



# Universidad Nacional Autónoma de México

---

FACULTAD DE QUIMICA

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

**ATPasa dependiente de sodio y potasio:  
Estudios en membranas de eritrocitos de  
pacientes desnutridos graves.**

**T E S I S**

Que para obtener el grado de:  
**MAESTRO EN CIENCIAS QUIMICAS  
(BIOQUIMICA)**

**P r e s e n t a :**  
**RAFAEL URZUA MACIAS**

México, D. F.

1985



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

**Jurado asignado;**

**Presidente: Dra. Victoria Chagoya de Sánchez**

**Secretario: Dr. Juan C. Díaz Zagoya**

**Primer Vocal: Dr. Alfonso González Noriega**

**Suplente: Dr. Blas Lotina Hensen**

**Suplente: Dr. Antonio Velázquez Arellano**

**El presente trabajo fue realizado en la Unidad de Genética de la Nutrición del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM bajo la supervisión de los Dres. Alfonso González Noriega y Antonio Velázquez Arellano.**

**A mi familia**

**A mis maestros**

**A mis compañeros y amigos**

**Agradecimientos:**

**A los doctores Antonio Velázquez Arellano  
Alfonso González Noriega y  
Bartolomé Pérez Ortíz.**

**Al personal de la Unidad de Genética de la  
Nutrición, particularmente a la Sra. Pauli  
na Rocha y al Sr. Carmelo López.**

**Al personal de la Sala de Nutrición del  
INCYTAS-DIF, en el Instituto Nacional de  
Pediatria, en especial a las doctoras Ju-  
lia Arce y Josefina Guzmán.**

**ATPasa DEPENDIENTE DE SODIO Y POTASIO:  
ESTUDIOS EN MEMBRANAS DE ERITROCITOS DE  
PACIENTES DESNUTRIDOS GRAVES.**

**Rafael Urzúa Macías  
Unidad de Genética de la Nutrición  
Instituto de Investigaciones Biomédicas  
U.N.A.M.**

## INDICE

### INTRODUCCION GENERAL

Antecedentes.....	1
Hipótesis.....	10
Objetivos.....	11

### SECCION I: Adecuación de un método para medir la actividad de la ATPasa dependiente de sodio y potasio en membranas de eritrocitos.

Introducción.....	13
Material y Métodos.....	19
Resultados.....	25
Discusión.....	54
Conclusiones.....	65

### SECCION II: Actividad y cinética aparente de membranas de eritrocitos de pacientes desnutridos graves.

Introducción.....	67
Material y Métodos.....	73
Resultados.....	75
Discusión.....	86
Conclusiones.....	96

RESUMEN.....	97
--------------	----

BIBLIOGRAFIA.....	99
-------------------	----

## INDICE DE FIGURAS Y CUADROS

Figura		Pag.
1	Mecanismo de reacción de la Na,K-ATPasa.....	15
2	Cuantificación colorimétrica de fosfato inorgánico. Método de Ames.....	21
3	Determinación colorimétrica de fosfato inorgánico por el método de Bonting y cols.....	22
4	Actividad de la Na,K-ATPasa vs. concentración de proteína de membranas.....	23
5	Actividad de Na,K-ATPasa vs. tiempo.....	24
6	Inhibición de la actividad de la Na,K-ATPasa por la ouabaina.....	34
7	Actividad de la Na,K-ATPasa: Efecto de la relación $Na^+ : K^+$ .....	36
8	Efecto del magnesio sobre la actividad de ATPasa de membranas de eritrocitos.....	37
9	Efecto del EDTA sobre la ATPasa de membranas de eritrocitos.....	39
10	Efecto del Tris sobre la actividad de la ATPasa de membranas de eritrocitos.....	40
11	Efecto de la temperatura de incubación sobre la actividad de Na,K-ATPasa de membranas de eritrocitos.....	42
12	Estabilidad de la Na,K-ATPasa de membranas de eritrocitos a temperatura.....	43
13	Efecto del pH de incubación sobre la actividad de la Na,K-ATPasa de membranas de eritrocitos....	44
14	Actividad de Na,K-ATPasa de membranas de eritrocitos a concentraciones variables de ATP.....	49
15	Actividad de Na,K-ATPasa vs. $Na^+$ : Efecto de la molaridad del medio de reacción.....	50
16	Actividad de ATPasa de membranas de eritrocitos a concentraciones variables de NaCl.....	52
17	Actividad de ATPasa de membranas de eritrocitos vs. $K^+$ .....	53

Figura		Pag.
18	Características clínicas del marasmo nutricional.....	68
19	Características clínicas del kwashiorkor.....	70
20	Actividad de Na,K-ATPasa a concentraciones variables de ATP. Casos individuales (desnutridos no tratados).....	77
21	Actividad de Na,K-ATPasa a concentraciones variables de NaCl. Casos individuales (desnutridos no tratados).....	79.1
22	Actividad de Na,K-ATPasa a concentraciones variables de KCl. Casos individuales (desnutridos no tratados).....	80
23	Actividad de Na,K-ATPasa a concentraciones variables de ATP. Paciente no tratado vs. paciente recuperado. A. Kwashiorkor B. Marasmo...	83
24	Actividad de Na,K-ATPasa a concentraciones variables de NaCl. Paciente no tratado vs. paciente recuperado. A. Kwashiorkor B. Marasmo...	84
25	Actividad de Na,K-ATPasa a concentraciones variables de KCl. Paciente no tratado vs. paciente recuperado. A. Kwashiorkor B. Marasmo...	85
Cuadro		Pag.
1	Actividad de la Na,K-ATPasa en diferentes fracciones de membranas de eritrocitos.....	26
2	Actividad de la Na,K-ATPasa de membranas de eritrocitos obtenidas por 2 procedimientos diferentes.....	27
3	Hidrólisis no enzimática de ATP. Comparación de 2 métodos colorimétricos para cuantificar fosfato inorgánico.....	28
4	Actividad de ATPasa de membranas de eritrocitos.....	30
5	Hidrólisis no enzimática de ATP en un ensayo de actividad de la Na,K-ATPasa.....	31

6	Actividad específica de la ATPasa de membranas de eritrocitos.....	32
7	Componentes de la actividad de ATPasa de membranas de eritrocitos.....	33
8	Actividad de Na,K-ATPasa de membranas de eritrocitos congelados por 2 días a -20°C.....	44
9	Efecto del desoxicolato de sodio (DOC) sobre la actividad de la Na,K-ATPasa de membranas de eritrocitos.....	45
10	Variaciones intra- e inter-ensayo de la actividad de ATPasa de membranas de eritrocitos...	46
11	Actividad de la Na,K-ATPasa de membranas de eritrocitos en un sujeto adulto sano: variación en un lapso de 23 meses.....	47
12	Constantes cinéticas aparentes de la Na,K-ATPasa de membranas de eritrocitos: variación intraindividual en 49 días.....	54
13	Actividad de la ATPasa de membranas de eritrocitos (desnutridos no tratados).....	76
14	Actividad de la ATPasa de membranas de eritrocitos a concentraciones variables de ATP (desnutridos no tratados).....	76
15	Actividad de la Na,K-ATPasa de membranas de eritrocitos de desnutridos no tratados, medida a concentraciones variables de NaCl.....	78
16	Actividad de la Na,K-ATPasa de membranas de eritrocitos de desnutridos no tratados, medida a concentraciones variables de KCl.....	79
17	Actividad de la ATPasa de membranas de eritrocitos (desnutridos no recuperados).....	79
18	Actividad de la Na,K-ATPasa de membranas de eritrocitos de desnutridos recuperados, medida a concentraciones variables de ATP.....	81
19	Actividad de la Na,K-ATPasa de membranas de eritrocitos de desnutridos recuperados, medida a concentraciones variables de NaCl.....	81

Cuadro

Pag.

20	Actividad de la Na,K-ATPasa de membranas de eritrocitos de desnutridos recuperados, medida a concentraciones variables de KCl,.....	82
21	Actividad de la Na,K-ATPasa de membranas de eritrocitos de desnutridos, medida en presencia y en ausencia de desoxicolato de sodio,...	82

**INTRODUCCION GENERAL**

## ANTECEDENTES

La especie humana apareció sobre la tierra hace aproximadamente cien mil años. Durante las primeras etapas de la divergencia hominoide, unos cuatro millones de años atrás, la dieta de nuestros ancestros era esencialmente vegetariana, ya que dependía de la recolección de frutos y raíces y, ocasionalmente, de huevos o algún animal pequeño (1). Hace un millón de años, en paralelo a una mayor capacidad para fabricar herramientas, los homínidos desarrollaron habilidad para la cacería. La dieta habitual fue cada vez más rica en proteínas de origen animal y, gradualmente, el hombre se volvió omnívoro (2).

Con el descubrimiento de la agricultura y de la domesticación de animales, eventos que ocurrieron de manera independiente hace unos diez mil años, el hombre se hizo sedentario. Construyó ciudades, las sociedades se estructuraron y apareció la especialización del trabajo. Fue posible acumular riquezas pero, debido a factores sociopolíticos, su distribución se volvió injusta. Los Imperios, el Coloniaje, la Revolución Industrial y la explosión demográfica, contribuyeron a acentuar esta desigualdad (2, 3). Así, en nuestros días, mientras algunos grupos humanos viven en la abundancia y acusan los efectos de la sobrealimentación (obesidad, diabetes, aterosclerosis), otros padecen las consecuencias de la pobreza y de una alimentación deficiente.

De lo anteriormente expuesto, se puede inferir lo siguiente:

a. El ambiente nutricional difiere substancialmente del que enfrentaron nuestra especie y sus ancestros durante más de cuatro millones de años. Los patrones dietéticos actuales de los humanos comenzaron al desarrollarse la agricultura y la domesticación, situación que, en términos evolutivos, es bastante reciente. En otras palabras, no es descabellado pensar que el hombre ha evolucionado a lo que es hoy en día como "cazador

-recolector" (2, 3).

b. Las condiciones nutriólogicas de algunos grupos primitivos que aún permanecen aislados del mundo tecnológico (por ejemplo, los bosquimanos Kung), tal vez son representativas de las prevalencias durante la evolución de nuestra especie, por lo cual se puede asumir que el genoma humano evolucionó para contender con un medio ambiente que, si bien limitado, satisfacía las necesidades de la mayoría (3). Quizá una minoría tuvo que enfrentarse a condiciones más precarias de vida, y la presión selectiva global fue hacia un mejor aprovechamiento de los recursos escasos (4). Con la evolución cultural, quizá hubieron épocas en que dicha presión selectiva se relajó, permitiendo un aumento en los requerimientos nutriólogicos definidos en el genoma (3).

c. El cambio de ambiente nutriólogico que enfrenta la humanidad es bastante reciente, y también lo son los principales problemas nutriólogicos que la aquejan, entre ellos la obesidad y la desnutrición. Aunque es evidente que los factores dominantes en su etiología son de tipo ambiental, esto no excluye la posibilidad de que existan genotipos susceptibles a algunos ambientes delétereos, que puedan influenciar la distribución intra- e interpoblacional de estas enfermedades (3).

Consideremos, por ejemplo, la obesidad, la cual es el resultado de un incremento en la contribución porcentual de la grasa corporal al peso de un individuo (2). Tiende a presentarse en familias y, aunque los estudios de heredabilidad sugieren la ocurrencia de factores genéticos que quizá intervengan en su mantenimiento y desarrollo (5), hasta la fecha no ha sido posible identificarlos.

Aunque algunos casos de obesidad son atribuibles a causas orgánicas específicas, tales como lesiones neurológicas o alteraciones endócrinas (2), en general el factor etiologico más importante es la sobrealimentación, esto es, cuando la dieta ingerida rebasa los requerimientos de energía de un individuo. Si los excesos energéticos son habituales, eventualmente dicha persona será obesa. Por otra parte, los estudios formales de alimentación usualmente muestran que la mayoría de los obesos

no comen más que las personas delgadas (2) e incluso, cuando se estudia la fase dinámica de la enfermedad --cuando el sujeto se está volviendo obeso--, existen pocas evidencias de que ingiere cantidades anormalmente grandes de comida (6).

Para explicar estos hallazgos, se ha propuesto que tal vez el problema primario de algunos obesos es que son más eficientes en la utilización de la energía de la dieta, que aquellos individuos que permanecen delgados (6). Según esta hipótesis, la persona propensa a la obesidad retiene en forma de grasa un porcentaje mayor de la energía de la dieta, aun cuando ésta sea aparentemente "normal". Dicho fenómeno podría ser explicado de dos maneras: o bien el individuo propenso a la obesidad tiene requerimientos energéticos menores que el que tiende a permanecer delgado, o carece de un mecanismo que le permite deshacerse de la energía dietética no deseable. Esta última posibilidad se ve apoyada por los resultados de intentos para inducir obesidad en adultos delgados. En uno de estos estudios (7), los voluntarios ingirieron dietas de contenido energético y composición variables. Aquellos con dietas mixtas hipercalóricas, tuvieron un incremento de peso corporal que no representaba la totalidad del exceso energético ingerido, lo que sugiere la existencia de un mecanismo compensatorio. En cambio, los voluntarios que ingirieron dietas ricas en lípidos mostraron un aumento significativo de peso corporal, aun consumiendo menos calorías que los que recibieron dietas bien balanceadas hipercalóricas. Esto sugiere que la eficiencia de utilización de la energía de la dieta se ve influenciada por la composición y contenido calórico de la misma, así como por el estado metabólico del individuo (7).

El mantenimiento de un peso corporal constante exige que la cantidad de energía ingerida y el gasto de la misma sean aproximadamente iguales durante un período largo de tiempo. En otras palabras, se requiere que el individuo se encuentre en equilibrio energético. La posibilidad de que algunos casos de obesidad o bien de resistencia al desarrollo de la misma, puedan deberse, al menos parcialmente, a variaciones indi

viduales en la utilización de la energía de la dieta, ha hecho que los investigadores fijen su atención en el segundo componente de la ecuación de equilibrio energético: el gasto.

La energía contenida en los nutrimentos se utiliza para realizar diversos tipos de trabajo biológico. Cuando mucho, un ser humano puede convertir en trabajo mecánico el 25 por ciento del contenido energético de los alimentos (2). La obesidad no es frecuente en aquellas personas cuyos trabajos o diversiones demandan un gran esfuerzo físico; empero, es relativamente frecuente en individuos con hábitos sedentarios. Por lo tanto, la actividad física no puede descartarse como un componente importante en la etiología de la obesidad.

De la energía requerida para el mantenimiento orgánico, menos del 10 por ciento se utiliza para hacer trabajo mecánico interno (por ejemplo, el latido cardiaco). Más del 90 por ciento se emplea en la biosíntesis de macromoléculas (trabajo químico) y en la operación de las "bombas" que regulan las concentraciones intra- y extracelulares de electrolitos (trabajo osmótico) (2). Debido al recambio de los componentes celulares, los procesos biosintéticos ocurren continuamente, y su velocidad aumenta durante el crecimiento (2).

Como los procesos metabólicos no son completamente eficientes, la energía química presente en los alimentos es transformada finalmente en energía térmica, cuya disipación mantiene la temperatura corporal.

Los organismos homeotermos, entre los que se encuentra el hombre, son endotérmicos; es decir, poseen la capacidad de generar una cantidad extra de calor (termogénesis), para regular su temperatura corporal dentro de un rango muy estrecho: 35 - 39°C (8). La gama de temperaturas ambientales compatibles con la vida, varía con el tamaño del organismo y con su capacidad de adaptación. Los homeotermos pequeños, con una superficie corporal muy grande en relación a su masa sufren mayores pérdidas de calor que los homeotermos grandes, cuya superficie corporal es pequeña con respecto a su masa metabólica (8). Cabe esperar que los mecanismos termogénicos

adaptativos estén más desarrollados en un ratón que en un elefante. El hombre ocuparía un lugar intermedio.

Desde hace tiempo se cuenta con modelos animales de obesidad hereditaria. Uno de los más estudiados es el ratón ob/ob, el cual hereda su predisposición a la obesidad de manera autosómica recesiva (9). La mutación se encuentra en el cromosoma 6 (9). y ha sido mantenida en líneas endogámicas de fondo ("background") genético diverso (10).

El ratón ob/ob mantiene su temperatura corporal 2°C por debajo de lo normal, en un rango amplio de temperaturas ambientales (11). Si se le expone súbitamente al frío (4° C), muestra hipotermia y muere en unas horas (10). En otras palabras, tiene un defecto termogénico.

Aunque durante las primeras semanas de vida extrauterina ingiere cantidades de alimento similares a las de sus compañeros de camada delgados (+/ob y +/+), el ratón ob/ob comienza a depositar cantidades anormales de grasa. Posteriormente, se vuelve hiperfágico (10). Aun cuando sólo se le proporcionen la mitad de las calorías que reciben los ratones delgados, el ratón ob/ob continúa acumulando grasa con una eficiencia (energía retenida/energía ingerida) mayor del 40 por ciento (12). En consecuencia, el ratón mutante sólo requiere el 60 por ciento de la energía de la dieta que necesitan los ratones fenotípicamente delgados. De los datos anteriores también se puede inferir que la hiperfagia no es un prerequisito para el desarrollo de la obesidad en este modelo.

Cuando la temperatura ambiental es normal (22 a 25° C), la baja capacidad termogénica del ratón ob/ob es un factor importante en la determinación de sus requerimientos energéticos disminuidos (13). Si la temperatura ambiental se eleva a 33° C para reducir las necesidades termogénicas termorregulatorias, todavía se encuentran diferencias de eficiencia en la retención de energía entre los ratones obesos y los delgados (13).

Se ha propuesto que la mayor eficiencia de retención de energía de la dieta mostrada por el ratón ob/ob, podría ser

el resultado de una disminución en el gasto energético asociado al funcionamiento de la "bomba" de sodio (14), cuyo componente enzimático es la adenosintrifosfatasa dependiente de sodio y potasio (Na,K-ATPasa; ATP: fosfohidrolasa, EC 3.6.1.3) (15).

La Na,K-ATPasa se encuentra en la membrana celular. Al hidrolizar ATP, la enzima presenta cambios conformacionales que le permiten translocar iones sodio al exterior celular e iones potasio al interior (15).

La contribución porcentual del funcionamiento de la "bomba" de sodio al gasto energético total de un organismo, ha sido materia de discusión: los cálculos van del 5 al 45 por ciento del gasto energético basal (16,17). Sin embargo, la obesidad puede desarrollarse por la acumulación de pequeñas diferencias diarias en el balance de energía (2) y, al menos en teoría, una reducción modesta en la actividad de la "bomba" podría contribuir de manera significativa a que un animal se volviera obeso (12).

Desafortunadamente, todavía no se cuenta con técnicas que permitan evaluar in vivo el impacto de la operación de la "bomba" sobre el balance energético de un animal, por lo que la capacidad de esta vía ha sido evaluada a partir de mediciones de la Na,K-ATPasa en preparaciones de tejidos del ratón ob/ob.

En hígado y músculo esquelético de ratones ob/ob adultos, se han encontrado menos unidades de Na,K-ATPasa por miligramo de proteína que en las preparaciones correspondientes a ratones fenotípicamente delgados de la misma camada. Las reducciones encontradas fueron del orden de 50 por ciento en el hígado, y de 35 por ciento en el músculo esquelético (18,19). En cuanto al riñón, los datos son contradictorios: un estudio no mostró diferencias entre ratones obesos y delgados adultos (19), en tanto que en otro se encontró una menor actividad de Na,K-ATPasa de riñones de ratones ob/ob (18).

La utilización de ratones adultos no permite discriminar si las alteraciones observadas son consecuencia de la obesi-

dad, o si están presentes antes de que ésta se manifieste constituyéndose en un factor causal en potencia.

Cuando se estudiaron ratones jóvenes, esto es, durante la fase dinámica de la obesidad, se observó que la disminución en la concentración de la Na,K-ATPasa de músculo esquelético del ratón ob/ob y, en menor grado, en el hígado, es evidente antes de que el animal sea manifiestamente obeso (12, 19).

Un aspecto a considerar, es que la actividad de la Na,K-ATPasa de varios tejidos depende del estado tiroideo del animal: aumenta con el hipertiroidismo y disminuye con el hipotiroidismo (17). Aunque el eje hipotálamo-hipófisis-tiroides del ratón ob/ob, así como las concentraciones plasmáticas de hormonas tiroideas parecen ser normales (20), existen datos que pudiesen ser compatibles con alguna alteración en la respuesta celular a las hormonas tiroideas (14), a saber:

a. La presencia simultánea de hipotermia e hipometabolismo y de concentraciones plasmáticas normales de tri- y tetrayodotironina ( $T_3$  y  $T_4$ ) en los ratones mutantes;

b. El requerimiento de dosis suprafisiológicas de  $T_3$  y  $T_4$  para normalizar la temperatura corporal del ratón ob/ob, o para inducir cambios en su composición corporal; y,

c. La pobre respuesta lipolítica --dependiente de catecolaminas-- al administrar hormonas tiroideas.

d. Una disminución en la capacidad de unión de  $T_3$  al nucleó de células hepáticas y pulmonares del ratón ob/ob (12).

Para determinar si la Na,K-ATPasa del ratón obeso responde a la administración de hormonas tiroideas, se inyectó  $T_4$  durante dos semanas a ratones ob/ob y +/-?. Ambos tipos de ratón mostraron un incremento en la concentración de la enzima en el hígado y en el músculo esquelético, desapareciendo las diferencias observadas antes del tratamiento (19). Este resultado sugiere que la enzima del ratón mutante responde a dosis elevadas de hormona exógena y que los niveles disminuidos de la Na,K-ATPasa en algunos tejidos del ratón no tratado, pueden deberse a una alteración en la capacidad de respuesta

a la hormona endógena (12). A este respecto, quizá sea importante la disminución observada en la unión nuclear de  $T_3$ .

Otro aspecto a considerar es la probable participación de la Na,K-ATPasa en los mecanismos termogénicos termorregulatorios. Cuando se expone a una rata a una temperatura ambiental de 4° C, sus tejidos muestran un incremento en la respiración asociada al transporte activo de sodio, esto es, en el componente respiratorio sensible a ouabaína, un inhibidor específico de la Na,K-ATPasa (21). Si dicho estímulo aplicado en forma crónica pudiese aumentar la concentración de la enzima en los tejidos del ratón ob/ob, esto sería indicativo de que el ratón mutante posee la facultad intrínseca de modular las concentraciones de la Na,K-ATPasa (12).

Se había mencionado que el ratón ob/ob no sobrevive por mucho tiempo al ser expuesto de manera brusca al frío (4° C); sin embargo, los ratones ob/ob jóvenes pueden tolerar temperaturas más moderadas. Cuando estos animales fueron expuestos a 15° C, su termogénesis fue un 80 por ciento mayor que la observada en los ratones obesos mantenidos a 25° C, sin signos aparentes de tiriteo muscular (22), lo que sugiere que el ratón ob/ob puede activar el componente metabólico de la termogénesis inducida por frío.

Después de tres semanas de aclimatación a 14° C, los ratones delgados (genotipos +/+ y +/ob), mostraron un incremento de las concentraciones de Na,K-ATPasa en hígado (34 por ciento) y en músculo esquelético (29 por ciento), en relación a los controles aclimatados a 25° C. El efecto fue mayor en los ratones ob/ob, con aumentos de 83 y 107 por ciento en hígado y en músculo esquelético, respectivamente (22). La magnitud de la respuesta fue similar a la observada al administrar dosis farmacológicas de tiroxina ( $T_4$ ), (19). Por otra parte, los animales aclimatados al frío no parecen ser hipertiroideos (23), dato que sugiere que la exposición de los animales a temperaturas bajas aumenta la respuesta de la enzima a las concentraciones endógenas de hormonas tiroideas, o bien que otros factores asociados a la aclimatación al frío pueden

incrementar las concentraciones de Na,K-ATPasa (12).

En resumen, aunque en algunos tejidos del ratón ob/ob se han encontrado concentraciones disminuidas de la Na,K-ATPasa, se requieren más datos para evaluar el impacto de esta alteración sobre el desarrollo de la obesidad en este modelo.

La posibilidad de que la Na,K-ATPasa contribuya de manera significativa al gasto energético de un organismo, aunada a los hallazgos en hígado y músculo esquelético del ratón ob/ob, indujeron a De Luise y cols. (24) a examinar el funcionamiento de la "bomba" de sodio en eritrocitos de humanos obesos, midiendo dos parámetros independientes: a) la unión de ouabaina tritiada y, b) el transporte de rubidio-86 ( $^{86}\text{Rb}^+$ ). La determinación del número de sitios para ouabaina permite estimar el número de unidades de Na,K-ATPasa por célula (25), en tanto que el transporte de  $^{86}\text{Rb}^+$  al interior del eritrocito evalúa la actividad de la "bomba" ya que la Na,K-ATPasa maneja este catión de manera similar al potasio (26).

Los autores observaron una reducción significativa (22 por ciento) en el número de unidades y en la actividad de la "bomba" de sodio de los eritrocitos de sus pacientes obesos, en comparación con los individuos no obesos (24). Las concentraciones intraeritrocíticas de sodio fueron significativamente mayores en los obesos que en los delgados (24).

Doce de los sujetos obesos perdieron peso mediante restricción dietética, hecho que no tuvo un efecto apreciable sobre las concentraciones de Na,K-ATPasa y actividad de "bomba" observadas antes del tratamiento reductivo, lo que sugiere que dicha alteración tal vez no sea concomitante a la obesidad (24).

En base a los resultados del estudio, De Luise y cols. postularon que una reducción en el número de unidades y en la actividad de la Na,K-ATPasa podría desempeñar un papel relevante en la fisiopatología de la obesidad en el humano, proporción condicionada por el cumplimiento de los supuestos siguientes: a) que dicha alteración fuese generalizada, esto es, presente en otros tipos celulares además del eritrocito

y, b) que la contribución de la "bomba" de sodio al gasto energético total del organismo fuese significativa (24). Expresada en otras palabras, la hipótesis sugiere que una actividad disminuida de la Na,K-ATPasa (y por ende, de la "bomba" de sodio) haría a un individuo más eficiente en la retención de energía de la dieta y tal vez más propenso a volverse obeso en un ambiente nutricional satisfactorio; en cambio, aquel individuo con una actividad normal o aumentada de esta enzima y sometido a las mismas condiciones de nutrición, sería más resistente a la obesidad.

#### HIPOTESIS

Otra consecuencia probable de la hipótesis de De Luise y cols. es la siguiente: En un ambiente carencial, el sujeto con una mayor eficiencia en la conservación de energía derivada de una "bomba" de sodio (Na,K-ATPasa) menos activa, sería más resistente a los efectos de un bajo aporte energético en la dieta; aquél con una actividad normal o aumentada de la "bomba" (Na,K-ATPasa), sería más lábil a este ambiente deletéreo. Dicha susceptibilidad podría manifestarse en una forma grave de desnutrición.

Para explorar esta última posibilidad, en un grupo de niños gravemente desnutridos, hospitalizados en el Instituto Nacional de Pediatría (Servicio de Nutrición, INCYTAS-DIF), se midió la actividad de Na,K-ATPasa en "fantasmas" (membranas) de eritrocitos, en dos condiciones clínicas: paciente no tratado y paciente recuperado. Con fines comparativos, se incluyó un grupo de niños bien nutridos, hospitalizados en el Servicio de Oftalmología del mismo Instituto. Los ensayos enzimáticos fueron llevados a cabo en la Unidad de Genética de la Nutrición del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México.

### OBJETIVOS

Los objetivos concretos del estudio fueron los siguientes:

a. Determinar si existe una alteración en la actividad de la Na,K-ATPasa de membranas de eritrocitos de pacientes con formas graves de desnutrición.

b. En su caso, caracterizar dicha alteración, mediante la determinación de las constantes cinéticas aparentes ( $K_m$  y  $V_{max}$ ) para ATP, sodio y potasio.

c. Discriminar si la supuesta alteración de la actividad enzimática es un fenómeno asociado a la desnutrición, o bien una característica permanente de los sujetos que tal vez fuese un factor de riesgo para la enfermedad.

La presentación de este trabajo se ha dividido en dos secciones: la primera se refiere a la adecuación de un método para medir la actividad y las constantes cinéticas aparentes de la Na,K-ATPasa en fantasmas de eritrocitos. En la segunda sección se describen los resultados obtenidos con este método en los pacientes desnutridos.

**SECCION I:**

**Adecuación de un método para  
medir la actividad de la ATP-  
asa dependiente de sodio y de  
potasio en membranas de eri-  
troцитos.**

## INTRODUCCION

La mayoría de las células animales tienen una concentración citoplasmática elevada de potasio y una concentración baja de sodio, situación opuesta a la que prevalece en el líquido extracelular. Para mantener la distribución asimétrica de estos cationes monovalentes en ambos compartimientos, las células cuentan con un sistema de transporte activo que media el movimiento transmembranal de los iones de sodio ( $\text{Na}^+$ ) y potasio ( $\text{K}^+$ ), en contra de su gradiente electroquímico: la llamada "bomba" de sodio (15).

En 1957, Skou describió por vez primera a la ATPasa dependiente de sodio y de potasio ( $\text{Na,K-ATPasa}$ ; ATP: fosfohidrolasa, EC 3.6.1.2), en una preparación microsomal de nervios periféricos de cangrejo (27). Desde entonces, un gran cúmulo de evidencias sugieren que esta enzima es una parte funcional de la "bomba" de sodio (28):

- a. La enzima se encuentra en la membrana celular.
- b. Su substrato es el ATP, el cual actúa en la cara interna de la membrana.
- c. La actividad máxima de la ATPasa se obtiene en presencia de magnesio ( $\text{Mg}^{++}$ ),  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$ , a las concentraciones de estos dos últimos iones que producen transporte máximo en la célula intacta.
- d. La enzima muestra asimetría con respecto a los iones  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$ . Los "sitios" para el ión  $\text{K}^+$  se encuentran en el lado externo de la membrana celular.
- e. La  $\text{Na,K-ATPasa}$  es inhibida por glucósidos cardiactivos (por ejemplo, la ouabaina), los cuales son inhibidores específicos de la "bomba" de sodio.
- f. Las células que mantienen una baja concentración de  $\text{K}^+$ , como sucede en la variante LK de eritrocitos de ovino, tienen un menor número de unidades de  $\text{Na,K-ATPasa}$ .
- g. En vesículas reconstituidas a partir de la enzima pu

rificada se ha observado un transporte de  $\text{Na}^+$  que depende de ATP y que es sensible a ouabafina.

La Na,K-ATPasa ha sido purificada a partir de varios tejidos. En todos los casos, se han encontrado dos tipos de subunidades polipeptídicas (15). La subunidad mayor (alfa), con un peso molecular aproximado de 95 kilodaltones, contiene el sitio activo para la hidrólisis del ATP (29), así como el sitio de unión para la ouabafina (30). El ATP actúa en la cara interna de la membrana, en tanto que la ouabafina lo hace en la cara externa (28), lo que sugiere que la subunidad alfa atraviesa por completo esta estructura (15). La subunidad menor (beta) es una glucoproteína cuyo peso molecular aproximado es de 40 kilodaltones. Su función bioquímica se desconoce, pero no se puede separar de la subunidad mayor sin que se pierda la actividad de la ATPasa (15).

Los estudios con agentes químicos que inducen la formación de enlaces covalentes han proporcionado información acerca de la posible estructura funcional de la Na,K-ATPasa. Cuando se emplean imidoésteres, los cuales reaccionan con residuos de lisina, se forma un enlace covalente entre una subunidad alfa y una beta (31). La o-fenantrolina cúprica induce la unión covalente entre dos subunidades alfa, mediante la oxidación de grupos sulfhidrilo adyacentes (32). Estos datos han sugerido un modelo tetramérico (beta-alfa-alfa-beta), compatible con varios de los modelos cinéticos que se han propuesto para la Na,K-ATPasa (33), aunque todavía se discute su validez (34),

La Na,K-ATPasa purificada contiene lípidos que parecen ser esenciales para su actividad. La enzima delipidada puede ser reactivada por diversos fosfolípidos, especialmente por la fosfatidilserina y el fosfatidil inositol (35). Otros estudios indican que no hay un requerimiento absoluto por algún fosfolípido en particular (33).

El sustrato primario para la actividad de esta ATPasa es el ATP (36). Otros nucleótidos son hidrolizados a una velocidad menor, en el orden siguiente de efectividad decrecien

te: CTP, ITP, GTP, UTP y TTP (37). Aunque el ATP puede unirse a la enzima en ausencia de magnesio, se considera que el substrato real es el complejo  $Mg^{++}$ -ATP para el que la ATPasa posee dos sitios con afinidad variable. El de alta afinidad ( $K_M$  aparente = 1 micromolar) es el sitio de fosforilación (38), en tanto que el de baja afinidad ( $K_M$  aparente = 480 micromolar) funciona como sitio activador para la fosforilación y la reacción global de ATPasa (35).

La enzima requiere en forma característica de la presencia conjunta de  $Na^+$  y  $K^+$  (28). El requerimiento es absoluto para el ión  $Na^+$  ( $K_a$  = 5 - 13 milimolar), en tanto que el ión  $K^+$  ( $K_a$  = 0.5 - 1.8 milimolar) puede ser reemplazado por talio ( $Tl^+$ ), rubidio ( $Rb^+$ ), cesio ( $Cs^+$ ) y amonio ( $NH_4^+$ ) (35). La actividad máxima de la enzima se observa a una relación  $Na^+ : K^+$  en el rango de 5:1 a 10:1 (39).

El mecanismo de reacción de la Na,K-ATPasa no se conoce todavía con exactitud. Para los fines del presente trabajo se puede utilizar un esquema derivado del propuesto inicialmente por Albers (40) y Post y cols. (41). Dicho esquema involucra cinco pasos y se representa en la figura 1.

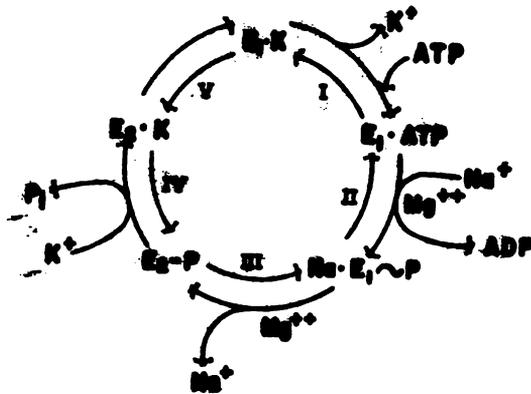


Fig. 1: Mecanismo de reacción de la Na,K-ATPasa.

En el paso I el ATP se une a la enzima interaccionando con un residuo de arginina, uno de tirosina y uno de cisteína, (35,42,43), evento que puede ocurrir en ausencia de  $\text{Na}^+$  y de  $\text{Mg}^{++}$  (44,45). Cuando estos cationes no están presentes, el ión  $\text{K}^+$  aumenta la constante de disociación ( $K_d$ ) del ATP (45) y se duplican el número de sitios para el nucleótido en la enzima (44). El efecto del ión  $\text{K}^+$  es antagonizado competitivamente por  $\text{Na}^+$  (44). Como resultado de la unión del sustrato, la enzima se vuelve muy afín por el ión  $\text{Na}^+$  (46).

Durante el paso II, la enzima se fosforila a partir de ATP en presencia de  $\text{Na}^+$  y de  $\text{Mg}^{++}$  (40). El intermediario fosforilado ( $E_1\text{-P}$ ) tiene gran afinidad por el ión  $\text{Na}^+$ ; además, es un compuesto de "alta energía" ya que puede reaccionar con ADP para formar ATP (41).

En el paso III la enzima pasa de una conformación de alta afinidad por  $\text{Na}^+$  ( $E_1\text{-P}$ ) a una conformación muy afín por el ión  $\text{K}^+$  ( $E_2\text{-P}$ ), transición que es favorecida por  $\text{Mg}^{++}$  (35,47). En la célula intacta este cambio conformacional se traduce en la exposición de los sitios de unión para  $\text{Na}^+$  al exterior celular (47). El intermediario  $E_2\text{-P}$  se vuelve insensible al ADP, pero se descompone en presencia de  $\text{K}^+$  (41).

Varias evidencias apoyan la existencia de esta transición conformacional. Los estudios con sondas ("probes") fluorescentes muestran que los iones  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  ejercen efectos opuestos sobre la ATPasa (48). Cuando se hace proteólisis controlada, los fragmentos peptídicos son diferentes para  $E_1$  (forma  $\text{Na}^+$ ) y  $E_2$  (forma  $\text{K}^+$ ) (49).

En la fase siguiente (paso IV), el ión  $\text{K}^+$  induce la desfosforilación de  $E_2\text{-P}$  (40). El intermediario resultante ( $E_2\text{-K}$ ) tiene baja afinidad por el sustrato (ATP) (50).

Finalmente (paso V),  $E_2\text{-K}$  se transforma en  $E_1\text{-K}$ , conformación que intercambia fácilmente el ión  $\text{K}^+$  por  $\text{Na}^+$ . En la célula intacta, los sitios de unión para el ión  $\text{K}^+$  se exponen al interior celular y la enzima puede recomenzar el ciclo catalítico (47,50).

Los glucósidos cardiactivos, derivados de la digital,

son inhibidores específicos de la Na,K-ATPasa y se emplean con frecuencia para determinar la presencia de esta enzima en varios tejidos (28). El más utilizado de estos compuestos es la ouabaina (estrofantina G), ya que es relativamente hidrosoluble. La ouabaina actúa en la cara extracelular de la ATPasa (35). Aparentemente, su efecto principal es la estabilización del intermediario  $E_2-P$ , impidiendo su hidrólisis (50, 51). La unión de la ouabaina a la enzima es favorecida por  $Na^+$  y  $Mg^{++}$  y es antagonizada por  $K^+$  (35). La fosforilación de la enzima aumenta notablemente la velocidad de unión del glucósido (52).

La actividad de la Na,K-ATPasa puede ser ensayada en preparaciones membranales como los "fantasmas" de eritrocitos, ya sea midiendo la desaparición del sustrato (por ejemplo, con un ensayo de bioluminiscencia, (53) o la aparición de un producto (por ejemplo, mediante la cuantificación colorimétrica de fosfato inorgánico, 54). En todos los casos, el método elegido debe excluir actividades fosfohidrolíticas contaminantes, lo que usualmente se logra substrayendo de la actividad total de ATPasa la actividad no específica (Mg-ATPasa). La Mg-ATPasa se define como aquella actividad que ocurre en ausencia de  $Na^+$  y/o  $K^+$  o en presencia de una concentración inhibitoria máxima de ouabaina (28).

Se han descrito un sinnúmero de procedimientos para preparar "fantasmas" (membranas de eritrocitos), así como para determinar en ellos la actividad y constantes cinéticas de la Na,K-ATPasa, debido a lo cual no es sorprendente que los valores encontrados varíen de comunicación a comunicación. Es por ello que en el presente trabajo se compararon varios métodos ya descritos, escogiendo aquellas condiciones que fueran las más adecuadas para la realización del mismo.

En las páginas siguientes se describe la adecuación de un método para determinar la actividad y las  $K_M$  aparentes de la Na,K-ATPasa de "fantasmas" (membranas) de eritrocitos utilizando como parámetro de actividad enzimática la liberación de fosfato inorgánico proveniente del ATP. La cuantificación

- 18 -

de fosfato se hizo mediante una técnica colorimétrica.

## MATERIAL Y METODOS

### A. Reactivos.

ATP (sal de Tris, libre de vanadio), octahidrato de ouabaina, Tris-HCL y Tris base provenientes de Sigma Chemical. Cloruros de Sodio, potasio y magnesio, así como los ácidos sulfúrico y tricloroacético, de J.T. Baker. Fosfato monobásico de potasio y sulfato ferroso de J.T. Baker. Molibdato de amonio, carbonato y bicarbonato de sodio y la sal disódica del ácido etilen-diamino-tetraacético (EDTA), de Malinckrodt. Desoxicolato de sodio y ácido ascórbico, de Merck.

En todos los procedimientos se utilizó agua desionizada bidestilada, la cual se almacenó en recipientes de vidrio sellados. El ATP se disolvió en agua a una concentración final de 60 milimolar (mM), llevándolo a un pH = 6.5 con Tris. Se congelaron alícuotas a -20°C.

El sodio del EDTA fue eliminado mediante precipitación con HCL 12N, lavando repetidamente con agua destilada. El ácido resultante se tituló con hidróxido de sodio.

### B. Métodos.

I. Preparación de membranas ("fantasmas") de eritrocitos. Se utilizaron dos métodos diferentes, con algunas modificaciones:

a. Método de Branley y cols. (55):

1. A partir de sangre completa heparinizada se separan los eritrocitos mediante centrifugación (2,000 r.p.m., 4° C, 15 minutos). Después de eliminar el plasma y la capa de leucocitos ("buffy coat") los eritrocitos se resuspenden en 4 volúmenes de bicarbonato de sodio 155 mM, pH 7.4, volviendo a centrifugar. El lavado se repite en dos ocasiones más.
2. Los eritrocitos se lisan con 11 volúmenes de una solución de bicarbonato de sodio 7.5 mM,

pH 7.4 agitado vigorosamente. A partir de este momento todas las manipulaciones se llevan cabo a 4° C.

El lisado se centrifuga durante 30 minutos, a 20,000 x g y 4° C. El sobrenadante es aspirado sin tocar el botón de membranas, las cuales se resuspenden en 11 volúmenes de la solución hipotónica de bicarbonato, volviendo a centrifugar. Los lavados con esta solución se repiten por cuatro ocasiones y, finalmente, las membranas son resuspendidas en el volumen deseado de solución hipotónica. La suspensión se fracciona en alícuotas, las cuales se congelan a -20° C.

b. Método de Hanahan y Ekholm (56):

La secuencia seguida en este procedimiento es similar a la descrita para el método de Branley y cols. La diferencia estriba en las soluciones empleadas. Los eritrocitos se lavan con una solución de Tris 172 mM, pH 7.6, y se lisan con Tris 11.1 mM, pH 7.6.

## II. Cuantificación colorimétrica de fosfato inorgánico.

Se emplearon dos técnicas:

a. Método de Ames (57).

Reactivo de Ames: 1 parte de ácido ascórbico al 10 por ciento en agua (p/V), en 6 partes de una solución de ácido sulfúrico 1 N que contiene molibdato de amonio al 0.42 por ciento (p/V).

Se añade 0.70 ml del reactivo a un tubo que contiene 0.30 ml de la muestra que va a ser analizada. Se utiliza como blanco agua bidestilada (0.30 ml). Se incuba durante 60 minutos a 37° C y se lee la absorbancia a 820 nm. La figura 2 muestra que con este método se pueden detectar desde 2 nanomolas de fosfato (solución estándar: fosfato monobásico de potasio 0.2 mM).

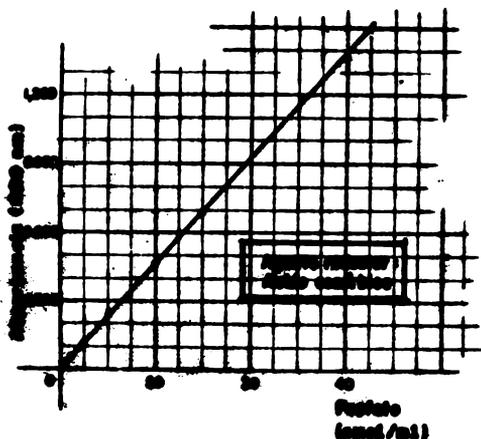


Fig. 2. Cuantificación colorimétrica de fosfato inorgánico. Método de Ames (57).

b. Método de Bonting y Cols. (58).

Reactivo: Solución de ácido sulfúrico 1.15 N, que contiene molibdato de amonio al 1.0 por ciento (p/V) y sulfato ferroso al 4 por ciento (p/V).

Se añade 0.500 ml del reactivo a un tubo que contiene un volumen similar de la muestra que se va a analizar (como blanco se utiliza agua bidestilada). La coloración (azul) se desarrolla a temperatura ambiente en un lapso de 10 minutos. La absorbancia se lee a 700 nm. Con este procedimiento es posible detectar cantidades de fosfato tan pequeñas como 2 nanomolas (Fig. 3).

III. Cuantificación de proteína membranal.

Se hizo mediante la modificación de Oyama y Eagle (59) del procedimiento de Lowry y cols. (60).

IV. Medición de la actividad de Na,K-ATPasa.

La actividad enzimática se midió cuantificando la liberación de fosfato inorgánico (Pi). Todos los ensayos se hicieron por duplicado o triplicado; en todos

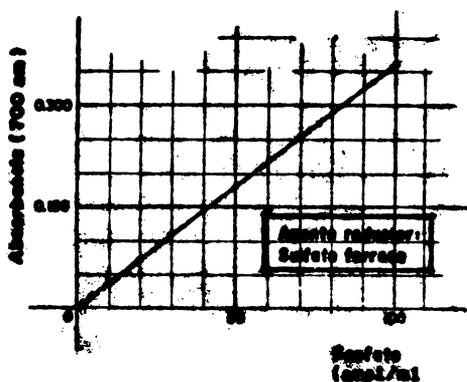


Fig. 3. Determinación colorimétrica de fosfato inorgánico por el método de Bonting y cols. (58). Estándar: fosfato monobásico de potasio (0.2 mM).

ellos, las membranas fueron incubadas en un medio que contenía ATP, cloruro de magnesio ( $MgCl_2$ ), cloruro de sodio (NaCl), cloruro de potasio (KCl), EDTA y Tris, en presencia y en ausencia de ouabaína.

Las concentraciones de estos reactivos, así como las condiciones de pH, molaridad, temperatura y duración de la incubación se describen en los pies de las figuras y/o en el apartado de Resultados. Excepto en un caso, el volumen final de reacción fue de 0.400 ml. Se emplearon como blancos mezclas de reacción en las que se excluyeron las membranas (hidrólisis no enzimática de ATP) o el sustrato (contribución basal de fosfato inorgánico).

En todos los casos, la reacción fue detenida por adición de ácido tricloroacético frío (5 por ciento final, p/V), manteniendo los tubos en baño de hielo. Se centrifugaron durante 5 minutos a 3,000 r.p.m. ( $4^\circ C$ ), tomando una alícuota de sobrenadante para determinar colorimétricamente el fosfato inorgánico.

La actividad enzimática se expresó como micromolas de fosfato inorgánico liberado por hora por miligramo de proteína membranal. La actividad de Na,K-ATPasa (componente sensible a ouabaína) fue calculada de la diferencia entre la actividad total de la ATPasa y la actividad no sensible al glucósido (Mg-ATPasa inespecífica).

En las determinaciones cinéticas, la  $V_{max}$  y  $K_M$  aparentes fueron obtenidas por el método de Lineweaver-Burk (61).

En todos los ensayos se utilizaron concentraciones de proteína membranal y un tiempo de incubación (60 minutos) que se encuentran dentro del rango lineal de actividad de la enzima (Figs. 4 y 5).

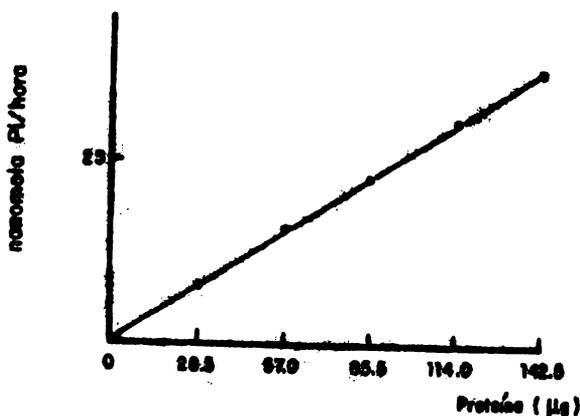


Fig. 4. Actividad de Na,K-ATPasa vs. concentración de proteína de membranas.

Las membranas se incubaron a 37° C, durante una hora, en ausencia y en presencia de ouabaína (1 mM). Mezcla de reacción (mM): ATP 3, MgCl<sub>2</sub> 3, NaCl 105.5, KCl 15, EDTA 0.2 y Tris 36.6, pH 7.5.

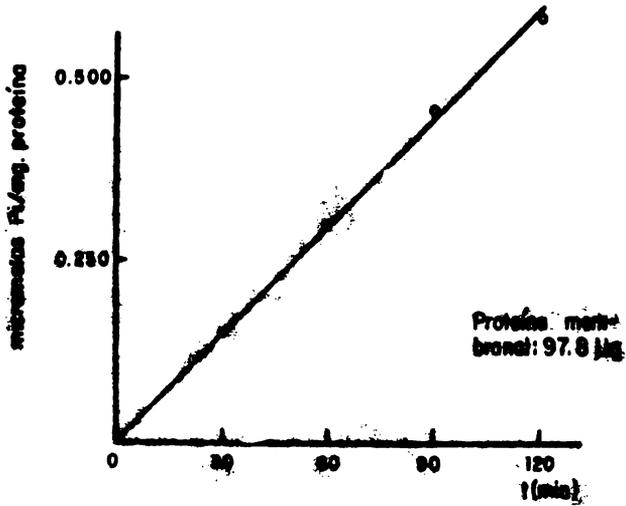


Fig. 5. Actividad de Na,K-ATPasa vs. tiempo.  
Se incubaron 97.8 microgramos de proteína a 37° C, en una mezcla de reacción similar a la de la figura 7.

V. Método estadístico.

Para comparar promedios se utilizó la prueba de "D" (62). La "D" calculada se obtuvo con la fórmula siguiente:

$$D = (\bar{x}_1 - \bar{x}_2) / (e.e.m._1^2 + e.e.m._2^2)^{1/2},$$

en la que  $\bar{x}_i$  = promedio.

e.e.m.<sub>i</sub> = error estándar de la media = desv. estándar/(n)<sup>1/2</sup>.

## RESULTADOS

### A. Método de preparación de membranas.

La mayoría de procedimientos para obtener "fantasmas" (membranas) de eritrocitos se basan en la lisis osmótica. Dodge y cols. (63), empleando soluciones de fosfato, establecieron las condiciones para preparar "fantasmas" substancialmente libres de hemoglobina, a saber: a) la osmolaridad de la solución para lisar los eritrocitos debe variar entre 10 y 20 miliosmolas por litro y, b) el pH de las soluciones debe encontrarse en la cercanía de 7.4. El método de Dodge y cols. no es adecuado para el presente trabajo, ya que el uso de fosfato podría interferir en la determinación colorimétrica de esta sustancia al ensayar la enzima. Branley y cols. (55) modificaron el procedimiento de Dodge y cols., sustituyendo la solución amortiguadora de fosfato por otra de carbonatos.

Branley y cols (55) encontraron que conforme aumentaba el número de lavados de las membranas de eritrocitos, se incrementaba la exposición de la actividad de la Na,K-ATPasa. Con el fin de corroborar esta observación, se prepararon membranas de eritrocitos por este procedimiento, retirando una alícuota de cada uno de los lavados (L-II a L-V). La mitad de cada muestra fue sonicada (5 segundos, 0° C) y la otra no. Posteriormente, se ensayó la actividad de Na,K-ATPasa de cada fracción, en las condiciones descritas en el Cuadro 1.

El Cuadro 1 muestra que las fracciones sonicadas de los primeros lavados tuvieron una mayor actividad enzimática que las correspondientes no sonicadas. Esta diferencia desapareció al lavar repetidamente las membranas, observándose actividades similares en L-V. La actividad específica fue aumentando debido a la eliminación progresiva de hemoglobina con cada lavado.

Debido a que el empleo de soluciones que contienen sodio

CUADRO 1. Actividad de Na,K-ATPasa en diferentes fracciones de membranas de eritrocitos.

Fracción <sup>b</sup>	micromolas Pi/hora-miligramo de protefna	
	Sin sonicar	Sonicado
L-II	0.123 ± 0.007	0.147 ± 0.006
L-III	0.151 ± 0.013	0.168 ± 0.004
L-IV	0.194 ± 0.011	0.205 ± 0.001
L-V	0.253 ± 0.002	0.243 ± 0.003

a. Valores: promedio ± e.e.m.

b. L-II a L-V: fracciones obtenidas al lavar repetidamente las membranas de eritrocitos con NaHCO<sub>3</sub> 7.5 mM, pH 7.4, 4° C.  
c. Las membranas se incubaron durante una hora a 37° C, en presencia y en ausencia de ouabaína. Mezcla de reacción: ATP 3 mM, MgCl<sub>2</sub> 3 mM, NaCl 140 mM, KCl 14 mM, EDTA 0.2 mM y Tris 20 mM, pH 7.5. Cuantificación de fosfato: Método de Ames.

podría causar problemas en los ensayos cinéticos, se probó otro método de preparación de "fantasmas" (Hanahan y Ekholm, 56), en el que se utiliza Tris 11.1 mM (20 miliosmolales/litro), pH 7.6, para lisar los eritrocitos.

Para comparar los procedimientos de Bramley y cols. y de Hanahan y Ekholm, mediante ambas técnicas se prepararon "fantasmas" de eritrocitos a partir de una misma muestra de sangre. Para eliminar el sodio de la preparación a base de bicarbonato, el último lavado se hizo con la solución hipotónica de Tris. En ambas muestras se ensayó la actividad de la Na,K-ATPasa. Las condiciones del ensayo y los resultados se muestran en el Cuadro 2.

Como en ambas preparaciones la actividad de Na,K-ATPasa fue muy similar (Cuadro 2), en los experimentos siguientes se aislaron las membranas de eritrocitos mediante el procedimiento de Hanahan y Ekholm (56).

---

CUADRO 2. Actividad de Na,K-ATPasa de membranas de eritrocitos obtenidas por dos procedimientos diferentes.

---

Método	micromolas Pi/hora-mg. de proteina
Bramley y cols. (55)	0.264 $\pm$ 0.014
Hanahan y Ekholm (56)	0.265 $\pm$ 0.008

---

a. Valores: promedio  $\pm$  e.e.m.

b. Las membranas se incubaron una hora a 37° C, en ausencia y en presencia de ouabaína 1 mM. Mezcla de reacción: ATP 3 mM, MgCl<sub>2</sub> 3 mM, NaCl 99 mM, KCl 15 mM, EDTA 0.2 mM y Tris 30.2 mM, pH 7.5. Cuantificación de fosfato: Método de Bonting y cols. (58).

---

#### B. Determinación colorimétrica de fosfato inorgánico.

La mayoría de las técnicas colorimétricas para cuantificar fosfato inorgánico se basan en la formación de un complejo fosfomolibdico en un medio fuertemente ácido. Cuando dicho complejo es reducido se produce una coloración azul, cuya intensidad es proporcional a la cantidad de fosfato inorgánico presente en la muestra analizada (64). Por otra parte, el trifosfato de adenosina (ATP) tiene dos enlaces de tipo anhidrido ácido, uno entre los fosfatos alfa y beta y otro entre los fosfatos beta y gama, muy susceptibles a la acidez y a la temperatura (64). Así, la elección de un método colorimétrico para determinar el fosfato inorgánico liberado por una ATPasa a concentraciones saturantes de ATP, debe basarse en el grado de hidrólisis no enzimática del nucleótido producida por dicho procedimiento.

Dos de tales técnicas colorimétricas que son ampliamente utilizadas son la de Ames (57), en la que el agente reductor es ácido ascórbico y la muestra se incuba a 37° C durante una hora, y la descrita por Bonting y cols., en la que el complejo fosfomolibdico se reduce con sulfato ferroso y la coloración se desarrolla a temperatura ambiente en 10 minutos (58).

Para comparar el grado de hidrólisis no enzimática de ATP causada por cada uno de estos métodos, se incubó ATP (3 mM) durante una hora a 37° C en un medio que contenía MgCl<sub>2</sub>, NaCl, KCl, EDTA y Tris, pH 7.5. Posteriormente se añadió ácido tricloroacético frío (5 por ciento, p/V, final) y se cuantificó el fosfato inorgánico mediante los dos procedimientos mencionados. Los resultados, descritos en el Cuadro 3, muestran que el método de Ames produce una liberación no enzimática de fosfato inorgánico significativamente mayor a la producida por el procedimiento de Bonting y cols., debido a lo cual en los ensayos enzimáticos siguientes se empleó el segundo método.

CUADRO 3. Hidrólisis no enzimática de ATP. Comparación de dos métodos colorimétricos para cuantificar fosfato inorgánico.

	Método de Ames	Método de Bonting
Agente reductor	ácido ascórbico	sulfato ferroso
Incubación	una hora, 37° C	10 minutos, temperatura ambiente.
Liberación no enzimática de fosfato (ATP 3 mM)	40.1 ± 0.4 <sup>b</sup>	29.2 ± 0.8

a. Valores: nanomolas de fosfato /hora (promedio ± e.e.m.)

b. p menor que 0.001, prueba de "D" (62).

c. Descripción de los métodos colorimétricos en MATERIAL Y MÉTODOS.

C. Condiciones para medir la actividad de Na,K-ATPasa en membranas de eritrocitos.

En la literatura se describen diferentes procedimientos para medir la actividad de la Na,K-ATPasa en "fantasmas" (membranas) de eritrocitos; sin embargo, en cada uno de ellos se

utilizan mezclas de reacción cuya composición es muy diversa. En siete de tales reportes (65-71), las concentraciones de los componentes del ensayo variaron de la manera siguiente: ATP, de 1 a 3 mM;  $MgCl_2$ , de 2 a 6 mM; NaCl, de 50 a 132 mM; KCl, de 5 a 33 mM; EDTA, de 0 a 1 mM y, molaridades finales, de 92 a 193 mM por adición de soluciones amortiguadoras, con pH que iba de 7.0 a 7.6. Debido a esta heterogeneidad en las condiciones de ensayo de la Na,K-ATPasa de laboratorio a laboratorio, lo cual evidentemente dificulta la comparación de resultados, se decidió averiguar cuáles eran las condiciones para el ensayo de la enzima que se tradujeran en un máximo de actividad de la misma. Se partió de una concentración que parece ser la más utilizada en los trabajos consultados (65-71). Además, arbitrariamente se decidió emplear concentraciones de  $Na^+$  y  $K^+$  cuya suma fuese constante:  $Na^+ + K^+ = 120$  mM.

En el Cuadro 4 se presentan las condiciones óptimas en nuestras manos para medir la actividad de ATPasa de "fantasmas" de eritrocitos, en una mezcla de reacción que contiene concentraciones equimolares de ATP y  $Mg^{++}$  y una suma constante de  $Na^+$  y  $K^+$  (120 mM).

El medio completo contenía 80.4 microgramos de proteína membranal, ATP 3 mM,  $MgCl_2$  3 mM, NaCl 105.5 mM, KCl 15 mM, EDTA 0.2 mM y Tris 36.6 mM, pH 7.5, con una molaridad final de 163.3 mM. La incubación se hizo durante 60 minutos a 37°C. Tanto la concentración de proteína, como el tiempo de incubación, se encuentran dentro del rango lineal de actividad de la Na,K-ATPasa (Figs. 4 y 5), esto es, se está determinando la actividad enzimática en condiciones de velocidad inicial (61).

La contribución basal de fosfato (medio sin sustrato) representó el 2.6 por ciento del total (medio completo), en tanto que la hidrólisis no enzimática de ATP (medio sin membranas) aportó un 36.6 por ciento del total de fosfato (Cuadro 4). Cuando de la mezcla de reacción se excluyó al ión  $Na^+$  y/o el ión  $K^+$ , o al medio completo se le añadió ouabaina (1mM), disminuyó la cantidad de fosfato inorgánico en 33 a 34 por

CUADRO 4. Actividad de ATPasa de membranas de eritrocitos.

Condición	nanomolas fosfato/hora	porcentaje del total
Medio completo <sup>b</sup>	78.1 ± 1.1	100.0
Sin membranas	28.6 ± 1.5	36.6
Sin ATP	2.0 ± 0.5	2.6
Sin Na <sup>+</sup>	52.1 ± 0.8	66.7
Sin K <sup>+</sup>	51.6 ± 0.4	66.1
Sin Na <sup>+</sup> y K <sup>+</sup>	51.9 ± 1.1	66.5
Completo + ouabafina 1 mM	52.6 ± 1.1	67.3
Sin Mg <sup>++</sup>	40.9 ± 1.1	52.4
Sin EDTA	83.1 ± 0.9	106.4
Sin Tris, 16.6 mM pH 7.5	75.0 ± 1.3	96.0

- a. Valores: promedio de triplicados ± desviación estándar.  
 b. Medio completo: 80.4 microgramos de proteína membranal en una mezcla de ATP 3 mM, MgCl<sub>2</sub> 3 mM, NaCl 105.5 mM, KCl 15 mM, EDTA 0.2 mM y Tris 36.6 mM, pH 7.5. Volumen final: 0.400 ml.  
 c. Incubación: 60 minutos, 37° C.

ciento. Un decremento mayor se observó al excluir al ión Mg<sup>++</sup> (47 por ciento). En tanto que la ausencia de Tris pH 7.5 (16.6 mM) causó una disminución del 4 por ciento en el fosfato cuantificado, la exclusión del EDTA del medio de incubación lo aumentó en un 6 por ciento (Cuadro 4).

Debido a que la hidrólisis no enzimática de ATP contribuye de manera importante a la liberación de fosfato inorgánico (Cuadro 4), se trató de identificar los factores que la producen y la importancia relativa de cada uno de ellos. Para ello, en ausencia de membranas de eritrocitos se incubó ATP (3 mM) en una mezcla similar a la del medio completo del Cuadro 4, duran

te una hora a dos temperaturas (4 y 37° C). Al terminar la incubación, se añadió ácido tricloroacético o un volumen comparable de agua bidestilada y se cuantificó el fosfato inorgánico. El Cuadro 5 muestra que el 12 por ciento de la hidrólisis no enzimática de ATP es imputable a la incubación, un 4.5 por ciento al ácido tricloroacético y el 83.5 por ciento a otros factores, tales como el método para determinar fosfato y/o degradación previa del ATP. En otras palabras, el 88 por ciento de la hidrólisis no enzimática es imputable a factores fuera del ensayo de actividad de ATPasa.

CUADRO 5. Hidrólisis no enzimática de ATP en un ensayo de actividad de Na,K-ATPasa.

Hidrólisis no enzimática	nanomolas de fosfato/hora	por ciento del total
Atribuible a incubación (una hora, 37° C)	3.5 ± 0.5	12.0
Atribuible al ácido tricloroacético (5%, p/V, final)	1.3 ± 0.6	4.5
Atribuible a otros factores <sup>b</sup>	24.4 ± 1.1	83.5
Total	29.2 ± 1.3	100.0

- a. Valores: promedio de triplicados ± desviación estándar.  
b. Método de cuantificación de fosfato (Bonting y cols.) y/o degradación previa de ATP.  
c. Concentración de ATP: 3 mM.

Para calcular la actividad enzimática específica (micro-molas de fosfato liberado por hora por miligramo de proteína membranosa) se resta la contribución basal de fosfato y la producida por hidrólisis no enzimática. En el Cuadro 6 se presentan los datos del Cuadro 4, corregidos, como actividad específica.

CUADRO 6. Actividad específica de ATPasa de membranas de eritrocitos.

Condición de ensayo	Actividad específica <sup>a</sup> (micromol Pi/hr.-mg. prot.)	Porcentaje del total
Medio completo	0.591 ± 0.014	100.0
Sin Na <sup>+</sup>	0.268 ± 0.009	45.3
Sin K <sup>+</sup>	0.262 ± 0.005	44.3
Sin Na <sup>+</sup> y K <sup>+</sup>	0.265 ± 0.014	44.8
Medio completo + ouabaina 1 mM	0.274 ± 0.014	46.4
Sin Mg <sup>++</sup>	0.129 ± 0.013	21.8
Sin EDTA	0.653 ± 0.010	110.5
Sin Tris, 16.6 mM, pH 7.5	0.552 ± 0.016	93.4

a. Se calculó después de restar "blancos". Los valores representan el promedio de triplicados ± desviación estándar.

b. Medio completo y condiciones de incubación: ver pie del Cuadro 4.

Las actividades de ATPasa obtenidas en ausencia de Na<sup>+</sup> y/o K<sup>+</sup> o en presencia de ouabaina fueron muy similares (44 a 46 por ciento del total), en tanto que la actividad en ausencia de Mg<sup>++</sup> representó sólo el 22 por ciento del total. La exclusión de Tris (16.6 mM, pH 7.5) hizo disminuir la actividad de ATPasa en 6.6 por ciento, mientras que la ausencia de EDTA se reflejó en un incremento de la actividad total (10.5 por ciento), (Cuadro 6).

Estos resultados sugieren la presencia de otro tipo de ATPasas, por lo que la actividad de Na,K-ATPasa se define como el incremento en la actividad de ATPasa inespecífica (Mg-ATPasa) producido por la presencia conjunta de Na<sup>+</sup> y K<sup>+</sup> en la mezcla de reacción. Así, cuando se resta la actividad observada en ausencia de Na<sup>+</sup> y K<sup>+</sup> de la actividad total de ATPasa,

se obtiene la actividad de la Na,K-ATPasa. Existe además otro método para calcular la actividad de Na,K-ATPasa: se resta la actividad no sensible a ouabaina de la actividad total observada en ausencia del inhibidor. El Cuadro 7 muestra que las actividades de Na,K-ATPasa obtenidas por ambos procedimientos son similares.

CUADRO 7. Componentes de la actividad de ATPasa de membranas de eritrocitos.

ATPasa	Micromolas Pi/hr.-mg. prot.	Cálculo
Total (A)	0.591 $\pm$ 0.014	-
No dependiente de Na <sup>+</sup> y K <sup>+</sup> (B)	0.265 $\pm$ 0.014	-
Insensible a ouabaina (C)	0.274 $\pm$ 0.014	-
Dependiente de Na <sup>+</sup> y K <sup>+</sup>	0.326 $\pm$ 0.004	A - B
Sensible a ouabaina	0.317 $\pm$ 0.005	A - C

a. Valores: promedio de triplicados  $\pm$  desviación estándar.  
b. Datos tomados del Cuadro 6.

Cuando se utiliza ouabaina como control, es importante emplear este fármaco a concentraciones inhibitorias máximas. Para determinar este valor, se incubaron membranas de eritrocitos en las condiciones descritas en la figura 6. Las concentraciones del glucósido variaron de 5 micromolar a 1 milimolar. Se utilizaron como blancos, mezclas de reacción en las que no se incluyó el inhibidor (ATPasa total) o los iones Na<sup>+</sup> y K<sup>+</sup> (ATPasa no dependiente de Na<sup>+</sup> y K<sup>+</sup>). La actividad total de ATPasa en este experimento fue de 0.480  $\pm$  0.011 (promedio  $\pm$  d.e.) micromolas de fosfato/hora-miligramo de proteína membranar, en tanto que la actividad no dependiente

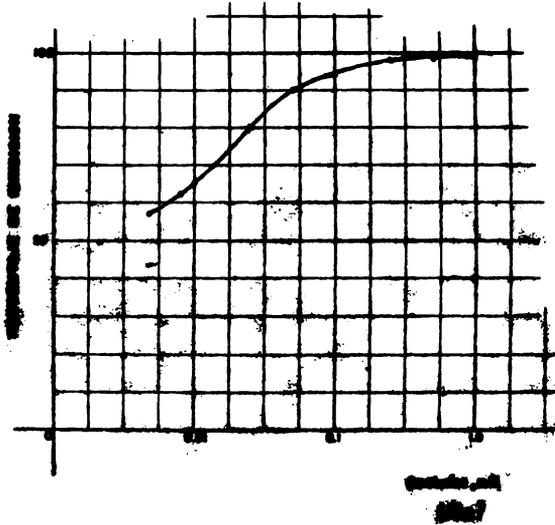


Fig. 6. Inhibición de la actividad de la Na,K-ATPasa por la ouabaína.

Se incubaron 128.5 microgramos de proteína membranar (60 min., 37°C) en un medio que contenía ATP 3 mM, MgCl<sub>2</sub> 3 mM, NaCl 105.5 mM, KCl 15 mM, EDTA 0.2 mM, Tris 36.6 mM, pH 7.5 y concentraciones crecientes de ouabaína.

de Na<sup>+</sup> y K<sup>+</sup> (Mg<sup>++</sup> ATPasa) fue de 0.202 ± 0.009. Para calcular el porcentaje de inhibición de la Na,K-ATPasa producido por cada concentración particular de ouabaína, se utilizó la fórmula siguiente:

$$\% \text{ inhibición} = 100 - \frac{(x - 0.202) 100}{0.278}$$

en la que x es la actividad de la ATPasa observada a una concentración determinada del glucósido. El número en el denominador (0.278) representa la actividad calculada de Na,K-ATPasa (resultado de restar la actividad de Mg<sup>++</sup> - ATPasa de la actividad total). La figura 6 muestra que el efecto inhibitorio de la ouabaína es máximo a una concentración de 1 mM, misma que se utilizó en los ensayos subsecuentes.

Para determinar las concentraciones óptimas de Na<sup>+</sup> y de

$K^+$  a concentraciones equimolares de ATP y de  $Mg^{++}$  y una suma constante de cationes monovalentes ( $Na^+ + K^+ = 120$  mM), se incubaron membranas de eritrocitos durante 60 minutos a una temperatura de  $37^\circ C$ , en ausencia y en presencia de ouabaina 1 mM. La mezcla de reacción contenía ATP 3 mM,  $MgCl_2$  3 mM, EDTA 0.2 mM y Tris 36.6 mM, pH 7.5. Las concentraciones de  $Na^+$  y  $K^+$  se covariaron, manteniendo una suma constante de estos cationes ( $= 120$  mM). La figura 7A muestra que la actividad de Na,K-ATPasa es mínima en ausencia de  $Na^+$  o de  $K^+$ , en tanto que es máxima a una concentración de  $Na^+ = 105$  mM y una concentración de  $K^+ = 15$  mM, esto es, cuando la relación  $Na^+ : K^+$  es de 7 : 1.

Con objeto de explorar el rango de concentraciones de  $Na^+$  y  $K^+$  cercanas a 105 y 15 mM respectivamente, se realizó un experimento similar en el que las concentraciones de estos iones fueron covariados de la manera mostrada en la figura 7B. Nuevamente, la actividad máxima observada de la Na,K-ATPasa se logró cuando la concentración de  $Na^+$  era de 105 mM y la de  $K^+$  de 15 mM. fuera de la relación óptima de concentraciones ( $Na^+ : K^+ = 7 : 1$ ), se observa una actividad menor de la Na,K-ATPasa (Fig. 7B).

Cuando se determina la actividad de ATPasa en membranas de eritrocitos en ausencia del ión  $Mg^{++}$ , disminuye la liberación enzimática de fosfato inorgánico en un 78 por ciento (Cuadro 6). Con objeto de averiguar cuál es la concentración más adecuada de este catión para ensayar la Na,K-ATPasa, se incubaron membranas de eritrocitos durante una hora, a una temperatura de  $37^\circ C$  y, en ausencia y en presencia de ouabaina. La mezcla de reacción contenía ATP 3 mM y las concentraciones de NaCl, KCl, EDTA y Tris, pH 7.5, descritas en el Cuadro 4. La cantidad de  $MgCl_2$  varió de 0 a 5 mM.

La figura 8A muestra que tanto la actividad de ATPasa total como la de ATPasa no sensible a ouabaina, aumentaron conforme se incrementaba la concentración de  $Mg^{++}$  en la mezcla de reacción. Sin embargo, al calcular la actividad de la Na,K-ATPasa (componente sensible al inhibidor), se observó un

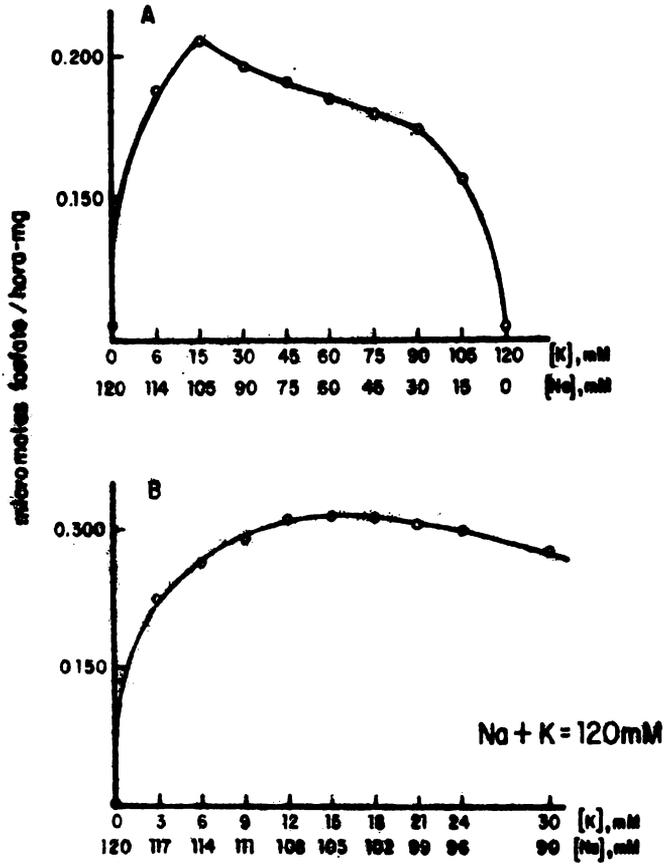


Fig. 7. Actividad de Na<sub>2</sub>K-ATPasa: Efecto de la relación Na<sup>+</sup> : K<sup>+</sup>. Concentración de proteína membranar = 80.4 microgramos. Las demás condiciones se describen en el texto.

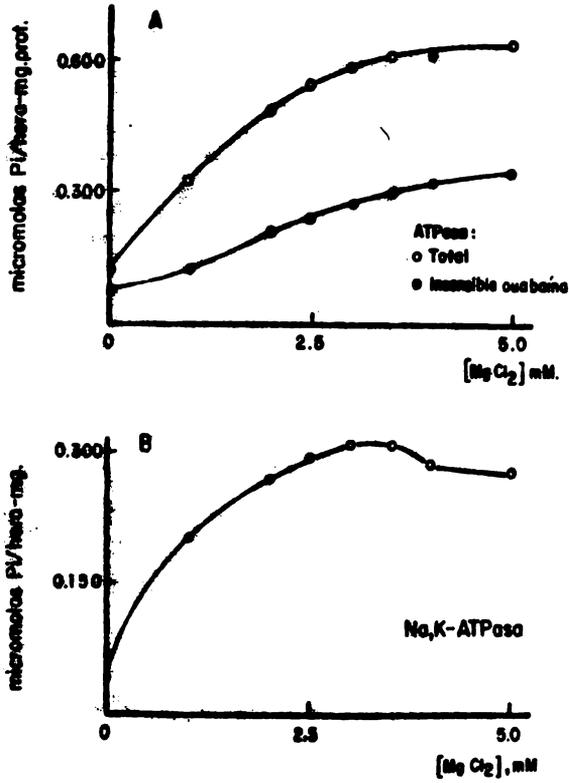


Fig. 8. Efecto del magnesio sobre la actividad de ATPasa de membranas de eritrocitos. Proteína: 80.4 microgramos. Condiciones de ensayo: descritas en el texto.

máximo de actividad de la enzima a una concentración de  $\text{MgCl}_2$  la vecindad de 3 mM, declinando la actividad a concentraciones mayores de este reactivo (Fig. 8B). En otras palabras, la actividad máxima de Na,K-ATPasa se obtiene cuando las concentraciones de ATP y  $\text{MgCl}_2$  son aproximadamente equimolares.

La actividad total de ATPasa de membranas de eritrocitos es mayor cuando se ensaya en ausencia de EDTA que cuando este quelante se incluye en la mezcla de reacción (Cuadro 6). Para determinar cuál es el efecto del EDTA sobre la actividad de ATPasa, se incubaron membranas de eritrocitos durante una hora, a 37° C, en ausencia y en presencia de ouabaína, en una mezcla que contenía ATP,  $\text{MgCl}_2$ , NaCl, KCl y Tris a las concentraciones descritas en el Cuadro 4. La concentración de EDTA varió de 0 a 1 mM.

En la figura 9A se observa que la actividad total de ATPasa decreció conforme aumentó la concentración de EDTA. El componente no sensible a ouabaína mostró un comportamiento similar. Sin embargo, la actividad de la Na,K-ATPasa (componente sensible a ouabaína) fue máxima en la vecindad de 0.2 mM de EDTA, decreciendo a concentraciones mayores de este agente (Fig. 9B).

La actividad de ATPasa de "fantasmas" de eritrocitos decrece cuando se disminuye la concentración de Tris en la mezcla de reacción (de 36.6 a 20 mM, Cuadro 6). Para explorar este efecto, se incubaron membranas de eritrocitos en las condiciones descritas en el Cuadro 4, en presencia de concentraciones variables de Tris, pH 7.5 (20 a 67.5 mM), con y sin ouabaína. La molaridad final osciló entre 146.7 a 194.2 mM.

La figura 10A muestra que la actividad de ATPasa total ascendió al incrementarse la concentración de Tris, alcanzando posteriormente una meseta. Por el contrario, el componente de la actividad de ATPasa que no es sensible al inhibidor creció con toda la gama de concentraciones de Tris adicionadas al medio de reacción. En consecuencia, la actividad de la Na,K-ATPasa, resultado de la resta del componente no sensible a ouabaína de la actividad total, mostró un máximo en la

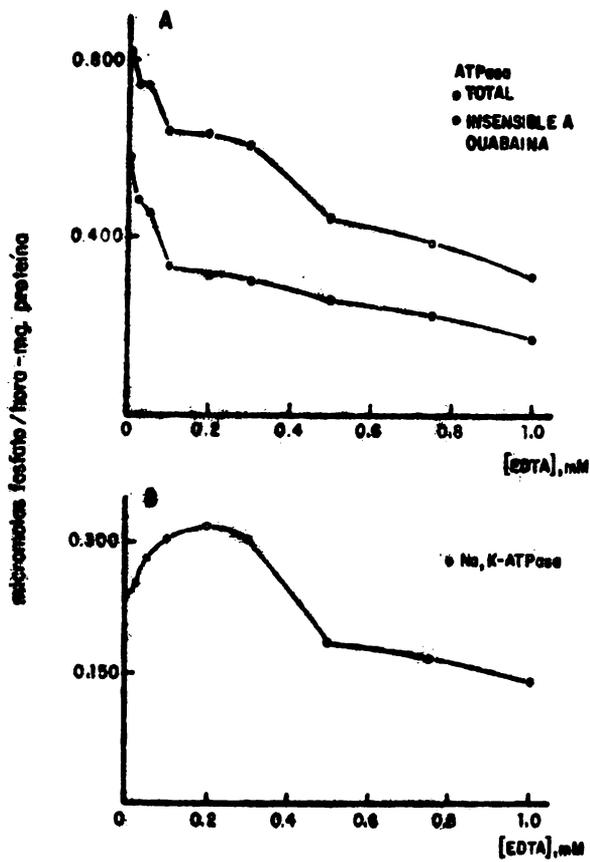


Fig. 9. Efecto del EDTA sobre la ATPasa de membranas de eritrocitos.  
Proteína: 78.6 microgramos.  
Condiciones de ensayo: descritas en el texto.

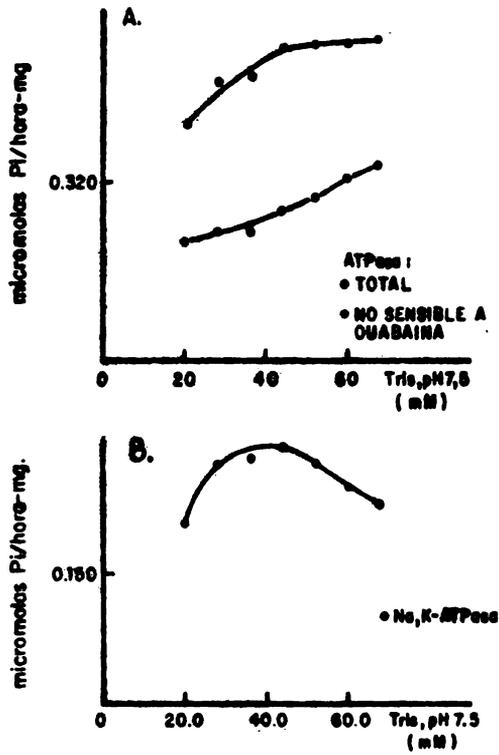


Fig. 10. Efecto del Tris sobre la actividad de la ATPasa de membranas de eritrocitos. Proteína: 110 microgramos. Las condiciones del ensayo se describen en el texto.

vecindad de Tris 40 mM y decreció a concentraciones mayores de esta substancia (Fig. 10B).

En todos los ensayos descritos hasta el momento, la incubación se hizo a una temperatura de 37° C. La elección de esta temperatura derivó de los experimentos siguientes:

I. La actividad de la Na,K-ATPasa se determinó en membranas de eritrocitos incubados durante una hora, en presencia de ouabaína, a diversas témperaturas: 32 a 45° C. La mezcla de reacción contenía las concentraciones de ATP, MgCl<sub>2</sub>, EDTA, NaCl, KCl y Tris, pH 7.5, mencionadas en el Cuadro 4. La figura 11 muestra que el máximo de actividad de la enzima se obtuvo cuando la temperatura de incubación fue de 41° C.

II. Se ensayó la actividad de Na,K-ATPasa después de preincubar las membranas de eritrocitos a las temperaturas siguientes: 4, 20, 32, 37, 40, 45 y 55° C, durante una hora. El ensayo de actividad se hizo a 37° C, incubando las membranas durante 60 minutos en un medio similar al descrito en el Cuadro 4, con y sin ouabaína 1 mM.

La actividad de Na,K-ATPasa se preservó mejor cuando la temperatura de preincubación fue de 37° C. (Fig. 12).

El pH de incubación de todos los ensayos de actividad que han sido mencionados fue de 7.5, empleando Tris como amortiguador. Para explorar el efecto de la acidez o alcalinidad del medio de reacción sobre la actividad de la Na,K-ATPasa, se incubaron membranas de eritrocitos durante una hora, a 37° C, en ausencia y en presencia de ouabaína 1 mM. El medio de reacción contenía las concentraciones de ATP, MgCl<sub>2</sub>, KCl, NaCl y EDTA descritas en el Cuadro 4. Se varió el pH de la mezcla de reacción de 6.1 a 9.0 mediante la adición de Tris, manteniendo la molaridad final en 163 mM.

La figura 13 muestra que la actividad de la Na,K-ATPasa aumentó conforme decreció la acidez del medio. El máximo de actividad enzimática se observó en la vecindad de pH 7.4. A valores mayores de pH, disminuyó la actividad de la enzima, desapareciendo a pH 9.0 (Fig. 13).

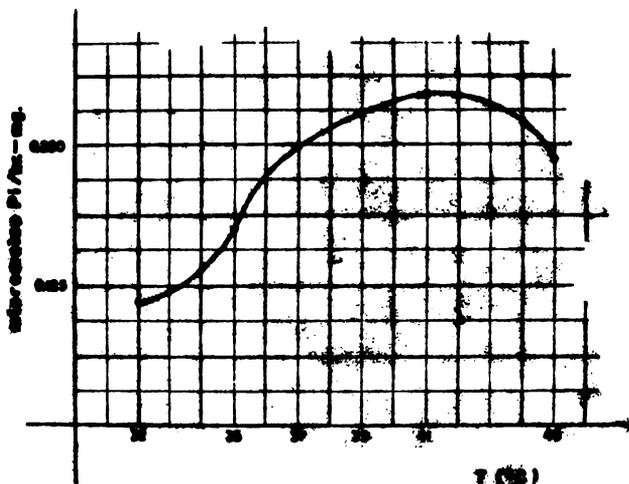


Fig. 11. Efecto de la temperatura de incubación sobre la actividad de Na,K-ATPasa de membranas de eritrocitos. Proteína: 119 microgramos. Condiciones de ensayo: descritas en el texto.

En Material y Métodos se mencionó que las membranas de eritrocitos, una vez obtenidas, podían guardarse a  $-20^{\circ}\text{C}$  suspendidas en solución de Tris 11.1 mM, pH 7.6. Para determinar el efecto de este método de almacenamiento sobre la actividad de la Na,K-ATPasa, se ensayó la actividad enzimática en alícuotas de una misma muestra de "fantasmas" durante varios días posteriores a su preparación. En el Cuadro 8 se describen los resultados de estos ensayos.

La actividad de Na,K-ATPasa observada durante los primeros cinco días posteriores a la preparación y almacenamiento de las membranas se mantuvo constante (Cuadro 8). Al décimo día, la actividad enzimática disminuyó en un 15 por ciento con respecto de la inicial. Para el decimoquinto día, la diferencia de actividad fue de un 25 por ciento (Cuadro 8).

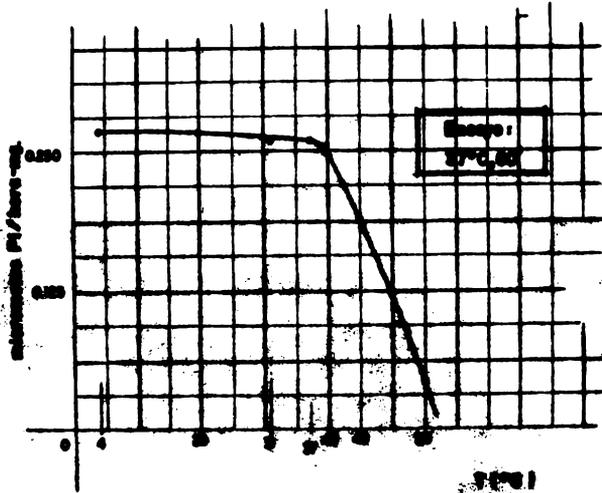


Fig. 12. Estabilidad de la Na,K-ATPasa de membranas de eritrocitos a temperatura. Las membranas (106.7 microgramos de protefina) fueron preincubadas durante una hora a las temperaturas señaladas. Posteriormente se determinó la actividad enzimática a 37°C, en las condiciones descritas en el texto.

En un experimento posterior se trató de discriminar si el procedimiento de preparación de los "fantasmas" de eritrocitos (Hanahan y Ekholm, 56), expone completamente la actividad de la Na,K-ATPasa. Para ello, se preincubaron las membranas con diversas concentraciones del detergente iónico desoxicolato de sodio, ensayando posteriormente la actividad de la enzima. En el Cuadro 9 se presentan los resultados.

La actividad de la Na,K-ATPasa se aumentó en un ocho por ciento, cuando la concentración final de desoxicolato de sodio en la mezcla de reacción fue de 0.005 por ciento, p/V. A concentraciones del detergente mayores que 0.010 por ciento, p/V, se observó una disminución progresiva de la actividad enzimática (Cuadro 9).

Para determinar si el ensayo de actividad de la Na,K-ATPasa es reproducible, se realizó el experimento siguiente:

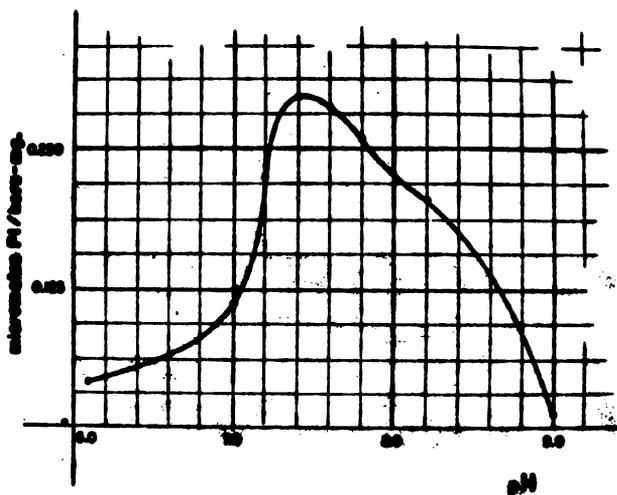


Fig. 13. Efecto del pH de incubación sobre la actividad de la Na,K-ATPasa de membranas de eritrocitos. Proteína membranar = 86.2 microgramos. Las condiciones del ensayo se describen en el texto.

CUADRO 8. Actividad de Na,K-ATPasa de membranas de eritrocitos congelados por varios días a  $-20^{\circ}$  C.

Días de almacenamiento	Micromolas de fosfato/hr.-mg. prot.
1	0.295 $\pm$ 0.003
2	0.297 $\pm$ 0.002
3	0.302 $\pm$ 0.004
4	0.294 $\pm$ 0.005
5	0.292 $\pm$ 0.003
10	0.259 $\pm$ 0.002
15	0.225 $\pm$ 0.003

a. Valores: promedio de triplicados  $\pm$  e.e.m.

b. En todos los ensayos se incubaron 114 microgramos de proteína membranar (una hora,  $37^{\circ}$  C), en ausencia y en presencia de ouabafina 1 mM. Mezcla de reacción: ATP 3mM,  $MgCl_2$  3 mM, NaCl 105.5 mM, KCl 15 mM, EDTA 0.2 mM y Tris 36.6 mM, pH 7.5.

**CUADRO 9. Efecto del desoxicolato de sodio (DOC) sobre la actividad de la Na,K-ATPasa de membranas de eritrocitos.**

DOC $\frac{\%}{(p/v)}$ <sup>b</sup>	Micromolas de fosfato por hora por mg. de progefna	Actividad relativa promedio <sup>c</sup>
0.0	0.310 $\pm$ 0.008	1.00
0.0025	0.318 $\pm$ 0.009	1.03
0.005	0.335 $\pm$ 0.006	1.08
0.010	0.320 $\pm$ 0.012	1.03
0.015	0.299 $\pm$ 0.010	0.96
0.025	0.276 $\pm$ 0.013	0.89
0.030	0.231 $\pm$ 0.009	0.75
0.035	0.205 $\pm$ 0.010	0.66

a. Valores: promedio de duplicados  $\pm$  d.e.

b. La concentración de DOC (desoxicolato de sodio) es la final en la mezcla de reacción para ensayar la enzima.

c. Actividad relativa promedio: actividad con DOC/actividad sin DOC.

d. Las membranas (105 microgramos de protefna) se preincubaron con el detergente por 5 minutos a 37° C. Las condiciones de ensayo de actividad de Na,K-ATPasa fueron similares a las descritas en el Cuadro 8.

A partir de una misma muestra de "fantasmas" de eritrocitos se ensayó por dos ocasiones la actividad enzimática, empleando el mismo protocolo con unas horas de diferencia entre ambos ensayos. En cada uno de ellos se usaron 14 tubos para determinar la actividad total de ATPasa (medio completo, Cuadro 4), y otros 14 para medir la Mg-ATPasa (medio completo + ouabaina. Los resultados se muestran en el Cuadro 10.

La variabilidad intraensayo no fue significativa, ya que los coeficientes de variación de todos los componentes de la actividad de ATPasa (total, no sensible a ouabaina y sensible al inhibidor) oscilaron entre 2 y 4 por ciento en ambos ensayos (Cuadro 10). Tampoco se encontraron diferencias interensayo significativas (Cuadro 10).

**CUADRO 10. Variaciones intra- e inter-ensayo de la actividad de ATPasa de membranas de eritrocitos.**

ATPasa	Ensayo I	Ensayo II
	(Micromolas de fosfato/hr.-mg. protefna)	
Total	0.487 $\pm$ 0.012 (C.V. = 2.5 %)	0.479 $\pm$ 0.008 <sup>c</sup> (C.V. = 1.7 %)
Mg-ATPasa (no sensible a ouabafna)	0.212 $\pm$ 0.008 (C.V. = 3.8 %)	0.208 $\pm$ 0.007 <sup>c</sup> (C.V. = 3.4 %)
Na,K-ATPasa (sensible a ouabafna)	0.275 $\pm$ 0.007 (C.V. = 2.5 %)	0.271 $\pm$ 0.009 <sup>c</sup> (C.V. = 3.3 %)

- a. Valores: promedio de tetraduplicados  $\pm$  d.e.  
 b. C.V. (coeficiente de variación) = (d.e.) (100)/promedio.  
 c. p mayor que 0.10, respecto del ensayo I (prueba de "D", ver Mat. y Mét.).  
 d. El ensayo II se hizo 4 horas después del I. Membranas de una misma preparación (118 microgramos de protefna). Las condiciones de ensayo fueron similares a las del Cuadro 8.

Se ha comunicado que tanto la actividad de Na,K-ATPasa de membranas de eritrocitos, como el número de unidades de la enzima presentes en cada célula, son relativamente constantes a través del tiempo (72). En el Cuadro 11 se presentan los resultados de nueve determinaciones independientes de la actividad de la Na,K-ATPasa de membranas de eritrocitos de un mismo individuo (adulto), hechas a lo largo de 23 meses. Aunque el coeficiente de variación es de 7.8 por ciento, se observó una diferencia del 26 por ciento entre los valores máximo y mínimo de la actividad enzimática (Cuadro 11).

D. Cinética aparente de la Na,K-ATPasa de membranas de eritrocitos.

A partir de las concentraciones de ATP, MgCl<sub>2</sub>, NaCl, KCl, EDTA y Tris, pH 7.5, descritas en el apartado anterior, se procedió a determinar las K<sub>m</sub> aparentes de la Na,K-ATPasa para el sustrato (ATP) y los cationes activadores (Na<sup>+</sup> y K<sup>+</sup>).

**CUADRO 11. Actividad de la Na,K-ATPasa de membranas de eritrocitos de un sujeto adulto sano: variación en un lapso de 23 meses.**

Tiempo (meses)	Micromolas de fosfato por hora por miligramo de protefna
0	0.270 $\pm$ 0.013
1	0.302 $\pm$ 0.005
2	0.286 $\pm$ 0.001
4	0.251 $\pm$ 0.011
5	0.260 $\pm$ 0.008
10	0.276 $\pm$ 0.007
15	0.269 $\pm$ 0.006
21	0.317 $\pm$ 0.005
23	0.295 $\pm$ 0.005
Promedio $\pm$ d.e.	0.281 $\pm$ 0.022
Coeficiente de variación	7.8 por ciento

- a. Valores: promedios de duplicados o triplicados  $\pm$  d.e.  
 b. Coeficiente de variación: (d.e.) (100)/promedio.  
 c. En todos los ensayos se incubaron membranas de eritrocitos (una hora, 37° C, con y sin ouabafina 1 mM), en una mezcla de reacción que tenfa ATP 3 mM, MgCl<sub>2</sub> 3 mM, NaCl 105.5 mM, KCl 15 mM, EDTA 0.2 mM y Tris 36.6 mM, pH 7.5.

**I. Actividad de Na,K-ATPasa versus concentración de ATP.**

Se incubaron membranas de eritrocitos en ausencia y en presencia de ouabafina 1 mM, durante una hora a 37° C. La mezcla de reacción contenfa MgCl<sub>2</sub> 3 mM, NaCl 105.5 mM, KCl 15 mM, EDTA 0.2 mM y Tris 36.6 mM (pH 7.5). La concentración de ATP varió de 0.21 a 3 mM.

En estas condiciones, se obtuvo una curva de actividad enzimática con comportamiento hiperbólico rectangular (Fig. 14). Al regraficar por el método de Lineweaver-Burk (doble recfproco), la K<sub>M</sub> aparente calculada para

ATP fue de 0.43 mM (Fig. 14).

## II. Actividad de la Na,K-ATPasa versus $\text{Na}^+$ .

Durante los primeros intentos para determinar la actividad de la Na,K-ATPasa de membranas de eritrocitos contra diversas concentraciones de NaCl, manteniendo fijas las concentraciones de los demás componentes del ensayo (a saber, ATP 3 mM,  $\text{MgCl}_2$  3 mM, KCl 15 mM, EDTA 0.2 mM, Tris 36.6 mM, pH 7.5), se obtenían curvas de velocidad en las que el máximo de actividad enzimática ocurría a una concentración de NaCl de 10 a 15 mM, descendiendo a concentraciones mayores (dato no mostrado). La única diferencia ostensible entre este ensayo y el convencional, descrito en las páginas anteriores, fue la molaridad final de la mezcla de reacción. Para explorar el efecto de este parámetro sobre la actividad de la Na,K-ATPasa a concentraciones variables de NaCl, se realizó el experimento siguiente: se incubaron membranas de eritrocitos (una hora, 37° C), en ausencia y en presencia de ouabaina, y en una mezcla de reacción que contenía las concentraciones usuales de ATP,  $\text{MgCl}_2$ , KCl y EDTA (Cuadro 4), y concentraciones variables de NaCl (0 a 30 mM). La molaridad de la mezcla de reacción se ajustó con Tris pH 7.5 a 71 mM (medio hipotónico), 166 mM (medio aproximadamente isotónico al plasma) y 261 mM (medio hipertónico).

Cuando la molaridad del medio de incubación se mantuvo en 71 mM, la actividad de Na,K-ATPasa fue máxima a una concentración de NaCl de 10 mM, descendiendo a medida que aumentó el ión  $\text{Na}^+$  (Fig. 15A). La gráfica de doble recíproco, en consecuencia, no permitió calcular los interceptos.

Al mantenerse la molaridad de la mezcla de reacción en 166 mM, la actividad de Na,K-ATPasa se incrementó de manera hiperbólica conforme aumentó la concentración de NaCl (Fig. 15B). Al regraficar mediante doble recíproco, se calculó una  $K_M$  aparente para  $\text{Na}^+$  de 11 mM (Fig. 15B).

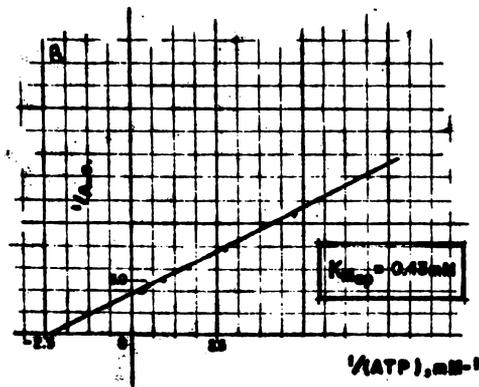
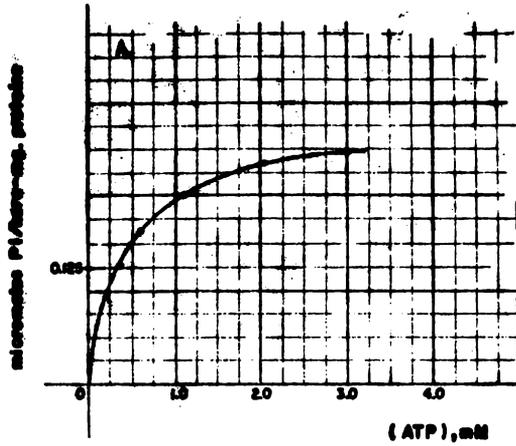


Fig. 14. Actividad de Na,K-ATPasa de membranas de eritrocitos a concentraciones variables de ATP.  
Proteína membranal: 89.6 microgramos.  
Detalles en el texto.

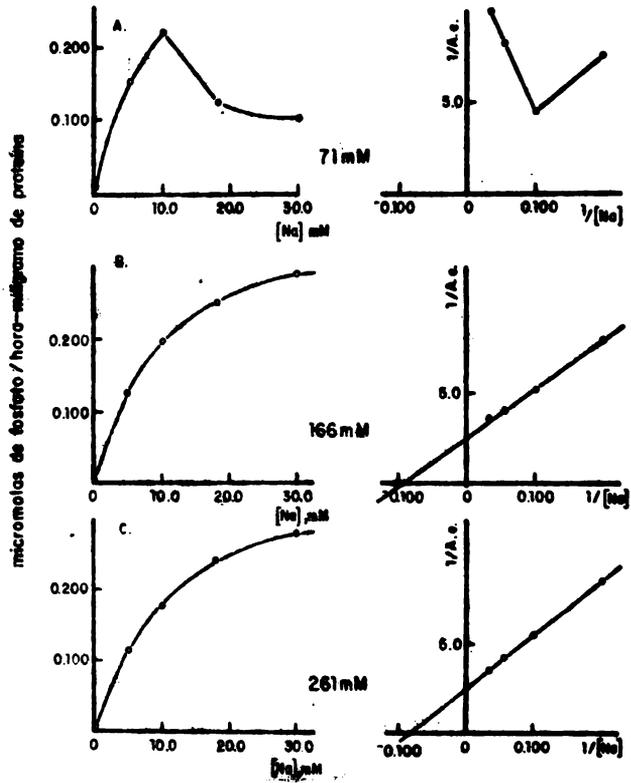


Fig. 15. Actividad de Na,K-ATPasa versus Na<sup>+</sup>: Efecto de la molaridad del medio de reacción. Detalles en el texto.

Al regraficar mediante doble recíproco, se calculó una  $K_M$  aparente para  $Na^+$  de 11 mM (Fig. 15B).

Un comportamiento similar se observó al mantener la molaridad final en 261 mM (Fig. 15C), aunque ahora la  $K_M$  aparente para  $Na^+$ , calculada por el doble recíproco, aumentó a 13 mM.

A consecuencia de este experimento, se decidió emplear en todos los ensayos de cinética una molaridad final de 163 mM, similar a la empleada en el ensayo convencional de actividad de la Na,K-ATPasa (Cuadro 4). En la Figura 16 se muestra el resultado de uno de estos experimentos. En tanto que la actividad total de ATPasa, en presencia de cantidades crecientes de NaCl, se ajusta a una función hiperbólica, el componente no sensible a ouabaina (Mg-ATPasa) permanece inalterable (Fig. 16A). En consecuencia, el componente de actividad que es sensible al glucósido (Na,K-ATPasa) se comporta de manera hiperbólica (Fig. 16B), lo que se traduce en una línea recta al graficar el recíproco de la actividad específica contra el recíproco de la concentración de  $Na^+$  (Fig. 16C).

### III. Actividad de Na,K-ATPasa a concentraciones variables de $K^+$ .

Se incubaron membranas en ausencia y en presencia de ouabaina, a 37° C, durante una hora. La mezcla de reacción contenía las concentraciones usuales de ATP, NaCl, MgCl<sub>2</sub> y EDTA. La concentración de KCl varió de 0 a 10.5 mM, y se mantuvo la molaridad final en 163 mM por adición de Tris, pH 7.5.

Tanto la actividad total de ATPasa como su componente sensible a ouabaina (Na,K-ATPasa), se ajustaron a una función hiperbólica al aumentar la concentración de  $K^+$  (Figs. 17A y 17B); el componente no sensible a ouabaina fue creciendo lentamente (Fig. 17A). Al regraficar la actividad de Na,K-ATPasa por el método de Lineweaver-Burk, se observó un comportamiento lineal (Fig. 17C).

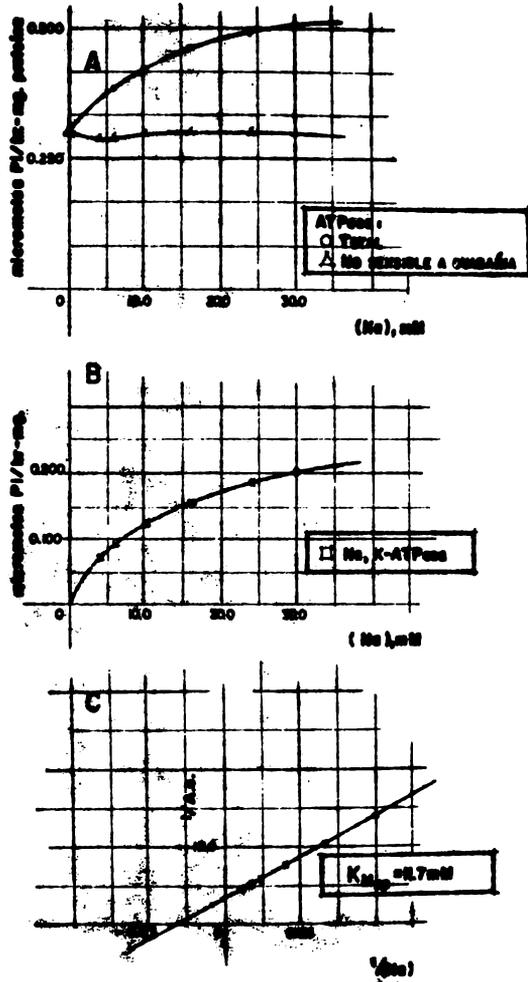


Fig. 16. Actividad de ATPasa de membranas de eritrocitos a concentraciones variables de NaCl. Proteína membranar: 89.6 microgramos. Detalles en el texto.

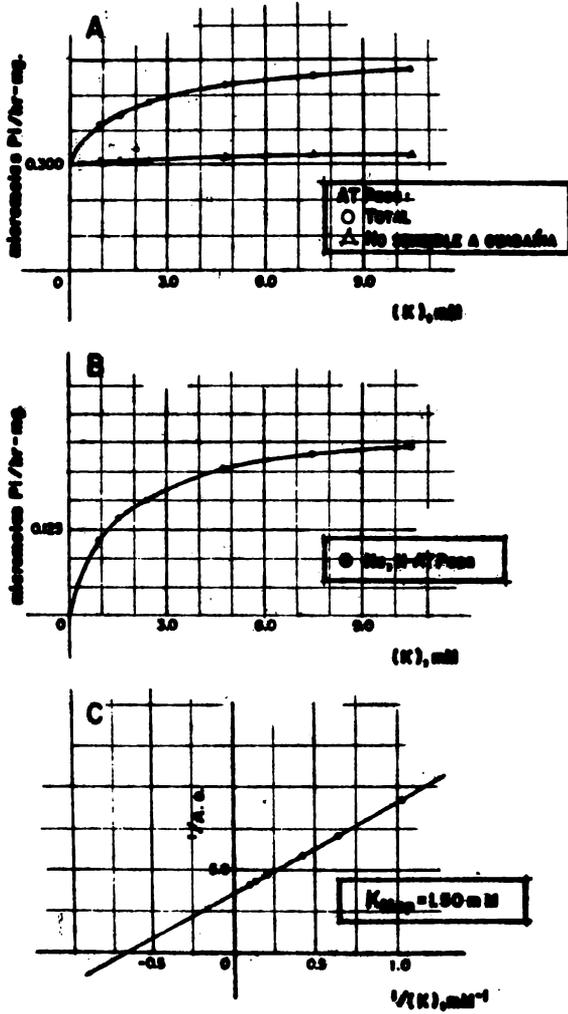


Fig. 17. Actividad de ATPasa de membranas de eritrocitos versus  $K^+$ .  
Proteína membranal: 89.6 microgramos.  
Detalles en el texto.

Para averiguar qué tanto varían las constantes cinéticas en la Na,K-ATPasa, obtenidas por los métodos recién descritos, se hicieron tres determinaciones independientes en una misma persona en un lapso de 49 días. El Cuadro 12 muestra que la variación intraindividual fue pequeña, ya que los coeficientes de variación oscilaron entre 3 y 7 por ciento.

CUADRO 12. Constantes cinéticas aparentes de la Na,K-ATPasa de membranas de eritrocitos: variación intraindividual en 49 días.

Tiempo (días)	$K_M$ aparente (mM) <sup>a</sup>		
	ATP	Na <sup>+</sup>	K <sup>+</sup>
0	0.497	12.6	1.67
15	0.466	11.8	1.55
49	0.431	12.1	1.46
Promedio $\pm$	0.465 $\pm$	12.2 $\pm$	1.56 $\pm$
Desv. est.	0.033	0.4	0.11
C.V. <sup>b</sup>	7.1	3.3	7.1

a. Obtenidas por el método de Lineweaver-Burk (61).

b. Coeficiente de variación = desv. est.) (100)/promedio.

## DISCUSION

### A. Preparación de "fantasmas" (membranas) de eritrocitos.

La lisis osmótica y el lavado repetido de los eritrocitos con una solución de bicarbonato de sodio 7.5 mM, pH 7.4, bastan para exponer la actividad de la Na,K-ATPasa sin necesidad de otros procedimientos (por ejemplo, la sonicación) (Cuadro 1). La exposición de la actividad enzimática se debe al parecer a la eliminación de la barrera de permeabilidad que opone la membrana celular intacta al paso del ATP, ya que el

sitio activo de la Na,K-ATPasa se encuentra en el lado citoplasmático de la membrana (55). El método de Hanahan y Ekholm (56), a base de soluciones de Tris, pH 7.6, produce una exposición similar de la actividad enzimática (Cuadro 2), con la ventaja adicional de que las soluciones empleadas no contienen sodio.

En las preparaciones membranales, como los "fantasmas" de eritrocitos, puede haber un cierto porcentaje de actividad enmascarada de la Na,K-ATPasa, ya que la enzima está rodeada por una matriz lipídica que no es eliminable por las soluciones de fuerza iónica baja. Cuando las membranas ("fantasmas") de eritrocitos fueron pretratadas con desoxicolato de sodio, se logró exponer un 8 por ciento extra de la actividad de la enzima, cuando la concentración final de la sal biliar fue de 0.005 por ciento, p/V (final), (Cuadro 9). A concentraciones mayores del detergente se observó una disminución progresiva de la actividad de la Na,K-ATPasa (Cuadro 9), hecho que pudiera se atribuido a la eliminación de lípidos esenciales para el funcionamiento de la enzima (73).

#### B. Cuantificación colorimétrica de fosfato inorgánico.

La determinación colorimétrica del fosfato inorgánico liberado por la Na,K-ATPasa, presenta el problema de una hidrólisis no enzimática de ATP de magnitud significativa (Cuadro 4), ya que este compuesto es muy sensible a la temperatura elevada y el pH ácido (64). El método de Bonting y cols. (58), que emplea sulfato ferroso como agente reductor, produce una hidrólisis no enzimática de ATP 37 por ciento menor que la causada por el método de Ames (57), en el que el agente que reduce el complejo fosfomolibdico es el ácido cítrico y se requiere una incubación a 37° C durante una hora (Cuadro 3). El método de Bonting y cols. ofrece la ventaja adicional de que la coloración se desarrolla en 10 minutos a temperatura ambiente.

Solamente el 12 por ciento de la hidrólisis no enzimática es imputable al ensayo de actividad de la Na,K-ATPasa (Cuadro 5). Este hecho es relevante ya que una concentración ele

vada de ADP o de fosfato inorgánico en el medio de reacción (más del 10 por ciento de la concentración de ATP), inhibe la actividad de la Na,K-ATPasa (28).

C. Condiciones para medir la actividad de la Na,K-ATPasa de membranas ("fantasmas") de eritrocitos.

La medición de la actividad de la Na,K-ATPasa en una preparación impura como son las membranas de eritrocitos, plantea el problema de identificar la contribución de otras fosfohidrolasas presentes en la membrana a la actividad total de ATPasa. Entre ellas se cuentan la ATPasa dependiente de calcio y de magnesio (Ca,Mg-ATPasa) y la ATPasa dependiente de magnesio y de aniones (Cl<sup>-</sup> y HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>), (35). Además de evitar la presencia de Ca<sup>++</sup> y HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> en la mezcla de reacción, se requieren otros controles. Si en el medio de reacción no se incluye el ión Na<sup>+</sup> o el ión K<sup>+</sup>, se obtiene una actividad residual de ATPasa (Mg-ATPasa inespecífica). Al restar esta actividad de la total, se obtiene la actividad dependiente de Na<sup>+</sup> y K<sup>+</sup> o Na,K-ATPasa (Cuadro 7). Si se emplea el glucósido ouabaina a una concentración inhibitoria máxima (1 mM, Fig 6), se observa una actividad residual de ATPasa equiparable en magnitud a la obtenida en ausencia de Na<sup>+</sup> y/o K<sup>+</sup> (Cuadro 6), por lo que, al sustraer de la actividad total el componente insensible a ouabaina, el componente sensible al inhibidor es similar en magnitud a la actividad de Na,K-ATPasa obtenido con el otro control (Cuadro 7).

A una concentración de ATP de 3 mM, una relación equimolar de Mg<sup>++</sup> y ATP y una suma constante de Na<sup>+</sup> + K<sup>+</sup> = 120 mM, las concentraciones de NaCl y KCl que producen una actividad máxima de la Na,K-ATPasa son de 105 y de 15 mM, respectivamente (Fig. 7). Esto es, la relación de concentraciones Na<sup>+</sup>:K<sup>+</sup> óptima es de 7 : 1, la cual se encuentra dentro del rango recomendado para ensayar la actividad de la Na,K-ATPasa (35).

La Na,K-ATPasa es una enzima membranal que, en la célula intacta, acopla la hidrólisis de ATP a un flujo de cationes monovalentes (Na<sup>+</sup> y K<sup>+</sup>) en contra de sus gradientes electroquímicos (74). Bajo ciertas condiciones, también puede aco-

plar el flujo de estos cationes monovalentes a favor de sus gradientes electroquímicos con la síntesis de ATP (75). La enzima actúa por lo tanto como un transductor que convierte la energía química en gradientes electroquímicos para  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$ , o sus congéneres, de una manera reversible (74). El funcionamiento de la enzima implica la capacidad para discriminar entre los iones  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$ , capacidad que se manifiesta en la transición entre dos conformaciones de la Na,K-ATPasa: una forma  $\text{Na}^+$  ( $E_1$ ) y una forma  $\text{K}^+$  ( $E_2$ ), (49). Esta adaptación de la estructura molecular de la enzima a cada uno de estos cationes guarda una relación íntima con la afinidad de la Na,K-ATPasa por su sustrato: cuando está "adaptada" al ión  $\text{Na}^+$  ( $E_1$ ), se "abre" un sitio de alta afinidad por el ATP; por el contrario, la adaptación a  $\text{K}^+$  ( $E_2$ ) está asociada a una disminución de la afinidad por el sustrato (45). Así pues, la transición conformacional enlaza de alguna manera la reacción de la enzima con el ATP a la reacción con los cationes activadores ( $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$ ) (74), y no resulta sorprendente que bajo las condiciones de ensayo descritas existan concentraciones determinadas de NaCl y KCl que faciliten las transiciones estructurales de la Na,K-ATPasa y, por ende, la hidrólisis enzimática del ATP. La relación de concentraciones de  $\text{Na}^+ : \text{K}^+$  que produce la hidrólisis máxima de ATP es de 7: 1 (Fig. 7). Fuera de esta relación óptima de concentraciones, las actividades observadas de la Na,K-ATPasa son menores (Fig. 7), lo cual puede deberse a la competencia entre  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  por sus sitios respectivos de activación (39).

Cuando se excluye del medio de ensayo al ión  $\text{Mg}^{++}$ , disminuye la actividad total de ATPasa de membranas de eritrocitos en un 80 por ciento con respecto de la obtenida al emplear  $\text{MgCl}_2$  3 mM (Cuadro 6), disminución que también se refleja en el componente sensible a ouabaina de la actividad (Na,K-ATPasa, Fig. 8B). Este resultado corrobora el requerimiento de la enzima por el catión divalente (28), el cual no solamente favorece la unión del sustrato (45) sino también la transición de la Na,K-ATPasa de una conformación afín por  $\text{Na}^+$  ( $E_1 - P$ ) a una

conformación afin por  $K^+$  ( $E_2 - P$ ), (35). Asimismo, el ión  $Mg^{++}$  estimula la unión de ouabaína en presencia de  $Na^+$  (51). Cuando se incrementa la concentración de este catión en el medio, la actividad total de ATPasa crece hasta alcanzar una meseta (Fig. 8A); sin embargo, el componente de la actividad que no es sensible a ouabaína (Mg-ATPasa), continúa creciendo conforme aumenta la concentración de  $MgCl_2$  (Fig. 8A). Por esta razón, la actividad de Na,K-ATPasa (componente sensible a ouabaína) decrece a concentraciones de  $MgCl_2$  superiores a 3.5 mM (Fig. 8B). Este efecto inhibitorio del ión  $Mg^{++}$  sobre la actividad de la Na,K-ATPasa es aparentemente de tipo no competitivo (76).

La ausencia de EDTA en el medio de reacción produce un aumento en la actividad total de la ATPasa (Cuadro 6), a expensas del componente insensible a ouabaína (Mg-ATPasa), (Fig. 9A). Conforme se añade EDTA a la mezcla de reacción, las actividades de ATPasa total y Mg-ATPasa disminuyen (Fig. 9A), en tanto que la actividad de la Na,K-ATPasa (componente sensible al inhibidor) aumenta, alcanzando un máximo en la vecindad de EDTA 0.2 mM (Fig. 9B) y decreciendo a concentraciones mayores del reactivo. A diferencia del ión  $Mg^{++}$ , otros cationes divalentes (por ejemplo,  $Ca^{++}$ ) inhiben la actividad de la Na,K-ATPasa y activan otras fosfohidrolasas de ATP (incluidas en la Mg-ATPasa inespecífica) (77). Por lo tanto, la "estimulación" producida por el EDTA de la actividad de la Na,K-ATPasa pudiera ser atribuida a la quelación de pequeñas cantidades de  $Ca^{++}$  presentes en la preparación membranal y/o en la mezcla de reacción. A concentraciones elevadas de EDTA disminuye la actividad de la Na,K-ATPasa, presumiblemente porque este agente también quela  $Mg^{++}$ .

En todos los ensayos descritos el pH de la mezcla de reacción se mantuvo por adición de Tris, pH 7.5. Cuando la concentración de este catión es de 20 mM, la actividad total de ATPasa de membranas de eritrocitos es menor (6 por ciento) con respecto de la observada con Tris 36.6 mM (Cuadro 6). Si se incrementa la concentración de Tris en el medio de reac-

ción, se observa un aumento en la actividad total de ATPasa que es a expensas del componente insensible a ouabafina (Fig. 10A), en tanto que la actividad sensible al glucósido (Na,K-ATPasa) es máxima en la vecindad de Tris 40 mM, declinando a concentraciones mayores de este catión (Fig. 10B).

Debido a que los ensayos de actividad se llevan a cabo con preparaciones impuras de naturaleza vesicular ("fantasmas" de eritrocitos), podría pensarse que el efecto del Tris sobre la actividad de la Na,K-ATPasa se debe a fuerza iónica. Empero, se ha comunicado que este catión ejerce además un efecto directo sobre la enzima, induciendo una conformación  $E_1$  de alta afinidad por  $Na^+$  y ATP (74,78). Otros cationes (colina, imidazol) actúan de manera similar sobre la enzima, en tanto que los iones  $Cs^+$ ,  $Rb^+$  y  $NH_4^+$  inducen una conformación  $E_2$  de la Na,K-ATPasa, con baja afinidad por ATP y afinidad elevada por  $K^+$  (74). Por lo tanto, es razonable que en las condiciones descritas para el ensayo de actividad haya una concentración de Tris óptima para el ciclo de transiciones conformacionales de la Na,K-ATPasa.

La temperatura óptima para un ensayo de actividad enzimática es aquella que mantiene constante una actividad máxima de la enzima a ser estudiada (61). Así, aunque incubando las membranas de eritrocitos a 41° C se observó el máximo de actividad de la Na,K-ATPasa (Fig. 11), ésta fue más estable a la preincubación durante una hora a 37° C (Fig. 12), por lo que se escogió esta última temperatura para el ensayo.

Para la elección del pH de incubación se aplica un criterio similar. Aunque no se preincubaron membranas de eritrocitos en medios de acidez variable, el pH de incubación aparentemente óptimo para determinar la actividad de la Na,K-ATPasa durante 60 minutos a 37° C se encuentra en la vecindad de 7.4 (Fig. 13), similar al encontrado en otros estudios (54).

Cuando se ensaya la actividad de la Na,K-ATPasa en presencia de una relación de concentraciones determinada de  $Na^+$ :  $K^+$ , un incremento en la suma de concentraciones de estos dos cationes desplaza el equilibrio de conformaciones de la Na, K,

-ATPasa en favor de la forma  $\text{Na}^+$  ( $E_1$ ), (74), cambio que ha sido corroborado mediante el empleo de sondas fluorescentes (35). Un efecto similar se obtiene cuando, a una suma constante de concentraciones de  $\text{Na}^+ + \text{K}^+$ , se incrementa el pH (74). En otras palabras, un pH elevado favorece una conformación enzimática tipo  $E_1$  de alta afinidad por ATP y  $\text{Na}^+$ , en tanto que una disminución en el pH desplaza la distribución de conformaciones de la enzima en favor de la forma  $E_2$  de alta afinidad por  $\text{K}^+$  (74). Por otra parte, cuando se titula el pH en términos de la afinidad relativa de la Na,K-ATPasa por  $\text{Na}^+$  o  $\text{K}^+$ , a una suma constante de concentraciones, un incremento en la relación  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  desplaza la curva hacia valores menores de pH, hecho que sugiere que un incremento en dicho cociente disminuye el pKa de grupos funcionales de la enzima que son importantes en su afinidad por  $\text{Na}^+$  con respecto a  $\text{K}^+$  (74). A partir de estos datos se ha postulado que la forma  $\text{Na}^+$  de la Na,K-ATPasa ( $E_1$ ) es una conformación no protonada, en tanto que  $E_2$  (forma  $\text{K}^+$ ) es una conformación protonada de la enzima (74).

La actividad de Na,K-ATPasa de membranas de eritrocitos congeladas a  $-20^\circ \text{C}$  es estable durante 4 semanas posteriores a su obtención (54). En las condiciones empleadas en el presente trabajo, la actividad de la enzima se preserva solamente durante los primeros cinco días posteriores al aislamiento de las membranas, las cuales se mantuvieron congeladas a  $-20^\circ \text{C}$  (Cuadro 8).

El ensayo convencional para determinar la actividad de la Na,K-ATPasa de membranas de eritrocitos es reproducible, ya que las variaciones intra- e interensayo observadas no son significativas (Cuadro 10).

En nueve determinaciones individuales la actividad de la Na,K-ATPasa de membranas de eritrocitos de una misma persona, mediante un ensayo convencional similar al descrito, mostró un coeficiente de variación del 8 por ciento (Cuadro 11). Este dato sugiere que al comparar las actividades enzimáticas de distintas personas, las diferencias deben ser superiores al 16 por ciento para ser significativas.

D. Cinética aparente de la Na,K-ATPasa de membranas de eritrocitos.

Un prerrequisito para estudiar la cinética de una enzima es que la determinación de actividad se haga en condiciones de "velocidad inicial", es decir, a concentraciones catalíticas de la enzima y concentraciones casi saturantes de su subtrato, de manera que la concentración de éste permanezca relativamente constante durante el tiempo que dure el ensayo y no haya acumulación significativa de producto (s) (61). En la figura 4 se observa que cuando la concentración inicial de ATP es de 3 mM y las concentraciones de los demás componentes del ensayo son las óptimas (Cuadro 4), la actividad de la Na, K-ATPasa de membranas de eritrocitos es lineal durante 60 minutos en un rango de concentraciones de proteína membranal de 30-140 microgramos. Esta linealidad sugiere que solamente se valora la hidrólisis enzimática de ATP sin la interferencia de los productos de la misma (ADP y fosfato inorgánico), cuya acumulación podría revertir el sentido de la reacción hacia la síntesis de ATP y/o la inhibición de la actividad enzimática. En la figura 5 se observa que el tiempo de incubación empleado (una hora a 35° C) se encuentra dentro del rango lineal de actividad de la Na,K-ATPasa.

I. Actividad de la Na,K-ATPasa a concentraciones variables de ATP.

Cuando se determina la actividad de la Na,K-ATPasa de membranas de eritrocitos en un medio de reacción que contiene las concentraciones previamente definidas de MgCl<sub>2</sub>, NaCl, KCl y EDTA (Cuadro 4) y concentraciones de ATP variables (0 a 3 mM), manteniendo la molaridad final de la mezcla (163 mM) mediante la adición de Tris, pH 7.5, la curva de velocidad inicial versus concentración de ATP muestra un comportamiento hiperbólico rectangular (Fig. 14A), típico de la cinética de Michaelis y Menten (61). Al linearizar la curva mediante el método de Lineweaver-Burk se obtienen los valores aparentes

de  $K_m$  y  $V_{max}$  (Fig. 14B). La  $K_m$  aparente para ATP en este ejemplo fue de 0,43 mM, valor que coincide con el de la  $K_m$  del sitio de baja afinidad para ATP de la Na, K-ATPasa (alrededor de 0,48 mM, ref. 38). Además, el valor calculado de la  $K_m$  es comparable a los encontrados por otros autores para la Na, K-ATPasa de membranas de eritrocitos (54).

## II. Actividad de la Na, K-ATPasa a concentraciones variables de NaCl.

La actividad de la Na, K-ATPasa es estimulada por la presencia conjunta de los cationes  $Na^+$  y  $K^+$  (Cuadro 6). Cuando la mezcla de reacción contiene las concentraciones preestablecidas de ATP,  $MgCl_2$ , KCl y EDTA, una concentración variable de NaCl (0 a 30 mM) y la molaridad final se mantiene en 71 mM por adición de Tris, pH 7.5, la actividad de la Na, K-ATPasa muestra un máximo a una concentración de NaCl de 10 mM, decreciendo a concentraciones mayores de este reactivo (Fig. 15A). Por consiguiente, la gráfica resultante de la aplicación del método de Lineweaver-Burk es no lineal, sugiriendo una inhibición por "substrato" (en este caso, el ión  $Na^+$ ) (Fig. 15A). Cuando la molaridad de la mezcla de reacción es de 166 mM (por adición de Tris), la curva de actividad de la Na, K-ATPasa contra la concentración de  $Na^+$  muestra un comportamiento hiperbólico rectangular, debido a lo cual la gráfica de doble recíproco (Lineweaver-Burk) es lineal (Fig. 15B), con una  $K_m$  aparente para  $Na^+$  de 11 mM. Si la molaridad de la mezcla de reacción se incrementa a 261 mM (nuevamente, por adición de Tris), la curva de velocidad inicial es también hiperbólica y su doble recíproco lineal y, aunque la  $V_{max}$  calculada es similar a la observada a 166 mM, la  $K_m$  aparente para  $Na^+$  es ahora de 13 mM (Fig. 15C). Estos resultados sugieren que el efecto del Tris sobre la actividad de la Na, K-ATPasa de membranas de

eritrocitos no solamente es debido a la fuerza iónica, sino también a una competencia con el ión  $\text{Na}^+$ , como lo muestra el aumento en la  $K_m$  aparente para este catión (Figs. 15B y 15C). Este hallazgo es congruente con el hecho de que el Tris induce una conformación de la Na,K-ATPasa de alta afinidad por ATP y  $\text{Na}^+$  ( $E_1$ ), (78).

Para ensayar rutinariamente la actividad de la Na, K-ATPasa a concentraciones variables de NaCl (0 a 34 mM) se eligió una molaridad final de la mezcla de reacción de 163 mM, la cual también se empleó en la medición convencional de actividad (Cuadro 4), así como para la determinación de la  $K_m$  para ATP (ver apartado anterior). En la figura 16 se presenta un ejemplo. Se observa que la actividad total de ATPasa asciende de manera hiperbólica a concentraciones crecientes de NaCl, en tanto que el componente insensible a ouabaína (Mg-ATPasa) permanece constante (Fig. 16A), lo cual se refleja en el comportamiento hiperbólico de la actividad de la Na,K-ATPasa (componente sensible a ouabaína), (Fig. 16B), con un doble recíproco lineal (Fig. 16C). La  $K_m$  aparente para  $\text{Na}^+$  fue de 11.7 mM, la cual se encuentra dentro del rango comunicado (5-13 mM, ref. 35).

### III. Actividad de Na,K-ATPasa a concentraciones variables de KCl.

La actividad enzimática se determinó en un medio que contenía las concentraciones previamente establecidas de ATP,  $\text{MgCl}_2$ , NaCl y EDTA (Cuadro 4), concentraciones variables de KCl (0 a 10.5 mM) y una molaridad final de 163 mM (Tris, pH 7.5). En la figura 17A se observa que la actividad total de ATPasa aumenta de manera hiperbólica al incrementarse la concentración de KCl en el medio de reacción, en tanto que el componente de actividad insensible a ouabaína (Mg-ATPasa) permanece relativamente constante. El comportamiento de la curva de actividad sensible al glucósido es hiperbólico rectangular

(17B), lo cual se traduce en una gráfica lineal de doble recíproco (Fig. 17C). La  $K_m$  aparente calculada para  $K^+$  en este ejemplo fue de 1,5 mM, valor que se encuentra dentro del rango reportado (0,7-1.8 mM, ref. 35).

La manera recién descrita para determinar las constantes cinéticas para  $Na^+$  y  $K^+$  es artificiosa, debido al efecto directo del Tris sobre la Na,K-ATPasa. Sin embargo, el procedimiento habitual descrito en la literatura no está exento de problemas. Para evitar los efectos del Tris o de otros cationes sobre la enzima, las constantes cinéticas aparentes para  $Na^+$  y  $K^+$  se determinan mediante la covariación de estos cationes, a una suma constante de las concentraciones de los mismos, manteniendo de esta manera la fuerza iónica (79). Por ejemplo, cuando se determina la  $K_m$  para  $Na^+$ , a una suma de  $Na^+ + K^+ = 120$  mM, se añaden a la mezcla de reacción cantidades crecientes de NaCl, manteniendo la molaridad final por adición de KCl. De este modo se genera una curva de actividad total de ATPasa, a la que se resta la actividad obtenida en ausencia de NaCl (esto es, con KCl = 120 mM). El fundamento teórico de este procedimiento es que los sitios de la enzima para el ión  $K^+$  estarían totalmente ocupados por la presencia abundante de KCl en el medio de reacción y por lo tanto, el incremento observado en la actividad de la ATPasa medida en ausencia de  $Na^+$  al añadir NaCl a la mezcla, sería la actividad de ATPasa dependiente de este catión (80). Un razonamiento similar se aplicaría para la cinética contra  $K^+$ . No hay que olvidar, sin embargo, que existe competencia entre los iones  $Na^+$  y  $K^+$  por sus sitios respectivos de unión en la enzima (39), lo que pondría en tela de juicio la validez de este método.

De cualquier manera, las constantes cinéticas obtenidas por los procedimientos anteriormente descritos (manteniendo la molaridad final en 163 mM por adición de Tris), no muestran una grave variación intraindividual, a juzgar por los datos del Cuadro 12.

## CONCLUSIONES

1. La lisis osmótica de los eritrocitos y el lavado respectivo de los "fantasmas" (membranas) obtenidos con soluciones de osmolaridad baja (10-20 miliosmolas ideales/litro), exponen la actividad de la ATPasa dependiente de sodio y de potasio (Na,K-ATPasa). El pretratamiento de las membranas con desoxicolato de sodio puede desenmascarar un porcentaje adicional de actividad enzimática.
2. La hidrólisis no enzimática de ATP es adjudicable en un 90 por ciento a factores extra-ensayo.
3. Para deducir el componente no específico de la actividad de ATPasa de membranas de eritrocitos, son igualmente efectivos los controles en los que se excluyen los iones  $\text{Na}^+$  o  $\text{K}^+$ , o bien se utiliza ouabaina 1 mM.
4. En condiciones de velocidad inicial, una concentración de ATP de 3 mM, una suma constante  $\text{Na}^+ + \text{K}^+ = 120$  mM, una molaridad final de 163 mM (con Tris, pH 7.5), e incubando durante una hora a 37° C, las concentraciones óptimas de los componentes de la mezcla de reacción para determinar la actividad de la Na,K-ATPasa de membranas de eritrocitos son:  $\text{MgCl}_2$ , 3 mM; NaCl, 105 mM; KCl, 15 mM y, EDTA, 0.2 mM.
5. El ensayo convencional de actividad de la Na,K-ATPasa es reproducible, con una variación intraindividual reducida de la actividad enzimática.
6. La determinación de las constantes cinéticas aparentes de la Na,K-ATPasa para su sustrato y sus cationes activadores, manteniendo una molaridad de 163 mM con Tris, es un procedimiento artificial debido a los efectos directos de este catión sobre la enzima. La variación intraindividual de las constantes cinéticas de esta manera obtenidas es, aparentemente, reducida.

**SECCION II:**

**Actividad y cinética aparente  
de la Na,K-ATPasa de membranas  
de eritrocitos de pacientes  
desnutridos graves.**

## INTRODUCCION

El término desnutrición, o estado deficiente de la nutrición, agrupa a todas las condiciones patológicas que derivan de un déficit en la ingestión, absorción o aprovechamiento de los nutrimentos, o de una situación de pérdidas energéticas exageradas (81).

La desnutrición es un proceso sistémico, ya que todas las células del organismo son afectadas (82). Aunque en ocasiones se habla de una desnutrición de origen primario, esto es, causada por una deficiencia cuantitativa o cualitativa en la ingestión de alimentos, o bien de una desnutrición de tipo secundario, debida a una deficiencia en el aprovechamiento corporal de los alimentos, en la práctica la desnutrición más frecuentemente observada es de tipo mixto, es decir, determinada por factores primarios y secundarios (81,82).

Los estudios experimentales han permitido discriminar el efecto de la falta de un nutrimento específico; sin embargo, las carencias nutriólogicas más frecuentemente observadas en el humano son de tipo múltiple, las cuales se traducen en manifestaciones complejas de enfermedad (81). Esto se explica porque los humanos no ingieren nutrimentos individuales, sino los vehículos que los contienen: los alimentos (81).

Aunque todas las personas pueden sufrir desnutrición, sus consecuencias son particularmente graves en las primeras etapas de la vida, cuando se completa el desarrollo de los órganos y el crecimiento del niño incrementa los requerimientos nutriólogicos por encima de las necesidades de mantenimiento corporal (2).

Entre la población infantil de los países subdesarrollados predomina la desnutrición denominada "energético-proteínica" (83), un espectro de enfermedades de gravedad variable. La denominación "energético-proteínica", enfatiza la importancia de las calorías y de la proteína de la dieta: si ésta es insuficiente de energía, es casi seguro que también la cantidad

de proteína sea deficiente ya que parte de ella se cataboliza para obtener energía. En otras ocasiones, la dieta puede ser deficiente en proteínas y relativamente suficiente en términos de energía (83).

Las variedades graves de la desnutrición energético-proteínica son el marasmo y el kwashiorkor, las cuales representan sólo la "punta" del gran iceberg de la desnutrición infantil, en el que predominan las formas leves y moderadas de la enfermedad (82).

El marasmo (Fig. 18), frecuente en lactantes, se caracteriza por un déficit ponderal marcado, con gran hipotrofia de los tejidos muscular y subcutáneo (84). Desde un punto de vista estrictamente dietético se considera que la gran consunción que presenta el niño marasmático es el resultado de un intento de adaptación metabólica, mediada por el sistema neuroendócrino (85).

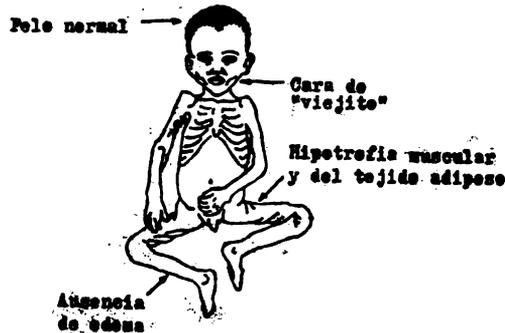


Fig. 18. Características clínicas del marasmo nutricional,  
Fuente: Referencia 83.

Aunque un paciente es catalogado como marasmático hasta que su déficit de peso corporal es mayor del 40 por ciento respecto del peso ideal para la edad, antes de que la desnutrición haya alcanzado esta fase pueden detectarse cambios metabólicos importantes. Así, en comunidades donde el marasmo es prevalente, los niños cuyo desarrollo se ha estancado muestran concentraciones plasmáticas elevadas de cortisol y de hormona del crecimiento, en tanto que la insulinemia es baja (86). El perfil hormonal de los niños marasmáticos hospitalizados es sólo una exageración del mostrado en etapas previas de la desnutrición (84), además de que se ha comunicado un descenso en la concentración plasmática de hormonas tiroideas (87). Estos cambios pueden interpretarse de la manera siguiente: la hipoinsulinemia sería una respuesta fisiológica a la ingestión inadecuada de alimentos que facilitaría la movilización de substratos energéticos endógenos (87). El cortisol estimularía la degradación de proteínas en el tejido muscular, por lo que habría mayor disponibilidad de aminoácidos para la gluconeogénesis y la síntesis de proteínas en el hígado (85). Esto podría explicar, al menos parcialmente, la hipotrofia muscular del marasmático y el por qué no hay una hipoproteïnemia acentuada. Los niveles altos de hormona del crecimiento promoverían la movilización de ácidos grasos en el tejido adiposo (85) y la disminución de hormonas tiroideas ayudaría a preservar las escasas reservas energéticas del paciente, al disminuir la tasa metabólica basal (87).

El kwashiorkor (Fig. 19) ocurre con mayor frecuencia en lactantes mayores y preescolares (81). Los niños afectados muestran un déficit ponderal e hipotrofia muscular marcada, la cual suele estar enmascarada por la relativa preservación del tejido adiposo subcutáneo y por el edema, el cual puede ser generalizado. Comúnmente se observan lesiones cutáneas (hipopigmentación difusa o en placas, con zonas de hiperpigmentación, descamación y ulceraciones, especialmente en los pliegues de flexión), alteraciones del cabello (decoloración,



Fig. 19. Características clínicas del kwashiorkor.  
Fuente: Referencia 73.

pérdida del brillo y fácil desprendimiento del cuero cabelludo), hepatomegalia (infiltración grasa del hígado) y cambios psicológicos (anorexia y apatía). Entre los hallazgos más característicos de laboratorio se cuentan la hipoalbuminemia, la anemia y alteraciones electrolíticas, (84).

También puede intentarse una interpretación homeostática del kwashiorkor, en función de una deficiencia crónica de proteína en la dieta (85). Se ha encontrado que en las fases previas al kwashiorkor manifiesto, el perfil hormonal de los preescolares es distinto al descrito para los premarasmáticos: la concentración plasmática de insulina es relativamente elevada, con niveles normales de glucocorticoides y de hormona del crecimiento (84).

Cuando una dieta es proporcionalmente deficiente en proteínas, hay un exceso relativo de energía, aun cuando ésta no satisfaga plenamente las necesidades del organismo (85). Este exceso energético relativo haría menos ostensible el consumo de las reservas endógenas (87). La secreción aumentada de insulina favorecería la síntesis y depósito de triglicéridos,

además de estimular la captación de aminoácidos esenciales por el tejido muscular, lo que, en condiciones de un aporte disminuido de proteína dietética, interferiría con la síntesis de proteínas hepáticas de exportación (albúmina y apoproteínas de la fracción lipoproteínica beta, entre otras). La hipoalbuminemia resultante podría contribuir a la aparición del edema, en tanto que la hipolipoproteinemia favorecería la acumulación de grasa en el hígado (85).

En niños con kwashiorkor manifiesto, el perfil hormonal es diferente del descrito para las fases previas de la enfermedad y muy parecido al del niño marasmático: hipoinsulinemia, hipotiroidismo relativo y concentraciones plasmáticas aumentadas de hormona del crecimiento y de cortisol (87). Estos cambios podrían resultar de la anorexia y de las infecciones intercurrentes (84).

Ahora bien, la desnutrición energético-proteínica no tiene un origen o una naturaleza exclusivamente dietéticos. Factores tales como la ignorancia, los tabúes culturales, la insalubridad, la marginación social y, en una palabra, todo lo que encierra el término pobreza, afectan necesariamente el consumo de alimentos, en perjuicio del estado de nutrición del individuo (82). Sin embargo, *aunque la contribución ambiental a la patogénesis de la desnutrición es muy importante, tal vez la búsqueda de diferencias individuales en la adaptación a las agresiones del medio ambiente ayuden a explicar por qué la desnutrición afecta de manera heterogénea a niños pertenecientes al mismo ecosistema e, incluso, a una misma familia* (83). En este contexto se inscribe el trabajo presente.

En la Introducción General se mencionó que en eritrocitos de humanos obesos, así como en hígado y músculo del ratón genéticamente obeso (ob/ob), se encontró una reducción en el número de unidades y en la actividad de la ATPasa dependiente de sodio y potasio (Na,K-ATPasa) (18,19,24), enzima a la que se ha atribuido una participación importante en el gasto ener

gético corporal (17). Estos hallazgos sugirieron que quizá un decremento de la actividad de la Na,K-ATPasa esté involucrada en la patogénesis de algunos casos de obesidad en el humano (24). Según esta hipótesis, los individuos con una ATPasa menos activa tendrían requerimientos energéticos menores y, por lo mismo, una dieta adecuada para sujetos cuya actividad enzimática fuese mayor, conduciría con el tiempo a un estado de obesidad en aquéllos. Si esto fuese cierto, también se podría esperar que individuos en los que la actividad de la Na,K-ATPasa fuese mayor requiriesen más energía dietética, lo cual podría traducirse en un aumento de la susceptibilidad a los efectos deletéreos de una alimentación deficiente. Entre otras cosas, esta hipótesis predice que niños afectados con desnutrición energético proteínica grave tengan una Na,K-ATPasa más activa que los niños bien nutridos y que, esta diferencia de actividad sea independiente del estado de nutrición. Para explorar esta posibilidad, se estudiaron la actividad y cinética aparente de la Na,K-ATPasa de membranas de eritrocitos en un grupo de niños con variedades graves de desnutrición, tanto a su ingreso como al egreso del Instituto Nacional de Pediatría (Servicio de Nutrición, INCyTAS-DIF). Con fines comparativos, se incluyó a un grupo de niños bien nutridos (Servicio de Oftalmología, Instituto Nacional de Pediatría). En las páginas siguientes se presentan y discuten los resultados de este trabajo.

## MATERIAL Y METODOS

A. Sujetos de estudio: Se incluyeron 16 niños con desnutrición energética proteínica de tercer grado (grave). Nueve de la variedad marasmática (45 días a 48 meses de edad; edad promedio = 12 meses) y siete con kwashiorkor (11 meses a 48 meses de edad; edad promedio = 32 meses). Con fines comparativos se estudiaron siete niños bien nutridos (24 meses a 9 años de edad; edad promedio = 50 meses).

En todos los niños desnutridos se hicieron las determinaciones de actividad enzimática a su ingreso al hospital. Sólo se completó el estudio (esto es, se hizo una segunda determinación de actividad de la Na,K-ATPasa en el paciente recuperado a su egreso del hospital) en seis de los niños marasmáticos (estancia promedio = 71 días) y en seis de los niños con kwashiorkor (estancia promedio = 44.5 días).

B. Obtención y procesamiento de muestras: Al ingreso y al egreso de los pacientes se colectó sangre venosa heparinizada (3-5 mililitros), después del ayuno nocturno. Los eritrocitos se separaron por centrifugación (2,000 r.p.m., 4° C), y se lavaron tres veces con 4 volúmenes de Tris 172 mM, pH 7.6. Las membranas ("fantasmas") se prepararon por el método de Hanahan y Ekholm (56), lisando los eritrocitos con 11 volúmenes de Tris 11.1 mM, pH 7.6, agitando vigorosamente. La suspensión fue centrifugada durante 30 minutos a 20,000 x g.; se eliminó el sobrenadante y los lavados se repitieron por cuatro ocasiones más. A partir de la lisis, todos los procedimientos se llevaron a cabo a 4° C. Las membranas de eritrocitos se resuspendieron en la misma solución de Tris 11.1 mM (volumen final = 4-5 mililitros) y se congelaron alcuotas a -20°C, las cuales fueron ensayadas dentro de las 36 horas siguientes. La concentración de proteína membranar fue determinada por la modificación de Oyama y Earle (59) al pro

cedimiento de Lowry y cols (60).

C. Actividad de la Na,K-ATPasa; Todos los ensayos se hicieron por duplicado o triplicado, empleando 60 a 90 microgramos de proteína de membranas (concentraciones que se encuentran dentro del rango de actividad lineal) (Fig. 4). Las membranas se incubaron durante una hora a 37° C, en un medio que contenía ATP, 3 mM; MgCl<sub>2</sub>, 3 mM; NaCl, 105.5 mM; y EDTA, 0.2 mM, y en el que la molaridad final fue mantenida en 163 mM por adición de Tris, pH 7.5, en ausencia y en presencia de ouabaína 1 mM, así como en presencia y en ausencia de desoxicolato de sodio (0.005 %, p/V final). La reacción fue detenida por adición de ácido tricloroacético frío (5 %, p/V final), manteniendo los tubos en un baño de hielo. Se centrifugó durante 5 minutos, a 3,000 r.p.m. (4° C) y se tomó una alícuota de sobrenadante para la cuantificación colorimétrica de fosfato inorgánico (58). Como blancos se utilizaron mezclas de reacción en las que se omitieron el ATP o las membranas.

La actividad de la Na,K-ATPasa (componente sensible a ouabaína) se calculó al restar la actividad no sensible al glucósido (Mg-ATPasa) de la actividad total, expresándola en términos de micromolas de fosfato inorgánico liberado por miligramo de proteína membranal por hora.

En los estudios cinéticos, las concentraciones de ATP fueron variadas entre 0.21 y 3 mM, las de NaCl entre 3 y 34 mM y las de KCl entre 0.96 y 10.5 mM. En todos los casos la tonicidad final del medio de reacción fue mantenida en 163 mM por adición de Tris, pH 7.5. Las constantes cinéticas aparentes (para ATP, Na<sup>+</sup> y K<sup>+</sup>) fueron calculadas por el método de Lineweaver-Burk (61). Debido a la insuficiente cantidad de sangre, en la mayoría de las muestras solamente se realizaron las determinaciones cinéticas.

D. Comparaciones estadísticas; Para comparar los promedios de la actividad enzimática observada en los distintos grupos estudiados, se empleó la prueba de "t" de Student (62). Cuando las actividades fueron en una misma población, se empleó la

prueba "D" (62). En ambos casos, el nivel de significación elegido fue  $p$  menor que 0.01.

### RESULTADOS

En un ensayo convencional, la actividad de ATPasa total de membranas de eritrocitos de los pacientes desnutridos no tratados, fue mayor que la correspondiente a los niños bien nutridos (Cuadro 13). El incremento observado en la actividad enzimática fue a expensas del componente sensible a ouabaina (Na,K-ATPasa, Cuadro 13).

La actividad de la Na,K-ATPasa eritrocítica de los niños con kwashiorkor fue, en promedio, 87 por ciento mayor que la observada en niños bien nutridos y 53 por ciento más elevada que la correspondiente a niños marasmáticos no tratados. En estos últimos, la actividad enzimática fue 22 por ciento mayor que la de los niños bien nutridos (Cuadro 13). Todas estas diferencias fueron estadísticamente significativas (prueba de "t", 62).

Al determinar la actividad de la Na,K-ATPasa contra diversas concentraciones de ATP, se observó un incremento en la  $V_{max}$  de la enzima de desnutridos no tratados, más ostensible en los niños con kwashiorkor (Cuadro 14), sin que la  $K_M$  aparente para el sustrato fuese diferente en alguno de los tres grupos estudiados (Cuadro 14). Esta situación se ilustra en la figura 20, donde se comparan los resultados de un niño con kwashiorkor, uno marasmático y uno bien nutrido.

Cuando se determinó la actividad de la Na,K-ATPasa de membranas de eritrocitos de desnutridos no tratados a concentraciones variables de NaCl en la mezcla de reacción, se observó un aumento de la  $V_{max}$  de la enzima, más notorio en los pacientes con kwashiorkor, pero sin diferencias en la  $K_M$  aparente para  $Na^+$  en los tres grupos estudiados (Cuadro 15). Este hecho se ejemplifica con los casos individuales de la figura 21.

**CUADRO 13. Actividad de ATPasa de membranas de eritrocitos (desnutridos, no tratados).**

Condición	N	ATPasa (micromol Pi/hr-mg) <sup>a</sup>		
		Total	Insensible a ouabaína	Sensible a ouabaína
Marasmo	9	0.710 <sup>b</sup> (± 0.015)	0.303 (± 0.014)	0.408 <sup>d</sup> (± 0.011)
Kwashiorkor	7	0.960 <sup>c</sup> (± 0.012)	0.336 (± 0.018)	0.624 <sup>c</sup> (± 0.013)
Bien nutridos	7	0.634 (± 0.019)	0.300 (± 0.008)	0.334 (± 0.013)

- a. Valores: Promedio ± e.i.m. N = número de pacientes  
 b. p menor que 0.01 vs. bien nutridos.  
 c. p menor que 0.001 vs. marasmo y bien nutridos  
 d. p menor que 0.001 vs. bien nutridos  
 e. Las comparaciones se hicieron mediante la prueba de "t".

**CUADRO 14. Actividad de la Na,K-ATPasa de membranas de eritrocitos a concentraciones variables de ATP (desnutridos no tratados).**

Condición	N	Constantes cinéticas aparentes <sup>b</sup>	
		V <sub>max</sub> (micromol Pi/hr-mg)	K <sub>M</sub> (mM)
Marasmo	5	0,434 ± 0,009	0,443 ± 0,015
Kwashiorkor	5	0,672 ± 0,031	0,429 ± 0,006
Niños bien nutridos	7	0.381 ± 0.015	0.444 ± 0.009

- a. Valores: Promedio ± e.e.m, N = número de pacientes.  
 b. Las constantes cinéticas aparentes fueron determinadas por el método de Lineweaver-Burk.

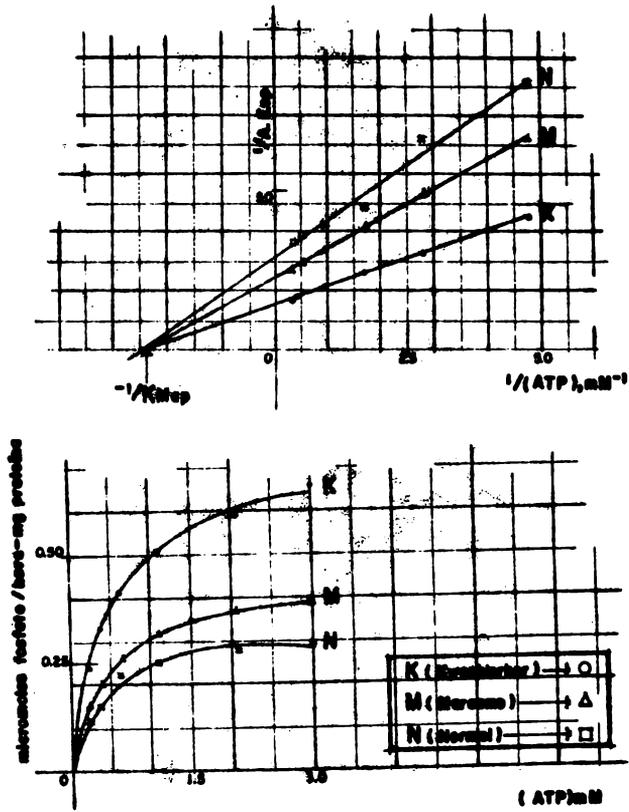


Fig. 20 Actividad de Na,K-ATPasa a concentraciones variables de ATP. Casos individuales (desnutridos no tratados).

Al medir la actividad de la Na,K-ATPasa de membranas de eritrocitos de desnutridos no tratados contra varias concentraciones de KCl, se obtuvo un resultado similar: la  $V_{max}$  estaba aumentada, sin variación de la  $K_M$  aparente para  $K^+$  (Cuadro 16). En la figura 22 se muestran ejemplos individuales. Nuevamente, el aumento de  $V_{max}$  era mayor en los niños con kwashiorkor.

Cuando se volvió a determinar la actividad de ATPasa de membranas de eritrocitos en los pacientes recuperados clínicamente, la actividad enzimática total era ahora de magnitud semejante en todos los grupos estudiados (marasmo, kwashiorkor y bien nutridos), a consecuencia de la disminución del componente sensible a ouabaína (Na,K-ATPasa, Cuadro 17).

CUADRO 15. Actividad de la Na,K-ATPasa de membranas de eritrocitos de desnutridos no tratados, medida a concentraciones variables de NaCl.

Condición	N	Constantes cinéticas aparentes <sup>b</sup>	
		$V_{max}$ (micromol Pi/hr-mg)	$K_M$ (mM)
Marasmo	9	0.433 ± 0.009	10.8 ± 0.2
Kwashiorkor	7	0.673 ± 0.018	10.1 ± 0.2
Niños bien nutridos	6	0.385 ± 0.017	10.8 ± 0.3

a. Valores: Promedio ± e.e.m. N = número de pacientes.

b. Las constantes cinéticas aparentes fueron determinadas por el método de Lineweaver-Burk.

Cuando los pacientes se recuperaron de la desnutrición se volvieron a estudiar las constantes cinéticas de la Na,K-ATPasa. Se observó que las  $V_{max}$  calculadas al ensayar la actividad de la enzima a concentraciones variables de ATP (Cuadro 18), NaCl (Cuadro 19) y KCl (Cuadro 20), respectivamente, eran ahora similares a las observadas en niños bien nutridos. Además, no se observaron diferencias en las  $K_M$  aparentes para

**CUADRO 16.** Actividad de la Na,K-ATPasa de membranas de eritrocitos de desnutridos no tratados, medida a concentraciones variables de KCl.

Condición	N	Constantes cinéticas aparentes <sup>b</sup>	
		V <sub>max</sub> (micromol Pi/hr-mg)	K <sub>M</sub> (mM)
Marasmo	6	0.428 ± 0.008	1.48 ± 0.05
Kwashiorkor	5	0.632 ± 0.019	1.41 ± 0.02
Niños bien nutridos	6	0.367 ± 0.011	1.48 ± 0.04

a. Valores: Promedio ± e.e.m. N = número de pacientes.

b. Las constantes cinéticas aparentes fueron determinadas por el método de Lineweaver-Burk.

**CUADRO 17.** Actividad de ATPasa de membranas de eritrocitos (desnutridos recuperados).

Condición	N	ATPasa (micromol Pi/hr-mg) <sup>a</sup>		
		Total	Insensible a ouabaína	Sensible a ouabaína
Marasmo	6	0.614 <sup>c</sup> (± 0.024)	0.281 (± 0.020)	0.342 <sup>c</sup> (± 0.030)
Kwashiorkor	6	0.676 <sup>b</sup> (± 0.024)	0.311 (± 0.014)	0.365 <sup>b</sup> (± 0.016)
Bien nutridos	7	0.634 (± 0.019)	0.300 (± 0.008)	0.334 (± 0.013)

a. Valores: Promedio ± e.e.m. N = número de pacientes.

b. p mayor que 0.10 vs. marasmo y bien nutridos.

c. p mayor que 0.10 vs. bien nutridos

d. Las comparaciones se hicieron mediante la prueba de "t".

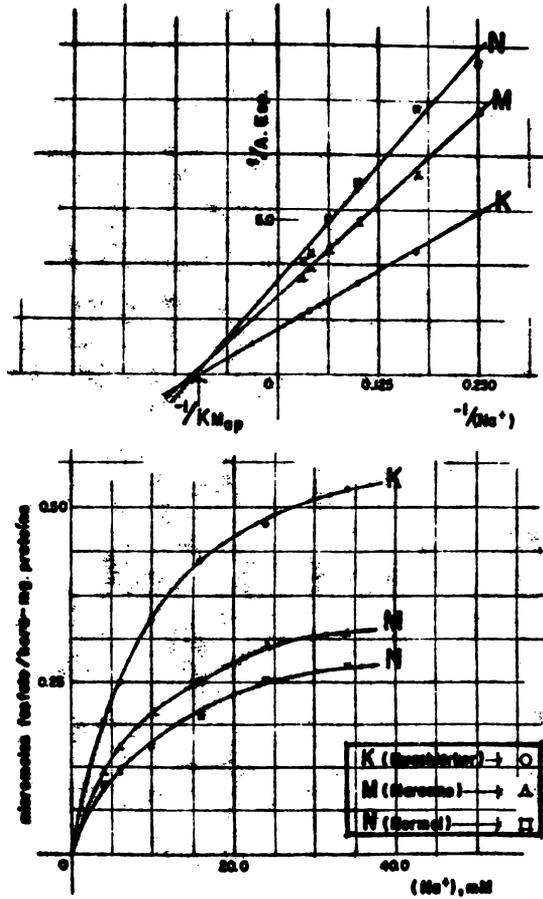


Fig. 21. Actividad de Na,K-ATPasa a concentraciones variables de NaCl. Casos individuales (Desnutridos no tratados).

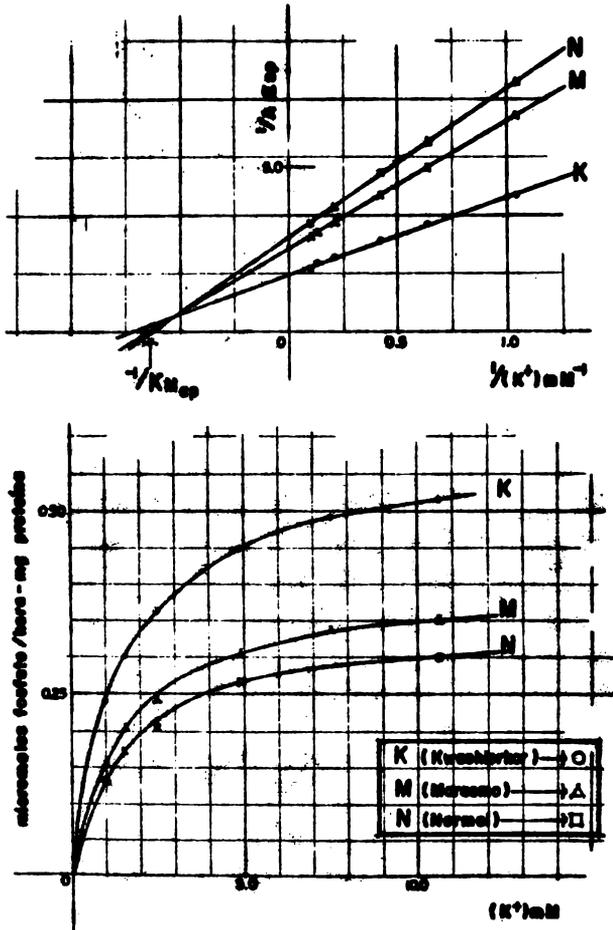


Fig. 22 Actividad de Na,K-ATPasa a concentraciones variables de KCl. Casos individuales (desnutridos no tratados).

**CUADRO 18.** Actividad de la Na,K-ATPasa de membranas de eritrocitos de desnutridos recuperados, medida a concentraciones variables de ATP.

Condición	N	Constantes cinéticas aparentes <sup>b</sup>	
		V <sub>max</sub> (micromol Pi/hr-mg)	K <sub>M</sub> (mM)
Marasmo	4	0.374 ± 0.014	0.440 ± 0.010
Kwashiorkor	4	0.378 ± 0.016	0.439 ± 0.015
Niños bien nutridos	7	0.381 ± 0.015	0.444 ± 0.009

a. Valores: Promedio ± e.e.m. N = número de pacientes.

b. Las constantes cinéticas aparentes se determinaron por el método de Lineweaver-Burk.

**CUADRO 19.** Actividad de la Na,K-ATPasa de membranas de eritrocitos de desnutridos recuperados, medida a concentraciones variables de NaCl.

Condición	N	Constantes cinéticas aparentes <sup>b</sup>	
		V <sub>max</sub> (micromol Pi/hr-mg)	K <sub>M</sub> (mM)
Marasmo	5	0.374 ± 0.011	10.8 ± 0.2
Kwashiorkor	6	0.405 ± 0.018	10.5 ± 0.3
Niños bien nutridos	6	0.385 ± 0.017	10.8 ± 0.3

a. Valores: Promedio ± e.e.m. N = número de pacientes.

b. Las constantes cinéticas aparentes fueron determinadas por el método de Lineweaver-Burk.

**CUADRO 20.** Actividad de la Na,K-ATPasa de membranas de eritrocitos de desnutridos recuperados, medida a concentraciones variables de KCl.

Condición	N	Constantes cinéticas aparentes <sup>b</sup>	
		V <sub>max</sub> (micromol Pi/hr-mg)	K <sub>M</sub> (mM)
Marasmo	5	0.356 ± 0.013	1.48 ± 0.06
Kwashiorkor	4	0.414 ± 0.014	1.45 ± 0.02
Niños bien nutridos	6	0.367 ± 0.011	1.48 ± 0.04

a. Valores: Promedio ± e.e.m. N = número de pacientes.

b. Las constantes cinéticas aparentes se determinaron por el método de Lineweaver-Burk.

**CUADRO 21.** Actividad de la Na,K-ATPasa de membranas de eritrocitos de desnutridos, medida en presencia y en ausencia de desoxicolato de sodio.

Condición	N	micromolas Pi/hr-mg. <sup>a</sup>		Actividad relativa promedio <sup>c</sup>
		Sin DOC	Con DOC <sup>b</sup>	
<b>A. Paciente no tratado:</b>				
Marasmo	9	0.408 ± 0.011	0.414 ± 0.016 <sup>d</sup>	1.02
Kwashiorkor	7	0.624 ± 0.022	0.626 ± 0.022 <sup>d</sup>	1.00
<b>B. Paciente recuperado:</b>				
Marasmo	6	0.333 ± 0.008	0.342 ± 0.012 <sup>d</sup>	1.03
Kwashiorkor	6	0.365 ± 0.016	0.364 ± 0.015 <sup>d</sup>	1.00

a. Valores: Promedio ± e.e.m. N = número de pacientes.

b. Desoxicolato de sodio (0.005 por ciento, p/V, final).

c. Actividad relativa promedio = actividad con DOC/actividad sin DOC.

d. p mayor que 0.10 (prueba de "D" para diferencias de promedios).

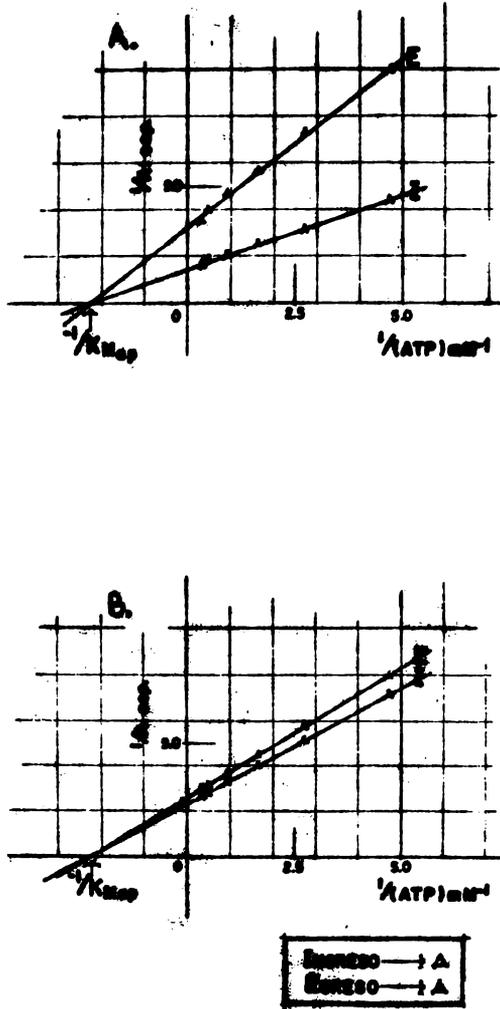


Fig. 23 Actividad de Na,K-ATPasa a concentraciones variables de ATP. Paciente no tratado vs. paciente recuperado,

A. Kwashiorkor

B. Marasmo

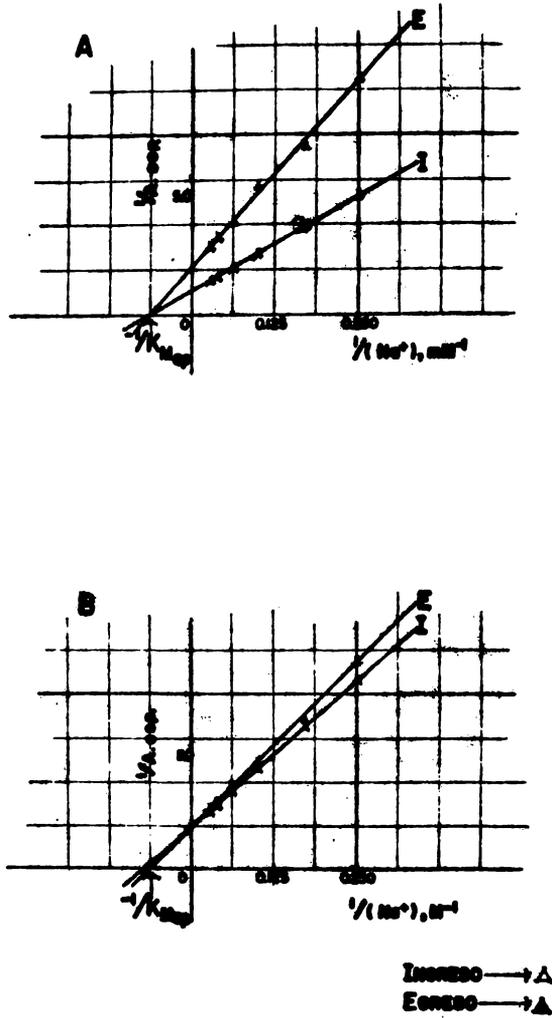


Fig. 24 Actividad de Na,K-ATPasa a concentraciones variables de NaCl, Paciente no tratado vs. paciente recuperado.

A. Kwashiorkor

B. Marasmo

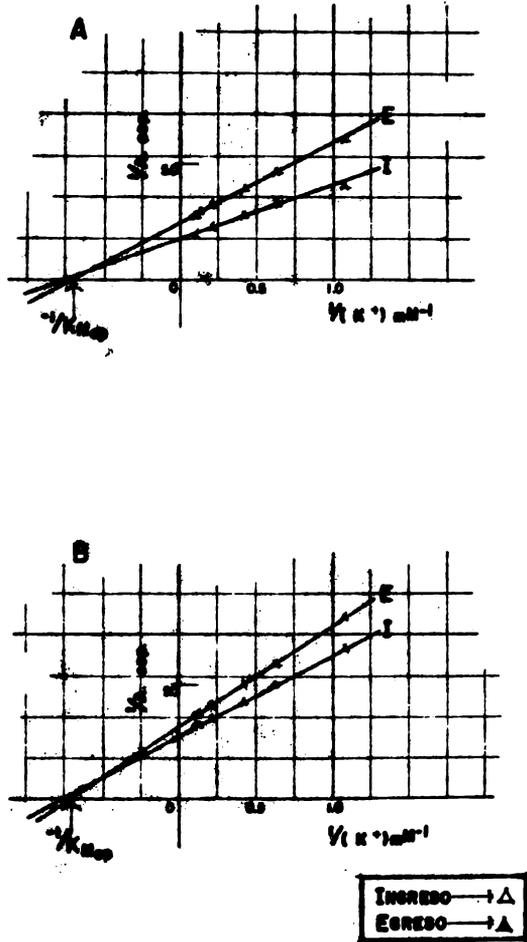


Fig. 25 Actividad de Na,K-ATPasa a concentraciones variables de KCl. Paciente no tratado vs. paciente recuperado.

A. Kwashiorkor

B. Marasmo

los tres componentes de la reacción (Cuadros 18-20). Este hecho se ilustra en las figuras 23, 24 y 25, que comparan las curvas de actividad de pacientes con marasmo y con kwashiorkor, obtenidas a su ingreso y al egreso del hospital, contra ATP, NaCl y KCl, respectivamente.

Previamente se había encontrado que al pretratar las membranas de eritrocitos con desoxicolato de sodio (0.005 por ciento, p/V), se lograba exponer un porcentaje adicional de actividad de la Na,K-ATPasa (Cuadro 9, Sección I). Cuando se pretrataron las membranas de eritrocitos de los pacientes desnutridos (no tratados y recuperados) con el detergente, la actividad de la Na,K-ATPasa observada en su presencia no difirió de la obtenida en ausencia del desoxicolato en ninguna de las condiciones clínicas estudiadas (Cuadro 21).

### DISCUSION

A. Na,K-ATPasa de membranas de eritrocitos y desnutrición energético- proteínica.

En los pacientes desnutridos graves no tratados se observó un aumento significativo de la actividad de membranas de eritrocitos (ensayo convencional), incremento que fue más ostensible en los niños con kwashiorkor, pero que también ocurrió en los afectados con marasmo (Cuadro 13). Este aumento de actividad en el ensayo convencional, también se reflejó en un incremento de la  $V_{max}$  calculada en los ensayos cinéticos contra ATP, NaCl y KCl, sin que se observara una variación significativa de las  $K_M$  aparentes para el substrato y los cationes activadores de la enzima (Cuadros 14, 15 y 16).

Estos resultados concuerdan, aparentemente, con la hipótesis que motivó la realización del presente trabajo: individuos que constitutivamente derrochan energía --resultado de incremento innato en la hidrólisis de ATP-- y que crecen en un ambiente de miseria, tendrían un riesgo mayor de verse a-

fectados por la desnutrición energético-proteínica. Una consecuencia de esta hipótesis sería el que índices de dicha hidrólisis de ATP, tal como la Na,K-ATPasa de membranas de eritrocitos, estarían aumentados en niños desnutridos en comparación con niños no desnutridos. Naturalmente, una concordancia de este tipo, si bien es necesaria en el caso de que la hipótesis sea correcta, está lejos de ser suficiente.

Con el objeto de discriminar si el incremento de la actividad de la Na,K-ATPasa de eritrocitos es un fenómeno asociado a la desnutrición, o es independiente de la misma, se repitieron los estudios en los pacientes recuperados clínicamente. La actividad de la Na,K-ATPasa de los niños inicialmente desnutridos y sometidos a tratamiento durante varias semanas, fue similar a la de niños bien nutridos: la diferencia entre ambos grupos desapareció (Cuadro 17). Asimismo, las  $V_{max}$  calculadas para ATP,  $Na^+$  y  $K^+$  de la enzima de eritrocitos de los pacientes tratados se volvieron semejantes a las de los bien nutridos, en tanto que las  $K_M$  correspondientes permanecieron inalterables (Cuadros 18, 19 y 20). Por lo tanto, estos datos descartan la hipótesis. La mayor hidrólisis de ATP observada, al menos la debida a la Na,K-ATPasa de membranas de eritrocitos, no es independiente, sino concomitante a la desnutrición, y desaparece al curarse la enfermedad. Así pues, no parece haber sido un factor predisponente ya que muy probablemente la actividad enzimática había sido normal en los eritrocitos de estos niños antes de que se iniciase el proceso de desnutrición.

No resulta fácil explicar los cambios de actividad enzimática observados en los niños desnutridos. Se puede descartar un enmascaramiento de la actividad de la Na,K-ATPasa, ya que en todas las condiciones clínicas estudiadas no se observaron diferencias de actividad entre las membranas que fueron pretratadas con desoxicolato de sodio y aquéllas que no lo fueron (Cuadro 21).

Un incremento de actividad de la Na,K-ATPasa de membra-

nas de eritrocitos como el observado en los niños desnutridos no tratados podría resultar de una disminución en el contenido proteínico de la membrana, ya que la actividad fue expresada por miligramo de proteína membranaral. En niños con kwashiorkor no tratados se ha descrito que la membrana de eritrocito tiene un 20 por ciento menos proteína que las membranas pertenecientes a niños bien nutridos (88). Sin embargo, aun corrigiendo por este factor la actividad enzimática que se observó en los pacientes con esta variedad de desnutrición (Cuadro 13), persiste una diferencia significativa con respecto a la actividad de la Na,K-ATPasa de los bien nutridos.

Otra posibilidad es que los niños desnutridos tengan en su sangre una mayor proporción de eritrocitos jóvenes, con un número mayor de unidades de Na,K-ATPasa por célula (89). De hecho, el número de sitios de unión para ouabaína tritiada, por eritrocito, es mayor en las células de pacientes con kwashiorkor que en las pertenecientes a niños marasmáticos y a niños bien nutridos (90).

Una de las características de la desnutrición energético-proteínica es la anemia (81). Entre los factores que contribuyen a su desarrollo se encuentran deficiencias de nutrimentos (por ejemplo, de hierro y de ácido fólico) y la infección crónica, la cual deprime la función hematopoyética (84). Por otra parte, se ha encontrado que los eritrocitos de niños con kwashiorkor no tratado tienen una vida media disminuida (84). A este respecto resulta interesante la hipótesis de Vertongen y cols (91), quienes proponen que este acortamiento de la vida media del eritrocito puede deberse, al menos parcialmente, a un proceso hemolítico oxidativo. Estos autores encontraron en eritrocitos de desnutridos no tratados un decremento significativo en las actividades de la peroxidasa de glutatión y de la dismutasa de superóxido (91). Ambas enzimas se encargan de reducir derivados activos del oxígeno, tales como el peróxido de hidrógeno y el ión superóxido, los cuales pueden dañar la membrana celular e interferir con la función acarrea

dora de oxígeno de la hemoglobina (91). Las deficiencias enzimáticas mencionadas pueden deberse a carencias nutricional, ya que la peroxidasa requiere selenio para su actividad, y la dismutasa contiene cobre y zinc (92). Cuando los desnutridos se recuperan, ambas actividades enzimáticas se normalizan (91). Por lo tanto, quizá las diferencias en la actividad de Na,K-ATPasa que se observaron en los dos estadios clínicos de los pacientes incluidos en este trabajo (paciente no tratado y paciente recuperado), resulten de una heterogeneidad en las poblaciones de eritrocitos. Se ha observado, por ejemplo, que los eritrocitos de desnutridos graves tienen mayor actividad de enzimas como la hexocinasa, la reductasa de glutatión y la deshidrogenasa de fosfogluconato (89, 91) y muestran una disminución de la fragilidad osmótica (93), características todas ellas de formas jóvenes de esta célula.

Las evidencias en contrario son las siguientes: en pacientes con kwashiorkor se ha encontrado una actividad normal de la acetilcolinesterasa de la membrana (94), enzima que es un índice confiable de la "edad" eritrocítica (93). Además, usualmente no hay reticulocitosis en los desnutridos no tratados (84, 89) y se ha descrito una resistencia de la médula ósea al estímulo de la eritropoyetina (89). Quizá esta controversia pueda resolverse empleando técnicas recientemente desarrolladas para separar poblaciones de eritrocitos; por ejemplo, un gradiente discontinuo de densidad con Percoll (partículas coloidales de sílice recubiertas con polivinilpirrolidona, 95). Se sabe que durante el envejecimiento, el eritrocito pierde agua y fragmentos de membrana, lo cual produce un decremento de volumen y un aumento de la densidad (96).

Otros factores que pudieran estar involucrados en el incremento de la actividad de la Na,K-ATPasa de membranas de eritrocitos de pacientes desnutridos, son los siguientes:

I. Alteraciones electrolíticas;

Quizá la causa más frecuente de activación de la Na,K-ATPasa sea el aumento de la concentración intracelular

del ión  $\text{Na}^+$  (80). Así, en algunos casos de anemia hemolítica hereditaria (por ejemplo, la esferocitosis), los eritrocitos son anormalmente permeables a este catión y muestran una actividad aumentada de la Na,K-ATPasa (97). Incluso, las alteraciones electrolíticas prolongadas, y muy especialmente, el aumento de concentración intracelular de  $\text{Na}^+$ , pueden estimular la síntesis de unidades de Na,K-ATPasa (80).

En la desnutrición energético-proteínica grave se ha encontrado una depleción de las reservas corporales de potasio, con un exceso relativo del sodio corporal (84). Sin embargo, los datos de la literatura referentes a las concentraciones intraeritrocitarias de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  en pacientes desnutridos, son contradictorios. En tanto que algunos encuentran un incremento de la concentración de  $\text{Na}^+$  en los eritrocitos de marasmáticos, con disminución del ión  $\text{K}^+$  en eritrocitos de pacientes con kwashiorkor (98), otros reportan un incremento en el potasio intraeritrocitario en esta variedad de desnutrición (89), con una disminución de la concentración de sodio.

## II. Moduladores endógenos de la actividad de la Na,K-ATPasa:

Los glucósidos cardiactivos, como la ouabaína y la digoxina, son inhibidores altamente específicos de la Na,K-ATPasa (35), y se ha postulado que quizá esta enzima sea el receptor farmacológico de tales sustancias (99). Ahora bien, el descubrimiento de ligandos endógenos para los receptores opiáceos ha estimulado la búsqueda de compuestos endógenos que actúen sobre los sitios de unión para ouabaína (100). Así, el plasma de batracios contiene un factor no caracterizado que compite con la ouabaína por su sitio de unión (Na,K-ATPasa) y presenta reacción cruzada con anticuerpos anti-digoxina (101), aunque no se ha encontrado una sustancia similar en el plasma de humano (100).

El órgano eléctrico de la anguila contiene sustancias que pueden inhibir la actividad de la Na,K-ATPasa, el transporte de rubidio hacia el interior celular y la unión de ouabaína tritiada a preparaciones puras de la enzima (102). Se encontró que el factor inhibitorio era una mezcla de ácidos grasos insaturados de cadena larga, entre los que destacaban por su actividad los ácidos linoléico

(18:2n-6) y araquidónico (20:4n-6), (102). En niños desnutridos peruanos las membranas de eritrocitos muestran una deficiencia de ácido araquidónico (más pronunciada en el kwashiorkor), en tanto que los eritrocitos de marasmáticos tienen un menor contenido de ácido linoléico (103), por lo que quizá conviniera reexaminar las alteraciones de actividad de la Na,K-ATPasa de los desnutridos del trabajo presente a la luz de estos hallazgos recientes.

El colesterol no esterificado puede inhibir la actividad de la Na,K-ATPasa de membranas de eritrocitos en las que se ha modificado el contenido de esta sustancia, mediante la incubación de eritrocitos intactos con vesículas de fosfatidilcolina que contienen concentraciones variables del estero<sup>l</sup> (104). Por otra parte, in vivo, la membrana del eritrocito participa en intercambios de colesterol no esterificado durante la transformación de las lipoproteínas plasmáticas (105), y, potencialmente, esta sustancia podría ser un regulador endógeno de la actividad de la Na,K-ATPasa de la membrana de eritrocito (104). Esto viene a colación porque generalmente los niños con kwashiorkor muestran hipocolesterolemia e hipolipoproteïnemia (84), hechos que tal vez sean relevantes en los cambios de actividad de la Na,K-ATPasa observados en los desnutridos.

### III. Vanadio:

El vanadio es uno de los micronutrientos esenciales para el funcionamiento normal del organismo (92). Está presente en todas las células, generalmente en forma de vanadato (106). Uno de los efectos más característicos de este ión es la inhibición de las fosfohidrolasas de ATP, entre las que se encuentra la Na,K-ATPasa (107), aunque también afecta a otras enzimas, tales como la fosfofructocinasa, la reductasa de 3-hidroximetil-glutaril-CoA y las fosfatasas ácida y alcalina (106).

La Na,K-ATPasa es el equivalente enzimático de la "bomba" de sodio de la membrana de las células intactas (15). El anión vanadato inhibe la actividad de la "bomba", aumentando la afinidad de la Na,K-ATPasa por el potasio extracelular, favoreciendo una conformación enzimática ( $E_2$ ) que dificulta su fosforilación inducida por sodio (107). En ausencia de vanadato, el potasio extracelular activa

la "bomba", en tanto que cuando el anión está presente, el efecto del potasio es inhibitorio (106).

Aunque no se conocen los efectos específicos de la deficiencia de vanadio en el hombre, la restricción de este elemento provoca un crecimiento subnormal en ratas (92). Por otra parte, en niños con kwashiorkor se ha encontrado una disminución del 40 por ciento en la concentración plasmática de vanadio (92), deficiencia que tal vez esté involucrada en las alteraciones de la actividad de la Na,K-ATPasa de la membrana de eritrocitos de niños desnutridos.

Los cambios observados en la actividad de la Na,K-ATPasa eritrocítica de pacientes desnutridos, no son privativos del glóbulo rojo ya que, en niños con kwashiorkor que fallecieron antes de mostrar signos de recuperación, se encontró un incremento en el eflujo de sodio de leucocitos (108). Además, en ratas sometidas a desnutrición experimental, se han descrito cambios en la actividad de la Na,K-ATPasa de preparaciones membranales de hígado, riñón y eritrocitos, mismos que, al parecer, dependieron del tipo de dieta empleada (109). Así, las ratas alimentadas con dieta hipoenérgica mostraron un incremento de la actividad enzimática de preparaciones de hígado y riñón, en tanto que la actividad de la Na,K-ATPasa de eritrocitos disminuyó con respecto a la observada en ratas que recibieron una dieta normal (109). En contraste, una dieta hipoproteínica se tradujo en un aumento de la actividad de la enzima de riñón y de eritrocitos, en tanto que no se modificó la actividad correspondiente a hígado (109). Estos hallazgos refuerzan la impresión de que las alteraciones de la actividad de la Na,K-ATPasa de eritrocitos de niños desnutridos son concomitantes a la desnutrición.

Ahora bien, los resultados del trabajo presente con cuerda parcialmente con los de Kaplay en la India (98),

quien encontró diferencias en la actividad de la Na,K-ATPasa eritrocítica entre niños con kwashiorkor y bien nutridos, aunque no entre éstos y pacientes con marasmo. Otra diferencia entre los resultados de Kaplay y los aquí presentados, es que dicho investigador observó un decremento significativo en la  $K_M$  aparente para  $Na^+$  en pacientes con kwashiorkor (110), alteración que nosotros no observamos. Estas discrepancias podrían deberse a los factores siguientes:

a. Metodológicos:

1. Preparación de membranas de eritrocitos:

En tanto que la solución empleada en este trabajo para lisar los eritrocitos, fue Tris 11.1 mM (20 miliosmolales/litro), pH 7.6, Kaplay utilizó Tris 5 mM (9 miliosmolales/litro) pH 8.0 (98). La osmolaridad de la solución empleada, especialmente cuando es menor de 10 miliosmolales/litro, puede alterar la composición de las membranas de eritrocitos (63) y exponer la actividad enzimática de manera no homogénea (55). Asimismo, un pH muy alcalino puede afectar la actividad de la Na,K-ATPasa (Fig. 13, Sección I).

2. Ensayo (convencional) de la actividad de la Na,K-ATPasa:

En la Sección I se mostró que a una suma constante  $Na^+ + K^+ = 120$  mM, las concentraciones de NaCl y KCl en el medio de reacción que producían una activación máxima de la enzima e ran de 105 y 15 mM, respectivamente (Fig. 7). En su ensayo, Kaplay emplea NaCl 140 mM y KCl 14 mM, concentraciones que para esa suma determinada de cationes ( $Na^+ + K^+ = 154$  mM), se en-

cuentran fuera del rango de actividad máxima de la Na,K-ATPasa (110).

### 3. Determinaciones cinéticas:

Para hacer la cinética aparente de la Na, K-ATPasa, Kaplay empleó la covariación de NaCl y KCl ( $\text{Na}^+ + \text{K}^+ = 154 \text{ mM}$ ) (110), y encontró que la  $K_M$  aparente para sodio estaba significativamente disminuida en los pacientes con kwashiorkor comparados con los marasmáticos, diferencia no observada en el presente trabajo (Cuadro 19). Esta discrepancia podría deberse a que la cinética aparente de la Na,K-ATPasa de nuestros pacientes contra el ión  $\text{Na}^+$ , se estudió empleando concentraciones crecientes de NaCl en un medio de reacción que contenía una concentración fija de KCl (15 mM), y en el que la molaridad final (163 mM) se mantuvo añadiendo Tris, pH 7.5. En otras palabras, se covariaron los cationes  $\text{Na}^+$  y  $\text{Tris}^+$ . Como el Tris ejerce un efecto directo sobre la Na,K-ATPasa (74), bajo las condiciones experimentales empleadas por nosotros, no se puede descartar que haya una alteración en la  $K_M$  aparentes para  $\text{Na}^+$  de la Na,K-ATPasa de eritrocitos de pacientes con kwashiorkor y que esta alteración sea responsable, al menos parcialmente, del incremento observado en la actividad de la enzima de estos pacientes.

#### b. Etnicos:

En grupos humanos de origen étnico diverso se han encontrado diferencias en la actividad de la Na,K-ATPasa de membranas de eritrocitos (111,112), siendo éste otro factor que se debe tomar en cuenta al comparar los resultados obtenidos por Kaplay en

la India (98,110) y los encontrados con niños mexi-  
canos.

c. Nutriológicos:

La Na,K-ATPasa es una enzima que se encuentra en la membrana plasmática (15), y sus propiedades pueden ser alteradas por cambios en la composición de la matriz lípida que la rodea (113). Por otra parte, la desnutrición afecta a todas las células del organismo, entre ellas a los eritrocitos (84). Por ejemplo, en niños desnutridos graves se ha encontrado que las membranas de eritrocitos contienen menos ácido linoléico y ácido araquidónico que las correspondientes a niños bien nutridos (103), y en niños con kwashiorkor se ha observado una dis-minución del cociente colesterol/fosfolípidos en las membranas de sus eritrocitos (93).

B. Actividad de la Na,K-ATPasa y obesidad.

Aunque otros grupos de investigación (114,115) han confirmado el hallazgo de una disminución en la actividad de la Na,K-ATPasa de eritrocitos de humanos obesos (24), existen co-municaciones en contrario (111,116). Además, en preparaciones de hígado obtenidas por biopsia de individuos obesos, la actividad de la Na,K-ATPasa no difirió de la correspondiente a los sujetos delgados (117), lo que contradice uno de los su-puestos de la hipótesis de De Luise y cols. (24): que la dis-minución de la actividad de la Na,K-ATPasa de individuos obesos fuese generalizada.

La proposición de que la Na,K-ATPasa pueda desempeñar un papel relevante en la patogenia de la obesidad ha perdido adeptos, a la luz de evidencias recientes. Al parecer, el de-fecto termogénico del ratón ob/ob se debe a una alteración en el funcionamiento del tejido adiposo pardo (118), cuyas mitocondrias permiten normalmente la disipación de grandes cantidades de energía en forma de calor ya que poseen una vía de

"escape" o "conductancia" de protones (119). Actualmente, a la  $\text{Na,K-ATPasa}$  se le atribuye un papel menor en el gasto energético corporal (120).

A pesar de que los cambios de actividad de la  $\text{Na,K-ATPasa}$  tienen una importancia fisiológica discutible, han servido para discriminar entre dos formas de obesidad en humanos adolescentes. Así, la obesidad idiopática, que se inicia a edad temprana, se asocia a una actividad disminuida de la  $\text{Na,K-ATPasa}$  de eritrocitos, en tanto que aquella obesidad que es imputable a lesiones hipotalámicas adquiridas se asocia a una actividad normal de la enzima (121). De la misma manera, se puede pensar que la actividad notablemente aumentada de la  $\text{Na,K-ATPasa}$  eritrocítica de pacientes con kwashiorkor es otra característica clínica de esta variedad de desnutrición, en razón de la concordancia de nuestro hallazgo con otras comunicaciones independientes (98,89).

### CONCLUSIONES

1. El incremento en la actividad de la  $\text{Na,K-ATPasa}$  de membranas de eritrocitos, observado en los niños desnutridos no tratados y que fue particularmente ostensible en los pacientes con kwashiorkor, no parece ser un fenómeno independiente de la desnutrición, sino concomitante a ella ya que desaparece al curar la enfermedad.
2. Las limitaciones del método utilizado (esto es, el empleo de Tris) no permiten descartar que en el aumento de la actividad de la  $\text{Na,K-ATPasa}$  eritrocítica de los desnutridos no tratados, esté involucrada una alteración de la  $K_M$  para  $\text{Na}^+$ .
3. Si bien los datos presentados descartan la hipótesis que motivó la realización de este trabajo, ello no invalida la proposición de que existan diferencias genéticamente determinadas en el manejo de la energía corporal que puedan modificar el riesgo a enfermedades como la obesidad y la desnutrición.

### RESUMEN

En algunos tejidos del ratón ob/ob, así como en eritrocitos de humanos obesos, se ha encontrado una disminución del número de unidades y de la actividad de la adenosintrifosfatasa dependiente de sodio y de potasio (Na,K-ATPasa), equivalente enzimático de la "bomba" de sodio presente en la membrana de todas las células. En opinión de algunos, el gasto energético asociado a la operación de la "bomba" puede contribuir significativamente a la termogénesis corporal, por lo que un decremento en la actividad de la Na,K-ATPasa pudiera estar involucrado en la predisposición de algunos individuos a la obesidad. Del mismo modo, un sujeto más eficiente en la conservación de energía por poseer una "bomba" de sodio menos activa, resistiría mejor los efectos de una dieta hipocalórica que aquél cuya "bomba" de sodio fuese más activa. Así, este individuo sería más lábil en un ambiente carencial, hecho que tal vez se manifestaría en una forma más grave de desnutrición. Si la Na,K-ATPasa estuviese involucrada en la susceptibilidad a esta enfermedad se podría esperar que estuviese aumentada su actividad en aquellos sujetos con formas graves de desnutrición, y que este incremento de actividad fuese independiente del estado de nutrición del individuo. Para explorar esta posibilidad, se midieron la actividad y las constantes cinéticas aparentes de la Na,K-ATPasa eritrocítica en un grupo de niños con variedades graves de desnutrición energético-proteínica, antes y después de recibir tratamiento.

Como paso previo al estudio de los niños desnutridos, se determinaron las condiciones para preparar las membranas de eritrocitos, así como para ensayar la actividad de la Na,K-ATPasa (ATPasa sensible a ouabaina) y determinar sus constantes cinéticas aparentes para ATP, Na<sup>+</sup> y K<sup>+</sup>.

En los niños desnutridos no tratados se observó un in-

cremento significativo de la actividad de la Na,K-ATPasa eritrocítica, con respecto a la correspondiente a los niños bien nutridos. En los estudios cinéticos, este aumento de la actividad enzimática, más notorio en los pacientes con kwashiorkor, se vio reflejado en un aumento de la  $V_{max}$  de la enzima, sin alteración de las  $K_M$  aparentes para ATP,  $Na^+$  y  $K^+$ . Una vez recuperados los pacientes, se repitieron los estudios, observándose que la actividad de la Na,K-ATPasa había disminuido a niveles similares a los encontrados en los sujetos sanos. Estos resultados sugieren que el incremento de actividad de la Na,K-ATPasa de membranas de eritrocitos de niños desnutridos es una respuesta a los cambios metabólicos propios de la desnutrición, y no una característica permanente del individuo que lo hace más susceptible a esta enfermedad.

BIBLIOGRAFIA

1. Neel, J.V.; Genetics and Nutrition: an evolutionary perspective. En: Genetic factors in Nutrition (Velázquez, A.; Bourges, H. y Pérez Montfort, I., eds.), Academic Press, Nueva York, 1984. p. 3-16.
2. Davidson, S.; Passmore, R.; Brock, J.F. y Turswell, A.S.: Human Nutrition and Dietetics, 7a ed., Churchill Livingstone, Edinburgh, 1979. pp 1-80.
3. Ward, R.H.: Genetic Epidemiology. En: Genetic factors in Nutrition (Velázquez, A.; Bourges, H. y Pérez Montfort, I., eds.), Academic Press, Nueva York, 1984. pp 37-52.
4. Neel, J.V.: Diabetes mellitus: a "thrifty" genotype rendered detrimental by "progress"? Am. J. Hum. Genet. 14:353-362, 1962.
5. Bray, G.A.: The inheritance of corpulence. En: The body weight regulatory system: normal and disturbed mechanisms (Cioffi, L.A.; James, W.P.T. y Van Itallie, T.B., eds.), Raven Press, Nueva York, 1981, pp. 185-195.
6. James, W.P.T. y Trayhurn, P.: An integrated view of the metabolic and genetic basis for obesity. Lancet 2: 770-773, 1976.
7. Sims, E.A.H.; Danforth, Jr., E.; Horton, E.S.; Bray, G.A.; Glennon, J.A. y Salans, L.B.: Endocrine and metabolic effects of experimental obesity in man. Recent Prog. Horm. Res. 29:457-496, 1973.
8. Danforth, Jr., E.; Harris, R.B.S.; Hervey, G.R. y Tobin, G.: Hormonal control of thermogenesis. En: The body weight regulatory system: normal and disturbed mechanisms (Cioffi, L.A.; James, W.P.T. y Van

- Itallie, eds.), Raven Press, Nueva York, 1981.  
p. 107-114.
9. Bray, G.A. y York, D.A.: Genetically transmitted obesity in rodents. *Physiol. Rev.* 51:598-646, 1971.
  10. Coleman, D.L.: Metabolic efficiency in mutant mice. En: Genetic factors in Nutrition (Velázquez, A.; Bourges, H. y Pérez Montfort, I. eds.), Academic Press, 1984. pp. 329-337.
  11. Garby, L.: Energy balance and obesity. En: Genetic factors in Nutrition (Velázquez, A.; Bourges, H. y Pérez Montfort, I., eds.), Academic Press, Nueva York, 1984. pp. 329 a 328.
  12. Romsos, D.R.: Alterations in  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase in obese animal models. En: Nutritional factors: modulating effects on metabolic processes (Beers, Jr., R.F. y Bassett, E.G., eds.), Raven Press, Nueva York, 1981. pp. 115-122.
  13. Thurlby, P.L. y Trayhurn, P.: The role of thermoregulatory thermogenesis in the development of obesity in genetically obese (ob/ob) mice pair-fed with lean siblings. *Br. J. Nutr.* 42: 377-385, 1979.
  14. Bray, G.A. y York, D.A.: Hypothalamic and genetic obesity in experimental animals: an autonomic and endocrine hypothesis. *Physiol. Rev.* 59:719-809, 1979.
  15. Sweadner, K.J. y Goldin, S.M.: Active transport of sodium and potassium ions: mechanism, function and regulation. *N. Engl. J. Med.* 302:777-783, 1980.
  16. Folke, M. y Sestoft, L.: Thyroid calorogenesis in isolated perfused rat liver: minor role of active sodium-potassium transport. *J. Physiol. (Lond)*

269:407-419, 1977.

17. Smith, T.J. y Edelman, I.S.: the role of sodium transport in thyroide thermogenesis. Fed. Proc. 38:2150-2153, 1979.
18. York, D.A.; Bray, G.A. y Yukimura, Y.: An enzymatic defect in the obese (ob/ob) mouse; loss of thyroid induced sodium and potassium-dependent adenosine triphosphatase. Proc. Natl. Adad. Sci. U.S.A. 75: 477-481, 1978.
19. Lin, M.H.; Vander Tuig, J.G.; Romson, D.R.; Akera, T. y Leveille, G.A.:  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase enzyme units in lean and obese (ob/ob) thyroxine injected mice. Am. J. Physiol. 237:E265-272, 1979.
20. Ohtake, M.; Bray, G.A. y Azukizawa, M.: Studies in hypothermia and thyroid function in the obese (ob/ob) mouse. Am. J. Physiol. 233:R110-115, 1977.
21. Guernsey, D.L. y Stevens, E.D.: The cell membrane sodium pump as a mechanism for increasing thermogenesis during cold acclimation in rats. Science 196:908-910, 1977.
22. Lin, M.H.; Vander Tuig, J.G.; Romsos, D.R.; Akera, T. y Leveille, G.A.: Heat production and  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase enzyme units in lean and obese (ob/ob) mice. Am. J. Physiol. 238:E193-199, 1980.
23. Himms Hagen, J.: Cellular thermogenesis. Annu. Rev. Physiol. 38:315-351, 1976.
24. De Luise, M.; Blackburn, G.L. y Flier, J.S.: Reduced activity of the red-cell sodium-potassium pump in human obesity. N. Engl. J. Med, 303:1017-1022, 1980.
25. Gelbart, A. y Goldman, R.H.: Correlation between microsomal ( $\text{Na}^+$  +  $\text{K}^+$ )-ATPase activity and ( $^3\text{H}$ ) ouabain bindign in heart tissue homogenates.

- Biochim. Biophys. Acta. 481:689-694, 1977.
26. Beaugé, L. y Adragne, N.: The kinetics of ouabain inhibition and partition of rubidium influx in human red blood cells. *J. Gen. Physiol.* 57:576-592, 1971.
  27. Skou, J.C.: The influence of some cations on an adenosine triphosphatase from peripheral nerves. *Biochim. Biophys. Acta.* 23:394-401, 1957.
  28. Ahmed, K.:  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase. En: *Advanced Cell Biology* (Schwartz, L.M. y Azar, M.M., eds.), 1a ed., Van Nostrand Reinhold, Nueva York, 1981. pp. 433-440.
  29. Post, R.L. y Kume, S.: Evidence for an aspartyl phosphate residue at the active site of sodium and potassium ion transport adenosine triphosphatase. *J. Biol. Chem.* 248:6993-7000, 1973.
  30. Ruoho, A. y Kyte, J.: Photoaffinity labeling of the ouabain binding site on  $\text{Na}^+$  +  $\text{K}^+$  adenosine triphosphatase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 71: 2352-2356, 1974.
  31. De Pont, J.J.H.H.M.: Reversible inactivation of ( $\text{Na}^+$  +  $\text{K}^+$ )-ATPase by use of a cleavable bifunctional agent. *Biochim. Biophys. Acta.* 567:247-256, 1979.
  32. Giotta, G.G.: Quaternary structure of ( $\text{Na}^+$  +  $\text{K}^+$ )-dependent adenosine triphosphatase. *J. Biol. Chem.* 251:1247-1252, 1976.
  33. Wallick, E.T.; Lane, L.K. y Schwartz, A.: Biochemical mechanism of the sodium pump. *Annu. Rev. Physiol.* 41:397-411, 1979.
  34. Craig, W.S.: Monomer of sodium and potassium ion activated adenosinetriphosphatase displays complete enzymatic function. *Biochemistry* 21: 5707-5717, 1982.

35. Schuurmans Stekhoven, F. y Bonting, S.L.: Transport adenosine triphosphatases: properties and functions. *Physiol. Rev.* 61:1-76, 1981.
36. Robinson, J.D.: Differences between CTP and ATP as substrates for the (Na + K)-ATPase. *Arch. Biochem. Biophys.* 213:650-657, 1982.
37. Matsui, H. y Schwartz, A.: Purification and properties of a highly active ouabain-sensitive Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-dependent adenosine-triphosphatase from cardiac tissue. *Biochim. Biophys. Acta.* 128:380-390, 1966.
38. Robinson, J.D.: Substrate sites of the (Na<sup>+</sup>+K<sup>+</sup>)-dependent ATPase. *Biochim. Biophys. Acta* 429: 1006-1019, 1976.
39. Skou, J.C.: Effects of ATP on the intermediary steps of the reaction of the (Na<sup>+</sup>+K<sup>+</sup>)-dependent enzyme system. I. Studied by the use of N-ethylmaleimide inhibition as a tool. *Biochim. Biophys. Acta* 429: 1006-1019, 1976.
40. Albers, R.W.: Biochemical aspects of active transport. *Annu. Rev. Biochem.* 36: 727-756, 1967.
41. Post, R.L.; Kume, S.; Tobin, T.; Orcutt, B. y Sen, A.K.: Flexibility of an active center in sodium-plus-potassium adenosine triphosphatase. *J. Gen. Physiol.* 54: 306s-326s, 1969.
42. De Pont, J.J.H.H.M.; Van Prooyen-Van Eeden, A. y S.L. Bonting: An essential arginine residue in the ATP-binding centre of (Na<sup>+</sup>+K<sup>+</sup>)-ATPase. *Biochim. Biophys. Acta* 482:213-227, 1977.
43. Cantley, L.C., Jr.; Gelles, J. y Josephson, L.: Reaction of the (Na-K)ATPase with 7-chloro-4-nitro-2-oxa-1,3-diazole: evidence for an essential tyrosine at the active site. *Biochemistry* 17:418-425, 1978.

44. Hegyvary, C. y Post, R.L.: Binding of adenosine triphosphate to sodium and potassium ion-stimulated adenosine triphosphatase. *J. Biol. Chem.* 246:5234-5240, 1971.
45. Nørby, J.G. y Jensen, J.: Binding of ATP to brain microsomal ATPase. Determination of the ATP binding capacity and the dissociation of the enzyme-ATP complex as a function of  $K^+$  concentration. *Biochim. Biophys. Acta* 233:104-116, 1971.
46. Skou, J.C.: Effect of ATP on the intermediary steps of the reaction of the  $(Na^+ + K^+)$ -dependent enzyme system. II. Effect of a variation in the  $ATP/Mg^{++}$  ratio. *Biochim. Biophys. Acta* 339:246-257, 1974.
47. Siegel, G.J. y Albers, R.W.: Sodium-potassium activated adenosine triphosphatase of Electrophorus electric organ. IV. Modification of responses to sodium and potassium by arsenite plus 2,3-dimercaptopropanol. *J. Biol. Chem.* 242:4972-4979, 1967.
48. Nagai, K. Linenmayer, G.E. y Schwartz, A.: Direct evidence for the conformational nature of the  $Na^+$ ,  $K^+$ -ATPase system: fluorescence and circular dichroism studies. *Arch. Biochem. Biophys.* 139: 252-254, 1970.
49. Jørgensen, P.L.; Skriver, E.; Hebert, H. y Maunsback, A.B.: Structure of the Na,K pump: cristallization of pure membrane bound Na,K-ATPase and identification of functional domains of the alpha-subunit. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 402:207-225, 1982.
50. Schuurmans-Stekhoven, F.M.A.H. y Bonting, S.L.: Sodium-potassium-activated adenosinetriphosphatase. En: Membrane transport (Bonting, S.L. y J.J.H.,H.M. de Pont, eds.). *New Comprehensive Biology*, vol. 2, Elsevier-North Holland Biomedical Press, Nueva York, 1981. p. 159-182.

51. Schwartz, A.; Whitmer, K.; Grupp, G.; Grupp, I; Adams, R.J. y Lee, S-W.: Mechanism of action of digitails: is the Na,K-ATPase the pharmacological receptor? Ann. N.Y. Acad. Sci. 402:253-271, 1982.
52. Van Winkle, W.B.; Allen, J.C. y Schwartz, A.: The nature of the transport ATPase-Digitails complex: III. Rapid binding studies and effects of ligands on the formation and stability of magnesium plus phosphate-induced glycoside-enzyme complex. Arch. Biochem. Biophys. 151:85-92, 1972.
53. Söderling, E.; Le Bell, Y.; Laikko, I. y Larmas, M.: Conditions for assay of ATPase from biological materials using a bioluminescence technique. Clin. Chim. Acta 111:33-37, 1981.
54. Serpersu, E. y Ciliv, G.: Some properties of  $(Na^+K^+)$ -dependent adenosinetriphosphatase from human erythrocytes. Biochem. Med. 20:31-39, 1978.
55. Bramley, T.A.; Coleman, R. y Finean, J.B.: Chemical, enzymological and permeability properties of human erythrocyte ghosts prepared by hypotonic lysis in media of different osmolarities. Biochim. Biophys. Acta 241:752-769, 1971.
56. Hanahan, D.J. y Ekholm, J.E.: The preparation of red cell ghosts (membranes). Methods in Enzymology, vol. 31, Academic Press, Nueva York, 1974. p 168-172.
57. Ames, B.N.: Assay of inorganic phosphate, total phosphate and phosphatases. Methods in Enzymology, vol. 8, Academic Press, Nueva York, 1966. p 115-117.
58. Bonting, S.L.; Simon, K.A. y Hawkins, N.M.: Studies on sodium-potassium-activated adenosine triphosphatase. 1. Quantitative distribution in several tissues of the cat. Arch. Biochem. Biophys. 95:416-425, 1961.

59. Oyama, V.I. y Eagle, H.: Measurement of cell growth in tissue culture with phenol reagent (Folin-Ciocalteu). Proc. Soc. Exptl. Biol. Med, 91: 305-307, 1956.
60. Lowry, O.H.; Rosebrough, N.J.; Farr, A.L. y Randall, R.J.: Protein measurement with the Folin-phenol reagent. J. Biol. Chem, 193:265-275, 1951.
61. Segel, I.H.: Enzyme Kinetics (Behavior and analysis of rapid equilibrium and steady-state enzyme systems), 1a ed., Wiley-Interscience, Nueva York, 1975.
62. Sokal, R.R. y Rohlf, F.J.: Biometry, 2a ed., Freeman, W.H., San Francisco, 1981. p 128-177.
63. Dodge, J.T.; Mitchell, C. y Hanahan, D.J.: The preparation and chemical characteristics of hemoglobin-free ghosts of human erythrocytes. Arch. Biochem. Biophys. 100:119-130, 1963.
64. Clark, J.M., Jr. y Switzer, R.L.: Experimental Biochemistry, 2a. ed., Freeman, W.H., San Francisco, 1977. pp. 159-164.
65. Marchesi, V.T. y Palade, G.E.: The localization of Mg-Na-K-activated adenosine triphosphatase on red cell ghost membranes. J. Cell. Biol. 35:385-403, 1967.
66. Priestland, R.N. y Whittam, R.: The influence of external sodium ions on the sodium pump in erythrocytes. Biochem. J. 109:369-374, 1968.
67. Dunham, E.T. y Glynn, I.M.: Adenosinetriphosphatase activity and the active movements of alkali metal ions. J. Physiol. (London) 156:274-293, 1961.
68. Sengupta, N.; Datta, S.C. y Sengupta, D.: Altered kinetics of membrane ATPase in mental illness. Biochem. Med. 26:277-285, 1981.

69. Igisu, H. y Mawatari, S.; Effect of propranolol on ATP in human erythrocytes --comparison with ouabain. *Biochem. Med.* 23:70-75, 1980.
70. Schrier, S.L.; Giberman, E. y Katchalski, E.; Variability in ouabain-induced inhibition of human erythrocyte membrane ( $\text{Na}^+ + \text{K}^+$ )-ATPase. *Biochim. Biophys. Acta* 183:397-400, 1969.
71. Reinila, M.; MacDonald, E.; Salem, N., Jr.; Linnoila, M. y Trans, E.G.; Standardized method for the determination of human erythrocyte membrane adenosinetriphosphatases.
72. Schmalzing, G.; Pfaff, E. y Breyer-Pfaff, U.; Red cell ouabain binding sites,  $\text{Na}^+ \text{K}^+$ -ATPase, and intracellular  $\text{Na}^+$  as individual characteristics. *Life Sci.* 29: 371-381, 1981.
73. Emmelot, P. y Bos, C.J.; Studies on plasma membranes. V. On the lipid dependence of some phosphohydrolases of isolated rat-liver plasma membranes. *Biochim. Biophys. Acta* 150:341-353, 1968.
74. Skou, J.C.; The ( $\text{Na}^+ + \text{K}^+$ )-ATPase: Coupling of the reaction with ATP to the reaction with  $\text{Na}^+$  and  $\text{K}^+$ . *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 402:169-184, 1982.
75. Taniguchi, K. y Post, R.L.; Synthesis of adenosine triphosphate and exchange between inorganic phosphate and adenosine triphosphate in sodium and potassium ion transport adenosine triphosphatase. *J. Biol. Chem.* 250:3010-3018, 1975.
76. Robinson, J.D.; Nucleotide and divalent cation interactions with the ( $\text{Na}^+ + \text{K}^+$ )-dependent ATPase. *Biochim. Biophys. Acta* 341:232-247, 1974.
77. Godfraind, T.; De Fover, A. y Verbeke, N.; Influence of pH and sodium on the inhibition of guinea-pig heart ( $\text{Na}^+ + \text{K}^+$ )-ATPase by calcium. *Biochim. Biophys. Acta*

481:202-211, 1977.

78. Rempeters, G. y Schoner, W.: Imidazole chloride and Tris-chloride substitute for sodium chloride in inducing high-affinity AdoPP(NH)P binding to  $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase. *Biochim. Biophys. Acta* 727:13-21, 1983.
79. Skou, J. C.: Effects of ATP on the intermediary steps of the reaction of the  $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase. IV. Effect of ATP on  $K_{0.5}$  for  $\text{Na}^+$  and on hydrolysis at different pH and temperature. *Biochim. Biophys. Acta* 567:421-435, 1979.
80. Trachenberg, M.C.; Packey, D.J. y Sweeney, T.: In vivo functioning of the  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -activated ATPase. *Curr. Topics Cell. Regul.* 19:159-217, 1981.
81. Luengas, J. y Valenzuela, R.H.: Desnutrición. Kwashiorkor. Marasmo. En: Valenzuela, R.H.; Luengas, J. y Marquet, S.L.: *Manual de Pediatría*, 8a ed., Interamericana, México, 1970. pp. 233-251.
82. Ramos Galván, R.; Mariscal, A.C.; Viniegra, C.A. y Pérez Ortiz, B.: Desnutrición en el niño. Ed. Hosp. Inf., México, 1969.
83. Caliendo, M.A.: Nutrition and the world food crisis. Macmillan, Nueva York, 1979. pp. 6-30.
84. Alleyne, G.A.O.; Hay, R.W.; Picou, D.I.; Stanfield, J.P. y Whitehead, R.G.: Protein-energy malnutrition, 1a ed., E. Arnold, Londres, 1977.
85. Coward, W.A. y Lunn, P.G.: The biochemistry and physiology of kwashiorkor and marasmus. *Br. Med. Bull.* 31: 19-24, 1981.
86. Lunn, P.G.; Whitehead, R.G.; Cole, T.J. y Austin, S.: The relationship between hormonal balance and growth in malnourished children and rats. *Br. J. Nutr.* 41:73-84, 1979.

87. Gardner, L.I.: Endocrine aspects of undernutrition; Protein-calorie malnutrition, psychosocial deprivation and anorexia nervosa. En: Endocrine and genetic diseases of childhood and adolescence (L.I. Gardner, ed.), 2a ed., Saunders, Filadelfia, 1975, pp. 1174-1180.
88. Kaplay, S.S.: Erythrocyte ion transport in protein-energy malnutrition. Am. J. Clin. Nutr, 32:722-723, 1979.
89. Mandelbaum, I.M.; Mozes, N. y Fondu, P.: Erythrocyte glycolysis in protein-energy malnutrition. Clin. Chim. Acta 124:263-275, 1982.
90. Narayanareddy, K, y Kaplay, S.S.: (<sup>3</sup>H) Ouabain binding to human erythrocytes in protein-energy malnutrition. 122:271-277, 1982.
91. Vertongen, F.; Heyder-Bruckner, C; Fondu, P. y Mandelbaum, I.: Oxidative haemolysis in protein malnutrition. Clin. Chim. Acta 116:217-222, 1981.
92. Golden, M.H.N. y Golden, B.E.: Trace elements. Potential importance in human nutrition with particular reference to zinc and vanadium. Br. Med. Bull. 37: 31-36, 1981.
93. Ramanadhan, M. y Kaplay, S.S.: Erythrocyte osmotic fragility in protein-energy malnutrition: Cholesterol, phospholipid, and Ca<sup>++</sup>, Mg<sup>++</sup> adenosine triphosphatase. Biochem. Med. 27:226-231, 1982.
94. Kaplay, S.S.: Lack of association between human erythrocyte membrane acetylcholinesterase and osmotic fragility. Biochem. Med, 19:229-304, 1978.
95. Salvo, G.; Caprari, P.; Samoggia, P.; Mariani, G. y Salvati, A.N.: Human erythrocyte separation according to age on a discontinuous "Percoll" density gradient. Clin. Chim. Acta 122:293-300, 1982.

96. Linderkamp, O.; Wu, P.Y.K. y Meiselman, H.J. :  
Deformability of density separated red blood cells  
in normal newborn infants and adults. *Pediatr. Res.*  
16:964-968, 1982.
97. Parker, J.C. y Berkowitz, L.R. : Physiologically  
instructive genetic variants involving the human  
red cell membrane. *Physiol. Rev.* 63:261-313, 1983.
98. Kaplay, S.S. : Erythrocyte membrane  $\text{Na}^+$  and  $\text{K}^+$  activated  
adenosine-triphosphatase in protein-calorie  
malnutrition. *Am. J. Clin. Nutr.* 31:579-584, 1978.
99. Akera, T. : Membrane adenosinetriphosphatase: a digitalis  
receptor? *Science* 198:569-574, 1977.
100. Akera, T. y Brody, T.M. : Myocardial membranes:  
regulation and function of the sodium pump. *Annu.*  
*Rev. Physiol.* 44:375-388, 1982.
101. Flier, J.S.; Maratos-Flier, E.; Pallotta, J.A. y  
McIssac: Endogenous digitalis-like activity in the  
plasma of the toad *Buffo marinus*. *Nature (London)*  
279:341-343, 1979.
102. Bidard, J.N.; Rossi, B.; Renaud, J.F. y Lazdunski, M. :  
A search for an "ouabain-like"-substance from the  
electric organ of *Electrophorus electricus* which  
led to arachidonic acid and related fatty acids.  
*Biochim. Biophys. Acta* 769:245-252, 1984.
103. Wolff, J.A.; Margolis, S.; Bujdoso-Wolff, K.; Matusick,  
E. y MacLean, W.C., Jr. : Plasma and red blood cell  
fatty acid composition in children with protein-  
calorie malnutrition. *Pediatr. Res.* 18:162-167,  
1984,
104. Yeagle, P.L. : Cholesterol modulation of  $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -  
ATPase ATP hydrolysing activity in the human  
erythrocyte. *Biochim. Biophys. Acta* 727:39-44,  
1983.

105. Myant, N.B.: The biology of cholesterol and related steroids. 1a ed., Heinemann Medical Books, Londres, 1981. pp. 547-560.
106. Ramasarma, T. y Crane, F.L.: Does vanadium play a role in cellular regulation? *Curr. Topics Cell. Regul.* 20:247-301, 1981.
107. Grantham, J.J.: The renal sodium pump and vanadate. *Am. J. Physiol.* 239:F97-F106, 1980.
108. Patrick, J.: Death during recovery from severe malnutrition and its possible relationship to sodium pump activity in the leucocyte. *Br. Med. J.* 1:1051-1054, 1977.
109. Pimplikar, S.W. y Kaplay, S.S.: Kidney, liver and erythrocyte membrane Na,K-adenosine triphosphatase in protein-energy malnourished rats. *Biochem. Med.* 26:12-19, 1981.
110. Kaplay, S.S.: Modified kinetics of erythrocyte membrane Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> adenosine triphosphatase in protein-energy malnutrition. *Biochem. Med.* 22: 282-287, 1979.
111. Beutler, E.; Kuhl, W. y Sacks, P.: Sodium-potassium-ATPase activity is influenced by ethnic origin and not by obesity. *N. Engl. J. Med.* 309:756-760, 1983.
112. Lijnen, P.; M'Buyamba-Kabangu, J.R.; Fagard, R.; Staessen, J. y Amery, A.: Carta al editor. *N. Engl. J. Med.* 310:1390, 1984.
113. Kimelberg, H.K. y Papahadjopoulos, D.: Effects of phospholipid acyl chain fluidity, phase transitions and cholesterol on (Na<sup>+</sup>+K<sup>+</sup>)-stimulated adenosine triphosphatase. *J. Biol. Chem.* 249:1071-1080, 1974.

114. Klimes, I.; Nagulesparan, M.; Unger, R.H.; Aronoff, S.L. y Mott, D.M.: Reduced  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase activity in intact red cells and isolated membranes from obese man. *J. Clin. Endocrinol, Metab*, 54: 721-724, 1982.
115. Beutler, E.; Sacks, P. y Kuhl, W.: Erythrocyte Na,K-ATPase and obesity. *N. Engl. J. Med.* 306:808-809, 1982.
116. Mir, M.A.; Charalambous, B.M.; Morgan, K. y Evans, P.J.: Erythrocyte sodium-potassium-ATPase and sodium transport in obesity. *N. Engl. J. Med.* 305:1264-1268, 1981.
117. Bray, G.A.; Kral, J.G. y Björntorp, P.: Hepatic sodium-potassium-dependent ATPase in obesity. *N. Engl. J. Med.* 304:1580-1582, 1981.
118. James, W.P.T. y Trayhurn, P.: Obesity in mice and men. En: *Nutritional factors: Modulating effects on metabolic processes* (Beers, Jr., R.F. y Bassett, E.G., eds.), Raven Press, Nueva York, 1981.
119. Nichols, D.G.: Brown adipose tissue mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta* 549:1-29, 1979.
120. Clausen, T. y Hansen, O.: The  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -pump, energy metabolism and obesity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 80:398-404, 1982.
121. De Luise, M.; Rappaport, E. y Flier, J.S.: Altered erythrocyte  $\text{Na}^+$ + $\text{K}^+$  pump in adolescent obesity. *Metabolism* 31:1153-1158, 1982.