



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

**ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS  
PROFESIONALES ZARAGOZA**



**RETICULO SARCOPLASMICO CARDIACO,  
CONSERVACION Y EFECTO DE CATIONES  
DIVALENTES EN EL TRANSPORTE DE  $\text{Ca}^{2+}$**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO**

**PRESENTAN**

**FRANCISCO CRUZ CERRA  
ROSA LILIA HERNANDEZ FELIPE**

**1985**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.

I N D I C E

- 1).- AGRADECIMIENTOS
- 2).- INDICE
- 3).- LISTA DE ABREVIATURAS
- 4).- LISTA DE SOLUCIONES, MEDIOS Y REACTIVOS
- 5).- RESUMEN
- 6).- CONSERVACION DE RETICULO SARCOPLASMICO CARDIACO
  - 6.1).- INTRODUCCION
  - 6.2).- MATERIAL Y METODOS
  - 6.3).- RESULTADOS
  - 6.4).- DISCUSION
  - 6.5).- CONCLUSIONES
- 7).- EFECTO DE LOS CATIONES DIVALENTES DEL GRUPO II-A  
SOBRE LA ACTIVIDAD DEL RETICULO SARCOPLASMICO DE  
MUSCULO CARDIACO DE PERRO.
  - 7.1).- INTRODUCCION
  - 7.2).- MATERIAL Y METODOS
  - 7.3).- RESULTADOS
  - 7.4).- DISCUSION
  - 7.5).- CONCLUSIONES
- 8).- BIBLIOGRAFIA
  - 8.1).- CONSERVACION DE R.S.
  - 8.2).- EFECTO DE CATIONES DIVALENTES.

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

R.S.	Retículo Sarcoplásmico
DMSO	Dimetilsulfóxido
ATP-tris	Adenosina 5-trifosfato, sal de tris (hidroximetilaminometano).
bis-MSB	p-bis-(o-metilstil) benceno
PIPES	Piperazina-N,N'-bis (2-etansulfonato) disodio.
PPO	2,5-Difeniloxazol.
TCA	Acido tricloroacético.
EGTA	Acido etilen glicol-bis-(B-aminoetileter)- N,N'-tetra acético.
Arsenazo III	Acido (2,2'- (1,3-dihidroxi-3,6-bisulfo- 2,7, --naftalen)-bis(azo) dibencenarsónico.
SDS	Dodecil sulfato de sodio.
TEMED	N,N,N', N'-tetrametilendiamina.
TBA	Acio 2-tiobarbitúrico.
BME	2-Mercaptoetanol (2-hidroxietilmercaptoetanol).
NaN <sub>3</sub>	Azida de sodio.
ABS	Albúmina Sérica Bovina.
Pi	Fosfato inorgánico
I	Isotónico
H	Hipertónico (en sacarosa)
HD	Hipertónico más DMSO (10%)
D.O.	Densidad óptica
cpm	cuentas por minuto
cbp	cantidad bastante para
mA	miliAmper
rpm	revoluciones por minuto

## S O L U C I O N E S   M E D I O S   Y   R E A C T I V O S

<u>Solución de homogenización (solución "A")</u>	<u>Concentraciones</u>
NaHCO <sub>3</sub>	10 mM
NaN <sub>3</sub>	5 mM

### Solución salina isotónica

NaCl	9.0 %
------	-------

### Solución para líquido de Centelleo

MF (Mezcla de Fluor) :

PPO	100 gr.
bis-MSB	2 gr.
Tolueno	1 lt.

ACM (Mezcla de conteo para líquidos acuosos):

Mezcla MF	42 ml.
Tolueno	1 lt.
Arkopal N-100	573 ml.

### Soluciones para electroforesis

A:	Tampón de fosfatos (pH 7.2)	0.1 M
	SDS	10 %
	βME	10 %
B:	Azul de bromofenol (0.05 % en agua)	3 ul.
	Glicerina	1 gota
	βME	5 ul.
	Fofatos (0.1 M)	50 μl.

Colorante :

Azul de Coomassie	2.5 g/l.
Metanol	50 %
Acido Acético	9.2 %

Decolorante : Concentraciones

Acido Acético	7.5 %
Metanol	5.0 %

De Corrimiento :

Tampón de fosfatos (pH 7.2)	0.1 M
SDS	0.1 %

Para conservación de geles de Poliacrilamida:

Acido Acético	7.5 %
---------------	-------

Medios de Reacción

ATPasa Total :

KCl	100 mM.
PIPES	10 mM
MgCl <sub>2</sub>	5 mM
CaCl <sub>2</sub>	0.02 mM
pH	6.6

ATPasa Basal :

KCl	100 mM
PIPES	10 mM
MgCl <sub>2</sub>	5 mM
EGTA	1 mM
pH	6.6

Ligamen :

KCl	100 mM
PIPES	10 mM
MgCl <sub>2</sub>	5 mM
CaCl <sub>2</sub>	0.02mM <sup>45</sup> Ca
pH	6.6

Captación :

KCl	100 mM
PIPES	10 mM
MgCl <sub>2</sub>	5 mM

	<u>Concentraciones</u>
$K_2C_2O_4 \cdot H_2O$	5 mM
$CaCl_2$	0.05 mM
pH	6.6

**Peroxidación total de lípidos:**

Tampón de fosfatos ( $NaH_2PO_4/Na_2HPO_4$ 0.2 M, pH 7.4)	60 mM
KCl	45 mM
Ácido ascórbico *	0.4 mM
$FeSO_4$ *	0.02 mM

**Medios de conservación**

**Isotónico :**

Sacarosa	250 mM
PIPES	10 mM
$NaN_3$	5 mM
$\beta$ ME	1 mM
pH	6.6 (con KOH)

**Hipertónico con sacarosa :**

Sacarosa	1 M
PIPES	10 mM
$NaN_3$	5 mM
$\beta$ ME	1 mM
pH	6.6 (con KOH)

**Hipertónico con sacarosa y DMSO :**

Sacarosa	1 M
PIPES	10 mM
$NaN_3$	5 mM
$\beta$ ME	1 mM
DMSO	10 %
pH	6.6 (con KOH)

\* Deben ser de preparación reciente.

Medios para purificación de microsomas.

Medio de conservación "A"

Concentración

Sacarosa 0.25 M

Tris-Maleato (pH 6.8) 20.0 mM

Medio con Oxalato

KCl 80.0 mM

Tris-Malico 20.0 mM

MgCl<sub>2</sub> 10.0 mM

Oxalato con K 10.0 mM

ATP 5.0 mM

Para gradiente

KCl 0.3 M

Pirofosfato de sodio 0.05 M

Tri-HCl (pH 7.2) 0.1 M

Medios para purificación de ATPasa de (Ca<sup>++</sup>, Mg<sup>++</sup>)

De resuspensión

Sacarosa 0.25 M

Tris-HCl (pH 8.0) 10.0 mM

Medios de suspensión "D"

Sacarosa 0.66 M

Histidina 1.0 mM

Tris-HCl (pH 7.6) 50.0 mM

Reactivos para proteínas Concentraciones

"P" :		
	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (en NaOH 0.2N)	4 %
"B" :		
	CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	0.5 %
	Tartrato de sodio y potasio	1.0 %
"C" (mezcla de "P" y "B" para n tubos):		
	Reactivo "P"	n ml.
	Agua	n ml.
	Reactivo "B"	0.4 X n ml.
Estandar de proteínas :		
	ABS	1 mg/ml.

Reactivos para Fosfatos.

"FS" :		
	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	10 N
"FM" :		
	Molibdato amónico	10 %
	A 50 g. de (NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> · 4H <sub>2</sub> O, se añaden aproximadamente 400 ml. de reactivo "FS", para evitar la formación de pasta, se agita continuamente y se afora posteriormente a 500 ml. con el mismo reactivo.	
"FF" (Molibdato ferroso recientemente preparado) :		
	Reactivo "FM"	10 ml.
	Agua	70 ml.
	FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	5 g.
	Agua	cbp 100 ml.

## R E S U M E N

Se prepararon las vesículas de Retículo Sarcoplásmico R.S. cardiaco de perro y se sometieron a tres temperaturas diferentes:  $7^{\circ}\text{C} \pm 1$ ,  $-18^{\circ}\text{C} \pm 0.5$  y  $-195.8^{\circ}\text{C}$ ; suspendidos en tres tipos de medios: isotónico, hipertónico e hipertónico con DMSO.

Se siguió la actividad de la ATPasa de  $(\text{Ca}^{++}, \text{Mg}^{++})$  y el transporte de  $\text{Ca}^{++}$  por el R.S., durante un período de 7 a 9 días desde su preparación.

Se determinaron las posibles causas de la pérdida de actividad biológica, midiéndose la peroxidación de lípidos membranales, liberación de fosfato (Pi), variación en la composición de proteínas e influencia de la velocidad de congelación.

La condición óptima encontrada para la preservación de la actividad del R.S. cardiaco, fué la presencia de un medio hipertónico para suspender las vesículas y el congelamiento de las muestras a la temperatura de  $-195.8^{\circ}\text{C}$ .

Las causas que encontramos para el deterioro de la actividad del R.S. cardiaco fueron:

- Formación de aldehídos procedentes de la peroxidación de los lípidos membranales y
- Posible formación de cristales de agua que dañan la membrana y particularmente a la actividad ATPásica.

Asimismo, se purificaron microsomas de R.S. cardiaco mediante el método descrito por Mac Lennan (1970), para posteriormente obtener una ATPasa de  $(\text{Ca}^{++}, \text{Mg}^{++})$  altamente purificada, con la que se provó el efecto de los cationes divalentes del grupo II-A de la tabla periódica; en el transporte de  $\text{Ca}^{++}$ .

Para tal efecto, se determinaron las constantes de asociación del Ar III con cada uno de los cationes en ensayos en base a los cuales, se obtuvo la serie de selección para el Ar III:  $\text{Ca}^{++} > \text{Sr}^{++} > \text{Ba}^{++} > \text{Mg}^{++}$ .

Los estudios tanto de captación como de transporte se realizaron a 2 pHs distintos 6.6 y 7.5. A pH 7.5 la afinidad sitio-cación se encontró que es mayor que a pH 6.6.

Excepto para el  $\text{Ba}^{++}$  el cual se transporta muy lentamente y prácticamente no precipita como oxalato de Bario, se encontró que el comportamiento de los restantes cationes se debía probablemente a la formación del complejo ATP-M, cuya serie de selección es:  $\text{Mg}^{++} > \text{Ca}^{++} > \text{Sr}^{++} > \text{Ba}^{++}$  y que corresponde a la serie deshidratada de los cationes.

3

CONSERVACION DE RETICULO SARCOPLASMICO  
CARDIACO

## I N T R O D U C C I O N

Una característica bien patente de todos los animales, es su capacidad de moverse voluntariamente al contraer sus músculos. A principios del siglo III A.C. Eristato de la escuela filosófica de Alejandría, fué quien por primera vez reconoció a los músculos como los órganos de la contracción. (35)

Los estudios hechos por Francis Glisson en el siglo XVII D.C. indicaron que las fibras musculares del organismo, poseen la propiedad especial de la "irritabilidad"; lo que provoca la respuesta a los estímulos mediante el fenómeno de contracción (Needham 1971). Esto fué demostrado experimentalmente por Von Haller en 1936. (15,35)

Actualmente se sabe que las células musculares, al igual que las neuronas, pueden ser excitadas química, eléctrica y mecánicamente, produciendo un potencial de acción que es transmitido a lo largo de la membrana celular. Estas células, se encuentran adaptadas al acortamiento unidireccional que se verifica durante la contracción por lo cual, suelen ser alargadas y fusiformes. (5)

Para que la contracción se lleve a cabo, es necesaria la participación de la maquinaria contráctil, así como de un mecanismo que se activa por el potencial de acción.

La ejecución de trabajo mecánico no está limitada en modo alguno al --- músculo. Casi todas las células contienen filamentos contráctiles y --- microtúbulos que participan en algunas funciones celulares importantes-  
tales como :

- a).- Organización del contenido celular.
- b).- Formación del huso y división celular.
- c).- Actividad de cilios y flagelos.
- d).- Transporte de material, al interior de las células por endocitosis

La matriz citoplásmica de las células contráctiles se encuentra sumamen-  
te diferenciada; la mayor parte del citoplasma se encuentra ocupado por  
fibrillas contráctiles, las cuales en el músculo liso, son homogéneas y  
birrefringentes; mientras que en el músculo cardíaco y esquelético son-  
estriadas y poseen zonas oscuras y birrefringentes (anisotrópicas), --  
que alternan con otras claras e isotrópicas (5,23).

Por esto, y en base a sus propiedades contráctiles, se pueden diferenciar  
tres tipos de células musculares, las cuales son:

- a).- Célula de músculo esquelético.
- b).- Célula de músculo cardíaco
- c).- Célula de músculo liso.

En general, las características funcionales de los diferentes tipos ---  
musculares son las siguientes:

#### Músculo esquelético.

- 1.- Se encuentra unido a los huesos del organismo.
- 2.- Es el responsable del movimiento de ciertas partes del esqueleto.
- 3.- Carece de conexiones anatómicas y funcionales entre las fibras ---  
individuales.

- 4.- Se encuentra bajo el control del Sistema Nervioso Somático.
- 5.- No se contrae normalmente en ausencia de estímulos nerviosos.
- 6.- Tiene estrías transversales bien desarrolladas.

Músculo Cardíaco.

- 1.- Se encuentra bajo el control del Sistema Nervioso Autónomo.
- 2.- Posee estrías transversales.
- 3.- Se contrae rítmicamente en ausencia de inervación externa, debido a la presencia en el miocardio, de células marcapaso que descargan espontáneamente.

Músculo Liso.

- 1.- Rodea las cavidades huecas del organismo
- 2.- No se encuentra bajo un control conciente directo.
- 3.- Está asociado con procesos que regulan el ambiente interno del organismo.
- 4.- Carece de estrías transversales
- 5.- Contiene células marcapaso que descargan irregularmente.

El músculo esquelético está constituido por haces de fibras largas; cada fibra puede ser considerada como una sola célula multinucleada (de 100- a 200 núcleos); ésta a su vez, se encuentra rodeada por una membrana polarizada eléctricamente, con una diferencia de potencial de 0,1 voltios con el interior negativo y el exterior positivo. También se hallan presentes los organelos típicos de las células, que reciben nombres especiales; así la membrana plásmica de las fibras musculares se nombra sarcolema, el citoplasma en el sarcoplasma y las mitocondrias se llaman sarcosomas. (5).

Gran parte de la célula muscular la ocupan sus elementos contráctiles,-- las miofibrillas, que se encuentran dispuestas en paquetes de haces ---- paralelos al eje de contracción . . Estas miofibrillas están bañadas y -- rodeadas por el sarcoplasma, que es el fluido intracelular del músculo - y que contiene elementos solubles; por ejemplo: ATP, Fosfato, Fosfocre-- atina, Glucosa, Sales, etc. (Ver figura 1).

Las miofibrillas constan de prolongados y finos haces de miofilamentos-- que se agrupan en forma regular dentro de una unidad estructural denomi-- nada sarcómero y que se repite cada 2.2 micras en el músculo cardíaco y-- 2.5 micras en el músculo esquelético (23) (Ver figura 2).

Tanto en el músculo esquelético como en el cardíaco, los sarcómeros están dispuestos transversalmente, mostrando estriaciones que son caracterís-- ticas de la célula muscular y que se forman a consecuencia de la super-- posición de bandas claras o isotrópicas (I) y bandas densas o aniso ---- trópicas. (A).

Las principales características del sarcómero que es la unidad contrac-- til del músculo que se encuentra encerrado entre dos líneas Z, están --- indicadas en la figura 3.

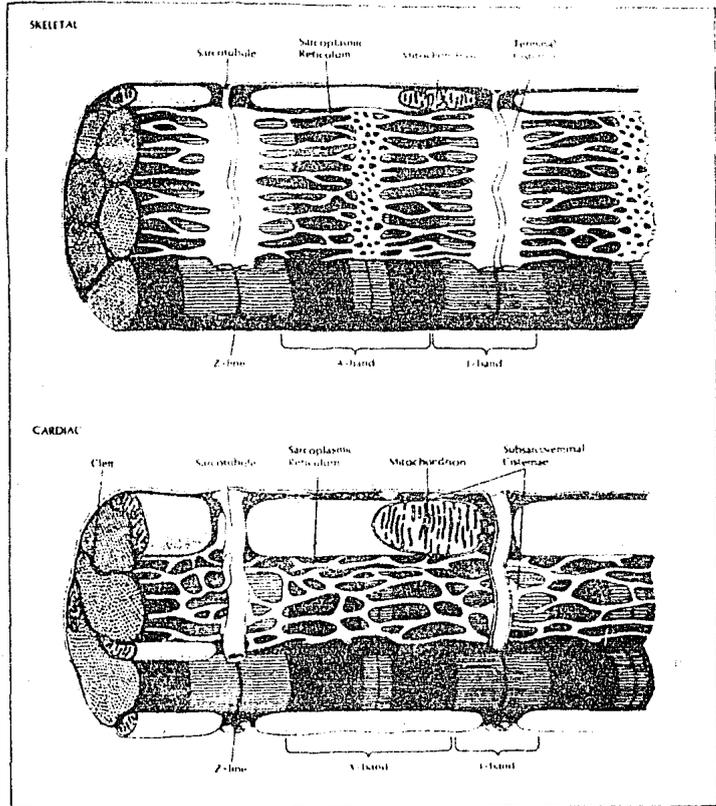


Figura 1.- Diferencias morfológicas presente en las células estriadas  
Célula de músculo esquelético (arriba) y célula de músculo  
cardiaco (abajo).

Se observa en ambos casos la presencia de mitocondrias ---  
miofibrillas, Retículo Sarcoplásmico y sarcotúbulos.  
Notese que las células de músculo cardiaco tienen tanto --  
mitocondrias como sarcotúbulos de mayor tamaño. La disposi-  
ción del R.S. en ambos es diferente.

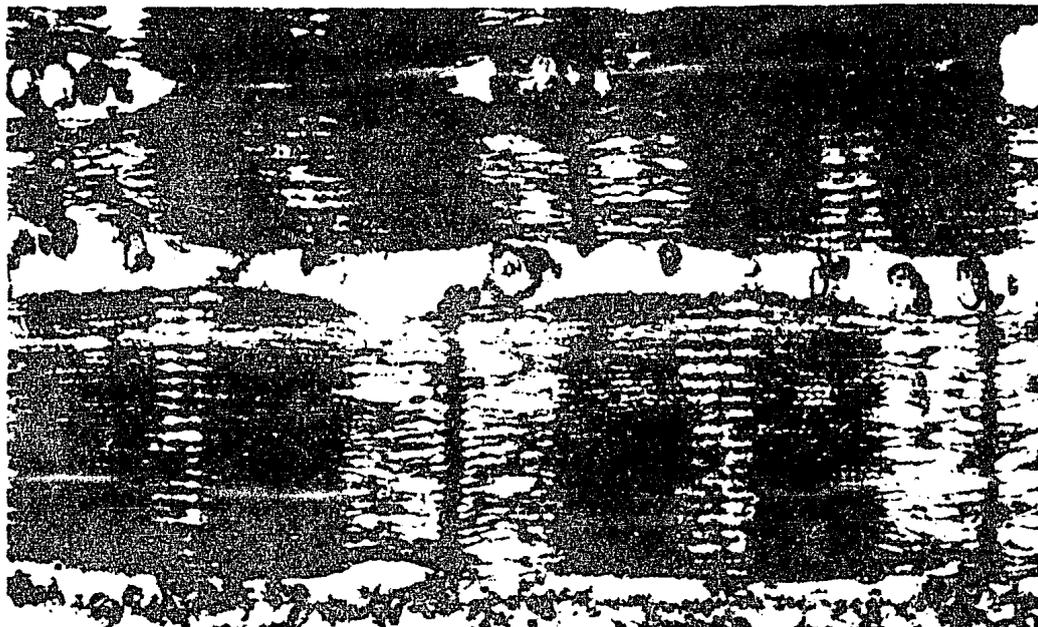


Figura 2.- Esta representación es una parte muy pequeña de una fibrilla de músculo esquelético de conejo. Las estrías observadas en el músculo esquelético y cardíaco, son debidas a la superposición de bandas claras y bandas densas como se aprecia en la figura. (Micrografía electrónica hecha por H.E. Huxley, del University College de Londres).

Mediante los estudios realizados por H.E. Huxley y J. Hanson (3) se ha comprobado que las bandas I corresponden a filamentos delgados - de 6 nm de diámetro, compuestos por moléculas de Actina.

Estos filamentos aparecen unidos a ambos lados de una estructura estrecha y densa que atraviesa la banda I y que se llama línea Z.

Las porciones densas de las bandas A, contienen tanto filamentos delgados (Actina), como filamentos gruesos de 15-17 nm. de diámetro -- dispuestos hexagonalmente; éstos últimos, formados por moléculas de -- Miosina. Las moléculas de Miosina se encuentran unidas temporalmente a las de Actina, mediante unos puentes transversales (Actina-Miosina), -

que constituye la única conexión estructural entre ambas. Los filamentos de Actina tienen asociadas dos proteínas que regulan la construcción y ruptura de los puentes transversales; la Troponina y la tropomiosina. La disposición molecular de éstas, es de una molécula de Troponina y otra de Tropomiosina, por cada siete moléculas de Actina - G. ( Ver figura 4 ).

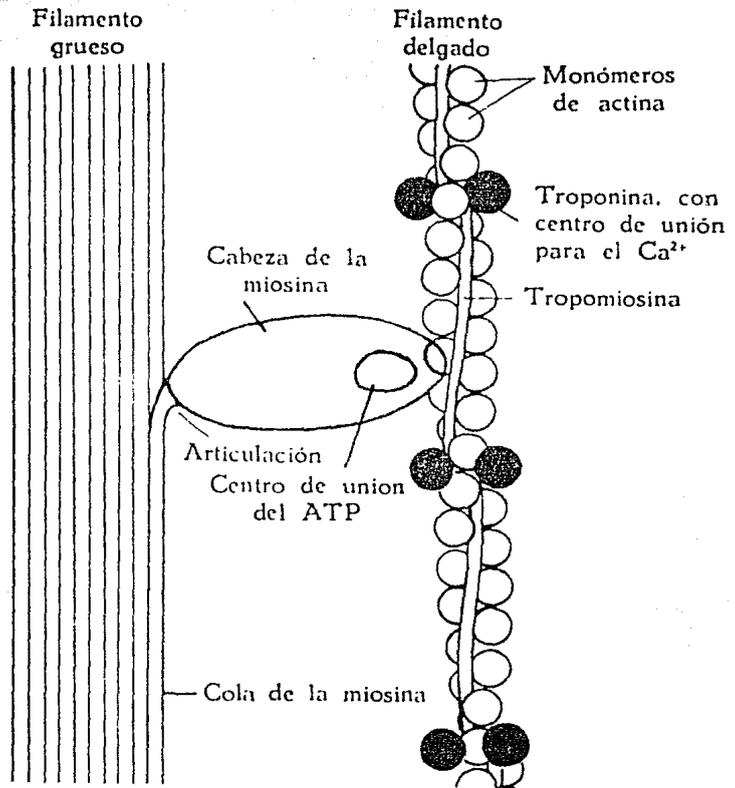


Figura 4.- Disposición de las moléculas de Tropomiosina y de Troponina en los filamentos delgados y su relación con las cabezas de Miosina de los filamentos gruesos. Existe una molécula de Troponina por cada siete monómeros de Actina G. La estructura de la Actina F (filamentos) se representa mediante dos cadenas de cuentas dispuestas helicoidalmente y en las que cada monómero es una unidad de Actina G (globular).

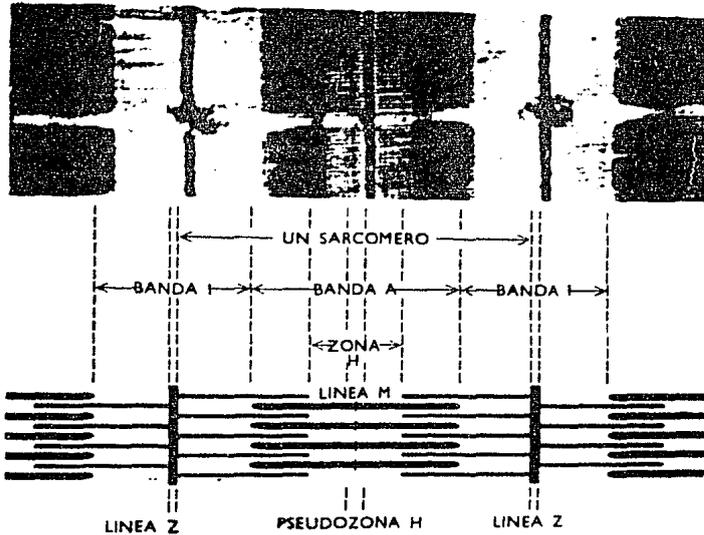


Figura 3.- Corte longitudinal de músculo estriado de la pata de una rana. Las principales características del sarcómero son las siguientes:

La banda I es clara debido a que está formada por filamentos delgados; se encuentra bisecada por una densa línea transversal denominada línea Z.

La banda A es densa (y por ello oscura), está formada por la superposición de filamentos gruesos y delgados. La porción central de la banda A, la zona H, es menos densa que el resto de la banda y esta bisecada por una densa línea transversal, la línea M.

El sarcómero que es la unidad longitudinal completa que se repite, se extiende desde la línea Z a la siguiente.

El peso molecular de estas moléculas es : Actina 45,000 daltones, Miosina 500,000 daltones. Estas moléculas representan el 80% y el 50% de las proteínas del aparato contráctil en músculo esquelético y músculo cardíaco respectivamente; además, asociada a la Miosina se encuentra otra proteína : la Proteína C (P.M. 140,000 daltones), mientras que la Tropomiosina (P.M. 70,000 daltones) y la Troponina se hallan asociadas a la Actina. La Troponina está compuesta a su vez, por tres subunidades : Troponina I, Troponina T y Troponina C (El P.M. de cada una es de 18,000 a 35,000 daltones), cuya función específica en el mecanismo contráctil está representada por las siglas : C,I,T.

La Troponina C es fijadora de dos moléculas de calcio y cambia de conformación durante el proceso contráctil; la Troponina I (inhibidora), posee centros de unión para la Actina, pero no liga calcio; inhibe la interacción de la Actina con los puentes cruzados de las cabezas de Miosina; la Troponina T es una subunidad que actúa fijando la Tropomiosina,

Las células musculares contienen un retículo endoplásmico altamente especializado, denominado Retículo Sarcoplásmico (R.S.),

El R.S. en el músculo esquelético, es un sistema de membranas que se extiende como una red a través del sarcoplasma, rodeado a las miofibrillas. Este sistema presenta un patrón tal, que sus zonas tienen una relación constante con las bandas del sarcómero.

A la altura de la banda A, el R.S. se presenta como túbulos longitudinales que por un lado se anastomosan en la región de la banda H y por otro lado hacia la línea Z confluyen ensanchándose en una estructura denominada cisterna terminal, que almacena la mayor parte del Calcio en condiciones de reposo (5,23).

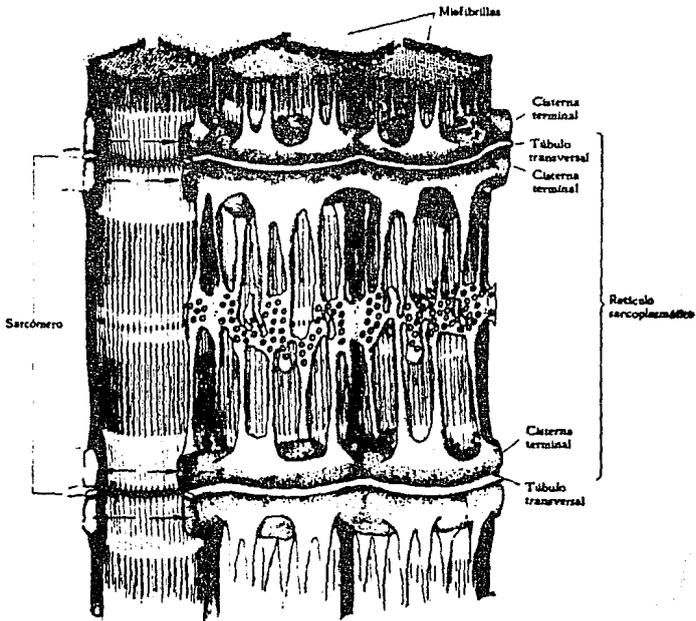


Figura 5.- Se ilustra la disposición del Retículo Sarcoplásmico de --- músculo esquelético, el cual se encuentra rodeando a las -- miofibrillas. Las cisternas terminales se encuentran indica das mediante flechas.

Fue Anderson y Cedergen en 1959, quienes utilizando la reconstrucción tridimensional microscópica, demostraron que los elementos centrales (en músculo esquelético), son túbulos continuos altamente convolutos. (Ver figura 5). En músculo cardíaco, la disposición de tales -- túbulos es semejante a la que se presenta en la figura 1,

En 1969, H.E. Huxley, sugirió que la despolarización de la es --  
tructura denominada Retículo Sarcoplásmico, podría inducir a la libera --  
ción del calcio de las cisternas terminales.

En músculo esquelético existen dos cisternas terminales y un ---  
túbulo transverso que se asocia para formar una estructura denominada  
triada, mientras que en músculo cardíaco, las cisternas terminales que  
son menos abundantes y más pequeñas que en el músculo esquelético, se  
asocian con el túbulo transverso de tal modo que forman diadas. (Ver --  
figura 1).

Diversos estudios bioquímicos (27,28,30) han revelado la compo --  
sición de la membrana del R.S. esquelético. Los lípidos constituyen --  
del 30-40%, mientras que el resto 60-70% está formado por proteínas --  
(28).

De los lípidos totales, el 80% está formado por fosfolípidos ---  
entre los que destacan la fosfatidilcolina (65-73%) y la fosfatidileta  
nolamina (12-19%); los cuales, según reportes de Knoles y colaborado --  
res (21,27), son indispensables para la actividad máxima de la ATPasa --  
de  $(Ca^{++}, Mg^{++})$ ; asimismo, se ha encontrado la presencia de fosfatidili  
nositol y la fosfatidilserina, cuya proporción es mucho menor que las --  
anteriores (9 y 12% respectivamente). (27).

Las proteínas relacionadas con el transporte o la acumulación --  
del  $Ca^{++}$  son :

- a).- ATPasa de  $(Ca^{++}, Mg^{++})$ ; dependiente de  $Mg^{++}$  y activada por --  
el  $Ca^{++}$ . Pasa alrededor de 100,000 daltones y constituye --  
del 80-90% del total proteico en las membranas microsomales  
(28,30).

- b).- Calsecuestrina; con un peso molecular de 44,000 daltones y una elevada capacidad de fijar  $\text{Ca}^{++}$  (43 nmoles de  $\text{Ca}^{++}$ /mg-de proteína). (28,30).
- c).- Proteína de alta afinidad por el calcio; pesa 56,000 daltones y fija  $\text{Ca}^{++}$  en una proporción de 25 moles/mol. de proteína (28,30).
- d).- Fosfolamban; proteína encontrada únicamente en músculo cardíaco y cuyo peso es aproximadamente de 22,000 daltones. - Se cree que juega un papel modulador en cuanto a la cantidad y velocidad de entrada de  $\text{Ca}^{++}$  al interior del R.S. -- cardíaco (28,30). Los requerimientos del Fosfolamban para que se efectue dicha función, son la presencia del c-AMP y de una proteína cinasa, capaz de fosforilar al Fosfolamban
- e).- Proteolípido; proteína de peso molecular de 12,000 daltones que se encuentra muy asociada a la membrana y cuyo papel - se desconoce (26,28,30).

De las anteriores proteínas, la Calsecuestrina y la de alta -- afinidad por el Calcio se encuentran en el lumen del R.S. y se piensa de acuerdo a los trabajos de Sierra y Holguín (41), que son las ---- responsables de mantener unida a ellas la cantidad de Calcio acumulada durante los procesos de relajación miocárdica.

Actualmente se sabe, que la función del R.S. en las células --- musculares, es la de regular la concentración y los movimientos de --  $\text{Ca}^{++}$  intracelular. Esta teoría es apoyada por los trabajos que realizaron Endo Y Col. (1970), en fibras aisladas. Ellos propusieron un -- mecanismo de liberación de Calcio del R.S. al citoplasma, inducido --

por pequeñas elevaciones del Calcio citoplásmico después de la despolarización (8).

Por lo tanto, el R.S. consta de un sistema de membrana impermeable al calcio, una bomba de calcio capaz de transportar dicho catión y por último, de la disposición morfológica intracelular adaptada específicamente para la realización del transporte y liberación de calcio. El desarrollo global del mecanismo contráctil a nivel del R.S. se resume de la siguiente manera:

En condiciones de reposo, las células se encuentran relajadas; su sarcoplasma se caracteriza por mantener en este estado, elevadas concentraciones de  $MgATP^-$ , mientras que la concentración de  $Ca^{++}$  citoplásmico, es menor al requerido para la concentración ( $10^{-7}M$ ).

A nivel microscópico no se observan puentes transversos entre los filamentos gruesos y delgados. Cada cabeza de miosina tiene unida una molécula de ATP (5,23). En estas condiciones, las cabezas de Miosina, no pueden interactuar con la Actina, porque la Tropomiosina enmascara el centro de unión sobre la actina.

El estímulo para que se efectúe la contracción del músculo, es un impulso eléctrico que procede del nervio motor o de la célula marcapasos y se extiende rápidamente por todo el sarcolema, provocando su despolarización; misma que es transmitida instantáneamente al interior de las fibras a través de los tubos T.

La despolarización del sistema T provoca que se transmita una señal (hasta ahora desconocida), al interior del R.S., la cual provoca un aumento en su permeabilidad, permitiendo así la salida de iones  $Ca^{++}$  previamente almacenados en las cisternas del R.S. durante la relajación anterior. (Ver figura 6).

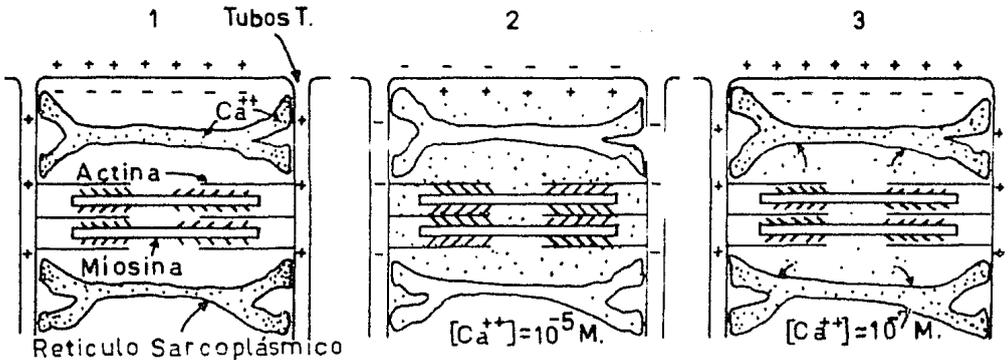


Figura 6.- Mecanismo de contracción muscular. Los iones de calcio --- (representados por los puntos negros) están normalmente -- almacenados en las cisternas del Reticulo sarcoplásmico -- (6-1).

El potencial de acción se propaga a través de los tubos T, lo que provoca la despolarización de la membrana que da lugar a una señal que hace que se libere el calcio y que los filamentos de Actina se deslicen sobre los de Miosina. La concentración de calcio aumenta desde 10<sup>-7</sup> M hasta 10<sup>-5</sup> M durante este proceso (6-2).

Las líneas Z se aproximan entre sí. Entonces el calcio es bombeado hacia el R.S. y el músculo se relaja. La concentración del calcio citoplasmático es nuevamente del orden de 10<sup>-7</sup> M (6-3).

Esta instantánea descarga de Ca<sup>++</sup> desde el interior del R.S. -- aumenta su concentración a 10<sup>-5</sup> M en el sarcoplasma y desencadena la interacción entre los filamentos gruesos y delgados: el Ca<sup>++</sup> se une a los centros de unión de la Troponina C (TnC), lo que da lugar a un -- cambio de conformación de ésta molécula que mueve a la Tropomiosina -- descubriendo de este modo el centro de unión de la Actina y permitiénd

do que se combine con la cabeza de miosina.

Las cabezas de Miosina cambian ahora su conformación y liberan -- la energía del complejo  $MgATP^-$ , con lo que el puente transversal altera su relación angular con el eje del filamento grueso y provoca finalmente el deslizamiento del filamento delgado a lo largo del grueso. Por -- cada puente transversal se hidrolizan dos moléculas de ATP. (Ver figura-4).

Cuando los impulsos neuromotores cesan, el sarcolema recupera su permeabilidad inicial y se repolariza. Igualmente, el R.S. vuelve a su estado inicial.

El mecanismo por el cual el R.S. promueve la relajación, ha sido propuesto por varios autores (2,8,18,19,25,37,42,46). La secuencia ---- cinética que se ha propuesto es la siguiente:

El proceso a nivel membranal se inicia cuando se unen dos  $Ca^{++}$  -- por la parte externa y el complejo  $ATP-Mg^-$ , el cual es el verdadero --- sustrato, a la enzima ATPasa de  $(Ca^{++}, Mg^{++})$  que posee en estas condiciones gran afinidad por el calcio, del orden de 0.2 a 2 mM (Ver figura 7, Ec1). Posteriormente, se verifica la fosforilación de la enzima, el --- fosfato queda unido al carboxilo libre de un ácido aspártico, formando un enlace de tipo anhídrico mixto, que es de alta energía y el cual se simboliza como  $E \sim P$  (Figura 7, Ec.2).

Cuando la enzima ya está fosforilada, sufre un cambio de conforma ción, formándose el compuesto  $E' \sim P$ , cuya afinidad por el  $Ca^{++}$  es del orden de mM, con lo cual, el  $Ca^{++}$  unido se libera hacia el interior del R.S. (Figura 7, Ec.3).

Las últimas etapas de reacción corresponden a la hidrólisis de la enzima fosforilada y finalmente, al cambio conformacional de la enzima a su estado inicial (Figura 7 Ec. 4 a 7)

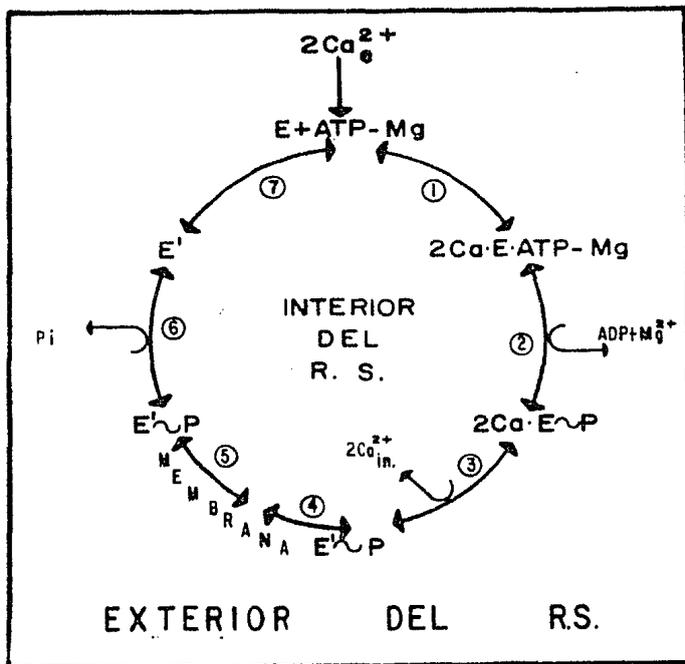


Figura 7.- Mecanismo de relajación a nivel muscular, promovido por el R.S.. Las diferentes etapas del proceso se señalan mediante números, mientras que las flechas bidireccionales indican la reversibilidad de las reacciones. La reacción energética es de  $2 Ca^{2+}$  por cada ATP hidrolizado.

Cuando se aísla R.S. cardíaco mediante homogenización y centrifugación diferencial, éste se obtiene en forma de vesículas membranales, las cuales, debido a factores aún no comprendidos, van perdiendo por envejecimiento, su capacidad de ligar y liberar  $Ca^{++}$  en un lapso muy corto de tiempo, lo que dificulta el estudio de las propiedades de estas vesículas.

El R.S. cardíaco ha sido estudiado en menor grado que el de tipo esquelético, probablemente por el inconveniente antes señalado; así --- como por el bajo rendimiento obtenido comparado con el de R.S. esquelético el cual, tiene además una elevada actividad ATPásica, (18,41).

Teniendo como antecedentes los estudios hechos por Ebashi y ---- Lipmann (1962), que describen en su trabajo micrograffas de vesículas - de R.S. de músculo esquelético envejecidas, con la membrana frecuente - mente discontinua. (7).

Weber y colaboradores (1963), reportan que en soluciones de KCl - 129 mM, Histidina 1 mM (pH 6.5) y altas concentraciones de proteína, -- los microsomas de músculo esquelético son activos aún después de una -- semana de preparados y almacenados a 4 °C. También Meissner y Fleicher- (1971) mantienen sus preparaciones microsomales de R.S. esquelético por algunos meses, en sacarosa 0.3 M, Hepes 2.5 mM (pH 7.4), 10-20 mg. de - proteína/ml.; congelados por medio de nitrógeno líquido y almacenado a -70 °C (33).

Herbest y Deamer. hacen un estudio de la actividad de la ATPasa - de ( $Ca^{++}$ ,  $Mg^{++}$ ) preservando sus vesículas de R.S. esquelético, a tempera - turas de nitrógeno líquido (17).

Se ha observado que temperaturas bajas y congelamiento rápido. - preservan el R.S. esquelético (17,18,41,33). y que soluciones hipertóni - cas preservan las propiedades de la membrana del R.S. esquelético.

Los resultados de las investigaciones sobre el R.S. cardíaco en - solución hipertónica encontrados en el laboratorio donde se realizó el-

presente trabajo, nos planteó la posibilidad de encontrar condiciones -- óptimas bajo las cuales el R.S. cardíaco pueda mantener su actividad -- biológica durante un período de varios días, con el fin de poder realizar estudios cuantitativos reproducibles de la actividad de la ATPasa -- dependiente de  $\text{Ca}^{++}$  y del transporte de este catión por el R.S. ----- cardíaco.

## M A T E R I A L Y M E T O D O S

### Preparación del Retículo Sarcoplásmico cardíaco<sup>11</sup> (12).

Se obtiene el corazón de un perro callejero de aproximadamente 15 a 20 Kg. de peso.

El músculo disecado se deposita en solución salina isotónica -- NaCl 0.9 %, previamente enfriada en hielo.

Se limpian los ventrículos de la mayor parte de tejido adiposo y conectivo.

Se corta el músculo en trozos pequeños y se enjuaga con solución salina isotónica, fría.

Se elimina toda la solución y se pesan los trozos de músculo -- cardíaco. Todas las operaciones se hacen en frío (5-8 °C). El tejido -- así obtenido, se homogeniza en 4 ml. por 1 g. de tejido, de solución -- de homogenización "A", utilizando una licuadora de dos velocidades -- con un vaso de vidrio. La velocidad y tiempo de homogenización es de -- 15 segundos totales a velocidad lenta y 1 segundo por cada gramo de -- tejido, a velocidad rápida.

El homogeneado se centrifuga a 3000 x g durante 20 minutos en -- una centrífuga tipo Sorvall con rotor modelo SS-34, En este paso se -- eliminan en el precipitado restos de núcleo, miofilamentos, tejido -- conectivo y restos celulares.

Se separa el sobrenadante y éste es centrifugado a 9000 x g. - durante 20 minutos. En este paso se eliminan en el precipitado las - mitocondrias.

El sobrenadante obtenido se separa por decantación y se mide su volumen.

Al volumen del sobrenadante se le agrega la cantidad necesaria de KCl sólido para que la solución sea 0.6 M final, con el objeto de solubilizar las miofibrillas contaminantes. Esta operación se realiza agitando suavemente y en frío aproximadamente 10 minutos, hasta lograr la completa solubilización de la sal.

La solución se cetrifuga nuevamente a 40,000 x g. durante 60 -- minutos, después de los cuales el sobrenadante obtenido se elimina y el precipitado se resuspende en un volumen no mayor de 5 ml. de medio de conservación isotónico y se homogeniza suavemente a mano, para --- evitar la ruptura de las visículas de .R.S., en un homogenizador ---- y{drío- teflón.

El homogenado se lleva a un volumen de aproximadamente 30 ml. - con el mismo medio de conservación anterior y nuevamente se centrifuga a 40,000 x 6 durante 60 minutos.

Se elimina el sobrenadante por succión, con la ayuda de una --- pipeta Pasteur y una bomba de vacío. El precipitado se resuspende en el medio de conservación elegido y se homogeniza como se mencionó --- anteriormente.

Preparación modificada del Retículo Sarcoplasmático Cardíaco. (41).

Para la determinación de peroxidación de lípidos membranales --- electroforesis de proteínas y determinación de fosfato membranal libre se utilizaron vesículas de R.S. cardíaco purificadas; las cuales ----- fueron tratadas en forma especial con Sacarosa, para disminuir la ---- contaminación por Sarcolema. El procedimiento fué el siguiente:

Una vez obtenido el corazón de perro, limpio y cortado, se pesa - y se mezcla con cuatro veces en volúmen de solución de homogenización - por peso de tejido cardíaco.

Se muele 15 segundos a velocidad lenta en una licuadora de dos - velocidades y un segundo por cada gramo de tejido, a velocidad rápida.

Se centrifuga a 2611 x g. durante 10 minutos, utilizando un ---- rotor modelo GSA, y posteriormente a 9179 x g. durante otros 10 minu - tos, sin detener la centrifugación.

Se mide el volúmen del sobrenadante y se le agrega la cantidad - necesaria de Sacarosa sólida (Sigma o Baker)\*, para hacer la solución - 0.25 M (985.577 mg/ml.). Se disuelve la Sacarosa por agitación suave y realizando la operación en frío (aproximadamente 4 °C) a la mayor -- brevedad posible.

Se centrifuga a 41.280 X g., durante una hora, y el precipitado - se resuspende en un volumen aproximado de 40 ml. de medio de conserva - ción isotónico, agregando posteriormente, cloruro de potasio -----

La sacarosa procedente de estos laboratorios no tienen impurezas que afecten la actividad de la preparación de R.S.

(KCl) sólido, en cantidad suficiente para llegar a una concentración final de 0.6 M (44.73 mg/ml).

Se centrifuga a 41,280 x g. durante 60 minutos más. El sobrenadante se elimina y el precipitado se resuspende en cada uno de los -- medios de conservación elejidos.

Cada muestra se homogeniza como en los casos anteriores.

#### Determinación de la Actividad del R.S. cardíaco.

##### ATPasa Total.

En un tubo de ensayo se colocan 0.8 ml. de medio de reacción -- para ATPasa Total y se le adicionan 0.08 ml. de agua bidestilada.

Se coloca la mezcla en el baño de agua tipo Tecan con regulador térmico modelo Poliscience a 37 °C durante 2 minutos.

Se agrega 0.02 ml. de R.S. que contienen 1.24 mg. de proteína/ml a la mezcla anterior, para llegar a una concentración final de aproximadamente 0.025 mg. de proteína/ml. de medio de reacción. Se deja -- incubar durante un minuto y se le añade 0.1 ml. de ATP-Tris 20 mM, - con agitación y permitiéndole que la reacción transcurra durante 2 minutos a 37 °C.

La reacción se detiene por adición de 1 ml. de TCA al 10%, previamente colocado en un baño de hielo.

El tubo de reacción es enfriado inmediatamente en un baño de -- hielo, para evitar que la reacción continúe.

Se centrifuga a 5,000 rpm, durante 2-3 minutos, en una centrífuga tipo internacional Clinical Centrifuge.

De la mezcla anterior, se toma una alícuota de 1 ml. y se procede a la cuantificación de fosfatos (ver más adelante).

Se hace un blanco de reactivos y la curva estándar para cada determinación. Las determinaciones se realizan por duplicado.

ATP Basal.

Se procede de la misma manera que en la ATPasa Total, salvo que se utiliza Medio de reacción de ATPasa Basal que no contiene  $\text{Ca}^{++}$  y además, un agente quelante de cationes divalentes.

ATPasa de ( $\text{Ca}^{++}$ ,  $\text{Mg}^{++}$ ).

Esta se determina por diferencia entre el valor obtenido para la ATPasa Total y el correspondiente de ATPasa Basal (sin  $\text{Ca}^{++}$ ).

Captación de  $\text{Ca}^{++}$ .

Esta determinación se realiza en un espectrofotómetro tipo Beckman Mod. 25, equipado con un graficador a una longitud de onda de 675 nm y a una temperatura de 37 °C. (Ver figura 8).

En una celda de vidrio de 3 ml. de capacidad, se colocan 1,6 ml de medio de captación, 0.165 ml. de agua bidestilada y se deja calentar en el interior del espectrofotómetro a 37 °C, durante unos 5 minutos.

Se añaden 0.03 ml. de Arsenazo III 3.5 mM. se agita en el interior de la celda y se registra inmediatamente la densidad óptica en el graficador. (Figura 8-a).

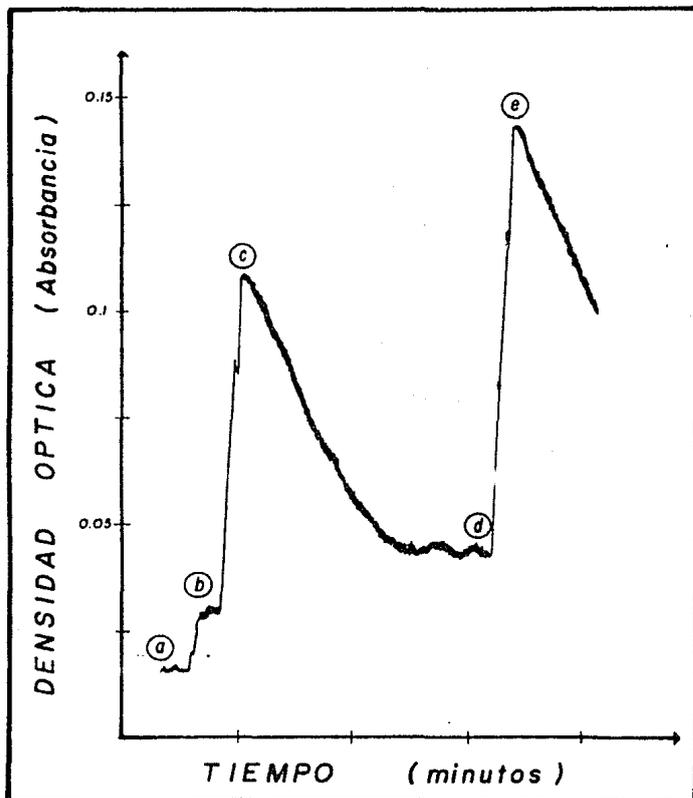


Figura 8.- Representación gráfica de la velocidad con que el R.S. --- cardíaco capta  $Ca^{++}$ . El análisis espectrofotométrico se realizó a 675 nm y 37 °C, utilizando el indicador metalocromico, Arsenazo III (39), el cual forma un complejo colorido con el  $Ca^{++}$ . La indicación de los diferentes puntos corresponde a la adición de los reactivos: a). Adición de Arsenazo III; b). Adición de  $R_2S_2$ ; c). Adición de ATP-Tris 20 mM; d). Desaparición del  $Ca^{++}$  presente en el medio de reacción y e). Adición de 50 nmoles de  $Ca^{++}$ . Las pendientes originadas por la desaparición del  $Ca^{++}$  indican la velocidad con que éste catión es captado por el R.S. cardíaco.

Al medio anterior se le adiciona 0.01 ml. de R.S. que contiene 1.24 mg. de proteína/ml., se agita y se registra nuevamente el valor de la D.O.. La concentración final de proteínas es de 0.0124 mg. de proteína/ml. de medio de reacción (Fig. 8-b).

Se agregan 0.2 ml. de ATP-Tris 20 mM y se registra la velocidad de reacción en el graficador. Cuando se vea que todo el calcio presente en el medio de reacción ha desaparecido (Lo cual se observa por ausencia de cambio en la lectura de D.O.), se anota esta lectura (Figura 8-c,d) y en ese momento, se añaden rápidamente 0.010 ml. de  $\text{Ca}^{++}$  10 mM. Se agita la mezcla y se registra en el graficador, tomando nuevamente la lectura de D.O. correspondiente a la adición de las 50 nmolas de  $\text{Ca}^{++}$  que sirven de calibración interna.\*

Ligamen de  $\text{Ca}^{++}$ .

A).- Cuentas de calcio filtrado:

En un tubo de ensayo de 16 x 100, se colocan 0.800 ml. del Medio de Ligamen (con  $^{45}\text{Ca}$ ), 0.080 ml. de agua bidestilada y desionizada y se coloca la mezcla anterior en un baño de agua a 37 °C durante aproximadamente 2 minutos.

Se le agregan 0.020 ml. de R.S. que contiene 1.24 mg. de proteína/ml. y se deja incubar a 37 °C, durante 1 minuto. La concentración final de proteína es de 0.025 mg de proteínas/ml. de medio de reacción.

La reacción se inicia por la adición de 0.1 ml. de ATP-Tris 20 mM. A los dos minutos de iniciada la reacción, se toma un volumen de 0.7 ml. del medio reaccionante y se filtra al vacío sobre filtros

\* La calibración en ausencia de ATP o de R.S. da valores semejantes.

Millipore HA con poro de 0.45 micras de diámetro; utilizando para ello una bomba de vacío.

Del filtrado anterior se toma un volumen de 0.2 ml. y se coloca en un vial de conteo, al cual se le ha adicionado previamente 0.3 ml. de EGTA 0.5 mM.

Se le añaden 5 ml. de líquido ACM y se determinan las cpm. en un contador de centelleo tipo Scintillation System Mod. 6847, Marck II.

B).- Cuentas de calcio total :

Del líquido no filtrado, se toma un volumen de 0.2 ml. y se pasa a un vial, procediendo como en el caso anterior.

Se corre un testigo en las mismas condiciones pero substituyendo el ATP-Tris 20 mM, por agua.

A todas las cuentas se le resta el valor de un blanco (cuentas debidas a un vial de muestra),

Las nmoles de  $Ca^{++}$  ligado por el R.S. cardiaco, se calculan mediante la siguiente expresión:

nmoles de  $Ca^{++}$  ligado/mg. de proteína/minuto:

Donde :

$$Ctas. de Ca_T \left[ \frac{(Ctas. de Ca_F) \times nmoles de Ca_T}{Ctas. de Ca_T} \right]$$

$Ca_T$  = Calcio Total

$Ca_L$  = Calcio Ligado

$Ca_F$  = Calcio Filtrado

---

mg. de proteína x tiempo de reacción.

Determinación de proteínas según Folin-Lowry (24).

Se toma un volumen de proteínas que no exceda de 50  $\mu$ g. de proteína total y se le agregan 2 ml. de reactivo C.

Se deja reposar la mezcla durante 10 minutos como mínimo, a temperatura ambiente; después de lo cual, se añade 0.1 ml. de reactivo de Folin-Ciocalteu cuyo volumen es el necesario para neutralizar los 2 ml. de reactivo C.

Se ajusta con agua a un volumen final de 2.5 ml.

Realizar una curva patrón con el estandar de proteínas, utilizando volúmenes comprendidos entre 0-50  $\mu$ l. de ABS 1 mg/ml. Se lleva a un volumen final de 2.5 ml. con agua desionizada después de agregados los reactivos. Se deja reposar 30 minutos.

Se determina la D.O. en un fotocolorímetro tipo Klett-Sumerson con filtro rojo o bien, en un espectrofotómetro a 750 nm.

Determinación de Fosfato. Método de Taussky y Shorr (48).

A 1 ml. de muestra se le agregan 2 ml. del reactivo FF.

Se prepara una curva patrón con solución de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  5 mM en TCA al 0.5 %, con una cantidad final de Pi que quede comprendida entre 0-500 nmoles:

n mol (Pi)	ml. (Pi)	ml. (H <sub>2</sub> O)
0.00	0.00	1.00
125.00	0.025	0.975
250.00	0.050	0.950
375.00	0.075	0.925
500.00	0.100	0.900

Finalmente, se lee la concentración de PI resultante, utilizando un fotocolorímetro con filtro rojo, o bien en un espectrofotómetro a 660 nm. de longitud de onda.

Electroforesis en geles de poliacrilamida en S.D.S. (53).

A.- Preparación de geles al 7.5 %

Las soluciones se mezclan en el orden siguiente (volumen para 11 geles de 2.0 ml./gel):

Tampón de fosfatos 0.2 M con SDS al 0.2 %	12.5	ml
Acrilamida 40 %	4.69	ml
Bisacrilamida 2 %	2.54	ml
Agua	4.0	ml
Persulfato amónico (15 mg/ml.)	1.25	ml
TEMED	0.025	ml

Una vez realizada la mezcla, el proceso de gelificación es rápido (entre 20-30 minutos). Inmediatamente después de preparada, se añade en tubos de vidrio de 0.6 x 10 cm. y se depositan varias gotas de agua en la superficie.

Cuando los geles se han formado, se someten a preelectroforesis durante 30 minutos a 4 mA/gel, en la solución de corrimiento. Cuando se termina la pre-electroforesis, los geles están listos para recibir la muestra de proteínas.

B.- Electroforesis. Preparación y corrimiento de la muestra proteica.

A cada muestra de proteínas (0.09 ml con aproximadamente 1 mg/ml) se añaden 0.01 ml de solución A de electroforesis.

La mezcla se somete de 1-2 minutos a la temperatura de ebullición en un baño maría y se añaden 50  $\mu$ l. de solución "B" de electroforesis y se coloca sobre su gel respectivo.

La electroforesis se inicia corriendo a 4 mA/gel hasta la penetración de las muestras (aproximadamente 60 minutos). Luego se corre a 8 mA/gel., la migración del frente del colorante hasta cerca del otro extremo del gel dura aproximadamente 10 horas: el corrimiento se detiene y los geles se sacan inyectando agua entre el gel y la pared del tubo de vidrio.

Los geles se tiñen durante 12 horas en solución de coloración. El exceso de colorante se elimina de los geles durante 2 días por difusión en solución decolorante.

Finalmente, los geles con las bandas protéicas coloreadas se mantienen en la solución de conservación.

#### Peroxidación de Lípidos Membranales. (40).

Se toma 0.1 de muestra de R.S. y se adiciona 0.1 ml. de TCA al 10% , se mezcla perfectamente y se centrifuga a 5,000 rpm durante 5 minutos. Se toma una alícuota de 0.1 ml. y se diluye con 0.5 ml. de agua destilada, adicionándole enseguida 0.5 ml. de TBA al 0.67 %.

Las muestras así tratadas se ponen en un baño maría a ebullición durante 10 minutos. Para evitar la evaporación del solvente se tapa la boca del tubo con una canica de vidrio.

Se deja enfriar las muestras y se leen en un espectrofotómetro a 543 nm de longitud de onda. La determinación se hace por duplicado y se corre los testigos correspondientes utilizando los medios de conservación exentos de R.S.

Para evaluar el % de peroxidación membranal, se realiza un control con ácido Ascórbico y  $\text{FeSO}_4$ , que corresponde a la peroxidación total del R.S. correspondiente (100 % de peroxidación). El control se realiza de la siguiente manera :

A una muestra de R.S. que corresponde a 0.5 mg. de proteína, se le adicionan 0.774 ml. del medio de peroxidación total de lípidos y se ajusta con agua destilada hasta un volumen final de 2.0 ml., dejando reaccionar la mezcla durante una hora a 37 °C.

La reacción se detiene con 0.2 ml. de TCA al 50 % y una vez terminada, se centrifuga a 5,000 rpm durante 5 minutos.

Se toma una alícuota de 0.25 ml. de 0.5 ml.. La alícuota menor se diluye hasta 0.5 ml. con agua destilada.

A las alícuotas anteriores se les añade 0.5 ml. de TBA al 0.67 % (pH 6,6 con NaOH).

Para la elaboración de los testigos de peroxidación, se toman 0.774 ml. de medio para peroxidación total de lípidos, y se le agrega un volumen de medio de conservación igual al volumen de la muestra de R.S. empleado, llevando después a un volumen final de 2 ml. con agua destilada.

Se sigue el mismo procedimiento que en la determinación antes descrita y al final, se resta en cada paso el testigo que correspondiera a la alícuota tomada.

## R E S U L T A D O S

### Determinación de la Actividad del R.S. Cardíaco

#### Actividad ATPásica.

Se prepararon vesículas de R.S. cardíaco según el método de Harigaya y Schwartz (1968). Una vez obtenidas, se suspendieron en tres tipos de medios de conservación: Medio isotónico, medio hipertónico y medio hipertónico con DMSO. Cada una de las preparaciones de R.S. suspendidas en los medios anteriores, se mantuvieron a las siguientes temperaturas:  $-195.8^{\circ}\text{C}$ ,  $-18^{\circ}\text{C} \pm 0.5$  y  $7^{\circ}\text{C} \pm 1$ .

La actividad ATPásica de las diversas preparaciones fué seguida en función del tiempo de envejecimiento, durante un período de 7 a 9 días; encontrando que a  $-195.8^{\circ}\text{C}$ , (Ver figura 9) existe una óptima conservación de las vesículas de R.S. aisladas de músculo cardíaco. La actividad ATPásica no disminuyó durante el tiempo probado, sin embargo, sí se observó un ligero incremento de actividad para cualquiera de los tres medios de suspensión que se probaron; concordando estos resultados con lo reportado por Meissner y Fleischer para R.S. de músculo esquelético (33), así como con los trabajos de Herbst y Deamer, también realizados en músculo esquelético (17).

La figura 9-C muestra además, que en el medio hipertónico con DMSO (HD), la actividad enzimática es ligeramente mayor que en el medio isotónico (I) e hipertónico (H); esto parece indicar que la presencia del DMSO en el medio, ejerce un ligero efecto "protector" de la actividad ATPásica.

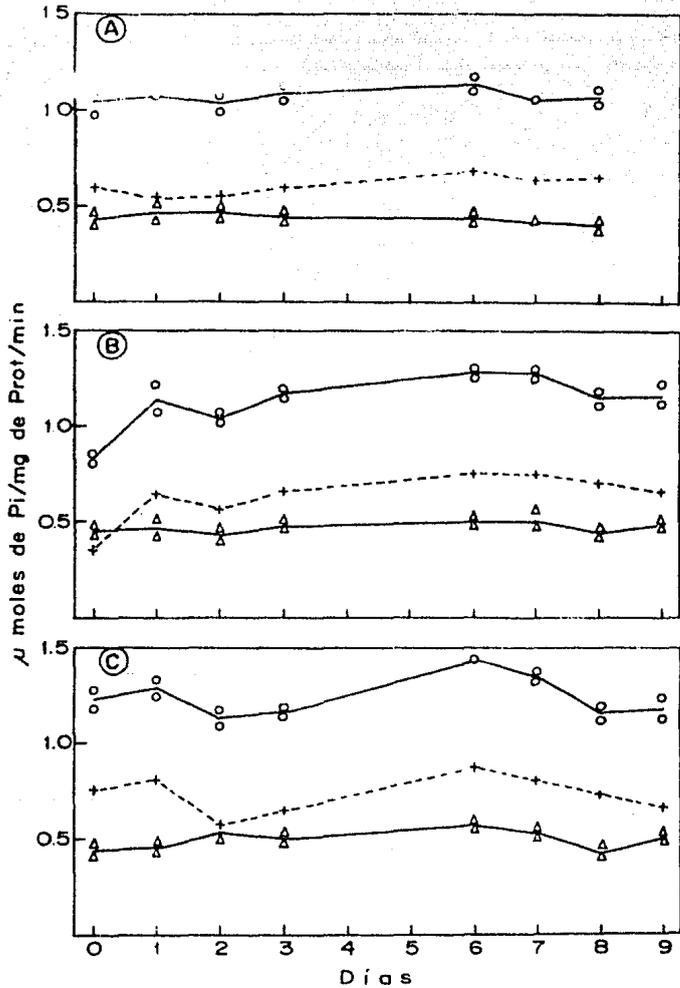


Figura 9.- Efecto de la temperatura de conservación ( $-195.8^{\circ}\text{C}$ ) y del medio de suspensión sobre la actividad específica de la ATPasa de ( $\text{Ca}^{++}, \text{Mg}^{++}$ ) de R.S. cardiaco. Las vesículas se conservaron en medio isotónico ( $\Delta$ ), medio hipertónico y (B) medio hipertónico con DMSO. Se midió la actividad de la ATPasa Total ( $-O-$ ) y la actividad de la ATPasa Basal ( $-\Delta-$ ). La diferencia entre estas actividades constituye la de la ATPasa de ( $\text{Ca}^{++}, \text{Mg}^{++}$ ). Obsérvese en todos los casos, el incremento de la ATPasa de  $\text{Ca}^{++}$  ( $---\Delta---$ ).

A la temperatura de  $-18 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0.5$ , los valores de la actividad --- ATPásica, decrecen en función del tiempo (Ver figura 10).

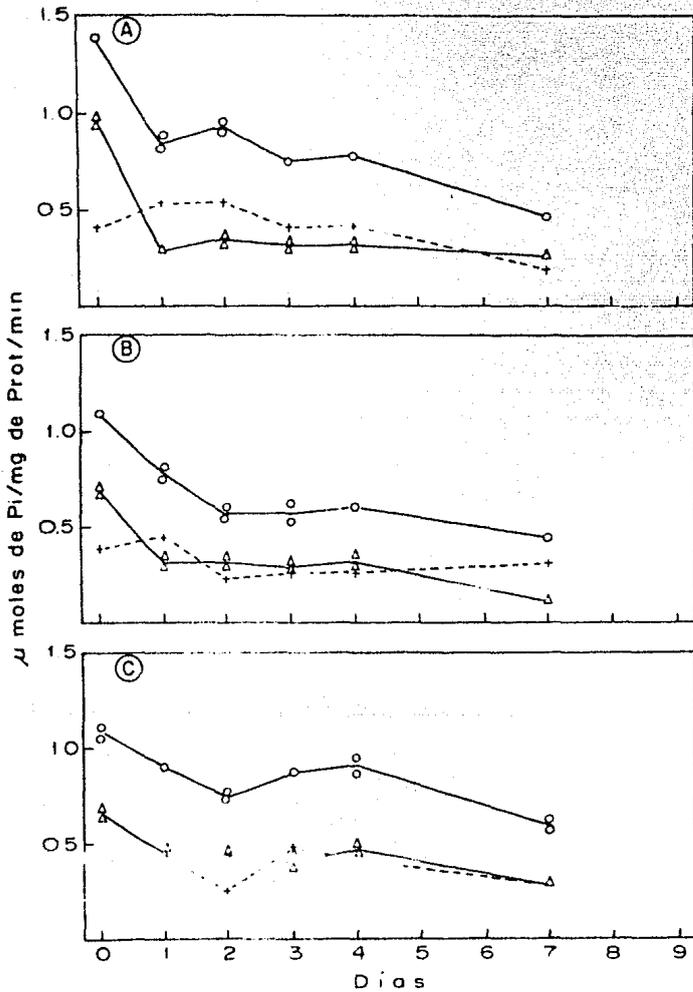


Figura 10.- Efecto de la temperatura de congelación a  $-18 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0.5$  y de los medios de conservación, sobre la actividad específica de la ATPasa de  $(\text{Ca}^{++}, \text{Mg}^{++})$ , de R.S. cardíaco. La ATPasa Total y la Basal disminuyen rápidamente, mientras que la de  $\text{Ca}^{++}, \text{Mg}^{++}$ , permanece casi constante pero con valores bajos en comparación a las figuras 9 y 11. El R.S. fué suspendido en: (A) medio isotónico, (B) medio hipertónico y (C) medio hipertónico con DMSO.

(-O-) ATPasa Total; (-A-) ATPasa Basal; (---) ATPasa de  $(Ca^{++}, Mg^{++})$ .

Esta pérdida de actividad se observa el día 1 de la preparación -- de las vesículas, la cual, para la ATPasa Total, disminuye desde valores de 1.1-1.4, hasta valores de 0.5  $\mu\text{mol}$  de Pi/mg. de proteína/----- minuto ---- aproximadamente; mientras que la ATPasa de  $(Ca^{++}, Mg^{++})$  permanece practicamente constante, con un valor medio de 0.4  $\mu\text{mol}$  de Pi/mg. de proteína/ minuto. La ATPasa Basal disminuye su actividad al día 1 y se mantiene en los días sucesivos a un nivel casi constante.

Los datos de actividad ATPásica encontrados a la temperatura de -- 7 °C<sup>±</sup> 1, son representados en la figura 11.

Para el medio I (figura 11-A), se nota una mayor pérdida de actividad con respecto a los casos anteriores e incluso, con respecto a los -- medios hipertónicos a 7 °C<sup>±</sup> 1. La actividad de la ATPasa Total disminuye aproximadamente desde valores que van de 1.1 hasta 0.4  $\mu\text{mol}$  de Pi/mg. - de proteína/minuto, durante los 7 días de experimentación, por otra parte, la ATPasa de  $(Ca^{++}, Mg^{++})$  disminuye también sus valores desde 0.8 hasta - 0.2  $\mu\text{mol}$  de Pi/mg. de proteína/minuto.

En el medio H, (figura 11-B), la actividad enzimática varía poco.- Para la ATPasa Total, el cambio es de aproximadamente 0.2  $\mu\text{mol}$  de Pi/mg. de proteína/minuto, mientras que la ATPasa de  $(Ca^{++}, Mg^{++})$  solo varía en 0.1  $\mu\text{mol}$  de Pi/mg. de proteína/minuto, mostrando ligeras fluctuaciones.

Para el Medio HD (figura 11-C), se observa una tendencia a mantener los

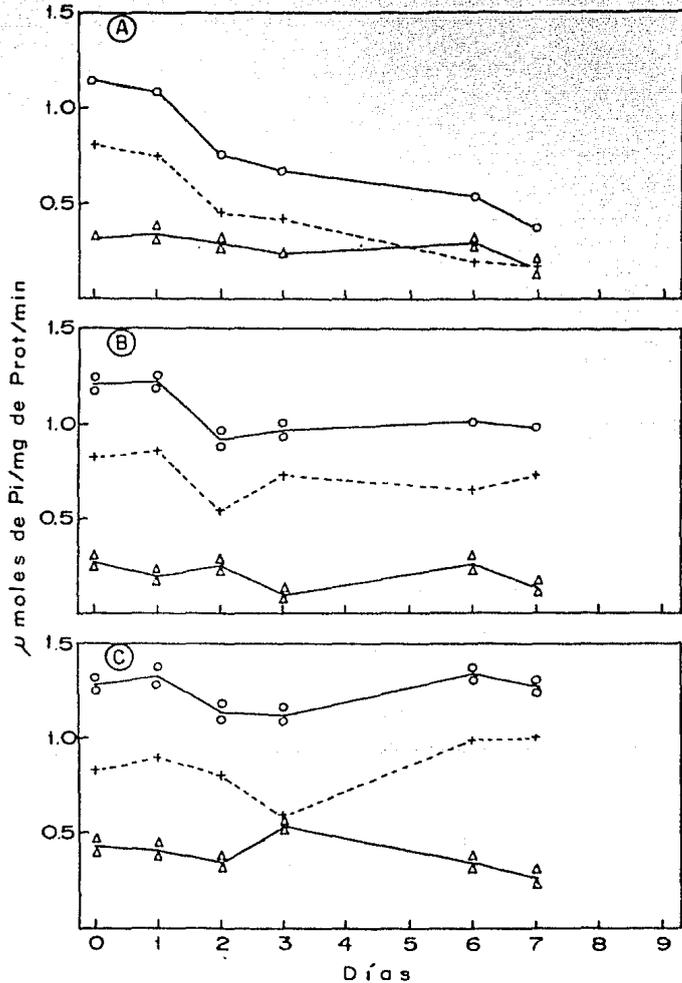


Figura 11.- Efecto de la temperatura de conservación de las vesículas de R.S. cardíaco mantenido a  $7^{\circ}C^{-1}$  y suspendidas en: (A) medio isotónico; (B) medio hipertónico y (C) medio hipertónico con DMSO. Nótese que en el medio isotónico (A), la actividad ATPásica se va perdiendo más rápidamente, mientras que en el medio hipertónico con DMSO (C) prácticamente no se altera. La actividad ATPásica se representó: ATPasa Total (-O-); ATPasa Basal (-Δ-) y ATPasa de  $(Ca^{++}, Mg^{++})$  (---+).

valores de actividad de la ATPasa Total; mientras que los de la ATPasa de  $(Ca^{++}, Mg^{++})$  tienden a incrementarse a  $0.2 \mu\text{mol}$  de  $Pi$ /mg. de Proteína/minuto.

Observamos para la ATPasa de  $(Ca^{++}, Mg^{++})$  una brusca disminución de la actividad al día 2 y 3, probablemente debido a fluctuaciones en las medidas.

La ATPasa Basal no se vió afectada ni por la temperatura de almacenamiento, ni por la tonicidad del medio en que fueron suspendidas las vesículas de R.S. durante todo el tiempo de experimentación.

Al comparar los resultados encontrados a  $-195.8 \text{ }^\circ\text{C}$  y  $-18 \text{ }^\circ\text{C} \pm 0.5$  (figuras 9 y 10), notamos un comportamiento diferente en ambos, a pesar de tratarse en los dos casos, de temperaturas de congelación; esto parece indicar que las diferencias halladas obedecen a cambios físicos y químicos en las vesículas y/o en el agua, debidas a velocidades de congelamiento diferentes y al nivel térmico que se alcanza en ambos casos.

#### Captación de $Ca^{++}$ .

Como se observa en la figura 12, la velocidad con que las vesículas de R.S. cardíaco transportan calcio, no sufre cambios drásticos con respecto al tiempo de envejecimiento, cuando son conservados en nitrógeno líquido ( $-195.8 \text{ }^\circ\text{C}$ , figura 12-A).

En la figura 12-A se observa que el R.S. mantenido en medio I y en  $N_2$  líquido, aumenta la velocidad de captación desde 55 nmoles del día 0, hasta 85 nmoles/mg. de proteína/minuto al día 3 y se estabiliza ulteriormente.

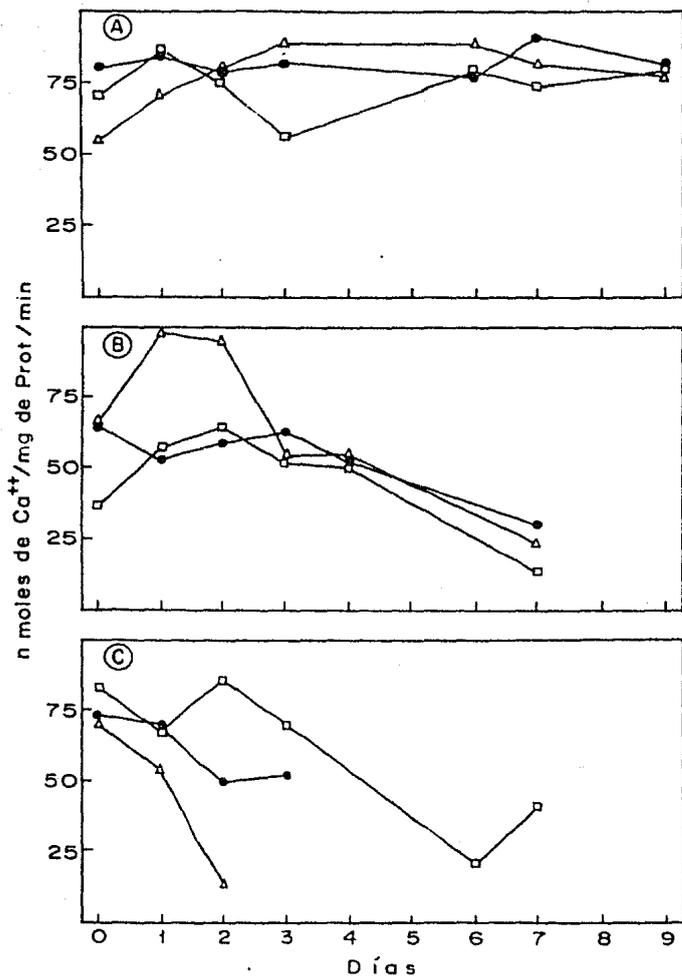


Figura 12.- Efecto de la temperatura de conservación sobre la velocidad de captación de  $\text{Ca}^{++}$  por el R.S. cardíaco (A) Conservación a  $-195.8\text{ }^{\circ}\text{C}$ ; (B) Conservación a  $-18\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0.5$ ; (C) Conservación a  $7\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1$ . Los medios de suspensión se representaron de la siguiente forma: ( $\Delta$ -) medio isotónico; ( $\square$ -) medio hipertónico; ( $\bullet$ -) medio hipertónico con DMSO. Obsérvese la excelente capacidad de captar  $\text{Ca}^{++}$  que se logra en (A).

En el medio HD se mantienen a un nivel de 80 n moles; mientras -- que el R.S. en medio H parece fluctuar, pero en general se mantiene --- alrededor de 75 n moles durante el período de seguimiento.

A la temperatura de -18 °C (figura 12-B), en los medios hipertó -- nicos H y HD, la velocidad de captación se mantiene alrededor de 60 n -- moles para esta preparación hasta el cuarto día de obtenido y al día 7 - observamos una disminución.

En el medio I parece haber una activación de los dos primeros días y luego vuelve a niveles iniciales para que el día 7 se encuentre ----- disminuido.

El R.S. mantenido a 7 °C (figura 12-C en cuarto frío, pierde con - relativa rapidez la propiedad de captar calcio. Al día 2, la velocidad - es del orden de 12 n moles para el medio I, mientras que en los medios - hipertónicos la actividad de captación se mantiene uno o dos días y ---- luego decae rápidamente.

Si comparamos la velocidad de captación con la actividad de la --- ATPasa, observamos que la pérdida en la primera (figura 12) es más ----- rápida y en mayor grado que la pérdida de la segunda (figura 9,10,11).-- Creemos que sea debido a un aumento de permeabilidad de la membrana que se hace porosa y el calcio que transporta la ATPasa, no puede almacenarse en el interior del R.S.. Deducimos de este comportamiento, que hay un - cambio inicial en la integridad de la membrana antes que un deterioro - de la actividad enzimática de la ATPasa de  $Ca^{++}$  y  $Mg^{++}$ .

### Ligamen de $\text{Ca}^{++}$ .

Como la figura 13 lo indica, la temperatura de nitrógeno líquido es la que mejor conserva las características de transporte de  $\text{Ca}^{++}$ .

Los niveles de ligamen se mantuvieron durante los nueve días de seguimiento independientemente de los medios de conservación empleados para suspender las vesículas. En los tres medios se nota un aumento de

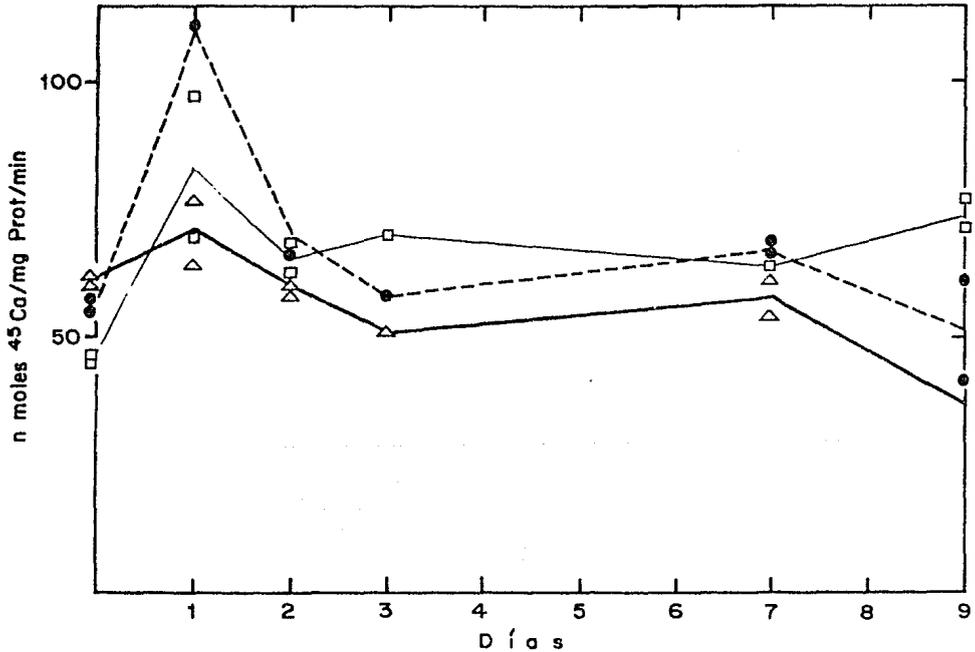


Figura 13.- Efecto de la temperatura de conservación a  $-195,8^\circ\text{C}$ , sobre la cantidad de calcio acumulada (Ligamen de  $\text{Ca}^{++}$ ) por el R.S. cardíaco, en diferentes medios de conservación: (- $\Delta$ -) medio I; (- $\square$ -) medio H y (- $\bullet$ -) medio HD. De los tres medios empleados, en el medio H se presentan características de conservación.

actividad el día 1, mismo que disminuye a partir del día dos, para ----

luego mantenerse en un rango constante que es mayor en el medio H ----- (70 n moles de  $^{45}\text{Ca}$ /mg. de proteína) y menor en el medio I (40-60 n ---- moles de  $^{45}\text{Ca}$ /mg. de proteína).

En el medio H es donde mejor se conserva la actividad.

A la temperatura de  $-18 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0.5$  el Ligamen resulta ser muy afecta - do. Como se observa en la figura 14, los valores de Ligamen de  $\text{Ca}^{++}$  son - ya bajos desde el día cero, lo cual nos indica que las vesículas obteni - das se deterioraron desde su preparación. El aumento de actividad -----

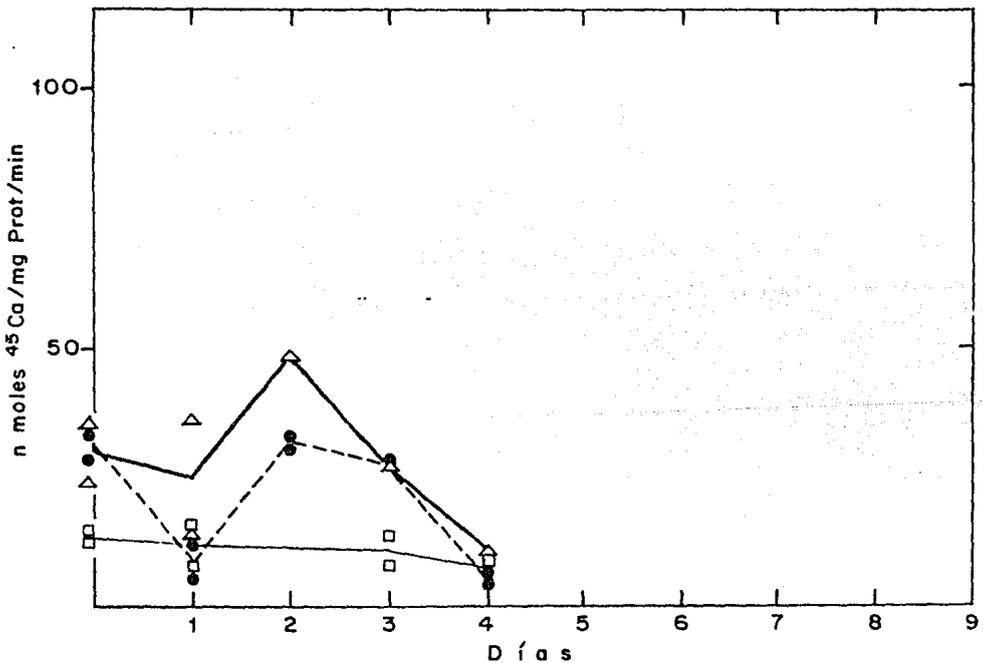


Figura 14.- Efecto de la temperatura de conservación a  $-18 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0.5$  sobre la capacidad de las vesículas de R.S. cardiaco para ligar  $\text{Ca}^{++}$ . A pesar de los valores tan bajos, se presenta una li - gera tendencia a conservarse durante los dos primeros días - para luego decaer aún más. La representación de los medios - de suspensión empleados es : (Δ) medio I; (□) medio H y (●) medio HD.

que se observa en las anteriores gráficas al día 1, en este caso se -- presenta hasta el día 2 y solo lo exhiben las vesículas suspendidas - en los medios I y HD, ya que las del medio H aunque se mantienen con - actividad constante, los niveles son sumamente bajos (12 n moles de --  $^{45}\text{Ca}/\text{Mg. de proteína}$  ). En los tres casos, la capacidad de Ligamen del R.S. cardiaco cae rápidamente del segundo al cuarto día de su prepara- ción.

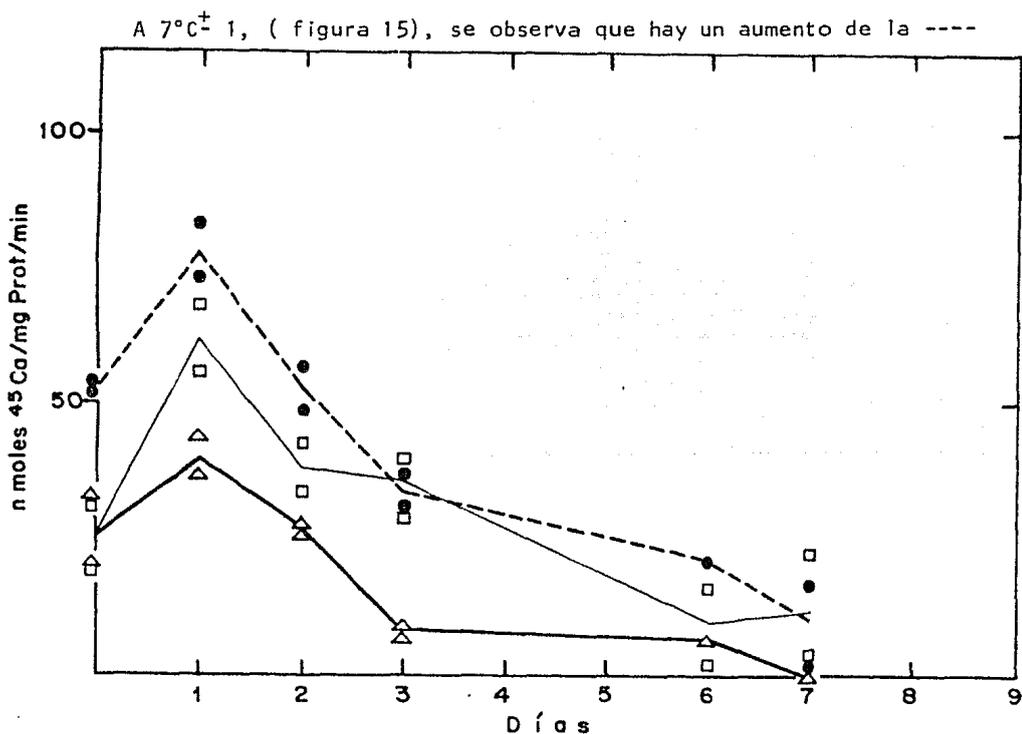


Figura 15.- Disminución del Ligamen de  $\text{Ca}^{++}$  del R.S. cardiaco cuando es conservado a  $7^{\circ}\text{C}^{\pm 1}$  en tres diferentes medios de suspen- ción : (-Δ-) medio I; (-□-) medio H y (-●-) medio HD.. A partir del 1 se presenta una pérdida constante de la --- capacidad de Ligamen de  $\text{Ca}^{++}$  en los tres casos. Las vesícu- las suspendidas en el medio HD presentan valores más ele- vados que los dos medios restantes.

actividad de ligamen de  $\text{Ca}^{++}$  al día 1 en cualquiera de los medios, - como habíamos observado en las vesículas mantenidas en nitrógeno líquido.

En el medio HD se mostró una mejor conservación del ligamen de  $\text{Ca}^{++}$ , mientras que en el medio I ocurre lo contrario, su actividad se pierde totalmente al día 7.

#### Determinación de la variación en la composición protéica.

##### Electroforesis.

El análisis electroforético no reveló la existencia de alguna -- degradación de las proteínas presentes en las vesículas de R.S. cardíaco por enzimas con actividad de proteasa, en ninguna de las condiciones de experimentación probadas.

Como se ve en la figura 16, las bandas que aparecen en los geles que se corrieron en el día de la preparación de los microsomas, son -- las mismas que aparecen siete días después, por tanto, la pérdida de - actividad microsomal no es debida a proteólisis.

La composición proteica del R.S. cardíaco que se muestra en la - figura 17, concuerda con lo descrito en la bibliografía.

En general, la membrana de las vesículas de R.S. cardíaco que se trabajaron, están constituidas por las siguientes proteínas, cuyo --- peso molecular medio (en daltones) es el siguiente :

- 1.- Proteína de 140,000 daltones.
- 2.- ATPasa dependiente de  $\text{Ca}^{++}$  de 100,000 daltones.
- 3.- Proteína de 81,000 daltones.

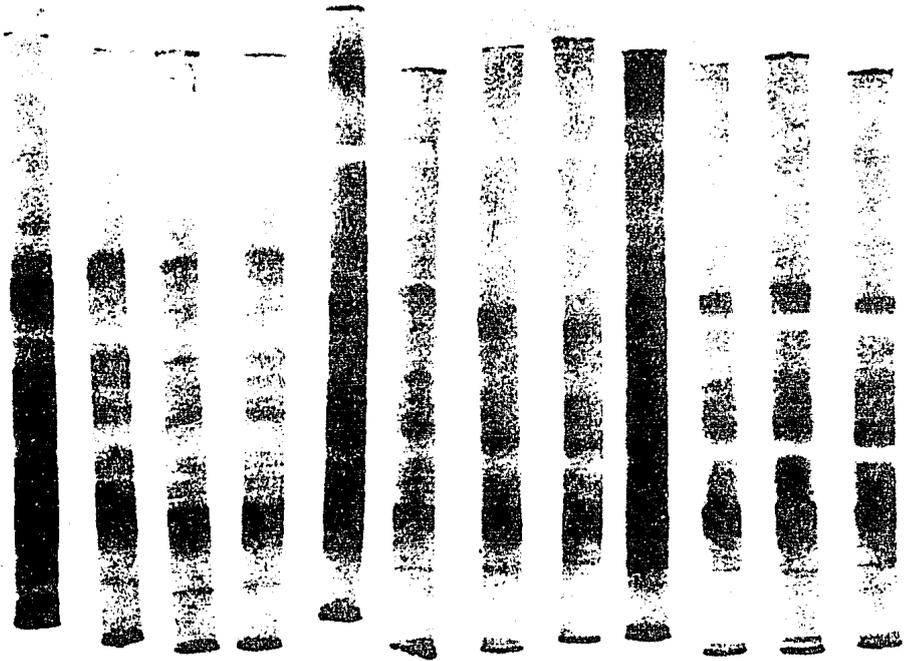


Figura 16.- Representación fotográfica de la variación en la composición proteica observada en geles de poliacrilamida (53). - Los geles están agrupados de tres en tres de izquierda a derecha. El primer grupo de geles representa las muestras-control (día 0), el segundo, tercero y cuarto grupos ---- representan muestras de vesículas de R.S. cardíaco mantenidas a 7 °C- 1, - 18 °C- 0.5 y - 195.8 °C respectivamente, muestreadas durante el día 7 de su preparación. Se observa en todos los casos, la presencia del mismo número y tipo de bandas protéicas.

- 4.- Proteína de alta afinidad por el calcio, de 56,000 daltones.
- 5.- Calsecuestrina de 46,000 daltones.
- 6.- Proteína de 38,000 daltones.
- 7.- Fosfolamban de 23,000 daltones.

De las proteínas 3 y 6, no se conoce su función.

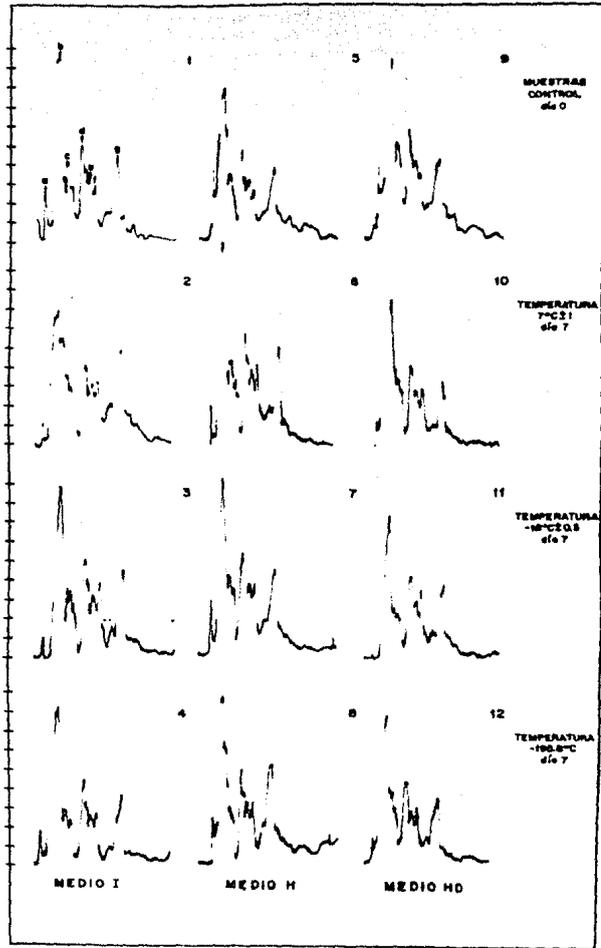


Figura 17.- Diagrama electroforético de vesículas de R.S. cardíaco. - Las muestras fueron tomadas al inicio de la preparación y 7 días después de almacenadas a diferentes temperaturas y medios de conservación. Los diferentes picos corresponden a las proteínas constituyentes del R.S. cardíaco. El peso molecular (P.M.  $\times 10^{-3}$  daltones) medio de las proteínas - es: a)  $140.5 \pm 13.5$ ; b)  $100.5 \pm 15.7$ ; c)  $81.1 \pm 11.0$ ; d)  $56.3 \pm 10$ ; e)  $45.9 \pm 6.6$ ; f)  $38.4 \pm 7.7$ ; g)  $23.3 \pm 7.5$ . Se utilizaron como referencia proteínas de P.M. de 100,000; 69,000; y 36,000.

### Determinación de la Peroxidación de lípidos membranales.

Es bien aceptado que las biomembranas y organelos subcelulares son susceptibles a que sus lípidos sufran peroxidaciones y como resultado se rompen los ácidos grasos insaturados y se degrada la estructura y funciones de la membrana. Cuando las biomembranas, tales como las de los microsomas y mitocondrias sufren peroxidación lipídica los ácidos grasos poliinsaturados en los fosfolípidos de la membrana se rompen a nivel de los dobles enlaces; dando como resultado, la formación de aldehídos (41), con la consecuente destrucción de la estructura membranal y la liberación de las enzimas unidas a la membrana (41,30).

La desintegración peroxidativa de las membranas se previene por diversos antioxidantes de tipo endógeno, el más representativo de éstos es el  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E) (41).

En la tabla I se muestran los resultados obtenidos en los experimentos de peroxidación de lípidos membranales de R.S. cardíaco, en donde se observa un mayor grado de deterioro de los lípidos a la temperatura de  $7 \pm 1$  °C.

A la temperatura de  $-18 \pm 0.5$  °C, también se encontró que la reacción de degradación lipídica se lleva a cabo, pero en una proporción menor con respecto a la temperatura de 7 °C y mayor que a 195.8 °C. Atribuimos este comportamiento a la velocidad del proceso de congelamiento; éste por sí mismo, es un factor que gobierna la calidad de las vesículas de R.S.

Si la muestra es congelada lentamente ( como sucede a  $-18$  °C ), el agua intervesicular es removida hacia el exterior, dando lugar a

PEROXIDACION DEL R.S. DE CORAZON

Temperatura	-195.8°C			-18°C ± 0.5			7°C ± 1		
Día	I	H	HD	i	H	HD	I	H	HD
0	3.132	1.450	2.693	3.132	1.450	2.693	3.132	1.450	2.693
2	3.170	1.307	2.536	3.501	2.900	3.207	1.194	3.040	3.207
7	3.163	1.592	2.784	5.770	4.705	5.069	16.252	11.230	11.903

\* Los valores están expresados como porcentaje del valor máximo de peroxidación por mg de proteína.

Tabla 1.- Se representa la variación temporal del % de peroxidación de los lípidos membranales en función de la temperatura de conservación y del medio de suspensión utilizado. Obsérvese la constancia en los valores correspondientes a las muestras de R.S. sometidas a -195.8 °C bajo cualquiera de los medios utilizados

la formación de grandes cristales y provocando probablemente, daño mecánico a las paredes membranales. Contrariamente, la rapidez de congelamiento ocasiona que se retenga más agua en el interior de las vesículas y los cristales intervesiculares que se forman son más pequeños. (29)

El proceso de deshidratación intravesicular tubo por objeto ----- minimizar las reacciones de degradación químicas y bioquímicas al ----- reducir la actividad del agua muy por debajo de los niveles que previenen los cambios que deterioran, como los de peroxidación de lípidos. Esto - lo logramos, al suspender las vesículas de R.S. en medios hipertónicos y mediante la adición del DMSO. (29)

Los resultados experimentales demuestran que en un medio isotónico, la reacción de peroxidación es mayor que cualquiera de las condiciones de temperatura probadas; mientras que en el medio hipertónico, el ----- porcentaje de peroxidación obtenido fué menor.

También se observó que la adición del DMSO al medio hipertónico - preserva ligeramente el estado de la membrana vesicular.

#### Determinación de la liberación de fosfatos lábil (Pi).

Simultáneamente a la determinación del grado de peroxidación, se determinó la presencia de fosfato proveniente de los fosfolípidos membranales, los cuales, en el caso de que hubiera liberación de fosfolipasas durante el proceso de envejecimiento, éstas podrían romper el enlace ester que une a los ácidos grasos con el fosfato, liberando consecuentemente el fosfato en forma de Pi o ester de fosfato.

Los resultados obtenidos demostraron que no se liberaba Pi en ninguno de los casos (los resultados numéricos se omitieron ya que correspondían a cero n moles de Pi/mg de proteína); esto nos prueba que no hay degradación importante de los lípidos además de la peroxidación."

#### Influencia de la velocidad de congelación.

Puesto que las muestras congeladas a diferentes temperaturas exhibieron comportamientos distintos, pensamos que las diferencias encontradas obedecían probablemente a la velocidad con que se realiza cada operación; por ello, se sometieron diversas muestras de R.S. cardiaco - suspendidas en un mismo medio (H), a tres diferentes condiciones :

- a).- Congelamiento únicamente en nitrógeno líquido.
- b).- Congelamiento en nitrógeno líquido y conservación a  $-18\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0.5$
- c).- Congelamiento y conservación a  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Las observaciones realizadas indican que en los medio ----- hipertónicos, en los que la concentración de sacarosa es alta, el punto de congelamiento desciende considerablemente y en particular las ----- muestras que contenían DMSO y que se sometieron a  $-18^{\circ}\text{C}$ , se mantuvie - ron aún líquidas durante varias horas.

El congelamiento y descongelamiento de las muestras de R.S. ----- ocasiona su deterioro por formación de cristales de agua que daña la -- membrana.

Finalmente, los resultados obtenidos en la determinación de la -- actividad ATPásica en función de la velocidad de congelamiento reveló - que la pérdida de la actividad del R.S. se ve afectada solo parcial --- mente, por la velocidad de congelamiento; estos datos nos sugirieron -- que los cambios de actividad enzimática debieran estar influenciados, - más que por la velocidad de congelamiento, por cambios físicos en el -- agua, la cual constituy el medio de suspensión de los microsomas.

Determinación de la densidad del agua a la temperaturas de congelación  
empleadas en la conservación de las vesículas de R.S.C.

Los resultados de velocidad de congelamiento dieron lugar a que - se pensara en posibles cambios en las propiedades del agua, la cual --- constituye el medio circundante de los microsomas; para probar lo ----- anterior, se hicieron una serie de experimentos destinados a revelar -- posibles cambios importantes en la densidad del agua.

La tabla II resume los experimentos sobre los cambios en la -----

densidad del agua y puede apreciarse perfectamente que a medida que --  
 desciende la temperatura, los valores en la densidad del solvente puro  
 descienden desde 1.013 gr/cm<sup>3</sup> a 20 °C, hasta 0.915 gr/cm<sup>3</sup>. a -195.8 °C  
 lo cual constituye un cambio importante que en definitiva está en ----  
 función del arreglo cristalino del agua y que posiblemente es lo que --  
 origina que se formen diferentes tipos de cristales a las dos tempe --  
 raturas de congelación empleadas y de que ésto sea la causa del -----  
 diferente comportamiento que se observa.

T A B L A II

Temperatura ( °C )	Densidad Aparente (gr/cm <sup>3</sup> )	Volumen del agua (cm <sup>3</sup> )	Densidad Real (gr/cm <sup>3</sup> ) *
20	1.014 <sup>±</sup> 0.0048	9.867 <sup>±</sup> 0.0074	1.013 <sup>±</sup> 0.010
-18	0.949 <sup>±</sup> 0.0082	10.537 <sup>±</sup> 0.009	0.950 <sup>±</sup> 0.012
-195.8	0.909 <sup>±</sup> 0.0039	10.991 <sup>±</sup> 0.0069	0.915 <sup>±</sup> 0.010

Tabla II.- Se representan las variaciones de densidad y volumen del --  
 agua, a las temperaturas de congelación empleadas para ----  
 conservar los microsomas de R.S. cardiaco. La temperatura --  
 de 20 °C se empleó como referencia. Muestras de agua conte-  
 nidas en tubos de vidrio de 25 x 0.8 cms., fueron sometidas  
 a las temperaturas señaladas; se midieron las variaciones --  
 en el volumen del líquido y los resultados se evaluaron de-  
 acuerdo a :  $V_T = V_0(1 + \alpha T)$ ; donde  $V_0$  es el volumen del agua  
 a 20 °C y  $V_T$  el volumen ocupado por el agua a la temperatu-  
 ra T,  $\alpha$  es el coeficiente de expansión cúbica.

\* Estos valores ya excluyen la disminución de densidad debida a la --  
 contracción del vidrio. T expresa la diferencia de temperatura en --  
 °C.

## D I S C U S I O N

Como hemos visto, la pérdida de la actividad microsomal obedece a varios factores. La peroxidación de los lípidos membranales es el principal factor que hemos encontrado que provoca que la ATPasa de  $(Ca^{++}, Mg^{++})$  pierda su capacidad de transportar  $Ca^{++}$  al lumen de los microsomas.

La formación de diferentes tipos de cristales de agua cuando las muestras de R.S. son sometidas a las temperaturas de  $-18\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5$  y de  $-195,8\text{ }^{\circ}\text{C}$ , es otra de las causas importantes encontradas.

Los resultados de peroxidación de lípidos que corresponden al día cero (día de la preparación), son indicativos de que durante el proceso de obtención de las vesículas, la reacción peroxidativa se está llevando a cabo, por lo que ya desde ese momento, la membrana se daña y como consecuencia, la ATPasa de  $(Ca^{++}, Mg^{++})$  va perdiendo su capacidad natural de transporte  $Ca^{++}$  al interior de la vesícula. Esta capacidad del R.S. es la que se ha querido mantener y para lo cual hemos probado diferentes sistemas de temperatura y medios de suspensión de las vesículas.

La conservación de la actividad de la ATPasa de  $(Ca^{++}, Mg^{++})$  fue encontrada en los medios hipertónicos de las temperaturas de  $-195,8\text{ }^{\circ}\text{C}$  y de  $7\text{ }^{\circ}\text{C}$ , siendo la primera temperatura la que resultó ser óptima; incluso cuando se midió la velocidad de transporte del  $Ca^{++}$  (captación) y la cantidad de este catión transportado (Ligamen).

El congelamiento a  $-18^{\circ}\text{C}$  muestra que existen factores que ocasionan la pérdida de las actividades biológicas del R.S. que hemos medido.

La importancia que tienen los medios en que fueron suspendidos -- los microsomas, está en función de su propiedad de formar cristales de agua cuando son congelados, así como de la velocidad con que se efectúa este proceso.

Obviamente, un medio isotónico se congela rápidamente y el tipo de cristales que puede formar depende de la velocidad de congelación; -- si lo sometemos a un sistema térmico de  $-18^{\circ}\text{C}$ , los cristales formados son muy semejantes a los que forma el agua pura bajo las mismas condiciones, mientras que en los medios hipertónicos, la elevada concentración de solutos hace que disminuya considerablemente su punto de congelación.

## C O N C L U S I O N E S

Se ha visto a través de este trabajo, que las dificultades acerca de la conservación de] R.A. de músculo cardiaco, se han podido superar al mejorar las condiciones para la susodicha conservación.

Es claro, que de las tres temperaturas ensayadas, es la de nitrógeno líquido la que mejor nos preserva las características biológicas de los microsomas, tanto a nivel de ATPasa, como a nivel de transporte.

Se ha visto también que el deterioro de la actividad microsomal se lleva a cabo mediante dos diferentes procesos principalmente, el primero involucra la formación de cristales fuera de la membrana y dependiendo del tipo de éstos, va a provocar un mayor o menor daño mecánico en la integridad membranal; el segundo es el provocado por la peroxidación de los lípidos membranales. Esta última aseveración esta basada en que fué el único factor deteriorativo que se encontró que aumentaba al tiempo en que la actividad microsomal disminuía.

Por otra parte, se pudo apreciar que la presencia de DMSO para la preservación de las vesículas, no es muy necesaria, ya que basta con un medio hipertónico para vaciar el agua intravesicular, lo que en el último de los casos, no es la causa de la formación de cristales deteriorativos de la membrana.

El tiempo en el cual se ha verificado la conservación de las vesículas (7 a 9 días), es suficientemente largo como para poder realizar estudios más significativos de las propiedades del R.S. cardíaco.

De acuerdo a lo anterior, pensamos que la solución a los problemas de peroxidación, podría ser mediante la adición de antioxidantes naturales del tipo  $\alpha$ -tocoferol (41) o bien, manteniendo las muestras en una atmósfera inerte; sin embargo, todos estos cuidados parecen innecesarios si se cuenta con un sistema de congelación por nitrógeno líquido u otro medio de congelamiento rápido.

RETICULO SARCOPLASMICO CARDIACO,  
CONSERVACION Y EFECTO DE CATIONES  
DIVALENTES EN EL TRANSPORTE DE  $\text{Ca}^{2+}$ .

## I N T R O D U C C I O N

Durante el proceso evolutivo de la vida, se han ido seleccionando diferentes sistemas de transporte de cationes, que necesitan la energía del enlace de los grupos fosfatos del ATP para ser movidos a través de la fase hidrofóbica de las membranas.

Razones desconocidas han seleccionado a pocos cationes entre los numerosos existentes, para cumplir funciones específicas en el proceso vital.

El problema de la selección de los cationes por superficies cargadas, fué tratado y desarrollado por Eisenman (7) y Sherry (30) en 1965 y 1968 respectivamente. Una buena revisión de éstos y otros trabajos, están en Diamond y Wright (6).

Estos trabajos se basan en las interacciones de tipo Coulomb entre los cationes y los sitios cargados negativamente de las superficies biológicas, formados por componentes de la membrana.

Los cationes más estudiados, sobre todo por que cumplen funciones específicas en los sistemas biológicos, son los del grupo I A y II A de la tabla periódica de los elementos.

La fuerza iónica influye decisivamente sobre la atracción ejercida entre un catión y un sitio de fijación cargado negativamente. A su vez, tal fuerza está en función principalmente, de dos factores importantes, el volumen iónico y la energía de hidratación ( $\Delta H_L$ ).

En la tabla III, se muestra en forma resumida, las principales -- características de los cationes divalentes y se ve claramente la ----- tendencia a aumentar el radio iónico, a medida que aumenta el número -- atómico en un mismo período. Asimismo, en la tabla IV se observa la --- tendencia de los radios iónicos hidratados, la cual varía inversamente- al radio iónico del cristal.

Configuración electrónica												
Átomos	3s <sup>2</sup>	4s <sup>2</sup>	5s <sup>2</sup>	6s <sup>2</sup>	3d <sup>4</sup> 4s <sup>2</sup>	3d <sup>6</sup> 4s <sup>2</sup>	3d <sup>8</sup> 4s <sup>2</sup>	3d <sup>10</sup> 4s <sup>2</sup>	3d <sup>10</sup> 4f <sup>1</sup>	4d <sup>10</sup> 5s <sup>2</sup>	5d <sup>10</sup> 6s <sup>2</sup>	
Cationes	2p <sup>6</sup>	3p <sup>6</sup>	4p <sup>6</sup>	5p <sup>6</sup>	3d <sup>2</sup>	3d <sup>4</sup>	3d <sup>6</sup>	3d <sup>8</sup>	3d <sup>8</sup>	4d <sup>8</sup>	5d <sup>8</sup>	
	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
	Mg	Ca	Sr	Ba	Mn	Fe	Co	Ni	Cu	Zn	Cd	Hg
Radio iónico Å	0.65	0.99	1.13	1.35	0.80	0.83 <sup>1</sup>	0.74	0.78 <sup>1</sup>	0.72	0.74	0.97	1.1
Volumen Å <sup>3</sup>	1.15	4.06	6.04	10.31	2.14		1.70		1.56	1.70	3.82	5.58
Densidad de carga $\frac{Z}{V}$	1.74	0.49	0.33	0.19	0.93		1.18		1.28	1.18	0.52	0.36

Tabla III.- Configuración electrónica, radio iónico, volumen y densidad de carga de los átomos y cationes de los elementos del ---- grupo II-A, II-B y de algunos elementos del cuarto período; considerando los cationes no hidratados. Datos de la ----- literatura.

T A B L A I V

Comparación entre los radios iónicos y los radios hidratados de los cationes del I A y II A grupos de la tabla periódica.

Catión	Radio del Cristal (A°)	Radio del Catión Hidratado (A°)	$\frac{\text{mol de H}_2\text{O}}{\text{mol de Catión}}$
Li <sup>+</sup>	0.60	7.3	11 - 13
Na <sup>+</sup>	0.95	5.6	9 - 13
K <sup>+</sup>	1.33	3.8	5 - 6
Rb <sup>+</sup>	1.48	3.6	----
Cs <sup>+</sup>	1.69	3.6	----
Mg <sup>++</sup>	0.65	10.8	10 - 23
Ca <sup>++</sup>	0.99	0.6	19 - 22
Sr <sup>++</sup>	1.13	9.6	18 - 20
Ba <sup>++</sup>	1.35	8.8	18 - 20

Observese que para cationes de igual carga, los de mayor radio se encuentran más hidratados, por lo que el radio aparente hidratado sigue un orden inverso al del radio del cristal.

Por otra parte, los cationes divalentes están más hidratados que los monovalentes.

### SELECTIVIDAD DE CATIONES.

El calcio tiene un papel central en el proceso de la contracción muscular y es del todo imprescindible en la contracción del miocardio (28). Además del calcio, otro catión divalente existe en concentraciones aún mayores en los sistemas vivos y es su vecino y próximo pariente del grupo II-A de la tabla periódica, el  $Mg^{++}$ .

Desde hace tiempo se sabe que el  $Sr^{++}$  puede substituir al calcio durante la concentración del músculo esquelético y el cardíaco (15,29).

Otros cationes a parte del  $Ca^{++}$ ,  $Mg^{++}$  y  $Sr^{++}$  pueden estimular la hidrólisis del ATP en preparaciones de sarcolema, mitocondrias y fracción microsomal del corazón de la rata (3), como son el  $Mn^{++}$ ,  $Co^{++}$  y  $Ba^{++}$ .

La ATPasa de calcio del R.S., necesita para ser activa no sólo el calcio, que es el catión modulador, sino al  $Mg^{++}$  y un catión monovalente como el  $K^+$  (27).

Otras ATPasas como la de  $Na^+$  y  $K^+$  de las membranas plasmáticas, poseen sitios para estos dos cationes pero además para el  $Mg^{++}$  el calcio en este caso particular, inhibe la actividad ATPásica (32).

Si suponemos cualquier sitio cargado negativamente en la superficie de una membrana y expuesto al medio acuoso que lo rodea, este sitio tendrá afinidad para unirse por atracción mediante fuerzas de Coulomb con los cationes y con las moléculas con cargas positivas que estén disueltas en la fase acuosa.

De todos los posibles cationes se selecciona por lo general uno de ellos y el catión preferido por ese sitio será el que produzca la mayor disminución de la Energía Libre ( $\Delta G$ ), para el sistema sitio-catión, cuando se unan en la superficie de la molécula que posee el sitio con carga negativa (7-13).

A las fuerzas de atracción de Coulomb entre el sitio cargado negativamente y el catión, se oponen las energías de hidratación de los cationes y probablemente, la de hidratación del sitio de carga negativa. En el caso del R.S. el sitio de fijación del  $\text{Ca}^{++}$  parece estar en una zona hidrófoba, ya que para eliminar el  $\text{Ca}^{++}$  unido, se requiere de un agente quelante como el EGTA y también, de un ionóforo hidrofóbico como el A=23187 (26).

La fuerza del campo eléctrico del sitio cargado negativamente de la membrana, es en definitiva el factor principal en la selección de un catión particular y por lo tanto, quien determinará el descenso en  $\Delta G$  durante la interacción del sitio-catión.

Podemos imaginar dos casos extremos en cuanto a la fuerza del campo eléctrico de un sitio de superficie membranal.

Si tenemos un sitio con fuerzas de campo eléctrico muy pequeña, éste no podrá quitar el agua de los cationes que estén más fuertemente hidratados; es decir, los cationes que tengan menor radio iónico en los grupos I-A y II-A. Así pues, los cationes más voluminosos con un radio iónico mayor y por lo tanto con menor energía de hidratación, serán los seleccionados por los sitios que poseen fuerzas de campo eléctrico débiles.

Las series de preferencia de los cationes serán  $Cs^+ > Rb^+ > K^+ > Na^+ > Li^+$  para el grupo I-A y  $Ba^{++} > Sr^{++} > Ca^{++} > Mg^{++}$  para el grupo II-A.

El otro caso extremo, será un sitio de superficie de membrana que posea una gran fuerza de campo electrónico. La disminución de la energía libre al interactuar el sitio y el catión debe ser suficiente como para deshidratar al catión, es decir, la energía de interacción del sitio-catión es mayor que la energía de solvatación de los cationes. Por otra parte, como la energía de interacción es mayor cuando menor sea el radio iónico, los cationes de radio iónico pequeño tendrán una interacción mayor con el sitio, que los cationes de mayor radio iónico y en este tipo de sitios con fuerzas de campo eléctrico grandes, se seleccionarán los cationes según las series en que los cationes se ordenan de acuerdo al radio iónico creciente:  $Li^+ > Na^+ > K^+ > Rb^+ > Cs^+$  para el grupo I-A y  $Mg^{++} > Ca^{++} > Sr^{++} > Ba^{++}$  para el grupo II-A.

Obviamente, la teoría de Eisenman y Sherry supone que para fuerzas de campo eléctrico intermedias, el orden de selectividad de los cationes serán series intermedias entre las fuerzas débiles y fuertes de los campos eléctricos

Sin embargo, no todas las series de posibles permutaciones se observan en la práctica. Para los cinco cationes del grupo I-A se tienen  $5! = 120$  permutaciones posibles.

Sin embargo, de ellas solamente 11 son las series que aparecen casi constantemente, no sólo en sistemas biológicos sino en sistemas orgánicos e inorgánicos, como por ejemplo electrodos selectivos para alguno de los cationes; la primera es la serie liotrópica que se ordena según el radio hidratado de los iones.

Los cuatro cationes del grupo II-A se pueden ordenar en  $4! = 24$  series diferentes: solamente se han observado siete de ellas y que fueron predichas por Sherry (31) para sitios muy próximos en superficies (6):

I:	Ba <sup>++</sup> > Sr <sup>++</sup> > Ca <sup>++</sup> > Mg <sup>++</sup>	(Serie liotrópica)
II:	Ba <sup>++</sup> > Ca <sup>++</sup> > Sr <sup>++</sup> > Mg <sup>++</sup>	
III:	Ca <sup>++</sup> > Ba <sup>++</sup> > Sr <sup>++</sup> > Mg <sup>++</sup>	
IV:	Ca <sup>++</sup> > Ba <sup>++</sup> > Mg <sup>++</sup> > Sr <sup>++</sup>	
V:	Ca <sup>++</sup> > Mg <sup>++</sup> > Ba <sup>++</sup> > Sr <sup>++</sup>	
VI:	Ca <sup>++</sup> > Mg <sup>++</sup> > Sr <sup>++</sup> > Ba <sup>++</sup>	
VII:	Mg <sup>++</sup> > Ca <sup>++</sup> > Sr <sup>++</sup> > Ba <sup>++</sup>	(Serie deshidratada)

La serie I sería la que se seleccionara por los sitios de fuerza de campo electrónico débil y I-VII, por sitios de fuerza de campo eléctrico fuertes. En la I predominan las energías de hidratación mientras que en la VII la energía de interacción sitio-cación es mayor que las energías de hidratación. Esta es una interpretación sencilla que está de acuerdo con la mayor parte de los datos experimentales, según la revisión de Diamond y Wright (6); sin embargo, estudios más recientes en los que se consideran múltiples grupos funcionales para la unión de un solo catión en el sitio de la superficie membranal, hacen intervenir no solamente las fuerzas coulombianas de atracción y las energías de hidratación, sino también la deformabilidad del sitio y la coordinación de los múltiples grupos del sitio con el catión.

Se ha estudiado el efecto de máxima coordinación de los cationes con compuestos macrocíclicos y se ha visto que la disminución de la energía libre debida a la deformación del sitio al coordinarse con los cationes, contribuye de forma importante en el cambio total de la energía libre del sistema sitio-catión (22,35).

Será pues necesario modificar la teoría de Eisenman y Sherry incluyendo, para sitios con múltiples grupos funcionales, la deformabilidad del sitio, las dimensiones del sitio delimitadas por los grupos funcionales que intervienen y la coordinación máxima del catión con los grupos funcionales en el espacio delimitado por ellos.

Hay que suponer que el sitio no es totalmente rígido y que sólo puede deformarse dentro de ciertos límites impuestos obviamente por las uniones de los grupos funcionales con átomos o grupos de átomos vecinos así como por las restricciones estéricas del sistema en su conjunto.

Así pues, en una solución acuosa, los cationes están hidratados. El mayor descenso en la energía libre se dará cuando las moléculas de agua del catión sean reemplazadas por los grupos funcionales del sitio.

Para un sitio de dimensiones intermedias, un catión de radio iónico grande estará impedido estéricamente de posicionarse correctamente en el sitio para alcanzar una coordinación óptima sin deformar excesivamente el sitio. Los cationes de radio iónico pequeño también tendrán que perder agua de hidratación y esto dependerá de la fuerza del campo eléctrico del sitio, pero además, el sitio tendrá que deformarse para adaptarse a un volumen menor, delimitado por los grupos funcionales para poder coordinarse, lo cual será tanto más difícil cuanto menor sea la deformabilidad del sitio.

Por esta razón, el valor mayor de disminución en energía libre -- se dará, en general, para un solo catión que reúna las condiciones de - 1). Substituir las moléculas de agua de hidratación por los grupos del sitio de fijación y 2). Cuando alcance el máximo de coordinación con los grupos del sitio con la menor deformación del mismo.

Se han realizado relativamente pocos estudios del efecto de ---- cationes divalentes sobre el R.S., por ejemplo, Mac Lennan (19) ensayó el efecto de varios cationes como substitutos del  $\text{Ca}^{++}$  y del  $\text{Mg}^{++}$ , ---- usando una sola concentración,  $50 \mu\text{M}$ , Además del  $\text{Ca}^{++}$  parecen estimular el  $\text{Mn}^{++}$  y el  $\text{Sr}^{++}$  y no encuentran casi efecto por el  $\text{Mg}^{++}$ ,  $\text{Ba}^{++}$  y  $\text{Co}^{++}$ , siendo muy inhibidores el  $\text{Cd}^{++}$ ,  $\text{Cu}^{++}$  y  $\text{Zn}^{++}$ . Sin embargo, estos resultados están sujetos a dudas razonables, ya que las concentraciones utilizadas fueron de  $5 \text{ mM}$  para el efecto del  $\text{Mg}^{++}$  y el efecto global puede ser la adición de efectos activatorios e inhibitorios puesto que ----- existen dos sitios sobre la enzima, específicos de  $\text{Mg}^{++}$  y  $\text{Ca}^{++}$  y además el  $\text{ATP-Mg}^-$  es el verdadero sustrato, siendo por ejemplo, el complejo --  $\text{ATP-Ca}^-$  fuertemente inhibitorio,  $K_i = 2 \mu\text{M}$  (37).

Otro estudio comparativo del efecto de cationes divalentes sobre mitocondrias, sarcolema y microsomas (R.S.), es el de Anand et al (3);- sin embargo, de nuevo es objeto de dudas ya que las concentraciones de diversos cationes usados es  $4 \text{ mM}$  e incluso, el  $\text{Sr}^{++}$  es inhibidor a ---- estas concentraciones en los microsomas enriquecidos en R.S.

Un estudio más serio concierne al transporte del  $\text{Sr}^{++}$ , por ----- Mernier y Hasselbach (20), en el que se observan que el  $\text{Sr}^{++}$  se transporta más rápidamente que el  $\text{Ca}^{++}$ .

La velocidad de acumulación del  $\text{Sr}^{++}$  es aparentemente lineal ---- hasta concentraciones de  $\text{Sr}^{++}$  del orden de mM. La estequiometría del --  $\text{Sr}^{++}$  transportado por ATP hidrolizado es de 1 a diferencia del  $\text{Ca}^{++}$  que es 2.

Este estudio y los realizados en músculo, muestran que el  $\text{Sr}^{++}$  -- substituye con eficacia al  $\text{Ca}^{++}$  (15,29), observándose similitudes entre ambos cationes.

El objetivo final de nuestro trabajo es comparar el comportamiento de los cuatro cationes divalentes del grupo IIA sobre la actividad de - la ATPasa y el transporte de calcio del R,S, de corazón de perro, para determinar en que orden se seleccionan dichos cationes en el sitio de - fijación del calcio y obtener información sobre la naturaleza química - de dicho sitio. El estudio se realizó a dos pHs diferentes. El pH 6,6 - es el óptimo para el transporte de calcio en estas preparaciones (9) y el pH 7.5 es el óptimo para la hidrólisis del ATP dependiente de ---- Calcio (17).

## MATERIAL Y METODOS

### Purificación de Microsomas de R.S. cardíaco.

La purificación de R.S. cardíaco, proporciona preparaciones con elevada actividad ATPásica. El método se basa en cargar los microsomas con oxalato de calcio (19) y su posterior precipitación en un gradiente de sacarosa y KCl.

Una vez obtenidos los microsomas "crudos" (19), éstos son diluídos hasta una concentración proteínica de 6-10 mg/ml, con un volumen igual de medio para reposición de actomiosina, centrifugando posteriormente después de 25-30 minutos a 40,000 x g. durante 1 hora.

El precipitado (microsomas-KCl) se suspende en Sacarosa 0,25 M, Tris-maleato 20 mM a pH 6.8.

Los microsomas se cargaron con oxalato de calcio en un medio que contenía: KCl 80 mM, Tris-Maleico 20 mM (pH 6.6),  $MgCl_2$  10 mM, Oxalato de potasio 10 mM, ATP 5 mM, Proteína 2.5 mg/ml. y el calcio se fue añadiendo por fracciones de 0.1 ml. hasta completar 0.5 mM. La reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente y se ajustó el pH a 6,6 con Tris diluído, durante los 10 minutos que dura el proceso.

La suspensión de los microsomas "cargados" se enfría a 0 °C y luego se pasa en porciones de 16 ml., en un gradiente discontinuo formado por capas de Sacarosa 0.6, 0.8, 1.0 y 1.5 M, que contienen KCl-0.3 M, pirofosfato de sodio 0.05 M y 0.1 M de Tris, PH 7.2 . .

Se centrifugó a 24,000 rpm en rotor SW24 durante 90 minutos.

Se colectan el precipitado y la parte que sobrenada entre las capas de 1.0 y 1.5 M en Sacarosa. Se diluye con Sacarosa 0.2 M y Tris-Maléico 20 mM a pH 7.0. La mezcla se centrifuga a 40,000 x g durante una hora, obteniendo en el precipitado la fracción correspondiente a los microsomas cardíacos purificados.

Se suspenden en Sacarosa 0.25 M, Tris-HCl 10 mM pH 8.0, a una concentración de 10 mg de proteína/ml.

Purificación de la ATPasa dependiente de  $(Ca^{++}, Mg^{++})$ . (17,19).

Para obtener la preparación proveniente de R.S. cardíaco, se empleó un método ligeramente modificado al descrito por Mac Lennan (17,19).

Los microsomas "cargados" con oxalato de calcio se suspendieron en Sacarosa 0.25 M y Tris-HCl 10 mM (pH 8.0). Se adicionó BME y KCl hasta una concentración final de 3 mM y 1 mM respectivamente, así como desoxicolato de sodio al 10% en una proporción de 0.1-0.12 mg/mg de proteína. Después de 30 minutos, la suspensión se centrifugó a 5,000 x g durante 20 minutos.

El sobrenadante ( $S_1$ ) se remueve cuidadosamente con una jeringa, mientras que el precipitado ( $P_1$ ) se suspende en medio D (incluido en métodos) hasta una concentración proteínica de 10 mg/ml. y posteriormente, se le adiciona BME a una concentración final de 3 mM, Acetato de amonio saturado al 50% (17) 0.2 ml/ml. y posteriormente, desoxicolato de sodio a razón de 0.5 mg/mg. de proteínas.

Se deja reposar la suspensión durante 30 minutos y el precipitado se disuelve ( $P_2$ ) en medio de resuspensión. Al sobrenadante ( $S_2$ ) se le adiciona 0.01 ml/ml. de Acetato de amonio al 50% y se centrifuga a 40,000 x g durante 30 minutos, obteniéndose un sobrenadante transparente ( $S_3$ ) y un pequeño precipitado ( $P_3$ ).

Al sobrenadante ( $S_3$ ), se le adiciona acetato de amonio saturado -- al 50% hasta una concentración final de 0.27-0.3 ml/ml., hasta que la -- solución se vuelve turbia inmediatamente.

Después de 15 minutos de incubación a 0 °C, la suspensión se ----- centrifuga a 20,000 x g por 30 minutos.

Se remueve el sobrenadante ( $S_4$ ) y el precipitado ( $P_4$ ) de color --- contiene la ATPasa dependiente de ( $Ca^{++}$ ,  $Mg^{++}$ ), se disuelve en un peque- ño volumen de medio de resuspensión. (19)

El tiempo completo del procedimiento desde la homogenización hasta el aislamiento de la enzima purificada es usualmente de 2-3 días. En el primer día se hacen todas las operaciones que incluyen hasta la purifica- ción preliminar de los microsomas y su peso a través del gradiente de -- sacarosa y KCl.

En los casos en los que la purificación se lleva varios días la -- preparación ( $P_1$ ) puede ser suspendida en medio A y luego congelada por - nitrógeno líquido y almacenada hasta nuevo uso. La selectividad obteni- da varió entre 7 y 12  $\mu$ moles/min/mg. de protefna.

Determinación de las Constantes de Disociación del Arsenazo III con los cationes divalentes.

El método seguido es una titulación del colorante con cada catión y la determinación de la  $K_D$  aparente de forma gráfica.

Una breve descripción del método para el colorante muréxida ha sido publicada por Chieri y Martonosí.

Las condiciones seguidas fueron: En una cubeta del espectrofotómetro se tiene una mezcla de KCl 100 mM, PIPES 20 mM, Arsenazo III 0.0525 mM, ajustado a pH 6.7 en un volumen de 2 ml, y a 37 °C, se registra el espectro de absorción en el visible en presencia de 1 mM de EGTA-K sin cationes divalentes añadidos y sobre otra cubeta similar se añaden pequeños volúmenes de solución de los cloruros de los cationes divalentes. Se mantiene la cubeta a temperatura de 37 °C y se registra el espectro entre 560 y 700 nm. La concentración de Arsenazo III de la solución stock es de  $3.5 \pm 0.2$  mM. Las mediciones se hicieron por duplicado y se corrigieron las lecturas por cambios de volumen.

Se determinó en punto isobéptico o el punto de menor variación en la absorción de luz al variar la concentración de los cationes y la longitud de onda donde la variación es máxima para el complejo Arsenazo III-Catión.

Se grafica en el eje de las abscisas la inversa de la concentración del catión y en el de las ordenadas la inversa de la diferencia entre la absorción del punto isobéptico y el máximo elegido sin catión (en presencia de EGTA 1 mM) y las absorbancias a las mismas longitudes de onda en presencia del catión sin EGTA.

Vease como ejemplo la gráfica de resultados para el calcio, Esto corresponde a graficar la inversa de la variación de la absorbancia en el pico máximo, corregida por variación de volumen y por contaminación-

de las soluciones por otros cationes que afectan el espectro del -----  
Arsenazo III.

## R E S U L T A D O S

### Cálculos de las constantes de asociación del Ar III con los cationes --- divalentes.

En el estudio con los cationes en general, es necesario conocer con la mayor precisión posible, las concentraciones de los cationes libres y complejados con diferentes ligandos.

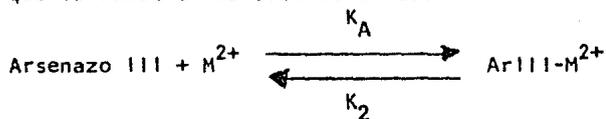
En el caso particular del R.S., se usan varios cationes tales como el  $K^+$ ,  $Mg^{++}$ ,  $Ca^{++}$ ; en el trabajo que presentamos se usan además el  $Sr^{++}$  y el  $Ba^{++}$ .

Los ligandos que se asocian con cationes y que forman parte del medio de reacción de ATPasa y/o de captación del calcio, son: oxalato, ATP y Arsenazo III. El verdadero sustrato de la ATPasa es el complejo ATP-Ca. (37) Por estas razones, es imperativo conocer las concentraciones de las especies libres y las que se encuentran formando complejos.

Con el advenimiento de las pequeñas calculadoras programables, es posible realizar cálculos que antes eran tediosos y largos. Hemos usado los programas publicados por A. Fabiato y F. Fabiato en 1979 (1), para una calculadora Texas TI-59. Se consideraron las recomendaciones de los autores, así como las constantes que aparecen en dicho artículo.

Para el cálculo de las constantes de asociación del colorante --- Ar III y los cationes  $Mg^{++}$ ,  $Sr^{++}$  y  $Ba^{++}$ , se utilizaron condiciones semejantes a las de captación de  $Ca^{++}$ .

Se consideró que la reacción de asociación es:



La constante de asociación es la constante del equilibrio de la reacción escrita en el sentido de asociación ligando-catión.

Se consideró que la estequiometría era 1:1 (30).

La figura 18 muestra el espectro de absorción del ArIII.

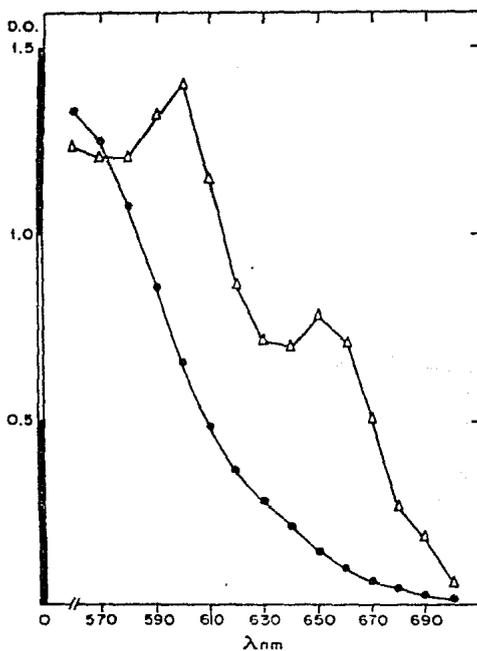


Figura 18.- Espectro de absorción del Arsenazo III.

en ausencia de cationes divalentes (se incluye al ligando EGTA) y en presencia de calcio.

La tabla VI muestra los valores de las concentraciones de calcio y las variaciones en absorvancia del complejo Ar III-Ca y Ar III solo.

T A B L A VI

Ca <sup>++</sup> m M	1/ Ca <sup>++</sup> m M <sup>-1</sup>	Abs.*	1/ Abs.*
0.02	50.0	0.34	2.92
0.04	25.0	0.46	2.18
0.06	16.7	0.53	1.87
0.08	12.5	0.58	1.73
0.10	10.0	0.60	1.65
0.15	6.7	0.65	1.54
0.20	5.0	0.67	1.49

Abs. = (Abs.<sub>570</sub> - Abs.<sub>650</sub>) EGTA = 1.098

Abs.\* = 1.098 - (Abs.<sub>570</sub> - Abs.<sub>650</sub>) Ca<sup>2+</sup>.

Los resultados se expresan graficamente en la figura 19 que permite -- estimar la K<sub>A</sub> del Ar III-Ca. El valor obtenido de  $3.85 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$  esta en acuerdo con los datos de la literatura,  $6.7 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$  (30).

De igual forma, se estimaron las  $K_A$  para los cationes  $Mg^{2+}$ ,  $Sr^{2+}$  y  $Ba^{2+}$  que se presentan en las figuras 20, 21 y 22 respectivamente.

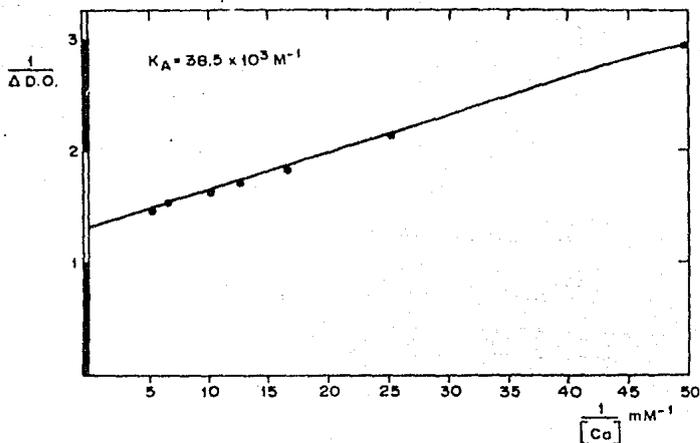
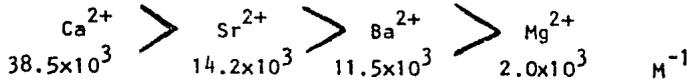


Figura 19.- Cálculo de la constante de asociación del ArIII con el calcio.  
Las condiciones de reacción fueron : EGTA-K 1 mM, KCl 100-mM, PIPES 20 mM, Ar III 0.0525 mM (pH 6.7), Temp. 37 °C. La longitud de onda fue de 560 y 700 nm respectivamente. La concentración del  $Ca^{2+}$  se varió entre 0.02 a 0.2 mM. Para calcular la constante de asociación  $K_A$ , se grafica el inverso de la concentración de calcio vs. la inversa de  $\Delta D.O.$ . La  $K$  calculada para el calcio es de  $38.5 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ .

Los valores de las  $K_A$  que se determinaron, permite obtener la serie de selección por el Arsenazo III:



que corresponde con una variación de la serie III de Sherry (31) que llamamos serie III-b.

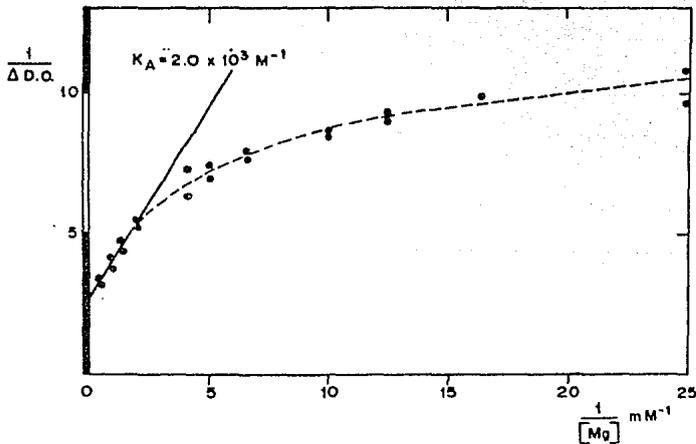


Figura 20.- Cálculo de la constante de asociación del ArIII con el --- magnesio.

Las condiciones de reacción fueron: EGTA-K 1 mM, KCl 100 mM, PIPES 20 mM, Ar III 0.0525 mM (pH 6.7), Temp. 37 °C.. La determinación se hizo a 560 y 700 nm respectivamente. La concentración de magnesio va desde 0.04 a 4.0 mM. El -- valor de la  $K_A$  para el magnesio, es de  $2.0 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ .

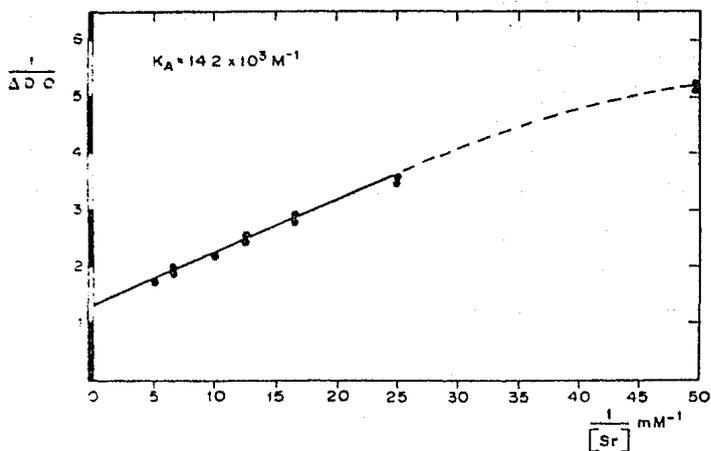


Figura 21.- Cálculo de la constante de asociación del Ar III con el -- estroncio.

Las condiciones de reacción fueron: EGTA-K 1 mM, KCl 100 mM, PIPES 20 mM, Ar III 0.0525 mM (pH 6.7), Temp. de 37 °C long. de onda 560 y 700 nm. La concentración de estroncio varía de 0.02 a 0.2 mM. La constante de asociación ----- obtenida, es de  $14.2 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ .

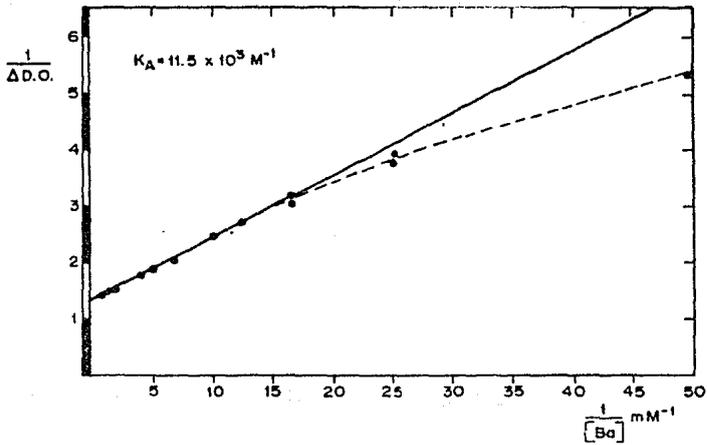


Figura 22.- Cálculo de la constante de asociación del Ar III con el -- Bario.

Las condiciones de reacción fueron: EGTA-K 1 mM, KCl 100 - nM, PIPES 20 mM, Ar III 0.0525 mM (pH 6.7), Temp. de 37 °C y Longitud de onda de 560 y 700 nm. La concentración de -- Bario varía entre 0.02 y 1.0 mM. La  $K_A$  calculada para el -- Bario es de  $12.5 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ .

Efecto de los cationes divalentes del grupo II-A, sobre la actividad de la ATPasa purificada de R.S. de músculo cardíaco de perro.

El primer catión que estudiamos del grupo II-A, es el  $Mg^{++}$ . Como ya hemos mencionado en la introducción, se utilizaron para el estudio dos pHs diferentes, 6.6 y 7.5. En estudios anteriores, hemos demostrado que el transporte de calcio es óptimo en un rango de pH del orden de 6.6 a 6.8 en vesículas de R.S. cardíaco y que ligamen de calcio es máximo a pH 6.6 e inferiores, mientras que para la hidrólisis del ATP, el pH óptimo es del orden de 7.3 a 7.5 es decir, existe una diferencia entre las funciones, la del transporte de  $Ca^{++}$  por las vesículas y la hidrólisis del ATP por ATPasa de  $(Ca^{++}, Mg^{++})$ ; es por esto que elegimos el pH de 6.6 para poderlo comparar con el transporte del  $Ca^{++}$  y el pH-7.5 que es el óptimo para la hidrólisis del ATP.

En la figura 23-a se observa el efecto del  $Mg^{++}$  sobre la velocidad de hidrólisis del ATP a concentraciones de ATP y de  $Ca^{++}$  constantes. Tanto a pH 6.6 como a 7.5, se observa que hasta aproximadamente 2 mM de  $Mg^{++}$ , tenemos un aumento en la velocidad de hidrólisis del ATP. Para cualquier valor de  $Mg^{++}$ , la velocidad de hidrólisis del ATP es mayor a pH 7.5 que a pH 6.6.

El aumento en la velocidad es debido a : 1) la formación del complejo  $ATP-Mg^{+}$ , el cual es el verdadero sustrato de la enzima y 2) a la saturación de un sitio específico para el  $Mg^{++}$  en la enzima, sobre la ATPasa de  $Ca^{++}$  que es necesaria para el funcionamiento óptimo de la enzima.

A partir de 2 mM, se observa una disminución en la velocidad de hidrólisis del ATP. El complejo  $ATP-Mg^{+}$  es constante a partir de 2 mM y

no hay formación del potente inhibidor ATP-Ca (37), puesto que el  $Mg^{++}$  está desplazando todo el  $Ca^{++}$  posible que pudiese unirse al ATP. Así -  
pués, suponemos que el efecto del  $Mg^{++}$  es un efecto inhibitorio direc-  
to sobre la enzima; la inhibición es relativamente pequeña, ya que a -  
las concentraciones ensayadas, del orden de 12 mM de  $Mg^{++}$ , sólo hay --  
una inhibición del orden del 20 al 30 % de la actividad de la ATPasa..

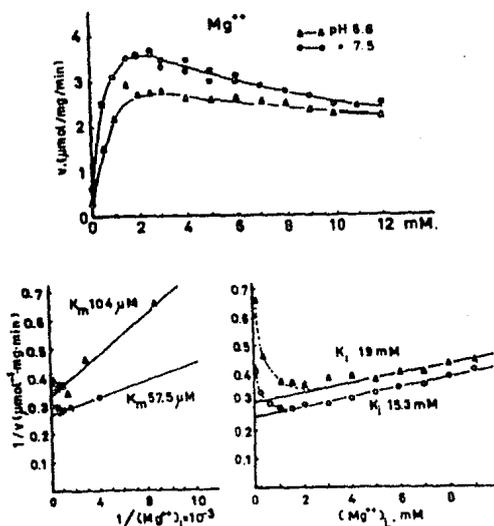


Figura 23.- Efecto del  $Mg^{++}$  en la hidrólisis de la ATPasa dependiente de  $Ca^{++}$ . La concentración total de magnesio va de 0 hasta 12 mM; el medio contiene ATP 1 mM, FGTA 1 mM, KCl 80 mM, --  $CaCl_2$  0.8 mM, a pH 6.6 y a 7.5 la concentración de  $CaCl_2$  es de 0.95 mM.

- Se ve la velocidad directa (en  $\mu\text{moles}$ ), y se observa un máximo alrededor de 2 mM de  $Mg^{++}$  libre, así como un efecto inhibitorio que es el más pronunciado para pH 7.5..
- Es la doble recíproca de la velocidad de hidrólisis respecto a la recíproca de la concentración de  $Mg^{++}$  libre. Se calculan dos constantes de activación para el magnesio: 57.5 y 104  $\mu\text{M}$  respectivamente para ambos pHs.
- De la parte inhibitoria de la curva (a), se puede deducir una constante de inhibición del orden de 15 a 19 mM respectivamente, para el magnesio y los efectos inhibitorios de este catión.

En la figura 23-b, podemos calcular a partir de estos datos, la velocidad máxima y la constante de Michaelis--Menden para el  $Mg^{2+}$ ; la representación es la inversa de la velocidad de hidrólisis del ATP vs. la inversa de la concentración libre del  $Mg^{2+}$ .

A pH 6.6, obtenemos una Km del orden  $104 \mu M$  para el  $Mg^{2+}$ , mientras que a pH 7.5 la Km es del orden de  $57.5 \mu M$ , indicando que al segundo pH existe una mayor afinidad por el  $Mg^{2+}$  que a pH 6.6 sin embargo, los valores de la Km a ambos valores de pH son inferiores al mM; lo que indica que la ATPasa de ( $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ) está en condiciones saturantes en el interior del músculo con respecto al  $Mg^{2+}$ .

La figura 23-C, es un representación para calcular la constante de inhibición del  $Mg^{2+}$  a partir del momento de saturación, es decir, más allá de 2 mM de concentración de  $Mg^{2+}$ . Observamos en este caso la inversa de la velocidad vs. la concentración libre de  $Mg^{2+}$ ; con esto podemos calcular la constante de inhibición a pH 6,6, que es de 19 mM y que para pH 7.5 es de 15.3 mM. Esta inhibición que resulta ser muy semejante en ambos casos, probablemente sea debida a la unión del  $Mg^{2+}$  sobre el sitio de unión del  $Ca^{2+}$ .

El hecho de que sean constantes muy altas, del orden de 15 a 20 mM, indica que ese sitio posee muy poca afinidad por el  $Mg^{2+}$ ; lo cual puede explicarse debido a que el  $Mg^{2+}$  por ser el catión más pequeño de la serie, tiene el agua muy fuertemente unida; por lo que resulta difícil eliminarla e introducirse en el sitio del  $Ca^{2+}$ , puesto que el radio hidratado es del orden de  $4 \text{ \AA}$ .

En la siguiente figura (fig. 24) se muestra el efecto del  $Ca^{2+}$ . Tenemos una representación de lo que se llama el factor de saturación, es decir, la velocidad para cada concentración, dividida por la velocidad máxima, lo que nos permite efectivamente normalizar valores para

pHs y condiciones enzimáticas muy diferentes. Se utilizó una concentración constante de EGTA 1 mM y diferentes concentraciones de  $\text{Ca}^{++}$ .

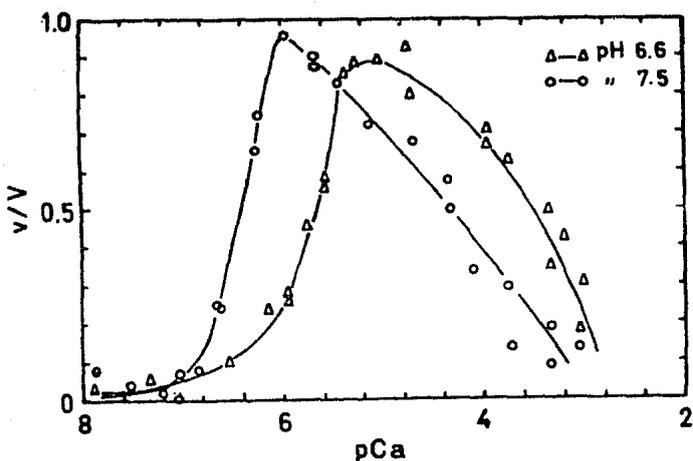


Figura 24.- Representación gráfica de la fracción de saturación  $v/V$  vs  $-\log \text{Ca}^{++}$  a los dos pHs 6.6 y 7.5. La concentración de  $\text{Ca}^{++}$  a pH 6.6 se varió de 0.1 a 1.2 mM y a pH 7.5 de 0.2 a 2 mM. La composición del medio de reacción fué: ATP 1 mM, EGTA 1 mM, KCl 80 mM,  $\text{MgCl}_2$  4 mM, a pH 6.6 se utilizó PIPES 20 mM, mientras que a pH 7.5 se empleó HEPES 20 mM. A pH 7.5 se observa que existe una mayor afinidad para el  $\text{Ca}^{++}$  que a pH 6.6. También se observa que el efecto inhibitorio por el exceso en la concentración de calcio produce un efecto inhibitorio importante en la hidrólisis del ATP; probablemente debido a un efecto de acomplejamiento del  $\text{Ca}^{++}$  con el ATP, dando lugar a la formación del complejo  $\text{ATP-Ca}^{++}$  que es muy inhibitorio y posee un valor muy elevado de  $K_i$ .

Observamos que a pH 6.6, la  $K_{0.5}$  es aproximadamente  $10 \mu\text{M}$ , mientras que a pH 7.5 es del orden de  $0.2-0.3 \mu\text{M}$ . La afinidad del  $\text{Ca}^{++}$  por la enzima aumenta con el pH. En ambos casos se observa una subida relativamente rápida de la velocidad de hidrólisis del ATP dependiente de  $\text{Ca}^{++}$  que pasa a un máximo y muy rápidamente se observa una inhibición de la velocidad de hidrólisis a medida que el  $\text{Ca}^{++}$  aumenta a niveles por encima de la zona del  $\mu\text{M}$ ; esto es debido a la formación del complejo  $\text{ATP-Ca}^-$  que es un potente inhibidor de esta enzima, como ha demostrado Vianna (37), se observa una inhibición rápida que progresa a medida que el  $\text{Ca}^{++}$  libre y el complejo  $\text{ATP-Ca}^-$  aumenta.

Seguidamente se estudió el efecto del  $\text{Sr}^{++}$  sobre la actividad de hidrólisis del ATP por la enzima. Ya hemos indicado que el  $\text{Sr}^{++}$  es un catión que puede substituir al calcio a nivel muscular y por tanto, a nivel de la ATPasa.

En un estudio previo de Mernier y Hasselback (20), se demostró que el  $\text{Sr}^{++}$  puede substituir perfectamente al  $\text{Ca}^{++}$ , ya que la ATPasa de calcio hidroliza al ATP y además, el  $\text{Sr}^{++}$  puede ser transportado al interior del R.S.. De hecho, soluciones de  $\text{Sr}^{++}$  pueden substituir al  $\text{Ca}^{++}$  en el músculo y permitir que se contraiga durante algún tiempo. (15)

En la figura 25, tenemos nuevamente la fracción de saturación sobre la velocidad máxima, en función del  $-\log (\text{Sr}^{++})$  libre a dos pHs diferentes, 6.6 y 7.5. De nuevo se presenta un fenómeno semejante al que se presenta con el  $\text{Ca}^{++}$ . A pH 6.6, la  $K_{0.5}$  del  $\text{Sr}^{++}$  es del orden de más de  $10 \mu\text{M}$  ( $12$  a  $13 \mu\text{M}$ ), mientras que a pH 7.5, la  $K_{0.5}$  baja y es del orden de  $3$  a  $4 \mu\text{M}$ ; lo cual nos indica de nuevo que al aumentar el pH de 6.6 a 7.5, aumenta la afinidad del sitio de los cationes divalentes por el  $\text{Sr}^{2+}$ , también igual a lo que sucede con el  $\text{Ca}^{2+}$  y con el  $\text{Mg}^{2+}$ .

A pH 6.6 se observa que para  $100 \mu\text{M}$  de  $\text{Sr}^{2+}$  se alcanza aproximadamente el efecto máximo de velocidad, mientras que a partir de esa concentración se empieza a observar una inhibición que recuerda a la producida por el  $\text{Ca}^{++}$ , indicando que probablemente se está formando el complejo  $\text{ATP-Sr}^-$  y que este complejo es inhibidor de la ATPasa; pero

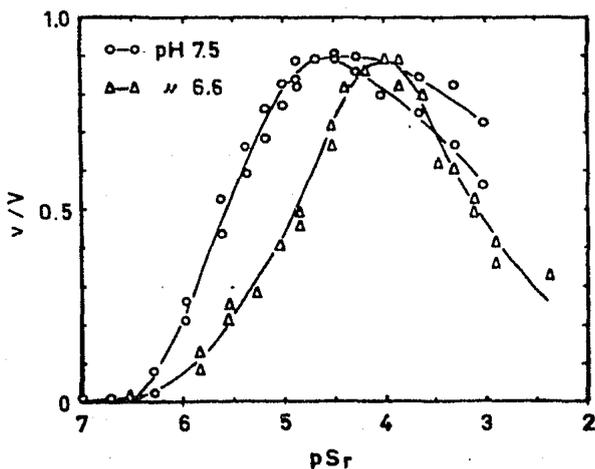


Figura 25.- Representa la fracción de saturación  $v/V$  vs.  $\log$  de la concentración de estroncio libre de los dos pHs., 6.6 y 7.5. La concentración de  $\text{Sr}^{2+}$  total a pH 7.5 va de  $20 \mu\text{M}$  a  $2 \text{mM}$ , mientras que a pH 6.6 la concentración varía entre  $1 \mu\text{M}$  y  $2 \text{mM}$ .

La composición del medio de reacción fué :  $\text{ATP}$   $1 \text{mM}$ ,  $\text{MgCl}_2$   $4 \text{mM}$ ,  $\text{EGTA}$   $1 \text{mM}$ ,  $\text{KCl}$   $80 \text{mM}$  y  $\text{PIPES}$   $20 \text{mM}$ .

Se observa que a pH 7.5 hay una mayor afinidad por el  $\text{Sr}^{2+}$  que a pH 6.6 la afinidad en ambos casos es del orden del  $\mu\text{M}$ , mucho más pequeña que en el caso del  $\text{Ca}^{++}$ .

Se observa también que a pH 6.6 el estroncio produce un efecto inhibitorio semejante al calcio; sin embargo, a pH 7.5 este efecto es mucho menos marcado.

obviamente, este complejo se forma en menor proporción que con el  $\text{Ca}^{++}$  y con el  $\text{Mg}^{++}$  ya que la inhibición se presenta para concentraciones relativamente elevadas de  $\text{Sr}^{++}$  y cuya constante  $K_A$  para el complejo  $\text{ATP-Sr}^-$  es de  $3.98 \times 10^3$ ; sin embargo, nos encontramos con un problema, y es que a pH 7.5 en que suponemos que el complejo  $\text{ATP-Sr}^-$  podría formarse de igual manera, se observa que la inhibición es aparentemente mucho menor que a concentraciones prácticamente de 1 mM, en que no hay excesiva inhibición para dos experimentos diferentes; lo cual estaría indicando que probablemente el  $\text{Sr}^{++}$  tiene algún efecto diferente al  $\text{Ca}^{++}$  y el  $\text{Mg}^{++}$  en cuanto a la formación del complejo con ATP se refiere, así como en cuanto al efecto inhibitorio.

Las constantes de Hill calculadas de los parámetros de hidrólisis del ATP en función del  $\text{Ca}^{++}$  y el  $\text{Sr}^{++}$ , indica que son cooperativos, es decir, mayores de 1, prácticamente de 1,8 para el  $\text{Ca}^{++}$  a ambos pHs, mientras que para el  $\text{Sr}^{++}$  es cercano a 1; indicando que la cinética de transporte de  $\text{Sr}^{++}$  y la cinética de hidrólisis del ATP en función del  $\text{Sr}^{++}$ , son probablemente de tipo Michaeliano.

#### Captación de calcio y estroncio por vesículas de R.S. cardíaco.

Vamos a estudiar ahora el transporte de cationes por vesículas de R.S. de corazón, así como el efecto de los cationes divalentes del grupo II-A sobre el transporte de  $\text{Ca}^{++}$  o de  $\text{Sr}^{++}$  en condiciones llamadas de captación; es decir, con oxalato como agente precipitante de estos dos cationes y utilizando la técnica de espectrofotometría visible con el colorante Ar III como se ha indicado en material y métodos.

Efecto del  $Mg^{2+}$  sobre el transporte de  $Ca^{++}$ . En la figura 26; ----- observamos en relación directa, la velocidad de transporte de  $Ca^{++}$  en función de la concentración de  $Mg^{2+}$  total en el medio.

Se observa una activación hasta alcanzar una concentración ----- aproximada de 4 mM de  $Mg^{2+}$  total, que es aproximadamente 2 mM de la -- libre o bién, de 1 mM. Después notamos un efecto inhibitorio que ----- recuerda el efecto de este catión sobre la ATPasa de  $Ca^{2+}$ .

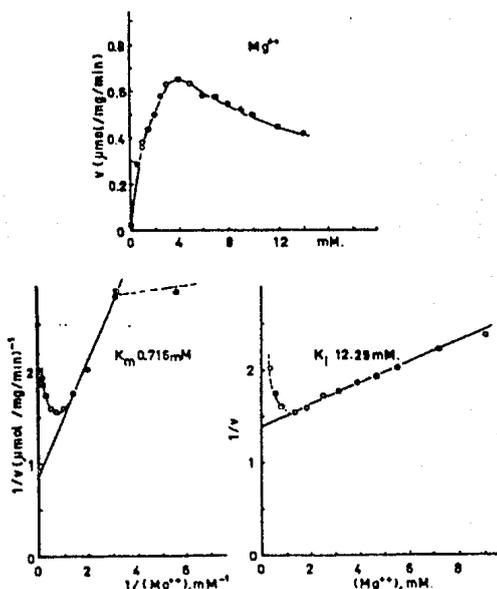


Figura 26.- Efecto del  $Mg^{2+}$  en el transporte de  $Ca^{2+}$ . Las condiciones fueron: R.S. (36  $\mu\text{g}$  de proteína/ml.) suspendido en un medio que contiene KCl 100 mM,  $CaCl_2$  30  $\mu\text{M}$ . Ar III 53  $\mu\text{M}$ , oxalato 5 mM, ATP 1 mM, a pH 6.7 con PIPES 50 mM. Long. de onda 670 nm.

Las concentraciones de  $Mg^{2+}$  utilizadas van de 0.5 a 14 mM.  
 a). Velocidad de transporte de  $Ca^{2+}$  ( $\mu\text{moles/mg}$ . de proteína /minuto) vs. la concentración de  $Mg^{2+}$  total. El  $Mg^{2+}$  produce un efecto semejante sobre la ATPasa de  $Ca^{2+}$ , al que se observa durante el transporte de  $Ca^{2+}$  a pH 6.7.  
 Nótese el efecto de actividad máxima a 4 mM de  $Mg^{2+}$ .  
 b). Gráfica de  $\frac{1}{v}$  recíproca (Lineweaver-Burck) para calcular la  $K_m$  del  $Mg^{2+}$ . El valor de la constante para la parte de activación, es de 0.7 mM.

- c). Representación de la  $1/v$  inversa de la velocidad vs. la concentración del  $Mg^{2+}$  para el cálculo de la constante de inhibición en la zona de máxima actividad. La  $K_i$  es de 12 mM.

En dobles inversas ( $1/v$  de la actividad del transporte de  $Ca^{++}$  vs  $1/[Mg^{++}]$  libre), podemos calcular, a partir de los puntos que se alinean, una constante del orden de 0.7 mM para el transporte de  $Ca^{++}$ . Este es un valor relativamente alto en condiciones de pH 6.6, comparado con el valor obtenido para la ATPasa de calcio en la que teníamos una  $K_m$  del orden de  $100 \mu M$ ; así como con el valor calculado en la captación que fué del orden de  $700 \mu M$ .

Para calcular el efecto inhibitorio  $K_i$ , graficamos  $1/v$  de transporte de calcio vs.  $[Mg^{++}]$  libre, con lo que aquí obtenemos una  $K_i$  del orden de 12 mM; recordando también que la  $K_i$  para la inhibición de la ATPasa era en condiciones similares, del orden de 15 a 19 mM; lo cual de nuevo nos estaría indicando que el  $Mg^{++}$  tiene un efecto semejante tanto para la hidrólisis del ATP, como para el transporte de  $Ca^{++}$  y que probablemente el efecto inhibitorio del magnesio es debido a una competencia con el calcio por su sitio.

El estudio del calcio en cuanto al transporte, se ha realizado muy frecuentemente por lo que no es nada nuevo lo que vamos a decir en este caso. La figura 27-a, nos muestra el efecto en dobles inversas, la inversa de la velocidad de transporte vs. la inversa de la concentración de calcio libre.

Podemos calcular la  $K_m$  que es del orden de  $2.6 \mu M$  a pH 6.6, lo cual está de acuerdo con los valores que nosotros hemos calculado, para el 50% de activación de la hidrólisis del ATP en el estudio anterior, y que concuerda también con los datos de la literatura, en que la activación de la ATPasa o del transporte de  $Ca^{++}$  es del orden del  $\mu M$  ( $0.5$  a  $2 \mu M$ ).

En la figura 27-b, lo que se representa es la inversa de la velocidad del transporte de calcio vs. la concentración de calcio libre, para calcular la constante de inhibición del  $\text{Ca}^{++}$ . En estas condiciones, se observa que la inhibición es del orden de  $45 \mu\text{M}$ . El valor de esta constante debe estar influenciado por los valores relativos de ATP y  $\text{Mg}^{++}$ ; ya que influyen en la formación del complejo  $\text{ATP-Ca}^-$ .

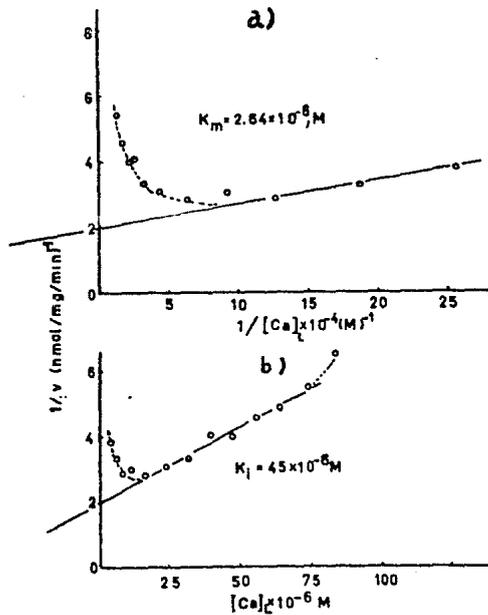


Figura 27.- Transporte de  $\text{Ca}^{2+}$ . Las condiciones son: R.S. (36  $\mu\text{g}$ . de proteína/ml.) suspendido en un medio que contiene KCl 100 mM, - ArIII 53  $\mu\text{M}$ , ATP 2 mM,  $\text{MgCl}_2$  10 mM, a pH 6.7 con PIPES 50 mM. Long. de onda fué de 670 nm. Las concentraciones de calcio total van de 12.5 a 260  $\mu\text{M}$ . - La concentración de calcio libre va de 3.9 a 84  $\mu\text{M}$ . a). Para el  $\text{Ca}^{2+}$  libre se observa a pH 6.7 en doble recíproca, una  $K_m$  de 2.6  $\mu\text{M}$ . b). Gráfica de la inversa de la velocidad vs. la concentración de calcio para calcular el efecto inhibitorio. La constante inhibitoria es de 45  $\mu\text{M}$ .

Por tal razón, el valor de esta constante puede ser debido a un efecto directo del calcio o bien, a un efecto asociado con la formación del complejo ATP-Ca.

El siguiente catión que estudiamos, fué el  $\text{Sr}^{2+}$ . Al igual que el  $\text{Ca}^{2+}$ , se puede estudiar el transporte del  $\text{Sr}^{2+}$  en presencia de oxalato, con la consecuente formación del oxalato de estroncio en el interior del R.S. y seguir la velocidad de este transporte, con ayuda del colorante Ar III que forma un complejo, como indicamos en la parte de material y métodos, tanto con el  $\text{Ca}^{2+}$  como con el  $\text{Sr}^{2+}$ . Para evitar contaminaciones por  $\text{Ca}^{2+}$ , lo que se añade en último lugar es el  $\text{Sr}^{2+}$ , permitiendo que el calcio contaminante sea transportado hacia el interior del R.S. y precipitado como oxalato por adición previa del ATP. Bajo estas condiciones, lo que vemos es solamente el transporte del  $\text{Sr}^{2+}$ .

La figura 28 nos muestra la inversa de la velocidad vs. la inversa de la concentración de estroncio libre. Los valores de la  $K_m$  para el  $\text{Sr}^{2+}$  en estas condiciones de transporte, son del orden de  $28 \mu\text{M}$ ; es decir, 10 veces más alta la  $K_m$  para el estroncio que para el calcio; indicando que el  $\text{Sr}^{2+}$  obviamente tiene menor afinidad por el sitio, que el  $\text{Ca}^{2+}$ . Este fenómeno ya lo habíamos notado en la hidrólisis del ATP en las constantes cinéticas obtenidas para el  $\text{Sr}^{2+}$  que son más altas que las que se obtuvieron para el  $\text{Ca}^{2+}$ , mostrando una disminución en la afinidad.

Esta figura nos permite calcular la constante de inhibición, que es el orden de  $62 \mu\text{M}$  para exceso de  $\text{Sr}^{2+}$ , semejante al que produce el  $\text{Ca}^{++}$  indicando que ya sea el  $\text{Sr}^{2+}$  por sí mismo o bien, por la formación del complejo ATP-Sr. Se observa una inhibición a concentraciones superiores a las de  $20 \mu\text{M}$  en las condiciones estudiadas.

Por tal razón, el valor de esta constante puede ser debido a un efecto directo del calcio o bien, a un efecto asociado con la formación del complejo ATP-Ca.

El siguiente catión que estudiamos, fué el  $\text{Sr}^{2+}$ . Al igual que el  $\text{Ca}^{2+}$ , se puede estudiar el transporte del  $\text{Sr}^{2+}$  en presencia de oxalato, con la consecuente formación del oxalato de estroncio en el interior del R.S. y seguir la velocidad de este transporte, con ayuda del colorante Ar III que forma un complejo, como indicamos en la parte de material y métodos, tanto con el  $\text{Ca}^{2+}$  como con el  $\text{Sr}^{2+}$ . Para evitar contaminaciones por  $\text{Ca}^{2+}$ , lo que se añade en último lugar es el  $\text{Sr}^{2+}$ , permitiendo que el calcio contaminante sea transportado hacia el interior del R.S. y precipitado como oxalato por adición previa del ATP. Bajo estas condiciones, lo que vemos es solamente el transporte del  $\text{Sr}^{2+}$ .

La figura 28 nos muestra la inversa de la velocidad vs. la inversa de la concentración de estroncio libre. Los valores de la  $K_m$  para el  $\text{Sr}^{2+}$  en estas condiciones de transporte, son del orden de  $28 \mu\text{M}$ ; es decir, 10 veces más alta la  $K_m$  para el estroncio que para el calcio; indicando que el  $\text{Sr}^{2+}$  obviamente tiene menor afinidad por el sitio, que el  $\text{Ca}^{2+}$ . Este fenómeno ya lo habíamos notado en la hidrólisis del ATP en las constantes cinéticas obtenidas para el  $\text{Sr}^{2+}$  que son más altas que las que se obtuvieron para el  $\text{Ca}^{2+}$ , mostrando una disminución en la afinidad.

Esta figura nos permite calcular la constante de inhibición, que es el orden de  $62 \mu\text{M}$  para exceso de  $\text{Sr}^{2+}$ , semejante al que produce el  $\text{Ca}^{++}$  indicando que ya sea el  $\text{Sr}^{2+}$  por sí mismo o bien, por la formación del complejo ATP- $\text{Sr}^{2+}$ . Se observa una inhibición a concentraciones superiores a las de  $20 \mu\text{M}$  en las condiciones estudiadas.

Por último, estudiamos el efecto del  $Ba^{++}$ , Para este catión no ---

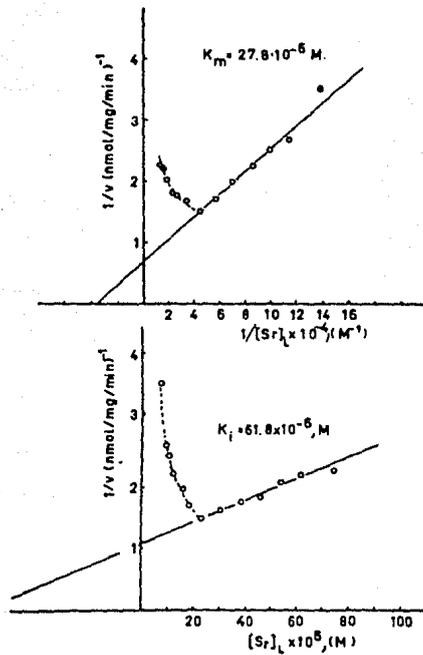


Figura 28.- Transporte del  $Sr^{2+}$  por el R.S., Las concentraciones de reacción son ; R.S. (36  $\mu g$  de proteína/ ml.) suspendidos en un medio que contiene KCl 100 mM, ArIII 53  $\mu M$ , Oxalato 8  $\mu M$ , ATP 1 mM,  $MgCl_2$  4 mM, a pH 6.7 con PIPES 50 mM, Long. de onda : 670 nm.  
La concentración del  $Sr^{2+}$  va de 25 a 240  $\mu M$  y la concentración de  $Sr^{2+}$  libre es de 7.6 a 74  $\mu M$ .  
a). Para el  $Sr^{2+}$  se observa en una gráfica de dobles recíprocas, una de 27.8  $\mu M$ .  
b). La representación de la inversa de la velocidad vs. la concentración del  $Sr^{2+}$ , da una constante de inhibición  $K_i$  de 61.8  $\mu M$  durante el transporte.

hemos podido medir, al menos colorimétricamente, el transporte hacia el interior del R.S.; creemos que si se transporta, es muy lentamente y en muy pequeñas cantidades; además de que probablemente no hay precipitación de  $Ba^{++}$  en forma de oxalato de bario en el interior del R.S., ---- porque el producto de solubilidad de esta sal es mucho más pequeño que el correspondiente para los otros cationes ensayados y porque la ----- cantidad de  $Ba^{2+}$  transportada no alcanza niveles suficientemente altos como para precipitar con oxalato. Lo que experimentalmente hicimos, fué estudiar el efecto del  $Ba^{2+}$  sobre el transporte del  $Ca^{2+}$ ; seguido por - el método colorimétrico a varias concentraciones de  $[Ca^{2+}]$  libre.

Se probaron dos concentraciones diferentes de bario libre, 105 y 187  $\mu M$  respectivamente. (figura 29).

Al representar los datos del efecto inhibitorio del  $Ba^{2+}$ , ----- observamos en la representación, la inversa de la velocidad del ----- transporte de  $Ca^{2+}$  vs. la inversa de concentración de  $Ca^{2+}$  libre; lo -- cual nos da unas rectas que se cortan con el eje de las ordenadas, ---- indicando que el bario está produciendo una inhibición de tipo compe - sitivo a nivel del transporte de calcio; lo que era de esperarse.

Podemos entonces suponer, que el  $Ba^{2+}$  se fija en el sitio del  $Ca^{2+}$

La constante calculada es del orden de 29  $\mu M$ , aproximadamente 10- veces mayor que la constante de afinidad del  $Ca^{2+}$  y semejante a las del  $Sr^{2+}$ ; esto nos indica que el bario es menos afín al sitio de fijación - que el calcio, y parecido al estroncio.

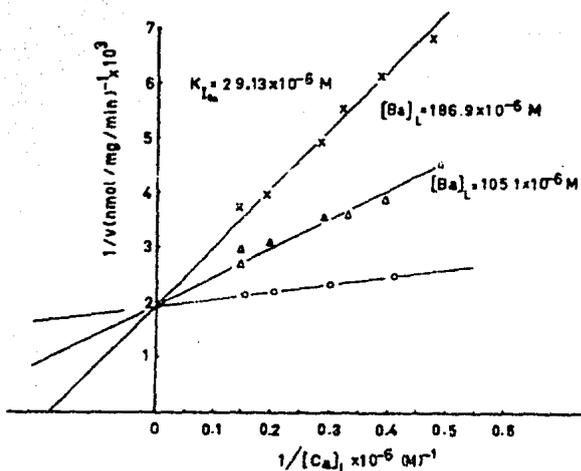


Figura 29.- Efecto inhibitorio del  $Ba^{++}$  en el transporte del  $Ca^{++}$ . Las - condiciones de reacción son las siguientes: R.S. (36  $\mu\text{g}$  de - proteína/ml.) suspendido en un medio que contiene KCl 100 mM Aril 53  $\mu\text{M}$ , Oxalato 5 mM, ATP 1 mM,  $MgCl_2$  4 mM, a pH 6.7 -- con PIPES 50 mM. Long. de onda de 670 nm. La concentración de bario total va de 200 a 350  $\mu\text{M}$  y la ---- concentración de calcio libre va de 10 a 33  $\mu\text{M}$ . No se pudo determinar el transporte del  $Ba^{++}$ , lo único que -- se pudo ver es un efecto inhibitorio del transporte de  $Ca^{++}$ . En la figura (12), tenemos una gráfica doble recíproca para -- concentraciones de calcio variables a dos concentraciones -- diferentes de bario, una es de 105  $\mu\text{M}$  y otra 185  $\mu\text{M}$  y ----- podemos decir que la inhibición es de tipo competitivo como -- cabría esperarse, es decir, el  $Ba^{++}$  se fija sobre el sitio de -- unión del calcio. La constante de inhibición calculada es -- del orden de 29  $\mu\text{M}$ .

## D I S C U S I O N

En base a los resultados obtenidos en la determinación de la constante de asociación ( $K_A$ ) entre el colorante Ar III y los distintos cationes, se observa que

Ca <sup>++</sup>	;	$K_A = 38.5 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$
Mg <sup>++</sup>	;	$K_A = 2.0 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$
Sr <sup>++</sup>	;	$K_A = 14.2 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$
Ba <sup>++</sup>	;	$K_A = 11.5 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$

Es decir, el orden de selección del Ar III con respecto a los cationes ensayados es :



lo cual corresponde a la serie III-b propuesta por Eisenman y Sherry - (7,31).

Para la ATPasa, tanto a pH 6.6 como a pH 7.5, aunque no tenemos el efecto del calcio es también mayor que el del estroncio y este a su vez, mayor que el del magnesio, indicando que el Ba<sup>++</sup> efectivamente, se encuentra después del Sr<sup>++</sup> y antes que el Mg<sup>++</sup>.

La misma serie podría esperarse en cuanto al orden de selectividad de los cationes, tanto para la hidrólisis del ATP como para la captación lo cual además es normal, puesto que la hidrólisis del ATP está acoplada al transporte de calcio y viceversa

La velocidad de hidrólisis se encuentra que es mayor en todos los

casos a pH 7.5 que a pH 6.6 . Dicho aumento se verifica hasta aproximadamente 2 mM de  $Mg^{++}$ , 1  $\mu M$  de  $Ca^{++}$  y 100  $\mu M$  de  $Sr^{++}$ , con lo que se verifica que tanto a pH 6.6 como 7.5, la ATPasa de ( $Ca^{++}$ ,  $Mg^{++}$ ), se une a los cationes del grupo II A en el siguiente ordenamiento :

$Ca^{++} \gg Sr^{++} \gg Ba^{++} \gg Mg^{++}$  que efectivamente corresponde a la serie III-b propuesta por Sherry et al.

El aumento de la velocidad es debido a la formación del complejo ATPasa y a la saturación de los sitios receptores de la enzima.

C O N C L U S I O N E S

Hemos visto que los cationes se seleccionan para la captación, de ----- acuerdo a la serie III-b propuesta por Eisenman y Sherry (7,31). ¿ Que-- significado tiene la serie III-b ? Al comparar la selectividad de los-- cationes con otros sistemas conocidos, por ejemplo, el Ar III que tiene-- cuatro grupos aniónicos y de los cuales, dos de ellos son sulfónicos y-- los otros dos son arsónicos, selecciona a los cationes en el orden : ---  $Ca^{++} > Sr^{++} > Ba^{++} > Mg^{++}$  , que corresponde precisamente a la serie -- III-b.

Otro tipo de compuesto que se utiliza frecuentemente para hacer que los-- cationes divalentes, el  $Ca^{++}$  en particular, se encuentren tamponados en-- el medio, es el EGTA, que nosotros hemos utilizado justamente para ----- modificar las concentraciones de  $Ca^{++}$ ,  $Sr^{++}$  y  $Ba^{++}$  libres en el medio -- de reacción. De datos publicados en la literatura, hemos calculado que a pH 6.6 el orden de selectividad del EGTA por los cationes divalentes -- es:  $Ca^{++} > Sr^{++} > Ba^{++} > Mg^{++}$ , lo cual nuevamente representa la serie -- III-b y a pH 7.5 el tipo de selección obtenida, es la misma, con lo que-- nos damos cuenta de que tanto el EGTA; que posee cuatro cargas negativas debidas a sus grupos carboxílicos, como el Ar III, que también tiene --- cuatro cargas negativas debidas a sus grupos sulfonato y arsónico ----- seleccionan en el mismo orden en que la ATPasa de R.S. de músculo ----- cardiaco selecciona a estos cationes.

El orden de selección del ATP debido a la formación de complejos con --- los cationes es  $Mg^{++} > Ca^{++} > Sr^{++} > Ba^{++}$  . Esta serie de acuerdo a la-- teoría de Eisenman y Sherry, es la serie VII, que corresponde a la serie-- deshidratada de los cationes.

Esta comparación nos indica que la ATPasa de R.S. de músculo cardiaco, - une a los cationes en un sitio que posee un campo de fuerza relativa ----

mente débil.

Por asociación con lo que ocurre con el EGTA o con el Ar III, en que las fuerzas con que se unen los cationes a los sitios, es justamente -- mediante la coordinación entre los grupos cargados negativamente y cada uno de los cationes, podríamos pensar que el  $\text{Ca}^{2+}$  se selecciona a nivel de la ATPasa de R.S. de músculo cardíaco, en el sitio de unión de los cationes divalentes, porque existe un lugar con cuatro cargas negativas que probablemente correspondan a grupos carboxílicos con los cuales --- interacciona mediante fuerzas coulombianas y por coordinación con el --  $\text{Ca}^{2+}$  en dicho sitio. Por esta razón la selección es el resultado de -- que la coordinación con el  $\text{Ca}^{2+}$  sea mayor que con el  $\text{Sr}^{2+}$  y a su vez -- mayor que con el  $\text{Ba}^{++}$  y con el  $\text{Mg}^{2+}$ , debido a que la fuerza de estos - cuatro grupos carboxílicos, no es suficiente como pra eliminar el agua del  $\text{Mg}^{2+}$  o bién, porque el  $\text{Mg}^{2+}$  es demasiado pequeño y deforma grande - mente el sitio de unión de los cationes.

Hasta el momento hemos determinado cual es la serie de selección - de los cationes en la ATPasa de calcio. En base a esto, surge una ----- hipótesis de trabajo consistente en demostrar que el sitio donde se --- fijan los cationes en esta enzima (ATPasa de  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$ ), es un sitio que posee 2 o 4 grupos carboxílicos. En parte, esta pregunta ha sido - resuelta por Pick y Racker (26), quienes han observado que la unión de una diciclohexilcarbodiimida (reactivo específico de los grupos ----- carboxílicos), inhibe a la ATPasa, para lo cual, es necesario que el --  $\text{Ca}^{2+}$  se haya eliminado no solamente por la adición del EGTA, sino ----- también por la presencia de un ionóforo que elimina totalmente el ----- calcio presente.

En ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$ , la diciclohexilcarbodiimida reacciona al ---

menos con un grupo carboxílico, inhibiendo tanto a la ATPasa como al -- transporte de calcio e incluso, por cada ATPasa con un solo grupo ----- carboxílico que se bloquee, es suficiente para que se inhiban dos ----- ATPasas. La estequiometría de unión para la dicitlohexilcarbodiimida, - es media mol de carbodiimida unida por dos moles de ATPasa inhibidas; - lo cual indica en cierta forma, que el sistema de asociación sobre la - membrana, es un dímero de dos subunidades de 100,000 daltones; esto --- explica porqué por cada ATP hidrolizado existen dos calcio que son --- transportados.

Vale la pena entonces elaborar otra hipótesis de trabajo, ya que con lo que respecta al  $Sr^{2+}$ , aparentemente la estequiometría es de 1 - ATP hidrolizado por cada  $Sr^{2+}$  transportado (20); en estas condiciones, para inhibir la hidrólisis del ATP dependiente de  $Sr^{2+}$ , es necesaria - que la estequiometría fuera de una molécula de carbodiimida unida, por cada molécula de ATPasa.

Estas son las hipótesis de trabajo que quedan efectivamente por- comprobar y que se debe intentar responder con trabajos posteriores.

B I B L I O G R A F I A

Conservación de Retículo Sarcoplásmico.

- 1.- Anderson-Cedergren, E.J., Ultraestructure of motor endoplasmic and -- Sarcoplasmic components of mouse skeletal muscle fibers-- revealed by three-dimensional reconstruction from serial-- sections, *Ultraestruct. Res. Suppl.* 1:1-191.
- 2.- Barritt, G.J., Calcium transport across cell membranes: progress to -- ward molecular mechanisms, *TIBS*, 6: 322-325 (1981).
- 3.- Blume, H., *La célula Viva*, Selección de Scientific American, ---- 2a. ed., Madrid, 1965.
- 4.- Chies, Michele and Martonosi, A., Calcium Transport in Sarcoplasmic Reticulum vesicles isolated from Rabbit Skeletal Muscle.
- 5.- De Robertis, E.D.P. *Biología Celular*, El Ateneo Editorial, 2a. ed.- Argentina (1974), 415-427.
- 6.- Diego Onofre, et., *J. Biol. Chem.*, 251:20, 6355-6359 (1976).
- 7.- Ebashi, E. and Lippmann, F., Adenosine, Triphosphate-linked concen-- tration of calcium ions, *J. Cell-Biol.*, 14:389-400 (1962).
- 8.- Endo, M., et. al., Calcium induced released of calcium from sarco - plasmic reticulum of skinned muscle fibers, *Nature*, 228:34 35 (1970).
- 9.- Entman, M.L., et. al., Analysis of Calcium Binding and Released by Canine cardiac Relaxing System (Sarcoplasmic Reticulum);-- *The Journal of Biol. Chem.*, 248:7762-7772 (1973).
- 10.- Ganong, F.G., *Manual de Fisiología Médica*, 6a. ed., Ed. El Manual- Moderno. (1978)
- 11.- Hardwicke, M.D.P. and Green, M., the effect of delipidation on --- the Adenosine triphosphate of Sarcoplasmic Reticulum, *Eur J. Biochem.*, 42:183-193 (1974).
- 12.- Harigaya, S. and Schwartz A. Rate of calcium binding and up-take - in normal animal and failin human cardiac muscle, *Circ.-- Res.* 25:781 (1968).
- 13.- Hasselbach, W. et. al., Mechanism of calcium transport in Sarcoplas mic Reticulum, *Annals of New York Ac. of Sci* 264:335-349- (1975).
- 14.- Hasselbach, W., et. al., *Z. Naturforsch.*, 32:992-996 (1977).

- 15.- Haller, A. Von, A., Dissertation on the sensible and irritable parts of animals (J. nourse ). Reprinted in-Bull Hist. Med., 4: 651-669 (1936).
- 16.- Hamm, W. Arthur, Tratado de Histología, 7a. ed., Ed. Inter-americana, Méx. (1975).
- 17.- Herbest, D.B. and Deamer, D.W., Calcium-dependent adenosine triphosphate activity preservation in isolated Sarcoplasmic Reticulum, Physiol. Chem. and phys., 9:2 (1977).
- 18.- Holguín, H.J.A., et. al., Los movimientos del ión calcio en las estructuras subcelulares del corazón, Investigación Básica México, 50 (1980).
- 19.- Inesi, G., Cohen, J.A. and Coan, C.R., Two functional States of Sarcoplasmic Reticulum ATPase, Biochemistry, 15-24: 5293 - 5298 (1976).
- 20.- Katz, A. and Repke, D., Am.J. Card. . 31:193 (1973).
- 21.- Kenneth, Owens, et. al., Lipid composition of purified fragmented Sarcoplasmic reticulum of the rabbit, Biochem Biophys. Acta, 288:479-481 (1972).
- 22.- Klaassen, P.laa, Lipid Peroxidation in vitro and in vivo, Biochem.-Pharmacol. 18:2019-2027 (1969).
- 23.- Lehninger, A.L., Bioquímica: Las bases moleculares de la estructura y función celular, 2a. ed., Ed. Omega S.A., Barcelona (1978).
- 24.- Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., et. al., Protein measurements with the Folin-Phenol reagent., J. Biol. Chem. 193:265 (1954).
- 25.- Luiz Vianna Antonio, Interaction of calcium and magnesium activating and inhibiting the nucleoside triphosphatase of Sarcoplasmic reticulum, Biochemica et Biophysica Acta, 410:389-406 (1975).
- 26.- Madeira, M.C.V., Bioch. et. Biophys. Acta, 464:583-588 (1977).
- 27.- Madeira, M.C.V., et. al., Comparative study of the lipid composition of rabbit and lobster Sarcoplasmic reticulum, Can. J. Biochem. 54:516-520 (1976).
- 28.- Malan, H.T., et. al., Functional and structural roles of Sarcoplasmic Reticulum Protein Components. FEBS Letters. 60:1, 122-125 (1975).
- 29.- Mannheim Chaim, Shelf life of foods, Water Removal Operations, Lab Ind. de fomento industrial, p 5-16.
- 30.- Martonosi, A. the development of Sarcoplasmic reticulum membranes, Ann.Rev. Physiol., 44:337-355 (1982).

- 31.- Mc. Lenan, D.H., J. Biol. Chem. 245:4508-4518 (1970).
- 32.- Mc. Lenan, et. al., J. Biol. Chem. 246:2702-2710.
- 33.- Meissner, G. and Fleicher, S., Biochem. Biophys Acta, 241:356(1971)-
- 34.- Namn, D. et. al., Circ. Res., 31:308 (1972).
- 35.- Needham, D.M., Machina Carnis, the Biochemistry of muscular contraction in its historical development, Cambridge University Press, London (1971).
- 36.- Racker, E. and Eytan, E., Biochem, Biophys. Res. Commun, 55; 174 --- 178 (1973).
- 37.- Reneter, H., Exchange of calcium ions in the mammalian myocardium --- mechanisms and physiological significance Circulation ----- Res. 34:599-605 (1974).
- 38.- Ringer, S.A., J. Physiol. 4:29 (1983).
- 39.- Scarpa, et. al., Metallochromic Indicator of ionized Calcium in ---- Calcium transport and cell function, Annals of the New ---- York Acad. of Sci. 307:86 (1978).
- 40.- Shimada, O. and Yasuda H., Lipid Peroxidation and its inhibition - by Tinoridine, Biochem. et Bioph. Acta, 489:163-172 (1977).
- 41.- Sierra, M. y Holguín. H.J.A., Cambios inducidos por soluciones ----- hipertónicas en el transporte de calcio por el retículo ----- sarcoplásmico del corazón. Arc. Inst. Cardiol. de México, -- 49:573 (1979).
- 42.- Sonnenblick, E.H. and Stam, A.C., Cardiac, muscle: activation and -- contraction, Annu. Rev. Physiol. 31:647-674 (1969).
- 43.- Sperelakis, N. and Schneider, J.A., A metabolic control mechanism -- for calcium ions influx that myprotect the ventricular ---- myocardial, cell, Am. J. Car. 37:1079-1085.
- 44.- Stam, A.S. et. al., J. Biol. Chem., 249:6174 (1974).
- 45.- Tada, M.K., et. al., Molecular Mechanism of active Calcium transport- by Sarcoplasmic Reticulum Physiological Reviews, 58:1 ---- (1978).
- 46.- Tada, M.K., et. al., J. Biol. Chem., 249:6174(1974).
- 47.- Tew, W.D., B.B. R.C., 78:2 (1977).
- 48.- Taussky and Shorr, J. Biol. Chem, 202 675 (1953).

- 49.- Van Deenen, L.L.M., et. al., Lipid-Lipid and Lipid-Protein Interaction in Model Systems and Membranes, Annals of New York Ac. of Sci 264:124-143 (1975).
- 50.- Wallach, F.H.D., et. al., Modes of Lipid-Protein Interactions in Biomembranes, Annals of New York Ac. of Sci 264:142- 160 (1975).
- 51.- Warren, G.B., Too, P.A. et. al., Proc. Natl., Acad. Sei, USA. 71:622 - 626.
- 52.- Weber, A. Curr, Top., Bionerg., 1:203-254 (1966).
- 53.- Weber, K. and Osborn, M., J. Biol. Chem., 244:4406 (1969).
- 54.- Yamanaka N. and Deam D.W., Bioch. et. Bioph. Acta, 426:132-147 (1976).

Efecto de cationes divalentes.

- 1).- A. Fabiato, F. Fabiato, J. Physiologie, Pons. 75, 463-505 (1979). -
- 2).- Ander P. y A.J. Sonnesa, Principios de Química. Introducción a los--  
conceptos teóricos, Ed. Limusa; Méx. (1977), p-275-287.
- 3).- B. Anand, M., M.S. Chanhand, N.S. Dhalla,  $Ca^{2+}/Mg^{2+}$  ATPase Activiti-  
es of heart Sarcolemma, Microsomes and Mitochondria.  
J. Biochem. 82, 1731-1739 (1977).
- 4).- Babor J.A., Química General Moderna, Ed. Limusa p- 724.-
- 5).- C. Reed Ken and Fyfe L. Bygrave, The inhibition of Mitochondrial ---  
Calcium Transport by Lanthanides and Ruthenium Red., ----  
Biochem. J. 140, 143-155 (1974).
- 6).- Diamond Jared M. and E.M. Wright. Biological Membranes: The Physical  
Basis of ion and nonelectrolyte selectivity Ann. Rev. ---  
Physiol. 39, 581-646 (1969).
- 7).- Eisenman G. Proc. 23rd. Intern Congr. Physiol. Sci. (Excerpta Med. -  
Found, Amsterdam, 644pp ), p 489-506 (1965).
- 8).- E. Ernst. Inorganic Materials in the striated Muscle, Acta Biochem.-  
et Biophys. Acad. Scer. Hung, 10, 95-99 (1975).
- 9).- Entman M.L. et al. Analysis of Calcium Binding and Release by canine  
cardiac Relaxing System. J. Biol. Chem. 248, 7762-7772 --  
(1973).
- 10).- G. dos remedios C., W.A. Huges and R.M. Golding, Di- and trivalent -  
metal ion discrimination in the myosin ATPase System, ---  
Muscle Research unit, departament of Anatomy. University-  
of Sydney and School of Chemistry, Univerity N.S.W 77pp.
- 11).- Godfraind T. Calcium exchange in vascular smooth muscle, action of -  
noradrenaline and Lanthanum, J. Physiol. 260, 21-35 (1976).
- 12).- Gutiérrez Rios, E. Química Inorgánica, Ed. Reverté S.A. España 1978.  
p 134-140.
- 13).- H. Sisler Harry, et al. College Chemistry, Ed. Limusa. USA 1972 ---  
p 85-92.

- 14).- K. Tume R. and M. Hunington, Calcium uptake by Sarcoplasmic Reticulum. A note on the effect of Oxalate and phosphate on the measurement of  $^{45}\text{Ca}$ . Anal. Bioch. 61, 614-617 (1974).
- 15).- H. Kawata and J. Matae. Contractile behaviour of cardiac ventricular muscle in strontium solution. Jap. J. Physiol. 27, 167-184 (1977).
- 16).- L.R. Jones M.R. Besch Jr., J.W. Fleming, Mc Connaughey, A.M. --- Watanabe, J. Biol. Chem. 254, 530-539 (1979).
- 17).- Levitsky D.O., Aliev M.K., Kuzmin A.V., Levchenko T.S. Smirnoc -- V.N., Chazov E.I. Biochim, Biophys. Acta, 443, 468-484 (1976).
- 18).- Longo F.R. Química General, Ed, Mc Graw-Hill, 1975, p 135-136-285-286.
- 19).- Mac. Lennan D.M. Purification and properties of an ATPase from Sarcoplasmic Reticulum. J. Biol. Chem., 245, 4508-4518 (1970).
- 20).- Mernier Pierre and W. Hasselbach. Comparison between  $\text{Sr}^{2+}$  and  $\text{Ca}^{2+}$  uptake by the fragmented Sarcoplasmic Reticulum. Eur. J. Biochem. 69, 79-86 (1976).
- 21).- Mernier P. and Hasselbach. The effect of Calcium and Phosphate on the Biphasic Calcium Uptake by the Sarcoplasmic Reticulum. Z. Naturforsch, 30c. 777-780 (1975).
- 22).- Morf, W.E. and Simon W. Helvetica Chim. Acta, 54, 2683-2704 (1971)
- 23).- Ortega-Blake J. and O. Novaro, et al. A molecular orbital study of the hydration of ions. The role of nonadditive effects in the hydration shells around  $\text{Mg}^{2+}$  and  $\text{Ca}^{2+}$ . J. Chem. Phys. 76, 5405-5413 (1982).
- 24).- Ortega-Blake J, and A. Lés G, del Conde P. On the dissociation of doubly charged cations:  $(\text{Mg}-\text{H}_2\text{O})^{2+}$  and  $(\text{Mg}-(\text{H}_2\text{O})_2)^{2+}$ . J. Chem. Phys 76, 5405-5413 (1982).
- 25).- P. Tew William. Use of the coulombic interactions of the Lanthanides series to identify two classes of  $\text{Ca}^{2+}$  Binding sites in Mitochondria. Bioch. and Bioph. Res. Comm. -- 78, 624-630 (1977).
- 26).- Pick U., Racker E. Inhibition of the  $(\text{Ca}^{2+})$  ATPase from Sarcoplasmic Reticulum by Dicyclohexylcarbodiimide: Evidence for location of the  $\text{Ca}^{2+}$  binding site in a hydrophobic Region. Biochemistry, 18, 108-113 (1979).
- 27).- R. Besch M. Jr. A.M. Watanabe. and L.R. Jones. J. Biol. Chem, 252 3315-3323 (1977).

- 28).- Ringer, S.A., J. Physiol. 4, 29 (1883).
- 29).- Ringer, S. and Sainsbury, M. An investigation regarding the -----  
action of strontium and barium salts compared with the  
action of line on the ventricul of the frog's heart,  
Practitioner, 31, 81-93 (1883).
- 30).- Scarpa Calcium transport and cell function. Ann. N.Y. Acad.--  
Sci. 307, (1978).
- 31).- Sherry, M.S. Ion Exchange II, Dekker, New York (1968).
- 32).- Skou, J.E. The influence of some cations on an adenosine triphos-  
phatase from peripheral nerves. Biochim. Biophys. ----  
Acta, 23, 394-401 (1957).
- 33).- Slabaugh y Persons, Química General, Ed. Limusa, México (1968).
- 34).- Stefanou J. and M.J. Woodster, Effects of Lanthanum and Low -----  
sodium on calcium movements and mechanical activity in  
frog ventricular strips., J. of Physiol, 5, 23-24 ----  
(1976).
- 35).- Talekar, S.V. Biochim. Biophys. Acta. 375,157-164 (1975).
- 36).- Ulrich Beil Frank; et al. Competition between Oxalate and phos--  
phate during active Calcium Accumulation by Sarcoplas-  
mic Vesicles, Z. Naturforsch. 32c. 281-287 (1977).
- 37).- Vlanna, A.L. Biochim. Biophys. Acta 410, 389-406 (1975).