INTRODUCCIÓN

Regulación intracelular de Ca^{2+}

El ión Ca^{2+} es un segundo mensajero que participa en la transducción de señales (para una revisión actualizada ver Berridge y col., 2003) por tanto, el Ca^{2+} libre en el citoplasma es un parámetro crítico. El papel del Ca^{2+} como regulador intracelular requiere el mantenimiento de un gradiente de Ca^{2+} con una concentración mM en el medio externo y en depósitos intracelulares y alrededor de 100 nM en el citoplasma (Grover y Khan, 1992).

El gradiente de Ca^{2+} se debe a mecanismos de transporte que tienden a contrarrestar la elevación del Ca^{2+} libre en el citoplasma. El Ca^{2+} es bombeado al exterior celular mediante la Ca^{2+}-ATPasa de la membrana plasmática con participación del intercambiador Na^{+}/Ca^{2+} mientras que la Ca^{2+}-ATPasa de retículo endoplásmico/RS también disminuye el nivel de Ca^{2+} en el citoplasma bombeando Ca^{2+} al interior de ese compartimento intracelular.

La actividad fisiológica del músculo proporciona uno de los ejemplos más claros sobre el papel del Ca^{2+} como señal intracelular si bien el mecanismo molecular de la contracción y el efecto concreto del Ca^{2+} son específicos de cada tipo de músculo (esquelético, cardíaco o liso).

En el *músculo cardíaco* se producen contracciones rítmicas espontáneas. La contracción de un miocito cardíaco se produce al abrirse canales de Ca^{2+} sensibles a voltaje de la membrana plasmática y coincide con la fase de meseta del potencial de acción. Esto origina la entrada de una pequeña cantidad de Ca^{2+} desde el medio externo al citoplasma lo que a su vez sirve para estimular la salida de Ca^{2+} desde el RS al citoplasma a través del receptor de rianodina (Fabiato, 1983). Tras la contracción muscular se produce la relajación. Para que ésta tenga lugar debe disminuir la concentración de Ca^{2+} en el citoplasma siendo de vital importancia la participación de la Ca^{2+}-ATPasa de RS (Hasselbach, 1964).

La *Figura 1* muestra los flujos de Ca^{2+} implicados en el ciclo de contracción-relajación de un miocito de corazón.

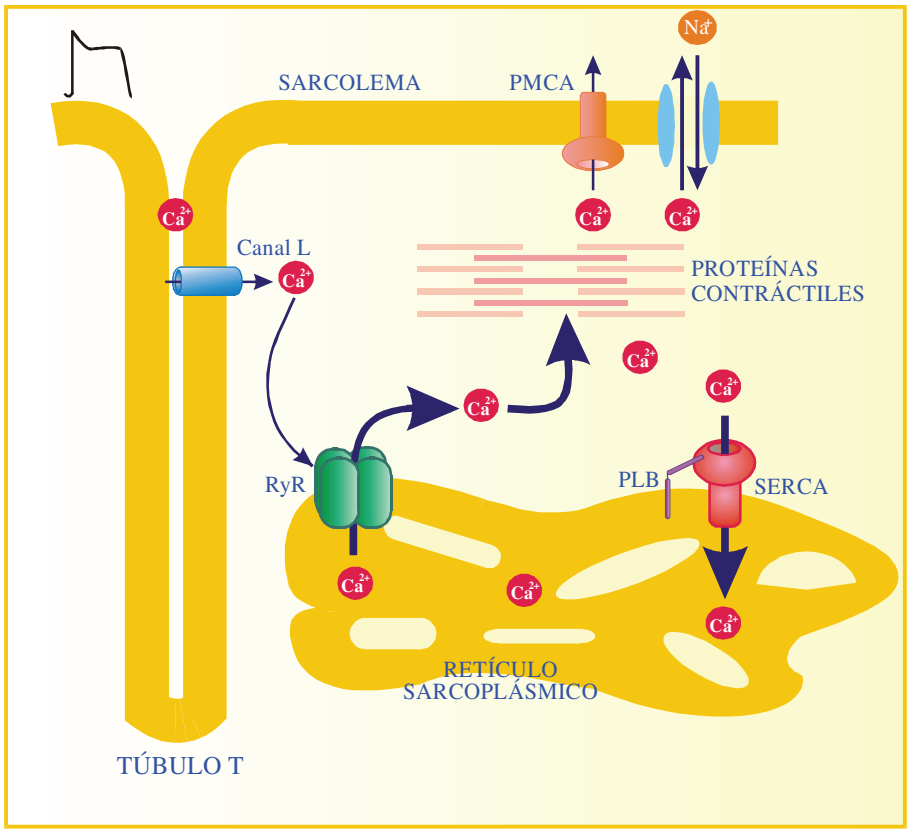


Figura 1. Flujos y transportadores de Ca^{2+} que participan en la actividad contráctil de un miocito cardíaco. El estímulo para la contracción se inicia tras la apertura de canales de Ca^{2+} de tipo L en la región de los túbulos T de la membrana del sarcolema. La entrada al citoplasma de una pequeña cantidad de Ca^{2+} externo activa al receptor de rianodina (RyR) que actúa como un canal produciendo salida de Ca^{2+} desde el RS al citoplasma. El Ca^{2+} que sale del RS activa a las proteínas contráctiles. La relajación se induce por el bombeo de Ca^{2+} desde el citoplasma al interior del RS que cataliza la Ca^{2+}-ATPasa de RS (SERCA). Fosfolambano (PLB) es otra proteína del RS que en su estado no fosforilado interacciona con SERCA y limita la capacidad catalítica de la bomba. La fosforilación de PLB tiene efecto activador. El intercambiador Na^{+}-Ca^{2+} contribuye a bajar la concentración de Ca^{2+} libre en el citoplasma. La Ca^{2+}-ATPasa de la membrana plasmática (PMCA) se encarga de mantener el nivel basal de Ca^{2+}. El grosor de las flechas guarda relación con la cantidad de Ca^{2+} implicada en cada flujo.

Retículo Sarcoplásmico

El RS es un retículo endoplásmico muy desarrollado que es específico de la célula muscular. Esta estructura —que se localiza en el espacio que rodea las miofibrillas—

está formada por dos regiones con morfología y funcionalidad diferentes. Los *túbulos longitudinales* son regiones alargadas que están dispuestas en sentido paralelo a las miofibrillas y cuya composición proteica refleja la función que desempeñan. La Ca^{2+}-ATPasa de RS es el componente proteico mayoritario. Las *cisternas terminales* aparecen como ensanchamientos de los túbulos longitudinales encontrándose en la región más próxima a los túbulos T (Saito y col., 1984; Imagawa y col., 1987; Franzini-Armstrong y Nunzi, 1983) y es la región que contiene el receptor de rianodina.

La membrana de RS se puede aislar más fácilmente a partir de músculo esquelético mediante disgregación del tejido y posterior centrifugación diferencial. Los fragmentos de membrana que se aíslan forman vesículas que mantienen la misma orientación que en el músculo intacto, es decir, con la cara citoplásmica hacia el exterior.

Las preparaciones enriquecidas en túbulos longitudinales son muy adecuadas para realizar estudios sobre la Ca^{2+}-ATPasa de RS dado su alto contenido en esta proteína. Las vesículas de RS procedentes de los túbulos longitudinales tienen un diámetro medio de 0´1 μm, presentan alta actividad hidrolítica para ATP en presencia de Ca^{2+} y son capaces de bombear Ca^{2+} al interior cuando se añade ATP y Mg^{2+} al medio. La elevación del Ca^{2+} libre dentro de las vesículas inhibe la actividad y el transporte de Ca^{2+} cuando se realizan ensayos *in vitro*. Para evitar esta situación se añade un ionóforo específico como A23187 que impide la acumulación de Ca^{2+} o un agente que precipite el Ca^{2+} dentro de las vesículas.

Ca^{2+}-ATPasa de RS

Esta proteína muestra actividad ATPasa dependiente de Mg^{2+} y que se activa por Ca^{2+}. Pertenece a las ATPasas de tipo P porque forma un intermedio fosforilado del tipo aspartil-fosfato durante el ciclo de reacción (Pedersen y Carafoli, 1987).

Esta ATPasa representa ~ 70% de la proteína total de la membrana del RS en el músculo esquelético siendo la única proteína en esta membrana con capacidad para

catalizar el transporte activo de Ca^{2+} (Racker y Eytan, 1973; Meissner y Fleischer, 1974; Inesi y col, 1983).

Estructura

Se trata de una proteína con una sola cadena polipeptídica que se encuentra anclada en la membrana de forma asimétrica. El número concreto de aminoácidos depende de la isoforma pero en todos los casos es próximo a 1000. La masa molecular estimada es de unos 110 kilodaltons (MacLennan, 1970; Martonosi y Halpin, 1971; McFarland e Inesi, 1971; Meissner y col., 1973).

La estructura de la conformación E_1Ca_2 obtenida a partir de estudios de difracción de rayos X a una resolución de 2´6 Å (Toyoshima y col., 2000) (*Figura 2*) confirma datos experimentales previos obtenidos con técnicas indirectas o de menor resolución. La región transmembranal de la proteína comprende diez hélices α (M1-M10) descritas en estudios anteriores. La estructura muestra una clara separación entre M1-M6 y M7-M10. Asimismo, la longitud e inclinación de las hélices varía de unas a otras. La hélice M5 se sitúa en el centro de la molécula y se extiende desde la cara interna (luminal) hasta el centro del dominio citosólico P donde se localiza Asp^{351} por lo que parece el centro de masas de la proteína. Los bucles que aparecen en la cara luminal son cortos excepto el que conecta las hélices M7 y M8 que se denomina L78 y consta de 35 aminoácidos.

La región que sobresale por la cara citoplásmica aparece dividida en tres dominios claramente separados que se designan: P (dominio de fosforilación), N (dominio de unión de nucleótidos) y A (dominio impulsor).

El *dominio de fosforilación* contiene el aminoácido Asp^{351} que da lugar al intermedio de reacción aspartil-fosfato durante la hidrólisis de ATP. Está formado por 410 aminoácidos que se encuentran en dos regiones muy separadas en la secuencia de aminoácidos. La región más próxima al extremo amino —aproximadamente entre Asn^{330} y Asn^{359}— está unida a M4 y la más próxima al extremo carboxilo

—aproximadamente entre Lys^{605} y Asp^{737}— se une a M5. El plegamiento hace que esas dos partes estén físicamente juntas adoptando una estructura de lámina β con siete cadenas paralelas.

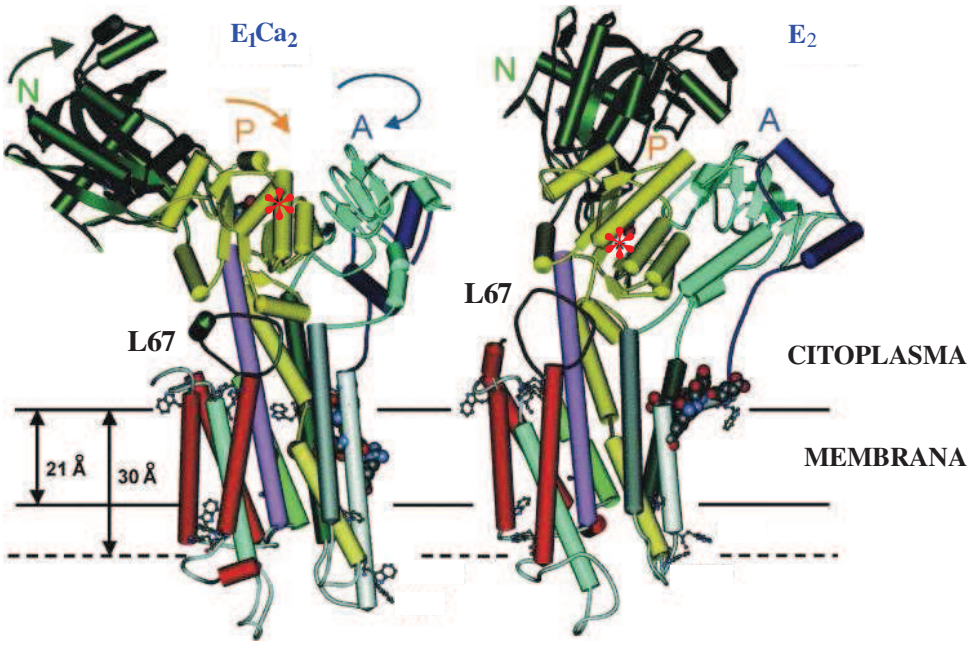


Figura 2. Estructura de la Ca^{2+}-ATPasa en sus conformaciones E_1Ca_2 y E_2. Las hélices α de la región transmembranal se muestran en distintos colores: M1 (gris claro), M2 (verde oscuro), M3 (gris oscuro), M4 (amarillo), M5 (morado), M6 (verde claro), M7 (rojo), M8 (azul claro), M9 (rojo) y M10 (rojo). Las hélices M4, M5, M6 y M8 contribuyen a formar los centros de unión del Ca^{2+}. Se indica la localización del lazo L67 que une las hélices M6 y M7 y que afecta al proceso de fosforilación. La región citoplásmica que forma la cabeza globular muestra el dominio de unión de nucleótidos, N (verde oscuro), el dominio de fosforilación, P (verde claro) con el aminoácido que se fosforila transitoriamente por ATP (asterisco rojo) y el dominio activador, A (azul). Las flechas que aparecen junto a los dominios N, P y A indican el movimiento que realizan estos dominios para que la conformación E_1Ca_2 se convierta en E_2.

El *dominio de unión de nucleótidos* es la región que interacciona con el ATP y está formada por los aminoácidos Gln^{360}-Arg^{604} situados entre las dos regiones que forman el dominio P. La estructura secundaria corresponde a una lámina β —formada por siete cadenas antiparalelas— que están envueltas por dos haces de hélices.

El *dominio impulsor* está formado por 125 aminoácidos que se sitúan entre las hélices transmembranales M2 y M3. Su unión a la región transmembranal se realiza a

través de dos grandes lazos. Este dominio conecta el centro de hidrólisis de ATP con el centro de unión y transporte de Ca^{2+}.

La estructura tridimensional de E_2 obtenida a una resolución de 3´1 Å (Toyoshima y Nomura, 2002) (*Figura 2*) es muy diferente a la de E_1Ca_2 lo que indica que la unión de Ca^{2+} es capaz de inducir un gran cambio conformacional en la proteína. Los cambios se producen tanto en los dominios que componen la cabeza globular de naturaleza hidrofílica como en las hélices transmembranales.

Los *dominios citoplásmicos* en la conformación E_1Ca_2 se encuentran muy separados mientras que en E_2 aparecen mucho más próximos formando una estructura más cerrada y compacta. Para que se produzca esa estructura compacta, el dominio A debe rotar sobre el eje vertical de la proteína unos 110º mientras que el dominio N se desplaza hacia adelante adoptando una posición casi vertical respecto al plano de la membrana. Como resultado de ello, la parte superior del dominio N se mueve más de 50 Å de su posición original y el dominio P rota unos 30º respecto a la membrana (*Figura 2*). A pesar de esos desplazamientos tan importantes el plegamiento de los dominios P y N apenas cambian.

El empaquetamiento de las *hélices transmembranales* también sufre un proceso de reorganización al unirse el Ca^{2+}. Estos cambios estructurales tienen una clara implicación en el mecanismo de unión y liberación de Ca^{2+} durante el transporte. La modificación del empaquetamiento afecta principalmente a las hélices M1-M6 y parece que el dominio de fosforilación desempeña un papel importante como coordinador de esos movimientos. Eso es lo que permite que el Ca^{2+} pueda atravesar la membrana durante el proceso de transporte. Hay que tener en cuenta que las bombas de iones no tienen una estructura definida de poro como ocurre con los canales iónicos. El lazo L67 está unido al dominio de fosforilación por puentes de hidrógeno (Toyoshima y col., 2000) y es importante en el proceso de fosforilación de la enzima. Por otro lado, las hélices M3-M5 están unidas directamente al dominio de fosforilación por puentes de hidrógeno mientras que M6 está conectada indirectamente a través del lazo L67 y de

M5. El desplazamiento del dominio de fosforilación provoca la inclinación de M5 y del resto de las hélices adyacentes (M3-M6).

El estudio de Toyoshima y col. (2000) también ha permitido conocer la localización de los centros de unión de Ca^{2+} en la conformación E_1Ca_2. Los centros —a los que se denomina sitio I y sitio II— están en la región transmembranal a una altura similar respecto al grosor de la membrana, equivalente a 5´7 Å (*Figura 3*).

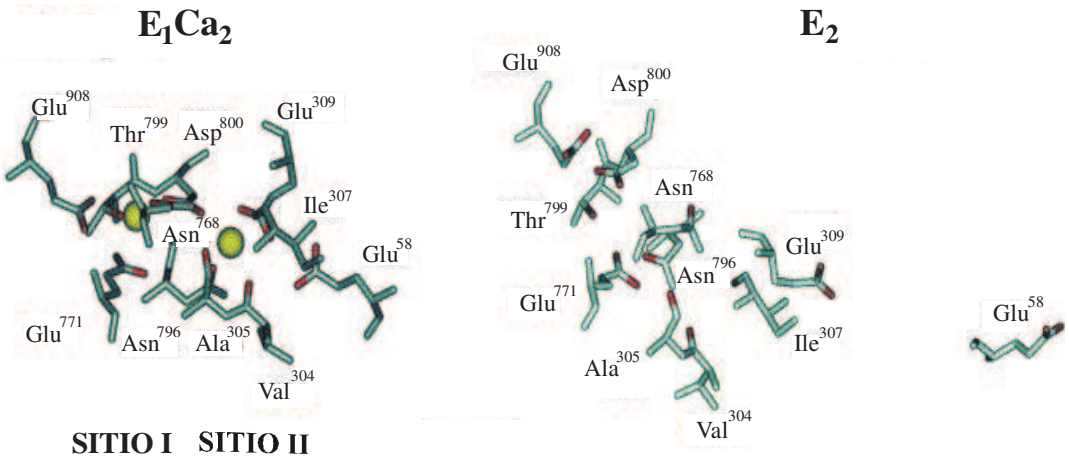


Figura 3. Sitios de unión de Ca^{2+} en las conformaciones E_1Ca_2 y E_2 de la Ca^{2+}-ATPasa. Los dos iones Ca^{2+} en la conformación E_1Ca_2 se muestran como círculos amarillo-verdoso. Los aminoácidos de los sitios de unión en la conformación E_1Ca_2 forman enlaces coordinados a través de oxígenos (rojo) de cadenas laterales o de la cadena principal. En la conformación E_2 (ausencia de Ca^{2+}) la disposición de estos mismos aminoácidos es claramente distinta.

El sitio I se localiza en el espacio entre las hélices M5 y M6 y tiene contribución de la hélice M8 mientras que el sitio II se forma prácticamente en su totalidad con la hélice M4 existiendo participación de la hélice M6.

Función

La Ca^{2+}-ATPasa es capaz de hidrolizar ATP y bombear Ca^{2+} al interior del RS mediante un ciclo de reacción en el que se producen cambios conformacionales de la enzima asociados a procesos de fosforilación y desfosforilación (Inesi y Kirtley, 1990; Inesi y col., 1992). En condiciones óptimas de actuación se transportan 2 iones Ca^{2+} por

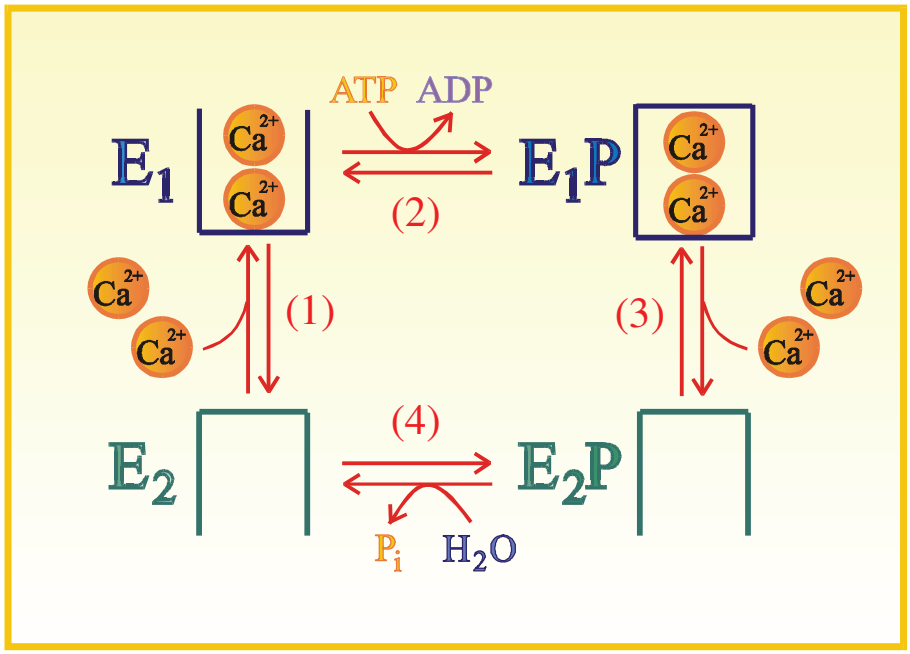
cada ATP hidrolizado (Hasselbach, 1964). Es un transportador electrogénico puesto que intercambia 2 ó 3 H^+ por cada 2 Ca^{2+} transportados (Yu y col., 1993).

Las dos conformaciones principales de la enzima E_1Ca_2 y E_2 son distinguibles desde el punto de vista experimental. La conformación E_1Ca_2 presenta alta afinidad por Ca^{2+} y tiene orientados los sitios de unión hacia el citoplasma de la célula —medio externo cuando se aíslan las vesículas de RS. La conformación E_2 posee baja afinidad por Ca^{2+} y los sitios de unión pueden presentar una orientación interna o externa.

El *Esquema I* corresponde a una versión simplificada del ciclo catalítico y de transporte. Incluye las cuatro etapas mínimas necesarias para que se transporte Ca^{2+} desde el medio externo (citoplásmico) al interno (luminal) al tiempo que se hidroliza el sustrato ATP. El *Esquema I* describe lo que denominamos ciclo acoplado de reacción o ciclo E_1-E_2 donde la relación entre Ca^{2+} transportado y ATP hidrolizado es 2.

De acuerdo con el *Esquema I*, la conformación enzimática E_2 interacciona con los iones Ca^{2+} situados en el medio externo para formar E_1Ca_2 (etapa 1). Por tanto, E_1Ca_2 representa el estado conformacional de la proteína con Ca^{2+} unido y orientación citoplásmica. E_1Ca_2 se fosforila (etapa 2) si el medio de reacción contiene ATP y Mg^{2+} dando lugar al intermedio $E_1P{\cdot}Ca_2$ (Yamamoto y Tonomura, 1968; Makinose, 1969; Kanazawa y col., 1971). El EP con Ca^{2+} unido se denomina "intermedio de alta energía" porque es capaz de regenerar ATP si se añade ADP al medio. Los iones Ca^{2+} en el complejo $E_1P{\cdot}Ca_2$ sufren un proceso de oclusión dentro de la membrana durante el proceso de transporte. Esto hace que en un determinado momento no puedan intercambiarse de forma rápida con Ca^{2+} presente dentro o fuera de las vesículas de RS (Dupont, 1980; Takisawa y Makinose, 1981). El intermedio $E_1P{\cdot}Ca_2$ —que es inestable— sufre un cambio conformacional (Kanazawa y col, 1995) que conlleva una modificación en el empaquetamiento de las hélices transmembranales. El resultado es que la afinidad de unión para el Ca^{2+} disminuye unas mil veces y los iones quedan accesibles al medio interno. Esto permite que el Ca^{2+} se libere dentro del RS (etapa 3) (Inesi y col., 1978). El intermedio sin Ca^{2+} unido se denomina E_2P y es un "intermedio

de baja energía" ya que en presencia de ADP no puede formar ATP. La hidrólisis de E_2P (etapa 4) da lugar a la liberación de P_i y a la formación de E_2 que entonces cambia su orientación hacia el medio externo. De esta forma, la enzima queda preparada para realizar un nuevo ciclo de reacción. El acoplamiento entre transporte e hidrólisis se produce como consecuencia de que las etapas parciales de unión y disociación de Ca^{2+}, con cambio en la orientación respecto al plano de la membrana —etapa 1 y etapa 3, respectivamente —están intercaladas entre las reacciones químicas de fosforilación por ATP e hidrólisis del EP —etapa 2 y etapa 4, respectivamente.



Esquema 1. Ciclo acoplado de reacción de la Ca^{2+}-ATPasa. Las etapas mínimas del ciclo son: (1) unión de Ca^{2+}, (2) fosforilación por ATP, (3) disociación de Ca^{2+} y (4) hidrólisis de EP. El ciclo E_1-E_2 es totalmente reversible pero en condiciones fisiológicas solo opera en el sentido de las agujas del reloj.

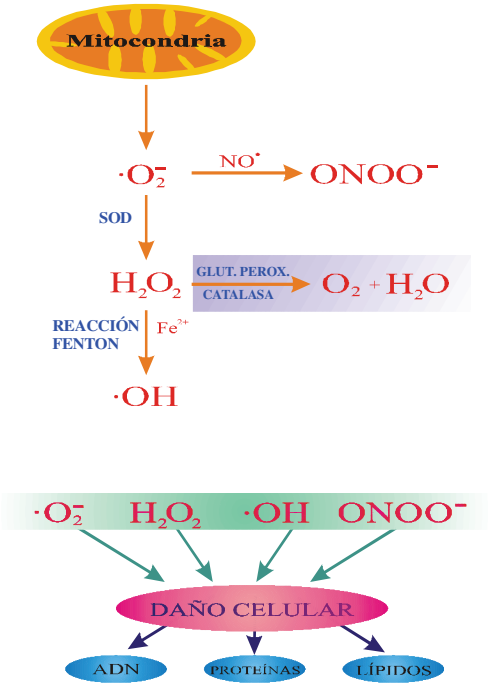
El ciclo de reacción no siempre se produce tal como se ha descrito. Estudios *in vitro* indican que el ciclo de reacción es muy versátil si se modifican las condiciones de ensayo. Así es posible conseguir que la conformación E_2, es decir la enzima en ausencia de Ca^{2+}, hidrolice ATP y otros sustratos donadores de fosfato (Carvalho-Alves y Scofano, 1987; Fortea y col., 2000; Fernández-Belda y col., 2001) o incluso que el intermedio $E_1P{\cdot}Ca_2$ se hidrolice a $E_1Ca_2 + P_i$ en lugar de liberar primero Ca^{2+} para dar

E_2P + 2 Ca^{2+} (Fortea y col., 2000; Fernández-Belda y col., 2001). El desacoplamiento entre transporte de Ca^{2+} e hidrólisis de sustrato fosforilante se produce indefectiblemente cuando tiene lugar alguna de estas reacciones parciales alternativas.

ROS y estrés oxidativo

Los radicales libres son estructuras moleculares que poseen un electrón desapareado y en consecuencia son inestables y altamente reactivas (Thompson y Hess, 1986; Fantone y Ward, 1985; McCord, 1985). Los radicales libres con átomos de oxígeno pertenecen a un grupo más amplio de estructuras relacionadas con el metabolismo oxidativo de la célula y que se caracterizan por su alta reactividad. Se trata de las denominadas especies ROS entre las cuales se encuentran: radical superóxido, H_2O_2, oxígeno singlete, radical hidroxilo y peroxinitrito.

La formación de superóxido desencadena una serie de procesos que producen la acumulación de otras especies (*Esquema 2*). Así, el radical y anión superóxido se puede transformar en H_2O_2 a través de la siguiente reacción: $\cdot O_2^- + \cdot O_2^- + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$. La reacción tiene lugar espontáneamente o por acción de superóxido dismutasa. El superóxido también puede reaccionar con el radical óxido nítrico para generar anión peroxinitrito que es igualmente citotóxico. El H_2O_2 puede a su vez reaccionar con superóxido para formar radical hidroxilo: $H_2O_2 + \cdot O_2^- \rightarrow O_2 + OH^- + \cdot OH$. El proceso se denomina reacción de Fenton y requiere la presencia de metales de transición reducidos que actúan como catalizador. El H_2O_2 también puede reaccionar con hipoclorito o con peroxinitrito para dar oxígeno singlete. El oxígeno singlete es una molécula de oxígeno que tiene electrones de valencia excitados ($^1O_2$) y eso le confiere una alta reactividad como oxidante. Otra fuente de producción de oxígeno singlete son las reacciones catalizadas por peroxidasas y lipooxigenasas.



Esquema 2. Interrelación entre especies ROS y efectos celulares. El radical y anión superóxido (· O_2^-) producido por la cadena respiratoria mitocondrial puede transformarse en H_2O_2 por acción de superóxido dismutasa (SOD) o puede reaccionar con el radical óxido nítrico para dar anión peroxinitrito. El H_2O_2 puede transformarse en radical hidroxilo (·OH) a través de la reacción de Fenton actuando como catalizador Fe^{2+}. La eliminación de H_2O_2 se produce por la acción antioxidante de glutatión peroxidasa y catalasa. Cuando los niveles de ROS exceden a la capacidad antioxidante de la célula, se produce el estrés oxidativo que desencadena un daño celular en proteínas, lípidos y material genético.

La generación de ROS en células normales está muy controlada a través de distintos mecanismos que se encargan de su eliminación. Existen antioxidantes naturales como glutatión, α-tocoferol (vitamina E), carotenoides y ácido ascórbico que reaccionan con la mayoría de estos oxidantes. También hay enzimas con función antioxidante como es el caso de: glutatión peroxidasa y catalasa que catalizan la reacción: $2\ H_2O_2 \rightarrow 2\ H_2O + O_2$. Sin embargo, cuando los niveles de ROS exceden a la capacidad antioxidante de la célula, se produce el estrés oxidativo.

La producción de ROS aumenta considerablemente en determinadas situaciones como pueden ser: un proceso inflamatorio, el envejecimiento, la exposición prolongada a radiaciones, el shock endotóxico o un proceso de isquemia-reperfusión. El exceso de ROS produce daño celular en distintos componentes celulares como son: proteínas,

lípidos y material genético. El estrés oxidativo está implicado en diversos tipos de alteraciones celulares (Kloner y col., 1989; Opie, 1989) incluyendo la capacidad para inducir la muerte celular a través de mecanismos de apoptosis o de necrosis (Kannan y Jain, 2000).

Uno de los efectos que se atribuye a las especies ROS es el de elevar el nivel basal de Ca^{2+} libre en el citoplasma. Esto sugiere que el efecto se debe producir sobre transportadores de Ca^{2+}. El tratamiento de vesículas de RS —procedentes de músculo de langosta— con agentes oxidantes como H_2O_2, peroxidisulfato y Fe^{2+}/ascorbato produce inhibición de la actividad Ca^{2+}-ATPasa y del transporte de Ca^{2+} (Scherer y Deamer, 1986). El efecto se correlaciona con la oxidación de grupos SH de la proteína descartando un efecto de la oxidación de lípidos de la membrana. Otros datos de la bibliografía indican que el tratamiento de vesículas de RS procedentes de arteria coronaria (músculo liso) con H_2O_2 entre 10 y 50 μM produce inhibición del transporte de Ca^{2+} y de la acumulación de EP (Grover y col., 1992). También se ha descrito que la inhibición de la Ca^{2+}-ATPasa de RS, medida a través de la velocidad del transporte de Ca^{2+} dependiente de ATP, es mayor en músculo liso vascular que en células endoteliales (Grover y Samson, 1997). La razón de esa diferencia se atribuye a que el músculo liso vascular expresa la isoforma 2b de la enzima mientras que el tejido endotelial expresa la isoforma 3 (Grover y col., 1997). La mayor resistencia de la isoforma 3 se interpreta como un mecanismo para que el tejido endotelial pueda soportar mejor el estrés oxidativo que se produce en el lumen de las arterias.

El radical hidroxilo —generado *in vitro* a través de la reacción de Fenton— también es capaz de inhibir la actividad hidrolítica de la Ca^{2+}-ATPasa y el transporte de Ca^{2+} tanto en vesículas de RS de músculo cardíaco como esquelético (Xu y col., 1997). Este trabajo muestra que cuando se preincuban vesículas de RS con ATP 1 mM —antes de exponerlas a la acción del radical libre— se observa una protección total de la actividad enzimática y del transporte. Los autores concluyen que el radical hidroxilo desnaturaliza a la enzima atacando directamente el sitio de unión del ATP.

El oxígeno singlete —generado por fotoactivación del colorante rosa bengala— inhibe significativamente la actividad ATPasa y el transporte de Ca^{2+} en vesículas de RS de músculo cardíaco (Kukreja y col., 1991). Se observa un descenso del 18% en la población de grupos SH valorables y el daño funcional se relaciona con la oxidación de la Ca^{2+}-ATPasa.

Otros estudios han utilizado el sistema exógeno hipoxantina/xantina oxidasa para producir un efecto inhibidor sobre la Ca^{2+}-ATPasa de RS de músculo liso vascular (Suzuki y Ford, 1991). El efecto también se relaciona con la oxidación de grupos SH y en este caso se atribuye al superóxido generado porque es inhibible por superóxido dismutasa.

El peroxinitrito —que es un derivado altamente reactivo del óxido nítrico— es capaz de oxidar distintos aminoácidos aromáticos (Beckman y col., 1992; van der Vliet y col., 1994), aminoácidos con átomos de azufre (Radi y col., 1991b), lípidos (Radi y col., 1991a) y otros tipos de moléculas como ascorbato (Shi y col., 1994) y desoxirribosa (Beckman y col., 1990). Para ello debe estar en forma protonada. Otros estudios han demostrado que concentraciones bajas de peroxinitrito son capaces de producir un descenso de la actividad Ca^{2+}-ATPasa debido a la oxidación de grupos SH de la proteína. Esa inactivación es en gran parte (~ 70%) reversible añadiendo agentes reductores como ditiotreitol o borohidruro sódico (Viner y col., 1996). Sin embargo al utilizar concentraciones altas de peroxinitrito se observa una inactivación de la enzima que no es reversible por tratamiento con agentes reductores. Este último resultado sugiere que posiblemente se produzca la oxidación de otros aminoácidos además de los aminoácidos con grupos SH.

H_2O_2

El H_2O_2 es un compuesto de bajo peso molecular, miscible en agua, inestable y con capacidad para atravesar las membranas celulares aunque la vía de entrada no se conoce con precisión (Halliwell y Gutteridge, 1999). Es muy tóxico *in vivo* y por tanto se elimina rápidamente por la acción de antioxidantes intracelulares y enzimas tales como:

catalasa, glutatión peroxidasa y sistemas con tiorredoxina (Bai y col., 1999; Matsumoto y col., 1999).

El H_2O_2 se forma a partir del radical superóxido generado en la mitocondria como se ha descrito antes aunque también puede aparecer por la acción de oxidasas entre las que se incluyen: glicolato oxidasa, monoamino oxidasa y la vía de β-oxidación de ácidos grasos en los peroxisomas (Chance y col., 1979, de Groot y Littauer, 1989). El H_2O_2 no solo ejerce efectos oxidantes sino que también es fuente para la formación de otras especies ROS como es el radical hidroxilo. Esta transformación se produce por exposición a la luz ultravioleta (Ueda y col., 1996) o por interacción con iones metálicos de transición de entre los cuales el más importante es el Fe^{2+} (Halliwell y Gutteridge,1990).

El H_2O_2 no solo está relacionado con el estrés oxidativo y el daño celular. Estos efectos son evidentes a altas concentraciones (Shimizu y col., 1994). Sin embargo, hay datos que indican que concentraciones bajas de H_2O_2 pueden tener un papel como señal intracelular o intercelular (Schreck y col., 1991; Abe y Berk, 1999). Así por ejemplo, los fagocitos que se activan en un proceso inflamatorio parece que modulan la respuesta inflamatoria —control de la proliferación celular o apoptosis y agregación plaquetaria— mediante el H_2O_2 que generan (Clement y col., 1998; Vepa y col., 1999).

OBJETIVOS

Al repasar los datos bibliográficos se constata que uno de los efectos nocivos que producen las especies ROS es alterar la homeostasis del Ca^{2+} intracelular actuando sobre la Ca^{2+}–ATPasa de RS. En estos estudios se han utilizado distintas especies ROS y vesículas de RS procedentes de distintos tejidos. La utilización de preparaciones microsomales procedentes de músculo cardíaco o liso —como se ha hecho en muchos casos— tiene dos inconvenientes importantes: (i) la fracción que se aísla con la membrana de RS contiene otras membranas contaminantes con actividad ATPasa y (ii)

el contenido en Ca^{2+}–ATPasa de la membrana del RS cardíaco o de músculo liso es relativamente bajo. La utilización de una preparación de RS —enriquecida en túbulos longitudinales de músculo esquelético— evita estos dos problemas y permite realizar un estudio más profundo sobre el mecanismo de inhibición. Dada la complejidad de acción de las distintas especies ROS hemos seleccionado para nuestro estudio a una de ellas, el H_2O_2.

El objetivo de este trabajo es caracterizar los efectos que se producen sobre la proteína Ca^{2+}-ATPasa al tratar *in vitro* vesículas RS con H_2O_2. Las preguntas a las que se pretende responder son:

¿Cómo afecta el tratamiento al transporte activo de Ca^{2+}?

¿Cómo afecta el tratamiento a la actividad Ca^{2+}-ATPasa?

¿Cómo afecta el tratamiento al factor de acoplamiento Ca^{2+}/P_i?

¿Qué tipo de intermedios de reacción se acumulan cuando hay desacoplamiento?

¿Cómo afecta el que las vesículas de RS se expongan al tratamiento en presencia o ausencia de Ca^{2+}?

¿Cómo afecta el tratamiento a la hidrólisis de ATP en ausencia de Ca^{2+}?

¿Cómo afecta el tratamiento a los sitios de unión de Ca^{2+}?

¿Cómo afecta el tratamiento al nivel de acumulación de EP y a su cinética de descomposición?

¿Cómo afecta el tratamiento a los grupos SH de la enzima?

Los resultados obtenidos están basados en medidas de hidrólisis de ATP, transporte de Ca^{2+}, unión de Ca^{2+}, acumulación de EP y determinación de grupos SH, realizadas en diferentes condiciones experimentales, utilizando para ello técnicas colorimétricas y radiométricas. Los datos muestran características y dependencias importantes del efecto inhibidor y permiten conocer la conformación enzimática y la reacción parcial del ciclo de reacción a las que afecta el H_2O_2.