

# Efecto agudo y crónico del Etanol sobre la actividad ATP-asa y consumo de oxígeno asociado en cerebro de rata adulta y neonata

Velasco Martín, A.\* , García Roldán, J.L.\*\* , y Mulas Gago M.ª L.\*\*\*

\*Catedrático de Farmacología - \*\*Profesor Titular de Farmacología - \*\*\*Doctora en Medicina y Cirugía

## RESUMEN

*Se estudia el efecto del etanol sobre la actividad ATP-asa estimada foto-colorimétricamente y consumo de oxígeno asociado determinado manométricamente en cerebro de rata. Se han realizado experimentos "in vitro" empleando concentraciones entre 10-100 mM de etanol sobre ratas de 7 meses de edad y ratas neonatas. Un segundo tipo de experimentos se ha llevado a cabo con ratas de 7 meses de edad pretratadas con 10 g/Kg/día oral de etanol durante un mes y ratas neonatas de madres pretratadas. El etanol a las concentraciones de 50'30 y 10 mM estimula la actividad ATP-asa no sensible a ouabaina y a las concentraciones de 30 y 10 mM inhibe la actividad ATP-asa Na-K dependiente de membrana en cerebros de rata "in vitro". A estas mismas concentraciones inhibe el consumo de oxígeno asociado con dicha actividad. Las ratas pretratadas con etanol así como las neonatas de madres pretratadas presentan una disminución del consumo de oxígeno con relación a los controles normales, no se modifica la actividad ATP-asa no sensible a ouabaina, sin embargo en ratas neonatas se observa una inhibición de la actividad ATP-asa Na-K dependiente y en ratas adultas pretratadas un incremento de dicha actividad. La hemineurina y clonidina "in vitro" revierten estos efectos.*

**Palabras clave:** Etanol, Consumo de oxígeno, Actividad ATP-asa, Cerebro, Hemineurina, Clonidina.

Correspondencia:

Dr. Alfonso Velasco Martín. Departamento de Biología Celular y Farmacología. Avda. Ramón y Cajal, 7. Facultad de Medicina. 47005 VALLADOLID

### SUMMARY

*The effect of ethanol on the ATP ase activity stimated photocolourimetrically and the associated consumption of oxygen was studied in the brain of adult and new-born rats. Experiments were made "in vitro" using concentrations between 10 and 100 nM of ethanol. A second serie of experiments were made in rats of seven moths pretreated with 9,29 g/kg per day of ethanol during one month and in new-born rats of pretreated mothers. In the adult rat, ethanol concentrations of 50'30 and 10 mM inhinbited na-K ATP ase activity and oxygen uptake associated with this activity.*

*In chronic treatment, on the contrary, the na-K ATP ase activity was stimulated in adult rats. This effect was inhinited by Hemineurine and clonidine. In the new-born rats in chronic treatment, ethanol inhinbited na-K ATP ase activity. This affect was antagonized by Hemineurine.*

**Key Words:** Ethanol, Oxygen uptake, ATP ase activity, Brain, Hemi-neurine, Clonidine.

### INTRODUCCIÓN

Los procesos activos de membrana, representados fundamentalmente por la actividad ATP asa (1'2) requieren energía (3) estando relacionados con el metabolismo oxidativo (4).

El etanol provoca modificaciones de la composición lipídica de la membrana (5), lo que le confiere propiedades estabilizadoras, inhibiendo el intercambio activo sodio-potasio (6'7), en tanto que posee un efecto estimulante sobre la actividad ATP asa Na-K dependiente (8). No obstante, el tratamiento crónico con etanol incrementa la actividad Na-K dependiente (9) y probablemente la actividad ATP asa no sensible a ouabaína (7).

En el presente trabajo se estudia el efecto "in vitro" del etanol a las concentraciones de 100 mM (4'6 g/l), correspondientes a una alcoholemia que provoca un cuadro comatoso, 70 mM (3'2 g/l), 50 mM (2'3 g/l), con la que el 100 por cien de los individuos presentan síntomas de embriaguez, 30 mM (1'3 g/l), con la que el 50 por ciento de la población presente síntomas de etilismo agudo y 10 mM (0'4 g/l) concentración que corresponde a niveles fisiológicos de alcoholemia.

Asímismo se estudia el efecto del etanol en tratamiento crónico sobre la actividad ATP asa y consumo de oxígeno asociado

en cerebro de rata adulta y neonata, y las modificaciones que sobre la actividad ATP asa inducen la hemineurina, derivado tiazólico de la vitamina B1 propuesto para el tratamiento del delirium tremens y el síndrome de abstinencia aguda al etanol (10) y la clonidina, fármaco propuesto para el síndrome de abstinencia de algunos psicofármacos (11).

### MATERIAL Y METODOS.

Se han utilizado ratas Wistar neonatas (menos de 24 horas de vida) y ratas adultas de siete meses de edad con  $386 \pm 8$  gramos de peso, muertas por decapitación.

El tratamiento crónico se ha llevado a cabo durante tres meses con una dieta libre con pienso compuesto Sanders industrial y la ingesta "ad libitum", de una solución etílica al 20 por ciento v/v tras un periodo de acomodación a ésta. La ingesta media de etanol ha sido de 9'29 g/kg/día.

La rata neonata ha sido pretratado exponiendo a la madre a esta solución etílica desde una semana antes de unirla al macho hasta la retirada de la camada.

La actividad ATP asa se ha determinado según la técnica de Wu y Phillis (12), midiendo el fosfato inorgánico liberado según el método de Fiske y Subbarow (13) en homogeneizados de corteza cerebral de rata.

El consumo de oxígeno se ha determinado por técnica manométrica directa (14) con un aparato de Warburg, en cortes de corteza cerebral de rata. El consumo de oxígeno ligado a la actividad ATP asa Na-K dependiente de membrana, se ha determinado por la diferencia entre dos medios de incubación (15) uno con exceso de potasio (105 mM) y sin calcio en el que la actividad ATP asa está estimulada, y un segundo medio en el que se ha sustituido el cloruro de sodio por cloruro de colina, y en el que dicha actividad está inhibida (16).

El contraste estadístico se ha realizado mediante un test para datos no apareados.

## RESULTADOS

### 1. Efecto del etanol sobre la actividad ATP asa (Tabla 1)

1.1. Efecto sobre homogeneizados de corteza cerebral de rata adulta "in vitro".— El etanol a las concentraciones 30 y 10 mM inhibe la actividad ATP asa Na-K dependiente de membrana en un 35 y 27 por ciento respectivamente, mientras que a las concentraciones 50, 30 y 10 mM incrementa la actividad ATP asa no sensible a ouabaína en un 22, 33 y 17 por ciento respectivamente.

1.2. Efecto sobre homogeneizados de corteza cerebral de ratas adultas pretratadas con etanol.— El etanol en tratamiento crónico incrementa la actividad ATP asa Na-K dependiente de membrana en un 21 por ciento, efecto que es bloqueado por la presencia "in vitro" de clonidina 0'001 mM y de hemineurina 1 y 0'001 mM.

1.3. Efecto sobre homogeneizados de corteza cerebral de ratas neonatas "in vitro".— El etanol a las concentraciones 70, 50, 30 y 10 mM inhibe la actividad ATP asa NA-K dependiente de membrana en un 89, 49, 97 y 85 por ciento respectivamente, mientras que a esas mismas concentraciones incrementa la actividad ATP asa no sensible a ouabaína en un 97, 91, 67 y 66 por ciento respectivamente.

1.4. Efecto sobre homogeneizados de corteza cerebral de ratas neonatas de ma-

dres pretratadas con etanol.— El etanol en tratamiento crónico disminuye la actividad ATP asa Na-K dependiente de membrana en un 58 por ciento, no modificando la actividad ATP asa no sensible a ouabaína. El efecto inhibitor sobre la actividad ATP asa Na-K dependiente de membrana es revertido por la hemineurina "in vitro" a la concentración 0'001 mM.

### 2. Efecto del etanol sobre el consumo de oxígeno cerebral (Tabla 2)

2.1. Efecto sobre el consumo de oxígeno de corteza cerebral de rata adulta y neonata "in vitro".— El etanol a ninguna de las concentraciones ensayadas modifica el consumo de oxígeno de cortes de cerebro de rata incubados en solución de Krebs-Ringer fosfato pH 7'4 con glucosa 10 mM, potasio 105 mM carente en calcio en el que se ha sustituido el cloruro de sodio por cloruro de colina; sin embargo cuando el medio de incubación es solución de Krebs-Ringer fosfato pH 7'4 con glucosa 10 mM, potasio 105 mM carente de calcio, el etanol a todas las concentraciones ensayadas disminuye el consumo de oxígeno cerebral.

2.2. Efecto sobre el consumo de oxígeno de corteza cerebral de rata adulta y neonata tratadas crónicamente con etanol.— El etanol administrado crónicamente a ratas adultas disminuye el consumo de oxígeno de cortes de cerebro de rata incubados en solución de Krebs-Ringer fosfato pH 7'4 con glucosa 10 mM, potasio 105 mM carente en calcio. El etanol disminuye el consumo de oxígeno de cortes de cerebro de ratas neonatas cuyas madres fueron tratadas crónicamente con etanol en los tres medios de incubación empleados.

### 3. Efecto del etanol sobre el peso de las ratas neonatas.

El peso de las ratas neonatas normales ha sido de  $6.3 \pm 1.2$  gramos, superior en un 10.5 por ciento (P menor de 0.05 al peso de las ratas neonatas de las madres pretratadas con etanol cuyo peso fue de  $5.7 \times 0.2$  gramos.

## DISCUSIÓN

El etanol por su efecto estabilizador de membrana bloquea el intercambio de sodio disminuyendo la conductancia a este ion (17-18), también inhibe la actividad ATP asa de membrana Na-K dependiente (19) "in vitro" en rata adulta y neonata; sin embargo en tratamiento crónico Israel y col (19) y Rangaraj y col (7) han descrito un incremento de la actividad Na-K dependiente de membrana en homogeneización de cerebro de rata hasta 24 horas después de la última dosis de etanol. Los experimentos presentados en la Tabla I en rata adulta confirman estos hallazgos. El estímulo de la actividad ATP asa Na-K dependiente en rata adulta tratada crónicamente con etanol es revertido por la presencia "in vitro" de hemineurina y clonidina. La actividad ATP asa no sensible a ouabaína "in vitro" es incrementada por la presencia de etanol en homogeneizados de corteza cerebral de rata adulta y neonata; sin embargo esta actividad no es modificada por el tratamiento crónico con etanol en ratas adultas y neonatas. En ratas neonatas cuyas madres fueron tratadas crónicamente con etanol, se observa una inhibición de la actividad ATP asa Na-K dependiente de membrana que es revertida "in vitro" por la presencia de hemineurina a la concentración 0'001 mM.

El etanol "in vitro" a las concentraciones ensayadas únicamente inhibe el consumo de oxígeno de cortes de cerebro de rata adulta y neonata cuando el medio de incubación contiene exceso de potasio y es carente de calcio, situación experimental en la que tiene lugar la mayor estimulación catiónica (16), comportándose el etanol a este respecto como la mayor parte de los depresores no selectivos del sistema nervioso central (20'21). Administrado crónicamente inhibe el consumo de oxígeno de cortes de cerebro de rata adulta y de ratas neonatas cuyas madres fueron tratadas crónicamente con etanol.

La clonidina "in vitro" no modifica la actividad ATP asa de membrana sodio-potasio dependiente, pero inhibe la actividad

ATP asa no sensible a ouabaína en rata adulta normal (22); en los experimentos presentados en la Tabla I se observa que inhibe la actividad ATP asa de membrana Na-K dependiente e incrementa la actividad ATYP asa no sensible a ouabaína en homogeneizados de corteza cerebral de rata neonata normal.

La hemineurina "in vitro" no modifica la actividad ATP asa de membrana sodio-potasio dependiente, ni la actividad ATP asa no sensible a ouabaína en rata adulta normal (23), pero inhibe la actividad ATP asa Na-K dependiente de membrana e incrementa la actividad ATP asa no sensible a ouabaína en homogeneizados de corteza cerebral de rata neonata (Tabla 1).

La clonidina y la hemineurina revierten los efectos de la administración crónica de etanol en ratas adultas sobre la actividad ATYP asa Na-K dependiente de membrana y la hemineurina revierte la inhibición de la actividad ATP asa Na-K dependiente de homogeneizados de corteza cerebral de ratas neonatas cuyas madres fueron tratadas crónicamente con etanol. La hemineurina es un fármaco muy útil en el tratamiento del síndrome de abstinencia aguda al etanol (10) y la clonidina se emplea en el tratamiento del síndrome de abstinencia a opioides (11).

Con el presente trabajo se quiere hacer evidente como niveles de alcoholemia alcanzables en clínica, poseen un claro efecto sobre el transporte activo iónico, así como la importante repercusión que puede tener el etanol en la embarazada, contribuyendo de esta forma al estudio del síndrome alcohólico-fetal.

## BIBLIOGRAFIA

- BROWN, A.M., LEW, V.L. (1983). The effect of intracellular calcium on sodium pump of human red cells. *J. Physiol.* 343: pp 455-493.
- ALLEN, J.C., NAVRAN, S.S. (1984). Role of Na pump in smooth muscle contractile regulation. *Trends in Pharmacol. Sci.* 5: pp 462-463.

- ROCKER, E. (1976). A new look at mechanism in bioenergetics. Academic Press Inc. N.Y.
- SPIRES, D.D. WEINER, M.W. (1980). Use of uncoupling agent to distinguish between direct stimulation of metabolism and direct stimulation of transport: investigation of antidiuretic hormone and aldosterone. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 214: pp 507-515.
- LEE, H., HOSEIN, E.A., ROVINSKI, B. (1983). Effect of chronic ethanol feeding and withdrawal on rat liver plasma membranes structure and function: a study of binding of (3H) prazosin to membrane bound adrenergic receptor. *Biochem. Pharmacol.*, 32: pp 1321-1323.
- HUNT, G.R.A., JONES, I.C. (1983). A <sup>1</sup>H NMR investigation of the effect of ethanol and general anesthetics on the ion channels and membrane fusion using unilamellar phospholipid membranes. *Biochem. Biophys. Acta.* 736: pp 1-10.
- RANGARAJ, N.J., KALANT, H. (1984). Effect of ethanol tolerance on Norepinephrine-Ethanol inhibition of (Na-K) adenosine triphosphatase in various regions of rat brain. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 231: pp 416-421.
- YAMAMOTO, H.A., HARRIS, R.A. (1983). Effects of Ethanol and barbiturates on Ca-ATPase activity of erythrocyte and brain membranes. *Biochem. Pharmacol.*, 32: pp 2787-2791.
- RANGARAJ, N.J. KALANT, H. (1978). Effects of ethanol withdrawal, stress and amphetamine on rat brain (Na-K)-ATPase. *Biochem. Pharmacol.*, 27: pp 1139-1144.
- VELASCO, A. MORENO, A. (1987). Hipnóticos y sedantes, en *Farmacología y su proyección a la Clínica*, 15 Edición, Lorenzo Velázquez, B. (Editor), Editorial Oteo, Madrid pp 361-371.
- CASARES, S., YAÑEZ, R., GAMO, E., JOSPE, A., GIMILIO, J. (1981). Deshabitación de opiáceos con clonidina en pacientes ambulatorios. *Psicopatología*, 4 pp 375-379.
- WU, P.H., PHILLIS, J.W. (1981). The effect of noradrenaline on Na-K transport in rat cerebral cortical slices. *Eur. J. Pharmacol.*, 69 pp 529-532.
- FISKE, C.H., SUBBAROW, Y. (1925). Determination of inorganic phosphorus. *J. Biol. Chem.*, 66: pp 375-381.
- UMBREIT, R.H., BURRIS, R. W., STAUFFER, J.F. (1972). *Manometric and Biochemical Techniques*, Burgess Publishing Co. 5th Edition, Minneapolis.
- GUBITZ, R.H., AKERA, T., BRODY, T.M.: (1977). Control of brain slice respiration by (Na-K) activated adenosine triphosphatase and the effects of enzyme inhibitors. *Biochem. Biophys. Acta* 459 pp 263-271.
- VELASCO, A., GONZALEZ, J.L. (1978). Efecto de la composición del medio de incubación sobre el metabolismo oxidativo celular de rata «in vitro», *Anales de la Real Academia Nacional de Medicina*, 95 pp 641-654.
- MULLIN, M.J., WALTER, A.H. (1985). Action of Ethanol on voltage sensitive sodium channels; effects on Neurotoxin-stimulated sodium uptake in synaptosomes, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 232: pp 413-419.
- HARRIS, A.A., BRUNO, P. (1985). Effects of Ethanol and other intoxicant-Anaesthetics on Voltage-dependent sodium channels of Brain synaptosomes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 232: pp 401-406.
- ISRAEL, Y., KALANT, H., LAUFER, F. (1965). Effects of Ethanol on NaK Mg-stimulated microsomal ATPase activity, *Biochem. Pharmacol.*, 14: pp 1802-1807.

- QUASTEL, J.H. (1975). Effect of drugs on energy metabolism of the brain and on cerebral transport en *Principales of Psychopharmacology* vol. V, L.L. Iversen and S.S. Iversen (Editors), Plenum Press, New York pp 1-46.
- VILLALAIN, J.D., RAMOS, M.T. (1974). Estudio del metabolismo oxidativo en ratas alcohólicas. *Segundas Jornadas Toxicológicas*. Sevilla pp 211-219.
- GONZALEZ, J.L., VELASCO, A. (1982). Efecto de d-anfetamina y clonidina sobre la actividad adenosintrifosfatasa y consumo de oxígeno asociado en cerebro de rata «in vitro». *Arch. de Farmacol. y Toxicol.*, 8: pp 13-20.
- BARRIGON, J.C., ALVAREZ, F.J., DUEÑAS, A., GARCIA-ROLDAN, J.L. VELASCO, A. (1984). Efecto de la Hemineurina sobre el metabolismo oxidativo de diversos tejidos de rata «in vitro». *Arch. de Neurobiol.*, 47: pp 37-44.

**TABLA 1: EFECTO AGUDO ("in vitro") Y CRONICO DEL ETANOL SOBRE LA ACTIVIDAD ATP asa Na-K Y ATP asa NO SENSIBLE A OUABAINA EN HOMONEIZADOS DE CORTEZA CEREBRAL DE RATA ADULTA Y NEONATA: SU MODIFICACION POR HEMINEURINA.**

Valores medios  $\pm$  E.S.M. de fosfato inorgánico liberado por mg de proteína y hora.

	Rata adulta			Rata neonata		
	n	ATP asa Na-k	ATP asa no sensible a ouabaína	n	ATP asa Na-k	ATP asa no sensible a ouabaína
<b>Efecto agudo "in vitro"</b>						
Control	10	7,80 $\pm$ 0,60	10,80 $\pm$ 0,50	8	4,45 $\pm$ 0,30	5,34 $\pm$ 0,24
Etanol mM 100	10	7,30 $\pm$ 0,30	9,80 $\pm$ 0,40	—	—	—
70	10	6,50 $\pm$ 0,50	10,70 $\pm$ 0,90	8	0,50 $\pm$ 0,04*	10,50 $\pm$ 0,17*
50	10	6,80 $\pm$ 0,40	13,20 $\pm$ 0,50*	8	2,28 $\pm$ 0,31*	10,18 $\pm$ 0,33*
30	10	5,10 $\pm$ 0,50**	14,40 $\pm$ 0,50	8	0,43 $\pm$ 0,01*	8,93 $\pm$ 0,07*
10	10	5,70 $\pm$ 0,30*	12,60 $\pm$ 0,30*	8	0,67 $\pm$ 0,11*	8,86 $\pm$ 0,15
Control	—	—	—	10	2,91 $\pm$ 0,27	10,00 $\pm$ 0,44
Clonidina 0,001 mM	—	—	—	10	2,04 $\pm$ 0,22***	11,54 $\pm$ 0,29*
Hemineurina 0,001 mM	—	—	—	10	1,51 $\pm$ 0,12*	11,22 $\pm$ 0,25***
<b>Efecto crónico</b>						
Control	9	8,50 $\pm$ 0,61	9,62 $\pm$ 0,91	10	2,91 $\pm$ 0,27	10,00 $\pm$ 0,44
Etanol	12	10,81 $\pm$ 0,70***	9,60 $\pm$ 0,51	10	1,21 $\pm$ 0,13*	11,98 $\pm$ 1,01
Clonidina 0,001 mM	12	8,20 $\pm$ 0,62	10,50 $\pm$ 1,71	—	—	—
Hemineurina 1 mM	10	6,00 $\pm$ 0,50	7,70 $\pm$ 0,90	—	—	—
0,001 mM	12	8,40 $\pm$ 0,40	10,90 $\pm$ 1,40	10	2,87 $\pm$ 0,12*	12,14 $\pm$ 0,76

\* P menor de 0,01; \*\* P menor de 0,02; \*\*\* P menor de 0,05

**TABLA 2: EFECTO AGUDO "IN VITRO" Y CRONICO DEL ETANOL SOBRE EL CONSUMO DE OXIGENO DE CORTESES DE CEREBRO DE RATA ADULTA Y NEONATA EXPRESADO EN MICROLITROS/100 mg DE TEJIDO FRESCO/HORA (Valores medios  $\pm$  E.S.M)**

Se han empleado los siguientes medios de incubación:

**Medio A:** Solución de Krebs-Ringer fosfato pH 7,4 con glucosa 10 mM.

**Medio B:** Solución de Krebs-Ringer fosfato pH 7,4 con glucosa 10 mM, potasio 105 mM, carente en calcio.

**Medio C:** Solución de Krebs-Ringer fosfato pH 7,4 con glucosa 10 mM potasio 105 mM, carente en calcio en el que se ha sustituido cloruro de sodio por cloruro de colina.

Efecto agudo in vitro	Rata adulta			Rata neonata		
	Medio A	Medio B	Medio C	Medio A	Medio B	Medio C
Control	179,6 $\pm$ 15,1	208,5 $\pm$ 14,0	104,5 $\pm$ 7,7	108,3 $\pm$ 12,5	140,7 $\pm$ 15,7	95,7 $\pm$ 10,0
Etanol mM 100	154,4 $\pm$ 9,7	143,1 $\pm$ 10,8*	104,5 $\pm$ 6,5	82,1 $\pm$ 5,1	97,9 $\pm$ 5,5**	70,6 $\pm$ 7,6
70	172,1 $\pm$ 13,5	150,0 $\pm$ 9,0*	103,0 $\pm$ 10,0	86,1 $\pm$ 2,4	94,2 $\pm$ 6,4**	70,5 $\pm$ 6,0
50	186,8 $\pm$ 13,5	153,3 $\pm$ 7,0*	117,9 $\pm$ 13,5	87,7 $\pm$ 4,4	95,3 $\pm$ 7,7**	74,1 $\pm$ 5,3
30	171,9 $\pm$ 13,7	137,1 $\pm$ 9,2*	85,7 $\pm$ 7,0	82,2 $\pm$ 7,0	90,2 $\pm$ 3,7**	75,3 $\pm$ 7,0
10	178,3 $\pm$ 18,0	156,7 $\pm$ 14,4**	91,2 $\pm$ 6,2	94,2 $\pm$ 4,4	102,0 $\pm$ 9,6***	79,9 $\pm$ 7,1
<b>Efecto crónico</b>						
Control	162,5 $\pm$ 10,2	206,0 $\pm$ 14,9	104,3 $\pm$ 11,2	109,4 $\pm$ 13,5	141,0 $\pm$ 16,0	96,0 $\pm$ 9,1
Etanol	134,3 $\pm$ 5,4**	159,8 $\pm$ 14,8*	110,4 $\pm$ 8,6	80,0 $\pm$ 2,1***	97,3 $\pm$ 9,0**	63,6 $\pm$ 6,1*

El número de experimentos en ningún caso ha sido inferior a siete

\* P menor de 0,01; \*\* P menor de 0,02; \*\*\* P menor de 0,05