

720659



Universidad Nacional Autónoma de México

FACULTAD DE QUIMICA

T E S I S

**Acción de Digitálicos naturales y sintéticos
sobre la ATPasa de Na^+ , K^+**

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

IGNACIO ORTIZ FLORES

1990

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

CLAS _____
ACC 243
FECHA _____
PROB _____



JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE Profra. RUTH ROMAN PALACIOS
VOCAL Profra. JOSE ANTONIO HOLGUIN HUESO
SECRETARIO Profra. MAGDALENA OLIVA GONZALEZ
1er Suplente Profra. BEATRIZ MEDINA JIMENEZ
2do Suplente Profra. REBECA GARCIA MACEDO

SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA:

INSTITUTO NACIONAL DE CARDIOLOGIA
DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA

SUSTENTANTE:


IGNACIO ORTIZ FLORES

ASESOR:


Dr. JOSE ANTONIO HOLGUIN HUESO



EXÁMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUIMICA

Dedico este trabajo a mi hijo JAVIER BALAM
y a mi esposa YOLANDA.

A mis padres EDUARDO y GUADALUPE.

A mis hermanos EDUARDO ISAAC, MANUEL RENE,
TRINIDAD y VALENTIN.

A mi cuñada TERESA y mi sobrino ARTURO ISAAC.

A JOSE GUADALUPE.

A la memoria de ESPERANZA.

A el Dr. Jose Antonio Holguin por ser más
que un asesor de Tesis.

A las familias Pacheco Esparragoza

Ortega Salinas

Varela Benitez

A mis amigos y compañeros JOSE
y HECTOR,

INDICE

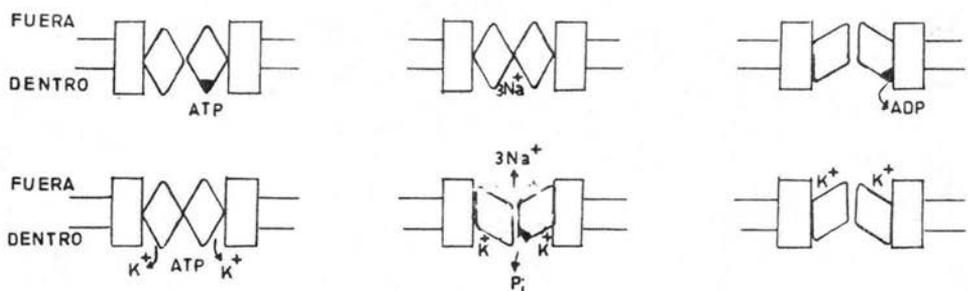
	pagina
INTRODUCCION.....	1
OBJETIVOS.....	17
HIPOTESIS.....	18
MATERIAL Y METODOS.....	20
RESULTADOS.....	27
DISCUSION Y CONCLUSIONES.....	54
BIBLIOGRAFIA.....	64

INTRODUCCION

En 1957 Skou (28) describio que en extractos membranales de nervio de cangrejo existia una enzima que hidrolizaba el ATP, y que esta era activada por la adiccion de Na^+ y K^+ en el medio de incubacion, tambien propuso que esta actividad enzimatica estaba asociada con el transporte de cationes monovalentes a traves de la membrana celular.

Durante las pasadas dos decadas la identificacion de la ATPasa de Na^+ y K^+ como la bomba de sodio se establecio firmemente (24, 25).

La mayoria de las celulas mantienen dentro de la celula una concentracion elevada de K^+ del orden de 140 mM, y una concentracion relativamente baja de Na^+ del orden de 7 a 10 mM. Y en el exterior las concentraciones de sodio y potasio son de 115 a 129 y 5 mM. Bajo condiciones fisiologicas normales el Na^+ interno es intercambiado por K^+ externo a expensas de la energia liberada por la hidrolisis del ATP en la superficie de la membrana celular; esta hidrolisis es acompanada por la salida de tres iones sodio y la entrada de dos iones potasio (6).

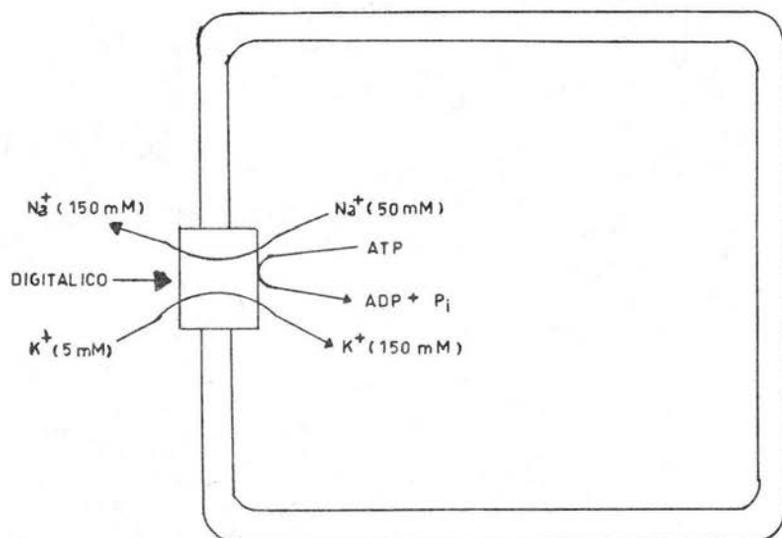


Modelo tomado de Sweadner, Kathleen J. Active Transport of sodium and potassium ion. *J. of Medicine* 302 : 27 : 777-783 1980

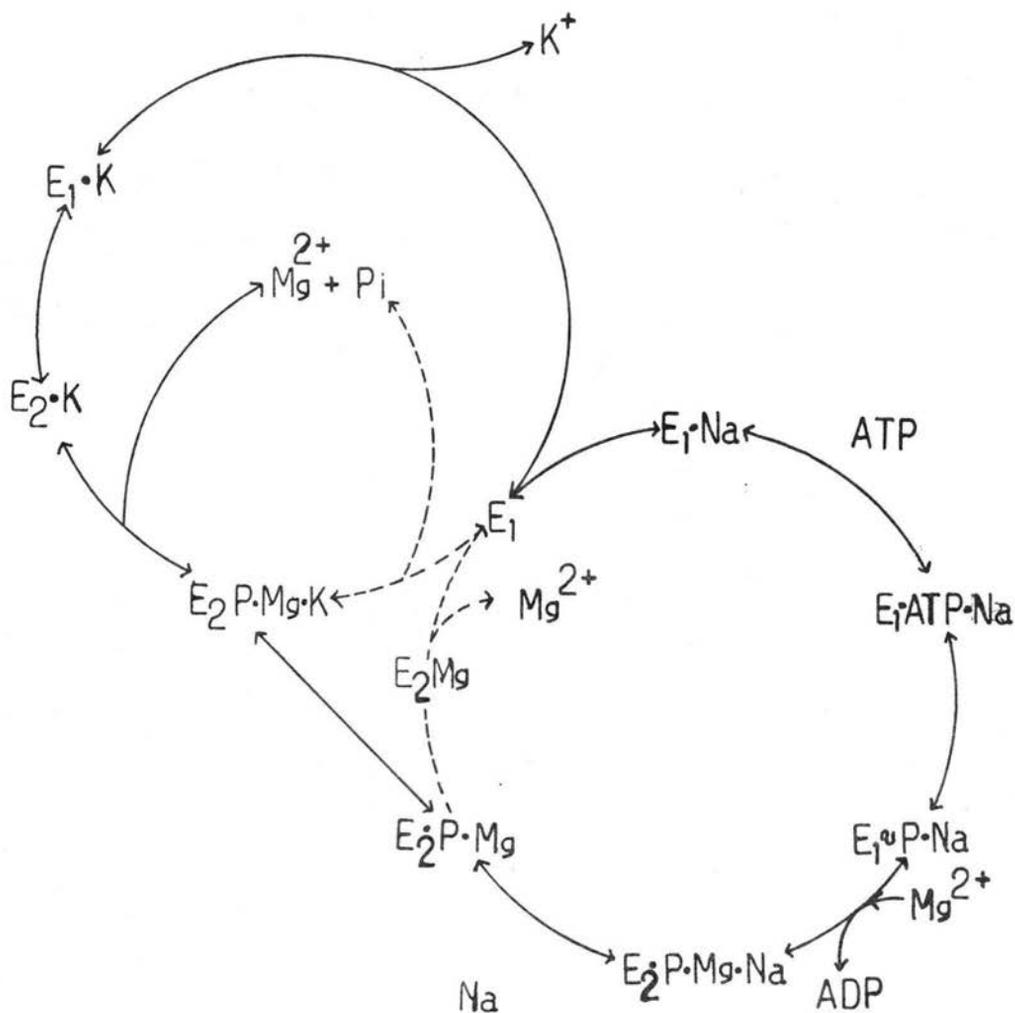
El potencial de la membrana plasmática es en condiciones basales, positivo en el exterior y negativo en el interior, así pues el ion sodio se mueve contra un gradiente de concentración y de carga y el potasio contra un gradiente de concentración y a favor del gradiente de carga cuando son transportados por la ATPasa (6). El papel funcional de la bomba de sodio (ATPasa de $\text{Na}^+ \text{K}^+$) es el de mantener concentraciones altas de potasio intracelular y sodio extracelular ayudando a la formación y al establecimiento del gradiente de concentraciones y de carga a través de la membrana plasmática, que contribuyen al estado de polarización de dicha membrana en la mayor parte de los seres vivos.

La ATPasa de $\text{Na}^+ \text{K}^+$ está localizada en la membrana de la célula y es accesible por ambos lados de ella. El adenosin trifosfato (ATP) se une a la enzima por la parte interna de la célula, cuando el Na^+ y Mg^{++} se unen al complejo ATP-Enzima, el fosfato terminal del ATP es transferido a la enzima con lo que se

provocan cambios conformacionales de la enzima ($E_1 \longrightarrow E_1-P \longrightarrow E_2-P$) translocándose el Na^+ hacia el exterior de la célula, en donde es liberado el Na^+ y se une al K^+ . La unión del K^+ con la fosfoenzima E_2-P causa un segundo cambio conformacional translocándose el K^+ dentro de la célula, iniciándose otro ciclo.



Modelo tomado de Akera, Tai. Membrane Adenosine Triphosphatase: A Digitalis Receptor?. SCIENCE No. 4317. Vol. 198. Nov. 1977.



Esquema de reacción para la ATPasa de $Na^+ K^+$ en relación al transporte de sodio y potasio. Tomado de Transport Adenosine Triphosphatases. Properties and Functions. Physiological Review Vol. 61 No. 1 enero 1981.

La ATPasa de $\text{Na}^+ \text{K}^+$ está formada por dos polipeptidos uno llamado subunidad alfa (polipeptido mayor) de peso molecular aproximadamente de 100,000 daltones y que posee los sitios de unión de Na^+ , K^+ , Mg^{++} y ATP, además de presentar alta afinidad por el ADP y Pi; el grupo beta carbonilo de un ácido aspártico de este polipeptido es donde se lleva a cabo la fosforilación de la enzima por el ATP, el otro polipeptido es la subunidad beta (polipeptido menor) de peso molecular aproximadamente de 50,000 daltones, para esta subunidad no se ha encontrado algún papel catalítico o afinidad por alguno de los iones necesarios para la actividad enzimática (3, 19).

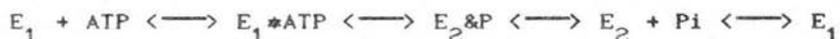
Para el complejo funcional de la ATPasa de $\text{Na}^+ \text{K}^+$ se le ha determinado un peso molecular de alrededor de 250 a 300 mil daltones, por lo que se puede pensar en una estequiometría de 2α 2β ó 2α 4β .

Se han propuesto varios modelos para el mecanismo reaccional de la ATPasa de $\text{Na}^+ \text{K}^+$ (32):

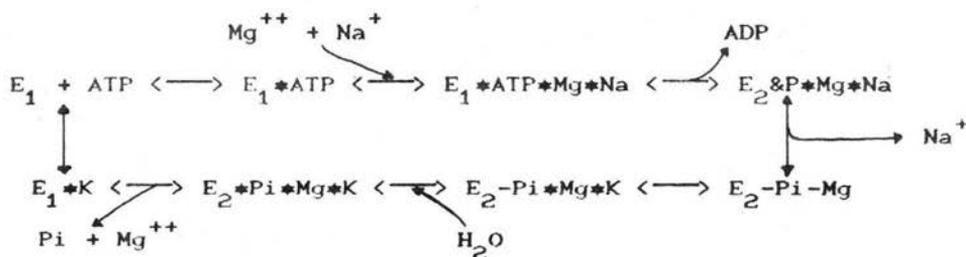
Froehlich et al (25) proponen:



Lowe & Smart (25) proponen algo mas elaborado:



El esquema general propuesto y más aceptado actualmente es el de Albers y Post (26):



Se puede ver que en el mecanismo de la actividad enzimática se han propuesto cuatro estados conformacionales de la ATPasa de $\text{Na}^+ \text{K}^+$; dos formas no fosforiladas E_1 y E_2 ; y dos formas fosforiladas $\text{E}_1\text{-P}$ y $\text{E}_2\text{-P}$. Se observa que en la forma E_1 tiene alta afinidad por el Na^+ , ATP y Mg^{++} y que la forma $\text{E}_1\text{-P}$ cambia su conformación en presencia de Mg^{++} a la forma $\text{E}_2\text{-P}$. La única forma que tendría fuerte afinidad por el K^+ , sería la forma fosforilada $\text{E}_2\text{-P}$.

La ATPasa de $\text{Na}^+ \text{K}^+$ ha sido purificada de tejidos de diferentes seres vivos, algunos ejemplos de ellos son: Médula de riñón de oveja, cerdo y perro (10, 12), electroplaca de pez eléctrico, glándulas de recto de escualo (19) y glándula salina de pato (8).

Por otra parte la ATPasa de $\text{Na}^+ \text{K}^+$ es la única macromolécula identificada, hasta el momento, como la receptora de los digitalicos cardiacos, farmacos utilizados en clinica (1, 30).

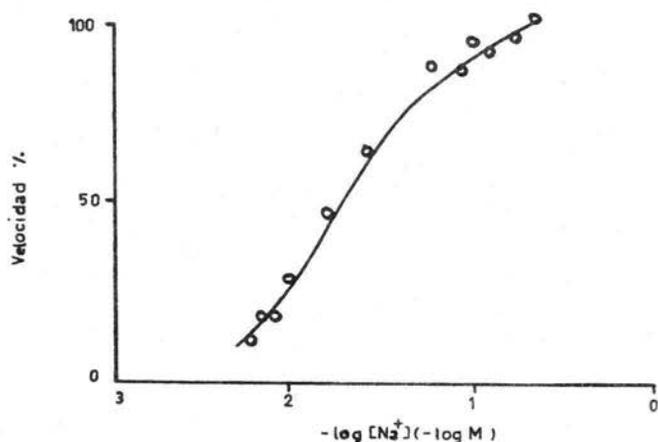
Los iones sodio y potasio tienen una accion activadora de la hidrolisis del ATP (28), existen estudios cineticos en los que se obtienen efectos cooperativos positivos, mostrando con ello la existencia de varios sitios de union para estos iones y un comportamiento alosterico de la enzima.

Para el sodio, Kniike (11) propone dos clases de sitios de union, el de más alta afinidad posee una constante de disociación $K_d = 0.2 \text{ mM}$, y llega a unir de 6 a 7 nmolas de sodio por miligramo de proteína y pierde su afinidad en presencia de ouabaina.

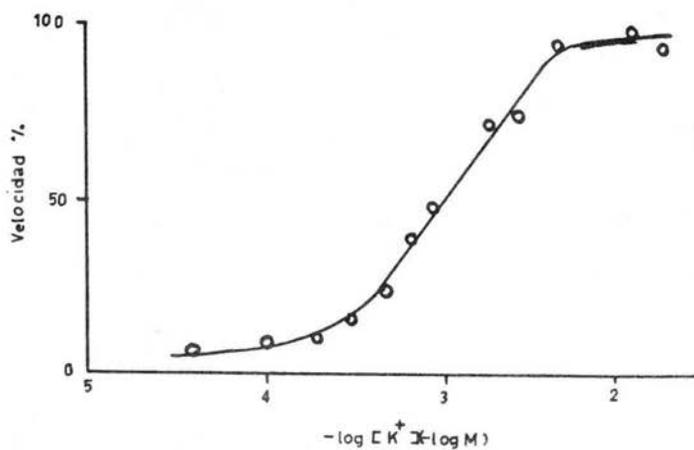
Matsui (13), encuentra para el potasio, un sitio sensible a la ouabaina, y que posee una constante de disociación, $K_d = 50 \text{ uM}$, esto lo determinó por union de K^+ a la ATPasa de $\text{Na}^+ \text{K}^+$.

En el departamento de Bioquímica del INSTITUTO NACIONAL DE CARDIOLOGIA, se han hecho estudios para Na^+ , K^+ con una preparacion de ATPasa de $\text{Na}^+ \text{K}^+$, de corazón de perro callejero,

obteniendo para el sodio una $K_{0.5} = 18 \text{ mM}$, $V_{\text{max}} = 635 \text{ nmolas de ATP hidrolizado/miligramo de proteina/minuto}$ y $n_H = 1.79$ para el Na^+ indicando efectos cooperativos positivos (varios sitios de asociación) para la activación de la ATPasa por sodio. Para el potasio una $K_{0.5} = 1.2 \text{ mM}$, $V_{\text{max}} = 620 \text{ nmolas/miligramo de proteina/minuto}$ y $n_H = 1.35$ que tambien indica efectos cooperativos y varios sitios de unión.



Efecto de las concentraciones del ion sodio en la velocidad de hidrólisis del ATP. La incubación se llevó a cabo en presencia de $\text{Mg}^{++} 5 \text{ mM}$, $\text{ATP} 3 \text{ mM}$, $\text{K}^+ 100 \text{ mM}$, $\text{Tris-HCl} 50 \text{ mM}$ $\text{pH} = 7.4$ a 37°C .



Efecto de las concentraciones del ion potasio en la velocidad de hidrolisis del ATP. La incubacion se llevo a cabo en presencia de Mg^{++} 5 mM, ATP 3 mM, Na^+ 100 mM, Tris-HCl 50 mM, pH= 7.4 a 37 C.

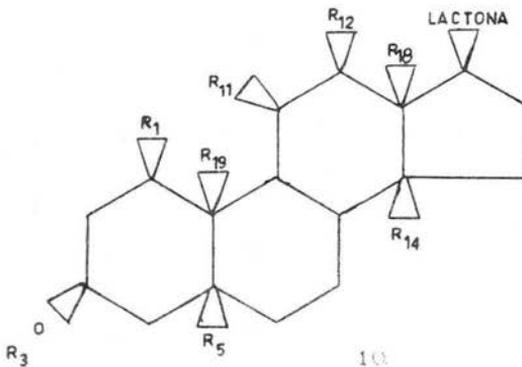
En un estudio cinetico semejante se calculo para el ATP una $K_{0.5} = 0.36$ mM, $V_{max} = 670$ nmolas/miligramo de proteina/minuto y

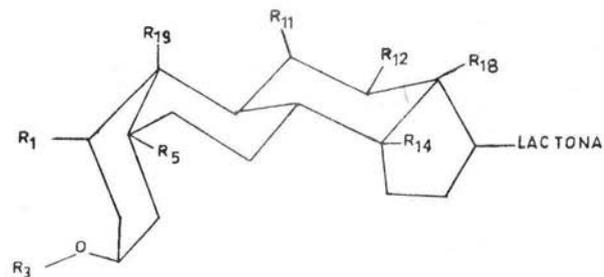
$n_H = 0.92$ muy próxima a 1.0, que indica un solo sitio para el ATP o varios sitios que no están interrelacionados.

Los digitalícos cardíacos fueron descritos por primera vez por W. Withering en 1775 en extractos de plantas del género *Digitalis*. Y en el presente siglo es cuando se empiezan a realizar estudios electrofisiológicos y farmacológicos para comprender la acción que tienen estos compuestos en el corazón.

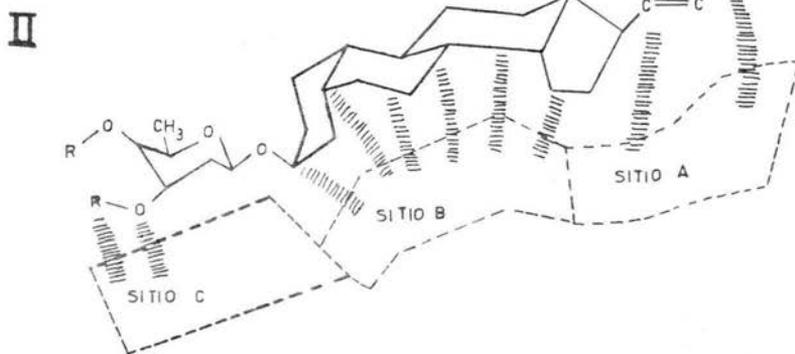
Repke en 1963 indica que posiblemente los efectos inotrópicos positivos en el músculo cardíaco inducido por los digitalícos tengan como sitio de acción la ATPasa de Na^+ , K^+ (23)

Los digitalícos son moléculas esteroideas, químicamente complejas y hasta ahora se desconoce la participación que tiene cada uno de los grupos funcionales durante la interacción molecular con su receptor (29, 35).





NOMBRE	R ₁	R ₃	R ₅	R ₁₁	R ₁₂	R ₁₄		R ₁₈	R ₁₉	LACTONA
OUABAINA	OH	β-RAMNOSA	OH	OH		OH		CH ₃	CH ₂ OH	
DIGOXINA		α-DIGITOXOSA			OH	OH		CH ₃	CH ₃	
No 10		GLUCOSA				OH		CH ₃	CH ₃	
No 24		GLUCOSA				OH		CH ₃	CH ₃	
TEVETINA		TEVETOSA - GENTOBIOXA				OH		CH ₃	CHO	
DIGITOXINA		DIGITOXOSA				OH		CH ₃	CH ₃	



Modelo del complejo receptor digitalico. La interacción es iniciada por un amplio rango de atracción entre la lactona y el sitio A; este es dirigido en dos puntos de ataque de la lactona al receptor (ver II). La parte eteroidea del digitalico interacciona con fuerzas del Van der Waals y/o fuerzas hidrofobicas con el sitio B. Esto es reforzado por el rearrreglo del receptor como resultado de la interacción del digitalico como se muestra en I. La interacción del azúcar con el sitio C puede incrementar grandemente la estabilidad del complejo y en algunos casos volverlo irreversible. (referencia: Thomas R. Cardiac Drugs. In Burger's Medicinal Chemistry, Chap. 38, edited by M. Wolff. New York, Wiley, 1980.).

Los digitalícos tienen un efecto farmacológico que es el de aumentar la contractilidad del corazón a esto se le llama inotropismo positivo, sin embargo poseen también efectos tóxicos; poseen en general un rango muy estrecho entre la dosis terapéutica y dosis tóxica y son de uso clínico cuidadoso.

El único receptor identificado que media los efectos de contractilidad del miocardio y los efectos tóxicos, es la bomba de sodio o ATPasa de $\text{Na}^+ \text{K}^+$. Como soporte de esta hipótesis es el paralelismo que existe entre los efectos de los digitalícos en la contractilidad y la habilidad para inhibir la ATPasa de $\text{Na}^+ \text{K}^+$ (13, 30).

Dentro de los compuestos que inhiben la ATPasa de $\text{Na}^+ \text{K}^+$ se encuentran los digitalícos, alcaloides del *eritrophellum*, bisguanidil-hidrazonas esteroideas y cationes monovalentes como el rubidio y talio, y todos estos producen un efecto inotrópico positivo.

Inicialmente se observó que cuando en el medio existía la enzima y el digitalíco éstos no se unían. Sin embargo en un medio que contiene Na^+ , Mg^{++} y ATP se induce la unión del digitalíco. En estas condiciones la enzima sufre una

fosforilación y se pensó que los digitalícos se unen exclusivamente a la forma fosforilada (2, 14).

El tiempo medio de velocidad de unión de los digitalícos a las preparaciones de ATPasa de $\text{Na}^+ \text{K}^+$ de miocardio aumenta en el orden de la presencia de los ligandos (20).

LIGANDO	$t_{1/2}$ (seg)
Mg^{++} , Pi.....	20
Mg^{++} , ATP, Na^+	27
Mg^{++} , ATP.....	45
Mg^{++} , ATP, Na^+ , K^+	170
Mg^{++}	250

El número de sitio de fijación de los digitalícos sobre la ATPasa de $\text{Na}^+ \text{K}^+$ aún está en controversia. Se sabe que para la mayor parte de las preparaciones es un sitio de fijación de los digitalícos por cada lugar de fosforilación (19), y que los valores máximos de fijación son del orden de 4 a 4.3 nmolas / mg de proteína. Otros sugieren la presencia de dos tipos diferentes de sitios que corresponderían a $\text{E}_1\text{-P}$ y $\text{E}_2\text{-P}$ y que son modulados por el sodio (4).

Las discrepancias pueden ser debidas a la metodología empleada pero tambien a condiciones propias de la enzima, ya que ademas de las diferentes conformaciones, segun el mecanismo la ATPasa de $\text{Na}^+ \text{K}^+$ esta presente en la membrana como un dimerico, que adopta cambios conformacionales o de orientacion en la membrana con sitios interconvertibles de alta o baja afinidad por el sodio y el potasio (24).

Como la unión de los digitalícos sobre la ATPasa de $\text{Na}^+ \text{K}^+$ es un fenómeno lento, influido por las condiciones y presencia de ligandos en el medio de incubación se han diseñado varios métodos de medir las constantes de velocidad de asociación y disociación.

Son dos los métodos empleados:

1.- Se mide el progreso de la inhibición de la ATPasa de $\text{Na}^+ \text{K}^+$ en función del tiempo en presencia de diferentes concentraciones de digitalícos (35).

2.- Medir la velocidad de unión de los digitalícos marcados con ^3H en función del tiempo (34).

Las constantes de velocidad de asociación obtenidas en diferentes condiciones experimentales y por diferentes autores son similares; sin embargo existen notables diferencias en las constantes de velocidad de disociación según el método seguido y para lo que aún no hay una explicación clara.

Es un hecho fuera de toda discusión que los digitalícos producen efectos inotrópicos positivos en la célula muscular cardíaca, y es un hecho también que los digitalícos inhiben la ATPasa de Na^+K^+ .

Existen diferentes sensibilidades del miocardio a los digitalícos según la especie, siendo las del humano, perro gato y bovino las más sensibles; el conejo y el cobayo son de sensibilidad intermedia (1, 34, 12) y la rata es de menor sensibilidad.

Así pues, la acción de los digitalícos sobre el miocardio y los efectos inotrópicos que inducen no están relacionados todavía en forma definitiva con una acción específica a nivel molecular a pesar de los numerosos trabajos que postulan a la ATPasa de Na^+K^+ como el receptor de los digitalícos y a su inhibición como un efecto inicial que se traduciría *in vivo*, por la respuesta inotrópica.

OBJETIVOS

1.- El presente trabajo tiene el propósito de relacionar los grupos sustituyentes que presentan diferentes digitalícos con las constantes de acción inhibitoria en las actividades de ATPasa de Na^+ K^+ y Fosfatasa dependiente de K^+ en preparaciones parcialmente puras de corazón de perro.

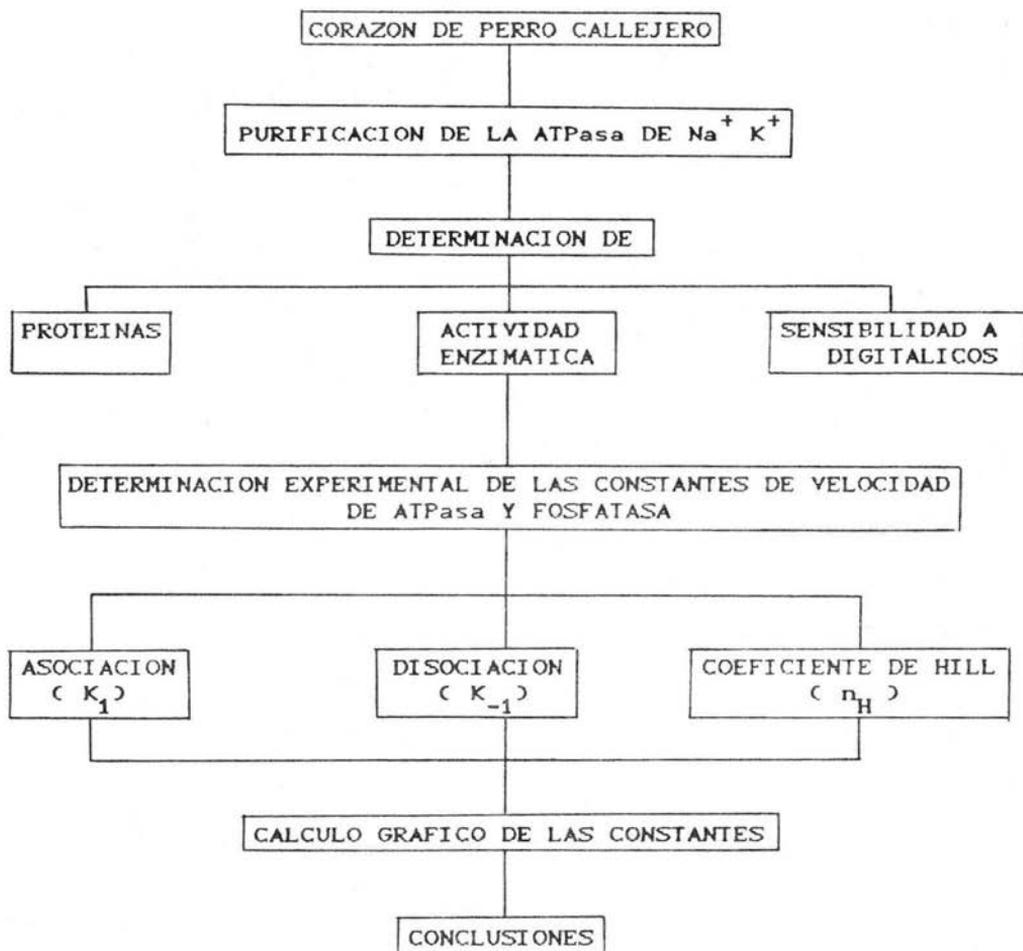
2.- Comparar las actividades ATPasa y fosfatasa porque es más fácil y más directo seguir el desarrollo de la actividad fosfatasa en reacciones parciales con Na^+ ó K^+ que la correspondiente ATPasa, y la actividad Fosfatasa dependiente de K^+ utiliza la enzima fosforilada $\text{E}_2\text{-P}$ que se sabe es la forma más sensible a la acción de los digitalícos.

HIPOTESIS

Es bien sabido que la familia de compuestos esteroideos llamados glicósidos cardíacos o digitalícos son inhibidores de la enzima ATPasa dependiente de Na^+ y K^+ y por lo tanto del transporte de estos cationes. La acción inhibitoria sobre la ATPasa está relacionada con las propiedades terapéuticas de esta familia de compuestos en los mamíferos. Se conoce un solo receptor de los digitalícos cardíacos que es la ATPasa de Na^+K^+ pero han sido propuestos otros receptores hipotéticos para explicar varios hechos que no han sido aclarados solamente con la inhibición de la ATPasa de Na^+K^+ , una de las formas indirectas para proponer la existencia de otros receptores es de comparar los compuestos químicamente relacionados sobre la inhibición de la ATPasa con las propiedades farmacológicas de los mismos compuestos en las mismas especies animales.

Como los digitalícos en general producen una inhibición pseudoirreversible y el progreso de asociación y disociación con la ATPasa es muy lenta, es una ventaja determinar no solo las constantes inhibitorias K_I ó K_D sino tambien las constantes de asociación y disociación de los digitalícos a la ATPasa de Na^+K^+ . Además los valores de K_I pueden ser comparados con la potencia farmacológica que induce a un inotropismo positivo; K_1 y K_{-1} (constantes de velocidad de asociación y disociación) con el inicio y término del efecto inotrópico positivo.

PLAN DE TRABAJO



MATERIAL Y METODOS

Purificación de la ATPasa de $\text{Na}^+ \text{K}^+$ por el método de Pitts y Schwartz (20).

La ATPasa se obtiene a partir de corazón de perro callejero anestesiado, el corazón es extraído y lavado perfectamente con agua destilada fría, se eliminan sangre, arterias, grasa y tejido conectivo, después se corta en pequeños pedazos y se pesa, todo el proceso se realiza en frío ($0-5^{\circ}\text{C}$). Se adiciona 1.5 ml por cada gramo de corazón de una solución de sacarosa 0.25M y EDTA 1mM a pH=7.0 ajustado con Tris (solución S-E) se muele a velocidad lenta en la licuadora durante 30 segundos tiempo que es independiente del peso del corazón utilizado, se diluye con 1.5 ml por cada gramo de corazón de la solución S-E y se muele a velocidad rápida durante 0.25 segundos por cada gramo de corazón utilizados, se centrifuga a $2,500 \times g$ durante 15 minutos (aproximadamente 2,000 rpm en Sorvall rotor SS-34), el sobrenadante se desecha y el precipitado se resuspende en la licuadora durante un minuto a velocidad lenta con 2 ml de la solución S-E por cada gramo de corazón del peso original. Se adicionan 0.20 ml, por cada gramo de corazón del peso original de una solución de desoxicolato de sodio el 5% en la solución S-E, la adición es gota a gota pero rápidamente y con buena

agitación, se continua la agitación durante 20 minutos mas, y se centrifuga a 96,000 X g (27,000 rpm en rotor 30 Beckman), durante 25 minutos, el sobrenadante se recoge y se afora hasta 4.2 ml por gramo de corazón del peso original con una solución de EDTA 1mM ajustado con Tris a pH=7.0 y se vuelve a centrifugar a 96,000 X g durante 90 minutos, el precipitado se resuspende con EDTA 1 mM a pH=7.0 en 0.3 ml por cada gramo de corazón del peso original y se congela durante una noche a -20°C .

A la preparación obtenida en la etapa anterior se le adicionan 0.075 ml por cada gramo de corazón del peso original de una solución de NaI 6M que contiene EDTA 15mM, Tris 150mM y tiene un pH=8.4 aproximadamente; la adición es gota a gota, en frio en no más de 1 minuto, con buena agitación y se mantiene agitando durante 5 minutos mas, al cabo de los cuales se diluye con 0.6 ml por cada gramo de corazón del peso original con una solución de EDTA 1mM a pH=7.0 ajustado con Tris, se centrifuga a 96,000 X g durante 25 minutos, el sobrenadante se elimina con cuidado ya que el precipitado es ligero y poco compacto, este último se resuspende en una solución de Imidazol 25 mM y EDTA 1mM pH=7.0 ajustado con HCl.

A la preparación anterior se le determina proteínas por el método de Lowry.

DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA

Entre 5 y 10 μg de la ATPasa de $\text{Na}^+ \text{K}^+$ se incuban a 37°C durante 5 minutos con ATP 3 mM en presencia de Trietanol amina (TEA) 5a mM pH=7.4 ajustado con HCl; MgCl_2 5mM; NaCl 100mM; KCl 20mM en un volumen final de 1 ml, de esta forma se mide la actividad total y la actividad basal se mide adicionando 5 μl de ouabaina 10mM, la reacción se detiene con ácido Tricloroacético al 50% frio, concentración final 5%, se centrifuga a 3,000 rpm y se toma 1 ml del sobrenadante. La reacción de hidrólisis del ATP no produce color por loque se adicionan 2 ml de reactivo C (Ver determinación de fosfato inorgánico). La actividad específica se obtiene interpolando la actividad total menos la basal en la curva estándar de Pi y se expresa en $\mu\text{molas}/\text{minuto}/\text{mg}$ de proteína.

DETERMINACION DE FOSFATO INORGANICO (Pi)

A partir de una solución estándar de KH_2PO_4 5 mM en una solución de ácido Tricloroacético al 1% se toman 25, 50, 75 y 100 μl que corresponden a 125, 250, 375 y 500 nmolas respectivamente y se completa hasta 1 ml con agua destilada, se adicionan 2 ml de reactivo C (100 ml de reactivo C se preparan

con 10 ml de molibdato de amonio al 10% en H_2SO_4 10N; 70 ml de H_2O ; 5g de $FeSO_4 \cdot 7 H_2O$ y se afora hasta 100 ml con agua destilada).

El blanco se prepara a partir de 1ml de agua destilada y 2ml de reactivo C; se lee en el espectrofotometro a 660 nm.

DETERMINACION DE LA CONSTANTE DE VELOCIDAD DE ASOCIACION (K_1)
DE LOS DIGITALICOS A LA ATPasa DE $Na^+ K^+$ (MIDIENDO ACTIVIDAD FOSFATASA).

Entre 70 y 100 ug de la enzima fueron preincubados durante 0 a 15 minutos con diferentes digitalicos naturales y sintéticos en concentraciones de 0.1 a 1.5uM en presencia de Trietanolamina (TEA) 50mM ajustado con HCl a pH= 7.4; $MgCl_2$ 2mM; Pi 1mM, en un volumen final de 25 ul, la asociación del digitalico con la enzima fue detenida con 225 ul de EDTA 1 mM a pH= 7.0 ajustado con Tris; se tomaron alicuotas de 200 ul para medir la actividad de fosfatasa dependiente de K^+ , se mezclaron con 800 ul de un medio que contenía TEA 50 mM ajustado con HCl a pH= 7.4; $MgCl_2$ 10mM; KCl 20mM y p-nitrofenolfosfato (pNPP) 5mM, se incubó a $30^{\circ}C$ y se midió la aparición de p-nitrofenol por absorbancia a 410 nm cada 30 segundos durante 5 minutos.

La actividad total se midió preincubando la enzima en ausencia de digitalícos, y la actividad basal se midió preincubando la enzima con 5 μ l de ouabaina 10 mM

Con los valores de absorbancia se calculó la pendiente por el método de regresión lineal en una calculadora Texas Instruments 55-II, lo anterior fue hecho para todas las concentraciones y tiempos ensayados incluyendo la actividad total y basal, con los valores de las pendientes se calculó el log. del % de actividad y estos se graficaron en función del tiempo para obtener el valor de la constante de velocidad de asociación K_1 .

DETERMINACION DE LA CONSTANTE DE VELOCIDAD DE DISOCIACION (K_{-1}) DE LOS DIGITALICOS A LA ATPasa DE $\text{Na}^+ \text{K}^{+(1)}$. (MIDIENDO ACTIVIDAD FOSFATASA).

Entre 70 y 100 μ g de la enzima fueron preincubados con cada uno de los digitalícos a 30°C durante el tiempo y con la concentración calculada a partir de los valores de K_1 , para obtener una inhibición aproximadamente del 90% en presencia de TEA 50mM a pH= 7.4 ajustado con HCl; MgCl_2 2mM y Pi 1mM en un volumen final de 25 μ l, para iniciar la disociación de la

(1) De acuerdo al método de Yoda (35).

enzima y el digitalico se agregó 225 ul de EDTA 1mM pH= 7.0 ajustado con Tris y se incubo a 30°C; entre 0 y 80 minutos se tomaron alicuotas de 200 ul para medir la actividad de fosfatasa dependiente de K⁺, se mezclaron con 800 ul que contenian TEA 50 mM a pH= 7.4 ajustado con HCl; MgCl₂ 10mM; KCl 20mM y pNPP 5mM, se incubo a 30°C y se midio la absorbancia a 410 nm cada 30 segundos durante 5 minutos.

La actividad total se midió preincubando la enzima en ausencia de digitalico, la basal preincubando con 5 ul de ouabaina 10mM y ambos fueron incubados a 30°C, se realizaron controles de tiempo es decir se incubaron en tiempos iguales a los que contenían digitalicos naturales y sintéticos sujetos a medir K₋₁.

Con los valores de absorbancia se calculó la pendiente por el método de regresión lineal en una calculadora Texas Instruments 55-II, lo anterior fue hecho para todos los tiempos ensayados incluyendo la actividad total y basal, con los valores de las pendientes se calculó el log. del % de inhibición y estos se graficaron en función del tiempo para obtener el valor de la constante de velocidad de disociación K₋₁.

DETERMINACION DE LA CONSTANTE DE VELOCIDAD DE ASOCIACION (K_1) DE
LOS DIGITALICOS A LA ATPasa DE $\text{Na}^+ \text{K}^+$, (ACTIVIDAD ATPásica)

Entre 70 y 100 ug de la enzima fueron preincubados durante 0 a 15 minutos con diferentes digitalicos naturales y sintéticos en concentraciones de 0.1 a 1.5 uM en presencia de Trietanolamina (TEA) 50 mM a pH=7.4 ajustado con HCl, MgCl_2 2mM y Pi 1mM en un volumen final de 25 ul, la asociación del digitalico con la enzima fue detenida con 225 ul de EDTA 1mM a pH=7.0 ajustado con Tris; se tomaron alicuotas de 200 ul para medir la actividad ATPásica dependiente de $\text{Na}^+ \text{K}^+$; se mezclaron con 595 ul de una solución A que contenia TEA 50mM ajustado con HCl a pH=7.4, MgCl_2 5mM, NaCl 100mM y KCl 10mM (concentraciones referidas a 1 ml); 155 ul de una solución B que contenia Fosfoenolpiruvato (PEP) 1mM, NADH 0.15mM y ATP 2mM (solución que se prepara minutos antes de iniciar la reacción); 50 ul de una solución C que contenia Piruvato cinasa (PKasa) y Lactato deshidrogenasa (LDHasa) (mezcla comercial diluida 1 a 10 en TEA pH= 7.4 ajustado con HCl). Se lee a 340 nm la desaparición de NADH.

RESULTADOS

Los digitalílicos utilizados en este estudio son Ouabaina, Digoxina, Digitoxina, Tevetina, Digitalílico No.10 y Digitalílico No.24. La elección de éstos digitalílicos fue teniendo en cuenta que produjeran una inhibición pseudoirreversible a la ATPasa de $\text{Na}^+ \text{K}^+$ y que se poseyeran datos previos midiendo actividad ATPasa, excepto la Ouabaina que se consideró como referencia por producir una inhibición ya comprobada. Dentro de los digitalílicos naturales se encuentran la ouabaina, digoxina, digitoxina y tevetina y como sintéticos están el digitalílico No. 10 y No. 24.

Se ensayaron diferentes concentraciones de los digitalílicos y tiempos de preincubación con la ATPasa de $\text{Na}^+ \text{K}^+$ hasta obtener las condiciones óptimas que inhiben a la ATPasa de $\text{Na}^+ \text{K}^+$ de un 10 a 80% en un tiempo no mayor de 15 minutos.

A continuación describo los resultados obtenidos con cada uno de los digitalílicos.

OUABAINA: Las concentraciones y tiempos de preincubación con la ATPasa de $\text{Na}^+ \text{K}^+$ que se utilizaron fueron:

concentración (μM)	tiempo (seg)
0.1	300, 600, 900
0.25	300, 600, 900

0.4	180, 300, 600
0.5	120, 240, 360

En la figura 1A se puede observar que independientemente de la concentración del digitalíco utilizada a tiempo igual a cero. La actividad disminuye al aumentar la concentración del digitalíco y el tiempo de preincubación, obteniéndose rectas al representarlas en forma semilogarítmica para cada concentración con un valor de pendiente diferente, los valores son:

concentración del digitalíco (μM)	valor de la pendiente (ouabaina) seg^{-1}
0.1	0.00109
0.25	0.00174
0.4	0.00244
0.5	0.00423

Estos valores se multiplicaron por 2.3 y se construyó la gráfica B de la figura 1, la pendiente de la recta resultante es la constante de velocidad de asociación (K_1) de la ouabaina a la ATPasa de $\text{Na}^+ \text{K}^+$ y tiene un valor de 0.86×10^4 .

Para la determinación de la constante de disociación la enzima se preincubó durante 8.58 minutos con una concentración de $0.5 \mu\text{M}$ de ouabaina para lograr un 90% de inhibición, el tiempo de preincubación fue calculado por la interpolación de la recta

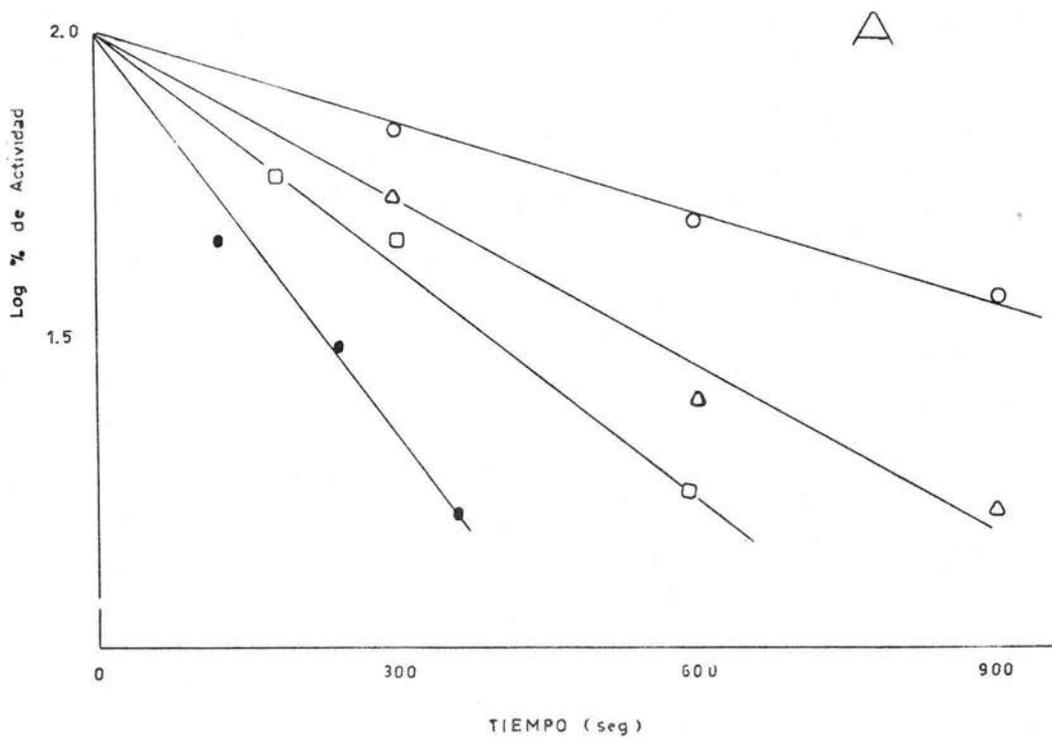
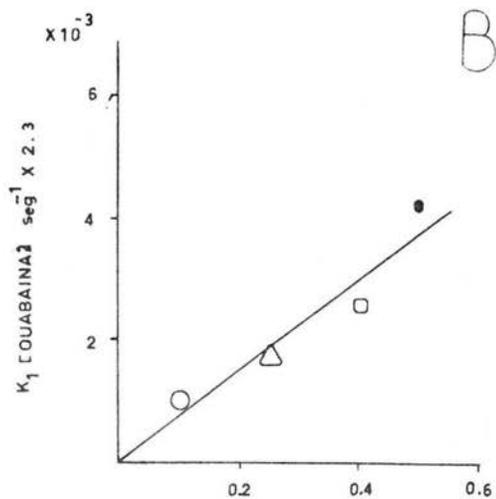


Figura 1.- Determinación gráfica de la constante de velocidad de asociación (K_1) de la ouabaina con la ATPasa de Na^+,K^+ . Las concentraciones que se utilizaron son en μM : 0.10 (\circ); 0.25 (Δ) 0.4 (\square) y 0.5 (\bullet). Se midió la actividad enzimática Fosfatasa dependiente de K^+ .

1A.-Log. del % de Actividad en función del tiempo de preincubación



1B. $-K_1 [ouabaina]^2 \text{ seg}^{-1}$ en función de la concentración de la ouabaina μM . $K_1 [ouabaina]$ es la pendiente para cada concentración utilizada en la gráfica A X 2.3.

obtenida para la concentración 0.5 μM y esta se escogió por ser la que en menos tiempo inhibe a la ATPasa de $\text{Na}^+ \text{K}^+$ y de esta forma se corre menor riesgo de pérdida de actividad de la enzima ya que fue incubada a 30°C .

En la figura 2 se graficó:

Log % de inhibición vs tiempo de preincubación (seg)

1.91	0
1.895	600
1.88	1200
1.85	2400
1.81	3600
1.75	4800

la pendiente de la recta por 2.3 es la constante de velocidad de disociación (K_{-1}) del complejo enzima-digitalico y tiene como valor 0.629×10^{-4} .

DIGOXINA: Las concentraciones de digoxina y los tiempos de preincubación con la enzima fueron:

concentración (μM)	tiempo (seg)
0.15	180, 300, 600
0.25	120, 300, 600, 900
0.4	120, 300, 600, 900
0.5	60, 120, 180

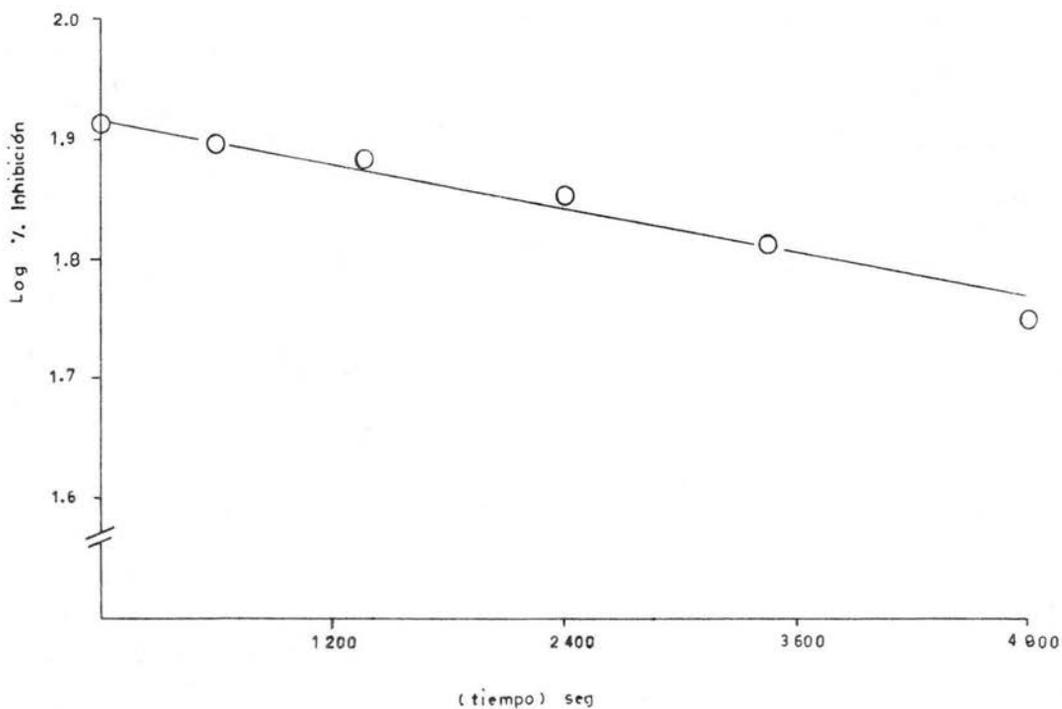


Figura 2.- Determinación gráfica de la constante de velocidad de disociación de la ouabaina a la ATPasa de $\text{Na}^+ \text{K}^+$. Se incubó a la ATPasa de $\text{Na}^+ \text{K}^+$ durante 8 minutos con $0.5 \mu\text{M}$ de ouabaina para obtener una inhibición del 81.28%.

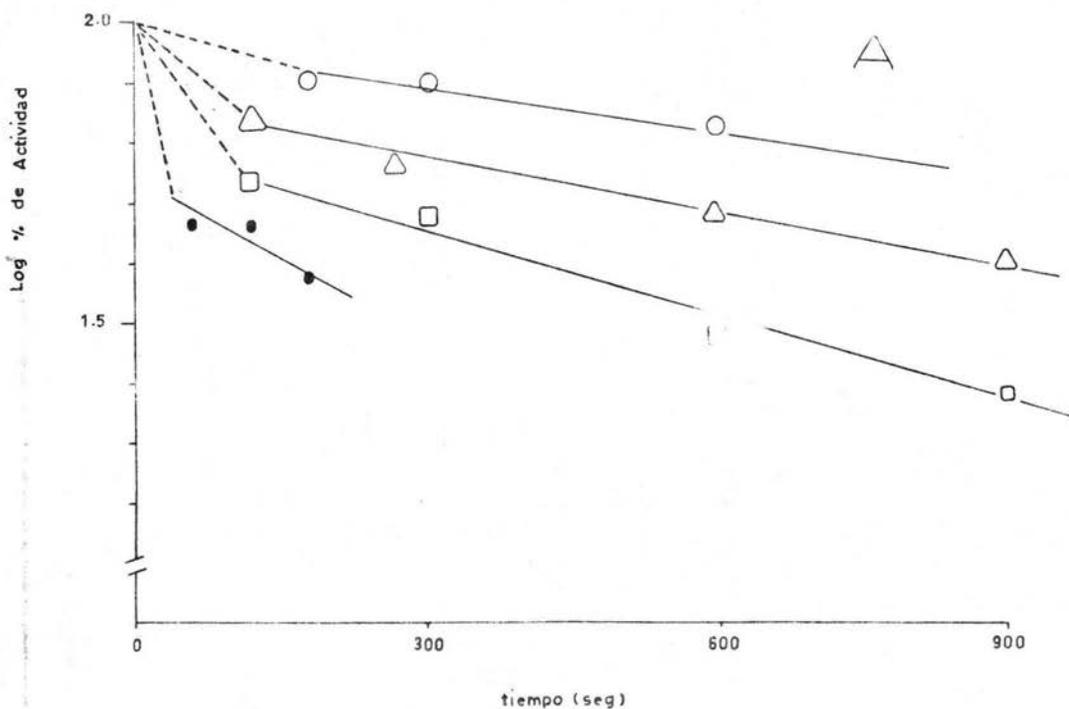
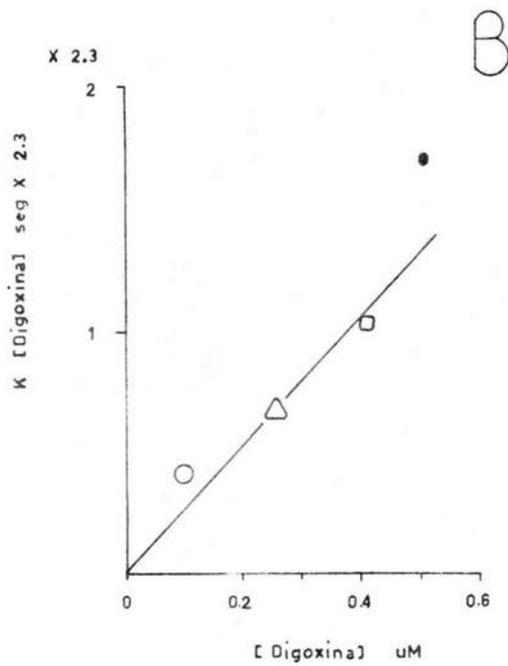


Figura 3.- Determinación gráfica de la constante de velocidad de asociación (K_1) de la digoxina a la ATPasa de Na^+K^+ . Las concentraciones que se utilizaron son en μM : 0.15 (O); 0.25 (Δ); 0.4 (□) y 0.5 (●). Se midió la actividad enzimática Fosfatasa dependiente de K^+ .

3A.-Log. del % de Actividad en función del tiempo de preincubación



B

28. $-K_1 \cdot [\text{digoxina}] \text{ seg}^{-1}$ en función de la concentración de la digoxina μM . $K_1 \cdot [\text{digoxina}]$ es la pendiente para cada concentración utilizada en la gráfica A X 2.3.

FALTA

PAGINA

35

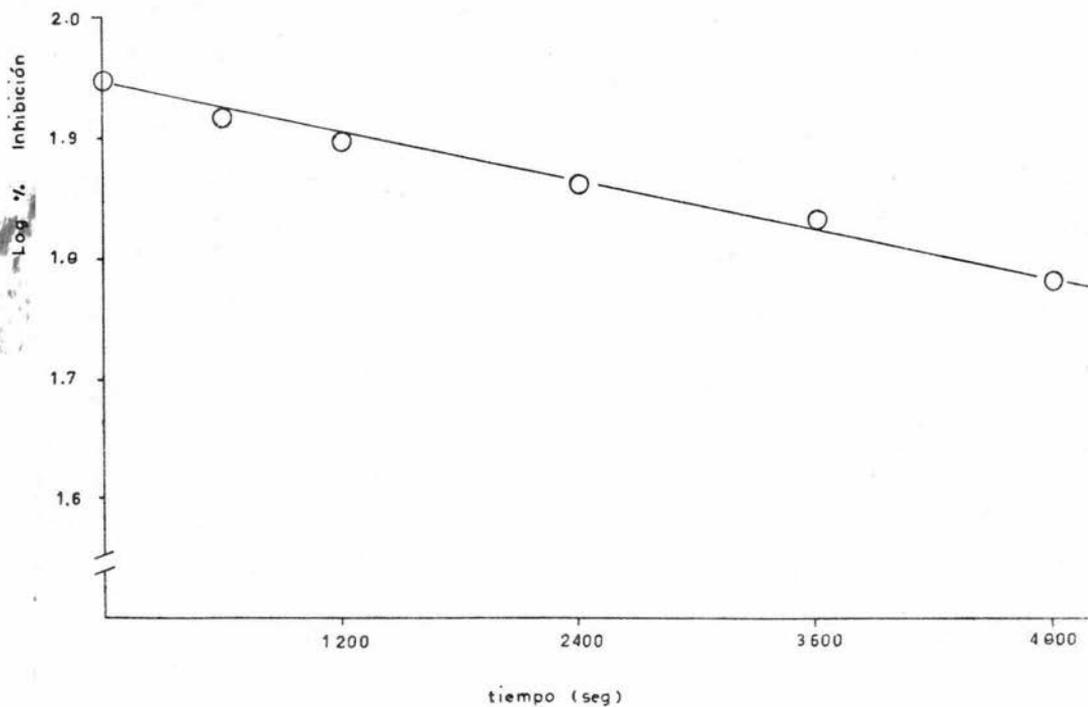


Figura 4.- Determinación gráfica de la constante de velocidad de disociación de la digoxina a la ATPasa de Na^+, K^+ . Se incubó a la ATPasa de Na^+, K^+ durante 26 minutos con 0.4 μM de digoxina para obtener una inhibición del 89.12%.

concentracion (uM)	tiempo de preincubación (seg)
0.1	300, 600, 900
0.25	300, 600, 900
0.4	300, 600, 900
0.5	120, 240, 360
0.65	120, 240, 360
0.85	120, 240, 360
1.00	120, 240, 360

En la figura 5A se presenta un comportamiento que depende de la concentración del digitalico; a las concentraciones 0.1, 0.25 y 0.4 en un tiempo igual a cero la inhibición también es cero pero con 0.5, 0.65, 0.85 y 1.00 uM presenta ya un porcentaje de inhibición a tiempo cero (si se interpolan las rectas para cada concentración). Los valores de las pendientes se calcularon según la gráfica y se les dió el mismo tratamiento que para la ouabaina obteniendo así una $K_1 = 0.32 \times 10^4$.

Para determinar K_{-1} fue necesario preincubar la enzima durante 24 minutos con una concentración del digitalico No. 10 de 0.5 uM para lograr una inhibición del 31.6% , es necesario aclarar que con el tiempo estimado se esperaba una inhibición del 90% aproximadamente. El valor obtenido fue de 10.4×10^{-4} .

DIGITALICO No.24. TEVETINA y DIGITOXINA: El comportamiento que

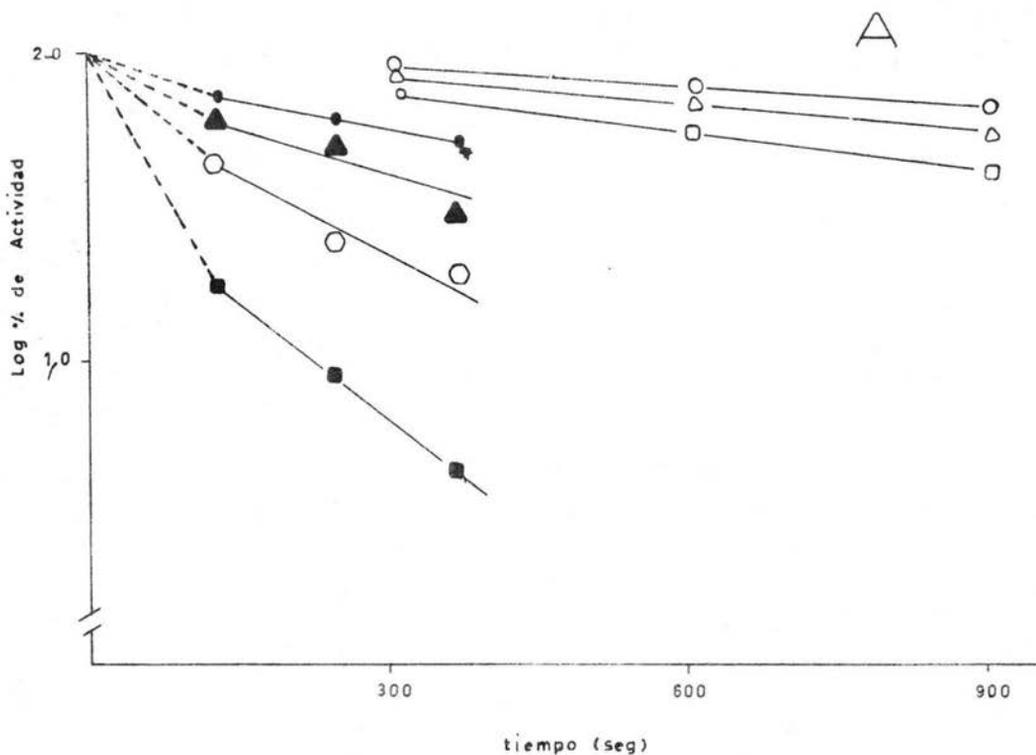
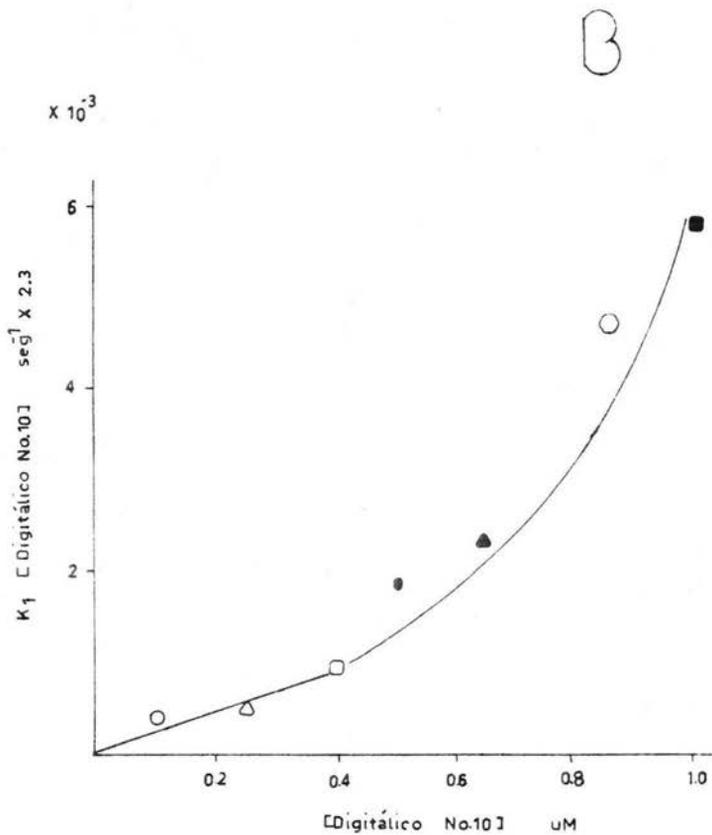


Figura 3.- Determinación gráfica de la constante de velocidad de asociación (K_1) del dig. No. 10 la ATPasa de Na^+, K^+ . Las concentraciones que se utilizaron son en uM: 0.10 (O); 0.25 (Δ); 0.4 (□); 0.5 (●); 0.65 (▲); 0.85 (○) y 1.00 (■). Se midió la actividad enzimática Fosfatasa dependiente de K^+ .

3A.-Log. del % de Actividad en función del tiempo de preincubación



5B. $-K_1 \cdot [\text{dig. No. 10}] \text{ seg}^{-1}$ en función de la concentración del dig. No. 10 μM . $K_1 \cdot [\text{dig. No. 10}]$ es la pendiente para cada concentración utilizada en la grafica A X 2.3.

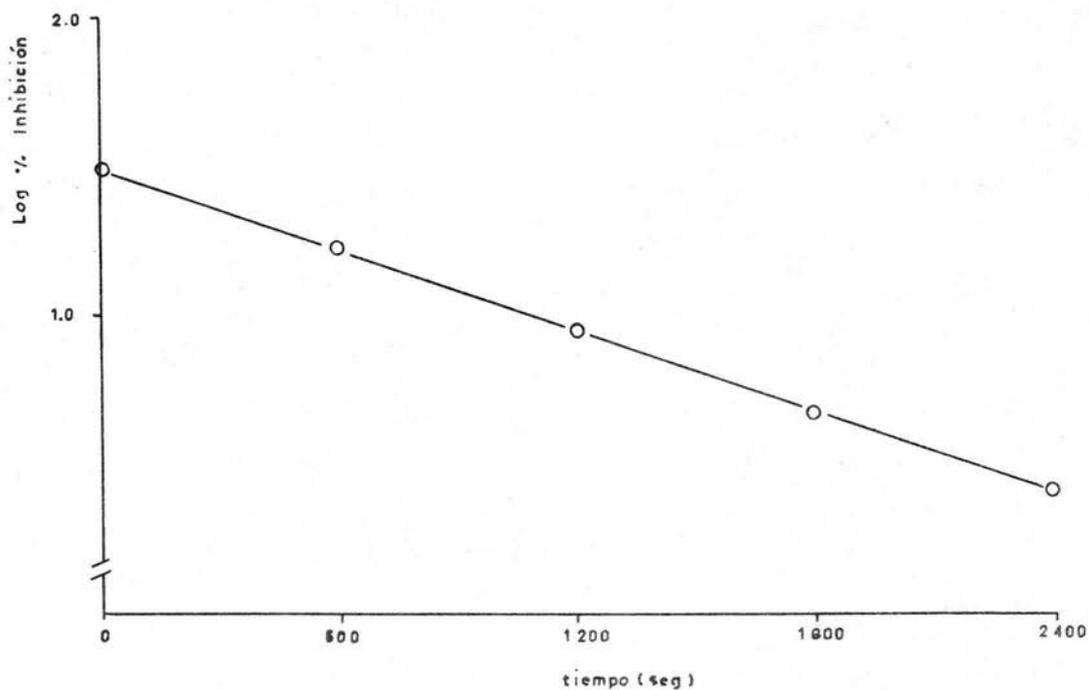


Figura 6.- Determinación gráfica de la constante de velocidad de disociación del dig. No.10 a la ATPasa de Na^+,K^+ . Se incubó a la ATPasa de Na^+,K^+ durante 24 minutos con $0.5 \mu\text{M}$ del dig. No.10 para obtener una inhibición del 31.62%.

presentaron estos digitalicos a la ATPasa de Na^+K^+ , no difiere en mucho al que manifesto la ouabaina, los valores son los siguientes:

	K_1	K_{-1}
Digitalico No. 24	2.08×10^4	11.8×10^{-4}
Tevetina	0.87×10^4	5.48×10^{-4}
Digitoxina	0.12×10^4	0.77×10^{-4}

Los detalles se encuentran al pie de figura C de la figura 7 a la 12).

En la determinación del coeficiente de Hill (n_H) se preincubo la enzima con concentraciones de 10^{-4} a 10^{-11} durante 30 minutos, tiempo suficiente para lograr el equilibrio entre la ATPasa de Na^+K^+ y cada uno de los digitalicos utilizados en este estudio. En las figuras 13 y 14 se muestra como se determina graficamente el n_H ; primeramente se grafica el % de actividad vs -log. de la concentración del digitalico obteniendo asi la curva de saturación (13A y 14A), para obtener la grafica de Hill se grafica Log. % de inhibición / 100 - % de inhibición vs log. de la concentración del digitalico; la pendiente de la recta obtenida es el valor del coeficiente de Hill (n_H) y es de 1.54 y 0.810 para ouabaina y digitalico No. 24 respectivamente.

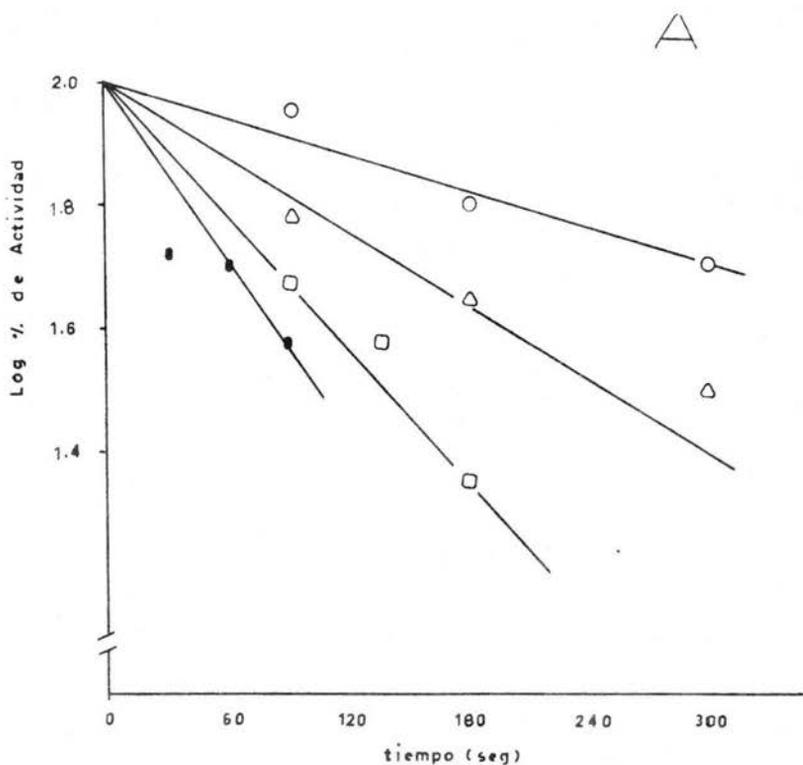
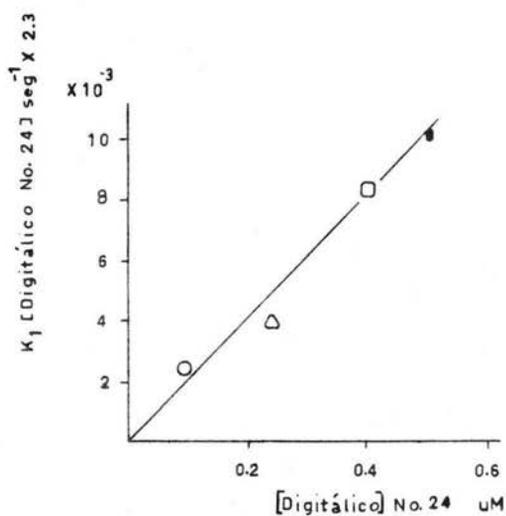


Figura 7.- Determinación gráfica de la constante de velocidad de asociación (K_1) del dig. No. 24 la ATPasa de Na^+, K^+ . Las concentraciones que se utilizaron son en μM : 0.15 (\circ); 0.25 (Δ); 0.4 (\square); 0.5 (\bullet). Se midió la actividad enzimática Fosfatasa dependiente de K^+ .

7A.-Log. del % de Actividad en función del tiempo de preincubación

B



7B. $-K_1 \cdot [\text{dig. No. 24}] \text{ seg}^{-1}$ en función de la concentración del dig. No. 24 μM . $K_1 \cdot [\text{dig. No. 24}]$ es la pendiente para cada concentración utilizada en la gráfica A X 2.3.

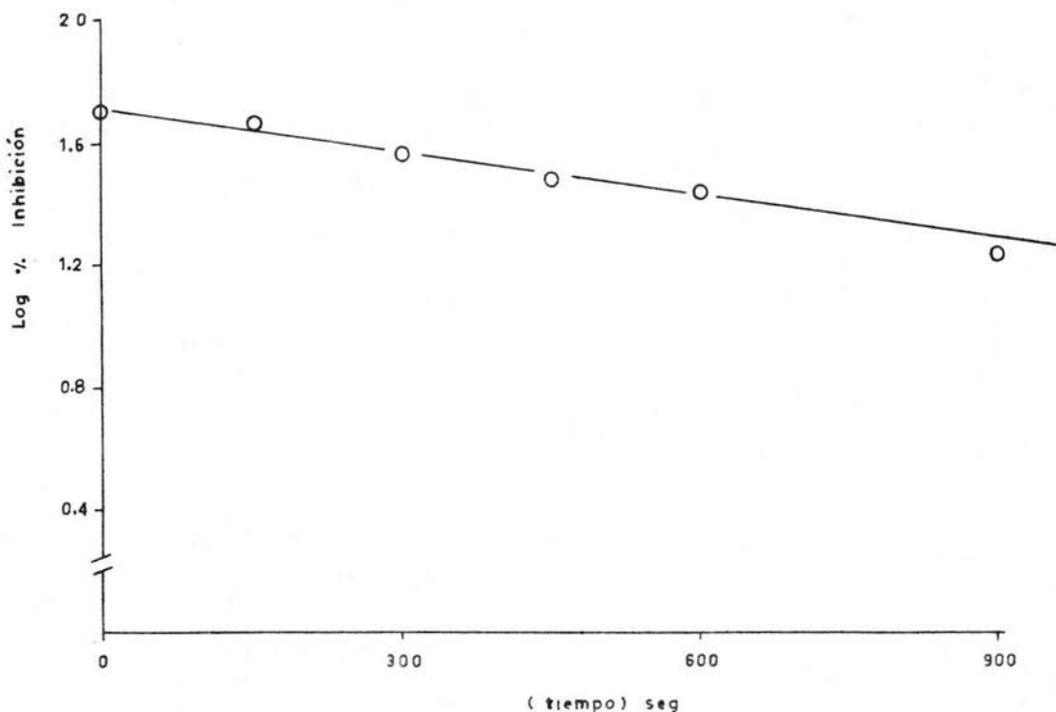


Figura 8. - Determinación grafica de la constante de velocidad de disociación del dig. No. 24 a la ATPasa de Na^+, K^+ . Se incubó a la ATPasa de Na^+, K^+ durante 10 minutos con $0.5 \mu\text{M}$ del dig. No. 24 para obtener una inhibición del 50.11%.

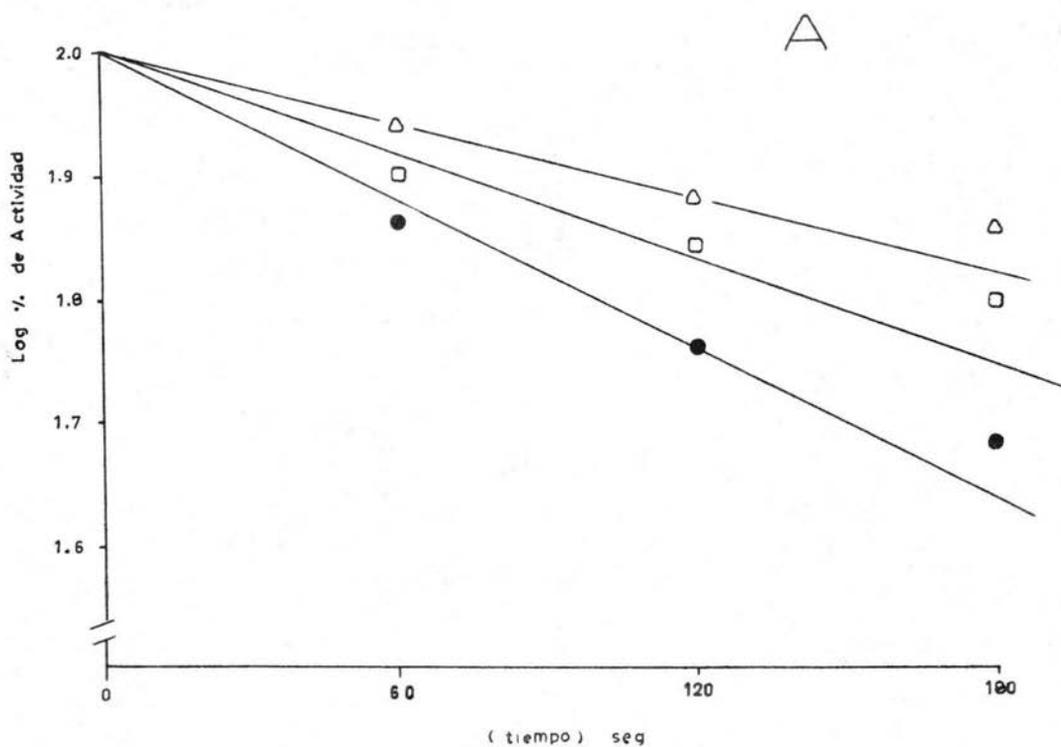
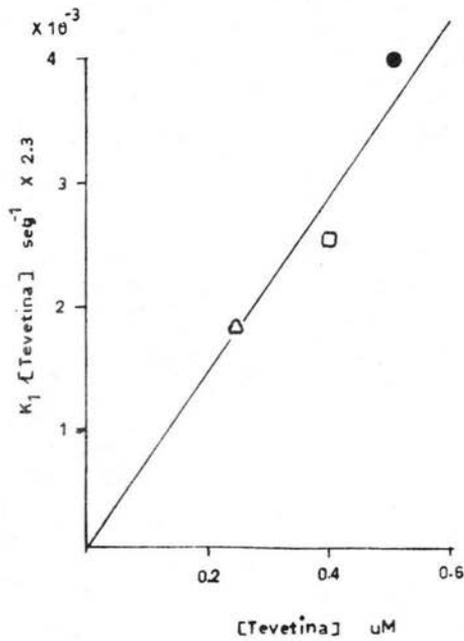


Figura 9.- Determinación gráfica de la constante de velocidad de asociación (K_1) de la tevetina la ATPasa de $\text{Na}^+.\text{K}^+$. Las concentraciones que se utilizaron son en μM : 0.25(Δ) 0.4(\square); 0.5(\bullet). Se midió la actividad enzimática Fosfatasa dependiente de K^+ .

9A.-Log. del % de Actividad en función del tiempo de preincubación

B



OB. $-K_1 * [tevetina] \text{ seg}^{-1}$ en función de la concentración de la tevetina uM. $K_1 * [tevetina]$ es la pendiente para cada concentración utilizada en la gráfica A X 2.3.

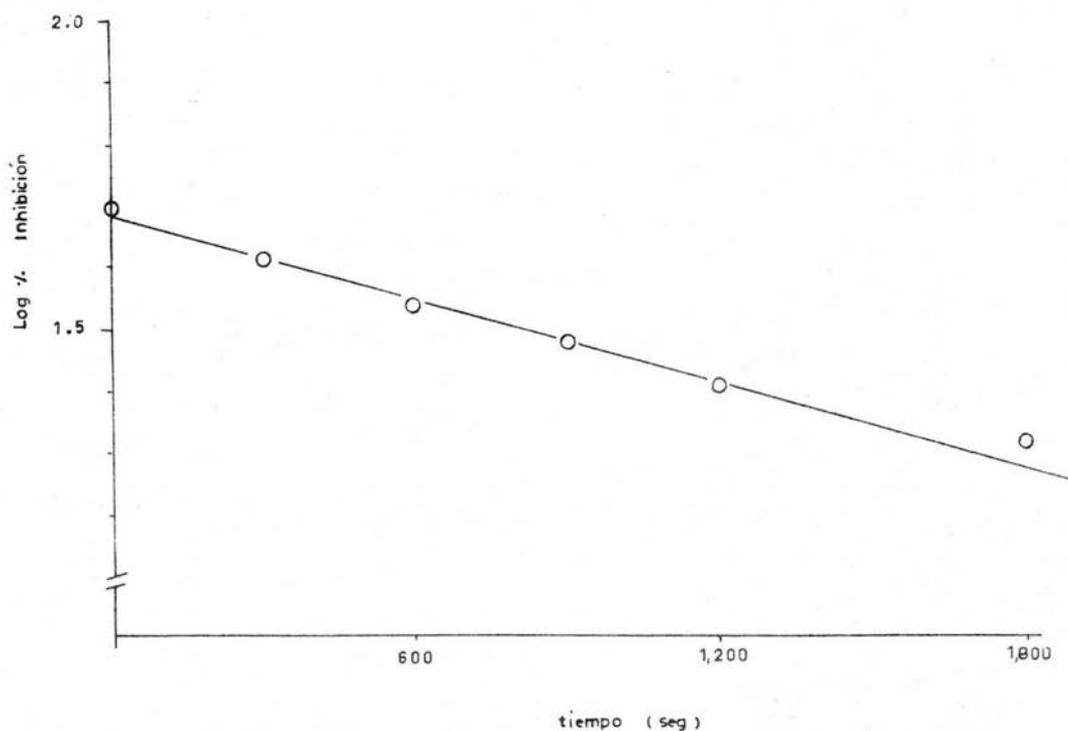


Figura 10.- Determinación gráfica de la constante de velocidad de disociación de la levetina a la ATPasa de Na^+, K^+ . Se incubó a la ATPasa de Na^+, K^+ durante 5 minutos con $0.5 \mu\text{M}$ de la levetina para obtener una inhibición del 49.54%.

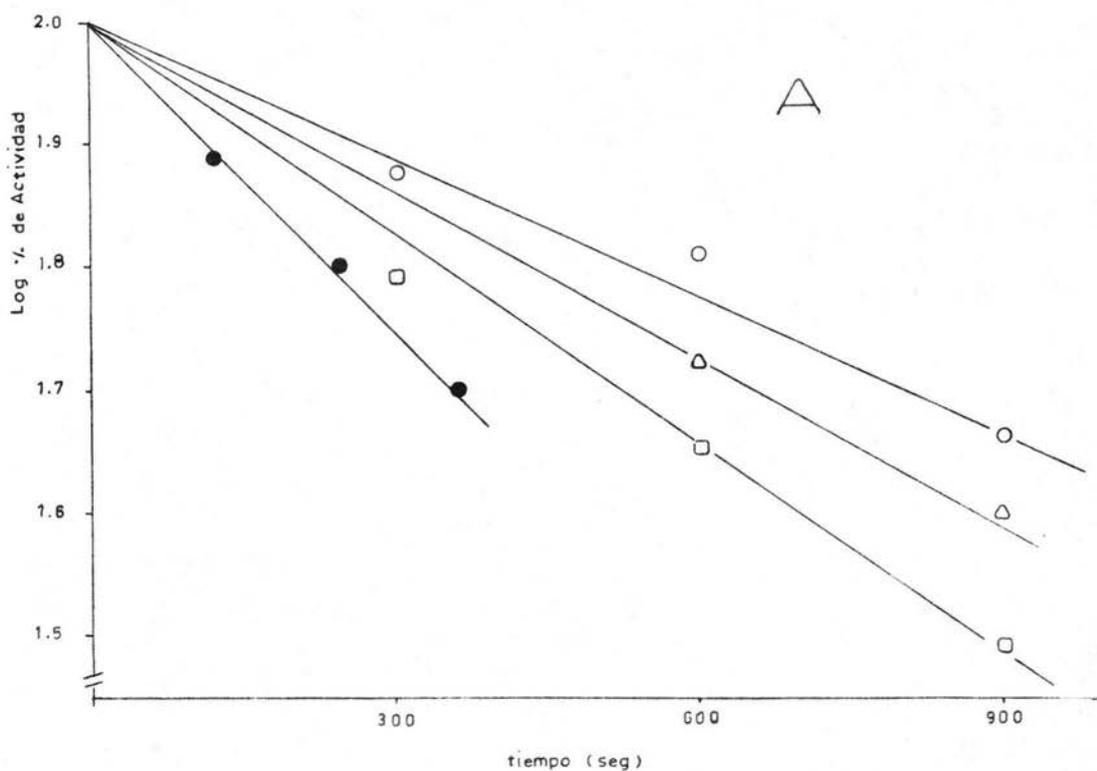
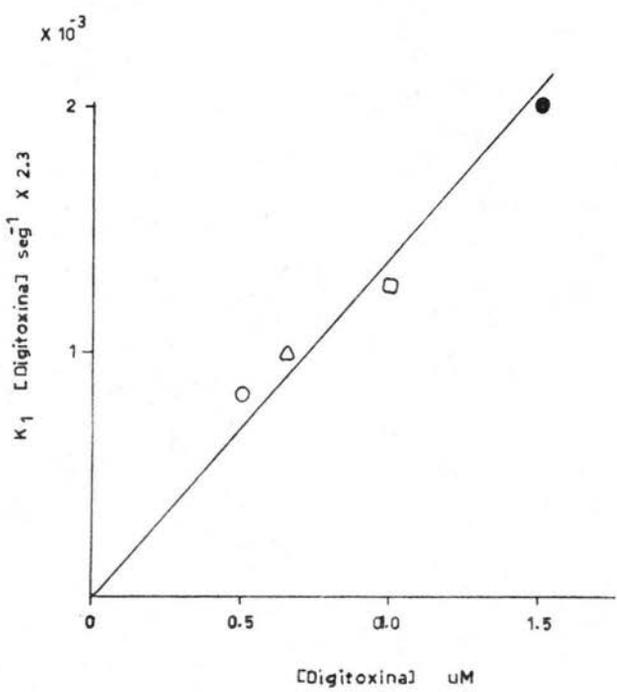


Figura 11.- Determinación gráfica de la constante de velocidad de asociación (K_1) de la digitoxina a la ATPasa de Na^+, K^+ . Las concentraciones que se utilizaron son en μM : 0.5 (○) 0.05 (△); 1.0 (□) y 1.5 (●). Se midió la actividad enzimática Fosfatasa dependiente de K^+ .

11A.-Log. del % de Actividad en función del tiempo de preincubación

B



11B. $-K_1 * [\text{tevetina}] \text{ seg}^{-1}$ en función de la concentración de la digitoxina uM. $K_1 * [\text{tevetina}]$ es la pendiente para cada concentración utilizada en la gráfica A X 2.3.

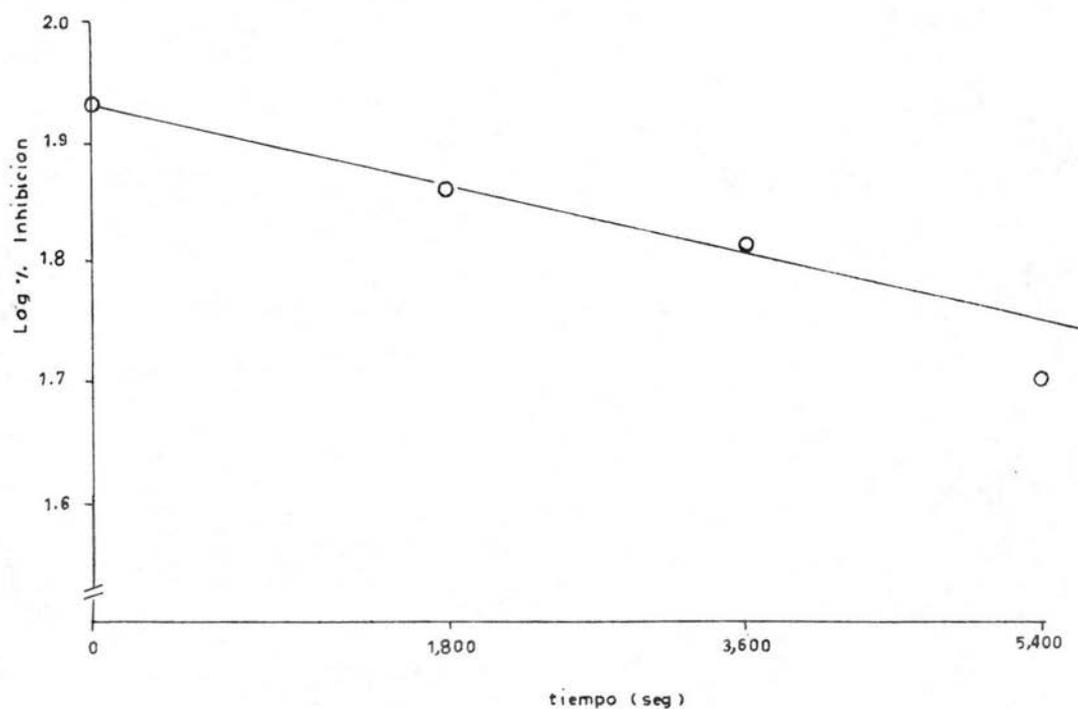


Figura 12.- Determinación grafica de la constante de velocidad de disociación de la digitoxina a la ATPasa de Na^+, K^+ . Se incubó a la ATPasa de Na^+, K^+ durante 1.5 minutos con 1.5 μM de la digitoxina para obtener una inhibición del 85.11%.

% Actividad

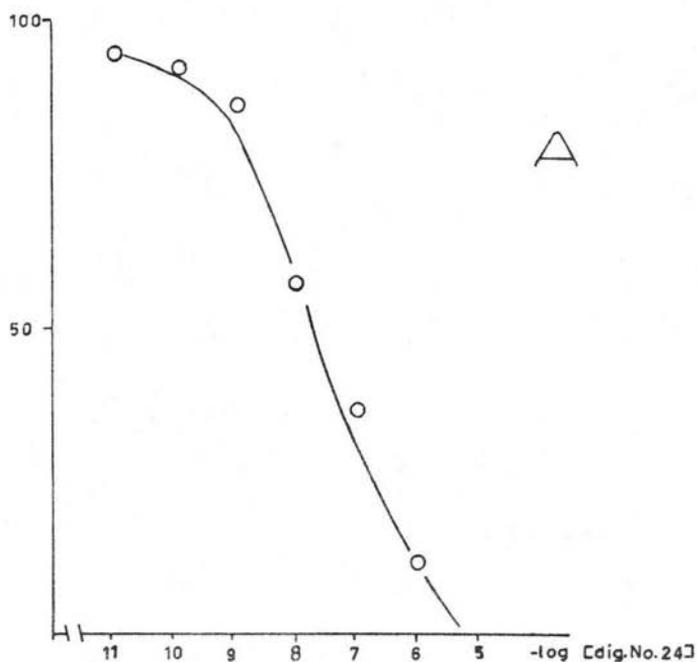
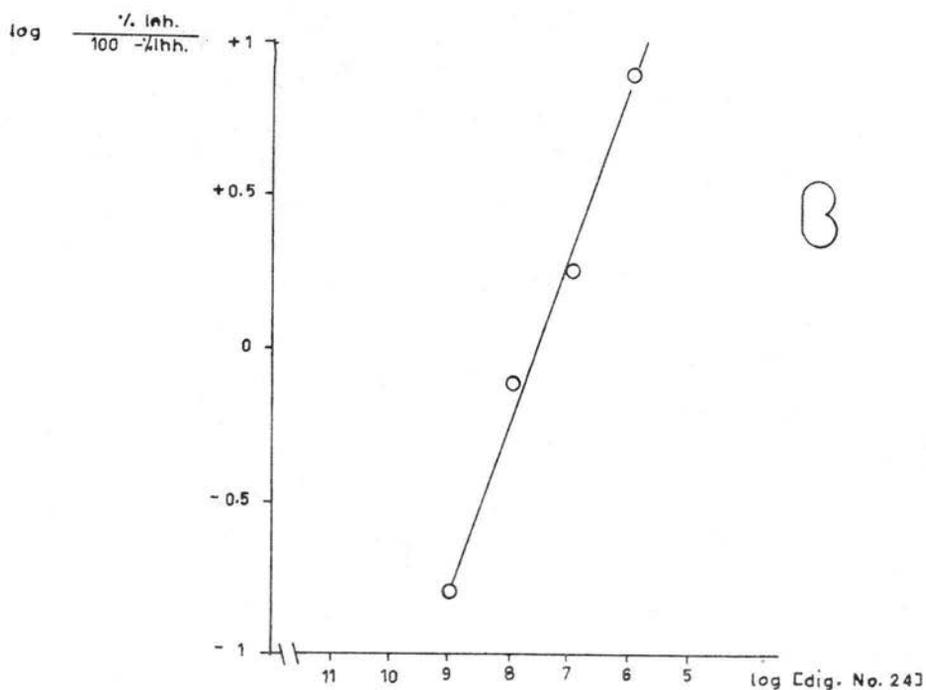


Figura 13.- Determinación gráfica del coeficiente de Hill (n_H) para el digitalico No. 24

A.- Curva de saturación. Logaritmo de la concentración del digitalico en función del % de actividad.



B.-Curva de Hill. Logaritmo de la concentración en función del logaritmo del % de inhibición/100-% inhibición.

La pendiente de la curva es el coeficiente de Hill (n_H).

% Actividad

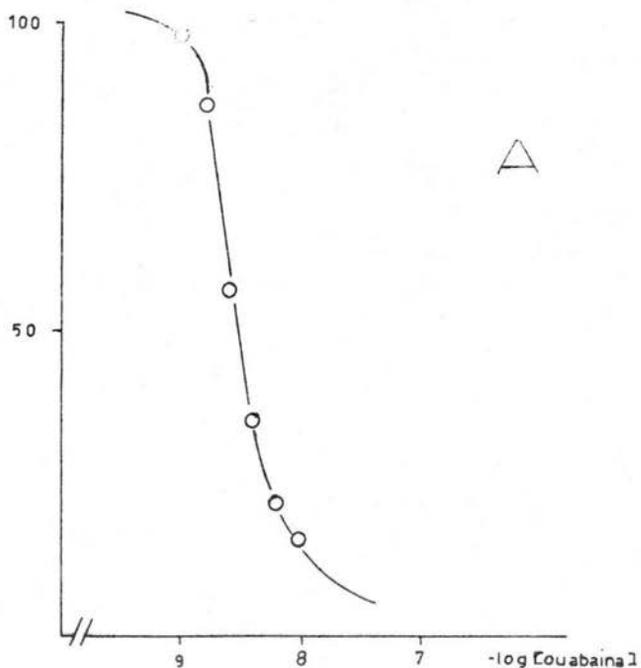
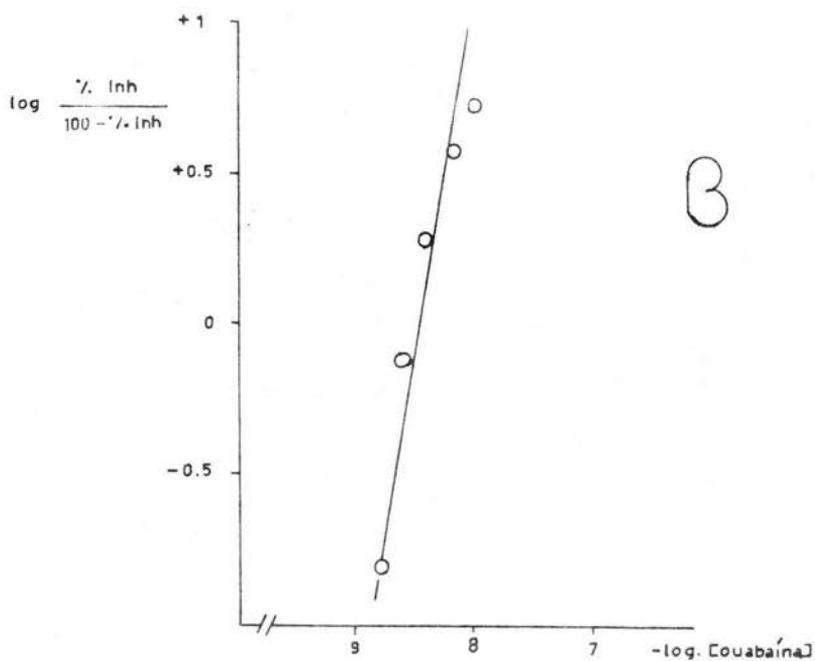


Figura 14.- Determinación gráfica del coeficiente de Hill (n_H) para ouabaina.

A.- Curva de saturación. Logaritmo de la concentración del digitalico en función del % de actividad.



B.-Curva de Hill. Logaritmo de la concentración en función del logaritmo del % de inhibición/100-% inhibición.

La pendiente de la curva es el coeficiente de Hill (n_H).

DISCUSION Y CONCLUSIONES

De los digitalicos utilizados en este trabajo la velocidad de asociacion de los digitalicos a las preparaciones de ATPasa de $\text{Na}^+ \text{K}^+$ de corazon de perro disminuye en el siguiente orden:

ATPasa:

No. 24 < No. 10 < ouabaina < digoxina < tevetina < digitoxina.

Fosfatasa dependiente de K^+ :

No. 24 < tevetina < ouabaina < No. 10 < digoxina < digitoxina.

En ambos casos coinciden con mayor velocidad de asociación el digitalico No. 24 y con menor velocidad la digitoxina, los digitalicos No. 10, ouabaina y digoxina y tevetina no coinciden con el orden, sin embargo en los valores de las constantes de asociación a la ATPasa de $\text{Na}^+ \text{K}^+$ (tabla I) la diferencia entre estos es pequeña ; tanto para ATPasa como para Fosfatasa dependiente de K^+ el valor mas alto es menos de cuatro veces mayor que el valor mas bajo (3.6 para ATPasa y 2.9 Fosfatasa de K^+) tambien es necesario precisar que para las determinaciones de las constantes de velocidad de asociación se utilizaron diferentes corazones de perro para las diferentes preparaciones de ATPasa de $\text{Na}^+ \text{K}^+$.

Tabla No. 1 Comparación de las constantes de velocidad de asociación (K_1) y disociación (K_{-1}) de diferentes digitalicos a la ATPasa de Na^+K^+ ; para actividad ATPasica y Fosfatasa dependiente de K^+ .

$$K_1 \text{ (M}^{-1}\text{seg.}^{-1} \text{)}$$

	ATPasa	Fosfatasa de K^+
Ouabaina	$1.47 \pm 0.71 \times 10^4$	0.86×10^4
Digoxina	$0.92 \pm 0.99 \times 10^4$	0.30×10^4
Dig. No. 10	2.47×10^4	0.32×10^4
Dig. No. 24	$2.83 \pm 0.30 \times 10^4$	2.08×10^4
Tevetina	0.68×10^4	0.87×10^4
Digitoxina	0.25×10^4	0.12×10^4

$$K_{-1} \text{ (seg}^{-1} \text{)}$$

	ATPasa	Fosfatasa de K^+
Ouabaina	$0.48 \pm 0.074 \times 10^{-4}$	0.629×10^{-4}
Digoxina	$0.346 \pm 0.075 \times 10^{-4}$	0.741×10^{-4}
Dig. No. 10	7.46×10^{-4}	10.4×10^{-4}
Dig. No. 24	$33.5 \pm 4.4 \times 10^{-4}$	11.8×10^{-4}
Tevetina	12.4×10^{-4}	5.48×10^{-4}
Digitoxina	0.518×10^{-4}	0.77×10^{-4}

Las velocidades de disociación de digitalícos a la preparación de ATPasa, aumentan en el siguiente orden:

ATPasa

digoxina < ouabaina < digitoxina < Dig. No. 10 < tevetina < Dig. No. 24.

Fosfatasa dependiente de K^+ .

ouabaina < digoxina < digitoxina < tevetina < Dig. No. 10 < Dig. No. 24.

En la tabla 1 se observa que la diferencia entre las constantes de velocidad de disociación para ATPasa y Fosfatasa dependiente de K^+ a los digitalícos utilizados es mínima; en el caso del digitalíco No. 24 y digoxina el valor para ATPasa es tres y dos veces mayor respectivamente que para Fosfatasa dependiente de K^+ , y en el resto de los valores es menor a una vez. Estas determinaciones también se realizaron con diferentes preparaciones de ATPasa de Na^+K^+ ; existe mayor variabilidad en el orden de mayor a menor velocidad de asociación al medir ATPasa y Fosfatasa dependiente de K^+ que en la velocidad de disociación.

Al comparar los valores de velocidad de asociación (K_1) y disociación (K_{-1}) para cada una de las actividades (ATPasa y Fosfatasa dependiente de K^+) de cada uno de los digitalícos se

puede decir que son congruentes y que es confiable el medir la actividad Fosfatasa dependiente de K^+ , además en estudios cinéticos con esta enzima resulta más fácil y económico medir la actividad enzimática con el pseudo sustrato pNPP que utilizar el sustrato específico, ya que este implica medir la actividad con enzimas y sustratos auxiliares que pueden presentar inconvenientes de límite de velocidad en condiciones de K^+ bajo por ejemplo o de inhibidores inespecíficos presentes en las soluciones.

Para la K_I el orden creciente de los digitalícos ensayados es como sigue (Tabla II):

ATPasa:

ouabaina < digoxina < digitoxina < Dig. No. 10 < Dig. No. 24 < tevetina.

Fosfatasa dependiente de K^+ :

ouabaina < digoxina < digitoxina < Dig. No. 24 < tevetina < Dig. No. 10.

Es necesario señalar que la K_I es el resultado de dividir K_{-1} entre K_1 y la diferencia que presenta en el orden, al medir ATPasa y Fosfatasa dependiente de K^+ , se debe a la variabilidad que presentaron los digitalícos en las constantes de velocidad de asociación y disociación.

Tabla II. -Comparación de los valores de K_I para diferentes digitalicos a la ATPasa de Na^+K^+ midiendo actividad ATPasica y Fosfatasa dependiente de K^+ .

	K_I (M)	
	ATPasa	Fosfatasa de K^+
Ouabaína	$2.93 \pm 0.50 \times 10^{-9}$	7.34×10^{-9}
Digoxina	$3.78 \pm 0.27 \times 10^{-9}$	24.90×10^{-9}
Dig. No. 10	30.20×10^{-9}	325.00×10^{-9}
Dig. No. 24	$121.00 \pm 22.0 \times 10^{-9}$	56.7×10^{-9}
Tevetina	183.00×10^{-9}	63.00×10^{-9}
Digitoxina	20.80×10^{-9}	16.26×10^{-9}

Tabla No. III. -Valores del coeficiente de Hill (n_H) determinados experimentalmente.

	ATPasa
Ouabaína	1.54 ± 0.1
Digoxina	2.04 ± 0.31
Dig. No. 10	0.90 ± 0.18
Dig. No. 24	0.81 ± 0.25
Tevetina	1.17
Digitoxina	1.94 ± 0.01



Los digitalícos que presentan coeficiente de Hill mayor a uno (cooperatismo positivo) son ouabaina, digoxina tevetina y digitoxina (ver tabla III) y los digitalícos 10 y 24 presentan coeficiente de Hill igual o menor a uno (cooperativismo negativo)

Las diferencias estructurales en cuanto a grupos funcionales que estan como sustituyentes en la molecula base de los digitalícos marcan tambien diferencias en las constantes de asociación, disociación y coeficiente de Hill (n_H) y se debe a la relación estructura-actividad que tienen los digitalícos (fig 16, 17).

Los digitalícos No. 10 y 24 con n_H menor o igual a 1 en la posición No.3 tienen una glucosa mientras que ouabaina, digoxina, tevetina y digitoxina con $n_H > 1$, en esa misma posición tienen di y trisacáridos. Por lo que se podria pensar que el azúcar en la posición No. 3 dependiendo de su naturaleza puede provocar o no un cambio alostérico de la estructura enzimática para favorecer o no la unión de otras moleculas de digitalíco.

Sin embargo en un estudio realizado en el mismo laboratorio (datos no publicados) dos parejas de digitalícos que varían solo en el azúcar, glucosa y (digitoxosa)₃ los valores de n_H son semejantes lo que indica que el azúcar no influye en el valor de n_H .

Figura 16

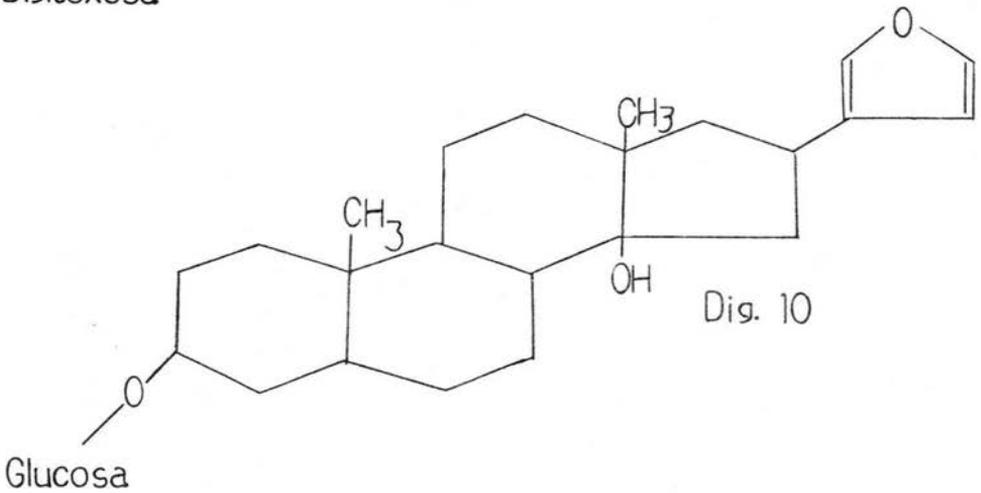
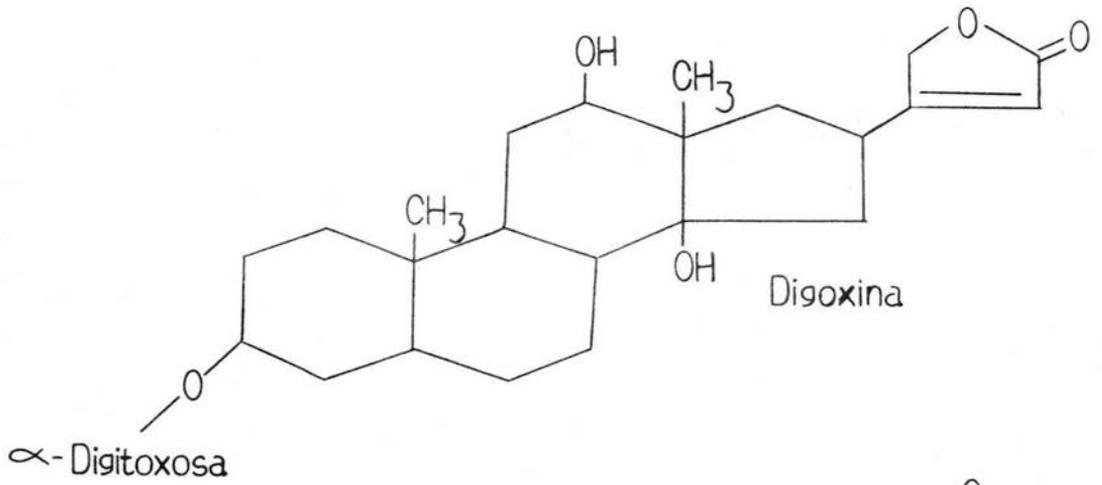
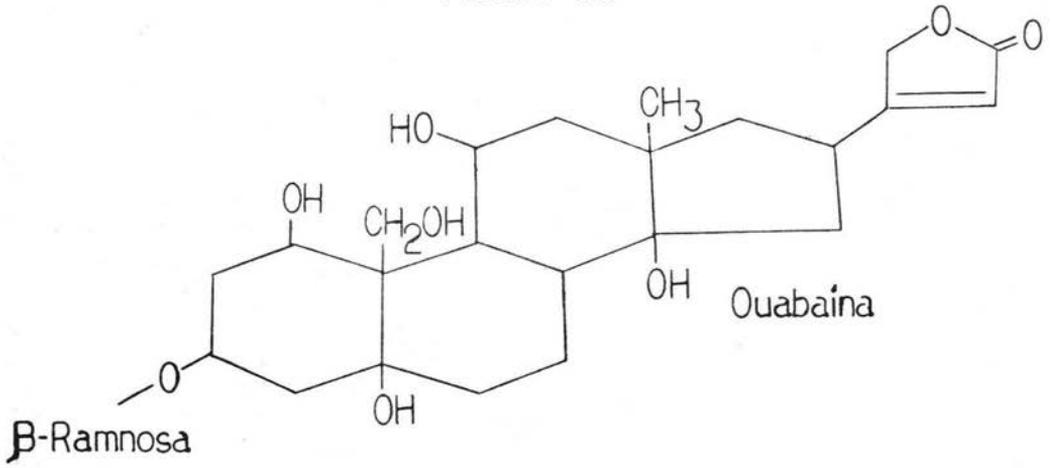
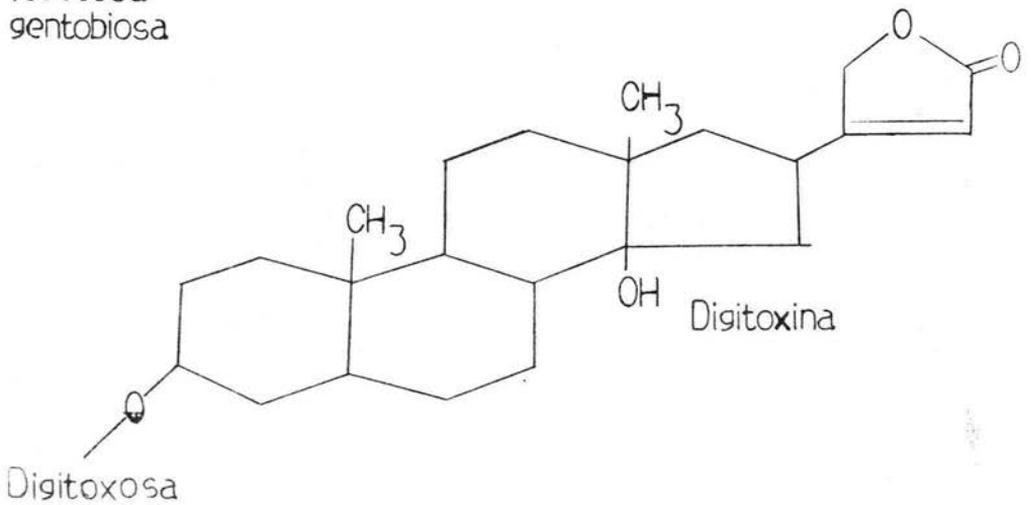
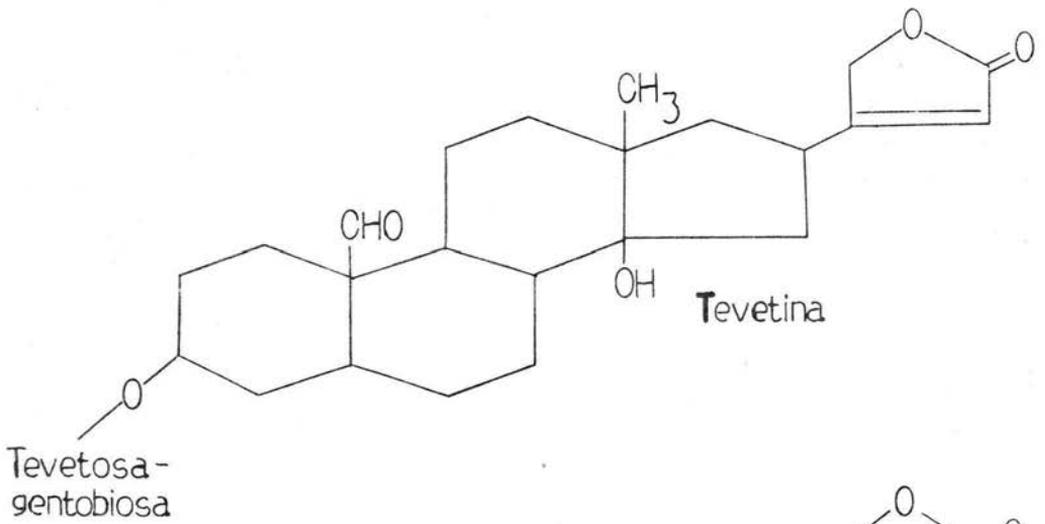
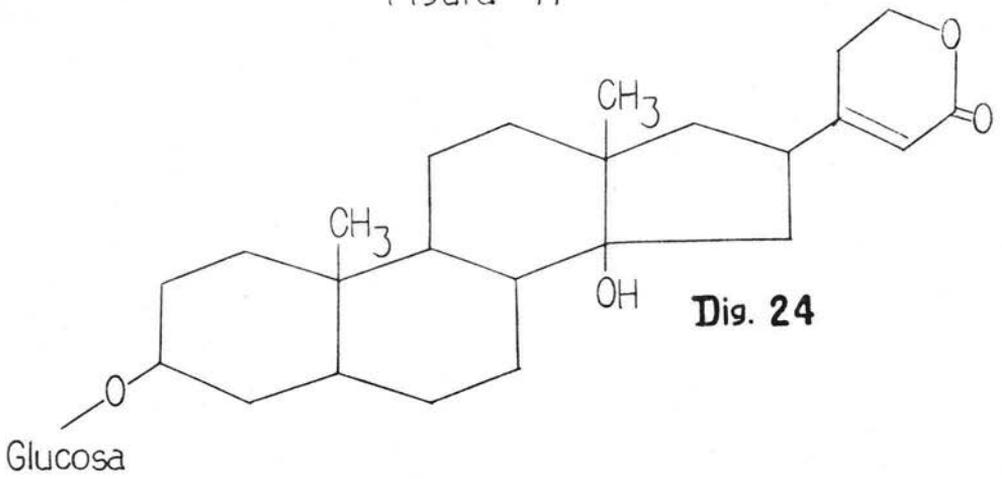


Figura 17



Los sustituyentes que se encuentran en las posiciones 5, 11, 12, 14, 18 y 19 de la molécula base de los digitalícos pueden considerarse no importantes en la relación estructura - actividad ya que aun entre los digitalícos que presentan cooperativismo positivo y los que presentan cooperativismo negativo hay diferencias.

En la posición 17 se encuentran diferentes tipos de lactonas como sustituyentes y en este caso parecen tener importancia en la relación estructura - actividad por lo que los digitalícos ouabaina, digoxina, tevetina, digitoxina en esta posición tienen una lactona insaturada; en los digitalícos 10 y 24 el sustituyente es un furano y una lactona respectivamente las últimas tienen propiedades diferentes (estructuras de resonancia) a las lactonas insaturadas por lo que la interacción con el receptor obviamente es diferente.

Por otro lado los valores de K_1 , K_{-1} , K_I y n_H pueden ser relacionados con los efectos farmacológicos.

K_1 y K_{-1} están relacionados con la velocidad con que se inicia el efecto farmacológico (K_1) y tiempo de duración del mismo (K_{-1}), entonces a mayor constante de velocidad de asociación más rápido se presentará el efecto farmacológico antes dicho, y en este estudio el digitalíco No. 24 es el que más rápido presentaría el efecto ya mencionado; mientras que la

digoxina y ouabaina son los que presentarían mas lento el inicio pero mas duradero el efecto.

K_I es la potencia del digitalico; es decir a menor K_I es mas potente y tiene una estrecha relacion con el n_H . Esta relacion entre K_I y n_H se refiere a lo siguiente. Un digitalico que es muy potente puede presentar n_H mayor o menor a uno, cuando es mayor a uno el rango entre dosis toxica y terapeutica es muy estrecho mientras que un $n_H < 1$ indica un amplio rango entre las dosis antes mencionadas.

El digitalico ideal es aquel que presenta una K_I alta, K_{-1} y K_I pequeñas y $n_H < 1$.

En este trabajo se presento un analisis del efecto de los digitalicos a la ATPasa de $Na^+ K^+$ pero es necesario dejar claro que el trabajo requiere de la participacion de especialistas en las areas quimica organica y bioquimica para la obtencion de un farmaco que produzca los efectos antes mencionados.

FALTA

PAGINA

64

BIBLIOGRAFIA

- 1.-Aker, T
Membrane ATPase: A digitalis receptor. Science
198: 569-574, 1977.
- 2.-Albers, R.W., Koval, G.J., Seigel, G.J.
Studies on interaction of ouabain and other
cardioactive steroids with sodium-potassium
activated adenosine triphosphatase. Mol. Pharmacol
4: 324-336, 1968.
- 3.-Askari, A.
 Na^+ , K^+ -ATPase. Relation conformational
transitions and functions. Mol. Cell. Biochemistry
43(2). 129-143. 1982.
- 4.-Fricke, V., Klans, W.
Evidence for two different Na^+ -dependent
 ^3H -ouabain binding sites of Na^+ , K^+ -ATPase of
guinea pig hearts. Br. J. Pharmacol. 61: 423-428,
1977.
- 5.-Gache, C., Rossi, B., Lazdunski, M.
(Na^+ , K^+)-Activated adenosine triphosphatase of
axonal membranes, cooperativity and control. Eur.
J. Biochem. 65: 293-306, 1976.
- 6.-Glynn, I.M. and Karlish, S.J.D.
The sodium pump. Ann. Rev. Physiol. 37: 13-55,
1975.

- 7.- Hegyvary, G., Chigurupati, R., Kang, K., Mahoney, D.
Reversible alterations in the kinetics of cardiac sodium and potassium activate adenosine triphosphatase after partial removal of membrane lipids. *J. Biol. Chem.* 225: 3068-3074, 1980.
- 8.- Hopkins, B.E., Wagner, Jr., Smith, J.W.
Sodium and potassium activated adenosine triphosphatase of the nasal gland of the duck. (*Anas Platyrhynchos*). *J. Biol. Chem.* 251: 4365 - 4371, 1976.
- 9.-Jean, D.H., Albers, R.W.
Molecular organization of sub-units of electroplax (sodium plus potassium) activated adenosine triphosphatase. *J. Biol. Chem.* 252: 2450-2451, 1977.
- 10.-Jorgensen, P.L.
Purification and characterization of (Na^+ , K^+) ATPase. *Biochem. Biophys. Acta.* 356: 36-52, 1974.
- 11.-Kaniike, K., Lindenmayer, G.E., Wallick, E.T., Lane, L.K., Schwartz, A.
Specific sodium-22 binding to a purified sodium + potassium adenosine triphosphatase. *J. Biol. Chem.* 251: 4794-4795, 1976.
- 12.-Kyte, J.
Purification of the sodium and potassium dependent

- ATPase from canine renal medula. J. Biol. Chem. 246: 4157-4165, 1971.
- 13.-Matsui, H., Hayashi, Y., Homaredo, H., Kimimura, M.
Ouabaine sensitive K^+ binding to Na^+, K^+ -ATPase purified from canine kidney outer medula. Biochem. Biophys. Res. Commun. 74: 373-388, 1977.
- 14.-Matsui, M., Schwartz, A.
ATP-dependent binding of 3H -digoxine to a Na^+, K^+ -ATPase from cardiac muscle. Fed. Proc. 26: 398, 1967.
- 15.-Matsui, M., Schwartz, A.
Mechanism of cardiac glycoside inhibition of the Na^+, K^+ dependent ATPase from cardiac tissue. Biochem. Biophys. Acta. 151: 655-663, 1968.
- 16.-Mendez, R.
Digitálicos y arritmias cardiacas: bases experimentales. Arch. Inst. Cardiol. Mex. 49 XLIX: 54-560, 1979.
- 17.-Mendez, R., Pastelin, G., Kabelá, E.
The influence of the position of attachment of the lactone ring to the steroid nucleus on the action of cardiac glycosides. J. Pharm. Exper. Therap. 188: 189-197, 1974.
- 18.-Nakas, T., Nakas, M., Nagai, F., Kawai, D., Fujihara, Y.,

Hara, Y., Fujita, M.

Purification and some properties of Na^+, K^+ -transport ATPase. II. Preparations with high specific activity obtained using aminoethyl cellulose chromatography. *J. Biochem. Tokyo.* 73: 781-791, 1974.

19.-Perrone, J.R., Hacney, J.F., Dixon, J.F. Hokin, L.E.

Molecular properties of purified sodium + potassium activated adenosine triphosphatases and their subunits from the rectal gland of *Squalus acantias* and the electric organ of *Electrophorus electricus*. *J. Biol. Chem.* 250: 4178-4184, 1975.

20.-Pitts, B.J.R., Schwartz, A.

Improved purification and partial characterization of $(\text{Na}^+, \text{K}^+)$ ATPase from cardiac muscle. *Biochem. Biophys. Acta.* 401: 184-195, 1975.

21.-Post, R.L., Kume, S.

Evidence for an aspartyl phosphate residue at the active site of sodium and potassium-transport adenosine triphosphatase. *J. Biol. Chem.* 248 6993-7000, 1973.

22.-Rhee, H.M., Hokin, L.E.

Inhibition of the purified sodium-potassium activated adenosine triphosphatase from the rectal

gland of *Squalus acanthias* by antibody against the glycoprotein subunit. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 63: 1139-1145, 1975.

23.-Repke, K.

Metabolism of cardiac glycosides. In *New aspects of cardiac Glycosides*. 43-47, vol. III, Wilbradt, W (editor), *Proceedings of the first International Pharmacological Meeting*. Stokholm. Pergamon Press London, 1963.

24.-Robinson, J.D., and Flashner, M.S.

The (Na^+ , K^+)-Activated ATPase. Enzymatic and transport properties. *Biochem. Biophys. Acta*. 549: 145-176, 1979.

25.-Schuumanns, S. and Bouting, S.L.

Tranport adenosine triphosphatase. Properties and functions. *Physiol. Rev.* 6 vol. 61 No. 1 enero 1981.

26.-Schwartz, A., Lindenmayer, G.E., Allen, J.C.

The sodium potassium ATPase: Pharmacological, physiological and biochemical aspects. *Pharmacol. Rev.* 27: 3-134, 1975.

27.-Skou, J.C.

Enzymatic basis for active transport of Na^+ and K^+ across cell membrane. *Physiol. Rev.* 45: 596-617, 1965.

28.-Skou, J.C.

The influence of some cations on and adenosin triphosphatase from peripheal nerves. Biochem. Biophys. Acta. 23: 394-401, 1957.

29.-Thomas, R., Boutagy, Gelbart, A.

Syntesis and biological activity of semisynthetic digitalis analogs. J. Pharm. Sci. 63: 1649-1698, 1974.

30.-Thomas, R., Brown, L., Boutagy, J., Gelbart, A.

The digitalis receptor. Interferences from structure-activity relation ships studies. Ar. Res 46 1167-1172, 1980.

31.-Van Alstyne, E., Bartschat, D.K., poe, S.L. Lindenmayer, G.E.

Cardiac membranes vesicles emiched in ouabain sites Fed. Proc. 37: (3) 779, 1978.

32.-Wallick, E.T., Lane, L.K., and Shwartz, A.

Biochemical mecanism of the sodium pump. Am. Rev. Physiol. 41: 393-411, 1975.

33.-Wallick, E.T., Lindenmayer, G.E., Lane, L.K., Allen, J.C., Pitts, B.J.R., Shwartz, A.

Recent advances in cardiac glycoside- Na^+ , K^+ -ATPase interaction. Fed. Proc. 36: 2214-2218, 1977.

34.-Wallick, E.T., Pitts, B.J.R. Lane, L.K., Schwartz, A.

A kinetic comparison of cardiac glycoside interactions with Na^+, K^+ -ATPase from skeletal and cardiac muscle and from kidney. Arch. Biochem. 202: 442-449, 1980.

35. -Yoda, A.

Association and dissociation rate constants of the complex between various cardiac monoglycosides and Na^+, K^+ -ATPase. Ann. of the New York Acad. Sci. 242: 598-616, 1974.