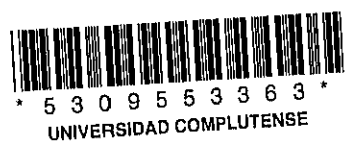


19.268

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE BIOLOGIA
DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA Y BIOLOGIA MOLECULAR



**MODULACION POR EL FACTOR INHIBIDOR
HIPOTALAMICO-HIPOFISARIO DE LA ACTIVIDAD
(Ca²⁺,Mg²⁺)ATPasa Y DEL TRANSPORTE DE Ca²⁺ EN
SINAPTOSOMAS Y RETICULO SARCOPLASMICO**

Autor
Mercedes Rieo Pacheco
Mercedes Rieo Pacheco

Vº Bº Director
Dr. José M. Sancho Rof
José M. Sancho Rof

TESIS DOCTORAL

Madrid, 1994

A mi familia

A Manolo

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo se ha llevado a cabo en el Servicio de Endocrinología del Hospital Ramón y Cajal con el soporte económico del Fondo de Investigaciones Sanitarias de la Seguridad Social y de la Fundación Rich.

Deseo expresar mi agradecimiento a todas aquellas personas que han hecho posible la realización de este trabajo y muy especialmente, al Dr. Jose M. Sancho Rof, director de esta Tesis, por haberme brindado la posibilidad de su realización e iniciarme en la investigación.

También quiero agradecer al Dr. Carlos Gutiérrez Merino el haberme recibido en su laboratorio como uno más, por su gran profesionalidad, su inestimable colaboración y su optimismo.

Mi gratitud a la Dra. Elena García Martín por su ayuda experta, por su trato familiar y cariñoso que hicieron de mi trabajo algo agradable.

A Jesús, por el día a día, eso que es tan difícil, su gran capacidad de trabajo y por supuesto, por haberme aguantado durante todo este tiempo.

A la Dra. Lucinda Cacicedo por su amabilidad y cariño durante todos estos años.

Al Dr. Enrique Méndez por sus consejos en el HPLC.

Al Dr. José M. López Novoa y Alicia Rodríguez del Departamento de Fisiología y Farmacología de la Universidad de Medicina de Salamanca por su colaboración y amabilidad.

A Fernando Pazos por hacerme comprender que todo está en los manuales, sin su ayuda no habría sido posible que este trabajo estuviese escrito y las gráficas dibujadas.

Agradezco también la inestimable colaboración de todo el personal de las Bibliotecas de este Hospital.

Al Dr. Francisco Montero del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad Complutense, por su amable disposición a ser tutor de esta Tesis.

Y por último un millar de gracias para cada una de las personas a quien he tenido la alegría y la suerte de conocer: a mis compañeros de laboratorio por haber compartido todos estos años de trabajo, su ayuda y cariño en todo momento, a mis amigas por haber creído en mí y estar siempre a mi lado, y a mis compañeros y amigos del Departamento de Bioquímica de la Universidad de Extremadura que han hecho posible que conozca, quiera Badajoz y les eche de menos.

INDICE

ABREVIATURAS

INTRODUCCION

1. Inhibidores fisiológicos de la (Na ⁺ ,K ⁺)ATPasa	2
1.1. Distribución tisular	2
1.2. Estructura química	9
2. Relación entre EDLF, alteraciones del transporte de membrana e hipertensión	10
3. Homeostasis celular del Ca ²⁺	10
4. Transporte de Ca ²⁺ a través de la membrana plasmática	12
4.1 Intercambio Na ⁺ /Ca ²⁺	13
4.2 Bomba de Ca ²⁺ dependiente de ATP	13
5. Actividad adenosintrifosfatasa en sinaptosomas	17
6. Retículo sarcoplásmico: estructura, función y composición	19
6.1. (Ca ²⁺ +Mg ²⁺)ATPasa de retículo sarcoplásmico	20
7. (Na ⁺ ,K ⁺)ATPasa	23
7.1. Estructura	23
7.2. Actividad	25
7.3. Inhibidores de la bomba de Na ²⁺	26
8. Alteraciones en el metabolismo del calcio	26
9. Reactividad vascular	30
OBJETIVOS	33
MATERIALES Y METODOS	
1. Reactivos	34
2. Extracción del tejido	34
3. Purificación	35
3.1. Cromatografía de filtración en gel	35
3.2. Cromatografía líquida de alta resolución	35

4. Detección mediante multifotodiodos en HPLC de HHIF	36
5. Espectrofotometría UV/Vis	36
6. Reacción cruzada con anticuerpos anti-digoxina	36
7. Ultrafiltración	36
8. Análisis de aminoácidos	37
9. Oxidación con ácido perbórico	37
10. S-piridetilación	37
11. Digestión enzimática	37
12. Purificación de la $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{ATPasa}$	38
13. Preparación de sinaptosomas	38
14. Preparación de vesículas de la membrana plasmática derivadas de sinaptosomas	39
15. Preparación de vesículas del retículo sarcoplásmico	40
16. Purificación de la $(\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+})\text{ATPasa}$ a partir de membranas del retículo sarcoplásmico	41
17. Reconstitución de la ATPasa en vesículas de fosfatidilcolina	42
18. Determinación de la concentración de proteína	42
19. Diálisis	42
20. Medida de la actividad ATPasa	43
20.1. Sistema enzimático acoplado piruvato quinasa-lactato deshidrogenasa	43
20.2. Determinación de fosfato inorgánico	45
21. Unión de ^3H -ouabaína a la $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{ATPasa}$	45
22. Medidas de captación de Ca^{2+} dependiente de ATP en vesículas	46
23. Medida de la permeabilidad de vesículas por dispersión de luz	46
24. Medida del flujo de Ca^{2+} con clortetraciclina	50
25. Niveles de Ca^{2+} en estado estacionario en vesículas del retículo sarcoplásmico	51
26. Medidas de velocidad del transporte en presencia de oxalato	53
27. Determinación del Ca^{2+} intracelular en células mesangiales de rata	53
28. Medidas de fluidez de membranas	54
29. Determinación del coeficiente aparente de partición (K_p) de HHIF en la membrana de sinaptosomas	56

30. Tratamiento de datos	57
30.1. Determinación del tiempo de relajación	57
30.2. Cálculo de la concentración de calcio libre	57

RESULTADOS

1. Purificación	60
2. Efecto de HHIF sobre la (Na ⁺ ,K ⁺)ATPasa purificada. Estudios de dependencia de la concentración. Comparación con ouabaína	69
3. Reacción cruzada con anticuerpos antidigoxina	69
4. Propiedades físico-químicas	72
4.1. Comparación con otros compuestos	72
4.2. Estudios de ultrafiltración	73
4.3. Reducción a cenizas	73
4.4. Efecto de la temperatura	73
4.5. Hidrólisis ácida	73
4.6. Digestión enzimática: Incubación con fosfolipasa C o pronasa E	74
4.7. Oxidación con ácido per fórmico	74
4.8. Hidrólisis básica	74
4.9. Preincubación con BSA	75
4.10. Análisis de amonoácidos	75
4.11. Influencia del pH sobre la fluorescencia de HHIF	75
5. Modulación de la actividad (Ca ²⁺ ,Mg ²⁺)ATPasa de sinaptosomas y de vesículas de membrana plasmática sinaptosomal por HHIF	77
5.1. Actividades adenosintrifosfatasa de sinaptosomas y de vesículas derivadas de membrana plasmática sinaptosomal	77
5.2. Efecto de HHIF sobre las actividades adenosintrifosfatasa en sinaptosomas y en vesículas derivadas de membrana plasmática	79
5.2.1. Inhibición de la actividad (Ca ²⁺ ,Mg ²⁺)ATPasa total por HHIF	79
5.2.2. Inhibición de la actividad (Na ⁺ ,K ⁺)ATPasa por HHIF	82
6. Estudio sobre el mecanismo de inhibición de la actividad (Ca ²⁺ ,Mg ²⁺)ATPasa por HHIF	83
6.1. Efecto de HHIF sobre la fluidez de la membrana plasmática en sinaptosomas	83
6.2. Efecto de HHIF sobre la dependencia de la actividad (Ca ²⁺ ,Mg ²⁺)ATPasa respecto a ATP	86
6.3. Efecto de HHIF sobre la modulación de la actividad (Ca ²⁺ ,Mg ²⁺)ATPasa por Ca ²⁺	89
7. Efecto de HHIF sobre el transporte de Ca ²⁺ en sinaptosomas	92
7.1. Transporte activo de Ca ²⁺	92
7.2. Flujo pasivo de Ca ²⁺	93
7.3. Efecto de HHIF sobre el intercambio Na ⁺ /Ca ²⁺	95
8. Modulación de la actividad (Ca ²⁺ + Mg ²⁺)ATPasa del retículo sarcoplásmico	98

8.1. Efecto de HHIF sobre la actividad $(Ca^{2+} + Mg^{2+})ATPasa$ en membranas del retículo sarcoplásmico	99
8.2. Efecto de HHIF sobre la fluidez de la membrana del retículo sarcoplásmico	103
8.3. Efecto de HHIF sobre la acumulación de Ca^{2+} en estado estacionario y sobre la velocidad inicial de Ca^{2+} por el retículo sarcoplásmico	105
8.3.1. Acumulación activa de Ca^{2+} en estado estacionario	105
8.3.2. Velocidad inicial del transporte de Ca^{2+}	106
8.4. Efecto del Mg^{2+} -ADP sobre la inhibición de la actividad ATPasa por HHIF	107
8.5. Efecto del Ca^{2+} sobre la inhibición de la actividad $(Ca^{2+} + Mg^{2+})ATPasa$ por HHIF	108
8.6. Efecto de HHIF sobre la inactivación de la $(Ca^{2+} + Mg^{2+})ATPasa$ por isotiocianato de fluoresceína	108
8.7. Extinción de la fluorescencia intrínseca del retículo sarcoplásmico por HHIF	109
9. Modulación por HHIF de la actividad $(Ca^{2+} + Mg^{2+})ATPasa$ purificada de retículo sarcoplásmico	110
9.1. Inhibición por HHIF de la actividad $(Ca^{2+} + Mg^{2+})ATPasa$ purificada de RS	110
9.2. Efecto del Ca^{2+} y del Mg^{2+} -ADP sobre la inhibición de la actividad ATPasa purificada por HHIF	112
10. Efecto de HHIF sobre la actividad $(Ca^{2+} + Mg^{2+})ATPasa$ reconstituida en vesículas de fosfatidilcolina	114
11. Efecto de HHIF sobre la concentración de Ca^{2+} intracelular en células mesangiales	116
 DISCUSION	
1. Purificación de un inhibidor endógeno de la $(Na^+, K^+)ATPasa$	118
2. Modulación por HHIF de la actividad $(Ca^{2+} + Mg^{2+})ATPasa$ de la membrana plasmática sinaptosomal	120
3. Modulación de la actividad $(Ca^{2+} + Mg^{2+})ATPasa$ del retículo sarcoplásmico de músculo esquelético	121
4. Mecanismo de inhibición de la actividad $(Ca^{2+} + Mg^{2+})ATPasa$ de la membrana plasmática sinaptosomal y del retículo sarcoplásmico por HHIF	123
5. Efecto de HHIF sobre el transporte de Ca^{2+} en sinaptosomas	128
6. HHIF e hipertensión	133
CONCLUSIONES	134
BIBLIOGRAFIA	136
APENDICE I	152
APENDICE II	155

ABREVIATURAS

A23187	Calcimicina
ADN _c	Acido desoxirribonucleico complementario
ARN	Acido ribonucleico
ATP	Adenosin 5'-trifosfato
ATP _{asa}	Adenosintrifosfatasa
β -ME	β -mercaptoetanol
BSA	Albúmina de suero bovino
Butil-PBD	[2-(4-difenil-5-p-ter-butilfenil)-1,3,4-]-oxadiazol
cpm	Cuentas por minuto
CTC	Clorotetraciclina
DCCD	Diciclohexilcarbodiimida
DHEA-S	Sulfato de deshidroepiandrosterona
DLA	Actividad similar a digoxina
DMSO	Dimetil-sulfóxido
D.O.	Densidad óptica
DOC	Deoxicolato
DOCA	Acetato de deoxicorticosterona
DPH	1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno
DS	Desviación estándar
DTT	Ditiotreitol
EDLF	Endogenous Digitalis-Like Factor
EDTA	Acido etilén-diamin-tetraacético
EGTA	Acido etilenglicol-bis-(β -aminoetiléter)- N,N,N',N'- tetraacético
ES	Error estándar
FITC	Isotiocanato de fluoresceína
HHIF	Factor Inhibidor Hipotalámico Hipofisario
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
IP ₃	Inositol 1,4,5-trifosfato
I ₉₀	Intensidad de dispersión de luz a 90°
K _{0,5}	Concentración de efector a la cual se produce el 50% del efecto
K _p	Coefficiente de partición

λ	Longitud de onda
λ_{exc}	Longitud de onda de excitación de fluorescencia
λ_{em}	Longitud de onda de emisión de fluorescencia
LDH	Lactato deshidrogenasa
Mes	Acido 2-(N-morfolino)etanosulfónico
NAD ⁺	Nicotinamín adenín dinucleótido (forma oxidada)
NADH	Nicotinamín adenín dinucleótido (forma reducida)
NBD-Cl	7-cloro-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol
NEM	N-etil-maleimida
n_H	Indice de Hill
nm	Nanometros
p/p	Peso/peso
p/v	Peso/volumen
PEP	Fosfoenolpiruvato
PK	Piruvato quinasa
PM	Peso molecular
PMCA	Bomba de Ca ²⁺ de la membrana plasmática
PMSF	Fluoruro de fenil-metil-sulfonilo
rpm	Revoluciones por minuto
RS	Retículo sarcoplásmico
SDS	Dodecil sulfato sódico
$t_{1/2}$	Tiempo preciso para que transcurra el 50% de un proceso cinético de primer orden
TCA	Acido tricloroacético
Tes	Acido 2-{[2-hidroxi-1,1-bis(hidroximetil)etil]-amino}etanosulfónico
TFA	Acido trifluoroacético
TNP-ATP	2',3'-O-(2,4,6-trinitrofenil)adenosin-5'-trifosfato
Tr	Tiempo de retención
Tris	Tris-(hidroximetil)-aminometano
U	Unidades arbitrarias de inhibición
U.A.	Unidades arbitrarias
U.I.	Unidades internacionales de actividad enzimática

INTRODUCCION

Durante los últimos 30 años se han ido acumulando una serie de observaciones experimentales que han llevado al concepto de la existencia de una hormona natriurética circulante cuyo mecanismo de acción sería la inhibición de la bomba de sodio de manera similar a un **digitálico** endógeno. En 1961 de Wardener postuló que el efecto natriurético asociado con la expansión de volumen intravascular estaría mediado por una sustancia humoral. En una serie de experimentos de circulación cruzada observó que el plasma de animales sometidos a expansión de volumen producía un marcado aumento de la natriuresis en el animal sometido a circulación cruzada. Al estar controlada la presión de perfusión y no haber cambios en los niveles circulantes de mineralocorticoides la conclusión fue que, al menos en parte, el efecto natriurético estaría producido por un factor humoral circulante que actuaría directamente en la reabsorción tubular de sodio sin afectar la hemodinámica renal.

Estas observaciones fueron confirmadas mediante experimentos más controlados en los que se evitaban los cambios en la composición plasmática producidos por la infusión de suero salino (Bahlman y cols., 1967; Kaloyanides y Azer, 1971). Posteriormente diversos autores intentaron confirmar mediante distintas técnicas *in vitro* que esta hipotética sustancia actuaría inhibiendo directamente el transporte de sodio en el túbulo renal y no a través de cambios hemodinámicos. Para ello se utilizaron tanto segmentos aislados de túbulo renal (Fine y cols., 1976) como la medición de cambios en el transporte de sodio activo en vejiga de sapo, que es considerado como un análogo de la nefrona distal humana (Bourgoignie y cols., 1971; Hauptert y Sancho, 1979). De esta manera se confirmó que distintos extractos de plasma, orina o tejidos con actividad diurética *in vivo* tenían un efecto inhibitor del transporte de sodio transepitelial y que esta alteración del transporte se asociaba a una inhibición de la (Na^+,K^+) ATPasa (Hillyard y cols., 1976).

Respecto al origen de esta hipotética sustancia se postuló el sistema nervioso central como sitio de producción. Esta hipótesis estaba basada en experimentos en los que lesiones en la región anteroventral del tercer ventrículo cerebral prevenían la aparición de hipertensión mediada por expansión de volumen en modelos animales (Pamnani y cols., 1981; Songu-Mize y cols., 1982). La hipótesis formulada por Haddy y Overbeck (1976) consistía en que la aparición de un inhibidor circulante de (Na^+,K^+) ATPasa estaría relacionada con la patogénesis de estos tipos de hipertensión, lo cual explicaría las observaciones de una disminución de la actividad (Na^+,K^+) ATPasa en tejidos de animales con hipertensión producida por expansión de volumen (Haddy y Overbeck, 1976). Este inhibidor modularía la reabsorción tubular de sodio y el tono de la musculatura vascular a través de la regulación de la actividad de la (Na^+,K^+) ATPasa. Esta modulación del tono vascular, según la hipótesis de Blaustein, se realizaría a través de la inhibición de la bomba de sodio que produciría un

aumento del calcio libre citosólico (Blaustein, 1977a; Rasgado-Flores y cols., 1989).

1. INHIBIDORES FISIOLÓGICOS DE LA (Na⁺,K⁺)ATPasa.

La expansión aguda del volumen extracelular o la sobrecarga de sodio en sujetos sanos induce la producción de un inhibidor de la bomba de sodio que provocaría la disminución de la reabsorción renal de sodio, restableciendo el balance sódico y pudiéndose detectar dicha inhibición en plasma y orina (de Wardener y MacGregor, 1980; MacGregor y de Wardener, 1984; Haber y Hauptert, 1987; Buckalew y Gruber, 1984; Buckalew y cols., 1987). La estrecha relación establecida entre la ingesta de sodio e hipertensión junto con la demostración de una actividad anormal de (Na⁺,K⁺)ATPasa y un aumento del sodio intracelular en pacientes con hipertensión arterial condujo a la hipótesis ya reseñada (Blaustein, 1977a) de que en pacientes con hipertensión esencial existiría una elevación de sustancias con acción semejante a glicósidos cardíacos (Endogenous Digitalis-Like Factor, EDLF). Según esta hipótesis la elevada producción de un inhibidor de la bomba de sodio contribuiría fundamentalmente a la elevación de la presión arterial a través de un aumento del tono vascular. Este aumento sería producido por un aumento de la entrada de Ca²⁺ secundario a la inhibición del transporte de sodio. Esta hipótesis se ha visto apoyada por la observación de una correlación positiva entre niveles de tensión arterial y la concentración en plasma de niveles de inhibidor (Hamlyn y cols., 1982; Poston y cols., 1981; Moreth y cols., 1986, 1987; Poston, 1987; Cloix y cols., 1988). En apoyo del papel jugado por esta o estas sustancias EDLF también están las observaciones de la detección de un inhibidor de la bomba de sodio en distintas situaciones de aumento de volumen circulante como en la hipertensión de embarazo, neonatos, insuficiencia renal crónica y cirrosis hepática (Buckalew y Gruber, 1984; Haddy y cols., 1987; Poston, 1990).

1.1. Distribución tisular.

Todos los compuestos endógenos inhibidores de la bomba de Na⁺ descritos en la actualidad podrían ser clasificados en cuatro grupos según Schoner (1991): A) glicósidos cardíacos endógenos, B) factor hipotalámico, C) derivados de ácidos grasos insaturados y D) inhibidores peptídicos de bajo peso molecular. Hasta el momento existirían diferentes compuestos que, de acuerdo con los datos obtenidos, podrían diferenciarse entre ellos por alguna característica bioquímica o biológica (Wechter y Benaksas, 1990) (véase Apéndice I).

1. Plasma y orina.

Debido a la hipótesis de que EDLF sería una hormona circulante, y a las observaciones de ciertos autores que detectaban actividad inhibidora en plasma (Devynck y cols., 1984b; Hamlyn y cols., 1980; Buckalew y cols., 1987; de Wardener y cols., 1987), muchos grupos han intentado purificar la hormona a partir de plasma humano o animal. Sin embargo, la existencia de diversas sustancias plasmáticas no específicas con actividad inhibidora ha dificultado enormemente la identificación y el aislamiento del EDLF. Así, en situaciones de expansión de volumen se liberan ácidos grasos libres con actividad inhibidora sobre la bomba de sodio. De ahí que varios grupos, en su intento de purificación de EDLF a partir de plasma llegaran al aislamiento de ácidos grasos libres como oleico y linoleico (Tamura y cols., 1985, 1987; Kelly y cols., 1986; Vasdev y cols., 1989). Las concentraciones plasmáticas pueden ser estimadas a partir de su actividad en ensayos biológicos, como la inhibición de captación de $^{86}\text{Rb}^+$ en hematíes o el desplazamiento de ^3H -ouabaína de su receptor en la bomba de sodio. Las estimaciones basadas en estos ensayos son de unos 20-100 pM de equivalentes de ouabaína en plasma de sujetos normales (Goto y cols., 1988a) siendo las concentraciones terapéuticas de digoxina en plasma en el rango de 1-2 nM. Existen grandes variaciones de las concentraciones de EDLF descritas en plasma debido fundamentalmente a las distintas técnicas utilizadas, especialmente cuando se utiliza la reacción cruzada con anticuerpos anti-digoxina, debido a que esta valoración sobreestimaría la determinación por la reacción cruzada de otros factores inespecíficos. Así, se han descrito concentraciones de hasta 80 nM (Devynck y cols., 1984a; Moreth y cols., 1987). La utilidad de estas determinaciones en plasma intacto o parcialmente purificado está basada, más que en valores absolutos, en la observación de cambios relativos en la concentración de EDLF ante distintas condiciones fisiológicas o en diferentes situaciones patológicas. Así, se han encontrado aumentos en la concentración relativa de EDLF con expansión de volumen (Kaloyanides y Azer, 1971; Pamnani y cols.; 1989; Inagami y Tamura, 1987), en hipertensión (Hamlyn y cols., 1982; Buckalew y Gruber, 1984; de Wardener, 1990), embarazo (Poston, 1990; Graves y Williams, 1984), neonatos (Montali y cols., 1991) o situaciones de descompensación como la cirrosis hepática (Naomi y cols., 1991).

1.a. EDLF similar a ouabaína.

Recientemente Hamlyn (1989, 1991b) ha descrito la completa purificación y caracterización de un compuesto, aparentemente idéntico a ouabaína, a partir del plasma humano. A partir del plasma de sujetos normales y mediante múltiples pasos cromatográficos logró purificar una sustancia que posee las mismas características cromatográficas de retención que ouabaína en cuatro sistemas

distintos. Este compuesto purificado presenta reacción cruzada con anticuerpos anti-ouabaína y un peso molecular idéntico medido por espectrometría de masas con FAB, además de otras características químicas como la derivatización con ácido acético anhidro. Estabiliza la conformación E₂P del enzima de forma análoga a la ouabaína. Ya que la ouabaína no es activa por vía oral, la posibilidad de que este hallazgo sea consecuencia de contaminación dietética puede ser desechada. Los autores llegan a la conclusión de que en plasma humano existe una molécula natural idéntica a ouabaína aunque no se ha descartado la posibilidad de que se trate de un isómero de la misma. Los niveles de esta sustancia en humanos normotensos es de 138 ± 43 pmol/l. Su sitio de producción podría ser la glándula suprarrenal ya que se han encontrado altas concentraciones en extractos tisulares de esta glándula en ratas, y la adrenalectomía disminuye los niveles plasmáticos, mientras que la nefrectomía unilateral o el tratamiento con DOCA los eleva. Respecto al significado fisiológico de esta ouabaína endógena hay que tener en cuenta que en preparaciones aisladas de aurícula y anillos aórticos de cobaya su efecto es igual al de ouabaína de origen vegetal aunque el efecto cardiotónico y vasotónico necesita concentraciones superiores (80 - 170 nM). Por otra parte la concentración de ouabaína medida por radioinmunoensayo se reduce, al igual que la tensión arterial después de la extirpación de adenomas en pacientes con hiperaldosteronismo primario (Masugi y cols., 1988).

Goto y cols. (1988a, 1988b) han aislado a partir de plasma y de orina un inhibidor que desplaza ³H-ouabaína de su sitio de unión en eritrocitos y es reconocido por anticuerpos anti-ouabaína, lo cual sugiere que este componente tendría una estructura esteroidea similar a ouabaína (Goto y cols., 1989a, 1992). El inhibidor aislado a partir de orina incrementa la concentración libre de calcio intracelular en cultivo de células de músculo liso vascular de rata (Goto y cols., 1988c, 1989b).

1.b. EDLF similar a digoxina.

Sustancias de características similares a digoxina y con marcada reacción cruzada con anticuerpos anti-digoxina han sido parcialmente purificadas a partir del plasma. El factor EDLF descrito por Cloix y cols. (1984, 1985, 1986, 1987) ha sido purificado a partir de orina y encontrado en plasma. Parece ser un aminoglicósido con un grupo carboxilo y tres grupos metilos que actuaría de manera similar a la digoxina de origen vegetal aunque difiere de ella en que inhibiría la Mg²⁺-ATPasa y Ca²⁺-ATPasa de microsomas de cerebro de conejo y no tendría actividad kaliurética en bioensayos.

Goto y cols. (1990, 1993) han descrito la purificación de un compuesto con características idénticas a digoxina. Este compuesto aislado a partir de orina humana tiene una movilidad cromatográfica idéntica a la digoxina de origen vegetal y por espectrometría de masas con FAB tiene un peso molecular igual y un espectro idéntico en resonancia magnética nuclear (RMN). Su concentra-

ción en plasma sería de 10-50 pM, o sea muy inferior a los niveles terapéuticos de digoxina. Este factor es incapaz de aumentar la concentración de calcio libre en cultivo de células de músculo liso vascular de rata (Goto y cols., 1989b). De acuerdo con los trabajos de Valdes esta digoxina endógena sería también producida en la glándula suprarrenal (Shaikh y cols., 1991). Este grupo ha purificado a partir de corteza suprarrenal bovina una sustancia de similar peso molecular al de la digoxina de origen vegetal, que en HPLC es ligeramente más hidrofóbica, y que presenta una absorción máxima de UV de 215 nm, siendo la de los glicósidos cardíacos de 220 nm. La composición sería una aglicona de 390 Da y varios residuos de azúcares. Su concentración en plasma sería de 728 nM y también estaría presente en extractos de otros tejidos como hígado, riñón y cerebro.

I.c. Otros.

Además de los compuestos ya descritos existen otras sustancias EDLF parcialmente purificadas del plasma que tendrían características distintas a las anteriores. Buckalew ha aislado una sustancia a partir de plasma de perro con expansión de volumen (Gruber y cols., 1980; Buckalew y Gruber, 1987; Rauch y Buckalew, 1988). Esta sustancia denominada *endoxina* no es un péptido, ni un esteroide, ni tampoco tiene características lipídicas. Interacciona con la conformación E_2 de la $(Na^+,K^+)ATPasa$ y su estructura química no es conocida. Kelly y cols. (1985, 1986) a partir de plasma normal humano aislaron tres fracciones activas de EDLF comprobando que dos de ellas eran ácidos grasos no saturados. La tercera fracción es una sustancia no proteica con una absorción UV entre 210 y 260. Tamura (1985, 1987) también aisló ácidos grasos insaturados a partir del plasma de cerdo sometido a expansión aguda de volumen. Poston y cols. (1989) han purificado EDLF a partir de suero de cordón umbilical en recién nacidos utilizando el transporte de sodio sensible a ouabaína en leucocitos como bioensayo, siendo su estructura desconocida, aunque se ha descartado que sea un péptido (Morris y cols., 1988). El grupo de Diamandis (1985) también ha purificado parcialmente una sustancia EDLF a partir de suero de cordón umbilical cuya acción inhibitoria de la captación de $^{86}Rb^+$ se explicaría en parte por las concentraciones de progesterona en los extractos. Kramer y cols. (1986, 1991) han descrito la presencia en plasma de una sustancia, posteriormente caracterizada en orina, que parece ser un péptido de peso molecular menor de 1000 Da que tiene actividad natriurética *in vivo*. Boschi y cols. (1990) han descrito la presencia de EDLF en plasma y en su posterior intento de purificación han identificado una sustancia, probablemente peptídica, de un peso molecular mayor de 1000 Da.

2. Suprarrenal.

Debido a la alta concentración de sustancias con reacción cruzada con anticuerpos anti-glicósidos cardíacos en extractos de glándulas suprarrenales y a la posible naturaleza esteroidea de este factor, este tejido ha sido considerado como posible origen del EDLF. Diversos grupos han intentado su purificación a partir de este tejido. Ya hemos mencionado en los apartados 1.a. y 1.b. sustancias EDLF de posible origen adrenal o purificadas a partir de este tejido (Doris, 1992; Shaikh y cols., 1991). Tamura e Inagami (1988, 1993) han aislado recientemente un compuesto de bajo peso molecular, menor de 350 Da, cuya estructura química es aún desconocida. Este compuesto no tiene una absorción UV característica, tiene reacción cruzada con anticuerpos anti-ouabaína e inhibe específicamente la bomba de sodio, y su actividad no es afectada por enzimas proteolíticos aunque se destruye por hidrólisis ácida y alcalina.

Schoner y cols. (1993) han purificado a partir de glándula adrenal de cerdo mediante sucesivos pasos de cromatografía de afinidad y HPLC dos componentes, uno de ellos similar a ouabaína en cuanto al tiempo de retención en HPLC y otro, en menor proporción, y más hidrofóbico, de lo cual deducen que posiblemente exista más de un factor similar a ouabaína en mamíferos.

3. Hipotálamo- hipófisis.

Pamnani y cols. (1981) describieron en ratas sometidas a expansión de volumen, que una lesión en la región AV3, disminuía el nivel de inhibidor de $(Na^+, K^+)ATPasa$. Extractos de hipotálamo bovino fueron ensayados en membrana de vejiga de sapo, tejido muy rico en bombas de sodio, para medir la corriente de cortocircuito (CCC) en microcámaras especiales e *in vitro*, con $(Na^+, K^+)ATPasa$ de médula renal de cerdo, mostrando claramente la presencia de un factor o factores sin purificar, que inhibían de forma reversible ambas actividades.

Alagband-Zadeh y cols. (1983) ensayaron diferentes tejidos de rata y encontraron en el extracto de acetona del hipotálamo una activación de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa seis veces mayor que en el correspondiente extracto de plasma. Este mismo grupo (Millet y cols., 1987) ha aislado un inhibidor de plasma humano y de rata y lo han comparado con el aislado de hipotálamo de ratas hipertensas Okamoto. El factor aislado presentó las mismas características físico-químicas en los 3 tipos de tejidos considerados. Tan sólo dos grupos (Goto y cols., 1989a; Holland y cols., 1991) han verificado la identidad de un factor similar a digoxina aislado de hipotálamo de rata y bovino, con el previamente aislado de plasma y orina humanos, pero su nivel de caracterización estructural es aún escaso.

Hauptert y Sancho (1979) llevaron a cabo la purificación parcial de un compuesto EDLF a partir de tejido hipotalámico. Extractos de acetona-éter fraccionados en cromatografía de filtración en gel inhibían el transporte de sodio en preparaciones aisladas de vejiga de sapo (*Bufo Marinus*) y la producción de fósforo inorgánico por $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{ATPasa}$ renal purificada. Además desplazaba a ^3H -ouabaína de su receptor. Posteriormente, Hauptert (1984, 1987, 1988b) ha estudiado ampliamente las características de este factor parcialmente purificado (Haber y Hauptert, 1987). Entre otras característica este factor es resistente a proteasas y fosfolipasas, actúa en la superficie extracelular de la membrana (Carilli y cols., 1985) aunque atraviesa las membranas de liposomas (Anner y cols., 1990). Inhibe la $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{ATPasa}$ de forma dosis dependiente y reversible, con una afinidad estimada de $K_i = 1,4 \text{ nM}$, con requerimientos iónicos diferentes a los de ouabaína y vanadato, y parece unirse al enzima en su conformación E_2 . Recientemente han mostrado que este inhibidor sería un isómero de la ouabaína (Tymiak y cols., 1993). En contraste con los glicósidos cardíacos, inhibe la Ca^{2+} -ATPasa de retículo endoplásmico aunque no la de membrana plasmática (Carilli y cols., 1985). También se ha descrito su efecto inotrópico (Hallaq y cols., 1989). De Wardener ha estudiado un factor purificado a partir de hipotálamo de rata, evidenciando que la actividad inhibidora de la $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{ATPasa}$ incrementa con el aumento de la ingesta de sodio (Millet y cols., 1986, 1987; Holland y cols., 1991). Este material, parcialmente purificado, induce un aumento reversible de la actividad G6PD (glucosa-6-fosfato deshidrogenasa), técnica citoquímica cuyas curvas dosis respuesta son paralelas a las obtenidas inhibiendo $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{ATPasa}$. No absorbe en el UV y parece tener un peso molecular menor de 500 Da.

Algunos autores han postulado que el hipotálamo estaría implicado en el desarrollo de la hipertensión experimental y en la inhibición de la bomba de sodio. Songu-Mize y Bealer (1993) han mostrado que una lesión del tercer ventrículo anteroventral (AV3V) reduce la inhibición del transporte de sodio y atenúa el incremento en la presión sanguínea. La búsqueda de un factor EDLF en el sistema nervioso central se ha extendido al líquido cefalorraquídeo (LCR). Se ha demostrado en LCR humano intacto un efecto inhibidor sobre la $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{ATPasa}$ (Halperin y cols., 1983). Este factor tendría características compatibles con una estructura peptídica (Halperin, 1989), su concentración en LCR aumentaría con expansión del volumen intravascular (Halperin y cols., 1985) e inhibiría la producción de LCR al igual que la ouabaína exógena.

Con respecto a que la hipófisis sea el lugar de origen del factor natriurético, las evidencias son más escasas. Sin embargo ya en 1974, se especulaba con el posible papel natriurético de las neurofisinas (Robinson y cols., 1974), aunque otros autores atribuyen los efectos natriuréticos de los extractos de los lóbulos posteriores de la pituitaria, observados en modelos experimentales en ratas,

a oxitocina y vasopresina (Quamme y cols., 1976). Sin embargo al hipofisectomizar ratas Wistar, el 70% de la actividad digoxino-mimética presente en plasma, desaparece (Pernollet y cols., 1986; Bose y cols., 1988). Encontrándose valores de actividad digitálica para el tejido hipofisario muy altos comparados con otros tejidos como cerebro, hipotálamo, corazón y riñón. Experimentos de expansión de volumen con suero salino (Lichardus y Ponec, 1973) sugieren que un componente de la cascada de la hormona natriurética pueda ser almacenado en la hipófisis posterior o en la pars intermedia. Seldakova y cols. (1974) han aislado de hipófisis posterior bovina un tridecapéptido natriurético cuya secuencia de aminoácidos se corresponde con los 13 primeros residuos de la ACTH.

4. Cultivos celulares.

El grupo de Mir, al estudiar la presencia de EDLF en hipotálamo, adoptó la estrategia de estudiar cultivos de células hipotalámicas, eliminando así las interferencias de fosfolípidos y neurotransmisores presentes en altas concentraciones en extractos tisulares (Mir y cols., 1987). Con este modelo este grupo ha demostrado la liberación en el medio de cultivo de células hipotalámicas fetales de una sustancia EDLF. Esta sustancia es destruida por enzimas proteolíticas y por hidrólisis ácida, sugiriendo una estructura peptídica (Morgan y cols., 1985).

5. Otros.

Para explicar la hipótesis de la presencia en organismos superiores de un inhibidor endógeno de la $(Na^+,K^+)ATPasa$, también se ha postulado el efecto regulador de sustancias ya conocidas. Existen derivados de la progesterona que interaccionan con el receptor para glicósidos de la $(Na^+,K^+)ATPasa$ produciendo una inhibición *in vitro*, siendo, por tanto candidatos a inhibidores endógenos de la bomba de sodio. Vasdev y cols. (1985) han aislado de plasma humano sulfato de dehidroepiandrosterona (DHEAS). El grupo de LaBella ha sintetizado un derivado 3- β -D-glucósido de la 14- β -OH-Progesterona, que además de interaccionar con el receptor digitálico, tiene un efecto inotrópico positivo sobre musculatura cardíaca de perro (LaBella y cols., 1985). Estos autores postulan que, a través de dos pasos enzimáticos, la progesterona endógena podría adoptar la configuración no planar de este compuesto y actuar como un digitálico endógeno.

Otros candidatos a esta función serían los derivados de ácidos grasos insaturados. Ya hemos mencionado que diversas búsquedas de una molécula con actividad EDLF han resultado en la purificación de ácidos grasos insaturados (Tamura y cols., 1985; Kelly y cols., 1986) aunque las concentraciones necesarias para producir inhibición de la bomba de sodio son tan elevadas que su

papel como reguladores fisiológicos es muy dudoso. Los derivados del ácido araquidónico sintetizados vía el sistema citocromo P450 han sido recientemente foco de atención como posibles reguladores endógenos de la $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{ATPasa}$ (Escalante y cols., 1993). La función de estos derivados en el control de la presión arterial no está aclarada. Su concentración está aumentada en la hipertensión arterial aunque están considerados como vasodilatadores, acción contraria a la de sustancias con actividad EDLF.

Fagoo y Godfraind (1985) han aislado un inhibidor de la bomba de sodio llamado *cardiogenina* a partir de diferentes tejidos animales y estos autores postulan que podría tratarse de un compuesto de la familia de los *lignan*os (Fagoo y cols., 1986). Estos compuestos derivados de plantas han sido identificados en orina de mamíferos (Stitch y cols., 1980), siendo el mayoritario la enterolactona.

1.2. Estructura química.

No existe, por el momento, unanimidad a la hora de establecer la naturaleza del inhibidor o inhibidores endógenos de la bomba de sodio. A causa de la gran similitud entre los efectos del inhibidor endógeno del transporte de sodio y la acción de los digitálicos en el organismo, algunos autores (Cloix y cols., 1985; LaBella y cols., 1985) han sugerido la posible naturaleza esteroidea del factor. Por otro lado autores como Kramer y cols. (1985) han apoyado la naturaleza peptídica del inhibidor, aislado de orina de sujetos sometidos a sobrecarga de sodio.

Hamlyn y cols., 1991b han aislado a partir de plasma humano un factor que estructural, biológica e inmunológicamente es indistinguible de ouabaína.

De los grupos que utilizan el tejido hipotalámico como fuente de aislamiento (Hauptert y cols., 1984; Akagawa, 1984; Morgan y cols., 1985), los hay que apoyan la naturaleza peptídica del mismo, basándose en su naturaleza zwitterónica y su sensibilidad a diferentes enzimas proteolíticas (Akagawa, 1984; Morgan y cols., 1985). Otros autores (Hauptert y cols., 1984; Millet y cols., 1987) han constatado su carácter no peptídico al comprobar su resistencia a hidrólisis ácida (Millet y cols., 1987; Haber y Hauptert, 1987). Recientemente algunos grupos han aislado un compuesto que es un isómero de la ouabaína (Tymiak y cols., 1993).

Algunos datos concernientes a su estructura química coinciden entre los diferentes grupos. El bajo peso molecular (500-1000 Da), su carácter termoestable, la desaparición de su efecto inhibidor al ser sometido a reducción a cenizas, su sensibilidad a hidrólisis básica (Akagawa, 1984; Morgan y cols., 1985; Millet y cols., 1987; Haber y Hauptert, 1987).

Incluso existen grupos que apoyan que existan dos formas moleculares del inhibidor, una no peptídica de bajo peso molecular y otra de mayor tamaño, sensible a la hidrólisis ácida (Coggins y cols., 1987). Lo que otros grupos interpretan como forma libre del inhibidor y forma asociada a una proteína (Montali y cols., 1987).

2. RELACION ENTRE EDLF, ALTERACIONES DEL TRANSPORTE DE MEMBRANA E HIPERTENSION.

Alteraciones en la homeostasis de Na^+ y Ca^{2+} son posiblemente la base del proceso vasoconstrictor que provoca la elevación en la presión arterial característica de la hipertensión esencial (Poston, 1987; Hauptert, 1988a; Aviv y Lasker, 1990; Marín, 1993).

La hipótesis descrita anteriormente que relaciona la existencia de un inhibidor de la bomba de sodio con la iniciación y el mantenimiento del mecanismo hipertensivo está basada en tres fenómenos fisiológicos bien documentados que aparecen durante la expansión de volumen en mamíferos. Estos son: la inhibición del transporte de sodio mediado por la presencia de una actividad inhibidora en plasma, la inducción de natriuresis y el aumento de la reactividad vascular. Según esta teoría estos tres fenómenos estarían producidos por un único agente común que sería de un inhibidor endógeno de la $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{ATPasa}$ que se liberaría ante el estímulo de la sobrecarga de volumen.

Por otro lado, se ha propuesto que cambios en la concentración de Ca^{2+} intracelular ($[\text{Ca}^{2+}]_i$), como consecuencia de una alteración en el transporte a través de la membrana celular, causarían directamente un aumento de la contracción arterial característica de la hipertensión (Postnov y Orlov, 1984; Hermsmeyer, 1987).

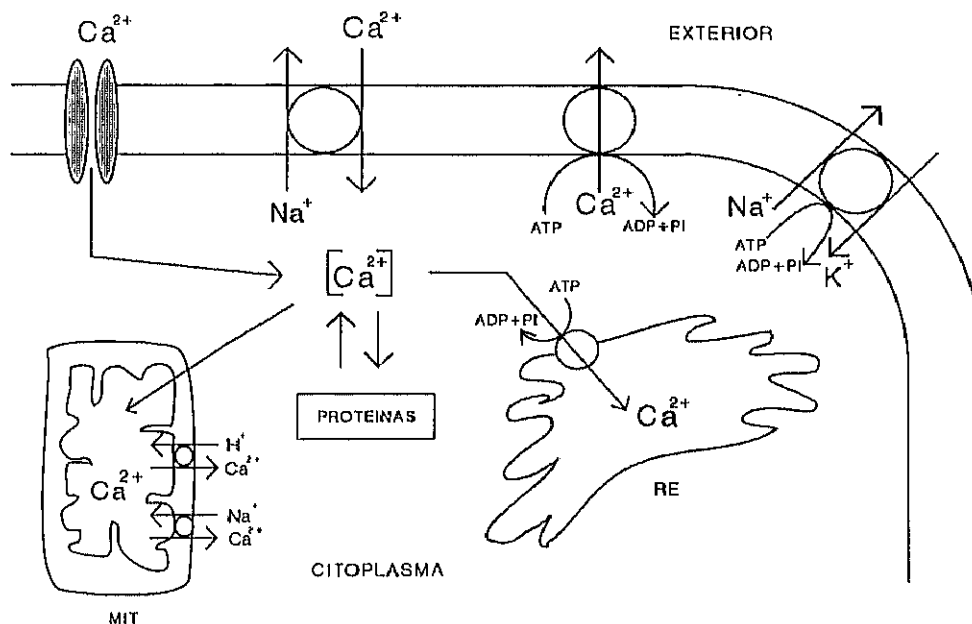
Con las recientes evidencias de que la hipertensión no está siempre asociada con un incremento en la $[\text{Na}^+]_i$ (Alkajaer y cols., 1985) y del papel central que juega el calcio (Bühler y cols., 1984), parece razonable sugerir que el objetivo de la investigación sobre hipertensión debería ser trasladado al estudio de la regulación del Ca^{2+} intracelular.

3. HOMEOSTASIS CELULAR DEL Ca^{2+} .

La concentración de Ca^{2+} libre intracelular se mantiene dentro del rango 10^{-8} a 10^{-7} M frente a 10^{-3} M en el fluido extracelular. El transporte activo de calcio contra un gradiente electroquímico a través de la membrana plasmática junto con los sistemas de transporte intracelulares juegan un papel esencial en el mantenimiento de esta baja concentración de Ca^{2+} libre (DiPolo y Beaugé, 1980). A largo plazo, la salida de Ca^{2+} a través de la membrana plasmática es el único proceso no limitado que

permite eliminar el Ca^{2+} intracelular.

Puesto que un gran número de hormonas, neurotransmisores y otros estímulos celulares son responsables de causar un incremento en la velocidad de entrada de calcio a través de la membrana plasmática (Michell, 1979), así como debido al papel de este ión en muchos procesos celulares, entre ellos el control de la excitabilidad neuronal y liberación de neurotransmisores (Akerman y Nicholls, 1983), y en el control de la contracción y relajación muscular (Hasselbach, 1964) existe un gran interés en el mecanismo por el que se alcanza este cambio en la concentración de Ca^{2+} y también en el proceso por el cual el calcio es transportado a través de la membrana plasmática en ausencia de estímulo extracelular.



Esquema 1. Esquema de los mecanismos implicados en la regulación del Ca^{2+} intracelular. Mit: mitocondria, RE: retículo endoplásmico.

Algunos de los procesos implicados en la regulación de las concentraciones de Ca^{2+} intracelular (Rega y Garrahan, 1986; Carafoli, 1987; Blaustein, 1988) incluyen: (1) la unión de Ca^{2+} a proteínas de membrana o proteínas citosólicas con una alta afinidad por Ca^{2+} , que incluyen calmodulina (CM), parvalbúmina, y una proteína que une calcio, dependiente de la vitamina D

(calbindina), (2) captación de Ca^{2+} por orgánulos intracelulares que secuestran Ca^{2+} : el retículo endoplásmico liso, mitocondrias y vesículas sinápticas, y (3) transporte de Ca^{2+} a través de la membrana plasmática.

4. TRANSPORTE DE Ca^{2+} A TRAVES DE LA MEMBRANA PLASMÁTICA.

El aumento de la concentración de Ca^{2+} intracelular en células excitables proviene de la entrada de calcio vía canales dependientes de voltaje que se abren en respuesta a la despolarización de la membrana o por liberación de Ca^{2+} de los almacenes intracelulares sensibles a Ca^{2+} o IP_3 (Pandiella y cols., 1989).

Las células disponen de dos mecanismos paralelos e independientes en su membrana plasmática para el transporte de Ca^{2+} : una bomba de Ca^{2+} dependiente de ATP ($(\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+})\text{ATPasa}$) y un sistema de intercambio $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (ausente en eritrocitos maduros) dependiente del gradiente electroquímico de Na^+ generado por la $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{ATPasa}$. En eritrocitos humanos debido a la falta de este último sistema, la concentración de Ca^{2+} intracelular es mantenida solamente por la bomba de Ca^{2+} (Lew y cols., 1982), por el contrario la salida de Ca^{2+} en células neuronales es casi enteramente dependiente de un mecanismo de intercambio $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (Blaustein, 1988; DiPolo y Beaugé, 1990). Este sistema puede promover la entrada de Ca^{2+} cuando el gradiente de concentración de Na^+ es reducido o la membrana despolarizada.

Diferentes estudios apoyan la conclusión de que los dos mecanismos existen en la membrana plasmática de las células excitables. Estos dos mecanismos coexisten en una misma población de vesículas de membrana plasmática sinaptosomal (Gill y cols., 1981), junto a canales de Na^+ y a la bomba de Na^+ dependiente de ATP (Gill, 1982).

La actividad $(\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+})\text{ATPasa}$ está bien documentada en varias fracciones subcelulares de cerebro (Rahamimoff y Abramovitz, 1978) y en la membrana plasmática sinaptosomal (Sorensen y Mahler, 1981). Además, un mecanismo de extrusión de Ca^{2+} dependiente de ATP en la membrana plasmática del axón de calamar ha sido caracterizado por DiPolo (1978). Esta membrana contiene los dos mecanismos de transporte que según Gill y cols. (1981) coexisten en la membrana plasmática sinaptosomal. Se ha mostrado que la membrana plasmática de la célula muscular contiene un sistema de intercambio $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ muy similar al encontrado en vesículas de membrana derivadas de sinaptosomas (Reeves y Sutko, 1979) y que también contiene un mecanismo de transporte de Ca^{2+} (Caroni y Carafoli, 1980).

Igual que el intercambio $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (Bersohn y cols., 1991) el proceso de transporte activo

de Ca^{2+} es muy dependiente de la temperatura y de la composición iónica del medio externo (Gill y cols., 1981).

4.1. Intercambio $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$.

Es particularmente activo en membrana plasmática de células excitables (Blaustein, 1988; DiPolo y Beaugé, 1990) aunque también está presente en células no excitables como células epiteliales y en tejido endocrino (Lee y cols., 1980).

Este sistema tiene una afinidad más baja para Ca^{2+} ($K_{\text{Ca}} = 0,5-1,0 \mu\text{M}$) que la bomba de Ca^{2+} pero una capacidad mayor de transporte (Blaustein, 1977b; Sanchez-Armass y Blaustein, 1987).

El intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ es electrogénico con una estequiometría en la mayor parte de las células de 3Na^+ por cada Ca^{2+} (Reeves, 1991), y bajo condiciones fisiológicas, la dirección del flujo de Ca^{2+} es modulada por el potencial de membrana y por el gradiente de concentración de Na^+ y de Ca^{2+} a través de la membrana (Carafoli, 1987). Este sistema de transporte es dependiente del gradiente electroquímico de Na^+ generado por la bomba de Na^+ . Puede transportar Ca^{2+} a través de la membrana sináptica en las dos direcciones dependiendo de la dirección hacia la que esté orientado el gradiente de Na^+ (Gill y cols., 1984).

Es también regulado por la concentración de Ca^{2+} intracelular. $[\text{Ca}^{2+}]_i$ estimula el influjo de calcio dependiente del Na^+ . El significado fisiológico de esta modulación por el Ca^{2+} , está en estos momentos en estudio. La entrada de calcio a través de los canales dependientes de voltaje (incremento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$) podría contribuir a favorecer la entrada de Ca^{2+} a través del intercambio $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (DiPolo y Beaugé, 1990).

El intercambio $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ es distinto de los canales de Na^+ porque tetrodotoxina no lo inhibe (Gill y cols., 1981) pero es específicamente inhibido por agentes que disipan el gradiente de Na^+ (monensina y veratridina). Consistentemente, la adición al medio externo de cationes monovalentes (Na^+ y Li^+) disminuye la captación de Ca^{2+} . El Li^+ puede inhibir el proceso por competición con el Na^+ por los mismos centros de unión. Los lantánidos inhiben aproximadamente en un 50% el intercambio $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ a una concentración de $7 \mu\text{M}$. Esta inhibición es competitiva y se produce tanto para la salida como la entrada de Ca^{2+} con valores de K_i similares en ambos casos (Rahamimoff y Spanier, 1984).

4.2. Bomba de Ca^{2+} dependiente de ATP.

La afinidad para Ca^{2+} ligeramente más alta de la bomba de Ca^{2+} puede sugerir su mayor importancia en el mantenimiento de bajos niveles de Ca^{2+} libre en condiciones de reposo dentro del citosol sináptico, mientras que la mayor capacidad de transporte y ligeramente más baja afinidad del

intercambio $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ puede indicar que este mecanismo tendría más relevancia para reducir los altos niveles de Ca^{2+} durante la activación eléctrica (Gill y cols., 1984; Sanchez-Armass, 1987; Blaustein, 1988).

Una actividad que requiere Mg^{2+} a concentraciones relativamente altas y Ca^{2+} a concentraciones submicromolares, actividad $(\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+})\text{ATPasa}$, originalmente descrita en eritrocitos, está presente en numerosas membranas plasmáticas incluyendo sinaptosomas (Gill y cols., 1981), adipocitos (Pershad Singh y McDonal, 1980), sarcolema (Caroni y Carafoli, 1980) y células musculares (Wuytack y cols., 1981). La identificación de este sistema de transporte de Ca^{2+} dependiente de ATP en diferentes tipos de células sugiere que puede ser el principal mecanismo del que dispone la célula en reposo para eliminar Ca^{2+} a través de la membrana plasmática. Un sistema similar con diferentes propiedades está presente en el retículo sarcoplásmico como describiremos posteriormente.

La ATPasa dependiente de Mg^{2+} y estimulada por Ca^{2+} en fracciones de membrana sinaptosomal es una enzima de alta afinidad hacia Ca^{2+} con valores de K_m en el rango submicromolar (Javors y cols., 1981; Sorensen y Mahler, 1981; Michaelis y cols., 1983; Gill y cols., 1981).

Existen en la bibliografía numerosos datos de distintos autores acerca de la estimulación por calmodulina (CM) de la actividad $(\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+})\text{ATPasa}$ de membrana plasmática sinaptosomal (Sorensen y Mahler, 1981; Hakim y cols., 1982) y de eritrocitos (Rega y Garrahan, 1986). Si bien el efecto estimulador de CM es un hecho probado, existen en la literatura grandes variaciones acerca de la magnitud del efecto. La ATPasa de cerebro es menos fuertemente activada por CM que lo es la de eritrocitos (Hakim y cols., 1982; Sorensen y Mahler, 1981). Estas variaciones pueden ser debidas a que en el cerebro existen altas concentraciones de proteínas capaces de unir CM (Sorensen y Mahler, 1981). Otra posible explicación puede ser que fosfatidilserina puede sustituir a CM en la activación de la $(\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+})\text{ATPasa}$ (Niggli y cols., 1981).

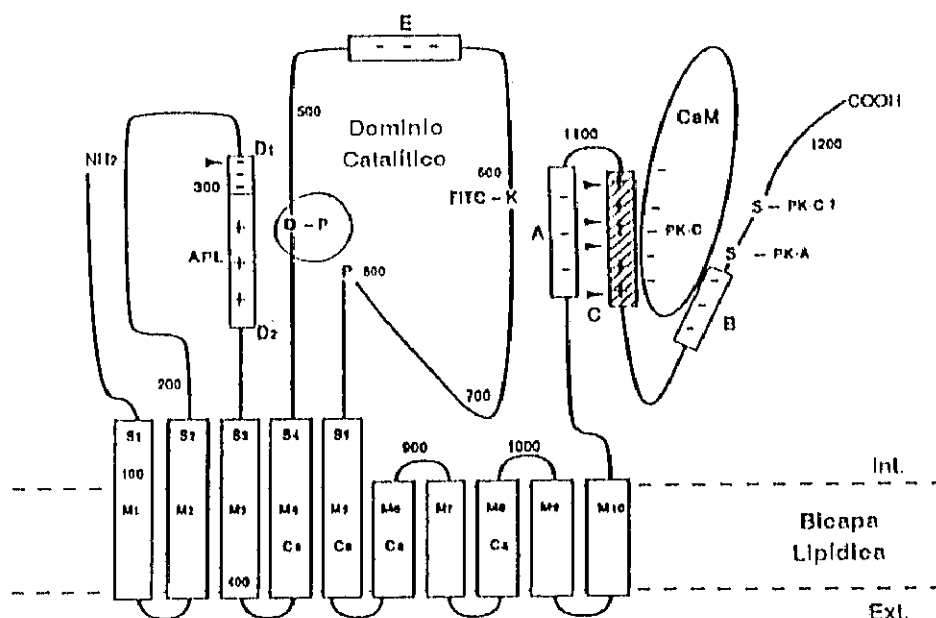
La $(\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+})\text{ATPasa}$ purificada de membrana plasmática sinaptosomal (Hakim y cols., 1982) tiene un peso molecular entre 138 y 150 KDa calculado por electroforesis en geles de poliacrilamida/SDS, siendo este similar al de la Ca^{2+} -ATPasa de membrana plasmática de eritrocitos y sarcolema (Carafoli, 1991b).

La $(\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+})\text{ATPasa}$ pertenece a la clase P-ATPasas sensibles a vanadato, según la clasificación de Pedersen y Carafoli (1987), dentro de las cuales también se incluye la $(\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+})\text{ATPasa}$ de retículo sarcoplásmico y la $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{ATPasa}$. Es estimulada, como ya hemos mencionado, por calmodulina y por diferentes tratamientos, como la presencia de fosfolípidos ácidos, proteasas, fosforilación por proteínas quinasas A o C y autoasociación para formar dímeros u oligómeros (Wuytack y Raeymackers, 1992).

4.2.1. Estructura.

La estructura primaria de la bomba de Ca^{2+} de la membrana plasmática era deducida en 1988 por Shull y Greb a partir del ADN_c aislado de cerebro de rata y por Verma y cols., de teratoma humano. La bomba de Ca^{2+} es una sola cadena polipeptídica de un peso molecular de aprox. 134 KDa, producto de una familia multigénica: 4 genes han sido encontrados en humanos, y han sido asignados a los cromosomas 1,3 y 12. Isoformas adicionales se originan a través de un procesamiento alternativo del ARN_m. Se ha sugerido que hay al menos 4 isoformas (Carafoli, 1991b). La secuencia en todas ellas está conservada excepto en la región C-terminal.

Esquema I. Modelo de la estructura secundaria de la bomba de Ca^{2+} de la membrana plasmática (Wang y cols., 1992).



El perfil de hidrofobicidad de la secuencia primaria de esta proteína, así como la homología con la bomba de Ca^{2+} de RS permite predecir la existencia de 10 α -hélices transmembranales (Carafoli, 1991b; Wang y cols., 1992), la localización de los extremos N- y C- terminales en la parte citoplasmática y tres grandes dominios que se orientan hacia la cara citosólica, el primero conecta las hélices transmembranales 2 y 3 y contiene α -hélice y hoja plegada β (aprox. 170 residuos), el segundo dominio (aprox. 400 residuos) rico en hoja plegada β está localizado entre las posibles hélices transmembranales 4 y 5. Este dominio contiene el sitio catalítico, con un residuo aspártico muy conservado en todas las ATPasas que forma el intermediario fosforilado (EP), una lisina implicada en la unión del ATP y una prolina en la posición *bisagra*.

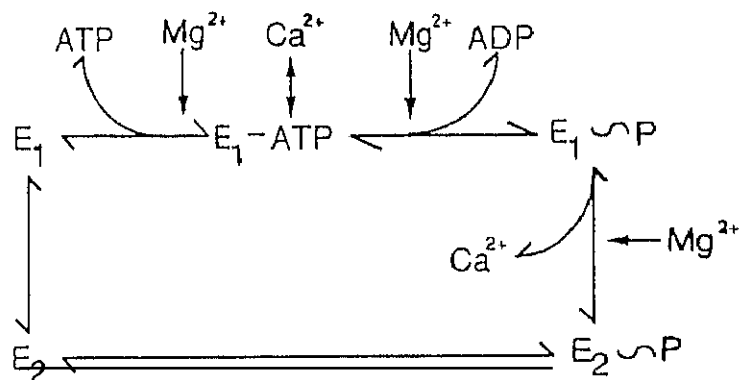
A pesar de ciertas similitudes con la bomba de Ca^{2+} del RS (Brandl y cols., 1986), la Ca^{2+} -ATPasa de membrana plasmática presenta dos dominios (A y B) que limitan un dominio básico (C) cerca del extremo C-terminal donde estaría localizado el sitio de unión de CM (aprox. 25 residuos básicos), y un dominio altamente cargado D (el cual puede ser dividido en un corto dominio ácido D_1 seguido por un dominio básico D_2) en el primer lazo citosólico donde estaría localizado el sitio de unión de los fosfolípidos ácidos.

Han sido identificadas 3 isoformas de la Ca^{2+} -ATPasa en cerebro de rata y 2 en eritrocitos humanos, que representan al menos 4 diferentes productos génicos (PMCA1-4). El ARN_m que codifica PMCA1 está presente en todos los tejidos, mientras que el de PMCA2 y PMCA3 es restringido a cerebro y músculo esquelético, respectivamente. Los eritrocitos humanos contienen isoformas PMCA1 y PMCA4 (Wang y cols., 1992; Wuytack y Raeymaeker, 1992).

Las isoformas de la bomba no muestran variaciones en los dominios conservados de las ATPasas tipo-P, que son los que se encuentran alrededor del sitio activo. La diversidad concierne a los dominios reguladores, por ejemplo, el procesamiento alternativo del ARN_m puede eliminar el dominio fosforilado por la proteína quinasa A o insertar dominios entre los subdominios A y B del sitio de unión de CM.

4.2.2. Actividad.

La $(\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+})$ ATPasa pertenece a las ATPasas tipo E_1/E_2 , con dos estados conformacionales E_1 y E_2 , que se interconvierten durante el ciclo catalítico y muestran diferentes afinidades a Ca^{2+} (Rega y Garrahan, 1986)(véase esquema)



Esquema 3. Ciclo catalítico de la bomba de Ca^{2+} de la membrana plasmática.

En el transporte de Ca^{2+} , una conformación de la enzima (E_1) con alta afinidad por Ca^{2+} es fosforilada por ATP en un residuo aspártico para formar el intermediario fosforilado $\text{Ca}^{2+}E_1P$. Este sufre un cambio conformacional a $\text{Ca}^{2+}E_2P$, con una baja afinidad por Ca^{2+} , y el Ca^{2+} es liberado al exterior de la célula, por un mecanismo no del todo conocido (de Meis y Vianna, 1979).

En su forma basal, la enzima existe en un estado de baja afinidad por Ca^{2+} ($K_{0,5}(\text{Ca})=4-20 \mu\text{M}$) y en presencia de reguladores fisiológicos incrementa su afinidad a $0,2-0,7 \mu\text{M}$. Es regulada por ATP a concentraciones submilimolares. La bomba transporta Ca^{2+} con una estequiometría de 1 ($\text{Ca}^{2+}:\text{ATP}$) (al menos en liposomas reconstituídos). Funciona predominantemente de modo electroneutro en eritrocitos, pero puede ser electrogénica en otras células incluyendo las células de musculatura lisa vascular (Furukawa y cols., 1988).

Posee una alta afinidad por Ca^{2+} . El calcio juega un doble papel regulador. Por un lado, estimula esta actividad a concentraciones submicromolar y, por otro, produce una completa inhibición en el rango submilimolar a milimolar (Sorensen y Mahler, 1981; Michaelis y cols., 1983). La respuesta bifásica de la enzima frente a la concentración de calcio parece ser una propiedad general de las bombas de Ca^{2+} de la membrana plasmática (Rega y Garrahan, 1986).

Vanadato es un inhibidor relativamente específico con una K_i aparente de $0,5 \mu\text{M}-2\mu\text{M}$ (Gill y cols., 1984, Michaelis y cols., 1983). Por el contrario, la K_i para la bomba de Ca^{2+} del retículo sarcoplásmico es de 10 a 100 veces más alta, lo cual permite diferenciar ambas actividades (O'Neal y cols., 1979). La inhibición producida por La^{3+} ha sido observada en eritrocitos, adipocitos y membrana sináptica (Schatzmann y Roelofsen, 1977; Pershadsingh y McDonald, 1980; Sorensen y Mahler, 1981). La^{3+} no inhibe la actividad ATPasa basal dependiente de Mg^{2+} (Michaelis y cols., 1983), siendo una inhibición específica de la $(\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+})\text{ATPasa}$ a la que en una concentración de $50 \mu\text{M}$ inhibe aprox. en un 80% (Michaelis y cols., 1983).

La actividad $(\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+})\text{ATPasa}$ de sinaptosomas es insensible a ouabaína y oligomicina (Michaelis y cols., 1983).

5. ACTIVIDAD ADENOSINTRIFOSFATASA EN SINAPTOSOMAS.

La aplicación de métodos de fraccionamiento celular al sistema nervioso central ha permitido el aislamiento de los sinaptosomas como unidad estructural y funcional. Estos han sido ampliamente utilizados como modelo experimental para el estudio de la actividad $(\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+})\text{ATPasa}$ de membrana plasmática, acoplada al transporte de Ca^{2+} , y de los diferentes sistemas de transporte implicados en la regulación de la homeostasis celular de Ca^{2+} en las células nerviosas.

Sorensen y Mahler (1981) han descrito en membrana sináptica de corteza cerebral de rata tres

actividades ATPasa funcionalmente distinguibles por su dependencia de iones metálicos divalentes y su respuesta a cationes monovalentes e inhibidores: Mg^{2+} -ATPasa, Ca^{2+} -ATPasa y $(Ca^{2+} + Mg^{2+})$ ATPasa, esta última se manifiesta en presencia de ambos iones como una estimulación por Ca^{2+} por encima de la actividad máxima medida en presencia solamente de Mg^{2+} .

La actividad ATPasa dependiente de Mg^{2+} (Mg^{2+} -ATPasa) parece exhibir algunas características descritas para la actividad electrogénica que transporta protones asociada con vesículas que almacenan neurotransmisores (Toll y Howard, 1978). Otro posible origen de esta actividad enzimática podría ser una ATPasa del tipo de la miosina o actomiosina o proteínas asociadas a microtúbulos, unidas a la cara interna de la membrana sináptica (White y cols., 1980). No obstante, en estas membranas existe una concentración muy baja de miosina, lo cual junto con la respuesta de la enzima a algunos inhibidores específicos (Sorensen y Mahler, 1981), como NEM, permite considerar poco probable una contribución significativa de la actividad ATPasa de miosina o actomiosina. La actividad relativamente baja asociada a tubulina en preparaciones purificadas de la proteína (White y cols., 1980) hace que no sea probable una contribución sustancial de esta actividad a la membrana sinaptosomal. Recientemente ha sido descrito un proceso de eflujo activo de Mg^{2+} a través de la membrana plasmática de sinaptosomas dependiente de ATP y que es inhibido por altas concentraciones de Na^+ citosólico (Zoccarato y Alexandre, 1986). Es muy probable que este proceso sea mediado por una ATPasa que bombee Mg^+ .

La actividad ATPasa dependiente de Ca^{2+} , con una baja afinidad por Ca^{2+} , puede en parte reflejar la susceptibilidad de la enzima, asociada con algunos gránulos almacenadores, de ser activada por cualquier catión, v.g. funcionar como una (Mg^{2+}/Ca^{2+}) ATPasa (Jones, 1979). Sin embargo, la ausencia de respuesta de la actividad Ca^{2+} -ATPasa en membrana sináptica a algunos inhibidores de la actividad enzimática dependiente de Mg^{2+} , como DCCD o NBD-Cl (Sorensen y Mahler, 1981) sugiere que las membranas sinápticas contienen una actividad adicional dependiente sólo de Ca^{2+} . Esta situación es similar a la descrita por Pershadsingh y McDonald (1980) en membrana plasmática de adipocitos y por Verma y Penninston (1981) en cuerpo lúteo. Una explicación alternativa sugerida por Sorensen y Mahler (1981) es que en presencia de diferentes iones metálicos divalentes la enzima asume diferentes conformaciones, lo cual varía la accesibilidad de estos inhibidores altamente específicos. Finalmente, la presencia de esta actividad asociada a membranas sinápticas podría hallarse relacionada con su función de liberación de neurotransmisores, más que de captación.

Estas actividades ATPasa tienen sus sitios activos orientados externamente y por tanto pueden ser clasificadas como ectoenzimas (Nagy y cols., 1986). La localización externa de las ecto-ATPasas sugiere que son diferentes de las ATPasas localizadas en la superficie interna de la membrana

plasmática implicadas en funciones de transporte celular.

La posible función fisiológica de las ecto-ATPasas sinaptosomal no es conocida. Se ha propuesto (Nagy y cols., 1986) que el ATP liberado desde ciertos tipos celulares, como terminaciones pre o postsinápticas sea hidrolizado produciendo adenosina (Sorensen y Mahler, 1982). Por participar en el control del nivel de ATP extracelular las ecto-ATPasas pueden afectar a toda una serie de sucesos en la membrana, como cambios en la permeabilidad o procesos de transporte activos y pasivos. Los metabolitos de la hidrólisis de ATP extrasinaptosomal y la energía liberada podrían estar implicados en la regulación de la transmisión nerviosa (Nagy y cols., 1986).

La actividad que requiere Mg^{2+} a concentraciones relativamente altas y Ca^{2+} a concentraciones submicromolares representa la contrapartida enzimática de la bomba de Ca^{2+} presente en numerosas membranas plasmáticas incluyendo sinapsis (Gill y cols., 1981), adipocitos (Pershad Singh y McDonal, 1980) y sarcolema (Caroni y Carafoli, 1980).

6. RETICULO SARCOPLASMICO: ESTRUCTURA, FUNCION Y COMPOSICION.

El retículo sarcoplásmico (RS) es el orgánulo subcelular encargado de controlar la concentración del calcio en el citosol de la célula muscular. Está formado por numerosos túbulos membranosos longitudinales que se disponen de forma paralela envolviendo a cada miofibrilla en la célula muscular. Se conecta con la membrana plasmática de la célula muscular, denominada sarcolema, a través de los llamados túbulos T.

El retículo sarcoplásmico está directamente implicado en el control de la contracción y relajación muscular. En una fibra muscular en reposo el Ca^{2+} está almacenado en el interior del RS. El gradiente de Ca^{2+} entre el interior y el exterior de las vesículas se mantiene por acción de la ATPasa dependiente de Ca^{2+} , que bombea iones Ca^{2+} al interior del RS con consumo de ATP ($2Ca^{2+}/1ATP$). La llegada de un potencial de acción al músculo, provoca una onda de despolarización que se transmite desde el sarcolema, a través de los túbulos T, hasta las cisternas terminales del retículo sarcoplásmico donde se produce la liberación del Ca^{2+} al sarcoplasma a través de canales de Ca^{2+} . Este flujo de salida de Ca^{2+} produce un incremento en la concentración del ión en el citoplasma y desencadena la contracción muscular (Hasselbach, 1964; Ebashi y cols., 1969). Cuando el impulso nervioso cesa, los iones calcio son recaptados por el RS por la acción de la ATPasa dependiente de Ca^{2+} (MacLennan y cols., 1976; Tada y cols., 1978) y la célula muscular vuelve al estado de reposo.

Se han descrito diferentes proteínas localizadas en la membrana de RS, que están relacionadas con la actividad del transporte de Ca^{2+} . Entre estas proteínas se encuentran la ATPasa dependiente de Ca^{2+} . Es uno de los sistemas de transporte primario mejor caracterizados y constituye el 60%-80% (Inesi, 1972; Hasselbach, 1974) del total de proteína de esta membrana. Su función está relacionada con el mecanismo de relajación muscular y consiste en el transporte de iones Ca^{2+} al interior de las vesículas acoplado a la hidrólisis de ATP.

En el interior de las vesículas de RS están presentes dos proteínas solubles que unen Ca^{2+} : (a) la calsecuestrina, es una proteína extrínseca que se localiza en el lumen vesicular (Meissner, 1975), tiene una gran capacidad para unir Ca^{2+} y su peso molecular se encuentra entre 44 y 65 KDa (Meissner y cols., 1973), y (b) una glicoproteína que une Ca^{2+} con alta afinidad ($K_d=2,5-4 \mu\text{M}$), con un peso molecular de 55 KDa y se localiza en la cara interna del RS (Steward y cols., 1976).

En las cisternas terminales del RS se localiza el canal de Ca^{2+} sensible a rianodina, su peso molecular es de 450 KDa (Inui y cols., 1987) y está implicado en la liberación del calcio almacenado en el interior de las vesículas (Meissner, 1986).

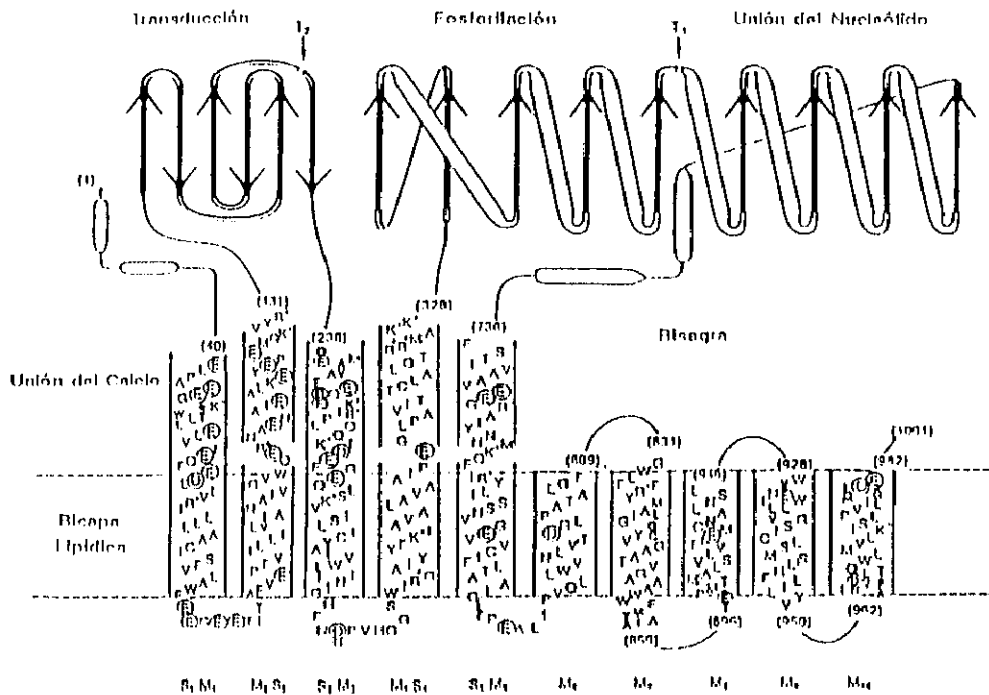
6.1. $(\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+})\text{ATPasa}$ de retículo sarcoplásmico.

La $(\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+})\text{ATPasa}$ está formada por una sola cadena polipeptídica de 1001 aminoácidos, con un peso molecular de 110 KDa (Brandl y cols., 1986, MacLennan y cols., 1985).

El perfil de hidrofobicidad de la secuencia primaria de esta proteína permite predecir la existencia de 10 α -hélices transmembranales con los extremos N- y C-terminal localizados en la parte citoplasmática y una gran cabeza globular rica en hoja plegada β , constituida por dos grandes secuencias hidrofílicas que se orientan hacia la cara citosólica (Brandl y cols., 1986). El sitio de unión para el ATP, fosforilación y el mecanismo de transducción estarían localizados en estos dos dominios globulares citoplasmáticos, mientras que la unión de Ca^{2+} estaría localizada en la región transmembranal. Los estudios de mutagénesis dirigida han permitido determinar la existencia de 6 residuos muy conservados en la estructura de la ATPasa localizados en las posibles secuencias transmembranales M_4, M_5, M_6 y M_8 que podría formar parte de un canal transmembranal para el paso del calcio (Clarke y cols., 1989; MacLennan, 1990, Andersen y cols., 1992).

La estructura cuaternaria de la ATPasa, debido a la dificultad para obtener cristales en tres dimensiones, es objeto de numerosos estudios de baja resolución: digestión proteolítica limitada (Le Maire y cols., 1990), utilización de anticuerpos monoclonales (Clarke y cols., 1990), difracción de rayos X o de neutrones en vesículas nativas o reconstituídas (Dupont y cols., 1973), microscopía electrónica de cristales bidimensionales (Stokes y Green, 1990), RMN, etc. Pero una gran parte de la información sobre la localización de centros funcionales en la ATPasa se ha obtenido por la

utilización de marcadores fluorescentes y técnicas de transferencia de energía (Gutiérrez-Merino y cols., 1987; Munkonge y cols., 1989; Martonosi y cols., 1990; Inesi y cols., 1992).



Esquema 4. Modelo de la estructura secundaria de la ATPasa dependiente de Ca^{2+} . Basado en el perfil de hidrofobicidad de la secuencia primaria (Brandl y cols., 1986).

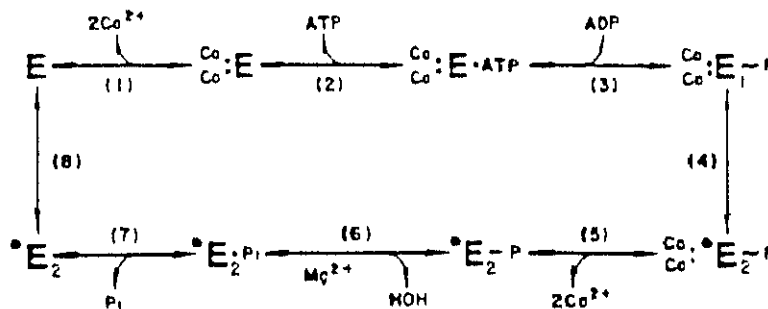
Aunque parece bastante clara la tendencia a agregar de la $(\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+})\text{ATPasa}$, el significado funcional de estos oligómeros no es tan evidente. Un importante número de estudios con $(\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+})\text{ATPasa}$ solubilizada con detergentes presenta evidencias en favor del estado monomérico de la proteína (Møller y cols., 1980; Vilsen y Andersen, 1986; Andersen, 1989). La $(\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+})\text{ATPasa}$ monomérica mantiene toda la maquinaria requerida para acoplar la hidrólisis de ATP con los cambios estructurales en los sitios de unión del Ca^{2+} implicados en el transporte, mientras que las interacciones proteína-proteína juegan un papel modulador y estabilizante para la función de la enzima (Møller y cols., 1982; Andersen, 1989). El equilibrio monómero-oligómero presente en una solución detergente implica contactos relativamente suaves péptido-péptido que podrían disociarse durante el transporte.

La hidrólisis de una molécula de ATP permite el transporte activo de dos iones Ca^{2+} (Hasselbach, 1964). El calcio se acumula en el interior de las vesículas hasta alcanzar una

concentración interna de calcio libre lo suficientemente elevada como para inhibir a la enzima (Scarpa y cols., 1972), entonces la ATPasa actúa a una velocidad estacionaria igual a la velocidad de salida pasiva de los iones Ca^{2+} a través de la membrana.

La $(\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+})\text{ATPasa}$ de RS pertenece junto a la $\text{Ca}^{2+}\text{-ATPasa}$ de membrana plasmática y la $\text{Na}^+, \text{K}^+\text{-ATPasa}$ a las denominadas P-ATPasas según la clasificación sugerida por Pedersen y Carafoli (1987). Todas las cation ATPasas tienen una secuencia de alta homología entre el residuo 308 y 358 en la ATPasa de RS, este segmento incluye el residuo de Asp (351) que es fosforilado y una secuencia que conecta este segmento a la cuarta hélice transmembranal (Green y MacLennan, 1989; Inesi y Kirtley, 1992).

Se han propuesto varios mecanismos de acción para la $(\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+})\text{ATPasa}$; el modelo cinético que vamos a comentar aquí es el de de Meis y Vianna, 1979:



Esquema 5. Esquema propuesto por de Meis y Vianna (1979) para el ciclo catalítico de la ATPasa dependiente de Ca^{2+} .

El enzima puede encontrarse en dos estados conformacionales Ca_2E_1 y E_2 . La forma E_1 de la enzima posee los centros de alta afinidad para Ca^{2+} orientados hacia el citoplasma. El proceso implica la unión de 2Ca^{2+} a un sitio de unión de alta afinidad en la conformación E_1 seguido por la fosforilación de un grupo β -carboxilo de un residuo de aspartato en el centro activo y la *oclusión* de Ca^{2+} en un intermediario $\text{Ca}_2\text{-E}_1\text{P}$. Un cambio en la conformación del enzima del estado E_1 a E_2 ($\text{Ca}_2\text{-E}_2\text{P}$) conduce a la traslocación y liberación del Ca^{2+} en el interior del RS. El proceso es completado por la hidrólisis dependiente de Mg^{2+} del intermediario $\text{E}_2\text{-P}$, con la liberación de P_i y la isomerización del enzima del estado E_2 a E_1 (Inesi y de Meis, 1985). El transporte de calcio es reversible, conduciendo a la síntesis de 1 mol de ATP por cada 2 iones calcio liberados del RS (Martonosi, 1984).

La conformación E_1 es estabilizada por saturación de los sitios de alta afinidad por Ca^{2+} o por lantánidos. La eliminación de Ca^{2+} con EGTA y la unión de vanadato estabiliza la conformación E_2 .

La $(\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+})\text{ATPasa}$ no es inhibida por oligomicina, pero sí lo es por rojo rutenio,

reactivos sulfhidrilos como la NEM, y ciertas aminas aromáticas como la fenilamina, reserpina, etc. Vanadato inhibe el enzima pero a un valor de $K_{0,5}$ más alto que para la bomba de Ca^{2+} de membrana plasmática y esta inhibición es abolida por la unión del Ca^{2+} a los sitios de baja afinidad.

Recientemente, se ha descrito la existencia de inhibidores específicos para esta enzima, como son la taspigargina y el ácido ciclopiazónico (Seidler y cols., 1989; DeJesus y cols., 1993).

7. $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{ATPasa}$.

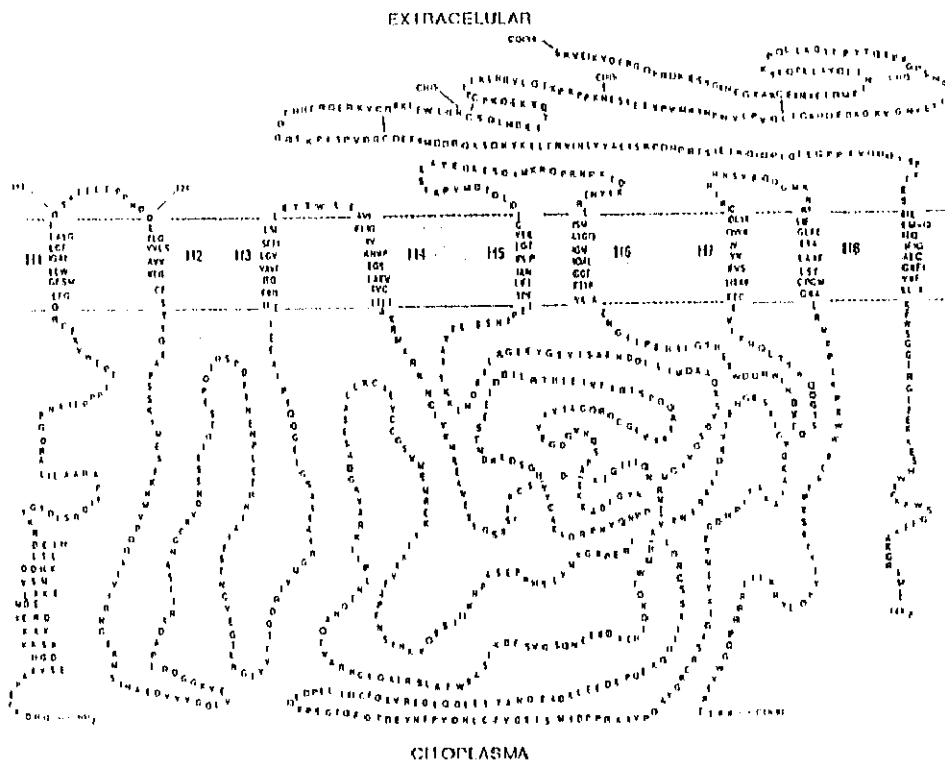
El intercambio del Na^+ citoplasmático por el K^+ extracelular a través de la membrana plasmática de todas las células animales está mediado por una enzima de la membrana plasmática, la $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{ATPasa}$.

La $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{ATPasa}$ descrita por Skou en 1957, es una bomba electrogénica que intercambia 3Na^+ por 2K^+ a través de la membrana celular mediante la hidrólisis de ATP. La enzima mantiene un gradiente de concentración de Na^+ y K^+ y contribuye a mantener el potencial de membrana de la célula en reposo. Estos gradientes son utilizados para la re- y despolarización del potencial de membrana, para la regulación del volumen celular, y el transporte activo de glucosa y aminoácidos, procesos de cotransporte a través de la membrana.

7.1. Estructura.

Está formada por dos subunidades, α y β , y se encuentra asociada en la membrana a fosfolípidos de gran importancia para su actividad fisiológica (Ottolenghi, 1979). Es una proteína transmembranal que puede unir ligandos tanto en la parte citoplasmática de la membrana (ATP, vanadato, Na^+) como en la extracelular (ouabaína, K^+ , Rb). La subunidad mayoritaria es la α , que supone el 70% de la proteína total del complejo, contiene cerca de 1012 aminoácidos (Shull y cols., 1985) y un peso molecular de unos 112 KDa. En esta subunidad radican los centros catalíticos, sitio de unión para el ATP, el sitio fosforilado durante el ciclo catalítico y el sitio de unión de los glicósidos cardíacos.

Se han identificado diferentes isoformas, tres de ellas han sido identificadas en vertebrados (Lingrel y cols., 1991). La isoforma α_1 se encuentra prácticamente en todas las células, α_2 en músculo esquelético, y α_3 se encuentra en tejido nervioso. La identidad de la secuencia entre estas isoformas es de un 84%, con las diferencias mayores en el extremo N-terminal.



Esquema 6. Modelo de la estructura secundaria de las subunidades α y β de la $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{ATPasa}$. Basado en el perfil de hidrofobicidad de la secuencia primaria (Lingrel, 1992).

El extremo N-terminal está en el lado intracelular de la membrana y estudios recientes sugieren que el extremo C-terminal también se encuentra en este lado (Antolovic y cols., 1991). El número de segmentos embebidos en la membrana deducidos del perfil de hidrofobicidad es 7 u 8 con una estructura α -hélice. Con ambos extremos de la proteína en el mismo lado de la membrana, el número más probable de hélices es 8. El gran lazo intracelular, el cual contiene el sitio de unión del nucleótido es predominantemente estructura en hoja plegada β (Modyanov y cols, 1991). La subunidad α tiene el sitio de fosforilación (Asp 369) en el lado citoplasmático. La unión de ouabaína tiene lugar en el lado extracelular. La unión entre el primero y el segundo segmento transmembranal es de gran importancia para la sensibilidad hacia los glicósidos cardíacos. El sitio de unión del catión no ha sido identificado, pero la oclusión de Rb^+ y Na^+ parece estar relacionado con un fragmento de 19 KDa en el lado amino terminal en el residuo 831 (Karlsh y cols, 1990). Recientes experimentos sugieren que esta subunidad está glicosilada en el lado intracelular (Pedenonte y Kaplar, 1991).

La subunidad β es una glicoproteína de 35 KDa, que contiene cerca de 300 aminoácidos deducida a partir del ADN_c de riñón de oveja en 1986 por Shull y cols., con una alta homología entre las isoformas.

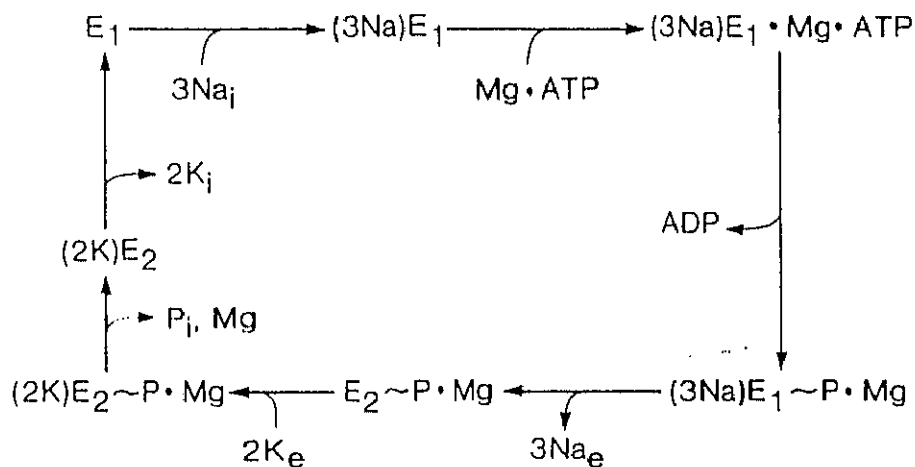
Hay un segmento hidrofóbico embebido en la membrana plasmática cerca del extremo N-

terminal de la proteína, y el C-terminal está localizado en el lado extracelular de la membrana. La subunidad β está glicosilada en 3 residuos de Asp en el lado extracelular, con un peso molecular de los restos hidrocarbonados de 10 KDa (Esmann y cols., 1980). La subunidad β parece tener importancia para la inserción del complejo $\alpha\beta$ en la membrana. No ha sido posible separar la subunidad β de la α sin pérdida de actividad enzimática. Se ha mostrado que la reducción de puentes disulfuro en la subunidad β conduce a la inactivación de la actividad enzimática, lo cual sugiere un papel estructural para esta subunidad (Skou y Esmann, 1992).

No existe consenso sobre si la enzima puede llevar a cabo todas sus actividades biológicas en forma de dímero $\alpha\beta$ o de tetramero $\alpha_2\beta_2$. Recientemente se ha comprobado que cada unidad soluble $\alpha\beta$ es capaz de unir una molécula de ATP y de llevar a cabo la interacción entre las dos conformaciones en las que podemos encontrar la enzima, E_1 - E_2 , pero no se puede descartar que sea necesaria la formación de complejos tetraméricos para llevar a cabo el transporte de Na^+ y K^+ (Craig y Kyte, 1980; Vilsen y cols., 1987).

7.2. Actividad.

La enzima existe en 2 conformaciones diferentes llamadas E_1 y E_2 . Las interconversiones entre ambas conformaciones quedan recogidas en el ciclo adjunto en donde se reproduce el esquema propuesto por Cantley, 1981:



Esquema 7. Ciclo catalítico de la $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{ATPasa}$ (Cantley, 1981).

En ausencia de cationes en el medio, la enzima se encuentra en la conformación E_2 . La adición de Na^+ conlleva una transición conformacional a $E_1\text{Na}_n$. Si en lugar de Na^+ añadimos K^+ al medio, favorecemos la transición a una conformación $E_2(\text{K}_m)$, con una velocidad de liberación de K^+

muy lenta. Es lo que se denomina conformación con *oclusión* de K^+ . La principal diferencia entre ambas conformaciones es la alta afinidad para el ATP de la conformación E_1Na_n frente a la baja afinidad de la $E_2(K_m)$. La unión de ATP favorece la transición de E_2 a E_1 , mientras que la fosforilación del enzima favorece la transición opuesta, es decir de E_1 a E_2 . La oclusión de los cationes puede representar una inmovilización de los mismos en entornos más intracelulares o más cerca del citoplasma, según que catión se trate.

7.3. Inhibidores de la bomba de Na^+ .

Los glicósidos cardíacos son inhibidores específicos de la $(Na^+,K^+)ATPasa$. Existe un sitio específico en la estructura enzimática de la $(Na^+,K^+)ATPasa$ para esta familia de sustancias aisladas de plantas (Schatzmann, 1953; Schwartz y cols., 1975). También se ha demostrado la síntesis de glicósidos cardíacos en insectos y en anfibios (Meyer y Linde, 1971; Pasteels y cols., 1979), interpretándose evolutivamente su presencia como un mecanismo adaptativo de defensa de estas especies frente a sus predadores.

Este receptor específico para glicósidos cardíacos se ha conservado filogenéticamente en las $(Na^+,K^+)ATPasa$ de diversas especies animales estudiadas, aunque su grado de afinidad varía ampliamente para diferentes especies y dentro de cada especie para los diferentes tejidos, lo cual está relacionado con las diferentes isoformas de la enzima.

Al igual que ocurriera con los opiáceos se ha especulado con la posibilidad de que este sitio fuera, en realidad, un receptor específico de un ligando endógeno con propiedades inhibitorias de la bomba de Na^+ . Esta hipótesis ha ganado credibilidad con la purificación de sustancias con acción semejante a glicósidos cardíacos (Endogenous Digitalis-Like Factor, EDLF) (Schoner, 1991; Hamlyn y cols., 1991b; Shaikh y cols., 1991).

El glicósido más ampliamente estudiado es la ouabaína, debido a su solubilidad en agua. Tiene una $K_{0.5}$ del orden de 10^{-7} - 10^{-5} M para la enzima en la mayor parte de los tejidos y se une a la enzima preferentemente en la conformación E_2-P , es decir en la superficie externa de la membrana (Schwartz y cols., 1975; Wallick y Schwartz, 1988); la presencia de K^+ protege a la enzima de su inhibición.

8. ALTERACIONES EN EL METABOLISMO DEL CALCIO.

El calcio desempeña un papel central en el control de la contracción de la musculatura vascular lisa y ha sido implicado en la patogénesis de la hipertensión esencial (Aoki, 1984; Young

y cols., 1990). Hay numerosas evidencias de que alteraciones en el metabolismo celular del Ca^{2+} descritas en hipertensión son debidas a un defecto humoral. Se ha postulado la existencia de una sustancia endógena que directamente inhibiría la bomba de Na^+ e indirectamente incrementaría los niveles de Ca^{2+} intracelular (Haddy, 1990).

Diferentes modificaciones del metabolismo del Ca^{2+} , tales como alteraciones en la unión del Ca^{2+} a la membrana celular, en los canales de Ca^{2+} y en la captura de Ca^{2+} a través de la membrana plasmática y del retículo sarcoplásmico de la musculatura lisa arteriolar producen un aumento de la concentración de Ca^{2+} libre y elevación de la resistencia periférica vascular (Aoki, 1984; Young y cols., 1990). Por este motivo los antagonistas de Ca^{2+} son muy efectivos en hipertensión al reducir la entrada de Ca^{2+} (Scriabine y Kazda, 1989).

La eliminación del Ca^{2+} intracelular es principalmente debido a un intercambio $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ y a la $(\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+})\text{ATPasa}$, y a concentraciones extremadamente altas y probablemente patológicas, el Ca^{2+} es acumulado por las mitocondrias (Marín, 1988). En hipertensión, la $(\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+})\text{ATPasa}$ y el intercambio $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ pueden operar con baja afinidad, facilitando la acumulación intracelular del calcio. Además la bomba de Na^+ juega un importante papel en la regulación de la concentración iónica intracelular (Marín, 1988). Se ha descrito también en hipertensión una actividad aumentada del tono simpático periférico (De Champlain, 1990; Michel y cols., 1990). El sistema simpático está implicado a corto y largo plazo en el ajuste de la presión sanguínea. Los niveles de noradrenalina (NA) en plasma están incrementados en pacientes con hipertensión esencial (De Quattro y Chan, 1972; De Champlain y cols., 1976), observándose un defecto neuronal en la captura de NA (Esler y cols., 1981). Otra posible explicación para el incremento de la neurotransmisión noradrenérgica es la existencia de un defecto en la modulación de la neurotransmisión por sustancias endógenas.

Se ha observado en plaquetas de pacientes hipertensos una elevada concentración de Ca^{2+} intracelular (Bühler y cols., 1986). Además, la vasculatura de estos pacientes es más sensible a agentes vasoactivos, la mayoría de los cuales producen sus acciones por liberación del Ca^{2+} intracelular y la entrada de Ca^{2+} parece aumentada en células musculares vasculares lisas (Friedman, 1983). Análogamente, los niveles basales de Ca^{2+} intracelular en células de musculatura lisa vascular (VSMC) son más altos en ratas SHR (ratas hipertensas genéticamente Aoki-Okamoto) frente a células de ratas control WKY (ratas normotensas Wistar-Kyoto) (Sugiyama y cols., 1990); sugiriendo una regulación anormal de calcio en estas células. Hay estudios que demuestran que tanto el nivel basal como el influjo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ inducido por agonistas está incrementado en vasos de resistencia en SHR (Cauvin y cols., 1987). La captura de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ está aumentada en cultivo de células musculares aórticas lisas y en grandes arterias de ratas hipertensas comparado con ratas normotensas (Sugiyama y cols., 1986).

Se ha descrito también que en la membrana de eritrocitos de sujetos hipertensos disminuye la unión de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ comparada con sujetos normotensos (Postnov y cols., 1977; Zemel y Sowers, 1990; Bukoski, 1990). Análogamente ratas SHR y tratadas con DOCA muestran reducida su unión de Ca^{2+} en aorta y pequeñas arterias comparadas con el control (Jones y Hart, 1975). Como la unión de calcio en la membrana puede bloquear la entrada de Ca^{2+} por inactivar los canales dependientes de voltaje, este descenso podría facilitar el incremento del Ca^{2+} intracelular (Zemel y Sowers, 1990). En los eritrocitos de pacientes hipertensos, la unión de Ca^{2+} a la superficie interna de la membrana disminuye en comparación con sujetos normotensos (Postnov y cols., 1977, Postnov y Orlov, 1984; Orlov y Postnov, 1982), resultados similares han sido observados en preparaciones de eritrocitos, hígado, corazón y tejido neural en SHR (Postnov y Orlov, 1984; Bühler y cols., 1986; Zemel y Sowers, 1990). Adicionalmente, el descenso en la unión de Ca^{2+} en la cara interna de la membrana podría facilitar la entrada de Ca^{2+} al reducir la conductancia de K^{+} , lo cual produciría la despolarización de la membrana y la activación de los canales dependientes de voltaje (Robinson, 1984).

La actividad de la bomba de Ca^{2+} de la membrana plasmática es más baja en hipertensión, bien por un defecto de la bomba o por una inadecuada activación por calmodulina, facilitando la acumulación intracelular de Ca^{2+} (Postnov y cols., 1984; Poston y Orlov, 1984; Vezzoli y cols., 1985; Takaya y cols., 1990). Eritrocitos humanos de pacientes hipertensos muestran un funcionamiento poco eficiente de la actividad $(\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+})\text{ATPasa}$ de la membrana plasmática (Postnov y cols., 1984; Vezzoli y cols., 1985; Bühler y cols., 1986). Efectos similares se han descrito en eritrocitos de pacientes diabéticos y urémicos (Zidek y cols., 1992; Krzesinsky y cols., 1993) y en eritrocitos de ratas hipertensas, SHR y MSH (ratas hipertensas genéticamente Milan) (Vezzoli y cols., 1985). En ambos casos, la actividad ATPasa estimulada por calmodulina está reducida con respecto al control. Los cambios en la actividad ATPasa pueden ser debidos a un defecto en la bomba o alteraciones del medio lipídico. Orlov y cols. (1983) apoyan esta segunda posibilidad, basándose en las diferencias en los lípidos de membrana de *fantasmas* de eritrocitos observados entre SHR y WKY (Boriskina y cols., 1977; Tsuda y cols., 1992). Por medio de técnicas fluorescentes, se ha observado un incremento de microviscosidad en las regiones hidrofóbicas de membranas de eritrocitos de SRH (Montenay-Garestier y cols., 1981) al igual que en pacientes con hipertensión esencial (Orlov y Postnov, 1982). Estos cambios han sido observados en otras células como en la membrana plasmática de hepatocitos, sinaptosomas y cardiomiocitos de SHR (Devynck y cols., 1982).

Otro mecanismo molecular alterado en animales hipertensos es el intercambio $\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{2+}$. Se ha observado que la actividad de este sistema está aumentada en VSMC de ratas SHR comparado con el control (WKY) (Ashida y cols., 1989).

Alteraciones en el metabolismo del Ca^{2+} se han observado también en la membrana plasmática de sinaptosomas, adipocitos y hepatocitos de ratas hipertensas (Devynck y cols., 1982). Como ya hemos señalado el calcio está implicado en una gran variedad de funciones en el SNC, entre ellas la liberación de neurotransmisores en las terminales sinápticas. Honda y cols., 1990 observaron que la captura de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ en sinaptosomas era mayor en ratas SHR frente a ratas control (WKY); lo cual puede sugerir que un cambio en el metabolismo del Ca^{2+} también ocurre en el SNC de ratas SHR, y éste podría ser parcialmente responsable de la alteración en la liberación de neurotransmisores, que se reflejaría en un aumento en la hipertensión de SHR.

Resultados similares han sido observados por Postnov y Orlov (1984) en sinaptosomas de cerebro de rata y en la fracción microsomal.

Hay numerosas evidencias de que esta alteración en el metabolismo de Ca^{2+} característico de la hipertensión podría ser debido a un defecto humoral (Le Quang Sang y cols., 1990; Sugiyama y cols., 1990). Varios factores pueden modular la entrada de calcio, en particular la composición lipídica de la membrana (Locher y cols., 1986). Factores circulantes han sido propuestos en el control de la concentración de Ca^{2+} en plaquetas. La incubación de plaquetas de sujetos normotensos en plasma de pacientes hipertensos incrementaba la concentración de Ca^{2+} libre citosólica mientras que la incubación de plaquetas de pacientes hipertensos en plasma de sujetos normotensos conducía a un significativo descenso en la concentración de Ca^{2+} libre (Lindner y cols., 1987). Diferentes hormonas circulantes como angiotensina, vasopresina y noradrenalina son capaces de modificar la concentración de Ca^{2+} intracelular en plaquetas. El nivel de inhibidores circulantes de la bomba de Na^+ descrito en hipertensión esencial podría también modular la concentración de Ca^{2+} intracelular. La concentración de Ca^{2+} libre en plaquetas de sujetos hipertensos correlacionaba positivamente con la capacidad de extractos del plasma de estos sujetos para inhibir la actividad $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{ATPasa}$ renal y la unión de ouabaína en eritrocitos humanos (Le Quan Sang y cols., 1990). Estos resultados indican que componentes endógenos, similares a digoxina, podrían participar en el control de la concentración de Ca^{2+} libre citosólico, de acuerdo con su posible papel en hipertensión.

Meyer-Lehnert y cols. (1993) han aislado a partir de orina humana de sujetos con una dieta rica en sodio por diferentes pasos cromatográficos un factor similar a ouabaína (OLF). Este compuesto tenía un efecto bifásico sobre la concentración de Ca^{2+} intracelular en cultivos de células musculares vasculares lisas. Primero inducía un incremento rápido en la concentración de calcio retornando a niveles más bajos pero por encima de la línea base en unos cuantos minutos, este efecto era eliminado en presencia de verapamil, lo cual sugiere que este aumento estaba relacionado con el influjo de Ca^{2+} a través de los canales dependientes de voltaje. La ouabaína tenía similares efectos después de 45 min de preincubación, pero a diferencia de OLF no inducía este rápido incremento

transitorio de la concentración de calcio.

Estos descubrimientos son consistentes con las observaciones de Goto y cols. (1988c, 1989b) de que un factor similar a digoxina aislado de orina humana incrementaba la captura de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ en VSCM y reducía el eflujo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$. Resultados similares han sido obtenidos por Schoner y cols. (1993).

El factor hipotalámico aislado por Hauptert (Haber y Hauptert, 1987) además de inhibir la $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{ATPasa}$ como ya hemos descrito también inhibía la $\text{Ca}^{2+}\text{-ATPasa}$ de RS pero no de membrana plasmática. Este factor incrementaba la concentración de Ca^{2+} libre en miocitos cardíacos (Hallaq y Hauptert, 1989) con el consiguiente efecto inotrópico. Efectos similares han sido observados con ouabaina. A partir de células hipotalámicas en cultivo se ha aislado un péptido de bajo peso molecular (ASTI) (Mir y cols., 1988) que aumenta la concentración de Ca^{2+} intracelular en anillos aórticos y potencia el efecto vasoconstrictor de la noradrenalina.

Cloix y cols. (1986) han aislado un factor derivado de orina que inhibía la $\text{Mg}^{2+}\text{-ATPasa}$ y $\text{Ca}^{2+}\text{-ATPasa}$ de microsomas de cerebro de rata.

Algunos estudios experimentales (Yamaji y cols., 1990; Haddy y cols., 1979, Janssens y cols., 1993) indican que el inhibidor endógeno de la bomba de sodio acelera la liberación e inhibe la recaptura de noradrenalina en los terminales nerviosos simpáticos.

9. REACTIVIDAD VASCULAR.

Un elemento crucial de la hipótesis previamente señalada es que la presencia de un inhibidor de $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{ATPasa}$ produciría un aumento de la reactividad vascular. Desde las observaciones de Michelakis y cols. (1975) se ha acumulado amplia evidencia de que en la hipertensión esencial humana y en distintos modelos de hipertensión animal existiría una sustancia circulante vasoactiva que aumentaría la reactividad vascular ante distintos agentes presores (de Wardener y MacGregor, 1985). La hipótesis que estamos discutiendo postula que este factor vasoactivo sería el inhibidor endógeno de la bomba de sodio. Este aumento de reactividad estaría determinado por un aumento del Ca^{2+} libre citosólico. El mecanismo por el que la inhibición de la bomba de sodio produciría este efecto no está suficientemente aclarado. Ya hemos mencionado la hipótesis de Blaustein según la cual la inhibición parcial de la bomba de sodio podría ser responsable del aumento del Ca^{2+} intracelular en las células vasculares musculares lisas (Blaustein, 1977a; Blaustein y Hamlyn, 1983, 1984; Rasgado-Flores y cols., 1989). Esta hipótesis ha sido discutida ya que sólo en condiciones extremas de sobrecarga de Ca^{2+} existiría, en el músculo liso, una regulación del Ca^{2+} intracelular mediado por el intercambio $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (Mulvany, 1984), que no se produciría en condiciones fisiológicas (Knorr

y cols., 1991). La realidad es que existen múltiples observaciones que relacionan la inhibición de la bomba de sodio con un aumento de reactividad vascular secundaria a una elevación del Ca^{2+} libre citosólico (Goto y cols., 1990; Le Quan Sang y cols., 1990). Una explicación, distinta a la postulada por Blaustein sería que la inhibición de la $(\text{Na}^+, \text{K}^+)$ ATPasa produciría una despolarización de la membrana celular, aumentando la concentración de Ca^{2+} intracelular a través de los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje (Montali y cols., 1991), habiéndose demostrado cambios de polarización en presencia de EDLF (Ishizuka y cols., 1991; Pamnani y cols., 1991). Otra posibilidad sería la acción del inhibidor a través de su efecto sobre la inervación simpática vascular ya que la captación de norepinefrina en terminales nerviosas es dependiente de la concentración de Na^+ e inhibida por ouabaína (Ishizuka y cols., 1991). En este sentido se ha descrito una inhibición de la captación de norepinefrina en vena safena aislada, bajo la acción de EDLF (Cress y cols., 1991; Goto y cols., 1992).

La hipótesis general de Blaustein está apoyada por estudios experimentales (Overbeck y cols., 1976; Pamnani y cols., 1980) y clínicos (Poston y cols., 1981; Hamlyn y cols., 1982), que incluso relacionan los niveles de actividad digoxino-mimética de los hipertensos esenciales con los efectos hipotensivos de antagonistas del calcio tipo nifedipina (Palombo y cols., 1986), o los niveles de Ca^{2+}_i en plaquetas de sujetos normales incubadas en plasma ultrafiltrado de hipertensos y viceversa (Lindner y cols., 1987). En efecto, la administración de ouabaína a normotensos, provocó una inhibición en la $(\text{Na}^+, \text{K}^+)$ ATPasa de eritrocitos e incrementó la resistencia vascular periférica. Cuando se les trató previamente con nifedipina, bloqueante de la entrada de Ca^{2+} , el incremento de la resistencia vascular periférica fue totalmente prevenido. Estos estudios complementan la hipótesis original de Dahl (Dahl y cols., 1969) que hablaba de una sustancia salinúrica circulante como causante del mantenimiento de niveles elevados de presión arterial en ratas hipertensas sensibles a la ingesta de sales. Esta hipótesis originaria fue seguida luego por Haddy y Overbeck (1976) cuando explicaron el aumento de la tensión arterial subsiguiente a la expansión de volumen que ocurre en los modelos de hipertensión experimental. Estas hipótesis serían ampliadas por Blaustein, como ya he comentado y definitivamente relacionadas entre sí y con la hipertensión esencial por De Wardener Y MacGregor (1983, 1984). La teoría parte de un defecto renal, genético o adquirido, indetectable en los ensayos estándar de función renal. El riñón enfermo tendería a excretar de forma defectuosa el sodio del organismo, con la consiguiente retención de agua y expansión del volumen extracelular. El organismo secretaría como mecanismo de emergencia un factor hormonal natriurético que promovería la excreción de sodio a través de la inhibición de las bombas de sodio en las células de los túbulos renales.

Asímismo la inhibición de la bomba de sodio podría inducir un incremento de la secreción

neurohipofisiaria de vasopresina, dependiente de Ca^{2+} , con el consiguiente aumento en la retención de agua por el riñón y el mantenimiento subsiguiente de una presión arterial elevada (Sorimachi, 1983).

El efecto por tanto de un inhibidor circulante del transporte de Na^+ serían alteraciones en el metabolismo del Ca^{2+} y/o de los neurotransmisores, con la consiguiente vasoconstricción. En los estados de hipertensión, por tanto, la inhibición de la $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{ATPasa}$ se produciría no como consecuencia de un transporte de membrana primario anormal, ni como un efecto secundario al desarrollo de la propia hipertensión, sino como una respuesta fisiológica a la acumulación de fluido extracelular en exceso (Hauptert, 1988a). En cualquier caso para que inhibiciones de la $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{ATPasa}$ de las células del túbulo renal, sean crónicas, se postula que debe existir algún defecto en estas células, claramente puesto de manifiesto por Rayson (1988) en el caso de ratas Dahl sensibles o resistentes a desarrollar hipertensión como consecuencia de una ingesta de Na^+ alta, a la hora de responder homeostáticamente, con un incremento en el número de bombas de Na^+ .

OBJETIVOS

Existe en la actualidad evidencia clara de una serie de fenómenos fisiológicos que han mantenido la búsqueda de sustancias candidatas a ser un inhibidor fisiológico de la bomba de sodio. Pese al esfuerzo de numerosos investigadores para identificar dicho inhibidor o inhibidores en mamíferos, no existe unanimidad acerca de su naturaleza química, origen y mecanismo de acción.

La síntesis o almacenamiento de la llamada "hormona natriurética" está asociada a diferentes tejidos. En relación con este hecho, el cerebro y más específicamente, el hipotálamo y la hipófisis, como tejidos secretores de neuropéptidos con actividad hormonal, han sido considerados como posible lugar de síntesis y/o almacenamiento de un inhibidor endógeno de la $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{ATPasa}$.

Debido a la elevada concentración de sustancias con alta reacción cruzada con anticuerpos antiglicósidos cardíacos en extractos de glándula suprarrenal, así como a la posible naturaleza esteroidea de este factor, se considera que este tejido puede ser también fuente de esta hormona.

Se ha postulado que la inhibición de la $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{ATPasa}$ por dicho factor o factores endógenos podría aumentar el tono vascular como consecuencia del incremento en la concentración de Ca^{2+} intracelular vía intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, o a través de los canales de Ca^{2+} dependientes del voltaje o por su acción sobre la inervación simpática del músculo liso vascular.

Los objetivos de nuestro estudio han sido:

1. El aislamiento y purificación de un inhibidor endógeno de la $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{ATPasa}$ a partir de diferentes tejidos (Factor Inhibidor Hipotalámico Hipofisario -HHIF-).
2. Estudiar el efecto de HHIF sobre la homeostasis celular del Ca^{2+} .
3. El estudio cinético de la acción de HHIF sobre la actividad $(\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+})\text{ATPasa}$ de la membrana plasmática sinaptosomal y del retículo sarcoplásmico.
4. Establecer si la modulación de la actividad $(\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+})\text{ATPasa}$ y del transporte de Ca^{2+} por HHIF procede a través de un mecanismo indirecto, vía alteración de parámetros estructurales de la bicapa lipídica, o por interacción con centros específicos de unión en la proteína.

MATERIALES Y METODOS

1. REACTIVOS.

L-Histidina, Tris, NaCl, KCl, MgCl₂, molibdato amónico, CuSO₄, NaOH, H₂SO₄, KOH, KH₂OH, NaHSO₃, CaCl₂, MgSO₄, éter de petróleo, cloroformo, HCl, HClO₄, ácido tricloroacético, piruvato quinasa, lactato deshidrogenasa, tartrato sódico procedían de MercK (Darmstadt, Alemania). Hepes, ouabaína, digoxina, sacarosa, β-mercaptoetanol, fluoruro de fenil metil sulfonilo, saponina, difenil-hexatrieno, EDTA, ATP, ADP, BSA, Mes, Tes, TEA, cloruro de colina, fosfonenolpiruvato, ditiotreitól, EGTA, SDS, arsenazo III, fura-2/AM, fosfolipasa C (*Clostridium perfringens*), glucosa, citrato sódico, clortetraciclina, isotiocianato de fluoresceína, L-tirosina, acetato de clormadinona, dopamina, ácido glicocólico, ramnosa, linoleico, oleandrina, estrofantidina, digitonina, digoxigenina de Sigma Chemical Co. (St.Louis, Missouri, USA). Imidazol, deoxicolato de Calbiochem - Behring Corp. (La Jolla, California, USA). Butil-PBD, tolueno, sulfato amónico, sacarosa, reactivo de Folin-Cicolteau, metanol, acetronitrilo grado HPLC de Carlo Erba (Milán, Italia). NADH, cianamicina, piruvato quinasa, lactato deshidrogenasa de Boehringer-Mannheim (Alemania). 4-vinil piridina de Aldrich (Milwaukee, Wisconsin, EE.UU.). Pronasa E (*Streptomyces griseus*) de Serva (Heidelberg, Alemania). Reactivos de análisis de aminoácidos de Beckman Instrumens (Palo Alto, California, EE.UU.).

La solución salina de Hanks, RPMI 1640, la solución tripsina-EDTA y el suero fetal bovino fueron suministrados por laboratorios Whittaker (Barcelona, España).

³H-ouabaína de Amersham (England), ⁴⁵Ca²⁺ fue suministrado por New England Nuclear (Boston, Massachusetts, EE.UU.). Kits comerciales de ¹²⁵I-digoxina de Immuchem Corp., Carson, USA.

Sephadex LH-20 de Pharmacia Fine Chemicals (Uppsala, Suecia). Filtros de nitrocelulosa GSWP(0,22 μm) y HAWP (0,45 μm) de Millipore (USA), filtros de papel n° 54 de Whatman (Inglaterra) y filtros YM50-100 de Amicon (USA).

Los lignanos fueron cedidos por el Dr.J.A. Pérez del Instituto de Productos Naturales y Agrobiología de Canarias (CSIC, Tenerife). El cultivo de células mesangiales fue preparado por el Laboratorio de Fisiología y Farmacología de la Universidad de Salamanca del Dr. J.M. López-Novoa.

2. EXTRACCION DEL TEJIDO.

El método es una modificación del descrito por Carilli y cols. (1985). 300 g de los diferentes tejidos procesados (cerebro, cortex, hipotálamo, hipófisis y glándula suprarrenal) son

homogeneizados en 1.200 ml de metanol y agitados durante toda la noche a 4°C. El homogeneizado es filtrado a través de filtros Whatman N°54 y el residuo es resuspendido en 600 ml de metanol:agua (4:1,v:v) agitado toda la noche y filtrado de nuevo. Ambos filtrados eran unidos y evaporados a vacío a una temperatura de 40°C en un rotavapor Buchii. El componente acuoso es resuspendido en 300 ml de agua destilada (MilliQ) y extraído tres veces con 0,3 volúmenes de éter de petróleo y tres veces con 0,3 volúmenes de cloroformo para eliminar lípidos. La fase acuosa resultante es liofilizada y el residuo obtenido es resuspendido en 20 ml de metanol y centrifugado a 500 x g durante 10 minutos para separar las proteínas precipitadas.

3. PURIFICACION.

3.1. Cromatografía de filtración en gel.

El sobrenadante de la centrifugación de la fase anterior, es cargado en una columna de Sephadex LH-20 (2 x 150 cm), equilibrada y eluida con metanol, a un flujo de 0,8 ml/min y a temperatura ambiente. La actividad inhibidora de la (Na⁺,K⁺)ATPasa se detectó mediante el sistema de enzimas acopladas descrito en el apartado 18.1. Las fracciones se midieron, en cuanto a su contenido en sales, mediante un conductivímetro Radiometer, modelo CDM3 (Copenague, Dinamarca) y un fotómetro de llama Beckman, modelo Klina-flame.

3.2. Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

El cromatógrafo líquido de alta resolución empleado estuvo formado por los siguientes componentes: un controlador automático de gradiente Waters 600E, un detector de fotodiodos Waters 990 con un rango de 190-800 nm, equipado con un ordenador personal AT (IBM) y un inyector universal Waters U6K.

3.2.1. HPLC semipreparativa en fase reversa.

Se utilizó una columna μ Bondapak C-18 (Waters) (7,8 x 300 mm) conectada en serie a una precolumna μ Bondapak C-18/Corasil (Waters). La columna fue equilibrada con ácido trifluoroacético al 0,1 % (v/v) en agua y eluida a temperatura ambiente, a un flujo de 2 ml/min con un gradiente de acetonitrilo:agua con ácido trifluoroacético al 0,1 % (v/v) (30 min 0-40%, 75 min 40-80%, 30 min 80-100% de acetonitrilo).

3.2.2. HPLC analítica en fase reversa.

Se empleó una columna μ Bondapak Fatty Acid (Waters)(3,9 x 300 mm) conectada en serie

a una precolumna μ Bondapak C-18/Corasil (Waters). La columna fue equilibrada con ácido trifluoroacético al 0,1% (v/v) en un 20% de acetonitrilo y un 80% de agua y eluida a temperatura ambiente, a un flujo de 1 ml/min con un gradiente de acetonitrilo:agua con ácido trifluoroacético al 0,1% (v/v) (50 min 20-80%, 10 min 80-100% de acetonitrilo)

4. DETECCION MEDIANTE MULTIFOTODIODOS EN HPLC DE HHIF.

Durante las cromatografías se determinaron los espectros de absorción (190-800 nm) de las moléculas eluidas mediante un detector de fotodiodos, y se almacenaron en un ordenador. Estos datos fueron analizados después de finalizadas las cromatografías, mediante diferentes programas Waters 990.

5. ESPECTROFOTOMETRIA UV/Vis.

Estudio del espectro de diferentes compuestos conocidos por ser inhibidores de la $(Na^+,K^+)ATPasa$ o que formen parte de la estructura de alguna de dichas moléculas (digitálicos, esteroides, lípidos, lignanos, azúcares, etc.). Para ello se utiliza un espectrofotómetro Spectronic 3000 Array (Milton Roy) asociado a un detector de diodos que permite la obtención del espectro de cada uno de estos compuestos.

6. REACCION CRUZADA CON ANTICUERPOS ANTI-DIGOXINA.

Se utiliza un ensayo comercial de Immunochem con alguna modificación (Illescas y cols., 1990). Los estándares de digoxina (0,1-10⁵ ng/ml) son diluidos 1:2 con Tris-HCl 2 M, pH 7,5. Los anticuerpos anti-digoxina están covalentemente unidos a la superficie interna de los tubos de polipropileno. Tras una incubación de 30 min a 37°C con ¹²⁵I-digoxina, los tubos se aspiran para eliminar la radioactividad no fijada, contándose la unida al anticuerpo en un contador gamma (Kontron). Los valores de equivalentes de digoxina (DLA - Digoxin Like Activity -) se calculan por interpolación en una curva estandar para digoxina, representando %B/B₀ frente a la concentración de digoxina (ng/ml).

7. ULTRAFILTRACION

Se emplearon membranas YC05/YM2 (Amicon) con una exclusión de masa molecular

respectivamente de 500/1000 D. Las membranas se preparan 1 h antes de ser empleadas dejándolas en agua destilada. Se empleó una célula de filtración Amicon, modelo 8010 (Massachusetts, EE.UU.), para volúmenes de hasta 10 ml, con agitación magnética y presión de nitrógeno.

8. ANALISIS DE AMINOACIDOS.

HHIF (10 U) fue hidrolizado durante 20 h a 110°C con 80 μ l de HCl 5,7 M tridestilado, conteniendo 2-mercaptoetanol al 0,02% (v/v), en tubos cerrados a vacío. Las muestras hidrolizadas se secaron en una estufa a vacío, se disolvieron en tampón citrato sódico 0,2 M, pH 2,2, conteniendo norleucina 25 mM y se aplicaron en un analizador de aminoácidos Beckman system 6000 (Beckman Instruments; Palo Alto, California, EE.UU.), equipado con un procesador de datos Shimadzu modelo C-R6A (Shimadzu Corporation; Analytical Instruments Division, Kyoto, Japón). La sensibilidad empleada en el espectrofotómetro fue de 0,1 unidades de densidad óptica a 440 y 570 nm.

9. OXIDACION CON ACIDO PERFORMICO.

La oxidación del HHIF se llevó a cabo según el método descrito por Moore (1963). Para ello fue disuelto en 20 μ l de ácido fórmico al 97% (v/v) y 30 μ l de ácido perfoómico (el ácido perfoómico se obtuvo añadiendo a 9,7 ml de ácido fórmico al 97% (v/v) 0,5 ml de H₂O₂ al 30% (v/v) e incubando la mezcla durante 120 min a temperatura ambiente). La oxidación se realizó durante 3 h, en un baño de hielo. Finalmente la mezcla de reacción se liofilizó y resuspendió en agua.

10. S-PIRIDILETILACION.

HHIF (20U) disuelto en 0,2 ml de Tris 1M (pH 8,5), conteniendo cloruro de guanidinio 6 M, EDTA 2 mM y β -ME 0,1 M fue incubado durante 2 horas a 37°C. A continuación, se añadieron 5 μ l de 4-vinilpiridina y se incubó durante 15 min a 37°C (Friedman y cols., 1970). Finalmente, la mezcla de reacción se cromatografió en una columna μ Bondapak Fatty Acid según las condiciones descritas anteriormente.

11. DIGESTION ENZIMATICA.

HHIF (2U) se incubó con pronasa E 1mg/ml o fosfolipasa C 0,6 mg/ml en Tris 0,1 M durante 2 h a 37°C. Posteriormente se calentó a 80°C durante 10 min para desnaturalizar las enzimas

y se centrifugó a 12.000 rpm durante 15 min, en una centrífuga Eppendorf 5415 (Eppendorf Gerätebau, Hamburgo, Alemania). Después de la digestión el material se ensayó utilizando el sistema de enzimas acopladas descrito previamente.

12. PURIFICACION DE LA (Na⁺,K⁺)ATPasa.

La enzima se purificó según el procedimiento descrito por Jorgensen (1974). La ATPasa obtenida fue sensible a la inhibición por ouabaína (0,1 mM) en un 98%, con una actividad específica de $8 \pm 2 \mu\text{mol P/ min/ mg proteína}$. El método consiste en diseccionar del riñón de cerdo la parte de médula externa más roja, se añaden 10 ml/g de tampón sacarosa-histidina (histidina 30 mM, sacarosa 250 mM, EDTA 1 mM e imidazol 5 mM, pH 7,4) y se homogeniza en un homogeneizador de vidrio con émbolo de teflón. La suspensión se centrifugó a 7.000 rpm durante 15 min en una centrífuga Sorwall J2-21 (Beckman), con un rotor JA-17, resuspendiéndose el residuo del fondo de los tubos en la mitad del volumen inicial (5 ml/g) de medio sacarosa-histidina, y volviéndose a centrifugar 15 min a 10.000 rpm en la misma centrífuga Sorwall (Beckman).

Los sobrenadantes de las centrifugaciones anteriores se mezclan y centrifugan a 20.000 rpm durante 30 min en una ultracentrífuga L5-75 (Beckman) a 4°C, con un rotor 70Ti, para obtener la fracción microsomal. Esta se incuba 30 minutos a 20°C, a una concentración de proteínas de 1,35 - 1,4 mg/ml con SDS 0,55 mg/ml, ATP 3 mM, EDTA 2 mM e imidazol 50 mM, pH 7,4. Tras incubar, el medio de incubación se centrifuga en un gradiente discontinuo de sacarosa a 60.000 rpm/min en una ultracentrífuga Beckman L5-75 con un rotor 70Ti, durante 90 minutos a 4°C. El residuo obtenido se resuspende mediante homogenización en 0,66 ml/g de tampón imidazol 25 mM, EDTA 1 mM y sacarosa al 10%, pH 7,4, y se almacena a -80°C hasta su utilización.

13. PREPARACION DE SINAPTOSOMAS.

Los sinaptosomas han sido preparados siguiendo el método de Michaelis y cols. (1983), con algunas modificaciones como se describe en García-Martín y Gutiérrez-Merino (1986). Los sinaptosomas fueron obtenidos de cerebro de rata hembra tipo Wistar de un peso aproximado entre 200 y 250 gramos, las cuales fueron sacrificadas por dislocación cervical. En cada preparación el peso del tejido cerebral obtenido fue de 1-1,5 gramos por rata.

El cerebro extraído fue desmenuzado y resuspendido en 15 ml de una solución que contenía sacarosa 0,32 M, SO₄Mg 0,5 mM, PMSF 0,1 M, β-mercaptoetanol 2 mM y Tes 10 mM, pH 7,4 a

una temperatura de 4°C.

Esta suspensión fue homogeneizada mecánicamente en un homogenizador Potter, mediante 8-10 golpes de 15 segundos de duración a 1.000 rpm. A continuación se centrifugó a 1.500 x g en una centrífuga Kontron Centrikon H-401, empleando un rotor A 8.24, durante 10 minutos a una temperatura máxima de 8°C. El sobrenadante se volvió a centrifugar durante otros 10 minutos a 20.000 x g. El precipitado obtenido de esta segunda centrifugación se resuspendió en un volumen de 1,5 ml de la misma solución utilizada anteriormente y esta suspensión se centrifugó contra un gradiente de sacarosa en dos capas, empleando una ultracentrífuga Beckman L7-55, con un rotor SW-28. Para preparar el gradiente se deposita una primera capa de una solución que contiene β -mercaptoetanol 2 mM, sacarosa 40% y Tes 10 mM (pH 7,4). Sobre esta capa, se deposita otra del mismo volumen de β -mercaptoetanol 2 mM, sacarosa 20% y Tes 10 mM (pH 7,4). A continuación se deposita 1 ml de la suspensión preparada con el precipitado de la segunda centrifugación y se centrifuga a 63.000 x g durante 45 minutos a una temperatura máxima de 8°C. A continuación se extrae la interfase entre las capas de sacarosa al 40% y al 20% (que es donde se equilibran los sinaptosomas). Este material se dividió en pequeñas fracciones y se almacenó a una temperatura de -60°C hasta su uso. El material congelado se utilizó sólo durante 2-3 semanas después de su preparación.

14. PREPARACION DE VESICULAS DE LA MEMBRANA PLASMÁTICA DERIVADAS DE SINAPTOSOMAS.

Las vesículas fueron preparadas por lisis hipotónica de sinaptosomas como se describe en García-Martín y Gutiérrez-Merino (1986).

Los sinaptosomas fueron lisados durante 40 minutos a temperatura ambiente en una solución tamponada a pH 7,4 que contenía Tes 5 mM, EDTA 1 mM y β -mercaptoetanol 2 mM.

Las vesículas de membrana fueron aisladas mediante la centrifugación del lisado a 20.000 x g durante 25 minutos a una temperatura máxima de 8°C. El precipitado se resuspendió en una solución Tes 5 mM (pH 7,4), β -mercaptoetanol 2 mM y sacarosa 0,3 M. La suspensión se dividió en pequeñas fracciones y fue rápidamente congelada a -60°C hasta su utilización.

La orientación de la membrana plasmática de sinaptosomas y vesículas se ha estimado por el análisis de las actividades enzimáticas: (Na⁺,K⁺)ATPasa y Ca²⁺-ATPasa antes y después de la permeabilización con saponina, glicósido que permeabiliza selectivamente membranas plasmáticas ricas en colesterol (Gill y cols., 1984). Se determinó las actividades ATPasas manteniendo isoosmolaridad en los medios intra y extraventricular utilizando concentraciones adecuadas de sacarosa,

de esta forma se determina la actividad ATPasa que tiene orientado el centro de unión de ATP hacia el medio externo. A continuación, se determinó la actividad ATPasa total para cada enzima en presencia de saponina 0,05%, la relación entre ambas actividades para cada enzima nos da la proporción de sinaptosomas o de vesículas invertidas.

15. PREPARACION DE VESICULAS DEL RETICULO SARCOPLASMICO.

La obtención de vesículas de retículo sarcoplásmico de músculo esquelético de conejo, se llevó a cabo siguiendo el método descrito por MacLennan (1970), salvo que se añadió PMSF y β -mercaptoetanol para prevenir proteólisis y oxidación, respectivamente (Mata y Gutiérrez-Merino, 1985).

El músculo esquelético se extrajo de los músculos dorsales y de las patas traseras de conejos albinos New Zealand de un peso aproximado entre 2,5 y 3 Kg muertos por dislocación cervical y se recolectó en hielo. Todo el proceso posterior se realizó a una temperatura entre 0 y 4°C.

A continuación, el músculo es triturado en una picadora de carne (Danamix TR/BM-330) y homogeneizado con tres volúmenes de una solución que contenía KCl 0,12 M, imidazol 5 mM, PMSF 0,1 mM y β -mercaptoetanol 2 mM, pH 7,4 a 4°C.

La suspensión se centrifugó a 1.600 x g durante 15 minutos a 4°C. El sobrenadante se filtró a través de cuatro capas de gasas previamente humedecidas con agua destilada, ajustándose posteriormente el pH a 7,4.

Se realizó una segunda centrifugación a 10.000 x g durante 20 minutos a 4°C, filtrando el sobrenadante como antes se ha indicado, y ajustando el pH a 7,4.

El sobrenadante se centrifugó a 35.000 x g durante 60 minutos a 4°C. Tras esta centrifugación se eliminó el sobrenadante y el precipitado, sin el anillo marrón que aparece en el fondo del tubo de centrífuga formado fundamentalmente por contaminantes mitocondriales, se resuspendió en una solución que contenía Tes 10 mM (pH 7,4), KCl 1 M, PMSF 0,1 M y β -mercaptoetanol 2 mM. Se homogenizó y se enrasó con el mismo tampón hasta un volumen final de 250-300 ml. A continuación, se ajustó a pH 7,4 y se dejó incubar durante 2 horas. El KCl proporciona alta fuerza iónica que permite la eliminación de la actomiosina además de otras proteínas contaminantes del retículo sarcoplásmico.

Tras la incubación se realizó una nueva centrifugación en las mismas condiciones que la centrifugación anterior. A continuación se resuspendió y homogenizó el precipitado en unos 20 ml de una solución Tes 50 mM, KCl 0,1 M y sacarosa 0,25 M (tampón de resuspensión), pH 7,4, a una concentración de proteína entre 20-40 mg/ml.

La preparación se dividió en pequeñas fracciones que fueron congeladas a -60°C hasta su uso. La concentración de proteínas se determinó espectrofotométricamente teniendo en cuenta que una concentración de 1 mg de proteínas de RS por ml en SDS al 1% tiene una absorción de 1,0 a 280 nm (Harwicke y Green, 1974).

Las centrifugaciones se realizaron en una centrífuga Kontron Centrikon H-401 dotada con rotores Kontron A6.14 y A8.24. Para las ultracentrifugaciones se utilizó una ultracentrífuga Beckman L7-55, con rotores SW 28 y SW 55 Ti.

16. PURIFICACION DE LA $(\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+})\text{ATPasa}$ A PARTIR DE MEMBRANAS DEL RETICULO SARCOPLASMICO.

La purificación de la ATPasa de RS se realizó siguiendo el método descrito por MacLennan (1970).

Las vesículas de RS se resuspenden en sacarosa 250 mM, Tris/ClH 10 mM, pH 8, y se añade KCl sólido hasta alcanzar una concentración final de 1 M y a continuación, con agitación lenta, DOC al 10% (p/v), disuelto en el tampón anterior, hasta una concentración final de 0,1 mg DOC/mg de proteína. Se incuba 10 minutos a 0°C . Se centrifuga a $165.000 \times g$ durante 30 minutos a 4°C . Se aspira el sobrenadante opalescente con cuidado de no remover el precipitado. Este se resuspende y homogeneiza en un volumen igual al de partida de tampón sacarosa-Tris, centrifugando de nuevo a $165.000 \times g$ durante 25 minutos a 4°C . Se elimina el sobrenadante y se repite la operación de lavado con sacarosa-Tris y centrifugación. El precipitado se resuspende a una concentración de proteína de 25 mg/ml en el tampón sacarosa-Tris, pH 8.

La suspensión se diluye hasta 10 mg/ml con 1,5 volúmenes de una solución Tris/ClH 50 mM (pH 8), sacarosa 0,66 M, histidina 1 mM. Se puede añadir CaCl_2 hasta 0,1 mM para aumentar la estabilidad de la ATPasa. A continuación se añade a la suspensión por cada mg de proteína, 0,17 mg de acetato amónico saturado al 50% a 4°C . Se añade de nuevo DOC al 10% con agitación suave hasta una concentración final de 0,5 mg DOC/mg de proteína, y tras incubar durante 25 minutos a 0°C , se centrifuga a $165.000 \times g$ durante 10 minutos a 4°C , eliminando el precipitado insoluble. Se añade al sobrenadante acetato amónico saturado al 50% en fracciones de $10 \mu\text{l}/\text{ml}$ de suspensión hasta observar una turbidez significativa (de 30 a $60 \mu\text{l}/\text{ml}$ de solución, según las preparaciones). Se incuba la suspensión a 0°C durante 25 minutos y se centrifuga a $165.000 \times g$ durante 10 minutos a 4°C . Se elimina el precipitado y al sobrenadante se le añade un volumen de $70 \mu\text{l}$ de la solución de acetato amónico por ml de suspensión proteica, formándose de inmediato un precipitado. Tras 10 minutos a 0°C se recoge este por centrifugación a $165.000 \times g$ durante 10 minutos a 4°C . El precipitado

contiene la ATPasa purificada que se resuspende hasta una concentración de proteína de 10-25 mg/ml en una solución sacarosa 0,5 M, KCl 100 mM, Tes/KOH 50 mM (pH 7,4). La enzima se almacena a -60°C hasta su uso, siendo estable durante varios meses.

17. RECONSTITUCION DE LA ATPasa EN VESICULAS DE FOSFATIDILCOLINA.

La reconstitución de la ATPasa en vesículas de fosfatidilcolina se realizó utilizando el método de dilución rápida en tampón descrito por East y Lee (1982). Se toman 300 moles de lípidos por mol de ATPasa, se secan totalmente con N₂ y se añaden 0,5 mg DOC/mg de lípido, por agitación mecánica suave se resuspende el lípido, y a continuación se añade la ATPasa purificada en la relación molar, con respecto al lípido, deseada. La concentración de detergente, en este volumen final debe mantenerse por encima (1,2 veces) de la c.m.c. del DOC (5 mM). Se deja incubar la mezcla lípido-detergente-proteína a temperatura ambiente, con agitación suave, durante media hora. A continuación se adiciona un volumen de tampón tal que la concentración de detergente quede 10-20 veces por debajo de la c.m.c.. Las vesículas se conservan a -60°C. El tampón que se usa es Tes/KOH 50 mM (pH 7,4), sacarosa 0,5 M y KCl 100mM.

18. DETERMINACION DE LA CONCENTRACION DE PROTEINA.

Las proteínas han sido valoradas siguiendo el método colorimétrico descrito por Lowry y cols. (1951) (además de la determinación por medidas de absorción a 280 nm).

Se toman por duplicado muestras problema de proteína y se añade agua destilada (Milli-Q) hasta completar 200 µl. Después se añaden 2,5 ml de una solución de CO₃Na₂ al 4% en NaOH 0,1 N y 25 µl de CuSO₄.5 H₂O al 2%, se agita y se deja reposar 10 minutos a temperatura ambiente. A continuación se añaden 25 µl de tartrato- sódico-potásico al 4,9% en agua y 0,25 ml de reactivo Folin diluido en agua (1:2), se agita y se deja reposar otros 20 minutos a temperatura ambiente. Después se lee la absorbancia a 750 nm.

La cantidad de proteína se determina utilizando albúmina de suero bovino (BSA) como estándar e interpolando la absorbancia de la muestra problema en la recta patrón de albúmina.

19. DIALISIS.

Para dializar las muestras se utilizaron sacos de diálisis de celulosa de 6 mm de diámetro hervidos dos veces durante 10-15 minutos en una solución al 2,5% de CO₃Na₂, y a continuación tres

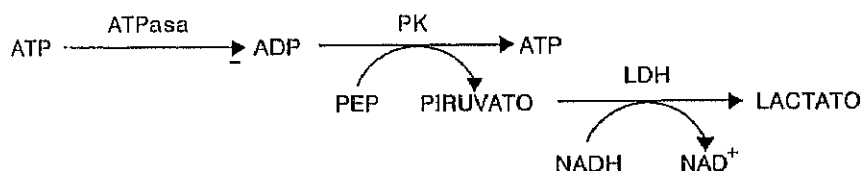
veces durante otros 10-15 minutos en agua Milli Q. Posteriormente, y hasta su utilización se almacenan en una solución de EDTA 10 mM a 4°C.

Los sinaptosomas y vesículas de RS fueron dializados a 4°C, con agitación continua, contra distintas soluciones según se requería para cada experimento y diferentes tiempos que osciló en cada caso entre 4 y 17 horas. En todos los casos el volumen de estos tampones fue 250-500 veces superior al volumen de muestra.

20. MEDIDA DE LA ACTIVIDAD ATPasa.

20.1. Sistema enzimático acoplado piruvato quinasa-lactato deshidrogenasa.

El ATP hidrolizado por la enzima es regenerado a partir de ADP y fosfoenol piruvato (PEP) añadido al medio, por la acción de la enzima piruvato quinasa (PK), tal y como se indica en el siguiente esquema:



El piruvato que resulta de esta reacción es reducido por la lactato deshidrogenasa (LDH) a lactato, y el donador de electrones acoplado a esta reacción, NADH, pasa a su estado oxidado NAD⁺.

Como indica la secuencia de reacciones anteriores, la relación estequiométrica entre ATP consumido y NADH oxidado hasta NAD⁺ es 1:1, pudiendo establecerse una relación directa entre disminución de absorbancia a 340 nm, y la actividad ATPasa en μ moles consumidos por minuto y por mg de proteína (U.I.). Para transformar la disminución de la concentración de NADH en U.I. referimos la velocidad de cambio de absorción (mD.O./min) a la cantidad de proteína presente en el ensayo. El valor obtenido se transforma en μ moles de ATP consumidos por minuto y por mg de proteína empleando el coeficiente de extinción molar del NADH a 340 nm, que en nuestras condiciones experimentales es $7,1 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

El ensayo de inhibición de la (Na⁺,K⁺)ATPasa purificada de médula renal de cerdo es el descrito por Josephson y cols., 1977, con una preincubación previa con Mg²⁺ 6mM. La solución de ensayo contenía NaCl 100 mM, KCl 25 mM, PEP 1,4 mM, MgCl₂ 6 mM, DTT 1 mM, HEPES-TEA 20 mM, ATP 3 mM, NADH 0,26 mM, PK 10 μ g/ml, LDH 10 μ g/ml. El inhibidor es previamente preincubado con la enzima purificada en Tris-HCl 1 M (pH 7,4) y MgCl₂ 6mM a 37°C durante 2

horas. Tras la preincubación se añade el medio de ensayo precalentado a 37°C y se mide la oxidación del NADH a 340 nm en un espectrofotómetro Beckman, modelo 25. Cuando se hicieron curvas control de inhibición con concentraciones crecientes de ouabafina (10^{-5} a 10^{-8} M), la concentración de potasio en el medio de reacción se redujo a 5 mM. El porcentaje de inhibición se obtiene al comparar con tubos control sin inhibidor.

La actividad específica de la $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{ATPasa}$ purificada osciló entre 6 y 10 U.I. Se define como unidad arbitraria de inhibición (1 U) la cantidad de inhibidor necesaria para producir una inhibición del 50%, en las condiciones de ensayo descritas, sobre la actividad $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{ATPasa}$ purificada de médula renal de cerdo.

La actividad total $(\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+})\text{ATPasa}$ de sinaptosomas y vesículas era cuantificada según han descrito García-Martín y Gutiérrez-Merino, 1986. La composición del medio de ensayo fue: Tes 50 mM (pH 7,4), KCl 0,1 M, MgCl_2 2 mM, ATP 2 mM, CaCl_2 50 μM , $\beta\text{-ME}$ 2 mM, azida sódica 5 mM, NADH 0,22 mM, PEP 0,42 mM, PK 10 U/ml y LDH 28 U/ml. Se registró la línea base en ausencia de sinaptosomas, y tras alcanzar una situación de estado estacionario se comienza la reacción con la adición de sinaptosomas. Las medidas se realizaron a 25°C en un espectrofotómetro Kontron Uvikon 810 con registrador Kontron Uvikon 21. La concentración de proteínas dependió de las condiciones experimentales de cada ensayo, pero en general fue de 20 $\mu\text{g/ml}$. Las modificaciones del medio de ensayo para determinar la actividad $\text{Mg}^{2+}\text{-ATPasa}$ y $(\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+})\text{ATPasa}$ son indicadas en las leyendas de las Figuras de los correspondientes apartados de Resultados. La contribución de la actividad $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{ATPasa}$ a la actividad ATPasa total en estas condiciones experimentales era menor de un 10% en todas las preparaciones.

La actividad $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{ATPasa}$ de vesículas derivadas de membrana plasmática sinaptosomal se midió según las condiciones descritas por Floreani y cols., 1981. El medio de ensayo era igual al descrito para medir la actividad $(\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+})\text{ATPasa}$ de sinaptosomas pero con una concentración de KCl 20 mM, NaCl 100 mM y ouabafina 1 mM.

La medida de la actividad $(\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+})\text{ATPasa}$ de vesículas de RS se ha realizado de manera similar a la descrita para las otras enzimas pero con pequeñas modificaciones (Gutiérrez-Merino y cols., 1989). La composición de la mezcla de reacción utilizada fue: Tes/KOH 0,1 M (pH 7,4), KCl 0,1 M, CaCl_2 0,1 mM, MgCl_2 5 mM, ATP 2,5 mM, NADH 0,25 mM, PEP 0,42 mM, PK 7,5 U.I. y LDH 18 U.I., a una temperatura de 25°C. Se registró la línea base en ausencia de vesículas de RS y a continuación, se adicionó a la cubeta el RS registrándose la variación de la absorbancia en función del tiempo. La concentración de proteína empleada dependía de las condiciones experimentales de

cada ensayo, pero en general fue de 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Para analizar el grado de pureza de las vesículas, se han realizado medidas de la actividad ATPasa independiente de Ca^{2+} en presencia de EGTA (3-4 mM). Se ha encontrado que en las preparaciones utilizadas en el estudio, esta actividad era inferior al 10% del total de la actividad ATPasa medida. El grado de sellamiento de las vesículas se ha estudiado a partir del efecto de A23187 sobre la actividad ATPasa. La actividad ATPasa se estimuló entre 2,5 y 4 veces a 25°C por A23187 4% (p/p) en las preparaciones de RS utilizadas.

La actividad específica de la ATPasa para vesículas de RS acopladas fue de $1,07 \pm 0,12$ U.I. y $4,12 \pm 0,69$ U.I. para vesículas desacopladas. Otras condiciones experimentales están indicadas en las leyendas de las Figuras correspondientes a Resultados.

20.2. Determinación de fosfato inorgánico.

Se ha utilizado el método de Fiske-Subbarow (Leloir y Cardini, 1957). Los reactivos utilizados fueron los siguientes: ácido sulfúrico 5 N (A), molibdato amónico 2,5 % (p/v) (B) y reactivo reductor (C), que se prepara mezclando 0,2 g de ácido 1-amino-2-naftol-4-sulfónico con 1,2 g de bisulfito sódico. En el momento de utilizarlo se disuelven 0,25 g de esta mezcla en 10 ml de agua. Esta solución se oxida lentamente y no se puede usar después de una semana de su preparación.

La solución estándar para el patrón de fosfato se prepara de una disolución de $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$ 10 mM que se almacena a 4°C. Para utilizarla se diluye 1:10 de forma que 1 ml de solución contiene 1 μmol de fosfato.

Para llevar a cabo la determinación de fosfato liberado se procedió como sigue: la reacción enzimática se detuvo con la adición de un volumen de ácido tricloroacético 10% igual al volumen de la mezcla de reacción descrita en el ensayo acoplado pero sin las enzimas auxiliares, NADH y PEP. A continuación las muestras se centrifugan a 1.500 x g durante 10 minutos a temperatura ambiente y se recoge 1 ml del sobrenadante, que contiene entre 0,1 y 1 μmol de fosfato. Al sobrenadante se le añade 1 ml del reactivo A, seguido de 1 ml del reactivo B. Después de agitar se añade 0,1 ml del reactivo C y agua hasta completar 10 ml. Una vez agitada la mezcla se esperan 10 minutos y se lee la absorbancia a 660 nm. En paralelo se realizaron patrones de concentración de fosfato conocida entre 0,1 y 1 μmol .

21. UNION DE ^3H -OUABAINA A LA $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{ATPasa}$.

Utilizamos el método descrito por Brooker y Jelliffe (1972) con algunas modificaciones. Se preincubaban durante 60 minutos $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{ATPasa}$ 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$, diferentes concentraciones de ouabaina

(10^{-6} M - 10^{-9} M) y/o el inhibidor (0,1 - 12 U/ml) en un volumen final de 1 ml en el siguiente medio: Tris-HCl 50 mM , NaCl 100 mM , EDTA 0,25 mM , $MgCl_2$ 7 mM , ATP 5 mM y 50 nCi de 3H -ouabaína (20,6 Ci/mmol) a $37^\circ C$ y a un pH de 7,4 . La reacción se detiene poniendo los tubos en hielo. A continuación se filtran a través de discos de nitrato de celulosa (GSWP02500, Millipore) de $0,22 \mu m$ de tamaño de poro. Una vez secos se les añade 10 ml de líquido de centelleo (OptiPhase Hisafe II, LKB) y se cuentan en un contador rackbeta 1209 (LKB). Los blancos para descontar la unión no específica de 3H -ouabaína se obtienen añadiendo ouabaína fría 1 mM al medio de ensayo. El porcentaje de inhibición se calcula por comparación con los tubos controles sin inhibidor.

22. MEDIDAS DE CAPTACION DE Ca^{2+} DEPENDIENTE DE ATP EN VESICULAS.

La captación de $^{45}Ca^{2+}$ fue determinada por filtración rápida a través de filtros Millipore HAWP02500. El medio de reacción contenía Tes 50 mM (pH 7,4), KCl 0,1 M, $MgCl_2$ 2 mM, ATP 1 mM, $CaCl_2$ $50 \mu M$ ($0,4 \mu Ci/ml$, $[Ca^{2+}]_{libre}$ $42 \mu M$), β -mercaptoetanol 2 mM y 0,12 mg de proteína/ml.

Se tomaron fracciones a los 2 y 5 minutos y a los 10 minutos después de la adición de A23187 ($19 \mu M$), que eran inmediatamente filtrados a través de filtros Millipore de diámetro de poro de $0,45 \mu m$. Los filtros fueron lavados 3 veces con 3 ml de una solución fría que contenía Tes 50 mM (pH 7,4), KCl 0,1 M, $MgCl_2$ 1 mM y $LaCl_3$ 1 mM y contados en un contador de centelleo Beckman LS 3801, usando como líquido de centelleo 2-(4'-butilfenil)-5-(4'-difenil)-1,3,4-oxadiazol/tolueno (5 g/l).

Paralelamente se realizaron controles sin ATP en las mismas condiciones con objeto de valorar la captación de Ca^{2+} independiente de ATP. La unión inespecífica de Ca^{2+} a los filtros fue valorada realizando el experimento en las condiciones descritas sin sinaptosomas.

Para transformar las cpm medidas en el contador de centelleo en nmol de Ca^{2+}/mg de proteína, se obtuvo el valor de actividad específica (cpm/nmol Ca^{2+}) midiendo las cpm totales que había en cada tubo antes de filtrar.

23. MEDIDA DE LA PERMEABILIDAD DE VESICULAS POR DISPERSION DE LUZ.

La permeabilidad pasiva de Ca^{2+} a través de la membrana plasmática se ha medido siguiendo el método de dispersión de luz descrito por Kometani y Kasai, 1978; Escudero y Gutiérrez-Merino, 1987; García-Martín y cols., 1990.

La forma de las partículas microsomaes en suspensión depende de las propiedades físico-químicas de sus membranas. Estas tienden a adoptar una forma esférica o elipsoide en condiciones de equilibrio (Arrio y cols., 1974; Kometani y Kasay, 1978), como ocurre en las preparaciones utilizadas en este estudio. Sin embargo, estas vesículas pueden sufrir deformaciones notables cuando se les aplica convenientemente una fuerza como puede ser un choque osmótico (Sha'afi y cols., 1970; Knauf y cols., 1977).

La dispersión de luz por una partícula depende de su forma (Timasheff y Townend, 1969). La cuantía de la luz dispersa con respecto a la luz incidente muestra una fuerte dependencia no sólo con el tamaño y la forma de la partícula, sino también con la longitud de onda de la radiación incidente. Se ha utilizado para realizar estas medidas un espectrofluorímetro, que recoge la intensidad de luz dispersa (I_{90}) en una dirección perpendicular a la del haz de luz incidente, trabajando con ambos monocromadores (de excitación y de emisión) a la misma longitud de onda. Se ha comprobado previamente que la muestra objeto de estudio no emite fluorescencia a la longitud de onda elegida.

En respuesta al choque osmótico las vesículas pierden agua de su espacio intravesicular, para compensar la diferencia de osmolaridad entre los espacios intra y extravesicular. Debido al alto coeficiente de permeabilidad al agua que presentan las membranas de mamíferos (Sha'afi y cols., 1970), este proceso tiene lugar muy rápidamente, en un tiempo de 60-100 ms. Al finalizar este rápido eflujo de agua las vesículas han adoptado una forma más aplanada concentrando las sales en ellas contenidas, hasta igualar su osmolaridad con la del medio exterior. La intensidad de dispersión de luz sufre un apreciable incremento, dado que a mayor asimetría tridimensional corresponde una mayor dispersión de luz (Timasheff y Townend, 1969).

A este rápido aumento inicial de dispersión de luz sigue una fase de características cinéticas más lentas de disminución de la misma. La velocidad de esta segunda fase depende de la composición iónica del medio, pues se halla relacionada con el coeficiente de difusión de las especies iónicas del medio a través de la membrana de las vesículas que tienden a recuperar su forma esférica. No obstante, para que se mantenga la isoosmolaridad entre los dos compartimentos la entrada de agua a de ir acompañada de los iones del medio exterior. Diseñando los experimentos de forma que existan en el medio sólo una o dos especies iónicas mayoritarias en un medio débilmente tamponado, según lo indicado por Kometani y Kasai (1978) la constante aparente de tiempo de permeabilidad, τ , para el caso de una sal se podría escribir como:

$$\tau_{sal} = \infty (\tau_{catión} + \tau_{anión})$$

donde τ es proporcional a la inversa del coeficiente de difusión de dicha especie. Si una de las dos especies difunde a través de la membrana a mucha mayor velocidad que la otra, la constante de tiempo de permeabilidad de la sal será aproximadamente igual a la de la especie que difunde más lentamente. En nuestros experimentos, dado que el ión cloruro difunde mucho más rápidamente que el calcio a través de la membrana plasmática de sinaptosomas (Hille, 1981) y de la membrana de retículo sarcoplásmico (Kometani y Kasai, 1978), esta constante de permeabilidad de la sal reflejará la constante de difusión del catión.

En el caso más simple, la difusión de una especie iónica a través de una membrana puede describirse como un proceso cinético de primer orden, con una única constante de difusión (D); en otros casos, sin embargo, puede ajustarse a la suma de dos procesos cinéticos, obteniendo entonces dos constantes de difusión (D_1 y D_2).

Por otra parte, ha sido mostrado para liposomas (Yoshikawa y cols., 1983) que la relación entre el volumen interior, V_i , y la intensidad de dispersión de luz (I_{90}) viene dada por la siguiente expresión (1):

$$\Delta V_i = (\Delta I_{90})^{3/2}$$

El agua acompaña al catión cuando este difunde hacia el interior de las vesículas con el fin de mantener la isoosmolaridad durante el proceso de recuperación de la forma esférica (Kometani y Kasai, 1978). Para el caso de un proceso de difusión pasiva de una especie iónica o molecular definido por una constante de difusión, $D_{\text{catión}}$, podemos escribir (2):

$$(V_{\infty} - V_t) = (V_{\infty} - V_0) \cdot e^{-D_{\text{catión}} \cdot t}$$

donde V_{∞} , V_0 y V_t son el volumen limitante (volumen del estado esférico relajado), el volumen de las vesículas al comenzar la fase de recuperación de la forma esférica y el volumen a tiempo t después del choque osmótico, respectivamente.

Combinando las ecuaciones (1) y (2) se puede obtener:

$$(I_{\infty} - I_t)^{3/2} = (I_{\infty} - I_0)^{3/2} \cdot e^{-D_{\text{catión}} \cdot t}$$

donde I_{∞} , I_0 y I_t representan la intensidad de luz dispersa de las vesículas en los estados definidos por V_{∞} , V_0 y V_t , respectivamente. La electroneutralidad en la difusión pasiva del catión está

garantizada en nuestras condiciones experimentales por la difusión paralela de iones cloruro. Ello conlleva que la recuperación de la forma esférica puede ser descrita por un proceso de difusión simple a través de un único tipo de canales con propiedades constantes de permeabilidad. La representación de $3/2 \ln(I_{\infty}-I_t)$ frente a t , debe ser una línea recta a partir de la cual se puede estimar $D_{\text{catión}}$. Como se verá más adelante, en muchos casos se producen desviaciones claras y significativas de la linealidad en este tipo de representaciones semilogarítmicas de los datos experimentales. En estos casos los datos han sido satisfactoriamente ajustados a la suma de dos exponenciales:

$$(I_{\infty}-I_t)^{3/2} = (I_{\infty}-I_0)^{3/2} \cdot [A \cdot e^{-D_1 \cdot t} + (1-A) \cdot e^{-D_2 \cdot t}]$$

donde D_1 y D_2 son las constantes de difusión del catión a través de a) dos canales o vías distintas en la membrana o b) dos estados conformacionales diferentes del mismo canal con propiedades también distintas de permeabilidad, y A es la fracción de canales de tipo 1 o en estado conformacional 1.

En todos los casos, los datos transformados han sido ajustados por regresión lineal para obtener los valores de $D_{\text{catión}}$. Cuando los datos se han ajustado a la suma de dos exponenciales, el procedimiento seguido ha sido el siguiente: Primero, se ha obtenido D_2 del ajuste de los datos a tiempos largos a una línea recta por regresión lineal. La diferencia entre los datos transformados y el correspondiente valor de Y de la línea recta ajustada a tiempos largos ha sido ajustada a otra línea recta a partir de la cual se ha obtenido D_1 .

El procedimiento seguido para medir la permeabilidad a Ca^{2+} de las vesículas de membrana plasmática ha sido el siguiente. A una cubeta de cristal de cuarzo de paso de luz 1 cm, que contenía el medio de choque Tes 5mM (pH 7,4) y CaCl_2 100 mM, se añaden vesículas, previamente dializadas frente a Tes 5mM durante 4 h a 4°C, y se agita inmediatamente. La concentración de proteína en la cubeta es de 0,1 mg/ml. La disminución en la dispersión de luz, que proporciona una medida de la permeabilidad de la membrana a Ca^{2+} , fue medida a una longitud de onda de excitación de 400 nm, registrando la emisión a 410 nm a 25°C usando un espectrofluorímetro Hitachi/Perkin Elmer, modelo 650-640. Además, se añaden al medio distintas concentraciones de HHIF.

Los monocromadores de excitación y emisión fueron desfasados 10 nm para disminuir la intensidad de luz dispersa que de otra manera sería muy elevada. La intensidad de luz dispersa se registró directamente en función del tiempo. Como se ha indicado previamente, el análisis de los datos requiere calcular el valor de I_{∞} . Este valor ha sido obtenido midiendo la intensidad de dispersión de luz entre 2-3 h después de producido el choque osmótico en un medio con agitación continua. Medidas llevadas a cabo previamente a diferentes tiempos entre 2 y 6 h han mostrado que 3 h es un tiempo suficiente para que la intensidad de dispersión de luz tras el choque osmótico se estabilice y

alcance los mismos valores, dentro del error experimental, que los obtenidos con la misma concentración de vesículas en ausencia de choque osmótico.

24. MEDIDA DEL FLUJO DE Ca^{2+} CON CLORTETRACICLINA.

La actividad del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ ha sido medida utilizando la fluorescencia de clortetraciclina (CTC) (Caswell, 1972; Schaffer y Olson, 1976; García-Martín y cols., 1990).

Ha sido mostrado por diferentes grupos de investigadores que la clortetraciclina (CTC) forma complejos con Ca^{2+} y que el rendimiento cuántico de la fluorescencia de estos complejos se eleva notablemente cuando estos se adsorben a membranas biológicas (Millman y cols., 1980) (Figura 1).

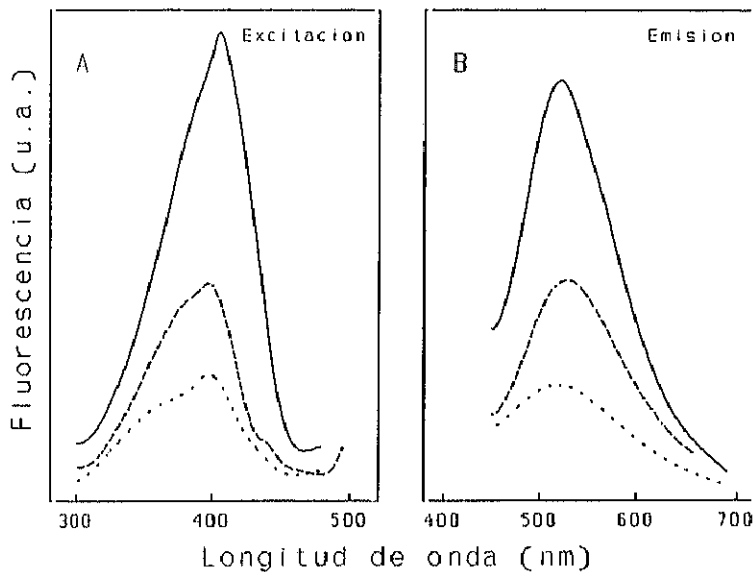


Figura 1. Espectro de fluorescencia de la clortetraciclina en presencia y ausencia de Ca^{2+} . La línea continua corresponde al espectro de una solución de sinaptosomas en presencia de CTC y Ca^{2+} . La línea discontinua es el registro de CTC más Ca^{2+} . La línea punteada es el registro de CTC.

El método operacional ha sido el siguiente: las vesículas ($45 \mu\text{g}/\text{ml}$) se incubaron durante 30 min a 37°C en una solución que contenía Tes 5 mM ($\text{pH } 7,4$), $\text{NaCl } 0,1 \text{ M}$ y CTC $50 \mu\text{M}$. Tras la centrifugación durante 30 minutos se resuspenden en Tes 5 mM ($\text{pH } 7,4$), $\text{NaCl } 0,1 \text{ M}$, CTC $50 \mu\text{M}$. Para realizar las medidas de fluorescencia, a una cubeta de cuarzo de paso de luz de 1 cm se añadieron 2 ml de una solución que contenía Tes 5 mM ($\text{pH } 7,4$), CTC $50 \mu\text{M}$, CaCl_2 $50 \mu\text{M}$ y $\text{KCl } 0,1 \text{ M}$ o $\text{NaCl } 0,1 \text{ M}$ o cloruro de colina $0,1 \text{ M}$, según las diferentes condiciones experimentales. A tiempo cero se añaden las vesículas precargadas con Na^+ a una concentración final de proteínas de

45 $\mu\text{g/ml}$ y se registra la variación de fluorescencia de CTC con el tiempo a 37°C en un espectrofluorímetro Hitachi/Perkin-Elmer, modelo 650-640. Se emplearon una longitud de onda de excitación de 380 nm y 520 nm de emisión.

A partir del ajuste de los datos del aumento de la intensidad de fluorescencia de CTC con el tiempo a un proceso exponencial simple es posible obtener el valor de la constante de velocidad del influjo de Ca^{2+} (K) a través de la membrana de sinaptosomas. Los valores de K representados en los Resultados han sido obtenidos a partir del ajuste por regresión lineal de $\text{Ln}(F_{\infty} - F_t)$ frente al tiempo, donde F_{∞} y F_t representan la intensidad de fluorescencia en el infinito y a un tiempo t , respectivamente.

25. NIVELES DE Ca^{2+} EN ESTADO ESTACIONARIO EN VESICULAS DEL RETICULO SARCOPLASMICO.

Los estudios sobre niveles de Ca^{2+} acumulado en estado estacionario se llevaron a cabo utilizando el indicador metalocrómico arsenazo III. Este compuesto presenta una alta afinidad por Ca^{2+} y puede formar complejos con él. Como se muestra en el espectro de absorción (Figura 2), la absorbancia de arsenazo III en ausencia de Ca^{2+} es mayor a 540 nm, y relativamente más pequeña a 650 nm. La unión de Ca^{2+} reduce la absorbancia a 540 nm y la incrementa a longitud de onda mayores. El incremento muestra dos picos, centrados a 600 y 650 nm, y un punto isosbético a una longitud de onda de 570 nm (en la cual no hay cambio de absorción).

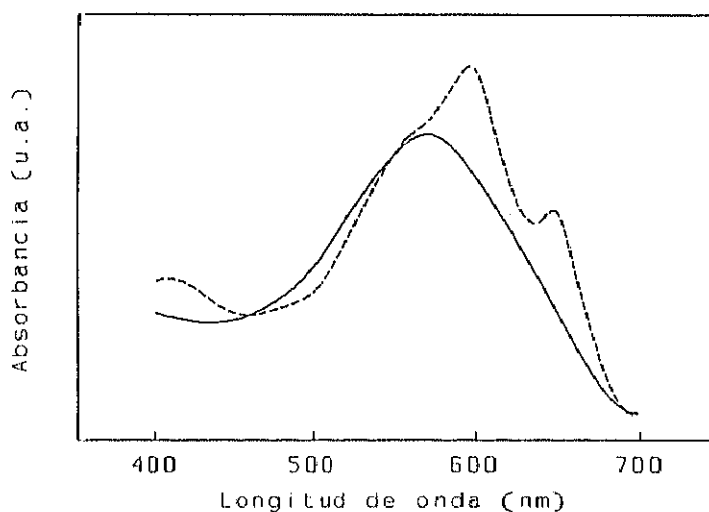


Figura 2. Espectro de absorción de arsenazo III (línea continua) y arsenazo III- Ca^{2+} (línea discontinua).

Para la determinación de los niveles de Ca^{2+} acumulado por RS en estado estacionario con arsenazo III, utilizamos la diferencia de absorción entre 650 y 700 nm, que es función lineal de la

concentración de Ca^{2+} . Se preparan cubetas de 1-2 ml de volumen total con Tes/KOH 50 mM (pH 7,4), KCl 0,1 M, MgCl_2 5 mM, sacarosa 0,25 M, arsenazo III 30 μM , y se dejan incubar durante 10 minutos a 25°C, registrando la línea base en estas condiciones (Figura 3). A continuación se calibra la señal con adiciones de 2 x Ca^{2+} 40 μM . Tras la calibración se añaden las vesículas de RS (2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) previamente preincubadas con o sin inhibidor durante 15 minutos a 25°C. A continuación se dispara la reacción añadiendo ATP a una concentración final de 2,5 mM. El descenso de absorbancia registrado es debido a la acumulación de Ca^{2+} por fosfato inorgánico y ADP, especies resultantes de la hidrólisis de ATP, y contaminantes habituales en las preparaciones comerciales de ATP. Por esta razón se añadió a las cubetas de reacción, una vez estabilizado el proceso de captura de Ca^{2+} por el RS, el ionóforo de Ca^{2+} A23187 (2 $\mu\text{g}/\text{ml}$), observándose una reversión parcial del fenómeno de captura de Ca^{2+} , siendo esta variación de absorción la que se toma para determinar la concentración de Ca^{2+} capturado por las vesículas de RS.

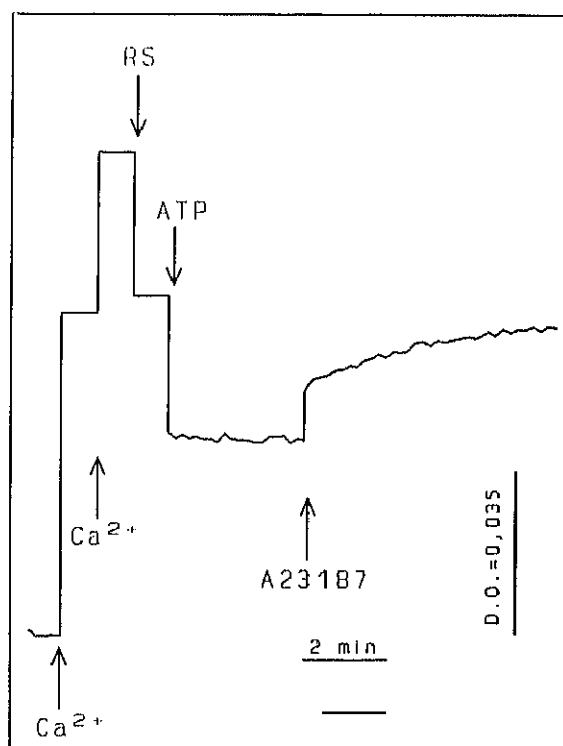


Figura 3. Cambios en la absorción de arsenazo III durante la acumulación de Ca^{2+} . El medio contiene Tes/KOH 50 mM (pH 7,4), sacarosa 0,25 M, arsenazo III 30 μM , KCl 0,1 M, MgCl_2 5 mM y 0,2 mg/ml de RS. Adiciones secuenciales de Ca^{2+} 40 μM para la calibración de la señal, ATP 2,5 mM para estimular la captura de Ca^{2+} y A23187 (2 $\mu\text{g}/\text{ml}$) para determinar el Ca^{2+} acumulado.

26. MEDID DE VELOCIDAD DE TRANSPORTE EN PRESENCIA DE OXALATO.

Las medidas de velocidad inicial del transporte de calcio se realizaron utilizando arsenazo III $5 \mu\text{M}$, como se indica en el apartado anterior y en presencia de oxalato 5 mM .

El oxalato es un agente precipitante de calcio, que se equilibra rápidamente entre el medio externo y el medio interno de las vesículas (Stefanova y cols., 1991). Esto produce una disminución del Ca^{2+} libre en el interior de las vesículas de RS, gracias a la formación de oxalato cálcico, y como consecuencia desaparece la inhibición que el propio Ca^{2+} interno produce sobre la actividad ATPasa. De esta forma la hidrólisis de ATP se estimula y la acumulación de calcio se prolonga.

La cantidad de RS utilizada en estos ensayos fue de $25 \mu\text{g/ml}$. La señal se calibra con adiciones de Ca^{2+} $40 \mu\text{M}$ y la reacción se inicia con ATP $2,5 \text{ mM}$. La velocidad inicial de transporte de Ca^{2+} se calcula a partir de la pendiente que se obtiene con los valores de los 2 o 3 primeros minutos de la reacción.

27. DETERMINACION DEL Ca^{2+} INTRACELULAR EN CELULAS MESANGIALES DE RATA.

La concentración de Ca^{2+} intracelular fue medida como se describe en Olivera y cols. (1992). Las células en cultivo fueron tratadas con tripsina y centrifugadas durante 3 min a 1.800 rpm. El precipitado se resuspendió en RPMI 1640 suplementado con suero fetal bovino al 10%. A continuación, las células eran incubadas con Fura-2/AM $5 \mu\text{M}$ durante 45 min a 37°C y centrifugadas para eliminar el Fura-2 del medio. Las células resuspendidas en solución salina Hanks sin Ca^{2+} ni Mg^{2+} se dejan incubar 15 min, para que el Fura-2 no hidrolizado salga de la célula, se centrifugan y resuspenden en solución salina de Hanks sin Ca^{2+} ni Mg^{2+} .

A una cubeta de cristal de cuarzo que contenía 1 ml de solución de Hanks, se añade 1 ml de suspensión celular, CaCl_2 1 mM y MgCl_2 1 mM , se deja incubar durante 15 min a 37°C con agitación. A continuación, la fluorescencia (F) fue medida a una longitud de onda de excitación de 340 nm, registrando la emisión a 510 nm a 37°C usando un espectrofluorímetro Perkin-Elmer LS50. Además, se añaden al medio distintas concentraciones de HHIF. La concentración de Ca^{2+} intracelular se calcula utilizando un valor de K_D de 224 nm (Grynkiewicz y cols. (1985)), según la siguiente expresión:

$$[\text{Ca}^{2+}]_i = \frac{225 (F - F_{\text{min}})}{F_{\text{max}} - F}$$

La calibración de las medidas se llevan a cabo utilizando digitonina 50 μM (F_{max}) y 40 μl de una solución de EGTA 0,2 M (F_{min}).

28. MEDIDAS DE FLUIDEZ DE MEMBRANA.

La fluidez de la membrana ha sido estudiada utilizando medidas de polarización de fluorescencia, para lo cual se utilizó como sonda una molécula hidrofóbica fluorescente (1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno (DPH)).

La polarización de fluorescencia se puede medir utilizando dos polarizadores, uno en la trayectoria del haz de excitación (polarizador de excitación) y otro se sitúa entre la muestra y el detector (polarizador de emisión). La intensidad de fluorescencia se ha medido con el polarizador de excitación vertical y el polarizador de emisión primero vertical y después horizontal.

En general, se puede definir la polarización, P , como:

$$P = \frac{I_{VV} - I_{VH}}{I_{VV} + I_{VH}}$$

donde I_{VV} y I_{VH} representan la intensidad de fluorescencia con el polarizador de excitación vertical y el de emisión vertical y horizontal, respectivamente.

Alternativamente, se puede definir la anisotropía, r_s , como:

$$r_s = \frac{2P}{3 - P}$$

La relación entre estos dos parámetros es:

$$r_s = \frac{I_{VV} - I_{VH}}{I_{VV} + 2I_{VH}}$$

Es necesario introducir un factor de corrección dado que cualquier superficie reflectante plana refleja preferentemente la luz polarizada paralela a la superficie reflectante y porque las lentes tienen más transmitancia para un plano de polarización que en el otro. El factor de corrección, G , se determina midiendo la intensidad de fluorescencia con el polarizador de excitación horizontal y, el polarizador de emisión vertical y horizontal:

$$G = \frac{I_{HV}}{I_{HH}}$$

La ecuación de polarización quedaría entonces (Lee,1982):

$$P = \frac{I_{VV} - GI_{VH}}{I_{VV} + GI_{VH}}$$

A partir de la anisotropía de fluorescencia puede calcularse el parámetro de orden (S) según la ecuación desarrollada por Pottel y cols.(1983):

$$S = \frac{[1 - 2(r_s - r_0) + S(r_s/r_0)^2]^{1/2} - 1 + r_s/r_0}{2(r_s/r_0)}$$

donde r_s es la anisotropía de fluorescencia y r_0 es la anisotropía de fluorescencia en ausencia de cualquier movimiento rotacional de la sonda. Para DPH el valor teórico de $r_0 = 0,4$, y los valores experimentales varían entre 0,362 y 0,395 (Heyn, 1979 y Jähing, 1979). El parámetro de orden varía desde 0, que corresponde a un estado de máximo desorden, hasta 1 que sería el estado de rigidez total.

Tras incidir sobre la sonda una radiación de excitación polarizada en un plano, el nivel de polarización de la radiación emitida depende directamente de la microviscosidad del medio, siendo máxima en un medio altamente viscoso como glicerol (Lee,1982). Por el contrario, una despolarización de la radiación fluorescente emitida elevada indica que la sonda, en el tiempo transcurrido entre la excitación y la emisión, ha variado su orientación. El grado de despolarización de la señal refleja la movilidad rotacional de la sonda fluorescente que depende directamente de la microviscosidad de la membrana.

A partir de S se puede calcular la microviscosidad corregida " η_0 ", con la siguiente ecuación (Pottel y cols., 1983):

$$\eta_0 = \frac{V \cdot S}{(1 + S)}$$

donde V es $C \tau T$, C es un factor geométrico, τ es el tiempo de vida media en estado excitado de la molécula fluorescente y T es la temperatura absoluta. Para difenil-hexatrieno V toma el valor de 2,4 poise.

Se utilizó como sonda fluorescente para realizar estas medidas el 1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno (DPH). Este presenta la ventaja de tener un alto coeficiente de extinción y un máximo de absorción a 355 nm, lejos del máximo de absorción del triptófano. Además forma microagregados en agua no fluorescentes, mientras que es altamente fluorescente cuando se incorpora a la membrana. En la

Figura 4 se muestran los espectros polarizados de emisión de fluorescencia de DPH obtenidos en presencia de membranas en cubetas de cuarzo de 1 cm de paso de luz

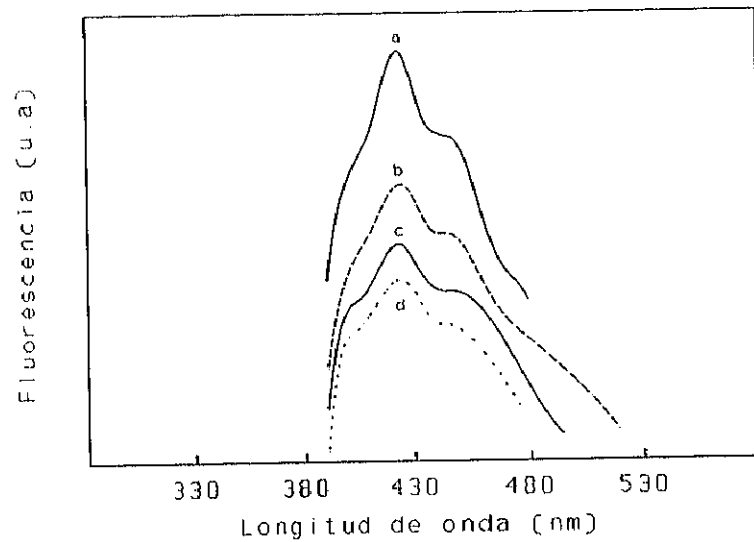


Figura 4. Espectros polarizados de emisión de fluorescencia de DPH en presencia de sinaptosomas a 25°C. La posición de los polarizadores de excitación y emisión es la siguiente: (a) $I_V^{ex}-I_V^{em}$, (b) $I_{II}^{ex}-I_V^{em}$, (c) $I_{II}^{ex}-I_{II}^{em}$, (d) $I_V^{ex}-I_{II}^{em}$.

DPH, disuelto en tetrahidrofurano, se añadió a una suspensión de sinaptosomas o vesículas de retículo sarcoplásmico en una proporción menor o igual a 1/500 moles DPH/moles lípidos. Se deja incubar en la oscuridad durante 90 minutos para permitir que se alcance el equilibrio DPH en solución acuosa/DPH en membrana. El paso de luz hacia la cubeta ha de estar cerrado siempre que no se estén realizando medidas para evitar la fotodescomposición del DPH. La longitud de onda de excitación fue de 360 nm y la de emisión 440 nm. La composición de la solución de medida contenía KCl 0,1 M, sacarosa 0,3 M, Tes 5 mM (pH 7,4), β -mercaptoetanol 2 mM en el caso de los sinaptosomas y Tes 50 mM (pH 7,4), sacarosa 0,25 M, KCl 0,1 M para las vesículas de retículo sarcoplásmico. Todas las medidas se realizaron a una temperatura de 25°C.

29. DETERMINACION DEL COEFICIENTE APARENTE DE PARTICION (K_p) DE HHIF EN LA MEMBRANA DE SINAPTOSOMAS.

El coeficiente de partición se define como la relación entre la concentración de HHIF unido a la membrana y la concentración del inhibidor libre. Para determinar estas concentraciones hemos medido la intensidad de fluorescencia de HHIF fijando una longitud de onda de excitación y de emisión de 270 y 304, respectivamente. La intensidad de fluorescencia correspondiente a la concentración de HHIF unido a la membrana se ha estimado como la diferencia entre la fluorescencia correspondiente a la concentración de inhibidor total y la del libre.

Las medidas fueron realizadas a una concentración de proteína de 25 µg/ml y 50 µg/ml, y varias concentraciones de inhibidor en un medio que contenía Tes/KOH 50 mM (pH 7,4), KCl 0,1 M.

El proceso experimental seguido consistió en medir la intensidad de fluorescencia del medio antes de añadir sinaptosomas en presencia de distintas concentraciones de HHIF. A continuación, se añaden estos, y previa incubación durante 15 minutos a temperatura ambiente, se centrifugan a 45.000 rpm durante 2h a 4°C. Se mide la fluorescencia del sobrenadante para valorar la concentración de HHIF libre que no se ha adsorbido a la bicapa lipídica.

30. TRATAMIENTO DE DATOS.

30.1. Determinación del tiempo de relajación, τ .

El curso en el tiempo de la cinética enzimática de la $(Ca^{2+}, Mg^{2+})ATPasa$ puede ser descrito satisfactoriamente por la expresión:

$$V_t = V_f + (V_i - V_f) \cdot e^{-K \cdot t}$$

donde V_t es la velocidad a tiempo t , V_i es la velocidad inicial, V_f es la velocidad final y K es la constante de velocidad aparente del proceso. Para obtener el valor de K se hizo la representación gráfica de la concentración de producto frente al tiempo (véase la Figura 5). La intersección de las dos rectas ajustadas permite obtener el valor de $1/K$ o tiempo de relajación (Frieden, 1981). Las pendientes de las líneas señaladas como a y b son V_i y V_f , respectivamente.

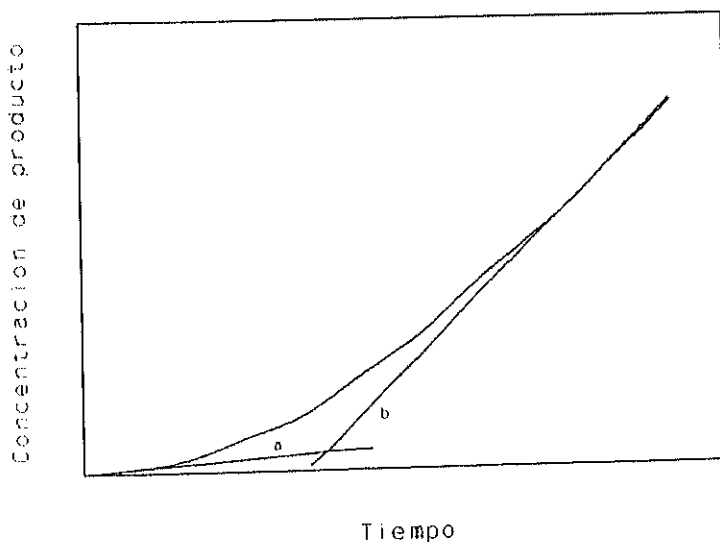
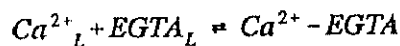


Figura 5. Formación del producto en función del tiempo en un proceso cinético de autoactivación.

30.2. Cálculo de la concentración de calcio libre.

El ajuste de concentraciones submicromolares de Ca^{2+} libre en determinadas condiciones experimentales se llevó a cabo añadiendo tampones Ca^{2+} -EGTA.

El equilibrio químico entre Ca^{2+} y EGTA a un pH dado vendría expresado como:



donde la constante de disociación vendría dada por (1):

$$K_d = \frac{[\text{Ca}^{2+}]_L \cdot [\text{EGTA}]_L}{[\text{Ca}^{2+} - \text{EGTA}]}$$

considerando un valor de K_d de $10^{-7.2}$ a pH 7,4 (Harafuji y Ogawa, 1980).

1. Si la concentración de Ca^{2+} es mayor que la concentración de EGTA, la concentración de Ca^{2+} libre es aproximadamente igual a:

$$[\text{Ca}^{2+}]_L \approx [\text{Ca}^{2+}]_T - [\text{EGTA}]_T$$

2. Cuando la concentración de Ca^{2+} es inferior a la concentración de EGTA, entonces (2) y (3):

$$[\text{Ca}^{2+}]_T \approx [\text{EGTA} - \text{Ca}^{2+}]$$

$$[\text{EGTA}]_L \approx [\text{EGTA}]_T - [\text{Ca}^{2+}]_T$$

Sustituyendo en la ecuación (1) las expresiones (2) y (3),

$$K_d = \frac{[\text{Ca}^{2+}]_L ([\text{EGTA}]_T - [\text{Ca}^{2+}]_T)}{[\text{Ca}^{2+}]_T}$$

Despejando se obtiene la siguiente expresión:

$$[Ca^{2+}]_L = \frac{K_d \cdot [Ca^{2+}]_T}{[EGTA]_T - [Ca^{2+}]_T}$$

donde la concentración de Ca^{2+} libre es función de las concentraciones totales de EGTA y de Ca^{2+} .

30.3. Todos los experimentos se realizaron por duplicado o triplicado con al menos tres preparaciones diferentes de membranas. Los valores representan la media \pm DS. En los casos en que la desviación estándar es $< 10\%$ no se representa barra de error. El ajuste de los valores experimentales a las correspondientes curvas se realizó mediante el programa GraphPad Inplot.

RESULTADOS

1. PURIFICACION.

De extractos de cerebro, hipófisis, hipotálamo y glándula suprarrenal bovinos hemos purificado un factor que actúa como inhibidor de la $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{ATPasa}$ y de la unión de ^3H -ouabaína a la enzima. La enzima utilizada procede de médula renal de cerdo y se ha purificado según se describe en Materiales y Métodos. El factor inhibidor recibe el nombre de HHIF (Hypothalamic Hypophysary Inhibitory Factor).

Para su purificación se homogeniza el tejido recién descongelado en metanol. Tras una extracción lipídica con éter de petróleo-cloroformo, la fase acuosa se concentra por liofilización y se resuspende en metanol. A continuación se centrifuga y el sobrenadante se cromatografía por filtración en gel (véase Materiales y Métodos). Como se muestra en la Figura 6, las fracciones con actividad inhibidora de la $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{ATPasa}$, eluyen inmediatamente antes del pico correspondiente a las sales. Estas fracciones inhibidoras aparecen en todos los tejidos procesados. Dependiendo de cada cromatografía, el pico abarca desde el final del volumen de exclusión teórico de la columna (35% del volumen total) hasta el doble de este valor. Previamente se comprobó que estas fracciones no afectaban a las enzimas auxiliares del ensayo enzimático acoplado (PK y LDH).

Las fracciones activas son recogidas, liofilizadas y concentradas. Este material parcialmente purificado se somete de nuevo a cromatografía, en este caso HPLC semipreparativa en fase reversa.

Los cromatogramas obtenidos (Figura 7), registrados a una longitud de onda de 214 nm, muestran dos picos con actividad inhibidora de la $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPasa}$. Esto ocurre en todos los tejidos estudiados excepto en cortex cerebral donde sólo aparece uno. El primer pico, que es el que aparece en todos los casos, coincide con el volumen de exclusión de la columna y corresponde a un tiempo de retención entre 6 y 10 min. El segundo pico presenta un tiempo de retención de 143 min y aparece en todos los tejidos estudiados a excepción del cortex cerebral.

Las fracciones del primer pico (a) conservan su acción inhibidora de la actividad $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{ATPasa}$ medida *in vitro* tras su reducción a cenizas (250°C durante 24 h) por lo que probablemente corresponda a componentes de naturaleza inorgánica. Este hecho se confirma porque la incubación de estas fracciones con EDTA 1 mM, agente quelante de iones metálicos divalentes, elimina el efecto inhibidor de estas fracciones.

Las fracciones con actividad inhibidora correspondientes al segundo pico (b) son recogidas, liofilizadas y recromatografiadas por HPLC analítica. La Figura 8 presenta el perfil de elución en una columna $\mu\text{Bondapak Fatty Acid}$ de todos los tejidos procesados. En el cromatograma registrado a 214 nm se detecta un pico mayoritario, con un tiempo similar de retención en todos los tejidos procesados.

En el perfil correspondiente a cortex no aparece pico ni hay actividad inhibidora de la $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{ATPasa}$.

El análisis espectral, llevado a cabo con un detector de multifotodiodos asociado al cromatógrafo líquido de alta resolución (HPLC), permite identificar el pico con un máximo de absorción a 274 nm (Figura 9, columna de la derecha). Al comparar los espectros de absorción de este pico, considerando las pendientes ascendente y descendente, así como el máximo del pico (puntos a-e, Figura 9, columna de la izquierda) y normalizando a 274 nm se observa el solapamiento de los espectros lo cual muestra la presencia de un único componente con un máximo de absorción a 274 nm (Figura 9).

En la columna de la izquierda de la Figura 9 se muestra la localización de la actividad inhibidora en los diferentes picos aislados correspondientes a los distintos tejidos procesados. El efecto inhibidor medido utilizando el ensayo acoplado se superpone con la absorbancia a 214 nm de los picos correspondientes a cada tejido.

Los resultados mostrados en las Figuras 6-9, 16 corresponden a una serie experimental realizada con una preparación de cada uno de los tejidos procesados, obteniéndose resultados similares en diferentes preparaciones.

Los niveles más elevados de HHIF, a pesar de la variabilidad debido a la metodología, han sido detectados en glándula suprarrenal e hipófisis. Los valores obtenidos son para los diferentes tejidos procesados: (1) cerebro $0,36 \pm 0,02$ U/g, (2) hipófisis $0,76 \pm 0,12$ U/g, (3) hipotálamo $0,43 \pm 0,17$ U/g, y (3) glándula suprarrenal $0,64 \pm 0,18$ U/g de tejido. Estos valores representan la media \pm ES de los resultados obtenidos en al menos cuatro preparaciones diferentes de cada tejido.

La comparación, mediante el programa *Spectrum analysis*, del espectro del pico correspondiente a cada uno de los tejidos permite comprobar que todos corresponden al mismo (Figura 10).

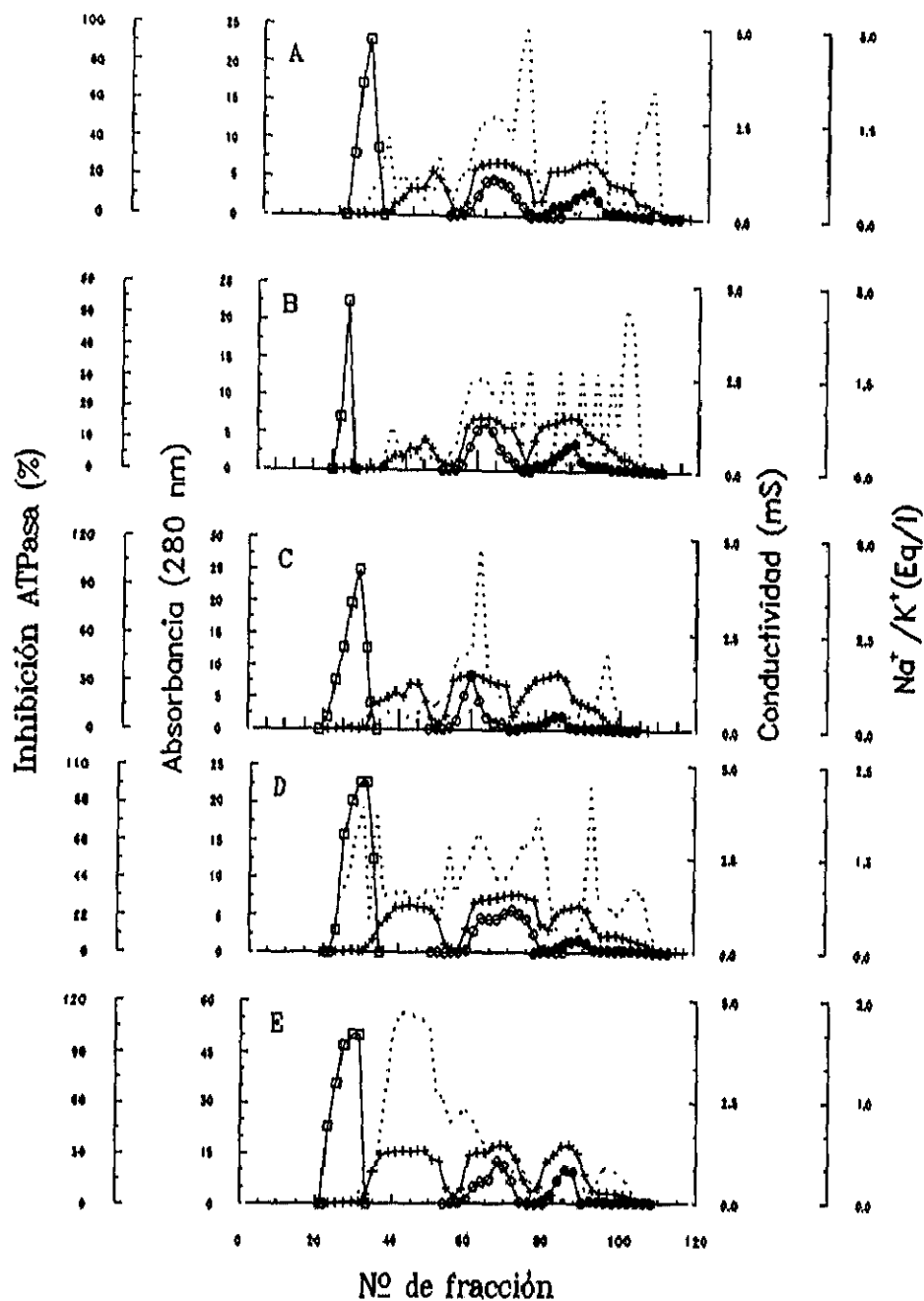


Figura 6. Cromatografía en Sephadex LH-20 de los extractos de cerebro (A), cortex (B), hipotálamo (D), hipófisis (D), y glándula suprarrenal (E). La elución se realizó con metanol, a un flujo de 0,8 ml/min y a temperatura ambiente. Las fracciones (8ml), se evaporan y resuspenden en 1 ml de agua MilliQ. En todas ellas se mide la actividad inhibidora de $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{ATPasa}$ (□), la conductividad (+) y el contenido en Na^+ (○) y K^+ (●). Las condiciones experimentales están descritas en Materiales y Métodos.

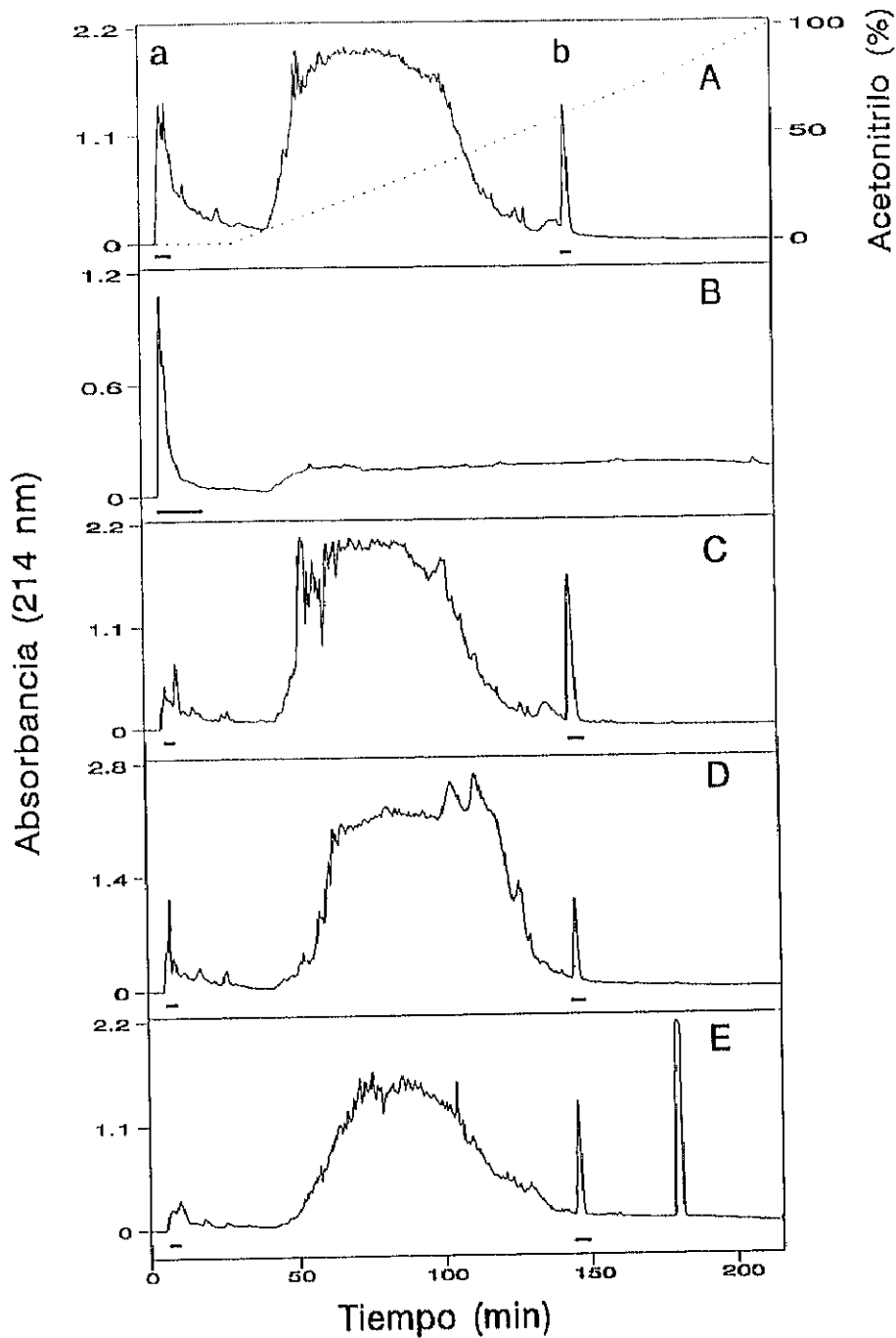


Figura 7. Fraccionamiento por HPLC semipreparativa en fase reversa de HHIF parcialmente purificado de cerebro (A), cortex (B), hipotálamo (C), hipófisis (D) y glándula suprarrenal (E). El material parcialmente purificado se cromatografió en una columna μ Bondapak C-18, eluida con el gradiente de acetonitrilo indicado con línea discontinua, a un flujo de 2 ml/min y a temperatura ambiente. Se colectaron fracciones de 4 ml, que fueron liofilizadas y resuspendidas en 0,5 ml de agua Milli Q. Mediante las letras a y b se indica los picos donde se localizan las fracciones con actividad inhibitora medida utilizando el sistema de enzimas acopladas que se describe en Métodos. Estas fracciones se mezclaron como se indica por barras horizontales, y se recromatografiaron en las condiciones descritas en la Figura 8.

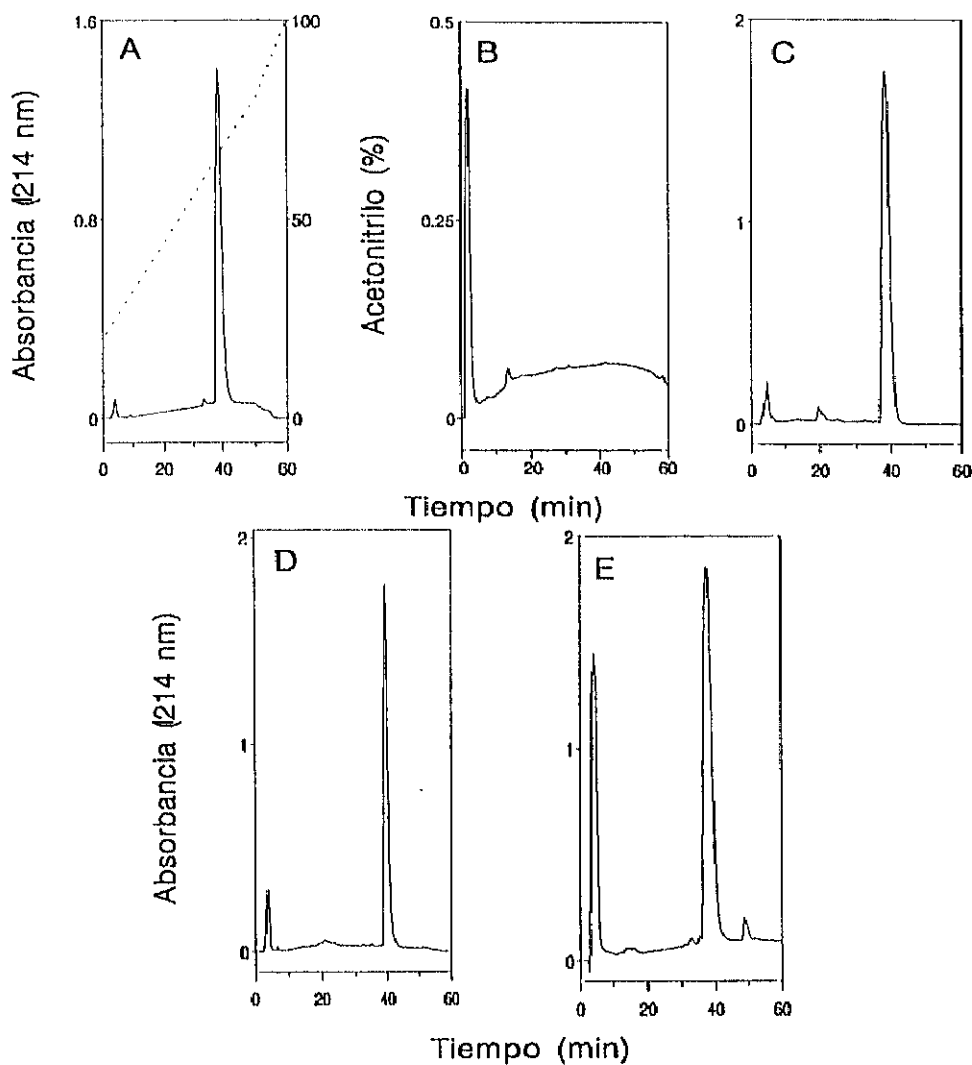


Figura 8. HPLC analítica en fase reversa del material purificado. A: Cerebro, B: Cortex, C: Hipotálamo, D: Hipófisis, E: Glándula suprarrenal. El material del pico b de la Figura 7 correspondiente a cada tejido fue recromatografiado en una columna μ Bondapak Fatty Acid, eluida con el gradiente de acetonitrilo indicado con línea discontinua, a un flujo de 0,5 ml/min y a temperatura ambiente. Se colectaron fracciones de 1 ml, que fueron evaporadas y resuspendidas en 0,250 ml de agua MilliQ. La actividad se midió utilizando el sistema de enzimas acopladas. Otras condiciones experimentales están indicadas en Materiales y Métodos.

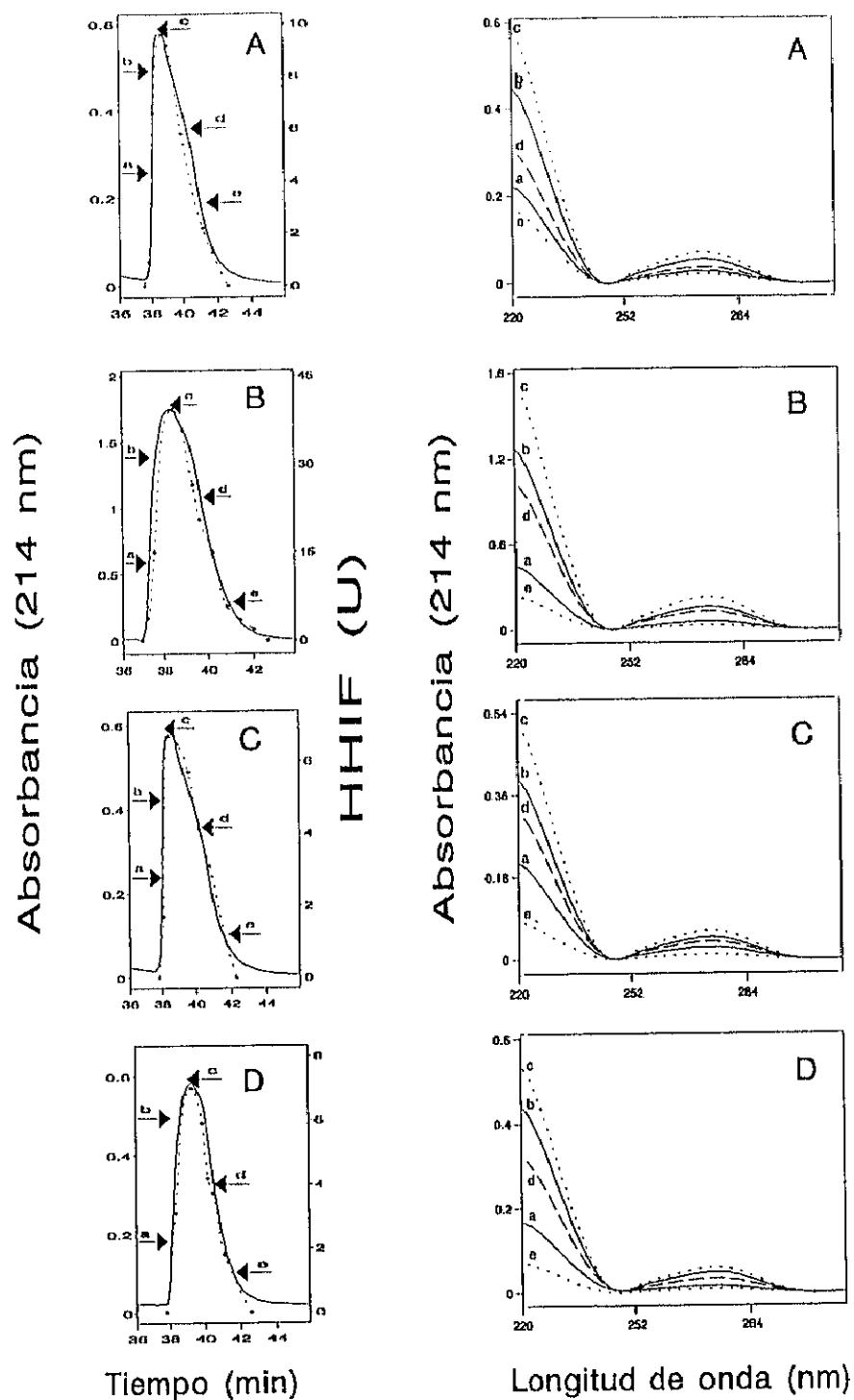


Figura 9. Actividad inhibitoria de la $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{ATPasa}$ y análisis de los espectros de absorción de HHIF recromatografiado en una columna $\mu\text{Bondapak Fatty Acid}$. A: Cerebro, B: Hipotálamo, C: Hipófisis, y D: Glándula suprarrenal. Izquierda: Localización de la actividad inhibitoria (línea discontinua) en el pico correspondiente a cada tejido. Derecha: Superposición de los espectros de absorción en los puntos del pico indicados por flechas (a-e) para cada tejido. Los espectros se realizaron con un detector de fotodiodos acoplado al cromatógrafo. Mediante el programa *Spectrum analysis* se compararon los espectros de los picos.

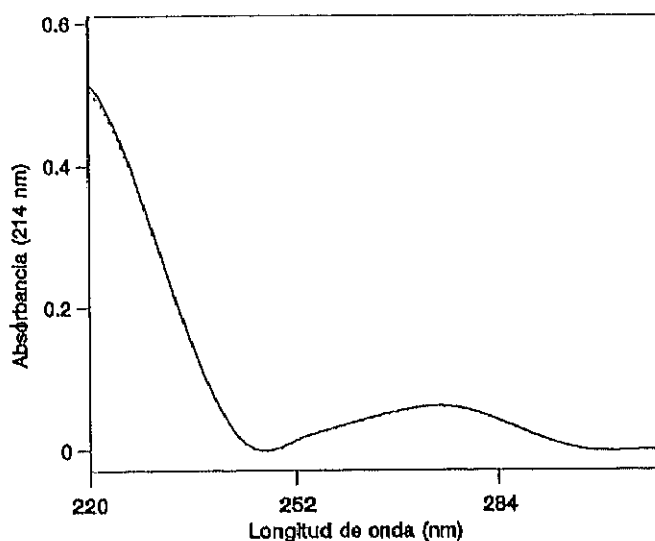


Figura 10. Espectro de absorción del HHIF purificado de los diferentes tejidos, normalizados a 274 nm. Los espectros se realizaron con un detector de fotodiodos acoplado al cromatógrafo y corresponden al máximo de los picos de los cromatogramas de la Figura 8.

El espectro de fluorescencia de HHIF purificado se muestra en la Figura 11. Este espectro presenta un máximo de excitación a 280 nm y un máximo de emisión a 305 nm, lo cual sugiere la presencia de algún anillo aromático en el material purificado.

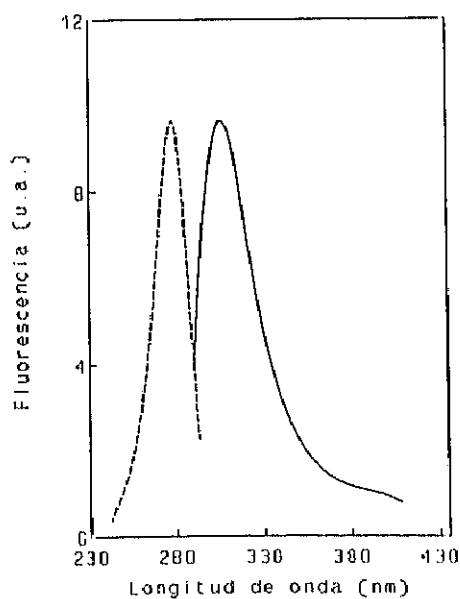


Figura 11. Espectro de emisión de fluorescencia (λ_{exc} 280 nm) (línea continua) y de excitación (λ_{em} 305 nm) (línea discontinua) de HHIF en agua a 25°C.

Este material procedente de cada tejido era ensayado como inhibidor de la actividad $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{ATPasa}$. El valor control de la actividad de la enzima purificada es de $8 \pm 2 \mu\text{moles de } \text{P}_i/\text{min}/\text{mg}$ de proteína, empleando el ensayo acoplado según las condiciones descritas en Materiales y Métodos. Una unidad arbitraria de inhibición (U) se define como la cantidad de HHIF necesaria para inhibir un 50% la actividad $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{ATPasa}$ purificada.

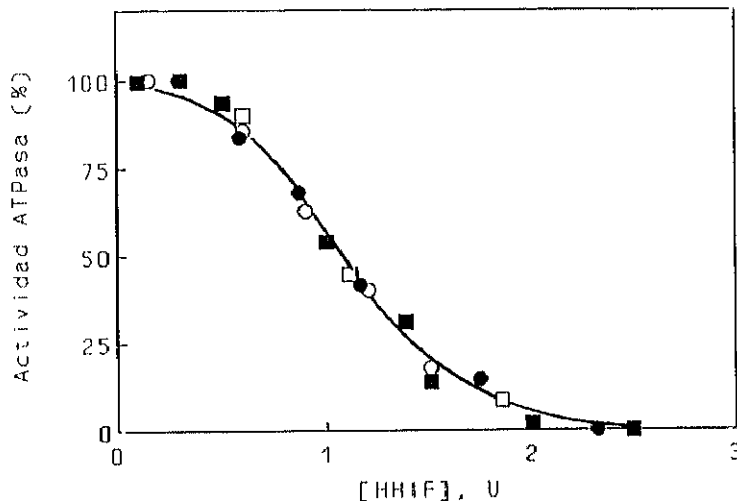


Figura 12. Efecto de HHIF purificado de diferentes tejidos sobre la actividad $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{ATPasa}$ purificada de médula renal. Cerebro (■), hipotálamo (●), hipófisis (○) y glándula suprarrenal (□). La preincubación se realiza en ausencia o presencia de HHIF durante 2 h a 37°C en un medio que contenía Tris/ClH 1 M (pH 7,4), MgCl_2 6 mM y $36 \mu\text{g}$ de proteína/ml. La concentración final de proteína en el medio de ensayo de actividad ATPasa es $4 \mu\text{g}/\text{ml}$. La actividad se midió a 37°C utilizando es sistema de enzimas acopladas que se indica en Materiales y Métodos. La referencia (100%) es la actividad ATPasa en ausencia de HHIF y corresponde a un valor de $9 \pm 3 \text{ U.I.}$

La Figura 12 muestra la inhibición de la actividad $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{ATPasa}$ en presencia de cantidades crecientes del material purificado procedente de cada tejido. Como puede observarse la dependencia de la inhibición es exactamente la misma en los diferentes tejidos estudiados, lo cual apoya que el material purificado en cada uno de ellos sea el mismo.

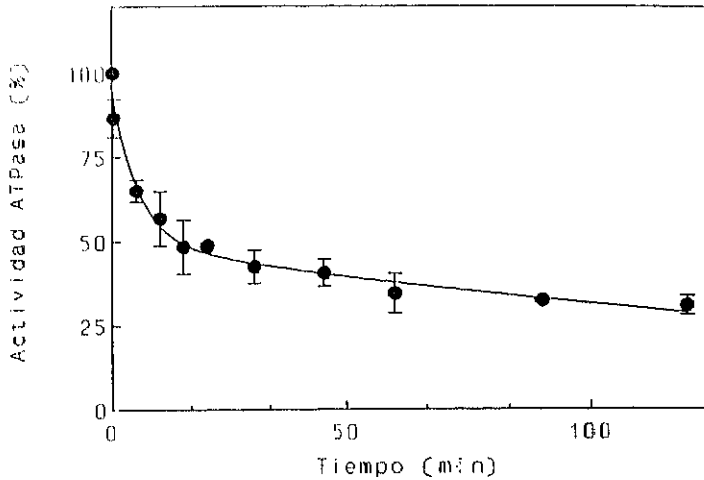
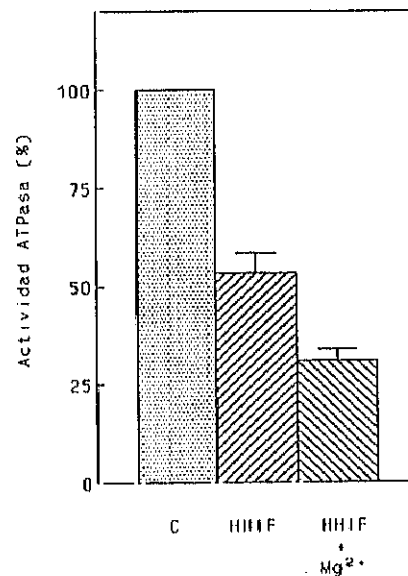


Figura 13. Efecto de HHIF sobre la actividad $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{ATPasa}$ en función del tiempo de incubación. La incubación se realizó a 37°C en un medio que contenía Tris/ClH 1 M (pH 7,4), MgCl_2 6 mM, 36 μg de proteína/ml y 12 U/ml de HHIF. La concentración final de proteína y de HHIF en el medio de ensayo de actividad ATPasa son 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y 1,3 U/ml, respectivamente.

La Figura 13 muestra que la inhibición de la actividad $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{ATPasa}$ por HHIF es dependiente del tiempo de preincubación. Para estudiar este efecto se preincubó el enzima en presencia o ausencia de HHIF hasta un período de tiempo de 120 min a 37°C , y pH 7,4. En estas condiciones se observa un aumento de la inhibición con el tiempo alcanzándose un máximo de inhibición (70%) para la dosis ensayada (1,3 U/ml) después de 60 min de preincubación. La presencia de Mg^{2+} aumenta la inhibición de la bomba de sodio por HHIF (Figura 14). El enzima en estas condiciones de ensayo sin inhibidor no se ve afectada.

Figura 14. Inhibición de la $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{ATPasa}$ por HHIF en ausencia o presencia de Mg^{2+} 6 mM en el medio de preincubación. Las condiciones experimentales son las indicadas en la Figura 13. C: Actividad ATPasa sin HHIF en el medio de ensayo.



2. EFECTO DE HHIF SOBRE LA (Na⁺,K⁺)ATPasa PURIFICADA. Estudios de dependencia de la concentración. Comparación con ouabaína.

Debido a la diferente especificidad de los ensayos utilizados para detectar compuestos como el descrito es importante la combinación de distintos procedimientos para estudiar el efecto de HHIF sobre la (Na⁺,K⁺)ATPasa. Así hemos utilizado tres bioensayos diferentes: inhibición *in vitro* de la actividad (Na⁺,K⁺)ATPasa purificada, inhibición de la unión de ³H-ouabaína a la enzima y reacción cruzada con anticuerpos antidigoxina.

La ouabaína es un potente inhibidor de la (Na⁺,K⁺)ATPasa (Wallick y Schwartz, 1988) por lo que es importante establecer si HHIF inhibe por un mecanismo similar. Para ello se ha comparado el efecto que produce el factor purificado con la respuesta de ouabaína para cada uno de los ensayos señalados. Como puede observarse en la Figura 15, la actividad biológica del factor purificado es equivalente en las curvas de dependencia de la concentración con respecto al comportamiento de ouabaína. Además las curvas de desplazamiento de ³H-ouabaína obtenida con HHIF u ouabaína son similares. La cantidad de HHIF necesaria para inhibir un 50% la actividad de la (Na⁺,K⁺)ATPasa purificada de médula renal de cerdo equivale a 0,1 μM de ouabaína en las mismas condiciones experimentales.

El compuesto HHIF no presenta reacción cruzada con anticuerpos antidigoxina a las dosis que normalmente inhibe y que desplazan ³H-ouabaína de su sitio de unión al enzima, mientras que ouabaína presenta un ligera reacción cruzada. Hay que señalar que el factor hipotalámico parcialmente purificado en Sephadex LH-20 sí mostraba reacción cruzada con estos anticuerpos a concentraciones elevadas.

3. REACCION CRUZADA CON ANTICUERPOS ANTIDIGOXINA.

El comportamiento análogo a digoxina se ha empleado como uno de los criterios de actividad natriurética que todo inhibidor de la bomba de sodio debería cumplir (véase Introducción), debido a la semejanza estructural del posible inhibidor endógeno con la familia de los digitálicos aislados de plantas. Sin embargo, como se pone de manifiesto en la gráfica de dependencia de la concentración de este ensayo (Figura 15E), conforme avanzamos en la estrategia de purificación, las unidades de inhibición de HHIF pierden la capacidad de dar reacción cruzada con los anticuerpos antidigoxina, incluso a concentraciones de inhibidor hasta 2 veces superiores a las que producen un 100% de inhibición de la enzima. Tan sólo extractos crudos, material parcialmente purificado (previo a la cromatografía en Sephadex LH-20) o la zona de conductividad presentan reacción cruzada.

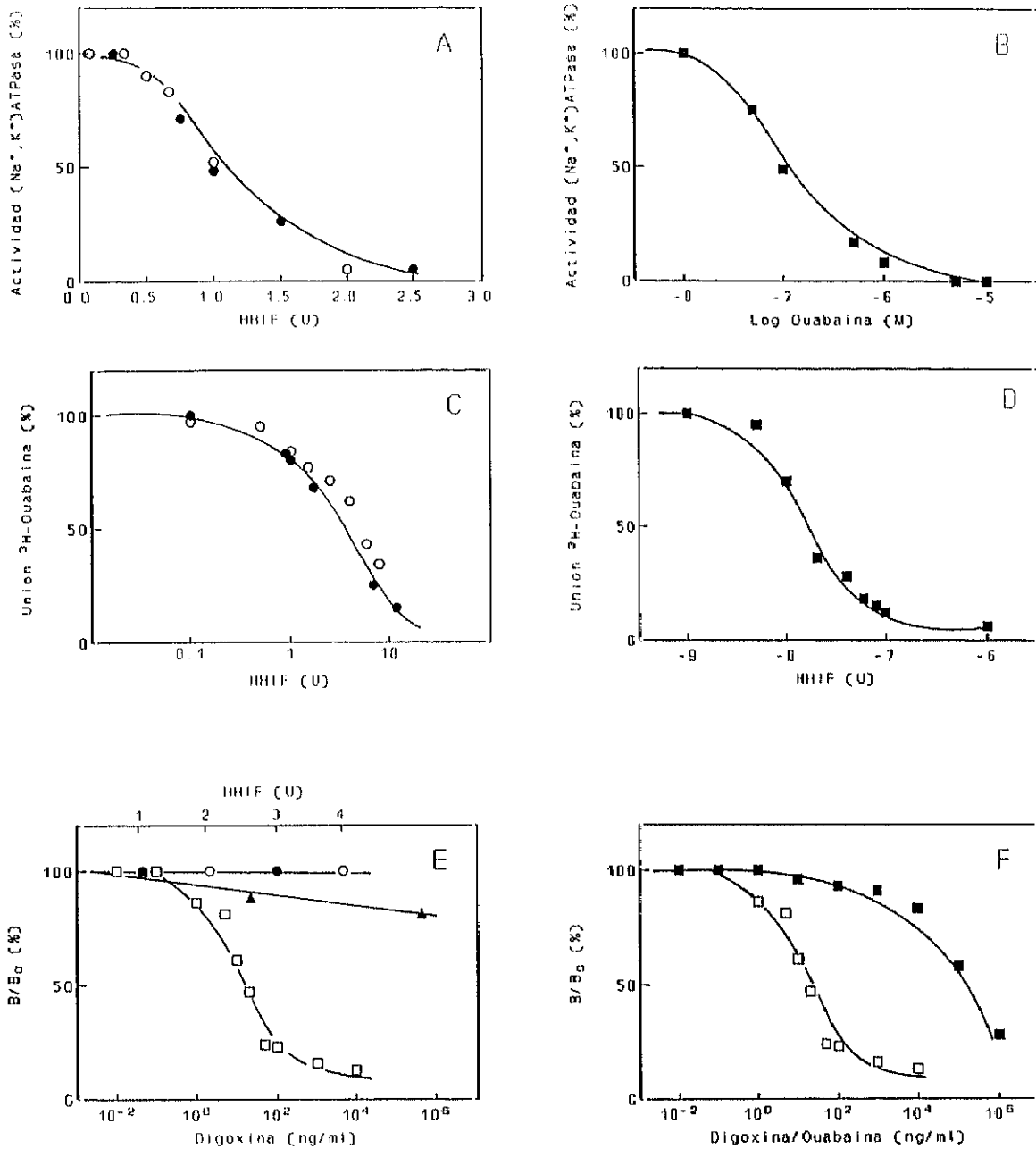


Figura 15. Efecto del factor hipotalámico (●) e hipofisario (○) purificado sobre la actividad (Na⁺,K⁺)ATPasa (A), sobre el desplazamiento de ³H-ouabaina (C) y reacción cruzada con anticuerpos antidigoxina (E). Las curvas de dependencia de la concentración eran comparadas con ouabaina (■) (B,D,F) y digoxina (E,F) bajo las mismas condiciones de ensayo. La reacción cruzada del factor hipotalámico parcialmente purificado (▲) es expresado en la Figura E. Las condiciones experimentales están indicadas en Materiales y Métodos.

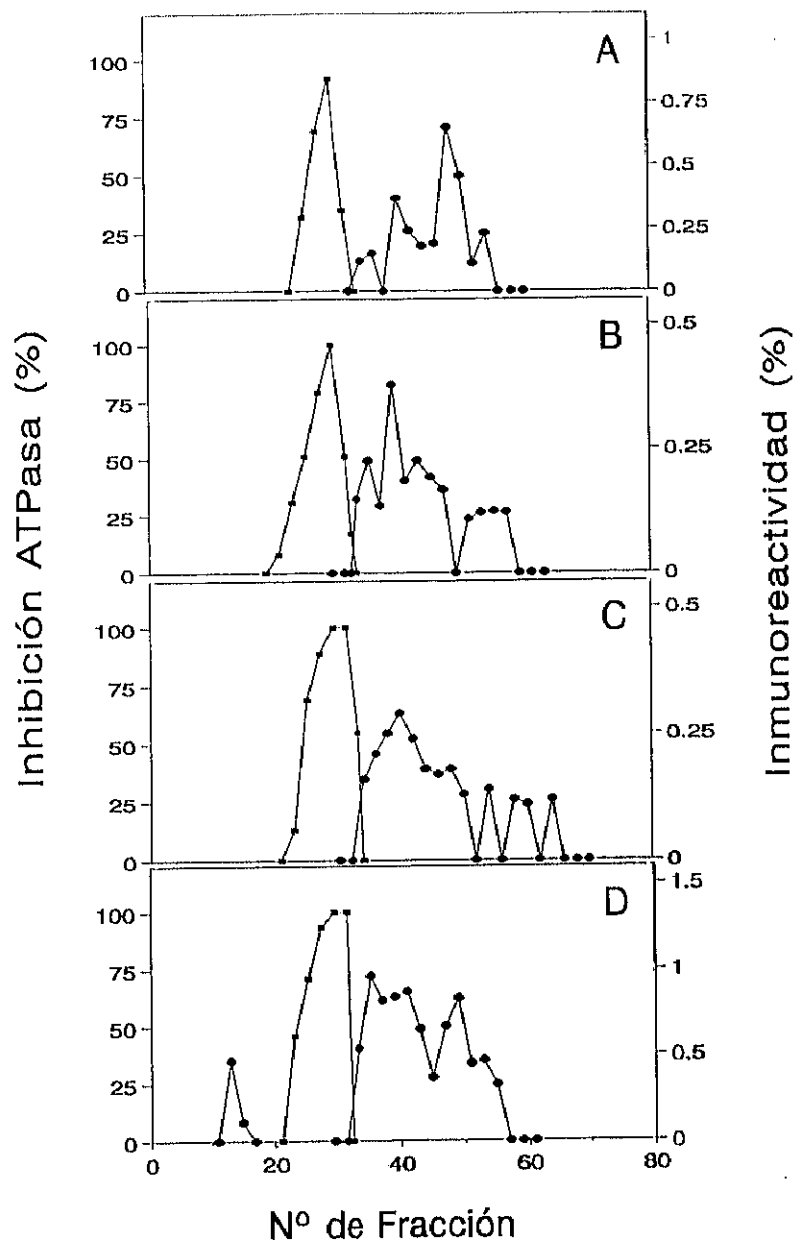


Figura 16. Reacción cruzada con anticuerpos antidigoxina de los extractos de los diferentes tejidos purificados en Sephadex LH-20 (■). A: Cerebro, B: Hipotálamo, C: Hipófisis y D: Glándula suprarrenal. Inhibición de la actividad $(Na^+, K^+)ATPasa$ (●). Las condiciones experimentales están indicadas en Materiales y Métodos.

Como puede verse en la Figura 16 en donde se muestra el perfil de elución en LH-20 para muestras de los diferentes tejidos procesados, la zona de reacción cruzada con anticuerpos antidigoxina coincide con la zona de conductividad y/o sales, aunque varía ligeramente dependiendo de cada cromatograma y tejido. Los resultados mostrados corresponden a una preparación de cada tejido procesado obteniéndose resultados similares en diferentes preparaciones.

En los primeros pasos de purificación a nivel de LH-20 se ha podido observar que en alguna de las preparaciones estudiadas las fracciones con reacción cruzada con anticuerpos antidigoxina coinciden con las últimas fracciones con actividad inhibitora de la $(Na^+,K^+)ATPasa$. Sin embargo, la reacción cruzada de estas fracciones desaparece a lo largo del proceso de purificación. Estas variaciones pueden ser debidas a parámetros difíciles de controlar a lo largo del proceso de purificación, tales como la temperatura, extracción de la muestra, empaquetamiento del gel de LH-20, densidad de la muestra cargada, etc.

4. PROPIEDADES FISICO-QUIMICAS.

4.1. Comparación con otros compuestos.

Diferentes tipos de compuestos que actúan como inhibidores de la actividad $(Na^+,K^+)ATPasa$, que desplazan 3H -ouabaína del sitio de unión al enzima o bien sustancias que dan reacción cruzada con anticuerpos antidigoxina, podrían estar implicados en la regulación endógena del transporte de sodio (Clarkson y cols., 1985; Kelly y cols., 1986; Braquet y cols., 1986). Entre estos compuestos se encuentran: lignanos, digitálicos, fosfolípidos, ácidos biliares, ácidos grasos libres, dopamina, esteroides, etc.

Cabe la posibilidad de que el compuesto que nosotros purificamos fuese similar a alguno de estos compuestos, para ello estudiamos la similitud de los espectros de toda una serie de familias de compuestos con el espectro de HHIF (véase Apéndice II).

La selección de estos compuestos se hizo teniendo en cuenta la posible presencia de algún anillo aromático. Se incluyen compuestos tales como tirosina, hidroxifenilácidos, catecolaminas y sus metabolitos, catecolestrógenos y lignanos (formados por dimerización oxidativa de fenoles). Estos compuestos se cromatografiaron por HPLC en una columna μ Bondapak Fatty Acid en idénticas condiciones experimentales que las empleadas para la purificación del inhibidor endógeno.

Ninguna de las sustancias estudiadas presenta un espectro similar ni el mismo tiempo de retención que el inhibidor, tan sólo algunos fenilácidos del tipo de los encontrados en elevada concentración en el fallo hepático agudo (Seda y cols., 1984) y la L-Tyr presentan un espectro muy similar aunque estos eluyen en el volumen de exclusión de la columna.

Otros dos compuestos cromatografiados en las mismas condiciones descritas para el inhibidor son ouabaína y digoxina. Estos compuestos son inhibidores específicos de la bomba de sodio que se aíslan de plantas y se les ha atribuido por algunos autores un papel de reguladores endógenos de la $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPasa}$ (Hamlyn y cols., 1991b; Tymiak y cols., 1993). Ninguno de ellos eluye con el mismo tiempo de retención que el inhibidor, la ouabaína tiene un tiempo de retención de 5,2 min y la digoxina de 19 min. Los tiempos de retención para cada uno de los compuestos cromatografiados se muestran en el Apéndice II.

4.2. Estudios de ultrafiltración.

El material purificado se sometió a ultrafiltración a presión utilizando células de Amicon con agitación continua y en atmósfera de nitrógeno. Las membranas empleadas tenían un tamaño de exclusión de peso molecular comprendido entre 500 (YC05) y 1000 D (YM2). El inhibidor atraviesa ambos tipos de membranas. La identificación antes y después de HHIF en el filtrado se demuestra porque produce inhibición de la $(\text{Na}^+,\text{K}^+)\text{ATPasa}$ antes y después de cromatografiar el filtrado por HPLC en una columna $\mu\text{Bondapak Fatty Acid}$. La recuperación del material filtrado no es del 100%, probablemente debido a interacciones inespecíficas del inhibidor con las membranas. Estos resultados sugieren un peso molecular aparente para HHIF menor de 500 Da, que coincide con los descritos para un factor de estas características por otros autores (Akagawa, 1984; Morgan y cols., 1987; Millet y cols., 1987; Haber y Hauptert, 1987).

4.3. Reducción a cenizas.

HHIF pierde totalmente su actividad inhibidora de la $(\text{Na}^+,\text{K}^+)\text{ATPasa}$ *in vitro* cuando se somete a 250°C durante 24 h (véase Tabla 1) lo cual descarta la posibilidad de que se trate de iones inorgánicos contaminantes.

Este resultado se ve apoyado por la ausencia de efecto de EDTA 1 mM sobre la inhibición del factor aislado sobre la enzima (véase Tabla 1).

4.4. Efecto de la temperatura.

Como se muestra en la Tabla 1, HHIF es estable al incubarlo a 37°C durante 24 h y a 80°C durante 10 min pero pierde ligeramente su actividad cuando se calienta a 110°C durante 24 h o a 120°C durante 30 min.

4.5. Hidrólisis ácida.

La acción combinada de HCl 5,7 N, temperatura de 110°C durante 24 h y 2-mercaptoetanol

al 0,02% en condiciones de vacío conlleva la pérdida de la actividad inhibidora de HHIF. Este efecto se observa tanto en condiciones reductoras por la presencia de 2-mercaptoetanol como en ausencia de éste.

Debido al ligero efecto de la temperatura sobre HHIF realizamos el mismo experimento pero a 37°C durante 24 h, condiciones que no afectan a la estabilidad del inhibidor, observándose que la presencia de HCl 5,7 N no altera la capacidad de inhibición, si bien cuando añadimos al medio HCl 5,7 N más 2-mercaptoetanol al 0,02% el factor pierde su actividad inhibidora (Tabla 1)

Debido a este efecto del 2-mercaptoetanol sobre HHIF, se investigó la posible presencia de grupos sulfhidrilo libres en HHIF mediante incubación de éste con 4-vinilpiridina, según las condiciones descritas en Materiales y Métodos. Tras la incubación, HHIF fue cromatografiado en HPLC en fase reversa utilizando una columna μ Bondapak Fatty Acid. Mediante un detector de fotodiodos se obtuvo su espectro de absorción, que resultó idéntico al de HHIF (datos no mostrado), indicando al ausencia de grupos sulfhidrilos libres en el material purificado.

4.6. Digestión enzimática: Incubación con fosfolipasa C o pronasa E.

Al tratar HHIF (2U) con fosfolipasa C (0,6 mg/ml) o pronasa E (1 mg/ml), según las condiciones descritas en Materiales y Métodos, no se ve disminuido su efecto inhibidor sobre la actividad (Na⁺,K⁺)ATPasa (Tabla 1).

4.7. Oxidación con ácido per fórmico.

El compuesto HHIF se incubó con ácido per fórmico durante 3 h en hielo, y tras ese tiempo se liofiliza y resuspende en agua. La comparación de los espectros de absorción obtenidos antes y después del tratamiento con ácido per fórmico muestran que HHIF pierde su máximo de absorción a 274 nm. La muestra de HHIF oxidada por ácido per fórmico es cromatografiada en una columna μ Bondapak Fatty Acid y se eluye en las condiciones señaladas en el proceso de purificación. Durante la cromatografía se van realizando espectros de absorción de las moléculas eluidas, observándose que el tiempo de retención del material purificado aumenta a 43 min al tiempo que desaparece el máximo de absorción a 274 nm. Es interesante señalar que el factor mantiene su efecto inhibidor de la actividad (Na⁺,K⁺)ATPasa.

4.8. Hidrólisis básica.

La capacidad inhibidora de este agente es estable al tratamiento alcalino con NaOH 0,2 N, durante 30 min a 120°C o durante 2 h a 37°C (Tabla 1) comparado con los correspondientes controles. Para ello se realizan los correspondientes ensayos y controles de la enzima en las mismas

condiciones pero sin inhibidor no observándose ningún cambio en la actividad ATPasa.

4.9. Preincubación con BSA.

La incubación de HHIF con BSA (0,1 mg/ml) tampoco varió la inhibición de la $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{ATPasa}$ (véase Tabla 1).

4.10. Análisis de aminoácidos.

En el análisis de aminoácidos del material purificado sometido a hidrólisis con ClH 5,7 M en presencia de 2-mercaptoetanol al 0,02% (v/v) no se detectó la presencia de aminoácidos.

4.10. Influencia del pH sobre la fluorescencia de HHIF.

La intensidad de fluorescencia del factor HHIF varía con el pH del medio como puede observarse en la Figura 17, presentando dos puntos de inflexión a pH 4,3 y pH 7,5. Este efecto es especialmente significativo a pH ácido donde se observa un gran aumento de la intensidad de fluorescencia de este compuesto.

Figura 17. Efecto del pH sobre la intensidad de fluorescencia de HHIF (λ_{exc} 280 nm, λ_{em} 315 nm). El medio de ensayo contenía Tes/KOH 25 mM para la zona de pH básicos y Mes/ClH 25 mM para para la zona de pH ácidos. En el eje de ordenadas se representa el porcentaje con respecto al valor control que corresponde a la intensidad de fluorescencia de HHIF (F_0) a un pH entre 5,7-6,8.

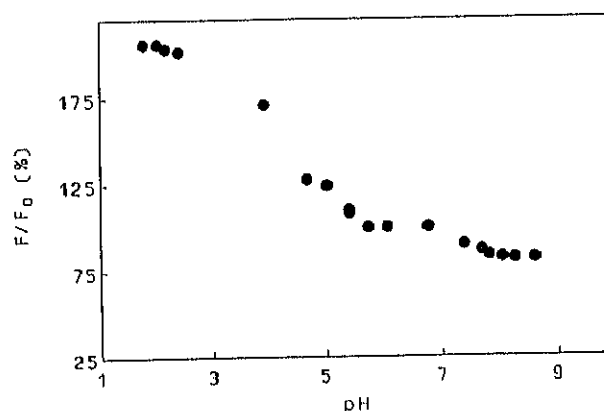


Tabla 1. Efecto de diferentes tratamientos sobre la actividad inhibidora de HHIF.

Tratamiento	Inhibición (Na ⁺ ,K ⁺)ATPasa (%)
Control (HHIF 2U/ml)	93 ± 7
Temperatura (80°C, 10 min)	95 ± 6
(37°C, 24 h)	100
(110°C, 24 h)	58 ± 14
(120°C, 30 min)	62 ± 5
Hidrólisis ácida	
(ClH 5,7 N, 24h, 110°C)	15 ± 10
(ClH 5,7 N, β-ME 0,02%, 24h, 110°C)	7 ± 4
(ClH 5,7 N, 24h, 37°C)	100
(ClH 5,7 N, β-ME 0,02%, 24h, 37°C)	60 ± 14
Hidrólisis básica	
(NaOH 0,2 N, 30 min, 120°C)	62 ± 5
(NaOH 0,2 N, 2h, 37°C)	100
Fosfolipasa C	95 ± 1
Pronasa E	97 ± 3
BSA	94 ± 2
EDTA 1mM	83 ± 3
Reducción a cenizas (24 h, 250°C)	0

5. MODULACION DE LA ACTIVIDAD $(Ca^{2+}, Mg^{2+})ATPasa$ DE SINAPTOSOMAS Y DE VESICULAS DE MEMBRANA PLASMATICA SINAPTOSOMAL POR HHIF.

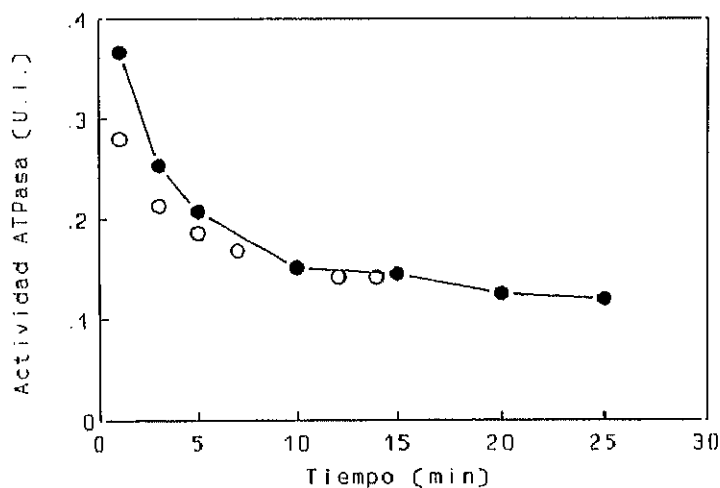
5.1. Actividades adenosintrifosfatasa de sinaptosomas y de vesículas derivadas de membrana plasmatica sinaptosomal.

La membrana plasmática de sinaptosomas de cerebro de rata presenta diferentes actividades ATPasas: $(Na^+, K^+)ATPasa$, $Ca^{2+}-ATPasa$, $Mg^{2+}-ATPasa$ y $(Ca^{2+} + Mg^{2+})ATPasa$ (Sorensen y Mahler, 1981; Michaelis y cols., 1983).

En nuestras preparaciones existe además una actividad contaminante $Mg^{2+}-ATPasa$ de origen mitocondrial, que corresponde al factor F1-ATPasa, que representa aproximadamente el 20%-25% de la actividad total y que es inhibida específicamente por la adición de azida sódica 5 mM en el medio de ensayo.

La actividad $(Na^+, K^+)ATPasa$ se determina como la actividad ATPasa que es inhibida por ouabaína 1 mM en presencia de Na^+ 100 mM y K^+ 20 mM en un medio de ensayo hipotónico. Esta actividad es de $0,41 \pm 0,07 \mu\text{moles Pi /min/ mg protefna}$.

Figura 18. Actividad $(Ca^{2+}, Mg^{2+})ATPasa$ de vesículas derivadas de membrana plasmática sinaptosomal en función del tiempo. Los puntos corresponden a los valores obtenidos midiendo directamente el fosfato (P_i) liberado (\circ) y utilizando el sistema acoplado PK-LDH (\bullet). Otras condiciones experimentales como se indica en Materiales y Métodos.



La actividad ATPasa dependiente de Ca^{2+} y/o Mg^{2+} , $(Ca^{2+}, Mg^{2+})ATPasa$ decae lentamente en función del tiempo (Figura 18) hasta estabilizarse en una actividad que es aproximadamente el 40 - 50 % del valor de la actividad inicial (García-Martín y Gutiérrez-Merino, 1986, 1990). Este proceso sigue una cinética de primer orden con una constante de velocidad de $0,26 \pm 0,04 \text{ min}^{-1}$ en sinaptosomas y $0,41 \pm 0,04 \text{ min}^{-1}$ en vesículas. Para evitar errores metodológicos debidos a esta

inactivación, todas las medidas cinéticas realizadas en este estudio se han llevado a cabo en condiciones experimentales en las que se había alcanzado el valor de actividad ATPasa del estado estacionario.

La actividad total dependiente de Ca^{2+} y Mg^{2+} se ha medido en presencia de Ca^{2+} 50 μM y Mg^{2+} 2mM alcanzando un valor máximo de $0,16 \pm 0,03$ $\mu\text{moles de Pi/min/ mg de proteína}$ en vesículas y de $0,1 \pm 0,015$ $\mu\text{moles de Pi/min/mg proteína}$ en sinaptosomas.

La actividad ATPasa dependiente de Mg^{2+} y activada por Ca^{2+} se ha medido en presencia de Mg^{2+} y ATP 2mM y la concentración de EGTA necesaria para alcanzar la concentración de Ca^{2+} libre deseada en cada caso (véase Materiales y Métodos). El valor obtenido es de $0,08 \pm 0,01$ $\mu\text{moles Pi/min/ mg proteína}$.

La actividad ATPasa dependiente de Ca^{2+} e independiente de Mg^{2+} se ha medido en presencia de Ca^{2+} 50 μM y ATP 2 mM sin Mg^{2+} en el medio obteniéndose un valor de $0,06 \pm 0,007$ $\mu\text{moles Pi/min/mg proteína}$.

Todos estos valores son similares a los publicados por otros investigadores (Sorensen y Mahler, 1981; Michaelis y cols., 1983; García-Martín y Gutiérrez-Merino, 1990) y representan la media de los resultados obtenidos por duplicado en diferentes preparaciones de sinaptosomas y vesículas. Todos los valores de actividades reseñados con anterioridad representan la media de los resultados obtenidos en 10 preparaciones diferentes de sinaptosomas.

Los valores mostrados de actividades $(\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+})\text{ATPasa}$ representan valores totales de actividad. La orientación de la membrana plasmática es igual en sinaptosomas y en la célula nerviosa, por lo que para medir actividades en que la enzima presente el centro de unión del ATP hacia el citosol, en concreto $(\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+})\text{ATPasa}$ y $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{ATPasa}$, es necesario hacerlo en un medio hipotónico o permeabilizando la membrana con saponina. Las vesículas presentan un grado de inversión de la membrana que en nuestras preparaciones corresponde aproximadamente al 40% (García-Martín y Gutiérrez-Merino, 1990). Estos resultados son similares a los obtenidos por Gill y cols. (1986), utilizando un protocolo similar al nuestro. En estos estudios se miden las actividades ATPasa de estas membranas, así como el efecto de tetradotoxina (bloqueante no permeable de canales de Na^+) y veratridina (agonista de canales de Na^+ que difunde fácilmente a través de las membranas) sobre la disipación del gradiente de Na^+ a través de estas membranas.

5.2. Efecto de HHIF sobre las actividades adenosintrifosfatasa en sinaptosomas y en vesículas derivadas de membrana plasmática.

5.2.1. Inhibición de la actividad (Ca^{2+}, Mg^{2+}) ATPasa total por HHIF.

Para estudiar el efecto del HHIF sobre la actividad (Ca^{2+}, Mg^{2+}) ATPasa se ha utilizado el ensayo enzimático acoplado PK-LDH (véase Materiales y Métodos) para lo cual se comprobó previamente que en el intervalo de concentraciones de HHIF empleado no inhibía a dichas enzimas.

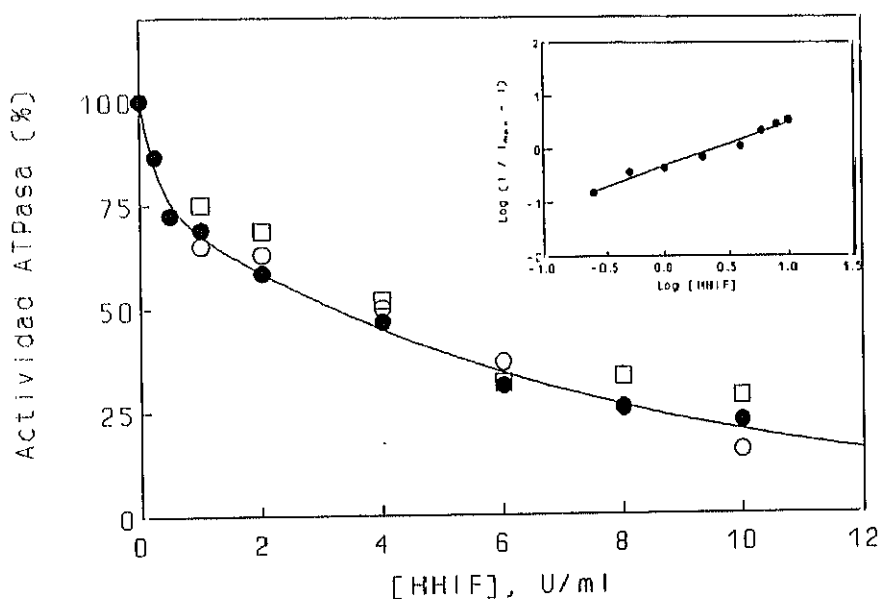


Figura 19. Inhibición de la actividad (Ca^{2+}, Mg^{2+}) ATPasa total por HHIF. Los datos mostrados corresponden condiciones de ensayo estándar, pH 7,4 y 25°C (●), pH 7 y 25°C (□) y pH 7,4 y 37°C (○). El medio de reacción contenía Tes/KOH 50 mM, $MgCl_2$ 2 mM, $CaCl_2$ 50 μ M, KCl 100 mM, β -mercaptoetanol 2 mM, azida sódica 5 mM, ATP 2 mM, PEP 0,42 mM, NADH 0,22 mM, 10 U/ml de PK, 28 U/ml de LDH y 20 μ g de proteína/ml. La referencia (100%) es la actividad ATPasa determinada en ausencia de HHIF. Inserto: Representación de Hill de los datos de inhibición en las condiciones de ensayo estándar.

La Figura 19 muestra que HHIF inhibe la actividad (Ca^{2+}, Mg^{2+}) ATPasa de vesículas de membrana plasmática. La dependencia de esta actividad con respecto a la concentración de HHIF no se modifica con el cambio de pH de 7,4 a 7 ni con el de la temperatura de 25°C a 37°C. A partir de la representación de Hill de estos datos se obtiene un valor de $K_{0,5}$ aparente de 2,45 U/ml y un coeficiente de Hill de $0,8 \pm 0,06$.

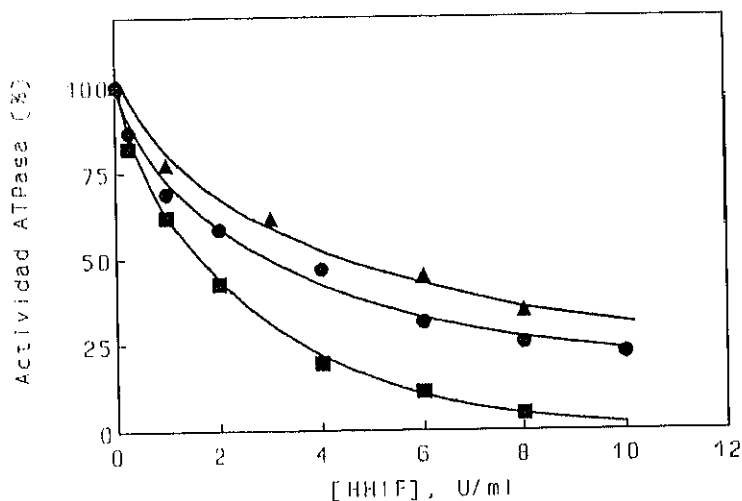


Figura 20. Dependencia del efecto inhibitor de HHIF sobre la actividad (Ca^{2+} , Mg^{2+})ATPasa con la concentración de proteína. Las concentraciones de proteína eran 10 (■), 20 (●) y 40 (▲) $\mu\text{g}/\text{ml}$.

Como se muestra en la Figura 20 la concentración de HHIF necesaria para producir el 50% de inhibición se incrementa al aumentar la concentración de proteína, obteniéndose valores de 1,24 U/ml, 2,45 U/ml y 4,21 U/ml para 10, 20 y 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$, respectivamente. Esto indica que una importante fracción del inhibidor se une a la membrana. Por este motivo, hemos estimado la incorporación de HHIF a la membrana sinaptosomal midiendo la intensidad de fluorescencia del sobrenadante antes y después de la centrifugación a 45.000 rpm durante 2 h a 4°C utilizando distintas concentraciones de membrana y HHIF en un medio que contiene Tes/KOH 50 mM (pH 7,4), KCl 0,1 M. En la Tabla 2 se muestran los valores de fluorescencia obtenidos para $\text{HHIF}_{\text{total}}$ y $\text{HHIF}_{\text{libre}}$ en sinaptosomas de cerebro de rata a una concentración de proteína de 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$. El valor del coeficiente de partición aparente (Kp) para la unión de HHIF a la membrana sinaptosomal a partir de estos datos, calculado según se indica en Materiales y Métodos, es de 0,08 (μg prot de membrana/ml)⁻¹. El mismo valor se obtiene, dentro del error experimental, cuando se estima el coeficiente de partición a partir de las curvas de dependencia de inhibición de la actividad (Ca^{2+} , Mg^{2+})ATPasa respecto a HHIF (Figura 20), siguiendo el método descrito por de Foresta y cols., 1990. Por tanto, las concentraciones de HHIF totales utilizadas en este estudio deberían ser corregidas teniendo en cuenta la unión del inhibidor a la membrana plasmática. La concentración de inhibidor libre capaz de producir el 50% de inhibición de la actividad (Ca^{2+} , Mg^{2+})ATPasa es de 0,88 \pm 0,16 U/ml.

Tabla 2. Intensidad de fluorescencia (u.a.) obtenidos para HHIF_{TOTAL} y HHIF_{LIBRE} en sinaptosomas de cerebro de rata. La concentración de HHIF unida a sinaptosomas se estimó a partir de la disminución de la concentración de inhibidor en el sobrenadante después de centrifugar, como se indica en el texto.

HHIF _{TOTAL} (U/ml)	HHIF _{TOTAL} F(u.a.)	HHIF _{LIBRE} F(u.a.)	
		SINAPTOSOMAS	
		25 µg/ml	50 µg/ml
0,5	12,5 ± 2	3,15 ± 1,17	3,05 ± 0,03
1	26,3 ± 0,7		5,4 ± 0,26
1,5	32,0 ± 1,7	10,2 ± 0,27	7,3 ± 0,25
2	41,8 ± 0,3	15,0 ± 1,08	7,2 ± 1,65

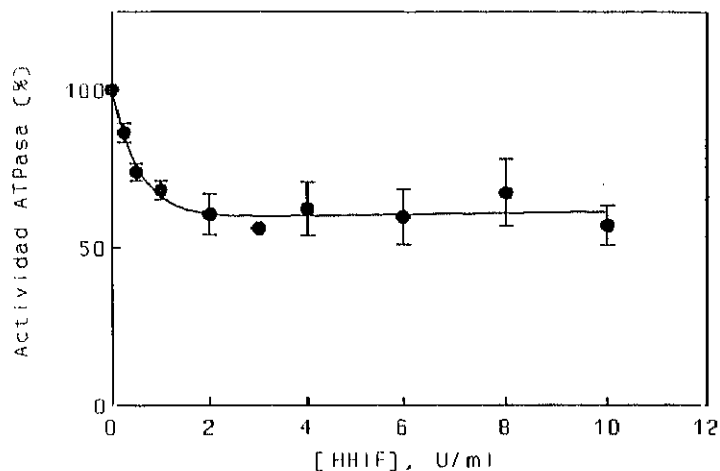
La actividad (Ca²⁺,Mg²⁺)ATPasa total de 0,25 mg/ml de vesículas de membrana plasmática derivadas de sinaptosomas incubadas en ausencia o presencia de 100 U/ml de HHIF no se recupera con respecto al valor control tras 4 h de diálisis a 4°C frente a un medio que contiene Tes 5 mM (pH 7,4), β-ME 2 mM, sacarosa 0,3 M, fosfatidilcolina 0,5 mM. En estas condiciones experimentales la enzima estaba inhibida aproximadamente un 75% con respecto al control. Este hecho sugiere que la inactivación de la actividad (Ca²⁺,Mg²⁺)ATPasa por altas concentraciones de HHIF produce la desnaturalización de la enzima.

También se ha estudiado si la inhibición de la actividad (Ca²⁺,Mg²⁺)ATPasa por HHIF es dependiente del tiempo de incubación. Para ello se han incubado las vesículas, en presencia o ausencia de diferentes concentraciones de inhibidor, durante un período de tiempo de hasta 30 min a 25°C. En estas condiciones no se observa ningún efecto sobre la extensión de la inhibición de la actividad ATPasa. La estabilidad entre 15 s y varios minutos en la velocidad de hidrólisis de ATP (linealidad en la variación de absorbancia a 340 nm con el tiempo) después de añadir el inhibidor al medio de ensayo de la actividad ATPasa apoya esta conclusión.

La Figura 21 muestra el efecto de HHIF sobre la actividad (Ca²⁺,Mg²⁺)ATPasa de sinaptosomas. Mediante representación de dobles inversos se calcula una inhibición máxima del 46%, que coincide con el valor obtenido experimentalmente. A partir de la representación de Hill de los datos mostrados en la Figura 21 se obtiene una K_{0,5} aparente de 0,47 U/ml y un valor de n₁₁ próximo a la unidad. Es importante indicar que hemos encontrado una gran variabilidad en las distintas preparaciones de sinaptosomas utilizadas, especialmente cuando se emplean concentraciones altas de HHIF para obtener la inhibición máxima. Por ejemplo, para una concentración de HHIF de 10 U/ml en algunas preparaciones se alcanza un valor de inhibición del 80%, mientras que en otras no llega

a superar el valor del 50 % indicado anteriormente.

Figura 21. Efecto de HHIF sobre la actividad $(Ca^{2+}+Mg^{2+})ATPasa$ de sinaptosomas. Las condiciones experimentales son las indicadas en la Figura. En el eje de ordenadas se representa la actividad ATPasa referida a la actividad medida en ausencia de HHIF en el medio de ensayo.



5.2.2. Inhibición de la actividad $(Na^+,K^+)ATPasa$ por HHIF.

HHIF inhibe la actividad $(Na^+,K^+)ATPasa$ de vesículas derivadas de membrana plasmática sinaptosomal como puede observarse en la Figura 22. El análisis cinético de estos datos mediante representación de Hill permite el cálculo de un valor de $K_{0,5}$ aparente de 0,76 U/ml, que corresponde a un valor de 0,3 U/ml libre cuando se corrige utilizando el coeficiente de partición. La inhibición no presenta cooperatividad $n_H = 0,98 \pm 0,05$.

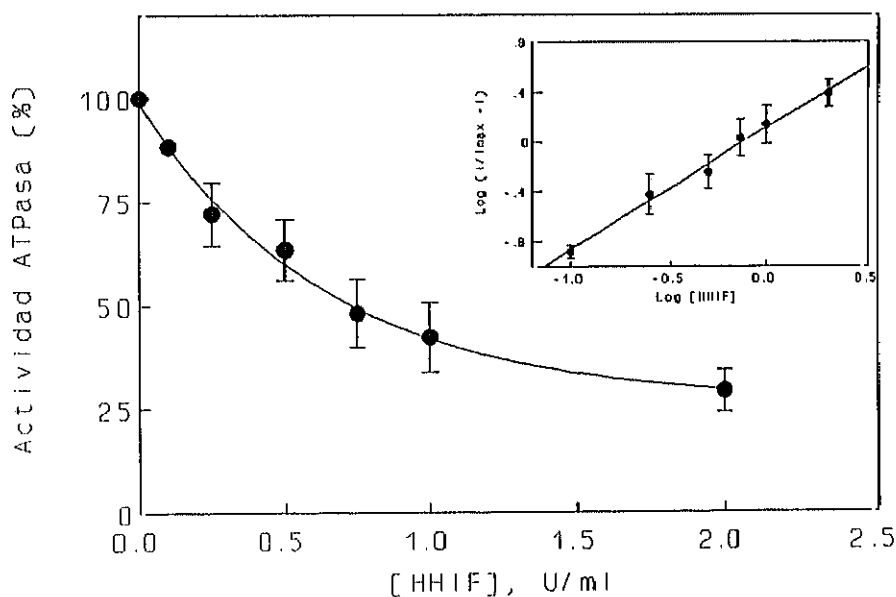


Figura 22. Efecto de HHIF sobre la actividad $(Na^+,K^+)ATPasa$ de vesículas derivadas de sinaptosomas. El medio de ensayo contenía: Tes/KOH 50 mM (pH 7,4), NaCl 100 mM, KCl 20 mM, β -mercaptoetanol 2 mM, $MgCl_2$ 2 mM, ATP 2 mM, ouabaína 1 mM, PEP 0,42 mM, NADH 0,22 mM, 10 U/ml de PK, 28 U/ml de LDH, azida sódica 5 mM y 20 μ g de proteína/ml a 25°C.

La actividad $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{ATPasa}$ de 0,25 mg/ml de vesículas derivadas de sinaptosomas incubadas en ausencia o presencia de 50 U/ml de HHIF no se recupera con respecto al valor control tras 4 h de diálisis a 4°C frente a Tes 5 mM (pH 7,4), β -ME 2 mM, sacarosa 0,3 M, fosfatidilcolina 0,5 mM. En estas condiciones experimentales la enzima está inhibida un 70 % con respecto al control. Estos resultados sugieren que la inhibición de la $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{ATPasa}$ por altas concentraciones de HHIF puede ser debido posiblemente a la desnaturalización de la enzima, de forma análoga a los resultados obtenidos con la $(\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+})\text{ATPasa}$.

6. ESTUDIO SOBRE EL MECANISMO DE INHIBICION DE LA ACTIVIDAD $(\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+})\text{ATPasa}$ POR HHIF.

En este apartado se analiza el efecto de HHIF sobre los factores reguladores más importantes de la actividad $(\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+})\text{ATPasa}$. Hemos estudiado si la inhibición de la actividad $(\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+})\text{ATPasa}$ podría ser debida a una perturbación de la fluidez de la bicapa lipídica de estas membranas en las condiciones experimentales en la que la actividad ATPasa se inhibe. Alternativamente, este efecto podría ser debido a una interacción directa con la proteína a través de la competición de HHIF con sustratos y/o ligandos de la actividad $(\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+})\text{ATPasa}$.

6.1. Efecto de HHIF sobre la fluidez de la membrana plasmática en sinaptosomas.

La fluidez de la membrana no sólo proporciona la flexibilidad que ésta requiere para diversos procesos sino que puede ser crítica para la función de muchas proteínas, bien porque la actividad dependa de su difusión lateral o rotacional o porque su funcionamiento implique cambios de conformación dentro de la bicapa (Hitzemann y cols., 1984). Por tanto, es necesario estudiar si el efecto inhibitor de HHIF sobre la actividad $(\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+})\text{ATPasa}$ podría ser debido a cambios en este parámetro de la membrana plasmática de sinaptosomas. Para ello se han utilizado medidas de la polarización de fluorescencia del DPH según se indica en Materiales y Métodos.

A partir de los datos de polarización de fluorescencia se puede calcular el parámetro de orden (S) y la microviscosidad corregida (η_0) según la ecuación desarrollada por Pottel y cols (1983)(véase Materiales y Métodos). Estos mostraron que existe una estrecha correlación entre los valores de anisotropía relativa (r_s/r_0) y el parámetro de orden para membranas en las que el valor de r_s/r_0 sea superior a 0,2, mientras que existe una gran dispersión de puntos cuando se representa η_0 frente a r_s/r_0 . En la mayoría de las membranas biológicas, como ocurre en nuestras preparaciones, r_s/r_0 tiene un valor superior a 0,4, en nuestro caso este valor varía entre 0,574 y 0,526, según se tome un valor

de r_0 de 0,362 o de 0,395. Por esta razón, el parámetro de orden obtenido a partir de los datos de anisotropía de fluorescencia es más fiable que el de microviscosidad corregida para estimar la fluidez de las membranas.

Los resultados obtenidos en presencia de distintas concentraciones de inhibidor a 25°C y una concentración de proteína de 25 $\mu\text{g/ml}$ se muestran en la Tabla 3. Puede observarse que las concentraciones de HHIF que inhiben la $(\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+})\text{ATPasa}$ no producen cambios significativos en el parámetro de orden. No obstante, hay una ligera alteración de la fluidez que va siendo progresiva según aumenta la concentración de inhibidor hasta alcanzar un valor el parámetro de orden (S) de 0,507 para una concentración de HHIF de 10 U/ml que corresponde a un valor de inhibición de la actividad ATPasa del 80% (Figura 19). Cuando se emplean unas condiciones experimentales similares a las utilizadas para estudiar la inhibición de la acumulación de Ca^{2+} dependiente de ATP (véase el apartado 7.1 de Resultados) con una concentración de proteína de 120 $\mu\text{g/ml}$ no se observa ningún efecto sobre la fluidez de la membrana hasta una concentración de HHIF de 10 U/ml. Estos resultados permiten concluir que la inhibición de la actividad ATPasa no puede explicarse exclusivamente por alteraciones en la fluidez de la membrana.

Debido a este efecto de HHIF sobre la fluidez de la membrana nos cuestionamos si este efecto podría ser debido a una acción detergente de HHIF sobre la membrana sinaptosomal. Para muchas proteínas intrínsecas de membrana la solubilización por detergentes provoca cambios en la actividad por deslipidación del lípido anular (de Foresta y cols., 1989; Sandermann, 1978, 1983). Por tanto, nos planteamos si al añadir HHIF al medio de ensayo este agente induce algún tipo de solubilización de la membrana. La técnica de dispersión de luz es especialmente útil para determinar la solubilización de membranas (Tandford, 1980).

Para llevar a cabo este estudio se han realizado medidas de la dispersión de luz (I_{90}) a 400 nm. En este método se hace incidir un rayo de luz monocromática sobre una solución o suspensión de macromoléculas y se mide a 90° la intensidad de luz dispersa a esa longitud de onda. Vesículas derivadas de sinaptosomas, 25 $\mu\text{g/ml}$, se incuban con concentraciones crecientes de inhibidor en el mismo intervalo de las que inhiben la actividad $(\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+})\text{ATPasa}$ con agitación continua y en un medio que contiene: Tes 5 mM (pH 7,4), KCl 100 mM, β -mercaptoetanol 2 mM y sacarosa 0,3 M, a 25°C. En estas condiciones HHIF (hasta 10 U/ml) no tiene ningún efecto sobre la dispersión de luz (I_{90}).

Tabla 3. Efecto de HHIF sobre la fluidez de la membrana de sinaptosomas. La polarización de la fluorescencia del DPH(difenil-hexatrieno) se ha medido a 25°C en un medio que contiene: sacarosa 0,3 M, KCl 0,1 M, β -mercaptoetanol 2 mM y Tes 5 mM (pH 7,4). La concentración de proteína fue de 25 μ g/ml.

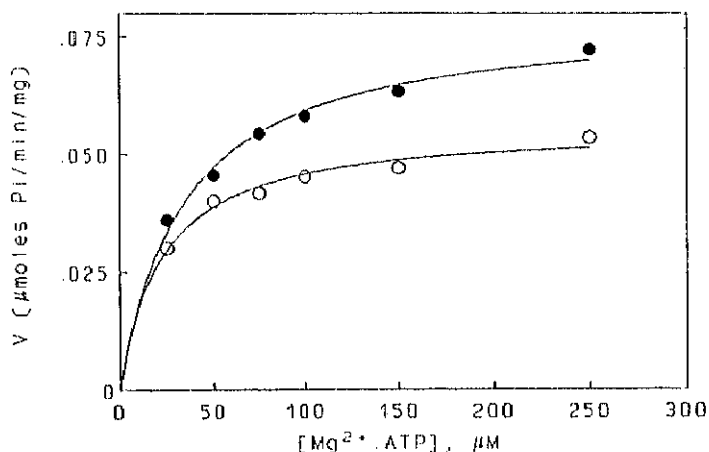
	P	R _s	S	η_0
CONTROL	0,283 \pm 0,01	0,208 \pm 0,008	0,673 \pm 0,02	0,966 \pm 0,018
HHIF (U/ml)				
0,25	0,274 \pm 0,006	0,2 \pm 0,005	0,653 \pm 0,013	0,948 \pm 0,012
0,5	0,263 \pm 0,006	0,192 \pm 0,004	0,63 \pm 0,01	0,926 \pm 0,011
1	0,248 \pm 0,011	0,180 \pm 0,009	0,595 \pm 0,027	0,895 \pm 0,026
2,5	0,251 \pm 0,008	0,183 \pm 0,007	0,602 \pm 0,02	0,902 \pm 0,018
5	0,215 \pm 0,007	0,155 \pm 0,005	0,514 \pm 0,018	0,815 \pm 0,02
10	0,213 \pm 0,005	0,153 \pm 0,004	0,507 \pm 0,015	0,808 \pm 0,015

P: Polarización de fluorescencia.
R_s: Anisotropía de fluorescencia.
S: Parámetro de orden.
 η_0 : Microviscosidad corregida.

6.2. Efecto de HHIF sobre la dependencia de la actividad $(Ca^{2+}, Mg^{2+})ATPasa$ respecto a ATP.

Para conocer el mecanismo cinético de inhibición de la actividad $(Ca^{2+}, Mg^{2+})ATPasa$ de sinaptosomas por HHIF se ha estudiado el efecto de éste sobre los parámetros cinéticos de la activación por ATP.

Figura 23. Activación de la Mg^{2+} -ATPasa basal y de la $(Ca^{2+} + Mg^{2+})ATPasa$ por concentraciones crecientes de Mg^{2+} -ATP (0-250 μM). La actividad se midió utilizando el sistema de enzimas acopladas PK/LDH, como se describe en Materiales y Métodos, en un medio de reacción tamponado con EGTA y una concentración de Mg^{2+} libre de 250 μM (○) y el mismo medio de ensayo más Ca^{2+} libre 1 μM (●).



El efecto de Mg^{2+} -ATP sobre la actividad Mg^{2+} -ATPasa basal y $(Ca^{2+} + Mg^{2+})ATPasa$ en el intervalo de concentraciones empleadas en nuestras condiciones de ensayo, 0-250 μM , se ajusta a una representación hiperbólica de Michaelis-Menten (Figura 23). La actividad Mg^{2+} -ATPasa basal tiene un K_m de 21 μM para ATP y de 29 μM para la actividad dependiente de Ca^{2+} y Mg^{2+} . Estos valores se han obtenido a partir de la representación de dobles inversos o Lineweaver-Burk. La presencia de 1 μM de Ca^{2+} no altera la afinidad de la enzima para ATP pero sí incrementa la velocidad máxima desde 0,055 $\mu moles Pi/min/mg$ de proteína hasta 0,076 $\mu moles Pi/min/mg$ de proteína. Estos valores están de acuerdo con los descritos previamente por otros autores (Michaelis y cols., 1983, García-Martín y Gutiérrez-Merino, 1990).

En el medio de ensayo la concentración de Ca^{2+} libre es de aproximadamente 1 μM , calculado como se indica en Materiales y Métodos, por lo que considerando que la K_m para Ca^{2+} -ATP de la Ca^{2+} -ATPasa es de 53 μM (Nagy y cols., 1986) y de 17-19,5 μM para Ca^{2+} (Michaelis y cols., 1983; Sorensen y cols., 1981), la contribución de la actividad Ca^{2+} -ATPasa en estas condiciones puede ser despreciada.

Los datos obtenidos para HHIF sobre ambas actividades ATPasa se muestra en las Figuras 24 y 25. Para estudiar el efecto de HHIF sobre la dependencia de la actividad ATPasa con la concentración de ATP se han utilizado concentraciones de HHIF que producen una inhibición entre el 20 y 50% de la actividad $(Ca^{2+}, Mg^{2+})ATPasa$ total (Figura 19). Representaciones de Lineweaver-Burk de estos datos se ajustan satisfactoriamente a una línea recta, indicando que no existe cooperatividad positiva en el proceso de activación del ATP en este intervalo de concentraciones.

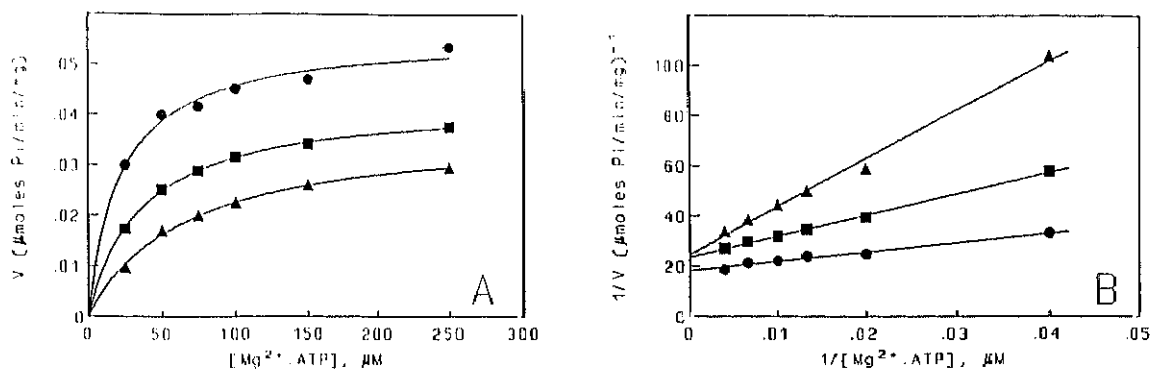


Figura 24. Efecto de HHIF sobre la dependencia de la actividad Mg^{2+} -ATPasa con la concentración de Mg^{2+} -ATP. Panel A. La actividad se midió en condiciones experimentales estándar en un medio de ensayo tamponado con EGTA, una concentración de Mg^{2+} libre de 250 μM y diferentes concentraciones de HHIF: 0 (\bullet), 0,5 (\blacksquare) y 2,5 (\blacktriangle) U/ml. Panel B. Representación de Lineweaver-Burk.

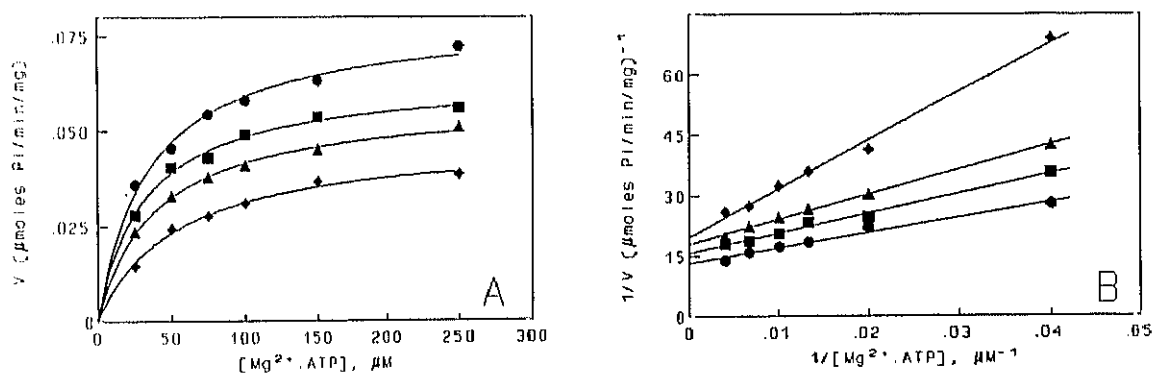


Figura 25. Dependencia de la actividad $(Ca^{2+} + Mg^{2+})$ ATPasa con la concentración de Mg^{2+} ATP en presencia de distintas concentraciones de HHIF. Panel A. Condiciones experimentales indicadas en la Figura 24 excepto que la concentración de Ca^{2+} libre es 1 μM y 0 (\bullet), 0,5 (\blacksquare), 1,5 (\blacktriangle) y 2,5 (\blacklozenge) U/ml de HHIF. Panel B. Representación de Lineweaver-Burk.

Los parámetros cinéticos, K_m y V_m , obtenidos a partir de estos datos se presentan en la Tabla 4. Tanto para la $(Ca^{2+} + Mg^{2+})$ ATPasa como para la actividad Mg^{2+} -ATPasa basal la velocidad máxima y la afinidad por el Mg^{2+} -ATP disminuye en presencia del inhibidor. Este efecto sobre V_m no se revierte por altas concentraciones de ATP, por lo que la inhibición producida por HHIF no es competitiva con el sustrato.

Tabla 4. Efecto de HHIF sobre los parámetros cinéticos de la actividad Mg^{2+} -ATPasa y $(Ca^{2+} + Mg^{2+})$ ATPasa de la membrana plasmática sinaptosomal.

	Mg^{2+} -ATPasa		$(Ca^{2+} + Mg^{2+})$ ATPasa	
	K_m (μM)	V_m (U.I.)	K_m (μM)	V_m (U.I.)
CONTROL	21	0,055	29	0,075
HHIF (U/ml)				
0.5	36	0,042	31,5	0,064
1.5			34,5	0,056
2.5	78	0,040	60,8	0,050

Se ha estudiado también el efecto de diferentes concentraciones de ATP sobre la $K_{0,5}$ de inhibición de la actividad (Ca^{2+}, Mg^{2+}) ATPasa por HHIF (Figura 26). De estos resultados se puede deducir que al incrementar la concentración de ATP en el medio de ensayo disminuye la sensibilidad de la actividad (Ca^{2+}, Mg^{2+}) ATPasa por el inhibidor. La $K_{0,5}$ hacia HHIF se incrementa aproximadamente al doble, variando desde 1,3 U/ml a 0,1mM de ATP hasta 2,45 U/ml para una concentración de ATP de 2 mM. Estos resultados apoyan las conclusiones obtenidas a partir de los datos mostrados en las Figuras 24 y 25.

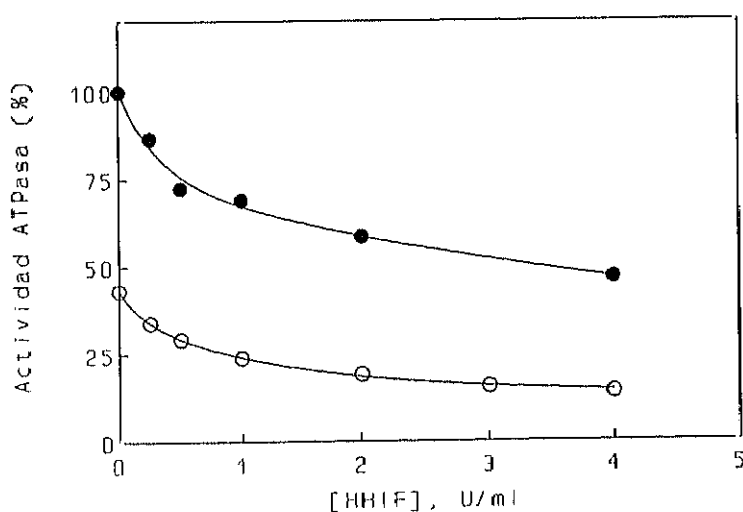


Figura 26. Dependencia de la actividad (Ca^{2+}, Mg^{2+}) ATPasa de vesículas derivadas de sinaptosomas con la concentración de HHIF, en presencia de distintas concentraciones de ATP: (○) 0,1 mM y (●) 2 mM. En el eje de ordenadas se ha representado la actividad ATPasa calculada en ausencia de HHIF y en presencia de ATP 2 mM.

6.3. Efecto de HHIF sobre la modulación de la actividad $(Ca^{2+}, Mg^{2+})ATPasa$ por Ca^{2+} .

La modulación por Ca^{2+} de la actividad $(Ca^{2+} + Mg^{2+})ATPasa$ de membrana plasmática de sinaptosomas es compleja, mostrando una fase de estimulación a concentraciones submicromolares y una fuerte inhibición en el rango de concentraciones 0,1 mM - 1 mM (Sorensen y Mahler, 1981; Michaelis y cols., 1983).

Hemos estudiado el efecto de distintas concentraciones de HHIF que inhiben entre un 25 y un 50% la actividad $(Ca^{2+}, Mg^{2+})ATPasa$ total sobre la activación de la $(Ca^{2+} + Mg^{2+})ATPasa$ por Ca^{2+} libre submicromolar, ajustando estas concentraciones utilizando EGTA como se indica en Materiales y Métodos. La dependencia de la actividad $(Ca^{2+} + Mg^{2+})ATPasa$ con estas concentraciones de Ca^{2+} libre se presenta en la Figura 27. De estos datos se deduce que la actividad $(Ca^{2+} + Mg^{2+})ATPasa$ constituye aproximadamente el 50% de la actividad ATPasa total y corresponde a un valor de $0,08 \pm 0,01$ μ moles Pi/min/mg de proteína. A partir de la representación de Hill de estos datos se obtiene un valor de $K_{0,5}$ igual a $0,1$ μ M y un índice de Hill de $1,42 \pm 0,18$, que indica la existencia de cooperatividad positiva en el proceso de activación. Estos resultados están de acuerdo con los publicados por otros investigadores (Sorensen y Mahler, 1981; Michaelis y cols., 1983).

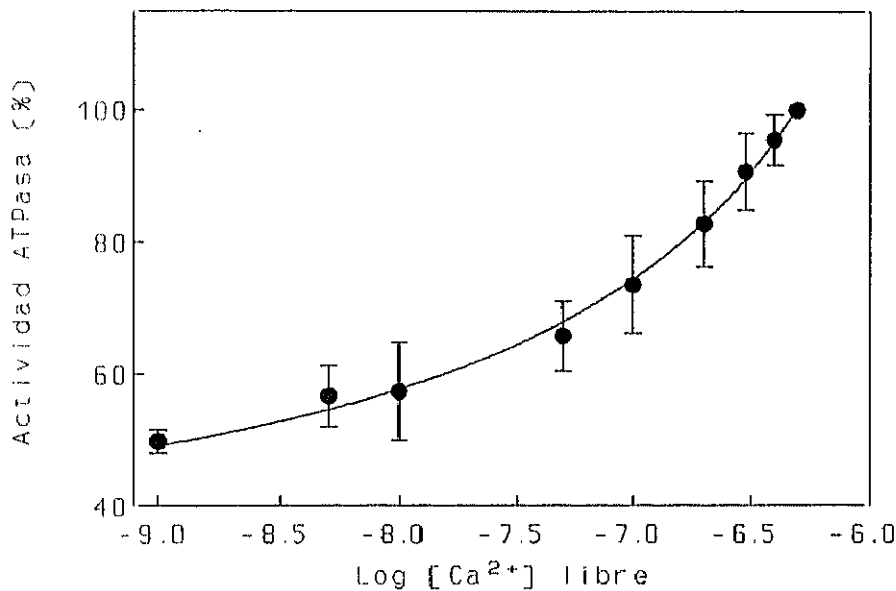


Figura 27. Estimulación por Ca^{2+} de la actividad Mg^{2+} -ATPasa basal de la membrana plasmática sinaptosomal. La actividad ATPasa era determinada en el medio de ensayo estándar, a $25^{\circ}C$, Cl_2Mg 2mM, ATP 2mM y concentraciones de EGTA variables como se describe en Materiales y Métodos. En el eje de ordenadas se representa la actividad ATPasa referida a la actividad obtenida en cada serie experimental con una $[Ca^{2+}]_i$ de 50 μ M.

El efecto de HHIF sobre la dependencia de la actividad $(Ca^{2+} + Mg^{2+})ATPasa$ con la concentración de Ca^{2+} se muestra en la Figura 28. El efecto de HHIF es similar sobre la actividad

$(Ca^{2+} + Mg^{2+})ATPasa$ y $Mg^{2+}-ATPasa$ basal. Por otro lado, no se observa ningún cambio significativo en el valor de $K_{0,5}$ ni en el índice de cooperatividad del proceso en presencia de HHIF.

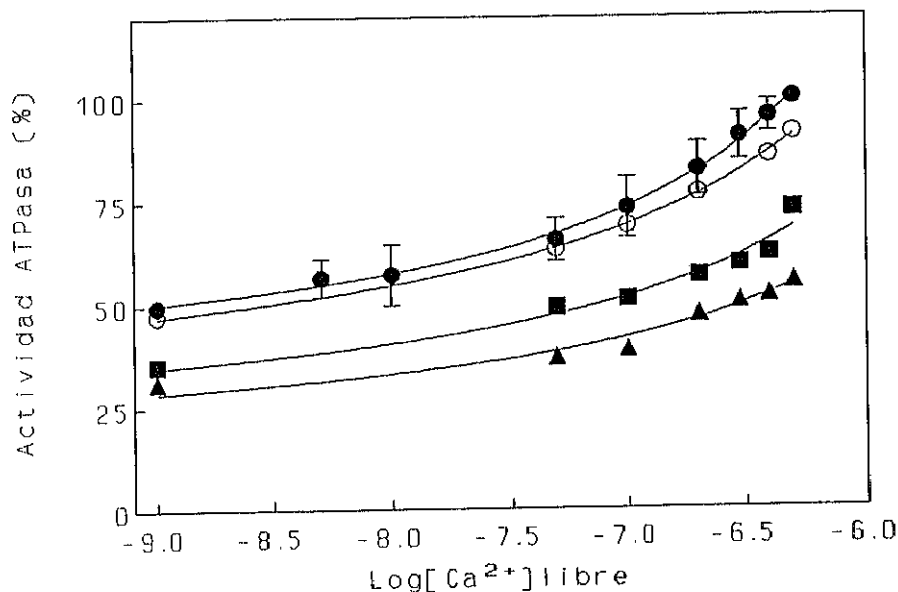


Figura 28. Estimulación por Ca^{2+} de la actividad $Mg^{2+}-ATPasa$ basal en ausencia (●) y en presencia de HHIF 0,1, (○) 0,5 (■), (▲) 2,5 U/ml. En el eje de ordenadas se representa la actividad ATPasa referida a la actividad obtenida con una $[Ca^{2+}]_L$ de $50 \mu M$ en ausencia de HHIF.

Como se ha indicado previamente, concentraciones de Ca^{2+} del orden de $0,1 \text{ mM} - 1 \text{ mM}$ inhiben la actividad $(Ca^{2+} + Mg^{2+})ATPasa$. Puesto que los niveles de Ca^{2+} libre presentes en el líquido extracelular son aproximadamente 1 mM , hemos estudiado el efecto de concentraciones submilimolares de Ca^{2+} sobre la dependencia de la actividad $(Ca^{2+} + Mg^{2+})ATPasa$ con distintas concentraciones de HHIF (Figura 29). Representaciones de Hill de estos datos permiten obtener los valores de $0,213 \text{ mM}$ y de $1,4 \pm 0,03$ para $K_{0,5}$ y el índice de Hill, respectivamente, en ausencia de HHIF. En presencia del inhibidor se observa un ligero aumento del valor de $K_{0,5}$ y del índice de Hill, obteniéndose valores de $K_{0,5} = 0,247 \text{ mM}$ $n_{H1} = 1,6 \pm 0,2$ y $K_{0,5} = 0,336 \text{ mM}$ $n_{H1} = 2,3 \pm 0,2$ para unas concentraciones de inhibidor de $0,75 \text{ U/ml}$ y $2,5 \text{ U/ml}$, respectivamente.

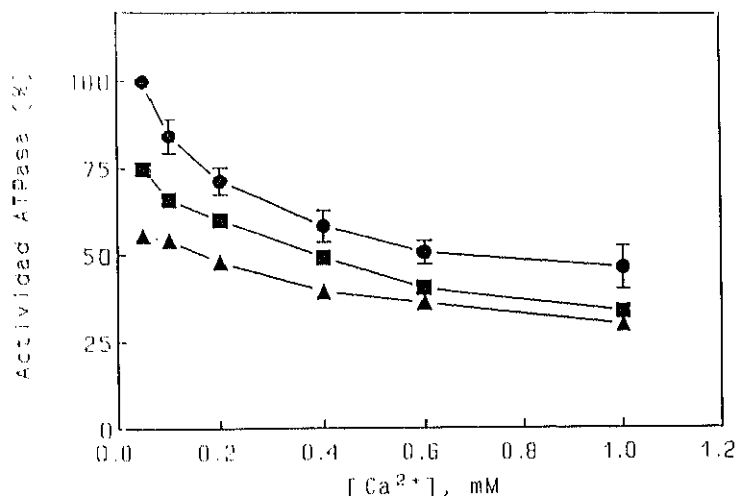
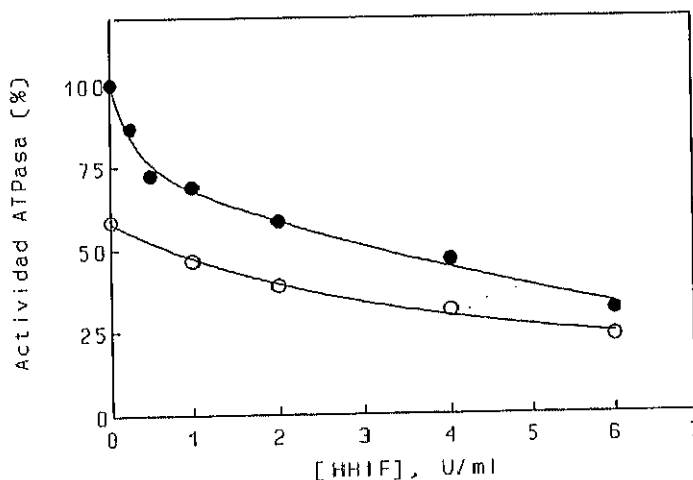


Figura 29. Efecto de HHIF sobre la dependencia de la actividad $(Ca^{2+}, Mg^{2+})ATPasa$ total de vesículas con la concentración de Ca^{2+} . Concentraciones de HHIF en el medio de ensayo: 0 (●), 0,75 (■) y 2,5 (▲) U/ml. En el eje de ordenadas se ha representado la actividad ATPasa referida a la actividad obtenida en presencia de Ca^{2+} 50 μM en ausencia de HHIF.

Puede observarse también que la extensión de la inhibición de la actividad $(Ca^{2+}, Mg^{2+})ATPasa$ total por Ca^{2+} es inferior en presencia de HHIF. El valor de máxima inhibición en presencia de 1 mM de Ca^{2+} en el medio de ensayo y en presencia de HHIF alcanza un valor del 70 % de la actividad medida en presencia de una concentración de Ca^{2+} 50 μM y en ausencia de HHIF. Este valor es sólo aproximadamente un 20 % mayor que el obtenido en ausencia de HHIF sugiriendo un cierto efecto sinérgico entre Ca^{2+} y HHIF en la inhibición de la actividad $(Ca^{2+} + Mg^{2+})ATPasa$ de sinaptosomas. Por esta razón se ha estudiado el efecto de Ca^{2+} 1 mM sobre la dependencia de la actividad $(Ca^{2+}, Mg^{2+})ATPasa$ con la concentración de HHIF.

Figura 30. Inhibición de la actividad ATPasa total por HHIF en presencia de Ca^{2+} 50 μM (●) o 1 mM (○). En el eje de ordenadas se ha representado la actividad ATPasa referida a la actividad medida en ausencia de HHIF y en presencia de Ca^{2+} 50 μM . Otras condiciones experimentales están indicadas en Materiales y Métodos.



Como puede observarse en la Figura 30 el valor de $K_{0,5}$ de inhibición se desplaza hacia valores más elevados en presencia de Ca^{2+} 1 mM, variando desde un valor 2,45 U/ml para una concentración de Ca^{2+} 50 μM a 4,2 U/ml a una concentración de Ca^{2+} 1 mM sin variación en la cooperatividad del proceso. Podemos concluir, pues, que la sensibilidad de la actividad

(Ca^{2+} , Mg^{2+})ATPasa a la inhibición por HHIF disminuye en presencia de altas concentraciones de calcio en el medio.

7. EFECTO DE HHIF SOBRE EL TRANSPORTE DE Ca^{2+} EN SINAPTOSOMAS.

El control de los niveles de Ca^{2+} en las terminales sinápticas se lleva a cabo, principalmente, a través de tres sistemas diferentes: canales de Ca^{2+} , intercambio $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ y transporte de calcio dependiente de ATP y Mg^{2+} (Akerman y Nicholls, 1983; Gill y cols., 1984; Carafoli, 1987; Blaustein, 1991). Por tanto, hemos estudiado el efecto de HHIF sobre cada uno de estos sistemas.

7.1. Transporte activo de Ca^{2+} .

El transporte activo de Ca^{2+} a través de la membrana plasmática de vesículas derivadas de sinaptosomas es dependiente de ATP y está acoplado a la hidrólisis de éste por la bomba de Ca^{2+} (Gill y cols., 1981; Carafoli, 1991b). Como ya hemos señalado anteriormente la actividad (Ca^{2+} + Mg^{2+})ATPasa es inhibida por HHIF lo cual debe acompañarse de una inhibición en el transporte de Ca^{2+} dependiente de ATP. Para comprobarlo se ha estudiado la captación de Ca^{2+} en vesículas y el efecto de HHIF.

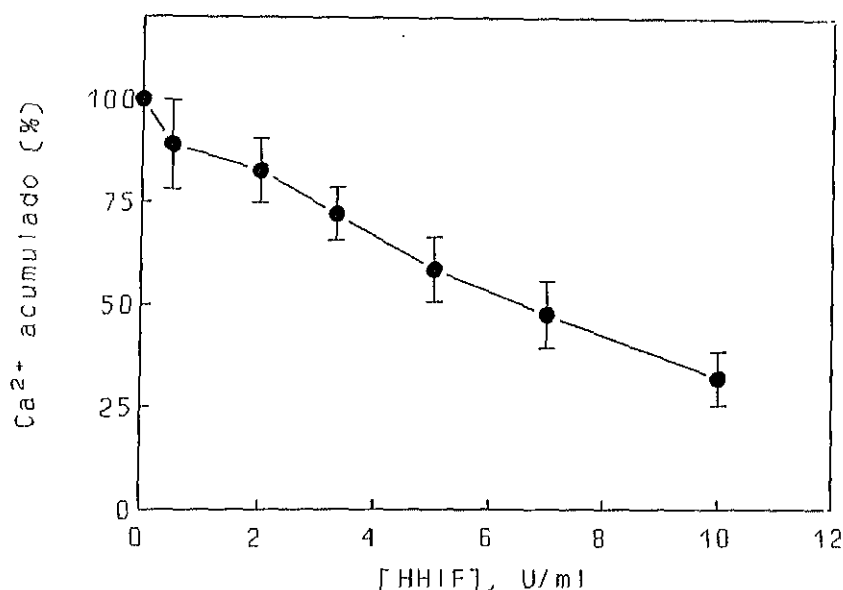


Figura 31. Inhibición de la captación de Ca^{2+} dependiente de ATP por HHIF en vesículas de membrana plasmática a 25°C. El medio de ensayo contenía: Tes/KOH 50 mM (pH 7,4), KCl 0,1 M, MgCl_2 2 mM, ATP 1 mM, CaCl_2 50 μM (0,4 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$, Ca^{2+} libre 42 μM), β -mercaptoetanol 2 mM y 0,12 mg de proteína/ml. El calcio acumulado se determina a los 2 primeros minutos después de añadir ATP 1 mM y es expresado como porcentaje del valor control medido en ausencia de HHIF en el medio de ensayo. Cada valor ha sido corregido por el calcio acumulado en ausencia de ATP con y sin inhibidor. Véase Materiales y Métodos para más detalles experimentales.

La acumulación de calcio se determina por filtración rápida, según se ha descrito en Materiales y Métodos, siendo en ausencia de HHIF a los 2 y 5 min de $3,6 \pm 0,6$ nmoles de Ca^{2+} /mg de proteína y $5,0 \pm 0,8$ nmoles de Ca^{2+} /mg de proteína, respectivamente. Estos resultados son similares a los obtenidos por otros investigadores en similares condiciones experimentales. El Ca^{2+} acumulado es liberado cuando se añade el ionóforo A23187 al medio externo indicando que la acumulación es en contra de gradiente de concentración.

La Figura 31 muestra el efecto de diferentes concentraciones de HHIF sobre la acumulación de Ca^{2+} dependiente de ATP. Cada valor representa la acumulación de Ca^{2+} debida a la $(\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+})\text{ATPasa}$ y está corregido por el transporte pasivo y la unión no específica de Ca^{2+} determinada en ausencia de ATP, con y sin inhibidor. La representación de Hill de estos datos permite calcular un valor de $K_{0,5}$ aparente de 6,25 U/ml y un valor de coeficiente de Hill (n_H) de $1,42 \pm 0,07$, lo cual indica que el proceso presenta una ligera cooperatividad positiva. Debido a la alta adsorción de este compuesto a la bicapa lipídica es necesario corregir esta concentración por el coeficiente de partición aparente, determinado según se indica en Materiales y Métodos. El valor de HHIF libre capaz de inhibir el 50% del transporte de Ca^{2+} es de aproximadamente 0,6 U/ml. En presencia de A23187 $19 \mu\text{M}$ la unión de Ca^{2+} por mg de proteína es de $2,9 \pm 0,4$ nmoles/mg de proteína. Las concentraciones de HHIF que inhiben la acumulación de Ca^{2+} no alteran significativamente la capacidad de unión de Ca^{2+} de las membranas sinápticas hasta 10 U/ml donde el valor disminuye ligeramente con respecto al control siendo éste de $1,98 \pm 0,18$ nmoles/mg proteína.

7.2. Flujo pasivo de Ca^{2+} .

Hemos estudiado la variación de la permeabilidad de la membrana plasmática de vesículas (dializadas frente a Tes 5mM) para el calcio en presencia de diferentes concentraciones de HHIF utilizando para ello la dependencia con el tiempo de la dispersión de luz tras choque osmótico con CaCl_2 100mM (véase Materiales y Métodos).

Se ha considerado la posibilidad de que la presencia de HHIF en el medio de ensayo induzca cambios en el estado de agregación de los sinaptosomas que podrían enmascarar los resultados. Para descartarlo, se incuban $25 \mu\text{g/ml}$ de vesículas derivadas de sinaptosomas con concentraciones crecientes de HHIF. Este tratamiento no produce ninguna variación apreciable en la intensidad de luz dispersa (I_{90}). La Figura 32 muestra el efecto de diferentes concentraciones de HHIF sobre el influjo pasivo de Ca^{2+} tras choque osmótico. Los resultados mostrados en la Figura 32 corresponden a una serie experimental realizada con una preparación de sinaptosomas, obteniéndose resultados similares en diferentes series y preparaciones.

En el Panel A (registro directo) puede observarse como concentraciones crecientes de HHIF (1, 2, 3, 4 U/ml) aceleran el proceso de disminución de la intensidad de luz dispersa, debido a un aumento de la permeabilidad a Ca^{2+} .

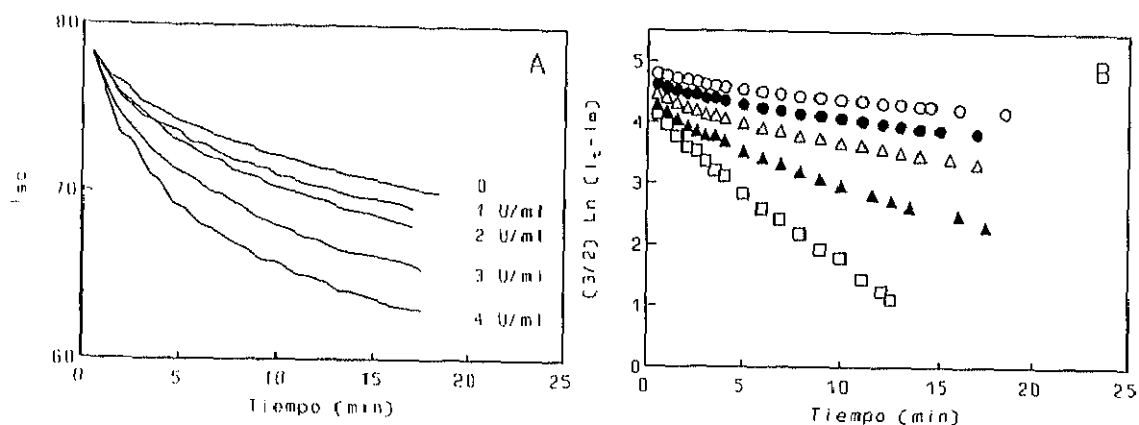


Figura 32. Efecto de HHIF sobre la dependencia con el tiempo de la intensidad de dispersión de luz (I_{90}) de vesículas de membrana plasmática (0,1 mg/ml) (dializadas frente a Tes 5 mM) tras choque osmótico con CaCl_2 100 mM a 25°C. Panel A Registro directo. Panel B Representación semilogarítmica de los datos experimentales.

La representación semilogarítmica de estos datos (Panel B) permite obtener los valores de la constante de velocidad del proceso y el $t_{1/2}$ para Ca^{2+} (véase Materiales y Metodos). Se observa que la representación no se ajusta a una línea recta, sino que representa la suma de dos procesos exponenciales. Estos resultados sugieren que la difusión del ion Ca^{2+} hacia el interior de las vesículas tiene lugar a través de dos tipos de canales con características cinéticas diferentes. Este comportamiento es similar al encontrado cuando se utilizan preparaciones de retículo sarcoplásmico de músculo esquelético de conejo (Escudero y Gutiérrez-Merino, 1987). La constante de difusión obtenida es de $0,284 \pm 0,055 \text{ min}^{-1}$ (proceso rápido) y $0,02 \pm 0,0035 \text{ min}^{-1}$ (proceso lento).

Tabla 5. Efecto de HHIF sobre el $t_{1/2}$ aparente del influjo de Ca^{2+} al interior de vesículas derivadas de sinaptosomas. Las condiciones experimentales están indicadas en la Figura 32.

	$t_{1/2}$ (min)
CONTROL	$21,2 \pm 2,7$
HHIF (U/ml)	
1	$14,0 \pm 1,5$
2	$9,0 \pm 0,9$
3	$4,5 \pm 1,1$
4	$2,0 \pm 0,1$

En la Tabla 5 se muestran los valores de $t_{1/2}$ aparente en presencia de diferentes concentraciones de HHIF.

Como puede verse en la Tabla 6, HHIF altera significativamente la constante de difusión para Ca^{2+} tanto del proceso rápido (aproximadamente 4 veces) como del proceso lento (aproximadamente 12 veces), si bien no hay variación significativa del valor de A (fracción de canales de tipo 1 o en estado conformacional 1).

Tabla 6. Efecto de HHIF sobre la constante de difusión del influjo de Ca^{2+} a través de la membrana plasmática sinaptosomal. D_1 y D_2 han sido estimados por ajuste de la dependencia con el tiempo de la intensidad de luz dispersa a la suma de dos procesos exponenciales (véase Materiales y Métodos). D_1 y D_2 son las constantes de difusión del Ca^{2+} a través de a) dos canales distintos en la membrana o b) dos estados conformacionales diferentes del mismo canal con propiedades distintas de permeabilidad, y A es la fracción de canales tipo 1 o en estado conformacional 1.

	D_1 (min^{-1})	D_2 (min^{-1})	A
CONTROL	$0,28 \pm 0,05$	$0,02 \pm 0,003$	$0,28 \pm 0,05$
HHIF(U/ml)			
1	$0,34 \pm 0,07$	$0,030 \pm 0,004$	$0,25 \pm 0,01$
2	$0,47 \pm 0,02$	$0,047 \pm 0,005$	$0,31 \pm 0,01$
3	$0,67 \pm 0,21$	$0,09 \pm 0,02$	$0,33 \pm 0,03$
4	$1,17 \pm 0,18$	$0,24 \pm 0,01$	$0,31 \pm 0,02$

7.3. Efecto de HHIF sobre el intercambio $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$.

Las vesículas derivadas de la membrana plasmática de sinaptosomas transportan Ca^{2+} en contra de un gradiente de concentración utilizando la energía del gradiente de Na^+ a través de la membrana, vía el intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (Reeves, 1991). Para determinar el efecto de HHIF sobre este proceso de transporte se ha utilizado como marcador el compuesto fluorescente clorotetraciclina (CTC), según se indica en Materiales y Métodos.

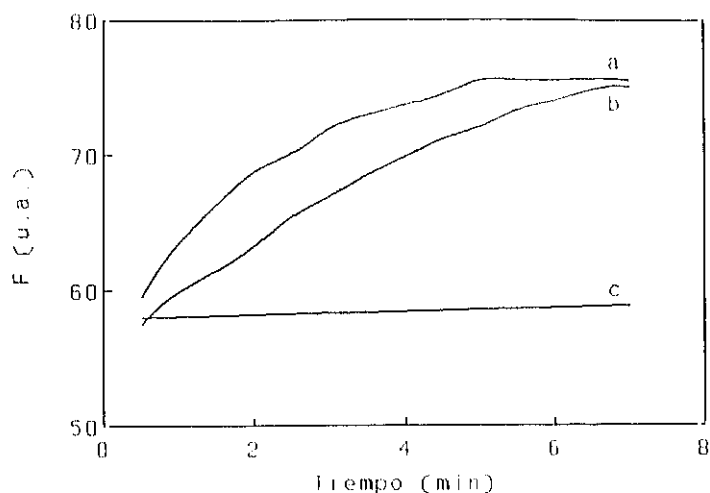


Figura 33. Efecto de diferentes iones sobre la dependencia con el tiempo de la intensidad de fluorescencia de CTC tras dilución de las vesículas de membrana plasmática ($45 \mu\text{g/ml}$) preincubadas a 37°C durante 30 min con Tes 5 mM (pH 7,4), NaCl 0,1 M y CTC $50 \mu\text{M}$ en un medio isoosmótico (37°C) que contiene: Tes 5mM (pH 7,4), CaCl_2 $50 \mu\text{M}$ y KCl 0,1 M (a) o cloruro de colina 0,1 M (b) o NaCl 0,1 M (c).

La Figura 33 muestra el efecto de diferentes iones sobre la dependencia con el tiempo de la intensidad de fluorescencia de CTC. Puede observarse como cuando las vesículas precargadas con NaCl 0,1 M, por incubación durante 30 min a 37°C , son diluidas en un medio isoosmótico con KCl 0,1 M, imponiendo de esta forma un gradiente de Na^+ hacia el exterior, el Ca^{2+} es captado por las vesículas. Como control, en ausencia de gradiente de Na^+ , es decir cuando la concentración de sodio a ambos lados de la membrana es la misma, no se observa una acumulación significativa de Ca^{2+} (Figura 33). La presencia de un gradiente de K^+ no es esencial para el transporte de Ca^{2+} porque puede ser reemplazado en el medio externo por cloruro de colina (véase la Figura 33).

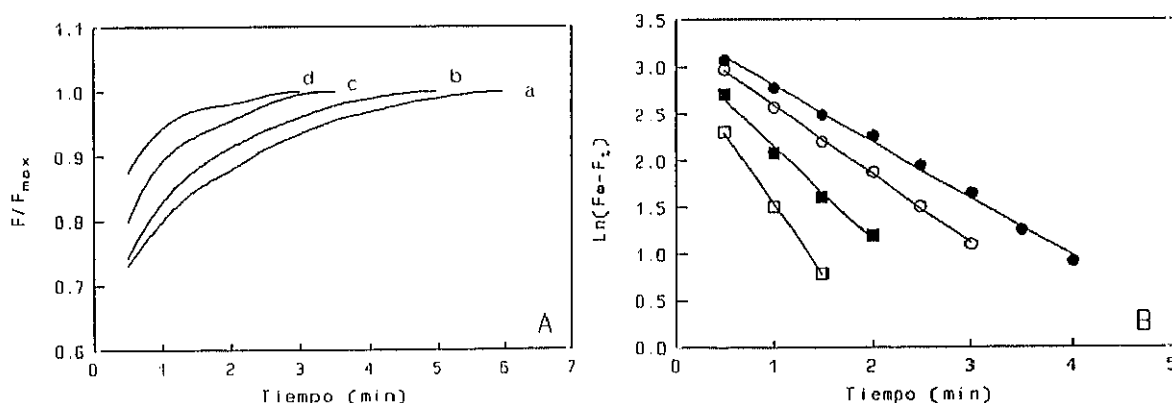


Figura 34. Efecto de HHIF sobre la dependencia de la intensidad de fluorescencia de CTC tras dilución de las vesículas derivadas de sinaptosomas ($45 \mu\text{g/ml}$) preincubadas durante 30 min, a 37°C , con Tes 5 mM (pH 7,4), NaCl 0,1 M y CTC $50 \mu\text{M}$ en un medio isoosmótico (37°C) que contiene: Tes 5 mM (pH 7,4), CaCl_2 $50 \mu\text{M}$, CTC $50 \mu\text{M}$ y KCl 0,1 M. Las concentraciones de HHIF en el medio son 0 (a), 0,5 (b), 1 (c) y 2 (d) U/ml. Panel A. Registro directo. Panel B. Representación semilogarítmica de los datos experimentales.

En las Figuras 34 y 35 (Panel A) (registro directo) se muestra el efecto de diferentes concentraciones de HHIF sobre la intensidad de fluorescencia de CTC con el tiempo después de la dilución de las vesículas precargadas con sodio (NaCl 0,1 M) en un medio con KCl 0,1 M (Figura 34) o cloruro de colina 0,1 M (Figura 35). Como puede observarse en ambos casos concentraciones crecientes de HHIF hasta un valor de 2 U/ml estimulan el influjo de Ca^{2+} . La representación de $\text{Ln}(F_{\infty} - F)$ frente al tiempo (Panel B) permite calcular a partir de la pendiente de las rectas ajustadas la constante de velocidad y el $t_{1/2}$ del proceso.

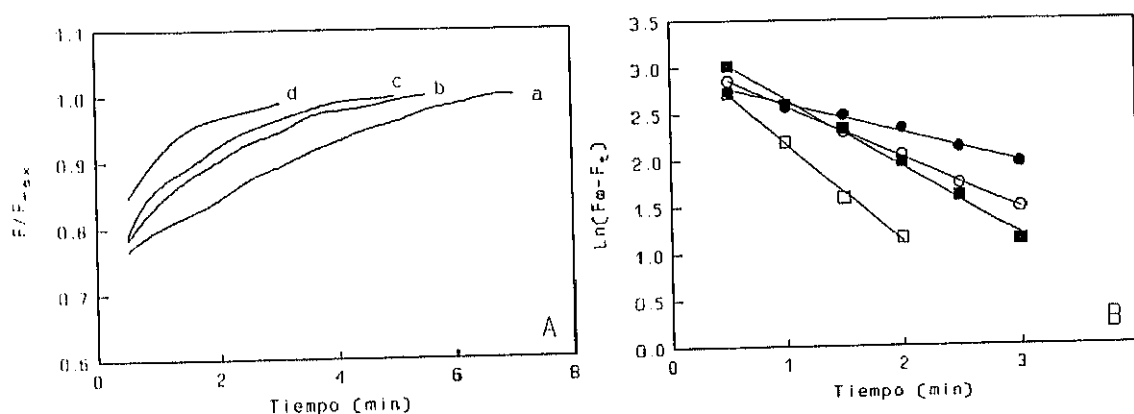


Figura 35. Efecto de HHIF sobre la dependencia con el tiempo de la intensidad de fluorescencia de CTC tras dilución de las vesículas en un medio isoosmótico con cloruro de colina 0,1 M, en presencia de distintas concentraciones de HHIF: 0 (a), 0,5 (b), 1 (c) y 2 (d) U/ml. Panel A. Registro directo. Panel B. Representación semilogarítmica de los datos experimentales. Las demás condiciones experimentales están indicadas en la leyenda de la Figura 34.

El efecto de HHIF sobre los parámetros más relevantes del proceso de intercambio $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ se muestra en la Tabla 7. La constante de velocidad del proceso aumenta, mientras que el incremento ($F_{\infty} - F_0$) relacionado con el calcio captado a saturación del proceso, no se modifica. Los resultados mostrados en la Figuras 34 y 35 corresponden a una serie experimental realizada con una preparación de sinaptosomas, obteniéndose resultados similares en diferentes series y preparaciones.

Tabla 7. Efecto de HHIF sobre los parámetros cinéticos del intercambio $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$. (A): Medio externo contiene cloruro de colina 0,1 M. (B): Medio externo contiene KCl 0,1 M.

	(A)		(B)	
	K (min^{-1})	($F_{\infty} - F_0$) (u.a.)	K (min^{-1})	($F_{\infty} - F_0$) (u.a.)
CONTROL	$0,34 \pm 0,03$	10 ± 1	$0,61 \pm 0,02$	$9,3 \pm 1,5$
HHIF(U/ml)				
0.5	$0,48 \pm 0,09$	$11 \pm 1,4$	$0,71 \pm 0,02$	$10,3 \pm 0,6$
1	$0,64 \pm 0,1$	$12 \pm 1,3$	$0,89 \pm 0,14$	$9,2 \pm 0,9$
2	$1,03 \pm 0,17$	$11 \pm 2,4$	$1,55 \pm 0,25$	$10,0 \pm 1,0$

8. MODULACION DE LA ACTIVIDAD $(\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+})\text{ATPasa}$ DEL RETICULO SARCOPLASMICO.

Los estudios llevados a cabo sobre la $(\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+})\text{ATPasa}$ de membrana plasmática de sinaptosomas ponen de manifiesto que HHIF inhibe la actividad ATPasa de estas membranas (véase el apartado 5.2.1 de Resultados). Esta enzima pertenece a las ATPasas tipo E_1-E_2 (Rega y Garrahan, 1986) y representa menos del 0,1 % de la proteína total de la membrana plasmática (Hakim y cols., 1982). La $(\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+})\text{ATPasa}$ de retículo sarcoplásmico de músculo esquelético es una proteína mayoritaria de la membrana del RS (70-90 %) (Inesi, 1972; Hasselbach, 1974) y es una de las mejor caracterizadas a nivel bioquímico y biofísico, por lo que nos planteamos el estudio con más detalle de la interacción de HHIF con la membrana del retículo sarcoplásmico (RS) como sistema modelo, con el fin de profundizar en la base molecular de la inhibición de la ATPasa por este compuesto. Además, diferentes grupos han mostrado que la bomba de Ca^{2+} de RS es modulada por una gran variedad de compuestos de naturaleza hidrofóbica (Solkolove y cols., 1986; Gutiérrez-Merino y cols., 1989; Michelangeli y cols., 1990; Martínez-Azorín y cols., 1992).

Para poder entender el mecanismo molecular de acción del HHIF es importante esclarecer si la perturbación de las propiedades funcionales de estas membranas es una consecuencia de la perturbación de propiedades físico-químicas de la matriz lipídica o, por el contrario, es consecuencia de la interacción directa del HHIF con la proteína. Por esta razón, hemos estudiado el efecto del HHIF sobre la fluidez de la membrana de RS y se han realizado estudios cinéticos tendentes a

cuestionar la posible influencia del ATP y del Ca^{2+} en la inhibición por HHIF.

8.1. Efecto de HHIF sobre la actividad $(\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+})\text{ATPasa}$ en membranas del retículo sarcoplásmico.

En el RS nativo la hidrólisis del ATP está acoplado al transporte de Ca^{2+} y se establece un fuerte gradiente de Ca^{2+} en las condiciones de ensayo, 0,1 mM de Ca^{2+} en el medio externo, 1-5 mM de Ca^{2+} en el lumen vesicular (de Meis y Vianna, 1979). En estas condiciones experimentales, la actividad $(\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+})\text{ATPasa}$ del retículo sarcoplásmico está fuertemente inhibida, aproximadamente un 80 % (Gould y cols., 1986) debido a los elevados niveles de Ca^{2+} en el interior de las vesículas. Cuando se añaden al medio detergentes o ionóforos selectivos para Ca^{2+} como la calcimicina (A23187) al 4 % (p/p), que disipan el gradiente de calcio, se produce una estimulación de la actividad ATPasa (Madden y cols., 1981; Quinn y cols., 1981). Por consiguiente, se ha estudiado la dependencia de la actividad ATPasa con HHIF en membranas con o sin gradiente de Ca^{2+} .

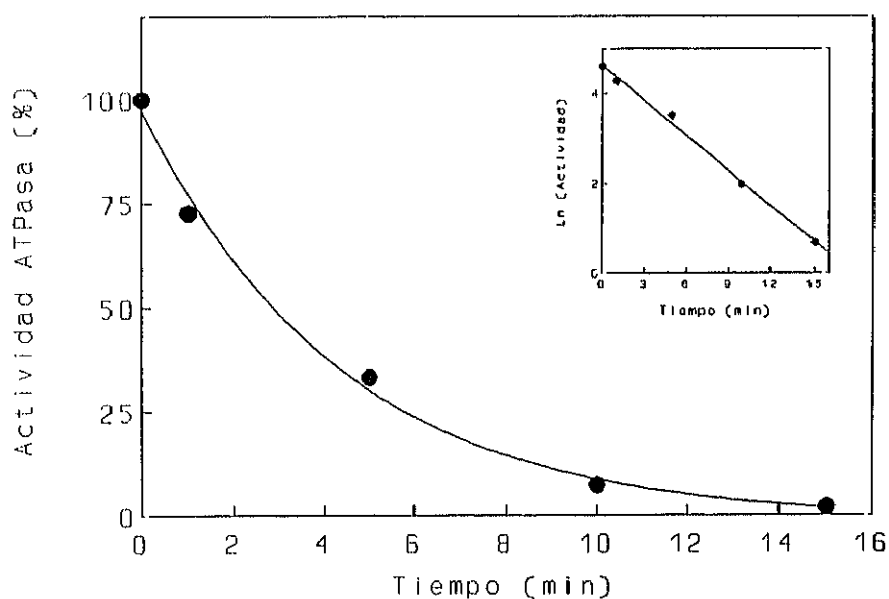


Figura 36. Efecto de HHIF sobre la $(\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+})\text{ATPasa}$ de vesículas de RS desacopladas con A23187 (0,04 mg/mg proteína) en función del tiempo de preincubación. La preincubación se realizó a 25°C en un medio que contenía Tes/Tris 100 mM (pH 7,4), RS 80 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y HHIF 25 U/ml. La actividad se midió a 25°C utilizando el sistema de enzimas acopladas que se indica en Materiales y Métodos. El medio de reacción contenía: Tes/KOH 0,1 M (pH 7,4), KCl 0,1 M, CaCl_2 0,1 M, MgCl_2 0,1 M, ATP 2,5 mM, PEP 0,42 mM, NADH 0,25 mM, PK 7,5 U.I., LDH 18 U.I., A23187 4% (p/p) y 4 μg de RS/ml.

Hemos estudiado la influencia del tiempo de preincubación sobre la inhibición de la actividad ATPasa. Para ello se preincuba RS 80 $\mu\text{g/ml}$ en ausencia o presencia de inhibidor 25 U/ml a 25°C en un medio que contiene Tes/Tris 100 mM pH 7,4. A distintos tiempos se toman 50 μl y se añaden al medio de ensayo de la actividad ATPasa (1ml). Las concentraciones finales de ATPasa y HHIF en el medio son de 4 $\mu\text{g/ml}$ y 1,25 U/ml, respectivamente. Paralelamente se lleva a cabo un control en ausencia de inhibidor comprobando que la actividad ATPasa permanece constante durante este tiempo.

La Figura 36 muestra que la actividad ATPasa decae en función del tiempo siguiendo una cinética de primer orden. La constante del proceso de inactivación obtenida a partir de estos datos es $0,26 \pm 0,01 \text{ min}^{-1}$.

La Figura 37 (Panel A) muestra la dependencia de la actividad $(\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+})\text{ATPasa}$ del RS nativo con la concentración de HHIF, previa preincubación durante 5 min a 25°C en Tes/Tris 100 mM (pH 7,4), la concentración final del RS en el medio de ensayo es de 4 $\mu\text{g/ml}$. Puede observarse que el efecto de HHIF presenta características complejas, mostrando dos fases claramente diferenciadas dependiendo de la concentración de HHIF en el medio de ensayo: una primera fase de activación de la $(\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+})\text{ATPasa}$ con un valor de $K_{0,5}$ aparente de 0,52 U/ml y un coeficiente de Hill de $1,8 \pm 0,2$ y una segunda fase de inhibición altamente cooperativa ($n_H = 13 \pm 2$), con un valor de $K_{0,5}$ aparente de 1,2 U/ml. Se ha tomado como 100% el valor máximo de actividad ATPasa calculado en presencia de A23187, que coincide con el valor de actividad máxima obtenida por el efecto "ionofórico" del inhibidor y que corresponde a un valor de $4 \pm 0,5 \text{ U.I.}$

En la Figura 37 (Panel A) se presenta además la dependencia de la actividad ATPasa en presencia de A23187 con la concentración de HHIF. No existe diferencia en la inhibición de la actividad ATPasa, obteniéndose el mismo valor de $K_{0,5}$ aparente dentro del error experimental.

El panel B de la Figura 37 se muestra la relación entre la actividad ATPasa en ausencia o presencia de A23187 al 4 % (p/p) en el medio de ensayo (RS acoplado/RS desacoplado), a diferentes concentraciones de HHIF. Puede observarse como esta relación aumenta hasta alcanzar el mismo valor de actividad que el obtenido en presencia de A23187 ($4 \pm 0,5 \text{ UI}$). Estos resultados sugieren que HHIF a bajas concentraciones estimula la actividad ATPasa disipando el gradiente de Ca^{2+} .

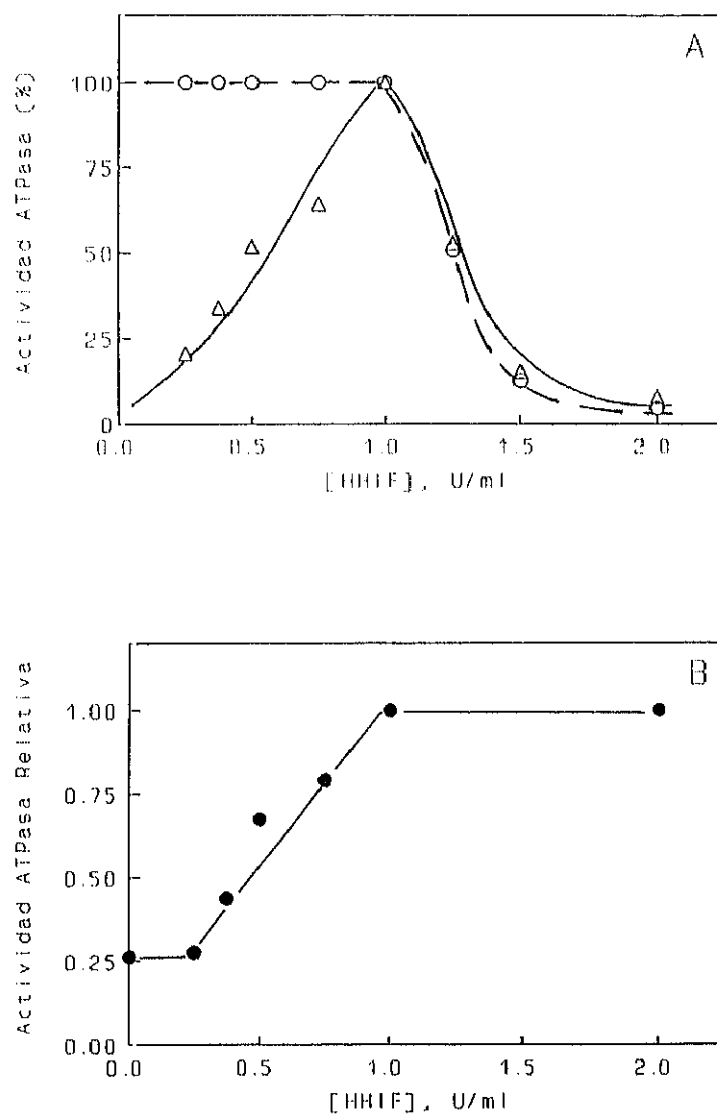


Figura 37. Panel A. Dependencia de la actividad ($\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+}$) con la concentración de HHIF en el medio de ensayo: vesículas de RS acopladas (Δ) y vesículas desacopladas con A23187 (0,04 mg/mg proteína) (\circ). La preincubación se realiza en presencia o ausencia de HHIF durante 5 min a 25°C en un medio que contiene Tes/Tris 100 mM (pH 7,4), RS 80 $\mu\text{g}/\text{ml}$. La actividad se midió a 25°C utilizando el sistema de enzimas acopladas que se indica en Materiales y Métodos. La referencia (100%) es la actividad ATPasa en ausencia de HHIF y corresponde al valor máximo calculado en presencia de A23187 ($4 \pm 0,5$ U.I.). **Panel B.** Relación entre la actividad ATPasa del RS acoplado y RS desacoplado a diferentes concentraciones de HHIF.

8.2. Efecto de HHIF sobre la fluidez de la membrana del retículo sarcoplásmico.

Puesto que uno de los posibles mecanismos de acción de HHIF, tal y como se ha mencionado anteriormente en los estudios realizados utilizando sinaptosomas, sería alterar la fluidez de la bicapa lipídica, se ha estudiado el efecto del inhibidor sobre este parámetro en membranas de RS utilizando medidas de polarización de fluorescencia del DPH (véase Materiales y Métodos).

Los resultados obtenidos para una concentración de RS de 25 $\mu\text{g/ml}$ a 25°C y distintas concentraciones de HHIF se presentan en la Tabla 8. Estos datos muestran que tanto las concentraciones de HHIF que inhiben la actividad $(\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+})\text{ATPasa}$ como las que disipan el gradiente de Ca^{2+} (“ionofóricas”), no producen cambios significativos del parámetro de orden ni de la microviscosidad de la membrana del RS que justifiquen esos efectos.

Debido al efecto de la concentración del RS y del tiempo de incubación sobre la inhibición de la actividad ATPasa debida a HHIF, se han realizado medidas de polarización de fluorescencia a una concentración de RS de 100 $\mu\text{g/ml}$ y diferentes tiempos de incubación, no observándose ningún efecto hasta una concentración de 10 U/ml.

Por otro lado, se ha estudiado el posible efecto detergente de HHIF sobre las membranas de RS midiendo la intensidad de luz dispersa (I_{90}) a 400 nm de vesículas de RS (20-25 $\mu\text{g/ml}$) en presencia de diferentes concentraciones de inhibidor hasta 10 U/ml a 25°C, con agitación continua y en un medio que contiene Tes/KOH 50 mM (pH 7,4), KCl 100 mM y sacarosa 250 mM. No se ha encontrado efecto significativo de HHIF sobre la dispersión de luz (menos del 10% de cambio en este parámetro), por lo que podemos excluir que ésta sea la causa de la inhibición de la actividad $(\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+})\text{ATPasa}$ y del efecto “ionofórico”.

Paralelamente se ha realizado un control en las mismas condiciones experimentales pero en ausencia de RS de diferentes concentraciones de HHIF hasta 10 U/ml, no observándose ningún efecto sobre la dispersión de luz que pudiera enmascarar el resultado anterior.

Tabla 8. Efecto del HHIF sobre la fluidez de membrana del retículo sarcoplásmico. La polarización de fluorescencia del DPH (difetil-hexatrieno) ha sido medida a 25°C en un medio que contenía Tes/KOH 50 mM (pH 7,4), sacarosa 250 mM y KCl 0,1 M. La concentración de proteína fue 25 µg/ml.

	P	R _s	S	η ₀
CONTROL	0,191 ± 0,005	0,136 ± 0,004	0,451 ± 0,012	0,746 ± 0,014
HHIF (U/ml)				
2	0,187 ± 0,005	0,133 ± 0,003	0,440 ± 0,012	0,734 ± 0,014
4	0,184 ± 0,006	0,130 ± 0,005	0,431 ± 0,017	0,723 ± 0,02
8	0,182 ± 0,006	0,129 ± 0,004	0,426 ± 0,015	0,717 ± 0,018
10	0,184 ± 0,005	0,130 ± 0,004	0,431 ± 0,013	0,723 ± 0,015

P: Polarización de fluorescencia.

R_s: Anisotropía de fluorescencia.

S: Parámetro de orden.

η₀: Microviscosidad corregida.

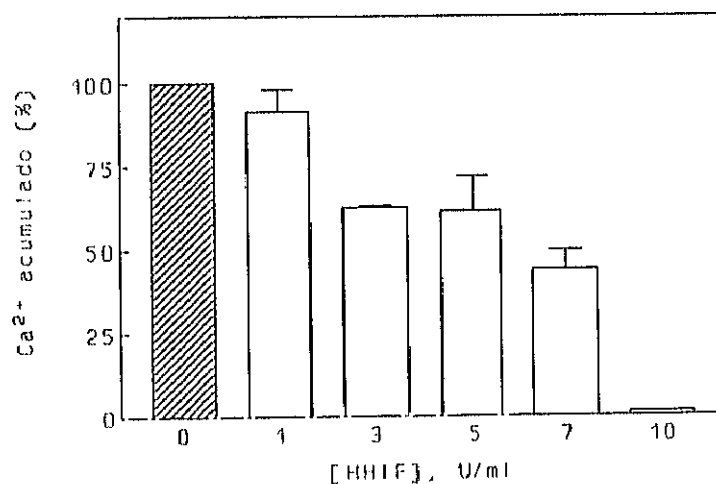
8.3. Efecto de HHIF sobre la acumulación de Ca^{2+} en estado estacionario y sobre la velocidad inicial de acumulación de Ca^{2+} por el retículo sarcoplásmico.

8.3.1. Acumulación activa de Ca^{2+} en estado estacionario.

La actividad de la ATPasa dependiente de Ca^{2+} del retículo sarcoplásmico está acoplada al transporte de calcio, con una estequiometría de dos iones transportados por molécula de ATP hidrolizada (Ebashi y Lipman, 1962; Hasselbach, 1964).

Se ha utilizado para hacer estas medidas el indicador metalocrómico arsenazo III. Como se indica en Materiales y Métodos, tras calibrar la señal con adiciones de Ca^{2+} , se induce su acumulación activa por adición de ATP. Una vez estabilizada se añade A23187 para cuantificar el calcio acumulado. El proceso de acumulación alcanza el equilibrio aproximadamente en el primer minuto y es preciso añadir el ionóforo inmediatamente después de la estabilización de la señal para evitar la liberación espontánea del Ca^{2+} acumulado (Gould y cols., 1987). Se ha descrito que esta liberación tiene una fase inicial lenta en presencia de ATP, y una segunda fase rápida cuando la concentración de ATP disminuye hasta niveles cercanos al valor de K_d para ATP (McWhirter y cols., 1987). El nivel de acumulación del Ca^{2+} obtenido en nuestras condiciones experimentales en ausencia de inhibidor es de $90,5 \pm 6,6$ nmoles Ca^{2+} /mg de proteína, valor que está dentro del intervalo publicado por otros autores (Meissner, 1975; Gould y cols., 1987; McWhirter y cols., 1987).

Figura 39. Efecto de HHIF sobre los niveles de Ca^{2+} acumulado por RS en estado estacionario a 25°C. El medio contenía Tes/KOH 50 mM (pH 7,4), sacarosa 0,25 M, arsenazo III 30 μM , KCl 100 mM, MgCl_2 5 mM, ATP 2,5 mM, CaCl_2 40 μM y 0,2 mg de proteína/ml. Los niveles de Ca^{2+} acumulado se determinan tras la adición de A23187 al 4% (p/p) como se indica en Materiales y Métodos.



En la Figura 39 se muestra el efecto de HHIF sobre los niveles del Ca^{2+} acumulado en estado estacionario tras incubación de 2 mg/ml de vesículas de RS y diferentes concentraciones de inhibidor a pH 7,4 durante 15 min a 25°C. Puede observarse que los niveles de Ca^{2+} acumulado por el RS

disminuyen en presencia de concentraciones crecientes de HHIF hasta un valor de 10 U/ml al cual la acumulación está completamente inhibida con respecto al control (véase la Figura 39).

8.3.2. Velocidad inicial del transporte de Ca^{2+} .

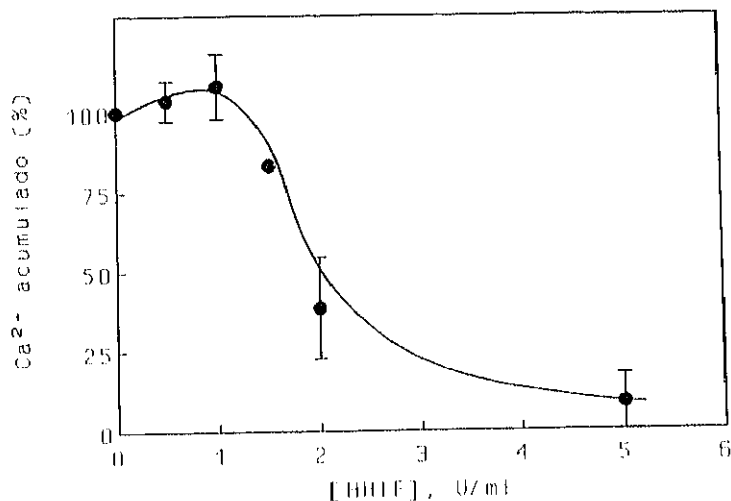


Figura 40. Efecto de HHIF sobre la velocidad inicial del transporte de Ca^{2+} por vesículas de RS. El medio contenía Tes/KOH 0,1 M (pH 7,4), KCl 0,1 M, MgCl_2 5 mM, CaCl_2 0,1 mM, arsenazo III 5 μM , oxalato 5 mM y 25 μg de RS/ml. La reacción se inicia con ATP 2,5 mM (25°C). Las demás condiciones experimentales están indicadas en el apartado de Materiales y Métodos.

Debido a la rapidez del proceso, las medidas de transporte de calcio se realizan en presencia de un anión precipitante, oxalato, que se une al calcio interno formando una sal insoluble. En ausencia de oxalato el transporte cesa cuando la concentración de calcio en el interior de las vesículas es de 1 mM (Berman, 1982) concentración a la cual los sitios de unión de Ca^{2+} de baja afinidad en la ATPasa están saturados. En presencia de oxalato, la concentración de calcio interno no excede de 10-20 μM (Hasselbach y Makinose, 1963), pudiendo prolongarse la acumulación del Ca^{2+} durante 10-15 min. Sin embargo, debido probablemente a una limitación del lumen vesicular para acumular cantidades altas de oxalato cálcico el transporte de Ca^{2+} cesa a los 5-10 min. La concentración de arsenazo III utilizada es 5 μM , para evitar el posible efecto inhibitor del transporte del calcio a concentraciones más altas (Riollet y Champeil, 1987). La velocidad inicial del transporte del Ca^{2+} en nuestras condiciones experimentales en ausencia de inhibidor es de 1038 ± 100 nmoles Ca^{2+} /min/mg de proteína. Para estudiar el efecto de HHIF sobre la velocidad del transporte del calcio se preincubaban 0,25 mg/ml de RS y diferentes concentraciones de HHIF a pH 7,4 y 25°C durante 15 min. La Figura 40 muestra que la velocidad inicial del transporte de calcio disminuye con concentraciones crecientes de HHIF en el medio de ensayo, obteniéndose un valor de $K_{0,5}$ aparente de 1,75 U/ml. En las mismas condiciones experimentales, una concentración de HHIF de 2 U/ml (que reduce aproximadamente un 80 % la velocidad de transporte) no inhibe la actividad ATPasa y 5

U/ml, que bloquea totalmente el transporte de Ca^{2+} , solamente producen el 50 % de inhibición de la actividad ATPasa. Estos resultados sugieren que el efecto observado a concentraciones bajas de HHIF es probablemente debido a su acción como "ionóforo" y no a la inhibición del transporte activo de Ca^{2+} .

8.4. Efecto del Mg^{2+} -ADP sobre la inhibición de la actividad ATPasa por HHIF

Para profundizar en el mecanismo de inhibición de la actividad ATPasa por HHIF se ha estudiado el efecto del Mg^{2+} -ADP en el medio de preincubación. Para ello el RS 80 $\mu\text{g}/\text{ml}$ se preincuba a 25°C en un medio que contiene Tes/Tris 100 mM (pH 7,4), Mg^{2+} -ADP 2,5 mM en ausencia o presencia de HHIF. Se toman volúmenes de 50 μl a distintos tiempos y se añaden al medio de ensayo de actividad ATPasa (1ml). Las concentraciones finales en el medio de ensayo de RS y HHIF son de 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y 1,25 U/ml, respectivamente.

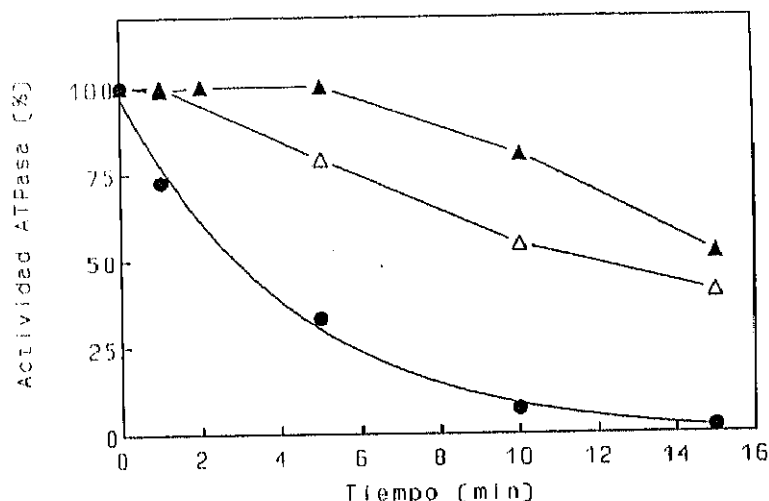


Figura 41. Efecto del Mg^{2+} -ADP sobre la inhibición de la actividad ATPasa por HHIF. La preincubación se realizó a 25°C en un medio que contenía Tes/Tris 100 mM (pH 7,4), 80 μg de RS/ml (●), y Mg^{2+} -ADP 2,5 mM (▲) o Mg^{2+} -ADP 2,5 mM y EGTA 1 mM (△). Las concentraciones finales de RS y HHIF en el medio de ensayo son 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y 1,25 U/ml, respectivamente.

La figura 41 muestra que la presencia de Mg^{2+} -ADP en el medio de preincubación protege contra la inhibición por HHIF, si bien esta protección es solo parcial cuando la inhibición es prácticamente del 100 %. Para evitar el posible efecto del calcio contaminante (10 μM) presente en el medio de ensayo, se añade al medio de preincubación EGTA 1 mM. Los valores de la actividad ATPasa control no varían en función del tiempo. Se obtienen resultados similares de protección por Mg^{2+} -ADP cuando en el medio de preincubación se añade EGTA 1mM.

8.5. Efecto del Ca^{2+} sobre la inhibición de la actividad $(\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+})\text{ATPasa}$ por HHIF.

El ion Ca^{2+} protege contra la inactivación irreversible por desnaturalización a la $(\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+})\text{ATPasa}$ purificada (Møller y cols., 1989; Andersen, 1980). Por tanto, hemos estudiado el efecto del ión calcio sobre la inhibición por HHIF de la actividad ATPasa en función del tiempo. Se preincubaban las membranas de RS a 25°C en un medio que contiene Tes/Tris 100 mM (pH 7,4), y Ca^{2+} 0,2 mM o EGTA 1 mM con el fin de eliminar el calcio contaminante (aprox. $10 \mu\text{M}$). La concentración de Ca^{2+} libre es $\leq 6,4 \text{ nM}$, calculado según se indica en Materiales y Métodos. Se toman volúmenes de $50 \mu\text{l}$ a distintos tiempos y se añaden al medio de ensayo de actividad ATPasa (1ml). Las concentraciones finales de RS y HHIF son de $4 \mu\text{g/ml}$ y $1,25 \text{ U/ml}$, respectivamente. La figura 42 muestra el efecto del calcio sobre la inhibición por HHIF de la actividad $(\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+})\text{ATPasa}$. Puede observarse a partir de estos datos que la presencia de calcio en el medio protege fuertemente de la inhibición por HHIF mientras que la eliminación del calcio del medio por EGTA aumenta la velocidad de inactivación de la ATPasa, obteniéndose una constante de inactivación de $1,43 \pm 0,1 \text{ min}^{-1}$.

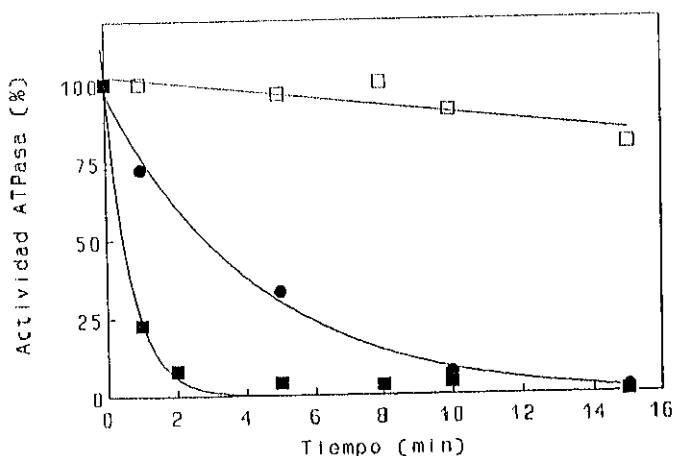


Figura 42. Efecto del Ca^{2+} sobre la inhibición de la actividad $(\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+})\text{ATPasa}$ por HHIF. La preincubación se realizó a 25°C en un medio que contenía Tes/Tris 100 mM (pH 7,4), $80 \mu\text{g}$ de RS/ml (●), y Ca^{2+} 0,2 mM (□) o EGTA 1 mM (■). Las concentraciones finales de RS y HHIF en el medio de ensayo son $4 \mu\text{g/ml}$ y $1,25 \text{ U/ml}$, respectivamente.

8.6. Efecto de HHIF sobre la inactivación de la $(\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+})\text{ATPasa}$ por isotiocianato de fluoresceína.

Los resultados obtenidos en los estudios cinéticos expuestos anteriormente sugieren la posibilidad de que HHIF interaccione con el centro de unión del ATP o bien, con un dominio estructural muy próximo a éste. Hemos cuestionado esta posible interacción estudiando la cinética de inactivación de la $(\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+})\text{ATPasa}$, en ausencia y presencia de inhibidor, por isotiocianato de fluoresceína (FITC), que se une de forma irreversible en el centro de unión del ATP a la Lys-515 (Pick y Bassilian, 1981; Andersen y col., 1982). Para ello se preincubaban a 25°C FITC $48 \mu\text{M}$ y RS $0,16 \text{ mg/ml}$ (relación mol:mol 35:1) en un medio que contiene Tes/KOH 50 mM (pH 7,4), KCl

0,1 M y sacarosa 250 mM. A distintos tiempos se toman volúmenes de 50 μ l de la mezcla de incubación y se añade al medio de ensayo de actividad ATPasa (1 ml). Las concentraciones finales, en el medio de ensayo, de RS y FITC son 8 μ g/ml y 2,4 μ M, respectivamente. En estas condiciones experimentales se obtiene un $t_{1/2}$ de inactivación por FITC de 3 - 4 min. Paralelamente se preincuban RS 0,16 mg/ml y HHIF 35 U/ml. Se toman volúmenes de 50 μ l a distintos tiempos y se añade a la mezcla de reacción de actividad ATPasa. Las concentraciones finales son 8 μ g/ml y 1,75 U/ml para RS y HHIF, respectivamente. El $t_{1/2}$ de inactivación obtenido en presencia de HHIF es de 18 min. Estos $t_{1/2}$ resultan óptimos para determinar si existe o no un efecto de protección de HHIF sobre la inactivación por FITC. Finalmente se preincuban a 25°C RS 0,16 mg/ml y HHIF 35 U/ml durante 10 min para favorecer la unión de HHIF a la proteína y se añade a continuación FITC 48 μ M. A distintos tiempos se toman 50 μ l y se mide la actividad ATPasa en las condiciones descritas previamente. El $t_{1/2}$ de inactivación obtenido es de 3 - 3,4 min. Por consiguiente, la velocidad de inactivación de la actividad $(Ca^{2+} + Mg^{2+})$ ATPasa por FITC no se ve afectada por la presencia de HHIF en el medio de preincubación. Estos resultados indican que en estas condiciones experimentales HHIF no compete con FITC por el centro catalítico de la ATPasa.

8.7. Extinción de la fluorescencia intrínseca del retículo sarcoplásmico por HHIF.

Cerca del 95 % de los Trp y Tyr totales de las membranas de RS pertenecen a la $(Ca^{2+} + Mg^{2+})$ ATPasa (Møller y cols., 1982). Por tanto, se puede estudiar la posible interacción de HHIF con la ATPasa midiendo su efecto sobre la fluorescencia intrínseca del retículo sarcoplásmico. Para ello hemos incubado diferentes concentraciones de HHIF hasta 12 U/ml y RS 20 μ g/ml en un medio que contiene Tes 50 mM (pH 7,4), KCl 100 mM y sacarosa 250 mM a 25°C. Debido al solapamiento entre el espectro de emisión de HHIF y el de las membranas del RS desplazamos la λ de excitación a 290 nm y fijamos la λ de emisión a 360 nm, con el fin de que la contribución de HHIF sea mínima.

La Figura 43 muestra que HHIF produce extinción de la fluorescencia intrínseca de estas membranas. Los datos presentados en la Figura 43 han sido corregidos por el efecto de filtro interno, debido a una absorbancia de la suspensión de RS de 0,2. Las correcciones por atenuación o filtro interno se han realizado utilizando la aproximación empírica descrita por Birdsall y cols. (1983):

$$F_{exp} = F_{corr} \times C$$

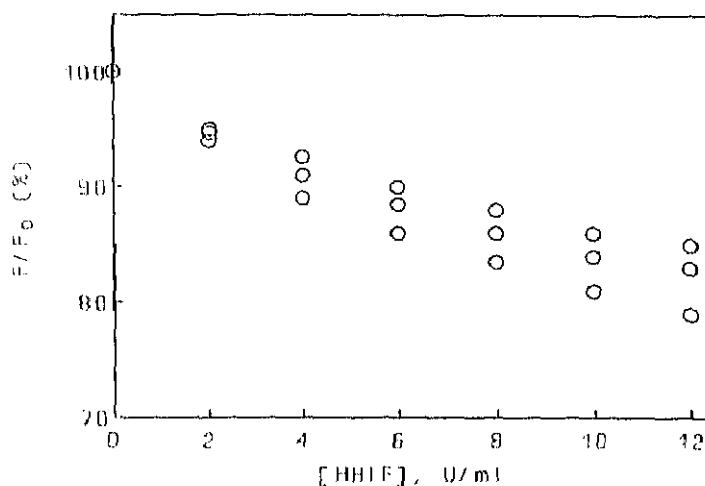
donde F_{exp} y F_{corr} son la fluorescencia experimental y corregida, respectivamente y C es el factor de

corrección que viene definido por la expresión:

$$C = \frac{1 - 10^{-A}}{2,303 A}$$

A = Absorbancia experimental.

Figura 43. Extinción de la fluorescencia intrínseca del retículo sarcoplásmico (λ_{exc} 290 nm) por HHIF. El medio de incubación contenía Tes 50 mM (pH 7,4), KCl 100 mM, sacarosa 250 mM y 20 μ g de RS/ml. Otras condiciones experimentales están indicadas en el texto.



La extinción de la fluorescencia podría ser debido a un proceso colisional, típico de aminas y óxidos (Lakowicz, 1983) o a un proceso de transferencia de energía debido al solapamiento entre el espectro de emisión de la fluorescencia intrínseca de las membranas de RS y el de absorción de HHIF.

9. MODULACION POR HHIF DE LA ACTIVIDAD $(Ca^{2+} + Mg^{2+})ATPasa$ PURIFICADA DE RETICULO SARCOPLASMICO.

9.1. Inhibición por HHIF de la actividad $(Ca^{2+} + Mg^{2+})ATPasa$ purificada de RS.

El efecto inhibitor de HHIF sobre la $(Ca^{2+} + Mg^{2+})ATPasa$ purificada es función del tiempo, como se muestra en la Figura 44. Hemos medido la actividad $(Ca^{2+} + Mg^{2+})ATPasa$ en presencia o ausencia de inhibidor tras diferentes tiempos de incubación a 25°C en un medio que contiene Tes/Tris 100 Mm pH 7,4. La concentración final de ATPasa y HHIF en el medio de ensayo es 4 μ g/ml y 1,5 U/ml, respectivamente. Como se puede observar en la Figura 44 la actividad de la ATPasa purificada decae en función del tiempo con una constante de inactivación del proceso de $0,034 \pm 0,004 \text{ min}^{-1}$.

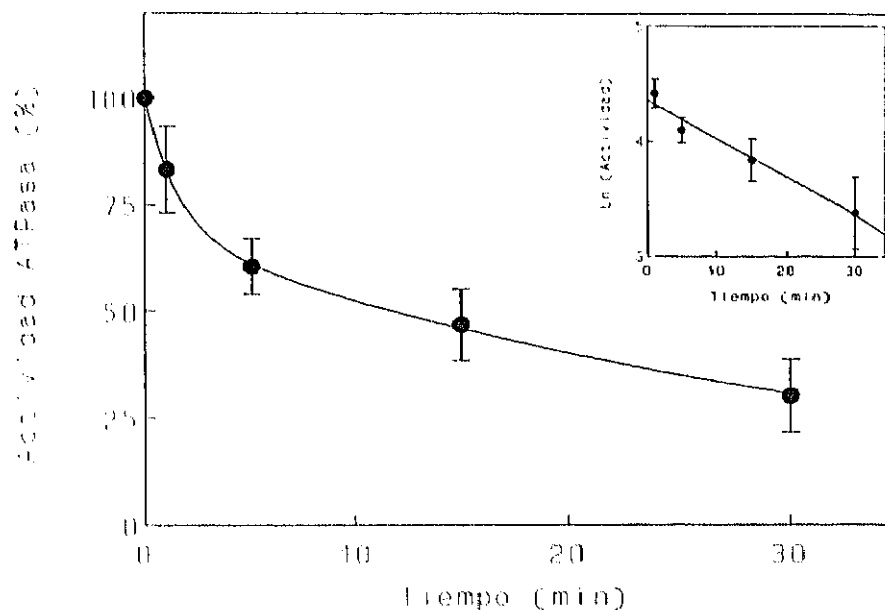


Figura 44. Efecto de HHIF sobre la $(Ca^{2+} + Mg^{2+})ATPasa$ purificada de retículo sarcoplásmico en función del tiempo de preincubación. La preincubación se realizó, a $25^{\circ}C$, en un medio que contenía Tes/Tris 100 Mm (pH 7,4), RS 80 $\mu g/ml$ y HHIF 30 U/ml. La actividad se midió a $25^{\circ}C$ utilizando el sistema de enzimas acopladas que se indica en Materiales y Métodos. Las demás condiciones experimentales están indicadas en la Figura 36. Inserto: Representación semilogarítmica de los datos de inhibición.

Además de la dependencia con el tiempo, el efecto inhibitorio de HHIF sobre la $(Ca^{2+} + Mg^{2+})ATPasa$ es función de la concentración de HHIF en el medio de preincubación (Figura 45). A partir de la representación de Hill de los datos mostrados en la Figura 45 se obtiene un valor de $k_{0,5}$ aparente de 1,6 U/ml y un coeficiente de Hill aparente de 8 ± 1 , lo cual indica que el proceso de inhibición es altamente cooperativo. Los resultados obtenidos son similares a los observados con la actividad $(Ca^{2+} + Mg^{2+})ATPasa$ de RS nativo.

Adicionalmente, la inhibición de la actividad ATPasa es dependiente de la concentración de proteína, siendo necesario concentraciones más altas de HHIF para alcanzar la misma inhibición cuando la concentración de proteína aumenta, sin variación en la cooperatividad del proceso (Figura 46). Los valores de $K_{0,5}$ obtenidos son 1 U/ml, 1,6 U/ml y 2,3 U/ml para una concentración de proteína final en el medio de ensayo de actividad ATPasa de 2, 4 y 6 $\mu g/ml$, respectivamente.

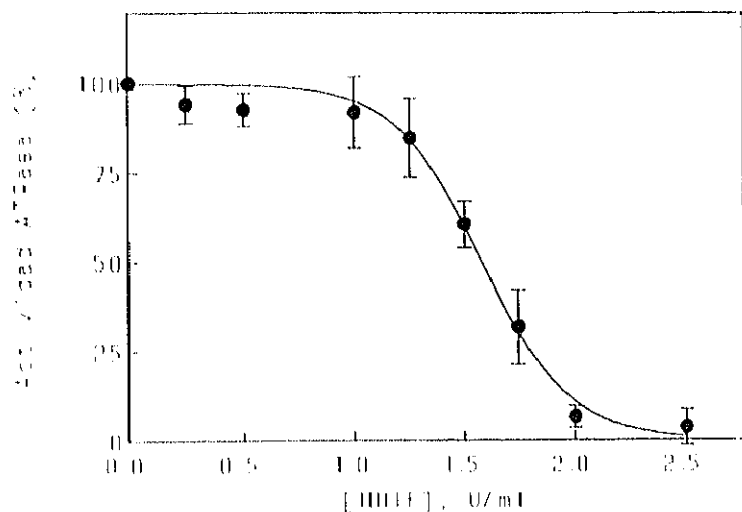


Figura 45. Dependencia de la actividad ATPasa purificada de RS con la concentración de HHIF. El tiempo de incubación fue 5 min. La concentración de enzima en el medio de reacción fue de 4 $\mu\text{g/ml}$. La referencia (100%) es la actividad ATPasa en ausencia de HHIF y corresponde a un valor de 7 ± 1 U.I. Las demás condiciones experimentales están indicadas en la leyenda de la Figura 44.

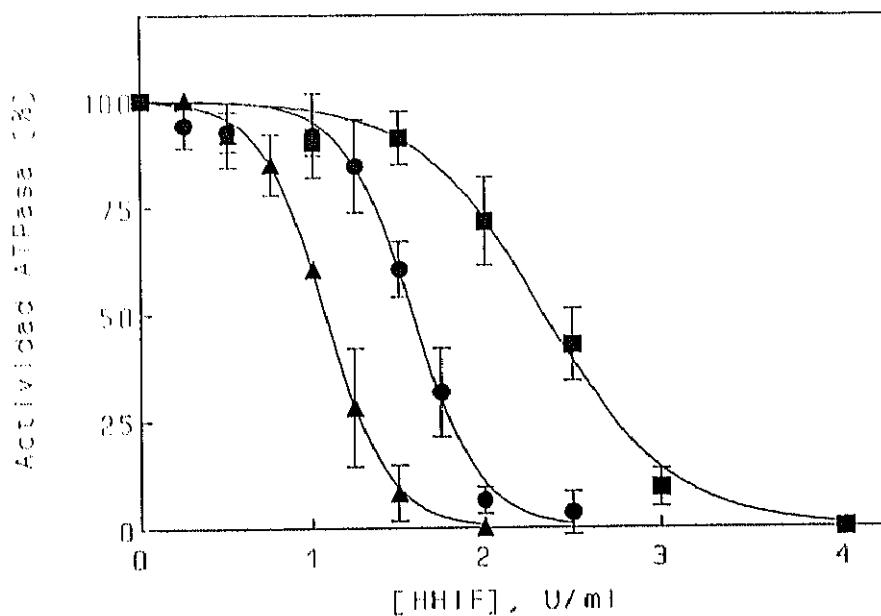


Figura 46. Dependencia del efecto inhibitor de HHIF sobre la actividad ATPasa purificada con la concentración de proteína. Las concentraciones de proteína en el medio de ensayo son 2 (\blacktriangle), 4 (\bullet) y 6 (\blacksquare) $\mu\text{g/ml}$.

9. 2. Efecto del Ca^{2+} y del Mg^{2+} -ADP sobre la inhibición de la actividad ATPasa purificada por HHIF.

La enzima puede encontrarse en dos estados conformacionales mayoritarios Ca_2E_1 y E_2 . La forma E_1 de la enzima tiene los centros de alta afinidad para Ca^{2+} orientados hacia el citoplasma. Tras la unión del calcio, la forma Ca_2E_1 se fosforila por ATP formándose $\text{Ca}_2\text{E}_1 \sim \text{P}$ (Makinose, 1973). Para evaluar, el efecto del calcio y del Mg^{2+} -ADP sobre la inhibición por HHIF hemos estudiado la

inhibición de la actividad ATPasa en función del tiempo en presencia o ausencia del Ca^{2+} y Mg^{2+} -ADP. Para ello se preincubó la enzima a 25°C en un medio que contiene Tes/Tris 100 mM (pH 7,4), Ca^{2+} 0,2 mM o EGTA 1 mM, en ausencia o presencia de HHIF. La Figura 47 (Panel A) muestra que una concentración de calcio 0,2 mM protege fuertemente contra la inhibición por HHIF, mientras que la eliminación del calcio contaminante del medio al añadir EGTA ($[\text{Ca}^{2+}]_f \leq 6,4 \text{ nM}$) acelera considerablemente la inactivación de la $(\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+})\text{ATPasa}$ producida por HHIF, obteniéndose una constante de inactivación del proceso de $0,52 \pm 0,04 \text{ min}^{-1}$.

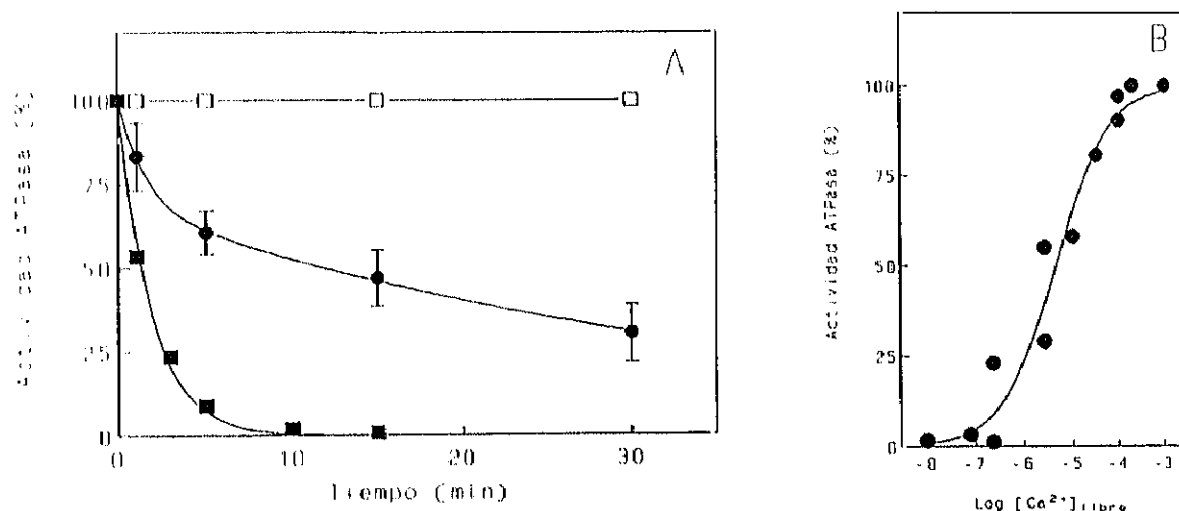
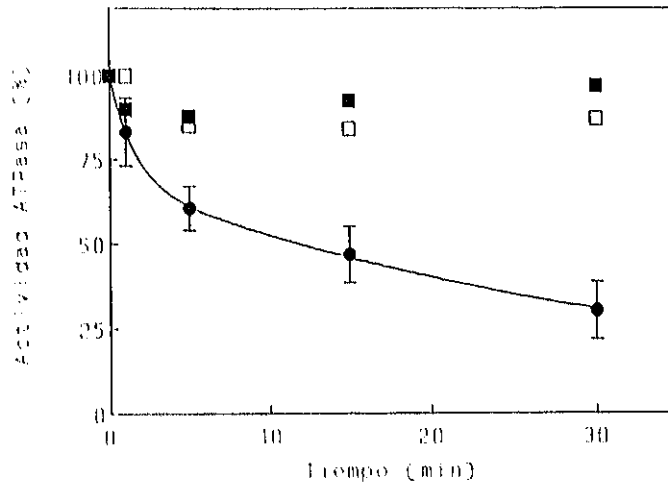


Figura 47. Efecto del Ca^{2+} sobre la inhibición de la actividad $(\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+})\text{ATPasa}$ purificada por HHIF. **Panel A.** La preincubación se realizó en un medio que contenía Tes/Tris 100 mM (pH 7,4), $80 \mu\text{g}$ de RS/ml (●), y Ca^{2+} 0,2 mM (□) o EGTA 1 mM (■). **Panel B.** Dependencia de la actividad ATPasa con la concentración de Ca^{2+} libre en el medio de preincubación, ajustando estas concentraciones utilizando EGTA. La referencia (100%) es la actividad ATPasa en ausencia de HHIF y corresponde a un valor de $8 \pm 1 \text{ U.I.}$ Las concentraciones finales de RS y HHIF en el medio de ensayo son $4 \mu\text{g/ml}$ y $1,5 \text{ U/ml}$, respectivamente.

En condiciones experimentales similares, hemos estudiado el efecto de diferentes concentraciones de Ca^{2+} libre en el medio de preincubación, ajustando estas concentraciones utilizando EGTA como se indica en Materiales y Métodos, sobre la inhibición de la actividad ATPasa por HHIF a 25°C y 5 min de incubación (Figura 47 (Panel B)). A partir de estos datos se obtiene un valor de $K_{0,5}$ aparente de protección por calcio de $4\text{-}5 \mu\text{M}$.

Cuando se lleva a cabo el mismo experimento pero sustituyendo en el medio de preincubación el Ca^{2+} por Mg^{2+} -ADP 2,5 mM se observan resultados similares. Como puede verse en la Figura 48, Mg^{2+} -ADP protege a la $(\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+})\text{ATPasa}$ de la inhibición por HHIF.

Figura 48. Efecto del Mg^{2+} -ADP sobre la inhibición de la actividad ATPasa por HHIF en ausencia (●) o presencia de Mg^{2+} -ADP 2,5 mM (■) o Mg^{2+} -ADP 2,5 mM/EGTA 1mM (□). Las concentraciones finales de RS y HHIF en el medio de ensayo son 4 μ g/ml y 1,5 U/ml, respectivamente. Las condiciones experimentales son las indicadas en la leyenda de la Figura 47.



Nos planteamos la posibilidad de que el calcio contaminante presente en el medio (10 μ M) fuese el responsable de este efecto protector para lo cual añadimos al medio de preincubación Mg^{2+} -ADP 2,5 mM y EGTA 1 mM. Como muestra la Figura 48 el efecto obtenido es el mismo que en ausencia de EGTA. Los resultados son similares a los obtenidos con la actividad ATPasa de membranas nativas de retículo sarcoplásmico.

10. EFECTO DE HHIF SOBRE LA ACTIVIDAD $(Ca^{2+} + Mg^{2+})$ ATPasa RECONSTITUIDA EN VESICULAS DE FOSFATIDILCOLINA.

La dependencia de la inhibición producida por HHIF con la concentración de proteína, así como la posible naturaleza lipofílica del inhibidor y los estudios realizados previamente en membrana plasmática de sinaptosomas donde se muestra la alta adsorción de este compuesto a la bicapa lipídica, sugieren que la inhibición de la actividad $(Ca^{2+} + Mg^{2+})$ ATPasa pueda ser por interacción con el lípido anular el cual está implicado en la estabilidad de la enzima.

Considerando estos hechos decidimos estudiar el efecto de HHIF sobre la $(Ca^{2+} + Mg^{2+})$ ATPasa reconstituida en vesículas de fosfatidilcolina (300:1, lípido:proteína), según el protocolo descrito en Materiales y Métodos.

La relación lípido/proteína en la membrana del RS es 90/1. De estas 90 moléculas de lípido, aproximadamente 30 interaccionan con la ATPasa dependiente de Ca^{2+} (Warren y cols., 1974). En la $(Ca^{2+} + Mg^{2+})$ ATPasa purificada esta relación es aproximadamente 60/1 (MacLennan, 1970).

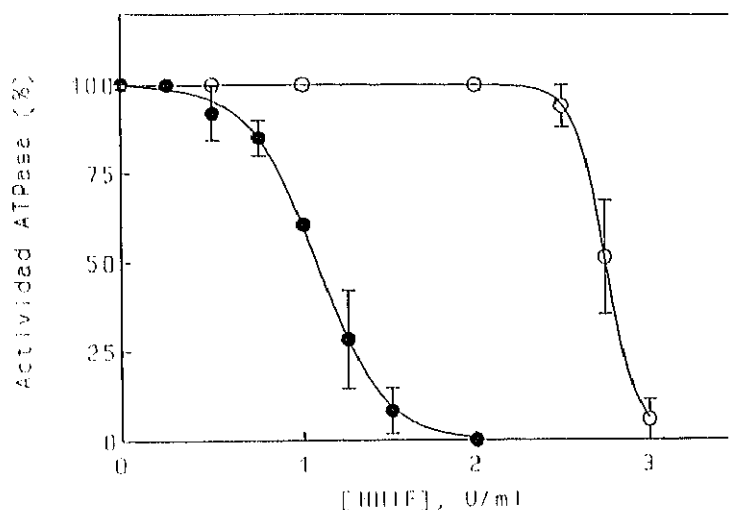


Figura 49. Dependencia de la actividad $(Ca^{2+}+Mg^{2+})ATPasa$ con la concentración de HHIF: $(Ca^{2+}+Mg^{2+})ATPasa$ purificada de retículo sarcoplásmico (●) y reconstituida en vesículas de fosfatidilcolina (○). Las condiciones experimentales están indicadas en Materiales y Métodos. La concentración final de proteína en el medio de ensayo es $2 \mu g/ml$.

La Figura 49 muestra que HHIF inhibe la actividad de la ATPasa reconstituida pero son necesarias concentraciones más altas para producir la inhibición. El valor de $K_{0,5}$ aparente obtenido a partir de estos datos es $2,75 U/ml$, mientras que el valor de $K_{0,5}$ de inhibición de la ATPasa purificada es de $1 U/ml$, para una concentración de proteína, en ambos casos, de $2 \mu g/ml$.

Estos resultados sugieren que cuando la concentración de lípido es muy alta parte del inhibidor se adsorbe a la bicapa lipídica, lo cual produce el desplazamiento de la $K_{0,5}$ aparente de inhibición hacia valores más elevados.

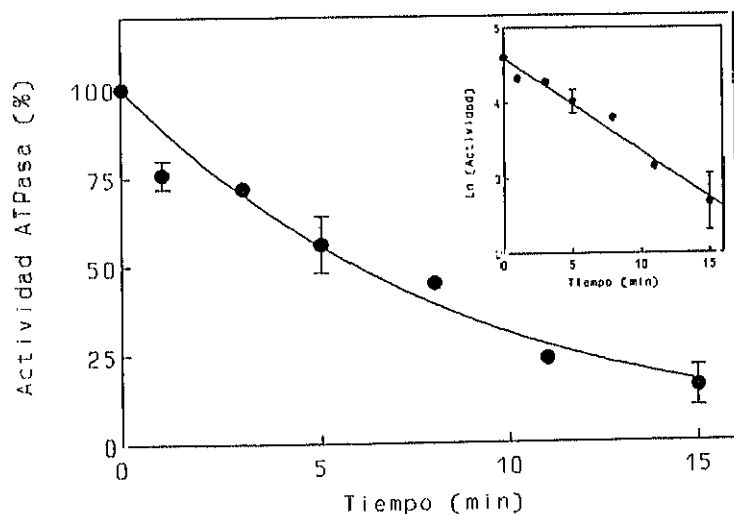


Figura 50. Efecto de HHIF sobre la $(Ca^{2+}+Mg^{2+})ATPasa$ reconstituida en función del tiempo de preincubación. Las condiciones experimentales son las descritas en la leyenda de la Figura 36. Las concentraciones finales de ATPasa y HHIF en el medio de reacción son $2 \mu g/ml$ y $2,75 U/ml$, respectivamente. La referencia (100 %) es la actividad ATPasa en ausencia de HHIF y corresponde a un valor de $3,3 \pm 0,7 U.I.$ Inserto: Representación semilogarítmica de los datos de inhibición.

Resultados similares a los descritos para $(Ca^{2+}+Mg^{2+})ATPasa$ de RS y purificada se obtienen cuando se estudia la inactivación de la bomba de Ca^{2+} en función del tiempo (Figura 50). La constante de inactivación del proceso es de $0,11 \pm 0,01 \text{ min}^{-1}$.

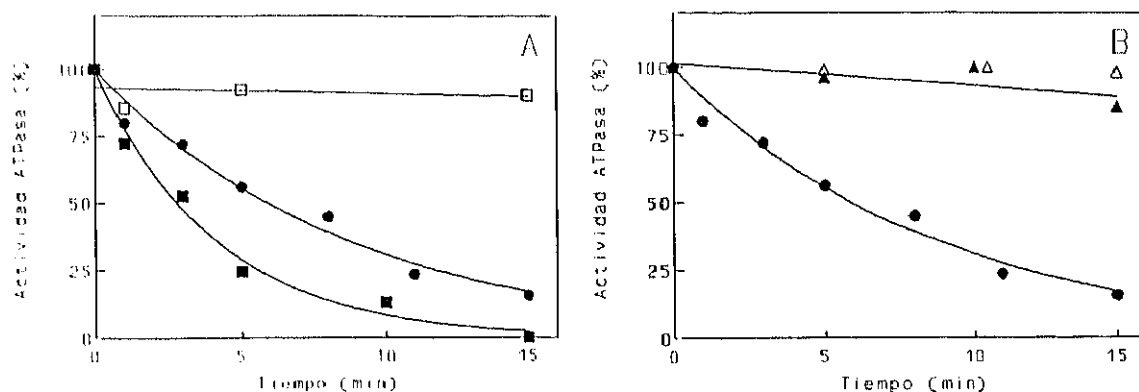


Figura 51. Efecto del Ca^{2+} y del Mg^{2+} -ADP sobre la inhibición de la actividad $(\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+})\text{ATPasa}$ reconstituida por HHIF. **Panel A.** En ausencia (●) o presencia de EGTA 1 mM (■) o Ca^{2+} 0,2 mM (□). **Panel B:** En ausencia (●) o presencia (▲) de Mg^{2+} -ADP 2,5 mM o (△) Mg^{2+} -ADP 2,5 mM/EGTA 1 mM. Otras condiciones experimentales en la leyenda de la Figura.

El efecto del Ca^{2+} y Mg^{2+} -ADP sobre la inhibición de la actividad ATPasa en presencia de HHIF (Figura 51 (Panel A y B)) es similar al obtenido en vesículas de RS y $(\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+})\text{ATPasa}$ purificada. En presencia de EGTA 1mM en el medio de preincubación la constante de inactivación es $0,25 \pm 0,02 \text{ min}^{-1}$.

11. EFECTO DE HHIF SOBRE LA CONCENTRACION DE Ca^{2+} INTRACELULAR EN CELULAS MESANGIALES.

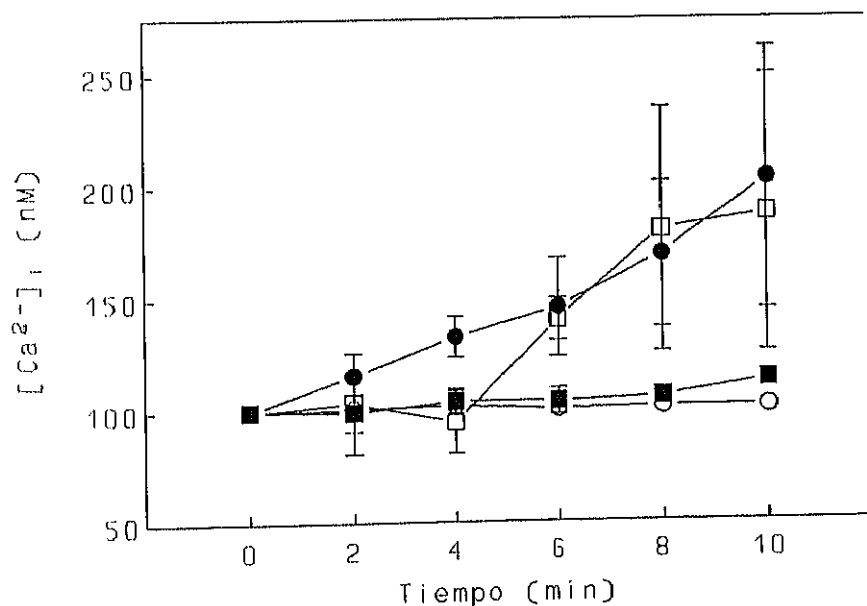


Figura 52. Efecto de HHIF sobre la concentración del calcio libre citosólico ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) medido por fluorescencia en cultivo de células mesangiales de rata pretratadas con fura-2. Las concentraciones de HHIF en el medio de ensayo son 0 (○), 0,002 (■), 0,02 (□) y 0,2 (●) U/ml. Las condiciones experimentales están indicadas en Materiales y Métodos.

HHIF induce un lento y progresivo incremento en la $[Ca^{2+}]_i$, dependiendo de la concentración de inhibidor en el medio como puede observarse en la Figura 52. Este aumento es dependiente del tiempo, con un incremento en la concentración de Ca^{2+} a los 10 min de aproximadamente 2 veces los valores basales (203 ± 58 vs 101 ± 2 nM en condiciones control).

DISCUSSION

1. PURIFICACION DE UN INHIBIDOR ENDOGENO DE LA $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{ATPasa}$.

La existencia de un sitio específico para digitálicos en la estructura enzimática de la $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{ATPasa}$ ha dado lugar a múltiples hipótesis de trabajo tendentes a identificar una molécula endógena que actúe como inhibidor fisiológico de la enzima, de forma análoga a la observada con los glicósidos cardíacos. Los esfuerzos experimentales en esta dirección, se intensificaron cuando se identificaron niveles elevados de factores circulantes que inhibían la bomba de Na^+ en estados de hipertensión experimental (expansión de volumen) o esencial (véase la Introducción).

La síntesis o almacenamiento de la llamada "hormona natriurética" está asociada a diferentes tejidos. En relación con este hecho, el cerebro y más específicamente el hipotálamo y la hipófisis, han sido considerados como posible lugar de síntesis y/o almacenamiento de un inhibidor endógeno de la $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{ATPasa}$. Debido a la posible naturaleza esteroidea de este inhibidor la glándula suprarrenal se ha propuesto también como posible origen (véase la Introducción).

Varios grupos han encontrado actividad inhibidora en extractos de cerebro, plasma, orina y glándula suprarrenal (de Wardener, 1983, Haber y Hauptert, 1987; Wechter y Benaksas, 1990; Hamlyn, 1991a), pero hay discrepancias acerca de su estructura química y posible mecanismo de acción (véase la Introducción).

Los resultados presentados en esta Tesis muestran la purificación de un inhibidor endógeno de la bomba de Na^+ a partir de hipotálamo e hipófisis bovinos (HHIF). Esta sustancia se ha aislado también de la glándula suprarrenal. La ausencia del inhibidor en cortex cerebral y los altos niveles presentes en hipófisis y glándula suprarrenal sugiere que alguno de estos tejidos podría ser el lugar de síntesis y/o almacenamiento del inhibidor.

Nuestros resultados concuerdan en cuanto al origen de un posible factor endógeno con los obtenidos por Tamura y cols. (1988) y Hauptert y cols. (1984, 1987, 1988b), que muestran la existencia de un factor aislado de glándula suprarrenal e hipotálamo, respectivamente, capaz de inhibir la bomba de Na^+ y desplazar ^3H -ouabaína de su sitio de unión a la enzima.

El factor purificado es una sustancia de bajo peso molecular, de naturaleza no peptídica y no lipídica, que eluye como un sólo pico puro de acuerdo al criterio de coincidencia de sus propiedades espectrales. Este compuesto parece ser el mismo de acuerdo con estos criterios en todos los tejidos procesados. La existencia de un inhibidor endógeno de la $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{ATPasa}$ idéntico en todos estos tejidos no había sido mostrada previamente.

Se han descrito numerosas sustancias conocidas capaces de inhibir la bomba de Na^+ tales como fosfolípidos (Kelly y cols., 1986), ácidos grasos (Bidard y cols., 1984; Tamura y cols., 1985),

sales biliares (Vasdev y cols., 1986), DHEA-S (sulfato de DH-epiandrosterona) (Vasdev y cols., 1985), lignanos (Braquet y cols., 1986) y dopamina (Clarkson y cols., 1985), si bien ninguna de ellas a concentraciones fisiológicas *in vivo* tienen ningún efecto apreciable sobre la bomba de Na^+ . La mayoría de estos compuestos inhiben la $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{ATPasa}$ en preparaciones aisladas, pero no inhiben el transporte de Na^+ en células intactas (Seccombe y cols., 1989).

Las características cromatográficas y espectrales de HHIF son diferentes de ouabaína, digoxina y otros compuestos descritos como inhibidores de la bomba de Na^+ y Ca^{2+} (Apéndice II). Además, HHIF a diferencia de la ouabaína, específica para la $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{ATPasa}$, inhibe la $(\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+})\text{ATPasa}$.

El descenso de reactividad cruzada con anticuerpos antidigoxina durante el procedimiento de purificación indica, por un lado, el riesgo de utilizar este parámetro como marcador en la purificación de factores análogos tal y como se ha venido usando por diferentes grupos (véase la Introducción), y apoya la hipótesis de que HHIF no es ni ouabaína, ni digoxina. Este resultado contrasta con los últimos resultados presentados por Hamlyn y cols. (1991b) y Tymiak y cols. (1993) que han identificado como ouabaína o un isómero de ouabaína un factor inhibidor de la bomba de Na^+ aislado de plasma humano y de hipotálamo, respectivamente. Se ha de notar, asimismo, que la ruta biosintética de glicósidos cardíacos no es conocida en mamíferos.

Por otro lado, no está claro si las concentraciones en suero de estos compuestos son suficientes para inducir efectos fisiológicos: por ejemplo, la constante de disociación de ouabaína para su sitio de unión en músculo cardíaco humano es de 2,5 nM. Asumiendo que la concentración de ouabaína endógena es aprox. 50 pM (Harris y cols., 1990) en sujetos normales, solamente un 2% de los sitios de unión estarían ocupados (Schoner, 1991). El aumento en la concentración de unas 3 veces de este factor en pacientes con hipertensión esencial (Schoner y cols., 1986) produciría una inhibición de un 5,6% de las bombas. Estos resultados llevan a cuestionar si sería suficiente esta inhibición de la bomba para producir un aumento en la presión arterial.

HHIF tiene un espectro UV y de fluorescencia característico, con un máximo de absorción a 274 nm (Figura 10) y de emisión y excitación a 305 nm y 280 nm (Figura 11), respectivamente. Estos resultados sugieren la existencia de un anillo aromático, probablemente fenólico, en la estructura de este compuesto. Esta hipótesis se ve apoyada por la pérdida del máximo de absorción a 274 nm de este compuesto en presencia de ácido per fórmico. Hay múltiples evidencias experimentales de la existencia de compuestos fenólicos que son inhibidores de la $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{ATPasa}$ (Seda y cols., 1984) y de la $(\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+})\text{ATPasa}$ de retículo sarcoplásmico (Solokove y cols., 1986; Gutiérrez-Merino y cols., 1989; Michelangeli y cols., 1990b; Martínez-Azorín y cols., 1992).

Múltiples evidencias experimentales apoyan que alteraciones en la homeostasis de Na^+ y Ca^{2+}

son posiblemente la base del aumento de la reactividad vascular responsable de la hipertensión arterial (Poston, 1987; Hauptert, 1988a; Aviv y Lasker, 1990; Marín, 1993). En base a esta hipótesis hemos analizado el mecanismo por el cual HHIF podría aumentar la concentración de Ca^{2+} intracelular, utilizando los sinaptosomas como modelo para estudiar los mecanismos de la membrana plasmática implicados en la regulación del calcio.

2. MODULACION POR HHIF DE LA ACTIVIDAD $(\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+})\text{ATPasa}$ DE LA MEMBRANA PLASMÁTICA SINAPTOSOMAL.

El factor purificado inhibe la bomba de Ca^{2+} y la actividad Mg^{2+} -ATPasa de membrana plasmática de sinaptosomas con aproximadamente el mismo valor de $K_{0,5}$. La potencia de HHIF como inhibidor de la actividad $(\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+})\text{ATPasa}$ total depende de la concentración de membrana en el medio de ensayo. Puesto que HHIF es moderadamente hidrofóbico, este resultado sugiere que o bien es la concentración de HHIF libre en el medio acuoso, o bien la relación entre lípido total y HHIF adsorbido en la bicapa la variable de la que depende directamente la actividad $(\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+})\text{ATPasa}$. La existencia de diferentes moléculas hidrofóbicas que afectan la actividad $(\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+})\text{ATPasa}$ de RS han sido ampliamente estudiadas (Solokove y cols., 1986; Petretski y cols., 1989; Gutiérrez-Merino y cols., 1989; Michelangeli y cols., 1990b; Martínez-Azorín y cols., 1992). Todas estas moléculas tienen en común una alta tendencia a particionar en la membrana, dando lugar a que su efecto sea dependiente de la concentración de membrana. HHIF, debido a su naturaleza lipofílica particiona entre la membrana y el agua, y por lo tanto, las concentraciones de HHIF libre en este estudio deben ser corregidas teniendo en cuenta su adsorción a la membrana plasmática. El coeficiente de partición aparente (K_p) obtenido para HHIF ($0,08 \text{ } (\mu\text{g proteína/ml})^{-1}$) es muy similar al calculado por de Foresta y cols., 1990 para otros compuestos inhibidores de la $(\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+})\text{ATPasa}$, como calcimicina, derivado brominado de calcimicina, nonilfenol, etc; lo cual sugiere una naturaleza hidrofóbica común y una modulación de la actividad enzimática similar para estos compuestos.

Una vez corregido por la unión a la membrana, el valor de $K_{0,5}$ aparente de inhibición por HHIF libre de la bomba de Ca^{2+} es aproximadamente $0,9 \text{ U/ml}$, que es aproximadamente 2 veces más alto que el valor de $K_{0,5}$ de inhibición por HHIF libre de la $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{ATPasa}$ de membrana plasmática sinaptosomal.

3. MODULACION DE LA ACTIVIDAD $(Ca^{2+} + Mg^{2+})ATPasa$ DEL RETICULO SARCOPLASMICO DE MUSCULO ESQUELETICO.

Debido a la baja especificidad de los inhibidores de las ATPasas que transportan iones (Pedersen y Carafoli, 1987) y a la alta homología estructural entre las ATPasas tipo P (Cantley, 1986; Green y cols., 1988; Inesi y Kirtley, 1992) hemos estudiado los efectos de HHIF sobre la actividad $(Ca^{2+} + Mg^{2+})ATPasa$ del retículo sarcoplásmico.

La $(Ca^{2+} + Mg^{2+})ATPasa$ de RS de músculo esquelético, representa cerca del 70-90% del RS de la membrana, y está mejor caracterizada a nivel bioquímico y biofísico que la de membrana plasmática, por lo que hemos estudiado en más detalle la interacción de HHIF con el RS como sistema modelo para tener un mayor conocimiento molecular de la inhibición por HHIF.

HHIF inhibe la actividad $(Ca^{2+} + Mg^{2+})ATPasa$ de RS y la ATPasa purificada. La dependencia de la actividad $(Ca^{2+} + Mg^{2+})ATPasa$ de RS acoplado respecto a HHIF presenta dos fases claramente diferenciadas (Figura 37). A concentraciones bajas de HHIF se observa una primera fase de activación, que se correlaciona con la pérdida de acumulación de Ca^{2+} por las membranas de RS, y una segunda fase de inhibición con fuerte cooperatividad positiva. Dado que en el retículo sarcoplásmico acoplado la actividad $(Ca^{2+} + Mg^{2+})ATPasa$ se halla fuertemente inhibida por la acumulación de Ca^{2+} en el interior de las vesículas (Gould y cols., 1986), la fase de estimulación de la actividad $(Ca^{2+} + Mg^{2+})ATPasa$ podría correlacionarse con una elevación de la permeabilidad pasiva a Ca^{2+} de estas membranas, lo cual estaría de acuerdo con el incremento de la permeabilidad pasiva a Ca^{2+} de sinaptosomas en presencia de HHIF. Medidas del nivel de Ca^{2+} acumulado por estas vesículas utilizando arsenazo III y de la velocidad de transporte para Ca^{2+} utilizando oxalato confirman que este incremento de eflujo de Ca^{2+} se produce también durante el proceso de transporte activo de Ca^{2+} , puesto que HHIF, a concentraciones que no inhiben la actividad $(Ca^{2+} + Mg^{2+})ATPasa$, disminuyen apreciablemente el nivel de Ca^{2+} acumulado en vesículas de RS (Figura 39). La estimulación de la actividad $(Ca^{2+} + Mg^{2+})ATPasa$ a bajas concentraciones de HHIF puede ser explicado como un mecanismo compensatorio derivado de la desrepresión de la actividad $(Ca^{2+} + Mg^{2+})ATPasa$ al disminuir la concentración de Ca^{2+} en el interior de las vesículas. Una argumentación similar ha sido utilizada por Escudero y Gutiérrez-Merino, 1987 para explicar la fase de activación de la Ca^{2+} -ATPasa de RS observada a bajas concentraciones de anestésicos locales. El efecto de la disipación del gradiente de Ca^{2+} a través de estas membranas a bajas concentraciones de HHIF y un efecto inhibitor de la bomba de Ca^{2+} a altas concentraciones es similar al descrito para el ionóforo A23187 (Hara y Kanazawa, 1986).

Los dos efectos señalados son dependientes de la concentración de membrana en el medio de

ensayo y del tiempo de preincubación de la enzima con el factor inhibidor. Debido a que HHIF es un compuesto lipofílico, estos datos confirman la existencia de cambios en la concentración de inhibidor libre por adsorción de este compuesto a las membranas e indican además que la modulación de la actividad $(Ca^{2+} + Mg^{2+})ATPasa$ implica una reorganización estructural lenta de la estructura de la membrana.

La perturbación de la actividad enzimática producida por HHIF (Figura 38) permite calcular un K_p aparente, según el método descrito por de Foresta y cols., 1990, de $0,6 (\mu g/ml)^{-1}$. Este puede ser expresado en unidades de concentración molar de lípido, como $K_p = 10 \times 10^5 (\text{mol lípido/l})^{-1}$, asumiendo que hay 0,5 g de lípido/g de proteína en las membranas de RS, y que el peso molecular calculado para lípidos es de 800. Coeficientes de partición aparente en el rango de 10^5 (expresado como $(\text{moles de lípido/l})^{-1}$) han sido obtenidos para diferentes moléculas hidrofóbicas descritas como inhibidoras de la Ca^{2+} -ATPasa de RS (de Foresta y cols., 1990).

La relación lípido/proteína en el RS es 90/1. De estas 90 moléculas de lípido, aproximadamente 30 interaccionan con la ATPasa dependiente de Ca^{2+} (Warren, 1974). En la Ca^{2+} -ATPasa purificada esta relación es de aproximadamente 60/1 (MacLennan, 1970). Las concentraciones de HHIF necesarias para producir la inhibición de la ATPasa reconstituida, en vesículas de fosfatidilcolina donde la relación lípido/proteína es de 300/1, son más altas con respecto a la Ca^{2+} -ATPasa purificada. Al corregir los respectivos valores de inhibición por el valor de K_p , las concentraciones de HHIF libre necesarias para producir el 50% de inhibición son similares para la $(Ca^{2+} + Mg^{2+})ATPasa$ purificada y para la reconstituida en vesículas de fosfatidilcolina y aproximadamente igual a 0,4 U/ml en las condiciones de ensayo descritas. Dado que el coeficiente de partición es una constante de equilibrio, este resultado implica que la inhibición se produce a niveles similares de saturación de la bicapa lipídica por HHIF.

La presencia de colesterol dentro de la bicapa lipídica disminuye fuertemente el valor de K_p de compuestos moderadamente lipofílicos (Luxnat y cols., 1986), lo cual justificaría la disminución del valor del coeficiente de partición de HHIF en la membrana plasmática sinaptosomal con respecto a la de RS, ya que la proporción de colesterol es muy diferente entre las membrana plasmática y el RS, en este último el colesterol está prácticamente ausente ($< 10\%$) (Michelangeli y cols., 1990a).

Kwan y cols. (1994) han propuesto que la inhibición de la bomba de Ca^{2+} en el RS de células vasculares de musculatura lisa (VSCM) puede ser un factor que contribuya al desarrollo de la hipertensión arterial. Haber y Hauptert (1987) han obtenido un factor hipotalámico inhibidor de la bomba de Na^+ y de la $(Ca^{2+} + Mg^{2+})ATPasa$ de retículo sarcoplásmico. Estos autores señalan que esta inhibición estaría de acuerdo con la homología estructural entre las ATPasas transportadoras de

caciones (Pedersen y Carafoli, 1987; Inesi y Kirtley, 1992) pero podría carecer de importancia fisiológica, ya que el inhibidor debería penetrar a través de la membrana celular para actuar a nivel del RS. Dado que HHIF es lipofílico, para poder confirmar la relevancia fisiológica de la inhibición por HHIF de la $(Ca^{2+} + Mg^{2+})ATPasa$ de RS serían necesarios experimentos en células intactas.

4. MECANISMO DE INHIBICION DE LA ACTIVIDAD $(Ca^{2+} + Mg^{2+})ATPasa$ DE LA MEMBRANA PLASMATICA SINAPTOSOMAL Y DEL RETICULO SARCOPLASMICO POR HHIF.

La fluidez de las membranas biológicas desempeña un importante papel en la modulación de la permeabilidad de iones a través de ellas. El mecanismo de inhibición de la $(Ca^{2+} + Mg^{2+})ATPasa$ y el efecto sobre la permeabilidad a Ca^{2+} debido a HHIF no parece ser consecuencia de una alteración apreciable de las propiedades estructurales de la bicapa lipídica. Esta conclusión se deriva de la mínima perturbación del parámetro de orden de la bicapa lipídica de la membrana de sinaptosomas y del retículo sarcoplásmico determinado a partir de medidas de polarización de fluorescencia de DPH en presencia de HHIF (véase los apartados 6.1 y 8.3 del capítulo de Resultados). Puesto que DPH se localiza en la parte central de la bicapa lipídica (Davenport y cols., 1985), esta sonda fluorescente da información sobre el parámetro de orden en la región hidrocarbonada de los lípidos. Así pues, HHIF no perturba significativamente el grado de empaquetamiento de las cadenas de ácidos grasos en esta región de la bicapa lipídica, a las concentraciones que inhiben fuertemente las actividades $(Ca^{2+}, Mg^{2+})ATPasa$ y los flujos de Ca^{2+} a través de estas membranas. Adicionalmente, los estudios de turbidez (apartados 6.1 y 8.3 de Resultados) indican que a estas concentraciones HHIF no solubiliza significativamente las membranas de RS y de sinaptosomas.

Teniendo en cuenta lo anterior, la inhibición de la actividad $(Ca^{2+} + Mg^{2+})ATPasa$ de estas membranas podría ser racionalizada en términos de interacción de HHIF con sitios de unión específicos de la enzima o vía perturbación del lípido anular. La cuestión es si el sitio de modulación de la $(Ca^{2+} + Mg^{2+})ATPasa$ por HHIF tiene lugar por interacción con un sitio específico en la proteína o en la interfase lípido/proteína.

La inhibición por HHIF de la actividad $(Ca^{2+}, Mg^{2+})ATPasa$ de membrana plasmática de sinaptosomas no muestra características de competición con el sustrato Mg^{2+} -ATP (véase el apartado 6.2 de Resultados). Los resultados obtenidos en el estudio sobre el efecto de HHIF sobre la inactivación de la $(Ca^{2+} + Mg^{2+})ATPasa$ de retículo sarcoplásmico por isotiocianato de fluoresceína (apartado 8.8 de Resultados) señalan que no hay competición entre el ATP y HHIF, por lo tanto

puede ser excluido que la inhibición de HHIF resulte de una interacción directa de HHIF con el centro catalítico de la $(Ca^{2+} + Mg^{2+})ATPasa$ en nuestras condiciones experimentales.

Sin embargo, la presencia de Mg^{2+} -ADP (2,5 mM) en el medio de preincubación protege fuertemente contra el efecto inhibitorio de HHIF sobre la actividad $(Ca^{2+} + Mg^{2+})ATPasa$ de retículo sarcoplásmico y de $ATPasa$ purificada. Resultados similares se observan en sinaptosomas donde al incrementar la concentración de ATP en el medio de ensayo disminuye la sensibilidad de la actividad $(Ca^{2+}, Mg^{2+})ATPasa$ por el inhibidor.

El efecto protector de ATP se produce a concentraciones milimolares de este nucleótido. A estas concentraciones el ATP ejerce un efecto modulador de la actividad $(Ca^{2+} + Mg^{2+})ATPasa$ en RS (de Meis, 1981, Andersen, 1989, Guillain y cols., 1988). Estos efectos han sido observados también en la $(Na^+, K^+)ATPasa$ (Schuurmans y Bonting, 1981) y en la $(Ca^{2+} + Mg^{2+})ATPasa$ de membrana plasmática (Rega y Garrahan, 1986). Se ha sugerido que este efecto modulador de ATP deriva de la aceleración de los cambios de la conformación E_2 a E_1 del ciclo catalítico por unión al centro catalítico fosforilado después de la salida de ADP del mismo (Gould y cols., 1986).

Alternativamente, el efecto de ATP sobre la inhibición de la actividad $(Ca^{2+} + Mg^{2+})ATPasa$ por HHIF podría explicarse suponiendo la interacción de ATP con un centro regulador diferente del catalítico. La posible existencia de un centro regulador diferente del catalítico, de baja afinidad presente en la conformación E_2 , ha sido sugerida para explicar algunos resultados cinéticos, entre ellos la estimulación de la actividad $(Ca^{2+} + Mg^{2+})ATPasa$ en presencia de concentraciones milimolares de ATP (Carvalho-Alves y cols., 1985; Nakamoto e Inesi, 1984). No obstante, hay que indicar que estos resultados han sido explicados más recientemente en base a la entrada de ATP en el centro catalítico tras liberación de ADP (Gould y cols., 1986).

Alternativamente, estos resultados podrían interpretarse suponiendo la unión de HHIF a centros hidrofóbicos en la $(Ca^{2+} + Mg^{2+})ATPasa$ diferentes del lípido anular. Se ha descrito la existencia de sitios de unión diferentes del lípido anular para drogas hidrofóbicas en la $(Ca^{2+} + Mg^{2+})ATPasa$ (Rooney y Lee, 1983; Michelangeli y cols., 1990a).

Existe la posibilidad de que estos centros hidrofóbicos solapen, al menos parcialmente, con el centro de unión de ATP. Hay que indicar que derivados hidrofóbicos de ATP como TNP-ATP se une a la $(Ca^{2+} + Mg^{2+})ATPasa$ con mayor afinidad que ATP (Dupont y cols., 1982). Se ha sugerido que estos sitios estarían localizados en la interfase proteína-proteína dentro del oligómero y en la superficie de la proteína que resulta expuesta a los lípidos debido a la disociación del oligómero en monómeros (Simmonds y cols., 1982). Se ha sugerido que los centros de unión de ATP localizados en monómeros diferentes se hallan muy próximos entre sí, en la zona de la interfase monómero-monómero (Cuenda y cols., 1990).

Se ha mostrado que concentraciones micromolares de Ca^{2+} en el medio desplazan el equilibrio conformacional E_1/E_2 de la ATPasa, estabilizándola en el estado E_1 y que la adición de EGTA a concentraciones milimolares o vanadato desplazan la conformación de la ATPasa hacia E_2 (Pick y Karlsh, 1982; Froud y Lee, 1986). La unión preferencial de ligandos al estado E_2 , desplazan el equilibrio conformacional hacia este estado estabilizándolo, y disminuyendo, asimismo, la velocidad de la catálisis (inhibición alostérica). Esta es la base de la inhibición por Ca^{2+} a concentraciones del rango submilimolar a milimolar (Gould y cols., 1986).

Por esta razón decidimos estudiar el efecto de estos ligandos en la inhibición de la Ca^{2+} -ATPasa de RS por HHIF (apartados 8.6 y 9.2 de Resultados). La inhibición de la bomba de Ca^{2+} por HHIF se potencia por EGTA y se protege por la presencia de calcio en el medio de preincubación.

Estos resultados sugieren que la conformación E_2 de la ATPasa (inducida por EGTA) podría favorecer la inhibición de HHIF. Esta hipótesis es consistente con el efecto de protección observado en la membrana plasmática de sinaptosomas.

No se ha encontrado ningún efecto significativo de HHIF sobre la afinidad de la $(\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+})$ ATPasa de membrana plasmática sinaptosomal para Ca^{2+} . Es improbable, pues, que HHIF compita con los centros de alta afinidad de Ca^{2+} en la $(\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+})$ ATPasa.

Además del efecto activador de concentraciones de Ca^{2+} entre $0,1 \mu\text{M}$ y $1 \mu\text{M}$, el Ca^{2+} a concentraciones del orden de $0,1$ a 1 mM inhibe fuertemente la actividad $(\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+})$ ATPasa de sinaptosomas (Sorensen y Mahler, 1981; Michaelis y cols., 1983). Este efecto del Ca^{2+} ha sido atribuido a la presencia de un centro inhibidor de baja afinidad para Ca^{2+} (Rega y Garrahan, 1986) en la conformación E_2 . La $(\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+})$ ATPasa de membrana plasmática de sinaptosomas es del tipo E_1 - E_2 (Rega y Garrahan, 1986). Los sitios de unión de Ca^{2+} en las formas E_1 y E_2 de la $(\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+})$ ATPasa son accesibles desde diferentes lados de la membrana (de Meis y Vianna, 1979; Gould y cols., 1986). Así, los sitios de unión de Ca^{2+} en la forma E_2 son accesibles desde el espacio extracelular. La existencia de centros de unión de Ca^{2+} de baja afinidad, $K_{0,5}$ aproximadamente de 1 mM , ha sido suficientemente contrastada en la $(\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+})$ ATPasa de RS (de Meis y Vianna, 1979). Se ha mostrado que la saturación de estos centros produce inhibición de esta actividad porque estabilizan la conformación E_2 de la enzima y disminuyen la velocidad de regeneración de la conformación E_1 (de Meis y Vianna, 1979).

Como se indicó en Resultados, esta inhibición por niveles elevados de Ca^{2+} se ve alterada por la presencia de HHIF que aparentemente produce un efecto similar a Ca^{2+} , ya que en presencia del inhibidor se observa una inhibición adicional de la producida por 1 mM de Ca^{2+} claramente inferior a la medida en ausencia de HHIF. La presencia de HHIF en el medio de ensayo modifica ligeramente

la sensibilidad de la $(Ca^{2+}+Mg^{2+})ATPasa$ hacia Ca^{2+} y disminuye la sensibilidad de ésta hacia el inhibidor en presencia de altas concentraciones de Ca^{2+} en el medio de ensayo. Estos resultados sugieren la posibilidad de que HHIF compita por los sitios de unión de baja afinidad para Ca^{2+} en la enzima.

Debido a la naturaleza hidrofóbica de HHIF sugerimos que la presencia de una región hidrofóbica en la proteína, próxima a un centro de interacción con iones divalentes, podría formar el centro de unión de HHIF. Esta hipótesis es fácil de explicar en proteínas intrínsecas de membrana, pues es suficiente que exista un centro de unión de cationes divalentes cerca de la interfase lípido-agua. Esta interacción debería ser favorecida cuando los dominios hidrofóbicos estén más cerca de los centros de unión de los cationes divalentes. Los resultados obtenidos en el estudio sobre el efecto de HHIF sobre la fluorescencia intrínseca de RS (apartado 8.8 de Resultados) apoyan esta hipótesis.

La fluorescencia intrínseca del RS es fundamentalmente atribuible a la fluorescencia de la $(Ca^{2+}+Mg^{2+})ATPasa$ dado que los Trp y Tyr de esta enzima constituyen aproximadamente el 95% del total de estos aminoácidos en la membrana de RS (Møller y cols., 1982). Ha sido demostrado, asimismo, que esta fluorescencia se extingue eficientemente por interacciones de derivados lipídicos brominados (East y Lee, 1982; de Foresta y cols., 1989) o marcados con radicales libres (London y Feigenson, 1981) incorporados en membranas reconstituidas. La primera conclusión derivada de estos datos es que, para que se produzca un nivel apreciable de extinción de la fluorescencia intrínseca, es preciso que el inhibidor se halle muy próximo a la región de interfase lípido-proteína.

La extinción de la fluorescencia intrínseca de RS por HHIF está directamente relacionada con la interacción de HHIF con dominios hidrofóbicos de la $(Ca^{2+}+Mg^{2+})ATPasa$ embebidos en la bicapa lipídica. Dos son los mecanismos básicos por los que se puede extinguir la fluorescencia intrínseca del RS: (1) mediante un mecanismo colisional o estático o (2) por transferencia de energía. Considerando los espectros de emisión de fluorescencia intrínseca de RS y de excitación (absorción) de HHIF la extinción podría ser debida a un proceso de transferencia de energía entre Trp y la unión de HHIF lo suficientemente cerca, para que tenga lugar este proceso.

La fluorescencia de los residuos de Trp de la ATPasa es sensible a la unión de Ca^{2+} (Dupont, 1976). Estos estudios sugieren, que de los 13 Trp contenidos en la estructura primaria de la ATPasa, una parte de los 11 Trp situados en la región intramembranosa (Brandl y cols., 1986) interacciona con los sitios de unión del Ca^{2+} , y que los sitios de transporte estarían situados en la región intramembranosa o al menos cerca de la interfase.

El centro de unión de Ca^{2+} en la Ca^{2+} -ATPasa, ha sido localizado próximo a la interfase lípido-agua, a una distancia de aproximadamente 10 Å (Teruel y Gómez-Fernandez, 1986; Munkonge y cols., 1989).

Los resultados que hemos obtenido sugieren que HHIF podría estar localizado cerca de la interfase lípido/proteína, de manera que la unión del inhibidor podría interferir con los sitios de unión de Ca^{2+} . La protección de la Ca^{2+} -ATPasa contra la desnaturalización parece estar asociada con la unión de Ca^{2+} a los sitios de alta afinidad (Andersen, 1989). La presencia de EGTA en el medio hace que la ATPasa pierda estabilidad, lo cual podría favorecer la acción de HHIF desorganizando el lípido anular de la enzima y como consecuencia inactivando la ATPasa.

Un tipo particular de sitios hidrofóbicos de una gran importancia para las proteínas de membrana es el lípido anular (Caffrey Feigenson, 1981; East y Lee, 1981; Lentz y cols., 1985; Lund y cols., 1989). Los lípidos anulares modulan la actividad de la bomba de Ca^{2+} de la membrana plasmática de sinaptosomas (Niggli y cols., 1981; Hermoni-Levine y Rahamimoff, 1990) y del retículo sarcoplásmico (Caffrey y Feigenson, 1981; East y Lee, 1982; Bick y cols., 1991).

Debido a sus propiedades lipofílicas, HHIF podría perturbar la estructura del lípido anular de la $(\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+})$ ATPasa.

Ha sido demostrado que la desorganización del lípido anular conduce a una inactivación irreversible de la $(\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+})$ ATPasa (Hardwicke y Green, 1974; Warren y cols., 1975; Lund y cols., 1989). La inhibición por HHIF de la $(\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+})$ ATPasa de sinaptosomas y de retículo sarcoplásmico, y la $(\text{Na}^+, \text{K}^+)$ ATPasa de membrana plasmática de sinaptosomas muestra características de inactivación irreversible de la enzima, lo cual permite especular que el lípido anular de la enzima es desorganizado por la unión de HHIF. La inhibición de la $(\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+})$ ATPasa de la membrana plasmática de sinaptosomas por HHIF podría ser debida al desplazamiento de algún lípido anular de estas proteínas, activador de la misma. Más concretamente, se ha demostrado que la fosfatidilserina es un potente activador de la actividad $(\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+})$ ATPasa de sinaptosomas. La activación por fosfatidilserina es de hecho tan fuerte como la producida por calmodulina (Niggli y cols., 1981; Gandhi y Ross, 1986).

La elevada adsorción de HHIF en la membrana de sinaptosomas y del retículo sarcoplásmico, la dependencia de la inhibición por HHIF con la concentración de proteína, así como una mayor sensibilidad de la $(\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+})$ ATPasa purificada a la inhibición por HHIF que la reconstituida en vesículas de fosfatidilcolina apoyan la hipótesis de que la inhibición de la $(\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+})$ ATPasa por HHIF esté directamente relacionada con la desorganización del lípido anular alrededor de la proteína. Esta hipótesis se ve corroborada por la dependencia tan acusada observada en la inhibición de la $(\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+})$ ATPasa con la concentración de inhibidor (mostrando coeficientes de Hill de 13 ± 2). De hecho se ha mostrado que la actividad de proteínas intrínsecas de membrana muestran un comportamiento alostérico con respecto a la saturación de su sitio de unión anular por lípidos

(Sandermann, 1983).

El conjunto de resultados presentados sugieren que la inhibición de la actividad $(Ca^{2+} + Mg^{2+})ATPasa$ de retículo sarcoplásmico y de membrana plasmática sinaptosomal es debida a la desorganización del lípido anular asociado a la proteína. Además, las interacciones lípido-proteína en el dominio de la proteína en contacto con el lípido y cerca de la interfase lípido-agua parecen desempeñar un importante papel en el control del estado conformacional de la $(Ca^{2+} + Mg^{2+})ATPasa$ (Andersen, 1989).

Aunque este punto necesita un mayor número de estudios que estarían fuera de los objetivos de esta Tesis, es importante señalar que la inhibición por anestésicos locales de la $(Ca^{2+} + Mg^{2+})ATPasa$ de RS y sinaptosomas ha sido racionalizado en estos términos (Gutiérrez-Merino y cols., 1989; García-Martín y cols., 1989).

5. EFECTO DE HHIF SOBRE EL TRANSPORTE DE Ca^{2+} EN SINAPTOSOMAS.

La actividad $(Ca^{2+} + Mg^{2+})ATPasa$ de membrana plasmática de la célula nerviosa está acoplada al transporte activo de Ca^{2+} a través de esta membrana (Javors y cols., 1981; Gill y cols., 1981; Carafoli, 1991b). Este transporte activo opera en la dirección de sacar Ca^{2+} desde el citosol hacia el espacio extravascular, siendo éste uno de los mecanismos más importantes para mantener niveles de Ca^{2+} citosólicos submicromolares (Akerman y Nicholls, 1983). Por tanto, una posible implicación fisiológica de la inhibición de la actividad $(Ca^{2+} + Mg^{2+})ATPasa$ de estas membranas es la elevación de los niveles de Ca^{2+} citosólicos en la neurona. Por su importancia este punto ha sido abordado en este estudio.

La actividad $(Ca^{2+} + Mg^{2+})ATPasa$ y el transporte activo de Ca^{2+} son inhibidos por HHIF con similares valores de $K_{0,5}$ después de corregir la adsorción de HHIF a la membrana. Estos valores son aproximadamente de 0,9 U/ml y 0,6 U/ml, respectivamente.

En condiciones fisiológicas, la bomba de Ca^{2+} de la membrana plasmática es el sistema más importante implicado en mantener los bajos niveles de Ca^{2+} neuronal (Akerman y Nicholls, 1983; Blaustein, 1988). En nuestras preparaciones, este sistema tiene una velocidad de transporte de Ca^{2+} de 4-5 nmoles Ca^{2+}/mg proteína/min (teniendo en cuenta que las vesículas presentan un grado de inversión de la membrana de aproximadamente el 40%). Este valor está de acuerdo con los resultados obtenidos por otros investigadores utilizando técnicas similares a la nuestra (Gill y cols., 1981; García-Martín y cols., 1990).

Otros procesos de transporte de Ca^{2+} , como el flujo pasivo de Ca^{2+} y el intercambio

$\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, están implicados en el mantenimiento de los gradientes del Ca^{2+} fisiológicos a través de la membrana plasmática de neuronas (Akerman y Nicholls, 1983; Blaustein, 1988; DiPolo y Beaugé, 1990). Por lo tanto, hemos estudiado y cuantificado el efecto de HHIF sobre todos estos procesos.

Los resultados presentados en las Tablas 5 y 6 (apartado 7.2 de Resultados) muestran, que el influjo pasivo de Ca^{2+} a través de la membrana plasmática de sinaptosomas no se puede describir satisfactoriamente por un proceso exponencial simple, sino como la suma de dos exponenciales (Figura 32). Este comportamiento sugiere la existencia de dos tipos de canales con diferentes características cinéticas. Estos resultados son similares a los descritos en RS (Escudero y Gutiérrez-Merino, 1987), en donde se ha sugerido que cada uno de estos canales se halla preferentemente localizado en cada una de las regiones diferenciadas del RS, cisternas transversales o tubos longitudinales. Los resultados obtenidos en nuestras preparaciones indican que la entrada pasiva de Ca^{2+} a través de la membrana plasmática de sinaptosomas tiene lugar con una constante de velocidad aparente (K) de $0,033 \text{ min}^{-1}$. Un valor similar de K se puede derivar de la salida pasiva de Ca^{2+} de sinaptosomas precargados con $^{45}\text{Ca}^{2+}$, calculado por Gill y cols. (1981) y la entrada pasiva de Ca^{2+} utilizando las medidas de dispersión de luz (Escudero y Gutiérrez-Merino, 1987; García-Martín y cols., 1990). Estos resultados se han obtenido preimponiendo un elevado gradiente de Ca^{2+} , de forma que la concentración de Ca^{2+} fuera sea de 100 mM y la concentración de Ca^{2+} dentro fuera de $10 \mu\text{M}$. Considerando que el volumen interno de estas vesículas es de $3-7 \mu\text{l/mg}$ proteína (Rahamimoff y Spanier, 1984), y para un gradiente fisiológico de Ca^{2+} , es decir, para concentraciones de Ca^{2+} dentro y fuera de las vesículas de $0,1 \mu\text{M}$ y 1 mM de Ca^{2+} libre, respectivamente, la cantidad de Ca^{2+} transportado durante el primer minuto es de $0,1-0,2 \text{ nmoles/mg}$ de proteína. Este resultado concuerda satisfactoriamente con experimentos utilizando $^{45}\text{Ca}^{2+}$ y filtración Millipore (Gill y cols., 1981). Los datos mostrados en las Tablas 5 y 6 muestran que HHIF incrementa notablemente la velocidad de influjo pasivo de Ca^{2+} a concentraciones más bajas que las necesarias para inhibir la bomba de Ca^{2+} . El flujo pasivo de Ca^{2+} ha sido calculado a una concentración de membrana de $0,1 \text{ mg}$ proteína/ml, por lo que, las concentraciones de HHIF utilizadas en este estudio requieren una corrección por la unión de HHIF a los sinaptosomas. Para una concentración de inhibidor libre de aproximadamente $0,45 \text{ U/ml}$ la cantidad de Ca^{2+} transportado durante el primer minuto es de $1,06-2,12 \text{ nmoles/mg}$ proteína, un valor de 10-11 veces superior con respecto al control.

A partir de las medidas de fluorescencia de CTC, utilizando la constante de la Tabla 7, y tomando un volumen interno de las vesículas de membrana plasmática de $3-7 \mu\text{l/mg}$ proteína (Rahamimoff y Spanier, 1984), la velocidad de entrada de Ca^{2+} en ausencia de HHIF, para una concentración de Ca^{2+} exterior de 1 mM , en condiciones despolarizadas de la membrana,

corresponde a un valor de 1,4-3,2 nmoles/mg/min.

La despolarización de la membrana plasmática de sinaptosomas con altas concentraciones de K^+ extracelular abre los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje y la entrada de Ca^{2+} a través de estos canales puede afectar la estimación de la velocidad de entrada de Ca^{2+} vía intercambiador Na^+/Ca^{2+} . Para mantener el potencial de membrana y la osmolaridad del medio extravesicular el KCl fue sustituido por cloruro de colina. En estas condiciones tiene lugar una ligera disminución de la constante de velocidad de entrada de Ca^{2+} y un ligero aumento del incremento de fluorescencia (véase apartado 7.3 de Resultados). El valor de la constante de velocidad calculado es de $0,34 \text{ min}^{-1}$. En estas condiciones la cantidad de Ca^{2+} transportado por el intercambio Na^+/Ca^{2+} operando a favor de la entrada de Ca^{2+} es de 0,9-2 nmoles/min/mg. Los valores obtenidos para el intercambio Na^+/Ca^{2+} operando de esa forma están de acuerdo con los resultados obtenidos por Gill y cols., 1981, 1984 y Rahamimoff y Spanier, 1984 usando $^{45}Ca^{2+}$ y filtración Millipore, así como por García-Martín y Gutiérrez-Merino, 1990 utilizando la fluorescencia de CTC.

La presencia de HHIF en el medio de ensayo estimula la entrada de Ca^{2+} vía intercambio Na^+/Ca^{2+} , aproximadamente 2,5- 3 veces con respecto al valor control, a concentraciones inferiores a las necesarias para inhibir la bomba de Ca^{2+} , tanto en condiciones despolarizadas como de reposo de la membrana. Esto supone un valor de entrada de Ca^{2+} , en presencia de HHIF, de 3,5-8 nmoles Ca^{2+} /mg proteína y 2,7-6 nmoles Ca^{2+} /mg proteína, en condiciones despolarizadas y en reposo de la membrana, respectivamente.

La $(Na^+,K^+)ATPasa$ mantiene el gradiente electroquímico de Na^+ y K^+ a través de la membrana plasmática y contribuye al mantenimiento del potencial de membrana de la célula en reposo. A su vez, este gradiente de Na^+ es utilizado por el sistema de intercambio Na^+/Ca^{2+} para eliminar Ca^{2+} de la célula. Cuando el gradiente de concentraciones de Na^+ es reducido este sistema puede revertir, introduciendo Ca^{2+} hacia el interior de la célula (Gill y cols., 1984; DiPolo y Béauge, 1990).

HHIF inhibe la $(Na^+,K^+)ATPasa$ de membrana plasmática de sinaptosomas con una mayor sensibilidad que la bomba de Ca^{2+} . La inhibición de la $(Na^+,K^+)ATPasa$ puede conducir a una elevada concentración de Ca^{2+} intracelular por diferentes mecanismos:

(1) Esta inhibición de la bomba de Na^+ puede resultar en una pequeña despolarización de la membrana (Mulvany, 1985) y consecuentemente, un incremento de la entrada de Ca^{2+} a través de los canales dependientes de voltaje (Meyer-Lehnert y cols., 1988). Meyer-Lehnert y cols.(1993) y Okada y cols. (1990) han mostrado que ouabaína induce en VSCM un incremento en la concentración de Ca^{2+} intracelular, que puede ser inhibido por verapamil, sugiriendo que la entrada de Ca^{2+}

transmembranal a través de los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje tiene un importante papel en el incremento de la concentración de Ca^{2+} intracelular en estas células. Meyer-Lehnert y cols. (1993) describen la existencia de una sustancia capaz de estimular la entrada de Ca^{2+} a través de la membrana en VSMC a través de canales de Ca^{2+} dependiente de voltaje. Sin embargo, la inhibición de la bomba de Na^+ en la mayoría de las células provoca una despolarización muy pequeña haciendo poco probable que influya en los canales de Ca^{2+} dependiente de voltaje (Casteels y cols., 1985). Como ya hemos señalado previamente, HHIF, independientemente de su efecto a través de la bomba de Na^+ , actúa directamente aumentando la entrada de Ca^{2+} vía canales dependientes de voltaje. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Goto y cols. (1988c) mostrando que un factor aislado a partir de orina humana incrementa la captura de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ en VSCM.

(2) En segundo lugar, la inhibición de la bomba de Na^+ conduciría a un incremento en la concentración de Na^+ citosólica, un descenso en el gradiente de Na^+ transmembranal y así, una inhibición del intercambio $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (Blaustein, 1977a; Goto y cols., 1988c). Existen, sin embargo, numerosas discrepancias en cuanto a la presencia de este sistema de transporte en todas las células. Aunque el intercambio $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ ha sido demostrado en grandes vasos (Blaustein, 1977a), en VSM y en células mesangiales (Rink y cols., 1982; Aviv y Lasker, 1990), su existencia en vasos precapilares (Vanbreenen y cols., 1979; Mulvany, 1985) y, como consecuencia, su posible papel en el aumento del tono vascular en presencia de un inhibidor, ha sido puesto en duda por numerosos grupos (Poston, 1987; Mir y cols., 1988).

(3) HHIF es capaz de inhibir la actividad $(\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+})\text{ATPasa}$ de membrana plasmática. Como la bomba de Ca^{2+} está implicada en la regulación de Ca^{2+} intracelular bombeando Ca^{2+} desde el citosol, éste podría ser un mecanismo por el cual HHIF sería capaz de incrementar la concentración de Ca^{2+} intracelular, hecho confirmado en este estudio. Esta hipótesis está de acuerdo con Goto y cols. (1988c, 1989b) que han mostrado que un factor purificado de orina humana inhibía la salida al exterior de la célula de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ en VSM.

La actividad de la $(\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+})\text{ATPasa}$ disminuye con respecto a los controles en ratas hipertensas y en pacientes con hipertensión esencial (Orlov y cols., 1983; Postnov y cols., 1984; Vezzoli y cols., 1985; Bukoski, 1990), lo cual podría contribuir al aumento en la concentración de Ca^{2+} intracelular descrito en estados de hipertensión (Postnov y Orlov, 1984; Bühler y cols., 1986; Marín, 1993).

Se ha descrito un aumento en plasma de una actividad similar a la de digoxina en pacientes y en ratas hipertensas (Sugiyama y cols., 1990; Le Quang y cols., 1990). Este aumento es paralelo

a un incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ en plaquetas y en VSMC. Estos hechos sugieren que HHIF podría desempeñar un importante papel en el incremento de la resistencia periférica característico de la hipertensión arterial.

En conjunto, estos resultados sugieren que los niveles de Ca^{2+} citosólicos estarían incrementados en presencia de HHIF, debido a una alteración generalizada de los sistemas de transporte de Ca^{2+} de la membrana plasmática, que han sido implicados en la patogénesis de la hipertensión esencial (Postnov y Orlov, 1984). Para asegurar este punto se ha estudiado el efecto de HHIF sobre el cultivo de células mesangiales de rata, utilizado como modelo de musculatura lisa vascular (VSM). HHIF induce un lento y progresivo aumento en la concentración de Ca^{2+} en el citosol, si bien concentraciones altas de inhibidor son tóxicas para la célula (resultados no mostrados). Estos hallazgos estarían de acuerdo con los descritos por numerosos autores los cuales han aislado a partir de diferentes tejidos un inhibidor endógeno de la bomba de Na^+ que incrementa la concentración de Ca^{2+} intracelular en cultivos de células de musculatura lisa (Meyer-Lehnert y cols., 1993; Schoner y cols., 1993; Hallaq y Hauptert, 1989; Mir y cols., 1988; Goto y cols., 1989b; Kramery cols., 1991).

En resumen, HHIF bloquea fuertemente el mecanismo de extrusión de Ca^{2+} desde el espacio intra al extravascular mediado por la $(Ca^{2+} + Mg^{2+})ATPasa$. Por otra parte, el efecto de HHIF de estimulación del intercambio Na^+/Ca^{2+} a de contribuir a potenciar este efecto tras estimulación de la célula nerviosa, ya que este sistema puede operar entonces en sentido de entrada de Ca^{2+} acoplado a salida de Na^+ (Mullins, 1985). HHIF podría tener dos efectos simultáneos sobre el Ca^{2+} intracelular: incrementar los niveles de Ca^{2+} citosólicos y disminuir el contenido de Ca^{2+} dentro del retículo sarcoplásmico. Por consiguiente, estos resultados apoyan la hipótesis de que HHIF puede actuar *in vivo* elevando los niveles de Ca^{2+} citosólico.

Debemos destacar que un incremento mantenido de Ca^{2+} libre citosólico en la neurona debería conducir a un aumento en la velocidad de liberación de neurotransmisores (Akerman y Nicholls, 1983; Smith y Augustine, 1988). Una de las hipótesis más apoyada es que la inhibición del transporte de Na^+ en los terminales nerviosos simpáticos alteraría el sistema de intercambio Na^+/Ca^{2+} a través de la membrana plasmática neuronal, incrementando la concentración de Ca^{2+} y por consiguiente la liberación de neurotransmisores. Esta inhibición de la bomba de Na^+ también conduciría a un descenso en la recaptura de éstos. Ello resultará en un aumento en la concentración de neurotransmisores, tales como la noradrenalina, en la unión neuromuscular. La noradrenalina incrementaría la concentración de Ca^{2+} en la musculatura vascular por activación de receptores que

controlan la entrada de Ca^{2+} desde el exterior celular o por la liberación del Ca^{2+} almacenado en el retículo sarcoplásmico (Blaustein y Hamlyn, 1983). Mir y cols. (1988); Jansen y cols. (1993) han mostrado que un factor aislado a partir de cultivo de células hipotalámicas incrementa el efecto vasoconstrictor de noradrenalina. Estos resultados han sido confirmados por otros autores (Hallaq y Hauptert, 1989; Jansen y cols., 1993; Meyer-Lehnert y cols., 1993) y, junto con los obtenidos en esta Tesis, apoyan esta última hipótesis.

6. HHIF E HIPERTENSION.

Un aumento de la reactividad vascular es una característica común en ciertas formas de hipertensión, bien como consecuencia de un aumento de la concentración de Ca^{2+} citosólico en las células de musculatura lisa, bien por hiperactividad de las terminales sinápticas de innervación muscular. La existencia de una alteración en las concentraciones de Ca^{2+} citosólico en musculatura lisa vascular ha sido bien documentada (Blaustein y Hamlyn, 1983; Blaustein y Hamlyn, 1984; Rasgado-Flores y cols., 1989) y relacionada con la inhibición de la $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{ATPasa}$ (Blaustein, 1977a). Por otro lado, una inhibición de la bomba de Ca^{2+} debería producir un incremento de la concentración de Ca^{2+} en las terminales sinápticas que conduciría a una hiperactividad sináptica. Los resultados mostrados en esta Tesis apoyan la existencia de un factor endógeno que podría estar implicado en el incremento de la concentración de Ca^{2+} en células de musculatura lisa y en un aumento de la hiperactividad sináptica contribuyendo a mantener un tono aumentado de la musculatura lisa vascular y de esta forma mantener la etiología de ciertas formas de hipertensión esencial.

CONCLUSIONES

1. Se ha purificado un factor inhibidor endógeno de $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{ATPasa}$, no peptídico, de bajo peso molecular, a partir de hipófisis, hipotálamo y glándula suprarrenal. El espectro de absorción y de fluorescencia de HHIF sugieren la existencia de un anillo aromático en su estructura.
2. HHIF inhibe la actividad $(\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+})\text{ATPasa}$ de la membrana plasmática sinaptosomal y del retículo sarcoplásmico, por un mecanismo no competitivo con el sustrato.
3. La dependencia de la actividad ATPasa de vesículas del retículo sarcoplásmico con la concentración de inhibidor es bifásica, con una primera fase de activación que se correlaciona con la pérdida de acumulación de Ca^{2+} por estas membranas y una segunda fase de inhibición a concentraciones más altas de inhibidor.
5. El efecto de HHIF sobre la actividad ATPasa es dependiente de la concentración de membranas en el medio de ensayo, lo cual sugiere cambios en la concentración de inhibidor libre por adsorción a las membranas de sinaptosomas y retículo sarcoplásmico.
6. Concentraciones de HHIF que inhiben la actividad $(\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+})\text{ATPasa}$ de estas membranas no producen cambios apreciables en el parámetro de orden de las mismas. Por tanto, la acción de este compuesto a nivel molecular no parece ser a nivel de alteraciones en el estado de fluidificación de la membrana plasmática de la célula nerviosa y del retículo sarcoplásmico.
7. HHIF altera los flujos de Ca^{2+} a través de las vesículas derivadas de la membrana plasmática sinaptosomal:
 - A. Inhibe el transporte de Ca^{2+} dependiente de ATP.
 - B. Aumenta la permeabilidad pasiva a Ca^{2+} .
 - C. Estimula el influjo de Ca^{2+} vía intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$.
8. HHIF aumenta la concentración de Ca^{2+} intracelular en cultivo de células mesangiales, utilizadas como modelo de células de musculatura lisa.

9. HHIF podría desempeñar un importante papel en el control de la homeostasis celular del Ca^{2+} , incrementando la concentración de Ca^{2+} intracelular tanto en las terminales sinápticas como en las células de musculatura lisa. El aumento de Ca^{2+} intracelular en sinaptosomas conduciría a un aumento en la liberación de neurotransmisores.

10. La modulación de la bomba de Ca^{2+} por HHIF podría deberse a la interacción directa con sitios hidrofóbicos de la proteína, desorganizando el lípido anular.

BIBLIOGRAFIA

- Aalkjaer C., Mulvany M.J. y Nyborg N.C.B. (1985) *Br. J. Pharmacol.* 86, 447-453.
- Akagawa K. (1984) *J. Neurochem.* 42, 775-780.
- Akerman K.E.O. y Nicholls D.G. (1983) *Trends Biochem. Sci.* 8, 63-64.
- Alagband-Zadeh J., Fenton S., Hancock K., Millett J.A. y de Wardener H.E. (1983) *J. Endocrinol.* 98, 221-226.
- Andersen J.P. (1989) *Biochim. Biophys. Acta* 988, 47-72.
- Andersen J.P., Møller J.V. y Jorgensen P.V. (1982) *J. Biol. Chem.* 257, 8300-8307.
- Andersen J.P. y Vilsen B. (1992) *J. Biol. Chem.* 267, 2767-2774.
- Anner B.M., Rey H.G., Moosmayer M., Meszoely I. y Hauptert G.T., Jr. (1990) *Am. J. Physiol.* 258, F144-F153.
- Antolovic R., Bruller H.-J., Bunk S., Linder D. y Choner W. (1991) *Eur. J. Biochem.* 199, 195-202.
- Aoki K. (1984) *Prog. Clin. Med.* 28, 529-548.
- Arrio B., Chevalier J., Jullien M., Yon J. y Calvayrac R. (1974) *J. Membr. Biol.* 18, 95-112.
- Ashida T., Kuramochi M. y Omac T. (1989) *Hypertension* 13, 890-895.
- Aviv A. y Lasker N. (1990) en "*Hypertension: Pathophysiology, Diagnosis, and Treatment*", 923-937. Ed. Laragh J.H. y Brenner B.M. Raven Press, New York.
- Bahlman N.J., McDonald S.J., Ventom M.G. y de Wardener H.E. (1967) *Clin. Sci.* 32, 403-413.
- Berman M.C. (1982) *Biochem. Biophys. Acta* 694, 95-121.
- Bersohn M.M., Vemuri R., Schuil D.W., Weiss R.S. y Philipson K.D. (1991) *Biochim. Biophys. Acta* 1062, 19-23.
- Bick R.J., Youker K.A., Pownall H.J., Van Winkle W.B. y Entman M.L. (1991) *Arch. Biochem. Biophys.* 286, No.2, 346-352.
- Birdsall B., King R.W., Eheeler M.L., Lewis C.H., Goode R.R., Dunlap R.B. y Roberts G.C.K. (1983) *Anal. Biochem.* 1983, 353-361.
- Blaustein M.P. (1977a) *Am. J. Physiol.* 232, C165-C173.
- Blaustein M.P. (1977b) *Biophys. J.* 20, 79-111.
- Blaustein M.P. (1988) *TINS* 11, No.10, 438-443.
- Blaustein M.P. y Hamlyn J.M. (1983) *Ann. Int. Med.* 98, 785-792.
- Blaustein M.P. y Hamlyn J.M. (1984) *Am. J. Med. Oct.*, 45-59.
- Boriskina G.M., Gulak P.V. y Postnov Y.V. (1977) *Experientia* 34, 744.

- Boschi S., Borghi C., Munarani A., Costa F.V., Lu Z.R., de Vries D. y Ambrosioni E. (1990) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 169, 360-368.
- Bose D., Elliott D., Kobayashi T., Templeton J.F., Kumar V.P.S. y LaBella F.S. (1988) *Br. J. Pharmacol.* 93, 453-461.
- Bourgoignie J., Klahr S. y Bricker N.S. (1971) *J. Clin. Invest.* 50, 303-311.
- Brandl C.J., Green N.M., Korczak B. y MacLennan D.H. (1986) *Cell* 44, 597-607.
- Braquet P., Senn N., Robin J.P., Esanu A. y Garay R. (1986) *J. Hypertens.* 4 (Suppl.5), S161-S164.
- Brooker G. y Jelliffe R.W. (1972) *Circulation* 45, 20-36.
- Buckalew V.M., Jr. y Gruber K.A. (1984) *Annu. Rev. Physiol.* 46, 343-358.
- Buckalew V.M., Jr., Morris M., Campbell W.G. y Rauch A.L. (1987) *Klin. Wochenschr.* 65 (Suppl.VIII), 133-138.
- Bühler F.R., Distler A., Laragh J.H., Tourkantonis D., Valdes G. y Weber M.A. (1984) *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 6, S929-S932.
- Bühler F.R., Resink T.J., Tkachuk V.A., Zschauer A., Dimitrov D., Raine A.E.G., Bolli P., Müller F.B. y Erne P. (1986) *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 8 (Suppl.8), S145-S149.
- Bukoski R.D. (1990) *J. Hypertens.* 8, 37-43.
- Caffrey M. y Feigenson G.W. (1981) *Biochemistry* 20, 1949-1961.
- Cantley L. (1986) *TINS* 9, No.1, 1-3.
- Cantley L.C. (1981) *Curr. Top. Bioenerg.* 11, 201-205.
- Carafoli E. (1987) *Ann. Rev. Biochem.* 56, 395-433.
- Carafoli E. (1991a) *Annu. Rev. Physiol.* 53, 531-547.
- Carafoli E. (1991b) *Physiol. Rev.* 71, No.1, 129-153.
- Carilli C.T., Berne M., Cantley L.C., Jr. y Hauptert G.T., Jr. (1985) *J. Biol. Chem.* 260, No.2, 1027-1031.
- Caroni P. y Carafoli E. (1980) *Nature* 283, 765-767.
- Carvalho-Alves P.C., Oliveira C.R.G. y Verjovski-Almeida S. (1985) *J. Biol. Chem.* 260, 4282-4287.
- Casteels R., Racymaekers L., Droogmans G. y Wuylaek F. (1985) *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 7 (Suppl.3), S103-S110.
- Caswell A.H. (1972) *J. Membr. Biol.* 7, 345-364.
- Cauvin C., Hwang B.S., Yamamoto M. y Van Breemen C. (1987) *Am. J. Cardiol.* 59, 116B-122B.
- Clarke D.M., Loo T.W., Inesi G. y MacLennan D.H. (1989) *Nature* 339, 476-478.

- Clarke D.M., Loo T.W. y MacLennan D.H. (1990) *J. Biol. Chem.* 265, 17405-17408.
- Clarkson E.M. y de Wardener H.E. (1985) *Clin. Exp. Hypert.* A7, 673-683.
- Cloix J.F., Crabos M., Grichois M.L., Guicheney P. y Meyer P. (1986) *J. Hypertens.* 4, S352-S354.
- Cloix J.F., Crabos M., Grichois M.L., Guicheney P. y Meyer P. (1987) *Klin. Wochenschr.* 65, 146-153.
- Cloix J.F., Crabos M., Wainer I.W., Ruegg U., Seiler M. y Meyer P. (1985) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 131, 1234-1240.
- Cloix J.F., Dagher G., Crabos M., Pernollet M.G. y Meyer P. (1984) *Experientia* 40, 1380-1382.
- Coggins P.J., Moore G.J. y Keane P.M. (1987) *Proc. West. Pharmacol. Soc.* 30, 205-208.
- Craigh W.S. y Kyte J. (1980) *J. Biol. Chem.* 255, 6262-6269.
- Cress L.W., Freas W., Haddy F. y Muldoon S.M. (1991) *Hypertension* 18, 516-522.
- Cuenda A., Henao F. y Gutiérrez-Merino C. (1990) *Eur. J. Biochem.* 194, 663-670.
- Dahl L.K., Knudson K.D. y Iwai J. (1969) *Cir. Res.* 24 (Suppl. 1), 21-23.
- Davenport L., Dale R.E., Bisby R.H. y Cundall R.B. (1985) *Biochemistry* 24, 4097-4108.
- De Champlain J. (1990) *J. Hypertens.* 8 (Suppl.7), S77-S85.
- De Champlain J., Farley L., Cousineau D. y Van Amerigen M.-R. (1976) *Circ. Res.* 38, 109-114.
- De Foresta B., Le Maire M., Orlowski S., Champeil P., Lund S., Møller J.V., Michelangeli F. y Lee A.G. (1989) *Biochemistry* 28, 2558-2567.
- De Foresta B., Merah Z., Le Maire M. y Champeil P. (1990) *Anal. Biochem.* 189, 59-67.
- DeJesus F., Girardet J.-L. y Dupont Y. (1993) *FEBS Lett.* 332 (3), 229-232.
- De Meis, L. (1981) en "Transport in the Life Sciences". Ed. Bittar E.E. Wiley J. & Sons, New York.
- De Meis L. y Vianna A.L. (1979) *Ann. Rev. Biochem.* 48, 275-292.
- De Quattro V. y Chan S. (1972) *Lancet* 1 (755), 806-809.
- De Wardener H.E. (1990) *Hypertension* 17, 830-836.
- De Wardener H.E. y MacGregor G.A. (1980) *Kidney. Int.* 18, 1-9.
- De Wardener H.E. y MacGregor G.A. (1983) *Medicine* 62, 310-326.
- De Wardener, H.E. y MacGregor, G.A. (1985) en "Butterworths International Medical Reviews. Essential Hypertension as Endocrine Disease". Ed. Edwards, C.R. y Carey, R.M. Butterworths & Co. London.
- De Wardener H.E., Millett J.A., Holland S.M., MacGregor G.A. y Alaghband-Zadeh J. (1987) *Hypertension* 10, 152-156.

- De Wardener H.E., Mills I.H., Clapham W.F. y Hayter C.J. (1961) *Clin. Sci.* 21, 249-258.
- Devynck M.A., Pernollet M.G. y Cloix J.F. (1984a) *Clin. Exp. Hypert.* 6, 441-453.
- Devynck M.A., Pernollet M.G., Nunez A.M., Aragon I., Montenay-Garestier T., Helene C. y Meyer P. (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79, 5057-5060.
- Devynck M.A., The de H., Pernollet M.G., Cloix J.F., Rosenfeld J.B., Kamal L.A. y Meyer P. (1984b) *J. Physiol.* 79, 538-541.
- Diamandis E.P., Papanastasiou-Diamandi A. y Soldin S.J. (1985) *Clin. Biochem.* 18, 48-55.
- DiPolo R. (1978) *Nature* 274, 390-392.
- DiPolo R. y Beaugé L. (1980) *Cell Calcium* 1, 147-169.
- DiPolo R. y Beaugé L. (1990) en "*Intracellular Calcium Regulation*", 381-413. Alan R. Liss, Inc.
- Doris P.A. (1992) *Life Sci.* 50, 1935-1941.
- Dupont Y. (1976) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 71 (2), 544-550.
- Dupont Y., Harrison S. y Hasselbasch W. (1973) *Nature* 244, 554-558.
- Dupont Y., Chapron Y. y Pougeois R. (1982) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 106, No.4, 1272-1279.
- East J.M. y Lee A.G. (1982) *Biochemistry* 21, 4144-4151.
- Ebashi S., Endo M. y Ohtsuki I. (1969) *Q. Rev. Biophys.* 2, 351-384.
- Ebashi S. y Lipman F. (1962) *J. Cell Biol.* 14, 389-400.
- Escalante B., Erlij D., Falck J.R. y McGiff J.C. (1993) *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 22 (Suppl.2), S106-S108.
- Escudero B. y Gutiérrez-Merino C. (1987) *Biochim. Biophys. Acta* 902, 374-384.
- Esler M., Jackman G., Bobik A., Leonard P., Kelleher D., Skews H., Jenneings G. y Korner P. (1981) *Hypertension* 3, 149-156.
- Esmann M., Christiansen C., Karlson K., Hansson G.C. y Skou J.C. (1980) *Biochem. Biophys. Acta* 603, 1-12.
- Fagoo M., Braquet P., Robin J.P., Esanu A. y Godfraind T. (1986) *Biochim. Biophys. Res. Comm.* 134 (2), 1064-1070.
- Fagoo M. y Godfraind T. (1985) *FEBS Lett.* 184, 150-154.
- Fine L.G., Bourgoignie J.J., Weber H. y Bricker N.S. (1976) *Kidney International* 10, 364-372.
- Floreani M., Bonetti A.C. y Carpenedo F. (1981) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 101, No.4, 1337-1344.
- Frieden, C. (1981) en "*Protein-Protein Interaction*", 290-314. Ed. Frieden C. y Nichol L. Wiley J. & Sons, New York.
- Friedman M., Krull L.H. y Cavins J.F. (1970) *J. Biol. Chem.* 245, 3868-3871.

- Friedman, S.M. (1983) en "Hypertension", 457-473. Ed. Genest J., Kuchel O., Hamet O. y Cantin M. McGraw-Hill, New York.
- Froud R.J. y Lee A.G. (1986) *Biochem. J.* 237, 197-206.
- Furukawa K.-I., Tawada Y. y Shigekawa M. (1988) *J. Biol. Chem.* 263, 8058-8065.
- Gandhi C.R. y Ross D.H. (1986) *Neurochemical Research* 11, 1447-1462.
- García-Martín E., González-Cabanillas S. y Gutiérrez-Merino C. (1990) *J. Neurochem.* 55, No.2, 370-378.
- García-Martín E., Escudero B., Fernández Salguero P., González-Cabanillas S. y Gutiérrez-Merino C. (1989) *Biochem Soc. Transactions* 17, 960-962.
- García-Martín E. y Gutiérrez-Merino C. (1986) *J. Neurochem.* 47, 668-672.
- García-Martín E. y Gutiérrez-Merino C. (1990) *J. Neurochem.* 54, 1238-1246.
- Gill D.L. (1982) *J. Biol. Chem.* 257, 10986-10990.
- Gill D.L., Chueh S.-H., Noel M.W. y Ueda T. (1986) *Biochim. Biophys. Acta* 856, 165-173.
- Gill D.L., Chueh S.-H. y Whitlow C.L. (1984) *J. Biol. Chem.* 259, 1087-10813.
- Gill D.L., Grollman E.F. y Kohn L.D. (1981) *J. Biol. Chem.* 256, 184-192.
- Gillain, F., Champeil, P. and McIntosh, D. (1988) en "The Ion Pumps: Structure, Function, and Regulation", 183-188. Ed. Stein W.D. Alan R. Liss, Inc., New York.
- Goto A., Ishiguro T., Yamada K., Ishii M., Yoshioka M., Eguchi C., Shimora M. y Sugimoto T. (1990) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 173, 1093-1101.
- Goto A., Yamada K., Ishii M., Yoshioka M., Ishiguro T., Eguchi C. y Sugimoto T. (1988a) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 152 (1), 322-327.
- Goto A., Yamada K., Ishii M., Yoshioka M., Ishiguro T., Eguchi C. y Sugimoto T. (1988b) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 154 (3), 847-853.
- Goto A., Yamada K., Ishii M., Yoshioka M., Ishiguro T., Eguchi C. y Sugimoto T. (1989a) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 161 (3), 953-958.
- Goto A., Yamada K., Ishii M., Yoshioka M., Ishiguro T., Eguchi C. y Sugimoto T. (1989b) *Hypertension* 13 (6 Pt.2), 916-921.
- Goto A., Yamada K., Ishii M., Yoshioka M., Ishiguro T. y Sugimoto T. (1988c) *Hypertension* 11, 645-650.
- Goto A., Yamada K., Yagi N., Hui C., Nagoshi H., Sasabe M. y Yoshioka M. (1993) *J. Cardio. Pharmacol.* 22 (Suppl.2), S58-S59.
- Goto A., Yamada K., Yagi N., Hui C., Terano Y. y Sugimoto T. (1992) *Clin. Chem.* 38, 161-162.
- Gould G.W., East J.M., Froud J., McWhirter J.M., Stefanova H.I. y Lee A.G. (1986) *Biochem. J.* 237, 217-227.

- Gould G.W., McWhirter J.M., East J.M. y Lee A.G. (1987) *Biochem. J.* 245, 739-749.
- Graves S.W. y Williams G.H. (1984) *J. Clin. Endocr. Metab.* 59, 1070-1075.
- Green N.M. y MacLennan D.H. (1989) *Biochem. Soc. Trans.* 263, 819-822.
- Green, N.M., Taylor, W.R. and MacLennan, D.H. (1988) en "*The Ion Pumps: Structure, Function and Regulation*", 15-24. Ed. Stein W.D. Alan R. Liss, INC, New York.
- Gruber K.A., Whitaker J.M. y Buckalew V.M., Jr. (1980) *Nature* 287, 743-745.
- Gryniewicz G., Poenie M. y Tsien R. (1985) *J. Biol. Chem.* 260, 3440-3550.
- Gutiérrez-Merino C., Molina A., Escudero B., Diez A. y Laynez J. (1989) *Biochemistry* 28, 3398-3406.
- Gutiérrez-Merino C., Mukonge F., Mata A.M., East J.M., Levinson B.L., Napier R.M. y Lee A.G. (1987) *Biochim. Biophys. Acta* 897, 207-216.
- Haber E. y Hauptert G.T., Jr. (1987) *Hypertension* 9, 315-324.
- Haddy F.J. (1990) *Cardiovasc. Drugs Ther.* 4, 343-349.
- Haddy F.J. y Overbeck H.W. (1976) *Life Sci.* 19, 935-948.
- Haddy F.J., Pamnani M.B. y Clough D.L. (1979) *Life Sci.* 24, 2105-2118.
- Haddy F.J., Pamnani M.B. y Clough D.L. (1987) *Hypertension* 10 (Suppl. I), I101-I107.
- Hakim G., Itano T., Verma A.K. y Penniston J.T. (1982) *Biochem. J.* 207, 2225-231.
- Hallaq H.A. y Hauptert G.T., Jr. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 10080-10084.
- Halperin J., Martín A.M. y Malave S. (1985) *Life Sci.* 37, 561-566.
- Halperin J., Schaeffer R., Galvez L. y Malave S. (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 6101-6104.
- Halperin J.A. (1990) *J. Neurol. Sci.* 90, 217-230.
- Hamlyn J.M. (1991a) *Therapeutic Res.* 12(2), 140(362)-151(373).
- Hamlyn J.M., Blaustein M.P., Bova S., DuCharme D.W., Harris D.W., Mandel F., Mathews W.R. y Ludens J.H. (1991b) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 6259-6263.
- Hamlyn J.M., Harris D.W. y Ludens J.H. (1989) *J. Biol. Chem.* 264 (13), 7395-7404.
- Hamlyn J.M., Ringel R., Schaeffer J., Levinson P.D., Hamilton B.P., Kowarski A.A. y Blaustein M.P. (1982) *Nature* 300, 650-652.
- Hamlyn J.M., Schenden J.A., Zyren J. y Baczynskyj L. (1987) *Hypertension* 10, I71-I77.
- Hara H. y Kanazawa T. (1986) *J. Biol. Chem.* 261, No.35, 16584-16590.
- Harafuji H. y Ogawa Y. (1980) *J. Biochem.* 87, 1305-1312.

- Hardwicke P.M.D. y Green N.M. (1974) *Eur. J. Biochem.* 42, 183-193.
- Harris D.W., Clark M.A., Ludens J.H., DuCharme D.W. y Hamlyn J.M. (1990) *Hypertension* 16, 337, P2.
- Hasselbach W. (1964) *Prog. Biophys. Chem.* 14, 167-222.
- Hasselbach, W. (1974) en "The Enzymes" , 431-467. Academic Press, New York 1974. .
- Hasselbach W. y Makinose M. (1963) *Biochem. Z.* 339, 94-111.
- Hauptert G.T.,Jr. (1987a) *Hypertension* 10, I61-I66.
- Hauptert G.T.,Jr. (1988b) *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 12 (Suppl.3), S70-S76.
- Hauptert G.T.,Jr. (1988) *Prog. Biochem. Pharmacol.* 23, 10-21.
- Hauptert G.T.,Jr., Carilli C.T. y Cantley L.W. (1984) *Am. J. Physiol.* 247, F919-F924.
- Hauptert G.T.,Jr. y Sancho J.M. (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci.USA* 76, 4658-4660.
- Hermoni-Levine M. y Rahamimoff H. (1990) *Biochemistry* 29, 4940-4950.
- Hermesmeyer R.K. (1987) *Hypertension* 10, I20-I22.
- Heyn M.P. (1979) *FEBS Lett.* 108, 359-364.
- Hille B. (1981) en "Basic Neurochemistry", 95-106. Ed. Siegel G.J., Wayne Albers R., Agranoff B.W. y Katzman R. Little, Brown, Boston.
- Hillyard S.D., Esther Lu Ph.D. y Gonick H.C. (1976) *Cir. Res.* 38, 250-255.
- Hitzemann R.J., Harris R.A. y Loh H.H. (1984) en "Physiology of Membrane Fluidity", 109-126. Ed. Shinitzky M. CRC Press, Boca Raton, Florida.
- Holland S., Millett J.A., Alaghband-Zadeh J., de Wardener H., Pamnani M. y Haddy F. (1991) *Am. J. Hypertens.* 4, 315-320.
- Honda H., Shibuya T. y Salafsky b. (1990) *Comp. Biochem. Physiol.* 95B, No.3, 555-558.
- Illescas M., Ricote M., Méndez E., G-Robles R. y Sancho J. (1990) *FEBS Lett.* 261, 436-440.
- Inagami T. y Tamura M. (1987) *Hypertension* 10, I108-I112.
- Inesi G. (1972) *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.* 1, 191-210.
- Inesi G. y de Meis L. (1985) en "The Enzymes of Biological Membranes", 157-191. Ed. Martonosi A. Plenum, New York.
- Inesi G. y Kirtley M.R. (1992) *J. Bioenerg. Biomembr.* 24, No.3, 271-283.
- Inesi G., Lewis D., Nikic D., Hussain A. y Kirtley M.E. (1992) en "Advances in Enzimology and Related Areas of Molecular Biology" Vol. 65, 185-215. Ed. Meister A. John Wiley & Sons, Inc, New York.
- Inui M., Saito A. y Fleischer S. (1987) *J. Biol. Chem.* 262, 1740-1747.

- Ishizuka N., Fukushima Y., Urayama O. y Akera T. (1991) *Biochim. Biophys. Acta* 1069, 259-266.
- Jähing F. (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 6361-6365.
- Janssens S.P., Kacharis C., Parker W.L., Hales C.A. y Hauptert Jr., G.T. (1993) *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 22 (Suppl.2), S42-S46.
- Javors M.A., Bowden C.L. y Ross D.H. (1981) *J. Neurochem.* 37, 381-387.
- Jones A.W. y Hart R.G. (1975) *Cir. Res.* 37, 333-341.
- Jones L. (1979) *Biochim. Biophys. Acta* 577, 230-242.
- Jorgensen P.L. (1974) *Biochim. Biophys. Acta* 356, 36-52.
- Josephson L. y Cantley L.C.Jr. (1977) *Biochemistry* 16, 4572-4578.
- Kaloyanides G.J. y Azer M. (1971) *J. Clin. Invest.* 50, 1603-1612.
- Karlish S.J.D., Goldshleger R. y Stein W.D. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 4566-4570.
- Kelly R.A., O'Hara D.S., Cancssa M., Mitch W.E. y Smith T.W. (1985) *J. Biol. Chem.* 260 (21), 11396-11405.
- Kelly R.A., O'Hara D.S., Mitch W.E. y Smith T.W. (1986) *J. Biol. Chem.* 261, 11704-11711.
- Knauf P.A., Furlmann G.F. y Rothstein A. (1977) *J. Gen. Physiol.* 69 (3), 363-386.
- Knorr A., Kazda S., Neuser D., Stasch J.-P. y Scuter F. (1991) *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 18 (Suppl.5), S1-S4.
- Kometani T. y Kasai M. (1978) *J. Membr. Biol.* 41, 295-308.
- Kramer H.J., Baecker A., Weiler E. y Liddiard C. (1986) *Klin. Wochenschr.* 64, 760-766.
- Kramer H.J., Heppe M., Weiler E., Backer A., Liddiard C. y Klingmuller D. (1985) *Renal Physiol.* 8, 80-89.
- Kramer H.J., Meyer-Lehnert H., Michel H. y Predel HG. (1991) *Am. J. Hypertens.* 4, 81-89.
- Krzesinski J.M., Du F., Pequeux M.L. y Rorive G.L. (1993) *Int. J. Arti. Organs* 16, No.1, 23-30.
- Kwan C.-Y., Chaudhary R., Zheng X.-F., Ni J. y Lee R.M.K.W. (1994) *Hypertension* 23, 1156-1160.
- LaBella F.S., Bihler I., Templeton J., Lim R.S., Hnastowich M. y Rohrer D. (1985) *Fed. Proc.* 44, 2806-2828.
- Lakowicz J.R. (1983) en "*Principles of Fluorescence Spectroscopy*". Plenum Press, New York.
- Le Maire M., Lund S., Viel A., Champeil P. y Moller J.V. (1990) *J. Biol. Chem.* 265, 1111-1123.
- Le Quan Sang K.-H., Pernollet M.-G., Meyer P. y Devynck M.-A. (1990) *Am. J. Hypertens.* 3, 171-175.
- Lee A.G. (1982) en "*Techniques In Lipid And Membrane Biochemistry*", 1-49. Ed. Hesketh T.R., Kornberg H.L., Metcalfe J.C., Northcote D.H., Pogson C.I. y Tipton K.F. Elsevier Biomedical, Ireland 1982.

- Lee C.O., Taylor A. y Windhager E.C. (1980) *Nature* 287, 299-320.
- Leloir L.F. y Cardini C.E. (1957) *Methods Enzymol.* 3, 843-844.
- Lentz B.R., Clubb K.W., Alford D.R., Hochli M. y Meissner G. (1985) *Biochemistry* 24, 433-442.
- Lew V.L., Tsien R.Y. y Miner C. (1982) *Nature* 298, 478-481.
- Lichardus B. y Ponec J. (1973) *Endocrinology* 61, 403-412.
- Lindner A., Kenny M. y Meacham A.J. (1987) *New Engl. J. Med.* 316, 509-513.
- Lingrel J.B., Orłowski J., Price E.M. y Pathak B.G. (1991) en "The Sodium Pump: Recent Developments" Vol. 46 (Part.1), 1-6. Eds: Kaplan J.H. y De Weer P. Society of General Physiologists Series, Rockefeller University Press, New York.
- Locher R., Knorr M., Edmonds D., Neyses L. y Vetter W. (1986) *J. Hypertens.* 4 (Suppl. 6), S358-S360.
- London E. y Feigenson G.W. (1981) *Biochemistry* 20, 1939-1948.
- Lowry O.H., Rosenbrough N.J., Ferr A.L. y Randall R.J. (1951) *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.
- Ludens J.H., Clark M.A., DuCharme D.W., Harris D.W., Lutzke B.S., Mandel F., Mathews W.R., Sutter D.M. y Hamlyn J.M. (1991) *Hypertension* 17, 923-929.
- Lund S., Orłowski S., de Foresta B., Champeil P., Le Maire M. y Moller J.V. (1989) *J. Biol. Chem.* 264, 4907-4915.
- Luxnat M. y Galla H.-J. (1986) *Biochim. Biophys. Acta* 856, 274-282.
- MacGregor G.A. y de Wardener H.E. (1984) *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 6 (Suppl. 1), S55-S60.
- MacLennan D.H. (1970) *J. Biol. Chem.* 245, No.17, 4508-4518.
- MacLennan D.H. (1990) *Biophys. J.* 58, 1355-1365.
- MacLennan D.H., Brandl C.J., Korczak B. y Green N.M. (1985) *Nature* 316, 396-700.
- MacLennan D.H., Stewart P.S., Zubrycka E. y Holland P.C. (1976) en "Cell. Motility", 153-163. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Madden T.D., King M.D. y Quinn P.J. (1981) *Biochim. Biophys. Acta* 641, 265-269.
- Makinose M. (1973) *FEBS Lett.* 37, 140-143.
- Marín J. (1988) *Gen. Pharmacol.* 19, 295-306.
- Marín J. (1993) *J. Auton. Pharmacol.* 13, 127-176.
- Martínez-Azorín F., Teruel J.A., Fernández-Belda F. y Gómez-Fernández J. (1992) *J. Biol. Chem.* 267, 11923-11929.
- Martonosi A.N. (1984) *Physiol. Rev.* 64, 1246-1320.

- Martonosi, A.N., Jona I., Molnar E., Seidler N.W., Buchet R. y Varga S. (1990) *FEBS Lett.* 268, 365-370.
- Masugi F., Ogihara T., Hasegawa T., Sakaguchi K. y Kumahara Y. (1988) *J. Hum. Hypertens.* 2, 409-420.
- Mata A.M. y Gutiérrez-Merino C. (1985) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 133, 176-182.
- McWhirter J.M., Gould G.W., East J.M. y Lee A.G. (1987) *Biochem. J.* 245, 713-722.
- Meissner G. (1975) *Biochim. Biophys. Acta* 389, 51-68.
- Meissner G., Conner G. y Fleischer S. (1973) *Biochim. Biophys. Acta* 298, 246-269.
- Meyer K y Linde H. (1971) en "Venomous animals and their venoms", Vol.2. Eds. Bucherl W. y Buckley E.E. Academic Press, New York.
- Meyer-Lehnert H., Wanning C., Michel H., Backer A. y Kramer H.J. (1988) *J. Clin. Invest.* 82, 1407-1414.
- Meyer-Lehnert H., Wanning C., Michel H., Backer A. y Kramer H.J. (1993) *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 22 (suppl.2), S16-S19.
- Michaelis E.K., Michaelis M.L., Chang H.H. y Kitos T.E. (1983) *J. Biol. Chem.* 258, 6101-6108.
- Michel M.C., Brodde O.-E. y Insel P.A. (1990) *Hypertension* 16, 107-120.
- Michelakis A.M., Mizukoshi H., Huang C., Murakami H. y Inagami T. (1975) *J. Clin. Endocr. Metab.* 41, 90-96.
- Michelangeli F., East J.M. y Lee A.G. (1990a) *Biochim. Biophys. Acta* 1025, 99-108.
- Michelangeli F., Orłowski S., Champeil P., East J.M. y Lee A.G. (1990b) *Biochemistry* 29, 3091-3101.
- Mitchell R.H. (1979) *Trends Biochem. Sci.* 4, 128-131.
- Millett J.A., Holland S.M., Alaghband-Zadeh J. y de Wardener H.E. (1986) *J. Endocr.* 108, 69-73.
- Millett J.A., Holland S.M., Alaghband-Zadeh J. y de Wardener H.E. (1987) *J. Endocr.* 112, 299-303.
- Mir M.A., Morgan K., Chappell S., Lewis M., Spurlock G., Collins P. y Lewis M. (1988) en "Prog. Biochem. Pharmacol.", vol. 23, 119-127. Ed. Stokes G.S. y Marwood J.F. Karger, Basel.
- Mir M.A., Morgan K., Lewis M., Spurlock G., Chappell S. y Scanlon M. (1987) *Hypertension* 10, I57-I60.
- Modyanov N., Lutsenko S., Chertova E. y Efremov, R. (1991) en "The Sodium Pump: Recent Developments", vol.46 (Part. 1), 159-172. Ed. Kaplan J.H. y De Weer P. Society of General Physiologists Series, Rockefeller University Press, New York.
- Møller J.V., Andersen J.P. y Le Maire M. (1982) *Mol. Cell. Biochem.* 42, 83-107.
- Møller J.V., Lind K.E. y Andersen J.P. (1980) *J. Biol. Chem.* 255, 1912-1920.
- Montali U., Balzan S. y Ghione S. (1987) *J. Hypertens.* 5 (Suppl.5), S299-S302.
- Montali U., Balzan S. y Ghione S. (1991) *Biochem. Int.* 25, 853-859.

- Montenay-Garestier T., Aragon I., Devynck M., Meyer P. y Helene C. (1981) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 100, 660-665.
- Moore S: (1963) *J. Biol. Chem.* 238, 235-237.
- Moreth K., Kuske R., Renner D. y Schoner W. (1986) *Klin. Wochenschr.* 64, 239-244.
- Moreth K., Renner D. y Schoner W. (1987) *Klin. Wochenschr.* 65, 179-184.
- Morgan K., Lewis M.D., Spurlock G., Collins P.A., Foord S.M., Southgate K., Scanlon M.F. y Mir M.A. (1985) *J. Biol. Chem.* 260, No.25, 13595-13600.
- Morris J.F., Poston L., Wolfe C.D. y Hilton P.J. (1988) *Clin. Sci.* 75, 577-579.
- Mullins L.J., Requena J. y Wittembury J. (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 1847-1851.
- Mulvany M.J. (1984) *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 6 (Suppl.1) S82-S87.
- Mulvany M.J. (1985) *J. Hypertens.* 3, 429-436.
- Munkonge F., East J.M. y Lee A.G. (1989) *Biochim. Biophys. Acta* 979, 113-120.
- Nagy A.K., Shuster T.A. y Delgado-Escueta A.V. (1986) *J. Neurochem.* 47, No.3, 976-986.
- Nakamoto R.K. y Inesi G. (1984) *J. Biol. Chem.* 259, 2961-2970.
- Naomi S., Graves S., Lazarus M., Williams G.H. y Hollenberg N.K. (1991) *Am. J Hypertens.* 4, 795-801.
- Niggli V., Adunyah E.S., Penniston J.T. y Carafoli E. (1981) *J. Biol. Chem.* 256, 395-401.
- O'Neal S.G., Rhoads D.B. y Racker E. (1979) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 89, 845-850.
- Okada K., Caramelo C., Tsai P. y Schreier R.W. (1990) *J. Clin. Invest.* 86, 1241-1248.
- Olivera A., López-Rivas A. y López-Novoa J.M. (1992) *Biochem. J.* 282, 871-876.
- Orlov S.N., Pokudin N.I. y Postnov Y.V. (1983) *Pflügers Arch.* 397, 54-56.
- Orlov S.N. y Postnov Y.V. (1982) *Clin. Sci.* 63, 281-284.
- Ottolenghi P. (1979) *Eur.J.Biochem.* 99, 113-131.
- Overbeck H.W., Pamnani M.B., Akera T., Brody T.M. y Haddy F.J. (1976) *Circ. Res.* 38(suppl 2), 48-52.
- Palombo C., Marabotti C., Genovesi-Ebert A., Del Chicca M.G., Balzan S., Giaconi S., Fommei E., Gazzetti P., Clerico A. y Ghione S. (1986) *J. Hypertens.* 4 (Suppl.5), S461-S464.
- Pamnani M.B., Buggy J., Huot S.J. y Haddy F.J. (1981) *Clin. Sci.* 61, 57S-60S.
- Pamnani M.B., Burris J.F., Jemionek J.F., Huot S.J., Price M., Freis E.D. y Haddy F.J. (1989) *Am. J. Hypertens.* 2(7), 524-531.
- Pamnani M.B., Clough D.L., Huot S. y Haddy F.J. (1980) *Clin. Sci.* 59, 179S-181S.

- Pamnani M.B., Huot S., Buggy J., Clough D.L. y Haddy F.J. (1981) *Hypertension* 3, No.6., 96-101.
- Pandiella A., Magni M. y Meldolesi J. (1989) en "Recent Advances in Basic and Clinical Neuroendocrinology", 55-64. Ed. Casanueva F.F. y Dieguez C. Elsevier Science, Amsterdam. 55-64.
- Pasteels J.M., Dalozé D., Van Dorsser W. y Roba J. (1979) *Comp. Biochem. Physiol.* 63C, 117-121.
- Pedemonte C.H. y Kaplan, J.H. (1991) en "The Sodium pump: Recent Developments", vol.46 (Part. 2) 309-312. Ed. Kaplan J.H. y De Weer P. Society of General Physiologists Series, Rockefeller University Press, New York.
- Pernollet M.G., Ali R.M., Meyer P. y Devynck M.A. (1986) *J. Hypertens.* 4 (Suppl.6), S382-S384.
- Pershad Singh H.A. y McDonald J.M. (1980) *J. Biol. Chem.* 255, 4087-4093.
- Petretski J.H., Wolosker H. y de Meis L. (1989) *J. Biol. Chem.* 264, No.34, 20339-20343.
- Pick U. y Bassilian S. (1981) *FEBS Lett.* 123, 127-130.
- Pick U. y Karlisch S.J.D. (1982) *J. Biol. Chem.* 257, 6120-6126.
- Postnov Y.V. y Orlov S.N. (1984) *J. Hypertens.* 2, 1-6.
- Postnov Y.V., Orlov S.N., Reznikova M.B., Rjazhsky G.G. y Pokudin N.I. (1984) *Clin. Sci.* 66, 459-465.
- Postnov Y.V., Orlov S.N., Shevchenko A. y Adler A.M. (1977) *Pflügers Arch.* 371, 263-269.
- Poston L. (1987) *Clin.Sci.* 72, 647-655.
- Poston L. (1990) *Cardiovasc. Drugs Ther.* 4 (Suppl.2), 351-356.
- Poston L., Morris J.F., Wolfe C.D. y Hilton P.J. (1989) *Clin. Sci.* 77, 189-194.
- Poston L., Sewell R.B. y Wilkinson S.P. (1981) *Br. Med. J.* 282, 1267-1269.
- Pottel H., Van Der Meer W. y Herreman W. (1983) *Biochim. Biophys. Acta* 730, 181-186.
- Quamme G.A., Hwang P., Friesen H.G. y Dirks J.H. (1976) *J. Physiol. Pharmacol.* 54, 561-576.
- Quinn P.J., Madden T.D. y King M.D. (1981) *Biochem. Soc. Trans.* 9, 243-244.
- Rahamimoff H. y Abramovitz E. (1978) *FEBS Lett.* 92, 163-167.
- Rahamimoff H. y Spanier R. (1984) *Biochim. Biophys. Acta* 773, 279-289.
- Rasgado-Flores H., Santiago E.M. y Blaustein M.P. (1989) *J. Gen. Physiol.* 93, 1219-1241.
- Rauch A.L. y Buckalew V.M., Jr. (1988) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 150, No.2, 648-654.
- Rayson B.M. (1988) *J. Biol. Chem.* 263, 11056-11058.
- Reeves J. y Sutko J.L. (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 590-594.

- Reeves J.P. (1991) en "*Cellular Calcium. A Practical Approach*", 283-298. Ed. McCormack J.G. y Cobbold P.H. Oxford University Press, New York.
- Rega A.F. and Garrahan P.J. (1986) en "*The Ca²⁺ Pump of Plasma Membranes*". CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida.
- Rink T.J., Tsien R.V. y Pozzan T. (1982) *J. Cell Biol.* 95, 189-196.
- Riollet S. y Champeil P. (1987) *Analytical Biochemistry* 162, 160-162.
- Robinson A.G., Michelis M.F., Warms P.C. y Davis B.B. (1974) *J. Clin. Endocr.* 39, 913-918.
- Robinson B.F. (1984) *J. Hypertens.* 2, 453-460.
- Rooney E.K. y Lee A.G. (1983) *Biochim. Biophys. Acta* 732, 428-440.
- Sanchez-Armass S. y Blaustein M.P. (1987) *Am. J. Physiol.* 252, C595-C603.
- Sandermann H. (1978) *Biochem. Biophys. Acta* 515, 209-237.
- Sandermann H. (1983) *Trends Biochem. Sci.* 8, 408-411.
- Scarpa A., Baldassare J. e Inesi G. (1972) *J. Gen. Physiol.* 60 (6), 735-749.
- Schaffer W.T. y Olson M.S. (1976) *J. Neurochem.* 27, 1319-1325.
- Schatzmann H.J. (1953) *Helv. Physiol. Pharmacol. Acta* 11, 346-354.
- Schatzmann H.J. y Roelofsen B. (1977) *FEBS. Symp.* 42, 389-400.
- Schoner W. (1991) *TIPS* 12, 209-211.
- Schoner W., Heidrich-Lorsbach E., Kirch U., Ahlemeyer B. y Sich B. (1993) *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 22 (Suppl.2), S29-S31.
- Schoner W., Moreth K., Kuske R. y Renner D. (1986) en "*Cardiac Glycosides 1785-1985. Biochemistry, Pharmacology, Clinical Relevance*", 135-142. Ed. Erdmann E., Greef K. y Skou J.C. Springer-Verlag, Heidelberg.
- Schuurmans F.M.A.H. y Bonting S.L. (1981) en "*Membrane Transport*". Cap. 6. Ed. Bonting S.L. y de Pont, J.J.H.H.M. Elsevier, Amsterdam.
- Schwartz A., Lindenmayer D.E. y Allen J.C. (1975) *Pharmacol. Rev.* 27 (1), 3-134.
- Scriabine A. y Kazda S. (1989) *Magnesium* 8, 253-265.
- Secombe D.W., Pudek M.R., Humphries K.H., Matthewson B., Taylor G.P., Jacobson B.E. y Whitfield M.P. (1989) *Biol. Neonate* 56 (3), 136-146.
- Seda H.W.M., Gove C.D., Hughes R.D. y Williams R. (1984) *Clin. Sci.* 66, 415-420.
- Sedlakova E., Prusik Z. y Skopkova J. (1974) *Eur. J. Clin. Invest.* 4, 285-292.
- Seidler N.W., Istvan J., Vegh M. y Martonosi A. (1989) *J. Biol. Chem.* 264 (30), 17186-17823.

- Sha'afi R.I., Rich G.T., Mikulecky D.C. y Solomon A.K. (1970) *J. Gen. Physiol.* 55, 427-436.
- Shaikh I.M., Lau B.W.C., Siegfried B.A. y Valdes R.Jr. (1991) *J. Biol. Chem.* 266, 13672-13678.
- Shull G.E. y Greeb J. (1988) *J. Biol. Chem.* 263, 8646-8657.
- Shull G.E., Schwartz A. y Lingrel J.B. (1985) *Nature* 316, 691-695.
- Shull G.E., Lane L.K. y Lingrel J.B. (1986) *Nature* 321, 429-431.
- Simmonds A.C., East J.M., Jones O.T., Rooney E.K., McWhirther J. y Lee A.G. (1982) *Biochim. Biophys. Acta* 693, 398-406.
- Skou J.C., Butler K.W. y Hansen O. (1971) *Biochim. Biophys. Acta.* 241, 443-461.
- Skou J.C. y Esmann M. (1992) *J. Bioenerg. Biomembr.* 24, No.3, 249-261.
- Smith S. y Agustine G. (1988) *TINS* 11, 458-464.
- Sokolove P.M., Albuquerque E.X., Kauffman F.C., Spande T.F. y Daly J.W. (1986) *FEBS Lett.* 203, No.2, 121-126.
- Songu-Mize E. y Bealer S.L. (1993) *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 22 (suppl.2), S4-S6.
- Songu-Mize E., Bealer S.L. y Caldwell R.W. (1982) *Hypertension* 4, 575-580.
- Sorensen R.G. y Mahler H.R. (1981) *J. Neurochem.* 37, 1407-1418.
- Sorensen R.G. y Mahler H.R. (1982) *J. Bioenerg. Biomembr.* 14, 527-547.
- Sorimachi M. (1983) *Japan. J. Phys.* 33, 1061-1066.
- Stefanova H.I., East J.M. y Lee A.G. (1991) *Biochim. Biophys. Acta* 1064, 329-334.
- Steward P.S., MacLennan D.H. y Good D.S. (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78, 4828-4832.
- Stitch S.R., Toumba J.K., Groen M.B., Funke C.W., Leemhuis J., Vink J. y Woods G.F. (1980) *Nature* 287, 738-740.
- Stokes D.L. y Green N.M. (1990) *J. Mol. Biol.* 213, 529-538.
- Sugiyama T., Yoshizumi M., Takaku F., Urabe H., Tsukakoshi M., Kasuya T. y Yazaki Y. (1986) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 141, 340-345.
- Sugiyama T., Yoshizumi M., Takaku F. y Yazaki Y. (1990) *J. Hypertens.* 8, 369-375.
- Tada M., Yamamoto T. y Tonomura Y. (1978) *Physiol. Rev.* 58, 1-79.
- Takaya J., Lasker N., Bamforth R., Gutkin M., Byrd L.H. y Aviv A. (1990) *Am. J. Physiol.* 258 (6 Pt 1), C988-C994.
- Tamura M., Harris T.M., Higashimori K., Sweetman B.J., Blair I.A. y Inagami T. (1987) *Biochemistry* 26, 2798-2807.

- Tamura M., Konishi F. y Inagami T. (1993) *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 22 (Suppl.2), S47-S50.
- Tamura M., Kuwano H., Kinoshita T. y Inagami T. (1985) *J. Biol. Chem.* 260, 9672-9677.
- Tamura M., Lam T. y Inagami T. (1988) *Biochemistry* 27, 4244-4253.
- Teruel J.A. y Gómez-Fernández J.C. (1986) *Biochim. Biophys. Acta* 836, 178-184.
- Timasheff S.N. y Townd R. (1969) en "*Principles and Physical Techniques of Protein Chemistry*", 147-212. Ed. Leach S.J. Academic Press, New York.
- Tsuda K., Shima H., Takeda J., Kimura K., Nishio I. y Masuyama Y. (1992) *J. Hypertens.* 10, 657-661.
- Toll L. y Howard B.D. (1978) *Biochemistry* 17, 2517-2523.
- Tymiak A.A., Norman J.A., Bolgar M., DiDonato G.C., Lee H., Parker W.L., Lo L.-C., Berova N., Nakanishi k., Haber E. y Hauptert Jr.,G.T. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 8189-8193.
- Vanbreemen C., Aaronson P. y Loutzenhiser R. (1979) *Pharmacol. Rev.* 30, 167-208.
- Vasdev S., Longerich L., Johnson E., Brent D. y Gault M.H. (1985) *Res. Com. Chem. Pathol. Pharmacol.* 49, 387-399.
- Vasdev S.C., Longerich L., Prabhakaran V.M., Triggle C.R. y Gault M.H. (1989) *Clin. Biochem.* 22, 313-319.
- Vasdev S.C., Longerich L.L., Ittel T.H., Johnson E., Barrowman J.A. y Gault M.H. (1986) *Clin. Invest. Med.* 9, 201-208.
- Verma A.K. y Penniston J.T. (1981) *J. Biol. Chem.* 256, 1269-1275.
- Vezzoli G., Elli A.A., Tripodi G., Bianchi G. y Carafoli E. (1985) *J. Hypertens.* 3, 645-648.
- Vilsen B. y Andersen J.P. (1988) en "*The Ion Pumps: Structure, Function, and Regulation*", 147-154. Ed. Stein W.D. Alan R. Liss, Inc., New York.
- Vilsen B., Andersen J.P., Petersen J. y Jorgensen P.L. (1987) *J. Biol. Chem.* 262 (22), 10511-10517.
- Wallick E.T. y Schwartz, A. (1988) en "*Methods in Enzimology*", 202-213. Ed. Colowick S.P. y Kaplan N.O. Academic Press, New York.
- Wang K.K.W., Villalobo A. y Roufogalis D. (1992) *Trend Cell Biol.* 2, 46-52.
- Warren G.B., Monslay .D., Metcalfe J.C. y Birdsall N.J.M. (1975) *Nature* 255, 684-687.
- Warren G.B., Toon P.A., Birdsall N.J.M., Lee A.G. y Metcalfe J.C. (1974) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78, 795-799.
- Wechter W.J. y Benaksas E.J. (1990) *Progress in Drug Research* 34, 231-260.
- White H.D., Coughlin B.A. y Purich D.L. (1980) *J. Biol. Chem.* 255, 486-491.
- Wuytack F., De Schutter G. y Casteels R. (1981) *FEBS Lett.* 129, 297-300.

Wuytack F. y Raeymaekers L. (1992) *J. Bioenerg. Biomembr.* 24, No.3, 285-300.

Yamaji I., Kikuchi k., Nishimura M., Nozawa A., Hasegawa T., Kobayakawa H., Komura H. y Limura O. (1990) *Am. J. Hypertens.* 3, 176-181.

Yoshikawa W., Akutsu H. y Kyogoyu Y. (1983) *Biochim. Biophys. Acta* 735, 397-406.

Young E.W., Bukoski R.D. y McCarron D.A. (1990) en "*Hypertension: Pathophysiology, Diagnosis, and Management*", 977-987. Ed. Laragh J.H. y Brenner B.M. Raven Press, New York.

Zemel M.B. y Sowers J.R. (1990) en "*Hypertension: Pathophysiology, Diagnosis, and Management*", 547-563. Ed. Laragh J.H. y Brenner B.M. Raven Press, New York.

Zidek W., Rustemeyer T., Schuluter W., Karas M., Kisters K. y Grafe U. (1992) *Clin. Sci.* 82, 659-665.

Zoccarato F. y Alexandre A. (1986) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 136, 906-913.

APENDICE I

APENDICE I

Origen	Aislamiento (1 ^{er} paso)	UV	PM	Péptido	DLS	Estable hidrólisis ácida-calor	Despl. ouabaína	Inhibición Na ⁺ ,K ⁺ -ATPasa	Actividad <i>in vivo</i>	Otras	Lab.
Orina urémicos	F4 (G-25)	sí	<500	no					Natriurético vasopresor		Wechter Beneksas
Orina hipertensos/ Hemodializado	Cromat. Flash (C-18)		<500	no	sí		sí	sí	Natriurético	Esteroides?	Cloix Endalina
Orina hipertensos	Hidrol. Glucuron.; XAD-2	240	252.3	no				sí	no	C ₁₅ H ₂₄ O ₃ Gluco-Sesquiterpeno	Chayen Urodiolona
Orina E.V./plasma perros	XAD-2	no 220	340 780	no	suave sí	no	sí	sí		ODC1 ODC2	Goto
Hipotálamo Orina y suero E.V. (humana,perros, ratas)	F4 (G-25)		<1000	sí	sí		sí	sí	natriurético?	2 Tetrapeptidos; Fluoresc. a pH 9	Kramer
Orina humana Suero humano Líquido amniótico	F4 (G-25)		≈400 ≈200	no no	sí sí	no sí				Neutro; Unido a proteína	Graves
Plasma humano & plasma de perro E.V.	Delipidado; Cromatogr. RP			no	sí	no	sí	sí			Bukalew Endoxina

Plasma humano- Expansión de volumen	Diálisis; Extracción metanol; C-18	220	584,64	no	no	no	sí	sí	Kaliurético Cardiotónico	Isómero ouabaína	Hamlyn
Plasma humano (desproteínizado)	Prep.C-18	no	<2000		sí	sí	sí	sí		3 picos activos	Kelly y Smith
Suero cordón umbilical				sí			sí				Diamandi
Suero cordón umbilical	Sep-pack C-18	sí	467	no?						Eflujo de Na ⁺ en leucocitos	Poston y Hilton
Plasma de ratas- DOCA	G-25 (F4)			no	sí	sí		sí			Kojima
Hipotálamo (rata)	Extracción acetona	no	<500	no	sí	sí		sí		Estimula G6PD; Insoluble CHCl ₃	de Wardener
Hipotálamo bovino	Extracto acuoso; gel lipofílico; intercambio iónico	no	<500	no	no	sí	sí	sí	sí Inotró- pico	zwitterion Isómero ouabaína	Hauptert
Cerebro rata	Extracción Metanol; C-18			sí	sí		sí	sí	Contracc. músculo cardíaco		Lichstein
Células hipotalámicas (fetos de rata)	G-15	200	1648	sí		no	sí	sí	Contracc. músculo liso	9/13 aa secuen- ciados	Mir Inhibina

Adrenal bovina; Plasma-Expansión de volumen	Extrac. metanol; Cromat. RP	no	<350	no	sí	no	sí	sí		2 aislados metanol; soluble agua	Inagami Tamura
Líquido cefalorraquídeo (humano)	Ultrafiltra- ción; C-18		≈ 600	sí			sí	sí		neuropé- tido?	Halperin
Síntesis química			494	no			sí		Natriuré- tico	3β-gluco- 14-β-OH- progeste- rona	LaBella
Hipotálamo	Síntesis	288	288,4	no		sí		no	2-OH Natriuré- tico	catecol- estrógeno (2- y 4- estradiol)	
	Bufofalina Ouabage- nina							sí sí	Efecto presor		Haddy
Plasma bovino						sí	sí	sí		11,13- dihidroxi- 14-octade- canoico	Lichstein
Hemofiltrado pacientes urémicos/ Gl. adrenal	XAD-2		582	no	sí			sí		Aumento [Ca ²⁺] _i Similar ouabaína	Schoner
Orina humana	XAD-2		780,92	no	sí		sí	sí	Cardiotó- nico Kaliuré- tico	Isómero Digoxina	Goto

APENDICE II

APENDICE II

COMPUESTO	DISOLVENTE	λ (nm)	Tr (min)
AZUCARES	Agua		
L(+)-Arabinosa		206	
D(+)-Galactosa		218	
D(+)-Glucosa		206	
Maltosa		207	
L-Ramnosa		206	
D(+)-Xilosa		207	
DIGITALICOS	Etanol		
Acetil Estrofantidina		221	
Acetil Digitoxina		213	
D(+)-Digitoxosa		203	
Digitonina		205	
Digoxina		221	19
Estrofantidina		220	
Estrofantidol		223	
Estrofantina K		217	
Gitoxina		207,218	
Oleandrogenina		223	
Ouabaína		220	5,2
Oleandrina		218	
GENINAS	DMSO		
3-Acetato de Gitoxigenina		259	
Bufalina		305	
Cimarina		259,310	
Convallatoxina		261	
Digitoxigenina		259	
3,12-Diacetato de Digoxigenina		260	
3,16-Diacetato de Gitoxigenina		259	
Gitoxigenina		259	
Gitoxigenina		264,383	
Hormalina		260	
Helvelicósido		260	
Ouabagenina		260	
Tomatidina		287,344	
Tomatina		262	
Yohimbina		284,294	
LIPIDOS	Metanol		
Araquidónico		206,230,268	
Esteárico		205,262	
L- α -Fosfatidilcolina, β -acetil- γ -oleil		207,286	
L- α -Fosfatidilcolina, β -araquidonoil- γ -estearoil		218,248,324	

L- α -Fosfatidilcolina, dioleil	207,284
L- α -Fosfatidilcolina, diaraquidoil	205,216
L- α -Fosfatidilcolina, β -estearoil- γ -oleil	206
L- α -Fosfatidilcolina, β -palmitoil- γ -oleil	206
L- α -Lisofosfatidilcolina, oleil	207
L- α -Fosfatidiletanolamina, dioleil	205
L- α -Lisofosfatidiletanolamina, oleil	207
Mirístico	204
Linoléico	214,236
Palmítico	205,218,262

ESTEROIDES

	Metanol	
Acetato de cortisol	242	
Acetato de cortisona	204,240	25,5
Acetato de clormadinona	210,288	35,3
3-Acetato de deshidroisoandroterona	213,296	
Acetato de liproterona	281	
Acetato de 6- α -metil-7- α -hidroxiprogesterona	206,242	
Acetato de testosterona	240	
D-Aldosterona	240	15,7
Androsterona	205,222,292	
Canrenona	283	
Colesterol	209	
Corticosterona	204,244	
Cortisona	238,285	
Cortisol	243	
Deshidroisoandrosterona	212,294	27
Desoxicorticosterona	204,240	
Estriol	210,282	25,15
Estradiol	209,282	15,46
Estrona	240,281	27,4
	(Cloroformo)	
Epiandrosterona	204,294	
3-Glucurónido deshidroisoandrosterona	214,296	
2-Hidroxiestrona	205,273,291	27,6
4-Hidroxiestradiol	213,284	23,85
2-Hidroxiestriol	205,273,291	11
17- α -Hidroxiprogesterona	243	
18-Hidroxicorticosterona	241	
17-Isoaldosterona	203,240	
17- α -Metil-testosterona	240	
2-Metoxiestrona	211,288	28
Progesterona	244	
Tetrahidrocortisona	206,298	

Testosterona		240	
3-sulfato-deshidroisodroandrosterona		211,296	
ACIDOS BILIARES	Metanol		
Glicocólico		206,280	
Quenodeoxicólico		205,220	
Glicoquenodeoxicólico	(Acetonitrilo/agua) (65:35)	204,224	
LIGNANOS	Acetonitrilo		
Cubebina		207,236,289	29
4-Desoxiisodiphyllina		202,257,308,352	31
Helioxantina		202,219,267	35
Isodiphyllina		202,230,267,311,355	29
Justicidina E	(Metanol)	206,288	35
Matairesinol dimetiléter		210,233,282	28
7-O-Metilkonyanina		202,288	28
Sesamina		210,238,288	33
AMINOACIDOS			
L-Fenilalanina	Agua	208,258	
L-Histidina	Agua	206	
L-Triptófano	Agua	218,274,280,290	6
	Metanol	223,276,282,291	
L-Tirosina	Agua	223,275	4,75
	Metanol	203,226,278	
CATECOLAMINAS E INTERMEDIARIOS	Agua		
Adrenalina		205,282	3,2
Acido Mandélico		205,260	6,4
DL-Acido Mandélico etil éster		210,258	13,2
DL-Acido Mandélico metil éster		210,258	9,7
Acido Homovanílico		205,280,224	6,7
Alcohol Homovanílico		207,280	6,2
Dopamina		205,282	4,6
L-DOPA		208,282	4,6
DOPAC		207,282	5,2
DL-Metanefrina		205,228,280	4,6
3-Metoxitiramina		207,224,280	4,9
Noradrenalina		207,282	3,1
DL-Normetanefrina		207,228,280	4,5
4-Hidroxi-3-Metoxifenil glicol		207,228,280	4,7
ACIDOS	Agua		
Ascórbico		252	
m-Hidroxibenzoico		212,235,294	
p-Hidroxibenzoico		204,254	7,25
o-Hidroxifenilacético		217,274	7,46
p-Hidroxifenilpirúvico		224,280	5,5
p-Hidroxifenil láctico		224,276	5,3

OTROS

DL-Tironina	Agua	209,230,282	11,78
D-Tiroxina	Metanol	213,226,303	26,2
Bilirrubina	Cloroformo	242,454	
Lipopolisacárido	Agua	204,260	
HHIF	Agua	274	39
	Metanol	209,277	