

150
2ej



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

**"Caracterización Cinética del Efecto del Colesterol
Sobre la Actividad Hidrolítica de la
ATPasa - (Ca²⁺, Mg²⁺) de Sarcolema
Cardíaco de Res"**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
B I O L O G O
P R E S E N T A :
DAVID OLIVARÉS VILLAGOMEZ

México, D. F.

FALLA DE ORIGEN

1991.



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

INDICE

Resumen.....	(1)
1. Introducción.	
1.1 Membranas Biológicas.....	(3)
1.2 Catalizadores Biológicos.....	(10)
1.3 La ATPasa-(Ca²⁺, Mg²⁺) de membrana plasmática.....	(13)
1.3.1 Revisión histórica de la ATPasa-(Ca ²⁺ , Mg ²⁺).....	(15)
1.3.2 Proteínas que unen calcio.....	(18)
1.3.3 Propiedades de la ATPasa-(Ca ²⁺ , Mg ²⁺).....	(19)
1.3.4 Transporte de Ca ²⁺	(20)
1.3.5 Hidrólisis de ATP.....	(22)
1.3.6 Otras propiedades de la ATPasa-(Ca ²⁺ , Mg ²⁺).....	(24)
1.3.7 Acoplamiento entre el transporte de Ca ²⁺ y la hidrólisis de ATP.....	(25)
1.3.8 Los pasos elementales para la hidrólisis de ATP.....	(26)
1.3.9 Modelos para el transporte de Ca ²⁺	(30)
1.3.10 El Magnesio y otras especies iónicas que regulan la actividad de la enzima.....	(32)
1.3.11 Genética molecular de la ATPasa-(Ca ²⁺ , Mg ²⁺).....	(33)
1.4 El colesterol. Propiedades y efectos.....	(37)
1.4.1 Generalidades.....	(37)
1.4.2 Presencia en la célula.....	(37)
1.4.3 Modulación de la fluidez de la membrana por colesterol. (39)	
1.4.4 Distribución del colesterol en la membrana.....	(40)

1.4.5	Control de la fluidez de la membrana por la distribución de la molécula de colesterol.....	(43)
1.4.6	Regulación de las funciones de membrana por colesterol.(44)
1.4.7	El papel del colesterol en las funciones celulares.....	(45)
1.4.8	Modulación del funcionamiento de las proteínas de la membrana por colesterol.....	(46)
2.	Objetivos.....	(49)
3.	Materiales y Métodos	
3.1	Obtención y conservación de fracciones microsomales de sarcolema cardíaco de res (membranas).....	(51)
3.1.1	Procedimiento de aislamiento.....	(51)
3.1.2	Amortiguadores utilizados en el procedimiento de aislamiento de la fracción microsomal.....	(52)
3.2	Cuantificación de proteínas.....	(54)
3.3	Modulación del contenido de colesterol en lipoproteínas.....	(54)
3.3.1	Obtención de plasma sanguíneo.....	(54)
3.3.2	Enriquecimiento de plasma sanguíneo (lipoproteínas) con colesterol.....	(55)
3.3.3	Enriquecimiento de plasma sanguíneo (lipoproteínas) con fosfolípidos.....	(55)
3.4	Modulación del contenido de colesterol en las membranas.	
3.4.1	Enriquecimiento de membranas con colesterol.....	(55)
3.4.2	Extracción de colesterol de las membranas.....	(56)

3.5 Microscopía Electrónica.....(57)

3.6 Cuantificación de la actividad hidrolítica de la ATPasa-(Ca²⁺, Mg²⁺).....(57)

3.7 Cuantificación de colesterol.....(58)

3.8 Ensayo de la actividad hidrolítica de la ATPasa-(Ca²⁺, Mg²⁺)

3.8.1 Mezclas de reacción (MR) para la ATPasa-(Ca²⁺, Mg²⁺).....(59)

3.8.2 Incubación.....(59)

3.8.3 Análisis electroforético.....(61)

4. Resultados y discusión.

4.1 Cinética enzimática.....(62)

4.1.1 Ensayo de la actividad hidrolítica en ausencia de Mg²⁺ y diferentes concentraciones de Ca²⁺.....(62)

4.1.2 Ensayo de la actividad hidrolítica en presencia de Ca²⁺ y diferentes concentraciones de Mg²⁺.....(65)

4.1.3 Ensayo de la actividad hidrolítica en presencia de Mg²⁺ y diferentes concentraciones de Ca²⁺.....(65)

4.1.4 Ensayo de la actividad hidrolítica en presencia de Ca²⁺, Mg²⁺ y diferentes concentraciones de ATP(72)

4.2 Modulación del contenido de colesterol en los sistemas membranales.....(75)

4.3 Microscopía Electrónica.....(77)

4.4	Ensayo de la actividad hidrolítica a diferentes temperaturas.....	(79)
4.5	Efecto del colesterol en la cinética enzimática de la ATPasa- (Ca ²⁺ , Mg ²⁺).....	(81)
4.5.1	Cinética de temperatura. Membranas nativas vs. membranas lavadas.....	(81)
4.5.2	Cinética de temperatura. Membranas lavadas vs. membranas enriquecidas con colesterol.....	(85)
4.5.3	Cinética de actividad en función del tiempo.....	(88)
4.5.4	¿ De qué manera el colesterol influye sobre la actividad enzimática ?	(92)
4.6	Ensayo de actividad hidrolítica con concentrado de proteínas extraídas del lavado de las membranas.....	(106)
4.6.1	Respuesta enzimática.....	(106)
4.6.2	Análisis electroforético.....	(108)
5.	Conclusiones.....	(111)
6.	Referencias.....	(114)

A B R E V I A T U R A S

ACAT	Acil-Co A-aciltransferasa
ADP	Difosfato de adenosina
ATP	Trifosfato de adenosina
ATPasa-Ca ²⁺ = ATPasa-(Ca ²⁺ , Mg ²⁺) = Bomba de calcio	Adenosin trifosfatasa dependiente de Ca ²⁺ y Mg ²⁺ .
Ca ²⁺	Catión calcio
Col	Colesterol
DMSO	Dimetilsulfóxido
DTT	Ditiotreitol
Ea	Energía de activación
EDTA	Acido etilén diamino tetraacético
EGTA	Acido etilénglicol bis (amino-etil-eter) N,N' tetraacético
E-P	Intermediario fosforilado
H ⁺	Protón
HEPES	Acido N-2Hidroxi-etil-pi- peracina-N'-2-etansulfónico
K ⁺	Catión potasio
Lpp-col	Lipoproteínas-colesterol
Lpp-pl	Lipoproteínas-fosfatidil colina
Mg ²⁺	Catión magnesio
Na ⁺	Catión sodio
Pi	Fosfato inorgánico
REL	Reticulo endoplásmico liso

RER

Reticulo endoplásmico
rugoso

RS

Reticulo sarcoplásmico

SDS

Dodecil sulfato de sodio

Tris

Tris (hidroximetil) amino
metano

RESUMEN

La expulsión del Ca^{2+} de las células eucariontes ocurre mediante dos sistemas principalmente: un intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ de baja afinidad y una ATPasa específica de alta afinidad. Esta ATPasa- $(\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+})$ fue reportada por primera vez en eritrocitos hace ya más de 20 años. Ha sido caracterizada por varios laboratorios y clasificada como una ATPasa tipo P.

La calmodulina cambia la afinidad de la enzima por Ca^{2+} . Esta sensibilidad de la enzima ha permitido su purificación mediante columnas de calmodulina-sepharosa a partir de eritrocitos y otras membranas plasmáticas. La enzima pura tiene una movilidad relativa (Mr) de 140,000 KDa, forma intermediarios fosforilados y su actividad se inhibe con vanadato. La ATPasa pura, puede ser reconstituida en liposomas operando como un intercambiador $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ obligado. La ATPasa- $(\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+})$ de membrana plasmática presenta una serie de cambios conformacionales bien definidos durante su ciclo catalítico.

El colesterol es un lípido común de las membranas eucariontes que, se ha visto, tiene influencia sobre la actividad de muchas proteínas catalíticas de la célula y especialmente de proteínas de membrana.

Se ha encontrado que el colesterol regula la actividad de la ATPasa- $(\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+})$, de tal manera que al aumentar los niveles de colesterol en la sarcolema cardíaca, la ATPasa se inhibe; mientras que al extraer este lípido de las membranas la actividad se estimula.

Con la intención de tener una mayor comprensión acerca del papel del colesterol en la actividad de la ATPasa- $(\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+})$ y tratando de probar la hipótesis de que el colesterol confiere estabilidad térmica a proteínas membranales, se estudió el efecto del colesterol en la

estabilidad térmica de la ATPasa-(Ca²⁺, Mg²⁺) de sarcolema cardiaco. Los resultados obtenidos señalan que, un aumento en los niveles de colesterol en las membranas protege a la enzima contra la inactivación térmica. Los datos sugieren una correlación positiva entre el contenido de colesterol en las membranas y la estabilidad térmica de esta enzima.

Algunos estudios en nuestro laboratorio, con el fin de encontrar posibles cambios en la estructura de la proteína inducidos por colesterol, han demostrado que la Km para ATP no cambia, mientras que la Vmax disminuye al aumentar el contenido del esteroles en las membranas.

El hallazgo de un factor de naturaleza proteica aparentemente asociado con la actividad enzimática, constituye un punto novedoso e importante en el presente trabajo y constituye el punto de partida de la continuación de esta investigación.

1. INTRODUCCION

1. Membranas Biológicas.

Las funciones que llevan a cabo las membranas biológicas, son indispensables para la vida. La membrana plasmática, confiere la individualidad celular, distinguiendo a ésta de su medio ambiente (1). La membrana plasmática es una barrera permeable altamente selectiva; contiene distintos tipos de proteínas (receptores, canales, bombas, transductores de energía, enzimas, etc.) que llevan a cabo los procesos de intercambio de materia con el entorno (2).

Las membranas son estructuras laminares típicamente con un espesor de 75 Å. Cumplen con una gran variedad de funciones: en algunos casos generan señales químicas o eléctricas que son indispensables para la comunicación; contienen receptores específicos que le indican, por ejemplo, a la bacteria la dirección hacia zonas ricas en nutrientes, median la respuesta de células blanco ante hormonas, constituyen la estructura celular en la cual se inicia el proceso de percepción de la luz, etc. Estas funciones, así como cientos más, constituyen parte del papel que juega la membrana en la fisiología celular (3).

Los dos procesos más importantes de conversión energética en los sistemas biológicos son llevados a cabo por sistemas membranales: En la membrana interna de la mitocondria se lleva a cabo la síntesis de ATP, proceso denominado fosforilación oxidativa. La fotosíntesis, en la cual la luz es transformada a enlaces químicos energéticos, se lleva a cabo en las membranas internas de los cloroplastos (3).

Las membranas biológicas son tan diversas en función como en estructura.

Modelo de membrana

El modelo de membrana más aceptado es el denominado como de mosaico fluido (2). Este modelo postula que las membranas están constituidas por una bicapa de fosfolípidos en la cual se encuentran embebidos los otros elementos de la membrana como son proteínas, azúcares, otros lípidos, etc. La figura 1.1 muestra un esquema de la disposición de los elementos membranales en el modelo de mosaico fluido.

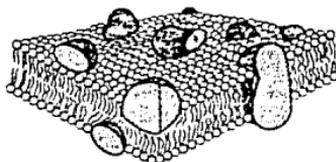


Figura 1.1 Modelo de mosaico fluido de membrana.

Las membranas están constituidas principalmente por lípidos, proteínas, carbohidratos y agua, la cual constituye aproximadamente el 20% del peso total.

Los componentes lipídicos de la membrana comparten características comunes; son moléculas anfipáticas, lo que significa que coexiste una región hidrofóbica y una región hidrofílica en la misma molécula. Los fosfolípidos presentan cadenas de ácidos grasos esterificadas a un grupo glicerol y a un grupo alcohol polar que se denomina cabeza del fosfolípido. Esta cabeza se orienta en la bicapa hacia el ambiente acuoso, mientras que las colas hidrofóbicas permanecen en la región

interna de la bicapa. En la figura 1.2 se muestran los principales lípidos que constituyen a las membranas biológicas (2).



Figura 1.2 Estructura de los principales lípidos de la membrana.

Las proteínas de membrana se clasifican en dos grandes grupos con base en los métodos que se requieren para disociarlas de la bicapa. La primer clase se denomina como proteínas periféricas o extrínsecas, las cuales, se liberan al sobrenadante cuando las membranas se lavan en amortiguadores de diferente pH o diferente fuerza iónica. El segundo grupo de proteínas de membrana se designa como integrales, estructurales o intrínsecas, las cuales pueden ser aisladas después de destruir la bicapa lipídica (2).

Una característica importante de las membranas es su estado físico. Un concepto importante que se ha desarrollado para estudiar a los sistemas membranales es el de fluidez de membrana. La fluidez es un término que refleja el grado de viscosidad de la membrana. La viscosidad se determina por la movilidad de los componentes de la membrana en el plano de la misma. La relación entre viscosidad y

fluidez es inversa: a mayor viscosidad, existirá menor fluidez y por lo tanto menor movimiento de los componentes de la membrana (2).

Los lípidos de la membrana son los componentes responsables de la fluidez. Una característica importante de los fosfolípidos es que es que pueden existir en la membrana en un estado denominado como líquido cristalino, con libertad de movimiento en las dos dimensiones de la bicapa. Los fosfolípidos presentan un cambio de fase, de un arreglo rígido, más ordenado y menos fluido conocido como estado gel, a un estado de líquido cristalino. El estado gel se presenta a bajas temperaturas. El cambio en el arreglo se conoce como transición de fase y se presenta a una temperatura determinada dependiendo de la naturaleza del fosfolípido, esta temperatura se denomina temperatura de transición. La transición de fase en una membrana es el resultado de la suma del comportamiento de todos los fosfolípidos que la componen (2).

El ambiente normal para la mayoría de las proteínas de membrana es una bicapa lipídica. Esta provee el soporte y los requerimientos estructurales para una interacción óptima entre las proteínas de membrana y los lípidos que las rodean (4). La composición de los anillos lipídicos que rodean a las proteínas, pueden ser distintos de todos los demás lípidos que conforman la bicapa (5) (Figura 1.3).



Figura 1.3 Modelos que muestran los lípidos anulares de las proteínas integrales.

Los lípidos de la membrana crean el ambiente apropiado para el funcionamiento de las proteínas de membrana. Estas proteínas en las membranas plasmáticas constituyen aproximadamente el 50% de su composición. Con respecto a su localización en la bicapa, las proteínas se clasifican en dos grupos: integrales y periféricas. Las primeras interactúan directamente con las cadenas hidrocarbonadas de los lípidos. Las proteínas periféricas se asocian a la membrana de una manera superficial, mediante puentes de hidrógeno e interacciones electrostáticas (6).

Las membranas son soluciones 'bidimensionales' de proteínas y lípidos. De hecho se considera a la bicapa como un solvente para las proteínas estructurales (3).

En las membranas la matriz lipídica se encuentra en una condición fluida, en la cual, los lípidos están arreglados por arriba de su temperatura de transición (T_m) y tienen la capacidad de difundir a lo largo de la bicapa. Se ha sugerido que las proteínas estructurales presentan una envoltura de lípidos inmóviles que regulan su actividad. Con base en lo anterior, se puede señalar que , un complejo lípido-proteína difunde lateral y continuamente en la bicapa (7,8). Los fosfolípidos constituyen una gran barrera al flujo de moléculas polares (9,10).

Las membranas son asimétricas puesto que las proteínas integrales no presentan una rotación de una cara de la bicapa a la otra. Constituyen estructuras fluidas, en las cuales, los lípidos y las proteínas difunden fácilmente, excepto cuando las proteínas están ancladas a regiones específicas de la membrana, lo anterior pensando en que las proteínas tienen un anillo lipídico asociado de manera

constante. Algunas proteínas son tan móviles como los lípidos, mientras que otras son virtualmente inmóviles. Los constituyentes de la membrana se relacionan entre sí mediante interacciones no-covalentes cooperativas (3).

Los lípidos son biomoléculas insolubles en agua y solubles en solventes orgánicos. Aparte de constituir los elementos estructurales de la membrana, los lípidos son moléculas "activas" que pueden contener o modular tipos especiales de señales celulares.

Los fosfolípidos derivan del glicerol (fosfoglicéridos) o de la esfingosina (esfingolípidos). Los fosfoglicéridos están constituidos por un esqueleto de glicerol, dos cadenas de ácidos grasos (de 14 a 24 átomos de carbono de largo) y un alcohol fosforilado. En las células animales, los esfingolípidos tienen moléculas de azúcar asociadas constituyendo los glicolípidos. Los fosfolípidos y glicolípidos se unen espontáneamente en agua para reducir al máximo el número de cadenas hidrocarbonadas expuestas al ambiente polar (9,10). Las bicapas lipídicas se autosellan puesto que un espacio en la bicapa es energéticamente desfavorable.

Otro lípido importante de las membranas es el colesterol. Esta molécula se encuentra principalmente en las membranas celulares externas, mientras que en las internas, prácticamente no se presenta. Es un constituyente principal de la membrana de células eucariontes y no de los procariontes. La necesidad de O_2 para la epoxidación del escualeno (intermediario en la biosíntesis del colesterol), sugiere que el colesterol aparece en la tierra cuando la atmósfera se hace oxidante (11).

Las cadenas de los ácidos grasos de las moléculas fosfolipídicas de

membrana, pueden existir en un estado rígido y ordenado o en un estado relativamente desordenado o fluido. En el estado rígido, todos los enlaces C-C tienen una conformación Trans, mientras que en el estado fluido, algunos presentan un arreglo Cis. La transición del estado totalmente Trans al estado parcialmente gauche, ocurre abruptamente cuando la temperatura se eleva por arriba de la temperatura de transición de los lípidos (T_m). La T_m depende de la longitud de las cadenas de los ácidos grasos y de su grado de insaturación. El estado rígido se favorece con fosfolípidos saturados (3,9) (Figura 1.4).



Figura 1.4 Modelo de fosfolípidos saturados e insaturados. Estado Trans (a); estado Cis (b).

La fluidez de la membrana se ha considerado como un factor muy importante y determinante en una gran variedad de procesos membranales. Muchos organismos modulan la composición fosfolípida de sus membranas en respuesta a cambios ambientales, con el objeto de mantener las condiciones óptimas de fluidez de membrana (12,13). Para responder a los cambios ambientales, un organismo puede modular la composición lipídica y aumentar la fluidez de su membrana, reduciendo el promedio de longitud de las cadenas de los fosfolípidos o también, aumentando el promedio de insaturación de las cadenas. La disminución del contenido de colesterol en la bicapa, tendría el mismo efecto (14). En los procariontes, que carecen de colesterol, la regulación de la fluidez de membrana se da por medio de la variación en el número de

dobles enlaces, así como, de la longitud en la cadena de los ácidos grasos (3).

En los eucariontes, el colesterol es el regulador clave de la fluidez de membrana. La adición de colesterol a bicapas lipídicas en estado líquido-cristalino, produce una marcada disminución en la fluidez (14).

Esta molécula contiene un núcleo esteroide con un grupo OH en un extremo y una cadena hidrocarbonada en el otro extremo. El colesterol se inserta a la membrana con su eje más largo perpendicular a la bicapa.

Se ha generado la idea de que el colesterol puede desplazar a los lípidos que rodean a una proteína de membrana y así, modular su actividad. También se ha propuesto que la actividad de las proteínas de membrana, tales como la ATPasa-(Ca²⁺, Mg²⁺), es sensible a la composición química de los fosfolípidos que las rodean. Esta sensibilidad es tanto a las cadenas hidrocarbonadas, como a las cabezas polares de los fosfolípidos (12,13).

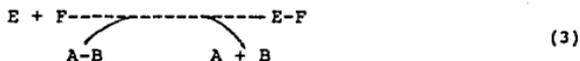
1.2 Catalizadores Biológicos.

Las reacciones químicas se clasifican en dos grupos: exergónicas (que liberan energía) y endergónicas (que absorben energía). Una célula tiene la característica de poder acoplar los dos tipos de reacciones para mantener un metabolismo basal. Así, la vida se puede resumir en un par de ecuaciones :



La reacción 1 representa a los procesos catabólicos mientras que la

segunda ecuación representa a los procesos de síntesis o anabólicos. La liberación de energía en 1 debe estar acoplada y ser útil para una reacción del tipo 3:



De esta manera, los procesos metabólicos en la célula se llevan a cabo bajo una economía y un rendimiento tan altos, que constituyen los sistemas de transformación más eficientes conocidos (15).

Los catalizadores más abundantes de los sistemas biológicos son las enzimas. Estas son 'las herramientas' que determinan el comportamiento de las transformaciones químicas. Las enzimas regulan la transformación de varias formas de energía. Las características más sobresalientes de las enzimas son, su capacidad catalítica y su especificidad. Todas las enzimas son proteínas, pero no todos los catalizadores biológicos son enzimas; se conoce ahora que las moléculas de ARN también pueden presentar actividad catalítica. Estos catalizadores se conocen como ribozimas (16).

En esencia, las enzimas catalizan las reacciones estabilizando los estados de transición, los cuales, se consideran como las especies más energéticas en las reacciones.

Las enzimas aceleran las reacciones por factores de cientos a miles de veces reduciendo la energía de activación (E_a) de la reacción. La anhidrasa carbónica es una de las enzimas más rápidas que se conocen; cada enzima puede hidratar hasta 10^5 moléculas de CO_2 por segundo (3).

Las enzimas son altamente específicas, tanto en la reacción que catalizan, como en la elección de los reactantes o sustratos (17). La catálisis de las enzimas puede estar regulada por varios factores,

entre otros (3,15):

-Interacción alostérica. Una molécula reguladora se une a la enzima a un sitio distinto al catalítico.

-Proteínas reguladoras. Polipéptidos que se unen a sitios específicos de la enzima para su activación o inhibición.

-Modificación covalente. Consiste en la fosforilación de un residuo específico.

-Activación proteolítica. Los precursores de enzimas o zimógenos presentan hidrólisis en enlaces peptídicos específicos, lo que resulta en una conversión irreversible de una enzima inactiva a una enzima activa.

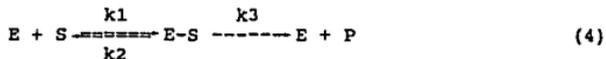
Otros factores que determinan la actividad de los catalizadores biológicos son, la temperatura, la fuerza iónica y el pH (15,17).

Las enzimas pueden adquirir conformaciones que son complementarias a los estados de transición de las reacciones que catalizan. En las reacciones bioquímicas, la energía de los reactivos se transforma con gran eficiencia.

En una enzima el sitio activo presenta residuos que intervienen directamente en la formación y ruptura de los enlaces químicos; estos residuos se conocen como grupos catalíticos. El sustrato se une a la enzima por medio de múltiples uniones débiles (puentes de hidrógeno, interacciones electrostáticas, fuerzas van der Waals e interacciones hidrofóbicas); para interactuar con el sitio catalítico, debe de tener una conformación especial y específica (3,15).

En la cinética enzimática, la velocidad de catálisis es dependiente de la concentración de sustrato cuando la concentración del mismo es baja; cuando la concentración del sustrato es alta, la velocidad de la

reacción tiende a ser independiente de dicha concentración. En 1913 Michaelis y Menten proponen un modelo que refleja este comportamiento, el cual se define por la ecuación 4 (3,15,17).



Los parámetros cinéticos más importantes son:

- Constante de Michaelis (K_m). Que refleja la afinidad de la enzima por el sustrato; es la concentración de sustrato en la cual, la mitad de los sitios activos están ocupados.

- Velocidad Máxima (V_{max}). Que refleja la velocidad máxima de la reacción cuando la enzima está completamente saturada con el sustrato.

La actividad catalítica de las enzimas puede ser regulada por inhibidores competitivos (cuando éste compite con el sustrato por el sitio activo de la enzima y, por lo tanto, cambia la afinidad) e inhibidores no competitivos (cuando éste no compite por el sitio activo, pero sí cambia la velocidad de la reacción).

1.3 La ATPasa-(Ca^{2+} , Mg^{2+}) de membrana plasmática.

La regulación del movimiento de Ca^{2+} a través de la membrana plasmática es de suma importancia para la integridad celular. La importancia de este catión radica fundamentalmente en que un aumento de su concentración interna es la señal que utilizan las células para disparar una gran variedad de eventos y procesos intracelulares, los cuales, culminan en distintas respuestas fisiológicas, tales como: la liberación de neurotransmisores, la modulación de la respuesta a estímulos nerviosos, el mantenimiento del potencial y el gradiente electroquímico en la membrana celular, el control de la contracción de

músculos esqueléticos, la regulación del ritmo de contracción cardíaca y la liberación de hormonas, entre otras (18).

En las células excitables existen ciertas estructuras de naturaleza protéica por las cuales el Ca^{2+} permea através de la membrana. Estas proteínas forman canales y bombas cuya actividad es de suma importancia para la regulación homeostática de la concentración de cationes en la célula (18).

La ATPasa-(Ca^{2+} , Mg^{2+}) o ATP fosfohidrolasa transportadora de calcio (19) o adenosintrifosfatasa transportadora de calcio dependiente de magnesio, es una enzima que acopla la hidrólisis de ATP al transporte de Ca^{2+} a través de la membrana. Es un polipéptido de alrededor de 140,000 Kd. Se cree que las ATPasas de Ca^{2+} existen casi en todas las células eucariontes. Por regla general tienen una afinidad alta por Ca^{2+} y una velocidad máxima de bombeo baja, al contrario de lo que sucede con el intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$. La accesibilidad al sitio activo para Ca^{2+} y ATP se incrementa por medio de una transición conformacional de la molécula inducida por calmodulina, una proteína que funciona como un activador enzimático plurifuncional (20).

La concentración de Ca^{2+} en el citosol de células en reposo está alrededor de 10^{-7}M mientras que en el exterior, la concentración de Ca^{2+} es del orden de 10^{-3}M (18). La entrada o influjo de Ca^{2+} está favorecido por una diferencia de concentración cercana a 10^4 y un potencial de membrana negativo en el interior. La ATPasa-(Ca^{2+} , Mg^{2+}) bombea Ca^{2+} en contra de un gradiente y un potencial de membrana negativo.

La ATPasa-(Ca^{2+} , Mg^{2+}) de retículo sarcoplásmico de células

musculares es uno de los sistemas transportadores de Ca^{2+} más activos. Esta acopla la hidrólisis del ATP al transporte de Ca^{2+} desde el citoplasma hacia el interior del retículo con una afinidad muy alta.

1.3.1 Revisión Histórica de la ATPasa-(Ca^{2+} , Mg^{2+}).

En 1966, Hans J. Schatzmann, reportó el descubrimiento de la bomba de Ca^{2+} de membrana plasmática (22). En ese tiempo ya se conocía que la actividad de la bomba de Na^+ de eritrocitos humanos se inhibía con una concentración de Ca^{2+} de 100 μM . La concentración de Ca^{2+} en el plasma sanguíneo es de 3×10^{-3} M. Con base en esto, Schatzmann pensó que "obviamente el sitio sensible a Ca^{2+} debería estar localizado en la superficie interna de la membrana y, por lo tanto, la concentración intracelular de Ca^{2+} debería ser considerablemente menor que la concentración de Ca^{2+} en el plasma pues, de no ser así, la bomba de Na^+ , K^+ estaría incapacitada".

Las células rojas humanas son capaces de mantener una concentración intracelular de Ca^{2+} baja con la ayuda de un mecanismo de transporte activo para este catión. Este sistema obtiene su energía a partir de la ruptura de la molécula de ATP y opera independientemente del mecanismo de la bomba de Na^+ , K^+ . Schatzmann y Vicenzi demostraron que, cuando es transportado, el calcio activa la hidrólisis de ATP en la superficie interna de la membrana. Estas dos observaciones representan el punto de partida del conocimiento que se ha generado sobre la bomba de Ca^{2+} de membrana plasmática (21).

No fue sino hasta hace poco que se demostró la existencia de un transporte activo de Ca^{2+} mediado por ATP en la membrana plasmática de la mayoría de las células. Al tiempo que Schatzmann descubrió la bomba de Ca^{2+} de membranas de eritrocitos, se propuso que en las células de

músculo cardíaco, la energía para transportar el Ca^{2+} se genera a partir del movimiento de Na^+ hacia el interior celular, desde una concentración muy alta en el exterior, por medio de un sistema de intercambio $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$. La existencia de un sistema para expulsar Ca^{2+} del interior celular en contra de un gradiente electroquímico utilizando la energía generada por el gradiente de concentración de Na^+ , retardó por años la postulación de la existencia de una bomba de Ca^{2+} mediada por ATP (21).

Evidencias experimentales de la existencia de la enzima.

En 1976 J.D. Robinson reportó que en fracciones microsomales de cerebro de rata se registraba una actividad de ATPasa dependiente de Ca^{2+} y una acumulación de Ca^{2+} dependiente de ATP. Después de centrifugar en un gradiente de sacarosa, la actividad de la ATPasa de Ca^{2+} se distribuía junto con la actividad de la ATPasa-(Na^+ , K^+) y no así con los marcadores mitocondriales. Después de esto, Robinson sugirió que esta ATPasa podía representar un sistema de transporte de Ca^{2+} a través de la membrana plasmática neural (21).

En 1978, Cittadini y van Rossum reportaron que la expulsión de Ca^{2+} en células de hígado de rata era un proceso de transporte metabólicamente dependiente que ocurría de forma ajena al intercambio de Na^+ entre el tejido y el medio (21).

Gmaj, Murer y Kine en 1979, utilizando vesículas de riñón, encontraron un transporte de Ca^{2+} dependiente de ATP, con una K_m 0.5 μM distinguible de la entrada de Ca^{2+} a la mitocondria o al retículo endoplásmico (21).

La existencia de un transporte de Ca^{2+} dependiente de ATP en células excitables, fue demostrado en 1980 por Caroni y Carafoli (23)

trabajando con sarcolema de corazón de perro. Estos autores encontraron que existía una hidrólisis de ATP y una acumulación de Ca^{2+} en ausencia de un gradiente de Na^+ . El Ca^{2+} acumulado en las vesículas era liberado en presencia de Na^+ externo, descartando la posibilidad de que el transporte de Ca^{2+} fuese de vesículas de retículo sarcoplásmico dado que, en estas membranas no existe un mecanismo de intercambio $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$. Estos autores concluyeron que el sarcolema de células cardíacas posee, en conjunto con el intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, un sistema de transporte de Ca^{2+} dependiente de ATP (23,24).

En otros trabajos se demostró que vesículas de membranas obtenidas a partir de varios vegetales tales como, maíz (Zea mays), avena (Avena sativa) y mostaza (Sinapsis alba), en presencia de ATP y Mg^{2+} , acumulaban Ca^{2+} en contra de un gradiente de concentración (21). Esta serie de trabajos sugiere que la bomba de Ca^{2+} , considerada durante 12 años como exclusiva de las células rojas humanas, tiene una distribución muy amplia y se encuentra en diversos tejidos tales como el axón gigante de calamar o el sarcolema cardíaco de perro.

Las células pueden ser clasificadas en: circulantes, exitables, tisulares y otras (21). De todos estos tipos celulares se han realizado preparaciones de membranas las cuales han demostrado tener en común ya sea, proteínas de membrana con actividad dependiente de Ca^{2+} sensible a calmodulina y/o antagonistas de calmodulina ó proteínas que presentan intermediarios fosforilados con una Mr de 130,000 a 150,000 Kd en geles SDS-poliacrilamida.

1.3.2 Proteínas que unen calcio.

Las proteínas que unen Ca^{2+} muestran un grado muy alto de homología estructural sugiriendo que se derivan de un ancestro común. El sitio de unión al Ca^{2+} en estas proteínas tiene una afinidad por Ca^{2+} muy alta, ésta del orden de μM cuando más alto. De estas proteínas la más estudiada es la calmodulina, la cual, modula mensajes de Ca^{2+} en la mayoría de las células eucariontes. Otras proteínas que unen Ca^{2+} son la troponina C y la parvalbúmina entre muchas otras.

Existen varias enzimas cuya actividad depende de Ca^{2+} y calmodulina. Las principales se enlistan a continuación (21):

- Enzimas involucradas en el metabolismo del glicógeno. Fosforilcinasa de músculo esquelético, glicógenosintetasa, proteinafosfatasa 1,2a,2b y 2c.
- Enzimas involucradas en el metabolismo de nucleótidos cíclicos. Adenilatociclasa, fosfodiesterasa.
- Enzimas que intervienen en la contracción muscular y otros procesos móviles. Miosinacinasa de cadena ligera, fosfolambacinasa, proteinacinasa de músculo esquelético.
- Proteinacinasa de tejido nervioso. Sinapsina I, calcineurina.
- Proteinacinasa de membrana en otros tejidos. Enzimas que fosforilan proteínas tejido-específicas.
- Otras enzimas. NADcinasa, fosfolipasa A2 de plaquetas, 15-hidroxi prostaglandina deshidrogenasa.
- ATPasas de Ca^{2+} de membrana.

1.3.3 Propiedades de la ATPasa-(Ca²⁺, Mg²⁺).

Estabilidad.

La ATPasa-Ca²⁺ pura puede ser mantenida en nitrógeno líquido por varias semanas sin pérdida de actividad en un medio que contenga calcio.

Peso Molecular y Composición.

La ATPasa está constituida por una sola cadena polipeptídica cuya migración electroforética o movilidad relativa (Mr) estimada en geles de poliacrilamida con SDS, es de aproximadamente 140,000 Kd. En la enzima pura no se han encontrado carbohidratos asociados (25,26). La enzima contiene fosfato fuertemente pegado en una relación de 7 mol de fosfato : mol enzima (26). Gietzen y Kolandt estimaron que la preparación pura contiene una relación de 1 mol de calmodulina disociable por EGTA, por cada 400 mol de ATPasa (21).

La ATPasa-(Ca²⁺, Mg²⁺) de eritrocito muestra una fuerte tendencia a agregarse en forma de dímeros y oligómeros de mayor orden, los cuales no se disocian en 7 M de urea o mercaptoetanol (25). La ATPasa es moderadamente hidrofóbica; una parte significativa de la molécula no está embebida en la bicapa lipídica, sino que se expone a las soluciones acuosas que bañan a la membrana.

Bajo proteólisis controlada con tripsina, se puede obtener un polipéptido de alrededor de 30,000 Kd sin pérdida ni de actividad catalítica ni de transporte, pero si de sensibilidad a calmodulina. El hecho que este polipéptido sea accesible al ataque de tripsina (una enzima muy hidrofílica) hace pensar que pertenece a una región de la molécula de la ATPasa que es hidrofílica y que está expuesta al

medio que rodea a la membrana (21).

Propiedades Cinéticas.

Las muestras más puras de la ATPasa-Ca²⁺ de eritrocito presentan una actividad específica alrededor de 15-20 umoles Pi/mg prot/min, aunque otro grupo de investigadores reporta que la actividad es del 50% de lo reportado (21). Considerando que estas muestras son 100% puras y la enzima activa es monomérica, las máximas actividades específicas medidas, corresponderían a un valor de recambio de aproximadamente 50 seg⁻¹. Otras propiedades características de la ATPasa-Ca²⁺ son: su alta afinidad por el sustrato modulada por calmodulina (la calmodulina llega a estimular hasta en un 50% la actividad enzimática) (21), el ambiente lipídico y proteólisis parcial, así como, la fosforilación por ATP dependiente de Ca²⁺ y la desfosforilación dependiente de Mg²⁺-ATP (26).

Inmunoreactividad.

La ATPasa pura de retículo sarcoplásmico de conejo no muestra ninguna similitud inmunológica con la enzima de células rojas. Esto constituye una evidencia fuerte apoyando la idea de que las bombas de Ca²⁺ de membrana plasmática y de retículo sarcoplásmico son dos entidades diferentes (27).

1.3.4 Transporte de Ca²⁺.

El transporte de Ca²⁺ es dependiente de varios factores: la concentración de Ca²⁺, sustancias y tratamientos que elevan la tasa (velocidad) de transporte y el balance eléctrico durante el transporte, son considerados entre los más importantes. A continuación se explica de manera breve la importancia de cada uno.

Dependencia de la concentración de Ca^{2+} .

a.- Activación por Ca^{2+} . Bajo condiciones experimentales la medición de la salida o eflujo de Ca^{2+} varía con la concentración intracelular de Ca^{2+} a lo largo de una curva de Michaelis con una K_m de $3.3\mu M$ y una velocidad máxima de $21nmol/l$ células/hora ó $0.035\mu mol$ Pi/mg prot./min.

b.- Inhibición por Ca^{2+} . Se ha reportado que a concentraciones de Ca^{2+} mayores para la activación por Ca^{2+} se observa una inhibición por Ca^{2+} . La tasa de transporte de Ca^{2+} con respecto a la concentración del catión resulta en una curva bifásica. El Ca^{2+} inhibe el transporte activo con una afinidad aparente baja ($K_i = 9mM$) a lo largo de una hipérbola rectangular que tiende a cero (21).

Sustancias y tratamientos que elevan la tasa de transporte.

Una proteólisis limitada o controlada (28,29), el ambiente lipídico ácido (30) y la calmodulina (23), elevan la afinidad aparente de la enzima por Ca^{2+} y la tasa del transporte activo. En células intactas la concentración de ATP es de aproximadamente de $1-1.5mM$ y la concentración de Mg^{2+} es de alrededor de $0.7mM$ a $0.8mM$ (21). Estas concentraciones están por arriba de las necesarias para obtener el 50% de una estimulación completa.

El balance eléctrico durante el transporte de Ca^{2+} .

Una interrogante que surge con respecto al bombeo de Ca^{2+} , es el saber si este transporte activo está acoplado con el movimiento de otros iones. El proceso puede ser de dos tipos: es electrogénico, si la $ATPasa-(Ca^{2+}, Mg^{2+})$ mueve Ca^{2+} sin compensar estas dos cargas positivas; es electroneutro si el transporte de Ca^{2+} está acoplado al movimiento de otras especies iónicas y las dos cargas positivas son

compensadas por un fenómeno de cotransporte. En este segundo tipo de transporte podrían estar implicadas especies tales como el Mg^{2+} , esencial para la activación de la enzima; el Na^+ o el K^+ , que estimulan la actividad de la bomba y el Cl^- e H^+ , que están siempre presentes durante el transporte bajo condiciones fisiológicas (31).

a.- Transporte electrogénico. Gimble (32) realizó mediciones cualitativas del potencial de membrana, encontrando que, durante el transporte activo de Ca^{2+} en un medio con un anión no permeable como el gluconato, las vesículas de membrana de eritrocito desarrollan un potencial de membrana positivo al interior.

b.- Transporte electroneutro. Con base en muchas evidencias experimentales en membranas modelo (33) se ha encontrado que la relación molar H^+ expulsado / ATP hidrolizado es cercana a 2; asumiendo que un Ca^{2+} es transportado por cada molécula de ATP hidrolizada en liposomas, 2 protones son expulsados cuando entra un Ca^{2+} . Niggli (33) concluyó que el transporte de la bomba de Ca^{2+} es electroneutro y siendo que la $ATPasa-Ca^{2+}$ es el único constituyente protéico de los liposomas, la enzima debe comportarse como un intercambiador Ca^{2+}/H^+ ó Ca^{2+}/OH^- . Se ha señalado que la enzima se comporta transportando Ca^{2+} intercambiándolo por H^+ (34). También se ha sugerido que puede presentarse un cotransporte Ca^{2+}/K^+ generado por la enzima (18).

1.3.5 Hidrólisis de ATP.

El sustrato donador de energía para la bomba de Ca^{2+} de membrana plasmática es necesario en la cara interna de la bicapa, donde el ATP es hidrolizado en ADP y Pi. Existe una marcada diferencia entre la bomba de Ca^{2+} de membrana plasmática y la de retículo sarcoplásmico. La primera utiliza específicamente ATP como sustrato, mientras que la

segunda puede utilizar UTP, CTP, GTP e ITP como sustratos energéticos durante el transporte de Ca^{2+} (21).

Activación por Ca^{2+} .

Schattzmann y Roelofsen, realizaron experimentos midiendo la actividad de ATPasa con concentraciones de Ca^{2+} dentro de un intervalo de 10^{-6} a 10^{-5}M . La curva de actividad de ATPasa- Ca^{2+} vs. concentración de Ca^{2+} muestra una tasa máxima de hidrólisis de ATP de 0.033 $\mu\text{mol Pi/mg prot/min}$ y una K_m de $2\mu\text{M}$ (21).

Inhibición por Ca^{2+} .

Scharff encontró que cuando se ensaya la actividad de ATPasa- Ca^{2+} con concentraciones de Ca^{2+} del orden de mM, se presenta un fenómeno diferente al anterior. La curva de actividad de ATPasa muestra un comportamiento bifásico, se incrementa hasta alcanzar un máximo para después caer hasta casi cero mientras la concentración de Ca^{2+} es cada vez mayor (21). Si el ensayo se realiza en presencia de calmodulina, la forma de la curva persiste pero el máximo se desplaza a concentraciones menores de Ca^{2+} .

Las especies inhibitoras de la actividad de la bomba de Ca^{2+} pueden ser tanto el Ca^{2+} , como el complejo Ca-ATP. Ikemoto (35), demostró la existencia de tres sitios de unión de Ca^{2+} en la ATPasa de Ca^{2+} de retículo sarcoplásmico definidos como α , β y γ . La unión del Ca^{2+} en el sitio Alfa ejerce un efecto de activación; si el Ca^{2+} se une al sitio Gamma inhibe a la ATPasa. Existen en la molécula sitios desde los cuales el Ca^{2+} regula la tasa de bombeo de Ca^{2+} .

1.3.6 Otras propiedades de la ATPasa-(Ca²⁺, Mg²⁺).

Especificidad por el Ca²⁺.

La selectividad de la ATPasa-Ca²⁺ de membrana no es muy alta ya que otros metales divalentes pueden reemplazar al Ca²⁺ en el ciclo de transporte. El sitio de unión para el Ca²⁺ puede ser ocupado por Mg²⁺. Bajo estas condiciones la actividad de la enzima desaparece ya que no acepta Mg²⁺ para el transporte. El Sr²⁺ es transportado de la misma manera que el Ca²⁺(21). El transporte de Sr²⁺ se detiene cuando aumenta la concentración de Ca²⁺ interna indicando que el Sr²⁺ pudiera ser desplazado por el Ca²⁺ del sitio que ocupa en la enzima. La eficacia de los metales divalentes para activar a la ATPasa, depende del radio iónico de la especie, más que de la naturaleza del metal (21).

Efecto del EGTA.

Es posible que el acceso del Ca²⁺ a su sitio de unión se vea facilitado cuando forma el complejo Ca-EGTA. Si la tasa de transporte fuera más alta que la tasa de acceso del Ca²⁺ a su sitio de unión, parecería que el complejo Ca-EGTA incrementara la afinidad aparente de la bomba por Ca²⁺. Con esta idea, el Ca²⁺ se une a la ATPasa con gran afinidad y el papel de la calmodulina sería facilitar el acceso del Ca²⁺ a su sitio de unión. Los efectos del EGTA y la calmodulina son diferentes y están acoplados entre sí; el Ca-EGTA aumenta la afinidad de la enzima por Ca²⁺, mientras que la calmodulina facilita el acceso del catión a su sitio de unión en la enzima (21).

Sitios para Ca²⁺.

Giuseppe Inesi (36), reporta que la catálisis y el sitio de unión para Ca²⁺ en la enzima de retículo sarcoplásmico, se lleva a cabo en

dos dominios diferentes. Dos Ca^{2+} se unen secuencialmente en una molécula de ATPasa.

pH.

La tasa de transporte alcanza un máximo en un pH de 7.5 - 8.0. La entrada de Ca^{2+} mediada por ATP en vesículas de sarcolema cardíaco es óptima a pH de 7.4, y cae en un 80% y 20% a pH de 6.3 y 8.0 respectivamente (21). Se ha reportado que el pH óptimo para la actividad enzimática puede variar dependiendo de la presencia o ausencia de calmodulina en el medio (21).

Temperatura.

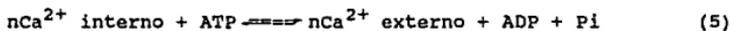
Generalmente cuando se calculan y grafican los ajustes de Arrhenius, se encuentra que existe un cambio o desviación en las cinéticas de activación alrededor de los 20°C. Esto, tentativamente, puede atribuirse a cambios de fase en el arreglo de los lípidos de la membrana. Arriba de 42°C el transporte de Ca^{2+} es muy pobre o nulo y el acoplamiento con la hidrólisis de ATP dependiente de Ca^{2+} se pierde (37,38). Es posible, entonces, registrar actividad hidrolítica de la enzima, más no así el transporte de Ca^{2+} .

1.3.7 Acoplamiento entre el transporte de Ca^{2+} y la hidrólisis de ATP.

Antes de que se dispusiera de preparaciones puras de la bomba de calcio, Quist y Roufogalis utilizando cloruro de lantano (LaCl_3) encontraron que bajo las condiciones en las que el transporte de Ca^{2+} desaparecía, aún se mantenía el 50% de la actividad de ATPasa en fantasmas de eritrocitos resellados (21). La conclusión fue que en la preparación de eritrocitos utilizada, solo el 50% del total de la

hidrólisis de ATP observada en un medio de Mg^{2+} y Ca^{2+} está acoplada al transporte de calcio. Los autores concluyeron que 2 calcioes son transportados por cada molécula de ATP hidrolizada. Se acepta generalmente que en el retículo sarcoplásmico, el movimiento de Ca^{2+} y la hidrólisis de ATP están estequiométricamente conectadas por una relación de 2:1 (21).

La reacción del transporte de Ca^{2+} acoplado a la hidrólisis de ATP puede expresarse por medio de la ecuación 5:



Esta ecuación predice que cuando el cambio en la energía de Gibbs necesario para la expulsión de 'n' iones Ca^{2+} es mayor que el mismo para la hidrólisis de ATP, la reacción de transporte se invierte en el sentido de derecha a izquierda con una síntesis neta de ATP. La concentración de Ca^{2+} externo debe ser alta en relación a la concentración de Ca^{2+} interno ; aunado a esto, una concentración de ATP baja y una concentración de ADP y Pi alta son necesarias. En conclusión, la $ATP_{asa-Ca^{2+}}$ puede ser forzada a trabajar en reversa utilizando la energía derivada de un gradiente de concentración, para sintetizar ATP en condiciones experimentales (39).

1.3.8 Los pasos elementales para la hidrólisis de ATP.

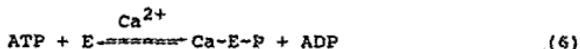
La hidrólisis de ATP llevada a cabo por la $ATP_{asa-Ca^{2+}}$ involucra una serie de transiciones conformacionales cíclicas, así como también, la formación e hidrólisis de intermediarios fosforilados. La formación de una fosfoenzima ácido-estable como intermediario en la reacción de hidrólisis de ATP, ha sido de gran importancia para los estudios que se han realizado sobre esta enzima. La mayoría de la

información que se tiene de los pasos básicos para la hidrólisis de ATP, proviene de ensayos realizados a temperaturas alrededor de 0°C ya que a estas temperaturas la velocidad del ciclo catalítico de la enzima es del orden de segundos (21).

Fosforilación.

La hidrólisis de la molécula de ATP por la ATPasa-(Ca²⁺, Mg²⁺) inicia con la transferencia del fosfato t del ATP formando una unión covalente que da lugar a la formación de una fosfoenzima y a la liberación de ADP al medio. La Km para ATP de la enzima de membrana se ha reportado alrededor de 0.2mM (24).

La transferencia del fosfato t del ATP es dependiente de Ca²⁺. Lo anterior se expresa con la ecuación 6 :



Se conoce que la fosforilación dependiente de Ca²⁺ tiene lugar en un polipéptido con una Mr aparente de 140,000, el cual, no se fosforila en ausencia de Ca²⁺ (21,24).

a.- Cinética de la fosforilación. La fosforilación es el único paso del ciclo catalítico que es absolutamente dependiente de Ca²⁺. El nivel basal de la fosforilación aumenta junto con la concentración de Ca²⁺ y de ATP siguiendo una cinética hiperbólica. El Mg²⁺ acelera la formación de la fosfoenzima (40). En la ATPasa de eritrocito la fosforilación requiere de ATP en el sitio de alta afinidad por el nucleótido y de Ca²⁺ en el sitio de transporte. Es razonable pensar que el sitio de alta afinidad por ATP es el sitio catalítico de la enzima.

b.- Reversa de la fosforilación. La fosforilación puede ser detenida por una dilución del ATP con lo cual, el nivel de fosfoenzima disminuye rápidamente. Este decremento es acelerado por ADP cuyo efecto es también dependiente de Ca^{2+} (21). El hecho de que el nivel de fosfoenzima disminuya con la adición de ADP sugiere la capacidad intrínseca de la enzima para transferir su fosfato al ADP y así regenerar ATP.

c.- Propiedades químicas de la fosfoenzima. Las membranas fosforiladas pueden ser desnaturalizadas y disueltas en soluciones de SDS para ser sometidas a electroforesis en geles de poliacrilamida. La radioactividad, que es incorporada de una manera dependiente de la concentración de Ca^{2+} , aparece en una sola banda de 140,000 Kd. Otros estudios con la ATPasa pura han demostrado que esta banda corresponde a la ATPasa misma (21).

La estabilidad de la fosfoenzima es máxima a pH 1 y disminuye progresivamente mientras el pH aumenta (41); este dato sugiere que la unión del fosfato a la enzima es por medio de un enlace acil-fosfato, aunque no se ha realizado la identificación química.

Desfosforilación.

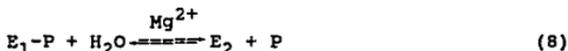
La fosfoenzima tiene la posibilidad de donar el fosfato al agua. La desfosforilación es por hidrólisis y sigue la reacción:



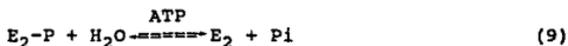
La desfosforilación es catalizada enzimáticamente. La tasa de hidrólisis no se afecta por Ca^{2+} (0-50 μM). A concentraciones de Ca^{2+} del orden de mM, se inhibe la desfosforilación y la actividad de ATPasa- Ca^{2+} (41). Por sí solos, el Mg^{2+} y el ATP no tienen ningún

efecto en la desfosforilación, sin embargo, cuando son utilizados juntos, la hidrólisis de la fosfoenzima aumenta de 5 a 10 veces (21).

a.- La transición E_1P-E_2P . Los términos E_1P y E_2P son utilizados para denominar a los dos elementos que definen a la forma de fosfoenzima. La reacción 6 involucra dos pasos elementales: el primero es una transición conformacional que lleva a la enzima de un estado E_1P a un estado E_2P sin alterar su estructura covalente. Este paso es promovido por Mg^{2+} y no requiere de ATP.



El segundo paso de la reacción 6 es la hidrólisis de la fosfoenzima. Tomando en cuenta que E_2P y no E_1P presenta la hidrólisis, y que una vez que el Mg^{2+} ha actuado a nivel de la reacción 8, se tiene que la tasa de desfosforilación se incrementa cuando el ATP se une a E_1P en un sitio determinado con una afinidad considerablemente menor que la del sitio en el cual el ATP promueve la fosforilación:



A bajas concentraciones de ATP, su sitio en E_2-P estaría prácticamente vacío; la reacción 9 se llevaría a cabo muy lentamente y el Mg^{2+} sería ineficaz. Siendo que la de la hidrólisis del ATP puede ser completamente explicada en términos de la transferencia de su grupo fosfato a la enzima (reacción 7), seguida por su transferencia al agua (reacción 9), puede considerarse que el ATP en E_2P actúa como modificador sin ser hidrolizado (21,41,42).

b.- La transición E_2-E_1 . Aunque la catálisis de la hidrólisis del ATP

termina con la reacción 9, el ciclo catalítico no se completa sino hasta que la enzima de forma E_2 regresa a la forma de E_1 :



Esta reacción es la menos conocida de todas las que intervienen en el ciclo catalítico de la ATPasa-(Ca^{2+} , Mg^{2+}). Muallem y Karlsh (43), realizaron algunos ensayos de actividad probando el efecto del fluoreseinisotiocianato (FITC= agente que se une covalentemente a los sitios para ATP de la enzima). Encontraron que la enzima existe por lo menos en dos conformaciones las cuales, son similares o idénticas a los estados E_1 y E_2 que participan en la hidrólisis del ATP. Los análisis cinéticos de la inhibición por FITC indican que los dos sitios para ATP no coexisten en la misma molécula, sino que, son diferentes estados del mismo sitio. La forma E_1 posee el sitio de alta afinidad para ATP, mientras que el sitio E_2 posee el sitio de baja afinidad (42).

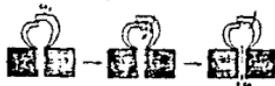
Se ha encontrado que aún estando en una forma soluble la ATPasa-(Ca^{2+} , Mg^{2+}) mantiene varios sitios de unión para Ca^{2+} y dos afinidades distintas para ATP (44).

1.3.9. Modelos para el transporte de Ca^{2+} .

Existen varios modelos para tratar de explicar el funcionamiento de la ATPasa-(Ca^{2+} , Mg^{2+}) (45). Un primer modelo conocido como rotatorio propone que la ATPasa presenta una rotación durante la reacción de transporte, en la cual, el sitio activo de Ca^{2+} es expuesto de manera cíclica hacia el lado interno y el externo de la bicapa (45). Sin embargo, Dutton, et-al. (46), señalan que, termodinámicamente no es

favorable el hecho de pasar una región hidrofílica de una proteína, a través de la bicapa hidrofóbica. Un segundo modelo que se conoce como de poro móvil, propone que varias moléculas de ATPasa se unen formando un poro para Ca^{2+} ; el poro se transforma mediante un rearrreglo energéticamente, el cual permite que el Ca^{2+} fluya por su interior (45). Estos dos modelos anteriores son insuficientes para explicar el movimiento de Ca^{2+} a través de la bicapa. Otro modelo se denomina como compuerta móvil (45), en este modelo se propone la existencia de un compartimento y un poro, formados por moléculas de ATPasa (monómeros u oligómeros) (Figura 1.5).

Modelo de compuerta móvil



Modelo de canal móvil



Figura 1.5 Modelos moleculares para el transporte activo de calcio.

El compartimento está protegido por compuertas móviles que restringen el intercambio catiónico con el exterior. El poro, que presenta un diámetro constante, permite el paso de Ca^{2+} hidratado y no así del Mg^{2+} . Dos moles de Ca^{2+} se unen a un mol de ATPasa y se traslocan a la superficie interna del compartimento por un movimiento rotatorio de la compuerta inducido por la formación de E_1P . Este

modelo asume que el intercambio catiónico entre el interior y el exterior es limitado. Otro modelo es el de canal móvil para el transporte activo de Ca^{2+} . En este caso se supone, no solo que el compartimento se abre, sino que el canal por sí solo cambia de conformación y se expande permitiendo el paso del Ca^{2+} (45).

1.3.10 El Magnesio y otras especies iónicas que regulan la actividad de la enzima.

Magnesio.

Como en otras ATPasas, la ATPasa- $(\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+})$ requiere de Mg^{2+} para tener una actividad óptima. El magnesio no puede mimetizar el efecto del calcio sobre la enzima, así como, tampoco es transportado durante la actividad de la bomba. Para la ATPasa- $(\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+})$ de membrana de eritrocito se ha reportado una K_m de Mg^{2+} de 0.08mM y una K_i de Mg^{2+} de 10mM (21).

El control del Mg^{2+} sobre la actividad de la bomba de Ca^{2+} puede ser a partir de tres formas: mediante la formación del complejo Mg-ATP , mediante la unión directa del Mg^{2+} a un sitio de la enzima o por una combinación de ambos procesos (21).

Calmodulina.

En 1972 se demostró la existencia de una proteína soluble, en el citoplasma de células rojas, que activa a la ATPasa- Ca^{2+} . Hasta 1977 la calmodulina era conocida como "activador de fosfodiesterasas". En 1978, se purificó al activador y se realizaron comparaciones físicas, químicas y biológicas de esta proteína con la calmodulina de otras fuentes para establecer definitivamente la identidad del activador de Bond y Clough con la calmodulina (21).

Existen evidencias de que la calmodulina tiene una interacción directa con la ATPasa- Ca^{2+} . El complejo Ca-calmodulina presenta una Mr de 168,000. La unión de la calmodulina es absolutamente dependiente de Ca^{2+} ; solo el complejo Ca-calmodulina presenta la conformación adecuada para interactuar con la enzima (21). No solo la integridad funcional y estructural de la ATPasa- Ca^{2+} , sino también su interacción con la calmodulina es dependiente del ambiente lipídico. La calmodulina activa a la bomba de Ca^{2+} de membrana plasmática interactuando con un dominio próximo al extremo carboxi-terminal (47). Este dominio que contiene aproximadamente 30 aminoácidos ha sido identificado y secuenciado (47). El dominio de unión a la calmodulina muestra una homología a los mismos en otras proteínas que también interactúan con calmodulina (48,49). Se ha demostrado que la calmodulina no modifica la Km para ATP (50).

Inhibidores.

No se conoce ningún inhibidor selectivo y específico de la ATPasa- $(\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+})$ de membrana plasmática, como los glicósidos cardíacos en el caso de la ATPasa- $(\text{Na}^+ / \text{K}^+)$. Un inhibidor específico sería de gran utilidad para distinguir la actividad de la bomba de Ca^{2+} de membrana plasmática, de otras actividades enzimáticas dependientes de Ca^{2+} .

Algunos iones inorgánicos como el lantano, el vanadato y el rojo de rutenio ejercen efectos inhibitorios sobre la actividad de la enzima. Estas especies actúan sobre la enzima en diferentes estados del ciclo catalítico (21).

1.3.11 Genética molecular de la ATPasa- $(\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+})$.

Mediante la utilización de técnicas de biología molecular ha sido

posible obtener y conocer la secuencia de los genes que codifican para la ATPasa-(Ca²⁺, Mg²⁺) (51,52). El análisis de la secuencia de aminoácidos de la ATPasa-(Ca²⁺, Mg²⁺) de retículo sarcoplásmico permite proponer un modelo de enzima, en el cual, tres dominios citoplásmicos forman una estructura principal. Estos son un dominio formado por 7 láminas β y dos dominios α - β . Uno de estos dominios pega ATP y el otro se fosforila con el ATP unido al otro segmento. La transducción energética se inicia en estos dominios (53).

El segmento transmembranal está constituido por 10 α -hélices. Cinco de éstas, las amino terminales, se extienden hacia el lado citoplásmico. Se propone que el sitio para Ca²⁺ se encuentra en una región de α -hélice. Se sugiere también que la energía que se genera en la estructura principal, se utiliza para rotar los distintos segmentos y así, acarrear el Ca²⁺ unido hacia el interior de la estructura. La rotación puede resultar en el depósito del calcio en un sitio luminal o cercano al lado opuesto de donde se unió. La energía también puede ser utilizada para realinear sectores transmembranales y crear canales. También puede ser utilizada para posicionar cargas a lo largo del canal, que faciliten el paso del Ca²⁺ (53).

Estudios de secuenciación han mostrado que la ATPasa-(Ca²⁺, Mg²⁺) de retículo sarcoplásmico está constituida por 1001 residuos. El residuo Asp 351 se fosforila cuando el intermediario es formado (estudios realizados en células humanas). El segmento formado por el intervalo de residuos del 316-759 presenta un carácter polar muy fuerte y se presenta por afuera de la región transmembranal hacia el citoplasma. Se ha encontrado la formación de 10 hélices transmembranales (36) que presentan un arreglo similar a cinco horquillas, las cuales dejan a los extremos amino y carboxilo del lado

citoplásmico. Aparte del dominio citoplásmico y de las 10 hélices, existen otros segmentos de conexión localizados del lado citoplásmico: el segmento N-terminal constituido por los segmentos 1-57, el segmento 108-260, dos segmentos pequeños constituidos por los residuos 810-830 y 917-928 respectivamente y el segmento 987-1001 que constituye el extremo C-terminal que incluye el dominio de unión a la calmodulina. Cinco segmentos cortos constituyen la conexión entre las cinco horquillas transmembranales (36) (Figura 1.6).

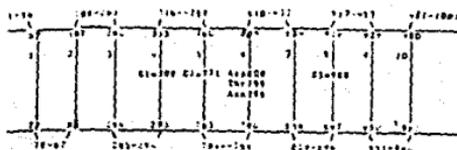


Figura 1.6 Topología de la ATPasa de calcio de membrana.

En los dominios transmembranales se presenta el sitio de unión a Ca^{2+} . Seis residuos en este dominio modulan la activación del sitio catalítico por Ca^{2+} permitiendo la utilización del ATP. El Ca^{2+} unido es desplazado cuando se presenta la fosforilación del sitio catalítico (54,55).

Se ha encontrado que la ATPasa-(Ca^{2+} , Mg^{2+}) de membrana plasmática está constituida por 1220 residuos, esto la coloca como la ATPasa tipo P más grande descrita (56). El residuo Asp 475 es el que se fosforila. El ATP se une al residuo Lys 601. La catálisis y la unión de Ca^{2+} se llevan a cabo en dominios separados. Cerca del extremo C-terminal se une la calmodulina en una región constituida por los residuos 1100-1127 que está delimitada por dos regiones ricas en aminoácidos

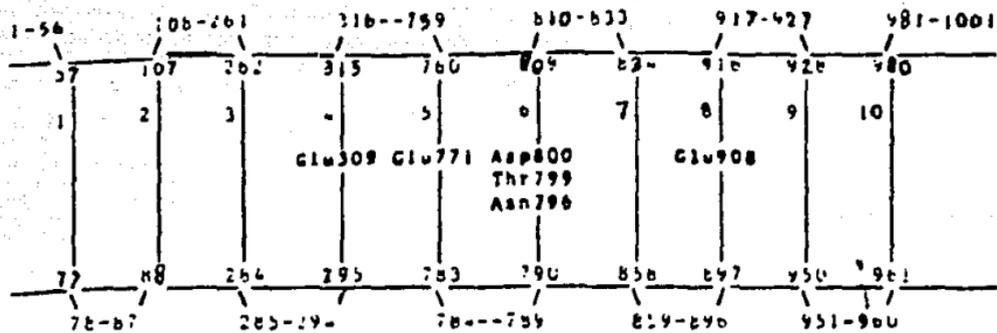


Figura 1.6 Topología de la ATPasa de calcio de membrana.

cargados negativamente. De las regiones que delimitan el segmento de unión a la calmodulina (57), la región constituida por los residuos 1079-1094 se denomina como A y se postula como la región de unión al Ca^{2+} . La región que delimita al sitio de unión a la calmodulina por el otro lado se denomina como B y esta formada por los residuos 1153-1170 (56).

El sitio de fosforilación y la hélice transmembranal #4 están muy conservadas no solo en las ATPasas de Ca^{2+} sino también en las ATPasas Na^+/K^+ ; H^+/K^+ y en la H^+ -ATPasa (36,58,59).

1.4 El colesterol. Propiedades y efectos.

1.4.1 Generalidades.

El colesterol es un lípido esencial para las células de los mamíferos. Las líneas celulares que no son capaces de sintetizar colesterol producen otros esteroides u otros equivalentes estructurales, los cuales, aparentemente, juegan papeles similares. Por ejemplo, en las plantas no se ha encontrado colesterol, sin embargo, se presentan otros esteroides tales como el estigmasterol o el sitoesterol. Tetrahymena sp. no sintetiza colesterol, en cambio sintetiza tetrahymenol; este compuesto no es estrictamente un esteroide, pero funciona de una manera similar (60).

Se ha demostrado que el colesterol produce en las membranas tanto un efecto condensante por arriba de la temperatura de transición de los lípidos y un efecto licuificante por abajo de dichas temperaturas de transición (60).

Las células de mamíferos requieren del colesterol para el funcionamiento apropiado de las membranas celulares. Así mismo, casi todos los organismos eucariontes requieren de colesterol o un esteroide similar para la viabilidad celular. El colesterol también es un precursor de los ácidos biliares y hormonas esteroides (61).

1.4.2 Presencia en la célula.

La molécula de colesterol se encuentra en la célula tanto como colesterol libre, como esterificado a cadenas largas de ácidos grasos y grupos sulfato. Las proporciones del colesterol esterificado en la célula, varían desde 1% hasta el 85%, dependiendo del tipo celular específico. De manera general la concentración de colesterol-ésteres es mayor en el suero y en aquellos tejidos que tienen un papel

importante en la síntesis y metabolismo de colesterol (hígado, intestino, ovario, etc.). También se conoce que se pueden acumular cantidades importantes de ésteres de colesterol en algunos tejidos, debido a alteraciones en el metabolismo de lípidos, tales como la arterioesclerosis (61).

La síntesis de ésteres de colesterol en el retículo endoplásmico, con el subsecuente transporte e hidrólisis del ester puede ser importante en el movimiento de esteroides a través de las pozas intracelulares.

La esterificación del colesterol se lleva a cabo en los diferentes tejidos de mamíferos por medio de una enzima conocida como ACAT (Acil-CoA : colesterol aciltransferasa). La esterificación de esteroides dependiente de Acil-CoA, se ha descrito en peces, insectos y microorganismos (61). Los únicos organismos eucariontes que al parecer no utilizan a la Acil-CoA como donador de ácidos grasos, son las plantas, que por su parte, utilizan acilglicérols (61).

Recientemente, varios trabajos han demostrado que la ACAT, se localiza principalmente en el retículo endoplásmico rugoso (RER) (62,63). El retículo endoplásmico liso (REL) presenta un nivel mayor de colesterol que el RER. Estos datos sugieren que la ACAT puede tener un papel importante en la biogénesis del RER e indirecto en la síntesis de proteínas, manteniendo el contenido de colesterol libre, en el RER, a niveles bajos.

La ACAT pertenece a un grupo de enzimas de membrana, las cuales, tienen por lo menos un sustrato que es insoluble en agua. El colesterol se sintetiza tanto en el REL como en el RER. El RER tiene un contenido menor de colesterol como ester, lo que puede ser

necesario para mantener funcionando al RER; la acumulación de colesterol en ciertas regiones de la membrana, puede resultar en la formación del REL (62).

La estructura del colesterol y el sistema de numeración de la cadena puede verse a continuación (Figura 1.7).

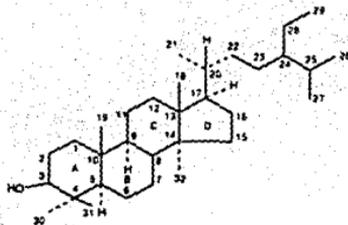


Figura 1.7 Sistema de numeración y estructura de esteroides.

1.4.3 Modulación de la fluidez de la membrana por colesterol.

La fluidez de la membrana juega un papel muy importante en la regulación de muchas funciones de la bicapa incluyendo, tanto la actividad enzimática y el transporte micro y macromolecular, así como, la expresión de componentes celulares de superficie (14). La posibilidad de que la fluidez de membrana afecte la actividad enzimática es una idea que se maneja en los estudios de fisiología de membranas. Existen algunos resultados que sugieren que la actividad de la ACAT, por ejemplo, está sujeta a modulación viscotrópica.

Sin duda, la modulación viscotrópica de la actividad enzimática por colesterol será tan específica, como lo son las enzimas mismas. Debetto (64), reporta una estimulación por colesterol en el intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ en vesículas de sarcolema cardíaco de bovino y en proteoliposomas. Yeagle (65) reporta un efecto inhibitorio del colesterol sobre la actividad de la $\text{ATPasa}-(\text{Na}^+, \text{K}^+)$. Ortega y Mas-

Oliva (66,67) reportan la inhibición de la actividad enzimática de la ATPasa-Ca²⁺ de sarcolema cardiaco. El colesterol no tiene ningún efecto sobre la ATPasa-Ca²⁺ aislada de retículo sarcoplásmico (67).

1.4.4 Distribución del colesterol en la membrana.

La distribución transmembranal de los lípidos de membrana plasmática en células eucariontes y procariontes es heterogénea. La mayoría de los fosfolípidos muestran una distribución asimétrica en la membrana plasmática (68,69) (Figura 1.8). A su vez, se conoce muy poco acerca del origen y regulación de la distribución transmembranal del colesterol en las membranas de superficie celular.



Figura 1.8 Arreglo y disposición de los lípidos en el plano de la membrana.

La existencia de una distribución asimétrica de colesterol en la membrana plasmática de células rojas y mielina, fué observada por primera vez por Caspar y Fisher (70). Varios métodos se han utilizado para demostrar cual de las dos monocapas que constituyen a la membrana es la enriquecida con colesterol. Los métodos utilizados más frecuentemente incluyen, resonancia de la rotación del electrón (ESR), espectroscopia de fluorescencia utilizando sondas moleculares y mediante reacciones enzimáticas utilizando la enzima colesterol oxidasa (70).

La molécula de colesterol, por sí misma, no tiene propiedades intrínsecas que permitan la determinación de sus características estáticas o dinámicas en la membrana. Algunos métodos estáticos para medir la distribución transmembranal del colesterol incluyen, la microscopía electrónica y la difracción de rayos X. La determinación de la tasa de migración transmembranal del colesterol tanto para membranas modelo, como para membranas biológicas, muestra datos que difieren de segundos hasta semanas. La migración transmembranal de colesterol parece estar involucrada, por una parte, con el mecanismo de empobrecimiento de las membranas de este esterol y por otra, con el intercambio espontáneo entre membranas. Así, la existencia de mecanismos facilitadores que pudieran potenciar el movimiento de colesterol en la membrana, podría resultar en el incremento de la tasa de migración del colesterol. Santiago y Mas-Oliva (71), reportan la existencia de una proteína facilitadora del recambio de colesterol en membranas plasmáticas denominada CHTP (cholesterol transfer protein). Las propiedades cinéticas y estructurales de esta novedosa molécula actualmente son motivo de estudio.

Membranas modelo.

Se han realizado experimentos con pequeñas vesículas monocapa (SUV por sus siglas en inglés). Se ha encontrado que cuando la relación molar colesterol/fosfolípido en las SUV es menor a 0.45, dos terceras partes del esterol se localizan preferencialmente en la monocapa externa. Cuando la relación colesterol/fosfolípido es mayor a 0.45, el colesterol se localiza preferencialmente en la monocapa interna (70).

La distribución del colesterol puede ser el resultado de la interacción de un número definido de variables. En primer término, el

equilibrio de la distribución transmembranal del colesterol en membranas modelo es dependiente de la relación molar colesterol/fosfolípido. En segundo lugar, un factor que parece ser determinante es el empaquetado de los lípidos en la membrana. También la estructura de fase de los fosfolípidos (gel o líquido cristalino), puede ejercer un efecto considerable. Si los lípidos en la monocapa interna y externa difieren en fluidez o fase, entonces, se puede generar una distribución asimétrica del colesterol (70).

A partir de estudios con espectroscopía de resonancia, se ha concluido que el colesterol afecta el orden de movimiento con un efecto pequeño en las propiedades móviles del centro de la bicapa. El colesterol también aumenta el grosor de la bicapa de membranas constituidas por fosfolípidos con cadenas hidrocarbonadas de hasta 16 átomos de largo. Por último, la interacción específica del colesterol con los fosfolípidos de membrana que están asimétricamente distribuidos, resulta en un reparto similar del colesterol (70).

Membranas biológicas.

Se conoce muy poco acerca de la distribución del colesterol en las membranas plasmáticas. La distribución transmembranal del colesterol en la mayoría de las membranas de superficie y células rojas es más rica en la monocapa interna de la bicapa (70).

La distribución del colesterol puede tener implicaciones biológicas importantes: Las membranas virales adquieren zonas al azar de la membrana plasmática de las células hospedadoras (70). La manipulación del contenido de colesterol de las envolturas lipídicas, como la del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) (72) y el virus de la estomatitis vesicular (73), alteran de una forma drástica la

infectividad de estos retrovirus. Esta observación puede ser importante para el problema del SIDA causado por el VIH, uno de los virus envueltos, cuya composición lipídica ya ha sido descrita (72).

1.4.5 Control de la fluidez de la membrana por la distribución de la molécula de colesterol.

El colesterol aumenta la rigidez de los lípidos en fase fluida. Schroeder (70), ha reportado datos de fluidez lipídica en membranas con zonas enriquecidas con colesterol y zonas que carecen del estero. Técnicas como la de tiempo de relajación rotacional de esteroides fluorescentes, indican que las regiones con poco colesterol son más desordenadas (más fluidas), mientras que se presenta un arreglo más ordenado en las zonas con niveles de colesterol mayor. Ensayos de empobrecimiento de colesterol disminuyen su concentración en la monocapa externa; el enriquecimiento de colesterol incrementa la accesibilidad de la colesterol-oxidasa a la monocapa externa. Así, el enriquecimiento de colesterol, resulta en una disminución de la fluidez de la monocapa lipídica externa (70).

El efecto del colesterol sobre la bicapa, se refleja en que reduce la flexibilidad conformacional de las cadenas hidrocarbonadas que entran en contacto con este lípido. Existe un parámetro que permite conocer el grado de libertad de movimiento que presenta un segmento particular de una cadena hidrocarbonada, este parámetro se designa como *S*. La incorporación de colesterol en una membrana induce un incremento en el parámetro *S* ó una disminución en la libertad de movimiento de las cadenas (74).

1.4.6 Regulación de las funciones de la membrana por colesterol.

La posición del colesterol en la membrana tiene implicaciones sobre el grosor de la membrana. El grupo hidroxilo de la molécula de colesterol se encuentra localizado en una posición tal, que coincide con la interfase del agua, así como también, con los grupos ester de los ácidos grasos. La bicapa lipídica se hace más delgada mientras el contenido de colesterol disminuye y la temperatura y la hidratación aumentan. El efecto de la temperatura y la hidratación es mucho menor cuando las membranas contienen alto colesterol (70).

El papel del colesterol en la membrana parece ser no solamente el de mantener una 'condición fluida intermedia', sino también el de ayudar a determinar y estabilizar el grosor de la membrana. La necesidad de mantener un cierto grosor de la membrana es importante al pensar en que las proteínas estructurales tienen una forma determinada, así como, una función dependiente de la geometría estructural que guardan en los espacios transmembranales. El colesterol puede ser considerado como un 'amortiguador' del grosor de la membrana. Las alteraciones en la distribución transmembranal y/o lateral del colesterol en dominios específicos de la membrana pueden entonces modificar la función de las proteínas contenidas en éstas (70).

Otras funciones del colesterol.

El colesterol expuesto en la monocapa externa puede funcionar como un receptor para antibióticos, saponinas y otras moléculas (69). Numerosos estudios, señalan que el colesterol está involucrado en el

control de mecanismos de regulación de la actividad de enzimas biosintéticas incluyendo la acilación proteica y la producción de ácidos grasos insaturados. Aparentemente, el colesterol en la membrana plasmática modula la capacidad de fertilización de las células espermáticas. El enriquecimiento de colesterol, estimula la agregación de plaquetas (69).

1.4.7 El papel del colesterol en las funciones celulares.

Varios estudios han demostrado que la célula requiere de una cantidad determinada de esteroides para su crecimiento, diferenciación, síntesis de DNA y síntesis de fosfolípidos. En las células de mamíferos el colesterol se requiere para la biosíntesis de fosfolípidos, síntesis de ADN y ARN y consecuentemente, en la síntesis de proteínas (74).

La molécula de colesterol está constituida por un sistema de anillos que resulta en una estructura lipídica relativamente rígida y plana conformacionalmente limitada. Esto distingue al colesterol de los otros lípidos de membrana, los cuales, presentan cadenas hidrocarbonadas con una cierta flexibilidad conformacional. El colesterol está restringido en su libertad conformacional debido al sistema anular ciclopentanoperhidrofenantreno que lo compone.

Generalmente las enzimas de membrana son inactivas o presentan muy poca actividad cuando la bicapa está en un estado cristalino (gel). La célula tiene un método efectivo para evitar el estado gel; esto se logra con la inclusión de ácidos grasos insaturados en los lípidos de membrana. Pequeños incrementos en el grosor de la membrana, debido a la inclusión de colesterol, pueden tener un efecto sobre la actividad de las enzimas estructurales (74).

1.4.8 Modulación del funcionamiento de proteínas de membrana por colesterol.

Las proteínas de membrana presentan en su estructura regiones tanto hidrofóbicas como hidrofílicas. Los cambios en el espesor de la membrana, o sea, en el espesor de la porción hidrofóbica de la membrana, pueden de alguna manera, alterar la relación de la región hidrofóbica de la proteína con la misma de la membrana, modificando así su función. La estructura nativa de la proteína podría ser modificada para compensar los cambios en el grosor de la membrana.

Los efectos del colesterol sobre las enzimas de membrana son estudiados, generalmente, alterando el contenido de colesterol en la membrana, seguido ésto de la medición de la actividad de la enzima en función de la cantidad de colesterol. La modulación del contenido de colesterol en la membrana puede ser de dos formas; una es, incubando las membranas con vesículas fosfolípídicas. Si las vesículas presentan una relación molar colesterol / fosfolípido (c/f) en exceso con respecto a las membranas en cuestión, entonces, existirá un flujo neto de colesterol hacia las membranas desde las vesículas. Si la relación c/f en las vesículas es menor, entonces, el flujo de colesterol será contrario al anterior, resultando en un decremento o extracción del esteroles en las membranas.

Otra forma de modular el contenido de colesterol celular es inhibiendo la biosíntesis de colesterol (74).

Varios estudios han sugerido que en algunos casos la interacción del colesterol con las proteínas es directa. Se piensa que en la proteína existe alguna región específica para la unión del colesterol.

Estos estudios de interacción lípido proteína, actualmente, llaman la atención de numerosos grupos de investigación en los que se trabaja con el objetivo de conocer el papel de los lípidos en el metabolismo celular.

El proceso de contracción-relajación en el músculo es regulado a través de cambios en la concentración de calcio dentro de la fibra muscular al inicio de una contracción muscular, el potencial de acción generado en la unión neuromuscular se propaga de la sarcolema a las fibras musculares, a través de los túbulos transversos, que son invaginaciones de la sarcolema. Por un mecanismo aún desconocido, la despolarización de la membrana de los túbulos transversos dispara la liberación de Ca^{2+} del retículo sarcoplásmico a los miofilamentos. Las corrientes de Ca^{2+} sensibles a voltaje y a la liberación de calcio de las cisternas terminales del retículo sarcoplásmico provocan un incremento en las concentraciones intracelulares de Ca^{2+} . El Ca^{2+} liberado difunde, se une a la troponina C y la contracción muscular se lleva a cabo. El músculo se relaja cuando el Ca^{2+} se remueve del espacio de los miofilamentos al lumen del retículo sarcoplásmico, por acción de una ATPasa-(Ca^{2+} , Mg^{2+}) y al espacio extracelular por medio de una ATPasa-(Ca^{2+} , Mg^{2+}) y un intercambiador Na^+ / Ca^{2+} localizados en la membrana plasmática.

Con el fin de establecer los objetivos del presente trabajo, varias consideraciones previas fueron realizadas:

El análisis térmico ha sido aplicado exitosamente al estudio de muchos materiales y macromoléculas. La aproximación general es monitorear transiciones en función de la temperatura. El análisis térmico permite obtener información de la presencia de dominios, la

fuerza o energía de interacción de estos dominios, y los efectos de la unión de ligandos o sustratos en la estabilidad de los dominios.

Bajo ciertas condiciones la sensibilidad celular al calor es modulada por la composición lipídica de las membranas. En los últimos años se le ha dado mucho interés a la posibilidad de que el colesterol puede influir en la sensibilidad térmica de varias líneas celulares. Algunas líneas celulares con mayor contenido de colesterol en sus membranas son más resistentes a la hipertermia (66).

El análisis fino de un proceso de termoestabilidad en la interacción lípido/proteína requiere de la visualización previa del fenómeno como tal a un nivel más general. El objetivo central de este trabajo se refiere a la modulación enzimática de la ATPasa-(Ca²⁺, Mg²⁺) de membrana plasmática y su posible estabilidad térmica a temperaturas elevadas conferida por la molécula de colesterol.

2. OBJETIVOS

Con base en muchos trabajos que se han realizado estudiando el control de algunos sistemas de regulación homeostática celular, a partir de interacciones lípido-proteína, el presente trabajo se enfocó en abordar el estudio del efecto de la molécula de colesterol sobre la actividad hidrolítica de la ATPasa-(Ca²⁺, Mg²⁺) de membrana plasmática, para lo cual se plantearon los siguientes objetivos:

2.1 Ensayar actividad de ATPasa-(Ca²⁺, Mg²⁺) en una nueva preparación microsomal (sarcolema cardíaco de res).

2.2 Establecer la caracterización parcial de la ATPasa-(Ca²⁺, Mg²⁺) de microsomas de sarcolema cardíaco de res, con base en su actividad catalítica ante diferentes sustratos.

2.1.1 Determinar los parámetros cinéticos Km y Vmax en cinéticas dependientes de Ca²⁺, Mg²⁺ y ATP,

2.3 Establecer las condiciones adecuadas para modular el contenido de colesterol de las vesículas microsomales.

2.3.1 Enriquecimiento de colesterol.

2.3.2 Empobrecimiento de colesterol.

2.4 Ensayar la actividad de ATPasa-(Ca²⁺, Mg²⁺) en membranas con diferente contenido de colesterol.

2.4.1 Determinar el efecto que ejerce el colesterol sobre la actividad hidrolítica de la enzima.

2.4.2 Determinar el efecto del colesterol sobre la ATPasa-(Ca²⁺,

Mg²⁺) en membranas con diferente contenido de colesterol y a diferentes temperaturas.

2.4.3 Establecer las energías de activación en las fases de activación e inactivación de la enzima en los sistemas con alto y bajo contenido de colesterol.

2.4.4 Conocer la respuesta enzimática a lo largo del tiempo y a diferentes temperaturas en sistemas con alto y bajo contenido de colesterol.

2.5 Proponer una explicación al efecto del colesterol sobre la actividad hidrolítica de la ATPasa-(Ca²⁺, Mg²⁺).

3. MATERIALES Y METODOS

3.1 Obtención y conservación de fracciones microsomaes de sarcolema cardiaco de res (membranas).

La preparación de la fracción microsomal de sarcolema cardiaco fué originalmente reportada por van Alstyne y cols. (75) y modificada en nuestro laboratorio (76). La preparación consta de un método de homogenización del tejido cardiaco de res y la subsecuente separación de los componentes subcelulares mediante técnicas de centrifugación diferencial.

3.1.1 Procedimiento de aislamiento.

En su totalidad el procedimiento se realiza a 4°C.

-Homogenizar el tejido en licuadora con 2 volúmenes (p/v) de amortiguador A (NaHCO₃ 10mM, Azida de Na 0.5 mM, pH 7.0) durante 2 minutos. Repetir una vez.

-Homogenizar en Politrón con 5 volúmenes (p/v) de amortiguador A durante 5 segundos. Repetir 5 veces.

-Homogenizar en licuadora durante 2 minutos. Repetir una vez.

-Filtrar con gasa triple.

-Centrifugar el filtrado a 8,700 g durante 30 minutos.

-Separar el sobrenadante (1).

-Resuspender la pastilla en 5-6 volúmenes (p/v) de amortiguador A.

-Homogenizar la pastilla en licuadora durante 1 minuto. Repetir una vez.

-Centrifugar el homogenado a 8,700 g durante 30 minutos.

-Separar el sobrenadante (2). Mezclar los sobrenadantes (1) y (2).

- Centrifugar la mezcla a 22,000 g durante 60 minutos.
- Resuspender la pastilla en 5-6 volúmenes de amortiguador B (Acido málico 20 mM, KCl 0.6 M, pH 6.8
- Homogenizar la pastilla con homogenizador de vástago.
- Centrifugar a 33,000 g durante 60 minutos.
- Resuspender la pastilla en 5-6 volúmenes (p/v) de amortiguador C (HEPES 10 mM, EDTA 2 mM, pH 7.4).
- Homogenizar con homogenizador de vástago.
- Agitar con agitador magnético durante 10 minutos.
- Centrifugar a 50,000 g durante 30 minutos.
- Resuspender la pastilla en 1-2 volúmenes (p/v) de amortiguador D (Tris/malato 0.5 mM, MgCl₂ 1 M, CaCl₂ 50 mM, DTT 100 mM, pH 7.4)
- La fracción microsomal se separa en alícuotas y se conserva a -70°C.

Un esquema general de la preparación se ilustra en la figura 3.1

A esta temperatura las membranas se conservan estables. Pueden ser utilizadas inclusive hasta por tres meses después de su preparación sin observar cambios considerables en la actividad de la ATPasa-(Ca²⁺, Mg²⁺).

3.1.2 Amortiguadores utilizados en el procedimiento de aislamiento de la fracción microsomal.

Amortiguador A: NaHCO₃ 10mM, Azida de Na 0.5mM, pH 7.0

Amortiguador B: Acido málico 20mM, KCl 0.6M, pH 6.8

Amortiguador C: HEPES 10mM, EDTA 2mM, pH 7.4

Amortiguador D: Tris/Malato 0.5mM, MgCl₂ 1M, CaCl₂ 50mM, DTT 100mM, pH 7.4

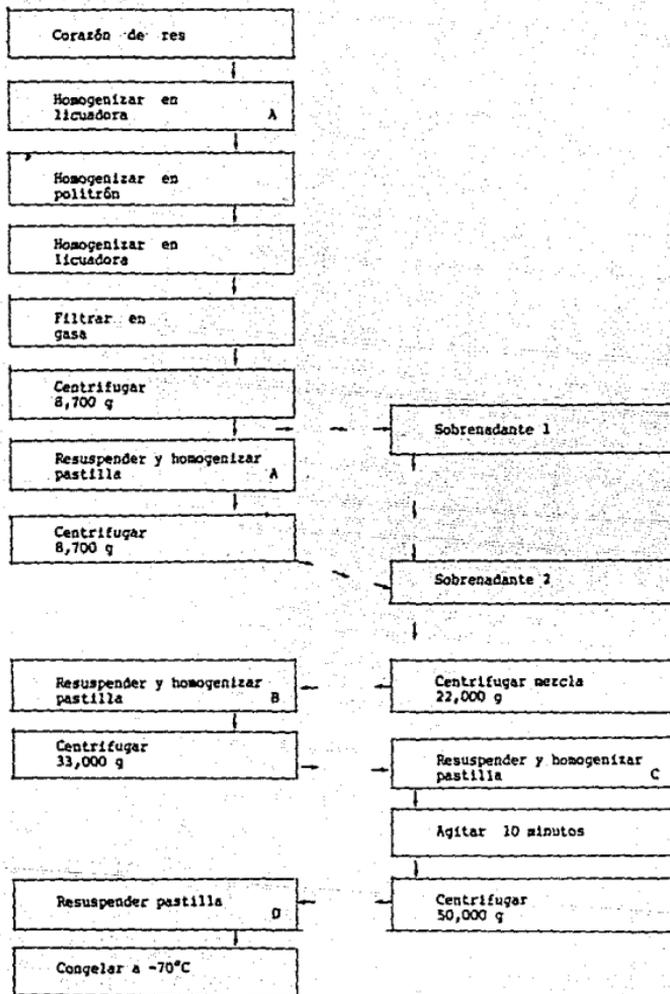


Figura 3.1 Esquema de la preparación microsomal.

3.2 Cuantificación de proteínas.

La cuantificación de la concentración de proteína en las muestras fue realizada siguiendo el método descrito por Lowry (77). Se midió la densidad óptica (absorbancia) a 660nm comparando las muestras con los puntos de una curva patrón de albúmina sérica bovina. Para obtener la concentración de proteínas se hizo un ajuste de regresión lineal por el método de mínimos cuadrados. La concentración de proteínas se reportó como ug proteína/ ul solución.

3.3 Modulación del contenido de colesterol en lipoproteínas.

Para modular el nivel de colesterol en las membranas y medir la actividad enzimática a diferentes concentraciones de colesterol, fue necesario emplear un sistema de lipoproteínas. Este método, reportado por Shinitzky (78) y modificado en el laboratorio, permite enriquecer o en su caso, extraer colesterol de las membranas, utilizando lipoproteínas de plasma sanguíneo humano enriquecidas con colesterol o con fosfolípidos respectivamente.

3.3.1 Obtención de plasma sanguíneo.

Se vierten 20ml de sangre humana recién extraída en un tubo heparinizado, se mezcla lentamente por inversión del tubo de ensaye y se deja reposar durante 5 minutos. A continuación se centrifuga la muestra en una centrifuga clínica a 2000rpm durante 15 minutos y a una temperatura de 25°C. El plasma recuperado en el sobrenadante se incuba durante 40 minutos a 56°C y una vez inactivado, se centrifuga nuevamente a 2000 rpm durante 20 minutos a 25°C. Se recupera el sobrenadante y se diluye al 10% en un amortiguador de $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$

55mM pH 7.1 .

3.3.2 Enriquecimiento de plasma sanguíneo (lipoproteínas) con colesterol (lpp-col).

Sé disuelven 10-15mg de colesterol (Sigma) en 1ml de dimetil sulfóxido (DMSO) caliente (80°C). Mientras está caliente y agitando de manera continua y rápida, la solución se diluye en el plasma 1:100 v/v. Para eliminar los agregados de colesterol, la mezcla plasma/colesterol se centrifuga a 7800 g durante 15 minutos a 4°C. La pastilla se descarta y el sobrenadante se conserva a -70°C.

3.3.3 Enriquecimiento de plasma sanguíneo (lipoproteínas) con fosfolípidos (lpp-pl).

Se disuelven 20-30mg de fosfatidilcolina en 1ml de DMSO caliente (80°C). De la misma manera que para el enriquecimiento con colesterol, se diluye esta solución en el plasma, se reparte en alícuotas y se conserva a -70°C.

3.4 Modulación del contenido de colesterol en las membranas.

3.4.1 Enriquecimiento de membranas con colesterol.

Las membranas fueron incubadas en plasma tratado con colesterol. Después de ensayar a diferentes tiempos y temperaturas, la incorporación de colesterol a las membranas fue más efectiva cuando se realizó una incubación a 37°C durante 2-3 Hrs. Las membranas utilizadas para la incorporación de colesterol fueron previamente lavadas: diluidas 1:10 en amortiguador D (utilizado en la obtención de membranas), centrifugadas 30 minutos a 50,000 g y resuspendidas en el volumen original. Después de la incorporación de colesterol las membranas fueron lavadas de la misma manera para así eliminar el

colesterol libre. A excepción de la incubación, el resto del procedimiento se realizó a 4°C. Por último se realizó la determinación del colesterol incorporado a las membranas. Durante el primer lavado de los microsomas, se encontró en el sobrenadante una serie de moléculas aparentemente de tipo proteico que, al parecer están asociadas a la ATPasa-(Ca²⁺, Mg²⁺). Dichos elementos constituyen un hallazgo interesante del presente trabajo por lo que más adelante se mostrarán experimentos preliminares que sugieren la relación de estos elementos con la actividad hidrolítica de la ATPasa-(Ca²⁺, Mg²⁺) de membrana plasmática.

3.4.2 Extracción de colesterol de las membranas.

La segunda condición utilizada para ensayar la actividad enzimática de la bomba de calcio, fue la de registrar la hidrólisis de ATP por la enzima en microsomas con un contenido bajo de colesterol. Estos microsomas fueron incubados con lipoproteínas enriquecidas con fosfolípidos (lpp-pl), a una temperatura de 37°C durante 5 hrs. Al término de la incubación, los microsomas fueron lavados en amortiguador D, centrifugados a 50,000 g/ 30 minutos y resuspendidos en el volumen original. A excepción de la incubación, el resto del procedimiento se realizó a 4°C.

De manera paralela, se encontró que un simple lavado de las membranas, previo a este tratamiento, también resultaba en una disminución en el contenido de colesterol de las mismas, por lo que se optó por este sistema para el empobrecimiento de colesterol de las vesículas.

3.5 Microscopía electrónica.

Se realizaron estudios de microscopía electrónica para conocer el estado físico de las vesículas a lo largo del tiempo de incubación. Lo anterior, bajo la observación de que la incubación durante varias horas a 37°C, tendría efectos sobre la forma, el sellado, el tamaño, etc, de las vesículas. Las micrografías fueron realizadas en la Unidad de Microscopía Electrónica del IFC, UNAM.

3.6 Cuantificación de la actividad hidrolítica de la ATPasa-(Ca²⁺, Mg²⁺).

La actividad hidrolítica de la ATPasa-(Ca²⁺, Mg²⁺), se midió mediante la detección del Pi liberado al medio como producto de la hidrólisis de la molécula de ATP. El método utilizado en el presente trabajo fue el reportado por Fiske y Subbarow (modificado en nuestro laboratorio) (79). La liberación de Pi en los puntos experimentales se comparó contra una curva patrón de NaH₂PO₄ y la absorbancia se midió a 660nm. Se calculó la actividad específica de la enzima (A.E.) con la ayuda de una regresión lineal de los datos por el método de mínimos cuadrados. La A.E. se expresó como, nmol Pi/ mg prot/ min.

Los reactivos de Fiske se utilizaron fríos así como también se procuró que las muestras se mantuvieran en una gradilla sobre hielo, con el fin de normalizar el desarrollo del color en todos los tubos durante los 14 minutos de la reacción.

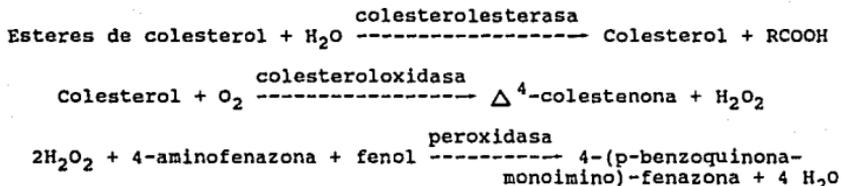
Cada punto experimental contó con uno control o testigo; la absorbancia de éstos últimos fue restada a los valores de los puntos experimentales a manera de eliminar el error por la hidrólisis

espontánea del ATP.

Todas las mediciones espectrofotométricas se hicieron con celdas de poliestireno con un paso de luz de 1cm.

3.7 Cuantificación de colesterol.

Fue necesario conocer la concentración de colesterol, tanto en las membranas 'nativas' (sin tratamiento), como en las vesículas que fueron enriquecidas con colesterol, así como en las vesículas donde el colesterol fue extraído. La medición del contenido de colesterol se llevó a cabo por medio de un método fotocolorimétrico que utiliza el sistema de colesterol oxidasa (80). Este sistema está constituido por tres enzimas acopladas: colesterol esterasa, colesterol oxidasa y peroxidasa. La reacción global, se describe a continuación:



El tiempo de la reacción es de 12 minutos utilizando una temperatura de 37°C. La lectura en el espectrofotómetro se realiza a 500nm.

Previo a la prueba de determinación de colesterol, todas las muestras fueron incubadas a 37°C durante 30 minutos con Tritón X-100 (2%) en una relación de 2:1 v/v (membranas : detergente) para favorecer la interacción de los reactivos con el colesterol de las membranas. El volumen final para la prueba es de 1ml.

3.8 Ensayo de actividad de ATPasa-(Ca²⁺, Mg²⁺)

Los ensayos de actividad enzimática tienen la finalidad de dar a conocer el comportamiento activo de una enzima bajo determinadas condiciones específicas: concentración de sustrato, tiempos de reacción, temperaturas de incubación, presencia de inhibidores y estimuladores, etc.

3.8.1 Mezclas de reacción (MR) para la ATPasa-(Ca²⁺, Mg²⁺).

-MR 1: Tris/Malato 50mM pH 7.4 , MgCl₂ 0.5mM, CaCl₂ 100uM (total), ATP variable desde 0.1mM hasta 20mM. Volúmen final 1ml.

-MR 2: Tris/Malato 50mM pH 7.4, CaCl₂ 0.5mM (total), EGTA 100uM, ATP 3mM, MgCl₂ variable desde 0 hasta 30mM. Volúmen final 1ml.

-MR 3: Tris/Malato 50mM pH 7.4 , MgCl₂ 4mM (total), EGTA 100uM, ATP 3mM, CaCl₂ variable desde 0 hasta 40mM. Volúmen final 1ml.

-MR 4: Tris/Malato 50mM pH 7.4, EGTA 100uM, ATP 3mM, CaCl₂ variable desde 0 hasta 40mM. Volúmen final 1ml.

-MR 5: Tris/Malato 50mM pH 7.4, MgCl₂ 4mM, CaCl₂ 10uM total, 1uM libre, EGTA 100uM, ATP 3mM. Volúmen final 1ml.

3.8.2 Incubación.

Cinéticas Variadas. ATP, Mg²⁺ y Ca²⁺.

Se realizaron curvas de actividad para ATP, Mg²⁺, Ca²⁺, y Ca²⁺ sin Mg²⁺, utilizando las mezclas de reacción 1,2,3 y 4 respectivamente. Se realizaron con un tiempo de incubación de 10 minutos y a una temperatura constante de 37°C.

Cinética a diferentes temperaturas.

Se ensayó la actividad de la enzima de 0 a 60°C empleando la MR 5, con tiempos de incubación de 10 minutos por determinación.

Cinética a diferentes temperaturas en membranas con diferente contenido de colesterol.

Se ensayó la actividad hidrolítica de la ATPasa-(Ca²⁺, Mg²⁺), en cinéticas dependientes de temperatura. Se utilizaron membranas con diferentes niveles de colesterol. Las muestras se incubaron durante 10 minutos a cada una de las temperaturas, en la mezcla MR 5.

Cinética de actividad dependiente del tiempo.

Se estudió el efecto del tiempo en la reacción enzimática a diferentes temperaturas utilizando la mezcla de reacción No.5.

Los ensayos anteriores fueron realizados a un volumen final de 200ul. Con 150ul de mezcla de reacción y una concentración uniforme de 50ug de proteína de membrana. En todos los ensayos biológicos de actividad enzimática, las reacciones se detuvieron mediante la adición de 100ul de ácido tricloroacético (ATC) al 30%. Después de parar la reacción, los tubos de ensayo se centrifugan durante 12 minutos a 3,500 rpm en una centrifuga clínica. Del sobrenadante se recuperan 200ul que son utilizados para la cuantificación fotocolorimétrica del Pi liberado en la reacción.

Como se señaló anteriormente en la sección 4.- (Enriquecimiento de colesterol), las membranas fueron lavadas antes de su incubación con lpp-col. El sobrenadante de varios lavados se concentró aproximadamente 20 veces en una cámara Amicón. Se determinó la concentración de proteínas de este concentrado con el método de Lowry y se realizaron ensayos de actividad de la ATPasa-(Ca²⁺, Mg²⁺) en microsomas nativos y microsomas lavados previo a la reacción. Ambas muestras fueron incubadas con la mezcla de reacción # 5 utilizando

cantidades diferentes de proteína de concentrado (0,5,10 y 15 ug). Como única variación al protocolo ya establecido, se utilizaron 100ug de proteína de membrana por punto. La reacción enzimática tuvo una duración de 10 minutos a 37°C. La determinación del Pi liberado se realizó por el método ya señalado anteriormente. Una vez más, todos los puntos experimentales contaron con su punto control de referencia para contrarrestar el error experimental.

3.8.3 Análisis electroforético.

Por otra parte, se realizaron también geles de poliacrilamida al 7.5% siguiendo el método de Laemmli (81) y teñidos con azul de Coomassie y tinción de plata. Los carriles se ocuparon con marcas de peso molecular (carriles 1 y 2), membranas nativas, membranas lavadas (pastilla de lavado), concentrado de sobrenadantes de 30 minutos de lavado y por último concentrado de sobrenadantes de 60 minutos de lavado respectivamente.

4. RESULTADOS Y DISCUSION

4.1 Cinética Enzimática.

Como punto de partida para conocer el efecto del colesterol sobre la actividad hidrolítica de la ATPasa-(Ca²⁺, Mg²⁺), fue necesario establecer ciertas condiciones de reacción que permitieran obtener mejor actividad enzimática. Estas condiciones se establecieron mediante diferentes cinéticas dependientes de sustrato.

Las constantes de Michaelis (Km) y las velocidades máximas (Vmax) fueron calculadas de forma manual apartir de los datos obtenidos experimentalmente y comparadas con las obtenidas de utilizar un paquete de programas ad hoc para mediciones de cinética enzimática (Enzfitter) (82). Los valores que aquí se muestran son los obtenidos directamente del programa de computadora por considerarseles de más precisión.

4.1.1 Ensayo de la actividad hidrolítica en ausencia de Mg²⁺ y diferentes concentraciones de Ca²⁺.

Los experimentos en presencia de Ca²⁺ y en ausencia de Mg²⁺ (Figura 4.1) muestran una cinética michaeliana típica. A concentraciones mayores de 2.5 mM de Ca²⁺ se presenta una actividad de saturación, seguida de una ligera etapa de inhibición. A partir de la transformación Lineweaver-Burk (15) (figura 4.2) se obtiene una Vmax de 1.81×10^2 nmoles Pi/mg prot/min y una Km para Ca²⁺ de aproximadamente 300uM, con un índice de correlación de 0.98. En la figura 4.1 también se muestran las concentraciones del Ca²⁺ libre, del ATP libre y del complejo Ca-ATP, cuya importancia se señala más adelante.

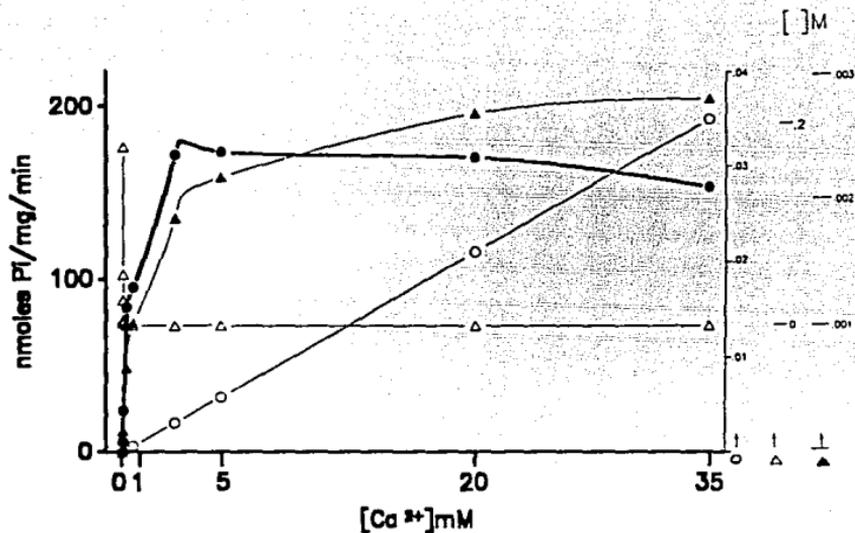


Figura 4.1 Actividad hidrolítica de la ATPasa- (Ca^{2+}, Mg^{2+}) en ausencia de Mg^{2+} y dependiente de la concentración de Ca^{2+} en el medio. La reacción se realiza a $37^{\circ}C/10$ min, con ATP 3 mM, EGTA 100 μ M y tris/malato 50 mM, pH 7.4. Curva promedio de una serie de 8 experimentos. La actividad hidrolítica se mantiene en su etapa inicial lineal hasta los 15 min de reacción. Cinética dependiente de Ca^{2+} (●); Ca^{2+} libre (○); ATP libre (△); Ca-ATP (▲).

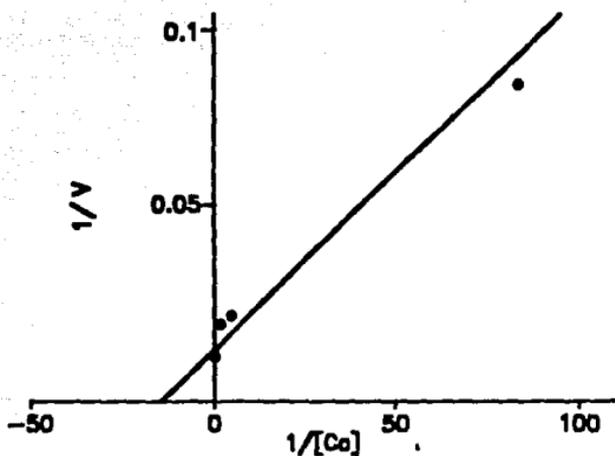


Figura 4.2 Determinación de la K_{mCa} y V_{max} para la ATPasa-(Ca^{2+} , Mg^{2+}). (a) Ajuste cinético Enzfitter. (b) Transformación Lineweaver-Burk. La constante de afinidad para calcio es de 300 μM y la V_{max} de 181 nmoles $P_i/mg/min$.

4.1.2 Ensayo de la actividad hidrolítica en presencia de Ca^{2+} y diferentes concentraciones de Mg^{2+} .

La segunda cinética que se ensayó fue la actividad hidrolítica con base en diferentes concentraciones de Mg^{2+} y a concentraciones constantes de Ca^{2+} . En esta serie de experimentos (Figura 4.3) se puede observar una actividad por Mg^{2+} más alta que la correspondiente para Ca^{2+} , con una saturación de la actividad en concentraciones del orden de micromolar de Mg^{2+} . Concentraciones de Mg^{2+} mayores a 4mM resultan en una inhibición parcial de la actividad enzimática. La V_{max} de la reacción es de 333.9 nmoles de Pi/mg prot./min y la K_m para Mg^{2+} es de 17.65 μM . La gráfica doble recíproca tiene un índice de correlación de 0.97 (Figura 4.4). También en la figura 4.3 se señala la concentración libre tanto de Ca^{2+} y ATP como la del complejo Ca-ATP. Estos últimos datos se consideran para su discusión más adelante en el texto.

4.1.3 Ensayo de la actividad hidrolítica en presencia de Mg^{2+} y diferentes concentraciones de Ca^{2+} .

Cuando se ensayó la actividad con concentraciones variables de Ca^{2+} libre a una concentración fija de Mg^{2+} (4mM), la cinética resultante mostró una forma peculiar (Figura 4.5). La forma de la curva sugiere una cinética de inactivación más que una cinética de activación. A concentraciones de Ca^{2+} en el orden de μM la hidrólisis de ATP es prácticamente la misma, mientras que a concentraciones mayores se presenta una inhibición por el sustrato, mayor inclusive que en las cinéticas anteriores.

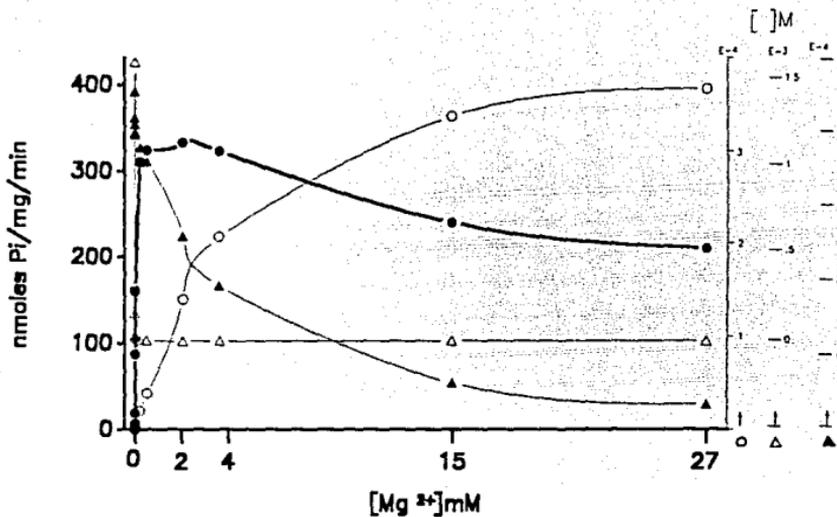


Figura 4.3 Actividad hidrolítica de la ATPasa-(Ca²⁺, Mg²⁺) dependiente de la concentración de Mg²⁺ en el medio. La reacción se realiza a 37°C/10 min en un medio que contiene Ca²⁺ 5 mM, Mg-ATP 3 mM, EGTA 100μM y tris/malato 50 mM, pH 7.4 Curva promedio de una serie de 8 experimentos. Los ensayos de velocidad inicial muestran una velocidad de hidrólisis lineal hasta los 20 min de reacción. Cinética dependiente de Mg²⁺ (●); Ca²⁺ libre (○); ATP libre (Δ); Ca-ATP (▲).

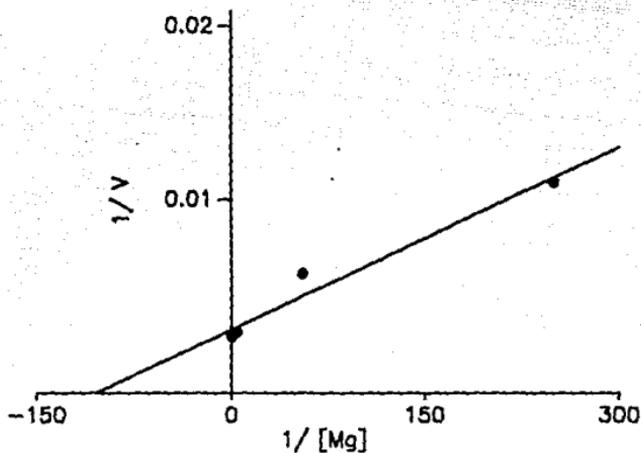
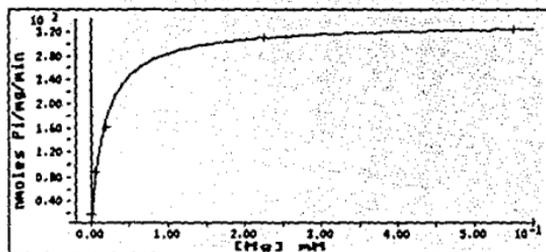


Figura 4.4 Determinación de la K_{mMg} y V_{max} para la ATPasa-(Ca^{2+} , Mg^{2+}). (a) Ajuste cinético Enzfitter. (b) Transformación Lineweaver-Burk. La constante de afinidad para magnesio es de 17.65 μM y la V_{max} es de 333.9 nmoles Pi/mg/min.

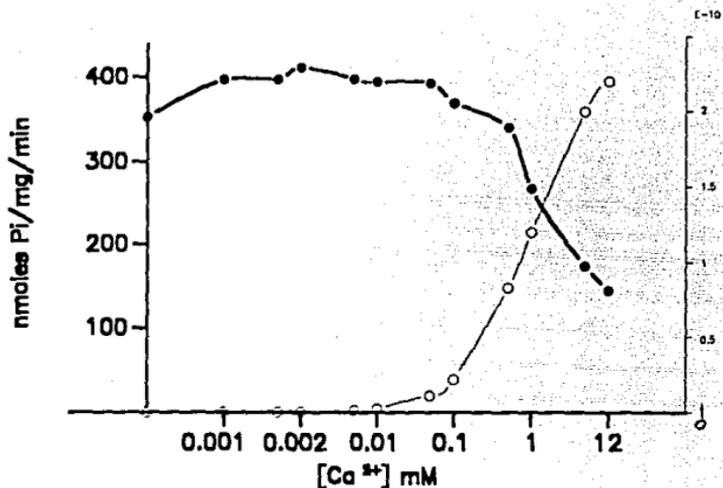


Figura 4.5 Actividad hidrolítica de la ATPasa-(Ca²⁺, Mg²⁺) dependiente de la concentración de calcio en el medio. La reacción se realiza a 37°C/10 min en un medio que contiene Mg-ATP 3mM, MgCl₂ 4 mM (total), EGTA 100 uM y tris/malato 50 mM, pH 7.4. Curva promedio en una serie de 8 experimentos. Cinética dependiente de Ca²⁺ (●); Ca-ATP (○).

Como se observa en la gráfica, cuando aún no se ha añadido Ca^{2+} al sistema, la enzima presenta una velocidad de hidrólisis cercana a 350 nmoles Pi/mg prot/min. Si se añade una concentración de Ca^{2+} de aproximadamente 1.1 μM (libre), la activación por el catión es muy pequeña comparada con la misma que se obtiene en la curva de Ca^{2+} en ausencia de Mg^{2+} . Dado lo anterior no fue posible obtener las constantes cinéticas para este experimento, aunque como se observa en la gráfica la máxima velocidad de la reacción corresponde a 400 nmoles Pi/mg prot/min.

De los experimentos anteriores en los que la adición del Ca^{2+} no modifica o estimula la actividad basal de la ATPasa- $(\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+})$, se puede sugerir la existencia de una ATPasa- Mg^{2+} no estimulada por Ca^{2+} .

Del análisis de esta serie de experimentos se observan datos importantes. En la actividad hidrolítica ensayada en presencia de Ca^{2+} se observa una $K_{m_{\text{Ca}}} = 200 \mu\text{M}$ en comparación a lo reportado en la literatura (21). La velocidad máxima de hidrólisis de 181 nmoles Pi/mg prot/min representa aproximadamente el 51% de la velocidad que se ha reportado para la enzima en presencia de Mg^{2+} y Ca^{2+} , la cual es de aproximadamente de 300-400 nmoles de Pi/mg prot/min. Por otra parte, en presencia de concentraciones micromolares de Mg^{2+} , se observa una clara activación que llega a ser máxima en presencia de 500-700 μM de Mg^{2+} . La velocidad de catálisis en este punto corresponde a 320 nmoles Pi/mg/min, lo que concuerda con las velocidades reportadas (21). Cuando el experimento se realiza a diferentes concentraciones de Ca^{2+} y una cantidad fija saturante de Mg^{2+} (4mM), la cinética que se obtiene es de inactivación. De esta curva se puede interpretar que al ensayar la actividad a esta concentración de Mg^{2+} (4mM), la activación

de la enzima es máxima y el Ca^{2+} tiene un efecto mínimo en la activación. Esta curva puede sugerir que con la adición de Ca^{2+} se forman complejos Ca-ATP que no se hidrolizan tan fácilmente en comparación a los complejos Mg-ATP.

Como se observa en la figura 4.4 a una concentración de Mg^{2+} aproximada de 4mM la actividad que se registra es de 350 nmoles Pi/mg/min. En la figura 4.5 el punto que no tiene Ca^{2+} ($\text{Mg}^{2+}=4\text{mM}$) presenta un actividad similar y el hecho de agregar Ca^{2+} al sistema resulta en una estimulación de alrededor del 12.5% de la actividad máxima.

En la figura 4.1 se observa la actividad hidrolítica de la ATPasa- (Ca^{2+} , Mg^{2+}), la cual utiliza al complejo Ca-ATP como sustrato. La adición progresiva de Ca^{2+} resulta en una formación gradual del complejo Ca-ATP que la enzima utiliza durante todo el ensayo realizado; la disponibilidad de ATP libre es cero. Se puede observar también que a medida que el Ca^{2+} se añade, la concentración libre del catión también aumenta. Se ha reportado que concentraciones de Ca^{2+} libre mayores de 100 μM , tienen un efecto inhibitorio sobre la actividad de la ATPasa- (Ca^{2+} , Mg^{2+}) al igual que el complejo Ca-ATP (21). La acumulación creciente de Ca^{2+} libre en este ensayo, pudiera ser la causa de la ligera caída de la actividad enzimática a concentraciones de Ca^{2+} mayores a 10 mM.

En la figura 4.3, que representa la hidrólisis de ATP cuando se ensayó la actividad enzimática con Ca^{2+} y en función del Mg^{2+} añadido, se observa una disminución progresiva en la acumulación del complejo Ca-ATP. A medida que se añade Mg^{2+} la concentración de Ca^{2+} libre aumenta progresivamente. En la figura 4.3 se obtiene que la disminución en la concentración del complejo Ca-ATP tiene una forma

similar a la curva que muestra la hidrólisis de ATP, sin embargo, la velocidad enzimática en esta cinética es de casi el doble con respecto a la cinética en ausencia de Mg^{2+} (figura 4.1). Debe recordarse que la concentración del complejo Mg-ATP se mantiene constante en este ensayo.

Los datos anteriores sugieren que la enzima utiliza como sustrato tanto al complejo Ca-ATP como al Mg-ATP, sin embargo la afinidad por el segundo es mayor. También se puede ver que la actividad hidrolítica es dependiente de la concentración de Ca^{2+} libre. Independientemente de cual sustrato sea utilizado por la enzima, la presencia de Ca^{2+} libre es indispensable.

La tercer cinética muestra la hidrólisis de ATP en presencia de Mg^{2+} y en función del Ca^{2+} añadido al medio de reacción. En este ensayo la enzima no responde al Ca^{2+} como era de esperarse, esto se interpretó como una cinética de saturación en la cual la enzima es sensible al Ca^{2+} libre, como ya se ha señalado, más no así al complejo Ca-ATP. A tal concentración (4 mM) de Mg^{2+} añadido, la enzima solo responde al complejo Mg-ATP como sustrato. Algunos grupos (61) han considerado esto de manera especial para proponer la existencia de una ATPasa-Mg²⁺ que trabaja de manera independiente a la ATPasa-(Ca²⁺, Mg²⁺)

Al parecer la enzima puede presentar dos dominios diferentes, uno para Ca^{2+} y otro para Mg^{2+} los cuales presentan afinidad distinta. Esta idea resulta difícil de explicar en términos de funcionalidad enzimática, sin embargo, recientemente ha surgido una nueva idea para explicar este fenómeno. Se propone la existencia de una ATPasa de Mg^{2+} cuya función no se ha especificado aún, pero que se activa de forma

similar a la ATPasa de calcio dependiente de magnesio. La bomba de Ca^{2+} se encarga de la regulación del movimiento de Ca^{2+} a través de la bicapa, pero al parecer su actividad puede ser enmascarada por la actividad de la ATPasa-Mg. La existencia de una enzima con afinidad alta por Mg^{2+} y que impida ver la actividad de la ATPasa- Ca^{2+} , provoca que sea muy difícil el tratar de separar la actividad de ambas ATPasas por lo que se ha convenido temporalmente hablar de la actividad de la ATPasa-($\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$) y no solo de una ATPasa- Ca^{2+} dependiente de Mg^{2+} . Cabe recordar que la preparación microsomal con la que se ha estado trabajando es una preparación nueva y la caracterización de la enzima en ésta no se ha reportado aún. En términos generales se necesita un análisis cinético más profundo para caracterizar a esta preparación.

4.1.4 Ensayo de la actividad hidrolítica en presencia de Ca^{2+} , Mg^{2+} y diferentes concentraciones de ATP.

Dentro de las cinéticas preeliminarias también se realizaron experimentos a diferentes concentraciones de ATP (Figura 4.6). La activación por el nucleótido se presenta progresiva y gradualmente hasta alcanzar una concentración de 4mM (total). Por arriba de esta concentración la actividad hidrolítica presenta una disminución de actividad hasta alcanzar un valor de 100 nmoles Pi/mg/min con 20mM de ATP.

La transformación de Lineweaver-Burk (Figura 4.7), muestra una constante de afinidad para ATP de 448 μM dato que concuerda con lo reportado en la literatura para esta enzima. La velocidad máxima de la reacción, estimada con el paquete Enzfitter alcanza valores de 358 nmoles Pi/mg prot/min.

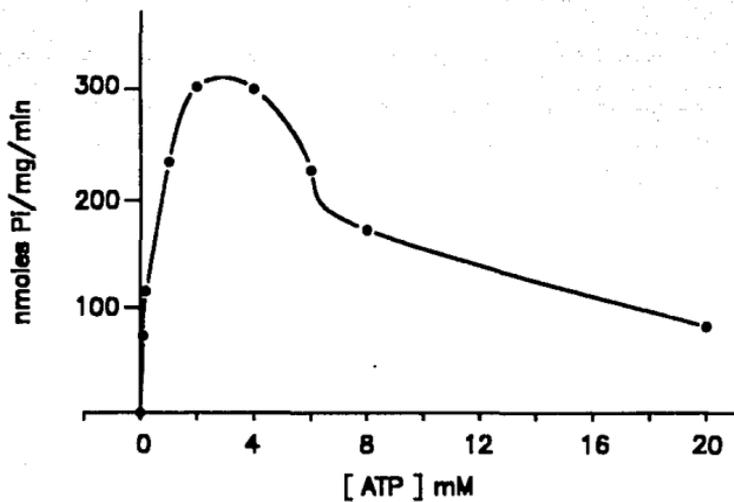


Figura 4.6 Actividad hidrolítica de la ATPasa-(Ca²⁺, Mg²⁺) a diferentes concentraciones de ATP. Reacción llevada a cabo a 37°C por 10 min. El medio de reacción contiene tris/malato 50 mM pH 7.4, MgCl₂ 0.5 mM y CaCl₂ 100 μ M (total). Curva promedio de una serie de cinco experimentos.

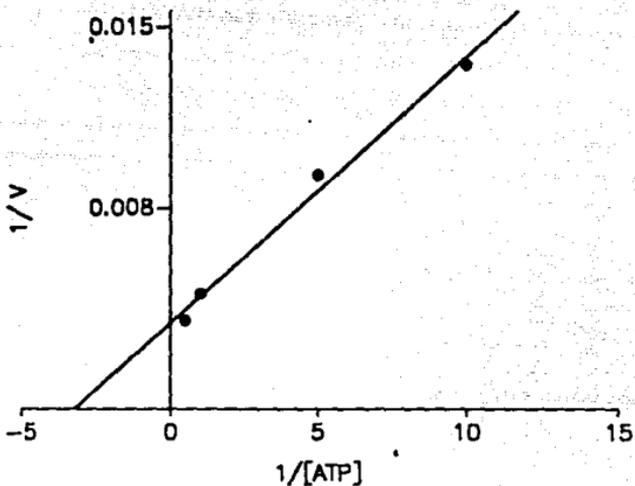
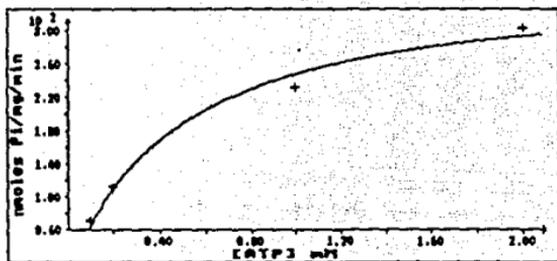


Figura 4.7 Determinación de la $K_{m,ATP}$ y V_{max} para la ATPasa-(Ca^{2+} , Mg^{2+}). (a) Ajuste cinético Enzfitter. (b) Transformación Lineweaver-Burk. La constante de afinidad para ATP es de 448 μM y la V_{max} de 358 moles P_i /mg·min.

4.2 Modulación del contenido de colesterol en los sistemas membranales.

Como se detalló en la sección de materiales y métodos, se utilizaron dos sistemas para la modulación del contenido de colesterol en las membranas. En la figura 4.8 se presenta una comparación de los niveles de colesterol en los diferentes 'tipos' de membranas utilizadas.

Las membranas nativas (control) presentan una concentración basal de colesterol de aproximadamente 12-13 ug colesterol/mg proteína de membrana. A partir de este tipo de membranas se realizó el procedimiento de enriquecimiento de colesterol, o bien, para el empobrecimiento de colesterol. El primero se realizó mediante incubación con plasma enriquecido con colesterol (lp-col) y el segundo mediante un lavado (centrifugación 30 min a 55,000 g en amortiguador D).

En las membranas lavadas se observó una disminución en el contenido de colesterol. La concentración del lípido en estas membranas fue de 9.0 ug colesterol/mg proteína de membrana.

Las membranas nativas incubadas con plasma enriquecido con colesterol mostraron un incremento en la concentración de colesterol alcanzando valores de hasta 21 ug colesterol/mg proteína de membrana. Este tipo de membranas no fue utilizado en los ensayos biológicos de actividad enzimática.

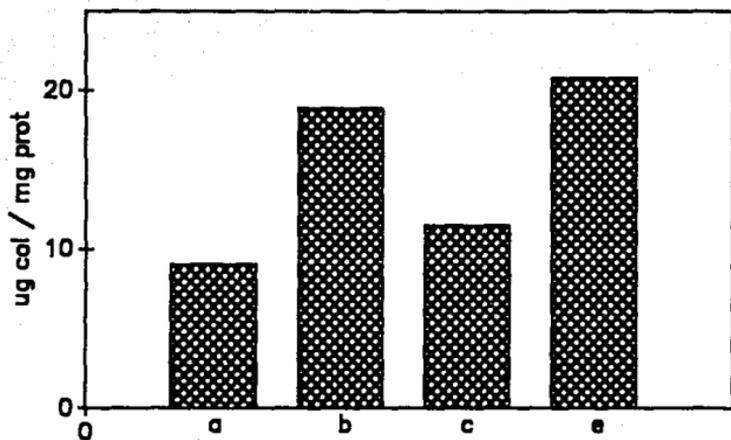


Figura 4.8 Resultado de la incorporación de colesterol a las membranas. (a) Membranas lavadas (centrifugadas en amortiguador D /30 min/ 55,000 g. (b) Membranas lavadas e incorporadas (incubadas 2-3 hrs/37°C con lpp-col). (c) Membranas nativas. (d) Membranas nativas enriquecidas con colesterol. La concentración de colesterol se expresa como ug col/mg prot. de membrana.

Otra serie de experimentos fue realizada con membranas lavadas y posteriormente incorporadas con colesterol. Al final de la incubación la concentración de colesterol aumentó, en promedio, de 9 a 20 ug colesterol/mg proteína de membrana.

Resumiendo, se utilizaron tres tipos de membranas para los ensayos de actividad a diferentes temperaturas: membranas nativas (alto colesterol) vs. membranas lavadas (bajo colesterol), y membranas lavadas (bajo colesterol) vs. membranas lavadas enriquecidas con colesterol (alto colesterol). La razón de haber utilizado estos sistemas se discute más adelante en la sección: Efecto del colesterol en la cinética.

4.3 Microscopía electrónica.

El análisis de la microscopía electrónica de transmisión realizado se llevó a cabo con el fin de conocer la posible existencia de alguna forma de alteración del estado físico de las membranas tras incubación prolongada a 37°C. La serie de micrografías electrónicas obtenidas (Figura 4.9), muestran los microsomas bajo los distintos tratamientos utilizados.

- A.- Control: Microsomas descongelados.
- B.- Microsomas incubados junto con pl-col, durante 1hr a 37°C.
- C.- Microsomas incubados junto con pl-col, durante 3hrs a 37°C.
- D.- Microsomas incubados en amortiguador D, durante 3hrs a 37°C.
- E.- Vesículas incubadas con pl-col, 1hr / 4°C.
- F.- Vesículas incubadas con pl-col, 4hrs / 4°C.

Las micrografías muestran a los microsomas con un aumento de aproximadamente 12600 veces. La barra de referencia (1.2cm) representa 1 um.

Como se puede observar no se presenta alguna alteración evidente en las vesículas con los seis tratamientos utilizados. Los microsomas conservan un volumen y forma similares a las membranas control.

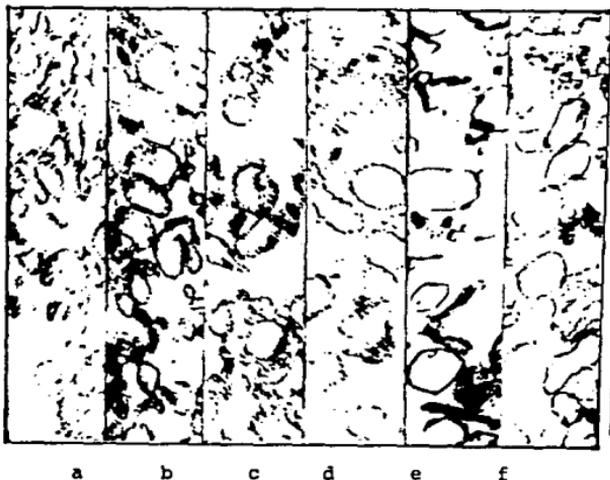


Figura 4.9 Microscopía electrónica de transmisión de vesículas microsomales de sarcolema cardíaco. (a) Microsomas control. (b) Microsomas incubados en lpp-col 1 hr/37°C. (c) Microsomas incubados 3 hrs/37°C con lpp-col. (d) Microsomas incubados en amortiguador D. (e) y (f) Microsomas incubados con lpp-col a 4°C durante 1 y 4 hrs respectivamente. Barra de referencia = 1 μ m.

4.4 Ensayo de la actividad hidrolítica a diferentes temperaturas.

Se realizó una cinética en función a diferentes temperaturas de incubación durante la reacción (Figura 4.10). La actividad que se registra puede variar dependiendo del estado en que se encuentre el tejido utilizado durante la obtención de fracciones microsomales. Para normalizar esta condición en todos los experimentos se utilizaron corazones de res lo más fresco posible y con características similares en talla, peso y estado general. Para todos los ensayos se utilizaron preparaciones que presentaban actividades similares dentro de intervalos ya establecidos en nuestro laboratorio.

Los ensayos de actividad enzimática a diferentes temperaturas muestran que la actividad es dependiente de la temperatura a la que se realizan. Conforme la temperatura aumenta gradualmente hasta una máxima de 55°C, la actividad también lo hace de manera prácticamente proporcional. Por arriba de los 55°C se presenta una importante disminución en la actividad catalítica. A 37°C la velocidad de hidrólisis es cercana a 400 nmoles Pi/mg/min. La máxima velocidad de catálisis observada a 55°C fue de aproximadamente 850 nmoles Pi/mg/min.

Esta serie de experimentos es de particular importancia puesto que representa el punto de partida de este estudio al proponer una relación directa entre la concentración de colesterol de la membrana plasmática y la modulación de la estabilidad térmica de las proteínas membranales.

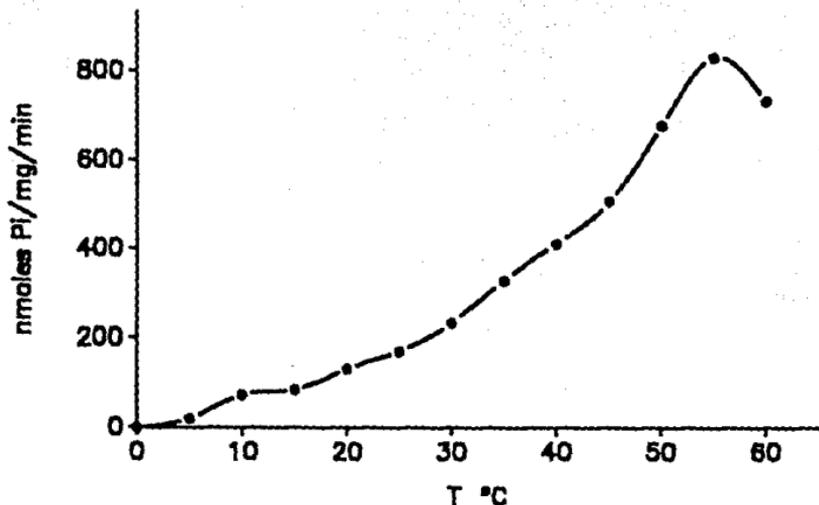


Figura 4.10 Activación hidrolítica de la ATPasa-(Ca²⁺, Mg²⁺) dependiente de la temperatura. Curva representativa de una serie de 6. La reacción se lleva a cabo en un medio que contiene tris/malato 50 mM pH 7.4, MgCl₂ 4 mM, CaCl₂ 10 μ M (1 μ M libre), EGTA 100 μ M, ATP 3 mM.

4.5 Efecto del colesterol en la cinética enzimática de la ATPasa-(Ca²⁺-Mg²⁺).

Se han publicado muchos antecedentes con respecto al efecto del colesterol sobre la actividad de varias enzimas de membrana (64,66,83,84,85).

Con base en los ensayos en los que se varió la temperatura, se encontró que estas condiciones son de los factores más importantes en la modulación de la actividad enzimática, por lo que se decidió investigar el efecto del colesterol sobre la actividad catalítica de la enzima al preguntarnos los siguientes puntos: ¿Influyen el colesterol y la fluidez de la bicapa sobre la actividad de las proteínas integrales?, ¿Presenta la cinética enzimática el mismo comportamiento cuando el nivel de colesterol es diferente en las membranas?, ¿confiere el colesterol propiedades de termoestabilidad a las proteínas de membrana?, ¿se mantiene el efecto inhibitorio del colesterol sobre la velocidad de hidrólisis de la ATPasa a lo largo de la cinética al emplear diferentes temperaturas?.

4.5.1 Cinética de temperatura. Membranas nativas vs membranas lavadas.

El primer sistema utilizado fue el descrito anteriormente como membranas nativas (alto colesterol) vs. membranas lavadas (bajo colesterol), ensayando a diferentes temperaturas la actividad de ATPasa-(Ca²⁺, Mg²⁺) (5°C - 65°C) (Figura 4.11-a). Las concentraciones de colesterol se indican en la figura.

Como se puede observar, la actividad de la enzima es dependiente de la temperatura aplicada al sistema. El aumento en la actividad hidrolítica se observa en paralelo al aumento de la temperatura hasta

50°C para ambas curvas. El efecto inhibitorio del colesterol se observa hasta 50°C en las membranas nativas, mientras que, las membranas con bajo contenido de colesterol presentan una actividad mayor. La actividad máxima del sistema con bajo contenido de colesterol se presenta a los 50°C y corresponde a 450 nmoles Pi/mg prot/mín. Las membranas con alto colesterol, en cambio, presentan una actividad máxima de 350 nmoles Pi/mg/min a los 55°C. Este último punto es de particular importancia pues representa el máximo de la actividad en las membranas con alto contenido de colesterol, mientras que en las de bajo contenido de colesterol representa el primer punto de inactivación. El desplazamiento de 5°C en los picos de actividad máxima para las dos curvas se refleja en una inversión del efecto del colesterol a temperaturas mayores a 55°C. Se puede descartar la posibilidad de sobreestimación de la lectura de Pi puesto que se realizaron, para cada sistema, curvas control de hidrólisis de ATP y a cada punto se le restó el blanco de ATP hidrolizado correspondiente.

Los datos obtenidos en la figura 4.11-a fueron utilizados para calcular las energías de activación e inactivación del sistema a partir de gráficas de Arrhenius (15,64,86) (Figura 4.11-b). La regresión lineal de los puntos dió como resultado la aparición de tres pendientes en los Arrhenius de ambas curvas, todas con índices de correlación mayores a 0.97. El sistema de bajo colesterol mostró energías de activación de 19.6 y 4.8 kcal/mol/°K en las regiones señaladas en la gráfica como A y B respectivamente. La energía de inactivación, considerada aquella para la zona con pendiente positiva, tuvo un valor de 32 kcal/mol/°K (región C). En el sistema con alto colesterol los valores de las energías se modificaron como era de

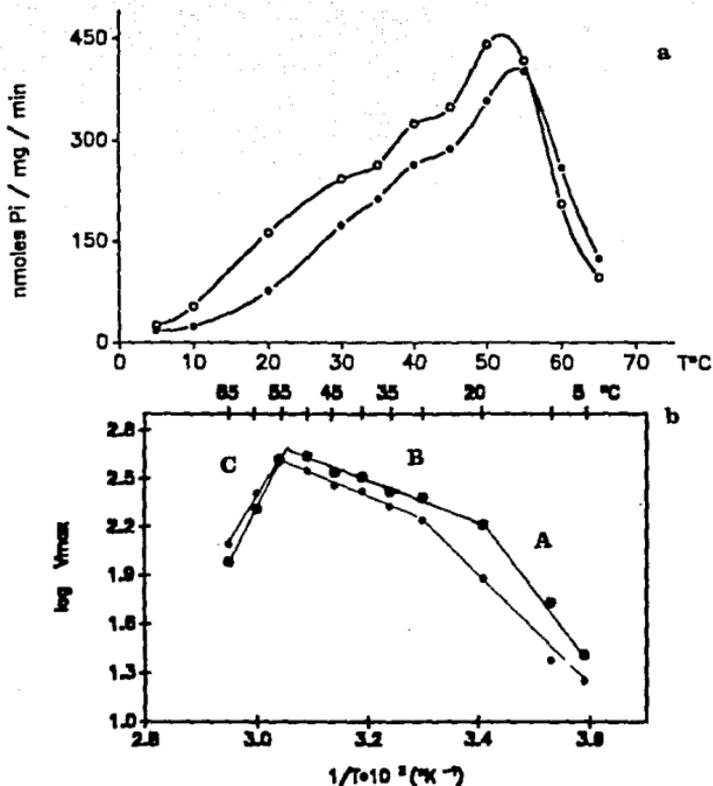


Figura 4.11 (a) Actividad de hidrolítica de la ATPasa-(Ca²⁺, Mg²⁺) en membranas nativas (●) y membranas lavadas (○), incubadas 10 min a diferentes temperaturas en un medio con MgCl₂ 4 mM, CaCl₂ 10 μM (total) 1 μM libre, EGTA 100 μM, ATP 3 mM y tris/malato 50 mM, pH 7.4. (b) Curvas de Arrhenius para el cálculo de las energías de activación e inactivación en membranas nativas y lavadas; membranas nativas: 16.4, 6.5 y 25 kcal/mol/°K. Membranas lavadas 19.6, 4.8 y 32 kcal/mol/°K. Regiones A, B, C respectivamente.

esperarse. Las energías de activación fueron de 16.4 y 6.5 kcal/mol/°K respectivas a la regiones A y B, mientras que la energía de inactivación alcanzó valores de 25 kcal/mol/°K (región C).

De estos valores se puede apreciar que en el sistema con bajo colesterol, la primera fase de activación es rápida (A) y la segunda fase es lenta (B) para dar resultado a una inactivación también rápida en comparación al sistema con más colesterol, en el cual, las fases de activación son moderadas (hasta 25° y 55°C respectivamente). La inversión del signo de la pendiente, o sea, la fase de inactivación enzimática, se retarda en esta segunda curva al conocerse que el colesterol modifica las propiedades de la membrana, posiblemente alterando el arreglo de los lípidos y su transición de fase; en las membranas normales, el retardo en el cambio de la pendiente en la zona de activación, puede ser explicado en términos de cambios de fase de los lípidos que conforman la membrana inducidos por colesterol, lo que a su vez pudiera afectar a la enzima. El desplazamiento de toda la curva hacia temperaturas mayores en las membranas con mayor contenido de colesterol puede estar indicando que en efecto, el colesterol puede proporcionar un medio adecuado al conferir estabilidad a altas temperaturas. Así el colesterol puede conferir una estabilidad térmica a las proteínas que se encuentran embebidas en la bicapa lo que se vería reflejado en una mayor actividad y una menor desnaturalización enzimática.

A lo largo del desarrollo experimental del presente trabajo se encontró que el lavado de las membranas no solo resultaba en la extracción de colesterol de las mismas, sino también, en una

estimulación de la actividad enzimática. Aparentemente con el lavado no solamente se extraía colesterol sino también algunos elementos de carácter proteico quizás relacionados con la actividad enzimática de la ATPasa. Este hallazgo se considerará en el siguiente apartado de esta sección de resultados y discusión. Por otra parte, la metodología empleada en esta sección fue ligeramente modificada para normalizar las condiciones de trabajo descritas a continuación.

4.5.2 Cinética de temperatura. Membranas lavadas vs membranas enriquecidas con colesterol.

El segundo sistema utilizado descrito como membranas lavadas (bajo colesterol) vs. membranas primeramente lavadas e incorporadas (alto colesterol) muestra cambios notorios con respecto a los resultados obtenidos con el sistema descrito anteriormente. Los valores de concentración de colesterol se expresan en la gráfica (Figura 4.12). Antes de preparar los dos tipos diferentes de membranas, éstas fueron lavadas, de la manera anteriormente descrita. Al término del lavado se separó la preparación en dos muestras; por un lado, para incubar las membranas con el sistema de enriquecimiento de colesterol, y por otro lado para incubar la segunda fracción con amortiguador D (utilizado en la preparación de membranas). La incubación a 37°C durante 2-3 hrs resultó en la activación de las membranas obteniéndose una actividad específica máxima mayor a 1 $\mu\text{mola Pi/mg/min}$. La hidrólisis espontánea de ATP fue restada a los puntos mediante una curva control, en la cual, la proteína de membrana se añadía a los tubos una vez que la reacción se había detenido con ATC 304.

En la figura 4.12-a se observa que la actividad enzimática en membranas con alto contenido de colesterol es menor y consistente

hasta temperaturas de 52°C en comparación con la actividad en membranas con bajo contenido de colesterol. La actividad en este punto es la máxima para las membranas lavadas y es de cerca de 1.2 $\mu\text{moles Pi/mg/min}$; en este mismo punto las membranas enriquecidas de colesterol muestran una actividad de 1 $\mu\text{mola Pi/mg/min}$. Si se analiza la actividad a la temperatura de 54°C se observa que las membranas con alto contenido de colesterol presentan su máximo de actividad en la curva con una velocidad aproximada de 1.1 $\mu\text{mola Pi/mg/min}$. La velocidad de hidrólisis para las membranas con bajo y alto contenido de colesterol coincide a esta temperatura, pero la diferencia radica en que este es el primer punto de inactivación en las membranas con menor contenido de colesterol. Una vez más el desplazamiento de toda la curva hacia temperaturas mayores cuando hay más colesterol es un fenómeno muy interesante. Aunque el desplazamiento del pico de actividad máxima en este experimento es de tan solo 2°C y menor que en el anterior (5'), debe de considerarse las implicaciones que un cambio de tan solo 2°C pueden traer en el metabolismo celular.

Se realizaron los cálculos para obtener las energías de activación-inactivación a partir de gráficas de Arrhenius (Figura 4.12-b). La actividad en las membranas con bajo contenido de colesterol muestra una energía de activación de 7.8 kcal/mol/°K y una energía de activación en la fase de inactivación de 30.8 kcal/mol/°K. En estas membranas, así como en las que tenían un alto contenido de colesterol no se presenta un cambio de pendiente a lo largo de la fase de activación. Las membranas enriquecidas con colesterol presentan una energía de inactivación de 33.1 kcal/mol/°K y una correspondiente de activación aproximada de 7.3 kcal/mol/°K. En la gráfica se señalan las regiones de activación e inactivación como A y B respectivamente.

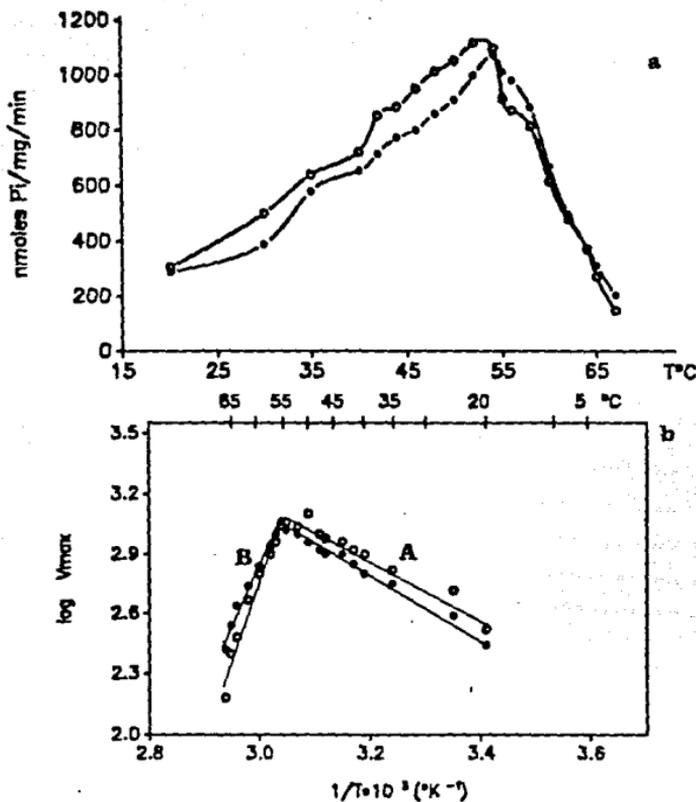


Figura 4.12 Actividad de hidrólisis de la ATPasa-(Ca^{2+} , Mg^{2+}) en membranas lavadas (O) y membranas enriquecidas con colesterol (●). El medio de reacción contiene MgCl_2 4mM, CaCl_2 1 μM libre, EGTA 100 μM , ATP 3mM y tris/malato 50 mM, pH 7.4. Aunque las energías de activación e inactivación (b) son similares, en el sistema de alto colesterol la inactivación se retarda con respecto a la temperatura. Membranas lavadas (7.8 y 30.8 kcal/mol/°K), membranas enriquecidas (7.3 y 33 kcal/mol/°K); regiones A y B respectivamente.

No se conoce completamente el papel que desempeña el colesterol en la membrana , la idea de que esta molécula pueda conferir estabilidad térmica a los sistemas que regulan el metabolismo celular es una idea que despierta interés por los fenómenos termodinámicos de los sistemas biológicos.

En este trabajo, así como en trabajos anteriores realizados en nuestro laboratorio (66,84), se ha demostrado que el colesterol no solo ejerce un efecto inhibitorio sobre la actividad hidrolítica de la enzima a temperatura fisiológica, sino también, que el colesterol confiere cierto grado de termoestabilidad a la enzima retardando la temperatura de inactivación y permitiendo así una catálisis aún a temperaturas muy por arriba de intervalos fisiológicos. El siguiente paso de la investigación tuvo el objetivo de conocer cual era el desempeño de la termoestabilidad conferida por colesterol a lo largo del tiempo en cinéticas con duración de hasta 2hrs. Si la hipótesis planteada era correcta, se esperaría que el colesterol no solo permitiera la catálisis a temperaturas más altas, sino que también ésta se mantuviera más estable en el tiempo. Los resultados obtenidos se ilustran a continuación.

4.5.3 Cinética de actividad en función del tiempo.

De las curvas de temperatura se eligieron tres puntos: 37°, 50° y 60°C. Estos puntos fueron tomados con el objetivo de tener el registro de actividad contra tiempo en las zonas de completa activación, mínima activación o actividad máxima e inactivación respectivamente. Como se observa en la figura 4.13, la actividad con respecto al tiempo es muy distinta para las tres temperaturas. El sistema de membranas utilizado corresponde al denominado membranas lavadas (bajo colesterol) vs.

membranas lavadas e incorporadas (alto colesterol).

A 60°C se registra actividad durante los primeros 15 minutos, después de este tiempo se observa que la enzima está prácticamente 'muerta'. En la figura 4.12 se observa que el efecto inhibitorio del colesterol sobre la actividad de la enzima se invierte a esta temperatura al observar que las membranas lavadas presentan una actividad inferior a la que presentan las membranas enriquecidas con el lípido.

A 37°C se observa que la actividad en ambas preparaciones de membrana tiene un aumento gradual. A lo largo del tiempo las membranas con cantidades reducidas de colesterol presentan una actividad mayor, de acuerdo con las observaciones previas (Figura 4.12). Durante 15 minutos de incubación, la actividad promedio observada en ambos sistemas es de alrededor de 1.6 μ moles Pi/mg prot.

Sin duda los experimentos más interesantes de esta figura son los que representan la actividad medida a 50°C. Esta temperatura está muy cerca de los máximos de actividad tanto para las membranas lavadas, como para las membranas lavadas y enriquecidas. Como se observa, la activación inicial es mayor en estas membranas, la actividad a los 15 minutos en los dos sistemas con diferente contenido de colesterol rebasa las 2 μ moles de Pi/mg prot. Bajo estas condiciones las membranas incorporadas presentan menor actividad que las membranas lavadas, esto es, el efecto inhibitorio del colesterol se manifiesta. Sin embargo, transcurridos 30 minutos, la hidrólisis de ATP en ambos tipos de membranas es exactamente la misma (3.6 μ moles Pi/mg prot aprox.). Después de media hora la actividad en las membranas es muy distinta. En primer término el efecto del colesterol se invierte, la catálisis en las membranas con mayor contenido de colesterol es más

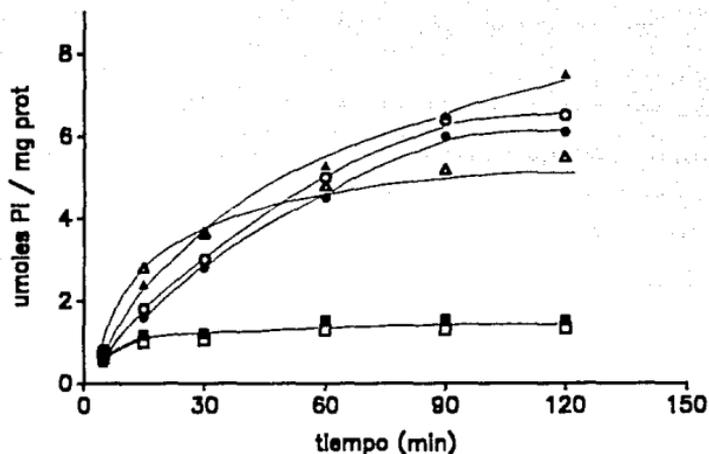


Figura 4.13 Actividad hidrolítica de la ATPasa-(Ca²⁺, Mg²⁺) a diferentes tiempos de reacción en un medio que contiene MgCl₂ 4 mM, CaCl₂ 10 μ M (total) 1 μ M libre, EGTA 100 μ M, ATP 3 mM y tris/malato 0.5 mM. La actividad se expresa como umoles Pi/ mg proteína. Símbolos abiertos, bajo colesterol; símbolos cerrados alto colesterol. 37°C (●); 50°C (▲); 60°C (■).

y se incrementa sin llegar a estabilizarse. En cambio, la actividad en las membranas con menor contenido de colesterol disminuye progresivamente y, aunque no se observa en esta curva, llega a estabilizarse alrededor de las 5 $\mu\text{moles Pi/mg prot.}$

En la figura 4.12 se observa que a 50°C en las membranas enriquecidas con colesterol no se ha alcanzado la actividad máxima. De hecho, aunque en ese punto la activación por temperatura se encuentra en su etapa final, el presentar más o menos colesterol en la membrana puede considerarse como un factor crítico para la estabilidad de la enzima. Esto puede explicar el porque la catálisis en las membranas enriquecidas con colesterol no se estabiliza aún después de dos horas de actividad continua; en este tiempo se obtiene una hidrólisis de ATP de 8 $\mu\text{moles Pi/mg prot.}$

En comparación con las membranas a 37°C que presentan una activación inicial menor, a 50°C las membranas con bajo colesterol se inactivan más rápido que las mismas a 37°C . Las membranas con alto colesterol a 50°C ilustran de una manera clara que el colesterol tiene la capacidad de conferir termoestabilidad a la enzima expuesta a altas temperaturas.

El efecto del colesterol sobre la actividad hidrolítica de la ATPasa-($\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$) se ha demostrado hasta este punto. La manera de como se ejerce este efecto constituye toda una polémica hoy día. En el presente trabajo varios aspectos se toman en consideración y se discuten.

4.5.4 ¿ De qué manera el colesterol influye sobre la actividad enzimática ?

Al pensar en la modulación de la actividad enzimática por colesterol, se debe de considerar que esta molécula, por un lado, interactúa con los componentes membranales y por otro, modifica las propiedades físicas de la membrana (73). Así, para entender mejor el efecto del colesterol sobre la actividad enzimática se debe de considerar, la composición química de los lípidos que forman la membrana, la fluidez de la bicapa, la temperatura de transición de los lípidos, su arreglo en la bicapa, la distribución que puede adoptar el colesterol, las interacciones lípido-lípido y lípido -proteína, etc. (30,87,88).

Los resultados obtenidos en este trabajo muestran datos importantes. En primer lugar se tiene que el colesterol ejerce un control sobre la actividad de la ATPasa-(Ca^{2+} , Mg^{2+}), este control se refleja como una inhibición parcial de la hidrólisis de ATP, mediada por la enzima, en sistemas donde la concentración de este lípido es mayor. Este efecto inhibitorio puede estar relacionado con una restricción en el movimiento de la enzima, debido a que la adición de colesterol disminuye la fluidez de la membrana. También pudiera relacionarse con cambios en el espesor de la membrana con los cuales se reduzca la exposición de los sitios activos de la enzima. Una interacción directa del colesterol con la enzima que resulte en cambios conformacionales de la proteína, en este punto, no se descarta.

En segundo lugar, se encontró que, si bien el colesterol ejerce un efecto de inhibición sobre la actividad de la enzima, también confiere

un grado de termoestabilidad a la ATPasa-(Ca²⁺, Mg²⁺), que permite a ésta, presentar catálisis a temperaturas muy altas. El hecho de que el colesterol inhibe o frena la actividad de la enzima pudiera interpretarse en términos de que la enzima, al estar protegida por las moléculas de colesterol, se encuentra en mejor condición para trabajar a temperaturas mas altas.

En tercer lugar los datos señalan que el colesterol puede modular la actividad enzimática, con base en que provoca o induce un aumento en la energía de activación necesaria para inactivar a la enzima, fenómeno que se vé resaltado primero, por el corrimiento de toda la curva de actividad, hacia temperaturas mayores en los sistemas con alto contenido de colesterol y en segundo lugar, por el retardo en el cambio de la pendiente en las curvas de inactivación enzimática. La presencia de colesterol en la bicapa, determina el cambio de fase en los fosfolípidos. Sistemas membranales con diferente contenido de colesterol, presentarán diferentes temperaturas de transición de fase de los lípidos, lo que se refleja en el retardo de las energías de activación.

Por último, el efecto termoprotector del colesterol sobre la enzima se hace más evidente en los ensayos de actividad en función del tiempo. Tomando en cuenta que el efecto protector del colesterol se presenta a temperaturas mayores a 50°C, es importante resaltar que a estas temperaturas el colesterol permite una catálisis enzimática, no solo mayor, sino que por más tiempo; lo anterior con respecto a los sistemas con menor contenido de colesterol.

La molécula de colesterol es un lípido que se encuentra en la bicapa, ahí interacciona con los otros componentes membranales, sean

éstos otros lípidos, proteínas, azúcares, etc. Sin duda cada uno de estos elementos tiene una función y un papel determinante para la fisiología de la membrana, sin embargo, el colesterol es una molécula que tiene la propiedad de poder alterar toda la serie de interacciones de los componentes membranales entre sí; ésto, debido a sus características de hidrofobicidad, tamaño, distribución, estabilidad, orientación en el plano de la membrana, etc. (70,74).

Los resultados obtenidos en este trabajo son la respuesta de varios sistemas membranales en los cuales la interacciones colesterol/componentes de la membrana, han sido alteradas. La alteración puede darse a diferentes niveles, los cuales se exponen más adelante en el texto.

Los cambios en la interacción colesterol/componentes de la membrana pueden ser visualizados por modificaciones en la actividad hidrolítica de la ATPasa-(Ca^{2+} , Mg^{2+}). Sin embargo con este trabajo solamente se hace una descripción del fenómeno como tal. Muchas ideas surgen para explicar este fenómeno, aunque un análisis fino del fenómeno se torna indispensable.

A continuación se presenta una serie muy amplia de estas ideas con las que se pretende explicar tanto el efecto inhibitorio del colesterol como el efecto termoprotector sobre la ATPasa-(Ca^{2+} , Mg^{2+}) de membrana plasmática.

Las proteínas de membrana se encuentran embebidas en una matriz lipídica y se asocian de una manera no covalente con los lípidos que forman la bicapa (89,90). A temperaturas fisiológicas, las biomembranas existen bajo el arreglo de un 'mosaico fluido' (91); la fluidez de la membrana se ha considerado como un factor muy importante que afecta una gran variedad de procesos membranales (66,92). El

aumento en la temperatura modifica el arreglo y disposición de los fosfolípidos que forman la bicapa.

Muchas funciones de las membranas biológicas están influenciadas por la composición y el estado físico de los lípidos que las constituyen (84). La célula puede adquirir cierto grado de control sobre la actividad de las proteínas estructurales de membrana regulando la fluidez de la bicapa. Estos cambios de actividad pueden ser resultado no solo de una modificación en la fluidez, sino de alteraciones en la composición lipídica de la membrana (93).

La tasa de operación de las proteínas integrales es dependiente tanto de la viscosidad de la membrana (94), como de la composición de los lípidos que las rodean (95,96). Algunos estudios con la ATPasa-(Ca^{2+} , Mg^{2+}) de retículo sarcoplásmico, sugieren que la actividad enzimática está determinada principalmente por la estructura química de los fosfolípidos que la rodean, más que por su estado fluido (7,94,97). Se conoce que la actividad de la ATPasa-(Ca^{2+} , Mg^{2+}), localizada en membranas de retículo sarcoplásmico, es sensible tanto a las cabezas polares como a las cadenas hidrocarbonadas de los lípidos a su alrededor (98,99). Al modificar el contenido de colesterol en la membrana la interacción de los fosfolípidos con la proteína también cambia y con esto la actividad enzimática. Si existen en la proteína sitios determinados para facilitar el contacto fosfolípido/enzima, la modificación de estos contactos inducida por colesterol, puede resultar en cambios conformacionales en la enzima que se reflejan como cambios en la actividad de hidrólisis.

Se ha propuesto que para la ATPasa-(Ca^{2+} , Mg^{2+}) la relación de E_1/E_2 se modifica paralelamente con el cambio en la composición de los

lípidos de la bicapa (93,100,101,102). La actividad de la enzima es considerablemente menor si los fosfolípidos circundantes se encuentran en estado gel (7,94).

Cada proteína integral hace contacto con la matriz lipídica por medio de un anillo lipídico específico (89,103). Para la mayoría de las enzimas estructurales la actividad enzimática se inhibe irreversiblemente si el anillo lipídico se extrae, esto, debido a que las regiones hidrofóbicas de la proteína son expuestas al medio acuoso y la inestabilidad de la molécula termina con su desnaturalización (89,90). La fluidez de los lípidos anulares es menor que la del resto de los lípidos debido a la interacción de las cadenas hidrocarbonadas de los fosfolípidos con la superficie constante y relativamente inmóvil de las proteínas (93). La inclusión de colesterol puede modificar el anillo lipídico, en el sentido de controlar su estado de fluidez. De esta manera si la enzima se encuentra más restringida en su movimiento, el desarrollo del ciclo catálico puede ser más lento y la hidrólisis de ATP obtenida puede interpretarse como un efecto de inhibición enzimática.

En la mayor parte de las enzimas integrales de membrana el colesterol se segrega del anillo lipídico que rodea a las proteínas al igual que otros lípidos inhibidores (89), por lo que esta molécula no tiene una influencia directa sobre su actividad (103). Sin embargo, existe la idea de que el colesterol pueda desplazar a los lípidos que rodean a la proteína y así modular su actividad (92,94), al señalarse que los efectos del colesterol sobre la actividad enzimática no pueden atribuirse solamente a cambios en la fluidez de membrana. Un reporte indica una interacción directa del colesterol con la ATPasa-(Na⁺, K⁺) incorporada en liposomas de dimiristoleoilfosfatidilcolina/colesterol.

Esta es una de las pocas evidencias de interacción directa esterol-proteína (65).

Se han calculado las constantes de afinidad proteína-colesterol y proteína-fosfolípido y la diferencia entre ambas es considerable; la tasa de recambio de los lípidos anulares es muy baja (96,104). El colesterol tiene la capacidad de desplazar solo cantidades muy pequeñas de fosfolípidos que rodean a la ATPasa-(Ca^{2+} , Mg^{2+}) de retículo sarcoplásmico. (99). Si el colesterol pudiese desplazar a todos los lípidos del anillo, muy probablemente se encontraría que la actividad enzimática desaparece, con base en que la estructura anular del colesterol es mucho más rígida en comparación con la estructura de un fosfolípido (70) y esto limitaría mucho más los cambios conformacionales de la enzima para llevar a cabo la hidrólisis de ATP y el transporte de Ca^{2+} .

El anillo lipídico tiene una fluidez diferente al resto de los lípidos de la bicapa. Los lípidos del anillo presentan un arreglo más rígido o menos fluido (60). Estos lípidos, por un lado, interaccionan con el resto de los lípidos y por otro lado, interaccionan con la proteína; esta segunda interacción estabiliza la organización del anillo. La ATPasa-(Ca^{2+} , Mg^{2+}) interactúa directamente con 30 moléculas de fosfolípidos; conociéndose que un mínimo de 35 moléculas son necesarias para mantener la actividad máxima de la ATPasa (98,105). El efecto del colesterol debe de ser transmitido a través del anillo a la proteína, donde la transmisión puede ser dependiente de la composición de dicho anillo. Si el colesterol interacciona con los fosfolípidos, puede tener efectos sobre la fluidez del anillo que rodea a la proteína y así modular la actividad de la misma.

Algunos autores señalan que el anillo de lípidos puede proteger a la enzima de cualquier cambio en la fluidez del resto de los fosfolípidos de la membrana (98,105). Puede pensarse que esta protección llega a ser insuficiente cuando la temperatura del sistema es alta. Sin embargo, se ha demostrado que el colesterol puede inducir la protección de la enzima aún a temperaturas altas (85).

A temperaturas bajas los lípidos de las membranas biológicas presentan un arreglo compacto y muy ordenado (gel), y a medida de que la temperatura aumenta, el arreglo de los lípidos se desorganiza. Dependiendo de la naturaleza lipídica de la membrana, existe una temperatura a la cual el estado gel de la membrana se transforma a un estado fluido o de líquido cristalino.

El desplazamiento de la curva de hidrólisis hacia temperaturas más altas, en membranas con mayor contenido de colesterol, puede explicarse en el sentido de que el colesterol retrasa la transición de fase de los lípidos; la enzima trabaja en una membrana que tiene un estado de fluidez similar al que tendría una membrana sin colesterol a temperaturas menores. Esto se ha interpretado como un efecto termoprotector conferido por el colesterol a la ATPasa-(Ca²⁺, Mg²⁺).

En el estado de gel la actividad de la ATPasa es muy baja, conforme la temperatura aumenta y el estado de la membrana se desorganiza, la actividad enzimática también aumenta; entre más fluido sea el estado de la bicapa, mayor será la actividad enzimática presente en estas membranas (93). Si pensamos en que los sistemas proteicos cuentan con una vida media determinada, se puede predecir que mientras más activo sea el sistema, el tiempo de vida media se reduce y su tasa de recambio en la bicapa será mayor. A temperatura fisiológica las membranas se encuentran en un estado fluido (60), si se incorpora

colesterol en exceso a la membrana, el estado gel puede ser recuperado (92). A concentraciones fisiológicas el colesterol no regresa a la membrana al estado de gel, pero le confiere un estado semifluido o de semigel (106) que antecede al estado completamente fluido o líquido cristalino, en el cual, las proteínas tienen mayor estabilidad. Esta estabilidad, se puede pensar, resulta en cambios conformacionales más lentos; la enzima de cierta forma, se encuentra restringida para moverse en la bicapa puesto que el arreglo de los lípidos es más rígido.

El enriquecimiento de las membranas con colesterol afecta las características generales de la matriz lipídica. El colesterol incrementa la viscosidad local de fase de los lípidos en la membrana sin ejercer ningún efecto aparente sobre la fase lipídica de las proteínas (107).

Cuando se somete a un sistema membranal a temperaturas elevadas la actividad enzimática será el resultado de la suma algebraica tanto del efecto de la temperatura como del efecto condensante del colesterol.

La disminución en la actividad catalítica de la enzima puede ser considerada no como un efecto inhibitorio del colesterol, sino como un efecto protector ante la temperatura. La disminución en la actividad en membranas con mayor contenido de colesterol puede ser una forma de previsión del recambio de unidades de enzima a lo largo del ciclo celular. Si pensamos en actividad catalítica a temperatura fisiológica, el colesterol puede considerarse como un factor involucrado en la economía energética de la célula, puesto que al impedir una tasa acelerada de actividad disminuye la tasa de recambio molecular a través del tiempo. El aumentar la temperatura del sistema

se puede considerar como un proceso de aceleración, lo cual, puede reflejar lo que sucede con la actividad enzimática durante intervalos más largos de tiempo.

Se ha señalado ya, la capacidad del colesterol para modular las propiedades físicas de la membrana (73). De las principales funciones del colesterol en la membrana resalta la de estar involucrado en minimizar la permeabilidad a moléculas pequeñas y iones (73,98). El efecto de inhibición enzimática encontrado en este trabajo puede ser el resultado de una insuficiencia de sustrato para la enzima.

El efecto inhibitorio del colesterol surge de la disminución de los grados de libertad de movimiento de las cadenas de los fosfolípidos (73). Esta restricción de movimiento resulta en un incremento de la viscosidad en el plano de la membrana (73). Tanto la fluidez, como su inverso la viscosidad, modifican la fisiología de las proteínas (108); la viscosidad puede actuar elevando la barrera energética que se debe de rebasar para que un proceso se lleve a cabo (93).

El colesterol puede modular la actividad y la distribución de las proteínas en la membrana (100). La membrana posee una cantidad crítica de colesterol que de manera normal modula la actividad de la ATPasa- (Ca^{2+}, Mg^{2+}) (84). Sin embargo cambios relativamente pequeños en este contenido normal de colesterol, tienen efectos profundos en el funcionamiento de las enzimas estructurales (109,110).

Se ha sugerido que el efecto modulador del colesterol se presenta por una disminución en la libertad de movimiento de la enzima debido a cambios en la fluidez de la membrana (85), así como en la distribución espacial de los lípidos en la membrana (65).

La molécula de colesterol atenúa el movimiento de las cadenas de los ácidos grasos en desorden, dando resultado a una reducción en la

entalpía a nivel de la transición de fase termotrópica de los lípidos y a una disminución en la fluidez de la membrana a temperaturas superiores a la de transición de fase de los lípidos que la integran (111). Esto resulta en una enzima menos susceptible a la inactivación térmica.

La primera evidencia de las interacciones lípido-lípido se dieron a conocer cuando se detectaron las transiciones cooperativas de fase en membranas de Acholeplasma laidlawii (8,112).

La molécula de colesterol en la membrana tiene influencia sobre la sensibilidad térmica de las proteínas y de otros lípidos, de esta manera puede jugar un papel importante en las propiedades de las proteínas estructurales, el que se refleja en cambios de actividad y termoestabilidad (85,113). Se ha sugerido que la disminución en la actividad enzimática puede estar relacionada por cambios en la hidratación de la membrana inducidos por colesterol. La molécula de agua está relacionada con el mantenimiento de las interacciones no covalentes en varios sistemas enzimáticos; con base en esto, se ha propuesto la posibilidad de que el arreglo normal de los puentes de hidrógeno entre el agua y los fosfolípidos que rodean a las proteínas, sea dependiente de la cantidad de colesterol presente en la bicapa (85).

En algunos casos, el colesterol aumenta el espesor de la bicapa e incrementa la orientación perpendicular de las cadenas de acilo (114). Datos de difracción de rayos X revelan que la molécula de colesterol se localiza de tal manera en la membrana que su grupo hidroxilo se encuentra en la vecindad inmediata del grupo ester-carbonil de los fosfolípidos, así el colesterol aumenta la longitud de la molécula del

fosfolípido y produce un aumento en el espesor de la bicapa. El colesterol incrementa el grosor de la bicapa en membranas constituidas por fosfolípidos con cadenas de hasta 16 carbonos de largo. Sin embargo, para fosfolípidos de 18 carbonos de largo, se registra una respuesta diferente, el colesterol disminuye el espesor de la bicapa. La manera de resolver los problemas de empaquetamiento en el centro de la bicapa es que las cadenas de los fosfolípidos llenen los espacios no ocupados por el colesterol mediante la adopción de estados más desordenados a la altura de las colas hidrofóbicas. Esto resulta en una disminución efectiva del espesor de la bicapa (60).

En vista a que la ATPasa-(Ca^{2+} , Mg^{2+}) presenta regiones hidrofóbicas e hidrofílicas bien determinadas, y que el colesterol modula el espesor de la bicapa, la exposición de las diferentes regiones de la proteína puede verse modificada, con cambios en el contenido de colesterol del sistema. Si la membrana presenta un espesor mayor al original, el cambio en la actividad enzimática puede derivar de dos procesos:

El primero sería pensar en que la proteína presentaría regiones hidrofílicas no expuestas al medio que baña la membrana, esto energéticamente es muy desfavorable. El hecho de tener regiones polares en la zona intramembranal hidrofóbica puede tener repercusiones en la conformación de la enzima, lo que puede manifestarse en cambios en la actividad catalítica.

El segundo proceso para explicar el cambio en la actividad es considerar que las regiones hidrofílicas de la enzima deben de mantenerse expuestas al medio; la enzima debe de presentar rearrreglos en su conformación para contrarrestar el aumento en el espesor de la bicapa y mantener solo los dominios hidrofílicos expuestos.

Si los cambios conformacionales modifican la exposición de los dominios en los que se localizan, por ejemplo, los sitios de unión para Ca^{2+} , Mg^{2+} , calmodulina, ATP, etc., la interacción de estos dominios en esta posición puede ser diferente y de ahí que se registren cambios en la actividad enzimática.

Si el espesor de la membrana disminuye con respecto a la cantidad de colesterol la exposición de los dominios enzimáticos sería inversa a la anterior. Algunas regiones intramembranales hidrofóbicas de la proteína estarían expuestas al medio; como resultado de esta exposición se pueden presentar rearrreglos conformacionales que de nueva cuenta alteran la actividad de la enzima.

Si se conociera la composición nativa del anillo lipídico que rodea a la ATPasa-(Ca^{2+} , Mg^{2+}) de membrana plasmática, se podría inferir el efecto que tiene el colesterol tanto sobre su fluidez, como sobre su espesor.

El hecho de que el colesterol disminuya la permeabilidad de la membrana (112,114) es también un factor importante. La baja en la actividad enzimática puede ser atribuida a una reducción en la permeabilidad al Ca^{2+} (98). En este punto puede pensarse que el colesterol ejerce un efecto doble; disminuye la capacidad de movimiento de la enzima y además reduce el transporte de Ca^{2+} mediado por la ATPasa-(Ca^{2+} , Mg^{2+}).

Otra evidencia de que la interacción del colesterol con la proteína es indirecta (115) ha sido señalada por resultados en los cuales el lípido no altera afinidad de la proteína por su sustrato (85,116,117).

El efecto del colesterol puede considerarse como un mecanismo de estabilización, inhibiendo cambios estructurales en la membrana

durante condiciones térmicas extremas, en vista de que el papel estabilizador del colesterol es necesario para mantener la integridad física de la membrana en la mayoría de las células eucariontes (114).

Es claro que una parte importante de control sobre las proteínas estructurales se presenta a nivel de la región transmembranal. Los cambios e interacciones que ahí se presentan son los determinantes de la actividad enzimática. Tanto la fluidez como la composición lipídica, juegan un papel muy importante. El tratar de explicar el control de las proteínas de membrana tomando en cuenta solo uno de estos dos factores resultaría en un análisis incompleto del fenómeno (115).

Se ha demostrado que la actividad de la ATPasa-(Ca²⁺, Mg²⁺) es inversamente proporcional a la concentración de colesterol en las membranas, mostrando la enzima una actividad baja cuando el nivel de colesterol es alto y viceversa (67,117). Al aumentar la concentración de colesterol, la ATPasa-(Ca²⁺, Mg²⁺) adquiere un cierto grado de termoestabilidad, fenómeno que se pierde si de las membranas se extrae este lípido. En experimentos realizados con membranas con diferentes niveles de colesterol se observó un importante desplazamiento de la temperatura óptima aparente de actividad, la cual es dependiente de la cantidad de colesterol presente en el sistema. A temperaturas altas, la relación entre la actividad y la termoestabilidad cambia en función de la concentración de colesterol en las membranas.

El efecto del colesterol sobre la actividad enzimática de la ATPasa-(Ca²⁺, Mg²⁺) puede ser ejercido mediante los mecanismos que se resumen en la figura 4.14.

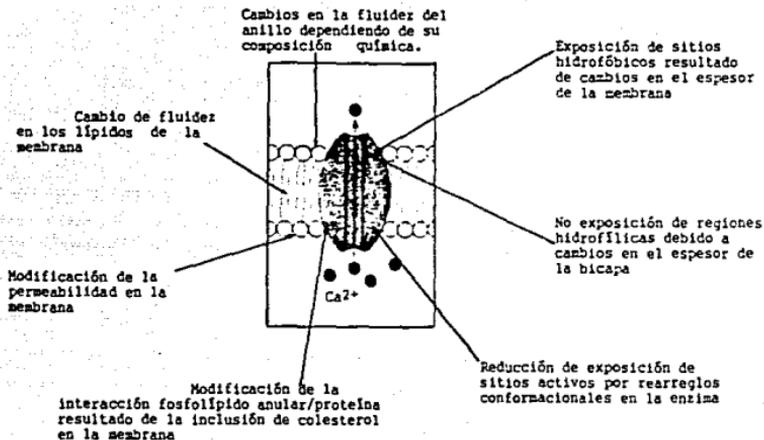


Figura 4.14 Modelo propuesto en la modulación del colesterol sobre la actividad enzimática de la ATPasa (Ca²⁺, Mg²⁺).

4.6 Ensayo de actividad hidrolítica con concentrado de proteínas extraídas del lavado de las membranas.

No se ha reportado inhibidor natural específico alguno para la ATPasa-(Ca²⁺, Mg²⁺) de membrana plasmática (21). El hallazgo de un compuesto o molécula con estas propiedades sería de gran importancia y utilidad para los estudios cinéticos de ATPasas membranales.

4.6.1 Respuesta enzimática.

Como ya se mencionó, durante el desarrollo de este estudio se detectó que con una centrifugación a 50,000 g en amortiguador D, era posible eliminar algunos elementos de naturaleza proteica asociados a las membranas. Estos péptidos, aparentemente están relacionados con la actividad hidrolítica de la ATPasa-(Ca²⁺, Mg²⁺), lo cual fue observado tras haber realizado una serie de ensayos de actividad biológica de esta fracción a 37°C.

Los sobrenadantes de lavados de varias muestras fueron conservados y posteriormente concentrados aproximadamente 20 veces. Se determinó la concentración de proteína final y diferentes cantidades de concentrado fueron agregadas a las muestras. En la figura 4.15 se presenta una comparación de la hidrólisis de ATP en membranas nativas y membranas lavadas en presencia y ausencia de diferentes cantidades del extracto de proteínas obtenido.

La actividad específica en membranas nativas (basal = 100%) fue de aproximadamente 200 nmoles Pi/mg prot/min. Al agregar 5 ug del concentrado de proteína, la actividad enzimática presentó una disminución del 44% con respecto a la basal.

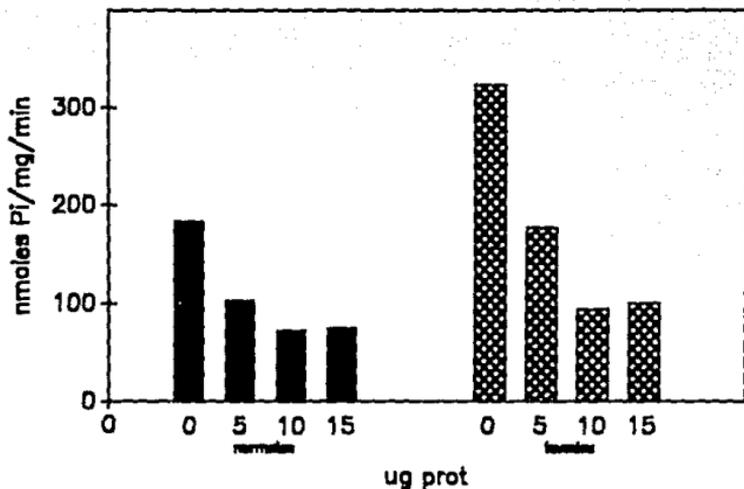


Figura 4.15 Actividad hidrolítica de la ATPasa-(Ca²⁺, Mg²⁺) incubada con cantidades diferentes de concentrado de proteínas extraídas del lavado de las membranas. La A.E. en membranas nativas representa el 100% (basal). Al agregar 5 y 10 ug de proteína de concentrado, la actividad disminuye un 44 y 61 % respectivamente. La A.E. en membranas lavadas es un 75% mayor con respecto a la basal. Adiciones graduales del concentrado de proteínas restauran la actividad basal e inclusive, disminuyen en mayor grado la actividad enzimática. El medio de reacción contiene CaCl₂ 1 μM libre, MgCl₂ 4 mM, EGTA 100 μM, ATP 3 mM y tris/fosfato 50 mM, pH 7.4.

Con 5 y 10 ug la actividad disminuyó hasta 75 nmoles Pi/mg/min correspondiendo a una disminución total del 61%. Las membranas lavadas (bajo colesterol) presentaron una actividad 75% mayor que la basal (325 nmoles Pi/mg/min). Sin embargo en presencia de 5 ug del concentrado de proteína, la actividad disminuyó a 200 nmoles Pi/mg/min. Con una cantidad mayor del concentrado, la hidrólisis se estabiliza en 100 nmoles Pi/mg/min (71% de la basal).

Estos cambios en actividad podrían ser atribuidos a la presencia de un inhibidor proteico cuyas características se encuentran en proceso de estudio en nuestro laboratorio.

4.6.2. Análisis electroforético.

Para reconocer la naturaleza proteica del extracto de membranas se procedió inicialmente a utilizar geles de poliacrilamida al 7.5% teñidos con azul de Coomasie y tinción de plata. En la figura 4.16 se presenta un gel representativo teñido con plata. Los dos primeros carriles contienen marcadores de peso molecular (carril 1: albúmina 66Kd, carril 2: marcas de 29,45,66,97,116 y 205 Kd). En el tercer carril se colocaron membranas nativas recién descongeladas; en el carril #4 se colocaron membranas lavadas (pastillas de lavado) y por último en los carriles 5 y 6 se colocó concentrado de sobrenadantes obtenidos tras un lavado de 30min y concentrado de sobrenadantes de un segundo lavado de 30min respectivamente.

En el carril número 5 se revela una serie de bandas que corresponden a los elementos que son extraídos con el lavado. Esencialmente estos factores son componentes de bajo peso molecular.

De particular interés son aquellas bandas que desaparecen de las

membranas lavadas (carril 4) y aparecen en el 5º carril. Las flechas señalan algunas bandas que aparecen en ambos carriles, pero que se enriquecen con el lavado de las membranas. En estudios futuros se realizarán la identificación y caracterización de estos elementos para así aislar a homogeneidad el factor que ejerce la acción inhibitoria sobre la actividad catalítica de la ATPasa-(Ca²⁺, Mg²⁺).



Figura 4.16 Electroforesis en geles de poliacrilamida teñidos con plata. Carril 1, albúmina bovina (66Kd). Carril 2, marcadores de peso molecular (29,45,66,97,117 y 205 Kd). Carril 3, membranas nativas. Carril 4, membranas lavadas. Carril 5 y 6, concentrado del lavado de 30 min y 30 min + 30 min de lavado respectivamente.

5. CONCLUSIONES

La actividad hidrolítica de la ATPasa-(Ca²⁺, Mg²⁺) es dependiente de la concentración de Ca²⁺ libre en el medio de reacción. La presencia de este catión es completamente necesaria para la enzima.

Para llevar a cabo la hidrólisis de ATP la enzima puede utilizar como sustrato tanto al complejo Ca-ATP como al complejo Mg-ATP. La afinidad por el segundo es mayor.

El hecho de que la actividad hidrolítica de la enzima sea mayor cuando se utiliza el complejo Mg-ATP como sustrato y que no exista una estimulación por Ca²⁺, sugiere la existencia de una ATPasa-Mg²⁺ cuya actividad pueda contribuir a sobreestimar la actividad de la ATPasa-(Ca²⁺, Mg²⁺).

El aumento en el contenido de colesterol en la membrana sarcolemal cardíaca tiene un efecto inhibitorio sobre la actividad hidrolítica de la ATPasa-(Ca²⁺, Mg²⁺).

El efecto de la temperatura sobre la actividad de la ATPasa-(Ca²⁺, Mg²⁺) es dependiente de la concentración de colesterol en el sistema membranar.

Los datos obtenidos sugieren que el colesterol actúa sobre las propiedades físicas de la membrana modulando la actividad de las proteínas integrales.

El corrimiento hacia temperaturas mayores en la actividad enzimática inducido por colesterol, sugiere que este lípido ejerce un efecto inhibitorio a bajas temperaturas y un efecto protector o de mantenimiento a temperaturas altas.

A temperaturas bajas el colesterol puede actuar como un factor de prevención del recambio de unidades de ATPasa en el tiempo.

El colesterol modifica las energías de activación de la enzima en membranas con diferente contenido de colesterol. Energías de activación medidas tanto en la fase de activación como en la fase de inactivación de la enzima inducidas por temperatura. El incremento en el contenido de colesterol provoca un aumento en la energía de activación necesaria para inactivar a la enzima.

La termoestabilidad conferida a la ATPasa-(Ca^{2+} , Mg^{2+}) por el efecto indirecto del colesterol permite llevar a cabo una hidrólisis de ATP aún a temperaturas elevadas. Las cinéticas contra tiempo muestran a la enzima activa por un mayor tiempo en sistemas membranales donde el contenido de colesterol es alto.

La termoestabilidad conferida a la enzima por colesterol es resultado de probables cambios en el arreglo de los fosfolípidos de la bicapa, tanto de los que forman el anillo, como de los que conforman el resto de la membrana. Cambios en la fluidez, espesor, permeabilidad e hidratación en la membrana causados por la inclusión de colesterol, pueden ser considerados como los factores responsables de los cambios en la actividad enzimática.

El desplazamiento aparente de las temperaturas de transición de los lípidos inducido por el colesterol, sin duda refleja uno de los sistemas de regulación homeostática y control celular más interesantes que se conocen.

De igual manera, cambios en el arreglo, disposición y movimiento de los lípidos, inducidos por el colesterol, pueden modular la actividad de la ATPasa-(Ca²⁺, Mg²⁺).

El presente trabajo representa la caracterización inicial del efecto cinético del colesterol sobre la actividad de la ATPasa-(Ca²⁺, Mg²⁺), por lo que varios puntos quedan por ser estudiados durante la realización de mis estudios de maestría:

a.- Definición a nivel molecular del efecto ejercido por el colesterol sobre la ATPasa-(Ca²⁺, Mg²⁺), descrito en el presente trabajo.

b.- Aislamiento y caracterización de la molécula o moléculas inhibitoras de la ATPasa-(Ca²⁺, Mg²⁺) identificadas en este estudio. En vista de constituir éste un hallazgo de potencial importancia en el estudio de esta enzima, buena parte de mi trabajo será dirigida en este sentido.

La fisiología celular representa uno de los campos más importantes e interesantes de la Biología. La generación de nuevos conocimientos no tiene valor cuando estos no se integran en un conocimiento general.

6. REFERENCIAS

1. Robertson, R.N. 1983. The Lively membranes. Cambridge University Press. 206 pp.
2. Sim, E. 1982. Membrane Biochemistry. Chapman & Hall. 80 pp.
3. Stryer, L. 1989. Biochemistry 3rd ed. Freeman. 1089 pp.
4. Parker, L. (1974). "Molecular architecture of energy transducing membranes related to function". En: Biomembranes: Architecture, Biogenesis, Bioenergetics, and Differentiation. (L. Parker). Academic Press Inc. pc 147-166. 423 pp.
5. Houslay, M.D. y K.K. Stanley. 1982. Dynamics of Biological Membranes. John Wiley & Sons. pc 92-125. 330 pp.
6. Malhotra, S.K. 1983. The Plasma Membrane. John Wiley & Sons. 209 pp.
7. Warren, R.C. 1987. Physics & Architecture of Cell Membranes. Adam Hilger. pc 1-20. 226pp.
8. Overath, P., Thilo, L. y H. Träuble. (1976). "Lipid phase transitions and membrane function". Trends Biochem. Sci.- Agosto, 186-
9. Kotyk, A. y K. Janáček. 1977. Membrane Transport. Plenum Press; pc 36-51. 348 pp.
10. Quinn, P.J. 1976. The Molecular Biology of Cell Membranes. The MacMillan Press LTD; pc. 1-40. 229 pp.
11. Miller, S.L. y L.E. Orgel. 1974. The Origins of Life on Earth. Ediciones Ciencias, UNAM; pc 47-51, 62-81. 229 pp.
12. Sinensky, M. (1974). "Homeoviscous Adaptation - A homeostatic process that regulates the viscosity of membrane lipids in E. coli". Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 17, No. 2, 522 -

13. Sinensky, M. (1980). "Adaptative alteration in phospholipid composition of plasma membranes from a somatic cell mutant defective in the regulation of cholesterol biosynthesis". *J. Cell Biol.* 85, 160-
14. Shinitzky, M. 1984. Physiology of Membrane Fluidity Vol 1. CRC Press; pc. 2-39. 196pp.
15. Segel, I.H. 1975. Enzyme Kinetics. John Wiley & Sons. 907 pp.
16. Lomeli, B.H. (1990). "En el principio fue el ARN". *ICYT* 12 No. 166/67, 33 -
17. Palmer, T. 1981. Understanding Enzymes. Ellis Horwood Limited; pc. 17-33. 405 pp.
18. Mas-Oliva, J. (1987). "Perspectivas en el estudio de la regulación de la bomba de calcio de membrana plasmática". *Ciencia* 38, 29 -
19. Bailin, G. y J.R. Huang. (1990). "Fluorescence properties of the Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPase protein of sarcoplasmic reticulum labeled with 7-chloro-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole". *FEBS lett.* 259 No. 2, 254 -
20. Carafoli, E. y M. Zurini. (1982). "The Ca^{2+} -pumping ATPase of plasma membranes. Purification, reconstitution, and properties". *Biochim. Biophys. Acta* 681, 279 -
21. Rega, A.F. y P.J. Garrahan. 1986. *The Ca^{2+} Pump of Plasma Membranes*. CRC Press. 173 pp.
22. Schatzmann, H.J. (1966). "ATP-dependent Ca^{++} extrusion from human red cells". *Experientia* 22, 334 -
23. Caroni, P. y E. Carafoli. (1980). "An ATP-dependent Ca^{2+} -pumping system in dog heart sarcolemma. *Nature* 282, 765 -
24. Caroni, P. et-al. (1983). "Further characterization and reconstitution of the purified Ca^{2+} -pumping ATPase of heart sarcolemma". *J. Biol. Chem.* 258 No. 12, 7305 -
25. Graf, E. et-al. (1982). "Molecular properties of calcium-pumping

- ATPase from human erythrocytes". *Biochemistry* 21, 4511 -
26. Carafoli, E. (1984). "Calmodulin-sensitive calcium-pumping ATPase of plasma membranes: isolation, reconstitution, and regulation". *FASEB J* No. 15, 3005 -
27. Verma, A.K., Gorski, J.P. y J.T. Penniston. (1982). "Antibodies directed toward human erythrocyte Ca^{2+} -ATPase: Effect on enzyme function and immunoreactivity of Ca^{2+} -ATPases from other sources". *Arch. Biochem. Biophys.* 215 No. 2, 345-
28. Zurini, M. et-al. (1984). "Controlled proteolysis of the purified Ca^{2+} -ATPase of the erythrocyte membrane". *J. Biol. Chem.* 259 No. 1, 618-
29. Enyedi, A. et-al. (1987). "The maximal velocity and the calcium affinity of the red cell calcium pump may be regulated independently". *J. Biol. Chem.* 262 No. 13, 6425-
30. Niggli, V., Adunyah, E.S. y E. Carafoli. (1981). "Acidic phospholipids, unsaturated fatty acids, and limited proteolysis mimic the effect of calmodulin on the purified erythrocyte Ca^{2+} -ATPase". *J. Biol. Chem.* 256 No. 16, 8588-
31. Muallem, S. y S.J.D. Karlish. (1979). "Is the red cell calcium pump regulated by ATP?". *Nature*, 277, 238-
32. Gimble, J.M. et-al. (1982). "Studies of the Ca^{2+} transport mechanism of human erythrocyte inside-out membrane vesicles". *J. Biol. Chem.* 257 No. 18, 10781-
33. Niggli, V., Sigel, E. y E. Carafoli. (1982). "The purified Ca^{2+} pump of human erythrocyte membranes catalyzes an electroneutral Ca^{2+} - H^{+} exchange in reconstituted liposomal systems". *J. Biol. Chem.* 257 No. 5, 2350-

34. Shull, G.E. y J. Greeb. (1988). "Molecular cloning of two isoforms of the plasma membrane Ca^{2+} -transporting ATPase from rat brain". J. Biol. Chem. 263 No. 18, 8646-
35. Ikemoto, N. (1974). "The calcium binding sites involved in the regulation of the purified Adenosine Triphosphatase of the sarcoplasmic reticulum". J. Biol. Chem. 249 No. 2, 649-
36. Inesi, G. y M.E. Kirtley. (1990). "Coupling of catalytic and channel function in the Ca^{2+} transport ATPase". J. Membrane Biol. 116 1-
37. Kratje, R.B., Garrahan, P.J. y A.F. Rega. (1983). "The effects of alkali metal ions on active Ca^{2+} transport in reconstituted ghosts from human red cells". Biochim. Biophys. Acta 731 40-
38. Mollman, J.E. y D.E. Pleasure. (1980). "Calcium transport in human inside-out erythrocyte vesicles". J. Biol. Chem. 255 No. 2, 569-
39. Wuthrich, A. et-al. (1979). "Net ATP synthesis by running the red cell calcium pump backwards". Experientia 35, 1789-
40. Adamo H.P., A.F. Rega y P.J. Garrahan. (1990). "Magnesium-ions accelerate the formation of the phosphoenzyme of the ($\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+}$)-activated ATPase from plasma membranes by acting on the phosphorylation reaction". Biochem. Biophys. Res. Comm. 169 No. 2, 700-
41. Lichtner, R. y H.U. Wolf. (1980). "Characterization of the phosphorylated intermediate of isolated high-affinity ($\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+}$)-ATPase of human erythrocyte membranes". Biochim. Biophys. Acta 598, 486-
42. Adamo, H.P., A.F. Rega y P.J. Garrahan. (1990). "The $E_2=E_1$ transition of the Ca^{2+} -ATPase from plasma membranes studied by

phosphorylation". J. Biol. Chem. 265 No. 7, 3789-

43. Muallem, S. y S.J.D. Karlisch. (1983). "Catalytic and regulatory ATP-binding sites of the red cell Ca^{2+} pump studied by irreversible modification with Fluorescein Isothiocyanate". J. Biol. Chem. 258 No. 2, 169-

44. Villalobo, A., Brown, L. y B.D. Roufogalis. (1986). "Kinetic properties of the purified Ca^{2+} -translocating ATPase from human erythrocyte plasma membrane". Biochim. Biophys. Acta 854, 9-

45. Tonomura, Y. 1986. Energy-Transducing ATPases: Structure and Kinetics. Cambridge University Press; pc 184-239. 296 pp.

46. Dutton, A., Rees, E.D. y S.J. Singer. (1976). "An experiment eliminating the rotating carrier mechanism for the active transport of Ca ion in sarcoplasmic reticulum membranes". Proc.Natl.Acad.Sci.USA 73 No. 5, 1532-

47. Vorherr, T. et-al. (1990). "Interaction of calmodulin with the calmodulin binding domain of the plasma membrane Ca^{2+} pump". Biochemistry 29, 355-

48. Blumenthal, D.K. et-al. (1985). "Identification of the calmodulin-binding domain of skeletal muscle myosin light chain kinase". Proc.Natl.Acad.Sci. USA 82, 3187-

49. Lukas, T.J. et-al. (1986). "Calmodulin binding domains: Characterization of a phosphorylation and calmodulin binding site from myosin light chain kinase". Biochemistry 25, 1458-

50. Caride, A.J. et-al. (1990). "Does calmodulin regulate the affinity of the human red cell Ca^{2+} pump for ATP?". Biochim. Biophys. Acta 1027, 21-

51. Reithmeier, R.A.F., de Leon, S. y D.H. MacLennan. (1980).

- "Assembly of the sarcoplasmic reticulum". J. Biol. Chem. 255 No. 24, 11839-
52. Brandl, C.J. et-al. (1986). "Two Ca^{2+} ATPase genes: Homologies and mechanistic implications of deduced amino acid sequences". Cell 44, 597-
53. MacLennan, D.H. (1986). "Molecular genetics of calcium ATPases". En: International Symposium in Honor of Luigi Sabbatani on calcium ion: membrane transport and cellular regulation. Padova-Venezia, Italy; July 1-4.
54. Inesi, G. (1987). "Sequential mechanism of calcium binding and translocation in sarcoplasmic reticulum Adenosine Triphosphatase". J. Biol. Chem. 262 No.34, 16338-
55. Khananshvili, D. y W.P. Jencks. (1988). "Two step internalization of Ca^{2+} from a single E- PCa_2 species by the Ca^{2+} -ATPase". Biochemistry 27 No. 8, 2943-
56. Verma, A.K. et-al. (1988). "Complete primary structure of a human plasma membrane Ca^{2+} pump". J. Biol. Chem. 263 No. 28, 14152-
57. Carafoli, E. (1989). "The plasma membrane calcium pump: structure, function, and regulation". Biochem. Soc. Trans. 17, 808-
58. Clarke, D.M., Loo, T.W. y D.H. MacLennan. (1990). "Functional consequences of mutations of conserved aminoacids in the B-strand domain of the Ca^{2+} -ATPase of sarcoplasmic reticulum". J. Biol. Chem. 265 No. 24, 14088-
59. Clarke, D.M. et-al. (1989). "Location of high affinity Ca^{2+} -binding sites within the predicted transmembrane domain of the sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase". Nature 339, 476-
60. Yeagle, P. 1987. The membranes of cells. Academic Press. 292 pp.
61. Billheimer, J.T. y P.J. Gillies. (1990). "Intracellular

- cholesterol esterification" en: Advances in Cholesterol Research cap. 1 (Esfahani, M. y J.B. Swaney). Telford Press. 420 pp.
62. Reinhart, M.P. et-al. (1987). "Subcellular localization of the enzymes of cholesterol biosynthesis and metabolism in rat liver". J. Biol. Chem. 262 9649-
63. Hashimoto, S. et-al. (1983). "Activity of Acyl-CoA: Cholesterol acyltransferase and 3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coa reductase in subfractions of hepatic microsomes enriched with cholesterol". Biochim. Biophys. Acta 754, 126-
64. Debbeto, P., Cusinato, F. y S. Luciani. (1990). " Temperature dependence of Na^+ / Ca^{2+} exchange activity in beef-heart sarcolemmal vesicles and proteoliposomes". Arch. Biochem. Biophys. 278 No.1, 205-
65. Yeagle, P. (1983). " Cholesterol modulation of $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase ATP hydrolyzing activity in the human erythrocyte". Biochim. Biophys. Acta 727, 39-
66. Ortega, A. y J. Mas-Oliva. (1986). "Direct regulatory effect of cholesterol on the calmodulin stimulated calcium pump of cardiac sarcolemma". Biochem. Biophys. Res. Comm. 139 No. 3, 868-
67. Johannsson, A. et-al. (1981). "Cholesterol in sarcoplasmic reticulum and the physiological significanse of membrane fluidity". Biochem. J. 196, 505-
68. Rothman, J.E. y J. Lenard. (1977). "Membrane asymmetry". Science 195, 743-
69. Etemadi, A.H. (1980). "Membrane asymmetry". Biochim. Biophys. Acta 604, 423-
70. Schoeder, F. y G. Nemezc. (1990). "Transmembrane cholesterol distribution" en: Advances in Cholesterol Research cap. 2. (Esfahani,

- M. y J.B. Swaney). Telford Press. 420 pp.
71. Santiago, J. y J. Mas-Oliva. (1991). "A novel cholesterol transfer protein in cardiac sarcolemma. Purification and initial characterization". *Mol.Cell.Biochem.* 100, 51-
72. Aloia, R.C. y J.M. Briggs. 1985. Membrane Fluidity in Biology Vol. 4. Academic Press. 300 pp.
73. Hyslop, P.A., Morel, B. y R.D. Sauerheber. (1990). "Organization and interaction of cholesterol and phosphatidylcholine in model bilayer membranes". *Biochemistry* 29, 1025-
74. Yeagle, P. (1990). "Role of cholesterol in cellular functions" en: Advances in Cholesterol Research cap. 4. (Esfahani, M. y J.B. Swaney) Telford Press. 420 pp.
75. van Alstyne, J. (1980). "Isolation of sealed vesicles highly enriched with sarcolemma markers from canine ventricle". *Biochim. Biophys. Acta* 602 No. 131, 143-
76. Oliva, G. Tesis de Maestría (en proceso); Fac. Medicina, UNAM.
77. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. y R. Randall (1951). "Protein measurement with the Folin Phenol reagent". *J. Biol. Chem.* 193, 265-
78. Shinitzky, M. (1978). "An efficient method for modulation of cholesterol level in cell membranes". *FEBS lett.* 85 No. 2, 317-
79. Fiske, C.M., y Y. Subbarow. (1925). "The colorimetric determination of phosphorous". *J. Biol. Chem.* 56, 375-
80. Siedel, J. et-al. (1981). "A clinical test for cholesterol determination" *J. Clin. Chem. Biochem.* 19, 838-
81. Laemmli, U.K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4". *Nature* 227, 680-
82. Enzfitter.

83. Grunze, M., Forst, B. y B. Deuticke. (1980). "Dual effect of membrane cholesterol on simple and mediated transport processes in human erythrocytes". Biochim. Biophys. Acta 600, 860-
84. Ortega, A. y J. Mas-Oliva. (1984). "Cholesterol effect on enzyme activity of the sarcolemmal (Ca²⁺ + Mg²⁺)-ATPase from cardiac muscle". Biochim. Biophys. Acta 773, 231-
85. Mas-Oliva, J. y J. Santiago-García. (1990). "Cholesterol effect on the thermostability of the (Ca²⁺, Mg²⁺)-ATPase from cardiac muscle sarcolemma". Biochem. Int. 21 No. 2, 233-
86. Wilson, J.E. (1971). "An expeditious method for determining the activation energies of enzymatic reactions". Arch. Biochem. Biophys. 147, 471-
87. Missiaen, L. et-al. (1989). "Phospholipid-protein interactios of plasma-membrane Ca²⁺-transporting ATPase". Biochem. J. 263, 687-
88. Missiaen, L. et-al.(1989). "Role of arginine residues in the stimulation of the smooth-muscle plasma-membrane Ca²⁺ pump by negatively charged phospholipids". Biochem. J. 264, 609-
89. Gordon, L.M. y P.W. Mobley. (1985). "Membrane lipids, membrane fluidity, and enzyme activity" en: Membrane Fluidity in Biology Vol. 4. Academic Press. 300 pp.
90. Baldwin, R.L. (1986). "Temperature dependence of the hydrophobic interaction in protein folding". Proc.Natl.Acad.Sci.USA. 83, 8069-
91. Singer, S. J. y G. L. Nicholson. (1972). "Fluyd mosaic model of membranes". Science 175, 720-
92. Simmonds, A.C., Rooney, E.K. y A.G. Lee. (1984). "Interactions of cholesterol hemisuccinate with phospholipids and (Ca²⁺- Mg²⁺)-ATPase". Biochemistry 23 No. 7, 1432-

93. Lee, A.G., Michelangeli, F. y J. Malcom East. (1989). "Tests for the importance of fluidity for the function of membrane proteins". *Biochem.Soc.Trans.* 17, 962-
94. Yuli, I., Wilbrandt, W. y M. Shinitzky. (1981). "Glucose transport through cell membranes of modified lipid fluidity". *Biochemistry* 20, 4250-
95. Malcom East, J. y A.G. Lee. (1982). "Lipid selectivity of the calcium and magnesium ion dependent Adenosinetriphosphatase, studied with fluorescence quenching by a brominated phospholipid". *Biochemistry* 21, 4144-
96. Silvius, J.R. et-al. (1984). "Competition between cholesterol and phosphatidylcholine for the hydrophobic surface of sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase". *Biochemistry* 23, 538-
97. Micheangeli, F. et-al. (1990). "Effects of phospholipids on binding of calcium to $(\text{Ca}^{2+}$ - Mg^{2+})-ATPase". *Biochemistry* 29, 8307-
98. Madden, P.D., King, M.D. y P.J. Quinn. (1981). "The modulation of the Ca^{2+} -ATPase activity of sarcoplasmic reticulum by membrane cholesterol". *Biochim. Biophys. Acta* 641, 265-
99. Simmonds, A.C. et-al. (1982). "Annular and non-annular binding sites on the $(\text{Ca}^{2+}$ + Mg^{2+})-ATPase". *Biochim. Biophys. Acta* 693, 398-
100. Froud, R.J. et-al. (1986). "Binding of long-chain alkyl derivatives to lipid bilayers and to $(\text{Ca}^{2+}$ - Mg^{2+})-ATPase". *Biochemistry* 25, 7535-
101. Froud, R.J. et-al. (1986). "Effects of lipids and long-chain alkyl derivatives on the activity of $(\text{Ca}^{2+}$ - Mg^{2+})-ATPase". *Biochemistry* 25, 7544-
102. Asturias, F.J., Pascolini, D. y J.K. Blasie. (1990). "Evidence that lipid lateral phase separation induces functionally significant

- structural changes in the Ca^{2+} ATPase of the sarcoplasmic reticulum".
Biophys. J. 58, 205-
103. (1979). "Cholesterol modulates activity of calcium-dependent ATPase of the sarcoplasmic reticulum". Nature 279 No. 5713, 538-
104. Gryffith, O.H. y P.C. Jost. 1979. In Cytocrome oxydase. Elsevier, Biomedical Press, pc. 207-217. 350pp.
105. Hesketh, T.R. et-al. (1976). "Annular lipids determine the ATPase activity of a calcium transport protein complexed with dipalmitoyllecithin". Biochemistry 15 No.19, 4145-
106. Hidalgo, C. (1985). "Membrane fluidity and the function of the Ca^{2+} -ATPase of sarcoplasmic reticulum" en: Membrane Fluidity in Biology Vol 4. (Aloia, R.C. y J.M. Boggs). Academic Press. 300 pp.
107. Kroes, J. y R. Ostwald. (1971). "Erythrocyte membranes-effect of increased cholesterol content on permeability". Biochim. Biophys. Acta 249, 647-
108. Shiga, T. y N. Maeda. (1980). "Influence of membrane fluidity on erythrocyte functions". Biorheology 17, 485-
109. Michelangeli, F., Malcom East, J. y A.G. Lee. (1990). "Structural effects on the interaction of sterols with the (Ca^{2+} Mg^{2+})-ATPase". Biochim. Biophys. Acta 1025, 99-
110. Alivisatos, E.G.A. et-al.(1977). "Enzymatic and electrophysiological changes of the function of membrane proteins by cholesterol". Biochem.Biophys.Res.Comm. 79 No.3, 677-
111. Trentacosty, P.F. (1985). "The role of cholesterol in regulating membrane fluidity" en: Membrane Fluidity in Biology Vol. 4. (Aloia, R.C. y J.M. Boggs) Academic Press. 300 pp.
112. de Kruff, B., Demel, R.A. y L.L.M. van Deenen. (1972). "The

effect of cholesterol and epicholesterol incorporation on the permeability and on the phase transition of intact Acholeplasma laidlawii cell membranes and derived liposomes". Biochim. Biophys. Acta, 255, 331-

113. Cheng, K., Hui, S.W. y J.R. Lepock. (1987). "Protection of the membrane calcium Adenosine Triphosphatase by cholesterol from thermal inactivation". Cancer Research 47, 1255-

114. Papahadjopoulos, D., Cowden, M. y H. Kimelberg. (1973). "Role of cholesterol in membranes effects on phospholipid-protein interactions, membrane permeability and enzymatic activity". Biochim. Biophys. Acta 330, 8-

115. Malcom East, J. et-al. (1984). "Membrane fluidity is not an important physiological regulator of the (Ca²⁺- Mg²⁺)-dependent ATPase of sarcoplasmic reticulum". J. Biol. Chem. 259 No. 13, 8070-

116. Kutryk, M.J.B. y G.N. Pierce. (1988). "Stimulation of sodium-calcium exchange by cholesterol incorporation into isolated cardiac sarcolemmal vesicles". J. Biol. Chem. 263 No.26, 13167-

117. Santiago-Garcia, J., Olivares-Villagómez, D. y J. Mas-Oliva. (1990). "Cholesterol effect on thermostability of the (Ca²⁺, Mg²⁺)-ATPase from cardiac muscle sarcolemma" En: 10th International Biophysics Congress. Vancouver, Canada; July 29- August 3.