

Estimulación de la actividad hidrolítica de la Na⁺, K⁺-ATPasa Eritrocitaria por la arginina vasopresina

A. Arrazola y J. Díez*

Departamento de Medicina Interna
Facultad de Medicina
Universidad de Navarra
31080 Pamplona (España)

(Recibido el 14 de agosto de 1986)

A. ARRAZOLA and J. DIEZ. *Stimulation of Human Erythrocyte Na⁺, K⁺-ATPase Activity by Arginine Vasopressin*. Rev. esp. Fisiol., 43 (2), 191-196, 1987.

The effects of arginine vasopressin (AVP) on Na⁺, K⁺-ATPase activity in human erythrocytes have been studied. AVP stimulates enzymatic activity with no effect on transport activity. Since the enzymatic reaction with AVP can proceed in the absence of ion transport, it may explain the discrepancies between the *in vivo* and *in vitro* effects observed with the hormone on Na⁺ processing by the kidney.

Key words: Arginine vasopressin, Na⁺, K⁺-ATPase, ATP, Hydrolysis, Na⁺, Transport.

Junto al conocido efecto hidrosmótico de la arginina vasopresina (AVP), se ha sugerido un posible efecto de la misma sobre la reabsorción renal del Na⁺ y del K⁺. Diversos experimentos realizados *in vitro* demuestran que la AVP favorece la reabsorción de Na⁺ en células de la porción medular gruesa de la rama ascendente del asa de Henle (13, 14, 23) y del túbulo colector (10). Sin embargo, otros experimentos muestran que el efecto neto de la AVP sobre una preparación de riñón entero (1) o sobre el animal intacto (4) es natriurético. Trabajos muy recientes, que aportan datos contrapuestos sobre el efecto de la AVP sobre la Na⁺, K⁺-ATPasa aislada de células renales de rata (20, 21), dificultan aún más la com-

prensión de la influencia de la hormona sobre la reabsorción tubular del Na⁺.

Los eritrocitos humanos constituyen un tejido fácilmente accesible, cuya membrana contiene Na⁺, K⁺-ATPasa inmunológicamente idéntica y funcionalmente análoga a la de las células tubulares renales (17). Por todo ello, en el presente trabajo se ha investigado el efecto de la AVP sobre la actividad enzimática y transportadora de la Na⁺, K⁺-ATPasa eritrocitaria.

Material y Métodos

Preparación de eritrocitos. — Todos los experimentos se realizaron con sangre donada por individuos sanos escogidos al azar. Se recogieron 20 ml de sangre venosa en tubos heparinizados que se cen-

* A quien debe dirigirse la correspondencia.

trifugaron a $1.750 \times g$ durante 10 min. El plasma y la capa superior de células (leucocitos y plaquetas) se aspiraron desechándose y el sedimento de eritrocitos se lavó cinco veces con Cl_2Mg 110 mM a 4°C .

Estimulación por el Na^+ intracelular del flujo de salida de Na^+ catalizado por la Na^+ , K^+ -ATPasa. — Se utilizó el método de GARAY *et al.* (12) ligeramente modificado, como a continuación se indica. Se prepararon cinco tubos conteniendo cada uno de ellos 2 ml de eritrocitos lavados que se suspendieron en un medio salino hasta un hematocrito del 8%. El medio salino se componía de sacarosa, PO_4Na_2 y PO_4K_2 . Con el fin de obtener cinco concentraciones distintas de Na^+ en el medio, éste se preparó mezclando distintos volúmenes de una solución de PO_4Na_2 100 mM y otra de PO_4K_2 100 mM. La concentración de sacarosa se mantuvo constante en 65 mM. Las suspensiones de células se incubaron durante 90 min a 37°C , renovándose el medio cada 30 min.

Tras la incubación los eritrocitos se suspendieron hasta un hematocrito del 15% en un medio de recuperación que contenía (en mM): glucosa 10, inosina 10, adenina 5, MOPS-Tris 10 y una mezcla de distintos volúmenes de ClNa 150 y ClK 150 para los distintos tubos. Las células se incubaron a 37°C durante 80 min, renovándose el medio al cabo de 40 minutos.

Finalizada esta segunda incubación los eritrocitos se lavaron cinco veces con Cl_2Mg 110 mM a 4°C y se procedió a determinar, en cada tubo, el flujo de Na^+ catalizado por la Na^+ , K^+ -ATPasa según el método de DíEZ *et al.* (6).

Estimulación por el Na^+ de la hidrólisis de ATP catalizada por la Na^+ , K^+ -ATPasa. — Para medir la actividad enzimática de la Na^+ , K^+ -ATPasa se utilizaron membranas aisladas de eritrocitos. El

método de aislamiento empleado fue similar al descrito por WAMBACH *et al.* (24). Las membranas se obtuvieron por hemólisis en una suspensión de agua y posterior centrifugación a $20.000 \times g$ durante 30 min. El paquete de membranas se lavó seis veces con un tampón que contenía (en mM): histidina 10, imidazol 10, EDTA 1 (pH 7,3). Las membranas se incubaron a 37°C en presencia y ausencia de ouabaína 1 mM junto con (en mM) histidina 40, imidazol 40, EDTA 0,5, ATP 4, ClMg 2, ClNa 15-45 y ClK 94-64 (pH 7,3). Se midió la concentración de fósforo inorgánico (Pi) en el sobrenadante tras 12 min de incubación siguiendo el método de FISKE y SUBBAROW (9). El contenido proteico de las membranas se determinó por el método de LOWRY *et al.* (19). La actividad enzimática de la Na^+ , K^+ -ATPasa se calculó como la diferencia entre el Pi generado en presencia y en ausencia de ouabaína, y se expresó en $\mu\text{moles Pi} \cdot \text{mg}^{-1} \text{ proteína} \cdot \text{h}^{-1}$.

Efecto de la AVP. — La medida de la actividad transportadora y de la actividad enzimática de la Na^+ , K^+ -ATPasa de eritrocitos humanos fue estudiada en presencia y en ausencia de AVP sintética (Sigma) disuelta en una cantidad mínima del medio de incubación final para no modificar apreciablemente el volumen o la concentración de las soluciones de incubación. La concentración de AVP empleada en todos los experimentos, 10^{-10} M, es la generalmente empleada por los autores que investigan *in vitro* el efecto de la hormona sobre el transporte de Na^+ (14).

Análisis estadístico. — La significación estadística se analizó con el test de la t de Student para datos no pareados.

Resultados

Efecto de la AVP sobre la actividad transportadora de la Na^+ , K^+ -ATPasa.

Tabla I. Efecto de la AVP 10⁻¹⁰ sobre las actividades transportadora y enzimática de la Na⁺, K⁺-ATPasa del eritrocito humano. Los resultados se expresan como MEDIA ± EEM.

	ACTIVIDAD TRANSPORTADORA (n = 5)		ACTIVIDAD ENZIMÁTICA (n = 9)	
	K ₅₀ (mM)	V _{máx} (mmoles Na ⁺ · l ⁻¹ · cel · h ⁻¹)	K ₅₀ (mM)	V _{máx} (μmoles Pi · mg ⁻¹ · prot · h ⁻¹)
Control	21,80 ± 3,10	9,32 ± 0,93	16,03 ± 3,16	0,49 ± 0,06
AVP	21,01 ± 2,60	8,98 ± 0,84	7,34 ± 2,05*	0,40 ± 0,03

* : p < 0,05

Dado que la estimulación de la actividad transportadora de la Na⁺, K⁺-ATPasa por el Na⁺ intracelular se ajusta a un modelo cinético simple (11), la curva de estimulación del flujo de salida de Na⁺ sensible a la ouabaína por el Na⁺ intracelular se estudió siguiendo un análisis cinético previamente publicado (5). De esta manera se obtuvieron dos parámetros: K₅₀ (concentración intracelular de Na⁺ a la que la actividad transportadora de Na⁺ de la Na⁺, K⁺-ATPasa es el 50% de la actividad transportadora máxima) y V_{máx} (flujo máximo de Na⁺ que es transportado por la Na⁺, K⁺-ATPasa).

En la tabla I se observa que no hay diferencias significativas entre los valores de K₅₀ y la V_{máx} en ausencia o en presencia de AVP.

Efecto de la AVP sobre la actividad enzimática de la Na⁺, K⁺-ATPasa eritrocitaria. — Para el estudio de la actividad enzimática de la Na⁺, K⁺-ATPasa se analizó la estimulación de la hidrólisis de ATP sensible a la ouabaína por el Na⁺ presente en el medio, siguiendo el modelo de representación de Eadie-Hofstee (3). Así se obtuvieron la K₅₀ (concentración de Na⁺ en el medio a la que la actividad enzimática de la Na⁺, K⁺-ATPasa es el 50% de la actividad enzimática máxima) y la V_{máx} (máxima hidrólisis de ATP catalizada por la Na⁺, K⁺-ATPasa).

En la tabla I se recoge el efecto de la AVP 10⁻¹⁰ M sobre ambos parámetros. Se observa que la K₅₀ para el Na⁺ dismi-

nuye de 16,03 ± 3,16 a 7,34 ± 2,05 mM en presencia de AVP (p < 0,05), lo que traduce que aumenta la afinidad de la enzima por el Na⁺ en presencia de AVP. En cambio, la V_{máx} no varía significativamente en presencia de AVP.

Discusión

La AVP no modifica la actividad transportadora de la Na⁺, K⁺-ATPasa de eritrocitos humanos cuya concentración de Na⁺ no se ha alterado (8). Dado que dicho resultado no excluye que la hormona pueda influir sobre la cinética de la enzima, en este trabajo se han utilizado eritrocitos cuyo contenido en Na⁺ se había modificado previamente para observar el efecto de la AVP sobre la respuesta de la Na⁺, K⁺-ATPasa a cambios en la concentración basal de Na⁺.

El primer grupo de resultados presentados muestra una ausencia de efecto de la AVP, a una concentración fija, sobre la actividad transportadora de la enzima en condiciones cambiantes de Na⁺ intracelular. Así, *in vitro*, la AVP no modifica directamente la capacidad de la Na⁺, K⁺-ATPasa eritrocitaria para transportar Na⁺. Esta observación, y otras previamente publicadas en eritrocitos (7), sugieren que la Na⁺, K⁺-ATPasa no parece ser el mecanismo de transporte diana para un efecto directo de la AVP. Por el contrario, dicho mecanismo parece ser el co-transporte Na⁺, K⁺, Cl⁻ (7). Esta consi-

deración se correspondería con las observaciones realizadas en la porción gruesa de la rama ascendente el asa de Henle (14, 15, 16). En efecto, los resultados publicados con dicho modelo celular permiten establecer que la AVP no influye directamente la Na^+ , K^+ -ATPasa. Sin embargo, estimulando directamente el cotransporte Na^+ , K^+ , Cl^- del lado luminal favorecería la reabsorción de Na^+ y el consiguiente aumento del contenido intracelular de Na^+ , por lo que, de manera indirecta, se activaría la Na^+ , K^+ -ATPasa del lado baso-lateral que transportaría Na^+ hacia el intersticio y la circulación capilar peritubular.

Por el contrario, la AVP sí es capaz de influir la actividad enzimática de la Na^+ , K^+ -ATPasa de la membrana eritrocitaria. En efecto, la hormona favorece la hidrólisis de ATP a cargo de la Na^+ , K^+ -ATPasa. Este hallazgo coincide con el observado por PIPPARD y BAYLIS (21) en células de la médula renal de ratas normales y se opone al descrito en células de la médula renal de ratas con diabetes insípida (20). Sin embargo, es preciso señalar que algunas diferencias metodológicas importantes restan valor a la comparación de nuestros resultados con el de esos autores. En efecto, los modelos celulares son distintos, las concentraciones de AVP empleadas también han sido diferentes y, finalmente, nuestro estudio se fundamenta en el análisis de la cinética de la enzima, en tanto que los autores referidos efectuaron sus experimentos a una única y saturante concentración de Na^+ en el medio (20, 21).

Analizados en conjunto, los resultados descritos en este trabajo presentan la particularidad de mostrar un efecto distinto de la misma hormona sobre actividades acopladas de una enzima. En presencia de AVP la actividad enzimática de la Na^+ , K^+ -ATPasa cambia, aumentando su afinidad por el Na^+ y consecuentemente hidrolizando más ATP a una misma concentración de Na^+ . Cabría esperar que el

transporte de Na^+ también aumentara, pero no sucede así, por lo tanto, se da la reacción de hidrólisis de ATP sin transporte de Na^+ acoplado.

El origen de esta disociación puede radicarse, simplemente, en que las condiciones experimentales en las que se han medido ambas actividades no son exactamente iguales, ya que, la actividad transportadora se ha medido en eritrocitos enteros y la actividad enzimática en membranas aisladas de eritrocitos. Otra explicación se refiere a la posibilidad de que en el funcionamiento de la Na^+ , K^+ -ATPasa la hidrólisis de ATP y el transporte de iones no estén perfectamente acoplados. Así, KAPLAN ha descrito un intercambio ATP-ADP catalizado por la Na^+ , K^+ -ATPasa que no está acoplado al transporte Na^+ - Na^+ (18). También se ha demostrado que la oligomicina, que inhibe dicho transporte Na^+ - Na^+ , no inhibe la reacción (2, 22). Otro hallazgo que corrobora la posibilidad del desacoplamiento es el hecho de que la modificación de la enzima con mercuriales puede desacoplar los requerimientos de cationes para la activación de las reacciones parciales (18). Finalmente, estudios sobre el intercambio ATP-ADP en membranas aisladas muestran que, incluso en ausencia de inhibidores, las reacciones bioquímicas y el transporte de iones no están siempre perfectamente acoplados (18). Este desacoplamiento entre actividad enzimática y actividad transportadora en presencia de AVP podría explicar las diferencias en los resultados observados al medir *in vitro* los dos tipos de comportamiento de la enzima.

Resumen

Se estudia la actividad transportadora y enzimática de la Na^+ , K^+ -ATPasa del eritrocito humano en presencia y en ausencia de arginina vasopresina (AVP) 10^{-10} M. La AVP aumenta la actividad enzi-

mática y no altera su actividad transportadora. Un desacoplamiento de las dos actividades de la Na⁺, K⁺-ATPasa podría explicar la disociación de los efectos observados en presencia de arginina vasopresina.

Palabras clave: Arginina vasopresina, Na⁺, K⁺-ATPasa, ATP, Hidrólisis, Na⁺, Transporte.

Bibliografía

1. Arruda, J. L., Stipanuk, S. y Walter, R.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 155, 308-313, 1977.
2. Blostein, R.: *J. Biol. Chem.*, 245, 270-275, 1970.
3. Cornish-Bowden, A.: En «Fundamentals of Enzyme Kinetics», Buitenworth and Co. Publishers Ltd, Londres, 1979, pp. 28.
4. Chan, W. Y.: *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 178, 141-149, 1971.
5. Dagher, G., Brossard, M., Feray, J. C. y Garay, R. P.: *Life Sci.*, 37, 243-253, 1985.
6. Díez, J., Virto, R., Yap, L., Errasti, P., Purroy, A. y Prieto, J.: *Nefrología*, 5, 109-114, 1985.
7. Díez, J., Miqueo, C., Arrazola, A. y Varela, J. I.: *Reg. Pept.*, Suppl. 4, 23-25, 1985.
8. Díez, J. y Arrazola, A.: *Nefrología*, 6, 37-42, 1986.
9. Fiske, G. H. y Subbarow, Y. J.: *J. Biol. Chem.*, 66, 375-400, 1925.
10. Frindt, G. y Burg, M. B.: *Kidney Int.*, 1, 224-232, 1972.
11. Garay, R. P. y Garrahan, P. J.: *J. Physiol.*, (London), 231, 297-325, 1973.
12. Garay, R., Nazaret, C., Hannaert, P. y Price, M.: *Eur. J. Clin. Invest.*, 13, 311-320, 1983.
13. Hall, D. A. y Verney, D. M.: *J. Clin. Invest.*, 66, 797-802, 1980.
14. Hebert, S. C., Culpepper, R. M. y Andreoli, T. E.: *Am. J. Physiol.*, 241, F412-F431, 1981.
15. Hebert, S. C., Culpepper, R. M. y Andreoli, T. E.: *Am. J. Physiol.*, 241, F432-F442, 1981.
16. Hebert, S. C., Culpepper, R. M. y Andreoli, T. E.: *Am. J. Physiol.*, 241, F443-F451, 1981.
17. Jorgensen, P. L.: *Kidney Int.*, 29, 10-20, 1986.
18. Kaplan, J. H.: *Am. J. Physiol.*, 245, G327-G333, 1983.
19. Lowry, O. M., Rosenbrough, M. J., Farr, A. L. y Randall, R. J.: *J. Biol. Chem.*, 193, 265-285, 1951.
20. Opava-Sützer, S., Rodríguez-Sargent, C., Cangiano, J. L. y Martínez-Maldonado, M.: *Kidney Int.*, 25, 312 (Abstract), 1984.
21. Pippard, C. y Baylis, P. H.: *Clin. Sci.*, 66, 561-567, 1984.
22. Sachs, J. R.: *J. Physiol.*, (London), 302, 219-240, 1980.
23. Sasaki, S. y Imai, M.: *Pflügers Archiv.*, 383, 215-221, 1980.
24. Wambach, G., Helber, A., Bonner, G., Hummerich, W., Konrads, A. y Kaufmann, W.: *Clin. Sci.*, 59, 1835-1855, 1980.

