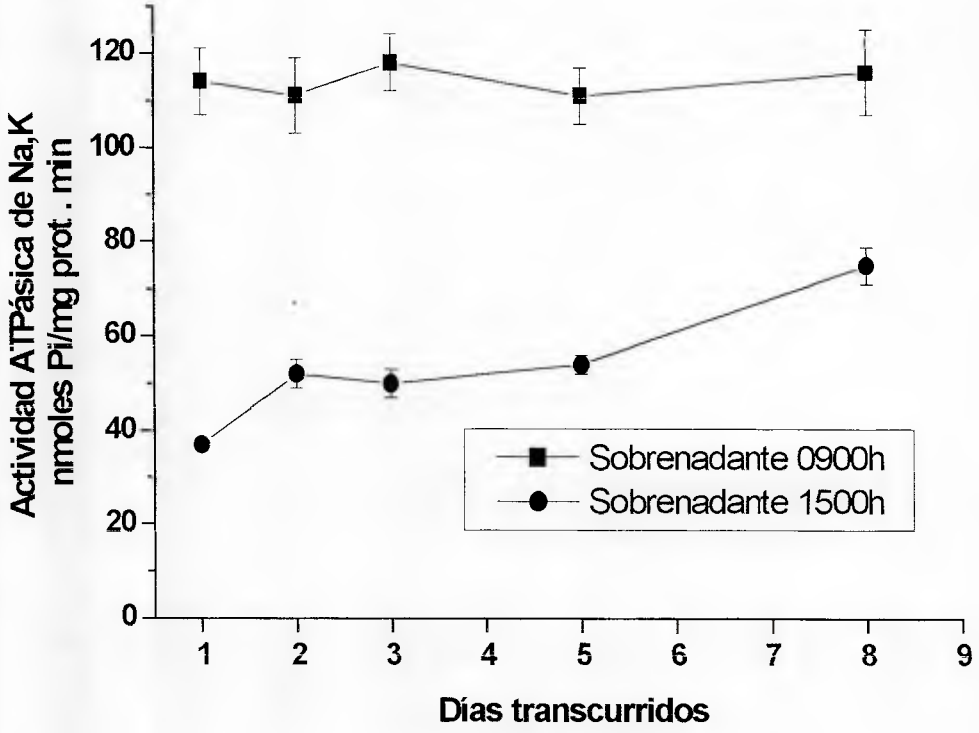

FIGURA 3

Actividad ATPásica de Na,K de precipitados por centrifugación de homogenizados de corteza renal de ratas sacrificadas a las 1500h, en función del tiempo transcurrido después de preparación de las muestras. Antes del ensayo, las muestras eran preincubadas con sobrenadantes de centrifugación de homogenizados de 0900h y 1500h. Los resultados son presentados como las medias ± el error estándar, para n = 6.

preparados, los homogenizados fueron preincubados con muestras de plasma de las 0900 ó 1500h, y ensayados para actividad ATPásica de Na,K. Los resultados de este experimento se muestran en las Figuras 4, 5 y 6. En la Figura 4, puede verse como la preincubación de material proveniente de riñón de las 0900h con el plasma sanguíneo obtenido a las 1500h, se tradujo en una importante inhibición de la ATPasa de Na,K, no produciéndose, por otro lado efecto alguno, por preincubación del mismo material con plasma de las 0900h. Por otra parte, preincubación de homogenizado de material obtenido a las 1500h (actividad inhibida) con plasma de las 0900h o de las 1500h, como se muestra en la Figura 5, no produjo efecto alguno sobre la Na,K-ATPasa en ninguno de los dos casos. Finalmente, la contribución que el plasma *per se* pudiera tener en la expresión de la actividad ATPásica de Na,K de la mezcla, como se muestra en la Figura 6, es prácticamente nula, ya que ambos plasmas sólo presentan una muy pobre actividad ATPásica de Na,K.

Es de esperar que preincubación de precipitado de material

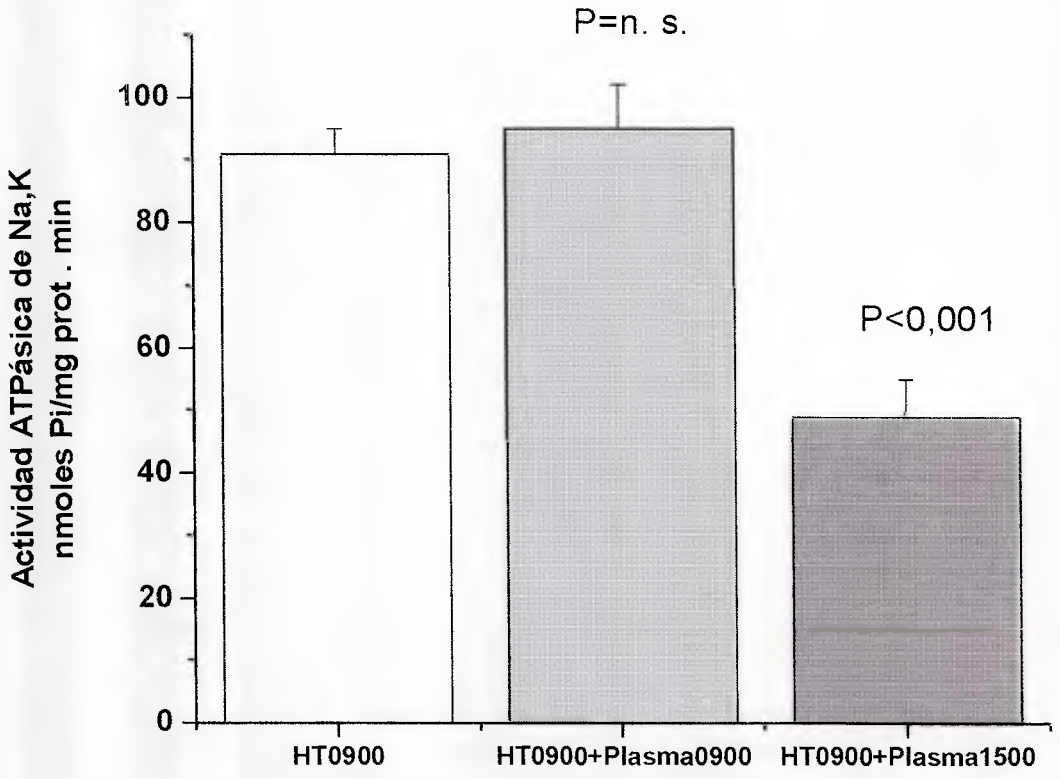

FIGURA 4

Actividad ATPásica de Na,K de homogenizados totales (HT) de corteza renal de ratas sacrificadas a las 0900h y preincubadas con plasma de los mismos animales obtenido a las 0900h y a las 1500h. Los resultados son presentados como las medias ± el error estándar, para n = 6. La probabilidad en cada caso, fue calculada comparando los resultados respecto a la condición HT 0900h.

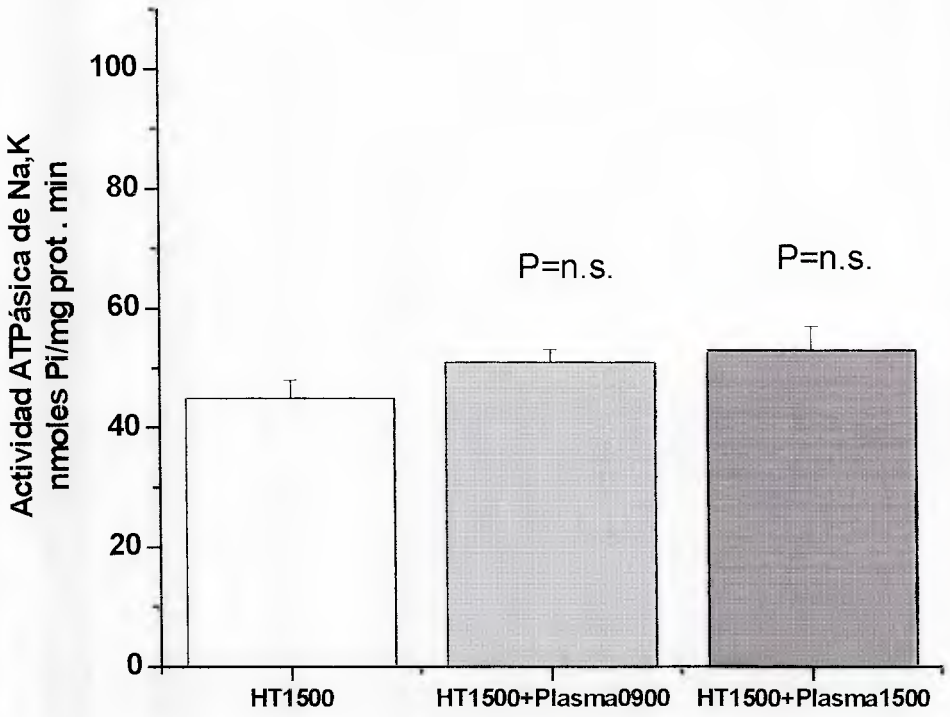

FIGURA 5

Actividad ATPásica de Na,K de homogenizados totales (HT) de corteza renal de ratas sacrificadas a las 1500h y preincubadas con plasma sanguíneo de rata, obtenido a las 0900h y a las 1500h. Los resultados son presentados como las medias ± el error estándar, para n = 6. La probabilidad en cada caso, fue calculada comparando los resultados respecto a la condición HT 1500h.

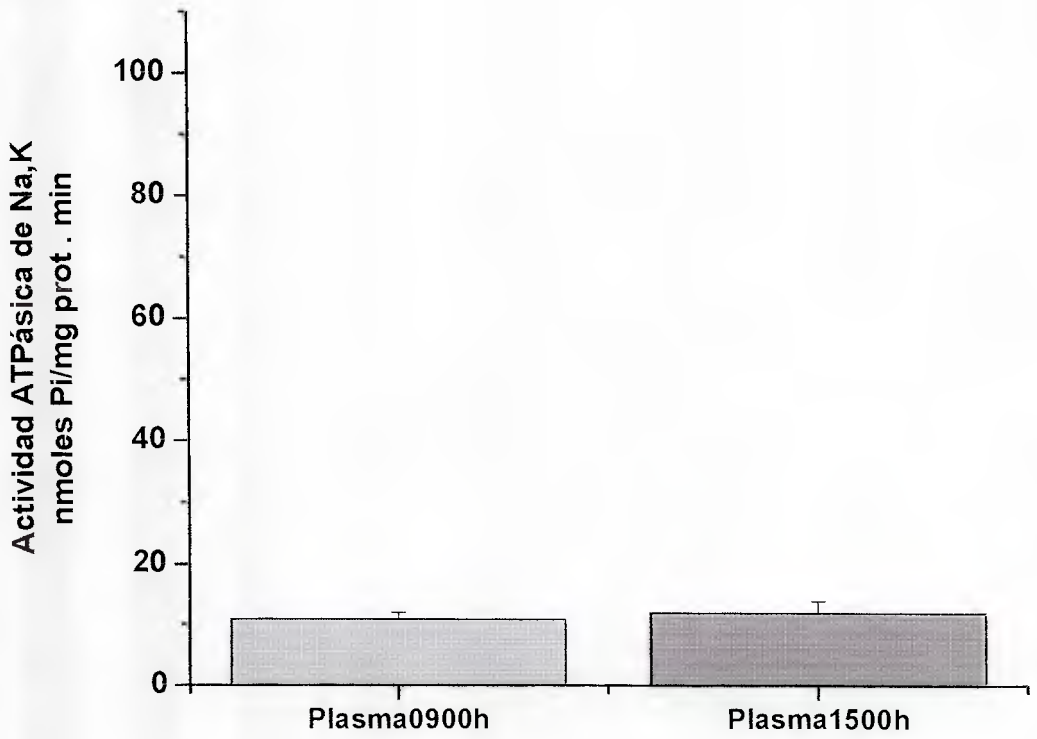

FIGURA 6

Actividad ATPásica de Na,K de plasma sanguíneo de ratas sacrificadas a las 0900h y a las 1500h. Los resultados son presentados como las medias ± el error estándar, para n = 6.

proveniente de cualquier hora, con plasma de las 0900h o de las 1500h, produzca los mismos efectos de preincubaciones con sobrenadantes provenientes de centrifugación de homogenizados de las 0900h o 1500h. El experimento fue realizado utilizando precipitado de homogenizado de material obtenido a las 1500h, y los resultados del mismo se presentan en la Figura 7: efectivamente, como esperado, la preincubación con plasma de la tarde se tradujo en una importante inhibición de la actividad de la ATPasa de Na,K, no produciéndose por otro lado, inhibición por preincubación con plasma de la mañana.

Una vez en la seguridad de hallarnos en presencia de un inhibidor de la Na,K-ATPasa, que se encuentra a distintas concentraciones en el plasma sanguíneo según la hora del día, y que ejerce su efecto incorporándose a las membranas celulares, por lo menos en tejido renal, decidimos indagar sobre la posible naturaleza del mismo. Esta parte del trabajo, se desarrolló siguiendo una serie de diferentes lineamientos.

En primer lugar, se procedió a tratar muestras de plasma de las 0900h y

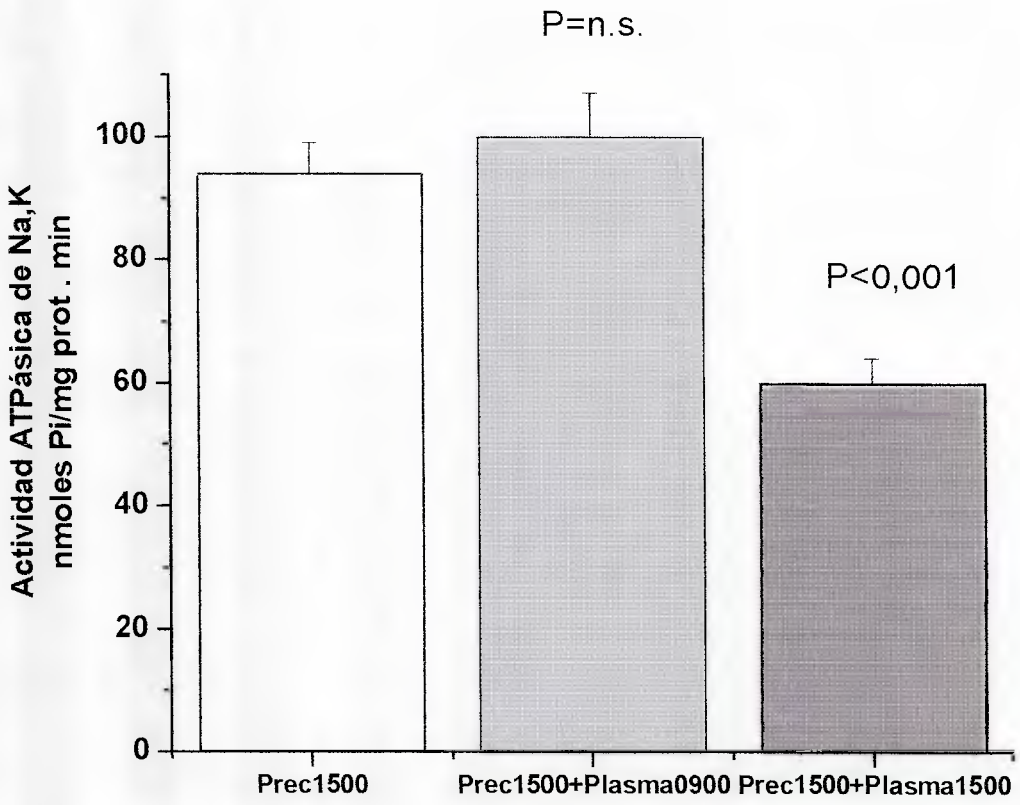

FIGURA 7

Actividad ATPásica de Na,K de precipitados (Prec) de homogenizados de corteza renal de ratas sacrificadas a las 1500h y preincubadas con plasma sanguíneo de rata obtenido a las 0900h y a las 1500h. Los resultados son presentados como las medias ± el error estándar, para n = 6. La probabilidad en cada caso, fue calculada comparando los resultados respecto a la condición Prec 1500h.

1500h con ácido sulfosalicílico al 20%, para desproteinizarlas. Homogenizados de las 0900h fueron preincubados con los sobrenadantes desproteinizados de ambos plasmas, y ensayados para actividad de Na,K-ATPasa. Los resultados de este experimento, como se muestra en la Figura 8, indican que el inhibidor no es una proteína, ya que la preincubación con la fracción desproteinizada del plasma de las 1500h, se tradujo en un significativo grado de inhibición de la enzima.

A continuación, se procedió a obtener información sobre el peso molecular del inhibidor de la Na,K-ATPasa presente en el plasma de las 1500h. Para ello, muestras de extracto ácido del mismo fueron centrifugadas a través de filtros de separación molecular hasta con corte para 3 KDa, obteniéndose en última instancia una fracción conteniendo sustancias de peso molecular inferior a los 3 KDa. Homogenizados de las 0900h fueron preincubados con esta fracción, y luego ensayados para actividad de Na,K-ATPasa. Los resultados de este experimento, se presentan en la Figura 9: nótese como la preincubación del homogenizado de las 0900h con el filtrado de extracto ácido de plasma de las 1500h,

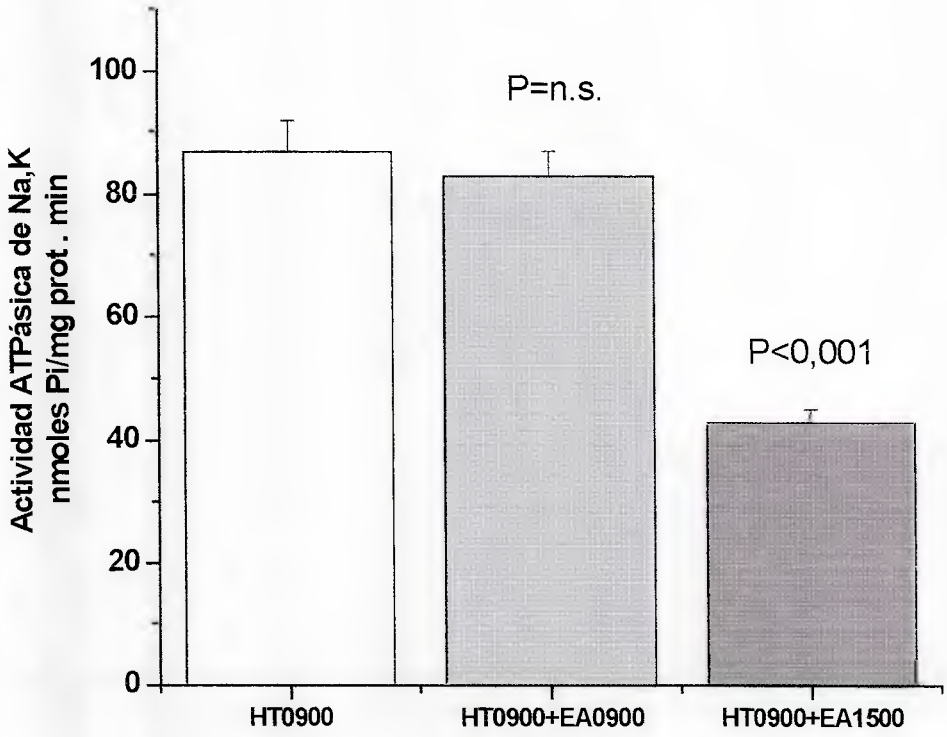

FIGURA 8

Actividad ATPásica de Na,K de homogenizados totales (HT) de corteza renal de ratas sacrificadas a las 0900h y preincubadas con extracto desproteinizado de plasma sanguíneo (EA) de rata obtenido a las 0900h y a las 1500h. Los resultados son presentados como las medias ± el error estándar, para n = 6. La probabilidad en cada caso, fue calculada comparando los resultados respecto a la condición HT 0900h.

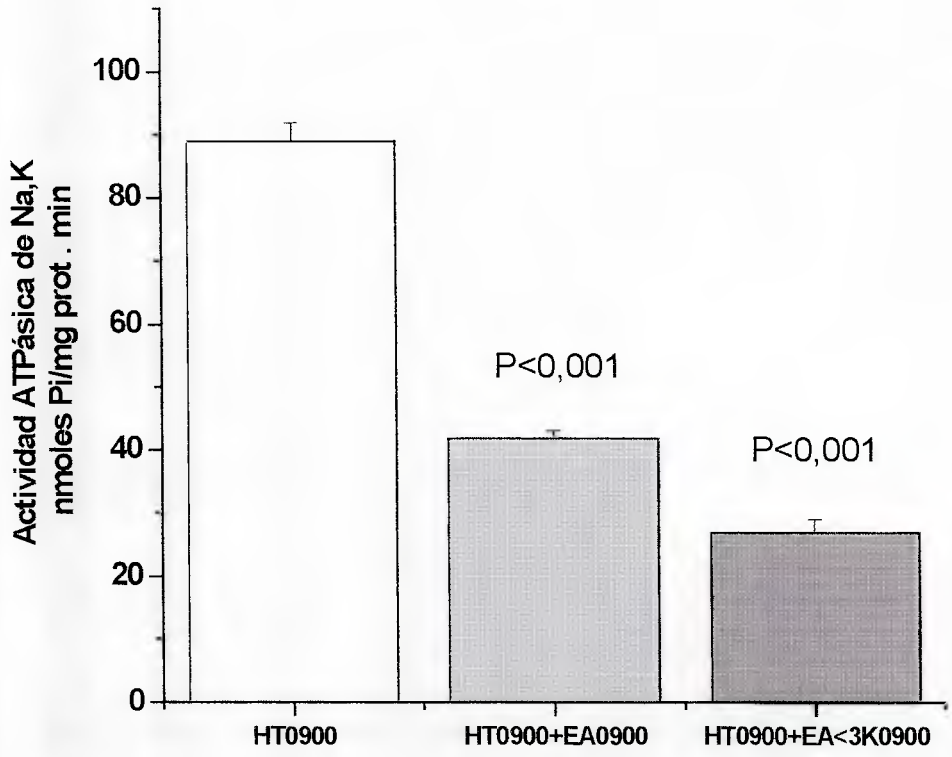

FIGURA 9

Actividad ATPásica de Na,K de homogenizados totales (HT) de corteza renal de ratas sacrificadas a las 0900h y preincubadas con filtrado de extracto ácido de plasma sanguíneo (EA) obtenido a las 1500h, conteniendo sustancias de peso molecular menor de 3KDa (EA<3K). Los resultados son presentados como las medias ± el error estándar, para n = 6. La probabilidad en cada caso, fue calculada comparando los resultados respecto a la condición HT 0900h.

conteniendo sustancias de peso molecular menor de 3 KDa, se tradujo en una importante inhibición de la enzima.

Un experimento similar, utilizando precipitado por centrifugación de homogenizado de 1500h preincubado con extracto ácido de filtrado de plasma de 1500h, con sustancias de peso molecular menor de 3KDa presentó, como puede verse en la Figura 10, resultados muy parecidos: preincubación del precipitado con filtrado de plasma con sustancias de peso molecular menores a los 3 KDa, se tradujo en una importante inhibición de la actividad de la Na,K-ATPasa.

Finalmente, se investigó acerca de la posibilidad de encontrarnos o no frente a una sustancia de naturaleza lipídica. Para ello, muestras de plasma obtenido a las 1500h fueron tratadas según la técnica de Folch (Folch y col., 1957), separándolas en una fracción acuosa y una lipídica. Homogenizados de las 0900h, fueron preincubados con cada una de las dos fracciones y ensayados para actividad ATPásica de Na,K.

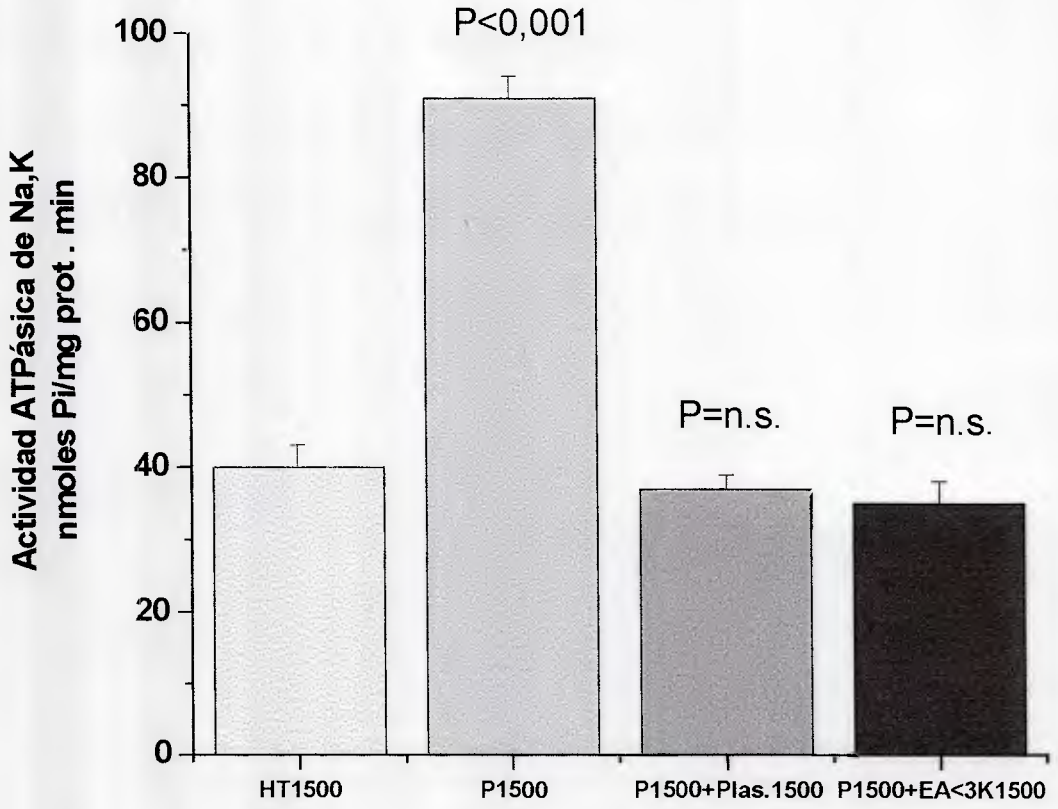

FIGURA 10

Actividad ATPásica de Na,K de precipitado (P) por centrifugación de homogenizados totales (HT) de corteza renal de ratas sacrificadas a las 1500h y preincubadas con filtrado de extracto ácido de plasma sanguíneo obtenido a las 1500h, conteniendo sustancias de peso molecular menor de 3KDa (EA<3K). Los resultados son presentados como las medias ± el error estándar, para n = 6. La probabilidad en cada caso, fue calculada comparando los resultados respecto a la condición HT 1500h.

Los resultados de este experimento se muestran a continuación: nótese en la Figura 11, que preincubación de homogenizado de material 0900h con fracción lipídica de plasma obtenido a las 1500h, no produjo ningún efecto inhibitorio sobre la actividad ATPásica de Na,K, ya que ésta arrojó resultados parecidos, incluso mayores, que los arrojados por el mismo homogenizado preincubado con fracción lipídica de plasma obtenido a 0900h.

Por otro lado, cuando se realizó el mismo experimento, pero preincubando homogenizado de material 0900h con fracción acuosa de plasma sanguíneo obtenido a las 1500h, como se muestra en la Figura 12, la actividad de la ATPasa de Na,K si fue significantemente menor que aquella obtenida después de preincubación con fracción acuosa de plasma obtenido a las 0900h.

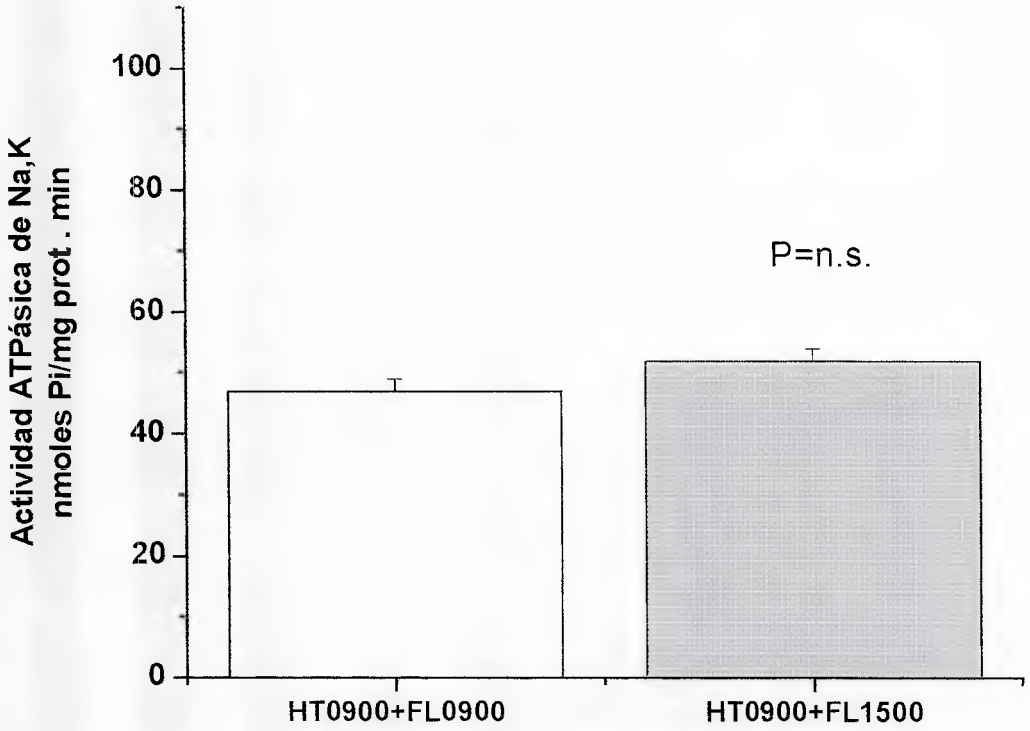

FIGURA 11

Actividad ATPásica de Na,K de homogenizados totales (HT) de corteza renal de ratas sacrificadas a las 0900h, preincubadas con fracción lipídica de plasma sanguíneo (FL) obtenido a las 0900h y 1500h. Los resultados son presentados como las medias ± el error estándar, para n = 6.

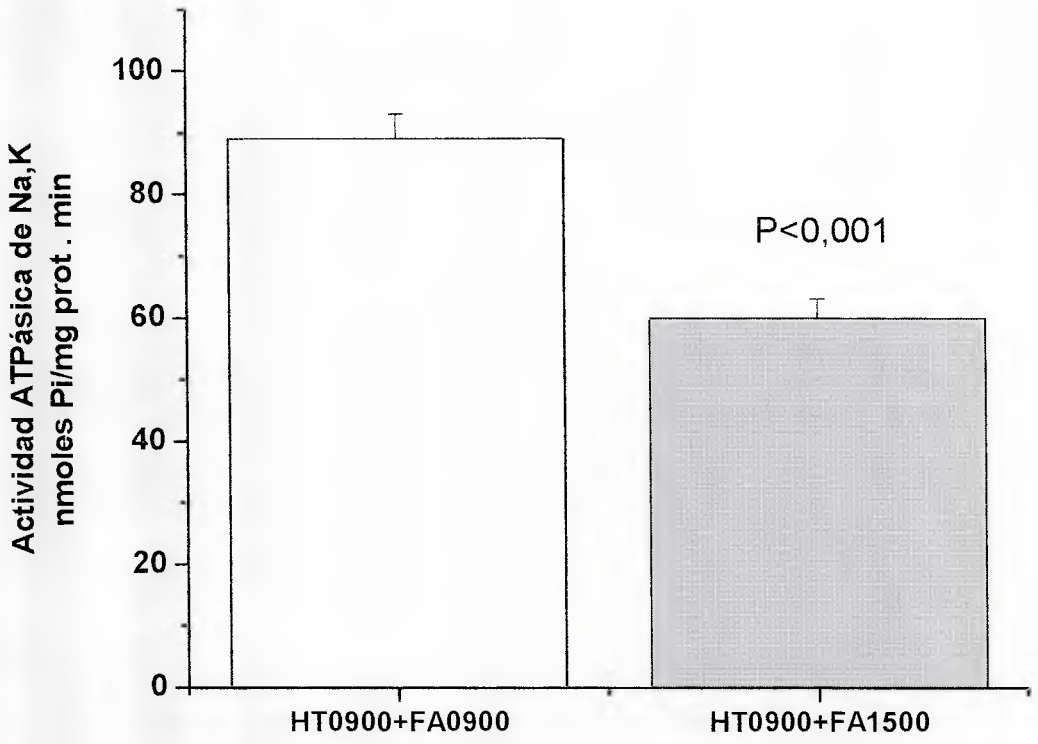

FIGURA 12

Actividad ATPásica de Na,K de homogenizados totales (HT) de corteza renal de ratas sacrificadas a las 0900h y preincubadas con fracción acuosa de plasma sanguíneo (FA) obtenido a las 0900h y 1500h. Los resultados son presentados como las medias ± el error estándar, para n = 6.

DISCUSIÓN

Como ya mencionado anteriormente, la excreción de sodio presenta una cierta ritmicidad diaria, según estudiado entre numerosos animales. Así por ejemplo:

- Monos: muestran una ritmicidad circadiana para la excreción de sodio, independiente de los patrones de comportamiento, alimentación o hidratación (Hawking, 1971; Moore-Ede y Herd, 1977).
- Perros (Hawking, 1971): presentan ritmos ultradianos durante el día para la excreción de potasio y para el volumen de orina excretada, a diferencia del sodio, el cual es excretado con un ritmo circadiano y no ultradiano (Gordon y Lavie, 1982).
- Ovejas: presentan una respuesta anticipada en la composición urinaria, en el sentido de que si son alimentadas cada 24 horas, el máximo de excreción de sodio diario sucede justo antes de alimentarse; por el contrario, si son alimentadas cada 4 horas, el máximo será justo después de ingerir el alimento (Sarelius y Greenway, 1975).
- Ratas, en las cuales también se han observado ritmos circadianos en la

composición urinaria (Rabinowitz y col., 1986; Cohn y col., 1970).

Este tipo de hechos habla acerca de la existencia de una especie de sincronización entre la excreción de sodio y otras sustancias con los ciclos de luz oscuridad, ajustándose a ellos en forma circadiana la composición urinaria (Sarelius y Greenway, 1975). También, en forma general, permiten observar cierta independencia entre la ritmicidad en la excreción y las variaciones ambientales, adjudicándosele entonces un carácter endógeno al gobierno de las variaciones diarias en los picos de excreción de sodio, con una influencia por factores externos como luz-oscuridad, ayuno, movimiento y postura del individuo, sobre la amplitud de los picos de excreción que sí se ven afectados (Sarelius y Greenway, 1975; Gordon y Lavie, 1982).

Según datos del laboratorio (Segura, 1997), reportados en el presente trabajo, se conoce que la actividad de la Na, K-ATPasa en homogenizados de corteza renal de rata, presenta un ritmo ultradiano caracterizado por dos ciclos cada 24 horas, con dos máximos de actividad (picos) a las 0900h y 2100h, y dos mínimos (valles), a las 0300h

y 1500h (Figura 1).

Las oscilaciones encontradas en la actividad de la Na, K-ATPasa, podían ser debidas a estados de inhibición de la enzima o, por el contrario, a estados de activación de la misma. Los resultados mostrados en la Figura 2, señalan como el almacenamiento de las fracciones de membrana se tradujo en un aumento en la actividad de la enzima que tenía una actividad baja recién preparada (muestra obtenida a las 1500h), llegando con el paso de los días, a adquirir valores similares a los de las membranas no inhibidas (0900h). Por otro lado, la actividad de la Na,K-ATPasa de las membranas obtenidas a las 0900h, no varió con el paso de los días. Estos resultados indican que la enzima obtenida a las 1500h se encuentra inhibida, aumentando su actividad paulatinamente con el paso de los días de preparación, hasta llegar a valores de no inhibición.

La activación de la enzima inhibida y la no inhibición de la enzima activada, habla claramente de encontrarnos en presencia de algún factor inhibitorio unido a las membranas, que con el paso del tiempo se degenera o,

simplemente se despega de las membranas, dejando así de ejercer su efecto inhibitorio sobre la actividad de la ATPasa de Na,K.

Evidencias cónsonas con la existencia de algún inhibidor unido a las membranas de material obtenido a las 1500h, que se despega con la fuerza centrífuga, y que no se encuentra pegado a membranas de material obtenido a las 0900h son las siguientes:

- Centrifugación de homogenizados de tejido renal obtenido a las 1500h (enzima inhibida), se traduce en un incremento en la actividad ATPásica de Na,K de los precipitados, la cual alcanza valores similares a los de muestras controles no inhibidas (Tabla 1).

- Centrifugación de homogenizados de material obtenido a las 0900h, no produce modificación importante en la actividad ATPásica de la enzima, indicando que la centrifugación, *per se,* no es la responsable de las variaciones en la actividad de la enzima que se producen al centrifugar homogenizados de material obtenido a las 1500h (Tabla 1).

- Preincubación de precipitado por centrifugación de homogenizado de las 1500h, con el sobrenadante resultante de la centrifugación, se traduce en una importante inhibición de la Actividad de la Na,K-ATPasa. Si se preincuba en cambio el mismo precipitado con sobrenadante de centrifugación de homogenizado de material obtenido a las 0900h, no se produce ninguna inhibición en la actividad de la enzima (Tabla 1).

Un detalle interesante, como puede deducirse de los resultados presentados en las Tablas 2 y 3, es la necesidad de la presencia del ión Mg^{2+} en las preincubaciones, para que el factor inhibitorio se una a las membranas.

Los resultados presentados en la Tabla 4, indican que el precipitado de homogenizado de material preparado a las 0900h, tiene exactamente el mismo comportamiento que el precipitado de material de las 1500h, respecto a la presencia o no de Mg^{2+} en el medio de preincubación, para que se produzca el efecto inhibitorio del factor presente en el sobrenadante.

Finalmente, el comportamiento del inhibidor presente en precipitado de las 1500h, en función del tiempo de obtención, es el mismo que demostró cuando está unido a las membranas, ya que también en este caso, el poder inhibitorio se va perdiendo a lo largo del tiempo de obtención (Figura 3).

Las Figuras 4 y 5, dan una clara indicación de que el plasma sanguíneo de rata obtenido a las 1500h, momento en el cual la enzima se encuentra inhibida, es capaz de inhibir la actividad de la Na,K-ATPasa de homogenizados de riñón de rata obtenidos a las 0900h, no sucediendo lo mismo si el homogenizado es preincubado con muestras de plasma obtenido a las 0900h. Estos resultados permiten concluir, sin ningún género de duda, que el inhibidor de la ATPasa de Na,K se encuentra circulando en el plasma del animal a las 1500h, pero no está presente o, está en muy bajas concentraciones, en el plasma de las 0900h.

El inhibidor presente en plasma parece ser el mismo que está pegado a las membranas, ya que preincubación de homogenizados de riñón obtenidos a las 1500h (enzima inhibida), con plasma obtenido a las 1500h, no se tradujo

en un grado de inhibición mayor (Figura 5). El precipitado por centrifugación de homogenizados de riñón obtenidos a las 1500h, en cambio, si mostró una importante inhibición en la actividad de la Na,K-ATPasa, después de ser preincubado con plasma obtenida a las 1500h (Figura 7).

La posibilidad de que el plasma *per se* pudiera tener algo que ver con la actividad de la Na,K-ATPasa, quedó descartada, al demostrarse que el plasma no posee prácticamente ninguna actividad ATPásica estimulada por sodio y potasio (Figura 6).

Nuestros esfuerzos indagando sobre la naturaleza del inhibidor, nos permitieron obtener alguna información sobre el mismo. Así:

- No es una proteína, ya que su poder no se pierde al precipitar las proteínas del plasma (Figura 8).

- No es un lípido, ya que al separar los componentes del extracto ácido en sus componentes lipídicos o no lipídicos, el inhibidor pasó a

la fracción acuosa de las muestras (Figuras 11 y 12).

- Finalmente, tiene un peso molecular por debajo de 3 KDa (Figura 10).

En humanos, se ha reportado que el potasio intracelular aumenta en las primeras horas de la noche, continuando así durante toda la noche (Moore-Ede y col. 1975). Este aumento, coincide con un aumento simultáneo en la excreción de sodio y potasio. El aumento en el potasio intracelular debe ser por un aumento de actividad de la Na,K-ATPasa, la cual mueve potasio al interior celular en contra de su gradiente de concentración, intercambiándolo por sodio, que es expulsado de las células. Esta situación bien pudiera reflejarse en una tendencia a la disminución del potasio plasmático, situación agravada por el hecho de que también hay una cierta pérdida de potasio por la orina cónsono con los resultados del presente trabajo. Pudiera suceder que, para tratar de mantener los niveles de la concentración plasmática de potasio en valores normales, durante las primeras horas de la noche comienza a inhibirse la actividad de la Na,K-

ATPasa. Esto se traduciría en una tendencia a la disminución del potasio intracelular y, consecuentemente, en una tendencia al aumento de su concentración extracelular. Paralelamente, una menor actividad de la Na,K-ATPasa se pudiera traducir en una menor reabsorción de sodio a nivel de túbulo renal, lo que explicaría el aumento en la excreción de sodio. (Morise y col., 1989).

La ouabaína es un esteroide cardiotónico que inhibe la actividad de la Na,K-ATPasa, uniéndose al lado externo de la membrana celular e impidiendo la desfosforilación de la enzima, lo que frena su reciclaje. Este compuesto es de origen vegetal, sin embargo, actualmente se conoce que en los humanos se sintetiza una ouabaína endógena (Hamlyn y col., 1991), más aún, se sabe que es una hormona producida por la corteza de las glándulas suprarrenales y quizá por el cerebro (Hamlyn y col., 1991; Ludens y col., 1992; Yamada y col., 1992). Se ha descrito que la secreción de esta hormona está regulada por variaciones en el volumen plasmático (Boulanger y col., 1989), lo cual tiene sentido, ya que su acción controla la actividad de la Na,K-ATPasa, lo que modifica el volumen celular.

Así mismo, otros autores reportan la existencia de un factor endógeno inhibitorio de la actividad de la Na,K-ATPasa, el cual varía circadianamente en humanos, con un ciclo que coincide con el de excreción de sodio (Morise y col, 1989). Dicho factor ha sido encontrado en plasma humano así como orina y, en un intento por determinar sus características químicas, Mir y col. (1988), concluyeron que se trata de una sustancia de origen peptídico. Por otro lado, Cloix y col. (1985), lo consideran un esteroide, cuyo peso molecular es 431. Finalmente, Tamura y col. (1987), sugieren que este agente inhibitorio de la Na,K-ATPasa en humanos no es un péptido, y su peso molecular es de 336.

A pesar de que las características químicas de este último inhibidor de la Na,K-ATPasa no se encuentran totalmente definidas, se asume que es el responsable directo de la inhibición circadiana de la enzima y, por ende, de la variación circadiana en la excreción de sodio (Morise y col. 1988). Si bien el factor inhibitorio estudiado en el presente trabajo tiene una variación ultradiana, sus características, en cierta forma similares a las de este inhibidor, hacen importante ampliar su caracterización, para

determinar si hay alguna relación o no con el factor inhibitorio aislado de orina humana.

El hecho de que la enzima presente dos ciclos diarios con dos picos y dos valles en su actividad, indica que el factor inhibitorio debiera empezar a sintetizarse al inicio de un ciclo (cuando la actividad de la Na,K-ATPasa es máxima), hasta llegar a un máximo a la mitad de éste (cuando la actividad de la ATPasa es mínima). En este momento debiera cesar su producción, hasta alcanzarse un mínimo de concentración (de nuevo máxima actividad ATPásica), iniciándose entonces un nuevo ciclo.

Una manera de explicar este comportamiento, es considerando la presencia de un fenómeno de retroalimentación negativa en el cual, un valor máximo de concentración plasmática del factor inhibitorio, es mensaje para que cese la producción del mismo; por otro lado, un valor mínimo de concentración plasmática del inhibidor, es mensaje para que de nuevo comience su producción.

Cuando la concentración en plasma del inhibidor supere un cierto valor límite, su capacidad de fijación a las membranas superaría su capacidad de despegue de las mismas, con lo que aumentaría la cantidad de inhibidor adosado a las membranas celulares, produciéndose así el nivel correspondiente de inhibición de la enzima. Cuando por el contrario, la concentración en plasma del inhibidor baja del valor límite, el proceso se revertiría y, el resultado neto, sería que la cantidad de inhibidor adosado a las membranas disminuya y, con ello, la actividad de la Na,K-ATPasa aumentaría.

En el riñón, la Na,K-ATPasa juega un papel muy importante en el manejo de la reabsorción de Na^+. Esta función de la enzima para mantener la homeostasis de fluidos y electrolitos, se encuentra altamente regulada a corto y largo plazo; en el primer caso, por numerosas hormonas circulantes y en el segundo, a largo plazo, por regulaciones transcripcionales, traduccionales y postraduccionales, así como por modificaciones en el ensamblaje de las subunidades α y β de la Na,K-ATPasa (McDonough y Farley, 1993).

El factor inhibitorio descrito en el presente trabajo, no es una proteína, ni tiene carácter lipídico (Figuras 9, 11 y 12) y posee un peso molecular menor de 3 KDa (Figura 10). Bien pudiera ser que se tratara de alguna de las hormonas implicadas en la regulación fina de la actividad de la Na,K-ATPasa (regulación a corto plazo). Para tratar de averiguar algo al respecto, se realizó una revisión, aunque breve, sobre los factores conocidos que regulan la actividad de la Na,K-ATPasa.

El sistema renina-angiotensina, la aldosterona y el cortisol, muestran ritmicidad y modifican la "hemodinámica renal" (Pons y col., 1994). Estas hormonas, junto con la norepirefrina (Bertorello y Katz, 1993) y hormona tiroidea, estimulan la actividad de la Na,K-ATPasa en el riñón, o la síntesis de enzimas (Ewart y Klip, 1995). Este efecto es contrario al ejercido por el factor aquí estudiado, razón por la cual se descartan estas hormonas como responsables de la variación cíclica reportada. Además, los niveles plasmáticos del péptido natriurético atrial, de la renina y, de la aldosterona, muestran ritmicidad circadiana, cuyas variaciones en el tiempo son distintas de los ciclos de excreción de Na y K reportados en humanos (Morise y col.,

1989; Pons y col., 1994).

La dopamina inhibe la actividad de la Na,K-ATPasa y del intercambiador Na/H (Bertorello y Katz. 1993). Presenta ritmos circadianos de actividad, con un máximo entre las 1500h y 1600h, al igual que la secreción de adrenalina y noradrenalina (Pons y col., 1994). La dopamina posee receptores en la membrana plasmática de las células de túbulo proximal, rama gruesa ascendente y tubo colector cortical. La actividad de la dopamina así como algunas otras hormonas, ha sido demostrada en células intactas o en preparaciones de membrana, sólo si la regulación por la hormona es ejercida antes de su preparación (Bertorello y Katz, 1993). Por este hecho, si el inhibidor en cuestión se tratase de esta hormona, no sería posible observar su efecto al incubar membranas con plasma, en condiciones experimentales. Caso similar, ocurre en la regulación de la Na,K-ATPasa por la hormona paratiroidea, la cual ejerce su efecto inhibitorio sobre el túbulo proximal, gracias a segundos mensajeros (Bertorello y Katz, 1993).

En resumen, el inhibidor de la Na,K-ATPasa descrito en este trabajo, que se encuentra en plasma sanguíneo de rata obtenido a las 1500h y también puede ser aislado de homogenizados de corteza renal de riñón de rata obtenidos a las 1500h, no parece ser ninguno de los moduladores conocidos y descritos de la enzima.

El hecho de que la acción del inhibidor sobre la actividad de la Na,K-ATPasa presente un ritmo ultradiano, lo hace interesante desde el punto de vista de que está regulando en ciclos de 12 horas, lo cual lo hace aparentemente no dependiente de los ciclos de luz - oscuridad.

El verdadero motivo de esta regulación ultradiana de la Na,K-ATPasa, es desconocido por nosotros en los actuales momentos. Es necesario en primer lugar averiguar si su efecto se ejerce sólo a nivel renal o, se ejerce también de un modo general en todo el organismo. De esta manera podremos tratar de discernir cual pudiera ser el objetivo de la regulación de una enzima que, no solamente es fundamental para el mantenimiento de las concentraciones intracelulares de sodio y potasio, sino que además

interviene en funciones del organismo como lo es la absorción intestinal y la reabsorción renal de sodio, y la generación de potenciales de acción por nervios y músculos. Asimismo, también se hace necesario identificar de modo inequívoco de qué sustancia se trata y, si su distribución es universal o se encuentra sólo confinada a algunos organismos.

BIBLIOGRAFÍA.

Aschoff, J., 1965. Circadian Rhythms in man. Science. Vol. 148: 1427-1448.

Bertorello, A., Katz, A., 1993. Short-term regulation of renal Na-K-ATPase activity: physiological relevance and cellular mechanisms. Am. J. Physiol. 265: F743-F755.

Biologic Rhythms: The rhythms of life. Marzo 2001. http://www.chronotherapy.com/

Boulanger, C., Hendrickson, H., Lorenz, R. R., Vanhoutte, P. M., 1989. Release of different relaxing factors by cultured porcine endothelial cells. Circ. Res. 64: 1070-1078.

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.

Carilli, C. T., Berne, M., Candley, L. C., Haupert, G. T., 1985. Hypothalamic factor inhibit the (Na,K) ATPase from the extracellular surface. J. Biol. Chem. 260: 1027-1031.

Cloix. J. F., Crabos, M., Wainer, I. W., Ruegg, U., Seiler, M., Meyer, P., 1985. High yield-purification of a Na^+ pump inhibitor. Biochem. Biophys. Res. Commun. 131: 1234-1240.

Cohn, C., Webb, L., Joseph, D. 1970. Diurnal rhythms in urinary electrolyte excretion by the rat: influence of feeding habits. Life Sci. 9: 803-809.

Conroy, R. T. y Mills J. N., 1970. Human circadian rhythms. London: J. and A. Churchill.

Daan, S., 1981. Biological Rhythms. Handbook of Behavioral Physiology. New York: Plenum Press.

Daan, S., Aschoof, J., 1982. Circadian rhythms in vertebrate. New York: Springer-Verlag.

Edwards, W. S., Lloyd, D., 1980. Oscillations in proteins and RNA content during synchronous growth of Acanthamoeba castellanii. Evidence for periodic turnover of macromolecules during cell cycle. FEBS Lett. 109: 21-26.

Ewart, H.S., Klip, A. 1995. Hormonal regulation of the Na^+-K^+-ATPase: mechanisms underlying rapid and sustained changes in pump activity. Am. J. Physiol. 269: C295-C311.

Folch, W.A., Less, M., Sloanestanley, G.H., 1957. A simple method for the isolation of total lipids from animal tissues. J Biol Chem; 226: 497-509.

Ganong, W. H., 1988. Fisiología Médica. 16ª ed, Manual Moderno, México, 981 pág.

Giese, A. C., 1983. Fisiología general y celular. 5° ed, Interamericana, México, 726 pág.

Gordon, C., Lavie, P. 1982. Ultradian rhythms in renal excretion in dogs. Life Sciences, Vol 31, N° 34, 2727-2734.

Hamlyn, J. M., Blaustein, M. P., Bova, S., DuCharme, D. W., Harris, D. W., Mandel, F., Mathews, W. R., Ludens, J. H., 1991. Identification and characterization of a ouabain-like compound from human plasma. Proc Natl Acad Sci USA 81: 6259-6263.

Hawking, F., 1971. Circadian rhythms in monkeys, dogs and other mammals. J. Interdiscipl. Cycle Res. 2: 153.

Ludens, J. H., Clark, M. A., Robinson, F. G., DuCharme, D. W., 1992. Rat adrenal cortex is a source of a circulating ouabainlike compound. Hypertension Dallas 19: 721-724.

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.

McDonough, A., Farley, R., 1993. Regulation of Na,K-ATPase activity. Current Opinion in Nephrology and Hypertension, 2: 725-734.

Mir, M. A., Morgan, K., Chappel, S., Lewis, M., Spurlock, G., Collins, P., Collins, P. Lewis, M., Scalon, M., 1988. Calcium retention and increased vascular reactivity caused by a hypothalamic sodium transport inhibitor. Clin. Sci. 75: 197-202.

Moore-Ede, M., 1986. Physiology of the circadian timing system: predictive versus reactive homeostasis. Am. J. Physiol. 250: R735-R752.

Moore-Ede, M., Czeisler, C., Richardson, G., 1983. Circadian timekeeping in healthand disease. N. Engl. J. Med. Vol. 309 N° 8: 469-476.

Moore-Ede, M., Herd, A., 1977. Renal electrolyte circadian rhythms: independence from feeding and activity patterns. Am. J. Physiol. 232 (2): F128-F135.

Moore-Ede, M., Brennan, M., Ball, M., 1975. Circadian variation of intercompartmental potassium fluxes in man. J. Appl. Physiol. 38 (1): 163-170.

Morise, T., Okamoto, S., Ikeda, M., Takeda, R., 1988. Biological activity of partially purified endogenous digitalis-like substance (DLS) and Na-K-ATPase inhibitor. Jpn. Circ. J. 52: 1309-1311.

Morise, T., Okamoto, S., Ikeda, M., Takeda, R., 1989. The possible role of endogenous digitalis-like substance in the regulation of circadian changes in urinary electrolyte excretion in man. Endocrinol. Japon, 36 (6): 845-850.

Pittendrigh, S. C., 1993. Temporal organization: reflections of a Darwinian clock watcher. Annu. Rev. Physiol. 55: 17-54.

Pons, M., Tranchot, J., L'Azou, B., Cambar, J., 1994. Circadian rhythms of renal hemodynamics in unanesthetized, unrestrained rats. Chronobiology International, vol 11, N° 5: 301-308.

Proverbio, F., del Castilllo, J. R., 1981. Na^+ - stimulated ATPase activities in kidney basal-lateral plasma membranes. Biochim. Biophys. Acta. 646: 99-108.

Rabinowitz, L., Wydner, C. J., Smith, K. M., Yamauchi, H., 1986. Diurnal potassium excretory cycles in the rat. Am. J. Physiol. 250: F930-F941.

Randall, D., Burggren, W., French, K., 1998. Fisiología Animal. Mecanismos y adaptaciones. 4° ed., McGraw Hill, España, 790 pág.

Sarelius, I., Greenway, R., 1975. Rhythmic fluctuations in the urine composition of sheep. Pflügers Arch. 355: 243-259.

Segura, D., 1997. Oscilaciones en la actividad ATPásica de Na,K de homogenizados de corteza renal de rata. Trabajo de grado como requisito para optar al título de Magister Scientiarium en Biología, mención Bioquímica. CEA, IVIC.

Tamura, M., Lam, T., Inagami, T., 1987. Specific endogenous Na,K-ATPase inhibitor purified from bovine adrenal. Biochem. Biophys. Res. Commun. 149: 468-474.

Termonia, Y., Ross, C., 1981. Oscillations and control features in glycolisis in numerical analysis of a comprehensive model. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 78: 2952-2956.

Vander, A., 1992. Fisiología renal. 4 ed., Mc Graw Hill, México, 227 pág.

Yamada, H., Naruse, M., Naruse, K., Demura, H., Takahashi, H., Yoshimura, M., Ochi, J., 1992. Histological study on ouabain inmunoreactivities in the mammalian hypothalamus. Neurosci Lett 141: 143-146.