

Estudio de la actividad $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPasa en mastocitos de las cavidades pleural y peritoneal de rata

N. Eleno, L. M. Botana, J. Espinosa, C. Segura, C. Taboada y P. Fernández-Otero *

Departamento de Fisiología Animal
Facultad de Farmacia
Santiago de Compostela

(Recibido el 3 de marzo de 1985)

N. ELENO, L. M. BOTANA, J. ESPINOSA, C. SEGURA, C. TABOADA and P. FERNANDEZ-OTERO. *The $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPase Activity in Rat Pleural and Peritoneal Mast Cells.* Rev. esp. Fisiol., 42, 85-90. 1986.

ATPase activity in rat mast cells was studied, assuming that pleural and peritoneal mast cells are different populations. Mast cells were purified with Percoll. Enzymatic activity was found to be 36 % higher in pleural cells than in peritoneal cells. Moreover, for both populations results show a $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPase activity either low or slightly inhibited by ouabain.

Key words: Mast cells, $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPase.

Los mastocitos, células responsables de la liberación de histamina, constituyen una población celular heterogénea (3), con un comportamiento distinto frente a un mismo estímulo según la especie e incluso según el órgano o cavidad de la que procedan (4).

Los mediadores químicos contenidos en los gránulos del citoplasma se liberan cuando las células son estimuladas por agentes naturales o químicos; en ambos casos juega un papel fundamental el transporte de iones a través de la membrana plasmática (10). La bomba $\text{Na}^+\text{-K}^+$

regula mayoritariamente el intercambio de iones Na^+ y K^+ en las células, de ahí la importancia de estudiar este sistema transportador en células secretoras de tipo mastocitario.

Material y Métodos

Aislamiento de las células y homogeneización. Los mastocitos del peritoneo se obtienen por un lavado de la cavidad peritoneal de ratas de raza Wistar (350-500 g) (15) con tampón fosfato de Sörensen con ligeras variaciones: PO_4H_2 9,087 g/l, $\text{PO}_4\text{HNa}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 11,876 g/l, EDTA 1 mM y ClNa 9 %, pH = 7,4. Para aislar los mastocitos de pleura se introducen 5 ml de la misma solución a través de una pequeña abertura practi-

* A quien debe dirigirse la correspondencia: Departamento de Fisiología Humana, Facultad de Medicina, Universidad de Navarra, 31080 Pamplona (España).

cada en la parte inferior media del tórax. Se lavan las células dos veces y se purifican con Percoll isotónico (4, 7). La homogeneización se realiza en un vaso Potter-Elvehjem a 0 °C diluyendo previamente la muestra en tampón Tris 50 mM.

El rendimiento obtenido por cada rata es $1-1,5 \times 10^6$ células del peritoneo y $3-5 \times 10^5$ de la pleura, con una pureza del 95 % en ambos casos.

Determinación de la proteína. Para el microensayo de proteína se sigue la técnica descrita por BRADFORD (5). El reactivo se mantiene en agitación durante 10 minutos antes de su uso para evitar la sedimentación del colorante. La absorbancia se mide en un espectrofotómetro Beckman modelo DB-GT a 595 nm.

En todas las determinaciones de actividad ATPasa se añaden alícuotas de 100 μ l de homogenado celular equivalentes a $1-1,5 \times 10^5$ mastocitos o 6,8-10,2 μ g de proteína.

Actividad ATPasa. Se adicionan 100 μ l de homogenado celular a un tubo de ensayo que contiene ClNa 100 mM, ClK 10 mM, Cl_2Mg 3 mM (16) y ouabaína 1 mM (ensayos de inhibición). Se completa hasta un volumen de 1,1 ml con tampón Tris 50 mM. Tras una incubación de 10 min a 37°C se añade una alícuota de 100 μ l de ATP en exceso (1,5 o 3 mM) prolongando el tiempo de incubación durante 30 minutos más. Se introducen los tubos en un baño de hielo y se precipita la proteína con TCA 7 %, 0°C. Se centrifuga a 1.082 g, 10 min y se recogen fracciones de 1 ml de sobrenadante. El fósforo inorgánico liberado por la ruptura del ATP se determina en un espectrofotómetro Shimadzu, modelo UV-200 a 865 nm (11).

La actividad Na^+-K^+ ATPasa específica sensible a la inhibición con ouabaína, se obtiene por diferencia entre el valor de la actividad Na^+-K^+ ATPasa Mg^{++} dependiente en ausencia y presencia de

ouabaína. El valor de la actividad ATPasa en presencia del sustrato de la reacción (ATP y Mg^{++} en cantidades equimoleculares), corresponde al valor de la actividad enzimática no ligada al transporte de iones Na^+ y K^+ .

En todos los casos se añade EGTA 0,1 mM para acomplejar trazas de iones Ca^{++} que pueden estar presentes en el medio de incubación. Se usa como tampón Tris base para evitar que se introduzcan iones Na^+ al ajustar el pH.

Hay dos tipos de blancos de reacción; uno contiene ATP y Mg^{++} sin muestra y otro ATP y muestra sin iones.

La actividad enzimática se expresa como nmoles Pi/min/mg proteína.

Reactivos. La albúmina bovina sérica (BSA, fracción V), el o-ftaldehído, y el Tris-ATP fueron obtenidos de Sigma, el Percoll de Pharmacia y el ClNa, el ClK y el Cl_2Mg de Merck. Todos los demás reactivos son de grado analítico.

Resultados

Valoración de la actividad ATPasa. En la tabla I se indican los valores de actividad ATPasa obtenidos con las dos poblaciones celulares, tórax y peritoneo, siendo superior la actividad enzimática de los mastocitos pleurales en todos los casos: 36,7 % y 40 % para Na^+-K^+ ATPasa Mg^{++} dependiente no inhibida e inhibida con ouabaína 1 mM respectivamente, 36,3 % en el valor Mg^{++} -ATPasa y 49,8 % en la actividad Na^+-K^+ ATPasa específica.

Inhibición con ouabaína. Previamente a los ensayos con ouabaína se estudia una posible inhibición competitiva entre la ouabaína y el ion K^+ determinando la actividad enzimática con distintas concentraciones de ouabaína en presencia de K^+ 1 y 10 mM (tabla III). También se determina la influencia del tiempo de incubación con ouabaína 1 mM, sobre

Tabla I. Actividad enzimática (nmol/min · mg) en mastocitos peritoneales y pleurales. Media + SEM, n = 10.

	Ouabaína (mM)	Peritoneo	Tórax
Na ⁺ -K ⁺ ATPasa Mg ⁺⁺ dependiente	—	315,7 ± 20	498,8 ± 35
Na ⁺ -K ⁺ ATPasa Mg ⁺⁺ dependiente	1	264,5 ± 23	440,0 ± 30
Mg ⁺⁺ ATPasa	—	305,5 ± 17	479,8 ± 22
Na ⁺ -K ⁺ ATPasa específica	—	24,0 ± 3	47,8 ± 5

el porcentaje de inhibición, incubando el homogenado celular desde 5 min hasta 1 hora. Los resultados obtenidos se omiten puesto que no presentan ninguna variación.

Tabla II. Inhibición de distintas concentraciones de ouabaína respecto al primer valor de actividad Na⁺-K⁺ ATPasa Mg⁺⁺ dependiente. Media + SEM % CV = porcentaje del coeficiente de variación respecto al SEM, n = 10.

Ouabaína (mM)	Actividad enzimática (nmol/min · mg)	% CV	Inhibición (%)
Na ⁺ -K ⁺ ATPasa Mg ⁺⁺ dependiente			
—	309 ± 4	1,3	—
0,1	291 ± 14	4	5,95
0,5	300 ± 13	4	3
1	303 ± 3	3,3	2
10	285 ± 5	5	7,9
Mg ⁺⁺ ATPasa			
—	283 ± 17	6	—

Los resultados de la tabla II muestran el efecto de distintas concentraciones de ouabaína (de 0,1 a 10 mM) sobre una preparación enzimática de tórax y peritoneo.

El porcentaje de hidrólisis no enzimática del ATP se mide en los blancos de la reacción y es del 1,32 % (n = 8) para el blanco que contiene ATP y Mg⁺⁺ y 1,38 % (n = 8) en el que lleva ATP y muestra. No existen diferencias significativas entre ambos valores, y por tanto se excluye la posibilidad de una actividad enzimática en presencia de iones procedentes de los reactivos u otro tipo de contaminantes del medio.

Discusión

La ouabaína es un heterósido cardiotónico que inhibe específicamente la Na⁺-K⁺ ATPasa (13). El enzima posee un receptor en el lado externo de la membrana plasmática cuya afinidad por

Tabla III. Inhibición de la actividad enzimática con ouabaína en presencia de K⁺ 1 y 10 mM. % CV = porcentaje del coeficiente de variación respecto al SEM, n = 2.

Ouabaína (mM)	Potasio (mM)	Actividad enzimática (nmol Pi/min · mg)		Na ⁺ -K ⁺ ATPasa Mg ⁺⁺ dependiente	
		Peritoneo	% CV	Tórax	% CV
—	1	273,3 ± 3	0,8	459,00 ± 20	2,0
0,2	1	263,5 ± 5	1,2	454,60 ± 6	0,8
1	1	260,4 ± 4	0,9	440,70 ± 11	1,4
—	10	264,5 ± 4	0,9	460,15 ± 5	0,6
0,2	10	269,4 ± 2	0,9	451,70 ± 7	0,8
1	10	260,5 ± 10	2,0	442,00 ± 15	1,9

el inhibidor es discutida y difiere según las especies animales. En el caso de los roedores, algunos autores afirman que poseen una ATPasa poco sensible a la ouabaína por lo que se necesitan altas concentraciones, al menos 1 mM (6); otros autores detectan inhibición enzimática con 0,1 mM (16). En este estudio se obtienen porcentajes de inhibición muy pequeños, para todas las concentraciones de ouabaína ensayadas (tabla II). Además, el valor de la actividad Na⁺-K⁺ ATPasa Mg²⁺ dependiente es superior al valor Mg²⁺ ATPasa únicamente en un 8,5 %, y por tanto la actividad enzimática ligada al transporte de iones Na⁺ y K⁺ es muy pequeña. Existe la posibilidad de que el ion K⁺ desplace a la ouabaína; sin embargo, la diferencia entre los resultados obtenidos y los de otros autores (1) puede ser debida a la relación ouabaína/K⁺ que se utiliza: 1/50 y 1/1.500 respectivamente. También se observa que aumentando el tiempo de incubación de la muestra con ouabaína no aumenta el porcentaje de inhibición, y por tanto no se favorece la fijación del inhibidor a su receptor enzimático (2).

Por acción de la Ca²⁺-Mg²⁺ ATPasa se observa una disminución de la actividad Na⁺-K⁺ ATPasa y de otras enzimas que también utilizan ATP, fosfofructoquinasa y piruvato-quinasa (8, 17); sin embargo, la adición de EGTA al medio de incubación y los porcentajes de hidrólisis de ATP obtenidos con los dos tipos de blancos de reacción, aseguran que las posibles trazas de este ion no activan la Ca²⁺-Mg²⁺ ATPasa (9).

Parece lógico que la actividad de la bomba Na⁺, K⁺ en mastocitos sea pequeña puesto que se trata de células poco excitables que se desgranulan esporádicamente durante la vida celular siguiendo un proceso de exocitosis. Además, se ha demostrado que la secreción de histamina inducida por el compuesto 48/80 y ATP no está directamente asociada a un cambio de potencial de membrana (14).

La existencia de una Na⁺-K⁺ ATPasa de baja actividad en mastocitos refleja una situación semejante a la existente en células beta de islotes de Langerhans y leucocitos polimorfonucleares; ambos tipos celulares poseen un potencial de membrana bajo y acumulan K⁺ mientras que son deficientes en la extrusión de Na⁺ (12). Estas células poseen una actividad p-nitrofenilfosfatasa activada por K⁺ e inhibida por ouabaína a la que se ha adscrito una función en el transporte de ion K⁺ (18), que parece debe ser detectada y caracterizada en mastocitos.

Es importante destacar el hecho de que la actividad enzimática es superior en las células de la cavidad pleural (tabla I). Este resultado está de acuerdo con la acción observada por agonistas adrenérgicos (datos no publicados) y diversas poliaminas (4) sobre las dos poblaciones celulares; en ambos casos los mastocitos de la cavidad pleural son más sensibles que los de la cavidad peritoneal frente a los mismos estímulos.

Resumen

Se estudia la actividad ATPasa en mastocitos de rata purificados con Percoll, considerando las células de la cavidad pleural y peritoneal como poblaciones diferentes. Los resultados demuestran una actividad Na⁺-K⁺ ATPasa muy pequeña tanto en mastocitos pleurales como peritoneales; por otra parte la actividad enzimática es superior en las células de la cavidad pleural en un 36 % respecto a las del peritoneo. Los resultados indican la posibilidad de que esta actividad ATPasa sea muy pequeña o bien que el enzima sea poco sensible a la ouabaína.

Bibliografía

1. Akera, T.: *Biochem. Biophys. Acta*, **249**, 53-62, 1971.
2. Amellal, M., Binck, N., Frossard, N.: Ilien, B. y Landry, Y.: *Br. J. Pharmacol.*, **82**, 423-430, 1984.

3. Barret, K. E. y Pearce, F. L.: *Agents Actions*, **12**, 186-188, 1982.
4. Botana, L. M., Espinosa, J., Eleno, N., Segura, C. y Fernández-Otero, P.: *Agents Actions*, **16**, 1-4, 1985.
5. Bradford, M. M.: *Anal. Biochem.*, **94**, 160-165, 1979.
6. Donaldson, J.: *Canad. J. Biochem.*, **50**, 888-896, 1976.
7. Ennerback, L.: *J. Immunol. Meth.*, **39**, 135-145, 1980.
8. Epstein, F. H. y Whittam, R.: *Biochem. J.*, **99**, 232-238, 1966.
9. Formby, B.: *Am. J. Physiol.*, **230**, 441-447, 1976.
10. Kazimierzak, W. y Diamant, B.: *Prog. Allergy*, **24**, 295-365, 1978.
11. Lebel, D., Poirier, G. G. y Beadouni, A. R.: *Anal. Biochem.*, **85**, 86-89, 1978.
12. Lenmark, A., Parman, A. y Taljedal, I. D.: *Biochem. J.*, **166**, 181-187, 1977.
13. Schwartz, A., Lindermayer, G. E. y Allen, J. C.: *Pharmacol. Rev.*, **27**, 3-133, 1975.
14. Sugiyama, R. y Utsumi, K.: *Cell Struct. Funct.*, **4**, 257-260, 1979.
15. Uvnas, B.: *Meth. Enz.*, **23**, 395-402, 1979.
16. Whittam, R.: *Biochem. J.*, **84**, 110-118, 1962.
17. Whittam, R. y Blond, D. M.: *Biochem. J.*, **92**, 147-157, 1964.
18. Woodin, A. M. y Wineke, A. A.: En «Calcium and Cellular Function» (Curbert, A. W., ed.), McMillan Publ. Co., Nueva York, 1970, pp. 183-197.

