

Efecto del Tributiltin Cloruro sobre la V-ATPasa Presente en el Músculo Liso Traqueal

G Pacheco¹, L Guerra¹, G Francis¹, I Lippo¹, R González¹ y M Alfonso¹.

1. Sección de Biomembranas, Instituto de Medicina Experimental y Cátedra Patología General y Fisiopatología, Escuela Luís Razetti, Facultad de Medicina. Universidad Central de Venezuela.

RESUMEN

En este trabajo se demuestra que la actividad de V-ATPasa presente en fracciones de membrana plasmática del músculo liso de las vías aéreas es inhibida de manera específica y a baja dosis por el cloruro de tributil tin (TBT). Este compuesto representa una de las sustancias tóxicas, de gran utilización en la industria y se ha demostrado que puede afectar a las células y tejidos de humanos con una potencialidad para producir enfermedades.

Palabras Claves: V-ATPasa, Músculo liso, Membrana plasmática.

Abstract

In this work, it is demonstrated that the V-ATPase activity presents in a plasma membrane fraction from tracheal smooth muscle is specifically inhibited by tributyl tin chloride (TBT). This compound belongs to a great family of toxic pollutants with broad use in modern industry and they can affect humans tissues and cells and produce diseases.

Key Words: V-ATPase, Smooth muscle, Plasma membrane.

INTRODUCCIÓN

Los compuestos órgano-metálicos del tipo alquiltin, en particular el tributiltin (TBT), son sustancias empleadas como limpiadores de las cañerías en la industria a nivel marino. Estos compuestos son sumamente tóxicos para la flora marina^(1,2) y en humanos^(3,4,5). Recientemente se ha demostrado que estos compuestos son capaces de inhibir las V-ATPasas en mamíferos^(6,7).

Las ATPasas vacuolares (tipo V) son enzimas que generalmente participan en procesos fundamentales de las células; ellas hidrolizan ATP, generando un gradiente de protones el cual es usado para la acidificación de los compartimientos celulares, tales como lisosomas^(8,9) vesículas de Golgi⁽¹⁰⁾, vesículas rodeadas de clatrina⁽¹¹⁾, sinápticas y endocíticas⁽¹²⁾ y funcionan exclusivamente como bombas de protones dependientes de ATP⁽¹³⁾.

Las V-ATPasas han sido descritas a nivel de la membrana plasmática, en numerosos tipos de células, especialmente en la células epiteliales de riñones de vertebrados donde pueden estar relacionadas con los procesos de acidificación celular⁽¹⁴⁾, también participan en la destrucción activa de la matriz ósea, donde participa el osteoclasto⁽¹⁵⁾, así como también en la membrana plasmática del acrosoma del espermatozoide y del tracto reproductor masculino^(16,17). También están presentes en el epitelio de la córnea, donde su principal función está referida a la regulación de la presión del globo ocular^(18,19).

Una V-ATPasa, asociada a una fracción de la membrana plasmática del Músculo Liso de las Vías Aéreas (MLVA), ha sido recientemente caracterizada por nosotros^(20,21).

Las V-ATPasas son enzimas multiméricas con una composición de subunidades análoga a las Fo.F1 ATPasas, poseen un dominio hidrofílico V1, involucrado en la hidrólisis de ATP (dominio catalítico) y un dominio hidrofóbico Vo enlazado a la membrana y responsable de la conductancia de protones⁽⁶⁾.

Varios compuestos inhiben indistintamente las ATPasas de tipo V y F, siendo uno de ellos el ciclohexil carbodimida (DCCD), el cual reacciona covalentemente con un polipéptido transmembrana que forma el canal para la conductancia de protones⁽²²⁾. Los compuestos triaril tin, inhiben a las ATPasas de tipo F y V⁽²³⁾. En trabajos con mitocondrias aisladas, se ha establecido que estos compuestos son inhibidores potentes de la síntesis de ATP mitocondrial, inhibiendo directamente la ATP sintetasa, y se ha determinado que el Tributyl tin cloruro (TBT) es un catalizador efectivo en el intercambio anión/hidróxido e inhibe la fosforilación oxidativa mitocondrial de una manera similar a como lo hace la oligomicina^(8,9,10). El desacoplamiento inducido por el TBT es atribuido a la acción de un intercambio cloruro/hidróxido, seguido por la salida de cloruro de la mitocondria^(24,25). Así mismo, Apps y Webster⁽²²⁾ han descrito que el TBT es un poderoso inhibidor de la V-ATPasa en gránulos cromafines de la médula suprarrenal.

Debido a la gran homología existente entre las V y F ATPasas, en este trabajo nos propusimos determinar el efecto del TBT sobre la actividad de la V-ATPasa presente en el MLVA, con la finalidad de caracterizar el efecto de este alquil tin sobre este tipo de V-ATPasa.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los siguientes compuestos, fueron adquiridos de la casa Sigma: ATP (ácido adenosin trifosfato) (A5394), TBT, Trizma base, MES, Sacarosa, PMSF (fenil metil sulfonil fluoruro) y DTT (Ditiotreitol). El resto de los reactivos químicos fueron de las casas Merck (Alemania) y Fisher (USA).

Las membranas plasmáticas (fracción P1) fueron aisladas del músculo liso traqueal de bovino, siguiendo el método de fraccionamiento subcelular descrito por Lippo et al⁽²⁶⁾. Luego, dicha fracción P1 fue extraída con una alta fuerza iónica en un medio que contiene: Tris-HCl 20 mM, pH 7,2; Sacarosa 0.3 M; DTT 0.5 mM y KCl 0.6 M en una relación 1:40. La extracción se realizó en frío con agitación por 1 hora y luego se centrifugó a 150.000 g por 30 minutos. El sedimento se lava dos veces con el amortiguador de resuspensión que contiene: Tris-MES 20 mM pH 7,2; Sacarosa 0.3 M

y DTT 0.5 mM y se resuspende en un volumen determinado hasta obtener una concentración final aproximada de 1 mg/ml de proteínas. Este fue el material biológico utilizado en la realización de los experimentos que se describen a continuación:

Determinación de la actividad de ATPasa: La ATPasa se determinó siguiendo el procedimiento descrito previamente⁽¹⁷⁾. El medio de incubación básico contiene amortiguador Tris-MES 30 mM pH 6,8; MgCl₂ 5 mM y KCl 150 mM, el volumen final de incubación es de 1 ml. Después de agregar el TBT, a cada una de las concentraciones ensayadas, se les añadió entre 20 a 30 mgs de proteínas de membranas plasmáticas (fracción P1) tratadas como se describió previamente y se pre-incubó 5 minutos a 37 °C. Posteriormente se agregó el ATP a una concentración final de 5 mM y se incubó 1 minuto a 37 °C. La reacción se detuvo agregando 100 µl de TCA (ácido tricloroacético) frío al 50%. Se centrifugó a 3000 x g por 10 minutos a 4 °C y el sobrenadante se guardó a -80 °C para la ulterior determinación del fosfato al día siguiente.

La cuantificación del fosfato liberado se hizo según el método de Fiske-Subbarow⁽²⁷⁾ modificado por nosotros en cuanto al tiempo y temperatura de incubación⁽²⁰⁾. La actividad de la V-ATPasa = Actividad ATPásica en presencia de 150 mM KCl - Actividad ATPásica en ausencia de KCl.

Para la determinación de la concentración de proteínas se usó el método de Lowry⁽²⁸⁾ modificado por Bensadoun y Weinstein⁽²⁹⁾.

RESULTADOS

Efecto del TBT sobre la actividad de la V-ATPasa

La [Figura 1](#) muestra la actividad de la V-ATPasa en presencia y ausencia de KCl 150 mM en el medio de incubación, y a concentraciones crecientes de TBT. Se observa que en la presencia de KCl 150 mM, la actividad de la Mg²⁺-ATPasa disminuye a medida que aumenta la concentración de TBT hasta una concentración de 10 µM. A elevadas concentraciones (>10 µM) de TBT, este compuesto inhibió la Mg²⁺-ATPasa con una menor intensidad (No mostrado). Puede observarse en la [Figura 1](#), que la actividad de la V-ATPasa se inhibe en función de la concentración de TBT. Así, se puede observar que a una concentración entre 5 y 10 µM de TBT hay una inhibición de la actividad de la V-ATPasa de aproximadamente 75%. Es importante enfatizar que la actividad basal (sin KCl) de la ATPasa no fue sensible al TBT lo cual sugiere a la V-ATPasa como el sitio de acción de este compuesto.

En la realización de estos estudios, se observó que las preparaciones frescas de membranas plasmáticas eran poco sensibles al TBT y que la sensibilidad a dicho compuesto dependía del período de almacenamiento de las preparaciones a -80 °C, como se puede observar en la [Figura 2](#). Así, en presencia de 0.15 M KCl, la actividad basal de la Mg²⁺-ATPasa disminuyó en un 10% hasta 12 días de almacenamiento mientras que la inhibición por el TBT (10 µM) fue un 10% (3 días) alcanzando un 40% (12 días). Adicionalmente se encontró que la actividad basal de ATPasa se mantiene constante hasta 30 días de almacenamiento⁽²⁰⁾ (No mostrado).

En un intento para entender la inhibición de la V-ATPasa por los compuestos, alquil-tin se procedió a una titulación del TBT en membranas plasmáticas con más de 15 días de

almacenamiento (Figura 3) y se encontró que el TBT mostró dos cinéticas de inhibición; una a bajas concentraciones que parece corresponder a la evaluada en la Figura 1 y otro proceso, a concentraciones mayores que 20 μM del TBT que parece ser inespecífico.

Figura 1: El efecto del TBT sobre la actividad del Mg^{2+} ATPasa presente en las membranas plasmáticas del músculo liso traqueal

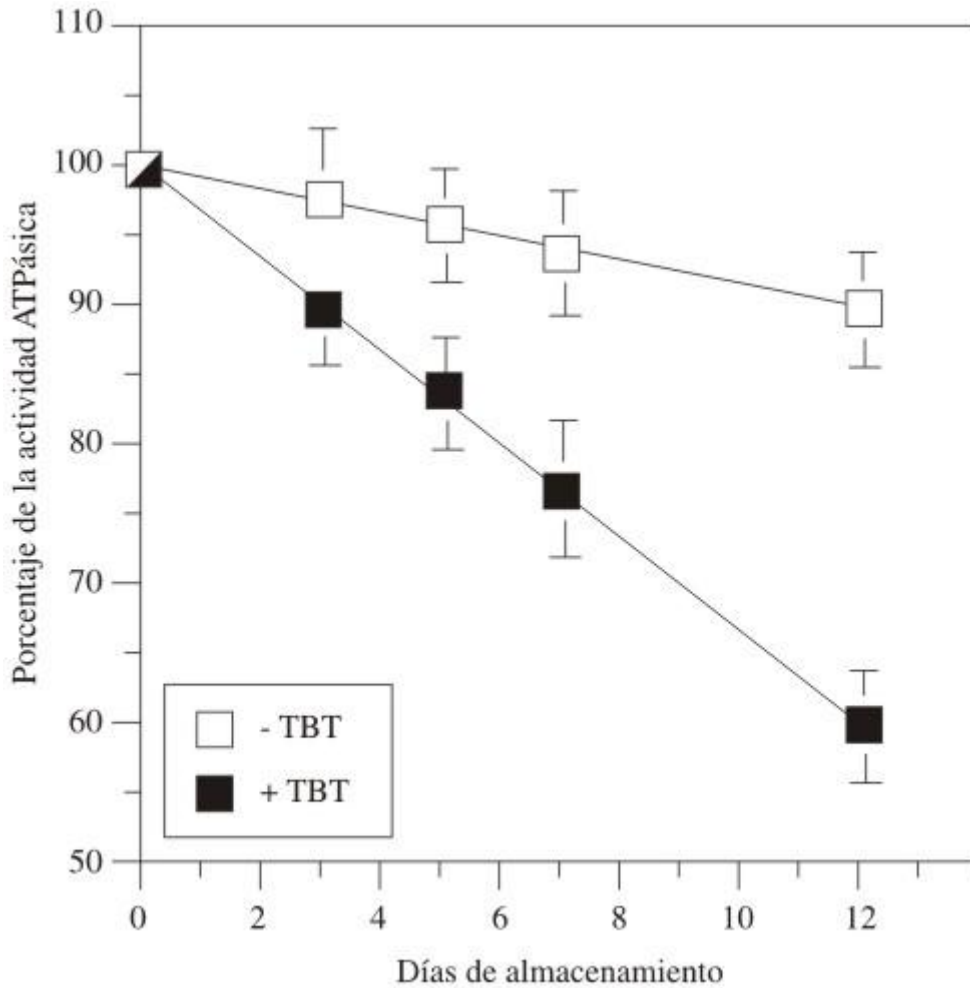


Figura 2: El efecto del tiempo de almacenamiento sobre la inhibición ejercida por el TBT (10 μM) sobre la V-ATPasa

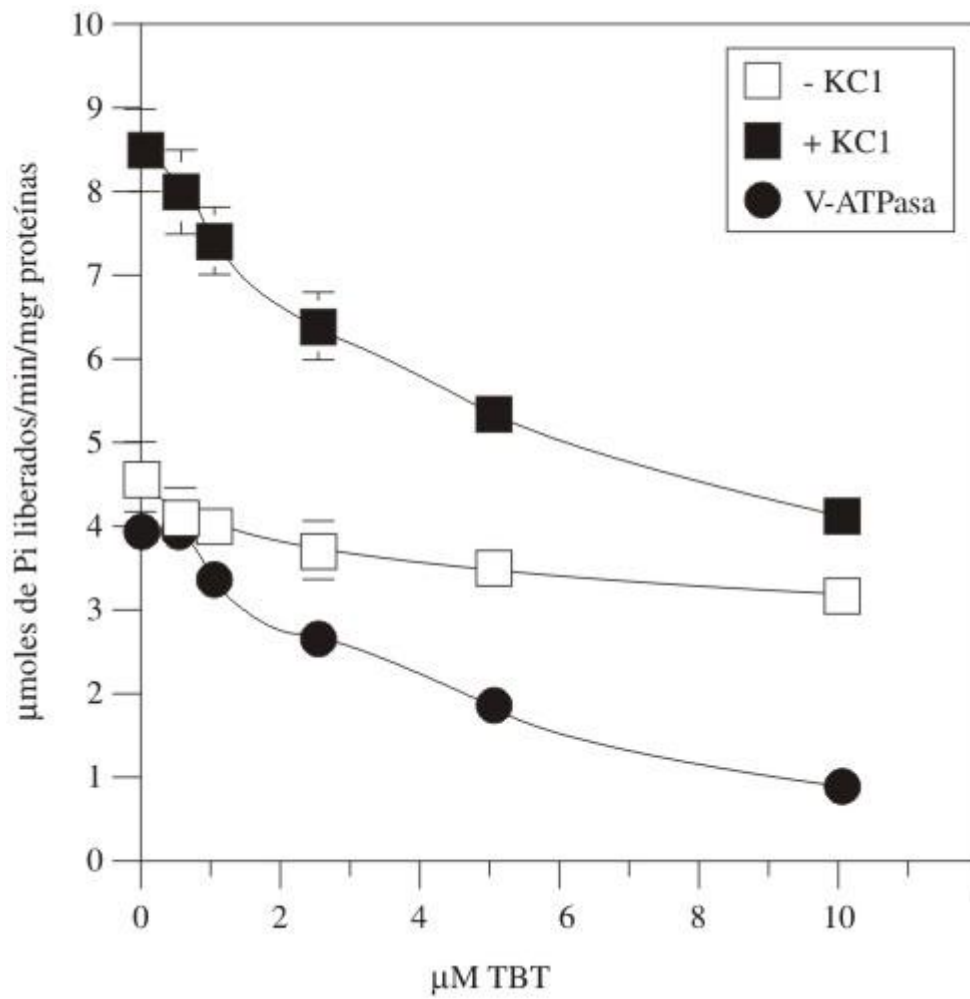
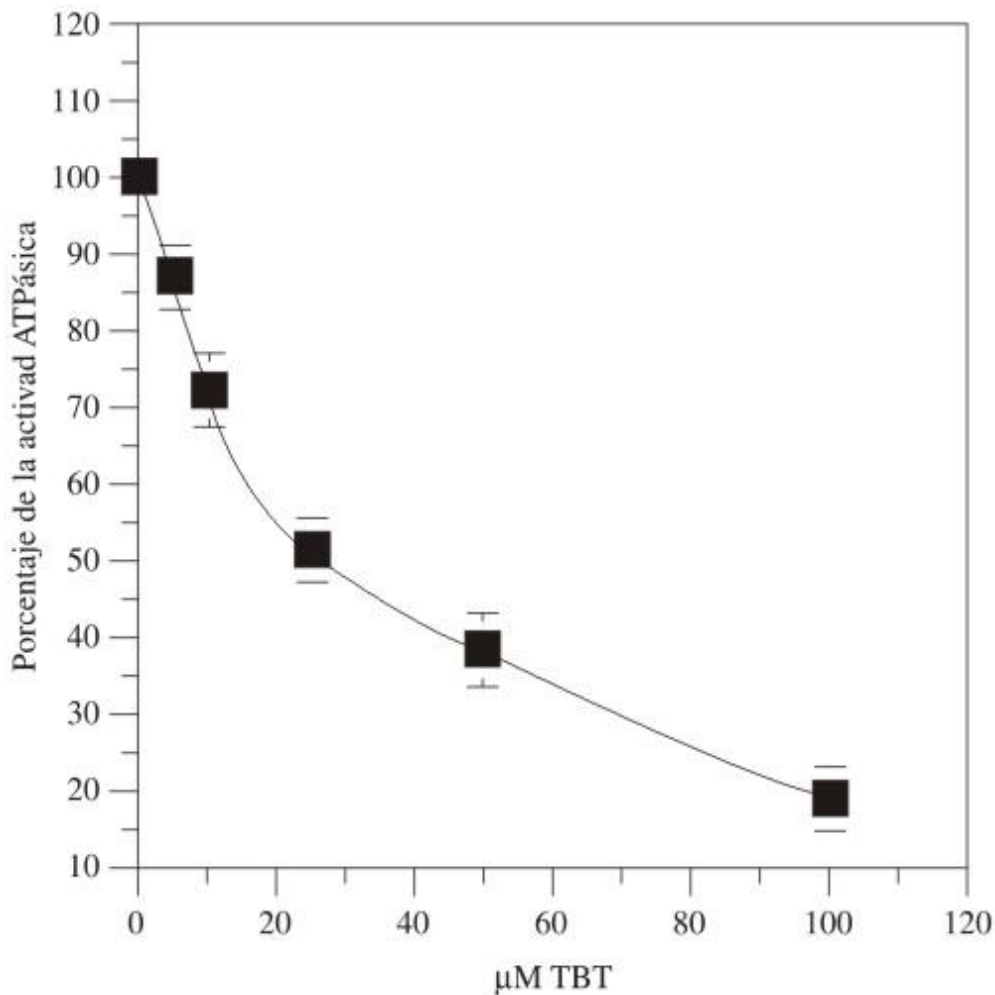


Figura 3: El efecto del TBT sobre la V-ATPasa en fracciones de membranas de más de 12 días de almacenamiento



DISCUSIÓN

Los compuestos alquil-tin son sustancias que se utilizan como ingredientes de pinturas de uso industrial para evitar el crecimiento de seres marinos (Fouling)⁽³⁰⁾ sobre estructuras inmersas en el mar. Estos órgano-metálicos son incorporados al plancton marino⁽²⁾ y de esta manera estos compuestos pasan a las cadenas alimenticias que conducen hasta el humano, como resultado del consumo de productos de origen marino⁽¹⁾.

El tributil-tin (TBT) y el trifenil-tin (TFT) son capaces de inducir apoptosis, afectando el desarrollo de líneas celulares humanas, como es el caso del linfocitoma Jurkat-t⁽⁴⁾. Efectos tóxicos similares se han descrito para líneas celulares de neuroblastoma⁽³⁾. También, estas sustancias pueden alterar, de manera significativa, las funciones de las células del sistema inmunológico humano como son las células NK (Natural Killer)⁽¹⁸⁾ y los linfocitos⁽³⁾.

En este trabajo se demuestra que el TBT a bajas concentraciones y de manera específica inhibe la actividad de la V-ATPasa presente en las membranas plasmáticas del músculo liso traqueal. Esta inhibición parece ser similar a la inhibición encontrada para la V-ATPasa de los gránulos cromafines⁽¹²⁾ en los cuales se han descrito modificaciones que afectan el sitio catalítico de esta enzima, el cual se encuentra localizado en la subunidad A (72Kda). Aún más, otros autores han descrito que el TBT puede afectar el transporte

de protones a través del sector Vo de la V-ATPasa⁽⁶⁾. La conducción de protones ocurre a través de un canal formado por la subunidad del proteolípido (16Kda)⁽⁶⁾. Es factible que en nuestro caso, ambos componentes como son la subunidad A y el 16Kda-proteolípido pudiesen ser los afectados por el TBT dependiendo de la concentración del compuesto alquil-tin.

De nuestros resultados se puede inferir que otras V-ATPasas de importancia médica como las que se encuentran localizadas en las células epiteliales del riñón^(31,32), en la membrana plasmática del osteoclasto^(14,15) y en el acrosoma del espermatozoide humano⁽¹⁶⁾ son sistemas biológicos que pueden ser afectados por estos compuestos alquil-tin.

AGRADECIMIENTOS

Los autores desean agradecer el financiamiento recibido del CDCH a través del proyecto No. 09-33-4259-98 y a la Licenciada Violeta N. de Herrera, por la preparación de las membranas plasmáticas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Shim WJ, Ok JR, Kahng SG, Shim JH and Kee SH. Accumulation of tributyl and triphenyl tin compounds in Pacific Oyster (*Crassostrea gigas*) from the chinese bay system Korea. Arch. Environ. Contam Toxicol. 1998; 35: 41-47.
2. Aima F, Ballarin L, Bressa G and Burighel P. Cytoskeletons alterations by tributyltin (TBT) in tunicate phagocytes. Eco. Toxicol. Environ. Saf. 1998; 1: 160-165.
3. Oortgiesen M, Visser E, Vijverberg HP and Seinen W. Naunyn-Schmiedeberg's Differential effects of organotin compounds on voltage-gated potassium currents in lymphocytes and neuroblastoma cells. Arch. Pharmacol. 1996; 353: 136-143.
4. Stridh H, Onrenius S and Hampton MB. Caspase involvement in the induction of apoptosis by the environmental toxicants tributyltin and triphenyltin. Toxicol. Appl. Pharmacol. 1999; 156: 141-146.
5. Karpiak VC and Eyer CL. Differential gliotoxicity in organotins. Cell Biol Toxicol. 1999; 15: 261-268.
6. Hughes G, Harrison MA, Dim Y, Griffiths DE, Finbow ME y Fidlay JB. Interaction of dibutyltin-3-hydroxyflavone bromide with the 16 kDa proteolipid indicates the disposition of proton translocation sites of the vacuolar ATPase. Biochem J. 1996; 317: 425-331.
7. Webster LC, Griffiths D y Apps D. Interaction of Vacuolar-Type H⁺ ATPases with fluorescent organotin-flavone complexes. Biochem. Soc. Trans. 1993; 21: 253.

8. Moriyama Y y Nelson N. Cold inactivation of vacuolar H⁺ATPasas J. Biol. Chem. 1989; 264: 3577-82.
9. Arai K, Shimaya A, Hiratanu N y Ohkuma S. Purification and characterization of lysosomal H⁺ATPase. J. Biol.Chem. 1993; 268: 5649-5660.
10. Moriyama Y y Nelson N. H⁺-translocating ATPase in Golgi apparatus: Characterization as vacuolar H⁺ATPase and its subunit structures. J. Biol. Chem. 1989; 264: 18445-18450.
11. Xie X-S, Sone DK y Racker E. Proton pump of clathrin-coated vesicles. Methods Enzymol. 1988; 157: 634-646.
12. Moriyama Y, Maeda M y Futai M. The role of V-ATPase in neuronal and endocrine systems J. Exp. Biol. 1992; 172: 171-178.
13. Bowman EJ, Siebers A y Altendorf K. Bafilomycins: A class of inhibitors of membrane ATPases from microorganisms, animal cells and plant cell. Proc. Natl. Acad. Sci. Usa. 1988; 85: 7972-76.
14. Baron RM, Bartkiewicz P David y Hernando-Sobrino J. Acidification and bone resorption: the role and characterization of V-ATPase in the osteoclast. In: Organellar Proton ATPases, edited by N. Nelson. Austin, TX: Landes, 1995.
15. Chatterjee DM, Chakraborty M, Leit L, Neff S, Samsa-Kellokumpu, R. Fuchs y R. Baron. Sensitivity to vanadate and isoforms of subunits a and b distinguish the osteoclast proton-pump from other vacuolar H⁺ATPase Proc. Natl. Acad. Sci. USA.1992; 89: 6257-6291.
16. McLeskey SB, Dowds C, Carballada R, White RR y Saling PM. Molecules involved in mammalian sperm-egg interaction. Int. Rev. Cytol.1998; 177: 57-113.
17. Nelson N. Structure and pharmacology of the proton-ATPases. Trends Pharmacol. Sc. 1991; 12: 71-75.
18. Whalen MM, Laganathan BG y K Kannam. Immunotoxicity and environmentally relevant concentrations of butyltins on human natural killer cells «in vitro». Environ. Res. 1999; 81: 108-116.
19. Nelson N. y Harvey WR. Vacuolar and Plasma Membrane Proton-Adenosinotriphosphatases. Physiol. Rev. 1999; 79:/2 361-385.
20. Pacheco G, Lippo de BI, González de AR y Alfonso M. Biochemical characterization of a V-ATPase of tracheal smooth muscle plasma membrane fraction. Biochemica et Biophysica Acta. 1996; 1282: 182-192.
21. Pacheco G, González de Alfonso R, Lippo de Becemberg I y Alfonso MJ. Papel de las H⁺ATPasa en las membranas plasmáticas del músculo liso de las vías Aéreas. Acta Cient, Vzla. 1993; 44: 111-119.

22. Apps D y Webster L. Interaction of Organotins With a Vacuolar-Type H⁺ATPase, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 1996; 227: 839-845.
23. Apps DK y Pryde JG, Sutton R y Phillips JH. Inhibition of adenosine triphosphatase, 5-hydroxytryptamine transport and proton-translocation *Biochem J.* 1980; 190: 173-282.
24. Stockdale M, Dawson AP y Selwyn MJ. Effects of Trialkyltin and Triphenyltin compounds on Mitochondrial Respiration. 1970; 15: 342-351.
25. Emanuel EC, Carven MA, Solani GL y Griffiths DE. Differential inhibition of Fo. F1-ATPase-catalysed reactions in bovine-heart submitochondrial particles by organotin compounds. *Biochem. Biophys. Acta* 1984; 766: 209-214.
26. Lippo de Becemberg I, Correa de Adjounian MF, Sánchez de Villarroel RS, Peña de Aguiar E, González de Alfonso R y Alfonso M. G-protein-sensitive guanylyl cyclase associated with plasma membranes. *Arch. of Biochem and Biophys.* 1995; 324: 209-215.
27. Fiske CH y Subbarow Y. The colorimetric determination of phosphorus. *J. Biol. Chem.* LXVI(2). 1925; 375-400.
28. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL y Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol Chem.* 1951; 193: 265-275.
29. Bensadoun A y Weinstein D. *Anal. Biochem.* 1976; 70: 241-250.
30. De Sousa G, Delescluse C, Pralavorio M, Perichuad M, Avon M, Lafaurie M y Rahmani R. Toxic effects of several types of antifouling paints in human and rat hepatic or epidermal cells. *Toxicol letters.* 1998; 96-97: 41-46.
31. Mellman I, Fuchs R y Helenius A. Acidification of the endocytic and exocytic pathways. *Annu. Rev. Biochem.* 1986; 55: 663-700.
32. Harvey WR. Physiology of V-ATPases. *J. Exp Biol.* 1992; 172: 1-17.