

Tesis de Posgrado

Variaciones en la cinética enzimática de membranas deficientes en grasas

Goldemberg, Adriana Lía

1971

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Químicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Goldemberg, Adriana Lía. (1971). Variaciones en la cinética enzimática de membranas deficientes en grasas. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1391_Goldemberg.pdf

Cita tipo Chicago:

Goldemberg, Adriana Lía. "Variaciones en la cinética enzimática de membranas deficientes en grasas". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1971. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1391_Goldemberg.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

VARIACIONES EN LA CINETICA ENZIMATICA DE MEMBRANAS DEFICIENTES EN GRASAS

Tesis para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires



- 1.391 -
EJ: 2

Por

Adriana Lfa Goldemberg

Buenos Aires, República Argentina

1971

o

A mis padres,
a mi esposo,
a mis hijos.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se realizó en el Centro de Investigaciones Microbiológicas de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires y en la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Nacional de Córdoba.

Al Dr. Raúl E. Trucco, Director del trabajo, mi sincero reconocimiento por su guía, apoyo y estimulante ejemplo.

Al Dr. Ricardo N. Farías por el aporte de sus conocimientos y de su colaboración durante la realización del trabajo de tesis.

A los integrantes del grupo de investigación del laboratorio por las fructíferas discusiones.

A la Sra. Martine Louis de Siñeriz por su eficaz tarea en la copia a máquina del manuscrito.

INDICE DE CONTENIDOS

	Página
Indice de Tablas	ii
Indice de Ilustraciones	iii
CAPITULO I. Introducción	1
CAPITULO I I. Materiales y Métodos	4
CAPITULO I I I. Resultados y Discusión	14
CAPITULO I V. Discusión General	77
Bibliografía	80

INDICE DE TABLAS

Tabla	Página
I. Inhibición por F^- de la ATPasa de ghost de eritrocitos de rata	16
I I. Efecto del pH en la inhibición por F^- de la ATPasa	18
I I I. Efecto de (Mg^{2+}) en la inhibición por F^- de la ATPasa	20
I V. Carácter reversible de la inhibición por F^- de la ATPasa	21
V. Influencia en el n de la ATPasa por adiciones a la dieta comercial	23
V I. ATPasa de ratas alimentadas con dieta comercial. Acción del cambio a dieta de composición definida	24
V I I. n de ATPasas de ratas suficiente y deficiente en grasas, respectivamente	35
V I I I. Cambio de dieta deficiente a suficiente en grasas. Valor del n	36
I X. n de ATPasas de membranas en dieta suficiente y deficiente en grasas	44
X. Solubilización de la ATPasa de microsomas de corazón de rata	49
X I. Activación por cationes de ATPasa de ratas en dieta suficiente en grasas	52
X I I. Activación por cationes de ATPasa de ratas en dieta deficiente en grasas	54
X I I I. Inhibición por F^- de la p-NPPasa de eritrocitos de rata	60
X I V. Inhibición por F^- de la p-NPPasa (K^+) a varias (K^+)	63
X V. Activación por K^+ de la p-NPPasa (Mg^{2+})	67
X V I. E_a (energía de activación)	73
X V I I. Activación por K^+ de la p-NPPasa (Mg^{2+}) a distintas temperaturas	74

INDICE DE ILUSTRACIONES

Figura	•	Página
1	Hidrólisis del p-Nitrofenolfosfato en función del tiempo	13
2	K_m de ATP-Mg en la ATPasa Total	15
3	Acción de F^- sobre la ATPasa (Mg^{2+}) en las dos dietas	26
4	Acción de F^- sobre la ATPasa Total en las dos dietas	27
5	Acción de F^- sobre las ATPasas en presencia de ouabafna en dieta suficiente,	30
6	Acción de F^- sobre las ATPasas en presencia de ouabafna en dieta deficiente	31
7	Coeficiente de Hill para la ATPasa ($Na^+ + K^+$) en ambas dietas	33
8A	Acción de F^- en las ATPasas de riñón de ratas suficientes en grasas	38
9A	Acción de F^- en las ATPasas de corazón de ratas suficientes en grasas	39
10A	Acción de F^- en las ATPasas de cerebro de ratas suficientes en grasas	40
8B	Acción de F^- en las ATPasas de riñón de ratas deficientes en grasas	41
9B	Acción de F^- en las ATPasas de corazón de ratas deficientes en grasas	42
10B	Acción de F^- en las ATPasas de cerebro de ratas deficientes en grasas	43
11	Acción de F^- sobre la ATPasa de microsomas de corazón tratados con digitonina	48
12	Activación de la ATPasa ($Na^+ + K^+$) por Na^+ a 200 mM K^+	51
13	Activación de la ATPasa ($Na^+ + K^+$) por K^+ a 200 mM Na^+	53
14	K_m del p-NPP Tris para la p-NPPasa	59
15	Acción de F^- sobre las p-NPPasas de ratas en ambas dietas	61
16	Activación por K^+ de la p-NPPasa (Mg^{2+}) de ratas en ambas dietas	64

Figura		Página
17	Efecto del pH sobre las p-NPPasas de ratas	66
18	Activación de la p-NPPasa (Mg^{2+}) por (K^+). Acción de F^-	69
19	Efecto de la temperatura sobre la p-NPPasa de ratas	72

CAPITULO I

INTRODUCCION

El sistema enzimático llamado Adenosintrifosfatasa (ATPasa) está ligado estrechamente con las membranas celulares. Desde que fuera descubierto por J. C. Skou se haq descrito preparaciones enzimáticas principalmente de microsomas (1), membranas celulares y fragmentos de membranas (2,3).

Trabajos previos realizados en nuestro laboratorio en eritrocitos de ratas alimentadas con una dieta de composición definida, mostraron que el F^- inhibe alostéricamente a la ATPasa unida a la membrana de los eritrocitos. Si las ratas se han criado con una dieta comercial compleja, la cinética de la inhibición por F^- es distinta con un grado de cooperatividad significativamente menor (4).

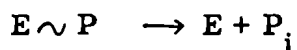
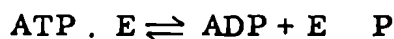
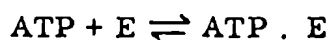
Estos dos tipos de comportamiento, con dietas diferentes, se observaron en las ATPasas (Mg^{2+}) dependientes, ATPasa ($Na^+ + K^+ + Mg^{2+}$) y en la ATPasa ($Na^+ + K^+$). *

En experimentos posteriores el agregado de grasa de cerdo y/o aceite de hígado de bacalao a la dieta comercial mostró resultados cinéticos análogos a los encontrados con la dieta de composición definida. Y al revés, en ratas crecidas con la dieta de composición definida pero privadas de estos dos componentes, la inhibición por F^- de la ATPasa fué similar a la observada con la dieta comercial. Estos resultados sugirieron que los cambios cinéticos podfan estar relacionados con las grasas de la dieta. Concretamente, la dieta comercial serfa un ejemplo de dieta deficiente en grasas frente a la definida, suficiente

o suplementada de grasas.

Esta tesis está orientada a estudiar más profundamente los hallazgos arriba descritos e intentar relacionarlos con un modelo de comportamiento de la ATPasa y de enzimas relacionadas, según se encuentren en membranas de ratas deficientes o suficientes en grasas. A lo largo del trabajo se han utilizado la dieta suplementada en grasas y la misma pero sin el agregado de grasas y se las ha identificado como dietas control y deficiente en grasas, respectivamente.

J. C. Skou ha propuesto para explicar el mecanismo de acción de la ATPasa, la formación de un intermediario donde hay enzima unida a un fosfato rico en energía $E \sim P$:



El Na^+ estimularía la formación del intermediario fosforilado y el K^+ su hidrólisis (5). Este esquema tiene similitudes con otros (6,7,8) en cuanto a los roles para Na^+ y K^+ y en la formulación de un intermediario fosforilado.

Las preparaciones de ATPasa catalizan la hidrólisis activada por K^+ de varios fosfatos orgánicos simples: glicerofosfato, p-nitrofenilfosfato, acetilfosfato (9 - 12). Si bien hay diferencias en ciertas propiedades de la actividad ATPásica y de la actividad fosfatásica, los trabajos recientes propugnan que la fosfatasa estimulada por K^+ es verdaderamente una reacción parcial de la ATPasa ($Na^+ + K^+$) (13) en donde la fosfatasa actuaría sobre la proteína fosforilada por ATP quién sería el sustrato de la enzima. La fosfatasa tendría

facultades de traslocar K^+ de afuera hacia adentro (14).

En esta tesis se estudiaron también las actividades fosfatásicas en las dietas normal y deficiente en grasas ya que era dable suponer que la fosfatasa como parte integrante del sistema ATPasa tenía posibilidades de mostrarse diferente también.

Los experimentos cinéticos proveen datos donde explicaciones alternativas pueden muy bien darse. En la fosfatasa, además de los parámetros cinéticos se midieron energías de activación y se graficó según Arrhenius intentando correlacionar los datos termodinámicos con los cinéticos.

* ATPasa (Mg^{2+}) = Adenosíntrifosfatasa dependiente de Mg^{2+} .

ATPasa ($Na^+ + K^+ + Mg^{2+}$) = Adenosíntrifosfatasa dependiente de Mg^{2+} y activada por $Na^+ + K^+$.

ATPasa ($Na^+ + K^+$) = Adenosíntrifosfatasa activada por $Na^+ + K^+$; se obtiene por diferencia de las dos anteriores.

CAPITULO I I

MATERIALES Y METODOS

1) Animales de experimentación : Se utilizaron ratas machos de una colonia iniciada con ratas Sprague Dawley provenientes del bioterio de Oklahoma Medical Research Foundation, Oklahoma City, Oklahoma, U. S. A.

A partir de los 20 días de edad se dividieron en dos lotes; uno recibió la dieta control o suficiente en grasas y el otro la dieta deficiente en grasas. Se utilizaron las ratas luego de 15 semanas, cuando el grupo que había recibido dieta libre de grasas mostraba los signos característicos de deficiencia; el crecimiento fué más lento que en los controles y desde la semana doceava el peso corporal había alcanzado un nivel estacionario a diferencia de las ratas controles que seguían creciendo. El peso promedio a las 15 semanas fué 270 g. en las ratas deficientes y 360 g. en las ratas controles. Las ratas deficientes mostraron decamaciones en la piel.

2) Composición de las dietas : La dieta básica usada por Caputto y col. (15) desprovista de aceite de hígado de bacalao y suplementada con 450 mg. de alfa tocoferol, 60 mg. de Vit. A y 6 m_g. de Vit. D₂, respectivamente, por kilo de dieta se usó como dieta suficiente en grasas

Como dieta deficiente en grasas se usó la misma dieta sin grasa de cerdo. En varios experimentos el aceite de maíz reemplazó a la grasa de cerdo.

Componentes de la dieta por kilo de dieta :

Caseína	140 g
Almídon	330 g
Azúcar	350 g
Mezcla de sales	25 g
Mezcla de vitaminas	10 g
Aceite de hígado de bacalao	15 g
Grasa de cerdo libre de alfa tocoferol	30 g
Aphacel (Cel ulosa sephacel)	10 g

Componentes de la mezcla de vitaminas para 1 kilo de dieta :

Azúcar	7,8 g
Cloruro de colina	1 g
Inositol	1 g
Nicotinamida	200 mg
Pantotenato de calcio	10 mg
Piridoxina	5 mg
Tiamina	5 mg
Riboflavina	5 mg
Acido fólico	5 mg
2-metilnaftoquinona	0,250 mg
Biotina	0,050 mg
Vitamina B₁₂	0,045 mg

Las vitaminas A y D están presentes en las cantidades necesarias, en el aceite de hígado de bacalao.

Componentes de la mezcla de sales para 1 kilo de dieta :

Carbonato de calcio	13,6 g
Fosfato monopotásico	5,5 g
Cloruro de potasio	2,8 g
Cloruro de sodio	1,7 g
Carbonato de magnesio	520 mg
Sulfato de magnesio	400 mg
Fosfato férrico	350 mg
Fluoruro de sodio	25 mg
Sulfato de cobre	22,5 mg
Cloruro manganoso	8,7 mg
Sulfato de aluminio y potasio	4,2 mg
Ioduro de potasio	2 mg

La dieta comercial Molinos Río de la Plata "Laboratorio" contiene los siguientes componentes :

Componentes de la dieta por kilo de dieta :

Trigo	470 g
Avena	400 g
Harina de carne	80 g

Leche desecada	30 g
Levadura de panaderfa desecada	10 g
Cloruro de sodio	10 g

La dieta se encuentra suplementada por kilo de dieta con las siguientes vitaminas :

Nicotinamida	5 g
Citrato de colina	1,6 g
Pantotenato de calcio	1,5 g
Tiamina	900 mg
Acetato de alfa tocoferol	500 mg
Riboflavina	150 mg
Vitamina K ₁	10 mg
Vitamina B ₁₂	0,5 mg
Vitamina A	400.000 I. U.
Vitamina D	2.150 I. U.

Los animales bebieron agua desionizada.

3) Obtención del ghost de glóbulos rojos : Se obtuvo sangre por punción cardíaca que se recibió en frío en un tubo que contenfa 0,1 ml. de heparina por cada 10 ml. de sangre (Heparina: 100 mg./10 ml. de solución fisiológica). Se lavó tres veces con ClNa 0,9% en frío y con una pipeta Pasteur se sacó la cubierta superior de glóbulos blancos. Con los glóbulos rojos así obtenidos se prepararon los ghost de acuerdo al método de Dodge y col. (16). Se lavaron con una mezcla de buffer Imidazol (pH 7,5) 0,002 M; cistefna,

0,001 M y EDTA (Acido Etiléndiamintetracético) 0,002 M por dos veces y luego se resuspendieron en buffer Tris-ClH (pH 8,0) 0,05 M. Esta suspensión de ghost la denominaremos enzima.

4) Preparación de microsomas de riñón, cerebro y corazón : Se sacrificaron los animales con un golpe en la nuca, inmediatamente se los desangró por completo y se retiraron los órganos que se colocaron en hielo. Se trabajaron dentro de los 30 minutos de extraídos del animal.

a) Microsomas de riñón : Se prepararon según el método de Chignel y col. (17) modificado, usando buffer Tris-ClH (pH 7,2) 0,005 M; con sacarosa 0,25 M en presencia de 0,1% DOC (Deoxicolato de sodio) y EDTA 0,005 M.

Los microsomas se suspendieron en buffer Tris-ClH (pH 7,2) 0,005 M en presencia o no de sacarosa.

b) Microsomas de corazón : Se obtuvieron siguiendo el método de Brown (18) con las siguientes modificaciones : el corazón se maceró en 10 volúmenes de buffer Tris-ClH (pH 7,2) 0,1 M conteniendo 0,25 M de sacarosa. Se centrifugó el homogenato resultante a 600 x g por 20 minutos y el sobrenadante fue luego centrifugado a 10.000 x g por 30 minutos; 20.000 x g por 30 minutos; 80.000 x g por 30 minutos, descartando el precipitado en cada vuelta. El sobrenadante resultante fue centrifugado a 105.000 x g por 120 minutos y el precipitado obtenido resuspendido en buffer Tris-ClH (pH 7,2) 0,05 M con 0,25 M de sacarosa constituyó la enzima.

c) Microsomas de cerebro : Se obtuvieron microsomas a partir de homogenatos preparados en un medio de buffer Tris-ClH (pH 7,2) 0,05 M en presencia de sacarosa 0,25 M, 0,1% DOC y EDTA 0,005 M.

Se centrifugó a 600 x g por 20 minutos en una centrífuga refrigerada International y luego se efectuaron centrifugaciones a 10.000 x g por 30 minutos, 20.000 x g por 30 minutos; 80.000 x g por 30 minutos; y 105.000 x g por 90 minutos en una ultracentrífuga Beckman L-2. El precipitado resultante se resuspendió en buffer Tris-ClH (pH 7,2) 0,05 M en presencia de sacarosa 0,25 M.

Tanto el ghost de glóbulos rojos como los microsomas de los diferentes órganos se guardaron a -72°C y conservaron intacta la actividad de la enzima por varias semanas.

5) Determinación de la actividad de la enzima :

a) Glóbulos rojos : La actividad de la ATPasa se estimó determinando el P_i^{32} liberado de ATP^{32} marcado en P γ que se preparó siguiendo a Glynn y col. (19). La ATPasa total se determinó en la siguiente mezcla de incubación que se desarrolló en el transcurso del trabajo, fundamentalmente por haberse encontrado que el pH óptimo de la ATPasa de eritrocitos de rata se encuentra alrededor de 8,0 :

Buffer Tris-ClH (pH 8,0)	25 mM
Cl ₂ Mg	2 mM
ClNa	80 mM
ClK	33 mM
ATP ³² -Tris (50.000 cpm)	1 mM

Suspensión de ghost hasta completar un volumen final de 1 ml.

La mezcla se incubó a 37°C hasta 60 minutos. En estas condiciones no se hidrolizó más del 5% del ATP. La reacción se paró adicionando 1,5 ml de Isobutanol-Benceno mezclados en proporciones 1:1 (v/v) y se separó el P_i formado del ATP por conversión al complejo fosfomolibdico el cuál se extrajo de la fase acuosa con la mezcla Isobutanol-Benceno. A la mezcla inactivada se le agregó entonces 0,1 ml de SO₄H₂ 4,6 N que contenía 0,06 M PO₄HNa₂ como carrier y 0,1 ml de molibdato de amonio 15%. La mezcla se agitó, se incubó a 37°C por 60 segundos y luego se centrifugó por 15 minutos. Se pipeteó 1 ml del sobrenadante en 5 ml del líquido de centelleo según describen Bramwell y Harris (20). La radiactividad resultante se determinó en un contador de centelleo líquido Packard. La actividad se expresó como μ moles de PO₄⁻³ liberados/hora/mg. de proteína.

La ATPasa (Mg²⁺) se determinó con la misma técnica pero en ausencia de ClNa y de ClK en la mezcla de incubación. Cuando hubo modificaciones se indican en el texto.

b) Riñón : La ATPasa total se determinó en una mezcla de incubación similar a la usada para ghost de glóbulos rojos. El pH óptimo fué 7,4 y se incubó a 37°C hasta 8 minutos. El procedimiento continuó igual al desarrollado para ghost.

c) Corazón : Se midió la enzima en el siguiente medio de incubación :

ATP ³² -Tris (50.000 cpm)	1 mM
ClNa	1 mM
ClK	2 mM

Cl_2Mg 1 mM

Buffer Tris-ClH (pH 7,2) 25 mM

Suspensión de microsomas hasta un volumen final de 1 ml.

El resto del procedimiento efectuado es similar al método seguido para ghost de glóbulos rojos.

d) Cerebro : Se utilizó para medir la actividad enzimática una mezcla de incubación que contenía :

$\text{ATP}^{32}\text{-Tris}$ (50.000 cpm) 1 mM

Cl_2Mg 2 mM

ClNa 80 mM

ClK 30 mM

Buffer Tris-ClH (pH 7,4) 25 mM

Suspensión de microsomas hasta un volumen final de 1 ml.

Se incubó a 37°C hasta 30 minutos, tiempo durante el cuál la reacción fué lineal y se continuó como se ha descrito para ghost de glóbulos rojos.

6) Solubilización de la ATPasa de microsomas de corazón : El método desarrollado por Brown para solubilizar la enzima de corazón en conejos fué utilizado para los microsomas de corazón de ratas (21).

7) Determinación de proteínas : Se utilizó el método de Lowry y col. (22).

8) Determinación de la actividad fosfatásica en ghost de glóbulos rojos : Se siguió el método de J. D. Judah y col. (23) con p-Nitrofenilfosfato (sal de Tris) como sustrato.

Tris p-Nitrofenilfosfato (p-NPP Tris)	5 mM
Cl ₂ Mg	2,5 mM
ClK (cuando se agrega)	20 mM
Enzima en suspensión	0,5 ml

El volumen final fue 1 ml. Se incubó a 37°C hasta dos horas en que hubo linealidad de la velocidad de reacción con el tiempo (ver Figura 1) y se paró la reacción con TCA (Acido tricloroacético) en concentración 20%. Se adicionó 0,5 ml de Tris 2M a un mililitro del sobrenadante que se obtuvo de centrifugar el precipitado obtenido y se leyó a 420 mu en un espectrofotómetro el color amarillo desarrollado proveniente del p-Nitrofenol.

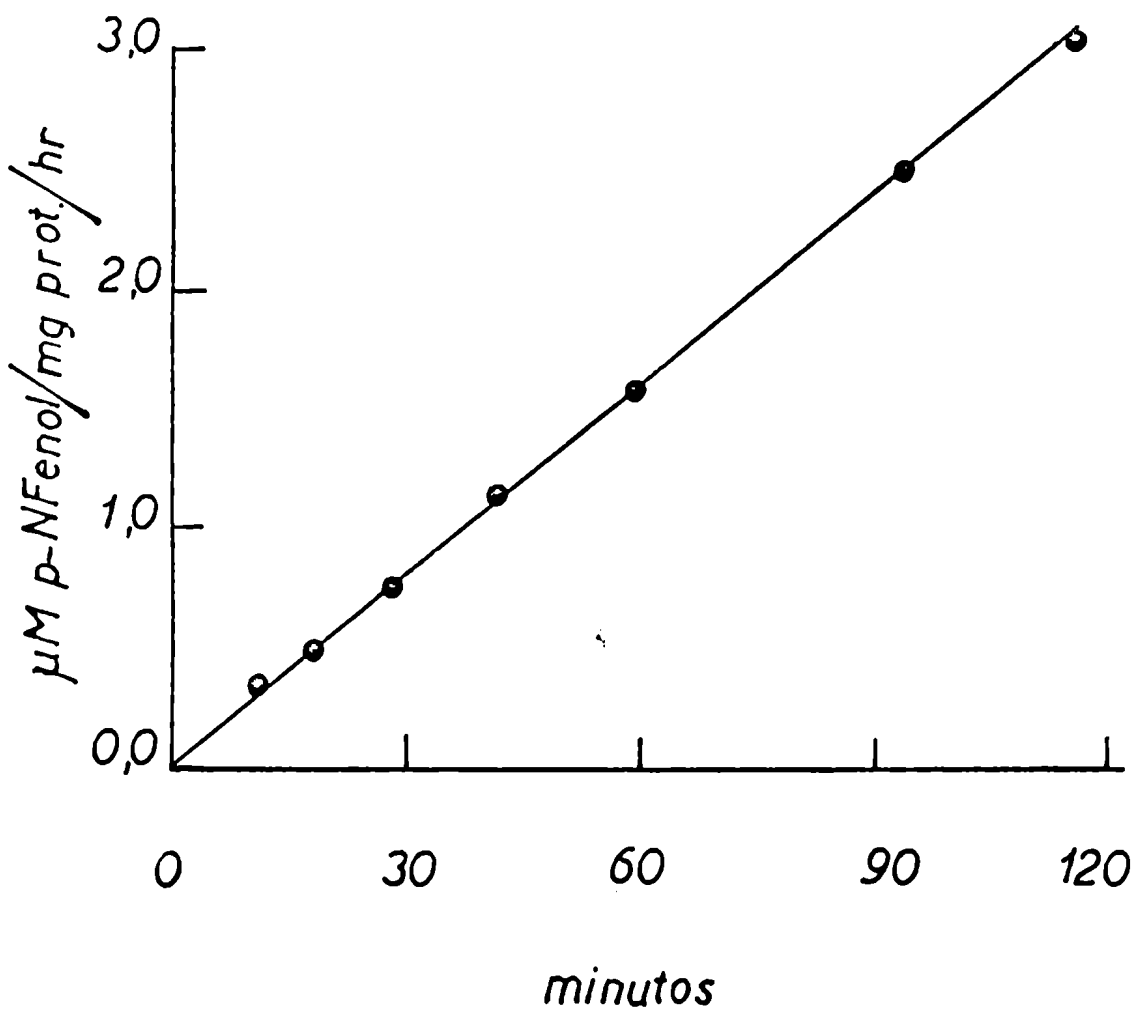


FIGURA 1

Crecimiento lineal de la velocidad de la reacción expresada como $\mu\text{M p-NFenol/mg. prot./hr}$ en función del tiempo.

CAPITULO I I I

RESULTADOS Y DISCUSION

a) ATPasa de ghost de eritrocitos :

Cinética de la inhibición por F^- : Las velocidades máximas de la ATPasa (Mg^{2+}) y de la ATPasa total a dos concentraciones de F^- están presentadas en la Tabla I. Un gráfico de Lineweaver y Bürk de (S/v) versus (s), donde s es la concentración de $ATP-Mg^{2+}$, mostró que la inhibición producida por F^- era no competitiva y el K_m 0,18 mM para ambas ATPasas (Figura 2).

Hill desarrolló la siguiente ecuación :

$$\log \left[\frac{v}{V_0 - v} \right] = - \log K + n \log I \quad (1) \quad \log \left[\frac{v}{V_m - v} \right] = n \log S - \log K \quad (2)$$

donde para (1) V_0 es la velocidad enzimática en ausencia de inhibidor, v es la velocidad a una concentración dada de inhibidor, I es la concentración del inhibidor, K es una constante de afinidad y n da una idea del número de sitios que interactúan en la enzima y de la intensidad de la interacción. En (2) S es la concentración de sustrato o activador, V_m es la velocidad máxima alcanzada con el activador o el sustrato, v es la velocidad a una concentración dada de estos dos últimos y n y k tienen el mismo significado que en (1).

El valor de n se obtiene de graficar $\log (v/V_0 - v)$ en función del $\log (I)$ para (1) y del $\log (v/V_m - v)$ en función del $\log (S)$ para (2). Una representación de este tipo dió $n = 1,0$ cuando se usó el sustrato ATP para la enzima total y la ATPasa (Mg^{2+}).

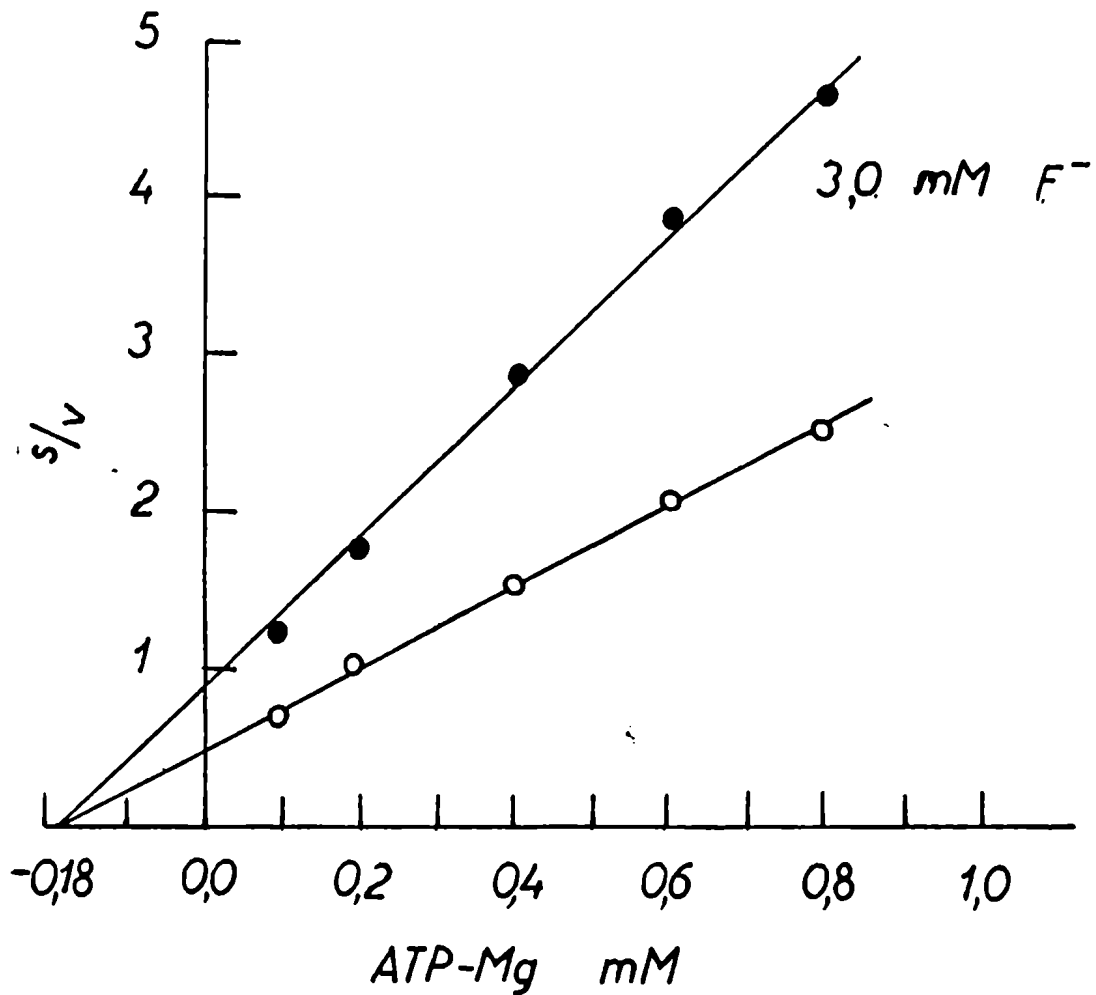


FIGURA 2

Efecto de la concentración de ATP-Mg sobre la actividad de la ATPasa total. Gráfico de la velocidad de producción de P₁ en ausencia o-o y en presencia ●-● de F⁻ en unidades arbitrarias en función de la concentración de sustrato según Lineweaver-Bürk.

La medición del $K_I = 50$, concentración del inhibidor que se precisa para inhibir el 50% de la reacción, mostró que la ATPasa total se inhibió más que la ATPasa (Mg^{2+}) (Tabla I).

TABLA I

Constantes Cinéticas de la Inhibición por F^- de la ATPasa (Mg^{2+}) y de la ATPasa Total de Ratas Alimentadas con Dieta Suficiente en Grasas

Constantes	F^- (mM)			
	ATPasa (Mg^{2+})		ATPasa Total	
	0,0	2,0	0,0	1,5
n	1,0	1,0	1,0	1,0
$V_{m\acute{a}x}$ (μ moles PO_4^{-3} /mg prot/hr)	2,8	2,1	6,0	4,3
$K_{0,5}$ (mM)	2,4		1,8	

Este resultado se puede analizar según las ideas actuales de enzimas alostéricas. El término enzima alostérica, según observa Koshland, puede definir a una enzima que A) contiene un sitio topológicamente distinto del sitio activo, B) muestra cinética sigmoidea y C) cataliza una reacción en la ramificación de un camino metabólico. (24). Estas propiedades pueden presentarse juntas aunque no siempre es así.

Se entiende como efecto alostérico al de un modificador (efector o ligando) unido

a un sitio topológicamente distinto (sitio alostérico) del sitio activo de la enzima, influenciando por acción indirecta la actividad o unión al sitio activo del sustrato. Finalmente se definen como interacciones homotrópicas y heterotrópicas a las que suceden entre ligandos iguales y ligandos diferentes, respectivamente (25).

Monod et al. desarrollaron un modelo basado en el "principio de simetría" para los efectos cooperativos, asumieron que los cambios conformacionales suceden a través de una isomerización entre dos estados R y T de la proteína. Si el sustrato se une a uno de los dos estados, sea R, la adición posterior de sustrato aumentará la concentración del estado R y la curva de saturación será sigmoidea, como lo confirma el análisis matemático.

Para la ATPasa del ghost de eritrocitos el sustrato ATP no presenta curvas de velocidad-sustrato sigmoideas y los datos transportados a un gráfico de Hill correspondieron a la cinética clásica con el valor $n = 1,0$. El sustrato ATP en consecuencia muestra igual afinidad por los estados R y T. Para este caso el modelo considera variaciones en los dos parámetros clásicamente usados K_m y V_m según esté presente el sustrato solo o el sustrato y el efector. Solo si los dos estados difieren en actividad catalítica el efector afectará la reacción, se comportará como activador o inhibidor según tenga máxima afinidad por el estado activo o el inactivo de la proteína. Estos sistemas se han llamado V positivo y V negativo, respectivamente.

La Tabla I muestra que el sustrato ATP y el efector negativo F^- forman un sistema V negativo, el ATP no cambia su K_m en presencia de F^- , no compiten ambos por el sitio activo de la enzima, tampoco el $n = 1,0$ se modifica y si cambia la velocidad máxima en

presencia de concentraciones crecientes de F^- .

Efecto del pH sobre la inhibición: En la Tabla I I vemos la inhibición por F^- de las ATPasas a distintos pH y la influencia del mismo sobre la inhibición.

TABLA I I

El Efecto del pH sobre la Inhibición por F^- de la ATPasa (Mg^{2+})
y de la ATPasa Total

Concentrac. F^- (mM)	ATPasa (Mg^{2+})			ATPasa Total		
	pH					
	7,2	8,0	9,0	7,2	8,0	9,0
	(μ moles PO_4^{-3} /mg. proteína/hora)					
0,0	0,9	3,0	3,0	1,5	6,2	5,8
0,4	0,7	2,9	3,0	1,3	5,9	5,8
0,8	0,4	2,7	3,0	0,9	4,8	5,2
1,6	0,2	2,0	3,0	0,2	2,6	5,0
3,0	0,1	1,3	3,0	0,1	0,7	4,0

A pH 9,0 la acción del F^- como inhibidor prácticamente desaparece, así la ATPasa (Mg^{2+}) que tiene igual actividad a pH 8,0 y pH 9,0 no modificó su actividad para concentraciones de F^- entre 0,4 y 3,0 mM a pH 9,0.

Hay evidencias que cambios en el pH modifican las curvas de velocidad para algunos sistemas enzimáticos, haciéndolas más o menos sigmoideas (26), en nuestro caso la ATPasa (Mg^{2+}), que en ausencia de F^- tiene a pH 8,0 igual actividad que a pH 9,0. El pH se comporta como un análogo del inhibidor F^- , en ausencia de F^- el análogo no modificaría la velocidad de la reacción pero en su presencia desplazaría al efector F^- y reactivaría a la enzima inhibida aunque no podría interactuar con el sustrato.

Si la analogía entre pH y análogos del efector se circunscribe a no permitirle al F^- ocupar sus sitios es posible que cambios en el pH induzcan a su vez cambios en la distribución de carga en la proteína alostérica y hagan inaccesibles los sitios al F^- .

Efecto de la concentración de Mg^{2+} sobre la inhibición : Opit y col. hicieron notar que la inhibición por F^- podía deberse a la formación de F_2Mg insoluble que secuestrara al Mg^{2+} del medio. En la Tabla I I I vemos que hay una inhibición creciente con las concentraciones de Mg^{2+} mayores y hace muy improbable que la formación de F_2Mg sea la causa de la inhibición por F^- . Además estos mismos autores vieron que altas concentraciones de Mg^{2+} en ausencia de F^- inhibían la actividad ATPásica aditivamente con la acción del F^- y parecían ser efectos independientes, como también se ve en la Tabla (27).

TABLA I I I

El Efecto de la Concentración de Mg^{2+} sobre la Inhibición por F^- de la ATPasa Total

Concentración de Mg^{2+} (mM)	Concentración de F^- (mM)	% Actividad
1,0	-	100
2,0 ^a	-	100
6,0	-	97
1,0	1,2	70
2,0	1,2	65
6,0	1,2	53
1,0	2,0	52
2,0	2,0	40
6,0	2,0	37

^a La actividad enzimática de 6 μ moles PO_4^{-3} /mg. proteína/hora a 2,0 mM Mg^{2+} en la ausencia de F^- , fué tomado como 100% de actividad.

El interés con que se efectuaron los experimentos mostrados en la Tabla I I I fué demostrar el no secuestro del Mg^{2+} por el anión aunque no sabemos en que manera actúa el Mg^{2+} cuando incrementa la inhibición, solo podemos dejar planteadas dos hipótesis de su acción: a) el Mg^{2+} es necesario para que haya actividad de la enzima con una relación

óptima 1 ATP : 1Cl₂Mg, el exceso de Mg²⁺ pudiera competir con el verdadero sustrato ATP-Cl₂Mg por el sitio activo disminuyendo la accesibilidad al mismo; b) el Mg²⁺ puede ocupar sitios específicos sobre la superficie de la enzima que produzcan modificaciones conformacionales en la proteína cuyo resultado sea una afinidad aumentada al F⁻.

Reversibilidad de la inhibición : La inhibición por F⁻ tiene un carácter reversible como se desprende de la Tabla I V.

TABLA I V

Carácter Reversible de la Inhibición por F⁻ de la ATPasa Total

Mezcla de incubación	Conc. F ⁻ (mM)	Tiempo de incubación (min)	Actividad enzimática ^a (cpm)
1	1,5	15	950
2	1,5	30	1920
3	3,0	15	615
4 ^b	3,0	15	
	1,5	15	1580

^a Determinada con ATP³² como se describe en materiales y métodos; la misma cantidad de enzima se usó en cada mezcla de incubación. Valores de radiactividad corresponden a la mezcla de incubación total.

^b Incubado por 15 min, luego diluído al volumen doble con una mezcla de incubación sin enzima e incubado por otros 15 minutos.

El valor de la actividad ATPásica obtenido cuando la enzima se incubó con 3,0 mM de F^- por 15 minutos, luego se diluyó al doble y se incubó otros 15 minutos (mezcla de incubación 4) fué similar a la suma de las actividades de dos incubaciones separadas de 15 minutos cada una de la enzima con 1,5 mM de F^- (mezcla 1) y con 3,0 mM de F^- (mezcla 3) respectivamente.

Otra característica de un inhibidor alostérico es la reversibilidad de la inhibición, condición que satisface el F^- .

Inhibición por F^- en las ATPasas de ratas alimentadas con dieta comercial : Farías en su tesis doctoral había mostrado que las curvas de velocidad relativa de la actividad enzimática vs. la (F^-) presentaban una forma sigmoidea y $n > 1,5$ (coeficiente de Hill) con la dieta de composición definida y una forma hiperbólica con coeficientes de Hill $< 1,5$ con la dieta comercial.

Se buscaron el o los posibles componentes responsables del comportamiento distinto de la dieta comercial. Los ensayos se orientaron a estudiar el efecto del agregado de grasas, sales y vitaminas a la dieta comercial. La Tabla V mostró que de éstos solamente las grasas producían un cambio del n a valores similares a los vistos con la dieta básica en un tiempo breve de 10 días.

El paso siguiente fué ver si las ratas alimentadas con la dieta comercial revertían sus valores de n cuando se las colocaba en dieta básica, se encontró que ya a los 4 días el n era $-2,0$. Con este dato y los aportados en la Tabla anterior se modificó la dieta de composición definida (Básica) en sus componentes grasos.

TABLA V

Diversas Adiciones a la Dieta Comercial y su Influencia sobre los Valores de n para la ATPasa Total de Ratas en Función del Tiempo

Adiciones a la dieta comercial	Tiempo (Días)			
	3	5	10	14
Sales y vitaminas 1,5%	1,4	1,3	-	1,4
Grasa de cerdo 2,5% y aceite de hígado de bacalao 2,5%	1,3	1,6	-	1,8
Grasa de cerdo 5%	-	-	1,8	-
Aceite de hígado de bacalao 5%	-	-	1,8	-

La Tabla siguiente (V I) muestra que la carencia de grasas no permite obtener los valores de n de la dieta definida completa. También se ve que el cambio de esta dieta a la dieta comercial modifica lentamente los coeficientes de Hill.

Así se logró tener una dieta de composición definida que diera frente a la inhibición por F^- en la ATPasa, curvas de comportamiento similar a la dieta comercial. Desde ese momento se utilizó como dieta carente o deficiente en grasas y reemplazó ventajosamente a la dieta comercial.

TABLA VI

Valores de n para la ATPasa Total de Ratas Alimentadas con Dieta Comercial y Posteriormente Cambiadas a una Segunda Dieta de Composición Definida: Influencia del Tiempo en la Segunda Dieta.

Primera dieta	Segunda dieta	Tiempo de Alimentación con la segunda dieta (días)						
		1	2	3	4	10	30	45
Comercial	Composición definida	1,5	1,7	1,9	2,0	2,0	-	-
Comercial	Composición definida sin grasa de cerdo	-	-	-	2,0	-	-	-
Comercial	Composición definida sin aceite de hígado de bacalao, más Vits. A y D	-	-	2,1	2,0	-	-	-
Comercial	Composición definida sin grasa de cerdo y aceite de hígado de bacalao, más Vits. A y D	-	-	1,4	1,3	1,3	-	-
Composición definida	Comercial	-	-	-	2,0	2,0	1,5	1,3

Efecto de la carencia de grasas esenciales en la inhibición alostérica de la ATPasa : La Figura 3 muestra el efecto de la inhibición por F^- sobre las ATPasas (Mg^{2+}) del ghost de ratas alimentadas con dieta suficiente en grasas (control) y con dieta deficiente en grasas. En la Figura 3 se ve la acción del F^- sobre la ATPasa total proveniente de ambas dietas.

Las Figuras 2 y 3 muestran que una representación de velocidades relativas de actividad enzimática en función de concentraciones crecientes de F^- da curvas de inhibición más sigmoideas para la enzima del lote control. Cuando se representó usando la ecuación de Hill el $\log (v/V_0 - v)$ en función del $\log (F^-)$, vemos en el ángulo superior de la Figura 3 para las ATPasas (Mg^{2+}) que las pendientes fueron -2,2 para la enzima del lote control y -1,4 para la del lote deficiente en grasas.

La Figura 4 para las ATPasas totales permite ver que se obtienen las mismas pendientes que con la ATPasa (Mg^{2+}) en las respectivas dietas.

Walker ha analizado la composición de los ácidos grasos en varios órganos en ratas deficientes en grasas y controles como también las modificaciones que sufren éstos al cambiar de dieta deficiente a control por varios períodos de tiempo (28). En nuestro laboratorio, Bernabé Bloj analizó la composición de ácidos grasos en eritrocitos de ratas de dietas suficientes y deficientes en grasas y obtuvo valores coincidentes con los de la literatura.

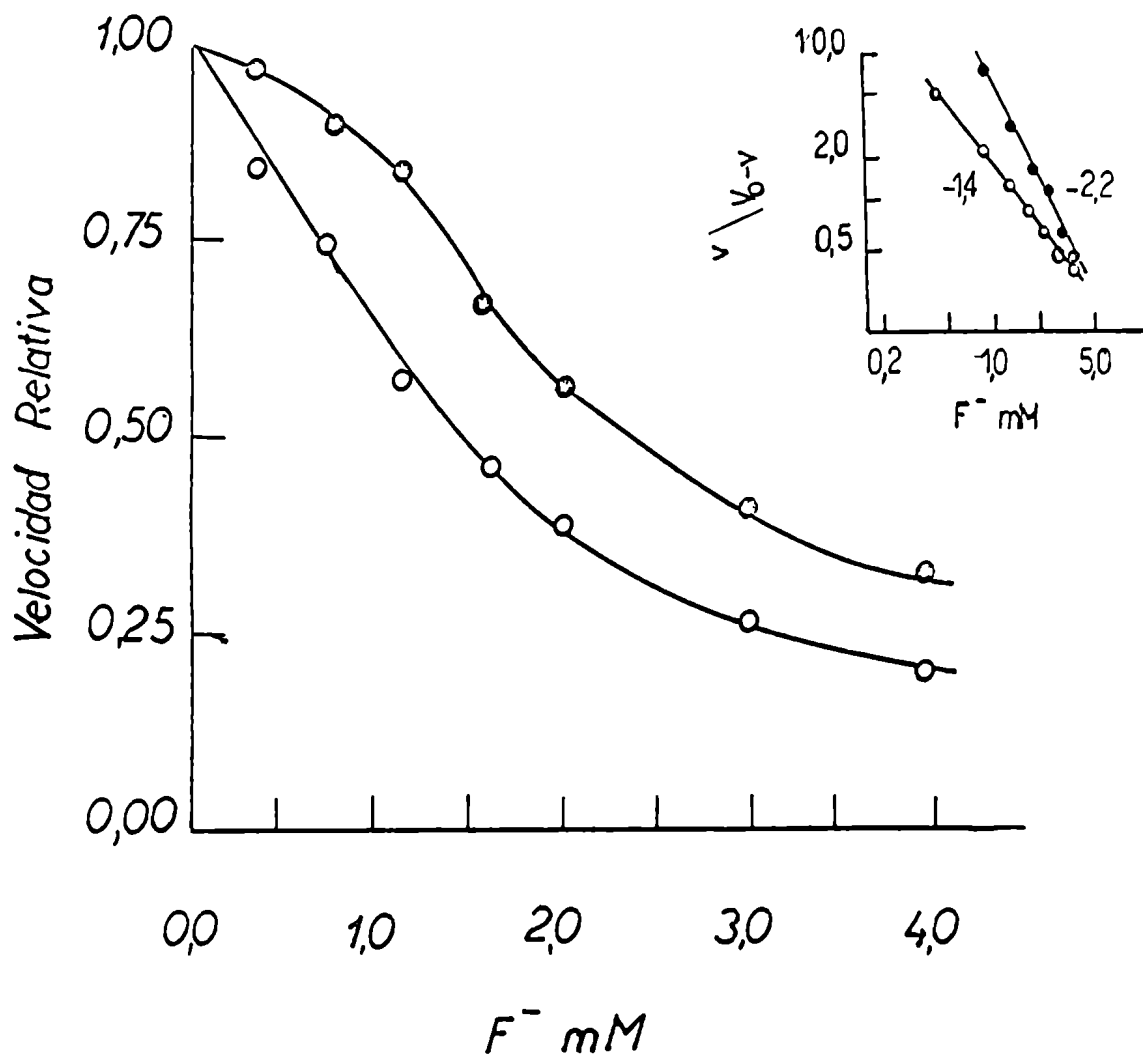


FIGURA 3

Acción de F^- sobre la ATPasa (Mg^{2+}) de ratas alimentadas con dieta suficiente en grasas ●-● y dieta deficiente en grasas ○-○. Gráfico de la velocidad relativa de la reacción en función de (F^-). En el ángulo superior gráfico de v/V_0-v en función de (F^-) en coordenadas logarítmicas. La pendiente de cada línea está indicada en la Figura.

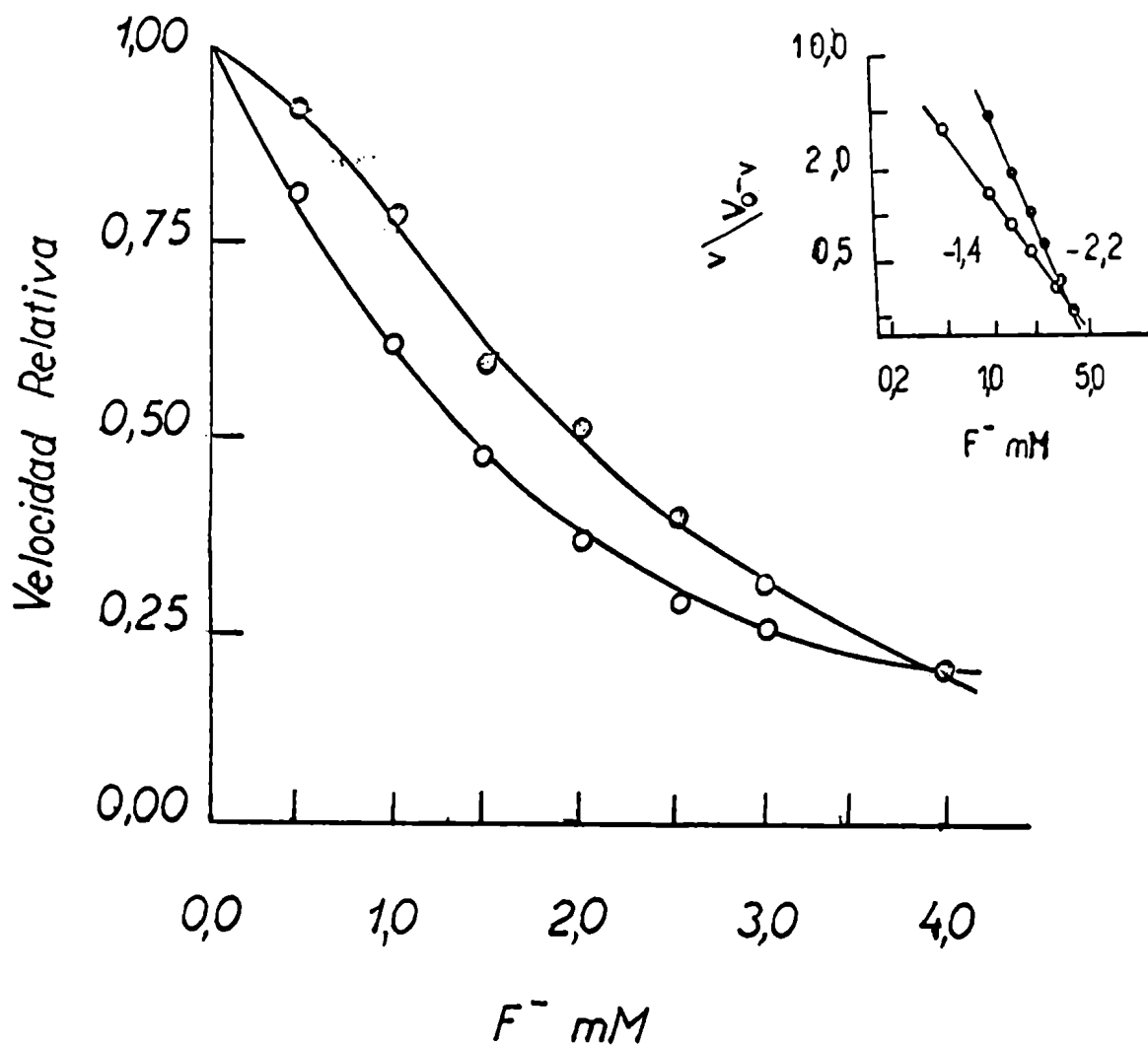


FIGURA 4

Acción de F^- sobre la ATPasa Total de ratas alimentadas con dieta suficiente en grasas ●-● y dieta deficiente en grasas ○-○. Gráfico de la velocidad relativa de la reacción en función de (F^-). En el ángulo superior gráfico de v/V_0-v en función de (F^-) en coordenadas logarítmicas. La pendiente de cada línea está indicada en la Figura.

% de Acidos Grasos Totales en Eritrocitos

Walker			Bloj		
Acido	Suficiente en grasas	Deficiente en grasas	Acido	Suficiente en grasas	Deficiente en grasas
16:0	26,8 ± 0,45	21,0 ± 0,41	16:0	10,8	9,6
16:1w7	1,0 ± 0,05	3,5 ± 0,79	18:0	12,6	10,8
18:0	16,3 ± 0,54	14,4 ± 0,47	18:1	12,5	10,9
18:1w9	9,5 ± 0,17	20,6 ± 1,52	18:2	12,0	4,3
18:2w6	10,2 ± 0,67	1,1 ± 0,29	20:3w9	0,4	13,5
20:3w9	0,1 ± 0,02	24,9 ± 0,88	20:3w6	1,8	-
20:4w6	28,2 ± 0,74	8,4 ± 0,90	20:4w6 + 22:1w9	30,0	20,6
22:3w9	trazas	1,9 ± 0,26	22:3w9	-	2,4
22:4w6	3,2 ± 0,04	0,6 ± 0,17	24:0	1,6	5,1
22:5w6	2,0 ± 0,15	0,7 ± 0,04	22:5w6	3,2	-
			22:5w3	1,3	-
			22:6w3	1,5	3,9

La Tabla anterior es una transcripción de la composición en ácidos grasos de eritrocitos en las dos dietas según Walker y Bloj respectivamente. Observamos que los eritrocitos de ratas controles tuvieron un alto porcentaje de ácido araquidónico (28 %) y de

ácido linoleico que aportó el 10% de los ácidos grasos totales. Ambos ácidos, como los otros insaturados 22:4 y 22:5 todos de la serie w6 están muy disminuidos en las ratas deficientes donde se observa un aumento en los de la serie w9.

Cuando se alimentó con ácidos grasos esenciales a los animales deficientes, Walker encontró que dentro de los 6 días los eritrocitos alcanzaban el nivel de ácido linoleico de los animales controles con disminución de oleico y palmitoleico; el ácido araquidónico fué más lento en alcanzar el nivel de los controles.

La incorporación de linoleico y araquidónico, dos ácidos grasos esenciales, se obtiene aumentando el linoleato de la dieta; cuando se consumen dietas pobres en linoleico se incorporan los ácidos oleico y palmitoleico; sus presencias son un índice de deficiencia en ácidos grasos esenciales.

Un control efectuado sobre los valores de n en la inhibición por F^- fué el obtenerlos con diferentes preparaciones enzimáticas: ghost no lavados, ghost rotos y ghost libres de hemoglobina. Los coeficientes de Hill no se alteraron y se interpretó como que la diferencia encontrada entre las dos dietas era improbable que se debiera a un efecto "in vitro" donde algún componente que actuase como cofactor se pudiese haber perdido en la obtención del preparado enzimático.

Inhibición por F^- en presencia de ouabafina : Las Figuras 5 y 6 corresponden a curvas de velocidades relativas de la acción enzimática para la inhibición por F^- en presencia de una concentración constante de ouabafina 1×10^{-4} M. A esta concentración se inhibió la activación por $(Na^+ + K^+)$ pero hubo en la ATPasa (Mg^{2+}) inhibición por F^- .

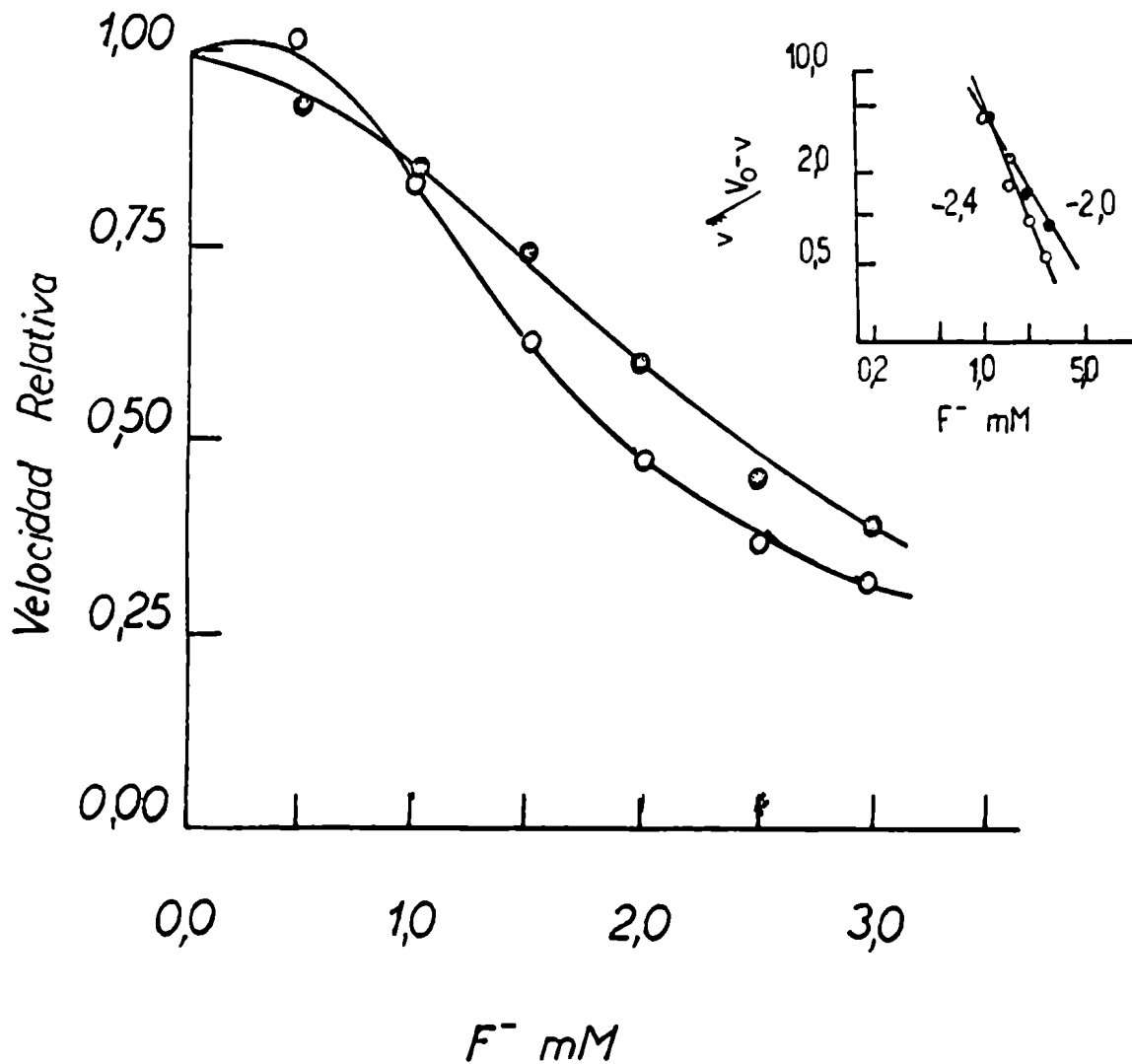


FIGURA 5

Acción de F^- sobre la ATPasa (Mg^{2+}) ●-● y ATPasa Total o-o de ratas alimentadas con dieta suficiente en grasas en presencia de 1×10^{-4} M Ouabaina. En esta concentración inhibió la activación por $Na^+ + K^+$ en un 75%. Gráfico de la velocidad relativa de la reacción en función de (F^-). En el ángulo superior gráfico de v/V_0-v en función de (F^-) en coordenadas logarítmicas. La pendiente de cada línea está indicada en la Figura.

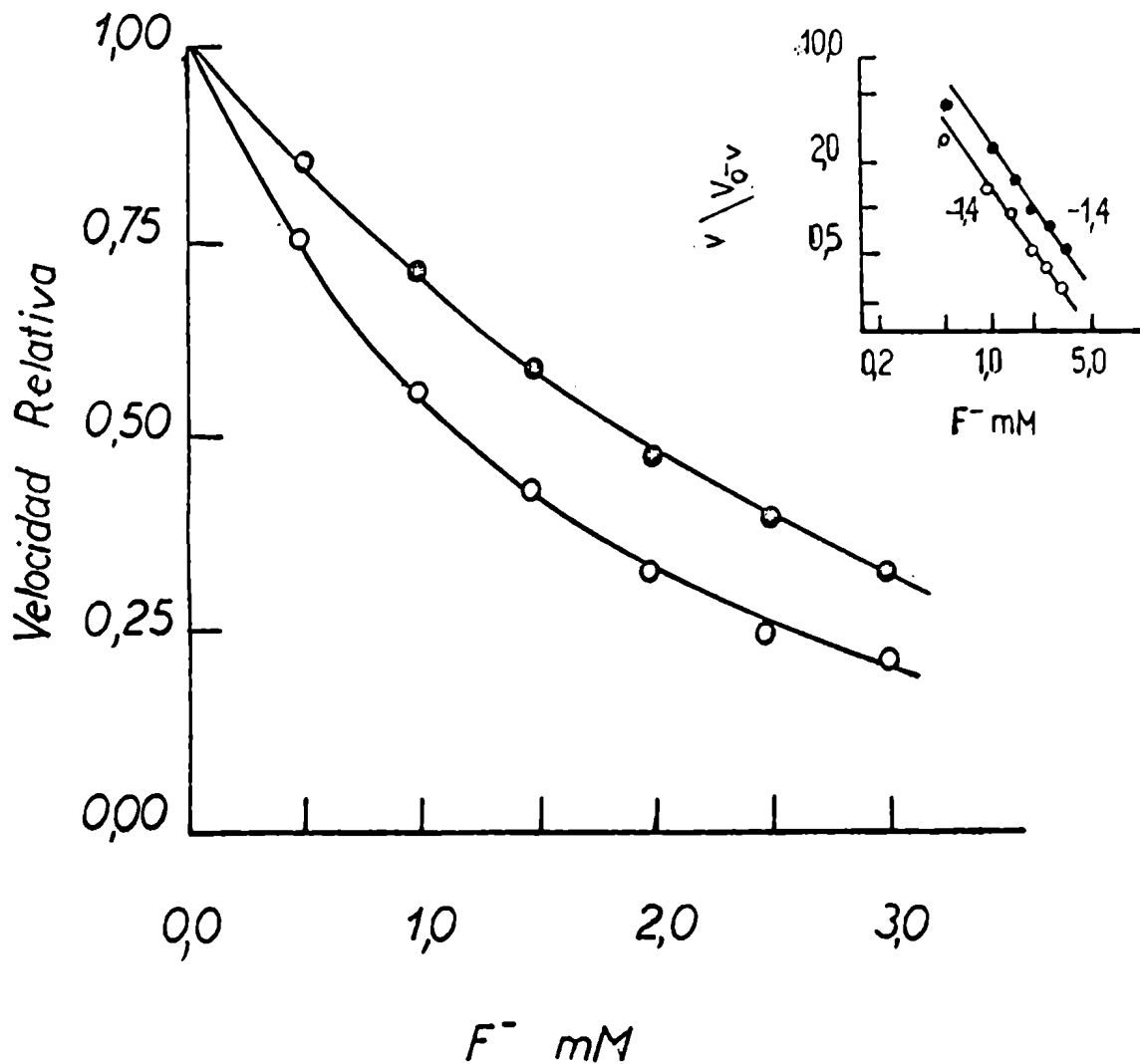


FIGURA 6

Acción de F^- sobre la ATPasa (Mg^{2+}) o-o y ATPasa Total ●-● de ratas alimentadas con dieta deficiente en grasas en presencia de 1×10^{-4} M Ouabaina. En esta concentración inhibió la activación por $Na^+ + K^+$ en un 75%. Gráfico de la velocidad relativa de la reacción en función de (F^-). En el ángulo superior gráfico de $v/V_0 - v$ en función de (F^-) en coordenadas logarítmicas. La pendiente de cada línea está indicada en la Figura.

No hubo cambios en la dirección de la sigmoidicidad de las curvas. Los valores de n obtenidos están mostrados en el ángulo superior de las figuras.

Para la activación por Na^+ y K^+ ó ATPasa ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$) los valores de n se determinaron gráficamente usando la siguiente ecuación :

$$\log \left[\frac{V_t - V_b}{v_t - v_b} - 1 \right] = \log K_a - n_a \log S \quad (1)$$

donde V_t y V_b son las velocidades máximas de la reacción para las ATPasas total y (Mg^{2+}), respectivamente; K_a es el K_m para la ATPasa ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$); n_a es el número de sitios o un factor de interacción de F^- y S es la concentración de F^- .

La ecuación (1) deriva de la ecuación general de la velocidad de reacción :

$$v_a = \frac{V_a}{1 + \frac{K_a}{S^{n_a}}} = v_t - v_b \quad (2)$$

donde v_a y V_a son las velocidades de reacción y la máxima velocidad de reacción para la ATPasa ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$) respectivamente; a una concentración mayor de F^- :

$$V_a = V_t - V_b$$

al sustituir V_a en (2) se obtiene :

$$\frac{V_t - V_b}{v_t - v_b} - 1 = \frac{K_a}{S^{n_a}} \quad (3)$$

aplicando logaritmos a la ecuación (3) se obtiene la ecuación (1). Un gráfico de

$\log \left[\frac{V_t - V_b}{v_t - v_b} - 1 \right]$ en función del $\log (S)$ es lineal con una pendiente n_a . Usando los datos de los experimentos representados en las Figuras 3 y 4 y graficando los logaritmos de las velocidades en función del $\log (S)$ se obtuvieron los valores de n de la Figura 7. La pendiente

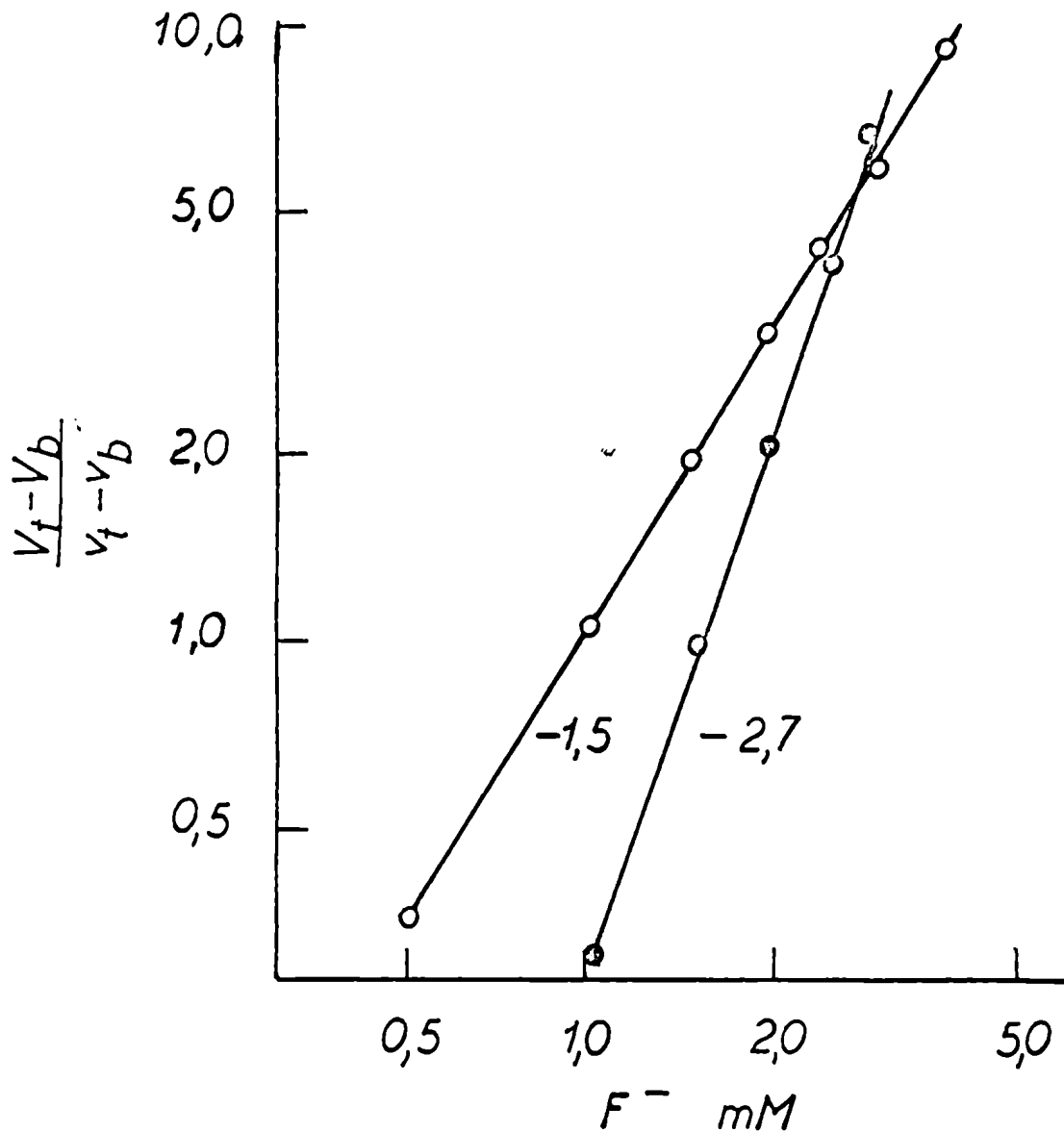


FIGURA 7

Determinación del valor de n para la ATPasa ($Na^+ + K^+$) de ratas alimentadas con dieta suficiente en grasas ●-● y dieta deficiente en grasas o-o. Gráfico de $(V_t - V_b)/(v_t - v_b) - 1$ en función de (F^-) en coordenadas logarítmicas. Los datos provienen de los experimentos representados en las Figuras 3 y 4.

fué - 2,7 para la ATPasa ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$) de animales suficientes en grasas y - 1,5 para la enzima de animales deficientes en grasas.

Los valores de n para las ATPasas de ratas criadas con las dos dietas se pueden ver en la Table V I I. Cada valor de n es el promedio del número de determinaciones que figura entre paréntesis. Se infiere de la Tabla V I I que los valores de n para las ATPasas del ghost del lote control fue siempre significativamente mayor que el de los animales deficientes en grasas.

Cambios en la dieta y su influencia sobre el n : La Tabla V I I I muestra los valores que fue alcanzando el n para la ATPasa total de ratas deficientes en grasas cuando se las cambió a la dieta control. A partir del día 12 en la nueva dieta se obtuvo el valor -2,2 que es típico de las ratas alimentadas desde su nacimiento con dieta control.

Asimismo cuando se cambió a dieta deficiente en grasas a ratas que habían crecido con la dieta control, el n cambió de -2,2 a -1,4 luego de cuatro a cinco semanas de consumir la dieta deficiente en grasas.

Es sugestivo que el n de ratas deficientes en grasa cambiara a los 12 días a valores similares a los de la dieta control; este tiempo es muy próximo al necesario para reestablecer el nivel de ácido linoleico en los eritrocitos, un ácido graso esencial presente en muy baja cantidad en dietas deficientes en grasas.

Asimismo estos resultados permiten descartar que hubiera una necesidad de una síntesis "de novo" de proteína enzimática pues en 12 días la población total de glóbulos rojos se ha renovado solo en un 10%.

TABLA V I I

Valores de n para las ATPasas de Ratas Alimentadas con Dietas Suficiente y Deficiente en Grasas, Respectivamente

Dieta	Valores de n		
	ATPasa (Mg ²⁺)	ATPasa Total	ATPasa (Na ⁺ + K ⁺)
Suficientes	- 2,1 ± 0,3 a (10) b	- 2,1 ± 0,4 (17)	- 2,8 ± 0,4 (6)
Deficientes	- 1,4 ± 0,2 (11)	- 1,4 ± 0,2 (15)	- 1,6 ± 0,4 (4)
	p < .001	p < .001	p < .01

a Los resultados están expresados como promedios ± D. S.

b Los valores entre paréntesis son los números de animales usados.

TABLA V I I I

Efectos del Cambio de Dieta Deficiente a Dieta Suficiente en Grasas Sobre el Valor de n para la ATPasa Total

Tiempo en dieta suficiente (Días)	Valor de n
0	- 1,4
2	- 1,3
5	- 1,7
12	- 2,2
15	- 2,2

b) ATPasas de riñón, corazón y cerebro.

La ATPasa ($\text{Na}^+ + \text{K}^+ + \text{Mg}^{2+}$) está presente en los tejidos de varias especies. Para conocer la generalidad del efecto encontrado durante la inhibición con F^- de ghost de eritrocitos, se estudió dicha inhibición en cerebro, riñón y corazón de ratas bajo las dos dietas y como influía en ratas deficientes cambiarlas a la dieta control.

Inhibición por F^- : Las ATPasas de los tres órganos estudiados se inhibieron por F^- en proporciones diferentes según se desprende del $K_I = 50$. Así para iguales (F^-) la ATPasa de cerebro sufrió la mayor inhibición.

Las Figuras 8A, 9A y 10A son curvas típicas de la velocidad relativa de reacción en función de (F^-) para las ATPasas totales y ATPasas (Mg^{2+}) de riñón, corazón y cerebro, respectivamente. Las ATPasas (Mg^{2+}) están representadas como un valor porcentual de la activación por Na^+ y K^+ .

En las Figuras 8B, 9B y 10B se han representado las ATPasas de riñón, corazón y cerebro de ratas deficientes en grasas.

En la Tabla IX se presentan los n para las ATPasas de ambas dietas. Vemos que riñón y corazón dieron, como el ghost de eritrocitos, $n > 1,5$ en los animales bajo dieta control y $n < 1,5$ para las ATPasas de animales deficientes en grasas.

El cerebro mostró un comportamiento particular y dió $n > 1,5$ cualquiera fuese la dieta a que estuvo sometido el animal. Se cambiaron las concentraciones de Na^+ y de K^+ ; con 160 mM de Na^+ y 60 mM de K^+ en el medio de incubación las curvas de inhibición que se obtuvieron para el F^- fueron similares a las que se hicieron con 80 mM de Na^+ y 30 mM de K^+ .

Bader y colaboradores (29) estudiaron en seis tejidos de once especies las relaciones entre la actividad ATPásica y los intermediarios fosforilados; sus resultados indican que se obtienen idénticos péptidos marcados con P^{32} cuando se fosforilan las enzimas y luego se las digiere con pepsina más pronasa y se hace electroforesis, es decir que el mecanismo de la ATPasa ($Na^+ + K^+$) es probablemente similar en la mayoría de los tejidos y especies animales. Se puede inferir que la deficiencia en ácidos grasos esenciales actúa sobre estas enzimas de membrana en la misma dirección (ver discusión general).

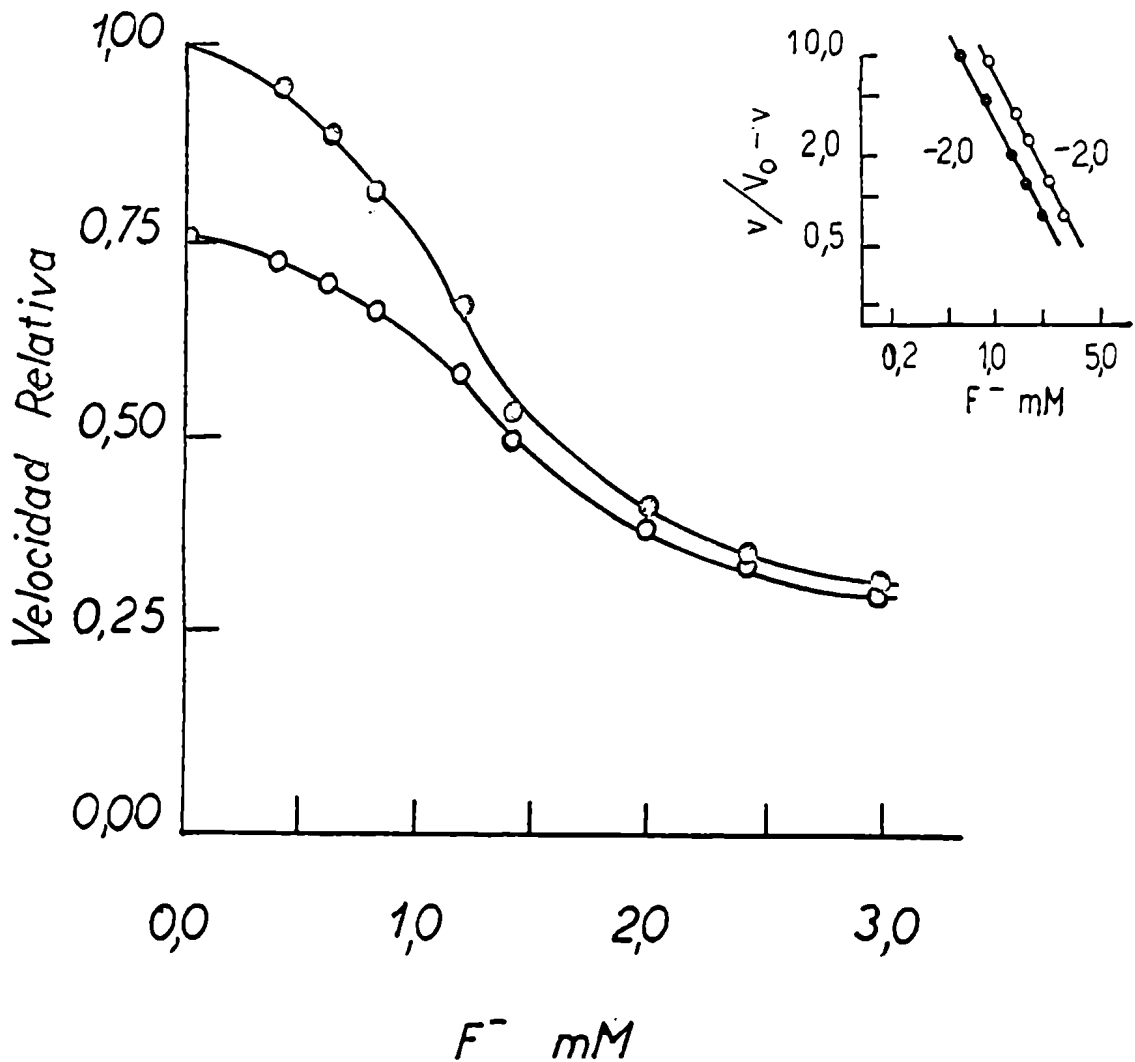


FIGURA 8A

Acción de F^- sobre la ATPasa (Mg^{2+}) o-o y sobre la ATPasa Total □-□ de microsomas de riñón de ratas alimentadas con dieta suficiente en grasas. Gráfico de la velocidad relativa de la reacción en función de (F^-). En el ángulo superior gráfico de v/V_0-v en función de (F^-) en coordenadas logarítmicas. La pendiente de cada línea está indicada en la Figura.

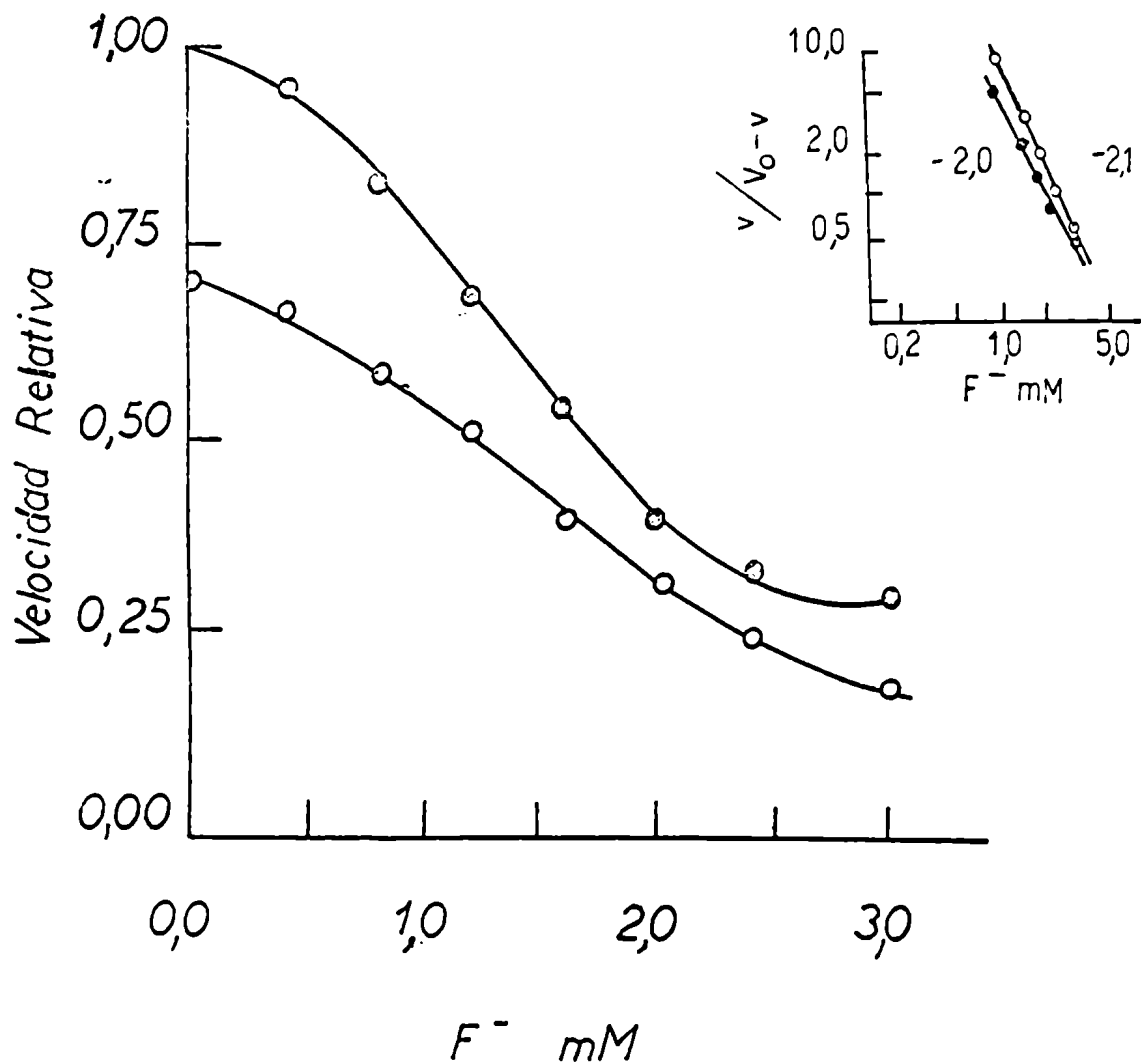


FIGURA 9A

Acción de F^- sobre la ATPasa (Mg^{2+}) o-o y sobre la ATPasa Total ●-● de microsomas de corazón de ratas alimentadas con dieta suficiente en grasas. Gráfico de la velocidad relativa de la reacción en función de (F^-). En el ángulo superior gráfico de v/V_0-v en función de (F^-) en coordenadas logarítmicas. La pendiente de cada línea está indicada en la Figura.

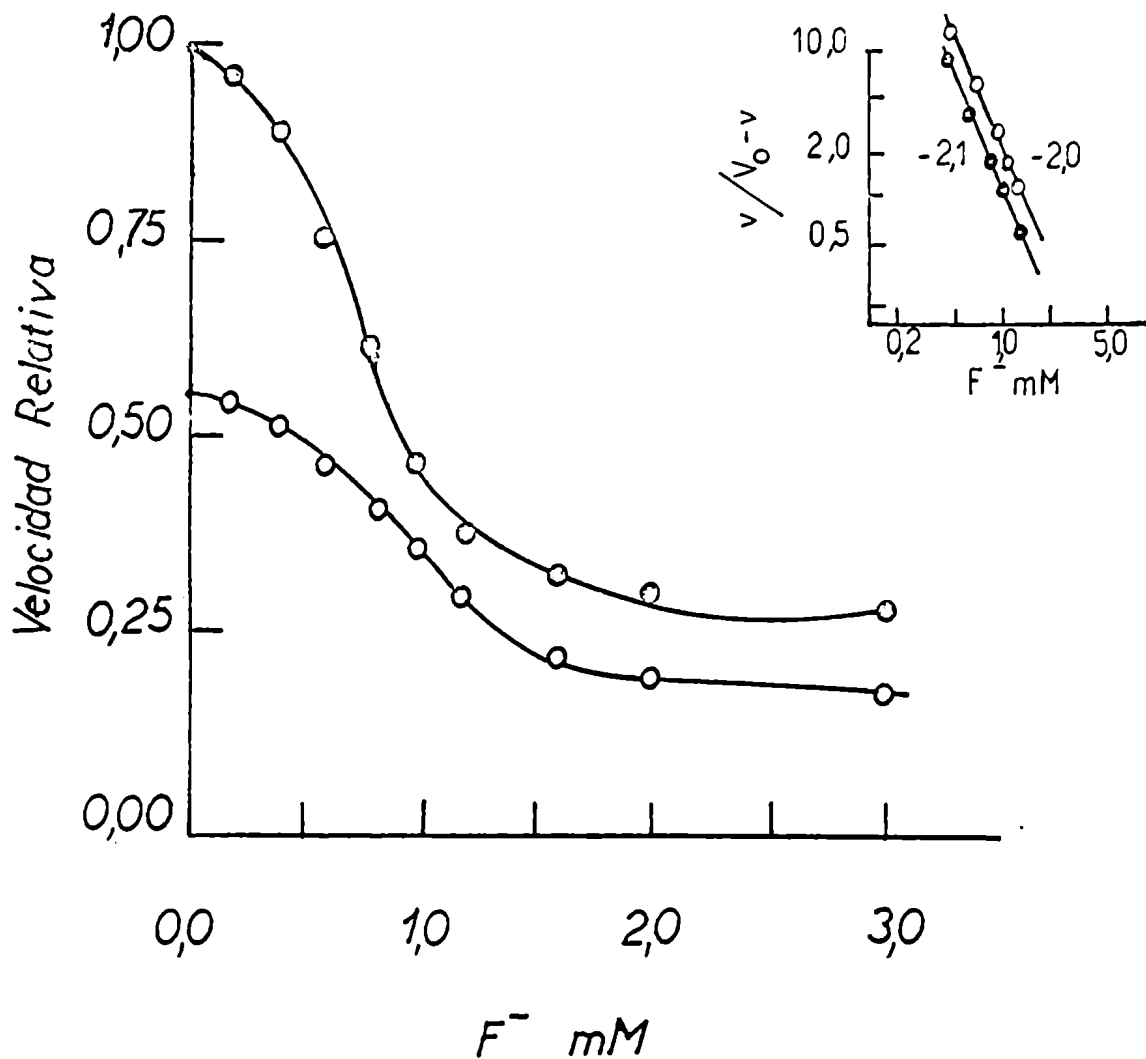


FIGURA 10A

Acción de F^- sobre la ATPasa (Mg^{2+}) o-o y sobre la ATPasa Total ●-● de microsomas de cerebro de ratas alimentadas con dieta suficiente en grasas. Gráfico de la velocidad relativa de la reacción en función de (F^-). En el ángulo superior gráfico de v/V_0-v en función de (F^-) en coordenadas logarítmicas. La pendiente de cada línea está indicada en la Figura.

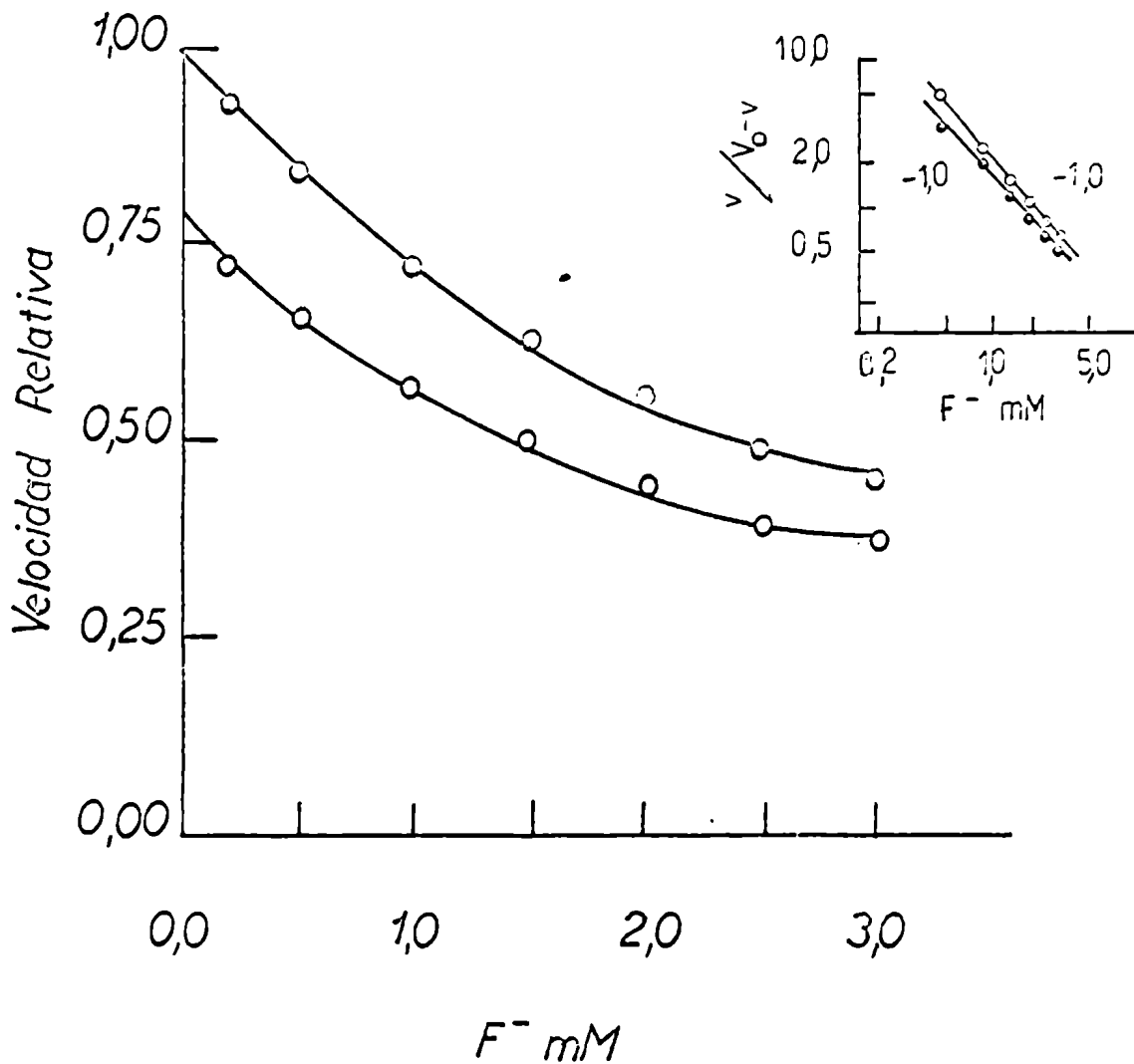


FIGURA 8B

Acción de F^- sobre la ATPasa (Mg^{2+}) o-o y sobre la ATPasa Total ●-● de microsomas de riñón de ratas alimentadas con dieta deficiente en grasas. Gráfico de la velocidad relativa de la reacción en función de (F^-). En el ángulo superior gráfico de v/V_0-v en función de (F^-) en coordenadas logarítmicas. La pendiente de cada línea está indicada en la Figura.

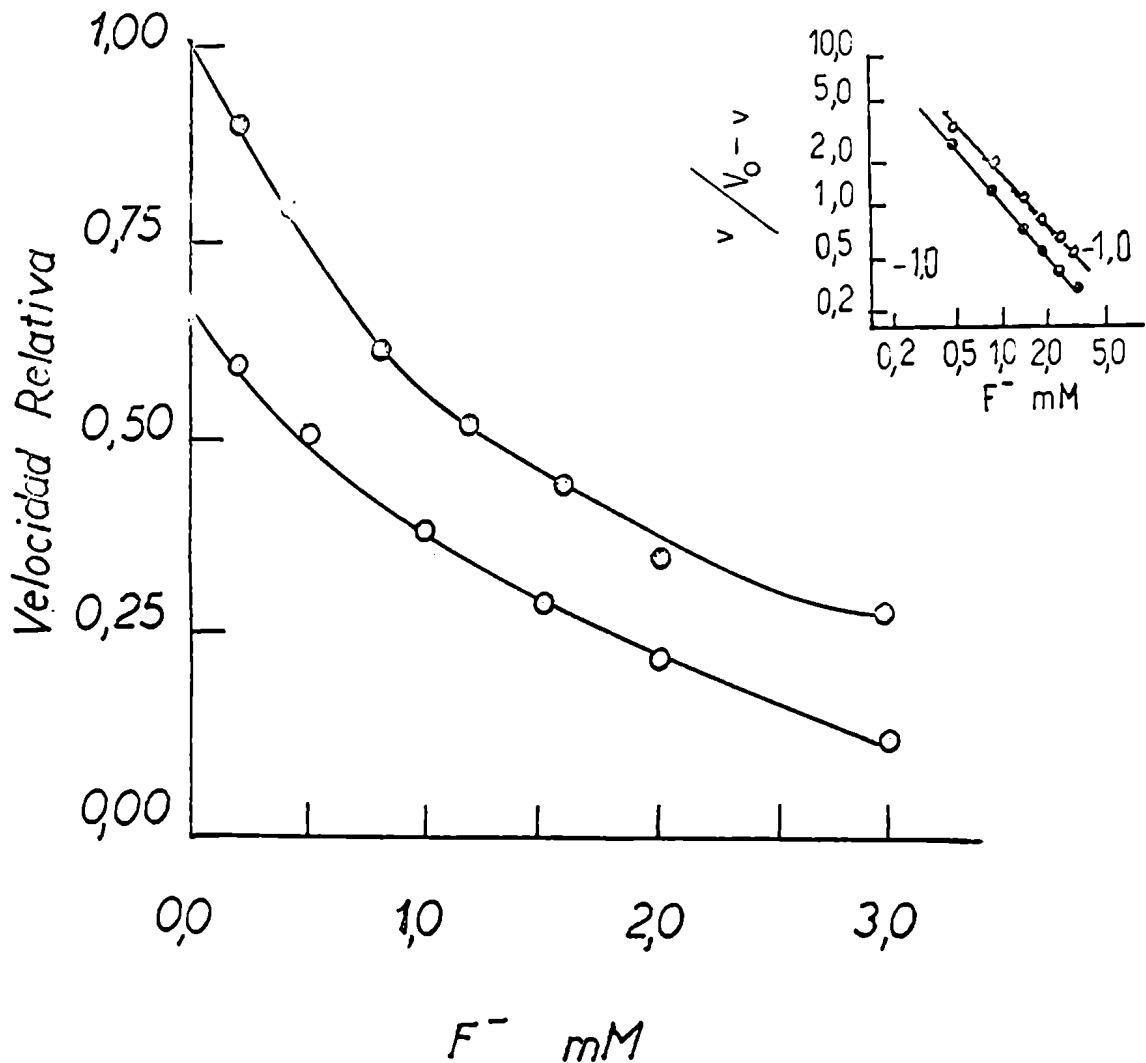


FIGURA 9B

Acción de F^- sobre la ATPasa (Mg^{2+}) o-o y sobre la ATPasa Total ●-● de microsomas de corazón de ratas alimentadas con dieta deficiente en grasas. Gráfico de la velocidad relativa de la reacción en función de (F^-). En el ángulo superior gráfico de $v/V_0 - v$ en función de (F^-) en coordenadas logarítmicas. La pendiente de cada línea está indicada en la Figura.

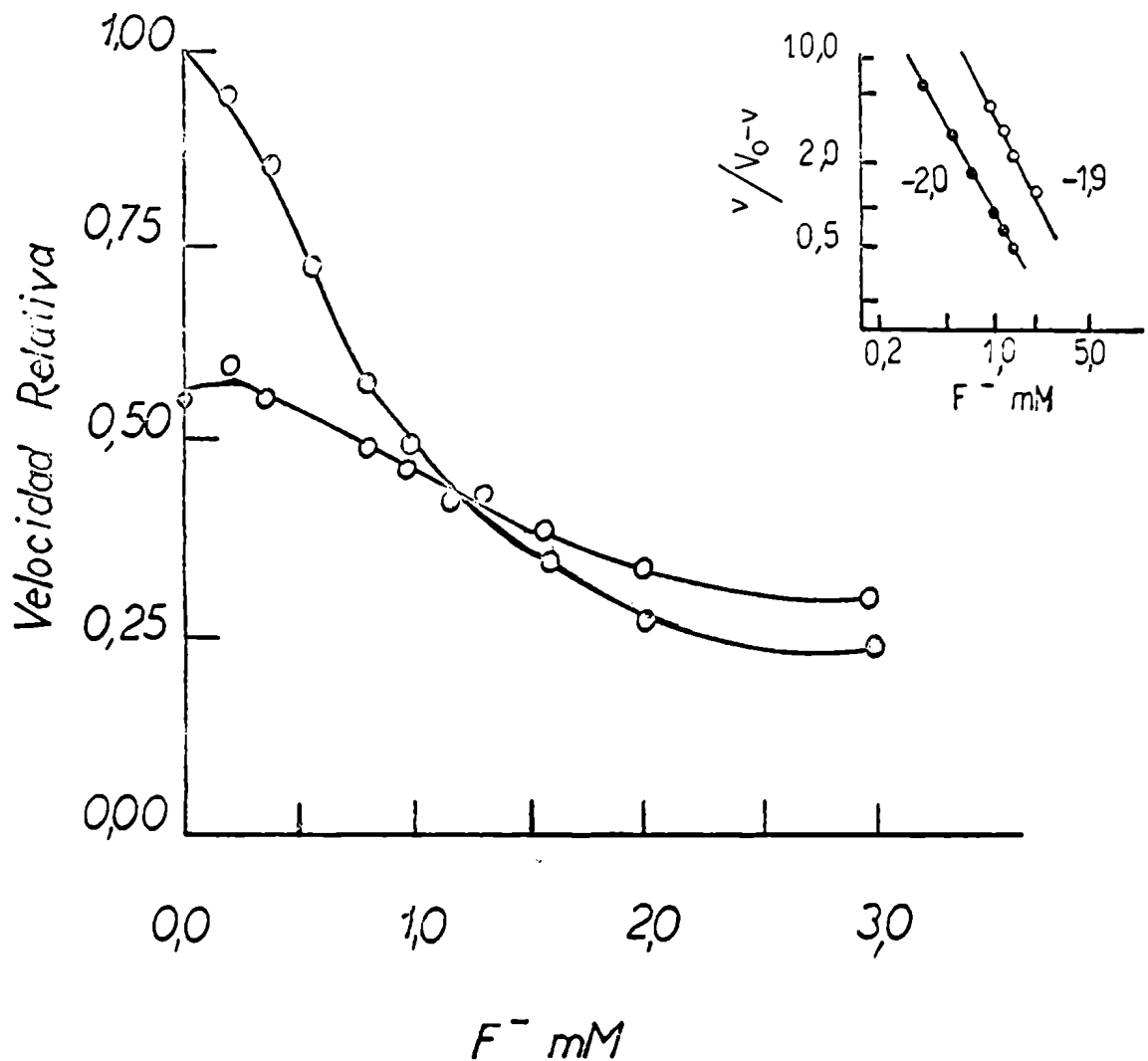


FIGURA 10B

Acción de F^- sobre la ATPasa (Mg^{2+}) o-o y sobre la ATPasa Total o-o de microsomas de cerebro de ratas alimentadas con dieta deficiente en grasas. Gráfico de la velocidad relativa de la reacción en función de (F^-). En el ángulo superior gráfico de v/V_0-v en función de (F^-) en coordenadas logarítmicas. La pendiente de cada línea está indicada en la Figura.

TABLA I X

Valores de n para las ATPasas de Riñón, Corazón y Cerebro en Ratas Alimentadas con Dieta Suficiente en Grasas y Deficiente en Grasas, Respectivamente

Membrana	Dieta Suficiente			Dieta Deficiente		
	ATPasa Total	ATPasa (Mg ²⁺)	ATPasa (Na ⁺ + K ⁺)	ATPasa Total	ATPasa (Mg ²⁺)	ATPasa (Na ⁺ + K ⁺)
Corazón	1,9	2,0		1,0	1,1	
Riñón	2,0	2,0	2,6	1,3	1,0	1,2
Cerebro	2,0	2,0	2,4	2,0	1,9	2,4

Cambios de la dieta y su influencia sobre el n: Paralelamente al ghost de eritrocitos, las ATPasas de riñón y de corazón de ratas deficientes en grasas dieron n -2,0 a los 16 días de haber sido cambiadas a la dieta control. Este valor -2,0 para la inhibición por F⁻ es típico de las ATPasas provenientes de ratas suficientes en grasas.

Del análisis efectuado sobre la composición de los ácidos grasos en ratas en deficiencia en grasas y en controles transcribimos la tabla que presenta la composición en ácidos grasos esenciales para corazón y cerebro (Brian L. Walker, (28)).

% de Acidos Grasos Totales en Corazón y Cerebro

Acido	Corazón		Cerebro	
	Suficiente en grasas	Deficiente en grasas	Suficiente en grasas	Deficiente en grasas
16:1w7	0,7 ± 0,15	4,7 ± 0,25	-	-
18:1w9	13,1 ± 0,45	28,2 ± 0,50	25,3 ± 0,36	27,5 ± 1,06
18:2w6	27,0 ± 0,92	2,8 ± 0,15	1,6 ± 0,69	0,3 ± 0,10
20:3w9	trazas	25,0 ± 0,91	0,2 ± 0,07	6,9 ± 0,35
20:4w6	18,9 ± 0,78	4,8 ± 0,28	10,4 ± 0,12	5,5 ± 0,19
22:3w9	-	-	trazas	1,6 ± 0,15
22:4w6	1,6 ± 0,12	0,2 ± 0,03	3,4 ± 0,15	1,1 ± 0,10
22:5w6	4,5 ± 0,45	0,3 ± 0,06	2,7 ± 0,26	2,2 ± 0,26
22:6w3	-	-	9,2 ± 0,31	9,6 ± 0,66

Vemos que en corazón el ácido linoleico fué el ácido insaturado presente en mayor cantidad en los lípidos de las ratas controles seguido por el ácido araquidónico. Ambos están visiblemente disminuídos en los lípidos de ratas deficientes con un incremento en los ácidos oleico, palmitoleico y el 20:3w9.

En cerebro encontramos un ácido característico de este órgano para varias especies, el ácido docohexanoico (22:6w3) que no se encuentra en otros tejidos estudiados. El ácido linoleico está en baja concentración y, en la dieta deficiente en grasas, los lípidos se mostraron poco susceptibles a cambiar, si bien hubo una leve disminución en la serie w6 y un aumento en los ácidos de la serie w9. En general el cerebro es menos susceptible a cambios por esta dieta que varios otros tejidos de rata, por ejemplo corazón, testículos, eritrocitos, hígado y plasma. Considera Walker que la relativa estabilidad es debida a la época temprana de la vida en que estos lípidos se forman y a una mayor estabilidad metabólica. En el cerebro el cambio en el contenido de ácidos grasos para las ratas deficientes cambiadas a dieta control fue muy lento, así por ejemplo a los 80 días de disminuir el ácido 22:3w9, estaba aún con valores por encima a los de los controles.

Este comportamiento de los ácidos grasos en los lípidos de los tejidos estudiados se puede correlacionar estrechamente con el parámetro cinético n encontrado en la inhibición por F^- ; las ATPasas de ratas deficientes pasadas a la dieta control dieron en todos los casos, excluyendo cerebro, en pocos días el valor de n de la enzima control.

Solubilización de la ATPasa de microsomas de corazón : Cuando se encontró el efecto arriba descrito con la enzima en membranas interesó saber si era propio de la enzima "per se"

o si dependía de su asociación con la membrana. Entonces se intentó solubilizar la enzima de los microsomas de corazón.

Se trató con digitonina a una concentración final del 0,5% y se obtuvo actividad ATPásica en el sobrenadante de 105.000 x g por dos horas. Los valores de n para la inhibición por F^- fueron -2,0 y -1,0 para las fracciones solubles del lote control y deficiente en grasas, respectivamente (Figura 11).

Las concentraciones de F^- requeridas para obtener inhibición fueron menores que las necesarias en microsomas sin tratar; es factible que la accesibilidad a los sitios del anión estuviera aumentada al tener el sistema menos proteína no activa. (Se duplicó la actividad específica con relación a la enzima microsomal sin tratamiento).

Sin embargo el procedimiento fragmentó a la membrana en partículas menores (21); así a 105.000 x g por 3 horas la fracción activa sedimentó por completo.

La enzima perdió tanto la capacidad de activarse por Na^+ y K^+ como la de ser inhibida por ouabaina; estos datos permiten inferir que posiblemente la enzima, si bien no está libre de la membrana sobre la que se asienta normalmente, se encuentra sobre una membrana incompleta. Esto está avalado en parte por la recuperación de la inhibición por ouabaina que se obtiene al fijar la preparación anterior sobre azida celulosa (21).

H. Yoshida y col. obtuvieron una fracción soluble de cerebro por tratamiento con digitonina al 0,5% y posterior sonicación por 15 minutos a 10 Kciclos / seg (30). La Tabla X muestra que la fracción activa soluble fué, en nuestro caso, menor que con el tratamiento de digitonina sola; asimismo luego de tres horas a 105.000 x g sedimentó.

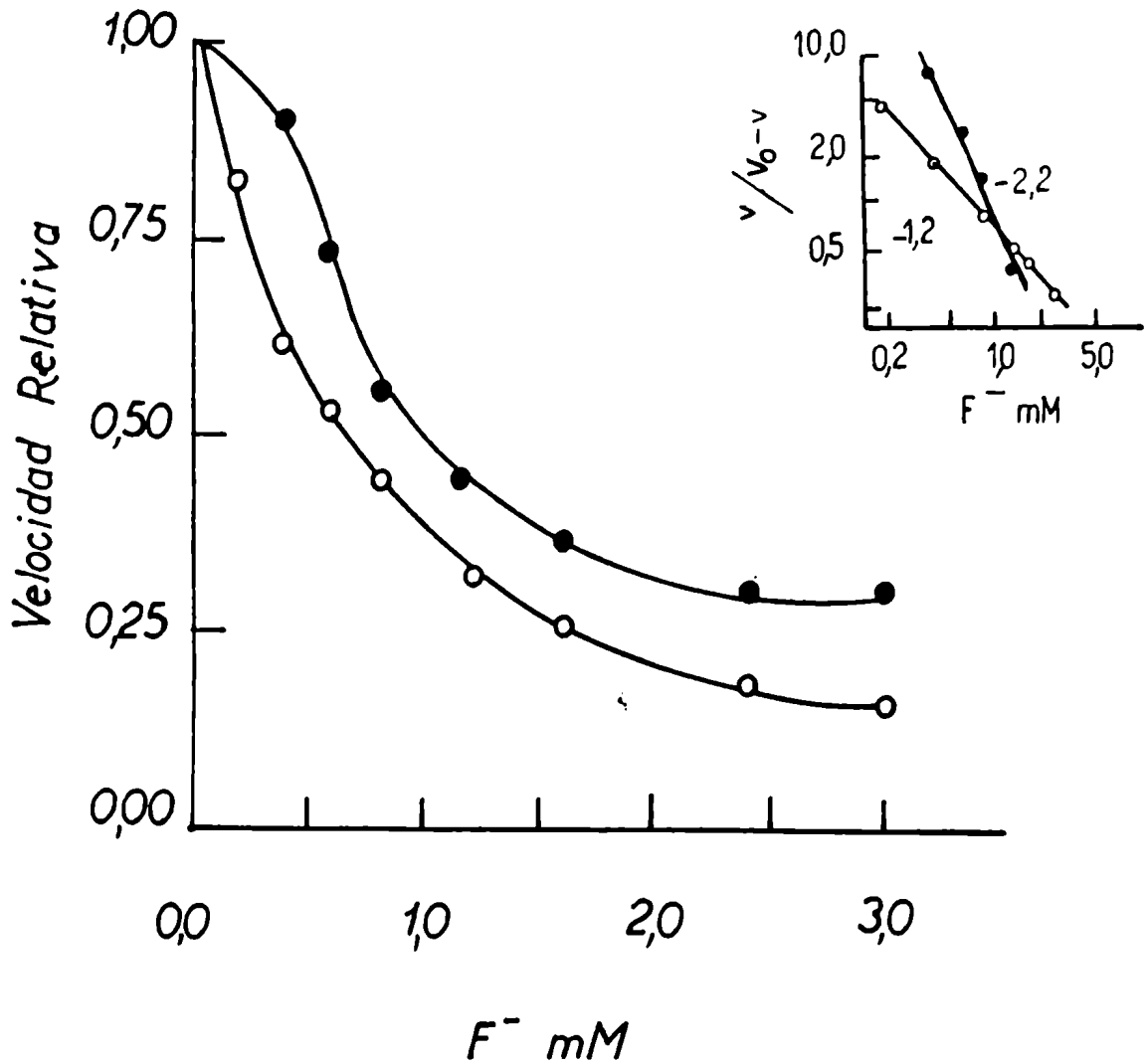


FIGURA 11

Acción de F^- sobre la ATPasa (Mg^{2+}) de ratas alimentadas con dieta suficiente en grasas ●-● y dieta deficiente en grasas ○-○ de microsomas de corazón tratados con digitonina. Gráfico de la velocidad relativa de la reacción en función de (F^-). En el ángulo superior gráfico de $v/V_0 - v$ en función de (F^-) en coordenadas logarítmicas. La pendiente de cada línea está indicada en la Figura.

TABLA X

Actividad Específica de la ATPasa (Mg^{2+}) en la Fracción Microsomal
y Soluble a 105.000 x g en Corazón de Ratas
Acción del Tratamiento con Varios Agentes durante la Solubilización

Microsomas (μ moles PO_4^{-3} /mg. protefna/hr.)	Fracción soluble	Solubilización por acción de :			
		Digitonina	Sonicado	Albúmina	Lecitina
32,5	67,7	+			
15,0	26,5	+		+	
27,0	23,0	+	+	+	+
13,7	21,0	+	+		
14,0	21,0	+	+	+	

R. Tanaka y col. (31) encontraron una ATPasa de membranas de cerebro de buey que por centrifugación a 100.000 x g por 45 minutos quedaba en la fracción soluble. La activación por Na^+ y K^+ y la inhibición por ouabafina solo se obtenían en presencia de lecitina, un fosfolípido. K. Ahmed y col. demostraron que las ATPasas de varios órganos pueden flotar en sucrosa concentrada sugiriendo que ellas existen como lipoproteínas (32). En nuestro sistema la incubación con lecitina de la fracción soluble no permitió recuperar ninguno de los dos efectos arriba mencionados.

Los coeficientes de Hill, como vimos, coincidieron con los obtenidos para los microsomas enteros en sus respectivas dietas, pero la enzima no está en nuestro sistema libre de su membrana soporte. Por lo tanto este experimento no permite deducir que el comportamiento encontrado en la inhibición por F^- no esté relacionado con la composición de la membrana con la que está asociada la proteína enzimática.

c) Activación por Na^+ y K^+ en ATPasa del ghost de glóbulos rojos.

Squires (33) demostró en la ATPasa ($\text{Na}^+ + \text{K}^+ + \text{Mg}^{2+}$) interacciones con Na^+ y K^+ , las cuales pudieron describirse por la ecuación de Hill con $1 < n < 2$, de donde estas cationes pueden ser considerados activadores alostéricos de la enzima.

En la Figura 12 se muestran curvas de activación por Na^+ a una concentración saturante de 200 mM de K^+ para la ATPasa del ghost de ratas alimentadas con la dieta control y con la dieta deficiente en grasas.

Cuando se usaron estos datos en un gráfico de $\log (v/V_m - v)$ versus $\log (\text{Na}^+)$ las pendientes fueron 2,9 y 2,0 para la ATPasa de las ratas en dietas control y deficiente, respectivamente.

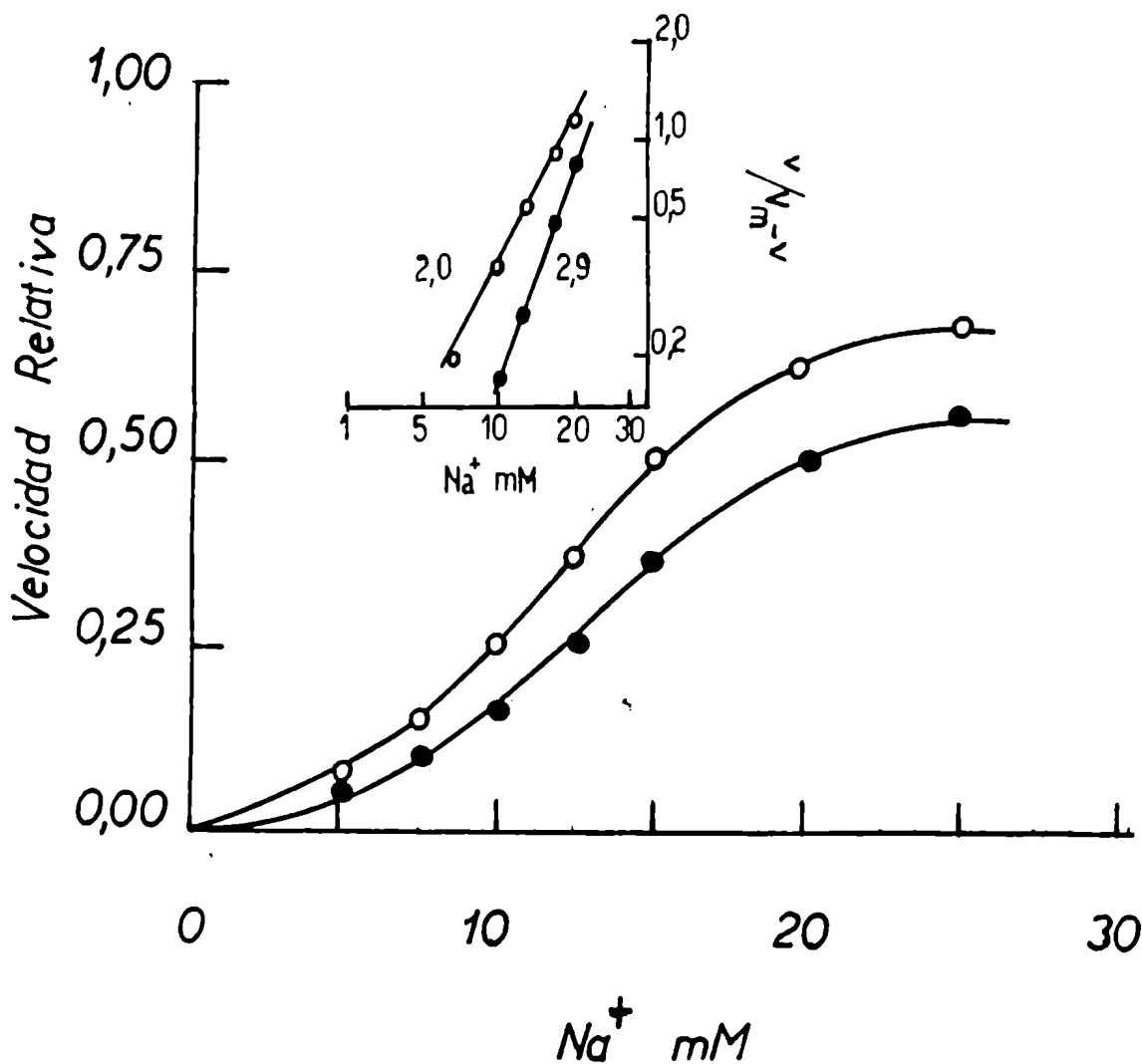


FIGURA 12

Activación de la ATPasa ($Na^+ + K^+$) por Na^+ a 200 mM K^+ . Enzima preparada de ratas alimentadas con dieta suficiente en grasas ●-● y dieta deficiente en grasas o-o. Gráfico directo de velocidad relativa de la reacción en función de (Na^+). En el ángulo superior gráfico de $v/V_m - v$ en función de (Na^+) en coordenadas logarítmicas. La pendiente de cada línea está indicada en la Figura.

Las curvas de la Figura 13 se obtuvieron para la activación por K^+ a 200 mM de Na^+ y las pendientes fueron 2,1 y 1,4 para la enzima de ratas alimentadas con las dietas control y deficiente en grasas, respectivamente.

Como se había encontrado en la inhibición por F^- , los valores de n revertieron al cambiar la dieta, así ratas que por cuatro meses habían estado en dieta deficiente cuando se cambiaron a la dieta control mostraron, a los 15 días, valores de n en el rango de los de ratas que desde su nacimiento habían sido alimentadas con la dieta control.

En la Tabla X I se ven los valores encontrados para los n en las ratas controles para la activación por un ión a varias concentraciones mantenidas fijas del otro ión.

TABLA X I

Valores de n para la Activación de la ATPasa ($Na^+ + K^+$) de Ratas Alimentadas con Dieta Suficiente con Na^+ y K^+ a diferentes (K^+) y (Na^+), respectivamente.

Activación por Na^+			Activación por K^+		
(K^+) mM	n^a	K_m (mM)	(Na^+) mM	n^b	K_m (mM)
50	1,3	6,25			
100	1,8	11,0	100	1,5	0,74
200	2,8	13,7	200	2,2	1,30

^a (Na^+) como en la Figura 12.

^b (K^+) como en la Figura 13.

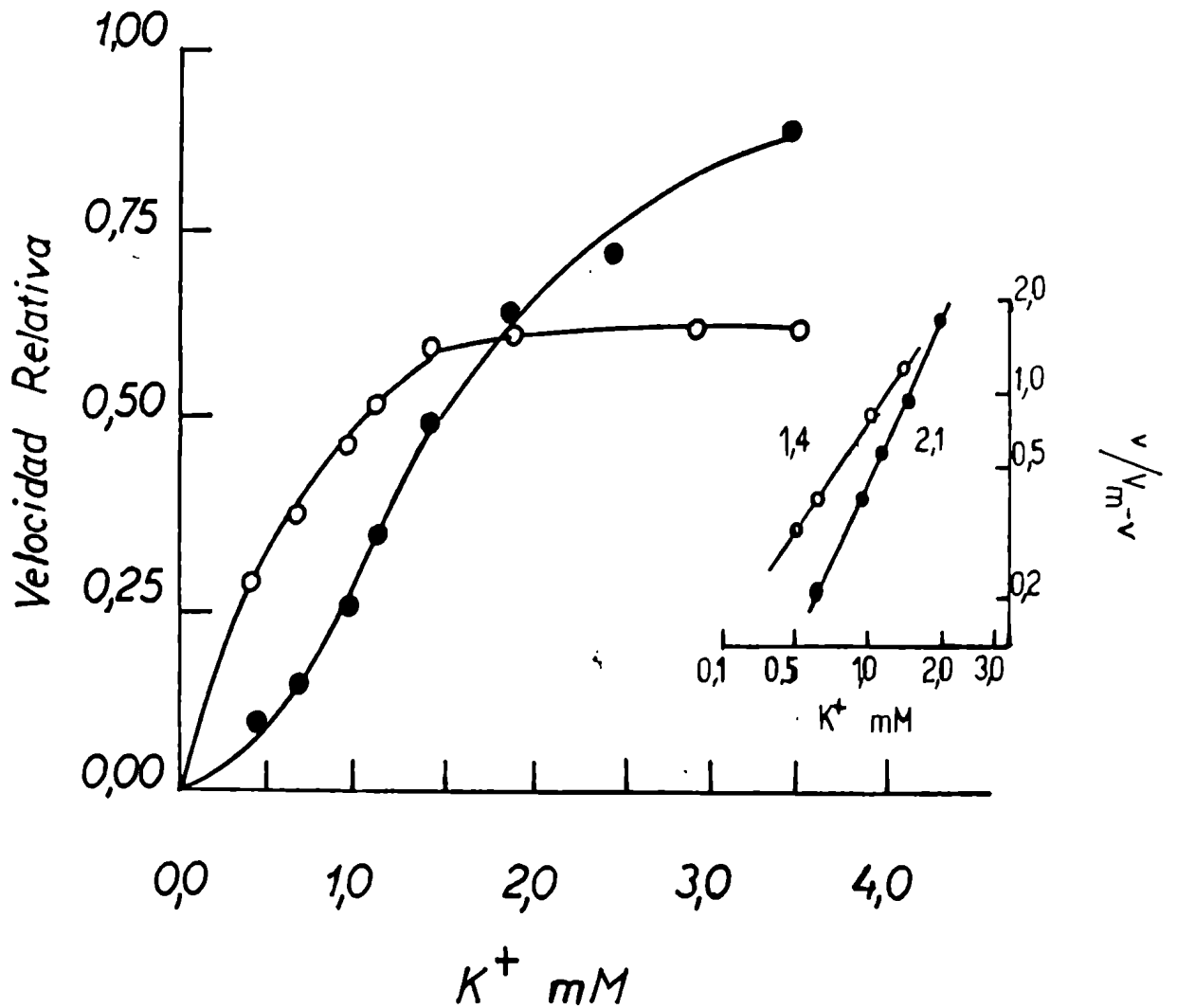


FIGURA 13

Activación de la ATPasa ($Na^+ + K^+$) por K^+ a 200 mM Na^+ . Enzima preparada de ratas alimentadas con dieta suficiente en grasas ●-● y dieta deficiente en grasas o-o. Gráfico directo de velocidad relativa de la reacción en función de (K^+). En el ángulo inferior gráfico de $v/V_m - v$ en función de (K^+) en coordenadas logarítmicas. La pendiente de cada línea está indicada en la Figura.

La Tabla X I I presenta los valores de n en la activación de la ATPasa ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$) para las ratas alimentadas en la dieta deficiente con diferentes concentraciones de Na^+ y de K^+ .

TABLA X I I

Valores de n para la Activación de la ATPasa ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$) de Ratas Alimentadas con Dieta Deficiente, con Na^+ y K^+ a diferentes (K^+) y (Na^+), respectivamente

Activación por Na^+			Activación por K^+		
(K^+) mM	n^a	K_m mM	(Na^+) mM	n^b	K_m mM
50	1,5	9,0	-	-	-
100	1,6	10,5	100	1,4	1,0
200	2,0	12,5	200	1,5	1,0

^a (Na^+) como en la Figura 12.

^b (K^+) como en la Figura 13.

Para los efectos homotrópicos, que como vimos suceden entre ligandos iguales, bajas concentraciones del modificador alostérico facilitan el ingreso de cantidades adicionales del mismo.

En nuestro sistema enzimático, la ATPasa de glóbulos rojos, cuando se variaron independientemente los iones Na^+ y K^+ se obtuvieron curvas sigmoideas de velocidad cuyos gráficos de Hill tuvieron $n > 1,0$ que son los encontrados en procesos cooperativos homotrópicos.

Una interpretación distinta de la respuesta sigmoidea obtenida para el K^+ cuando el Na^+ está en exceso y al revés, es que el ión en alta concentración competiría con el ión presente en una concentración menor por los sitios de este último dando como consecuencia una curva con forma de S (34). Una objeción importante a la interpretación anterior son las curvas de velocidad de reacción versus el efector K^+ que son sigmoideas para la actividad fosfatásica en ausencia de Na^+ como se ha descrito en microsomas de cerebro de rata (35) y en glóbulos rojos en esta tesis.

Priestland y col. encontraron en ghost de glóbulos rojos marcados con Na^{22} que el eflujo de Na^+ era estimulado por el K^+ externo y que era mayor en ausencia de Na^+ en el medio que en su presencia, lo que indicaría competencia entre los dos iones afectándose así el eflujo de Na^+ en la misma forma que se obtuvo con la actividad ATPásica (34).

Askari y col. hallaron en el ghost de glóbulos rojos que el eflujo de Na^+ es estimulado por K^+ en un medio libre de Na^+ y es incrementado por p-nitrofenilfosfato (NPP), mientras que en presencia de Na^+ externo el aumento del eflujo se obtuvo con K^+ + NPP + nucleótido (se probaron ATP y CTP); además se halló una estrecha relación entre los valores del eflujo de Na^+ y los de la actividad fosfatásica. Los autores concluyen que las concentraciones de Na^+ inhiben la fosfatasa y el intercambio de iones requiriéndose la

ocupación por un nucleótido de un sitio modificador para que no haya inhibición (14). Es de interés recalcar que la acción activante del nucleótido requiere la presencia de Na^+ y que la consecuencia es un aumento del efecto activante del K^+ en el paso hidrolítico (36) y en el eflujo del Na^+ .

Estos resultados sugieren que las interacciones entre Na^+ y K^+ son en sitios distintos siendo la función del nucleótido transformarlas en interacciones positivas, posiblemente por un cambio en la estructura de la enzima.

Por su parte Sen y col. (37) en base a estudios anteriores y de inhibición por ouabafina proponen como mínimo dos conformaciones principales de la enzima con las siguientes características :

Conformación	E_1	E_2
Presentación de "carriers"	Interna	Externa
Afinidad por ligandos	Na^+ , ATP	K^+ , ouabafina
Catalizadores para la transfosforilación	Na^+ y Mg^{2+}	K^+
Formas transientes asociadas	$E_1\text{-P}$	$E_2\text{-P}$
Reactividad de las fosfoformas	con ADP	con agua o ouabafina
Afinidad por ouabafina	baja	alta

Coincidiendo con Jardetzky (53) sugieren que estos cambios de conformación a su vez dan los cambios en orientación de los transportadores y en la afinidad de los ligandos resultando la translocación de 3 Na⁺ y 2 K⁺ por cada P_i hidrolizado.

En conclusión vemos un fuerte cúmulo de evidencias que tienden a demostrar que la enzima se comporta para la activación por Na⁺ y K⁺ como una proteína munida de propiedades alostéricas.

En la enzima proveniente del ghost de glóbulos rojos de ratas en dieta control, tenemos n = 2,8 para la activación por Na⁺ y 2,2 para la activación por K⁺ a concentraciones altas (200 mM) del otro catión, estos resultados coinciden con los 3 Na⁺ y 2 K⁺ que se traslocan al funcionar la bomba.

Para la enzima del lote deficiente en grasas, a 200 mM del catión mantenido en concentración constante, el valor de n es 2,0 para la activación por Na⁺ y 1,5 para la debida al K⁺, indicando que la interacción entre y la accesibilidad a los sitios de los dos iones está disminuída por un cambio en la conformación de la proteína que a su vez dependería de la dieta en cuestión ya que, revertiendo la dieta por 15 días, los valores de n obtenidos son los mostrados en la Tabla X I.

Al respecto Kummerow cree posible que cambios en la velocidad de hemólisis que se obtienen con distintas dietas reflejen cambios estructurales que aparecen en las membranas de los eritrocitos debido a la incorporación de ácidos grasos específicos (38). Con las dietas usadas, suficientes y deficientes en grasas, hemos visto que los lípidos en la membrana de los eritrocitos incorporan ácidos grasos distintos; los diferentes coeficientes

de Hill obtenidos para los distintos efectores usados darían cuenta del cambio estructural sufrido por la membrana.

d) p-Nitrofenil fosfatasa del ghost de eritrocitos.

La hidrólisis del p-Nitrofenilfosfato (p-NPP) y otros fosfatos orgánicos es catalizada por el sistema enzimático que tiene actividad de ATPasa y es estimulada por K^+ .

K_m del sustrato e influencia del F^- en el sustrato : El K_m del sustrato para la enzima proveniente de ratas controles se obtuvo de una representación de Lineweaver y Bürk de (s/v) en función de (s); el K_m fué 3,2 mM. En presencia de una concentración constante de 0,3 mM de F^- , la determinación del K_m por L-Bürk mostró que el F^- y el p-Nitrofenilfosfato no compiten por el mismo sitio en la enzima (Figura 14).

El coeficiente de Hill $n = 1,0$ es el mismo en presencia o ausencia de F^- . Para las ratas deficientes en grasas se obtuvieron los mismos valores de n y K_m .

El sustrato p-NPP presentó cinética Micaeliana en las enzimas de ratas controles y deficientes, o sea como sucedió con el ATP en la ATPasa, no se encontraron diferencias entre las dos dietas a este nivel. En presencia de F^- no se alteraron los valores de n y K_m y nuevamente como en la ATPasa, el F^- forma un sistema V negativo con el sustrato y se comporta como un efector heterotrópico negativo al disminuir la velocidad de la reacción sin modificar al n y al K_m (Tabla X I I I).

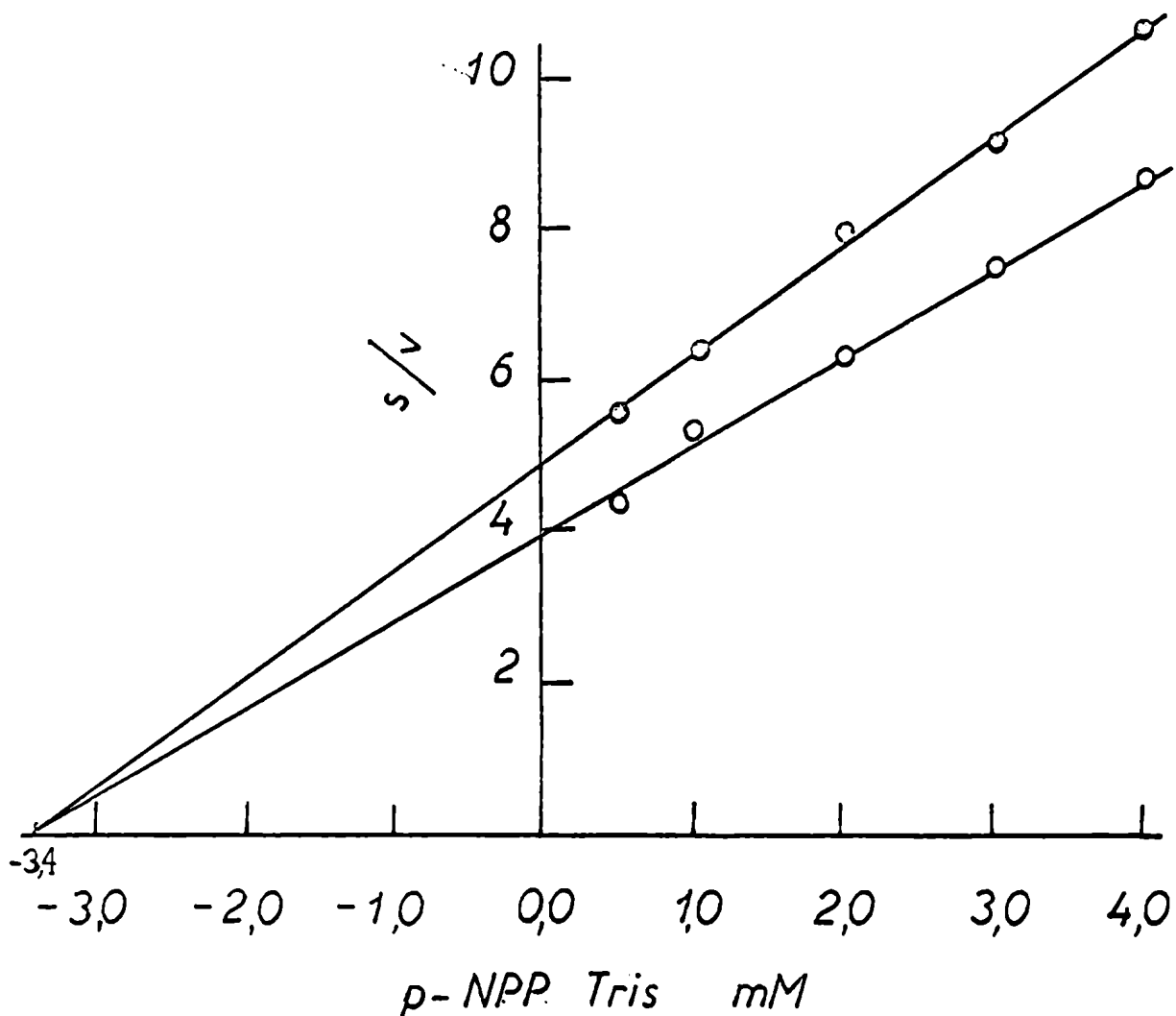


FIGURA 14

Efecto de la concentración de sustrato sobre la actividad de la p-NPPasa ($Mg^{2+} + K^+$). Gráfico de la velocidad de producción de p-Nitrofenol en ausencia ●-● y en presencia ○-○ de 0,3 mM de F^- en unidades arbitrarias en función de la concentración de sustrato según Lineweaver-Bürk.

TABLA X I I I

Constantes Cinéticas de la Inhibición por F^- de la p-NPPasa ($Mg^{2+} + K^+$) de Ratas Alimentadas con Dietas Suficiente y Deficiente en Grasas, respectivamente.

	Suficiente en grasas		Deficiente en grasas	
	(F^-) mM		(F^-) mM	
	0.0	0.3	0.0	0.3
K_m (mM)	3.2	3.2	3.3	3.3
n	1.0	1.0	1.0	1.0
V_m μ moles p-NFenol/mg. proteína/hr.	11.0	6.5	10.8	8.6

Inhibición por F^- : Se estudió el comportamiento de la p-NPPasa frente al F^- . Representando la velocidad de reacción expresada como μ M p-Nitrofenol/mg. proteína/hr. , en función de F^- se obtuvieron curvas sigmoideas para la p-NPPasa (Mg^{2+}) y para la p-NPPasa ($Mg^{2+} + K^+$) del ghost de ratas controles (Figura 15A).

Las curvas correspondientes en la enzima del ghost de ratas con dieta deficiente en grasas fueron hiperbólicas (Figura 15B).

Los n y $K_{0,5}$ que fueron obtenidos con los datos de las Figuras 15A y 15B y regráficos según Hill, se muestran en las Figuras 15A y 15B al lado de cada curva. Los valores de $K_{0,5} = 0,65$ mM y 0,61 mM para la p-NPPasa ($Mg^{2+} + K^+$) y 1,0 mM y 0,9 mM para la

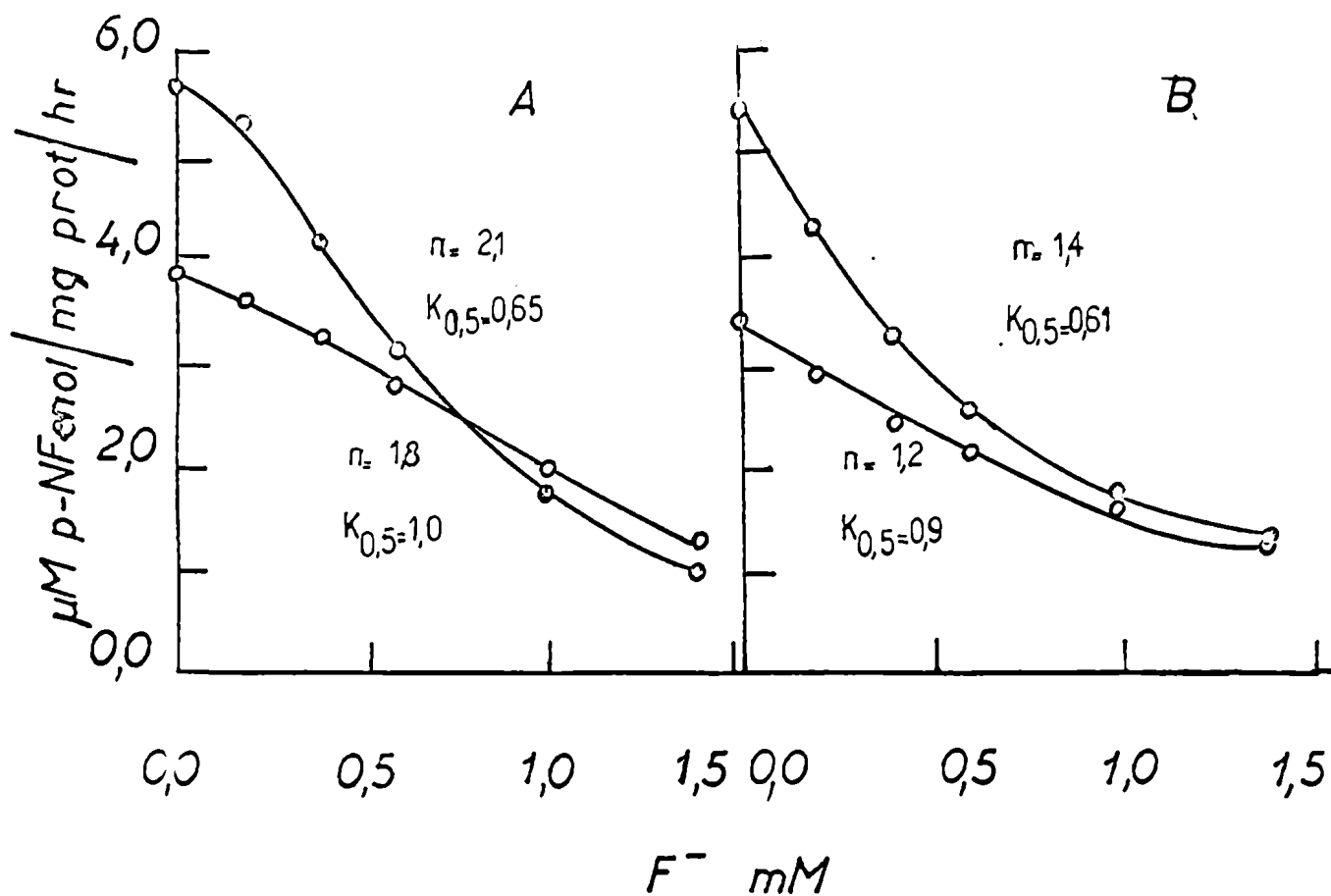


FIGURA 15

Acción de F^- sobre la p-NPPasa (Mg^{2+}) o-o y sobre la p-NPPasa ($Mg^{2+} + K^+$) ●-● de ratas alimentadas con dieta suficiente en grasas (A) y dieta deficiente en grasas (B). Gráfico de la actividad específica de la enzima en función de (F^-). El valor de n y de $K_{0,5}$ de cada curva está indicado en la Figura.

p-NPPasa (Mg^{2+}) de ratas controles y deficientes respectivamente, muestran que la concentración de F^- para inhibir el 50% de la reacción es la misma para las dos dietas. Aunque si observamos las Figuras 15A y 15B vemos que hay un efecto adicional debido al K^+ y es que para las ratas controles la inhibición de la p-NPPasa ($Mg^{2+} + K^+$) es siempre mayor que la de la p-NPPasa (Mg^{2+}). Se observa que en las enzimas de ratas deficientes se alcanza a partir de 1,4 mM de F^- un valor de inhibición que no es rebasado por ninguna de las dos actividades enzimáticas.

p-NPPasa (K^+) y su inhibición por F^- : Los valores de n y $K_{0,5}$ para la p-NPPasa (K^+) se determinaron gráficamente con la ecuación que ya habíamos desarrollado anteriormente para la ATPasa ($Na^+ + K^+$) :

$$\log \left[\frac{V_t - V_b}{v_t - v_b} - 1 \right] = \log K_h - n \log S$$

donde V_t y V_b son velocidades máximas de reacción para la p-NPPasa ($Mg^{2+} + K^+$) y para la p-NPPasa (Mg^{2+}), respectivamente; v_t y v_b son velocidades de reacción para las mismas dos enzimas, K_h es el K_m para la p-NPPasa (K^+), n es el coeficiente de Hill y S es la concentración de F^- .

• En la Tabla XIV se muestran los datos obtenidos siendo 3 mM de K^+ la concentración del catión que da el 50% de activación en la reacción. 9 mM de K^+ la concentración correspondiente a saturación y 20 mM de K^+ pertenece a un exceso del catión. Los datos de las Figuras 15A y 15B se usaron para los valores a 9 mM de K^+ .

TABLA X I V

Constantes Cinéticas de la Inhibición por F^- con Varios (K^+) de la p-NPPasa (K^+) de Ratas Alimentadas con Dietas Suficiente y Deficiente en Grasas, respectivamente.

K^+ (mM)	Suficiente en grasas		Deficiente en grasas	
	n	$K_{0,5}$ (mM)	n	$K_{0,5}$ (mM)
3	3.1	0.39	2.2	0.29
9	3.0	0.42	2.0	0.30
20	3.4	0.27	2.0	0.40

El efecto adicional del K^+ en la p-NPPasa ($Mg^{2+} + K^+$) indicado arriba pudiera explicarse con el conocimiento que para las ratas controles (donde se ve este efecto) el n es 3,0 para la p-NPPasa (K^+) y para las ratas deficientes (que no presentan el efecto) el n es 2,0 en la enzima correspondiente, señalando que el número de sitios accesibles al F^- , en nuestras condiciones experimentales, es mayor en la fosfatasa de ratas controles. Es probable también que los n encontrados sean los valores límites superiores en nuestro sistema pués con las tres concentraciones de K^+ usadas : mitad de saturación, saturación y con un exceso del catión no se alteraron los $K_{0,5}$ ni los coeficientes de Hill (Tabla XIV)

Activación por K^+ : Tanto las enzimas provenientes de ratas controles como de ratas deficientes en grasas presentaron curvas sigmoideas para la activación por K^+ (Figura 16).

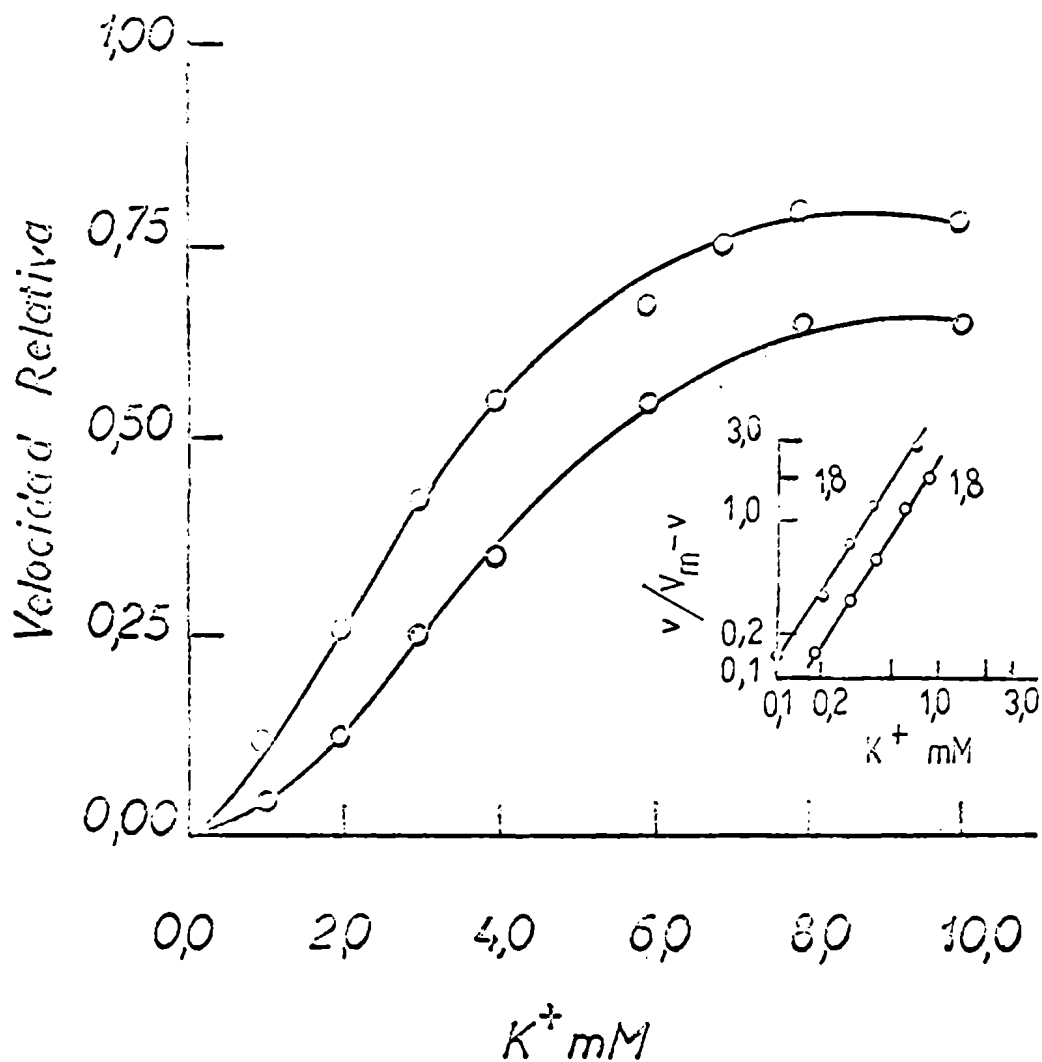


FIGURA 16

Activación de la p-NPPasa (Mg^{2+}) por K^+ , proveniente de ratas alimentadas con dieta suficiente en grasas o-o y dieta deficiente en grasas o-o. Gráfico directo de velocidad relativa de la reacción en función de (K^+). En el ángulo inferior gráfico de $v/V_m - v$ en función de (K^+) en coordenadas logarítmicas. La pendiente de cada línea está indicada en la Figura.

Los valores de n y $K_{0,5}$ fueron 1,8 y 3,5 mM y 1,8 y 5,4 mM respectivamente para la p-NPPasa de ratas controles y deficientes.

Vemos así que el K^+ mostró efectos cooperativos homotrópicos positivos en las enzimas de las dos dietas. La literatura también presenta ejemplos sobre la acción cooperativa del activador K^+ (39, 40).

Influencia del pH sobre la activación por K^+ y sobre la inhibición por F^- : Los experimentos hasta acá descriptos se realizaron a pH 7,4. Se estudió la velocidad de la acción enzimática en el rango de pH entre 7,3 y 8,9 (Figura 17) para el lote de ratas controles. Se vió que a pH 8,1 la activación por K^+ es máxima y es del órden del 300%. El mismo comportamiento mostró la enzima de ratas deficientes en grasas.

A pH 8,1 la activación por K^+ dió $n = 1,7$ para las dos dietas y $K_{0,5} = 3,6$ mM y 4,0 mM para la fosfatasa de ratas controles y deficientes, es decir que ni a pH 7,4 ó 8,1 se expresaron diferencias conformacionales entre las enzimas de animales en las dos dietas para la activación por K^+ .

La inhibición por F^- a pH 8,1 presentó curvas más sigmoideas con $n = -2,5$ para la p-NPPasa ($Mg^{2+} + K^+$) del ghost control y $n = -1,4$ para la del ghost de ratas deficientes en grasas.

Activación por K^+ y la influencia del sustrato y del Cl_2Mg : Como se vió arriba los coeficientes de Hill a pH 7,4 y 8,1 son iguales en la activación por K^+ . En la Tabla X V se muestran los valores de n y $K_{0,5}$ para la activación por K^+ en condiciones diferentes.

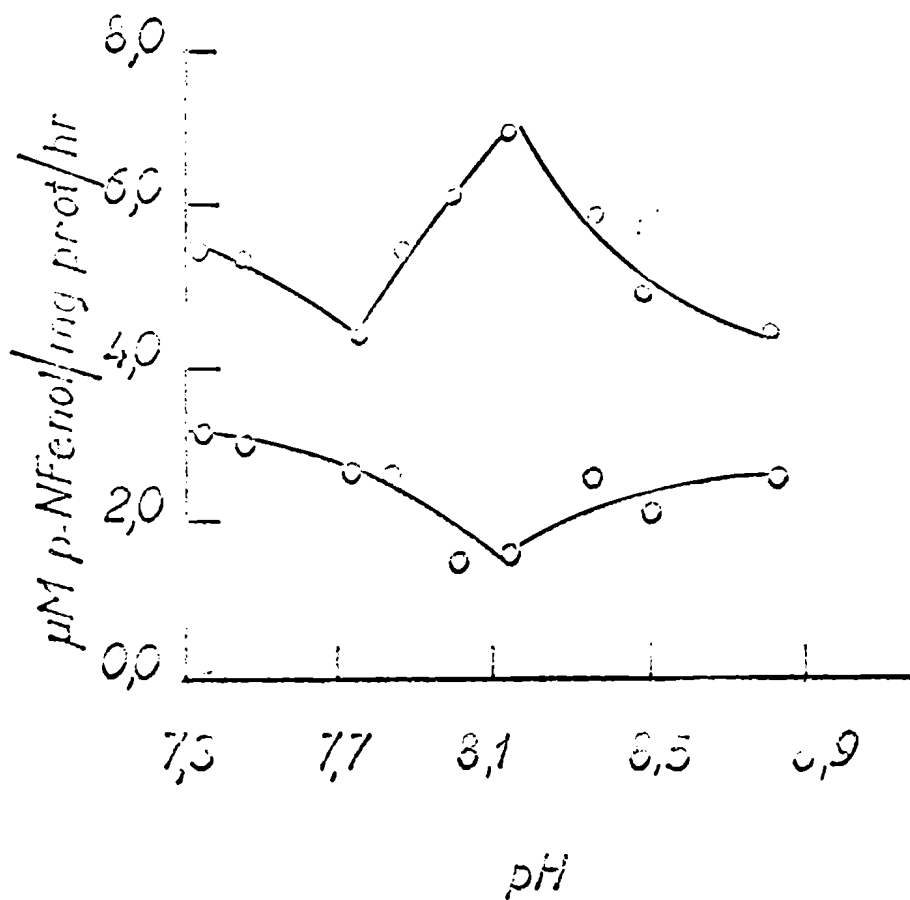


FIGURA 17

Efecto del pH sobre la actividad específica de la p-NPPasa (Mg^{2+}) o-o y la p-NPPasa ($Mg^{2+} + K^+$) ●-● de ratas alimentadas con dieta suficiente en grasas.

TABLA X V

Constantes Cinéticas de la Activación por K^+ de la p-NPPasa (Mg^{2+}) en función de (p-NPP) y de (Cl_2Mg) de Ratas Alimentadas con Dietas Suficiente y Deficiente en Grasas, respectivamente

p-NPP (mM) Cl ₂ Mg (mM)	Suficiente en grasas		Deficiente en grasas	
	n	K _{0,5} (mM)	n	K _{0,5} (mM)
10/5	1.5	2.4	1.5	2.7
10/2.5	1.8	5.6	1.6	4.0
2.5/2.5	1.6	2.4	1.1	2.5
2.5/0.5	1.9	1.4	1.0	1.7

Primeramente se duplicó la concentración de p-NPP y luego se estudió llevando al doble las concentraciones de sustrato y Cl_2Mg , en ambas situaciones los n fueron similares y los $K_{0,5}$ variaron escasamente. Pero se observa una diferencia neta cuando la concentración de p-NPP es 2,5 mM y la correspondiente de Cl_2Mg , 0,5 mM. La concentración de Cl_2Mg 0,5 mM en estas condiciones saturó el 50%.

En el ghost de ratas deficientes en grasas, con valores de $K_{0,5}$ del mismo orden, hay una disminución drástica de las interacciones cuando usamos 2,5/2,5 y 2,5/0,5 (mM p-NPP-Tris/mM Cl_2Mg).

Sobre la base de estudios de permeabilidad de cationes monovalentes se ha sugerido que el Mg^{2+} puede actuar como un cohesivo interno de la membrana en eritrocitos humanos (41). Estudios efectuados en monocapas implicaron grupos fosfato y carboxilo de fosfatidilserina y grupos de fosfato de fosfatidil etanolamina como sitios importantes de intercambio en la superficie celular (42). Por otro lado el Mg^{2+} y el Ca^{2+} pueden causar cambios en el espectro RMN de membranas bacterianas en la parte del espectro asociado con CH_2 en cadenas alifáticas de los componentes lipídicos. (43). Estos datos fueron interpretados como evidencia de alteraciones del estado físico de lípidos en las membranas por cationes divalentes. Tal efecto sobre los lípidos pudiera presumiblemente inducir cambios conformacionales en otros componentes de la membrana y llevar a un reordenamiento significativo de la estructura entera de la membrana.

Influencia del F^- en la activación por K^+ : En una representación de velocidades de reacción en función de (K^+) en ausencia y con 0,4 mM de F^- se encontró que la velocidad máxima alcanzada en presencia de F^- es menor y que el $K_m = 0,5$ mM no se modifica. El mismo comportamiento se encontró en ambos grupos de animales siendo indicativo que F^- y K^- no compiten (Figura 18).

En presencia de F^- el n para el lote deficiente elevó su valor de $n = 1,0$ a $n = 1,8$; niveles similares a los del lote control en el cuál, tanto en presencia o no de F^- , no se observan cambios.

El modelo de Monod et al. prevee que en los dos o más estados posibles en que la proteína puede encontrarse, un efector negativo con mayor afinidad hacia uno de esos estados,

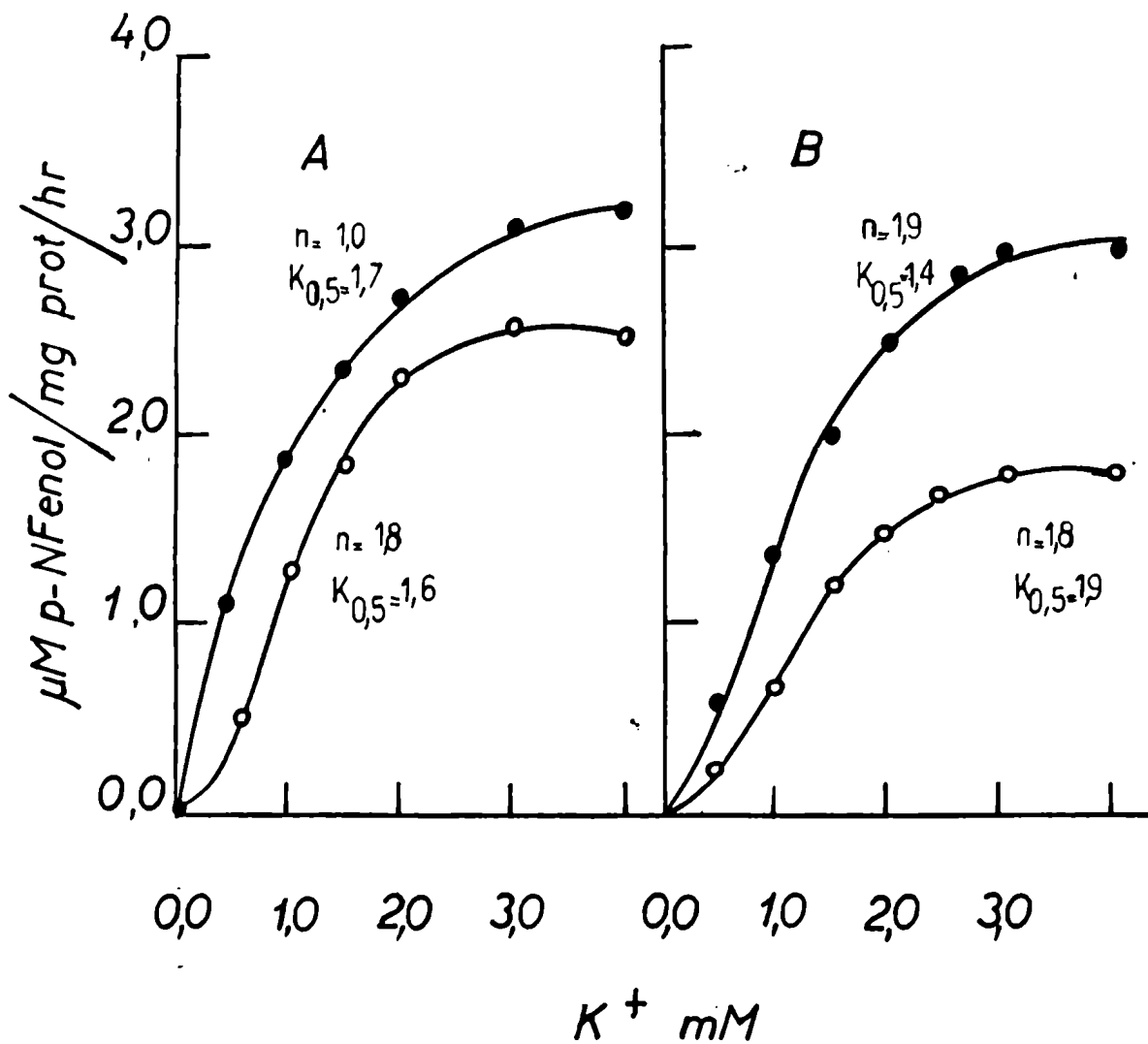


FIGURA 18

Activación de la p-NPPasa (Mg^{2+}) en función de (K^+) en presencia de $0,4 \text{ mM}$ de F^- ○-○ y en ausencia de F^- ●-● proveniente de ratas alimentadas con dieta deficiente en grasas (A) y con dieta suficiente en grasas (B). El valor de n y de $\text{K}_{0,5}$ está indicado al lado de cada curva.

sea el T, incrementará la cooperatividad de un efector positivo hacia el estado donde éste presente mayor afinidad, el estado R. En el ghost de glóbulos rojos de ratas, el F^- incrementó el n para el efector positivo K^+ en la enzima de animales deficientes.

El comportamiento de la fosfatasa de ratas deficientes en grasas se corresponde con el previsto para dos efectores de acción antagónica y sugiere que la enzima presenta una conformación diferente en su estructura con respecto a la de ratas controles, en la membrana de eritrocitos.

Hasta acá hemos identificado el diferente comportamiento alostérico en las dos dietas por análisis de parámetros cinéticos, si bien desviaciones de la cinética de Michaelis Menten no es sinónimo de efectos alostéricos. En este sentido es característico el estudio hecho por Gawron et al. (44) de la succinato dehidrogenasa quién presenta cinética que puede explicarse como una secuencia de reacciones en varios estados o multiestados. Asimismo Koshland et al. hacen notar que los varios modelos por ellos desarrollados de interacción de subunidades se caracterizan inadecuadamente solo en base a datos cinéticos (45). Se buscaron evidencias adicionales de cambios conformacionales a través del estudio del efecto de la temperatura sobre las fosfatasas.

Influencia de la temperatura en la p-NPPasa (Mg^{2+}) y p-NPPasa ($Mg^{2+} + K^+$) : Las actividades de las p-NPPasas activadas por (Mg^{2+}) y por ($Mg^{2+} + K^+$) fueron medidas a varias temperaturas. Se encontró que el incremento con la temperatura, es decir la relación entre las actividades específicas de la p-NPPasa ($Mg^{2+} + K^+$) y p-NPPasa (Mg^{2+}) era

constante en todo el rango de temperaturas estudiado,

La ecuación de Arrhenius que relaciona la velocidad de la reacción con la temperatura, en su forma integrada es :

$$\ln k = - \frac{E_a}{RT} + \text{Constante}$$

donde k es la constante de velocidad específica; E_a , la energía de activación de Arrhenius; R , la constante de los gases y T la temperatura absoluta. Un gráfico de $\ln k$ versus $(1/T)$ mostrará en general una débil curvatura, sin embargo hay casos en que la falta de linealidad se hace más pronunciada. La curva puede resolverse en dos o más partes cada una de las cuales se aproxima a la linealidad; esas discontinuidades en reacciones enzimáticas se han relacionado con cambios en la estructura de la proteína (46). Una representación de este tipo para la p-NPPasa del ghost de ratas controles mostró una discontinuidad a 30°C sea Mg^{2+} el ión presente o Mg^{2+} y K^+ (Figura 19).

La representación de la ecuación de Arrhenius para las p-NPPasas de ratas deficientes en grasas pudo resolverse en tres partes, la primera hasta 30°C, otra hasta 37°C donde el incremento de T no permitió detectar modificaciones a k , y una tercera a partir de 37°C (Figura 19).

Estos datos fueron acotados midiendo los valores de la velocidad de la reacción (asumida como directamente proporcional a "k") entre 30°C y 43°C cada dos grados centígrados. En el caso de la enzima de ratas deficientes en grasas, k fué constante hasta 37°C y luego siguió el modelo de la Figura 19 sea para Mg^{2+} o ($Mg^{2+} + K^+$).

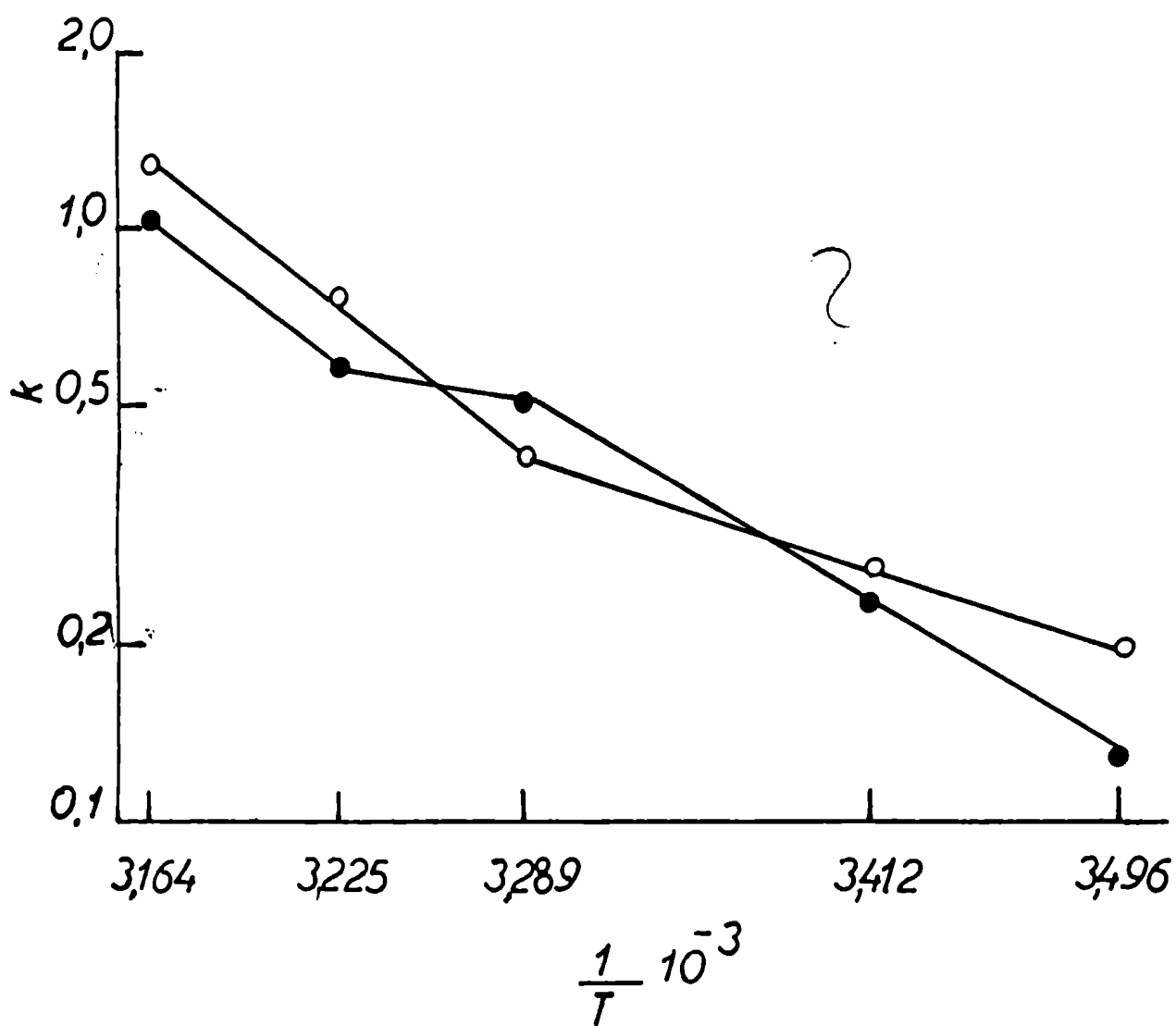


FIGURA 19

Efecto de la temperatura sobre la p-NPPasa ($Mg^{2+} + K^+$) de ratas alimentadas con dieta suficiente en grasas o-o y dieta deficiente en grasas ●-●.

Las E_a se calcularon por cuadrados mínimos y fueron prácticamente las mismas en las varias porciones en que se resolvieron las curvas, sugiriendo que las conformaciones de las enzimas pudieran ser similares a ciertas temperaturas, concretamente hasta 30°C y luego por sobre los 37°C (Tabla X V I).

TABLA X V I

E_a (calorías/mol/grado) para las Distintas Partes en que se puede dividir la Curva de Arrhenius

Dieta	Temperatura			
	Hasta 30°C		Sobre 30°C	
	(Mg^{2+})	($Mg^{2+} + K^+$)	(Mg^{2+})	($Mg^{2+} + K^+$)
Suficiente en grasas	4.121	5.918	35.298	30.992
Deficiente en grasas	4.990	6.498	47.065	46.779

Activación por K^+ a distintas temperaturas : Teniendo en cuenta los valores de las E_a encontrados para la enzima : una E_a de unos 4.500 cal/mol/grado en la primera zona de la curva hasta 30°C para ambas dietas y unos 40.000 cal/mol/grado en la zona que se inicia a partir de los 37°C también para las dos dietas, se pasó a medir a 25°C, 37°C y 43°C los valores de n y de $K_{0,5}$. Suponíamos que en las regiones de igual E_a los valores de n y $K_{0,5}$ podían coincidir para la activación por K^+ en el ghost de ratas controles y deficientes en grasas. Efectivamente, la Tabla XVII muestra que a 25°C y 43°C no hay

prácticamente diferencias entre los n y $K_{0,5}$ para ambas dietas. En cambio encontramos diferencias a 37°C , temperatura que da el punto de inflección en ratas controles y que corresponde a la zona en que los cambios de E_a son muy pequeños para las ratas deficientes.

TABLA X V I I

Activación por K^+ de la p-NPPasa (Mg^{2+}) a distintas Temperaturas

Dieta	25°C		37°C		43°C	
	n	$K_{0,5}$ (mM)	n	$K_{0,5}$ (mM)	n	$K_{0,5}$ mM
Suficiente en grasas	1,3	0,28	1,9	0,62	1,85	0,56
Deficiente en grasas	1,1	0,18	1,0	0,17	1,80	0,63

La energía de activación y la entropía de activación se relacionan con la constante de velocidad k_r

$$k_r = \frac{kT}{h} e^{\frac{\Delta S^\ddagger}{R} - \frac{E}{RT}}$$

donde k es la constante de Boltzmann; h , es la constante de Planck y ΔS^\ddagger , la entropía de activación. Los incrementos en k_r y por ende en la velocidad de la reacción enzimática deben aumentar a ΔS^\ddagger y/o disminuir E . Como E se incrementó cuando la velocidad de la reacción hizo lo propio (por cambios en la pendiente de un gráfico de Arrhenius), debe ΔS^\ddagger también aumentar para revertir el cambio de E . La entropía puede ser vista como una medida del

orden del sistema y así un cambio positivo en la entropía de activación, que sucede durante la hidrólisis del p-Nitrofenilfosfato, es un apoyo adicional de un cambio conformacional.

Hay antecedentes de enzimas con curvas de Arrhenius en segmentos; Gruener y Avi-dor en la ATPasa de microsomas obtenidos de cerebro encontraron discontinuidades en la pendiente a 6°C y a 20°C tanto en la presencia de Mg^{2+} o de Mg^{2+} , Na^+ y K^+ ; dichas discontinuidades se han relacionado con cambios en la estructura enzimática (46, 47). Emmelot y Bos describen que en la ATPasa de membranas del plasma se produce entre 30°C y 40°C un cambio de estructura en la membrana y sería responsable esta estructura cambiada de la actividad disminuída de la ATPasa (3).

En las curvas obtenidas para la fosfatasa consideramos llamativos dos aspectos :

1) pendientes de los gráficos que coinciden por sobre y por debajo del punto de transición para las dos fosfatasas (controles y deficientes), y 2) la identidad del punto de transición a 30°C para las dos enzimas.

G. Wilson et al. estudiando el efecto de la temperatura sobre el transporte de β -galactósidos y β -glucósidos en un auxótrofo de ácidos grasos insaturados, encontraron curvas de Arrhenius con inflexiones sugiriendo que la membrana puede existir en dos estados físicos, por arriba y por debajo del punto de transición que serían determinados por la composición de la fase lipídica (48).

La p-NPPasa de ratas deficientes se encuentra en una estructura lipoproteica modificada con respecto a las controles y sufre una primera transición a 30°C pero la nueva configuración es más rígida y precisa un incremento de varios grados centígrados para

alcanzar la energía necesaria y pasar a una segunda configuración. La composición de los ácidos grasos en los componentes lipídicos de la membrana pudiera ser responsable de las temperaturas en que se producen las discontinuidades en cada caso.

De ser cierto lo anterior, si se obtiene la enzima completamente soluble deben presentar ambas igual comportamiento frente a los efectores estudiados, tanto la proveniente de controles y deficientes serían alostéricas. Existen en nuestro laboratorio trabajos adelantados que otra enzima de membrana, la colinesterasa, se comporta en este sentido (49).

CAPITULO I V

DISCUSION GENERAL

Se efectuaron medidas cinéticas en dos enzimas, ATPasa de membranas de eritrocitos, de microsomas de cerebro, corazón y riñón de ratas y p-NPPasa en membranas de eritrocitos de ratas sometidas a dos dietas que difieren en el contenido de ácidos grasos esenciales y que llamamos dieta control o suficiente en grasas y dieta deficiente en grasas.

Estos ácidos llamados esenciales no pueden biosintetizarse o son sintetizados en cantidades por debajo de las requeridas por animales que los necesitan en procesos tales como crecimiento, mantenimiento y el funcionamiento adecuado de procesos biológicos.

Como los ácidos grasos esenciales intervienen en la estructura de las membranas es factible que en deficiencia de ácidos grasos esenciales se produzcan en estas membranas cambios estructurales.

Por otro lado la deficiencia producida en las ratas modificó la composición de los ácidos grasos en los lípidos de las membranas de eritrocitos, riñón y corazón, siendo éstos los constituyentes principales de la red lípido-proteína. El efecto de la composición cambiada de los fosfolípidos, el largo de la cadena y la insaturación de las cadenas parafínicas pueden provocar algunas de las variaciones en las propiedades de las membranas (50).

Las ATPasas y p-NPPasas estudiadas son enzimas localizadas en membranas y cuyos caracteres alostéricos frente a diversos efectores presenta modificaciones de una a otra dieta de las usadas. Es nuestra intención correlacionar estos comportamientos con

diferentes composiciones lipídicas de la membrana. Sugestivamente la ATPasa de microsomas de cerebro cuya composición en lípidos varía escasamente en ambas dietas, se mostró invariable en su comportamiento ante la inhibición por F^- .

Con la p-NPPasa se hicieron gráficos de Arrhenius que dieron curvas con varios segmentos, ya vimos que éstos se han relacionado con cambios en la estructura enzimática. Se ha visto que membranas de *Mycoplasma laidlawii* sufren transiciones a temperaturas que dependen de la composición lipídica de la membrana (51). Parece probable que membranas con composiciones diferentes en lípidos influyan en las propiedades termodinámicas de enzimas localizadas en ellas, dando curvas de Arrhenius diferentes para las dos dietas.

J. P. Changeux et al. desarrollaron una teoría para propiedades cooperativas de membranas biológicas consideradas como una colección ordenada de unidades lipoproteína o "protómeros" (52). Podemos analizar nuestros resultados en la siguiente manera :

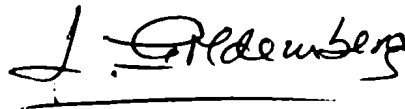
- 1) Las membranas bajo nuestro estudio tienen diferente composición lipídica; sus protómeros también deben serlo.
- 2) Las enzimas analizadas bajo una dieta son alostéricas y bajo otra esta propiedad se minimiza.
- 3) Si las enzimas fueran alostéricas al dejar la membrana en cualquiera de las dietas sería la membrana quién las modifica. Es así como se ha encontrado en la Acetilcolinesterasa de ghost de eritrocitos de ratas.

Es predecible que otras enzimas de membrana también se alteren con la dieta, como sucede con la colinesterasa que hemos mencionado; también procesos biológicos impor-

tantes relacionados con la estructura de membranas celulares como ser : iniciación o propagación de impulsos nerviosos y la respuesta a diversos agentes farmacológicos de membranas excitables (ouabafina).

El tipo de respuesta a las distintas dietas deficientes en lípidos sería función de la especie animal elegida; así la deficiencia de vitamina E en conejos provoca cambios en la actividad, K_m y pH óptimos de las ATPasas de membranas de eritrocitos. Estos cambios no se encuentran en ratas.

Finalmente sería interesante comprobar la composición de membranas de microorganismos crecidos en medios de cultivo suplementados con diversos ácidos grasos y las posibles implicaciones sobre el comportamiento de las bacterias. Es probable que este tipo de estudios resulte de interés tanto al campo básico como al aplicado.

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'M. S. ...', written over a horizontal line.A handwritten signature in black ink, appearing to be 'J. Goldberger', written over a horizontal line.

Wittmann

J. Goldenberg

BIBLIOGRAFIA

- (1) Schwartz, A. , Bachelard, H.S. and Mc Ilwain, H. , *Biochem. J.* , 84 (1962) 626.
- (2) Hosie, R.J.A. , *Biochem. J.* , 93 (1964) 13P.
- (3) Emmelot, P. and Bos, C.J. , *Biochim. Biophys. Acta* , 120 (1966) 369.
- (4) Farfas, R.N. , Tesis doctoral presentada ante la UBA (1967).
- (5) Skou, J.C. , *Biochim. Biophys. Acta* , 42 (1960) 6.
- (6) Post, R.L. , Sen, A.K. and Rosenthal, A.S. , *J. Biol. Chem.* , 240 (1965) 1437.
- (7) Albers, R.W. , Fahn, S. and Koval, G.J. , *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* , 50 (1963) 474.
- (8) Järnefelt, J. , *Biochim. Biophys. Acta* , 59 (1962) 643.
- (9) Yoshida, H. , Nagai, K. , Ohashi, T. and Nakagawa, Y. , *Biochim. Biophys. Acta* , 171 (1968) 178.
- (10) Moss, D.W. , *Biochemical J.* , 22P (1969) 111.
- (11) Yoshida, H. , Igumi, F. and Nagai, K. , *Biochim. Biophys. Acta* , 120 (1966) 183.
- (12) Fujita, M. , Nakao, T. and Tashima, Y. , *Biochim. Biophys. Acta* , 117 (1966) 42.
- (13) Askari, A. and Koyal D. , *Biochem. Biophys. Res. Commun.* , 32 (1968) 227.
- (14) Askari, A. and Rao, S.N. , *Biochem. Biophys. Res. Commun.* , 36 (1969) 631.
- (15) Caputto, R. , Mc Cay, P.B. and Carpenter, M.P. , *J. Biol. Chem.* , 233 (1958) 1025.
- (16) Dodge, J.T. , Mitchell, C. and Hanahan, D.I. , *Arch. Biochem. Biophys.* , 100 (1963) 119.
- (17) Chignell, C.F. and Titus, E. , *J. Biol. Chem.* , 241 (1966) 5083.
- (18) Brown, H.D. , *Biochim. Biophys. Acta.* , 120 (1966) 162.

- (19) Glynn, I. M. and Chappell, J. B. , Biochem. J. , 90 (1964) 147.
- (20) Bramwell, M. E. and Harris, H. , Biochem. J. , 103 (1967) 816.
- (21) Brown, H. D. , Chattopadhyay, S. K. and Patel, A. , Biochem. Biophys. Res. Commun. , 25 (1966) 304.
- (22) Lowry, O. H. , Rosebrough, N. J. , Farr, A. L. and Randall, R. J. , J. Biol. Chem. , 193 (1951) 265.
- (23) Judah, J. D. , Ahmed, K. and Mc Lean, A. E. M. , Biochim. Biophys. Acta, 65 (1962) 472.
- (24) Koshland, Jr. , D. E. and Neet, K. E. , Ann. Rev. Biochem. , 37 (1968) 359.
- (25) Monod, J. , Wyman, J. and Changeux, J. P. , J. Mol. Biol. , 12 (1965) 88.
- (26) Gerhart, J. C. and Pardee, A. B. , Cold Spring Harbor Symposia XXVIII, (1963) 491.
- (27) Opit, L. J. , Potter, H. and Charnodk, J. S. , Biochim. Biophys. Acta, 120 (1966) 159.
- (28) Walker, B. L. , J. of Nutrition, 94 (1968) 469.
- (29) Bader, H. , Post, R. L. and Bond, G. H. , Biochim. Biophys. Acta, 150 (1968) 41.
- (30) Yoshida, H. , Fujisawa, H. and Ohi, Y. , Biochim. Biophys. Acta, 88 (1964) 455.
- (31) Tanaka, R. , and Strickland, K. P. , Arch. Biochem. Biophys. , 111 (1965) 583.
- (32) Ahmed, K. and Judah, J. D. , Biochim. Biophys. Acta, 93 (1964) 603.
- (33) Squires, R. F. , Biochem. Biophys. Res. Commun. , 19 (1965) 27.
- (34) Priestland, R. N. and Whittam, R. , Biochem. J. , 109 (1968) 369.
- (35) Robinson, J. D. , Nature, 220 (1968) 1325.
- (36) Askari, A. , Biochim. Biophys. Acta, 191 (1968) 198.
- (37) Sen, A. K. , Amar, K. , Tobin, T. and Post, R. L. , J. Biol. Chem. , 244 (1969) 6596.

- (38) Walker, B.L. and Kummerow, F.A., Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine, 115 (1964) 1099.
- (39) Robinson, J.D., Biochemistry, 8 (1969) 3348.
- (40) Formby, B. and Chausen, J., Hoppe-Zeyler's Z. Physiol. Chem., 350 (1969) 973.
- (41) Hoffman, J.F., Circulation, 26 (1962) 1201.
- (42) Rojas, E. and Tobias, J.M., Biochim. Biophys. Acta, 94 (1965) 394.
- (43) Cerbón, J., Biochim. Biophys. Acta, 102 (1965) 449.
- (44) Grawon, O., Mahajan, K.P., Limetti, M., Kananen, G. and Gliad, A.J., Biochemistry, 5 (1966) 4111.
- (45) Koshland, D.E., Nemethy, G. and Filmer, D., Biochemistry, 5 (1966) 365.
- (46) Levi, H.M., Sharon, N. and Koshland, D.E., Biochim. Biophys. Acta, 33 (1959) 288.
- (47) Gruener, N. and Avi-dor, Y., Biochem. J., 100 (1966) 762.
- (48) Wilson, G., Rose, P.S. and Fox, F.C., Biochim. Biophys. Res. Commun., 384 (1970) 617.
- (49) Morero, R.D., Bloj. B., Farfás, R.N. y Trucco, R.E., VI Reunión de la Sociedad Argentina de Investigación Bioquímica; Octubre 1970 (La Plata) Argentina.
- (50) Van Deenen, L.L.M., in "Progress in the chemistry of fats and other lipids", R.T. Holman, ed., vol. 8, part 1.
- (51) Reinert, J.C. and Steim, J.M., Science, 168 (1970) 1580.
- (52) Changeux, J.P., Thiéry, J., Tieng, Y. and Kittel, C., Proc. Natl. Ac. Sc., 57 (1967) 335.
- (53) Jardetzky, O., Nature, 211 (1966) 969.