AR8945

Universidad Católica Andrés Bello
Facultad de Humanidades y Educación
Escuela de Educación
Mención: Biología y Química

ESTUDIO DEL POSIBLE EFECTO DE LOS AMINOÁCIDOS SÉRICOS QUE PRESENTAN OSCILACIONES ULTRADIANAS, SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA ATPasa DE Na,K DE CORTEZA RENAL DE RATAS MACHOS DE LA CEPA *Sprague-Dawley*

Trabajo de grado presentado como requisito para optar al título de Licenciada en Educación Mención Biología y Química en la Universidad Católica Andrés Bello.

Autora: Desirée Coromoto Botana Machado
Tutor: Dr. Reinaldo Marín
Co-Tutor: Dr. Fulgencio Proverbio

Caracas, Septiembre 2007

ÍNDICE GENERAL

		Página
LISTA DE TABLAS		
LISTA DE FIGURAS		
RESUMEN		
INTRODUCCIÓN		1
CAPÍTULO I		3
	Planteamiento del problema	3
	Objetivo General	4
	Objetivos Específicos	4
	Hipótesis	5
	Justificación	5
CAPÍTULO II		7
	Marco Teórico	7
CAPÍTULO III		14
	Metodología	14
1	Animales de experimentación	14
2	Obtención de sangre de rata	14
3	Preparación y homogenización de rebanadas de corteza renal de rata	14
4	Precipitación ácida, ultrafiltración y diálisis del plasma sanguíneo	15
5	Determinación de aminoácidos en las fracciones de plasma sanguíneo de ratas machos a las 0900h y 1500h	16
6	Preincubaciones de los homogenizados de la corteza renal con las distintas fracciones que se evaluarán para determinar su efecto sobre la actividad de la ATPasa de Na,K	17
7	Determinación de proteínas	19
8	Determinación de la actividad de la ATPasa de Na,K en homogenizados de corteza renal de rata	20

9 Análisis Estadístico..... 21
CAPÍTULO IV..... 22
Resultados..... 22
1 Ritmo ultradiano de la actividad ATPásica de Na,K 22
2 Características conocidas del factor inhibitorio responsable de las oscilaciones ultradianas de la actividad ATPásica de Na,K..... 22
3 Actividad de ATPasa de Na,K de corteza renal a las 0900h y a las 1500h 25
4 Búsqueda del posible factor inhibitorio responsable de las oscilaciones ultradianas de la actividad ATPásica de Na,K..... 25
5 Efecto de la preincubación con los aminoácidos Arginina, Asparagina, Taurina y Valina sobre la actividad ATPásica de Na,K de homogenizados de corteza renal de rata..... 28
6 Efecto de la preincubación con los aminoácidos Arginina, Asparagina, Taurina y Valina, previamente tratados con 2 mg/l de cinc, sobre la actividad ATPásica de Na,K de homogenizados de corteza renal de rata... 30
7 Efecto de la preincubación con distintas concentraciones de Taurina, previamente incubadas con 2 mg/l de cinc, sobre la actividad ATPásica de Na,K de homogenizados de corteza renal de rata obtenidas a las 0900h..... 33
8 Estabilidad de la unión complejo Taurina-Cinc-membrana a lo largo del tiempo..... 36
9 Requerimiento del ión Mg^{2+}, para la unión del complejo Taurina-Cinc con las membranas..... 39
10 Efecto de la preincubación de membranas provenientes de distintos tejidos de ratas sacrificadas a las 0900h con el complejo Taurina–Cinc, sobre la actividad ATPásica de Na,K de las mismas..... 41
11 Efecto de la centrifugación sobre la unión del complejo Taurina–Cinc con membranas de homogenizados de tejido renal de ratas sacrificadas a las 0900h..... 43
CAPÍTULO V..... 45

Análisis..... 45
Conclusiones..... 53
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... 55

LISTA DE TABLAS

TABLA Página

1 Algunas características del inhibidor, presente en plasma sanguíneo de rata, responsable de las oscilaciones ultradianas de la ATPasa de Na,K.... 24

2 Características del inhibidor natural y del ión cinc, respecto a su interacción con membranas de corteza renal de rata y sus efectos sobre la actividad de la ATPasa de Na,K de las mismas..... 26

3 Actividad ATPásica de Na,K de homogenizados de rebanadas de corteza renal de rata obtenidas a las 0900h y 1500h..... 27

LISTA DE FIGURAS

FIGURA Página

1. Curso temporal de la 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..... 23

2. Concentraciones de Arginina (ARG), Asparagina (ASP), Taurina (TAU) y Valina (VAL) en plasma de ratas obtenido a las 0900h y a las 1500h.... 29

3. Efecto de la preincubación de homogenizados de corteza renal de ratas, sacrificadas a las 0900h, con 274,6 μM Arginina, 95,2 μM Asparagina, 500,2 μM Taurina y 42,3 μM Valina, sobre la actividad de la ATPasa de Na,K de los mismos..... 31

4. Efecto de la preincubación de homogenizados de corteza renal de ratas sacrificadas a las 0900h con complejos Aminoácidos–Cinc, sobre la actividad de la ATPasa de Na,K de los mismos..... 32

5. Efecto de la preincubación de homogenizados de corteza renal de ratas sacrificadas a las 0900h con 300 μM o 500 μM Taurina, previamente acomplejada con cinc, sobre la actividad de la ATPasa de Na,K de los homogenizados de corteza renal..... 34

6. Efecto de preincubaciones de homogenizados de corteza renal de ratas sacrificadas a las 0900h con concentraciones 300 y 500 μM de Taurina, acomplejada previamente con distintas concentraciones de 1, 2, 4 y 8 mg/l de cinc, sobre la actividad de la ATPasa de Na,K de los mismos..... 35

7. Efecto de preincubaciones de homogenizados de corteza renal de ratas sacrificadas a las 0900h con distintas concentraciones de Taurina sobre la actividad de la ATPasa de Na,K de los mismos..... 37

8. Efecto del tiempo de almacenamiento de los homogenizados de corteza renal de rata sacrificadas a las 0900h y preincubados con el complejo Taurina–Cinc (500 μM Taurina y 2 mg/l de cinc) sobre la actividad

ATPásica de Na,K de dichos homogenizados..... 38

9. Efecto de la preincubación de homogenizados de corteza renal de ratas sacrificadas a las 0900h con el complejo Taurina–Cinc (500 μM Taurina y 2 mg/l de cinc), en ausencia o en presencia de 5 mM $MgCl_2$, sobre la actividad de la ATPasa de Na,K de los mismos..... 40

10. Efecto de la preincubación con el complejo Taurina-Cinc (500 μM Taurina y 2 mg/l de cinc), en presencia o no de 5 mM $MgCl_2$ sobre la actividad ATPásica de Na,K de homogenizados de distintos tejidos y membranas de glóbulos rojos de ratas sacrificadas a las 0900h..... 42

11. Actividad de la ATPasa de Na,K de homogenizados de corteza renal de ratas sacrificadas a las 0900h, incubados bajo condiciones control, con el complejo Taurina-Cinc (500 μM Taurina y 2 mg/l de cinc) o con el complejo Taurina-Cinc (500 μM Taurina y 2 mg/l de cinc) y luego incubados a 37°C en un medio sin potasio ($0K^+$)..... 44

UNIVERSIDAD CATÓLICA ANDRÉS BELLO

Trabajo especial de grado para optar al Título de Licenciado en Educación
Mención Biología y Química

ESTUDIO DEL POSIBLE EFECTO DE LOS AMINOÁCIDOS SÉRICOS QUE PRESENTAN OSCILACIONES ULTRADIANAS, SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA ATPasa DE Na,K DE CORTEZA RENAL DE RATAS MACHOS DE LA CEPA *Sprague-Dawley*

Autora: Desirée Botana
Tutor: Dr. Reinaldo Marín
Cotutor: Dr. Fulgencio Proverbio
Fecha: Septiembre 2007

RESUMEN

La ATPasa de Na,K es una proteína integral de membrana encargada de generar y mantener un gradiente transmembrana para Na^+ y K^+. Este gradiente es utilizado, entre otras cosas, como fuente de energía para la regulación de la composición iónica citoplasmática, para el transporte transepitelial y para la regulación del volumen celular, así como para el transporte hacia el interior de la célula de componentes esenciales en contra de un gradiente. La actividad de la ATPasa de Na,K está determinada por un ciclo menor a 24 horas o ritmo ultradiano (Segura, *et al* 2004). En el organismo los ritmos ultradianos y circadianos establecen ciertas funciones fisiológicas y moleculares como regulación en síntesis y degradación de proteínas y optimización del gasto energético, entre otros.

Segura y colaboradores (Segura, *et al* 2004) determinaron que las oscilaciones ultradianas de la actividad ATPásica de Na,K viene determinada por un inhibidor presente en plasma, que puede ser parcialmente aislado y de peso molecular menor a 1 kDa. Adicionalmente se reportaron oscilaciones ultradiana similares en tejidos como el hepático, cardíaco, intestinal y glóbulos rojos, y por ende, en los procesos fisiológicos implicados con los mismos (Reyes 2001). Por todo esto resultó determinante comenzar a indagar en la naturaleza del inhibidor que estaba influenciando la actividad de la enzima.

Andreotti (2007) estudió el efecto inhibitorio del cinc en la actividad de la ATPasa de Na,K. Todas las características de este ión coinciden con las del inhibidor natural, pero por su baja concentración en plasma y por ausencia en la variación de su concentración durante el día, resultó imposible postularlo como posible responsable de la inhibición de la actividad ATPásica.

Los aminoácidos son compuestos presentes en plasma y muchos de ellos se han reportado que modifican la actividad de la ATPasa de Na,K. En este trabajo, se propone la acción del complejo Taurina-Cinc como posible factor responsable de las oscilaciones ultradianas de la actividad ATPásica de Na,K, debido a que sus características coinciden con las del inhibidor natural reportado por Segura y colaboradores (Segura, *et al* 2004).

Descriptores: ATPasa de Na,K, ritmo ultradiano, Taurina, cinc, aminoácidos, inhibidor, riñón, ATP.

INTRODUCCIÓN

Los ritmos ultradianos son variaciones rítmicas, que se presentan con una frecuencia menor a las 20 horas. Este es el caso de la actividad de la ATPasa de Na,K de riñón y otros tejidos de la rata, la cual presenta dos ciclos diarios, con picos a las 0900h y a las 2100h y valles a las 1500h y a las 0300h (Segura, *et al* 2004). Si bien todavía no está claro cuáles son las consecuencias fisiológicas de esta ritmicidad, si se sabe que la misma es debida a la presencia de un inhibidor en el plasma sanguíneo (Segura, *et al*, 2004), cuyas concentraciones o eficiencia varían según las oscilaciones de la actividad enzimática, es decir, altas cuando la enzima está inhibida y bajas cuando no lo está (Segura, *et al*, 2004).

9:00
21:00
15:00
3:00

En la actualidad no se conoce con precisión cuál es la naturaleza química del *inhibidor sérico responsable de las oscilaciones ultradianas de la actividad de la* ATPasa de Na,K renal de rata, no obstante, se sabe que dicho inhibidor se une y permanece unido a las membranas, que no es una proteína ni un lípido, que tiene un peso molecular menor a 1 kDa, que es resistente a tratamientos con ácidos débiles, que se requiere magnesio en concentraciones milimolares para que el mismo se pueda ligar a la membrana y ejercer su efecto inhibitorio sobre la ATPasa de Na,K, y que puede ser despegado de las membranas por incubación a 37°C, a concentraciones de potasio inferiores a 5 mM (Segura, *et al* 2004). Si bien se ha descrito que el ión cinc posee un efecto inhibitorio muy parecido al ejercido por el inhibidor endógeno, las concentraciones totales del mismo en plasma no fluctúan, con lo que, por si mismo, no puede explicar el efecto rítmico del inhibidor endógeno. El presente estudio se diseñó con el fin de determinar si, en el plasma de la rata, puede existir un agente que, sólo o en unión del ión cinc, sea capaz de explicar, no sólo las características inhibitorias del inhibidor endógeno, sino también la ritmicidad de su efecto. Para ello,

se ~~van a hacer~~ determinaciones a distintas horas del día de sustancias presentes en el plasma de la rata, como proteínas, monoaminas, aminoácidos, con el fin de determinar, por un lado si presentan variaciones en sus concentraciones a lo largo del día y, por otro lado, estudiar la posibilidad de que las mismas, bien solas o bien en unión del ión cinc, son capaces de inhibir la actividad de la ATPasa de Na,K de tejido renal de rata, con características similares a las presentadas por el ión cinc, según descrito por Andreotti (Andreotti 2007).

CAPÍTULO I

Planteamiento del problema

La actividad ATPásica de Na,K de riñón de rata presenta oscilaciones durante el día, como consecuencia de la presencia de un inhibidor en plasma, cuya concentración varia de forma ultradiana. De este inhibidor endógeno, se conocen una serie de características que deberán ser presentadas por cualquier sustancia que sea capaz de producir la inhibición. En este particular, Andreotti (Andreotti, 2007) encontró que el ión cinc presenta características inhibitorias de la enzima iguales a las presentadas por el inhibidor endógeno; sin embargo, al no encontrar Andreotti (Andreotti, 2007) ninguna variación en el contenido total de cinc en plasma de rata, siendo ésta igual a las 0900h que a las 15.00 h lo llevaron a pensar que el cinc pudiera estar involucrado en el fenómeno, pero no solo, sino unido o acomplejado a otra sustancia, como proteínas, aminas o aminoácidos, cuyas concentraciones si variaran a lo largo del día, con lo que pudieran explicar, no sólo el patrón inhibitorio, sino también la ritmicidad a lo largo del día.

Por ello se plantea: ¿Hay variaciones ultradianas de algunas sustancias libres en plasma sanguíneo de la rata? y, en caso de haberlas, ¿cuál es el efecto de estas sustancias, solas o en compañía del ión cinc, sobre la actividad de la ATPasa de Na,K en homogenizados de corteza renal de rata, a las distintas concentraciones encontradas en plasma de las mismas?

Objetivo General

Evaluar el efecto de aminoácidos séricos que presentan oscilaciones ultradianas, sobre la actividad de la ATPasa de Na,K de corteza renal de ratas machos (*Sprague-Dawley)*

Objetivos Específicos

1. Determinar de la actividad ATPásica de Na,K en homogenizados de corteza renal de rata macho, preparados bien a las 0900h, o bien a las 1500h.

2. Seleccionar los aminoácidos cuyas concentraciones séricas en la rata presentan oscilaciones ultradianas.

3. Determinar el efecto de aminoácidos séricos con oscilaciones ultradianas sobre la actividad de la ATPasa de Na,K en homogenizados de corteza renal de rata macho, combinados o no con cinc.

Hipótesis

1. Hay uno o más aminoácidos en el plasma sanguíneo de las ratas, cuya concentración es alta a las 1500h y baja a las 0900h, pudiendo, en el primer caso, sólo o acompañada de cinc, inhibir la actividad ATPásica de Na,K de corteza renal de rata, más no producir efecto alguno en el segundo caso.

2. El efecto inhibitorio rítmico de estos aminoácidos, explicaría satisfactoriamente la variación ultradiana de la actividad de la ATPasa de Na,K de corteza renal de rata.

Justificación

La actividad de la ATPasa de Na,K en corteza renal de rata muestra oscilaciones ultradianas, las cuales se han demostrado que son debidas a la presencia de un inhibidor endógeno, que circula en el plasma sanguíneo (Segura, *et al* 2004). La naturaleza química de dicho inhibidor es desconocida hasta el presente. No obstante, se conocen varias de sus características, entre las cuales podemos mencionar: tiene un peso molecular menor a 1 kDa, es resistente a tratamientos con ácidos débiles, se requiere de magnesio en concentraciones milimolares, para que el mismo se pueda ligar a la membrana para ejercer su efecto inhibitorio sobre la ATPasa de Na,K, y s e desliga de las membranas, bien por incubación a 37°C en presencia de concentraciones de K menores a 5 mM, o bien con el paso del tiempo de preparación de las muestras (Segura, *et al* 2004). En este trabajo se van a utilizar estas características, para tratar de identificar al inhibidor endógeno responsable de las oscilaciones ultradianas de la ATPasa de Na,K.

En el plasma sanguíneo, se encuentran constantemente fracciones importantes tanto de monoaminas, como de aminoácidos. En la actualidad, se sabe que dependiendo de las circunstancias, ambiente o tejidos, la actividad de la ATPasa de

Na,K puede ser inhibida por monoaminas o por aminoácidos, tales como el ácido D,L-aspártico (Fedelesova, *et al* 1975), la fenilalanina (Bedin, *et al* 2000), metionina y homocisteína (Streck, *et al* 2002b), prolina (Pontes, *et al* 2001), Taurina e hipoTaurina (Mrsny & Meizel 1985) y la tirosina (Venugopal & Ramakrishna 2005). Por consiguiente, una monoamina, o un aminoácido sérico, cuya concentración en plasma oscile según esperado, pudiera ser el inhibidor endógeno responsable de las oscilaciones ultradianas de la ATPasa de Na,K. Como sea que, no se conocen con precisión las posibles oscilaciones diarias de estas sustancias, en el presente trabajo se planteó, en primera instancia, la evaluación de los niveles séricos de monoaminas y aminoácidos, a las 0900h y a las 1500h. En caso de conseguir una o más sustancias con oscilaciones ultradianas en sus concentraciones séricas cónsonas con el patrón inhibitorio, se evaluará el efecto directo *in vitro* de las mismas, solas o en compañía del ión cinc, sobre la actividad de la ATPasa de Na,K de homogenizados de corteza renal de rata, extraídos a las 0900h, cuando la actividad de esta enzima se encuentra en sus niveles máximos.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

La ritmicidad consiste en el mantenimiento de una variable fisiológica dentro de un rango de oscilación de valores. Esto incluye a la ritmicidad dentro del concepto de homeóstasis, puesto que los ritmos que puede presentar un individuo van a regular su estado interno en respuesta a las variaciones cíclicas del medio ambiente, permitiendo así una mejor adaptación de los mismos a su entorno (Moore-Ede 1986a). Existen diferentes tipos de ritmos biológicos, los ritmos circadianos son aquellos que se presentan de forma diaria, durando entre 20 y 24 horas; los supradianos, cuyo período es mayor de 24 horas, y los ultradianos, con períodos menores a 20 horas.

Se conoce que los ritmos circadianos y ultradianos tienen una importancia significativa en el establecimiento de ciertas funciones fisiológicas y en la sincronización de eventos celulares y moleculares, como la regulación de la síntesis y degradación de proteínas (Edwards & Lloyd 1980), el establecimiento de intervalos de vigilia y sueño en los vertebrados (Daan & Aschoof 1982), la optimización del gasto energético (Termonia & Ross 1981). Todas estas funciones parecen estar controladas por relojes endógenos, sincronizados por ciclos de luz y oscuridad (Kalmus 1940).

Adicionalmente, numerosos estudios han demostrado que existen ritmos circadianos de muchas funciones fisiológicas como secreción de hormonas (Gambardella, *et al* 1994), en la actividad de algunas enzimas, como la glucosa 6-fosfatasa y la fosfatasa alcalina (Gupta, *et al* 1994), liberación de melatonina por la

glándula pineal o epífisis (Quay 1963), actividad locomotora y temperatura corporal (Sweeney & Hastings 1960) y en la excreción de electrolitos en orina y el volumen de orina excretada (Moore-Ede & Herd 1977). Referido a éste último fenómeno, se sabe que la ATPasa de Na,K juega un papel clave en las funciones renales, donde participa, entre otras funciones, en la reabsorción del ión Na^+.

La ATPasa Na,K es una proteína integral de membrana, que consiste de tres subunidades: α, β y γ. La subunidad responsable de la actividad catalítica de la enzima es la α, la cual posee 1012 aminoácidos aproximadamente, y posee el sitio para la fosforilación (ASP 369) en el lado citoplasmático. Por su parte, la subunidad β es una glicoproteína de unos 300 aminoácidos aproximadamente. Esta subunidad juega un papel importante en la inserción de la subunidad α en la membrana (Skou & Esmann 1992). La subunidad γ, no parece ser esencial para la actividad de la ATPasa de Na,K, ya que puede inclusive estar ausente, como en el caso de algunas células, y parece tener funciones limitadas y específicas.. Hasta el presente, se ha demostrado la existencia de cuatro isoformas de la subunidad α y varias isoformas de la subunidad β (Skou & Esmann 1992).

La ATPasa de Na,K únicamente utiliza ATP para sustentar su transporte activo, y el mismo no puede ser reemplazado para esta función por ningún otro trifosfato, como ITP, UTP o GTP (Skou & Esmann 1992). La actividad de la enzima es dependiente de Mg^{2+}, y forma un intermediario fosforilado tipo acil fosfato, por lo cual se le conoce como una ATPasa tipo P. La subunidad α es la responsable de la formación del intermediario fosforilado en el ciclo catalítico de la enzima, el cual se encuentra hacia el lado citoplasmático (Skou & Esmann 1992).

A través del funcionamiento de la bomba, se mantiene un gradiente constante para Na^+ y para K^+, y esto es utilizado como fuente de energía para una serie de funciones, como la regulación de la composición iónica del citoplasma, el transporte transepitelial de sodio en riñones y sistema digestivo, la regulación del volumen

celular, transportes activos secundarios hacia el interior de la célula de importantes componentes como aminoácidos y glucosa en contra de sus gradientes de concentración y regulación del pH y del calcio intracelular, a través de la expulsión de protones y el ión calcio, en intercambio por el ión sodio que entra pasivamente a las células (Skou & Esmann, 1992).

En el año 1997, Segura y colaboradores encontraron que la actividad de la ATPasa de Na,K de riñón de rata, presenta oscilaciones diarias, las cuales siguen un ritmo cíclico menor a 20 horas, específicamente de 12 horas, por lo que se les clasifica como oscilaciones ultradianas. Esta variación en la actividad de la ATPasa de Na,K, se determinó con homogenizados de corteza renal de ratas sometidas a 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. Los máximos de actividad están dados a las 0900h y 2100h, mientras que los mínimos están a las 0300h y a las 1500h. En dicho estudio, se descartó la posibilidad de que las oscilaciones dependieran de cambios en el K_m del Na^+, del K^+ o del complejo Mg:ATP. También, se descartó que la oscilación estuviera relacionada con alteraciones en valores óptimos de pH o de temperatura para el funcionamiento de la enzima, o por cambios en el número de ATPasas en la célula (Galindo, 2001, Segura, *et al*, 2004). Por todo ello, se propuso que las mismas son debidas a variaciones en la velocidad de reciclaje de la enzima.

Asimismo, los mencionados estudios indicaron claramente que las oscilaciones de la actividad de la ATPasa de Na,K eran debidas a la presencia de un inhibidor sérico de dicha ATPasa (Segura, *et al* 2004). Las principales evidencias experimentales, que permitieron afirmar que las oscilaciones de la actividad ATPásica eran debidas a la presencia de un inhibidor son:

1. El factor inhibitorio pierde efecto con el tiempo, al ser almacenadas las muestras a -70°C. En otras palabras, la actividad ATPásica de Na,K de los valles (0300h y 1500h), con el almacenamiento a -70°C durante una semana, alcanza valores parecidos a los obtenidos en los picos (0900h y 2100h).

2. Dicho factor puede ser removido de las membranas mediante centrifugación o mediante preincubación de las membranas a 37°C, en ausencia o a bajas concentraciones de K^+.

3. El inhibidor se encuentra presente en el plasma de animales sacrificados a las 1500h y, para su unión a la membrana, es esencial la presencia del ión Mg^{2+} (Segura, *et al* 2004).

El hecho de que el factor inhibitorio responsable de las oscilaciones de la actividad ATPásica de Na,K, se encuentre circulando por el plasma a determinadas horas del día (Galindo, 2001), condujo a evaluar si la actividad ATPásica de Na,K en diversos tejidos, también presentaba las oscilaciones que se encontraron para la corteza renal. Para ello, se consideraron ciertos tejidos, como el hepático, cardíaco, intestinal y glóbulos rojos. Se encontró que el fenómeno descrito no está restringido a la corteza renal, sino que es capaz de afectar a diferentes órganos del cuerpo y, por ende, a procesos fisiológicos implicados con los mismos (Reyes, 2001). Todo este conocimiento, generó la necesidad de indagar sobre la naturaleza exacta del inhibidor de la ATPasa de Na, K.

Tomando en cuenta la cantidad de procesos en los que se encuentra vinculada la ATPasa de Na,K, resulta importante conocer la naturaleza del factor inhibitorio. Hasta ahora se han realizado una serie de pruebas experimentales que llevan al establecimiento de varias características generales, que pueden ayudar a la determinación de la naturaleza del inhibidor (Galindo, 2001, Reyes, 2001, Segura, *et al*, 2004):

1. El inhibidor no es una proteína.

2. No posee características de lípido.

3. Tiene un peso molecular menor a 1 kDa (filtración y diálisis).

4. El inhibidor puede ser parcialmente aislado. Para ello, el plasma de ratas de las 1500h se trata con un ácido débil, como lo es el ácido sulfosalicílico, lo cual precipita a las proteínas del plasma. El inhibidor permanece en la fracción ligera o sobrenadante, libre de proteínas plasmáticas. Esta fracción se puede someter a ultrafiltrado y diálisis con el fin de eliminar los componentes con pesos moleculares superiores a 1 kDa.

En la necesidad de dar respuesta exacta a la naturaleza del inhibidor, se ha indagado acerca de diversas sustancias que producen inhibición en la actividad de la ATPasa de Na,K, tales como la hormona paratiroidea, la dopamina y el factor natriurético atrial, estos agentes generan un efecto inhibitorio mediado por segundos mensajeros, y no por acción directa de las mismas sobre la ATPasa de Na,K (Goto, *et al*, 1992, Ominato, *et al*, 1996).

De igual manera, existen varios reportes sobre la existencia de un factor endógeno muy similar a la ouabaína, capaz de inhibir a la ATPasa de Na,K. Esta ouabaína endógena está implicada en una serie de procesos con relevancia fisiológica, y se ha demostrado que la corteza adrenal es la fuente principal de la misma, detectándose también en el hipotálamo, la hipófisis, así como en el corazón y en el riñón (Hamlyn, *et al*, 1989).

Por otra parte, se conoce que existen componentes circulantes en el organismo como son las monoaminas, los aminoácidos, péptidos e iones que pudiesen ser candidatos para asignar identidad al inhibidor. De hecho, en el plasma sanguíneo se encuentra una fracción importante de aminoácidos libres, que además han mostrado capacidad de inhibición de la actividad de la ATPasa de Na,K en diversos tejidos. Entre estos aminoácidos podemos mencionar: el ácido D,L-aspártico (Fedelesova, *et*

al, 1975), la fenilalanina (Bedin, *et al*, 2000), metionina y homocisteína (Streck, *et al*, 2002a), prolina (Pontes, *et al* 2001), Taurina e hipoTaurina (Mrsny & Meizel, 1985) y la tirosina (Venugopal & Ramakrishna, 2005).

De gran importancia han sido recientes estudios realizados en nuestro laboratorio, en los que se muestra que el ión cinc posee casi todas las características asociadas al inhibidor responsable de las variaciones ultradianas en la actividad ATPásica de Na,K (Andreotti, 2007). Sumado a esto, sobran antecedentes que muestran al cinc como un potente inhibidor de la actividad ATPásica de Na,K (Ribeiro, *et al*, 2002). A pesar de ser el ión cinc, por las propiedades mostradas, un candidato casi ideal para dar identidad al factor inhibitorio responsable del fenómeno en estudio, esta hipótesis posee dos importantes inconvenientes:

El primero de ellos es que se ha demostrado, empleando la técnica de espectrometría de absorción atómica, que las cantidades totales de cinc en plasma de ratas obtenido a las 0900 h y a las 1500 h no presentan una variación significativa (Andreotti, 2007). Este hallazgo es contradictorio con suposición lógica de que el factor inhibitorio en cuestión debe estar en máxima concentración cuando la actividad de la ATPasa de Na,K está en su mínimo, y en mínima concentración o inexistente cuando la actividad de dicha enzima presenta su máximo.

En segundo lugar, se sabe que la concentración de cinc libre intracelular se encuentra en el rango picomolar, es decir hay ínfimas cantidades de este ión en forma libre, pues la mayor parte se encuentra acomplejado a diferentes factores, por ejemplo a la proteína metalotioneina o, para glóbulos rojos específicamente, se sabe que gran parte del cinc puede ser encontrado asociado a la hemoglobina, de tal manera que la concentración libre de este ión en el eritrocito, está alrededor de los 24 pM (Hogstrand, *et al*, 1999). De la misma manera, gran parte del cinc del torrente sanguíneo se encuentra secuestrado, mayormente acomplejado a la albúmina, a la cual se une la mayor parte del cinc intercambiable o laxamente unido, a la α2 –

macroglobulina a la cual se une la mayor parte del cinc no intercambiable o fuertemente unido y también a aminoácidos como cisteína, histidina, glutamina o glicina (Giroux & Henkin, 1972).

Con base en todo este conocimiento, ~~nuestros~~ los esfuerzos en el presente trabajo de grado se dirigieron a la búsqueda de un factor o factores que interactúen o participen, con o sin el ión cinc, en la ocurrencia del fenómeno ultradiano que se encuentra en estudio.

CAPÍTULO III

METODOLOGÍA

1. Animales de experimentación

Los experimentos se realizaron con ratas machos de la cepa Sprague-Dawley, de 3 meses de edad, con un peso entre 250 y 350 g. En general, los animales eran sacrificados a las 0900h o a las 1500h.

2. Obtención de sangre de rata

Las ratas eran anestesiadas con 750 µl de pentotal sódico intraperitoneal. Luego, se les practicaba una incisión ventral media y se realizaba una punción en el ventrículo izquierdo con inyectadoras de 10 ml, previamente heparinizadas, siempre tratando de extrae la mayor cantidad posible de sangre. La sangre heparinizada se centrifugaba a 12000xg por 10 s a 4°C, con una centrífuga marca Sorvall RC-5B (rotor SS-34). Luego, se removía cuidadosamente el sobrenadante de cada tubo, lo que corresponde al plasma sanguíneo.

3. Preparación y homogenización de rebanadas de corteza renal de rata

Luego de extraída la sangre, se removieron los riñones a cada rata, se descapsularon y se colocaron a 4°C en la siguiente solución de resuspensión (mM): sacarosa, 250 mM; Tris-HCl (pH 7.2), 20 mM; ditiotreitol (DTT), 0,5 mM y fluoruro de fenil-metil-sulfónico (PMFS), 0,2 mM. 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 adicionaron tres volúmenes de la solución arriba indicada. Esta suspensión se homogenizó con ocho golpes, en un homogenizador de émbolo de teflón del tipo "Potter-Elvehjem", a 2.500 rpm. De esta forma, se prepararon 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 gasa.

4. Precipitación ácida, ultrafiltración y diálisis del plasma sanguíneo

El plasma sanguíneo obtenido era sometido a un proceso de separación y extracción ácida. 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 centrifugó durante 15 min a 48.000xg. El sobrenadante se llevó a pH 7,4 con Tris-OH 1 M. Una parte del material resultante, que corresponde al extracto ácido, se conservó a –70°C para preincubaciones con homogenizados de riñón de rata. La parte restante del extracto ácido, fue sometida a un proceso de ultrafiltración.

Muestras de extracto ácido de plasma sanguíneo de rata, obtenidas a las 1500h, fueron sometidas a un proceso de ultrafiltración con filtros Centriplus (Amicon, Millipore Co., Belford, USA.). Para ello los filtros con el plasma se centrifugaron a 3.000xg por 2 horas a 4°C. Se usó una serie de filtros de corte de 50, 30 y 3 kDa, con los cuales se obtenían fracciones que eran colectadas y almacenadas a –70°C hasta el momento de ser usadas para las preincubaciones. La fracción 3 kDa, luego se pasó por un filtro de diálisis con un punto de corte molecular de 1 kDa. La diálisis se realizó contra agua destilada y el producto dializado se liofilizó y se resuspendió en solución salina de 150 mM NaCl y 10 mM Tris-HCl pH 7.2 a 0°C, con un volumen final similar al del plasma original extraído.

5. Determinación de aminoácidos en las fracciones de plasma sanguíneo de ratas machos a las 0900h y 1500h

5.1. Estándares de aminoácidos

Se prepararon soluciones madre de cada uno de los aminoácidos en concentraciones de 1 mg/ml o 0,5 mg/ml, dependiendo del aminoácido. Luego, se colectaron diferentes volúmenes de aminoácidos que van desde 2 µl a 20 µl en un recipiente hasta llegar a un volumen determinado, que se completa hasta 1 ml con buffer borato. Luego, del volumen de 1 ml se tomaron 50 µl y se combinaron con 150 µl de buffer borato y se añadió, finalmente, 200 µl de mezcla de reacción. La mezcla de reacción contiene o-phtalaldehído (OPA) que se debe proteger muy bien de la humedad y de la luz, pues se oxida con facilidad, este agente fue diluido en metanol y se le agregó además un agente antioxidante, el β-mercaptoetanol. Todo esto se mezcla para un volumen final de 400 µl. De los 400 µl se toman 20 µl que fue el volumen a inyectar. Para poder lograr la separación adecuada de los picos de cada uno de los aminoácidos, se aplicó un gradiente en el que se usaron diferentes proporciones de diferentes solventes.

5.2. Sistemas de gradientes de elución para aminoácidos

Cuando se analizan muestras complejas en los que los componentes de interés cubren un amplio rango de retención, como es el caso de la detección de aminoácidos libres en plasma, es necesario modificar las condiciones de elución durante el análisis, para asegurar una resolución suficiente de los primeros componentes eluidos y mantener el tiempo de análisis dentro de un límite razonable. Esto se logra normalmente, mediante un cambio de la composición del eluente, incrementando la fuerza eluotrópica con el tiempo. Los sistemas de gradiente de elución pueden ser clasificados en dos grupos: sistemas de baja y de alta presión. En el primer grupo, los componentes del eluente fueron mezclados en proporciones que varían con el tiempo,

a baja presión, y la mezcla era entonces bombeada a alta presión hacia la columna. En el segundo grupo, los componentes de la mezcla de composición fija fueron bombeados por bombas separadas y luego mezclados, a alta presión, en una relación que variaba con el tiempo (Engelhardt 2004).

5.3. Procedimiento y técnica

La técnica de separación que se usó es la cromatografía líquida de alta resolución. Se usaron columnas de fase reversa (HPLC de fase reversa), en los que grupos alkilsilanos están químicamente unidos a la sílica, específicamente a grupos octadectil (C-18). La fase móvil que se utilizó es el acetonitrilo, construyendo gradientes en combinación con un buffer acuoso. Según esta característica y, como regla general, los compuestos más polares (los más rechazados por la fase estacionaria) eluyen primero y, los compuestos no polares (los menos rechazados por la fase estacionaria), eluyen de último. Antes de realizar los análisis de las muestras en el equipo, se pasó un estándar que contenía cantidades conocidas de cada uno de los aminoácidos en los que se tiene interés. Los tiempos de retención y las áreas de los picos que se obtienen como resultado, nos sirvieron para luego identificar (comparando los tiempos de retención) y cuantificar (comparando las áreas de los mencionados picos) cada uno de los compuestos a separar en las muestras que se han pasado en las cromatografías. En el caso del extracto ácido, el mismo se pasó por el HPLC sin ninguna dilución adicional.

6. Preincubaciones de los homogenizados de corteza renal con las distintas fracciones evaluadas para determinar su efecto sobre la actividad de la ATPasa de Na,K.

Las preincubaciones que se realizaron seguían un mismo patrón, cuidando de cambiar, en cada caso, los elementos a preincubar y sus cantidades. Las distintas preparaciones eran entonces incubadas con los homogenizados y, finalmente, éstos

eran ensayados para actividad ATPásica de Na,K. Se siguió la pauta de incubar los homogenizados con concentraciones fisiológicas de las distintas sustancias, bien solas o bien previamente acomplejadas con el ión cinc. En general, estas preincubaciones se realizaban de la siguiente manera:

6.1. Preincubaciones de diferentes aminoácidos con las preparaciones de membranas:

Se preparaban los aminoácidos de tal modo que, para las preincubaciones con los homogenizados, quedaran a sus concentraciones fisiológicas encontradas en plasma a las 1500h: 274,6 μM Arginina, 95,2 μM Asparagina, 500,2 μM Taurina y 42,3 μM Valina. Se preincubaban 200 μl de homogenizado de corteza renal de ratas sacrificadas a las 0900h u otro tejido, con 200 μl de solución de resuspensión en la que estaba disuelto el aminoácido a ensayar, y se añadía $MgCl_2$, para que quedara a una concentración final de 5 mM. Estas preincubaciones se realizaban a 37°C por 30 minutos. Después de las preincubaciones, los homogenizados eran ensayados para actividad de la ATPasa de Na,K.

6.2. Preincubaciones de complejos aminoácidos-cinc con las preparaciones de membranas

Cada uno de los aminoácidos a estudiar, se mezclaba con 2 mg/l de cinc (concentración final) y se incubaban por 15 min a 37°C. Luego, se añadía suficiente medio de resuspensión, con el fin de diluir el cinc y llevarlo a valores muy bajos de cinc libre. A continuación, se preincubaban 200 μl de homogenizado de corteza renal de ratas sacrificadas a las 0900h u otro tejido, con 200 μl de solución de resuspensión en la que estaba disuelto el complejo aminoácido-cinc, de manera que, luego de las diluciones, quedasen durante la preincubación con los homogenizados, las diferentes concentraciones fisiológicas encontradas en plasma de las 1500h: 274,6 μM Arginina, 95,2 μM Asparagina, 500,2 μM Taurina y 42,3 μM Valina. Esta preincubación se

realizó en presencia de 5 mM $MgCl_2$ (concentración final) y la misma se hizo por 30 min a 37°C. Luego, los homogenizados eran ensayados para actividad de la ATPasa de Na,K. Siguiendo este patrón general, se probaron las siguientes condiciones:

- *Incubaciones de homogenizados de corteza renal de las 0900h a las concentraciones de Taurina de las 0900h y las 1500h, previamente acomplejadas con cinc.*

- *Preincubaciones de homogenizados de corteza renal de rata de las 0900h a las concentraciones de Taurina de las 0900h y las 1500h, acomplejadas con concentraciones de 1, 2, 4 y 8 mg/l de cinc.*

- *Preincubaciones de homogenizados de corteza renal de ratas sacrificadas a las 0900h con distintas concentraciones de Taurina, previamente acomplejadas con cinc.*

- *Preincubación de homogenizados de corteza renal de rata de las 0900h con el complejo Taurina-cinc en ausencia y presencia de magnesio.*

- *Preincubación con el complejo Taurina-cinc de homogenizados de distintos tejidos y membranas de glóbulos rojos de ratas de las 0900h.*

7. 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, U.S.A). 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, 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. A cada tubo se le añaden 200 µl del reactivo, se agitan y, se dejan a temperatura ambiente durante 5 min. Luego, se transfieren 400 µl de cada tubo a una placa de Elisa de 96 pozos y se lee la absorbancia en un lector de Elisa Tecan a 595 nm. La densidad óptica es lineal entre 0,07 mg/ml y 2,7 mg/ml de proteínas.

8. Determinación de la actividad de la ATPasa de Na,K en homogenizados de corteza renal de rata

Se realizó la determinación de la actividad ATPasa de Na,K siguiendo el método descrito por Proverbio y col. (Proverbio & del Castillo, 1981) y la medición del fosfato inorgánico liberado durante la reacción, siguiendo el método descrito por Marín y col. (Marín, *et al*, 1986). El medio de ensayo constaba de 180 µl de medio de incubación y 20 µl de la suspensión de membranas (con una concentración de proteínas de 0,2 – 0,5 mg/ml), para obtener un volumen final de 200 µl. Los medios contenían:

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 contiene (%): 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 contenía (%): 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 transferir 400 µl de cada tubo de ensayo a una placa de Elisa de 96 pozos y se leyó la absorbancia en un lector de Elisa Tecan a 705 nm. La actividad ATPásica se expresó 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 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 estimulada por Na^+ y K^+, y sensible a ouabaína.

9. Análisis estadístico

Todos los ensayos se realizaron por cuadruplicado para cada muestra. Cada "n" representa una muestra diferente. Los resultados se expresaron 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*-Student.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS

1. Ritmo ultradiano de la actividad de la ATPasa de Na, K

Según mencionado en la Introducción, Segura y col. (Segura, *et al*, 2004) demostraron que la actividad de la ATPasa de Na,K de riñón de rata variaba a lo largo del día, siguiendo un ritmo ultradiano, según se puede constatar en la Figura 1. En las 24 horas del día, se definen dos ciclos en la actividad de la enzima, con picos a las 0900h y a las 2100h, y valles: a las 1500h y a las 0300h.

2. Características conocidas del factor inhibitorio responsable de las oscilaciones ultradianas de la actividad ATPásica de Na,K

En su trabajo original, Segura y col. (Segura, *et al*,2004) demostraron que el proceso inhibitorio es debido a la presencia de un inhibidor circulante en el plasma sanguíneo del animal, capaz de producir su efecto en plasma de las 15 horas, más no en el de las 9 horas. Gracias al trabajo de Galindo (Galindo, 2001), Reyes (Reyes, 2001) y Segura (Segura, *et al*, 2004), se conocen actualmente una serie de características respecto al inhibidor, a su comportamiento y a su efecto, un resumen de las cuales se muestran en la Tabla 1. Estos resultados, sin embargo, no arrojan idea alguna de cuál pudiera ser el inhibidor responsable del fenómeno.

En el primer intento para tratar de identificar al inhibidor, realizado por Andreotti (Andreotti, 2007), encontraron un elemento, el ión cinc, que presenta un modo de inhibición de la actividad de la ATPasa de Na,K muy parecido al presentado

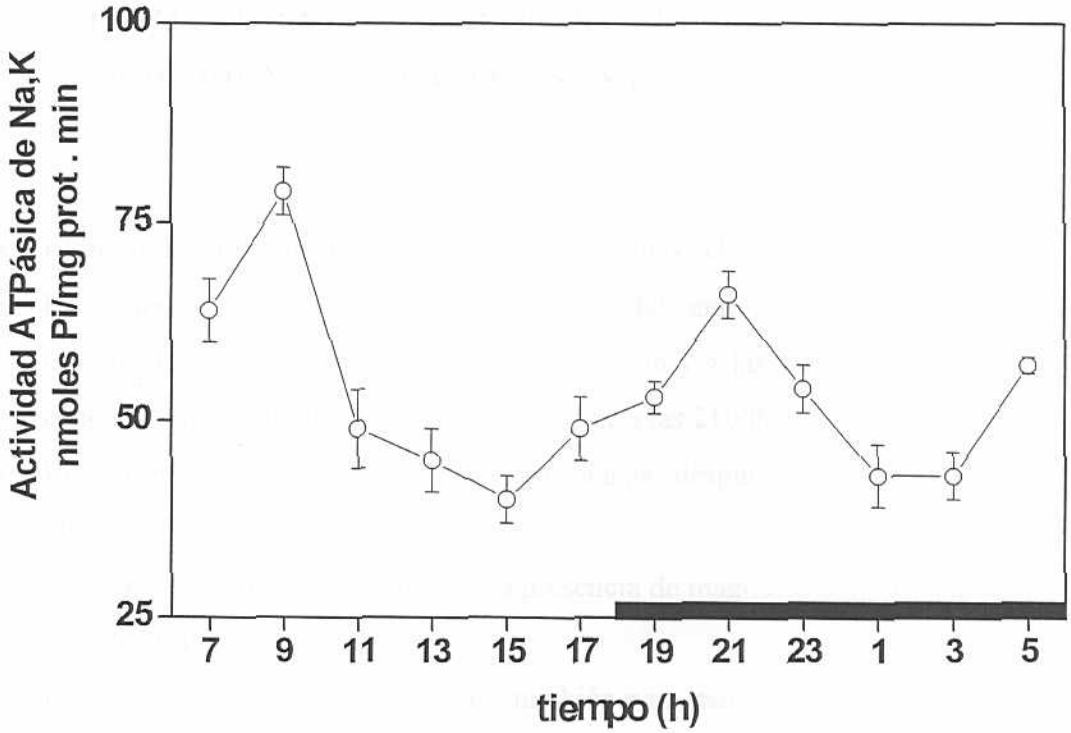

FIGURA 1

Curso temporal de la 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 ± el error estándar, para n= 6.
Tomado de Segura y col. (Segura, *et al*, 2004).

TABLA 1

ALGUNAS CARACTERÍSTICAS DEL INHIBIDOR, PRESENTE EN PLASMA SANGUÍNEO DE RATA, RESPONSABLE DE LAS OSCILACIONES ULTRADIANAS DE LA ATPasa DE Na,K

- El inhibidor se encuentra pegado a las membranas celulares.
- El inhibidor se encuentra en el plasma del animal, a concentraciones inhibitorias de la ATPasa de Na,K a las 0300h y a las 1500h y ausente o a concentraciones no inhibitorias a las 0900h y a las 2100h.
- El inhibidor se despega de las membranas después de varios días de preparación, aún almacenado a -70°C..
- "*In vitro*", el inhibidor requiere de la presencia de magnesio para pegarse a las membranas.
- El fenómeno inhibitorio se produce también para membranas de otros tejidos de la rata. Específicamente, para corazón, hígado, intestino, asta dorsal de la médula, y glóbulos rojos.
- El inhibidor puede también ser despegado de las membranas por centrifugación de las mismas.
- No es una proteína (20% ácido sulfosalicílico)
- No muestra características lipídicas (Folch)
- Peso molecular menor de 1 KDa (filtración y diálisis)

Tomado de (Galindo 2001; Reyes 2001; Segura, *et al* 2004).

por el inhibidor natural. Sin embargo no pudieron identificarlo como tal, ante la imposibilidad de explicar como podía el cinc ser el responsable de la ritmicidad de la actividad enzimática, si las cantidades totales de cinc circulante en plasma eran prácticamente iguales a las 0900h y a las 1500h.

Las características de la interacción membrana – cinc, comparadas con las de la interacción membrana – inhibidor natural, se muestran en la Tabla 2 (Andreotti 2007). Es evidente que el cinc se comporta, en la mayoría de los aspectos estudiados, de la misma manera que el inhibidor natural. Sin embargo, la constancia de su presencia en el plasma lleva a concluir que o bien el cinc, a pesar de las similitudes, no es el inhibidor que andamos buscando, o que no actúa solo sino en combinación con alguna otra sustancia, cuyas concentraciones si variaran de tal modo que pudieran ocasionar las oscilaciones ultradianas de la actividad de la enzima.

3. Actividad de la ATPasa de Na,K de corteza renal a las 0900h y a las 1500h

Para formarnos una idea más clara sobre lo que andamos trabajando, en la Tabla 3 se muestra la actividad de la ATPasa de Na,K de homogenizados de corteza renal de ratas sacrificadas a las 0900h o a las 1500h. Nótese que, como ya mostrado en la Figura 1, la actividad de la ATPasa de Na,K de las 1500h presenta una inhibición de alrededor del 30 % con respecto a la actividad de las preparaciones de las 0900h.

4. Búsqueda del posible factor inhibitorio responsable de las oscilaciones ultradianas de la actividad ATPásica de Na,K

El hecho de que, como se muestra en la Tabla 1, el inhibidor natural no parece ser una proteína y no tiene carácter lipídico, nos llevó a fijar nuestra atención en algún componente del plasma sanguíneo que no fuese ni lípido ni proteína y que estuviese en mayor concentración en el plasma de las 1500h que en el de las 0900h,

TABLA 2

CARACTERÍSTICAS DEL INHIBIDOR NATURAL Y DEL IÓN CINC, RESPECTO A SU INTERACCIÓN CON MEMBRANAS DE CORTEZA RENAL DE RATA Y A SUS EFECTOS SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA ATPasa DE Na,K DE LAS MISMAS

CARACTERÍSTICA	INHIBIDOR NATURAL	CINC
Es capaz de mantenerse unido a las membranas	√	√
Se desprende de las membranas con el tiempo	√	√
Se desprende por centrifugación	√	√
Requiere magnesio para unirse a la membrana	√	√
Actúa sobre tejido renal, corazón, hígado, intestino, glóbulos rojos	√	√
No es una proteína	√	√
No tiene carácter lipídico	√	√
Peso Molecular menor de 1 kDa	√	√
Presencia en plasma de las 1500h y no en plasma de las 0900h (o eficiencia disminuida a esa hora)	√	?

Tomado de (Andreotti, 2007, Galindo, 2001, Reyes, 2001, Segura, *et al*, 2004).

TABLA 3

ACTIVIDAD ATPásica DE Na,K DE HOMOGENIZADOS DE REBANADAS DE CORTEZA RENAL DE RATA OBTENIDAS A LAS 0900h Y 1500h

Muestra	Actividad ATPásica de Na,K nmoles Pi / mg prot . min	p
0900h	78 ± 4	
1500h	51 ± 3	< 0,001

La actividad de la ATPasa de Na,K fue medida según lo indicado en Materiales y Métodos. Valores expresados como la media ± E.S para n = 6.

como posible candidato a realizar esa función. En este particular, Reyes (comunicación personal[1]) evaluó la posible oscilación de las distintas monoaminas presentes en el plasma sanguíneo de la rata. Este estudio resultó ser negativo, ya que Reyes no encontró ninguna monoamina que presentase una mayor concentración a las 1500h que a las 0900h (datos no mostrados). Pasamos nuestra atención entonces a los aminoácidos circulantes en plasma, determinando las concentraciones de los mismos en sangre tomada de ratas a las 0900h, y a las 1500h, utilizándose para ello técnicas de cromatografía líquida de alta presión (HPLC). De todos los aminoácidos evaluados, sólo cuatro mostraron un patrón de oscilación semejante al observado por el inhibidor de la ATPasa de Na,K, es decir, aumenta su concentración en el plasma de las 1500h con respecto al plasma de las 0900h. Estos aminoácidos fueron: Arginina (ARG), Asparagina (ASP), Taurina (TAU) y Valina (VAL). Los resultados de las determinaciones de estos aminoácidos se muestran en la Figura 2. A diferencia de las monoaminas (Reyes, comunicación personal) e, independientemente del rango de concentración que alcanzan estos aminoácidos en el plasma de los animales, presentan concentraciones con valores estadísticamente mayores a las 1500h que a las 0900h. Este hallazgo abrió de nuevo el camino que bien pudiera llevarnos a la identificación del inhibidor natural responsable de las oscilaciones ultradianas de la actividad de la ATPasa de Na,K.

5. Efecto de la preincubación con los aminoácidos Arginina, Asparagina, Taurina y Valina sobre la actividad ATPásica de Na,K de homogenizados de corteza renal de rata.

En primer lugar, se decidió estudiar la posibilidad de que alguno de estos aminoácidos fuese el inhibidor responsable de las oscilaciones ultradianas de la actividad de la ATPasa de Na,K de nuestras preparaciones. Para aclarar este punto, se preincubaron homogenizados de corteza renal de rata, obtenidos a las 0900h, con

[1] Addis Andrés Reyes es Estudiante Graduado de Doctorado de Fisiología y Biofísica del IVIC.

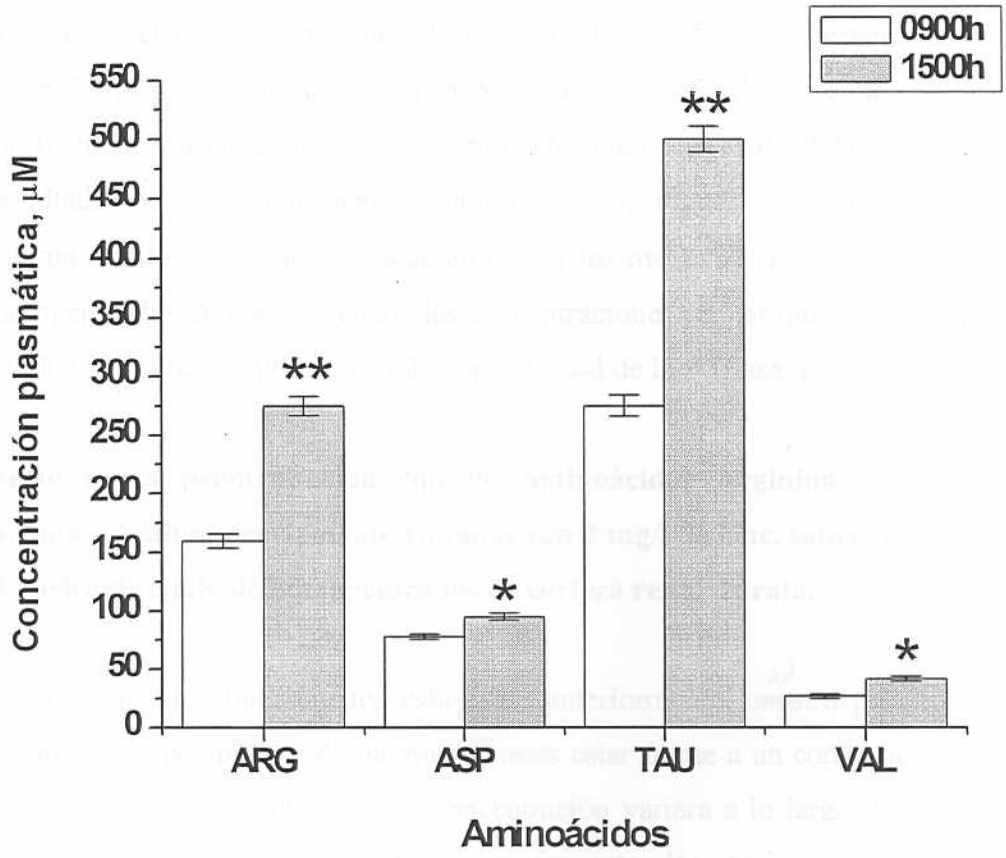

FIGURA 2

Concentraciones de Arginina (ARG), Asparagina (ASP), Taurina (TAU) y Valina (VAL) en plasma de ratas obtenido a las 0900h y a las 1500h. Los valores corresponden a la media ± el error estándar para 3 determinaciones con animales diferentes.

* $p < 0{,}01$ vs 0900h

** $p < 0{,}001$ vs 0900h

Arginina, Asparagina, Taurina y Valina, utilizando concentraciones similares a las encontradas en el plasma sanguíneo de las ratas de las 1500h. Específicamente, se utilizaron 274,6 μM Arginina, 95,2 μM Asparagina, 500,2 μM Taurina y 42,3 μM Valina. Luego, los homogenizados eran ensayados para actividad ATPásica de Na,K. Los resultados de este experimento se presentan en la Figura 3. Se puede observar, que ninguno de los aminoácidos estudiados, por los menos al ser preincubados con los homogenizados de corteza renal a las concentraciones séricas que se encuentran a las 1500h, causó efecto inhibitorio sobre la actividad de la ATPasa de Na,K.

6. Efecto de la preincubación con los aminoácidos Arginina, Asparagina, Taurina y Valina, previamente tratados con 2 mg/l de cinc, sobre la actividad ATPásica de Na,K de homogenizados de corteza renal de rata.

Siguiendo los lineamientos esbozados anteriormente, nuestro próximo paso fue el estudiar la posibilidad de que pudiéramos estar frente a un complejo formado por el ión cinc y una sustancia cuya concentración variara a lo largo del día. Para estudiar esta posibilidad, se trataron previamente los aminoácidos Arginina, Asparigina, Taurina y Valina, con 2 mg/l de $ZnCl_2$ (concentración final). Esta mezcla se mantuvo a 37°C por 15 min. Luego, la mezcla era diluida y utilizada para preincubar homogenizados de corteza renal de rata obtenidos a las 0900h, de tal modo que en dicha preincubación quedaran las concentraciones de los aminoácidos presentes en el plasma del animal a las 1500h, con muy bajas concentraciones de cinc libre. Estas preincubaciones se hicieron en presencia de 5 mM $MgCl_2$. Los controles fueron tratados de la misma manera, pero sin los aminoácidos. Los homogenizados eran entonces ensayados para actividad ATPásica de Na,K. Los resultados de este experimento, se muestran en la Figura 4. Interesantemente, de los cuatro aminoácidos probados, la preincubación de los homogenizados con la mezcla Taurina-Cinc, produjo esta vez un efecto inhibitorio, estadísticamente significativo, en la actividad de la ATPasa de Na,K. Estos resultados pueden ser interpretados considerando que el complejo Taurina-Cinc pueda ser el inhibidor natural buscado, responsable de las

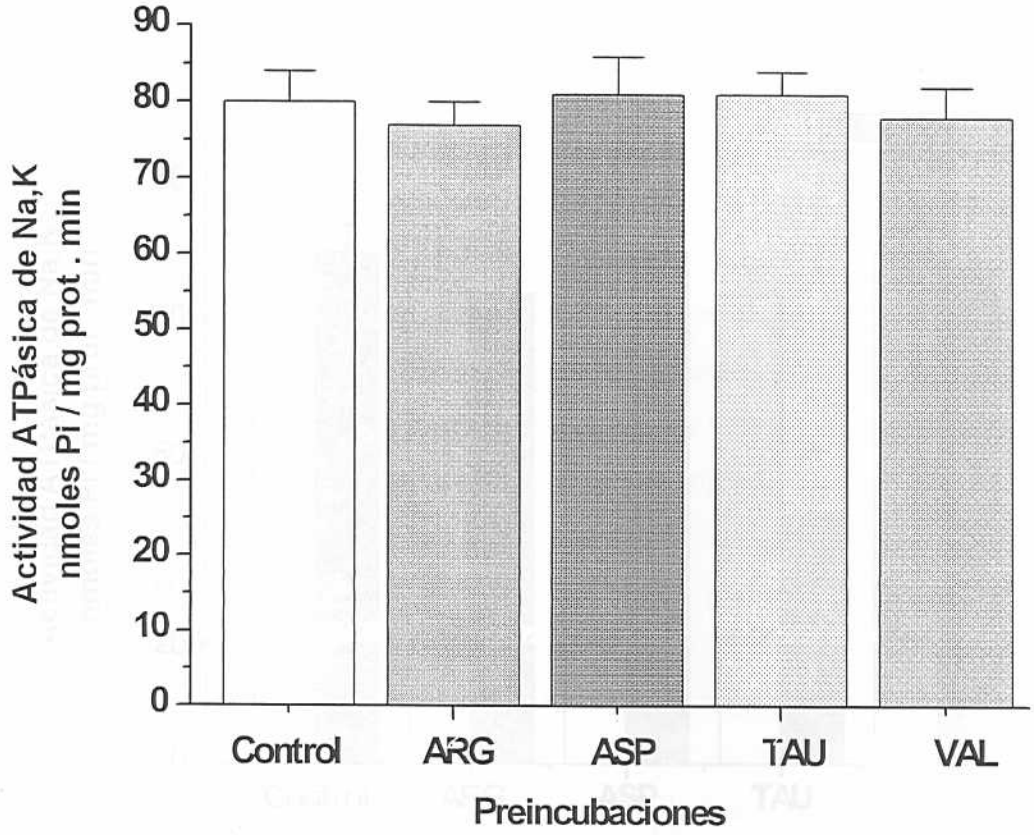

FIGURA 3

Efecto de la preincubación de homogenizados de corteza renal de ratas, sacrificadas a las 0900h, con 274,6 μM Arginina, 95,2 μM Asparagina, 500,2 μM Taurina y 42,3 μM Valina, sobre la actividad de la ATPasa de Na,K de los mismos. Las preincubaciones de los homogenizados fueron realizadas según indicado en Materiales y Métodos. Los valores corresponden a la media ± el error estándar, para 6 determinaciones con animales diferentes

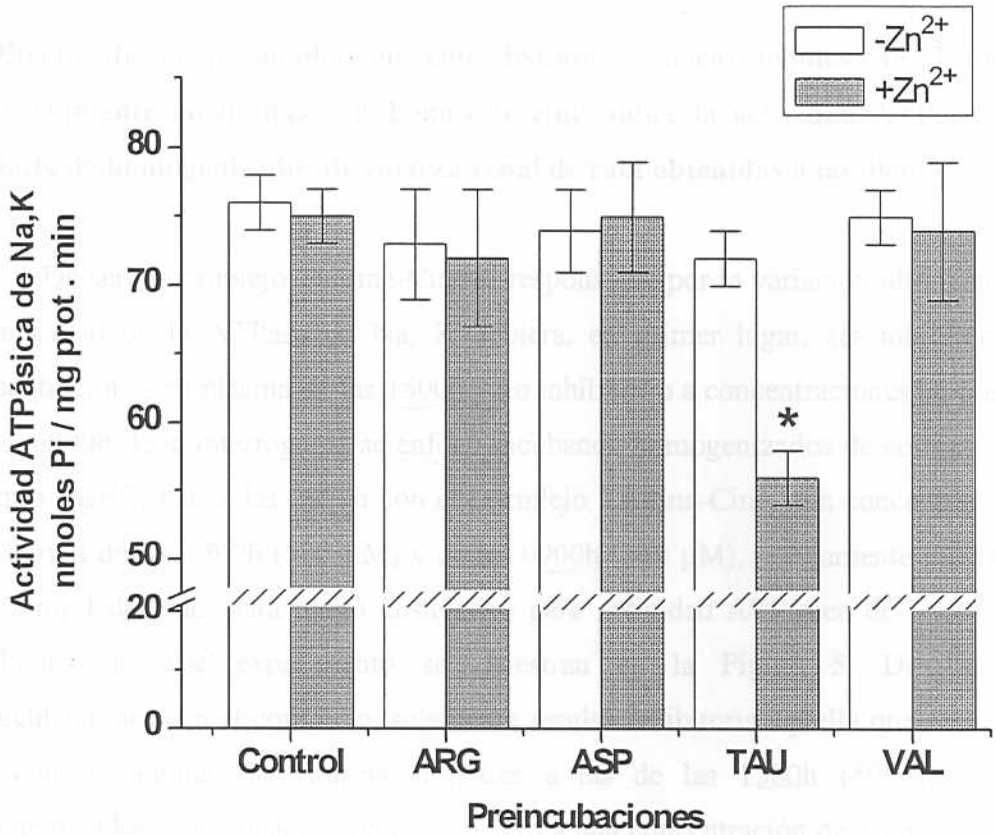

FIGURA 4

Efecto de la preincubación de homogenizados de corteza renal de ratas sacrificadas a las 0900h con complejos Aminoácidos–Cinc, sobre la actividad de la ATPasa de Na,K de los mismos. Todas las preincubaciones de los homogenizados fueron realizadas según indicado en Materiales y Métodos. Los valores corresponden a la media ± el error estándar para 6 determinaciones con animales diferentes.
* $p < 0,005$ con respecto a todas las demás condiciones, las cuales son iguales entre sí.

oscilaciones ultradianas de la actividad de la ATPasa de Na,K de corteza renal. Para ello, es necesario demostrar que su inhibición presenta las mismas características que la producida por el inhibidor natural, incluyendo las oscilaciones ultradianas.

7. Efecto de la preincubación con distintas concentraciones de Taurina, previamente incubadas con 2 mg/l de cinc, sobre la actividad ATPásica de Na,K de homogenizados de corteza renal de rata obtenidas a las 0900h

De ser el complejo Taurina-Cinc el responsable por la variación ultradiana de la actividad de la ATPasa de Na, K debiera, en primer lugar, ser inhibitorio a concentraciones en plasma de las 1500h y no inhibitorio a concentraciones en plasma de las 0900h. Esta interrogante se enfocó incubando homogenizados de corteza renal de ratas sacrificadas a las 0900h con el complejo Taurina-Cinc, con concentraciones de Taurina de las 1500h (500 μM) y de las 0900h (300 μM), previamente incubadas con 2 mg/l de cinc, para luego ensayarlos para actividad ATPásica de Na,K. Los resultados de este experimento se muestran en la Figura 5. De las dos preincubaciones con el complejo, solamente resultó inhibitoria aquella que se realizó con concentraciones de Taurina similares a las de las 1500h (500 μM). Los homogenizados preincubados con el complejo a una concentración de Taurina igual a la del plasma de las 0900h (300 μM) no produjo inhibición alguna, siendo la actividad de la ATPasa de Na,K de los mismos igual a la de las muestras control.

En otros experimentos, se determinó el efecto de distintas concentraciones de cinc, a concentraciones altas o bajas de Taurina, sobre la inhibición de la actividad ATPásica de Na,K. Para ello, se estudió la actividad ATPásica de Na,K de homogenizados de corteza renal de ratas sacrificadas a las 0900h y preincubadas con concentraciones 300 y 500 μM de Taurina, previamente tratadas con concentraciones de 1, 2, 4 y 8 mg/l de cinc. Los resultados de este experimento, se presentan en la Figura 6. Ninguna de las concentraciones de cinc utilizadas para acomplejar la

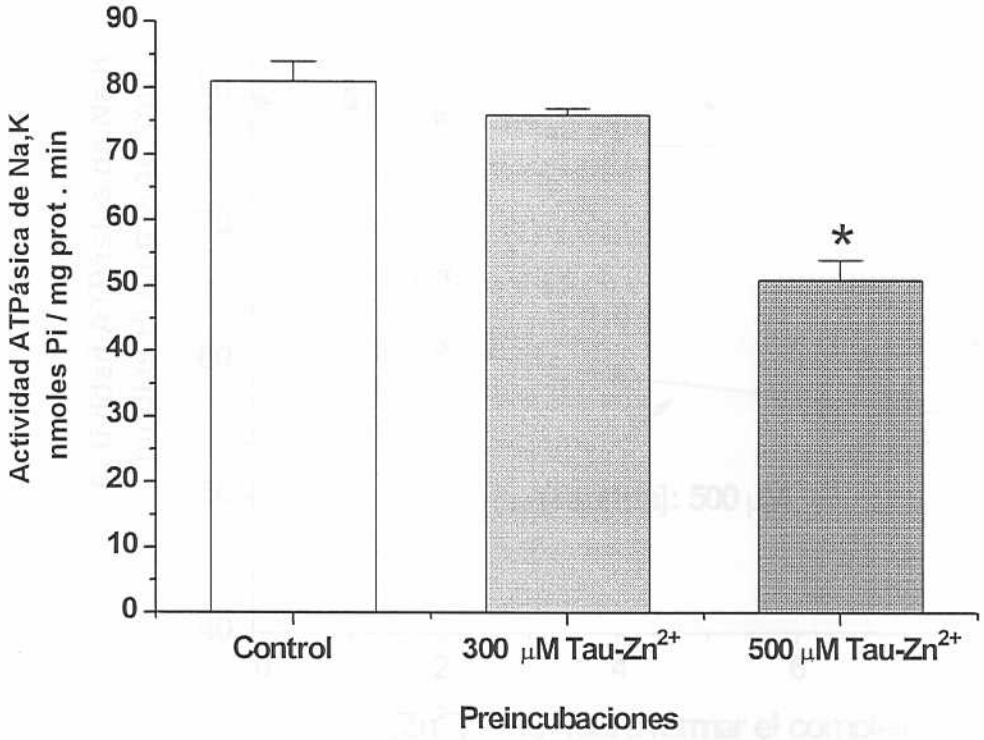

FIGURA 5

Efecto de la preincubación de homogenizados de corteza renal de ratas sacrificadas a las 0900h con 300 μM o 500 μM Taurina, previamente acomplejada con cinc, sobre la actividad de la ATPasa de Na,K de los homogenizados de corteza renal. Las preincubaciones se realizaron en presencia de 5 mM $MgCl_2$. Los valores corresponden a la media ± el error estándar para 6 determinaciones con animales diferentes.

* $p < 0,001$ con respecto a las otras dos condiciones, las cuales son iguales entre sí.

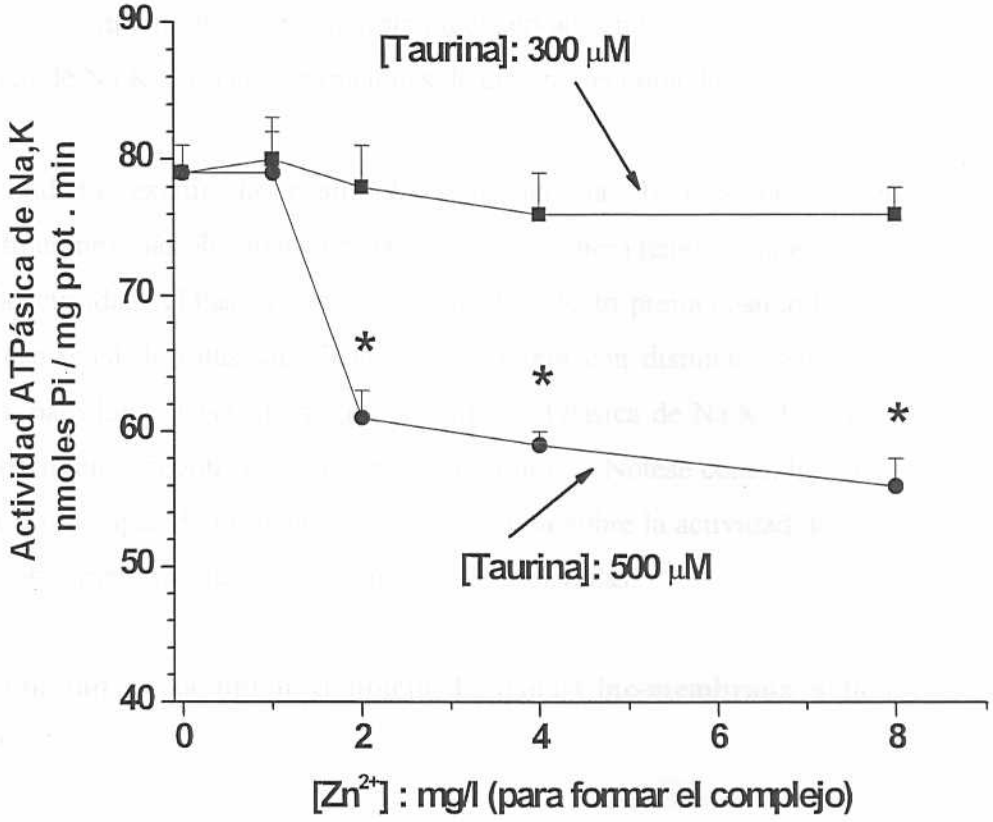

FIGURA 6

Efecto de preincubaciones de homogenizados de corteza renal de ratas sacrificadas a las 0900h con concentraciones 300 y 500 μM de Taurina, acomplejada previamente con distintas concentraciones de 1, 2, 4 y 8 mg/l de cinc, sobre la actividad de la ATPasa de Na,K de los mismos. Las preincubaciones se realizaron como indicado en Materiales y Métodos. Los valores corresponden a la media ± el error estándar para 6 determinaciones con animales diferentes

* $p < 0{,}001$ con respecto a preincubaciones en presencia de 300 μM Taurina.

Taurina, cuando ésta se encontraba a 300 μM, fue capaz de ejercer efecto inhibitorio alguno sobre la actividad de la ATPasa de Na,K. En cambio, en presencia de 500 μM Taurina, el complejo produce la inhibición observada en la Figura 4 sobre la actividad ATPásica de Na,K, para concentraciones de cinc por encima de 1 mg/l.

Pudiera existir la posibilidad de que la Taurina por sí misma, a concentraciones más elevadas que las probadas, pudiera tener algún efecto inhibitorio sobre la actividad ATPásica. Esta pregunta se contestó preincubando homogenizados de corteza renal de ratas sacrificadas a las 0900h con distintas concentraciones de Taurina, para luego ensayarlos para actividad ATPásica de Na,K. Los resultados de este experimento, según se puede ver en la Figura 7. Nótese como, la Taurina, por si misma, no es capaz de producir inhibición alguna sobre la actividad de la ATPasa de Na,K, por lo menos hasta las concentraciones ensayadas.

8. Estabilidad de la unión complejo Taurina-Cinc-membrana a lo largo del tiempo

Una de las características de la unión del inhibidor con la membrana celular encontrada por Segura y colaboradores (Segura, *et al*, 2004), y de la unión cinc – membrana encontrada por Andreotti (Andreotti, 2007), es que aún cuando las preparaciones de membranas celulares sean mantenidas a -70°C, el inhibidor se separa de las mismas, de tal modo que después de algunos días de preparación del tejido de las 0300h, la actividad de la ATPasa de Na,K del mismo pasaba a valores normales, parecidos a los de la actividad de la ATPasa de membranas preparadas a las 0900h. Este mismo experimento se realizó, preincubando los homogenizados de corteza renal de rata sacrificadas a las 0900h con el complejo Taurina–Cinc, y ensayándolos diariamente para actividad ATPásica de Na,K. Los resultados de estos experimentos se muestran en la Figura 8. Resulta claro que la actividad de la ATPasa de Na,K permanece constante para la muestra control, mientras que para aquella preincubada con el complejo Taurina–Cinc (utilizando 500 μM Taurina y 2 mg/l de

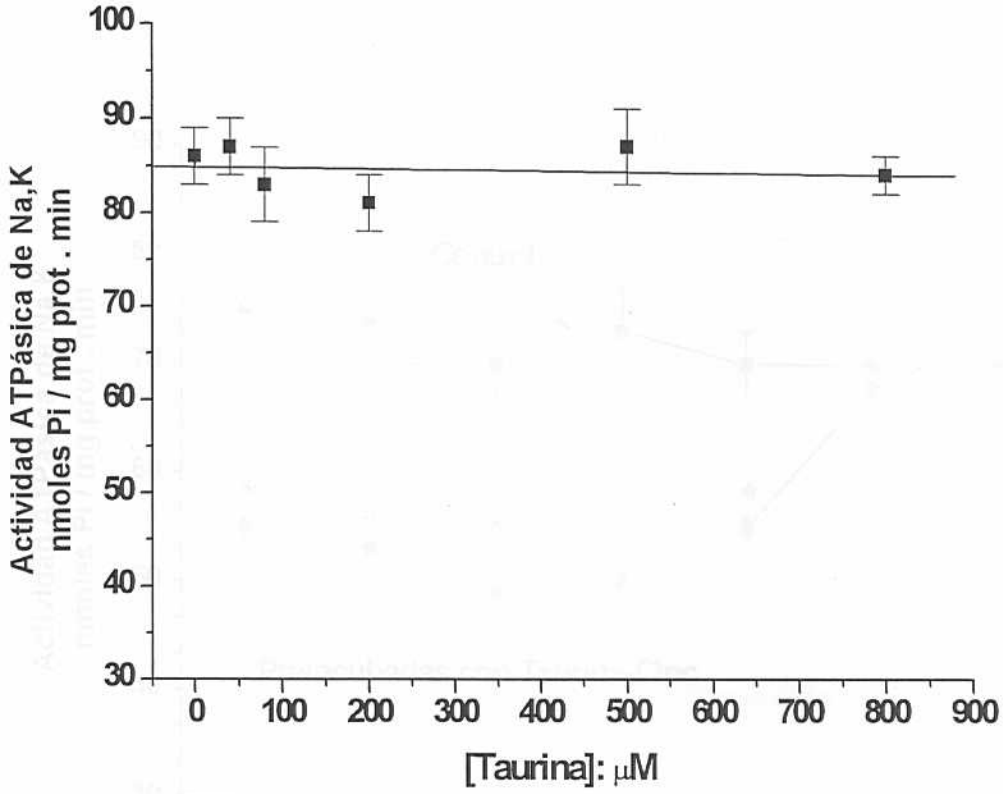

FIGURA 7

Efecto de preincubaciones de homogenizados de corteza renal de ratas sacrificadas a las 0900h con distintas concentraciones de Taurina sobre la actividad de la ATPasa de Na,K de los mismos. Las preincubaciones se realizaron como indicado en Materiales y Métodos. Los valores corresponden a la media ± el error estándar para 6 determinaciones con animales diferentes. La pendiente de la recta no es estadísticamente distinta de cero.

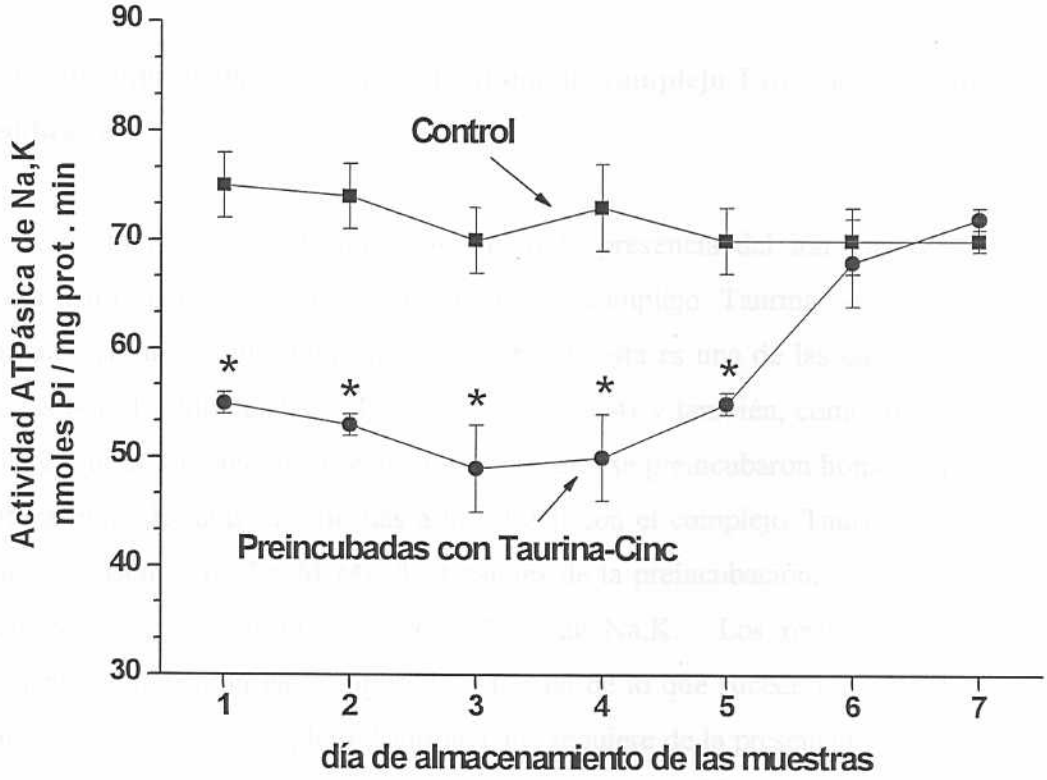

FIGURA 8

Efecto del tiempo de almacenamiento de los homogenizados de corteza renal de rata sacrificadas a las 0900h y preincubados con el complejo Taurina–Cinc (500 μM Taurina y 2 mg/l de cinc) sobre la actividad ATPásica de Na,K de dichos homogenizados. Las preincubaciones se realizaron como indicado en Materiales y Métodos. Los valores corresponden a la media ± el error estándar para 6 determinaciones con animales diferentes

* $p < 0{,}001$ con respecto al control.

cinc) y luego almacenada a -70°C, la actividad va aumentando con el tiempo de preparación, llegando a alcanzar valores similares a las preparaciones de las 0900 h, después de 6 días de preparación. Estos resultados nos permiten concluir, sin lugar a dudas, que la estabilidad del complejo Taurina - cinc con las membranas, en función del tiempo de unión, se comporta de la misma manera que lo hace el ión cinc y el inhibidor natural de la actividad de la ATPasa de Na,K de las mismas.

9. Requerimiento del ión Mg^{2+}, para la unión del complejo Taurina-Cinc con las membranas

A continuación, se decidió estudiar si la presencia del ión magnesio era necesaria para que se produzca la unión del complejo Taurina -cinc con las membranas, ya que, como indicado en la Tabla 1, ésta es una de las características mostradas por el inhibidor natural (Segura, *et al*, 2004) y también, como indicado en la Tabla 2, por el ión cinc. Para realizar este estudio, se preincubaron homogenizados de corteza renal de ratas sacrificadas a las 0900h con el complejo Taurina–Cinc, en presencia o ausencia de 5 mM $MgCl_2$. Después de la preincubación, las membranas eran ensayadas para actividad de la ATPasa de Na,K. Los resultados de este experimento se muestran en la Figura 9. Al igual de lo que sucede con el inhibidor natural y con el cinc, el complejo Taurina–Cinc requiere de la presencia de magnesio en el medio de preincubación para unirse y permanecer unido a las membranas, ya que en ausencia del mismo, las membranas preincubadas con cinc no muestran ningún grado de inhibición sobre la actividad ATPásica de Na,K con respecto al control, el cual fue preincubado en presencia de solamente magnesio.

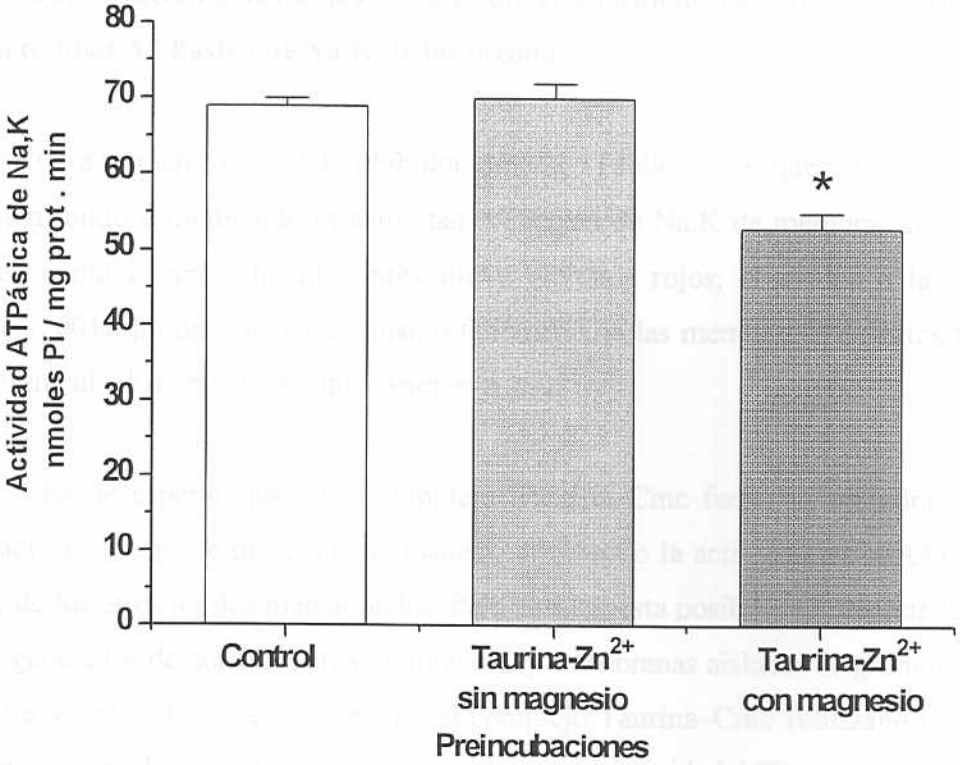

FIGURA 9

Efecto de la preincubación de homogenizados de corteza renal de ratas sacrificadas a las 0900h con el complejo Taurina–Cinc (500 μM Taurina y 2 mg/l de cinc), en ausencia o en presencia de 5 mM $MgCl_2$, sobre la actividad de la ATPasa de Na,K de los mismos. Las preincubaciones se realizaron como indicado en Materiales y Métodos. Los valores corresponden a la media ± el error estándar para 6 determinaciones con animales diferentes

* $p < 0,001$ respecto a las otras dos condiciones, las cuales son iguales entre sí.

10. Efecto de la preincubación de membranas provenientes de distintos tejidos de ratas sacrificadas a las 0900h con el complejo Taurina–Cinc, sobre la actividad ATPásica de Na,K de las mismas.

Otra característica del inhibidor natural (Tabla 1), es que se le encuentra también unido e inhibiendo la actividad ATPásica de Na,K de membranas de otros tejidos como corazón, hígado, intestino, y glóbulos rojos, obtenidos a las 0300h (Reyes 2001), produciéndose el mismo fenómeno, si las membranas de estos tejidos son preincubados con el ión cinc (Andreotti 2007).

Es de esperar que, si el complejo Taurina–Cinc fuese el inhibidor natural buscado, se comporte de la misma manera, inhibiendo la actividad de la ATPasa de Na,K de los otros tejidos mencionados. Para enfocar esta posibilidad, se preincubaron homogenizados de corazón, hígado, intestino y membranas aisladas de glóbulos rojos de ratas sacrificadas a las 0900h, con el complejo Taurina–Cinc (utilizando 500 μM Taurina y 2 mg/l de cinc) y luego se ensayaron para actividad ATPásica de Na,K. Los resultados de este experimento aparecen en la Figura 10: el complejo Taurina–Cinc unido a las membranas, al igual que el inhibidor natural y el cinc, es capaz de inhibir en un importante grado la actividad de la ATPasa de Na,K de membranas de todos los tejidos probados. Preincubación de las distintas membranas con el complejo Taurina–Cinc a concentraciones de Taurina correspondientes a las 0900h (300 μM), no produjo, al igual que para el tejido renal, efecto inhibitorio alguno sobre las actividad de la ATPasa de Na,K de los mismos (datos no mostrados).

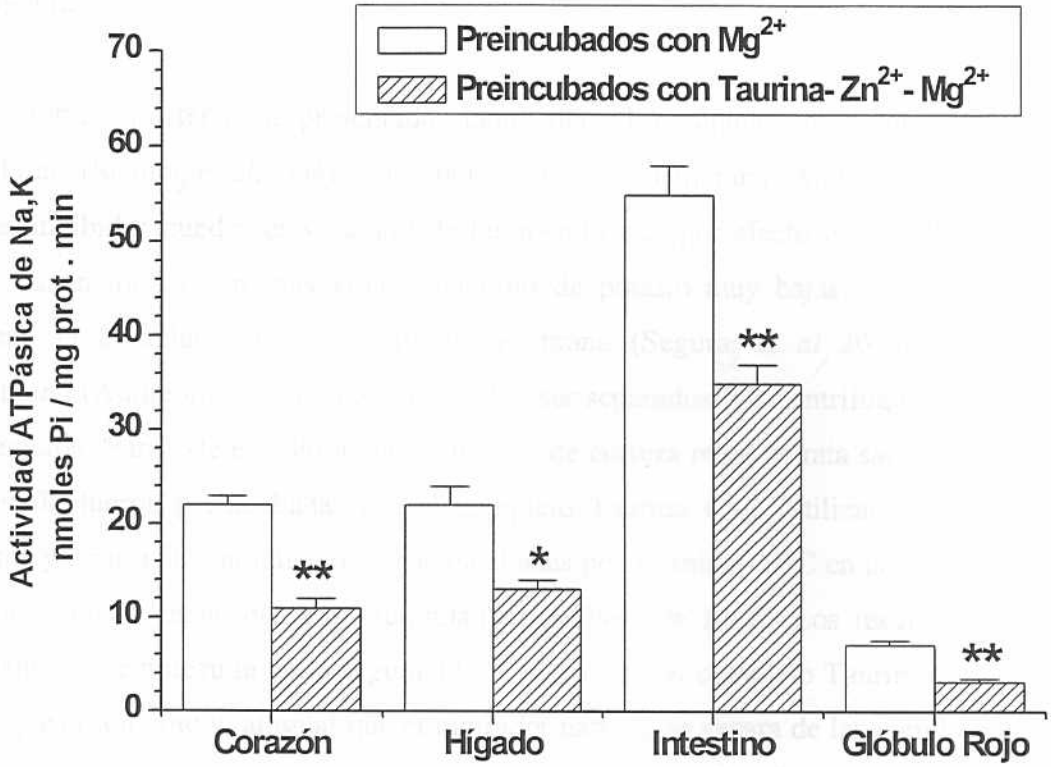

FIGURA 10

Efecto de la preincubación con el complejo Taurina-Cinc (500 μM Taurina y 2 mg/l de cinc), en presencia o no 5 mM $MgCl_2$ sobre la actividad ATPásica de Na,K de homogenizados de distintos tejidos y membranas de glóbulos rojos de ratas sacrificadas a las 0900h. Las preincubaciones se realizaron como indicado en Materiales y Métodos. Los valores corresponden a la media ± el error estándar para 6 determinaciones con animales diferentes.

*$p < 0,01$ respecto a preincubación con Mg^{2+}

**$p < 0,001$ respecto a preincubación con Mg^{2+}

11. Efecto de la centrifugación sobre la unión del complejo Taurina–Cinc con membranas de homogenizados de tejido renal de ratas sacrificadas a las 0900h.

Otra característica presentada, tanto por el complejo inhibidor natural–membrana (Segura, *et al*, 2004), como por el ión cinc–membrana (Andreotti 2007), es que el inhibidor puede ser separado de las membranas por efecto de incubación a 37°C en un medio con muy concentraciones de potasio muy bajas. De la misma manera, el complejo inhibidor natural–membrana (Segura, *et al*, 2004) o cinc–membrana (Andreotti 2007), también pueden ser separados por centrifugación de la preparación. Para este estudio, homogenizados de corteza renal de rata sacrificadas a las 0900h fueron preincubadas con el complejo Taurina–Cinc (utilizando 500 μM Taurina y 2 mg/l de cinc), luego fueron incubadas por 15 min a 37°C en un medio sin potasio y luego ensayados para actividad de ATPasa de Na,K. Los resultados del experimento se muestran en la Figura 11. Nótese como el complejo Taurina-Cinc, al igual que el ión cinc y, al igual que el inhibidor natural, se separa de las membranas, cuando éstas son incubadas en un medio sin potasio. Resultados similares se obtuvieron cuando los homogenizados tratados con el complejo Taurina-Cinc, fueron centrifugados a 48.000xg por 15 minutos y luego ensayados para actividad ATPásica de Na,K: el complejo Taurina-Cinc se separó y la actividad ATPásica no resultó inhibida (datos no mostrados).

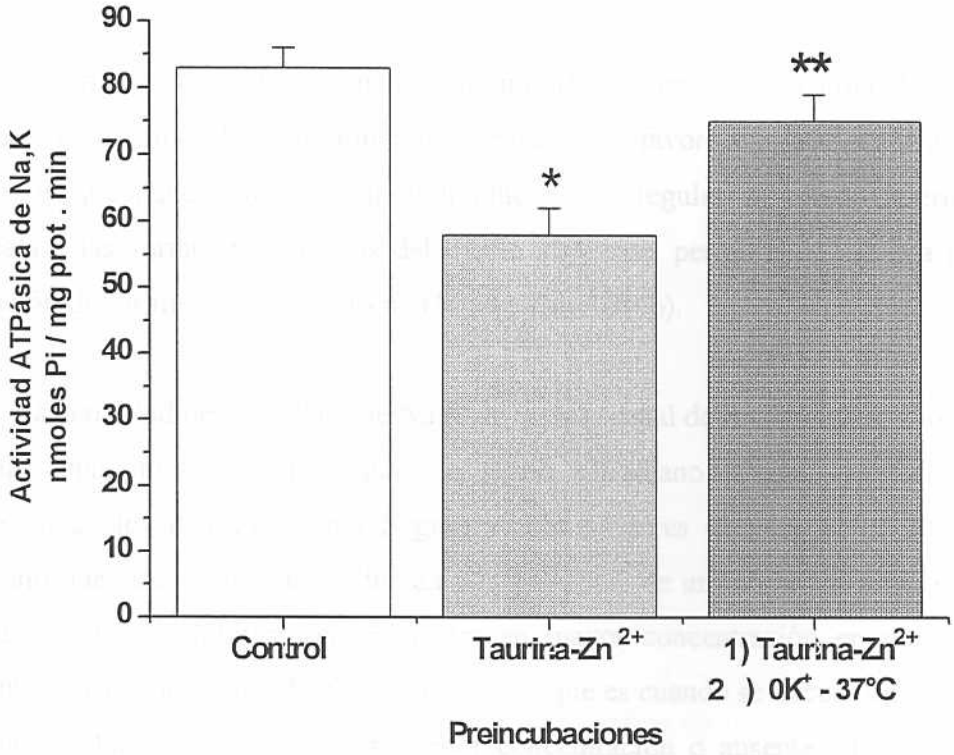

FIGURA 11

Actividad de la ATPasa de Na,K de homogenizados de corteza renal de ratas sacrificadas a las 0900h, incubados bajo condiciones control, con el complejo Taurina-Cinc (500 μM Taurina y 2 mg/l de cinc) o con el complejo Taurina-Cinc (500 μM Taurina y 2 mg/l de cinc) y luego incubados a 37°C en un medio sin potasio ($0K^+$). Las preincubaciones se realizaron como indicado en Materiales y Métodos. Luego de las preincubaciones los homogenizados fueron ensayados para actividad ATPásica de Na,K. Los valores corresponden a la media ± el error estándar para 6 determinaciones con animales diferentes.

* $p < 0{,}001$ respecto al control

** p = n.s. respecto al control < 0,05 respecto a la preincubación con Taurina-Cinc

CAPÍTULO V

ANÁLISIS

Los ritmos biológicos tienen gran importancia en la regulación de ciertas funciones fisiológicas. El cumplimiento de estos ciclos favorece la homeóstasis, pues los ritmos que puede presentar un individuo van a regular su estado interno en respuesta a las variaciones cíclicas del medio ambiente, permitiendo así una mejor adaptación de los mismos a su entorno (Moore-Ede 1986b).

La actividad de la ATPasa de Na,K de corteza renal de rata muestra, a lo largo del día, una ritmicidad que sigue un ritmo ultradiano (Figura 1). Mediante experimentos llevados a cabo por Segura y colaboradores (Segura, *et al*, 2004), se determinó que esta ritmicidad es debida a la presencia de un inhibidor circulante en plasma. El factor inhibitorio se encuentra en mayor concentración en plasma de animales sacrificados a las 1500h y a las 0300h, que es cuando se encuentra la menor actividad ATPásica de Na,K y, en menor concentración o ausente, en plasma de animales sacrificados a las 0900h y 2100h, cuando la actividad ATPásica de Na,K es máxima. Para la unión del inhibidor a la membrana, es necesaria la presencia de Mg^{2+} y puede ser removido de las membranas mediante centrifugación, o mediante preincubación de las membranas a 37°C, en ausencia de K^+ (Segura, *et al* 2004).

Estos resultados, sin embargo, no arrojan idea alguna de cuál pudiera ser el inhibidor responsable del fenómeno. Estudios realizados por Andreotti (Andreotti, 2007) en nuestro laboratorio, indican que el ión cinc presenta características similares al inhibidor natural protagonista de nuestro estudio (Tabla. 2). Esto no es nada nuevo, ya que resultados de diversos trabajos indican que el cinc puede actuar como un potente inhibidor de la ATPasa de Na,K (Gettelfinger & Siegel, 1978; Ribeiro, *et al*, 2002). Sin embargo, varios hechos debilitan la hipótesis de que sea el cinc el responsable del ritmo ultradiano de la actividad de la ATPasa de Na,K. Uno de ellos,

es la bajísima concentración de cinc libre que puede encontrarse tanto en el compartimiento intracelular como en el extracelular, (Hogstrand, *et al*, 1999). En forma libre, el cinc inhibe la actividad de la ATPasa de Ca^{2+} de glóbulo rojo humano (Hogstrand, *et al* 1999), pero se sabe, por experimentos realizados en el laboratorio, que concentraciones de cinc libre, aún por encima de las encontradas en plasma sanguíneo, fueron incapaces de inhibir la actividad ATPásica de Na,K de homogenizados de corteza renal de rata. Este hecho constituía un problema considerable para la hipótesis de Andreotti (Andreotti, 2007), pues si no hay cinc libre suficiente para realizar inhibición, entonces ¿cómo este inhibidor puede ser responsable de las variaciones ultradianas observadas?

La otra objeción a la hipótesis del cinc está en el hecho de que, mediciones por espectrometría de absorción atómica de las cantidades totales de este ión en plasma de animales sacrificados a las horas de máxima y mínima actividad ATPásica, no indican ninguna variación significativa (Andreotti, 2007); es decir, las cantidades totales de cinc entre las horas en que el inhibidor debiera en máxima concentración con respecto a las horas en las que debiera estar en mínima concentración o ausente, son iguales. Luego, no solo el ión cinc no está libre en cantidades suficientes como para realizar la inhibición, sino que además las cantidades totales del mismo no presentan una variación significativa, que conduzca a distintos grados de acción sobre la actividad ATPásica de Na,K. Por otro lado, sin embargo, no podemos olvidar las muchas similitudes que presenta la acción del ión cinc sobre la actividad ATPásica de Na,K, con las del inhibidor natural encontrado por Segura y colaboradores (Segura, *et al* 2004), responsable de la ritmicidad de la enzima.

Todo esto nos llevó a pensar en la posibilidad de que el ión cinc estuviese llevando a cabo el efecto inhibitorio formando una asociación, o complejo, con algún otro elemento presente en el plasma, que tuviese la propiedad de variar su concentración a través del tiempo. Dadas las características del inhibidor natural: no es una proteína, no es un lípido, tiene un peso molecular inferior a 1 kDa, se hace

evidente que existen diversos factores en el plasma que pudiesen ser candidatos para realizar esta función. Particularmente, el cinc puede asociarse a diferentes elementos presentes en los compartimientos intracelulares y extracelulares (Hallman, *et al*, 1971; Ohyoshi, *et al*, 1999; Rifkind & Heim, 1977). De esta manera, en un intento para dilucidar la identidad del agente inhibitorio, Reyes (comunicación personal) exploró, en primera instancia, la posibilidad de que monoaminas y aminoácidos, que se encuentran normalmente libres en el plasma, presenten alguna variación en su concentración entre las horas de máxima y mínima actividad ATPásica. Aplicando cromatografía líquida de alta presión en columnas C18, en un sistema especialmente adaptado para la medición de monoaminas, Reyes (comunicación personal) demostró que ninguna de las monoaminas medidas presentó variación significativa en sus concentraciones entre las 0900h y las 1500h, razón por la cual se descartaron. Diferentes, sin embargo, fueron los resultados en el caso de los aminoácidos determinados en el presente trabajo. En primer lugar, se encontró que al menos cuatro de los aminoácidos medidos (Arginina, Asparagina, Taurina y Valina), presentaban una diferencia significativa en cuanto a sus concentraciones a las 0900h y a las 1500h. Este hallazgo nos llevó a probar el efecto, sobre la actividad ATPásica de Na,K, de la preincubación de los homogenizados de corteza renal con los cuatro aminoácidos mencionados. Los resultados de estos experimentos indicaron que ninguno de ellos, por si sólo, fue capaz de inhibir la actividad ATPásica (Figura 3), aunque se encontrase a la concentración sérica hallada a las 1500h. Esto nos llevó a la próxima consideración: tal vez el responsable, necesitaría del ión cinc para realizar su acción inhibitoria. Interesantemente, hay estudios indican que el cinc puede asociarse a diversos aminoácidos (Hallman, *et al*, 1971).

Decidimos entonces realizar incubaciones, en las que se combinaban individualmente cada uno de los aminoácidos, con concentraciones de cinc parecidas o ligeramente mayores que el contenido total de cinc encontrado en plasma sanguíneo. El procedimiento utilizado garantizaba que el cinc que quedara no acomplejado al aminoácido, resultase a una concentración suficientemente baja como

para no realizar, por sí mismo, inhibición alguna de la actividad ATPásica de Na,K durante el ensayo. Los resultados de este procedimiento fueron sorprendentes: de los 4 amínoácidos probados, cuyas concentraciones en plasma eran mayores a las 1500h que a las 0900h, sólo uno, la Taurina, fue capaz, después de haber sido incubado con el ión cinc, de realizar una inhibición contundente de la actividad ATPásica de Na,K, (Figura 4). La Taurina sola, aún a mayores concentraciones, no pudo definitivamente producir efecto inhibitorio alguno sobre la actividad ATPásica (Figura 7).

Este hallazgo nos llevó, de manera directa, a hacernos la siguiente pregunta: ¿Cumplirá el conjunto Taurina-Cinc con las características ya encontradas para el agente inhibitorio responsable de las variaciones ultradianas de la actividad ATPásica de Na,K? Para contestar a esta interrogante, se comenzó por averiguar si la Taurina, a la concentración hallada en plasma para las 0900h, al ser combinada con el ión cinc, era capaz de producir alguna inhibición de la actividad ATPásica. Interesantemente, se encontró que a esta concentración, la Taurina combinada con el cinc no produce inhibición alguna de la actividad ATPásica de Na,K (Figura 5). Más aún, concentraciones de Taurina de las 0900h, aún incubadas con concentraciones de cinc por encima de los 2 mg/l, no mostraron efecto inhibitorio alguno, mientras que concentraciones de Taurina de las 1500h deben ser incubadas con concentraciones por encima de 1 mg/l de cinc, para producir su efecto inhibitorio (Figura 6). Estos hechos implican que son necesarias cantidades mínimas de Taurina y de cinc, para que pueda producirse una cantidad suficiente del complejo Taurina–Cinc que sea capaz de llevar a cabo la inhibición de la actividad ATPásica de Na,K. Si la cantidad de ión cinc suficiente estuviese siempre disponible, las variaciones en la actividad ATPásica de Na,K recaerían entonces sobre la concentración de Taurina.

Otra de las características del fenómeno en estudio, implica que el agente inhibitorio se despega o degrada, a medida que transcurren los días de almacenamiento de la muestra de homogenizado de corteza renal de ratas sacrificadas a las 1500 horas. Se estudió el fenómeno y se encontró (Figura 8), que la inhibición

producida por las preincubaciones de los homogenizados con el complejo Taurina y cinc va cediendo a medida que pasan los días de preparación de la muestra, hasta tomar valores parecidos a los que presentan las muestras control. Una vez comprobado que el complejo cumple con esta característica, podemos enfocar el punto sobre cuál es el destino de la unión Taurina-Cinc en la membrana, ¿Podríamos hablar de degradación de alguno de los integrantes del complejo Taurina-Cinc?, ¿O el complejo estaría simplemente separándose de la membrana? La hipótesis de la degradación pareciera ser inviable cuando nos referimos a la Taurina, ya que: 1) la Taurina es el producto final del metabolismo de la cisteína y de la metionina, dos aminoácidos que se encuentran también libres en el plasma; 2) no es metabolizada por los eucariotas, es decir, no es incorporada a ninguna ruta metabólica conocida; 3) es plenamente inerte y no es fuente de energía (Chesney *et al* 1985, Sturman & Chesney 1995) y 4) se excreta en la orina, siendo su detección una manera de obtener información acerca de su disponibilidad en la dieta. Podríamos pensar entonces que la asociación Taurina-Cinc se está separando de la membrana, dejando de producir la inhibición a medida que pasan los días de almacenamiento de la muestra. Por otra parte, también podría ocurrir la disociación de la posible unión de la Taurina con el cinc, pues se sabe que la constante de estabilidad para esta asociación no es muy elevada, comparada con la que se produce para otros aminoácidos (Wright *et al* 1986).

Otro punto a investigar, se basa en el hecho de que el inhibidor endógeno de la actividad ATPásica de Na,K necesita la presencia de magnesio en el medio de incubación para poder unirse a las membranas. El magnesio pudiera estar estabilizando la unión del inhibidor con la enzima, como lo hace para el inhibidor de origen hipotalámico encontrado por Carilli y colaboradores (Carilli *et al* 1985). En la Figura 9, se muestra de manera clara que la acción del la Taurina-Cinc sobre la membrana no se ejerce cuando las preincubaciones se realizan en ausencia de magnesio. Este hecho es coherente con las características del fenómeno inhibitorio

estudiado y fortalece la hipótesis del conjunto Taurina-Cinc como posible responsable de las variaciones ultradianas en la actividad ATPásica de Na,K.

Se ha comprobado en el pasado que el fenómeno inhibitorio se presenta de forma general en el organismo, ya que varios órganos de la rata presentan una variación de la actividad ATPásica de Na,K que se corresponden con las observadas para homogenizado total de corteza de riñón de rata (Galindo 2001, Reyes 2001). Por esta razón, se decidió probar si la Taurina y el cinc podían tener un efecto similar, es decir, extender su acción inhibitoria a diferentes tejidos. Para corazón, hígado, intestino y glóbulos rojos, se reportó una actividad inhibitoria significativa al preincubar estas membranas con el complejo Taurina-Cinc. La actividad reportada para el complejo es cercana a la que presenta el inhibidor natural probado para los diversos órganos (Figura 10).

Por último se decidió probar el efecto de la centrifugación sobre la unión del complejo Taurina-cinc. El inhibidor puede ser separado de las membranas por efecto de la incubación a 37°C en un medio sin potasio (Figura 11), así como por centrifugación de la preparación. En este caso se determinó que al igual que el inhibidor natural (Segura *et al* 2004) y el cinc de Andreotti (Andreotti 2007), el complejo Taurina-Cinc se separa de las membranas cuando se incuba en ausencia de potasio o las membranas se centrifugan.

Todos estos resultados nos permiten sugerir al complejo Taurina-Cinc como posible responsable de la inhibición ultradiana en la actividad ATPásica de Na,K, que se observó por primera vez en homogenizado total de corteza de riñón de rata. Las evidencias experimentales muestran homologías muy importantes entre las características de la acción del complejo Taurina-Cinc y sus propiedades, con las del inhibidor natural reportado por Segura (Segura *et al* 2004).

En este contexto, es pertinente mencionar varias características de la Taurina. La Taurina es un aminoácido que contiene azufre, y es uno de los aminoácidos libres más abundantes en tejidos excitables, incluyendo el cerebro, el músculo esquelético y el cardíaco; puede difundir libremente dentro de las células y puede encontrarse cerca de las membranas plasmáticas. Entre sus acciones fisiológicas se encuentra: conjugación de los ácidos biliares, detoxificación, neurotransmisión, modulación de los niveles celulares de calcio y puede servir como partícula osmóticamente activa a nivel intracelular, (Chesney, *et al*, 1985, Sturman & Chesney, 1995). Opuesto a lo que sucede con otros aminoácidos, donde la adaptación de los sistemas de transporte constituye un fenómeno limitado únicamente a estados de desnutrición y principalmente expresado en términos de transporte de aminoácidos a nivel intestinal, la recaptación de Taurina es regulada de una manera precisa por el riñón, con la participación de diferentes elementos que tienen diferentes roles (Han, *et al*, 2000). Cuando los mamíferos son sometidos a una dieta de restricción de Taurina, ellos conservan fuertemente éste aminoácido reduciendo su excreción, de tal modo que, a pesar de las diferencias significativas que se pueden encontrar en la excreción de Taurina dependiendo de la dieta administrada, las diferencias en la concentración de Taurina en plasma son pequeñas o insignificantes (Han, *et al*, 2006). Este último dato, está referido a la estabilidad de la concentración del aminoácido en plasma, luego de variaciones muy importantes de la cantidad de éste en la dieta. Nosotros hallamos diferencias significativas en la concentración de Taurina en plasma sanguíneo, a las horas en las que existen picos y valles en la actividad ATPásica de Na,K, lo que justifica en gran parte la propuesta de ser participante en el fenómeno inhibitorio ultradiano de la enzima.

La Taurina es capaz de inhibir la actividad ATPásica de Na,K de homogenizados totales de esperma de hámster. Probablemente, postularon los autores, la presencia de factores solubles son importantes para explicar la inhibición realizada por este aminoácido (Mrsny & Meizel, 1985). Este factor soluble muy bien pudiese ser el cinc, ya que se sabe que existen grandes cantidades de cinc, tanto en

algunos de los ambientes fisiológicos en los que se encuentra el espermatozoide, como almacenado por él mismo.

Por otro lado, muchos estudios hablan de la interacción taruina-cinc en varios contextos. Así:

1. Hay estudios que indican que la deficiencia de cinc lleva a un incremento en la excreción de Taurina (Hsu & Anthony 1970).

2. Tanto la Taurina como el cinc actúan como estabilizadores de membrana. Así, se sabe que el sulfato ferroso daña los segmentos exteriores de los bastones en la retina de la rana, llevando a aumento de volumen celular, agregación, y disrupción de las membranas de los discos. El cinc y la Taurina juntos, más no separados, protegen de estas consecuencias, sin afectar el grado de peroxidación de las membranas producida por el hierro (Pasantes-Morales & Cruz 1985). La Taurina y el cinc parecen impedir el paso excesivo de agua e iones a través de las membranas, que resulta de la peroxidación de las mismas (Pasantes-Morales, *et al* 1987).

3. La membrana del *tapetum*, en la parte posterior del ojo, refleja la luz que pasa sin ser absorbida a través de la retina, y así producir otra ocasión para su captación. El cinc y la Taurina son necesarios para la integridad de la membrana que rodea los bastones de la zona del *tapetum*. La deficiencia de Taurina lleva a una pérdida de cinc de la membrana, seguida por ruptura de la misma y desorganización de la zona del *tapetum* (Sturman, *et al* 1981).

4. Las acciones antiepilépticas de la Taurina pudiesen incluir al cinc como componente del fenómeno, ya que su acción específica implica inhibición de la actividad de la ATPasa de Na,K (Barbeau & Donaldson 1974, Donaldson, *et al* 1971).

CONCLUSIONES

1. En el presente trabajo, se encontró que el ión cinc y un aminoácido, la Taurina, pueden unirse para formar un complejo capaz de inhibir la actividad de la ATPasa de Na,K de distintos tejidos de la rata.

2. La inhibición de la enzima por el complejo Taurina–Cinc, presenta características muy semejantes a la producida por el cinc por sí mismo y a la producida por el inhibidor endógeno presente en el plasma de la rata, cuya identidad ~~estamos~~ se está tratando de dilucidar.

3. Ambos productos, Taurina-Cinc e inhibidor endógeno, tienen una serie de características comunes. Así: a) no son proteínas, b) no son lípidos, c) tienen un peso molecular menor de 3 kDa, d) forman un complejo relativamente estable con las membranas celulares, e) en ambos casos, el complejo con la membrana se mantiene por 5 ó 6 días, para luego perder su efectividad, f) en ambos casos, la actividad ATPásica se puede recuperar con sólo incubar los homogenizados pretratados, con el inhibidor o el complejo Taurina-Cinc, a 37°C en un medio sin potasio o por centrifugación de los homogenizados.

4. Si bien el contenido total del ión cinc no varía a lo largo del día, las concentraciones séricas de Taurina si lo hacen, presentando a las 1500h una concentración de casi el doble de la que tiene a las 0900h.

5. Preincubaciones de homogenizados de corteza renal de rata con concentraciones de Taurina de las 1500h (500 μM), previamente acomplejada con el ión cinc (2 mg/l), se tradujeron en una importante inhibición de la actividad ATPásica de

Na,K de los mismos. Igual experimento, realizado con concentraciones de Taurina de las 0900h (500 μM) no mostró inhibición alguna de la enzima.

6. Se concluye que el complejo Taurina-Cinc presenta características suficientes para ser considerado el inhibidor endógeno descrito por Segura y colaboradores (2004), responsable de las oscilaciones ultradianas de la actividad de la ATPasa de Na,K de corteza renal de rata.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Andreotti, D. (2007) *Estudio de la posible participación del ión cinc en las oscilaciones ultradianas de la actividad ATPásica de Na,K en diversos tejidos de rata.* Facultad de Humanidades y Educación, Escuela de Educación, Licenciado en Educación Mención Biología y Química. Universidad Católica Andrés Bello, Caracas.

Barbeau, A. & Donaldson, J. (1974) Zinc, taurine, and epilepsy. *Arch Neurol,* **30,** 52-58.

Bedin, M., Estrella, C.H., Duarte, D.V., Ponzi, D., Dutra-Filho, C.S., Wyse, A.T., Wajner, M. & Wannmacher, C.M. (2000) Platelet Na^+, K^+-ATPase activity as a possible peripheral marker for the neurotoxic effects of phenylalanine in phenylketonuria. *Metab Brain Dis,* **15,** 115-121.

Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analyt. Biochem.,* **72,** 248-254.

Carilli, C.T., Berne, M., Cantley, L.C. & Haupert, G.T., Jr. (1985) Hypothalamic factor inhibits the (Na,K)ATPase from the extracellular surface. Mechanism of inhibition. *J. Biol. Chem.,* **260,** 1027-1031.

Chesney, R.W., Gusowski, N., Dabbagh, S. & Padilla, M. (1985) Renal cortex taurine concentration regulates renal adaptive response to altered dietary intake of sulfur amino acids. *Prog Clin Biol Res,* **179,** 33-42.

Daan, S. & Aschoof, J. (1982) *Circadian rhythms in vertebrate.* Springer-Verlag, New York.

Donaldson, J., St Pierre, T., Minnich, J. & Barbeau, A. (1971) Seizures in rats associated with divalent cation inhibition of Na^+-K^+-ATPase. *Can J Biochem,* **49,** 1217-1224.

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

Engelhardt, H. (2004) One century of liquid chromatography. From Tswett's columns to modern high speed and high performance separations. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci,* **800,** 3-6.

Fedelesova, M., Dzurba, A. & Ziegelhoffer, A. (1975) Studies on the mechanism of dog heart ($Na^+ + K^+$)-ATPase inhibition by D,L-aspartic acid and its K^+ and Mg^{2+} salts. *Biochem Pharmacol,* **24,** 1847-1850.

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.* Escuela de Educación, Mención Ciencias Biológicas. Universidad Católica "Andrés Bello", Caracas.

Gambardella, P., Greco, A.M., Sticchi, R., Bellotti, R. & Di Renzo, G. (1994) Individual housing modulates daily rhythms of hypothalamic catecholaminergic system and circulating hormones in adult male rats. *Chronobiol Int,* **11,** 213-221.

Gettelfinger, D.M. & Siegel, G.J. (1978) Irreversible zinc ion inhibition of (Na+ -K+)-adenosinetriphosphatase, Na^+ -phosphorylation, and K+-p-nitrophenylphosphatase of Electrophorus electricus electroplax. *J Neurochem,* **31,** 1231-1237.

Giroux, E.L. & Henkin, R.I. (1972) Competition for zinc among serum albumin and amino acids. *Biochim Biophys Acta,* **273,** 64-72.

Goto, A., Yamada, K., Yagi, N., Yoshioka, M. & Sugimoto, T. (1992) Physiology and pharmacology of endogenous digitalis-like factors. *Pharmacol Rev,* **44,** 377-399.

Gupta, G.S., Gupta, V.P. & Sodhi, J. (1994) Circadian rhythms of renal phosphohydrolases analysed by Cosinor method. *Indian J Biochem Biophys,* **31,** 434-437.

Hallman, P.S., Perrin, D.D. & Watt, A.E. (1971) The computed distribution of copper(II) and zinc(II) ions among seventeen amino acids present in human blood plasma. *Biochem J,* **121,** 549-555.

Hamlyn, J.M., Harris, D.W., Clark, M.A., Rogowski, A.C., White, R.J. & Ludens, J.H. (1989) Isolation and characterization of a sodium pump inhibitor from human plasma. *Hypertension,* **13,** 681-689.

Han, X., Budreau, A.M. & Chesney, R.W. (2000) The taurine transporter gene and its role in renal development. *Amino Acids,* **19,** 499-507.

Han, X., Patters, A.B., Jones, D.P., Zelikovic, I. & Chesney, R.W. (2006) The taurine transporter: mechanisms of regulation. *Acta Physiol (Oxf),* **187,** 61-73.

Hogstrand, C., Verbost, P.M. & Wendelaar Bonga, S.E. (1999) Inhibition of human erythrocyte Ca^{2+}-ATPase by Zn^{2+}. *Toxicology,* **133,** 139-145.

Hsu, J.M. & Anthony, W.L. (1970) Zinc deficiency and urinary excretion of taurine-35S and inorganic sulfate-35S following cystine-35S injecion in rats. *J Nutr,* **100,** 1189-1195.

Kalmus, H. (1940) Diurnal rhythms in the axolotl larva and in drosophila. *Nature,* **145,** 72.

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.C. (1986a) Physiology of the circadian timing system: predictive versus reactive homeostasis. *Am. J. Physiol.,* **250,** R737-752.

Moore-Ede, M.C. (1986b) Physiology of the circadian timing system: predictive versus reactive homeostasis. *Am J Physiol,* **250,** R737-752.

Moore-Ede, M.C. & Herd, J.A. (1977) Renal electrolyte circadian rhythms: independence from feeding and activity patterns. *Am. J. Physiol.,* **232,** F128-135.

Mrsny, R.J. & Meizel, S. (1985) Inhibition of hamster sperm Na^+, K^+-ATPase activity by taurine and hypotaurine. *Life Sci,* **36,** 271-275.

Ohyoshi, E., Hamada, Y., Nakata, K. & Kohata, S. (1999) The interaction between human and bovine serum albumin and zinc studied by a competitive spectrophotometry. *J Inorg Biochem,* **75,** 213-218.

Ominato, M., Satoh, T. & Katz, A.I. (1996) Regulation of Na-K-ATPase activity in the proximal tubule: role of the protein kinase C pathway and of eicosanoids. *J Membr Biol,* **152,** 235-243.

Pasantes-Morales, H. & Cruz, C. (1985) Taurine: a physiological stabilizer of photoreceptor membranes. *Prog Clin Biol Res,* **179,** 371-381.

Pasantes-Morales, H., Quesada, O., Picones, A. & Lopez-Escalera, R. (1987) Taurine and photoreceptor structure: biochemical and electrophysiological studies. *Adv Exp Med Biol,* **217,** 89-99.

Pontes, Z.L., Oliveira, L.S., Franzon, R., Wajner, M., Wannmacher, C.M. & Wyse, A.T. (2001) Inhibition of Na^+,K^+-ATPase activity from rat hippocampus by proline. *Neurochem Res,* **26,** 1321-1326.

Proverbio, F. & del Castillo, J.R. (1981) Na^+-stimulated ATPase activities in kidney basal-lateral plasma membranes. *Biochim. Biophys. Acta,* **646,** 99-108.

Quay, W.B. (1963) Circadian Rhythm in Rat Pineal Serotonin and Its Modifications by Estrous Cycle and Photoperiod. *Gen Comp Endocrinol,* **14,** 473-479.

Reyes, A.A. (2001) *Estudio sobre posible efecto general del inhibidor ultradiano de la ATPasa de Na,K descrito para tejido renal de rata, en particular sobre tejido cardíaco.* Escuela de Educación, Mención Ciencias Biológicas. Universidad Catolica "Andrés Bello", Caracas.

Ribeiro, M.G., Pedrenho, A.R. & Hasson-Voloch, A. (2002) Electrocyte (Na^+,K^+)ATPase inhibition induced by zinc is reverted by dithiothreitol. *Int J Biochem Cell Biol,* **34,** 516-524.

Rifkind, J.M. & Heim, J.M. (1977) Interaction of zinc and hemoglobin: binding of zinc and the oxygen affinity. *Biochemistry,* **16,** 4438-4443.

Segura, D., Eblen-Zajjur, A., Proverbio, F., Proverbio, T., Carrera, F., Caruso-Neves, C. & Marín, R. (2004) A blood plasma inhibitor is responsible for circadian changes in rat renal Na,K-ATPase activity. *Int. J. Biochem. Cell Biol.,* **36,** 2054-2065.

Skou, J.C. & Esmann, M. (1992) The Na,K-ATPase. *J Bioenerg Biomembr,* **24,** 249-261.

Streck, E.L., Zugno, A.I., Tagliari, B., Sarkis, J.J., Wajner, M., Wannmacher, C.M. & Wyse, A.T. (2002a) On the mechanism of the inhibition of Na^+, K^+-ATPase activity caused by homocysteine. *Int J Dev Neurosci,* **20,** 77-81.

Streck, E.L., Zugno, A.I., Tagliari, B., Wannmacher, C., Wajner, M. & Wyse, A.T. (2002b) Inhibition of Na^+, K^+-ATPase activity by the metabolites accumulating in homocystinuria. *Metab Brain Dis,* **17,** 83-91.

Sturman, J.A. & Chesney, R.W. (1995) Taurine in pediatric nutrition. *Pediatr Clin North Am,* **42,** 879-897.

Sturman, J.A., Wen, G.Y., Wisniewski, H.M. & Hayes, K.C. (1981) Histochemical localization of zinc in the feline tapetum. Effect of taurine depletion. *Histochemistry,* **72,** 341-350.

Sweeney, B.M. & Hastings, J.W. (1960) Effects of temperature upon diurnal rhythms. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol,* **25,** 87-104.

Termonia, Y. & Ross, J. (1981) Oscillations and control features in glycolysis: numerical analysis of a comprehensive model. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* **78,** 2952-2956.

Venugopal, J. & Ramakrishna, S. (2005) Inhibition of ATPases enzyme activities on brain disturbing normal oestrous cycle. *Neurochem Res,* **30,** 315-323.

Wright, C.E., Tallan, H.H., Lin, Y.Y. & Gaull, G.E. (1986) Taurine: biological update. *Annu Rev Biochem,* **55,** 427-453.