



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

ENEP - IZTACALA

**LOCALIZACION DE LA ATPasa(Na-k) CON
ANTICUERPOS CONTRA OUABAINA**

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

B I O L O G O

P R E S E N T A

ENRIQUE OTHON HERNANDEZ GONZALEZ

LOS REYES IZTACALA, EDO. MEX.

1987





Universidad Nacional
Autónoma de México



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 esta 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.

DEDICO CON CARINO ESTA TESIS

A MI MADRE

A MIS HERMANOS

A El.

Gracias al Dr. Luis H. Perez Astudillo
por su valiosa asesoria y su apoyo.

A todos mis amigos, especialmente a aquellos
que tuvieron que ver en la realizaci3n de
este trabajo.

I N D I C E

INTRODUCCION

	Página
I.- Características de la (Na-K)ATPasa	1
II.- Papel Biológico de la (Na-K)ATPasa	2
III.- Localización de la (Na-K)ATPasa	5
A) Citoquímicos	5
B) Autoradiografía	7
C) Inmunohistoquímicos	8
IV.- Ventajas y desventajas de las técnicas de localiza ción de la (Na-K)ATPasa.	9
A) Citoquímica	9
B) Autoradiografía.	12
C) Inmunohistoquímica	13
V.- Objetivos	14

MATERIAL Y METODOS

1.- Preparación, purificación y caracterización de un -- conjugado de albúmina de suero bovino-ouabaina -- (BSA-O)	16
A) Síntesis del BSA-O	16
B) Purificación del BSA-O	17
C) Caracterización del BSA-O	17
1.- Espectrofotometría.	17
2.- Electroforesis en geles de poliacrilamida - SDS .	18
3.- Electroenfocue.	18
D) Inhibición del transporte de ouabaina y BSA-O .	19

	Página
II.- Obtención, caracterización y purificación de anticuerpos contra ouabaina.	20
A) Protocolo de inmunización	20
B) Caracterización del antisuero.	21
1.- Determinación del título.	21
2.- Inmunoelectroforesis.	22
3.- Dobleinmunoelectroforesis.	23
C) Purificación de anticuerpos contra BSA-O	23
1.- Purificación de IgG a partir del antisuero	23
2.- Síntesis de inmunoabsorbente.	24
3.- Purificación de anticuerpos contra BSA-O, mediante el inmunoabsorbente.	25
D) Prueba de especificidad de los anticuerpos	26
1.- Método de ELISA indirecto modificado.	26
2.- Inhibición por hapteno	27
III.- Localización de la (NA-K)ATPasa.	28
A) Congelación de los tejidos.	28
B) Localización de la (NA-K)ATPasa por el método de Guth Albers	28
C) Localización de la (NA-K)ATPasa con anticuerpos contra ouabaina.	29

RESULTADOS

I.- Purificación y caracterización de un conjugado de albúmina de suero bovino-ouabaina.	32
A) Purificación del BSA-O	32
B) Caracterización del BSA-O	34
1.- Espectrofotometría.	34
2.- Electroforesis.	37

	Página
3.- Electroenfoque.	37
D) Inhibición del transporte por ouabaina y BSA-O	40
II.- Caracterización del antisuero contra BSA-O y puri	
ficación de anticuerpos contra BSA-O.	42
A) Caracterización del antisuero.	42
1.- Título del antisuero	42
2.- Inmunolectroforesis y dobleinmunolectroforesis.	43
B) Purificación de anticuerpos contra BSA-O.	46
C) Especificidad de anticuerpos.	50
III.- Localización de la (NA-K)ATPasa	55
A) Técnica de Guth y Albers.	55
B) Localización de la (NA-K)ATPasa, con anticuerpos- contra ouabaina.	62
Discusión	65
Bibliografía.	75

INTRODUCCION

I.- Características de la (Na-K)ATPasa.

La bomba de sodio-potasio ha sido purificada de diferentes organismos y tejidos, como son riñón de perro, cerdo y conejo (1,2,3,4), glándula anal de Squalus acantias (5) organo electrico de Electrophorus electricus (6), cerebro de rata y res.

Maunsbach y col. (8,9) así como Jørgensen (3,4) indican las siguientes características para la bomba de sodio-potasio de riñón de conejo y cerdo, purificada por centrifugación zonal y electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS. La enzima posee dos subunidades, una denominada α , con un peso molecular de 104 Kdaltones y la cual presenta toda la función catalítica. También presenta una segunda subunidad llamada β , con un peso molecular de 40 Kdal. de proteína y 17 K dal. de carbohidratos (sialo-glicoproteína) de función desconocida.

La enzima puede organizarse como un oligómero formado por cuatro subunidades ($\alpha_2\beta_2$), estructura que corresponde a una unidad funcional de la bomba de sodio-potasio y la cual puede unirse una molecula de ouabaina o una de ATP. La capacidad de transporte de $\text{Na}:\text{K}$ de la bomba tiene una relación de $3\text{Na}/2\text{K}$.

II.- Función biológica de la (Na-K)ATPasa.

La bomba de sodio-potasio esta involucrada con el transporte activo de sodio y potasio, así como de su distribución intracelular y extracelular. Por lo tanto esta enzima esta involucrada en procesos como el mantenimiento del volumen celular, la absorción en riñón e intestina, y la excitabilidad de células nerviosas y musculares.

La (Na-K)ATPasa podria estar relacionada con procesos como la diferenciación celular y el desarrollo embrionario, como son la gastrulación y la inducción primaria, esta ultima descubierta por H. Speman y H. Mangold (1920), el mecanismo por el cual se regulan este proceso, son desconocidos en la actualidad. Barth y Barth (10) proponen que este mecanismo puede estar relacionado con las concentraciones del ion sodio, ya que al tratar gastrulas tempranas de anfibio con diferentes concentraciones de sodio, pudieron obtener celulas pigmentadas, ciliadas y epiteliales, cuando el ectodermo es cultivado in vitro. Ellos no encontraron ninguna relación de esta diferenciación con la bomba de sodio-potasio.

Messenger y Warner (11) han relacionado a la enzima con el desarrollo y diferenciación del sistema nervioso de rana, encontrando que la actividad de la (Na-K)ATPasa es esencial durante el estadio de pliegue neural medio, esta-

dio en el cual se diferencian las neuronas. Ellas mismas observan que la inhibición de la bomba de sodio-potasio -- por estrofantidina G (ouabaina) evita la diferenciación de una cierta población de neuronas, existiendo neuronas resistentes a la ouabaina. Así como la inhibición de la bomba de sodio-potasio, provoca en el embrión el desarrollo anómalo del sistema nervioso.

Bertoni y Siegel (12) por otro lado encuentran que la actividad de la (Na-K)ATPasa, así como su concentración, se ven incrementadas en el cerebro de rata, este aumento se dá entre el quinto día antes del nacimiento y el sesenta posnatal. Los cambios más rápidos de la enzima toman lugar durante el período correspondiente a la proliferación glial y la arborización neuronal.

El papel de la (Na-K)ATPasa no se limita al desarrollo y diferenciación del sistema nervioso, Vignee y Col., (13) indican que durante la miogénesis del músculo esquelético de pollo, y especialmente durante la fusión de miotúbulos, se dá un aumento de proteínas y enzimas como los receptores a acetilcolina, acetilcolinesterasa, proteínas contráctiles, canales de sodio dependientes de voltage, -- así como un aumento de los sitios de enlace a ouabaina marcada con tritio (ouabaina (^3H)).

Se sabe que durante la proliferación y diferenciación celular, se requiere de la síntesis de nuevas proteínas, o

un aumento de las ya existentes: así Quastel y Kaplan (14) han encontrado evidencias de la influencia de las concentraciones de K en la síntesis de macromoléculas y la división celular. Además los linfocitos activados con fitohemaglutinina, presentan un aumento en la síntesis de DNA y proteínas, así como un aumento del potasio intracelular. Quastel y Kaplan (14) también encuentran que los cambios anteriores y la activación mitogénica de la fitohemaglutinina, pueden ser bloqueados por acción de la ouabaina. La activación de los linfocitos involucra un transporte por parte de la (Na-K)ATPasa, y el cual es crítico para incrementar el potasio intracelular. Este mismo efecto ha sido observado en la división y diferenciación de fibroblastos (15), y como en los resultados obtenidos por Spivak y col. (16) en las células hematopoyéticas progenitoras, las que requieren de una bomba de sodio-potasio funcional para su proliferación y posterior diferenciación, fenómenos que podrían ser alterados por la ouabaina.

Se ha visto por otro lado, que la (Na-K)ATPasa tienen cambios en su actividad, estos cambios pueden estar relacionados con el ciclo celular, Tupper y col. (17) han encontrado que las células en el estadio G_1 , como fibroblastos de ratón 3T3, pueden ser estimuladas a reanudar su ciclo celular mediante la adición de suero, provocando que los fibroblastos entren a la fase de S en 10 horas. Durante el paso de la fase G_1 a S, se observó un incremento en el transporte de potasio. Estos cambios se relacionan con

la bomba de sodio-potasio, ya que al adicionar ouabaina al suero, se bloquea el paso de los fibroblastos a la fase S. Aunque también se ha observado que el incremento intracelular de potasio no es requerida para la entrada a la fase S (18) y que los factores de crecimiento del suero no actúan por alteración del potasio intracelular.

La (Na-K)ATPasa también interviene en procesos como la motilidad espermática (19) y la capacitación, Marsny y col. (20) encuentran una relación entre el incremento de la actividad de la enzima y la capacitación, la que también puede ser regulada por nucleótidos cíclicos como AMPc y GMPc.

III.- Técnicas de localización de la (Na-K)ATPasa.

A partir de los años sesenta se han desarrollado métodos para localizar a la bomba de sodio-potasio en tejidos como son: cerebro, nervio óptico, riñon, glandula de la saliva de aves, y otros. Estas técnicas pueden dividirse en tres grupos; citoquímicas, autoradiografía e inmunohistoquímicas.

A).- CITOQUIMICOS.

Durante su actividad la bomba de sodio-potasio requiere de ATP, el cual es degradado a ADP y fosfato inorganico (Pi) este ultimo producto es utilizado por los métodos ci-

toquímicos. Wachtein y Meisel (21) introdujeron el uso de ATP como sustrato para la enzima, con el fin de capturar el Pi producido, con agentes como el Pb, pudiendo observar en diferentes tejidos la actividad ATPasa de diferentes enzimas como fosfatasas, Ca ATPasa, (Na-K)ATPasa y otras.

Un gran avance se realizó en la localización citoquímica de la enzima al cambiar al ATP como sustrato y usar p-nitro fenil fosfato (p-npp), el que puede ser degradado por la (Na-K)ATPasa, esta actividad es dependiente de potasio, por lo que se le ha denominado como actividad p-nitro fenilfosfato dependiente de potasio (K-NPPasa), la hidrólisis del p-npp produce nitrifenol y Pi. La actividad K-NPPasa solo ha sido reportada para otra enzima, la fosfatasa alcalina, no así para otras enzimas como son las ATPasas mitocondriales, ni enzimas del sistema contractil, esta actividad también puede ser inhibida por ouabaina (22, 23, 24).

Ernst (25) aprovechó la actividad K-NPPasa de la bomba de sodio-potasio y desarrolló un método basado en el uso de cloruro de estroncio ($SrCl_2$), el cual en presencia de Pi se transforma en SrPi y el cual al ser tratado con $Pb(NO_2)_3$ es convertido en PbPi, que resulta ser un precipitado insoluble que puede ser visualizado tanto por microscopía óptica como electrónica.

Guth y Albers (26) mejoraron el método de Ernst, cambiando el agente de captura del Pi, por cloruro de cobalto

CoCl_2 , además evitan la difusión de los productos de la -- reacción adicionando al medio de incubación dimetil sulfóxido (DMSO), el producto final de la reacción es revelado con sulfuro de amonio, formando un precipitado visible a -- microscopía óptica. Por otro lado *Mayahara y Col.* (27,28) proponen el uso de citrato de plomo como agente de captura del Pi, realizando una reacción de un solo paso y no de varios como se realiza en los métodos de *Ernst y Guth-Albers*. Así mismo *Mayahara y Col.* introdujeron el uso de inhibidores específicos de fosfatasa alcalina como son el levamisol y bromo tetramisol, dado que esta enzima también puede usar al p-npp como sustrato.

B).- AUTORADIOGRAFIA.

Las bases para la utilización de la autoradiografía -- fueron propuestas por *Stirling*, el cual usó esta técnica -- con el fin de localizar los sitios del transporte a través del epitelio intestinal de conejo, de moléculas solubles -- como glucosas, galactosa, o manitol (29, 30). Como sabemos el transporte de estas moléculas puede ser inhibido por -- florizina y glucósidos cardiacos, como la ouabaina. El -- mismo *Stirling* (31) introdujo un método para la localiza-- ción en microscopía óptica de ouabaina tritiada (ouabaina- (^3H)), unida a sitios específicos en tejidos como son los de riñón, cerebro o intestino. La técnica consiste en ex-

poner el tejido a concentraciones micromolares de ouabaina (^3H), esta exposición puede realizarse tanto en cortes por congelación del tejido o perfusión de órganos. El tejido puede ser tratado con OsO_4 para su observación en microscopía electrónica.

C. INMUNOHISTOQUÍMICOS.

Como ya se mencionó, la $(\text{Na-K})\text{ATPasa}$ ha sido purificada de diferentes organismos (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7) obteniendo dos polipéptidos, uno aproximadamente de 104,000 de peso molecular que presenta la actividad catalítica, degrada ATP y puede unírsele glucósidos cardíacos. La otra subunidad es una glicoproteína con un peso molecular de 57,000 - y de la cual se desconoce su papel.

Varios investigadores han preparado anticuerpos dirigidos contra la holoenzima o cualquiera de sus subunidades, con el fin de analizar la orientación de la enzima en la membrana celular o para conocer mejor los cambios conformacionales que sufre la enzima durante su funcionamiento -- (32). A partir de la bibliografía es evidente que los anticuerpos producen efectos variables y algunas veces contradictorios sobre la bomba de sodio-potasio. Entre estos efectos podemos incluir; con anticuerpos antiholoenzima, no se observó ningún cambio en el enlace de ouabaina y la

degradación de ATP (33, 34). Anticuerpos antisubunidad catalítica hacen decrecer la hidrólisis de ATP (35) y el enlace de ouabaina (36). Los anticuerpos antisubunidad glicoproteica, inhiben parcialmente la hidrólisis de ATP, pero no el enlace de ouabaina (35, 36, 37).

Los anticuerpos producidos contra la bomba de sodio-potasio han sido utilizados para localizarla. Kyte (38, 39) introdujo la técnica al aislar anticuerpos contra $(Na-K)ATPasa$ y probarlos en cortes de riñón de perro, usando la técnica de sánwich, que consiste en el uso de un segundo anticuerpo, dirigido contra el anticuerpo antibomba de sodio-potasio (primer anticuerpo), y que es marcado con ferritina o peroxidasa. Schwartz (40) también utilizó anticuerpos contra la bomba de sodio-potasio de Electrophorus eléctricus, con el fin de localizar la enzima en el nervio óptico del pez dorado.

El método inmunohistoquímico es el menos socorrido como lo demuestra la tabla I, en la que observamos los diferentes tejidos y técnicas utilizadas para la localización de la $(Na-K)ATPasa$.

IV.- Ventajas y desventajas de las técnicas de localización de la $(Na-K)ATPasa$.

A).- CITOQUIMICA.

Los primeros métodos basados en la captura de Pi con

T A B L A I - A
 - - - - -

Tejido	Técnica utilizada.
Intestino delgado de conejo	Autoradiografía (ouabaina (^3H))
Médula de riñón de conejo	
Cultivo de células del riñón de cerdo	
Glándula submandibular de gato	
Glándulas sudoríparas de Humano	
Epitelio traqueal de perro	
Vejiga urinaria de sapo	
Epitelio de sapo	
Vejiga respiratoria de sapo	
Vejiga urinaria de teleosteo	
Glándula de la sal de aves	
Glándula rectal de tiburón	
Bránquias de teleosteo	
Epitelio opercular de teleosteo	
Glándula de la sal de tortuga marina	
Córtex de riñón de perro	Imunohistoquímico
Cerebro de pez sierra	

T A B L A I - B
- - - - - - - -

Técnica utilizada.

Córtex de riñón de conejo y rata	Citoquímica (K-NPPasa)
Hígado de rata	
Colon de conejo y rata	
Glándula submandibular de rata	
Córnea de rata	
Cristalino de rata	
Placenta de cobayo	
Plexus coroide de rata y conejo	
Endotelio capilar de la región	
Córtical del cerebro de rata	
Córtex somatosensorial de rata	
Coroalantoides de aves	
Glándula de la sal de aves	
Glándula de la sal en iguana del desierto.	
Glándula de la sal en tortuga marina.	
Glándula rectal de tiburón	
Branquias de teleosteo	

+ Tomada de Ernst y Mills (43).

Pb y que utilizan ATP como sustrato para la enzima (21), no solo evidencian a la bomba de sodio-potasio, sino a otras - enzimas capaces de degradar ATP como son la bomba de calcio magnesio, ATPasas mitocondriales, así como a la fosfatasa - alcalina, por lo que esta técnica presenta una gran inespecificidad en la localización de una enzima determinada. Por otro lado el Pb puede provocar la hidrólisis inespecífica - del ATP.

Los métodos de captura por metales pesados como el Pb y Co, y que utilizan la actividad K-NPasa de la enzima, como los de Ernst y Guth-Albers, presentan la ventaja de demostrar directamente la actividad de la enzima, siendo estable para microscopía óptica, como indica Mayahara (29). Este mismo investigador indica que la técnica de Ernst presenta dos problemas fundamentales; el primero es que el SrPi a pH neutro es soluble, por lo que la técnica se debe desarrollarse a pH alcalino (pH 9.0) que resulta ser subóptimo para la enzima. En segundo lugar el precipitado SrPi es soluble en OsO_4 aún cuando se realice una postfijación a pH alcalino, por lo que el SrPi debe ser transformado a PbPi mediante el uso de Pb $(\text{NO}_2)_3$ para su uso en microscopía electrónica. Tal transformación resulta en la difusión de los productos de la actividad de la bomba de sodio-potasio.

Guth y Albers (26) evitan la difusión de los productos de la actividad de la enzima, adicionando Li_2SO_4 al medio de

incubación, aunque su método da mejores resultados que el de Ernst para microscopía óptica, la técnica no puede ser aplicada a microscopía electrónica (27, 38, 42), ya que el tejido no puede ser tratado con OsO_4 .

Mayahara introdujo otro método (27, 28) el que muestra ciertas ventajas, especialmente por el uso de inhibidores para la fosfatasa alcalina, aunque sigue contando con deficiencias como el uso de un pH subóptimo para el desarrollo de la reacción, y el uso de fijadores como el formaldehído y glutaraldehído, los que inhiben seriamente a la enzima (25).

B).- AUTORADIOGRAFIA.

Ernst (43) enumera las siguientes ventajas para el uso de la ouabaina (^3H).

- 1.- La alta especificidad del glucósido en su unión a la $(\text{Na-K})\text{ATPasa}$.
- 2.- La oportunidad de cuantificar la distribución y densidad de la bomba de sodio-potasio.
- 3.- La dependencia del glucósido para unirse a la enzima activa.

- 4.- La relación entre la unión y la inhibición de la bomba de sodio-potasio.
- 5.- La posibilidad de correlacionar la inhibición de la enzima con la medición in vivo o in vitro, con la cantidad de glucósido enlazado.

Aunque esta técnica presenta grandes ventajas, además de ser un método simple, cuenta con las desventajas de poseer poca resolución a nivel de microscopía electrónica -- (42, 43). Por otro lado el revelado de una radioautografía puede llevar hasta varias semanas, dependiendo del tipo de radiación utilizada (alfa ó gama), trayendo consecuencias - como la difusión del material radioactivo. Además el costo de moléculas radioactivas y de los sistemas para su revelado, como emulsiones fotográficas, son elevados y requieren de instalaciones, equipo y manejos especiales.

C. INMUNOCITOQUÍMICOS.

El uso de anticuerpos contra la (Na-K)ATPasa, marcados con ferritina o peroxidasa, en cortes de tejido por congelación (38, 39, 40) representa un método con excelente resolución y una alta sensibilidad para microscopía electrónica. Aunque esta técnica presenta varias dificultades, por un lado es considerablemente compleja, ya que al ser la bomba de sodio-potasio un componente intrínseco de la membrana celu-

lar, su aislamiento requiere de agentes que pueden inactivar irreversiblemente a la enzima, como es el duodecil sulfato de sodio, y que alteran la purificación de la enzima al no poder detectar si toda la proteína obtenida corresponde a la bomba de sodio-potasio (7). A pesar de esto se han podido obtener anticuerpos contra la enzima o contra cualquiera de sus subunidades (32-37). Aunque el uso de estos anticuerpos para localizar la enzima, han dado buen resultado, ellos solo son capaces de demostrar la presencia del antígeno, en este caso la bomba de sodio-potasio, pero en ningún momento demuestra que la enzima se encuentra activa en el sitio donde es evidenciada, siendo esta la principal desventaja de la técnica inmunohistoquímica.

V.- OBJETIVOS.

A pesar de los diferentes estudios realizados para localizar a la (Na-K)ATPasa, no ha sido posible lograr este objetivo totalmente, por ninguna de las técnicas. Firth (41) indica que cualquier técnica citoquímica que se proponga, deberá ser capaz bioquímicamente de localizar a la enzima activa, o evidenciar los productos de tal actividad. Con excepción de las técnicas inmunohistoquímicas, el resto de las técnicas son capaces de localizar a la bomba de sodio-potasio activa, ya poniendo en evidencia a los productos de su actividad, como es el caso de las técnicas histoquímicas, o como en el caso de la autoradiografía que es capaz de localizar a la enzima activa mediante ouabaina

(3H). El mismo Frith (41) concluyó que en general las desventajas que presentan estas técnicas son de especificidad, resolución o interpretación, además que estos estudios citoquímicos no concuerdan con los estudios fisiológicos.

Por otro lado sabemos que la bioquímica de la $(Na-K) - ATPasa$ presenta ciertas características que podrían ser -- aprovechadas para su localización citoquímica, como son; la presencia de un inhibidor altamente específico como es la ouabaina, pues como se ha demostrado (44, 45) la ouabaina - inactiva hasta en un 99%. También se ha demostrado que la ouabaina solo se enlaza a la bomba de sodio-potasio cuando esta se encuentra activa, formando un complejo $(Na-K)ATPasa$ ouabaina (44, 45). El tiempo de disociación del complejo - es variable, manteniéndose hasta 9 horas a temperatura ambiente (73).

En este trabajo nosotros proponemos la hipótesis de - que el complejo $(Na-K)ATPasa$ -Ouabaina, podría ser localizado mediante anticuerpos contra ouabaina, pues como sabemos Smith Col. (48, 49) han obtenido anticuerpos contra este glucósido. El complejo se haría evidente con un segundo anticuerpo, antigamaglobulina de conejo, marcado con peroxidasa. Lo anterior permitiría localizar a la $(Na-K)ATPasa$ activa, obteniendo una alta especificidad y una alta resolución, ya que si se requiere la técnica podría llevarse a - microscopía electrónica. Esta hipótesis concuerda con lo

postulado por Firth (41) en cuanto a la localización citoquímica de una enzima.

Para este fin se dividió el trabajo en tres fases u o objetivos:

- 1.- Síntesis de un conjugado albumina de suero bovino ouabaina (BSA-O).
- 2.- Obtención, purificación y caracterización de anticuerpos contra ouabaina, empleando como antígeno al BSA-O.
- 3.- Localización del complejo $(Na-K)ATPasa$ -Ouabaina mediante anticuerpos contra ouabaina.

MATERIAL Y METODO

1.- Preparación, purificación y caracterización de un conjugado de albumina de suero bovino-ouabaina (BSA-O).

A).- SINTESIS DEL BSA-O.

Según variación de Erlanger (45), Estrada (46) y Smith (48, 49, 50).

250 mg. de ouabaina fueron disueltos en 15 ml. de agua destilada, los que fueron oxidados agregando, gota a gota, 214 mg. de m-periodato de sodio disueltos en 10 ml. de agua destilada. La reacción se llevó a cabo durante 30 minutos a temperatura ambiente y protegida de la luz. La ouabaina oxidada fue unida a la proteína acarreadora, albumina de suero bovino, goteando la ouabaina-oxidada a una solución de 250 mg. de la proteína disuelta en 12.5 ml. de agua destilada, la mezcla fue mantenida en agitación constante y a pH 9.5 que fue mantenido constantemente mediante una solución de carbonato de potasio al 5%. La reacción de unión se dejó que ocurriera durante 3 horas, a temperatura ambiente y protegido de la luz.

El conjugado fue estabilizado por reducción con 0.15 mg. de borohidruro de sodio disuelto en 10 ml. de agua destilada, la mezcla se deja reposar por tres horas más.

B).- PURIFICACION DEL BSA-O.

El conjugado fue dializado contra agua destilada a 4°C durante tres días, con tres cambios diarios. Enseguida el conjugado fue concentrado y repurificado por cromatografía en columna de sephadex G-15, usando como eluente amortiguador de fosfatos salino (PBS) 0.15 M, pH 7.2. Se recogieron fracciones de 1.0 ml. que se leyeron a 280 nm. en un espectrónico 21 (Baush and Lomb) con el fin de localizar la muestra.

En cada paso las muestras fueron analizadas por cromatografía en capa fina (se usaron cromatofolios de sílica-gel 60 F254) con el fin de observar la presencia o ausencia de ouabaina libre, usando como fase móvil cloroformo: metanol: agua (10:5:1), revelando con tricloruro de antimonio y calentando a 100°C por 5-10 minutos (51, 52). Las placas observadas con una lámpara de U.V. de una longitud de onda de 366 nm. Junto con el conjugado se llevaron patrones de ouabaina, ouabaina-oxidada y BSA.

C).- CARACTERIZACION DEL BSA-O.

El BSA-O fue caracterizado por tres métodos; espectrofotometría, electróforesis y electroénfoque.

1.- ESPECTROFOTOMETRIA.

Basada en el método de Brown y Write (53) para glucósi

dos cardíacos y agliconas.

20 μ g. de ouabaina y ouabaina oxidada, fueron disueltas en 100 μ l. de agua destilada, enfriándose hasta 4°C, - adicionando 900 μ l. de ácido sulfúrico al 95% y ha 4°C, obteniendo una concentración final de 20 μ g. ml.⁻¹. La mezcla fue dejada reposar por 60 minutos a temperatura ambiente. Terminado el tiempo fue realizado el espectro de absorción determinando los coeficientes de extinción molar.

Para los espectros de absorción del BSA y BSA-O se realizó el mismo procedimiento que para la ouabaina, excepto - que se usaron concentraciones finales de 60 μ g. ml.⁻¹. El número de moles de ouabaina unidas al BSA fueron calculados según el método de Erlanger y Col. (54).

2.- ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA- SDS.

Realizada según el método de Laemlli (55) con el fin - de determinar la movilidad relativa (M_r) y el peso molecular (M_n) del BSA-O y compararlo con el BSA. El corrimiento se llevó a cabo en geles al 10%. Se usaron como proteínas marcadoras para determinar el peso molecular BSA (68,000), ovoalbumina (48,000) y citocromo C (12,000).

3.- ELECTROENFOQUE.

Se usaron geles de poliacrilamida al 5% y anfotinas -- Pharmalyte (Pharmacia) con un rango de pH de 3-10. Los ge-

les se prepararon de la siguiente manera; a un ml. de acrilamida-bisacrilamida al 50% le fueron adicionados 9 ml. de agua destilada, desgacificándose al vacío. A la mezcla anterior se le adicionaron 0.25 ml. de anfolinas, 0.225 ml. de persulfato de amonio al 5% y 10 μ l. de TEMED. La mezcla fue vaciada en una cámara de 8 x 8 cm. dejándola gelificar por 30 minutos (56).

Las condiciones de corrimiento fueron las siguientes;-- el gel fue colocado en posición horizontal, las muestras de 5-10 μ l. fueron colocadas en posillos hechos a un centímetro del cátodo. Se usaron como electrolitos 1M de NaOH para el cátodo y 1M de H_3PO_4 para el ánodo, conectándolos al gel por tiras de papel filtro. El corrimiento fue seguido con marcadores como el azul de bromofenol y el verde de metilo. Al gel se le pasó una corriente de 200 volts durante 2.0-2.5 horas, tiempo en el cual el azul de bromofenol deja de migrar y vira de color (pasa de azul a café) (57). El gel fue teñido con verde rápido al 0.25% disuelto en ácido acético al 10% durante 0.5-1.0 hora y desteñido con una solución de metanol: ácido acético: agua (30:10:60).

D).- INHIBICION DEL TRANSPORTE POR OUABAINA Y BSA-O

Los efectos de la ouabaina y el BSA-O sobre el flujo de sodio, fue medido siguiendo el modelo descrito por Harroquin y Galar (74), el que consistió en medir el transporte de sodio a través de la piel de rana, bajo condiciones de -

corto circuito (diferencia de potencial de membrana anulada). El potencial de membrana fue medido en un multímetro como el voltaje de la piel de rana y expresando como milivolts, mientras que el flujo de sodio se registró en un amperímetro y expresado como microamperaje.

Los efectos de la ouabaina sobre el flujo de sodio medidos al adicionar en la región externa de la piel, concentraciones de $10^{-3}M$ y $10^{-5}M$ de ouabaina, mientras que el BSA-O fue probado en concentraciones semejantes, con fines comparativos.

La única variación realizada al modelo de Marroquín y Galar fue que mientras ellos utilizaron un ringer de rana modificado, el que contenía sulfatos y donde el cloro usado fue radioactivo, nosotros utilizamos un ringer normal de rana.

11.- Obtención, caracterización y purificación de anticuerpos contra ouabaina.

A).- PROTOCOLO DE INMUNIZACION.

2.5 mg. de BSA-O purificado, fueron diluidos en PBS hasta un volumen de 0.5 ml. y emulsificados con 0.5 ml. de adyuvante completo de Freund. Con esta emulsión se inmunizaron dos conejos Nueva Zelanda, 2.5 mg. del antígeno (BSA-O) por conejo, por vía subcutánea y en sitios múlti --

ples. Quince días después se repitió la dosis, aunque usando adyuvante incompleto y por vía intramuscular (I.M.) A los 30 días se inocularon a los conejos por vía I.M. 0.125 mg. de BSA-O emulsificado con adyuvante incompleto. Los días 31 y 32 se inocularon 0.25 mg. y 0.5 mg. respectivamente, del antígeno por vía I.M. Los conejos fueron reforzados cada 15 días con 0.5 mg. del BSA-O por vía I.M. y sangrados en el mismo lapso de tiempo para obtener suero y verificar el título (75).

B).- CARACTERIZACION DEL ANTISUERO.

1.- DETERMINACION DEL TITULO DE ANTICUERPOS.

Esto se realizó por la técnica de punto medio (58). A un gel de agarosa al 1.5%, disuelto en amortiguador de barbital-HCl 0.05 M, pH 8.2 y de 2.5 x 7.5 cm., se le perforaron dos líneas de pocillos, unos frente de otros, con una separación de un cm. En la línea superior se colocaron 25 μ l. del antisuero contra BSA-O, por cada pocillo. En la línea inferior se adicionaron 25 μ l. del antígeno con diluciones de 1:1 hasta 1:1024 (5.0 hasta 0.05 mg. ml⁻¹). El antígeno y el antisuero se dejaron difundir por toda la noche a 37°C, en cámara húmeda.

Otra forma de titular el suero fue la siguiente; en una placa de agarosa con las características anteriormente descritas, le fueron perforados pocillos a todo lo largo y

por el centro. En estos pocillos se adicionaron 5 μ l. de una mezcla de suero completo y antígeno a diferentes diluciones. Por debajo y por arriba de la línea de pocillos se hicieron dos carriles en uno de ellos se agregaron 200 μ l. del antígeno diluido 1:8, y en el otro 200 μ l. del antisuero diluido 1:2. La difusión se llevo a cabo toda la noche a 37°C, en cámara húmeda.

Los geles fueron comprimidos, lavados con solución salina y teñidos con azul de Coomassie al 0.25% disuelto en metanol: ácido acético: agua (40:10:50). El destañido de los geles se hizo en la misma solución, pero sin colorante.

2.- INMUNOELECTROFORESIS

Se llevó a cabo en placas de agarosa al 1.5% disueltas en amortiguador de barbital-HCl 0.08 M pH 8.2 y de 2.4 x 7.5 cm. En la placa dos pocillos y se añadieron muestras de 5 μ l. (6.25 g.) de BSA y BSA-O, se pasó por la placa una corriente de 10 volts cm^{-1} . El corrimiento se siguió adicionando a los pocillos 1 μ l de azul de bromofenol al 0.01%, el tiempo de corrimiento fue de una hora. Pasado el tiempo se hizo un carril de 7.0 x 0.2 cm., entre los dos pocillos colocando en el 200 μ l. de antisuero completo, el que fue dejado difundir por toda la noche a 37°C en cámara húmeda. Formados los arcos de precipitación, la placa fue conservada por compresión, lavado y teñido con azul de Coomassie (55, 58, 59).

3.- DOBLE INMUNOELECTROFORESIS.

La primera dimensión se realizó en una placa de 2.5 x 7.5 cm., de agarosa al 1.0% disuelta en amortiguador de barbitol- HCl 0.08 M pH 8.2 A la placa se le perforó un pocillo en un extremo de la placa y se colocaron 80 μ g. de BSA-0, disueltos en PBS. Se pasó por la placa una corriente de 100 volts por una hora, usando como marcador de corrimiento azul de bromofenol. Acabado el tiempo se cortó una tira -- del gel de 1.5 x 7.5 cm. tomando como centro al pocillo, se colocó la tira en un extremo de una placa de 7.5 cm² al resto de la placa se le agregaron 6 ml. de agarosa al 1.0%, -- que contenía 18 μ l. cm.⁻² de antisuero, ya solidificado el gel se pasó por el una corriente de 20 volts por toda la noche. El gel fue preservado de la misma manera que los anteriores (60).

G).- PURIFICACION DE ANTICUERPOS CONTRA BSA-0.

1.- PURIFICACION DE IgG A PARTIR DEL ANTISUERO.

10 ml. del antisuero fueron mezclados con 1.8g. de sulfato de sodio (18% p/v), se agitaron e incubaron por 30 minutos a 25°C. El antisuero fue centrifugado a 5000 rpm por 30 minutos, descartando el sobrenadante. La pastilla se -- resuspendió en 5ml. de agua destilada, enseguida se adicionaron 0.9 g. de sulfato de amonio agitando e incubando nuevamente. La centrifugación se volvió a repetir descartando el sobrenadante. La pastilla se volvió a resuspender en -

2.5 ml. de agua destilada y se dializó contra un amortiguador de fosfatos 0.07 M pH 6.3 (55).

La fracción gama-globulina obtenida por precipitación con sulfato de amonio y equilibrada con el amortiguador de fosfatos, fue colocada en una columna de DEAE celulosa con un volumen de 10 ml. y utilizando como eluyente el mismo -- amortiguador de fosfatos. El flujo se reguló a 0.3 ml. por minuto, del que se obtuvieron fracciones de 2 ml. cada una y registrando su absorbancia a 280 nm. La IgG purificada -- fue cuantificada por el método de Lowry (62). La inmunoglobulina se concentró, dializó, contra PBS y probó por doble -- inmunodifusión.

2.- SINTESIS DE INMUNOABSORBENTE.

Según una pequeña modificación del método de Wilson y Nakane (61). 10 ml. de sephadex G-75 hidratados fueron lavados tres veces con agua destilada y centrifugados a 500 rpm por cinco minutos. Retirado el sobrenadante del sephadex, este fue expuesto a 20 ml. de NaIO_4 15mM por 30 minutos, manteniéndolos en movimiento constante. La reacción -- fue detenida con 10 ml. de etilenglicol 2 M, manteniéndolos en movimiento constante por 30 minutos. El sephadex oxidado (sephadex-aldehído) fue entonces lavado con amortiguador de carbonatos 0.1 M pH 9.5, adicionando enseguida 400 mg. -- de BSA disuelta en 20 ml. del amortiguador de carbonatos, --

estos fueron agitados suavemente por 24 horas a 4°C. Enseguida el sobrenadante fue removido y el sephadex-BSA reducido con 20 ml. de una solución de 1.0 mg. ml⁻¹ de NaBH₄ disueltos en PBS y agitados por una hora a 4°C. Por último el gel fue lavado con tres cambios de PBS. La proteína unida no covalentemente fue extraída con Urea 3 M disuelta en amortiguador de fosfatos 0.01 M pH 6.0, haciendo tres lavados de 20 ml. por 30 minutos y en agitación suave, al final el gel fue lavado con tres cambios de PBS.

La presencia de proteína unida al sephadex es evidenciada por la reacción de Janger: 200 µl. de sephadex-BSA fueron lavados cinco veces con amortiguador de carbonatos, llevándolos a un volumen final de un mililitro. Se adicionaron 200 µl. de dinitro fluorobenceno al 2.0% en alcohol etílico al 95%, dejándolos reaccionar por una hora a temperatura ambiente. La muestra fue acidificada con tres gotas de HCl al 36%. El dinitrofluorobenceno no unido y el dinitrofenol producido durante la reacción fueron extraídos con tres cambios de 5 ml. cada uno de éter etílico y lavado el gel con PBS, la extracción se realizó con el fin de que estos productos no interfirieran con la observación. Se llevaron controles de sephadex, sephadex oxidado y reducido.

3.- PURIFICACION DE ANTICUERPO CONTRA BSA-O, MEDIANTE EL INMUNOABSORBENTE.

8 ml. de sephadex-BSA fueron empaquetados en una jeringa hipodérmica de 10 ml., el gel fue equilibrado con tres veces su volumen, con PBS.

Por la columna se hicieron pasar 500 μ l (15 mg.) de IgG purificada del antisuero, recogiendo fracciones de 1.0-ml. la columna presentó un flujo de 0.1 ml. min.^{-1} las fracciones fueron registradas a 280 nm.

Los anticuerpos absorbidos por el gel fueron eluidos de este mediante un amortiguador de glicina-HCl 0.1 M pH 2.5 (55, 59). Las fracciones obtenidas fueron neutralizadas, inmediatamente después de haber sido leídas a 280 nm, con unas gotas de carbonato de potasio al 5%.

Los anticuerpos absorbidos y los no absorbidos fueron cuantificados por el método de Lowry y luego probados por inmunodifusión.

Después de usada la columna fue lavada con tres volúmenes de urea 3 M disuelta en PBS, y vuelta a equilibrar con PBS.

D).- PRUEBA DE ESPECIFICIDAD DE LOS ANTICUERPOS.

1.- METODO DE ELISA INDIRECTO MODIFICADO (63, 64, 65).

La activación de los tubos de poliestireno se realizó de la siguiente manera: A los tubos se les adicionó 10 μ g. de BSA-O disuelto en un mililitro de amortiguador de carbonatos 0.1 M pH 9.6 dejándolos reposar por toda la noche a 4°C , después de activados los tubos fueron lavados con tres cambios de dos mililitros de PBS que contenía 0.05% de tween 20 (PBS-T).

A los tubos activados se les adicionó un mililitro de anticuerpos contra BSA-O (purificados como anteriormente se describió) a diferentes diluciones, desde 1:800 hasta 1:51, 200, los que fueron diluidos en PBS-T. Enseguida se dejó reaccionar a los anticuerpos con el antígeno durante dos horas a temperatura ambiente. Pasado el tiempo se lavó a los tubos con tres cambios de PBS-T, adicionando enseguida un mililitro de anticuerpos contra gama globulina de conejo, marcados con peroxidasa (Cappel) diluidos 1:400, dejándolos reaccionar por una hora a temperatura ambiente. Los tubos fueron lavados con PBS-T, adicionando después 1.0 ml. del sustrato para la peroxidasa que consiste en una solución de 0.4 mg. ml⁻¹ de o-fenildiamina más 0.03% de peróxido de hidrógeno, diluidos en un amortiguador de citratos 0.1 M pH 4.0. Después de 15 minutos de incubación con el sustrato, la reacción se detuvo con 200 µl. de ácido sulfúrico 4 N y se leyó la absorbancia a 492 nm. Cada muestra se probó por triplicado, llevando pruebas negativas.

2.- INHIBICION POR HAPTENO.

Anticuerpos contra BSA-O diluidos 1:12, 800, les fue adicionada ouabaina obteniendo concentraciones finales de 10⁻³ hasta 10⁻⁸ M, el anticuerpo y el hapteno se les permitió reaccionar por una hora a temperatura ambiente. Enseguida un mililitro de la mezcla de anticuerpos y hapteno fue adicionada a los tubos activados con 10 µg. de BSA-O, dejándolos reaccionar por dos horas a temperatura ambiente. Pasa-

do el tiempo el tubo fue lavado con PBS-T, adicionando un mililitro del segundo anticuerpo diluido 1:400, reaccionando por una hora a temperatura ambiente. Los tubos fueron lavados con PBS-T y adicionado el sustrato para la enzima dejándolo por 15 minutos, parando la reacción con ácido sulfúrico, 200 l. y leyendo a 492nm.

III.- Localización de la (Na-K)ATPasa.

A).- PREPARACION DE LOS TEJIDOS.

Pequeños fragmentos de tejido de cerebro, médula espinal, cerebelo y riñón de rata, fueron crioprotectados con una mezcla de PBS-Dimetil sulfóxido, en una proporción de 9:1, este lavado fue hecho por un minuto, volviendo a ser lavado con PBS por un minuto. El tejido fue secado con papel filtro e introducido en un tubo de plástico, enseguida el tubo fue introducido en una mezcla de hielo seco acetona por 20 minutos, con el fin de congelar rápidamente a los tejidos.

Congelados los tejidos, estos fueron montados sobre una platina y cubiertos con Tissutec para su posterior corte, -siendo conservados a -20°C . Los tejidos fueron cortados en un micrótopo de congelación, con un grosor de 10μ y montados sobre un portaobjetos bien limpio, dejándolos secar por 30 minutos para su posterior tratamiento.

B).- LOCALIZACION DE LA (Na-K)ATPasa POR EL METODO DE GUTH Y ALBERS.

1.- Cortes de 10μ . montados en portaobjetos y secados a temperatura ambiente por 20 minutos, fueron incubados en un medio que contenía: KCl (30 mM), $MgCl_2$ (5 mM), p-nitrofenilfosfato (5 mM), DMSO (25%) y 2-amino, 2-metil, 1-propanol (70 mM) como amortiguador, ajustando el pH a 9.0 con HCl. - La incubación se realizó por tres horas a $37^{\circ}C$.

Para la inhibición de la bomba de sodio-potasio, al medio se le adicionó $10^{-3}M$ de ouabaina.

2.- Después de la incubación se retiró el medio del portaobjetos, lavándolo por tres minutos con amortiguador de 2-amino, 2-metil, 1-propanol 70 mM pH 9.0. Los cortes fueron colocados directamente en 2.0% de $CoCl_2$ por cinco minutos, lavándolos enseguida con agua destilada por un minuto y con amortiguador por tres minutos.

3.- La reacción fue revelada cubriendo el tejido con una dilución de sulfuro de amonio (1:50 v/v) por tres minutos. Los cortes volvieron a ser lavados con el amortiguador, deshidratados y montados con resina sintética.

C).- LOCALIZACION DE LA $(Na-K)ATP_{asa}$ CON ANTICUERPOS - CONTRA OUABAINA.

1.- Cortes de tejidos montados en portaobjetos, fueron incubados con un medio que contenida ouabaina en concentraciones de $10^{-2}M$ y $10^{-3}M$, o BSA-0 a $10^{-3}M$. Los medios de incubación utilizados fueron:

a).- Medio de Mrsny y Col. (20) que contiene: 210 mM de NaCl, 50 mM de Tris, 5mM de MgCl₂, a un pH 7.4. El medio contiene 2 mM de ouabaina o 10⁻³M de BSA-O. Como testigos se usaron KCl (20 mM) y 10⁻³ de BSA, en lugar de ouabaina o BSA-O.

b).- Otro medio utilizado fue el descrito en el método de Guth-Albers, aquí se adicionó 10⁻²M o 10⁻³M de ouabaina, o en su caso 10⁻³M de BSA-O. Como testigos se usó el medio sin ouabaina o adicionando 10⁻³M de BSA.

c).- El tejido también fue incubado en ringer de mamífero adicionando 10⁻³M de ouabaina o BSA-O, utilizando como testigos el ringer sin ouabaina o con BSA.

El tiempo de incubación en todos los casos fue de tres horas a 37°C.

2.- Incubado el tejido este fue lavado con PBS (10 min.)

3.- El tejido fue recubierto con suero normal de cabra diluido 1:5 (30 min.).

4.- Se escurrió el exceso de suero normal de cabra y volviendo a recubrir el tejido con 4 a 6 volúmenes de anticuerpo anti-BSA-O diluido 1:30 (30 min.).

5.- Lavar con PBS (10 min.).

6.- Se recubrió el tejido con el segundo anticuerpo, -
antigama de conejo marcada con peroxidasa. Este se diluyó-
1:10 (30 min.).

7.- Lavar con PBS (10 min.).

8.- Adición del sustrato para la peroxidasa que consis-
te en : 5 mg. de 3,3'-diaminobenzidina (tetrahidro cloruro),
más 0.1 ml. de peróxido de hidrógeno al 0.3% diluidos en 10
ml. de amortiguador de Tris-HCl 0.05 M pH 7.6 (15 minutos).

9.- Se lavó por última vez con PBS por 10 minutos. Los
cortes fueron entonces deshidratados y montados con resina-
sintética.

En otros casos los cortes, después de haber sido incu-
bados fueron lavados por un minuto y luego tratados con Tri-
tón 4100 por un minuto. Otro tratamiento fue fijar al teji-
do después de haber sido incubado, con p-formaldehído al --
1.0% disuelto en amortiguador de fosfatos 0.1 M pH 7.8. El
protocolo se continuó en el paso número dos.

En el caso del epitelio de rana, este primero fue uti-
lizado en los experimentos de transporte y luego fue fijado
con p-formaldehído. El tejido fue entonces congelado, cor-
tado y montado en portaobjetos. Con el fin de bloquear la
peroxidasa endógena del epitelio de rana, los cortes fueron
sumergidos en acetona por cinco minutos, secados al aire y
vueltes a sumergir en peróxido de hidrógeno al 0.3%. El --
protocolo se continuó en el paso número dos.

R E S U L T A D O S

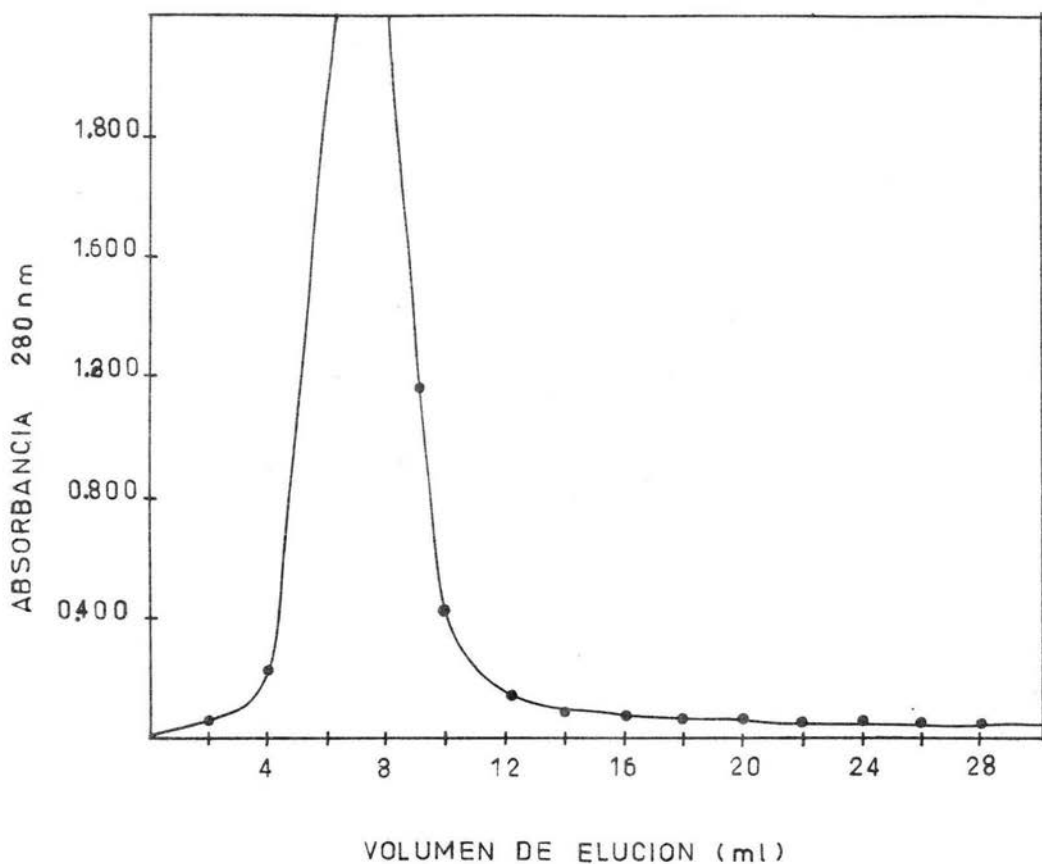
I.- Purificación y caracterización de un conjugado de albúmina de suero b ovino-ouabaina.

A).- PURIFICACION DEL BSA-O.

El BSA-O purificado por cromatografía en columna de sephadex G-15, es totalmente soluble en agua destilada a pH neutro, tendiendo a precipitarse a pH ácido. La cuantificación por el método de Lowry nos indicó una concentración de 50 mg. ml^{-1} del BSA-O, obteniendo un rendimiento aproximado de 200 mg. de BSA-O.

La cromatografía en placa fina (CPF) realizada después de la diálisis mostró la ausencia total de ouabaina libre.- La confiabilidad del método para detectar ouabaina libre es buena, ya que esta presenta una sensibilidad de $0.25 \mu\text{g. cm.}^{-2}$, por lo que pensamos que la cantidad de ouabaina libre es nula, aunque de cualquier manera el BSA-O fue repurificado por cromatografía en columna de sephadex G-15. Los resultados de esta cromatografía (gráfica 1) nos indica que el BSA-O es eluido con el volumen de exclusión del gel. Al probar cada una de las fracciones eluidas, mediante CPF, se observó, la ausencia de ouabaina libre.

En ambos casos, diálisis y cromatografía, el BSA-O fue comparado contra ouabaina, ouabaina oxidada y BSA, obtenien



Gráfica 1.- Purificación del conjugado BSA-O, mediante una columna de sephadex G-15. Se usó como eluyente PBS 0.15 M, pH 7.2 con una velocidad de flujo de 1.0 ml min⁻¹. No se registró ouabina libre en ninguna de las fracciones colectadas.

do los siguientes Rf:

BSA-O : 0.0

BSA : 0.0

Ouabaina: 0.518

Ouabaina oxidada: 0.794

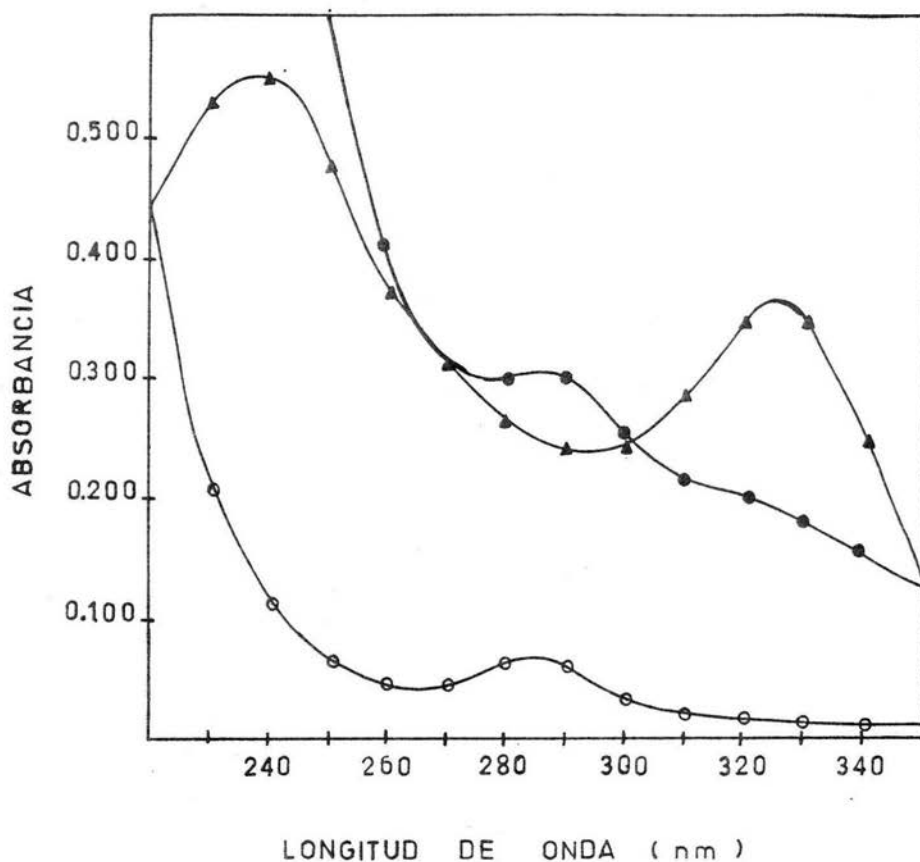
En los casos de la ouabaina, ouabaina oxidada y el BSA-O, estos resultaron ser fluorescentes al ser tratados con tetracloruro de antimonio y observados en luz U.V., no siendo así para el BSA que resulta no ser fluorescente bajo el mismo tratamiento, tanto el BSA-O como el BSA dieron reacción positiva al tratarlos con ninhidrina.

Por los anteriores resultados pudimos concluir que se obtuvo un conjugado con alta pureza, es decir que no contiene ouabaina libre.

B).- CARACTERIZACION DEL BSA-O.

1.- ESPECTROFOTOMETRIA.

Al realizar el espectro de absorción de la ouabaina se pudo observar que esta presenta dos picos máximos de absorción el primero a los 325 nm., y el segundo a los 240 nm. (gráfica 2) y que corresponden a los reportados por Brown y Write (53), aunque ellos encontraron un tercer pico a los 515 nm. y que no nos fue posible detectar. Para fines comparativos se usó el espectro de absorción de la ouabaina, -



Gráfica 2.- Espectro de absorción de ouabaina, albúmina de suero bovino y albúmina de suero bovino-ouabaina, según el método de Brown y Writh. Ouabaina 20 g ml^{-1} (▲-▲), BSA 60 g ml^{-1} (○-○), BSA-0 60 g ml^{-1} (●-●)

especialmente el pico de 325 nm., donde esta molécula presenta un coeficiente de extinción molar de 17,300.

Por otro lado los espectros de absorción del BSA y BSA-0 presentan claras diferencias entre ellos a la misma concentración ($60 \mu\text{g ml}^{-1}$). El BSA-0 presenta un aumento de la absorbancia, especialmente en la región de 330 a 320 nm. (ver gráfica 2). Ambos BSA y BSA-0 presentan un pico de absorción a los 285 nm., siendo más definido en el BSA, esto nos demuestra que el tratamiento al que fueron sometidas las proteínas, provocó pocos cambios en su estructura, posiblemente esta absorción, a los 275 nm., se relaciona con aminoácidos como la tirosina y el triptófano que absorben en la región de 270 a 290 nm.

Seguendo el método de Erlanger y Col., (43) se calculó el número de residuos de ouabaina unidos al BSA:

La absorbancia a 325 nm. del BSA-0 a una concentración de $60 \mu\text{g}$. por litro es de 0.196 y la absorbancia a la misma concentración y longitud de onda del BSA es de 0.014, la diferencia atribuida a los residuos de ouabaina es de 0.182.- Así la concentración de ouabaina es de $0.182/17,300 = 1.05 \times 10^{-5}$ moles por litro. Puesto que el peso de la ouabaina es de 728.6 gm. por mol., siendo su concentración de (1.05×10^{-5}) ($728.6 \text{ gm. por litro}$) = 7.65 mg. por litro. Por sustracción de la concentración de BSA obtenido fue de 52.35 mg. por litro. Si el peso molecular del BSA es de --

68,000 por lo que el número de moles por litro del BSA en la muestr. de 52.35×10^{-3} gm. por litro, dividido entre 68,000 gm. por mol. = 7.6×10^{-7} . Así el número de moles de ouabaina por mol de BSA es de $1.05 \times 10^{-5} / 7.6 \times 10^{-7} = 10^{-7} = 13.6$. De aquí se infiere un peso molecular para el BSA-O de 77,910.

2.- ELECTROFORESIS.

La electroforesis en geles de poliacrilamida nos muestra la presencia de cinco bandas para la albúmina de suero bovino siendo la principal la que posee un peso molecular de 68,000 y que fue utilizado para fines comparativos (figura-1). Por otro lado el conjugado presenta un peso molecular de 79,500 (gráfica 3), demostrando un aumento en el peso molecular de la albúmina, como consecuencia de la unión de residuos de ouabaina. La diferencia entre ambos pesos moleculares, BSA y BSA-O, es de 1,590, lo que nos da un número de residuos de ouabaina de 15.8, dato que concuerda con el de espectrofotometría.

El gel no demostró la existencia de hidrólisis del BSA-O dado que no se observó ninguna banda por debajo de la del conjugado.

3.- ELECTROENFOQUE.

Tanto el BSA como el BSA-O migran hacia el ánodo, lo que nos indica que ambas proteínas son básicas, dado su al-

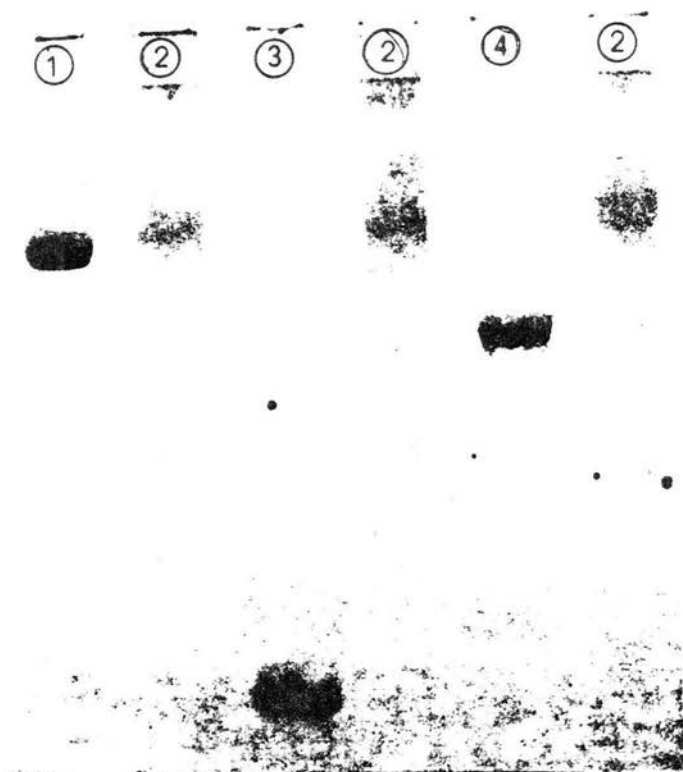
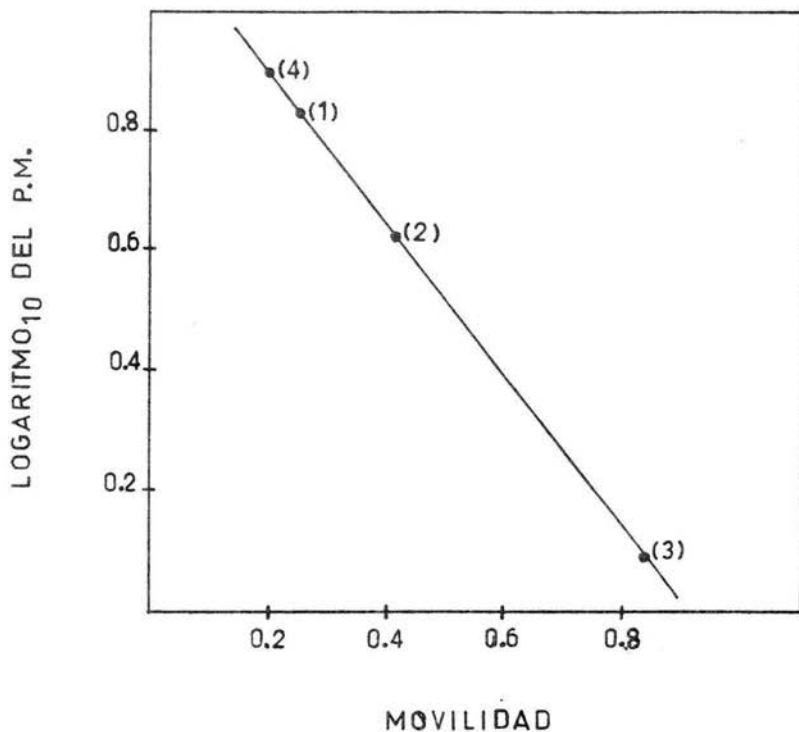


Figura 1.- Electróforesis en geles de poliacrilamida con SDS al 10% según el método de Laemmli (55).

- (1).- BSA
- (2).-BSA-C
- (3).-Citocromo C.
- (4).-Ovoalbúmina.



Gráfica 3.- Determinación del peso molecular del BSA-O mediante electrofóresis en geles de poliacrilamida-SDS. Proteínas patrón; (1).-BSA (68 Kdal), (2) Ovoalbúmina (42 Kdal) (3).-Citocromo C (11.5 Kdal). (4).- BSA-O (79.5 Kdal).

to contenido de residuos de lisina, aunque en el caso del -BSA-O este sufre un retraso comparado con el BSA, como consecuencia posible del bloqueo de varios de sus grupos lisina por parte de la ouabaina y que disminuye la basicidad del conjugado. No se determinó el pH en el que se encuentran las proteínas, puesto que no fue de nuestro interés.

D).- INHIBICION DEL TRANSPORTE POR OUABAINA Y BSA-O.

Inicialmente el transporte fue inhibido con 10^{-5} M de ouabaina y 10^{-5} M de BSA-O, mostrando una caída en el flujo de sodio, representando como el microamperaje a través de la piel de rana. Este flujo vá desde 64 μ amperes al inicio del experimento, hasta un amper a los 120 minutos después de la adición de la ouabaina. Los anteriores resultados sugieren una inhibición del flujo de 98.4% para la ouabaina.- En el caso del BSA-O se obtuvo un flujo inicial de 52 μ amperes y un final de 28 μ amperes a los 120 minutos, correspondiendo a un 46.2% de inhibición del transporte (ver tabla II y III).

A una concentración de 10^{-3} M tanto de ouabaina como del BSA-O, se obtuvieron inhibiciones de 95.2% para la ouabaina y de 88.3% para el BSA-O (Ver tabla II). Como vemos la inhibición del transporte resulta ser buena, aunque el -BSA-O requiere de una concentración 100 veces mayor que la ouabaina para presentar resultados semejantes a esta.

T A B L A II

Flujo de sodio (μ ampers) Inhibición (%)

		Inicio	Termino	
Ouabaina	(10^{-5} M)	64.0	1.0	98.4
BSA-O	(10^{-5} M)	52.0	28.0	46.2
Ouabaina	(10^{-3} M)	84.0	4.0	95.2
BSA-O	(10^{-3} M)	68.0	8.0	88.3
BSA	(10^{-3} M)	87.0	81.0	1.15

T A B L A III

Potencial de membrana (Voltaje)

		Inicio	Término
Ouabaina	(10^{-5} M)	40.8	5.8
BSA-O	(10^{-5} M)	91.2	69.2
Ouabaina	(10^{-3} M)	27.1	1.9
BSA-O	(10^{-3} M)	33.8	7.2
BSA	(10^{-3} M)	52.5	53.2

La inhibición máxima para 10^{-5} M de ouabaina se alcanzó a los 120 minutos después de haber adicionado la ouabaina, comparándose con la inhibición producida por el BSA-O al mismo tiempo y concentración. En la concentración de 10^{-3} M de ouabaina se alcanzó a los 105 minutos.

También se probaron tanto a la ouabaina como al BSA-O en piel de rana donde el flujo se encontraba aumentado por la acción de isoproterenol, obteniendo un 99% de inhibición para la ouabaina y un 85% para el BSA-O.

Por otro lado no podemos pensar que la inhibición pueda deberse a la acción de ouabaina contaminante, dado que esta no fue detectada por CPF, ni por la hidrólisis del BSA-O en subunidades de bajo peso molecular, ya que no fueron detectados por electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS. Además $10^{-3}M$ de BSA no causan ningún efecto sobre el flujo de sodio.

II.- Caracterización del antisuero contra BSA-O y purificación de anticuerpos contra BSA-O

A).- CARACTERIZACION DEL ANTISUERO.

1.- TITULO DEL ANTISUERO.

La respuesta de los conejos inmunizados con el BSA-O se da en la cuarta semana, tiempo en el cual se pudieron detectar anticuerpos, aunque en títulos bajos, tendiendo ha aumentar conforme pasa el tiempo, alcanzando su máximo nivel a las 40 semanas después de la primera inoculación, obteniendo la zona de equivalencia en la región $39 \mu g. ml^{-1}$ de BSA-O (dilución 1:120), manteniéndolos por 15 semanas, -

tiempo en el cual sesangró totalmente a los conejos. Las - dos técnicas usadas para la titulación, dan resultados seme- jantes (figura 2), aunque las técnicas son semicuantitati- vas, estas nos dan una idea de la existencia de anticuerpos contra BSA-O así como de su título.

Los datos obtenidos de la titulación difieren con los obtenidos por Smith (49) para anticuerpos específicos con- tra ouabaina. El obtuvo el título máximo entre la semana - 12-20 manteniéndose durante 33 semanas, aunque el determinó el título por radioinmunoanálisis, obteniendo 1.9 mg. de in- munoglobulina específica para ouabaina por mililitro de anti- suero.

2.- INMUNOELECTROFORESIS Y DOBELINMUNOELECTROFORESIS.

Al principio el BSA-O y BSA fueron probados por doble- inmunodifusión de Ouchterlony, encontrándose que ambos son reconocidos por el antisuero, siendo esta una reacción de - identidad total (figura 3).

Debido a que la obtención de una reacción de identidad total nos indicó la presencia de antígenos idénticos, se op- tó por probar a los antígenos por inmunoeléctroforesis, en- contrando que el BSA-O presenta una mayor movilidad electro- forética que el BSA. Por otro lado al precipitarse los an- tígenos con el antisuero, observamos que el BSA presentó un solo arco de precipitación bien definido, mientras que el -

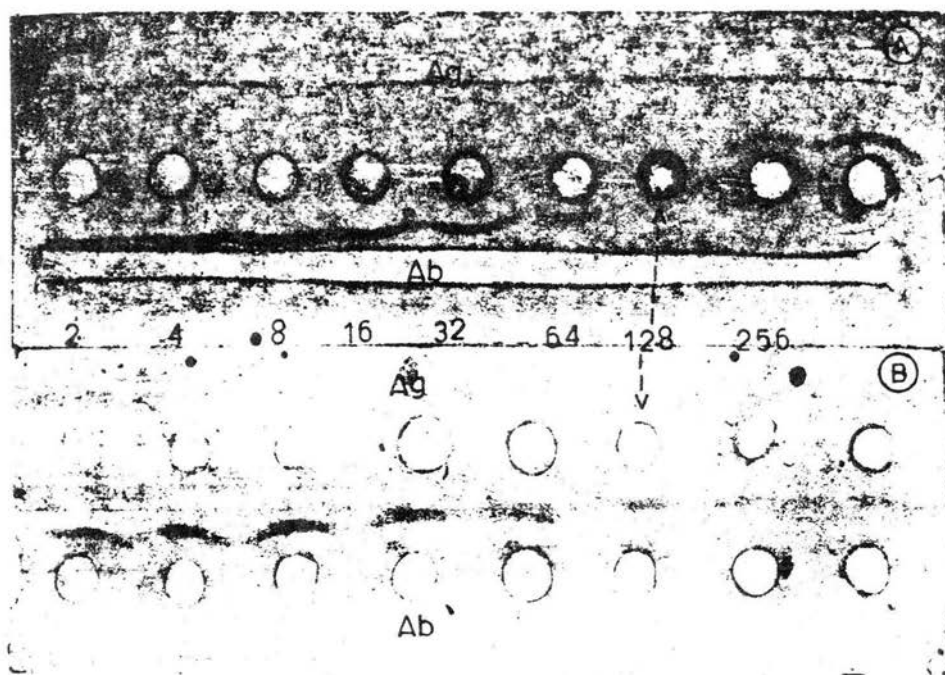


Figura 2.- (A).- Titulación del antisuero. El título fue encontrado en la dilución donde no existe arco de precipitación (1:128). (B) Titulación del antisuero por el método de punto medio. El título también se localizó en la dilución de 1:128.



Figura 3.- Doble inmunodifusión. En ella observamos que el antisuero reconoce tanto al BSA como al BSA-0, obteniendo un arco de precipitación de identidad total.

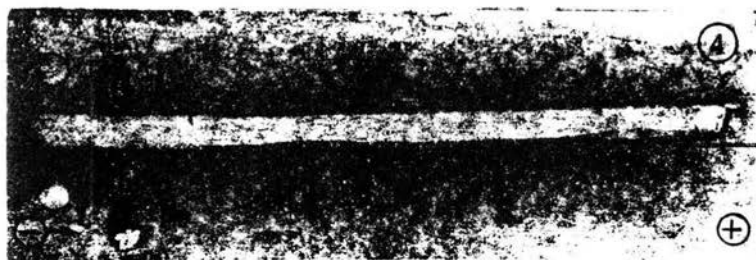


Figura 4.- Inmunolectroforesis. Podemos observar las diferencias entre el BSA y el BSA-0, en su movilidad electroforética en agarosa, así como su comportamiento frente al antisuero.

BSA-O dió dos arcos de precipitación (figura 4). Los anteriores resultados nos indicaron que el antisuero contra -- BSA-O puede contener por lo menos dos tipos de anticuerpos, uno contra el BSA-O y el otro contra BSA. Lo anterior pudo ser demostrado por dobleinmunoeléctroforesis.

La técnica de dobleinmunoeléctroforesis separa a los antígenos, en primer lugar por su carga eléctrica (primera dimensión) y en seguida los antígenos reaccionan con el antisuero bajo la acción de un pequeño campo eléctrico (segunda dimensión). En figura cinco podemos observar dos zonas de precipitación, una retrasada ligeramente con respecto a la otra, lo que demuestra que tanto el BSA-O como el BSA presentan diferencias como antígenos. Por otro lado esta misma prueba nos demostró que nuestro antisuero es heterólogo, es decir que por lo menos existen dos tipos de anticuerpos, unos que reconocen a los determinantes antigénicos del BSA y los otros posiblemente dirigidos contra la ouabaina unida al BSA.

B).- PURIFICACION DE ANTICUERPOS CONTRA BSA-O.

Considerando la posibilidad de haber obtenido dos tipos de anticuerpos se procedió a su purificación. Inicialmente se intentó la purificación mediante la síntesis de una columna de afinidad para ouabaina, la que se intentó sintetizar por la unión de la ouabaina a sephadex, mediante un -- puente de etilendiamina. Por un lado se consiguió unir el

⊕

⑤

↑
(2)

⊕

← (1)

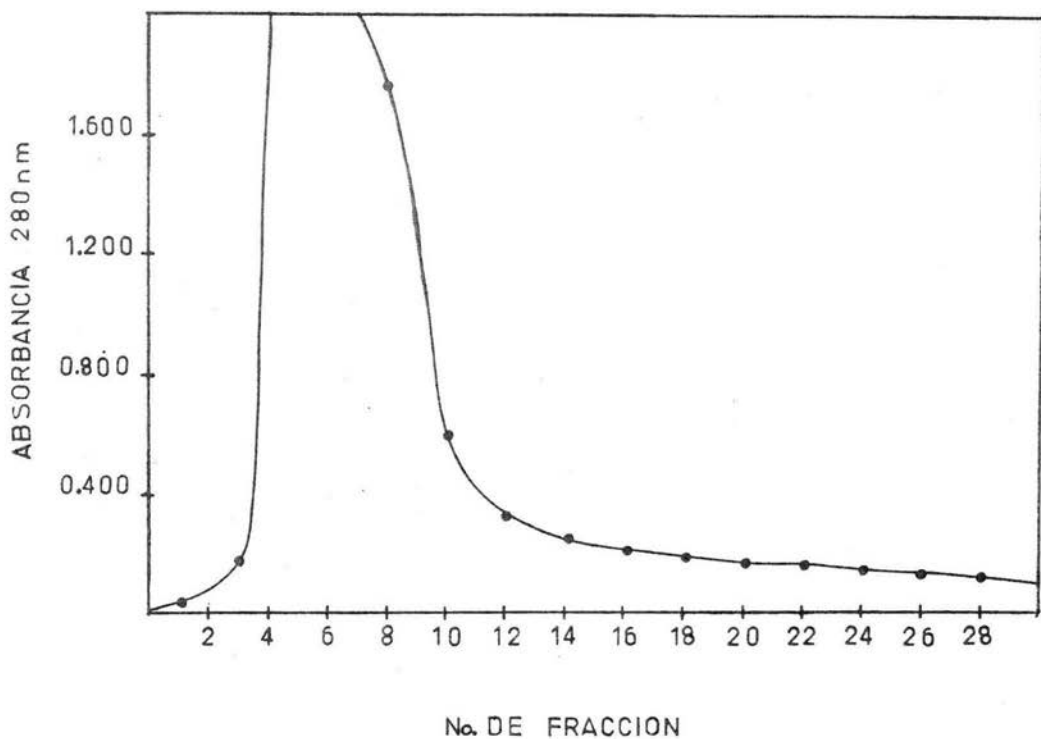
Figura 5.- Doble inmunoelectroforesis, en la que se observan dos zonas de precipitación, una para el BSA y la otra para el BSA-O. Esta es una demostración de la presencia de diferentes anticuerpos en el antisuero.

puente se etilendiamina, pero no la ouabaina puesto que - esta no pudo ser detectada en el sephadex-etilendiamina. - Por esta razón se continuó por una vía alterna, que consistió en la síntesis de un inmunoabsorbente para BSA.

Wilson y Nakane (61) reportaron la unión de 0.84 mg. - de BSA por mililitro de sephadex G-50, determinado por el método de fluorescamina. En nuestro caso se utilizó sephadex G-75 (también recomendado por Wilson y Nakane), obteniendo buenos resultados en la unión de la proteína al soporte, ya que este da positivo para la reacción de Sanger, aún cuando este fue lavado repetidas veces con varios volúmenes de -- urea 3 M, los últimos sobrenadante al ser leídos a 280 nm demostraron que en ellos no existía proteína. Los anteriores resultados muestran que la proteína se encuentra unida al gel, no siendo alterada esta unión por la urea, dado que esta solo es un agente desnaturizante más no rompe enlaces fuertes como los covalentes o peptídicos.

La reacción de Sanger no resultó ser positiva para sephadex, sephadex-oxidado y sephadex reducido, bajo las mismas condiciones que el sephadex-BSA.

La concentración de la IgG purificada por DEAE celulosa (gráfica 4), fue de 6.5 mg. por mililitro de antisuero. - Esta IgG fue concentrada hasta obtener 30 mg. ml⁻¹, de los cuales fueron usados por el inmunoabsorbente 500 μ l., obteniendo dos picos de absorción (gráfica 5) uno por cada amor



Gráfica 4 .- Purificación de IgG a partir de antisuero contra BSA-O, mediante una columna de DEAE-celulosa, usando como eluyente un amortiguador de fosfatos 0.07 M, pH 6.3, Pprevio a este paso, se realizó una purificación parcial por precipitación con sulfato de sodio.

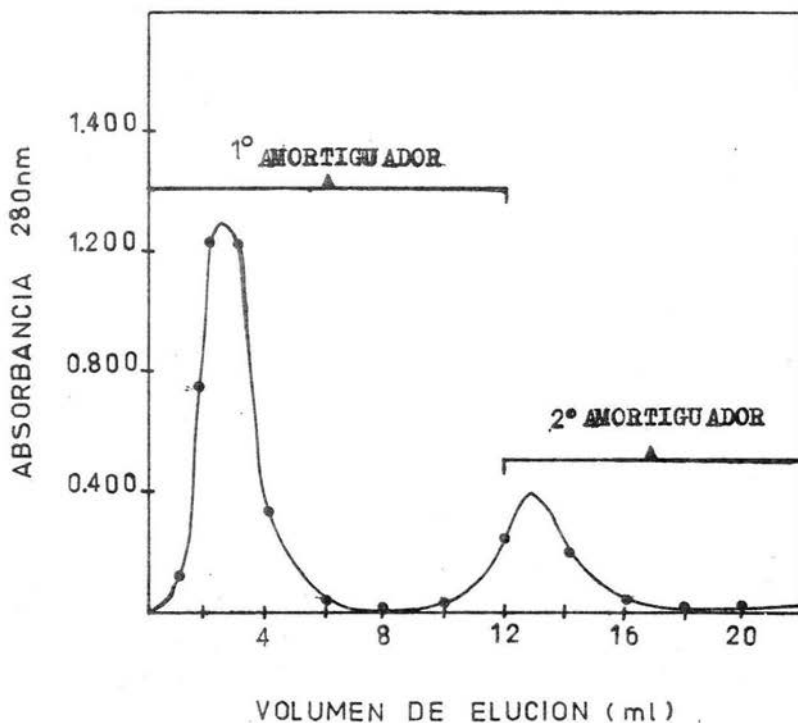
tiguador, siendo para nosotros más importante el primer pico. La IgG de este primer pico fue eluida con PBS, y solo es capaz de reconocer al BSA-O por doble inmunodifusión (figura 6), no reconociendo al BSA. Mientras tanto los anticuerpos retenidos por el inmunoabsorbente fueron eluidos con el amortiguador de glicina-HCl y son capaces de reconocer tanto al BSA como al BSA-O (figura 7). Para el primer pico se obtuvieron 5.7 mg. ml^{-1} de anticuerpos y 1.8 mg. ml^{-1} para el segundo pico.

Los anteriores resultados son una demostración de la presencia de diferentes anticuerpos en el antisuero.

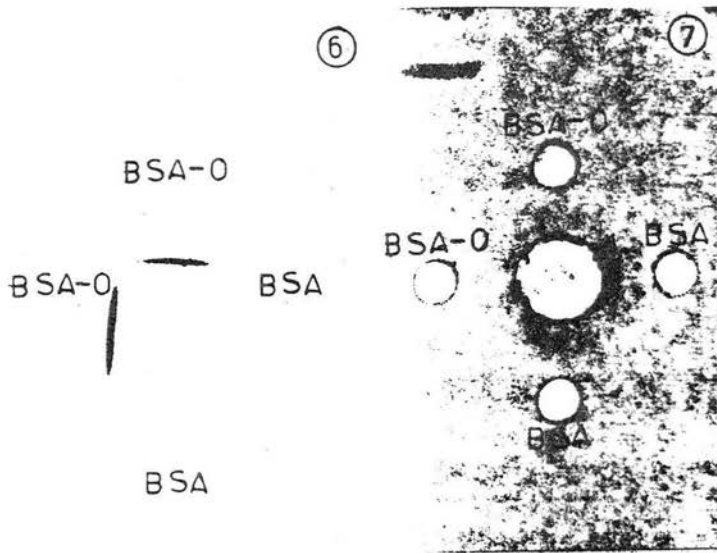
El inmunoabsorbente fue utilizado cinco veces obteniendo los mismos resultados, sin notar ningún cambio en sus propiedades.

C.- ESPECIFICIDAD DE ANTICUERPOS

Voller y Col. (63) han dividido la técnica de ELISA en dos tipos, directos e indirectos. La primera consiste en unir directamente el anticuerpo al tubo de poliestireno, adicionando al antígeno, estos luego son evidenciados mediante un segundo anticuerpo marcado con peroxidasa o fosfatasa alcalina. El ELISA indirecto consiste en unir al antígeno al tubo de poliestireno, adicionando enseguida al anticuerpo contra el antígeno y haciendo evidente este complejo mediante un segundo anticuerpo marcado con peroxidasa o fosfatasa alcalina, y que esta dirigido contra el primer anticuerpo.



Gráfica 5.- Purificación de anticuerpos específicos contra BSA-O y BSA, mediante un inmunoabsorbente, sephadex-BSA. Se usó como primer amortiguador ó eluente PBS 0.1 M, pH 7.2 y como segundo amortiguador Glicina-HCl 0.1 M, pH 2.5.

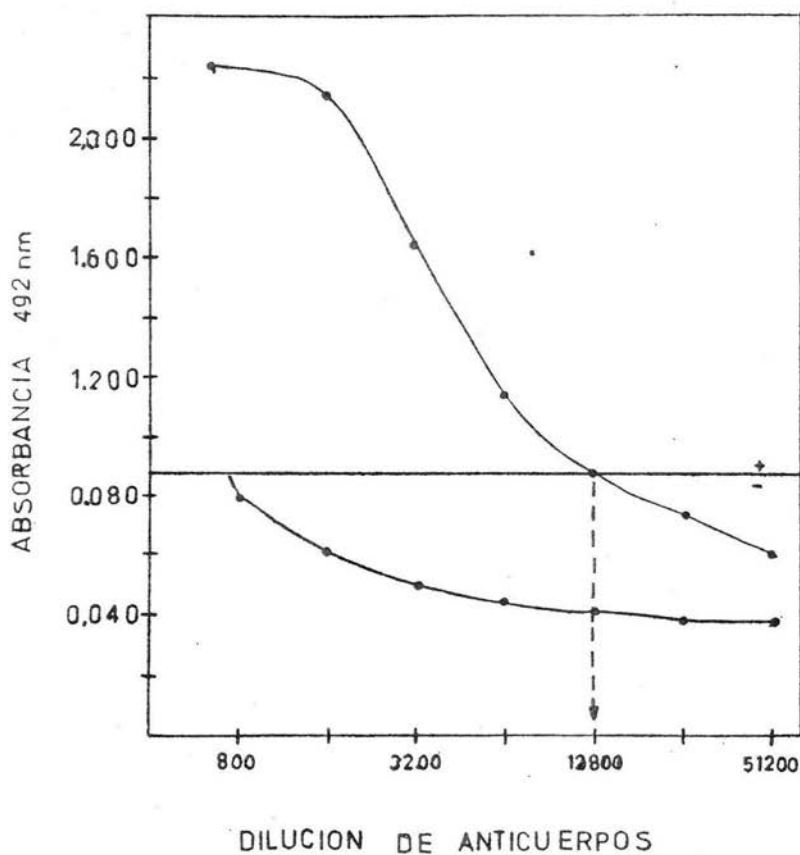


Figuras 6 y 7 .- Doble inmunodifusión. Esta nos demuestra la especificidad de los anticuerpos purificados mediante el inmunoadsorbente. En la figura 6 fueron probados los anticuerpos eluidos con PBS y que solo reconocen al BSA-O. En la figura 7 se probaron los anticuerpos eluidos con glicina-HCl y que reconocen tanto al BSA como al BSA-O .

El mismo Voller indica que una forma de titular un suero por ELISA indirecto es por el método de punto terminal -- (zona de equilibrio entre el Ag y Ab), en el cual una serie de diluciones son probadas, llevando paralelamente pruebas de falso negativo, para determinar que la reacción observada es consecuencia de la interacción entre el Ab y el Ag y no inespecífica. Por otro lado pruebas de falso positivo son tomadas en cuenta para determinar el título, ya que la dilución que de un valor de absorbancia, mayor pero cercano al valor más alto de las pruebas de falso positivo, ese será el título del suero.

Con el fin de determinar si los anticuerpos contra BSA-O son capaces de reconocer a la ouabaina libre, llevamos a cabo la prueba de ELISA indirecto. En primer lugar se determinó la dilución a la cual los anticuerpos reconocen adecuadamente al BSA-O absorbido en el tubo, esto mediante la determinación del punto terminal. En este caso no podemos hablar de un título como tal por no tratarse de un antisuero, sino de anticuerpos purificados, aunque la técnica cumple -- con los objetivos deseados, al indicarnos la zona de equilibrio.

La gráfica 6 nos muestra que la dilución en donde se encuentra el punto terminal (zona de equilibrio), dilución 1:12, 800 y que corresponde a $4.5 \mu\text{g. ml}^{-1}$ del anticuerpo, dilución que usamos para determinar si los anticuerpos reconocen a la ouabaina.



Gráfica 6.- Determinación de la zona de equilibrio de los anticuerpos contra BSA-O, mediante el método de ELISA indirecto. La zona de equilibrio fue obtenida en la dilución de 1:12,800 ($4.5 \mu\text{g ml}^{-1}$).

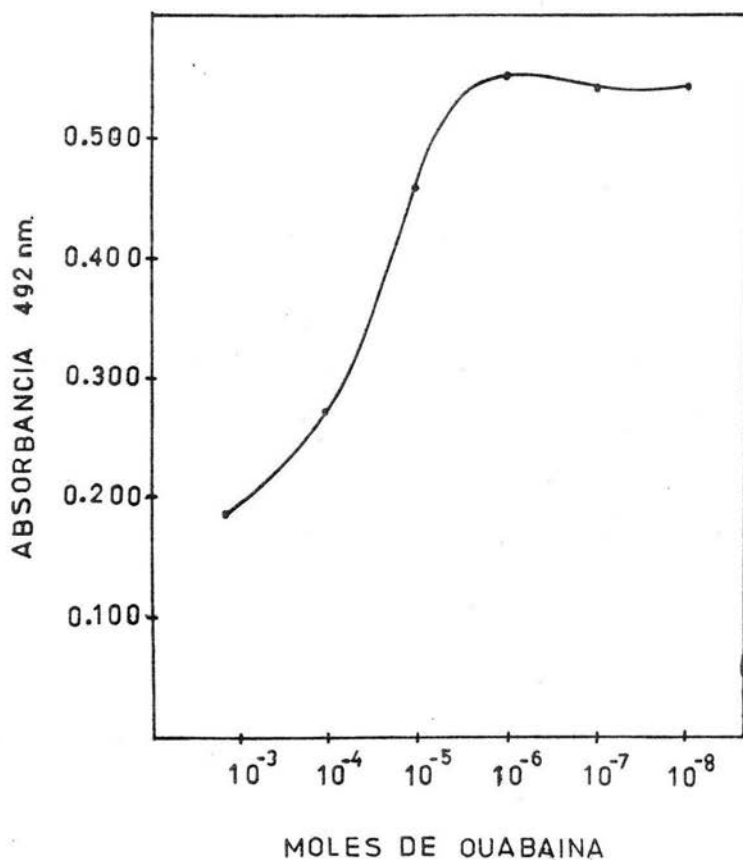
La gráfica 7 nos muestra una inhibición por hapteno, es decir que el hapteno, en este caso la ouabaina, al ser adicionado previamente a los anticuerpos contra BSA-O, es reconocida quedando los anticuerpos impedidos para reconocer al BSA-O unido al tubo. Como vemos la curva de la gráfica 7 es de tipo sigmoide, que muestra la máxima inhibición a una concentración de $10^{-3}M$ de ouabaina y la menor a $10^{-6}M$ del hapteno. Estos resultados demuestran que los anticuerpos purificados reconocen específicamente a la ouabaina libre, así como a la unida al BSA.

III.- Localización de la (Na-K)ATPasa.

A).- TECNICA DE GUTH Y ALBERS

Esta técnica se realizó con el fin de compararla con el método propuesto por nosotros.

Se puede decir que las estructuras teñidas son varias:- Para cerebelo y médula espinal la tinción principalmente es sobre neurofibrillas (figura 7 y 8) sitio donde existe - - - (Na-K)ATPasa. También en el cerebelo y médula espinal se tiñeron núcleos, al parecer de células no neuronales que bien podrían ser células gliales, esta tinción fue intensa, considerándose como inespecífica dado que en los núcleos no existe (Na-K)ATPasa. Además la inhibición de la actividad de la bomba por $10^{-3}M$ de ouabaina, provocaron casi la total desaparición de la tinción en las neurofibrillas, pero no de los -



Gráfica 7.- Demostración de la especificidad de los anticuerpos contra ouabaina mediante inhibición por hapteno llevado a cabo por el método de ELISA indirecto. Se obtuvo la máxima inhibición en la concentración de 10^{-3} M de ouabaina.

núcleos (figuras 8, 9). Un resultado interesante se da en la región del vermis del cerebelo, donde solo son teñidos núcleos a pesar de no encontrarse inhibida la actividad de la bomba de sodio-potasio (figura 10).

Tal vez la tinción inespecífica sea consecuencia de la actividad de otras enzimas como la fosfatasa alcalina o la Ca-ATPasa , así como a la difusión de los productos de esta actividad.

En riñón las estructuras visibles son: glomérulos, tubulillos contorneados y vasos sanguíneos, así como una gran cantidad de núcleos. La tinción tiende a ser más fuerte en la zona del córtex y médula externa, mientras que en la médula interna la tinción es pobre (figura 11, 12).

Cuando se usó el BSA-O para inhibir la reacción de Guth-Albers en el cerebelo, se obtuvieron resultados semejantes a los del a ouabaina, es decir una disminución de la tinción de fibras, probando que el BSA-O es capaz de reconocer a la $(\text{Na-K})\text{ATPasa}$ en cortes de tejido.

Un resultado extraño es que la reacción de Guth-Albers no se da en el encéfalo de rata a pesar de existir una gran cantidad de $(\text{Na-K})\text{ATPasa}$ en este tejido, además, en la bibliografía solo se ha reportado la actividad de la enzima en capilares del endotelio de la corteza cerebral.

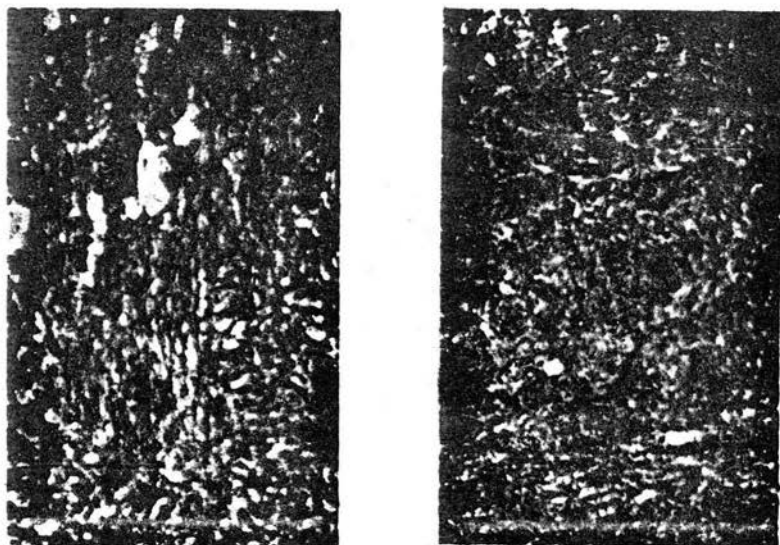


Figura 3.- Microfotografía de médula espinal, realizada según el método de Guth-Albers. (A) Aquí observemos fibras nerviosas (FN) y núcleos (N). (B) Médula espinal donde se adicionaron $10^{-3}M$ de ouabaina, observando solo la tinción de núcleos, pero no de fibras nerviosas. (160X).

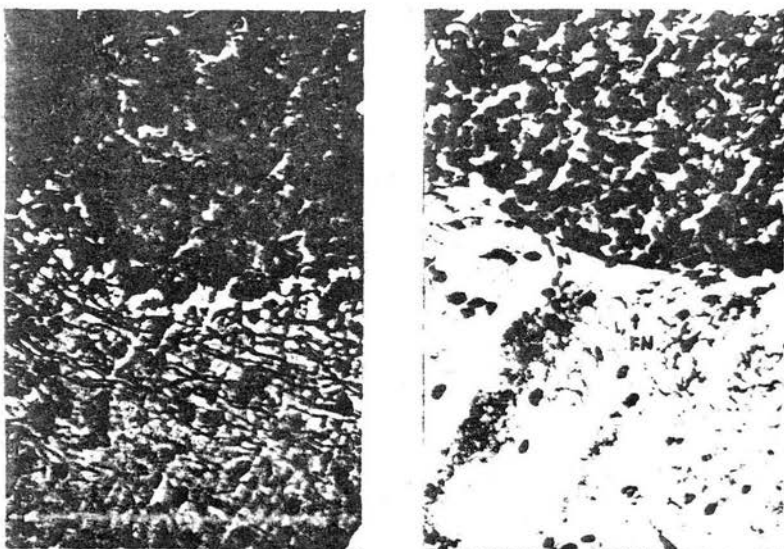


Figura 9.- Microfotografía de la histoquímica realizada en cerebelo mediante la técnica de Guth-Albers. (A) Fibras nerviosas (FN) y núcleos (N). Cerebelo donde se adicionó $10^{-3}M$ de ouabaina, donde se observó la tinción de núcleos y una baja actividad de fibras nerviosas (FN). (400X).

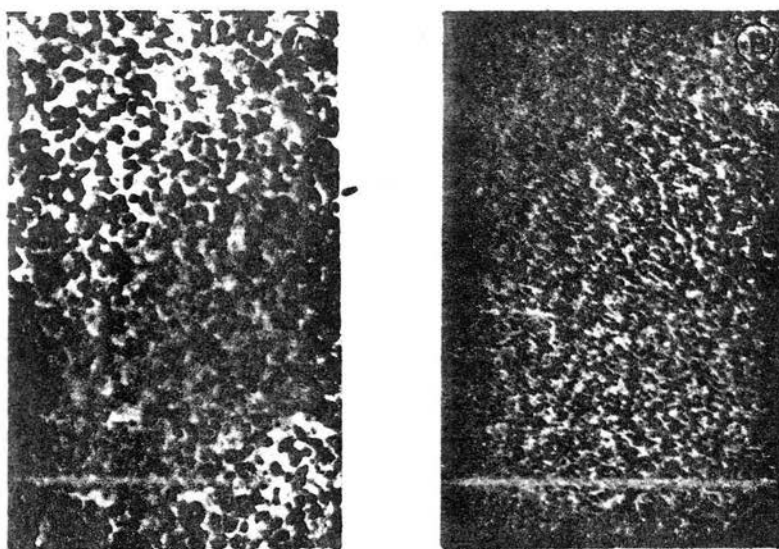


Figura 10.- (A) Núcleos de la región de la zona granulosa del cerebelo. Aquí se adicionaron $10^{-3}M$ de ouabaina, la actividad observada no es debida a la $(Na-K)ATPasa$. (B) Núcleos de la región de la vermis del cerebelo, en este caso no se adicionó ouabaina. (A= 400X, B= 160X).

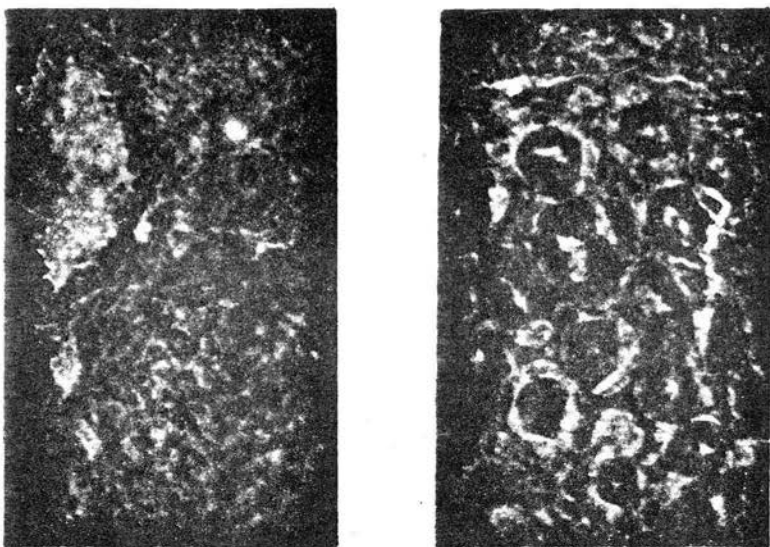


Figura 11.- Histoquímica de la (Na-K)ATPasa de riñón, según el método de Guth-Albers. (A) Glomerulo junto a un vaso sanguíneo. (B) Túbulos contorneados. En ambos casos observamos una gran cantidad de núcleos (400X).

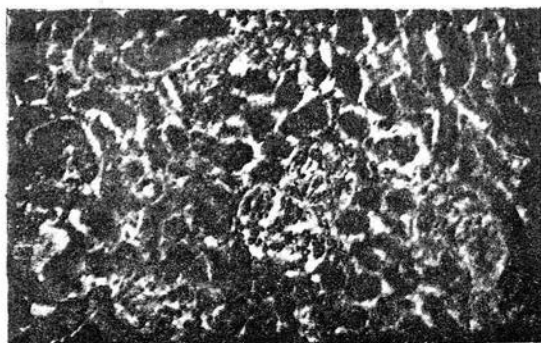


Figura 12.- Glomerulos renales teñidos mediante la técnica de Guth-Albers. (160X).

B).- LOCALIZACION DE LA (Na-K)ATPasa, CON ANTICUERPOS
CONTRA OUBAINA.

Al recubrir los tejidos con el sustrato para la peroxidasa, encontramos que solo la piel de rana presentó reacción positiva para peroxidasa endógena, por lo que tuvo que ser previamente bloqueada la actividad de esta enzima, con el fin de no confundirla con la peroxidasa conjugada con el segundo anticuerpo.

Se ha visto que para que la (Na-K)ATPasa tenga un buen funcionamiento, requiere principalmente de Na^+ , K^+ , Mg^{++} y ATP, dependiendo de estos elementos las diferentes formas que toma la bomba de sodio-potasio durante su actividad. Una de estas formas y que es de gran importancia es la denominada $\text{E}_1\text{-P}$, que se forma en presencia de Mg, Na. y ATP, siendo esta una forma fosforilada y con la cual interactúan los glucósidos cardiacos (74). Por otro lado la tasa de unión de la ouabaina se ve incrementada por el sodio, mientras que el potasio la hace disminuir, bajo condiciones fisiológicas (7). Teniendo en cuenta las anteriores condiciones para el enlace de la ouabaina a la (Na-K)ATPasa, se usaron medios de incubación que contenían sodio a concentraciones isotónicas, pero bajas concentraciones de potasio, como es el medio de Minsky y Col. (20) o el ringer de mamíferos. Por otro lado también se usó el medio de Guth Albers, aunque en este caso las condiciones son diferentes, dado que la actividad es dependiente de potasio. Tanto en el medio de Minsky, así como en el de Guth-Albers, la unión de ouabaina a la --

(Na-K)ATPasa fue demostrada por ellos, ya sea por el uso de ouabaina (^3H) o por la inhibición de los fenómenos observados por otros anteriores.

Después de realizar el protocolo para localizar a la enzima, pudimos observar que los tejidos no se tiñieron por la acción de la peroxidasa del segundo anticuerpo. El anterior resultado nos indicó que los anticuerpos fueron incapaces de unirse al complejo (Na-K)ATPasa-Ouabaina, ya sea por que la ouabaina quedó oculta por la enzima, o por que el complejo no se formó, eliminándose la ouabaina en alguno de los lavados a los que es sometido el tejido. Similares resultados fueron obtenidos con el BSA-O, en cualquiera de los medios de incubación. Pensamos que la unión del BSA-O a la bomba de sodio-potasio es inestable disociándose fácilmente.

Ya sea por que la ouabaina se encuentre enmascarada por la enzima o por que esta se disocie fácilmente, como también podría ser con el BSA-O, los resultados sugieren que el tejido incubado con la ouabaina y el BSA-O, debe ser tratado de diferente forma, con el fin de evitar lo sucedido. Así se procedió en primer lugar a tratar al tejido -- después de incubado, con tritón X 100, detergente no iónico-capaz de solubilizar parcialmente a la membrana celular, de senmascarando antígenos ocultos. Los resultados obtenidos con el detergente no fueron alentadores dado que tanto los cortes incubados con ouabaina como con BSA-O y los cortes testigo (que no contenían ouabaina o BSA-O) fueron teñidos-

por acción de la peroxidasa unida al segundo anticuerpo, conociéndose esto como una prueba de falso positivo en la que los anticuerpos reaccionan con el tejido inespecíficamente.

Otro procedimiento diferente fue el de fijar el tejido con para-formaldehído, después de haber sido incubado con la ouabaina o el BSA-O. Esto se realizó con el fin de fijar al sitio donde están enlazados la ouabaina y el BSA-O, pues como sabemos fijadores como el p-formaldehído o glutaraldehído, forman puentes de entrecruzamiento entre las moléculas. Desafortunadamente, con el uso de p-formaldehído también obtuvimos resultados semejantes a los del tritón X 100, tinción inespecífica, tanto en cortes tratados con ouabaina y BSA-O como con los testigos.

En ambos tratamientos. Tritón X.100 o p-formaldehído, la tinción obtenida es inespecífica debido a la alteración del tejido por los agentes usados. Tejidos a los que enlazan los anticuerpos por la existencia de cargas eléctricas, más que por afinidad del anticuerpo por el Ag., a pesar de encontrarse el tejido recubierto con suero normal de cabra. Tampoco pudo diferenciarse la existencia de tinción producida como consecuencia de la unión de los anticuerpos al antígeno no encontrando alguna estructura definida en los tejidos.

D I S C U S I O N

La oxidación de azúcares para la formación de aldehí-- dos mediante agentes como el ácido o el meta-periodato de - sodio, fueron usados por primera vez para la unión de un - hapteno a una proteína acarreadora por Erlanger y Col., (46) y por Estrada y Col. (47). Ellos utilizaron como haptenos- nucleótidos y nucleócidos (AMP, UMP, guanosina, citidina y y adenosina), oxidando el azúcar y enseguida uniéndolos a - proteínas como el BSA y HSA, a pH alcalino, estabilizando - el conjugado mediante reducción obteniendo buenos resulta-- dos en la unión. Años más tarde Smith (48, 49, 50) siguien do una metodología semejante sintetizó una serie de conjuga dos, en los que los haptenos fueron glucósidos cardiacos co mo la ouabaina y al digoxina, uniéndolos a proteínas como - el BSA y HSA. El mismo Smith (50) con el fin de aumentar la cantidad de ouabaina unida al acarreador produjo conjugados en los que en primer lugar unió puentes como el N-carboxil, D, L-alanina o el succinil, 3, 3 -diaminodipropil amina, a proteínas como el BSA y HSA. El hapteno fue unido por el - puente al acarreador. Estos conjugados fueron sintetizados con el fin de obtener anticuerpos contra glucósidos cardia- cos, usando estos anticuerpos con fines farmacológicos.

Smith y Col., encontraron que la cantidad de residuos- de hapteno unidos a cualquiera de los acarreadores usados - fue de 17 para la digoxina y 4-5 para la ouabaina. Ellos - usaron el método de Brown y Writh (53) para caracterizar - sus conjugados, aunque en ningún caso reportan los espec --

tros de absorción ni los coeficientes de extinción molar de los haptenos y conjugados, los que tienen mucha importancia en la caracterización del conjugado, puesto que como indica Erlanger y Col., (54) es necesario realizar varias pruebas que demuestren la presencia del hapteno unido a la proteína acarreadora, así como los cambios sufridos por esta última. Estas pruebas pueden ser de tipo espectrofotométricas, determinación del peso molecular del conjugado o mediante la determinación de aminas libres por agentes como el 2, 4-dinitrofluorobenceno.

En nuestro caso el conjugado sintetizado por nosotros presentó un rendimiento de 13-15 moles de ouabaina por mole de BSA, habiendo sido caracterizado espectrofotométricamente por el método de Brown y Writh (53), así mismo se determinó el peso molecular del conjugado por electrofóresis. Es tos resultados nos demostraron que la unión de la ouabaina al BSA fue en una proporción bastante aceptable como para la realización de ensayos inmunológicos y de inhibición del transporte.

Por otro lado como vimos se obtuvo una mayor cantidad de residuos de ouabaina unidos al BSA, que los obtenidos por Smith a pesar de haber seguido la misma metodología, ungración concreta para este resultado no la tenemos. La única diferencia encontrada, es que Smith después de la reducción del conjugado, acidificó a este con ácido fórmico durante una hora, basificándolo después con hidróxido de sodio. El paso anterior no fue llevado a cabo por nosotros, sino directamente dializamos después de la reducción. Smith

no explica la razón de la acidificación, tal vez durante este paso la ouabaina sea susceptible a disociarse, manteniéndose solo una pequeña parte unida al acarreador. Esta misma acidificación podría provocar la hidrólisis del conjugado.

Smith también reportó que la purificación de sus conjugados no es buena, dado que encuentra entre un 0.1 a un 1.0 % de ouabaina no unida como contaminante, dado que tanto por CPF y electrofóresis detectó ouabaina libre y péptidos de bajo peso molecular, a pesar de haber sido purificados los conjugados por diálisis y cromatografía en columna de sephadex G-75. Smith indicó que la contaminación puede deberse a la presencia de una proteasa que hidrolise al conjugado y la cual no puede ser inactivada por inhibidores específicos para proteasas. Otra razón aludida es la acción del agente reductor (Na BH_4).

Pensamos que la hidrólisis no es consecuencia de una proteasa, sino por un lado del tratamiento con ácido fórmico, como ya mencionamos. Por otro lado la purificación mediante la cromatografía en columna de sephadex G-75 no es adecuada, dado que esta no retienen fácilmente moléculas menores de 3,000 de peso molecular y la ouabaina posee un peso molecular de 728.8. Por lo que para la purificación de nuestro conjugado se sustituyó al sephadex G-75 por un sephadex G-15 que puede retener moléculas de hasta , 5000 de peso molecular. Tal vez por estas razones no detectamos hidrólisis ni ouabaina libre. Podríamos pensar que nuestro -

método de detectar ouabaina libre es pobre, pero este posee una resolución de ouabaina de $0.25 \mu\text{g cm}^{-2}$, que nos dá una buena confiabilidad.

La principal razón de obtener un conjugado libre de ouabaina, es probar su capacidad de inhibición del transporte, así Smith (50) probó la capacidad de inhibición de su conjugado, midiendo los cambios en la tensión de los músculos papilar y cardíaco, así como la inhibición del transporte de Rb^{86} en eritrocitos. En el primer caso obtuvo un máximo del 4.0% de cambios en la tensión muscular, mientras que en el transporte de Rb^{86} no hubo ningún cambio al usar concentraciones semejantes de ouabaina y conjugado. El mismo investigador indica que el conjugado puede alcanzar los mismos efectos que la ouabaina sobre el transporte, pero a concentraciones 1000 veces mayores, o hidrolizando al conjugado. Los anteriores resultados son obtenidos para todos los conjugados sintetizados por Smith, con excepción de los que presentan el puente de succinil, 3.3'-diaminodipropilamina, el que puede inhibir el transporte a una concentración 100-veces mayor que la ouabaina.

El conjugado sintetizado por nosotros presentó ciertas ventajas sobre los de Smith, puesto que puede inhibir hasta un 88.3% el transporte de sodio a través de la piel de rana, aunque este efecto solo se alcanza a concentraciones 100 veces mayores que la ouabaina, pero sin la necesidad de estar unida al acarreador por un puente. La razón de esta ventaja nos es desconocida pero bien podría deberse a que el ani

llo esteroide de la ouabaina, involucrado directamente en la inhibición de la $(Na-K)ATPasa$, queda lo suficientemente expuesto como para enlazarse a la $(Na-K)ATPasa$, aunque al parecer esta unión no es lo suficientemente fuerte, como veremos más adelante.

El BSA-O resultó ser un buen inmunógeno ya que se pueden obtener anticuerpos contra el. Estos anticuerpos se pudieron aislar dos tipos, unos dirigidos contra los determinantes antigénicos del BSA y otros contra los determinantes antigénicos de la ouabaina. Estos últimos resultan ser específicos contra ella dado que son capaces de reconocer a la ouabaina libre y unida al BSA, pero no reconocen al BSA. Por lo visto la ouabaina no es enmascarada por el BSA al unirse a ella, aunque Martínez y Col., (67). obtuvieron anticuerpos contra ouabaina siguiendo el método de Smith, encontraron que estos solo son capaces de reconocer al BSA-O y la ouabaina, anticuerpos que no fueron purificados de ninguna forma, estos anticuerpos no reconocieron al BSA, resultado extraño y solo posible si la ouabaina enmascara a los determinantes antigénicos del BSA, lo que depende de la cantidad de residuos unidos al acarreador, dato que no es reportado por ellos.

Los anticuerpos producidos contra la ouabaina parecen reconocer al anillo esteroide del glucósido, dado que esta es la región que queda expuesta en el conjugado, por lo que se podría esperar que los anticuerpos reconozcan a otros esteroides. Smith (49) al respecto indica que los anticuer-

pos obtenidos por el son capaces de reconocer a derivados de la ouabaina como la acetilestrofantidina, cuando esta se encuentra en exceso. También reconoce a la digoxina a concentraciones 50 veces mayores que la ouabaina y a esteroides - como el estradiol, progesterona, testosterona, colesterol y dehidroepiandrosterona, en concentraciones 1000 veces mayores. Como vemos estos anticuerpos son bastante específicos, ya que con excepción de la acetilestrofantidina, tanto -- otros digitálicos como esteroides son difícilmente reconocidos.

Podemos pensar que los anticuerpos obtenidos por nosotros presentan características semejantes a los obtenidos por Smith aunque tendrían que realizarse las pruebas pertinentes. Cabe mencionar que el marcaje de los anticuerpos con isotiocianato de fluoresceína provocó que estos perdieran su actividad de reconocer al BSA-O. Esto es raro - que suceda, aunque sí algunos grupos amina están relacionados con la región de enlace del anticuerpo con el antígeno (Fab), la fluoresceína puede unirse bloqueando la actividad del anticuerpo.

II.- Localización de la (Na-K)ATPasa.

Los resultados indican que el método de Guth-Albers no es totalmente específico para determinar la actividad de la (Na-K)ATPasa en tejidos, puesto que como observamos en los resultados, esta no es la única enzima que se evidencia en los tejidos ya que además de las estructuras que presentan-

a la (Na-K)ATPasa, encontramos otras en las que la enzima - no existe como son los núcleos y que se tiñieron a pesar de estar inhibida la enzima con ouabaina.

La tinción de estructuras donde no se localiza a la - bomba de sodio-potasio puede considerarse como inespecífica. Mayahara (28) y Firth (41) mencionan que bajo las condiciones de pH básico y utilizando como sustrato al para-nitrofenil fosfato, la tinción inespecífica puede deberse a la hidrólisis no enzimática del ATP, a la difusión de los productos de la actividad enzimática, así como a la actividad -- p-NPPasa de enzimas diferentes a la (Na-K)ATPasa, como pueden ser la fosfatasa alcalina. La primera opción es fácil de descartar ya que en este caso no se usa como sustrato - ATP, aunque el ATP propio de las **oélulas** puede ser hidrolizado por las enzimas de la célula o por metales pesados como el Pb. La difusión de los productos de la actividad enzimática puede darse si estos productos son solubles en el medio de incubación, pero el CoPi no es soluble en el medio usado especialmente por la presencia del DMSO, por lo que - si existe difusión esta debe ser pobre. Por último la actividad p-NPPasa de otras enzimas diferentes a la (Na-K)ATPasa puede ser la más viable dado que la fosfatasa alcalina presenta tal actividad y que además se ve favorecida a pH alcalino el que resulta subóptimo para la (Na-K)ATPasa. La fosfatasa alcalina ha sido encontrada en vasos sanguíneos, riñón y otras células por lo que podemos pensar que la actividad p-NPPasa inespecífica encontrada es consecuencia de esta enzima, por otro lado solo existe otra enzima capaz de -

utilizar al p-npp como sustrato y es la bomba de calcio magnesio.

En cuanto a la localización de la bomba de sodio-potasio mediante anticuerpos contra ouabaina, parece ser que al tratar de localizar al complejo $(Na-K)ATPasa-Ouabaina$, los anticuerpos no pueden reaccionar con el complejo por dos razones: 1) Garrilli y Col., (51, 70) utilizando antioil-ouabaina, derivado de la ouabaina que al enlazarse a la $(Na-K)ATPasa$ puede ser detectada por fotoafinidad, encontraron que el sitio de unión de la ouabaina a la enzima se localiza en la porción de la enzima que se encuentra en lado externo de la membrana celular. Así como se sabe que la ouabaina se une a la bomba de sodio-potasio por su anillo esteroide, por lo que a pesar de encontrarse la ouabaina en la superficie externa de la membrana celular, posiblemente se encuentre enmascarada por la enzima. 2) A pesar de que la ouabaina se une a la bomba de sodio-potasio por uniones polares fuertes, esta puede disociarse, manteniéndose enlazada por un tiempo medio, que según Tobin (71) va desde 9 horas a $0^{\circ}C$ hasta 3 minutos a $37^{\circ}C$, aumentando la tasa de disociación exponencialmente con el aumento de la temperatura. Aunque Schwartz y Col., (73) indican que la unión puede tener una vida media de 9 horas a $30^{\circ}C$. Tal vez la ouabaina-enlazada a la enzima durante la incubación se disocia y es lavada del tejido, siendo imposible para los anticuerpos reaccionar con ella.

De los dos puntos anteriores nosotros consideramos al primero como la más posible consecuencia de que los anticuer

pos no reaccionen con la ouabaina unida a la bomba de sodio-potasio ya que esta unión es muy factible bajo nuestras -- condiciones de trabajo. Por otro lado el que la ouabaina -- sea reconocida por los anticuerpos por su anillo esteroide -- y no a toda la molécula, por lo que aunque quede alguna -- parte de la molécula expuesta los anticuerpos no la recono -- cen.

El BSA-O fue una buena posibilidad para localizar a la enzima, dada su capacidad de inhibir el transporte en piel de rana y de la reacción de Guth-Albers. Por estas razones -- podemos concluir que la ouabaina unida al BSA no pierde su capacidad de inhibir a la (Na-K)ATPasa, aunque posiblemente enlazándose a ella de una forma muy inestable, disociándose fácilmente.

Suponiendo que la ouabaina quede enmascarada o se disocie el problema trató de ser resuelto fijando al tejido después de la incubación o tratándolo con Tritón K 100. Los -- resultados demostraron, en ambos casos, que estos agentes -- producen cambios en el tejido que dan lugar a una reacción -- cruzada, en la que los anticuerpos se unen a otros antígenos, como pueden ser proteínas del tipo de la colagena, -- siendo esta unión no específica.

Como vemos no fue posible localizar el complejo (Na-K) ATPasa-Ouabaina mediante anticuerpos. Aunque como también -- se vió moléculas como el antroil-ouabaina son capaces de enlazarse a la bomba de sodio-potasio, o moléculas como el --

BSA-O también pueden unirse a la enzima, pudiendo ser aprovechado este hecho para localizar a la enzima mediante otros derivados de la ouabaina, que además de enlazarse en forma estable a la enzima mantengan sitios lo suficientemente expuestos como para unirse a anticuerpos específicos.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Kyte, J. (1971). Purification of the sodium y potassium - dependent adenosine triphosphatase, from canine renal me - dulla. J. Biol. Chem. 246:4157.
- 2.- Lane, L.K., J.H. Copenhaver., G.E. Lindermayer. y A. Schwartz. (1973). Purification and characterization of (³H)oua bain binding to the transpor adenosine triphosphatasa, from outer medular canine kidney. J. Biol. Chem. 248:7197.
- 3.- Jorgensen P.L. (1974). Purification and characterization of (Na-K)ATPase. III. Purification from outer medullar of mammilian kidney after selective removal of membrane components by sodium duodecylsulphate. Bioph. Biochem. Acta. 356:36.
- 4.- Jorgensen P.L. (1974) Purification and characterization of (Na-K)ATPase IV. Estimation of the purity of the mole - cular weight and polipentyde content by enzyme unit in preparation from the outer medullar of rabbit kidney. Bioph. Biochem. Acta. 567:436.
- 5.- Skou, J.C. y M. Esmann. (1974). Preparation of membrane-bound and of solubilized (Na-K)ATPase from rectal glands of Squalus acanthias. The effect of preparative procedure on purity, specific and medular activity. Bioph. Biochem. Acta. 567:436.
- 6.- Dixon. J.F. y L.E. Hokin (1974). Studies on the characte rization of the sodium-potassium transport adenosine tri - phosphatase. Purification and propierties of the enzyme -

from the electric organ. Arch. Biochem. Biophys. 163:

- 7.- Dahl. L.J. y L.E. Hokin. (1974). The sodium-potassium adenosine triphosphatase. Ann. Rev. Biochem. 42:327.
- 8.- Maunsbach. A.B., E. Skriver. y P. L. Jorgensen. Ultraestructura of purified (Na-K)ATPase membranes. En (Na-K)ATPase structure and kinetic. Editado por J.C Skou y S.G. Nørby. Edt. Accademic Press (1979) Londres: 3-13.
- 9.- Skriver. E., B.A. Maunsbach., y P.L. Jorgensen (1980) Ultraestructure of (Na-K)ATPase, transport vesicles reconstituted with purified renal (Na-K)ATPase. J. Cell. Biol. 86:746.
- 10.- Barth. L.G. y L.J. Barth (1974). Ionic regulation of embryonic induction and cell diferentiation in Rana pipiens Dev. Biol. 39:1-22.
- 11.- Menssenger E.A. y A.E. Warner. (1979). The funtion of the sodium pump during diferentiation of amphibian embryonic neurones. J. Physiol. 292:85.
- 12.- Bertoni. M.J. y G.J. Siegel (1978). Development of (Na-K)ATPase in rat cerebrum; correlation whit Na^+ -dependent phosphorylation and K-para-nitrophenylphosphorylation and K-para-nitrophenylphosphatase. J. Neurochem. 31: 1501.
- 13.- Vigne. P., C. Erelin. y M. Lazdunzky. (1982). Ontogeny of the (Na-K)ATPase, during chick skeletal myogenesis. J. Biol. Chem. 267:5380.
- 14.- Quastel. R.M. y J.G. Kaplan. (1970). Lymphocyte stimulation: the effect of ouabain on acid nucleic and protein

Falta página

N° 77

synthesis. *Exp. Cell Res.* 62:407.

- 15.- Ledbertter. S.M. y M. Lubin.(1977).Control of protein synthesis in human fibroblast by intercelular potassium. *Exp. Cell Resch.* 105:223.
- 16.- Spivak L.J., S. Misinti., R. Stuar., J. Sharkis. y L.L. Sensenbrenner.(1980). Supression and potentiation of mouse hematopiotic orogenitor cell proliferation by ouabain. *Blood.* 56:315.
- 17.- Tupper T.J., F. Zorngiotti., y S. Mills. (1977).Potassium transport and content during G_1 and S phase following serum stimulation of 3T3 cell. *J. Cell Physiol.* 91:429.
- 18.- Frantz. N.C., D.C. Nathan. y C.D. Scher.(1981).Intracellular univalent cation and regulation of the BALB - c-3T3 cell cycle. *J. Cell Biol.* 88:51.
- 19.- Nelson. L. y V.A. McGrady.(1981).Effects of ouabain on spermatozoan funtion:A review. *Arch. Andrology.* 7:169.
- 20.- Mrsny. J.R., J.E. Siiteri. y J. Meizel.(1984).Hamster sperm (Na-K)ATPase:Increased activity during capacitation in vitro and its relationship to cyclic nucleotides. *Biol. Rep.* 30:573.
- 21.- Wchtein. M. y E. Meisel.(1957). Histochemistry of hepatic phosphatase at a physiologic pH. With special reference to the demonstration of bilicanaliculi. *Am. J. Clin. Pathol.* 27:13.
- 22.- Bader. H. y A.K. Sen.(1966). Dependent phosphatase as part of the (Na-K)ATPase of cell membranes. *Bioph. Bio -*

chem. Acta. 119:116.

- 23.- Fujita. M., T. Nakao., Y. Toshima., N. Mizuno., R. Nagano
y L. Makino. (1966). Potassium-ion stimulation p-NPPase
activity occurring in a highly specific ATPase preparation
from rabbit brain. Bioph. Biochem. Acta. 17:42.
- 24.- Izumi. F., K. Nagai. y H. Yshida. (1966). Studies on
potassium dependent phosphatase. J. Biochem. (Tokyo). 60:
533.
- 25.- Ernst. S.A. (1972). Transport adenosine triphosphatase
cytochemistry II. Cytochemical localization of ouabain
sensitive potassium dependent phosphatase activity in se-
cretory epithelium of avian salt gland. J. Histochem. and
Cytochem. 22:23.
- 26.- Guth. L. y W. Albers. (1974). Histochemical demonstra-
tion of (Na- K)ATPase. J. Histochem. Cytochem. 22:320.
- 27.- Mayahara. H., K. Ogawa. y T. Ando. (1979). One-step
citrate method for the ultrachemical demonstration of
ouabain sensitive, potassium dependent phosphatase activi-
ty. Acta Histochem. Cytochem. 12:170.
- 28.- Mayahara. H., K. Fujimoto., T. Ando. y K. Ogawa. (1980)
A new one-step method for cytochemical localization of
ouabain sensitive potassium-dependent p-nitrophenylphos-
phatase activity. Histochemistry. 67:125.
- 29.- Stirling. C.E. (1967). High-resolution radioautography
of phlorizin(³H). in rings of hamster intestine. J. Cell
Biol. 35:605.
- 30.- Stirling. C.E. y J.B. Kinter. (1967). High-resolution

- radioautography of galactose(^3H) accumulation in rings of hamster intestine. *J. Cell Biol.* 35:585.
- 31.- Stirling. G.E. (1972). Radioautographic localization of pump sites in rabbit intestine. *J. Cell Biol.* 53:704.
- 32.- McCans. J.L., G.E. Lindermyer., J.R. Pitts., M.V. Ray. D.B. Rayo., V.P. Buttler. y A. Schwartz. (1975). Antigenic differences in (Na-K)ATPase preparation isolated from various organs and species. *J. Biol. Chem.* 250:7257.
- 33.- Girardet. M., Geering. K., J.M. Frantes., D. Geser., B. C. Rosier. y J.P. Kranchenbuhl. (1981). Immunochemical evidences for transmembrane orientation of both the (Na-K)ATPase subunits. *Biochem.* 20:6684.
- 34.- Michel. J.L., T.S. Wallick. y A. Schwartz. (1975). Modification of (Na-K)ATPase function by purified antibodies to the holoenzyme: Effects on enzyme activity and (^3H)ouabain. binding. *J. Biol. Chem.* 252:8476.
- 35.- Rhee. M.H. y E.L. Hokin. (1974). Inhibition of ouabain to (Na-K)ATPase by antibody againsts the catalytic subunit but not by antibody against the glycoprotein subunit. *Bioph. Biochem. Acta.* 558:108.
- 36.- Rhee. M.H. y E.L. Hokin. (1974). Inhibition of the purified sodium-potassium activated adenosine triphosphatase from the rectal gland of Squalus acanthias by antibody against the glycoprotein subunit. *Bioph. Biochem. Acta.* 63:1139.
- 37.- Jean. D.H. y W.R. Albers. (1976). Immunochemical studies on the larger polypeptides of Electrophorus elec-

- ironlax (Na-K)ATPase. *Bioph. Biochem. Acta.* 432:219.
- 38.- Kyte. J. (1979). Immunoferritin determination of the distribution of (Na-K)ATPase over plasma membranes of renal convoluted tubules I. Distal segment. *J. Cell Biol.* 68: 287.
- 39.- Kyte. J. (1976). Immunoferritin determination of the distribution of (Na-K)ATPase over the plasma membranes of renal convoluted tubules II. Proximal segment. 68:304.
- 40.- Schwartz. M., S.A. Ernst., S.J. Georges. y A.W. Bernard. (1981). Immunochemical localization of (Na-K)ATPase in goldfish optic nerve. *J. Neurochem.* 36:107.
- 41.- Firth. J.A. (1980). Reliability and specificity of membrane adenosine triphosphatase localization. *J. Histochem. Cytochem.* 28:69.
- 42.- Mayahara. H., T. Ando., T. Fujimoto. y K. Ogawa. (1983) Membranes (Na-K)ATPase (K-pNitrophenylphosphate) in epithelial cells. *J. Histochem. Cytochem.* 31: 224.
- 43.- Ernst. S.A. y J.W. Mills. (1980). Autoradiographic localization of tritiated ouabain sensitive sodium pump sites in ion transporting epithelial. *J. Histochem. Cytochem.* 28:72.
- 44.- Schwartz. A., G.E. Lindermayer., J.C. Allen. y J.L. McCans. (1974). The nature of the cardiac glycoside enzyme complex; mechains and kinetics of binding and dissociation using a high-activity heart (Na-K)ATPase. *Ann. N.Y. Acad. Sc.* 242:577.
- 45.- Schwartz. A., G.E. Lindermayer. y J.C. Allen. (1975).

The sodium-potassium adenosine triphosphatase:pharmacological, physiological and biochemical aspect. *Pharmacol. Rev.* 27:3.

- 46.- Erlanger. B.F. y S.M. Beiser.(1964). Antibodies specific for ribonucleosides and ribonucleotides, and their reaccion with DNA. *Proct. Nat. Acad. Sc.* 56:68.
- 47.- Estrada. P.S., A. Schmill. y M.R. Martinez.(1965). Reaction of adenine-specific antibodies with desnatured deoxiribonucleic acid. *Nature.* 208:1010.
- 48.- Smith. T.W., V.P. Butler. y E. Habber.(1970). Characterization of antibodies of high affinity and specificity for they digitalis glycosides, digoxin. *Biochemistry.* 9(2) 331.
- 49.- Smith. T.W. (1972). Ouabain specific antibodies. Immunochemical properties and reversal of (Na-K)ATPase inhibition. *J. Clin. Inv.* 51:1583.
- 50.- Smith. T.W., H. Wagner., J.E. Markis. y M. Mung.(1972) Studies on the localization of cardiac glycoside receptor. *J. Clin. Inv.* 51:1777.
- 51.- Ledered. E. y Ledered. M. *Cromatografia.* Edt. Ateneo. 1960. Argentina. pp:289-292.
- 52.- Carrilli. C.T., R.A. Farley., D.M. Perlmen. y L.W. Cantley.(1982). The active site structure of Na-K-stimulated ATPase. *J. Biol. Chem.* 257:5601.
- 53.- Brown. B.T. y B.S. Wright.(1960). Absortion spectra of cardiac glycosides and aglicones in sulfuric acid. *J. Ann. Pharm. Ass.* 49:777.

- 54.- Erlanger, B.F., F. Broken., S.M. Weiser. y S. Liberman (1957). 1. Preparation and characterization of conjugates of bovine serum albumin with testosterone and with cortisone. J. Biol. Chem. 228:713.
- 55.- Johnstone. A. y Thorpe. R. Immunochimistry in practice. Edt. Blackwel. S.P. 1982. Inglaterra. pp:41-47, 120-173, 202-232.
- 56.- Rachel. A. (1977). Two-dimensional, microseparation technique for proteins and peptides, combining isoelectric focusing and gel gradient electrophoresis. J. Chromatography. 123:451.
- 57.- Karlsson. G., H. Davies., J. Choman. y A. Ulla-Briggitta. (1973). LKB 2117 Multiphor I. Analytical thin layer gel electrofocussing in polyacrylamide gel. En LKB' application. Note March. 29:75.
- 58.- Williams. C.A. y Chase. W.M. (Edts). Methods in Immunology and Immunochimistry. vol III. Academic Press. (London) 1974. pp:234-364.
- 59.- Mayer. R.J. y Walker. J.H. Immunochimical methods in the biological science: enzyme and proteins. Academic Press (London) 1980. pp:134-148.
- 60.- Week. B. Crossed immunoelectrophoresis. En ; A manual of cuantitative immunoelectrophoresis. Methods and application. Editado por N.H. Axelsen., J. Kroll. y B. week. en Scand. J. Immunology. supp 1. 1973. pp:47-53.
- 61.- Wilson. S.M. y P.K. Wakane. (1976). The covalent coupling of protein to immunoadsorbent preparation.

- J. Immunol. Methods. 12:171.
- 62.- Lowry. H.O., N.S. Rosebrough., D.L. Farr. y J.R. Randal (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193:265.
- 63.- Voller. A., Bidwel. E.E. y Bortlett. A. The enzyme linked immunoabsorbent assay (ELISA). Dyanetech Laborato - ries. Inc. London U.K. 1979.
- 64.- Engvall. E. y P. Perlmann.(1971). Enzyme linked immu - noabsorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immuno - globulin G. Immunochemistry. 8: 871.
- 65.- Engvall. E., J. Karin. y P. Perlmann.(1971). Enzyme linked immunoabsorbent assay III. Quantitative assay of protein antigen, immunoglobulin G. by means of enzyme-la - bed antigen and antibody-coated tubes. Bioph. Biochem. Acta. 251:427.
- 66.- Engvall. E. y P. Perlmann.(1972). ELISA III. Quanti - tative of specific antibodies by enzyme labeled anti - immunoglobulin in antigen-coated tubes. J. Immunology. 109:129.
- 67.- Martinez. E.J., B. Samano., G. Pastelin., G. Acosta. y R.D. Martinez. (1984). Determinación de anticuerpos anti - digitalicos por el metodo de ELISA. Bioquimia . 36:1389.
- 68.- Wilson. W.E., N.I. Sivitz. y L.T. Hana.(1970). Inhibition of calf brain membrane sodium and potassium dependent adenosine triphosphatase by cardiac steroids. Molc. Pharmacol. 6:449.
- 69.- Wick. G., Daunder. S. y Herzog. F. Immunofluorescence

- M. Die Medizinische Verlagsgesellschaft. (Alemania).
1978. pp:62.
- 70.- Cantley. L.J., C.T. Carilli., R.S. Farley. y D.M. Perlman. (1982). Localization of binding sites on the (Na-K)ATPase for fluorescein-5'-isothiocyanate and ouabain. Ann. N.Y. Acad. Sc. 402:289.
- 71.- Tobin. T. y K. Sen. (1970). Stability and ligand sensitivity of (³H)ouabain binding to (Na-K)ATPase. Bioph. Biochem. Acta. 198:120.
- 72.- Albers. R.W., G.J. Koval. y G.J. Siegel. (1968). Studies on the interaction of ouabain and other cardioactive steroids with sodium-potassium activated adenosine triphosphatase. Molc. Pharmacol. 4: 324.
- 73.- Schwartz. A., K. Whitmer., G. Grupp., I. Grupp., R.J. Adams. y S.H. Lee. (1982). Mechanism of action of digitalis: is the (Na-K)ATPase the pharmacological receptor? Ann. N.Y. Acad. Sc. 402:253.
- 74.- Marroquin Rojas M.C.T. Acción de ouabaina sobre el movimiento de cloruro y efecto de este sobre la excreción de H⁺ en la piel aislada de Rana pipiens. México ENCB 1978. 52 paginas.