

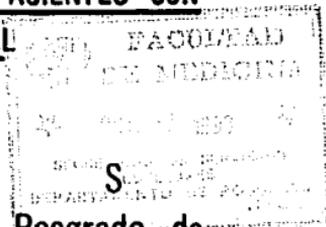
11227
23
203



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO
HOSPITAL DE ESPECIALIDADES
CENTRO MEDICO "LA RAZA"
INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL

ACTIVIDAD DE LA ATPasa-(Ca²⁺, Mg²⁺) EN MEMBRANAS
DE ERITROCITOS PROVENIENTES DE PACIENTES CON
HIPERTENSION ESENCIAL



T E S I S

Que para obtener el Titulo de Posgrado de
ESPECIALISTA EN MEDICINA INTERNA

p r e s e n t a

Dr. ANDRES ALFONSO GUTIERREZ LOPEZ



IMSS

México, D. F.

1993

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

I N D I C E

	Página
I. INTRODUCCION	1
II. OBJETIVOS	6
III. PACIENTES Y METODOS	7
IV. RESULTADOS	12
V. DISCUSION	16
VI. CONCLUSIONES	18
VII. REFERENCIAS	19
VIII. ANEXO	21

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

ADP	Difosfato de adenosina
ATP	Trifosfato de adenosina
ATPasa	Adenosín trifosfatasa
CaCl ₂	Cloruro de calcio
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Acido etilén diamino tetraacético
EGTA	Acido etilénglicol bis (amino-etil-eter) NN' tetraacético
kDa	Kilodalton
Pi	Fosfato inorgánico
Tris	Tris (hidroximetil) amino metano
V max	Velocidad catalítica máxima

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

Los avances recientes en el estudio de la relación entre homeostasis de cationes e hipertensión arterial sistémica, han revelado las bases celulares de la enfermedad en términos de una anormal concentración de calcio intracelular (1). De hecho, se ha demostrado que las concentraciones intracelulares de este ión se encuentran elevadas en diversos tejidos provenientes de pacientes con hipertensión arterial esencial (2, 3).

Varios mecanismos han sido propuestos para explicar la causa de esta condición. Uno de ellos, que se ha sostenido como el factor más importante, es un incremento en el influjo de calcio a través de los canales rápidos ubicados en la membrana plasmática (4).

Sin embargo, los mecanismos que controlan el eflujo celular de calcio, ampliamente reconocidos en el control de la homeostasis celular de este ión, han sido poco caracterizados en esta enfermedad. Es por esta razón por la cual otras moléculas importantes involucradas en la extrusión celular del calcio, como lo son un intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ y la ATPasa- $(\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+})$, son motivo de gran interés y de estudio en diversos tejidos provenientes de pacientes hipertensos (1, 3-5). La figura 1 resume la interrelación de estos factores determinantes de la homeostasis celular de calcio, y las concentraciones normales -intra y extracelulares- de este ión.

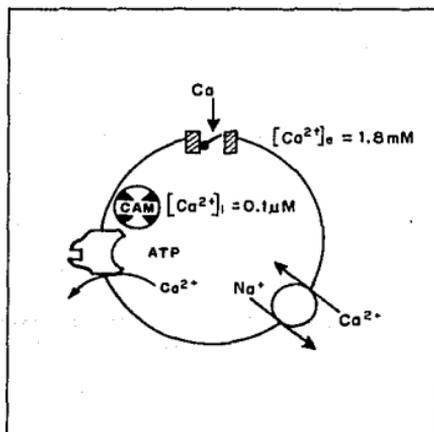


Figura 1. Mecanismos importantes en la homeostasis celular del calcio

Con respecto a la ATPasa-(Ca²⁺,Mg²⁺), se ha caracterizado como una proteína de 138-140 kDa que se encuentra unida a la membrana plasmática de células excitables y no-excitables. Esta proteína es una enzima que acopla la hidrólisis del ATP a la extrusión del calcio, que es entonces transferido del citoplasma hacia el espacio extracelular (6). Es importante mencionar aquí que esta ATPasa de calcio es regulada, a su vez, por otra proteína de membrana y fijadora de calcio: la calmodulina (Figura 2). Su unión a la ATPasa de calcio incrementa la afinidad de la enzima por el calcio y la V max de la reacción (7).

Hasta ahora, existen pocos estudios de la actividad de la ATPasa (Ca²⁺,Mg²⁺) en eritrocitos provenientes de sujetos hipertensos, y sus resultados han sido controversiales (8-10). Según lo informado en modelos experimentales o en pacientes hipertensos, la actividad de la ATPasa se ha encontrado normal (4-8), disminuida (9), o aún aumentada en plaquetas (10-13).

Esta diversidad de resultados ha creado gran confusión y desaliento en las comunidades médica y científica, ya que su relevancia en el desarrollo de nuevas estrategias para el tratamiento de la hipertensión arterial no ha podido ser establecida.

Aunque múltiples factores pueden ser invocados en la explicación de

CALMODULINA-ATPasa - Ca^{++} - Mg^{++}

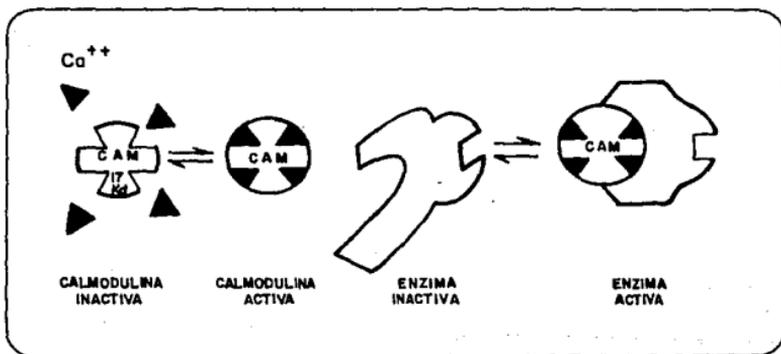


Figura 2. Regulación de la ATPasa-(Ca^{2+} , Mg^{2+}) por Calmodulina

estos resultados, nosotros hemos encontrado algunas diferencias significativas en los métodos empleados para la realización de cada estudio. De los más importantes resaltan: (1) el tipo de anticoagulante empleado para la recolección de la muestra sanguínea; (2) el procesamiento de las membranas de eritrocitos (e.g. con o sin EDTA) y (3) las condiciones en que se determina la actividad de la ATPasa de calcio (e.g. diversidad de concentraciones de EGTA, calmodulina y/o calcio empleadas en el medio de reacción).

En base a lo anterior, nuestro estudio pretende determinar: (a) si el contenido membranal de calmodulina y/o la sensibilidad de la enzima al EGTA, interfieren en la actividad de la ATPasa de membranas de eritrocitos obtenidos de pacientes hipertensos y de sujetos sanos y (b) si estos factores pudieran explicar los resultados discordantes que han sido informados hasta ahora sobre la actividad de esta enzima en pacientes hipertensos y en sujetos sanos.

II. O B J E T I V O S

Con la intención de tener una mejor comprensión del mecanismo o mecanismos de regulación de la actividad de la ATPasa-(Ca^{2+} , Mg^{2+}) en membranas de eritrocitos de pacientes con hipertensión arterial esencial, se plantearon los siguientes objetivos:

1. Seleccionar un grupo representativo de sujetos con hipertensión arterial esencial para determinar la actividad de la ATPasa-(Ca^{2+} , Mg^{2+}) en membranas aisladas de sus eritrocitos.

2. Obtener membranas de eritrocitos-depletadas de calmodulina para la adecuada evaluación de la actividad de la ATPasa de calcio in vitro. Para este fin, se recolectará sangre de sujetos hipertensos y controles usando una solución de dextrosa y citrato como anticoagulante, y procesando las membranas en un medio con EDTA.

3. Determinar el efecto del EGTA, la calmodulina y diversas concentraciones de calcio, sobre la actividad de la ATPasa-(Ca^{2+} , Mg^{2+}) en las membranas aisladas de eritrocitos de ambos grupos de sujetos.

III. PACIENTES Y METODOS

Pacientes y sujetos control

Se seleccionaron 12 pacientes con hipertensión arterial esencial del grupo de enfermos tratados regularmente en el Servicio de Medicina Interna del Centro Médico "La Raza", IMSS. La edad de los pacientes fluctuaba entre los 30 y los 70 años. Todos ellos (6 mujeres y 6 hombres) habían presentado cifras elevadas sostenidas en la presión arterial mayores de 140 mmHg la sistólica y 90 mmHg la diastólica, en al menos dos visitas al Hospital (Tabla 1).

El protocolo de investigación y sus procedimientos fueron aprobados previamente por el Comité ético de la Institución. A cada paciente se le practicaron historia clínica completa, exámen físico y estudios de laboratorio y gabinete pertinentes. Los criterios de exclusión al estudio incluyeron: hipertensión arterial secundaria; obesidad mórbida (mayor del 50% del peso ideal); embarazo; cardiopatía isquémica; insuficiencia renal o cardíaca; y/o si habían recibido tratamiento antihipertensivo en las últimas cuatro semanas antes de enlistarse al estudio.

Este grupo fué comparado con uno control de 14 sujetos normotensos con edades entre los 30 y 62 años. La presión arterial de estos sujetos nunca excedió a 140/90 mmHg en cuando menos dos visitas al Hospital, y sus exámenes clínicos, de laboratorio y gabinete, fueron normales (Tabla 1). Se tuvo mucho cuidado en seleccionar este grupo,

Tabla 1. Edad, sexo, y presión arterial de sujetos estudiados.
(Promedio \pm E.S.M.)

Características	Grupo	
	Hipertensos (n=12)	Normotensos (n=14)
Edad (años)	50 (34 - 70)	43 (30 - 62)
Sexo (M/F)	6/6	7/7
Presión sistólica (mmHg)		
Supina	164 \pm 4.4	111 \pm 2.5
Ortostática	160 \pm 5.2	107 \pm 2.2
Presión diastólica (mmHg)		
Supina	108 \pm 2.4	71 \pm 1.3
Ortostática	108 \pm 3.2	71 \pm 1.6

pues se excluyeron a aquellos con antecedentes de familiares consanguíneos que padecieran hipertensión arterial sistémica.

Todos los sujetos estudiados dieron su consentimiento por escrito para participar en el estudio.

Químicos

Los reactivos para los análisis se obtuvieron de Sigma Chemical Co, St Louis MO, USA. y, las sales empleadas, del Laboratorio Merck, Cd. de México, México.

Aislamiento de Membranas de Eritrocitos Humanos

La extracción de 50 ml de sangre se realizó por venopunción en posición supina en cada paciente con, cuando menos, 12 horas de ayuno. En cada caso, la sangre se recolectó por medio de un sistema Fenwal(Travenol SA,CV) que contiene la solución anticoagulante CPD (Acido cítrico, Citrato trisódico, fosfato monobásico y dextrosa). Las muestras fueron conservadas a 4°C y procesadas antes de 2 horas después de su extracción. La preparación de membranas a partir de eritrocitos se realizó siguiendo una modificación de la técnica original de Niggli y cols. (14). La importancia de esta técnica es que emplea EDTA (ácido etilén diamino tetraacético) en sus buffers y que la fracción de vesículas extraídas se compone predominante de membranas con la parte interna expuesta al exterior (i.e. "inside-

out") (15). Su concentración proteica fué determinada por el método de Lowry y cols (16) y las alícuotas de cada preparación se conservaron a -70°C hasta la realización posterior de los ensayos de la ATPasa.

Determinación de la actividad de la ATPasa-(Ca^{2+} , Mg^{2+})

La actividad de la ATPasa-(Ca^{2+} , Mg^{2+}) en estas preparaciones de membrana se evaluó empleando los siguientes elementos en el medio de incubación: (1) componentes invariables fueron: MgCl_2 4mM, Tris (hidroximetil) amino metano-malato (Tris malato) 50 mM y pH 7.4; (2) los componentes variables fueron: ácido etiléntrico bis (amino-etil-eter) NN'-tetraacético (EGTA) 0.1 mM junto con diversas concentraciones de CaCl_2 . Esta última estrategia tiene el objeto de obtener las concentraciones de calcio libre que se indican en las figuras, y que se calculan por medio de las constantes de estabilidad contenidas en un programa de computo (17). Otro grupo de experimentos se llevaron a cabo usando concentraciones fijas de calcio (CaCl_2 0.1 mM) en ausencia de EGTA.

Todos los ensayos se efectuaron en un volumen final de 300 μl de medio de incubación y una concentración proteica promedio de 100 μg . En todas las fracciones, la actividad de la ATPasa-(Ca^{2+} , Mg^{2+}) se midió a 37°C por 30 minutos, en condiciones estimuladas o no-estimuladas por calmodulina. En el primer caso, se añadieron 10 μg de calmodulina al medio de incubación y se dejó preincubar por 30

minutos a 4°C. La reacción se inició añadiendo la sal disódica de 5'trifosfato de adenosina (ATP) (pH7.4) necesaria para dar una concentración final de 3 mM. Esta se concluyó añadiendo ácido tricloroacético a una concentración final del 10%. La liberación de fosfato (Pi) se midió por espectrofotometría de acuerdo al método descrito por Fiske y Subbarow (18).

Las actividades de la ATPasa, no-estimuladas y estimuladas por calmodulina, se determinaron substrayendo la actividad medida en ausencia de CaCl_2 de los valores medidos en presencia de este catión. Todos los experimentos fueron realizados por duplicado en cada preparación de membrana de eritrocitos de sujetos hipertensos y controles.

IV. R E S U L T A D O S

Parámetros Clínicos

La tabla 1 resume los datos clínicos de los grupos control e hipertensivo. Entre ambos grupos no existieron diferencias significativas en lo que respecta a resultados de biometría hemática y química sanguínea. En los estudios de gabinete, cuatro pacientes hipertensos mostraron hipertrofia del ventrículo izquierdo por radiología y/o electrocardiograma.

Actividad de la ATPasa-(Ca²⁺,Mg²⁺) en presencia de EGTA

En los experimentos realizados en presencia de EGTA, no se encontraron diferencias significativas en la actividad de la ATPasa determinada en membranas de eritrocitos de sujetos normales o hipertensos.(Figura 3). En esa figura se aprecia también que la adición de calmodulina en el periodo de preincubación, no logra estimular la actividad de la ATPasa en ninguno de los dos grupos. Este hallazgo sugiere un bloqueo en la estimulación de la calmodulina, probablemente mediado por la adición de EGTA al medio de incubación. Sin embargo, es de hacer notar la relación directa que se encontró entre la actividad de la ATPasa y las concentraciones de calcio libre empleadas en estos ensayos. En este caso, la actividad hidrolítica máxima se alcanzó con calcio libre 100 μ M.

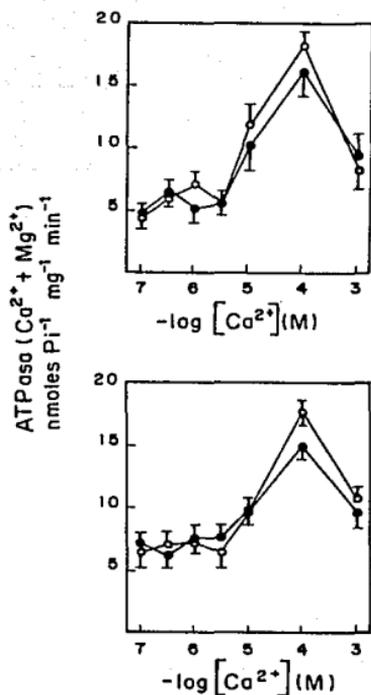


Figura 3. Efecto del complejo Ca-EGTA sobre la actividad de la ATPasa-(Ca²⁺,Mg²⁺) en membranas de eritrocitos (promedio \pm E.S.M. de 10 preparaciones diferentes de membrana en experimentos individuales por duplicado para cada grupo de sujetos evaluados). La actividad de la ATPasa de calcio fué medida según lo descrito en Pacientes y Métodos para sujetos normotensos (A) e hipertensos (B). Las concentraciones libres de calcio se mantuvieron estables utilizando EGTA (0.1 mM) en los ensayos de la actividad de la ATPasa-(Ca²⁺,Mg²⁺) estimulada (○) o no-estimulada por calmodulina (●).

Actividad de la ATPasa-(Ca²⁺,Mg²⁺) en ausencia de EGTA

En un segundo conjunto de experimentos, el EGTA fué removido del medio de incubación y se conservó constante una concentración de CaCl₂ (0.1 mM). Bajo estas condiciones, la actividad de la ATPasa de calcio no-estimulada por calmodulina, tampoco fue diferente entre las membranas de los sujetos hipertensos y las de los sanos. Sin embargo, estas actividades fueron menores que las encontradas para ambos grupos de sujetos en presencia de EGTA (Figura 4). Es muy interesante observar que, en ausencia de EGTA, la adición de calmodulina sí estimula la actividad de la ATPasa en un orden de 4 veces, tanto en el grupo de hipertensos como en el de sanos. La estimulación de la enzima por calmodulina en estos casos es estadísticamente significativa.

Estos resultados concuerdan con los de otros estudios en que el EGTA: (1) parece estimular parcialmente la actividad hidrolítica calcio-dependiente de la enzima e (2) inhibe el efecto estimulador de la calmodulina (14,15).

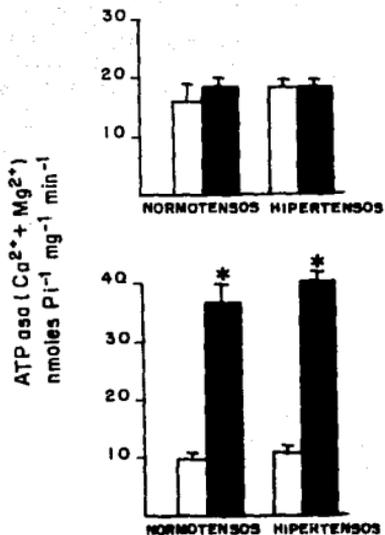


Figura 4. Efectos del Ca²⁺ y del EGTA sobre la ATPasa-(Ca²⁺,Mg²⁺) de eritrocito. (Promedio \pm E.S.M. de, (A) n = 10, (B) n = 6). La actividad de la ATPasa de calcio fué medida de acuerdo a lo descrito en Pacientes y Métodos y empleando el siguiente medio: (A) EGTA 0.1 mM y CaCl₂ 0.2mM, que producen una concentración libre de calcio de 0.1 mM o (B) CaCl₂ 0.1 mM sin adición de EGTA. En ambos casos con (●) o sin (○) adición de calmodulina.

* En comparación con la actividad encontrada sin añadir calmodulina, p < 0.001.

V. D I S C U S I O N

Los resultados obtenidos en membranas de eritrocitos de sujetos sanos y de pacientes con hipertensión arterial esencial, no mostraron diferencias en su actividad de ATPasa (Ca^{2+} , Mg^{2+}) ni en la activación de la enzima por calmodulina. Aunque estos resultados son contrarios a los informados por otros grupos (4,8), nosotros creemos que estas discrepancias en la literatura, se deben a diferencias importantes en la metodología empleada en cada estudio. Por ejemplo, y como se ha demostrado en nuestro trabajo, el uso de EGTA en el medio de incubación representa un factor importante que modifica la respuesta de la ATPasa a la calmodulina (Figura 4).

Por otra parte, hemos aislado las membranas de eritrocitos de ambos grupos (i.e. sanos e hipertensos), usando buffers con EDTA a lo largo de todo el procedimiento. Esta variable es particularmente importante al estudiar la activación de la ATPasa-(Ca^{2+} , Mg^{2+}) por calmodulina, ya que es esencial que las membranas aisladas hayan sido depletadas de esta proteína antes de medir su actividad de ATPasa de calcio (19,20). La mayoría de los estudios que han comparado la actividad de la ATPasa de sujetos sanos con la de hipertensos, han pasado por alto este parámetro. De hecho, son ellos quienes han informado que existen diferencias en las actividades, basal y estimulada por calmodulina, de la ATPasa-(Ca^{2+} , Mg^{2+}) medida en ambos grupos (9).

Desde luego, conocemos que existe una población de calmodulina fuertemente unida a la ATPasa-(Ca²⁺,Mg²⁺), que no es removida con el tratamiento de EDTA utilizado en nuestro proceso de aislamiento de membranas. Pero por otra parte, si no se controla cuidadosamente la remoción de la calmodulina débilmente-unida a la membrana por medio de EDTA, pudiera ser que las actividades de la ATPasa (basal y estimulada por calmodulina) que se observen no sean reales. Es por ello que recomendamos que cualquier estudio que informe una afinidad alterada de la ATPasa por calmodulina en membranas plasmáticas de células de sujetos hipertensos, sea analizado cuidadosamente si no se han especificado las condiciones experimentales arriba mencionadas.

Por último, está realizándose otra serie de experimentos para determinar si existen diferencias en las dos poblaciones de calmodulina unida a la ATPasa-(Ca²⁺,Mg²⁺), en membranas de eritrocitos de sujetos sanos y en las de los pacientes con hipertensión arterial esencial.

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

Los resultados presentados en este trabajo permiten concluir que:

1.- La actividad de la ATPasa-(Ca²⁺,Mg²⁺) medida en membranas de eritrocitos de sujetos hipertensos no difiere de la encontrada en las de los sujetos sanos, sea basal o estimulada por calmodulina.

2.- Es importante el uso de soluciones con EDTA durante el aislamiento de las membranas, con la finalidad de depletar de calmodulina a las mismas. Este punto es particularmente crucial en la determinación veraz de la actividad de la ATPasa-(Ca²⁺,Mg²⁺) estimulada por calmodulina.

3.- La presencia de EGTA en los medio de incubación en que se mide la actividad de la ATPasa-(Ca²⁺,Mg²⁺), bloquea la estimulación de la enzima por calmodulina.

VII. R E F E R E N C I A S

1. Postnov, Y.V. and Orlov, S.N. 1985. *Physiol. Rev.*, 65, 904-945.
2. Erne, P., Bolli, P., Bürgisser, E. and Bühler, F.R. 1984. *Physiol. Rev.*, 65, 904-945.
3. Blaustein, M.P. 1984. *Am. J. Med.* 77 (4A), 45-59.
4. Postnov, Y.V. and Orlov, S.N. 1983. In Genest J., Kuchel, O., Hamet P. and Cinti, M. (eds). *Hypertension*. Mc Graw Hill Co., New York pp 95-107.
5. Rasmussen, H. 1983. *Ann. Intern. Med.* 98 (part 2), pp 809-816.
6. Penniston, J.T., Graf, E., Niggli, V., et al. 1980. Siegel, F.L., Carafoli, E., Kretsinger, R.H., McLean, D.H. and Wasserman, R.H. (eds). *Holland, Elsevier North*. pp 23-30.
7. Jarret, H.W. and Penniston, J.T. 1978. *J. Biol. Chem.*, 253, 4676-82
8. Dahger, G., Amar, M. and Khefif, A. 1987. *Biochim. Biophys. Acta*, 903, 218-228.
9. Vincenzi, F.F., Morris, C.D., Kinsel, L. et al. 1986. *Hypertension*, 8, 1058-1066.
10. Resink, T.J., Tachuk, V.A., Erne, P. and Bühler, F.R. 1985. *J. Hypertension*, 3 (suppl.3), 337-340.
11. Furukawa, K.I. and Nakamura, H. 1984. *J. Biochem.*, 96, 1343-1350.
12. Postnov, Y.V., Orlov, S.N., Reznikova, M.V., Rjazhsky, C.G. and Pokudin, N.I. 1984. *Clin. Sci.*, 66, 459-463.
13. Kotagal, N., Colea, J.R. and McDaniel, M.L. 1983. *J. Biol. Chem.*, 258, 4808-4813.
14. Niggli, V., Adunyah, E.S., Penniston, J.T. and Carafoli, E. 1981. *J. Biol. Chem.*, 256, 395-401.
15. Mas Oliva, J. 1985. *Biochim. Biophys. Acta.*, 812, 163-167.
16. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. 1951. *J. Biol. Chem.*, 193, 265-275.
17. Sillén, L.G. and Martell, A.E. 1971, *Suppl. 1, spec. publ. 25, The Chemical Society, London.*

18. Fiske, C.H. and Subarrow, Y. 1925. *J. Biol. Chem.* 66, 375-400.
19. Mas Oliva, J. and Varela, M.E. 1987. *J. Moll. Cell. Cardiol.*, 19, 39-46.
20. Lamers, J.M.J., Verdow, P.D. and Mas Oliva, J. 1987. *Moll. Cell. Biochem.* 78, 169-176.

Reprinted From

**MEDICAL
SCIENCE
RESEARCH**

Science and Technology Letters

Rapid publication of concise reports in medical science

(Ca²⁺, Mg²⁺)-ATPase activity in erythrocyte membranes from essential hypertensive patients

A. Gutiérrez-L^{1,2}, G. Oliva², R. Ariza-Andraca¹, A. Frati-Munari¹ and J. Mas-Oliva^{2,3}

¹Servicio de Medicina Interna, Hospital de Especialidades, Centro Médico "La Raza", IMSS, ²Departamento de Bioenergética, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México and ³Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, D.F. México

Keywords: Hypertension, erythrocyte, calcium ATPase, calmodulin, ethylene-glycol-bis-(β -amino-ethyl)ine N, N'-tetraacetic acid (EGTA).

Introduction: Recent advances in the study of the relationship between cation homeostasis and hypertension have revealed the cellular basis of this disease in terms of altered intracellular concentrations of calcium [1]. High intracellular calcium concentrations have been demonstrated in different cell types from hypertensive patients [2, 3].

Several mechanisms have been put forward as the main causes for this condition, in which increased calcium influx at the plasma membrane has been proposed as one of the most important factors [4]. On the other hand, the mechanisms for calcium efflux from the cell, nowadays recognised as important in controlling cell calcium homeostasis, have been less well characterised. Among the molecules involved in the control of this efflux of calcium from the cell, a Na⁺/Ca²⁺ exchanger as well as a (Ca²⁺, Mg²⁺)-ATPase have generated interest in the study of a number of different cell types [1, 3-5].

The (Ca²⁺, Mg²⁺)-ATPase is a 138-140 kDa membrane bound protein whereby excitable and nonexcitable cells couple the hydrolysis of ATP to the extrusion of calcium ions from the cytoplasm to the extracellular space [6]. The ubiquitous calcium binding protein calmodulin, proposed as an important regulatory protein of the plasma membrane calcium-ATPase, increases enzyme affinity for calcium and the V_{max} of the reaction [7].

Several reports on the (Ca²⁺, Mg²⁺)-ATPase activity in erythrocytes from human hypertensive subjects have been controversial [8-10]. The ATPase activity in this cell system has been found to be either normal [4, 8], decreased [9], or even increased in platelets [10-13].

The purpose of this study was to investigate whether membrane calmodulin content and EGTA sensitivity might be important in understanding the differences observed so far in membrane ATPase activity from hypertensive patients.

Patients and methods: We studied a group of 12 hypertensive patients between the ages of 30 and 70, seen at the Service of Internal Medicine, Medical Center "La Raza", Mexican Institute for the Social Security. All patients (six females and six males) had sustained high blood pressure greater than 140 mmHg systolic and 90 mmHg diastolic measurements in at least two different visits (Table 1).

Procedures followed were in accordance with institutional guidelines. A medical history, physical examination and laboratory workout were always performed. Patients were excluded if the following criteria were met: secondary hypertension, morbid obesity (50% over ideal weight), pregnancy, ischaemic heart disease, cardiac or renal failure or antihypertensive treatment in the last four weeks before entry into the trial.

This group was compared to a normotensive control group

of 14 subjects (aged 30-62 years). Their blood pressures, in two different visits, never exceeded 140 mmHg/90 mmHg for systolic and diastolic measurements respectively (Table 1). All subjects in this group were selected to ensure that there were no known cases of hypertension among their close relatives. Clinical and laboratory examinations were performed too. All patients gave written consent.

Blood (50 mL) was drawn by venous puncture in a supine position after overnight fasting, and collected in acid citrate dextrose as anticoagulant. Samples were kept at 4°C until membrane preparation was performed within a 2 h period from extraction. A vesicle fraction mostly composed of inside-out membranes was prepared using a modification of the method described by Niggli, et al. [14], employing ([ethylenedinitro]tetraacetic acid) (EDTA) buffers in the isolation procedures [15]. Protein concentration was determined according to Lowry, et al. [16] and aliquots stored at -70°C until ATPase assays were carried out.

Membrane preparations were assayed for ATPase activity employing the following incubation media: invariable components, 4 mM MgCl₂ and 50 mM Tris(hydroxymethyl)aminomethane-malate (Tris-malate), pH 7.4; and variable components, 0.1 mM ethylene-glycol-bis-(β -amino-ethyl)ether N,N'-tetra-acetic acid (EGTA) and different CaCl₂ concentrations in order to give the indicated free calcium concentrations calculated with well-established stability constants [17] and a computer program. A different set of experiments was performed using a fixed calcium concentration (0.1 mM CaCl₂) without the use of EGTA.

Analytical reagents were purchased from the Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA, and salts from Merck, Mexico City, Mexico.

All assays were carried out in a final volume of 300 μ L utilising an average protein concentration of 100 μ g. Calmodulin stimulation of the ATPase activity was measured in the presence of 10 μ g calmodulin added during a 30 min preincubation period at 4°C. The (Ca²⁺, Mg²⁺)-ATPase activity was determined at 37°C for 10 min. The reactions initiated with the addition of adenosine 5'-triphosphate disodium salt (ATP) (pH 7.4) to give a final concentration of 3 mM and stopped with trichloroacetic acid to give a final concentration of 10%. Phosphate liberation was measured spectrophotometrically according to the method described by Fiske and Subbarow [18].

Non-stimulated and calmodulin-stimulated (Ca²⁺, Mg²⁺)-ATPase activities were determined subtracting the activity measured in the absence of CaCl₂ from the activity values measured in the presence of the cation. Experiments were performed in duplicate on separate membrane samples from each single individual.

Results: Table 1 shows the clinical data for the hypertensive and the normotensive groups. No significant differences were found in the blood counts or chemistry between both groups

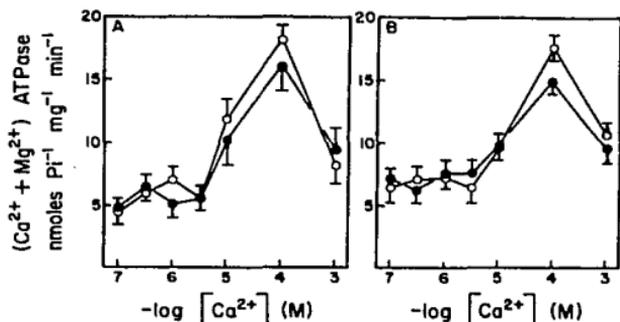


Figure 1: Effect of the Ca-EGTA complex on the $[Ca^{2+}, Mg^{2+}]$ -ATPase activity of erythrocytes membranes (means \pm SEM from 10 different preparations and individual experiments from each group of subjects performed in duplicate). The calcium-ATPase activity was measured as described under Patients and Methods for normotensive (A) and hypertensive (B) subjects. Free calcium concentration was maintained using 0.1 mM EGTA in the measurements for non-stimulated (\bullet) and calmodulin stimulated (Ca^{2+}, Mg^{2+})-ATPase activities (\circ).

Table 1: Age, sex and blood pressure of individuals studied (means \pm SEM).

Characteristics	Group	
	Hypertensive (n = 12)	Normotensive (n = 14)
Age (years)	50 (34-70)	43 (30-62)
Sex (M/F)	6/6	7/7
Systolic blood pressure (mmHg)		
Supine	164 \pm 4.4	111 \pm 2.5
Orthostatic	160 \pm 5.2	107 \pm 2.2
Diastolic blood pressure (mmHg)		
Supine	108 \pm 2.4	71 \pm 1.3
Orthostatic	108 \pm 3.2	71 \pm 1.6

(data not shown). Four hypertensive patients showed evidence of left ventricle hypertrophy in the chest X-ray and/or the electrocardiogram.

The calcium ATPase activity tested in the presence of EGTA did not significantly differ between both studied groups (Figure 1). Calmodulin pre-incubated membranes did not show stimulation of the enzyme activity, suggesting a blunted calmodulin stimulation, probably mediated by EGTA. Nevertheless, there was a direct relationship between the calcium ATPase activity and the free calcium concentrations employed, showing a maximum hydrolytic activity at 100 μ M.

In a second set of experiments, the EGTA was removed from the incubation media and a total concentration of 0.1 mM $CaCl_2$ kept constant. The non-calmodulin-stimulated calcium ATPase activity did not change in either group, showing only a lower activity than the activity obtained in the presence of EGTA (Figure 2). Under these conditions, calmodulin stimulated four-fold the calcium ATPase activity on both groups. In accordance with other reports [14, 15], EGTA seems to stimulate partially the calcium-dependent ATP hydrolytic activity of the enzyme and inhibit the stimulatory calmodulin effect.

Discussion: The present results obtained with erythrocyte membranes from normotensive subjects and essential hyper-

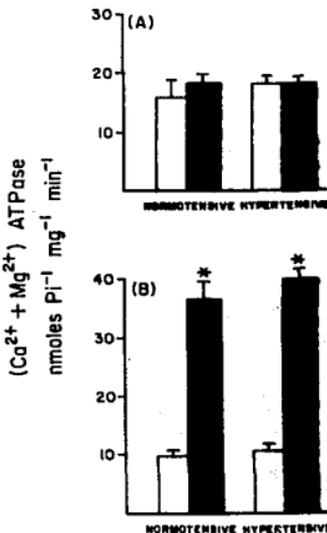


Figure 2: Effect of Ca^{2+} and EGTA on the erythrocyte (Ca^{2+}, Mg^{2+}) -ATPase. (Means \pm SEM, (A) n = 10, (B) n = 6.) The calcium ATPase activity was measured as described under Patients and Methods in a media containing: (A) 0.1 mM EGTA and 0.2 mM $CaCl_2$ to give a free calcium concentration of 0.1 mM, (B) 0.1 mM $CaCl_2$ with no EGTA in the medium, either with (\bullet) or without (\circ) added calmodulin.

* As compared with no added calmodulin, $p < 0.001$.

tensive patients show no differences in their (Ca^{2+} , Mg^{2+})-ATPase activity or their activation of the enzyme by calmodulin. Although these findings agree with those reported by other groups [4, 8], we believe the discrepancies observed in the literature when these parameters are measured could be due to differences in the methodology employed. For instance, as observed in our investigation, the use of EGTA in the assay media could represent an important factor in the altered response of the Ca^{2+} -ATPase to calmodulin.

In our study, moreover, the membrane preparations obtained from both groups, normotensive and hypertensive subjects, were carried out using EDTA buffers during the isolation procedure. This is particularly important when studying the activation of the Ca^{2+} -ATPase by calmodulin, since it is essential to have calmodulin-depleted membranes before the initiation of the Ca^{2+} -ATPase activity experiments [19, 20]. Most studies carried out so far comparing normotensive with hypertensive membranes have overlooked this situation, and reported differences in Ca^{2+} -ATPase activity and calmodulin activation without having controlled this parameter [9].

Although there seems to be a population of calmodulin tightly bound to the Ca^{2+} -ATPase, this accessory protein is not removed by an EDTA treatment during the membrane isolation procedure. On the other hand, if the so-called lightly bound calmodulin removed by the EDTA treatment is not carefully controlled, differences observed in Ca^{2+} -ATPase activity and calmodulin activation may not be real. Therefore, the suggestion of having a Ca^{2+} -ATPase with an altered affinity for calmodulin associated with the cell plasma membrane from hypertensive patients, should be taken with caution, if these conditions have not been met.

Experiments are in progress in our laboratory to elucidate whether there are any differences in the two populations of calmodulin bound to the Ca^{2+} -ATPase in both normotensive and hypertensive erythrocyte membranes.

- Postnov, Y.V. and Orlov, S.N. 1985. *Physiol. Rev.*, **65**, 904-945
- Erne, P., Bollen, P., Burgasser, E. and Bühler, F.R. 1984. *Physiol. Rev.*, **65**, 904-945
- Blaustein, M.P. 1984. *Am. J. Med.*, **77** (4A), 45-59
- Postnov, Y.V. and Orlov, S.N. 1983. In: Genest, J., Kuchel, G., Hamet, P. and Cantu, M. (eds). *Hypertension*, pp. 95-107. McGraw Hill Co., New York
- Rasmussen, H. 1983. *Ann. Intern. Med.*, **98** (part 2), pp. 809-816
- Penniston, J.T., Graf, E., Niggli, V. et al. 1980. In: Siegel, F.L., Cataloff, E., Kressinger, R.H., McLennan, D.H. and Wasserman, R.H. (eds), pp. 23-30. Holland, Elsevier North
- Jarret, H.W. and Penniston, J.T. 1978. *J. Biol. Chem.*, **253**, 4676-4682
- Daiger, G., Amar, M. and Kheif, A. 1987. *Biochem. Biophys. Acta*, **903**, 218-228
- Vincenzi, F.F., Morris, C.D., Kinsel, L. et al. 1986. *Hypertension*, **8**, 1058-1064
- Revnik, T.J., Tlachuk, V.A., Erne, P. and Bühler, F.R. 1985. *J. Hypertension*, **3** (suppl. 3), 337-340
- Furukawa, K.I. and Nakamura, H. 1984. *J. Biochem.*, **96**, 1343-1350
- Postnov, Y.V., Orlov, S.N., Ryznikova, M.V., Rjazhsky, C.G. and Pokudin, N.I. 1984. *Clin. Sci.*, **86**, 459-463
- Kotagal, N., Colea, J.R. and McDaniel, M.L. 1983. *J. Biol. Chem.*, **258**, 4828-4833
- Niggli, V., Adanyah, E.S., Penniston, J.T. and Cataloff, E. 1981. *J. Biol. Chem.*, **256**, 395-401
- Mas-Oliva, J. 1985. *Biochem. Biophys. Acta*, **812**, 163-167
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. 1951. *Biol. Chem.*, **193**, 265-275
- Sidrás, L.G. and Martell, A.E. 1971. Suppl. 1, spec. publ. 25. *The Chemical Society, London*
- Fiske, C.H. and Subarow, Y. 1925. *J. Biol. Chem.*, **66**, 375-400
- Mas-Oliva, J. and Varela, M.E. 1987. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, **19**, 39-46
- Lamers, J.M.J., Verdouw, P.D. and Mas-Oliva, J. 1987. *Mol. Cell. Biochem.*, **78**, 169-176

This study has been partially supported by CONACyT (Mexico) (Grant: PCEXCNA 050747). The secretarial assistance of Mrs Ma. Elena Gutiérrez is gratefully acknowledged.

Reprint requests to: Dr J. Mas-Oliva, Departamento de Bioenergética, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Apdo. Postal 70-440, 04510 México D.F., México.

Paper received: 1st September, 1992; amended 28th October, 1992.