Nº 158
2EJ.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

# "ACCION DEL CADMIO $^{2+}$ SOBRE LA ATPasa DE ($Na^+$ + $K^+$) DE RIÑON DE PERRO"

## T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A

JOSEFINA TENOPALA GARCIA

México, D. F. 1992

FALLA DE ORIGEN

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

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

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

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

# INDICE


| | pag. |
|---|---|
| **Objetivos** | 6 |
| **Antecedentes** | 7 |
| **Material y Métodos** | 16 |
| A) Obtención de la ATPasa de ($Na^+ + K^+$) | 17 |
| B) Determinación de proteínas | |
| 1. Método de Lowry | 18 |
| 2. Eliminación de agentes que interfieren | 19 |
| C) Determinación de fosfato inorgánico | |
| 1. Método según Taussky y Shorr | 20 |
| 2. Determinación de fosfato inorgánico con molibdato | 21 |
| D) Electroforesis | 21 |
| E) Determinación de la actividad enzimática de la ATPasa de ($Na^+ + K^+$) y de la ATPasa de $Na^+$ | 23 |
| F) Efecto del cadmio en las actividades de la ATPasa | 24 |
| G) Efecto de la o-fenantrolina en las actividades de la ATPasa | 25 |
| H) Efecto del cadmio en presencia de una concentración constante de o-fenantrolina sobre las actividades de la ATPasa | 25 |
| I) Determinación de la actividad enzimática de la fosfatasa de $K^+$ y de la fosfatasa de $Na^+$ | 25 |
| J) Efecto de la concentración del cadmio sobre las actividades de las fosfatasas | 26 |
| K) Efecto de la concentración de o-fenantrolina sobre las actividades de las fosfatasas | 27 |

L) Efecto del cadmio en presencia de una concentración constante de o-fenantrolina sobre las actividades medidas de las fosfatasas 27

M) Reversión de la inhibición de las actividades enzimáticas por agentes quelantes de cationes (EDTA y EGTA) y compuestos que interaccionan con grupos tioles (DTT y $\beta$-ME) 27

N) Titulación de grupos tioles (-SH) de la ATPasa 29

**Resultados** 31

Inhibición de las actividades de la ATPasa

1º Actividad dependiente de $Na^+$ 31

2º Actividad dependiente de $K^+$ 33

3º Actividad dependiente de $Na^+$ y de $K^+$ 33

Reversión de la inhibición de las actividades de la ATPasa 43

Titulación de grupos tioles 46

Electroforesis 48

Discusión 51

**Referencias** 55

## OBJETIVOS

Observar la forma de acción del Cadmio sobre la ATPasa de ($Na^+ + K^+$), mediante concentraciones crecientes del metal en cuatro reacciones de la enzima que implican diferentes estados conformacionales y, determinar con ésto, en cuál actividad lleva a cabo su efecto inhibitorio.

Tomando en cuenta el efecto que produce el complejo (Cobre+o-fenantrolina) sobre la actividad de la ATPasa, se pretende observar si el complejo (Cadmio+o-fenantrolina) produce un efecto similar en las actividades enzimáticas a ensayar.

Aplicar agentes quelantes de cationes y compuestos que interaccionan con grupos tioles para observar si existe efecto de reversión de la inhibición, lograda con cadmio en las diferentes actividades enzimáticas ensayadas.

Identificar si el efecto del metal se lleva a cabo sobre los grupos -SH de las cisteínas que componen la enzima y que ocasionan los cambios conformacionales de la misma.

# ANTECEDENTES

El cadmio es un metal blanco, dúctil y maleable que se emplea para recubrimiento electrolítico del acero, recubrimientos cerámicos, aleaciones, baterías de níquel-cadmio, pigmentos empleados en pintura artística; y en forma más impura y menos costosa se usa para teñir jabones, fibras textiles, vidrio, papel y caucho. Su amalgama sirve como cemento para empastes de odontología y en los automóviles se emplea para cubrir las partes de acero de los radiadores. En joyería, la aleación de cadmio y plata en partes iguales sirve como sustituto de la plata porque conserva su brillo más tiempo. El cadmio se emplea también en fertilizantes y fungicidas (2, 11).

Su acción toxicológica es similar a la del arsénico y el mercurio. La inhalación crónica de polvo o de vapores de cadmio causa sequedad en la garganta, tos, dolor de cabeza, vómito, dolor del pecho, extrema inquietud e irritabilidad, pneumonitis química con edema pulmonar, posible bronconeumonía y una necrosis cortical de ambos riñones. La ingestión del cadmio o sus compuestos causa incremento en la salivación, opresión en la garganta, vómito, dolor abdominal y gastroenteritis severa (11, 12, 13).

Los medios por los cuales puede haber intoxicación con cadmio son el aire, la comida y el tabaco. Se ha encontrado en el aire de áreas urbanas una concentración alta de cadmio en donde los niveles máximos llegan a 400 $\mu g/m^3$, mientras que en las rurales la concentración es de 2.5 $ng/m^3$, enfatizando que la contaminación es debida a la actividad industrial (14).

El grado de riesgo de contaminación por la comida depende de la cantidad consumida de alimentos afectados. Se ha observado que cosechas de raíces y

vegetales con hojas grandes se ven contaminadas dependiendo del grado de concentración del elemento en la tierra, ya que el agua de los drenajes contiene altos niveles de cadmio de los desechos industriales y algunas de estas residuales son usadas como agua de riego, siendo potencialmente iniciadores de la entrada del metal al hombre por la cadena alimenticia. De forma semejante, la contaminación del agua de mar con desechos de aguas negras contaminadas con cadmio afectan los alimentos consumidos por el hombre, ya que el metal se acumula en los mariscos como el caracol, la langosta y los cangrejos, y no en los peces (14, 15).

Otro factor importante es el tabaco, debido a que esta planta contiene, en todas sus formas, cantidades apreciables de cadmio. Se estima que al fumar 20 cigarrillos se absorben 2-4 $\mu$g de cadmio, los que pueden depositarse en los alveolos pulmonares y se considera que de un 60-70% es absorbido en forma de CdO; la absorción del metal a nivel pulmonar es 40% mayor que la absorción en el tracto intestinal (13, 15, 16, 17).

En un estudio comparativo realizado en personas que no están expuestas al metal por motivos profesionales, se encontraron niveles séricos de 0.228 $\mu$g/dl en fumadores y 0.153 $\mu$g/dl en no fumadores (13, 17, 18).

Cuando hay envenenamiento por cadmio los efectos graves muestran daño al tracto pulmonar, necrosis testicular, transtornos del sistema endócrino, hipertensión y relación con respuestas cardiovasculares, anemia, hepatotoxicidad y reducción de la respuesta inmunológica (19).

Debido a una exposición crónica al cadmio pueden presentarse efectos tales como el enfisema pulmonar y la lesión tubular renal. El daño renal se presenta por la acumulación de cadmio en el segmento proximal de las células epiteliales tubulares, las cuales están localizadas en la corteza del riñón. La exposición al cadmio induce biosíntesis de metalotioneína principalmente por el

hígado y el riñón. El papel de esta proteína es unir y transportar el metal del hígado y fijarlo en el riñón (15, 20). Se ha sugerido que el 99% del cadmio presente en la corteza renal está en forma unida a la tioneína y el 1% es cadmio iónico, y que la capacidad de la proteína para unir al metal es debida a la presencia de grupos sulfhidrilo titulables de las cisteínas presentes en la tioneína.

El cadmio absorbido se une inicialmente a la metalotioneína y sólo cuando se satura la capacidad de la proteína de unir al metal, se acumula suficiente cadmio libre para inhibir las actividades enzimáticas en general (3, 12, 21 al 24).

Se ha podido demostrar que la metalotioneína tiene un papel protector contra el envenenamiento por cadmio, y el efecto tóxico de éste se debe a la liberación del ión al ser transportado del hígado al riñón (25, 26, 27).

Ya que el metal se acumula como complejo cadmio-tioneína en la corteza tubular, la reabsorción de las proteínas y los electrolitos es inhibida ocasionando la aparición en la orina, de proteínas de peso molecular bajo (20 000 a 25 000 Kdal), especialmente $\beta$2-microglobulinas que son el signo principal de disfunción renal y en menor grado las $\alpha$ y $\delta$-globulinas con poca albúmina (12, 28).

La inhibición de la reabsorción tubular puede también dar como resultado glucosuria seguida de una abrupta diuresis y aminoaciduria generalizada, existiendo también fosfaturia; aunque la proteinuria es la anormalidad inicial y más consistente. Esta mezcla de hallazgos es conocida como el Síndrome de Fanconi que es un defecto generalizado en el transporte de las membranas, incluyendo las menbranas epiteliales de los túbulos proximales renales; y son también observados en la enfermedad de Itai-Itai que es una osteomalasia que afecta severamente, en su mayoría, a mujeres multíparas postmenopáusicas del

Japón (12). Se ha sugerido que en ambos padecimientos el mecanismo del daño involucra la inhibición del sistema de transporte de la ATPasa de ($Na^+ + K^+$), la cual está localizada en la membrana plasmática de las células renales. Esta inhibición podría causar la reducción del transporte tubular neto de solutos orgánicos e inorgánicos del lumen de los túbulos proximales (28).

Otro dato importante que indica una alteración renal es el hecho de que la depuración de creatinina se ve disminuida por debajo de 50 ml/min y se asocia a ésto una reducción en la reabsorción del fosfato, esta reducción no es notable hasta que las $\beta$2-microglobulinas o las proteínas totales en la orina alcanzan valores alrededor de 100 a 500 $\mu$g/l. También se ha encontrado que hay excreción de proteínas de alto peso molecular que pueden indicar una lesión a nivel glomerular secundaria a la lesión tubular (29).

El efecto del cadmio en los túbulos renales posiblemente causa un aumento en la excreción de algunas sales como el calcio, el cual puede depositarse en los túbulos renales propiciando la formación de cálculos (2). Se considera que la ingestión diaria de 200 a 300 $\mu$g de cadmio puede generar una concentración en la corteza renal de 200 $\mu$g/g de tejido en personas de 45 a 50 años de edad en poblaciones expuestas crónicamente al metal (30).

Se ha observado que el cadmio tiene afinidad por los grupos sulfhidrilo de las proteínas y, en consecuencia, altera las uniones disulfuro a nivel celular pudiendo causar necrosis (6, 7, 8). En particular, después de una exposición aguda a través de las vías respiratorias se produce necrosis tubular y cortical.

Se ha estudiado también el efecto del cadmio sobre la ATPasa de especies animales, encontrándose que el metal puede interactuar primeramente con el substrato y directamente en los sitios de unión del ATP y Na+, por lo que se puede decir que hay una inhibición competitiva clásica por los sitios de unión del ATP (9, 10).

Skou en 1957 (31) demostró la existencia de una enzima que hidrolizaba ATP y era activada por iones sodio y potasio en extractos membranales de nervio de cangrejo. Se han realizado estudios en diversas especies incluyendo el hombre para saber qué órganos contienen esta enzima en mayor cantidad (32 al 36 y 48).

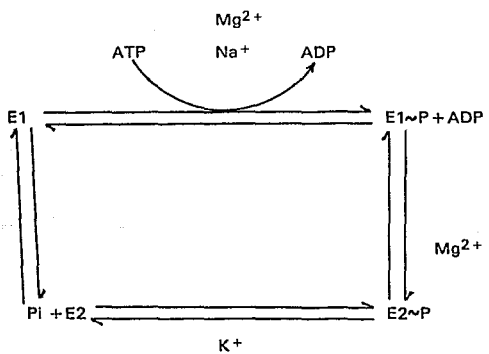
La adenosinatrifosfatasa (ATP fosfohidrolasa (E.C. 3.6.1.3.)) activada por iones $Na^+$ y $K^+$ (ATPasa de ($Na^+ + K^+$)) es conocida también como la "bomba de sodio y potasio" y se localiza en las membranas plasmáticas de todas las células del organismo. Esta enzima es la responsable del mantenimiento de la concentración de 140 mmol por litro de sodio a nivel extracelular y de 10 mmol por litro intracelularmente, creando así el gradiente de concentración y carga eléctrica a través de la membrana plasmática, que contribuye al estado de polarización de dicha membrana en la mayor parte de los organismos vivos, para ello, utiliza energía proveniente de la hidrólisis del ATP. Esta enzima transporta al ión sodio desde el interior de la célula hacia el exterior, y al ión potasio en sentido inverso, debido a que el potencial eléctrico de la membrana se considera positivo en el exterior y negativo en el interior, el ión sodio se mueve contra un gradiente de concentración y de carga, mientras que el potasio lo hace contra un gradiente de concentración y a favor de un gradiente de carga (32).

La enzima está compuesta de dos subunidades, una subunidad denominada $\alpha$ con un peso molecular de 100 Kdal es la unidad catalítica y se ubica dentro de la membrana atravesándola de lado a lado en forma asimétrica. En ésta subunidad los sitios de unión para el $Na^+$ y ATP se ubican hacia el citosol y el sitio de unión para el $K^+$ se localiza en el lado exterior. La subunidad $\beta$ de 50 Kdal es una glicoproteína que atraviesa la membrana, principalmente orientada hacia el espacio exterior. Aunque no se conocen sus

funciones específicas su presencia es imprescindible para el funcionamiento de la enzima.

Se desconoce como están ensambladas las subunidades, se ha propuesto que dos subunidades $\beta$ están colocadas a los lados de dos $\alpha$, constituyendo así un tetrámero ($\beta\alpha\alpha\beta$). Se ha postulado recientemente que la unidad mínima funcional es un protrómero compuesto por una sola subunidad $\beta$ y una $\alpha$. Cualquiera que sea su acomodo, las subunidades se unen entre sí por enlaces débiles los que se modificar al fosforilarse la enzima (37).

Para poder comprender la interrelación que existe entre los iones $Na^+$, $K^+$ y $Mg^{2+}$ y el ATP durante el proceso de hidrólisis, se presenta el esquema siguiente (38):



Donde:

E1 y E2 son los estados conformacionales de la enzima libre.

E1~P y E2~P representa los estados conformacionales de la enzima fosforilada.

E1~P sufre un cambio en su conformación, inducido por el magnesio.

E2~P conformación con afinidad por el potasio.

La ATPasa de ($Na^+ + K^+$) contiene 36 grupos sulfhidrilo por mol de enzima (P.M. 250 Kdal en conformación $\alpha_2\beta_2$), los cuales son importantes para la hidrólisis del ATP. Las diferentes reactividades de los grupos sulfhidrilo se pueden utilizar como una medida de las conformaciones de la ATPasa (39, 54).

Se ha determinado que 34 de los 36 grupos tioles se encuentran en la subunidad catalítica ($\alpha$) y sólo dos en la subunidad glicoproteica ($\beta$) (40). En ausencia de detergentes, sólo los grupos sulfhidrilo de la subunidad catalítica ($\alpha$) son accesibles a los reactivos, y la modificación de estos grupos genera diferentes estados conformacionales de la enzima (53).

El grado de inhibición de la actividad de la ATPasa de ($Na^+ + K^+$) por reactivos específicos para grupos sulfhidrilos, es influenciado por el tipo y la concentración de los cationes presentes. De 26 grupos tioles que reaccionan con la N-etilmaleimida sólo 12 reaccionan con el ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico (DTNB), estos son llamados grupos disponibles y de éstos, dos a seis grupos por molécula de enzima son esenciales para la actividad de la ATPasa (39, 41).

Varios autores han demostrado que el complejo (cobre-o-fenantrolina) produce la inhibición de la actividad de la ATPasa de ($Na^+ + K^+$) e induce la formación reversible de dímeros o tetrámeros (42, 43).

La o-fenantrolina es una molécula que en conjunción con el oxígeno del aire y un metal de transición lleva a la generación de radicales hidroxilo. Forma complejos estables con Cu(II), Co(II), Cd(II), Ni(II) y Zn(II), también con agentes quelantes que pueden unir al cobre tales como la trietanolamina, la neocuproína o el EDTA (44).

El complejo (cobre-o-fenantrolina) puede utilizarse como un reactivo que cataliza la oxidación de una variedad de compuestos con grupos sulfhidrilo a pH fisiológico, y puede ser usado para el entrecruzamiento de proteínas que contengan grupos -SH (45). Este complejo se utiliza para comparar el efecto que produce el complejo (cadmio-o-fenantrolina) sobre las cuatro funciones de la ATPasa de ($Na^+ + K^+$) que se estudian. Ya que el complejo (cobre-o-fenantrolina) causa las uniones disulfuro intra e intercadenas, éstas podrían ser, en parte, responsables de la disminución de la actividad de la ATPasa, de la fosfatasa de $K^+$ y de impedir la unión del ATP (46), sin embargo, se ha demostrado que no ocurre el entrecruzamiento de las subunidades $\alpha$, y que la formación de un dímero $\alpha$-$\alpha$ fue inducido al añadir $Na^+$ y ATP a la mezcla reaccionante; observando también que este entrecruzamiento fue precedido por la formación de la fosfoenzima (47). Parece ser que el complejo (cobre-o-fenantrolina) oxida los grupos sulfhidrilo que se van exponiendo por las transiciones conformacionales posteriores a la fosforilación (46, 47).

De los diferentes estudios publicados se concluye que los metales pesados como el cobre, el plomo, el mercurio y el cadmio producen efectos nocivos a nivel renal (1, 2, 3). Los tres primeros se han estudiado extensamente tanto por existir en altas concentraciones en diversas zonas geográficas, primordialmente en las urbanas, como por su alto grado de toxicidad (caso del mercurio). Tomando en consideración que el cadmio es utilizado en la industria, que en gran medida contamina el aire, que está

presente en algunos alimentos y que no alcanza los niveles tóxicos como los metales antes mencionados, se le ha menospreciado en su carácter citotóxico; por lo que basados en algunos estudios previos en los que se propone que el daño primario a nivel renal sea directamente sobre la ATPasa de ($Na^+ + K^+$) (1 a 10) se decidió ensayar el efecto de dicho metal en el sistema de transporte activo llamado "bomba de sodio y potasio", en riñón de perro, como uno de los principales sistemas que pudieran ser afectados.

# MATERIAL Y METODOS

A) Obtención de la ATPasa de ($Na^+ + K^+$).

B) Determinación de proteínas.

C) Determinación de fosfato inorgánico.

D) Electroforesis.

E) Determinación de la actividad enzimática de la ATPasa de ($Na^+ + K^+$) y de la ATPasa de $Na^+$.

F) Efecto del cadmio en las actividades de la ATPasa.

G) Efecto de la o-fenantrolina en las actividades de la ATPasa.

H) Efecto del cadmio en presencia de una concentración constante de o-fenantrolina sobre las actividades de la ATPasa.

I) Determinación de la actividad enzimática de la fosfatasa de $K^+$ y de la fosfatasa de $Na^+$.

J) Efecto de la concentración del cadmio sobre las actividades de las fosfatasas.

K) Efecto de la concentración de o-fenantrolina sobre las actividades de las fosfatasas.

L) Efecto del cadmio en presencia de una concentración constante de o-fenantrolina sobre las actividades medidas de las fosfatasas.

M) Reversión de la inhibición de las actividades enzimáticas por agentes quelantes de cationes (EDTA y EGTA)

y compuestos que interaccionan con grupos tioles (DTT y $\beta$-ME).

N) Titulación de grupos tioles (-SH) de la ATPasa.

**A) Obtención de la ATPasa de ($Na^+$ + $K^+$).**

Esta enzima se preparó por el procedimiento descrito por Jorgensen (48), en el cual se obtuvo la médula externa del riñón del perro para preparar la fracción proteínica por medio de la homogeneización y la centrifugación diferencial. El sedimento obtenido de la última centrifugación a 48000 xg por 30 minutos se resuspendió en una solución 0.25 M de sacarosa y 0.03 M en Imidazol a pH 7.2. Se cuantificó la concentración de proteínas de la suspensión por el método de Lowry (49) y se almacenaron las preparaciones en nitrógeno líquido hasta su uso.

Las fracciones enzimáticas descongeladas se trataron con SDS por 30 minutos a 20°C y se procedió a purificar la ATPasa por medio de una centrifugación en gradientes de densidad discontinua durante 90 minutos a 50 000 rpm, el botón obtenido fue la ATPasa que se resuspendió en un volumen de 1 a 3 ml de Imidazol 25 mM pH 7.4, se dializó durante 12 hrs. a 0°C, se almacenó la enzima a 5°C. La pureza de esta preparación fue confirmada por electroforesis.

**B) Determinación de proteínas.**

1. *Método de Lowry* (49).

Este método mostró un intervalo lineal que va de 30 a 300 $\mu$g/ml en el fotocolorímetro Klett-Summerson con filtro rojo y de 5 a 100 $\mu$g/ml en un espectrofotómetro Beckman a 750 nm.

Reactivos:

a) $Na_2CO_3$ al 2% en NaOH 0.1 N.

Solución concentrada (a x 2): $Na_2CO_3$ al 4% en NaOH 0.2 N.

b) $CuSO_4.5H_2O$ al 0.5% y tartrato de sodio y potasio al 1%.

c) Mezcla de a + b.

N mililitros de (a x 2) + N mililitros de $H_2O$ + 4N/100 mililitros de b.

Donde N es el número de muestras en las que se determinó la concentración de proteínas.

d) Reactivo de Folin - Ciocalteau (Sigma). Diluir en agua para hacer 1 N o bien, calcular el volumen que hay que añadir para neutralizar el reactivo c (aproximadamente 0.1 ml por 2 ml de c).

e) Estándar de proteínas: albúmina sérica bovina (BSA) de concentración 1 mg/ml.

Procedimiento:

En cada tubo se adicionaron 20 $\mu$l de proteína diluidos 1:50, que no excedieron de 50 $\mu$g de proteínas totales, se le añadieron 2 ml de reactivo c, se mezclaron y se mantuvieron 10 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido ese tiempo, se agregó 0.1 ml de Folin-Ciocalteau para neutralizar 2 ml del

reactivo c, se ajustó con agua destilada a un volumen final de 2.5 ml. Se leyó en espectrofotómetro a 750 nm a los 30 minutos.

La curva patrón se realizó con concentraciones de albúmina desde 0 a 50 $\mu$g totales.

*2. Eliminación de agentes que interfieren en la determinación de proteínas* (50).

Este procedimiento se utilizó cuando en la mezcla estubieron presentes, junto con la proteína, detergentes o reactivos que interfirieran en la determinación de proteínas.

Reactivos:

1. Desoxicolato de sodio al 1% (DOC Na).
2. Acido tricloroacético al 10% (TCA).
3. Hidróxido de sodio 1 N (NaOH).
4. a) $Na_2CO_3$ al 2% (Carbonato de sodio).
   b) $CuSO_4.5H_2O$ al 0.5% y tartrato de sodio y potasio al 1%.
   c) Preparación de la solución de cobre alcalino al 0.01%: se disolvió por separado y se mezcló en la siguiente proporción: 50 ml de a + 1 ml de b.
5. Reactivo de Folin-Ciocalteau.
6. Estándar de proteínas: albúmina sérica bovina 1 mg/ml.

Procedimiento:

Se utilizaron volúmenes entre 25 y 400 $\mu$l que contuvieron de 10 a 50 $\mu$g de proteínas totales, se añadieron 100 $\mu$l de DOC Na al 1% a cada muestra, se

agitó vigorosamente y se les adicionó 1 ml de TCA al 10% para precipitar las proteínas y el desoxicolato de sodio. Para lavar las paredes de los tubos se añadió un mililitro más de la solución de TCA. Inmediatamente después las mezclas se centrifugaron a 3 000 rpm 10 min a temperatura ambiente y el sobrenadante fue eliminado con cuidado. Al sedimento se le añadieron 0.5 ml de NaOH 1 N y se agitaron hasta disolver la pastilla, una vez disuelta se agregaron 2 ml de solución alcalina de cobre al 0.01%.

Después de reposar 10 minutos a temperatura ambiente se añadieron 0.5 ml de reactivo de Folin y se determinó la densidad óptica a 750 nm una vez transcurridos 30 minutos.

**C) Determinación de fosfato inorgánico.**

1. *Método de Taussky y Shorr* (51).

Reactivos:

a) Acido sulfúrico 10 N.

b) Molibdato de amonio al 10% (solución stock).
Se añadieron 50 g de $(NH_4)_6.Mo_7O_{24}.4H_2O$ a 400 ml de $H_2SO_4$ para evitar formación de pasta y una vez disuelto se completó el volumen a 500 ml con $H_2SO_4$ .

c) Molibdato ferroso (preparar fresco en cada ocasión).
Para preparar 100 ml de la solución se añadieron 10 ml de la solución b y 5 g de $FeSO_4.7H_2O$ a 70 ml de agua destilada, se disolvió y se llevó al volumen deseado.

Procedimiento:

Se utilizó 0.1 ml del problema con fosfatos y se añadieron 2 ml del reactivo c, el color se desarrolló durante 1 minuto y fue estable durante 2 hrs.

La concentración de fosfato se determinó extrapolando densidad óptica a 660 nm en la curva patrón. Dicha curva de fosfatos se realizó a partir de la solución estándar desde 125 hasta 500 nmoles de Pi.

2. *Determinación de fosfato inorgánico con molibdato* (56).

Soluciones:

1. Molibdato amónico al 6.6%.

2. Acetona.

Procedimiento:

A 0.5 ml de la muestra que contiene fosfatos se le añadieron 0.5 ml de TCA al 10% frío, 0.4 ml de molibdato amónico al 6.6% y 0.3 ml de acetona. El color amarillo obtenido se leyó en un espectrofotómetro a 410 nm contra curva patrón de $KH_2PO_4$ como en el método de Taussky.

**D) Electroforesis.**

Para determinar la posible formación de bandas de entrecruzamiento debido a la acción del cadmio en la enzima y el establecimiento de puentes disulfuro, se realizó un corrimiento electroforético en geles de acrilamida al 3.3%, según el método de Laemmli (55).

Para el estudio se emplearon los reactivos a ensayar bajo el siguiente esquema:

| TUBO | ENZIMA | β-ME | Cu | Cu-o-F | Cd | Cd-o-F |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | 105 μg | 100mM | 80 μM | 80 μM | 80 μM | 80 μM |
| | | | | 500 μM | | 500 μM |
| 1 | + | + | - | - | - | - |
| 2 | + | - | + | - | - | - |
| 3 | + | + | + | - | - | - |
| 4 | + | - | - | + | - | - |
| 5 | + | + | - | + | - | - |
| 6 | + | - | - | - | + | - |
| 7 | + | + | - | - | + | - |
| 8 | + | - | - | - | - | + |
| 9 | + | + | - | - | - | + |

Las muestras fueron preparadas en un volumen final de 100 μl. Se preincubaron 10 minutos a temperatura ambiente bajo atmósfera de nitrógeno para evitar la oxidación. Después se agregaron: 20 μl de una solución que contiene EDTA 10 mM, SDS al 2% y Mersalil 2mM para detener la reacción; seguidamente se añadieron 10 μl de una mexcla que contenía: amortiguador de fosfatos 0.1 mM, 10% de SDS, 10% de β-Mercaptoetanol y 50 μl de otra mezcla conteniendo: amortiguador de fosfatos 0.1 M, 10% de glicerol, 10% de β-Mercaptoetanol y 0.001% de azul de bromofenol.

Los geles se colocaron en la cámara de electroforesis y se les aplicó una corriente de 4 mA por gel durante una hora. Después del tiempo de preincubación las mezclas fueron colocadas sobre los geles, dejando el voltaje 1 hora a 4 mA e incrementándolo después a 8 mA por gel hasta que el azul de

bromofenol, que se utiliza como indicador del corrimiento, llegue al extremo del gel.

Una vez concluida la corrida, los geles fueron separados de los tubos y teñidos con azul brillante de Coomassie (G) durante la noche. Al día siguiente se procedió a decolorarlos con una solución de ácido acético al 7% hasta observar las bandas bien definidas.

Mediante este procedimiento se encontraron dos bandas proteicas, una de 50 000 y otra de 100 000 daltons, lo que nos mostró la pureza de la preparación (52).

**E) Determinación de la actividad enzimática de la ATPasa de ($Na^+$ + $K^+$) y de la ATPasa de $Na^+$.**

Se obtuvo la enzima pura por el método de Jorgensen (48) y se determinó la cantidad de proteínas de acuerdo a Lowry (49). Enseguida se procedió a medir la hidrólisis del ATP, determinada por la liberación de fosfato inorgánico por el método de Taussky y Shorr (51).

En dicha reacción se utilizó una mezcla a pH 7.4 de: 10 mM de $MgCl_2$, 50 mM de Trietanolamina, 20 mM de KCl, 20 mM de NaCl, enzima cuya concentración fue de 2 a 5 $\mu$g/ l y agua destilada para un volumen final de 1 ml. De esta mezcla se tomó la mitad del volumen y se le añadió TCA al 10% frío y 100 mM de ATP para realizar así, los tiempos iniciales de reacción o tiempos cero. Al resto de la mezcla se le añadió 3mM de ATP y se incubó a 37°C durante 10 minutos, se detuvo la reacción con TCA al 10% frío y se determinó la densidad óptica a 660 nm en un espectrofotómetro Beckman contra una curva de $KH_2PO_4$.

Se obtuvo la diferencia entre la densidad óptica de las reacciones a los 10 minutos y los tiempos cero para obtener las nanomolas de ATP hidrolizado y, considerando la cantidad de proteína utilizada, se determinó la actividad enzimática especificada en $\mu$Moles de ATP hidrolizado por miligramo de proteína por minuto.

La actividad de la ATPasa de $Na^+$ se midió de la misma forma que la antes mencionada para la ATPasa de ($Na^+ + K^+$), con la diferencia que se substituyó el KCl 20 mM por 20 mM de Cloruro de Colina para mantener la fuerza iónica de la reacción.

Este procedimiento produjo preparaciones con actividades específicas entre 14 y 26 $\mu$M de ATP/mg de proteína/minuto.

**F) Efecto del Cadmio en las actividades de la ATPasa.**

A una serie de tubos, por duplicado, se les añadió 5mM de $MgCl_2$, 50 mM de TEA-HCl pH 7.4, 100 mM de NaCl, 20 mM de KCl, concentraciones variables de $CdCl_2$ entre 0 y 60 M, 4.6 $\mu$g de enzima y agua destilada para completar un volumen final de 960 $\mu$l. Esta mezcla se preincubó durante 30 minutos a temperatura ambiente.

Al final de la preincubación se tomaron 480 $\mu$l de cada tubo y se añadieron a otro tubo con TCA al 10% frío y 3 mM de ATP para determinar el fosfato inorgánico a tiempo cero. Al volumen restante de los primeros tubos se les adicionó 3 mM de ATP y se incubaron a 37°C durante 10 minutos; se detuvo la reacción con TCA. Después de 5 minutos se añadieron los reactivos para desarrollar la coloración y se determinó la cantidad de fosfato inorgánico libre, por el primer método.

**G) Efecto de la o-fenantrolina en las actividades de la ATPasa.**

Se utilizaron cantidades variables de una solución alcohólica de o-fenantrolina de 0 a 500 $\mu$M, se evaporó el alcohol y se restituyó el volumen con agua. Se empleó el mismo procedimiento del inciso F sin la presencia de cadmio, bajo las mismas concentraciones de los reactivos y se obtuvo la densidad óptica a 660 nm en un espectrofotómetro Beckman.

**H) Efecto del cadmio en presencia de una concentración constante de o-fenantrolina sobre las actividades de la ATPasa.**

Con el objeto de determinar si la presencia de la o-fenantrolina estimula el efecto inhibidor del cadmio, se realizaron experimentos en los cuales se ocuparon 7 $\mu$g de enzima, concentraciones variables de cadmio de 0 a 60 $\mu$M y o-fenantrolina de 500 $\mu$M; realizando los ensayos bajo las mismas condiciones que los anteriores.

La determinación del fosfato liberado se realizó empleando el procedimiento 2, utilizando 1.5 ml de alcohol butírico para extraer el complejo fosfomolíbdico en acetona, debido a que hay formación de turbidez por la presencia de la o-fenantrolina. Se determinó la absorción del sobrenadante orgánico que contiene el complejo colorido a 410 nm.

**I) Determinación de la actividad enzimática de la fosfatasa de $K^+$ y de la fosfatasa de $Na^+$.**

Para determinar esta actividad se utilizó el p-nitrofenilfosfato (p-NFF) diciclohexilamonio en substitución del ATP. Se preparó una mezcla con 10 mM

de $MgCl_2$, 50 mM de TEA-HCl pH 7.4 , 20 mM de KCl, 2 $\mu$g de enzima y se añadió agua destilada para tener un volumen final de 375 $\mu$l, para la reacción de fosfatasa de $K^+$.

Se preincubaron los tubos a temperatura ambiente durante 30 minutos y después se agregó 10 mM de p-NFF y se incubó 10 minutos a 37°C. Al término de la reacción se añadieron 500 $\mu$l de TCA frío y 1 ml de solución 1M de Tris, teniendo un volumen final de 2 ml. El p-nitrofenol formado, de color amarillo, se determinó por su absorción a 410 nm; contra una curva patrón de 0 a 50 $\mu$M de p-nitrofenol.

En el caso de la fosfatasa de $Na^+$ se utilizó 100 mM de NaCl (en lugar de 20 mM de KCl) y 20 $\mu$g de enzima para producir una mayor respuesta de reacción, ya que la velocidad de la enzima para hidrolizar el p-nitrofenol, a diferencia de la fosfatasa de $K^+$, es más lenta. Se graficó el curso de la reacción a 410 nm, con una temperatura de 37°C durante 10 minutos para determinar la actividad enzimática.

**J) Efecto de la concentración del cadmio sobre las actividades de las fosfatasas.**

El efecto inhibitorio del cadmio se estudió realizando experimentos como los descritos en el inciso anterior, variando la concentración de cadmio entre 0 y 100 $\mu$M en presencia de una concentración constante de la enzima.

**K) Efecto de la concentración de o-fenantrolina sobre las actividades de las fosfatasas.**

Para observar la influencia de la o-fenantrolina se realizaron los experimentos como se indicó en el inciso I, variando las concentraciones de la o-fenantrolina desde 0 hasta 1mM.

**L) Efecto del cadmio en presencia de una concentración constante de o-fenantrolina sobre las actividades medidas de las fosfatasas.**

Se utilizaron concentraciones variables de cadmio desde 0 hasta 100 $\mu$M, con una concentración constante de 400 $\mu$M de o-fenantrolina para la fosfatasa de $Na^+$, se realizó el mismo procedimiento que en los ensayos anteriores.

**M) Reversión de la inhibición de las actividades enzimáticas por agentes quelantes de cationes (EDTA y EGTA) y compuestos que interaccionan con grupos tioles (DTT y $\beta$-ME).**

Primero se obtuvo la inhibición de las actividades enzimáticas ensayadas, para lo cual se preparó una mezcla inicial conteniendo 5 mM de $MgCl_2$, 50 mM de TEA-HCl pH 7.4, 100 mM de NaCl, 20 mM de KCl, 162 $\mu$g de enzima y agua destilada suficiente para un volumen final de 29.1 ml debido a que fueron varias reacciones.

A cada tubo se le añadieron 485 $\mu$l de la mezcla inicial, se seleccionaron tubos a los que se les agregó el complejo (cadmio-o-fenantrolina) en concentraciones de 80 $\mu$M y 500 $\mu$M respectivamente.

Después de 30 minutos de preincubación en presencia de los inhibidores, en cada caso se agregaron los siguientes reactivos:

| Agentes quelantes de cationes: | | Concentración final: |
|---|---|---|
| EDTA | Acido etilendiamino tetraacético | 500 $\mu$M |
| EGTA | Acido etilenguanido tetraacético | 500$\mu$M |

Compuestos que interaccionan con grupos tioles:

| | | |
|---|---|---|
| DTT | Ditiotreitol | 1mM |
| $\beta$-ME | $\beta$-Mercaptoetanol | 1mM |

Inmediatamente después se agregó 3 mM de ATP para efectuar la reacción de hidrólisis, la cual se desarrolló durante 10 minutos a 37°C y se detuvo tras la adición de TCA al 10% frío; se determinó la cantidad de fosfato liberado a 410 nm por el método 2 y se utilizó una curva estándar de $KH_2PO_4$.

El procedimiento anterior fue ensayado para la ATPasa de ($Na^+ + K^+$), y para las otras reacciones enzimáticas se realizaron las siguientes modificaciones pertinentes:

1. Reversión de la inhibición de la ATPasa de $Na^+$:

Se substituyó el KCl por Cloruro de Colina 20 mM en la mezcla inicial.

2. Reversión de la inhibición de la fosfatasa de $K^+$:

La reacción de hidrólisis se llevó a cabo con 10 mM de p-nitrofenilfosfato en lugar del ATP. Se desarrolló color con la adición de 1M de Tris y la densidad óptica, a 410 nm, se extrapoló en una curva estándar de p-nitrofenol.

3. Reversión de la inhibición de la fosfatasa de $Na^+$:

En esta reacción se eliminó la presencia de 20 mM de KCl, dejando la concentración de 100 mM de NaCl para mantener la fuerza iónica y se substituyó el ATP con p-nitrofenilfosfato.

Debido a que la velocidad de reacción es más lenta que la fosfatasa de $K^+$, la determinación se realizó en el espectrofotómetro a 410 nm y a 37°C, graficando el curso de la reacción durante 10 minutos.

**N) Titulación de grupos tioles (-SH) de la ATPasa.**

Para cuantificar el número de grupos -SH presentes en la preparación de la ATPasa de ($Na^+ + K^+$) se utilizó el ácido 5-5'-ditiobis-2-nitrobenzoico (DTNB) que reacciona específicamente con los grupos -SH libres (Boyne y Ellman, 52).

Se añadieron a una cubeta de 1 cm: 25 mM de TRIS-HCl, 1 mM de DTNB y concentraciones variables de una solución de cisteína para desarrollar una curva entre 0 y 60 $\mu$M en un volumen final de 1 ml. Se graficaron tanto la señal inicial producida por el DTNB como la señal después de reaccionar con los grupos -SH libres de la cisteína.

Se realizó un control con albúmina sérica bovina a una concentración de 1 mg/ml en 25 mM de TRIS (pH 7.5), en una cubeta de 1 cm. Se añadió 100 µM de DTNB y se graficó el curso de la reacción por espacio de 20 minutos a temperatura ambiente.

Para determinar los grupos -SH de la ATPasa de ($Na^+ + K^+$), la preparación enzimática fue centrifugada, lavada tres veces y resuspendida en 25 mM de Tris-HCl (pH 7.5) para eliminar el imidazol en que estaba resuspendida, ya que podría interferir en la lectura de la absorbancia a 412 nm.

Se adicionaron 428 $\mu$l de 25 mM de Tris-HCl y 0.5 $\mu$g/ml de enzima en una cubeta del espectrofotómetro y se determinó, en 10 minutos, el cambio en la absorbancia a 412 nm a 37ºC empleando un registrador.

Del mismo modo se preparó otra cubeta en la que se añadió la enzima bajo las mismas concentraciones, pero antes de agregar el DTNB se adicionó dodecil sulfato de sodio (SDS) 2 mg/500 $\mu$l para desnaturalizar la proteína y exponer los grupos -SH a la acción del DTNB que se añadió en concentración final de 200 M. Se registró todo el curso de la reacción en función del tiempo.

A una serie de tubos se les agregó 0.5 mg/ml de enzima, el complejo (cadmio 80$\mu$M-o-fenantrolina 500 $\mu$M) en unos tubos, y en otros el complejo (cobre 80$\mu$M-o-fenantrolina 500$\mu$M) y también 25 mM de Tris-HCl pH 7.5, para tener un volumen final de 500 $\mu$l. Se preincubaron estas mezclas 60 minutos a temperatura ambiente, después se añadió 5 mM de EDTA para frenar la reacción e inmediatamente se agregaron 200 $\mu$M de DTNB y se determinó la absorción a lo largo de 28 minutos a 412 nm, utilizando un registrador.

# RESULTADOS

El trabajo se realizó en tres etapas: la primera es el estudio cinético de la inhibición de las dos actividades dependientes de $Na^+$ y $Mg^{2+}$ (ATPasa y fosfatasa de $Na^+$), del ciclo de reacciones en las que participa la ATPasa de ($Na^+$ + $K^+$); la actividad dependiente de $K^+$ y $Mg^{2+}$ (que es la fosfatasa de $K^+$ como se indicó en la introducción), y el ciclo completo de la ATPasa dependiente de $Na^+$ + $K^+$ y $Mg^{2+}$; el objetivo era determinar en cuál de las etapas de reacción se mostraba el mayor efecto inhibitorio del cadmio y el complejo (cadmio-o-fenantrolina).

La segunda etapa fue determinar si el cadmio asociado o no a la o-fenantrolina modifica los grupos -SH de las cisteínas de la enzima, como se ha propuesto para el complejo (cobre-o-fenantrolina).

La tercera etapa consistió en buscar indicios de entrecruzamiento de las subunidades que forman parte de la ATPasa de ($Na^+$ + $K^+$), como se ha observado para el cobre y la o-fenantrolina (45).

## Inhibición de las actividades de la ATPasa

1° *Actividad dependiente de* $Na^+$.

Se estudiaron los efectos de la o-fenantrolina, el cadmio y el complejo (cadmio-o-fenantrolina) en las actividades de la ATPasa y de la fosfatasa dependientes de $Na^+$.

El efecto se presenta como la disminución en el porcentaje de actividad de la enzima.

La actividad de ATPasa de $Na^+$ es ligeramente inhibida por la o-fenantrolina (al rededor de un 20%) es máxima después de 0.3 mM (fig. 1).

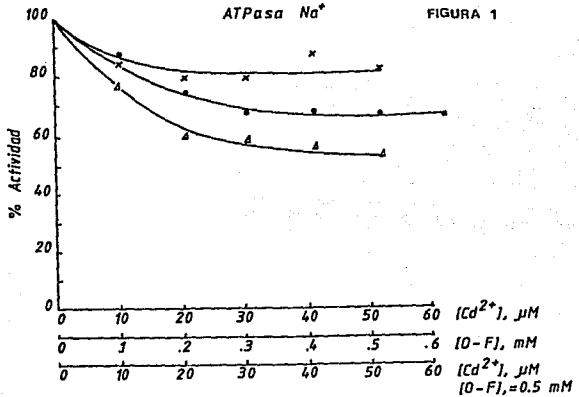



FIGURA 1

EFECTO DEL CADMIO Y EL COMPLEJO (CADMIO-o-FENANTROLINA) SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA ATPasa DE $Na^+$, EN DONDE SE MUESTRAN LAS CONCENTRACIONES CRECIENTES DE CADMIO (o), o-FENANTROLINA (x) Y EL COMPLEJO (CADMIO + o-FENANTROLINA) (Δ).

El cadmio tampoco es un inhibidor potente ya que alcanza su máximo efecto inhibiendo el 35% de la actividad. Cuando se adicionaron el cadmio y la o-fenantrolina juntos parece que la inhibición obtenida es la suma de las inhibiciones de ambos compuestos por separado, aparentemente no hay un efecto sinérgico del complejo ($Cd^{2+}$ + o-F).

La actividad de la fosfatasa dependiente de $Na^+$ (fig. 2) es mucho más sensible a estos inhibidores ya que la o-F por separado produce una inhibición del 50%, en estos datos posiblemente se incrementó esta inhibición porque no se evaporó el alcohol y por lo tanto no se restituyó el volumen con agua. El cadmio solo produce una inhibición ligeramente mayor que la producida por la o-F y el complejo de ambos inhibidores aumenta la inhibición hasta un 70% aproximadamente a la máxima concentración.

2° *Actividad dependiente de* $K^+$.

Con el $K^+$ solamente es posible medir la actividad de fosfatasa ya que el ATP no es hidrolizado en ausencia de $Na^+$. En la figura 3 se observa que la o-F no produce ningún efecto sobre esta actividad en las concentraciones ensayadas mientras que el $Cd^{2+}$ muestra ser un mejor inhibidor ya que se alcanza un 60% con sólo 20 $\mu$M de $Cd^{2+}$. La mezcla de ($Cd^{2+}$ + o-F) inhibe en menor porcentaje que el $Cd^{2+}$ solo.

3° *Actividad dependiente de* $Na^+$ *y de* $K^+$.

En el sistema de ATPasa de ($Na^+$ + $K^+$) se lleva a cabo el ciclo completo de reacción presentado en el esquema 1, en la figura 4 se observa una inhibición de la enzima del 70% en presencia del complejo (cadmio-o-

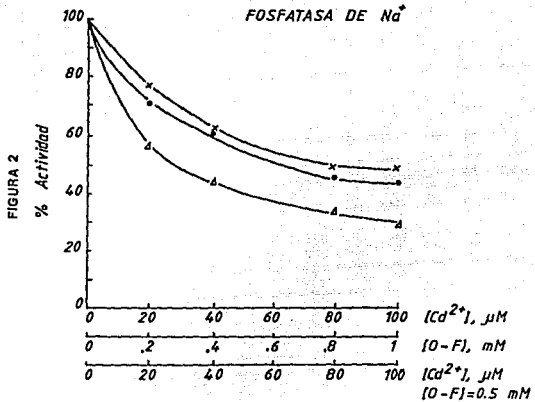



FIGURA 2

EFECTO DE DIFERENTES CONCENTRACIONES DE CADMIO (o), o-FENANTROLINA (x) Y EL COMPLEJO (CADMIO+o-FENANTROLINA) ( Δ ) SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA FOSFATASA DE SODIO.

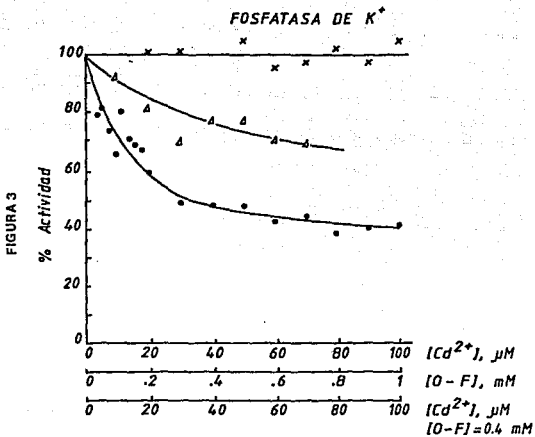



FIGURA 3

FIGURA 3

EFECTO DE CONCENTRACIONES VARIABLES DE CADMIO (o), o-FENANTROLINA (x) Y CADMIO + o-F (Δ) EN LA ACTICIDAD DE LA FOSFATASA DE $K^+$.

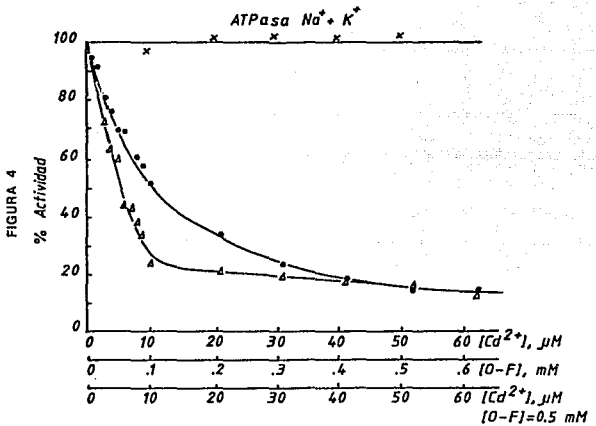



FIGURA 4

FIGURA 4

EFECTO DE CONCENTRACIONES CRECIENTES DE CADMIO (o), o-FENANTROLINA (x) Y CADMIO + o-F (Δ) EN LA ACTIVIDAD ENZIMATICA DE LA ATPasa DE ($Na^+ + K^+$).

fenantrolina) en concentraciones de 10 $\mu$M y 0.5 mM respectivamente, al incrementar la concentración del cadmio en el rango de 10 a 60 $\mu$M se llegó a un 85% de inhibición. En el mismo sistema se observa que el cadmio "per se" produce una inhibición del 50% de actividad a una concentración de 10 $\mu$M y que, al aumentar la concentración de cadmio se obtiene el mismo porcentaje de inhibición que el complejo anterior. En la misma figura se muestra que la o-F no tiene ningún efecto en la reacción. El cadmio parece tener un solo componente de inhibición, mientras que el complejo ($Cd^{2+}$ + o-F) parece tener dos componentes. Los porcentajes máximos de inhibición se presentan enseguida:

## PORCENTAJES MAXIMOS DE INHIBICION

| ACTIVIDADES | CADMIO | CADMIO + o-F |
|---|---|---|
| ATPasa $Na^+$ | 35 | 50 |
| FOSFATASA $Na^+$ | 55 | 70 |
| FOSFATASA $K^+$ | 60 | 30 |
| ATPasa ($Na^+$ + $K^+$) | 85 | 85 |

Los datos reportados en las figuras 1 a 4 se graficaron según Dixon, es decir, el inverso del porcentaje de actividad frente a la concentración de $Cd^{2+}$ en ausencia y en presencia de o-F (fig. 6 y 7), con el objeto de obtener una constante de inhibición aparente que permita comparar mejor la potencia inhibitoria del $Cd^{2+}$ en cada una de las reacciones estudiadas.

En las fig. 5 y 6 donde se muestra la acción del cadmio solo, se observa que la reacción de ATPasa de ($Na^+$ + $K^+$) es la más afectada ya que presenta una constante de inhibición aparente ($K_{Iap}$ = 9 $\mu$M) menor que para las otras

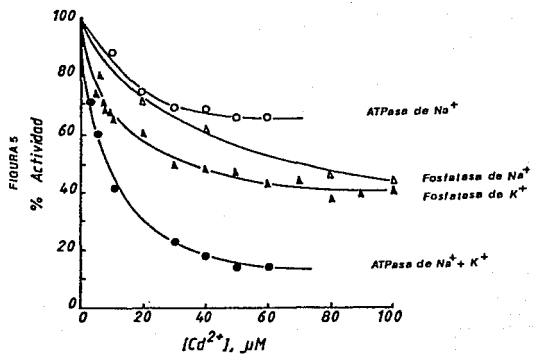



FIGURA 5

EFECTO DE CONCENTRACIONES CRECIENTES DE CADMIO EN CADA UNA DE LAS ACTIVIDADES ENZIMATICAS ENSAYADAS.

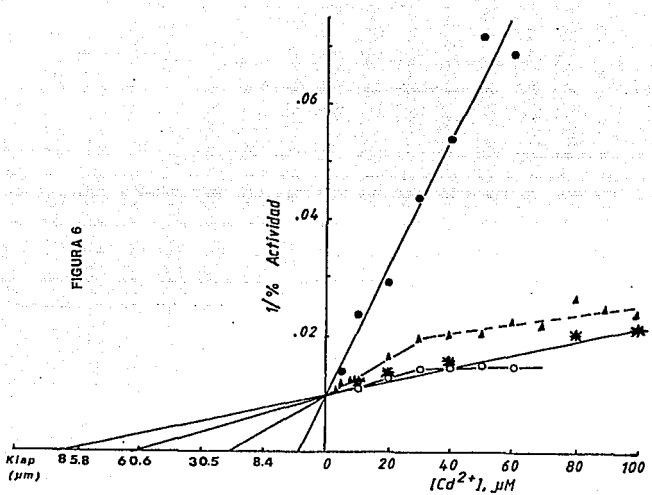



FIGURA 6

GRAFICA DE DIXON EN LA QUE SE MUESTRA EL INVERSO DEL PORCENTAJE DE ACTIVIDAD VS CONCENTRACIONES CRECIENTES DE CADMIO, PARA LAS DIFERENTES ACTIVIDADES MEDIDAS: ATPasa DE $Na^+$ (o), FOSFATASA DE $Na^+$ (*), FOSFATASA DE $K^+$ (▲) Y ATPasa DE ($Na^+$ + $K^+$) (●); PRESENTANDO LAS CONSTANTES DE INHIBICION APARENTES DE CADA REACCION.

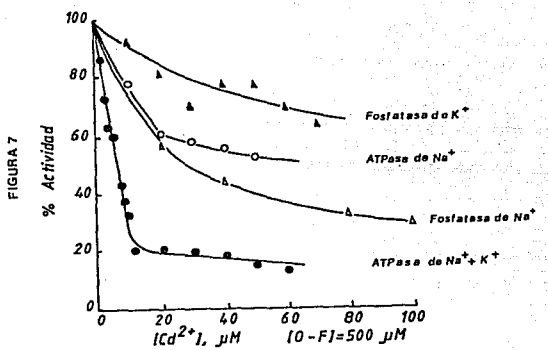



FIGURA 7

EFECTO DEL COMPLEJO (CADMIO -o-FENANTROLINA) EN LAS ACTIVIDADES ENZIMATICAS ENSAYADAS, EN LAS QUE SE VARIA LA CONCENTRACION DE CADMIO Y SE MUESTRA LA INHIBICION PRODUCIDA.

actividades medidas. Los valores de las $K_{iap}$ de los otros experimentos se encuentran en la siguiente Tabla :

CONSTANTES DE INHIBICION APARENTES DEL $Cd^{2+}$ Y ($Cd^{2+}$ +o-F) EN LA ATPasa de ($Na^+ + K^+$) DE RIÑON

| ACTIVIDADES | CADMIO$^{2+}$ ($\mu$M) | CADMIO$^{2+}$ ($\mu$M), o-FENANTROLINA (0.5 mM) |
|---|---|---|
| ATPasa $Na^+ + K^+$ | 8.41 | 4.26 |
| ATPasa $Na^+$ | 60.62 | 66.47 |
| FOSFATASA $K^+$ | 30.54 | 86.11 |
| FOSFATASA $Na^+$ | 85.84 | 67.38 |

En la fig. 7 se comparan los efectos causados por el complejo ($Cd^{2+}$ +o-F) en las actividades ensayadas, observándose una inhibición, alrededor del 80% en el ciclo completo de la ATPasa de ($Na^+ + K^+$).

La figura 8 presenta en gráfica de Dixon, que la mayor inhibición la provoca el complejo en la actividad de ATPasa de ($Na^+ + K^+$), mostrando una curva de dos componentes; uno con una constante de inhibición del orden de 5 $\mu$M y un segundo con una $K_{iap}$ del mismo orden que las constantes de menor afinidad de las otras reacciones parciales de la ATPasa (60 $\mu$M).

Los datos para cada una de ellas son presentados en la tabla anterior. Se puede observar que aparecen dos componentes con sensibilidad diferente al $Cd^{2+}$ y al complejo ($Cd^{2+}$ +o-F). Uno de ellos, el más sensible con valores de

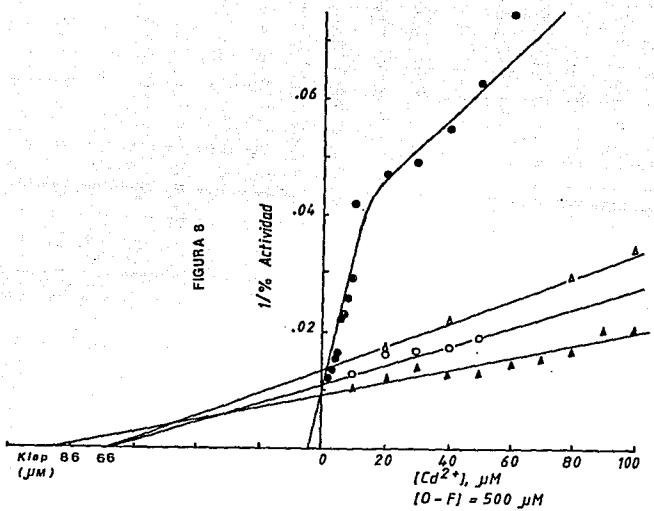



FIGURA 8

GRAFICA DE DIXON MOSTRANDO EL EFECTO DE CONCENTRACIONES CRECIENTES DE CADMIO CON UNA CONCENTRACION DE o-FENANTROLINA CONSTANTE SOBRE LAS ACTIVIDADES DE ATPasa DE $Na^+$ (o), FOSFATASA DE $Na^+$ (*), FOSFATASA DE $K^+$ (▲) Y ATPasa DE ($Na^+ + K^+$) (●); Y LAS CONSTANTES DE INHIBICION APARENTES PARA CADA UNA DE ELLAS.

$K_{iap}$ entre 4 y 8 $\mu$M de $Cd^{2+}$ es sólo accesible para la reacción completa en presencia de $Na^+$ y $K^+$. Para las otras reacciones parciales en presencia de uno solo de los cationes monovalentes sólo se muestran grupos de menor sensibilidad ($K_{iap}$ de 30 a 90 $\mu$M), es decir, un orden de magnitud mayor al valor de alta afinidad.

## Reversión de la inhibición de las actividades de la ATPasa

Ya que como se indicó previamente, el cadmio reacciona con grupos sulfhidrilo, se decidió estudiar si los efectos de inhibición son reversibles; para ello se emplearon agentes quelantes de los cationes divalentes tales como EDTA y EGTA, y reactivos para grupos sufhidrilo como son el $\beta$-Mercaptoetanol y el Ditiotreitol (DTT).

En la figura 9 se puede observar que para las dos actividades enzimáticas hay un mayor efecto de reversión de la inhibición por el DTT cuando se utiliza la enzima inhibida por el complejo ($Cd^{2+}$ +o-F), mientras que cuando se emplea la enzima inhibida por el cadmio solo hay un mayor efecto del EDTA en éste, alcanzándose una reversión de la inhibición del 40% para la ATPasa de ($Na^+$ + $K^+$) y un 20% para la ATPasa de $Na^+$.

En la figura 10-A se muestra que la inhibición producida por el cadmio solo, fue revertida por la presencia de DTT para la fosfatasa de $K^+$, y por el EGTA en la fosfatasa de $Na^+$; mientras que en la sección 10-B se observa que en la inhibición producida por el complejo ($Cd^{2+}$ +o-F) en ambas reacciones enzimáticas, no se logró un efecto significativo de reversión por ninguno de los cuatro reactivos utilizados para ello.

FIGURA 9

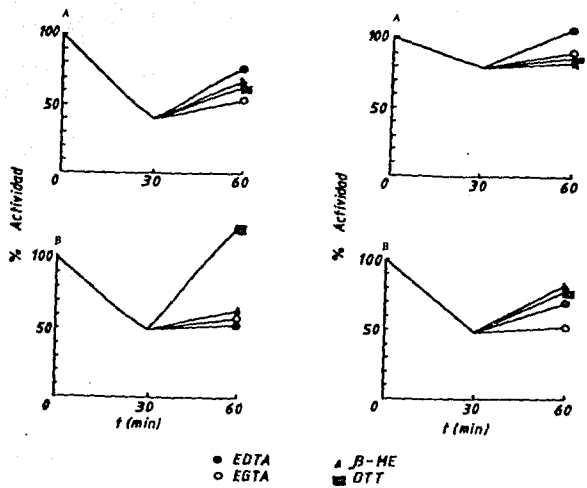



FIGURA 9

REVERSION DE LA INHIBICION PRODUCIDA POR Cd (80 $\mu$M) EN A Y CADMIO (80 $\mu$M) + o-F (500 $\mu$M) EN B; DEL LADO IZQUIERDO PARA LA ACTIVIDAD DE ATPasa DE ($Na^+ + K^+$) Y DEL DERECHO PARA LA ATPasa DE $Na^+$. UTILIZANDO LOS REACTIVOS PARA GRUPOS TIOLES: $\beta$-MERCAPTOETANOL ($\beta$ -ME) Y DITIOTREITOL (DTT), ASI COMO LOS QUELANTES DE CATIONES: EDTA Y EGTA.

FIGURA 10

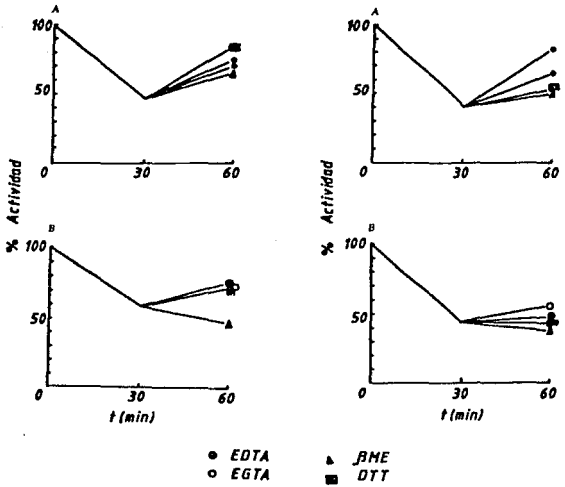



FIGURA 10

EFECTO DE LA REVERSION DE LA INHIBICION EN FOSFATASA DE $K^+$ (LADO IZQUIERDO) Y FOSFATASA DE $Na^+$ (LADO DERECHO) CON CONCENTRACIONES EN A DE Cd (80 $\mu$M) Y EN B Cd (80 $\mu$M) + o-F (500 $\mu$M). AÑADIENDO EN AMBOS CASOS LOS REACTIVOS PARA GRUPOS TIOLES $\beta$-MERCAPTOETANOL Y DTT ASI COMO LOS AGENTES QUELANTES DE CATIONES: EDTA Y EGTA.

## Titulación de grupos tioles

Como algunas de las inhibiciones se revirtieron parcialmente por los reactivos para los grupos tioles (DTT y $\beta$-mercaptoetanol), se pensó que probablemente el cadmio y el complejo ($Cd^{2+}$ +o-F) podrían afectar algunos de los grupos tioles presentes en la enzima, por lo que se procedió a realizar la titulación de dichos grupos con un reactivo específico, el ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico (DTNB) en presencia de SDS (fig. 11-A). Los resultados mostraron dos tipos de grupos tioles, unos que se titulan rápidamente y otros que aparecen tardíamente. Los primeros son los más expuestos y los segundos los ocultos y que sólo aparecen al ser desnaturalizada la proteína por el SDS Cabe recordar que la subunidad $\alpha$ de la enzima posee 34 grupos -SH, de los cuales sólo 12 reaccionan con DTNB. En la subunidad glicoproteica $\beta$ se encuentran dos grupos -SH y son inaccesibles sin la utilización de detergentes. El resto de los grupos presentes en la subunidad $\alpha$ y $\beta$ son titulados lentamente. También se llevó a cabo la titulación de los grupos -SH en presencia del complejo ($Cd^{2+}$ +o-F) en la ATPasa de ($Na^+$ + $K^+$); mostrando los resultados en la siguiente tabla:

TITULACION DE GRUPOS -SH DE LA ATPasa DE ($Na^+$ + $K^+$) DE RIÑON CON DTNB (P.M. 250 000 D)

| | mol -SH/mol de enzima |
|---|---|
| ATPasa | 3.50 |
| ATPasa + SDS | 17.50 |
| ATPasa + $Cd^{2+}$ + o-F | 1.25 |

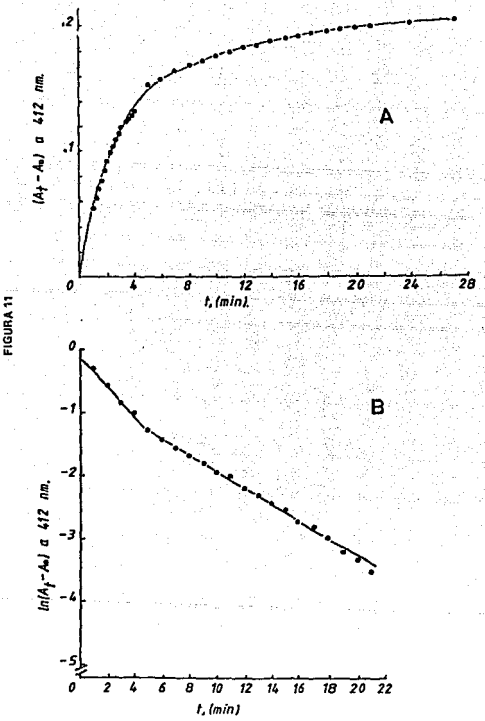



FIGURA 11

CURVA DE REACCION DE ATPasa CON SDS PARA EXPONER LOS GRUPOS -SH CON DTNB, EMPLEANDO 0.5 $\mu$g/ml DE ENZIMA (PARTE SUPERIOR) Y TITULACION DE GRUPOS -SH DE FORMA RAPIDA Y LENTA (PARTE INFERIOR).

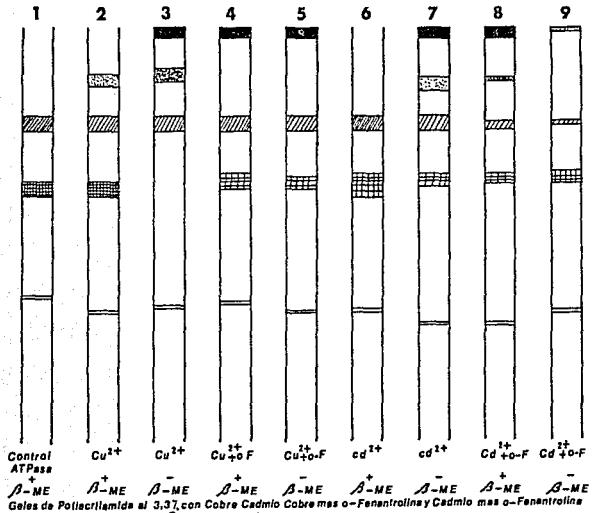
En la figura 11-B se representa el logaritmo natural de la diferencia de absorción a 412 nm contra el tiempo. Donde se aprecian dos pendientes con un valor aproximado en la primera de una p=-0.25 y la segunda de una p=-0.13, que muestran la presencia de dos grupos -SH diferentes, obteniendo un total de 17.5 mol de -SH titulados por molécula. Por el mismo procedimiento se utilizó ATPasa sin añadir SDS para cuantificar el número de grupos -SH libres presentes en la parte externa de la enzima, encontrándose que son 3.5 mol -SH/mol de enzima como se muestra en la misma tabla.

Para observar el efecto del complejo ($Cd^{2+}$ + o-F) se añadió cadmio 80 $\mu$M y o-F 0.5 mM preincubando 60 minutos y determinando el número de grupos tioles con DTNB 0.2 mM. Se encontró la existencia de 1.25 mol -SH/mol de enzima, que es aproximadamente 2 mol de -SH menos que en la ATPasa sin SDS; indicando con ello la posible unión del complejo con los grupos -SH.

## Electroforesis

La función del SDS en los geles de acrilamida es desnaturalizar los dímeros o tetrámeros ($\alpha\alpha$, $\alpha\beta$ o $\beta\alpha\alpha\beta$) que forman la estructura de la ATPasa; las reacciones descritas en Material y Métodos se realizan en ausencia de oxígeno atmosférico debido a que los grupos sulfhidrilo de las cisteínas se pueden oxidar y formar puentes disulfuro. Y como lo que se propone es observar las bandas de otro peso molecular debido a la presencia del cobre y el cadmio con y sin o-fenantrolina, es necesario asegurar la no oxidación de dichos grupos sulfhidrilo. Además la adición del $\beta$-ME, que es un agente reductor, escindirá los puentes disulfuro existentes; por lo que en asusencia de dicho compuesto se podrá

FIGURA 12




Geles de Poliacrilamida al 3,3% con Cobre Cadmio Cobre mas o-Fenantrolina y Cadmio mas o-Fenantrolina en Presencia o Ausencia de β Mercaptoetanol

observar la formación de bandas proteicas de peso molecular diferente, posiblemete por la formación de puentes -S-S- ya sea intra o intermoleculares. La figura 12 esquematiza los resultados obtenidos.

En el gel número 2 se observa que en presencia del cadmio existe la aparición de una banda con un peso molecular mayor a 100 000. En el gel número 3 en el que no hay $\beta$-ME se forman bandas todavía de mayor peso molecular, con una disminución considerable de la subunidad glicoproteica $\beta$.

Para los geles 4 y 5 en los que se empleó el complejo ($Cu^{2+}$ + o-F) con y sin $\beta$-ME respectivamente, se muestra la existencia de bandas proteicas de alto peso molecular con una visible disminución de ambas unidades $\alpha$ y $\beta$; coincidiendo con lo reportado en las referencias 42 al 46.

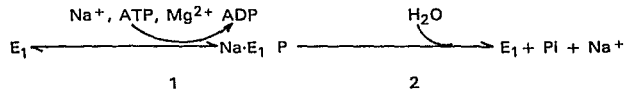
El resultado mostrado en el gel número 6 con $Cd^{2+}$ nos indica que no hay nuevas bandas proteicas en presencia de $\beta$-ME, por lo que se puede pensar que no hubo formación de puentes disulfuro intercadenas. Lo que no sucede en ausencia de $\beta$-ME (gel núm. 7) en el que existen nuevas bandas de un peso molecular mayor a 100 000.

Por último, lo mostrado en los geles 8 y 9 con el complejo ($Cd^{2+}$ + o-F) con y sin $\beta$-ME respectivamente, indica la existencia de proteínas de peso molecular alto, sugiriendo con ello, la formación de puentes disulfuro que no fueron escindidos en presencia de $\beta$-ME.

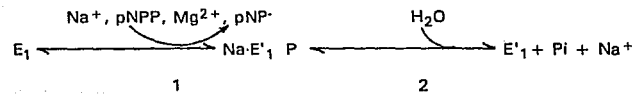
## Discusión

Los resultados obtenidos muestran que la ATPasa de ($Na^+ + K^+$) es sensible al cadmio. Sin embargo no todas las actividades que puede realizar la ATPasa son igualmente sensibles, ya que como vimos, el cadmio afecta principalmente la actividad total.

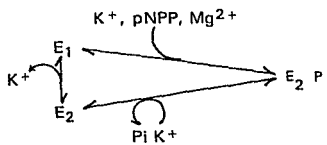
El ciclo de reacción de la ATPasa puede estudiarse parcialmente en sectores más o menos delimitados, así la ATPasa dependiente de $Na^+$ y $Mg^{2+}$ estudia los pasos siguientes:



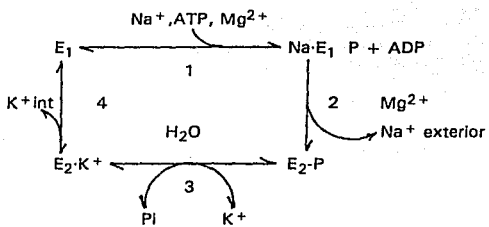

La fosfatasa dependiente de $Na^+$ y de $Mg^{2+}$ realiza las siguientes etapas:




La fosfatasa dependiente de $K^+$ y de $Mg^{2+}$ se activa en las etapas siguientes:



El conjunto de las etapas puede estudiarse con el empleo del medio completo: ATP, $Na^+$, $K^+$ y $Mg^{2+}$:




Al estudiar las inhibiciones relativas de esas actividades por la presencia del $Cd^{2+}$ se observó que las actividades hidrolíticas dependientes de $Na^+$ son poco afectadas por la concentración creciente del catión, lo que indica que estas reacciones no implican cambios importantes en las cadenas $\alpha$ y $\beta$ de la bomba de sodio o que no dependen de la integridad de algunos grupos -SH.

La actividad dependiente de $K^+$ se afecta más que la dependiente de $Na^+$, pero aunque tiene una $K_{iap}$ más pequeña, la inhibición no progresa más del 60% (fig. 6).

Como se observó en dicha figura solamente la actividad dependiente de $Na^+$ y $K^+$ es la más afectada, ya que se obtiene la inhibición casi completa. Este tipo de comportamiento puede interpretarse en función de las diferentes etapas que siguen cada una de las actividades, en las que se produce el cambio de conformación que corresponde con el cambio de orientación de los sitios internos de alta afinidad por el $Na^+$ hacia sitios externos de baja afinidad, es

decir, la etapa de transporte de $Na^+$ a través de la membrana, es la que se muestra más afectada. Este comportamiento está de acuerdo con los trabajos de Robinson (53) que indican que el efecto de la N-etilmaleimida sobre los grupos -SH afecta principalmente esta etapa de la reacción.

El efecto del complejo ($Cd^{2+}$-o-F) es similar al observado por efecto del $Cd^{2+}$ solo. Se observa en las figuras 7 y 8 que la más afectada sigue siendo la actividad total y en menor escala las actividades dependientes de $Na^+$ o de $K^+$, siendo esta última la menos afectada con una $K_{Iap}$ más alta y una inhibición en menor proporción que las otras actividades.

Podemos proponer que la actividad del cadmio sobre los grùpos -SH afecta la estructura secundaria y terciaria de la ATPasa en la etapa crucial del transporte $Na^+$.

El $Cd^{2+}$ no sólo reacciona con los grupos -SH sino que puede interacionar con los grupos carboxílicos cargados negativamente, sin embargo este efecto a nivel iónico debe ser reversible cuando se elimina el $Cd^{2+}$ con cualquiera de los agentes quelantes o los mercaptanos. Como hemos visto en los resultados de las figuras 9 y 10, el efecto del $Cd^{2+}$ con y sin o-F es poco reversible, lo que apunta hacia la idea de que el efecto de dicho metal sobre la ATPasa debe ser principalmente sobre los grupos -SH y que su efecto al modificar la proteína produce cambios de estructura que son irreversibles.

La titulación con DTNB nos permitió mostrar que el $Cd^{2+}$ modifica los grupos -SH accesibles, reforzando nuestra idea que son estos grupos los que sufren la modificación por el catión.

El efecto del complejo se ha descrito como entrecruzador de los grupos -SH cercanos (46 y 47). Si el entrecruzamiento se produce de forma intramolecular debe existir poca diferencia en el patrón electroforético de la ATPasa en presencia de SDS y en ausencia de $\beta$-ME. Si por el contrario los

entrecruzamientos son intermoleculares, el patrón electroforético debe modificarse y algunas de las subunidades deben disminuir en cantidad y presentarse una banda de mayor peso molecular. El hecho que la modificación producida por el cadmio es semejante a la que produce el cobre o el complejo ($Cu^{2+}$-o-F) sugiere el entrecruzamiento entre grupos -SH de moléculas vecinas y que la subunidad más afectada es la $\alpha$, lo que provocaría el entrecruzamiento entre subunidades semejantes y que estén cercanas al rededor de unos 3 Amstrongs como sugiere Nakamura (50).

En conclusión el cadmio es un catión que afecta a la ATPasa dependiente de $Na^+$ y de $K+$, del riñón de perro, modificando su actividad de forma irreversible. Como el cadmio tiende a acumularse en el riñón en ausencia de la metalotioneína, nuestro estudio sigiere un efecto a largo plazo sobre las propiedades de filtración y de recuperación del $K^+$ y la eliminación del exceso de $Na^+$ al inhibirse la "bomba de $Na^+$ y $K^+$".

## REFERENCIAS

1. NECHAY, B. R.; Saunders, J. P. Inhibitory characteristics of cadmium, lead and mercury in human sodium and potassium dependent adenosinetriphosphatase preparations. J. Environ. Pathol. Toxicol. 2: 283-290 (1978).

2. SCOTT, R.; Cunningham, C.; McLelland, A.; Fell, G.S.; Fitzgerald-Finch, O. P.; McKellar, N. The importance of cadmium as a factor in calcified upper urinary tract stone disease-a prospective 7 year study. Brit. J. Urol. 54: 584-589 (1982).

3. GONICK, H. C.; Indraprasit, S.; Rosend, B. J.; Neustein, H.; Van de Valde, R.; Raghavan, S. R. V. Experimental Fanconi syndrome. III. Effect of cadmium on renal tubular function, the ATP-Na-K-ATPase transport system and renal tubular ultraestructure. Min. Electrol. Metab. 3: 21-35 (1980).

4. TUCKER, R. K. Effects of in vivo cadmium exposure on ATPases in grill of the lobster, Homarus americanus. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 23: 33-35 (1979).

5. AHAMMADSAHIB, K. I.; Jinna, R. R.; Desaiah, D. Protection against cadmium toxicity and enzime enhibition by dithiothreitol. Cell. Biochem. Funct. 7: 185-192 (1989).

6. EMMERSON, B. T.; Beerson, P. B. Nefropatía tóxica. Tratado de Medicina Interna de Cecil (Nueva Editorial Interamericana) México, D.F. 1705-1714 (1983).

7. DHAVALE,D.M.; Masurekar,V.B.; Giridhar,B.A. Cadmium induced inhibition of $Na^+/K^+$ ATPase activity in tissues of crab Scylla serrata (Forskal). Bull. Environ. Contam. Toxicol. 40: 759-763 (1988).

8. MULLER, O. Cadmium induced alteration of the energy level in isolated hepatocytes. Toxicology 31: 297-306 (1984).

9. RAJANNA, B.; Habson, M.; Bausal, S.K.; Desaiah, D. Effect of cadmium chloride on rat brain synaptosomal ATPases (cadmium inhibition of ATPase activities). Toxicol. Letters 18: 331-336 (1983).

10. SUMIDA, M.; Hamada, M.; Takenaka, H.; Hirata, Y.; Neshigauchi, K.; Okuda, H. $Ca^{2+}$, $Mg^{2+}$-ATPase of microsomal membranes from bovine aortic smooth muscule: effects of $Sr^{2+}$ and $Cd^{2+}$ uptake and formation of the phosphorilate intermediate. J. Biochem. 100: 765-772 (1986).

11. STEPHEN M. Diccionario de Química. Ed. Atlante. México. D.F. 186-188 (1953).

12. KAZANTZIZ, G. Cadmium nephrophaty. Contr. Nephrol. 16: 161-166 (1979).

13. BERNARD, A.; Lauwerys, R. Cadmium in human population. Part. III: Cadmium and human health. Experientia (Suppl) 50: 114-123 (1986).

14. SHERLOCK, J. C. Cadmium in human health. Cadmium in food and the diet. Experientia (Suppl) 50: 110-114 (1986).

15. RYAN, J. A.; Pahren, H. R.; Lucas, J. B. Controlling cadmium in the human food chain: A review and rationale based of health effects. Environ. Res. 28: 251-302 (1982).

16. SHUKLA, G. S.; Singhal, R. L. The present status of biologycal effects toxic metals in the environment: lead, cadmium and manganesium. Can. J. Physiol. Pharmacol. 62: 1015-1031 (1984).

17. SHAIKH, Z. A.; Smith, L.M. Biologycal indicators of Cd exposure and toxicity. Part III: Cadmium and Human Health. Experientia (Suppl) 50: 124-130 (1986).

18. MEISINGER, V.; Harmuth, P.; Jahn, O.; Lachnit, B. Concentrazione del cadmio nel sangue in soggetti fumatori e non fumatori non professionalmente esposti al metallo. Med. Laboro 74: 30-37 (1983).

19. HALL, C.E. Influence of dosage, consciousness, and nifedipine on the acute pressor response to intraperitoneally administered cadmium. J. Toxicol. Environ. Healt 9: 953-962 (1982).

20. SUZUKI, Y. Cadmium, cooper and zinc distribution in blood of rats after long term cadmium administration. J. Toxicol. Environ. Health 7: 251-262 (1981).

21. NICHOLLS, D. M.; Teichert-Kuliszewska, k.; Kuliszewski, M.J. The activity of membrane enzimes in homogenate fractions of rat kidney following the administration of cadmium. Toxicol. Applied Pharmacol. 61: 441-450 (1981).

22. CARSON, S. D. Cadmium binding to human $\alpha_2$-macroglobulin. Biochim. Biophys. Acta 791: 370-374 (1984).

23. NORDBERG, G.F. Chelating agents and Cd toxicity: problems and prospects. Environ. Health Perspect. 54: 213-218 (1984).

24. SUZUKI, Y. Studies of Cd uptake and metabolism by the kidney. Environ. Health Perspect. 54: 21-30 (1984).

25. NOLDBERG, M. General aspects of Cadmium: Transport, uptake and metabolism by the kidney. Environ. Health Perspect. 54: 13-20 (1984).

26. ELLIS, K. J.; Morgan, W. D.; Zanzi, I.; Yazumura, S.; Vartsky, D.; Cohn, S. H. Critical concentrations of cadmium in human renal cortex: dose-effect studies in cadmium smelter workers. J. Toxicol. Environ. Health 7: 691-703 (1981).

27. KULISZEWSKI, M. J.; Nicholls, D. M. The effect of cadmium on kidney ribosomes. Chem. Biol. Interactions 33: 307-318 (1981).

ESTA TESIS NO DEBE

28. NAKAZAWA, H.; Masuzawa, Y.; Waru, K. The chemical form of cadmium in microsomal and mitochondrial fractions from rat liver and kidney after long term administration of cadmium. Toxicol. Letters 7: 297-304 (1981).

29. VALLEE, B. L.; Ulmer, D. D. Biochemical effects of mercury, cadmium and lead. Ann. Rev. Bichem. 41: 91-128 (1972).

30. NOGAWA, K.; Kobavashi, E.; Honda, R.; Ishizaki, A.; Kawanu, S.; Matsuda, H. Renal disfunctions of in habitants in a cadmium-polluted area. Environ. Res. 23: 13-23 (1980).

31. SKOU, J. C. The influence of some cations on an adenosine triphosphatase from peripheral nerves. Biochim. Biophys. Acta 23: 394-401 (1957).

32. HOLGUIN, J.A.; Sierra, M. Acción de los digitálicos sobre la ATPasa de ($Na^+ + K^+$). Mensaje bioquímico IV: 49-92 (1981).

33. KYTE, J. Purification of the sodium and potassium dependent ATPase from canine renal medula. J. Biol. Chem. 246:4157-4165 (1971).

34. PERRONE, J.R.; Hackney, J.F.; Dixon, J.F.; Hokin, L.E. Molecular properties of purified sodium+potassium activated adenosine triphosphatases and their subunitis from the rectal gland of Squalus acanthias and the electric organ of Electrophorus electricus. J. Biol. Chem. 250:4178-4184 (1975).

35. HOPKINS, B.E.; Wagner, H.Jr.; Smith, J.N. Sodium and potassium activated adenosine triphosphatase of the nasal gland of the duck (Anas platyrhynchos). J. Biol. Chem. 251:4365-4371 (1976).

36. PITTS, B.J.R.; Schuartz, A. Improved purification and partial characterization of ($Na^+ + K^+$)-ATPase from cardiac muscule. Biochim. Biophys. Acta 401: 184-195 (1975).

37. CARAFOLI, E.; Scarpa, A. Transport ATPases. Ann. N. Y. Acad. Sci. 402: 99-115 (1982).

38. ASKARI, A. Properties and functions of ($Na^+ + K^+$)-activated adenosinetriphosphatase. Ann. N. Y. Acad. Sci. 242: 12-133 (1974).

39. ESMANN, M. Sulphidryl groups of ($Na^+ + K^+$)-ATPase from rectal glands of Squalus acanthias. Detection of ligand-induced conformational changes. Biochim. Biophys. Acta 688: 260-270 (1982).

40. SCHOOT, B.M.; VanEmst-DeVries, S.E.; Van Haard, P.M.M.; De Pont, J.J.H.H.M.; Bonting, S.L. Studies on ($Na^+ + K^+$)-activated ATPase. Effect of cation induced conformational changes on sulphidryl group modification. Biochim. Biophys. Acta 602: 144-154 (1980).

41. SCHOOT, B.M.; De Pont, J.J.H.H.M.; Bonting, S.L. Studies on ($Na^+ + K^+$)-activated ATPase. XLII. Evidence for two clases of essential sulphidryl groups. Biochim. Biophys. Acta 522: 602-613 (1978).

42. HUANG, W.; Askari, E. ($Na^+$ + $K^+$)-ATPase: Effects of detergents on the cross-linking of subunities in the presence of $Cu^{2+}$ and o-phenantroline. Biochim. Biophys. Acta 578: 522-547 (1979).

43. GIOTTA, G. J. The effect of $(o\text{-phenantroline})_2$-cupric sulfate on several properties associated with ($Na^+$ + $K^+$)-dependent adenosinetriphosphatase. Arch. Biochem. Biophys. 180: 504-508 (1977).

44. QUE, B. G.; Downey, K.M.; So, A.G. Degradation of deoxirribonucleic acid by 1,10-phenantroline-cooper complex: the role of hidroxil radicals. Biochemistry 19: 5987-5991 (1980).

45. GIOTTA, G. J. Quaternary structure of ($Na^+$ + $K^+$)-dependent adenosinetriphosphatase. J. Biol. Chem. 251: 1247-1252 (1976).

46. HUANG, W.; Askari, A. $Na^+$, $K^+$-ATPase: on the nature of the "cross-linked" subunities obtained in the presence of o-phenantroline and cupric ion. Biochem. Biophys. Res. Commun. 82: 1314-1319 (1978).

47. HUANG, W.; Askari, A. ($Na^+$ + $K^+$)-ATPase: Phosphorilation-dependent cross-linking of the a-subunities in the presence of $Cu^{2+}$ and o-phenantroline. Biochem. Biophys. Acta 645: 54-58 (1981).

48. JORGENSEN, P.L. Purification and Characterization of $Na^+$,$K^+$-ATPase III. Biochim. Biophys. Acta 356: 36-52 (1974).

49. LOWRY, O.H., Rosebrough, L.J.; Farr, A.L.; Randall, R.J. Protein determination using the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193: 265-275 (1951).

50. NAKAMURA, J.; Wang, T.; Tsai, L.I.; Schuartz, A. Propieties and characterization of a higly purified sarcoplasmic reticulum $Ca^{2+}$-ATPase from dog cardiac and rabbit skeletal muscule. J. Biol. Chem. 258: 5079-5083 (1983).

51. TANNSKY, H.H.; Shorr, E. A microcholorimetric method for the determination of inorganic phosphorus. J. Biol. Chem. 202: 675-685 (1953).

52. BOYNE, A.F.; Ellman, G.L. A methodology for analysis of tissue sulphidryl components. Anal. Biochem. 46: 639-653 (1972).

53. ROBINSON, J. D.; Flashner, M.S. The $(Na^+ + K^+)$ - activated ATPase. Enzimatic and transport properties. Biochim. Biophys. Acta 549: 145-176 (1979).

54. HARRIS, W.E.; Sthal, W.L. Organization of thiol groups of electric-eel electric-organ sodium-plus-potassium ion-stimulated adenosinetriphosphatase studied with bifunctional reagents. Biochem. J. 185:787-790 (1980).

55. LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227:680-685 (1970).