RESULTADOS

Transporte de Ca^{2+} e hidrólisis de ATP

Nuestro primer objetivo fue estudiar la capacidad de transporte de Ca^{2+} que muestran vesículas aisladas de RS cuando previamente se someten a tratamiento con distintas concentraciones de H_2O_2. Los experimentos de transporte se realizaron a 25 ºC en un medio tamponado a pH 7´0 que contenía KCl 80 mM, $MgCl_2$ 5 mM, $^{45}Ca^{2+}$ libre 50 µM y oxalato potásico 5 mM. La inclusión del isótopo $^{45}Ca^{2+}$ en el medio de reacción sirvió como trazador para seguir la acumulación de Ca^{2+} dentro de las vesículas. El uso de vesículas intactas permite que podamos medir el transporte de Ca^{2+} y la presencia de oxalato hace que la velocidad del transporte sea lineal durante el tiempo de medida. El experimento control consiste en medir la velocidad de transporte antes de realizar el tratamiento con H_2O_2. La velocidad de transporte fue 1´04 ± 0´04 µmoles Ca^{2+}/min/mg de proteína al utilizar una concentración de ATP 50 µM y 2´11 ± 0´08 µmoles Ca^{2+}/min/mg de proteína cuando se utiliza ATP 1 mM. El efecto del H_2O_2 se estudió incubando muestras E_1Ca_2 (vesículas intactas) a 37 ºC durante 1 h con determinadas concentraciones de H_2O_2. Transcurrido el tiempo de incubación se añadía 20 UI catalasa/µmol de H_2O_2 con el fin de eliminar el H_2O_2 que no había reaccionado con la proteína. La velocidad inicial de transporte de Ca^{2+} en muestras tratadas con H_2O_2 se inhibió en función de la concentración de reactivo (*Figura 4*). Los datos se muestran en unidades relativas para facilitar la comparación a las dos concentraciones de ATP utilizadas. La inhibición del transporte, en unidades relativas, fue independiente de la concentración de ATP y mostró el mismo perfil monofásico con una $K_{0´5}$ de ~ 0´75 mM.

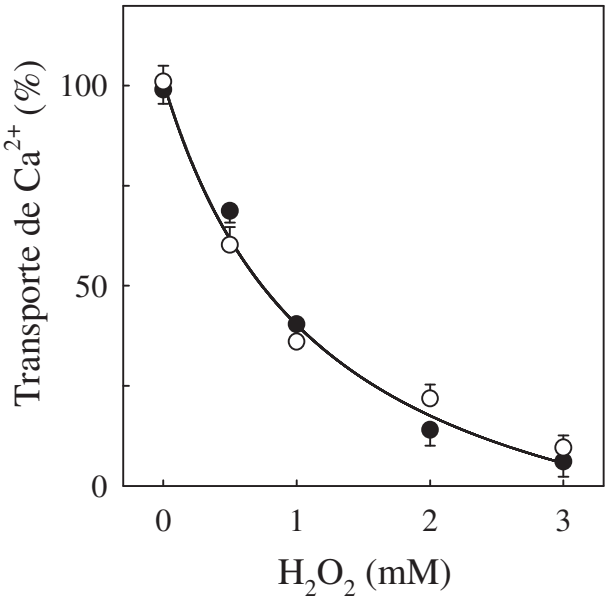

Figura 4. Transporte activo de Ca^{2+} en vesículas de RS tratadas con H_2O_2/catalasa. Muestras E_1Ca_2 compuestas por: Mops 20 mM (pH 7´0), KCl 80 mM, $MgCl_2$ 5 mM, EGTA 0´5 mM, $^{45}CaCl_2$ 0´551 mM (~ 2.000 cpm/nmol) (pCa = 4´3), 0´04 mg RS/mL y oxalato potásico 5 mM se trataron a 37 ºC durante 1 h con una determinada concentración de H_2O_2. El transporte de Ca^{2+} se estudió a 25 ºC tras añadir ATP 50 µM (●) ó 1 mM (○). En los ensayos con ATP 50 µM se incluyó fosfoenolpiruvato 2 mM y piruvato quinasa 6 UI/mL para evitar el agotamiento del sustrato. Alícuotas de 1 mL se sacaron y filtraron a vacío rápidamente. Cada filtro se lavó con 10 mL de medio: Mops 20 mM (pH 7´0) y $LaCl_3$ 1 mM antes de cuantificar el $^{45}Ca^{2+}$ retenido.

La hidrólisis de ATP en presencia de Ca^{2+} también se midió a 25 ºC utilizando las condiciones experimentales descritas para el transporte pero sin incluir el trazador $^{45}Ca^{2+}$. La velocidad de hidrólisis de ATP —en muestras no tratadas— fue 0´82 ± 0´03 µmoles P_i/min/mg de proteína al utilizar ATP 50 µM y 1´36 ± 0´05 µmoles P_i/min/mg de proteína cuando se utilizaba ATP 1 mM. El efecto del H_2O_2 sobre la actividad Ca^{2+}-ATPasa se evaluó una vez que las muestras E_1Ca_2 (vesículas intactas) se sometieron a incubación con determinadas concentraciones de H_2O_2 tal como se ha descrito antes. Los datos de actividad hidrolítica en presencia de Ca^{2+} se muestran en una escala relativa respecto a la actividad control que exhibe una muestra no tratada. La velocidad

inicial de hidrólisis de ATP fue resistente a la inhibición pero dependiente de la concentración de ATP presente en el medio de medida (*Figura 5*). Así por ejemplo, la inhibición fue de ~ 8 % cuando las muestras se trataron a 37 ºC durante 1 h con H_2O_2 3 mM y la concentración de ATP en el medio de medida fue 1 mM. El efecto inhibidor llegó a ser de ~ 25 % cuando la preincubación se hizo igualmente con H_2O_2 3 mM pero utilizando ATP 50 µM en el medio de medida.

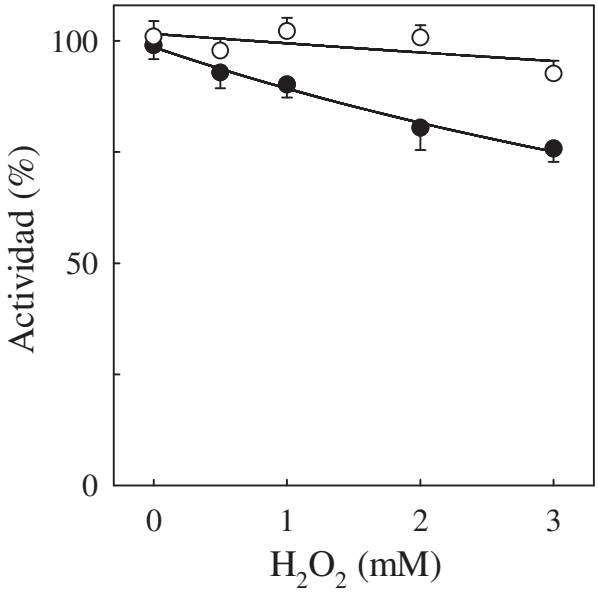

Figura 5. Actividad ATPasa dependiente de Ca^{2+} en vesículas de RS tratadas con H_2O_2/catalasa. Muestras E_1Ca_2 compuestas por: Mops 20 mM (pH 7´0), KCl 80 mM, $MgCl_2$ 5 mM, EGTA 0´5 mM, $CaCl_2$ 0´551 mM (pCa = 4´3), 0´04 mg RS/mL y oxalato potásico 5 mM se trataron a 37 ºC durante 1 h con una determinada concentración de H_2O_2. La reacción de hidrólisis se estudió a 25 ºC tras añadir ATP 50 µM (●) ó 1 mM (○). Alícuotas de 1 mL, sacadas a diferentes tiempos, se añadieron sobre tubos con 1 mL de reactivo de Lin y Morales para detener y evaluar la reacción. En los ensayos con ATP 50 µM se incluyó fosfoenolpiruvato 2 mM y piruvato quinasa 6 UI/mL como sistema regenerador de ATP.

El efecto del H_2O_2 sobre el acoplamiento Ca^{2+}/P_i se puede calcular dividiendo la velocidad de transporte de Ca^{2+} entre la velocidad de hidrólisis de ATP siempre que ambas medidas se realicen en las mismas condiciones experimentales. Los datos obtenidos en los experimentos anteriores permiten hacer este cálculo. El factor de

acoplamiento en muestras no tratadas fue 1´26 —al utilizar una concentración 50 µM de ATP— y 1´6 cuando el ATP se elevó a 1 mM (*Figura 6*). Nuestros datos también indican que el H_2O_2 produce desacoplamiento. El factor de acoplamiento Ca^{2+}/P_i disminuyó cuando las vesículas de RS se trataron previamente con H_2O_2 siendo ese descenso dependiente de la concentración de H_2O_2 utilizada. El desacoplamiento puede considerarse total cuando la incubación a 37 ºC durante 1 h se realizó en presencia de H_2O_2 3 mM.

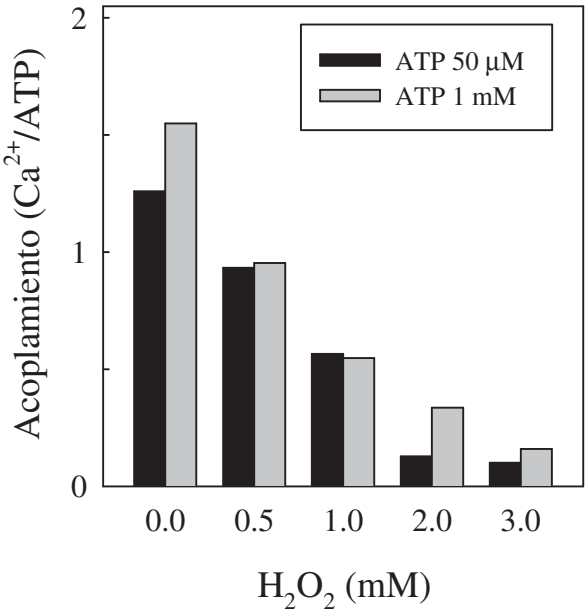

Figura 6. Acoplamiento Ca^{2+}/P_i en vesículas de RS tratadas con H_2O_2/catalasa. El factor de acoplamiento en vesículas de RS tratadas con H_2O_2 se obtuvo dividiendo la velocidad de transporte de Ca^{2+} entre la velocidad de hidrólisis de ATP en presencia de Ca^{2+}. Los datos experimentales están sacados de las *Figuras 1 y 2*.

En el siguiente ensayo se utilizaron las condiciones del tratamiento con H_2O_2 que producían un desacoplamiento total. Es decir, muestras E_1Ca_2 (vesículas intactas) en presencia de oxalato potásico 5 mM se expusieron a 37 ºC durante 1 h con H_2O_2 3 mM. Una vez transcurrido el tiempo de tratamiento, el H_2O_2 sobrante se eliminó incubando

con catalasa. La velocidad de hidrólisis de ATP en presencia de Ca^{2+} se midió añadiendo ATP. Los resultados obtenidos indican que la actividad enzimática de muestras tratadas con H_2O_2 3 mM se inhibe por TG cuando las medidas de hidrólisis se realizan en un medio con Ca^{2+} (*Figura 7*). El efecto de inhibición es dependiente de la concentración de TG en el medio de medida. El efecto es observable tanto cuando la concentración de ATP es 50 µM como cuando es 1 mM, si bien la actividad residual fue algo mayor al utilizar ATP 1 mM.

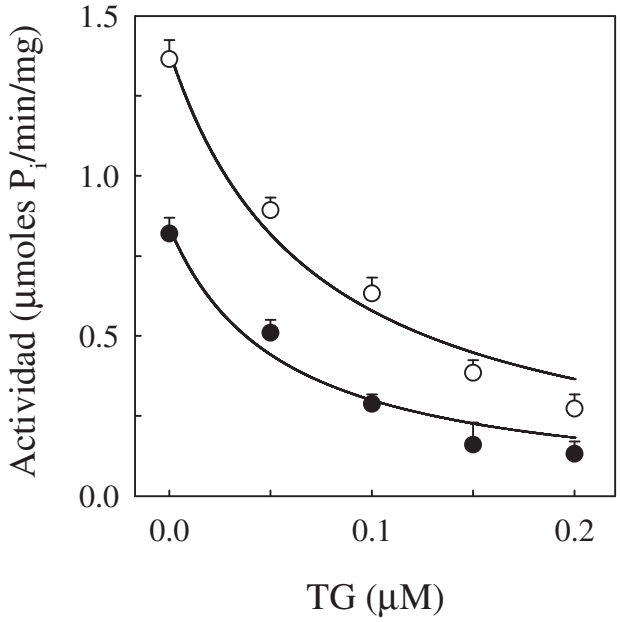

Figura 7. Efecto de TG sobre la actividad ATPasa dependiente de Ca^{2+} en vesículas de RS tratadas con H_2O_2 3 mM/catalasa. Vesículas de RS en un medio compuesto por: Mops 20 mM (pH 7´0), KCl 80 mM, $MgCl_2$ 5 mM, EGTA 0´953 mM, $CaCl_2$ 1 mM (pCa = 4´3), 0´04 mg RS/mL y oxalato potásico 5 mM se incubaron a 37 ºC durante 1 h con H_2O_2 3 mM. La velocidad de hidrólisis de ATP se estudió a 25 ºC incluyendo una determinada concentración de TG. El inicio de la reacción se produjo añadiendo ATP 50 µM (●) ó 1 mM (○). En los ensayos con ATP 50 µM se incluyó el sistema regenerador de ATP.

Una cuestión de interés fue conocer si el efecto inhibidor del H_2O_2 sobre la Ca^{2+}-ATPasa era dependiente de la temperatura a la que se mide la actividad enzimática y de la integridad de la membrana. Para estudiar el efecto de la temperatura a la que se hace el ensayo se utilizaron muestras E_1Ca_2 tratadas a 37 ºC durante 1 h con distintas concentraciones de H_2O_2 y donde estaba presente el ionóforo A23187 para hacer que las vesículas de RS fueran permeables al Ca^{2+}. Las medidas posteriores de actividad ATPasa en presencia de Ca^{2+} se realizaron a 25 ó a 37 ºC. El medio de reacción contenía 50 µM de Ca^{2+} libre y la reacción se inició añadiendo ATP 1 mM tal como se ha descrito en el capítulo 2 de **Materiales y métodos**. Los datos se muestran en valores relativos porque la actividad enzimática a 25 ºC es menor que a 37 ºC. El grado de inhibición de la actividad Ca^{2+}-ATPasa inducido por el tratamiento con una determinada concentración de H_2O_2 es el mismo tanto si las medidas se realizan a 25 como a 37 ºC (*Figura 8*). Por tanto, el perfil monofásico de inhibición de la actividad respecto a la concentración de H_2O_2 es exactamente el mismo.

La influencia de la integridad de la membrana se estudió utilizando vesículas de RS tal como se aíslan —lo que denominamos vesículas intactas— o bien vesículas de RS tratadas con el ionóforo A23187 —vesículas permeables al Ca^{2+}. Muestras E_1Ca_2 con vesículas intactas o vesículas permeables a Ca^{2+} se sometieron a tratamiento durante 1 h a 37 ºC con distintas concentraciones de H_2O_2. Las medidas posteriores de actividad Ca^{2+}-ATPasa se realizaron a 37 ºC utilizando una concentración 1 mM de ATP. Los datos obtenidos indican que el efecto inhibidor a una determinada concentración de H_2O_2 es siempre mayor si se utilizan vesículas permeables que si se utilizan vesículas intactas (*Figura 8*). Para conseguir que la actividad enzimática se inhiba hasta niveles próximos al 100% se requiere que el tratamiento a 37 ºC durante 1 h se realice con una concentración de H_2O_2 que sea al menos 20 mM y que las vesículas sean permeables al Ca^{2+}.

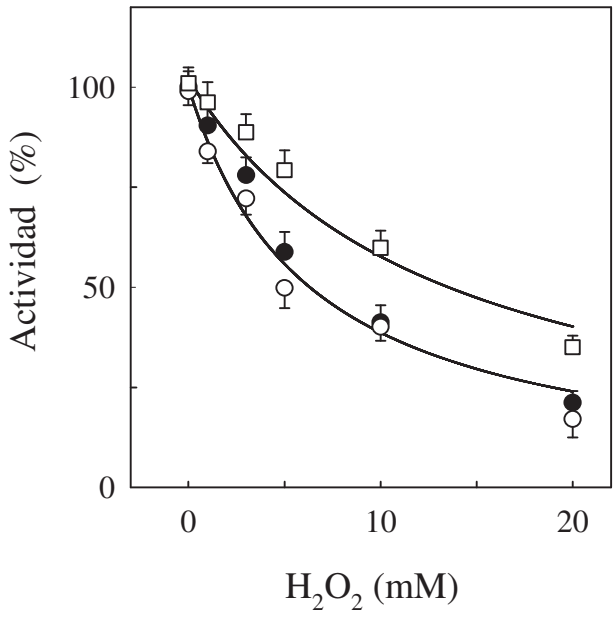

Figura 8. Actividad ATPasa dependiente de Ca^{2+} en vesículas de RS tratadas con H_2O_2/catalasa. Efecto de la temperatura y el estado de la membrana. Vesículas intactas de RS en un medio compuesto por: Mops 20 mM (pH 7´0), KCl 80 mM, $MgCl_2$ 5 mM, EGTA 0´953 mM, $CaCl_2$ 1 mM (pCa = 4´3), 0´04 mg RS/mL y oxalato potásico 5 mM ó vesículas permeables a Ca^{2+} en un medio compuesto por: Mops 20 mM (pH 7´0), KCl 80 mM, $MgCl_2$ 5 mM, EGTA 0´5 mM, $CaCl_2$ 0´551 mM (pCa = 4´3), 0´01 mg RS/mL y A23187 0´75 µM se trataron a 37 ºC durante 1 h con una determinada concentración de H_2O_2. La hidrólisis de ATP a 37 ºC se estudió en vesículas intactas (□) o permeables a Ca^{2+} (○) tratadas con H_2O_2. La velocidad de hidrólisis de ATP también se estudió a 25 ºC (●) en vesículas permeables a Ca^{2+} tratadas con H_2O_2. En este último caso las muestras en un medio compuesto por: Mops 20 mM (pH 7´0), KCl 80 mM, $MgCl_2$ 5 mM, EGTA 0´5 mM, $CaCl_2$ 0´551 mM (pCa = 4´3), 0´02 mg RS/mL, A23187 1´5 µM se incubaron previamente a 37 ºC durante 1 h con una determinada concentración de H_2O_2. La reacción de hidrólisis se inició en todos los casos añadiendo ATP 1 mM.

Otro de nuestros objetivos fue estudiar si existían diferencias en la actividad Ca^{2+}-ATPasa cuando el tratamiento de las vesículas de RS con H_2O_2 se hacía en presencia de Ca^{2+} (muestras E_1Ca_2) o en ausencia de Ca^{2+} (muestras E_2). Para ello, muestras E_1Ca_2 ó muestras E_2 se incubaron a 37 ºC durante 1 h con diferentes concentraciones de H_2O_2. Estos tratamientos se realizaron en presencia de A23187 porque hemos visto que las vesículas permeables son más sensibles a la inhibición que las vesículas intactas.

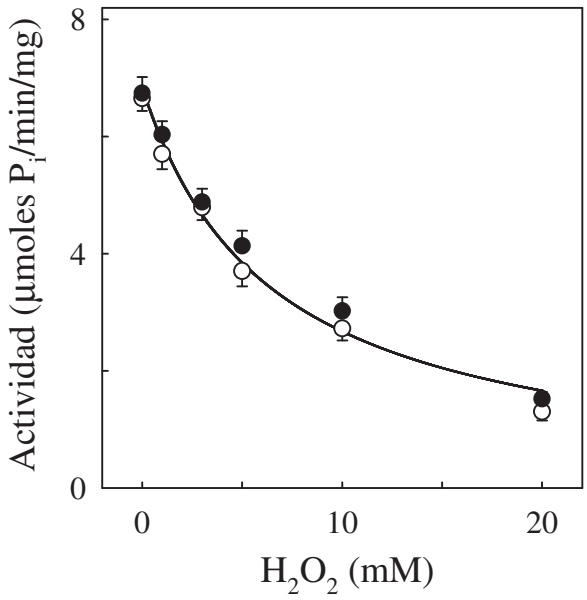

Figura 9. Actividad ATPasa dependiente de Ca^{2+} en vesículas de RS tratadas con H_2O_2/catalasa en presencia o ausencia de Ca^{2+}. Muestras E_1Ca_2 conteniendo: Mops 20 mM (pH 7´0), KCl 80 mM, $MgCl_2$ 5 mM, EGTA 0´5 mM, $CaCl_2$ 0´551 mM (pCa = 4´3), 0´01 mg RS/mL y A23187 0´75 µM, o muestras E_2 conteniendo: Mops 20 mM (pH 7´0), KCl 80 mM, $MgCl_2$ 5 mM, EGTA 0´5 mM, 0´01 mg RS/mL y A23187 0´75 µM se sometieron a tratamiento con determinadas concentraciones de H_2O_2 a 37 ºC y durante 1 h. La reacción de hidrólisis de ATP se estudió a 37 ºC. En muestras E_1Ca_2 tratadas con H_2O_2 la reacción se inició añadiendo ATP 1 mM (○). En muestras E_2 tratadas con H_2O_2 se añadió primero $CaCl_2$ 0´551 mM y después ATP 1 mM (●).

Las medidas posteriores de hidrólisis de ATP se realizaron a 37 ºC y en presencia de Ca^{2+} libre 50 µM y ATP 1 mM. La actividad ATPasa dependiente de Ca^{2+} disminuyó en función de la concentración de H_2O_2, tanto en muestras E_1Ca_2 como en muestras E_2 tratadas con H_2O_2 (*Figura 9*). El perfil de inhibición respecto a la concentración de peróxido utilizada en el tratamiento previo fue el mismo en ambos casos. Ese perfil hiperbólico muestra una inhibición del 50% cuando la concentración de H_2O_2 en el tratamiento fue 6 mM.

El efecto del H_2O_2 sobre las vesículas de RS es dependiente del tiempo. Para caracterizar el efecto del tiempo de tratamiento con H_2O_2 se utilizaron muestras E_1Ca_2 o muestras E_2 que se sometieron a una incubación a 37 ºC con H_2O_2 5 ó 10 mM. Las vesículas se encontraban en presencia de ionóforo y por tanto eran permeables al Ca^{2+}. La adición de H_2O_2 representó el tiempo cero del experimento. La reacción con H_2O_2 se detuvo a distintos tiempos añadiendo catalasa y las muestras tratadas se utilizaron para determinar la actividad Ca^{2+}-ATPasa. La hidrólisis de ATP también se midió a 37 ºC en presencia de Ca^{2+} 50 µM y ATP 1 mM. Los datos de la *Figura 10* corresponden a muestras E_1Ca_2 tratadas con H_2O_2. La inhibición de la actividad enzimática aumentó con el tiempo de tratamiento y el efecto fue mayor al utilizar H_2O_2 10 mM respecto a cuando se utilizó una concentración 5 mM.

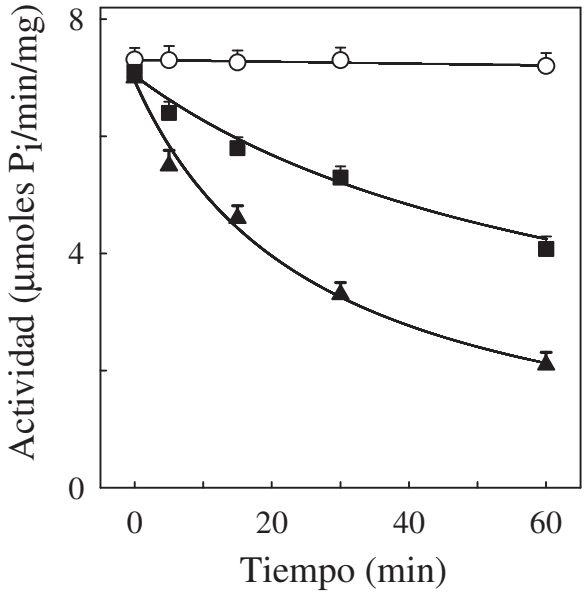

Figura 10. Actividad ATPasa dependiente de Ca^{2+} en vesículas de RS sometidas a distintos tiempos de tratamiento con H_2O_2/catalasa en presencia de Ca^{2+}. Muestras E_1Ca_2 conteniendo: Mops 20 mM (pH 7´0), KCl 80 mM, $MgCl_2$ 5 mM, EGTA 0´5 mM, $CaCl_2$ 0´551 mM (pCa = 4´3), 0´01 mg RS/mL y A23187 0´75 µM se trataron a 37 ºC con H_2O_2 5 ó 10 mM. En el ensayo control no se hizo tratamiento con H_2O_2. La actividad ATPasa dependiente de Ca^{2+} en muestras sometidas a distintos tiempos de tratamiento con H_2O_2 se estudió a 37 ºC. La reacción se inició añadiendo ATP 1 mM. Actividad de muestras tratadas con H_2O_2 5 mM (■) ó 10 mM (▲). Actividad de muestras no tratadas con H_2O_2 (○).

La actividad Ca^{2+}–ATPasa de muestras E_2 tratadas con H_2O_2 5 ó 10 mM mostró una dependencia similar a la descrita para las muestras E_1Ca_2 en lo que se refiere al tiempo de incubación con peróxido y a la concentración de peróxido utilizada (*Figura 11*). La inhibición aumentó con el tiempo de exposición a H_2O_2 y la inhibición fue más rápida al aumentar la concentración del reactivo químico.

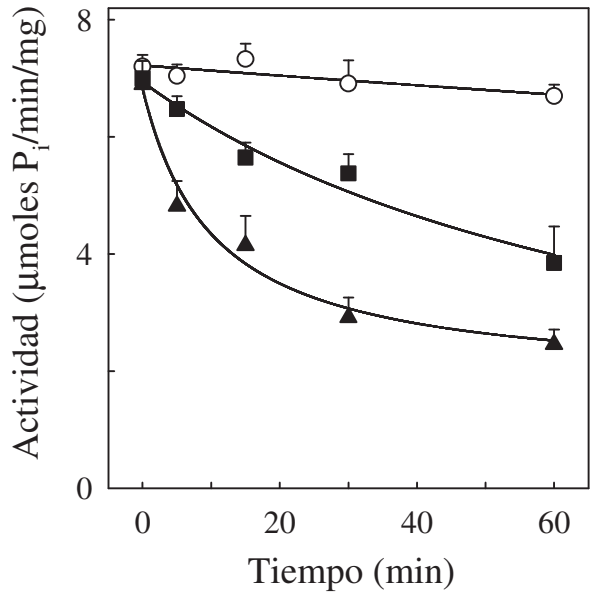

Figura 11. Actividad ATPasa dependiente de Ca^{2+} en vesículas de RS sometidas a distintos tiempos de tratamiento con H_2O_2/catalasa en ausencia de Ca^{2+}. Muestras E_2 conteniendo: Mops 20 mM (pH 7´0), KCl 80 mM, $MgCl_2$ 5 mM, EGTA 0´5 mM, 0´01 mg RS/mL y A23187 0´75 µM se sometieron a tratamiento a 37 ºC por un período de tiempo variable con H_2O_2 5 ó 10 mM. En el ensayo control no se hizo tratamiento con H_2O_2. La actividad ATPasa dependiente de Ca^{2+} en muestras sometidas a distintos tiempos de tratamiento con H_2O_2 se estudió a 37 ºC. Antes de añadir ATP 1 mM, para iniciar la reacción, se añadía $CaCl_2$ 0´551 mM. Actividad de muestras tratadas con H_2O_2 5 mM (■) ó 10 mM (▲). Actividad de muestras no tratadas con H_2O_2 (○)**.**

La proteína Ca^{2+}–ATPasa también puede hidrolizar ATP en ausencia de Ca^{2+} a través de una ruta de reacción distinta (Fernández-Belda y col., 2001; Soler y col., 2002). Es lo que conocemos como actividad ATPasa independiente de Ca^{2+} para

distinguirla de la actividad Ca^{2+}-ATPasa o dependiente de Ca^{2+}. Para conocer el efecto del H_2O_2 sobre la actividad ATPasa independiente de Ca^{2+} se incubaron muestras E_2 con H_2O_2 1 ó 5 mM. El tratamiento se realizó a 37 ºC y se prolongó durante un período de tiempo variable con objeto de examinar la cinética del efecto. Las muestras tratadas se utilizaron posteriormente para medir la hidrólisis de ATP a 37 ºC y en ausencia de Ca^{2+}. La reacción se inició añadiendo ATP 1 mM. La actividad ATPasa independiente de Ca^{2+} aumentó respecto a la actividad de muestras no tratadas con H_2O_2. El efecto activador fue dependiente del tiempo de exposición y de la concentración de peróxido (*Figura 12*).

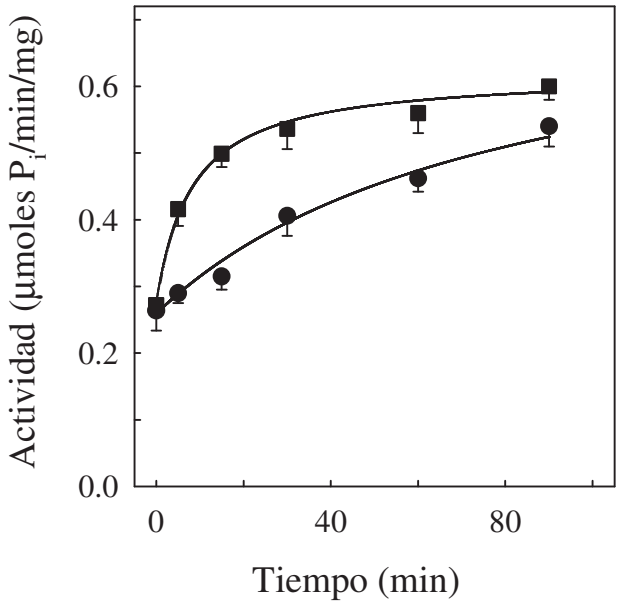

Figura 12. Actividad ATPasa independiente de Ca^{2+} en vesículas de RS sometidas a distintos tiempos de tratamiento con H_2O_2/catalasa en ausencia de Ca^{2+}. Muestras E_2 compuestas por: Mops 20 mM (pH 7´0), KCl 80 mM, $MgCl_2$ 5 mM, EGTA 0´5 mM, 0´1 mg RS/mL y equilibradas a 37 ºC se sometieron a distintos tiempos de tratamiento con H_2O_2 1 ó 5 mM. La hidrólisis de ATP se estudió a 37 ºC después de añadir ATP 1 mM. Actividad en presencia de H_2O_2 1 mM (●) ó 5 mM (■).

El aumento respecto al tiempo fue más lento al usar H_2O_2 1 mM que cuando se utilizó H_2O_2 5 mM. También se observa que el nivel máximo de activación tiende a ser

el mismo. Como referencia podemos ver que a los 90 min de incubación se produce una activación de ~ 2 veces con respecto al control (t = 0) cuando se utilizó H_2O_2 1 mM mientras que la activación fue de ~ 2´2 veces cuando se utilizó H_2O_2 5 mM.

Reacciones parciales del ciclo de reacción

La unión de Ca^{2+} a la conformación E_2 es una etapa clave en el ciclo catalítico y de transporte de la Ca^{2+}-ATPasa. Para evaluar el efecto del H_2O_2 sobre la unión de Ca^{2+} se incubaron muestras E_2 con H_2O_2. Las concentraciones de H_2O_2 utilizadas en este ensayo fueron 2 y 20 mM que según los resultados anteriores son las concentraciones que producen respectivamente un alto grado de desacoplamiento o de inhibición de la actividad enzimática. El tratamiento se realizó a 37 ºC durante 1 h. La unión de Ca^{2+} a la conformación E_2 se determinó añadiendo un determinado volumen de medio que contenía $^{45}Ca^{2+}$ para conseguir una determinada concentración de $^{45}Ca^{2+}$ libre (pCa 7´0-5´2). La inclusión de [^{3}H]glucosa en el medio permitió valorar el $^{45}Ca^{2+}$ inespecífico retenido por el filtro para así determinar el $^{45}Ca^{2+}$ específico unido a la enzima. La concentración de RS fue 0´4 mg/mL. Al representar el nivel de Ca^{2+} unido a la enzima no tratada con H_2O_2 respecto a la concentración de Ca^{2+} libre en el medio —expresada como pCa— se observa una dependencia sigmoidal (*Figura 13*). El nivel máximo de unión es de ~ 8 nmoles Ca^{2+}/mg de proteína y la constante aparente de disociación que informa de su afinidad es de ~ 0´36 μM. El tratamiento de muestras E_2 con H_2O_2 2 mM apenas afecta al nivel máximo de unión de Ca^{2+} y a la afinidad de la unión. Sin embargo, el efecto es claro cuando se utiliza H_2O_2 20 mM. El tratamiento con H_2O_2 20 mM afecta fundamentalmente al nivel máximo de unión que alcanza un valor de ~ 4´7 nmoles Ca^{2+}/mg de proteína .

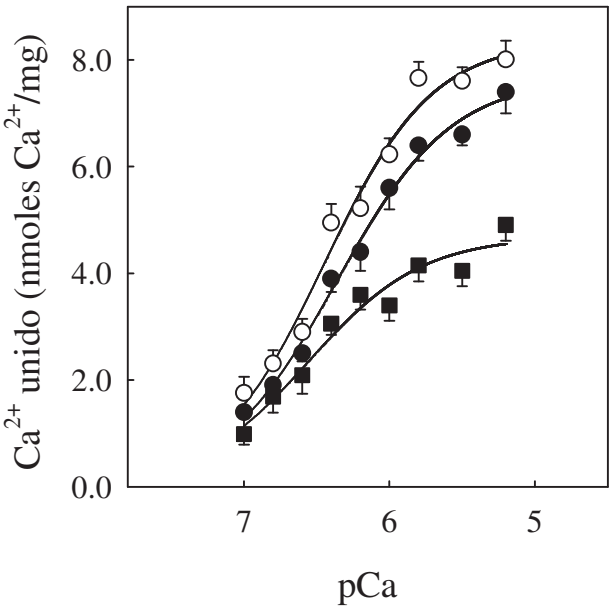

Figura 13. Unión de Ca^{2+} a la enzima después de tratar vesículas de RS con H_2O_2/catalasa. Muestras E_2 compuestas por: Mops 20 mM (pH 7´0), KCl 80 mM, $MgCl_2$ 1 mM, EGTA 100 µM y 0´4 mg RS/mL se sometieron a tratamiento a 37 ºC durante 1 h con H_2O_2. En el ensayo control no se realizó tratamiento con H_2O_2. La unión de Ca^{2+} se determinó añadiendo un determinado volumen de disolución compuesto por: Mops 20 mM (pH 7´0), KCl 80 mM, $MgCl_2$ 1 mM, EGTA 100 µM, $^{45}CaCl_2$ 3 mM (~ 8.000 cpm/nmol) y [^{3}H]glucosa 1 mM (~ 12.000 cpm/nmol) para conseguir una determinada concentración de Ca^{2+} libre (pCa 7´0–5´2). Las muestras se incubaron durante 5 min a 25 ºC. Alícuotas de 0´5 mL se filtraron para determinar el $^{45}Ca^{2+}$ total y el $^{45}Ca^{2+}$ inespecífico que son retenidos en cada filtro. Muestras tratadas con H_2O_2 2 mM (●) ó 20 mM (■). Muestras no tratadas con H_2O_2 (○).

El nivel de acumulación de EP en estado estacionario es un parámetro importante del ciclo de reacción de la Ca^{2+}-ATPasa. Se produce tras la unión de Ca^{2+} y es consecuencia de la unión de ATP y la consiguiente fosforilación de la enzima. La acumulación del intermedio es transitoria siendo una etapa previa a la liberación del P_i (Froehlich y Taylor, 1975). Si se utiliza [γ-^{32}P]ATP como sustrato se puede seguir la evolución del EP puesto que será radiactivo. Para valorar el posible efecto del H_2O_2 sobre el nivel de EP se trataron muestras E_1Ca_2 con diferentes concentraciones de H_2O_2

a 37 ºC durante 1 h. La capacidad de las muestras para acumular EP se evaluó fosforilando con [γ-^{32}P]ATP 50 µM durante 5 s. Estos experimentos se realizaron en un baño de agua-hielo para hacer más lenta la descomposición del EP y facilitar así su acumulación. La reacción de fosforilación se detuvo añadiendo un medio ácido que se mantenía en frío. El nivel de EP en muestras no tratadas alcanzó un valor de ~ 4´15 nmoles/mg de proteína (*Figura 14*). El tratamiento con H_2O_2 produjo un efecto inhibidor moderado que fue dependiente de la concentración de reactivo. El nivel máximo de EP fue de ~ 2´9 nmoles EP/mg de proteína al utilizar H_2O_2 20 mM.

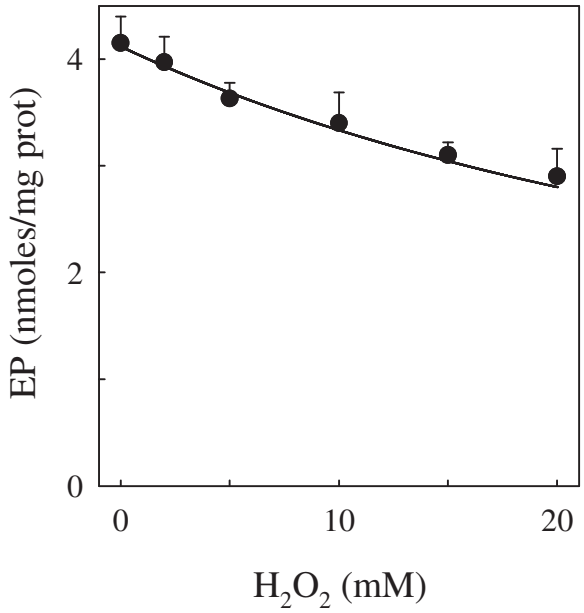

Figura 14. Niveles de EP en vesículas de RS tratadas con H_2O_2/catalasa. Muestras E_1Ca_2 compuestas por: Mops 20 mM (pH 7´0), KCl 80 mM, $MgCl_2$ 5 mM, EGTA 0´5 mM, $CaCl_2$ 0´551 mM (pCa = 4´3) y 0´2 mg RS/mL se trataron a 37 ºC durante 1 h con una determinada concentración de H_2O_2. La acumulación de EP se estudió con las muestras (0´5 mL) sumergidas en un baño de agua-hielo. El inicio de la reacción se produjo añadiendo 12´5 µL de un medio radiactivo formado por: Mops 20 mM (pH 7´0), KCl 80 mM, $MgCl_2$ 5 mM, EGTA 0´5 mM, $CaCl_2$ 0´551 mM (pCa = 4´3) y [γ-^{32}P]ATP 2 mM (~ 20.000 cpm/nmol) y que también se encontraba frío. La concentración final de ATP radiactivo fue 50 µM. La reacción de fosforilación se detuvo a los 5 s añadiendo 5 mL de disolución fría compuesta por: ácido perclórico 125 mM y fosfato sódico 2 mM. El contenido de cada tubo se incubó en un baño de hielo durante 5 min antes de filtrarlo. El filtro se lavó abundantemente con el medio ácido antes de determinar el ^{32}P retenido en cada filtro.

La descomposición de EP es un proceso cinético relacionado con la velocidad de reacción que también fue objeto de estudio para valorar el efecto del H_2O_2. La descomposición de EP se estudió en un baño de agua-hielo realizando primero el marcaje radiactivo del EP al añadir [γ-^{32}P]ATP 50 µM. El marcaje se terminó a los 5 s diluyendo 20 veces con un medio de reacción similar al de marcaje pero que contenía ATP no radiactivo 50 µM. La cinética de descomposición del EP se estudió deteniendo la reacción a distintos tiempos añadiendo un medio con ácido fuerte.

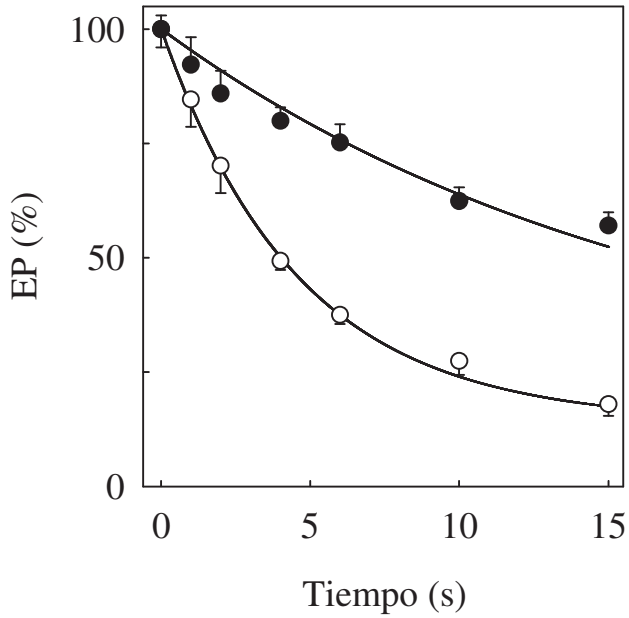

Figura 15. Cinética de descomposición de EP en vesículas de RS tratadas con H_2O_2/catalasa. Muestras E_1Ca_2 compuestas por: Mops 20 mM (pH 7´0), KCl 80 mM, $MgCl_2$ 5 mM, EGTA 0´5 mM, $CaCl_2$ 0´551 mM y 0´4 mg RS/mL se trataron a 37 ºC durante 1 h con H_2O_2 20 mM. En el ensayo control no se hizo tratamiento con H_2O_2. El marcaje radiactivo del EP en cada muestra (0´25 mL) se inició añadiendo 6´25 µL de un medio compuesto por: Mops 20 mM (pH 7´0), KCl 80 mM, $MgCl_2$ 5 mM, EGTA 0´5 mM, $CaCl_2$ 0´551 mM y [γ-^{32}P]ATP 2 mM (20.000 cpm/nmol) (la concentración final de [γ-^{32}P]ATP fue 50 µM). El marcaje terminó a los 5 s diluyendo con 4´75 mL de un medio similar al de marcaje pero con ATP no radiactivo 50 µM. A partir de ese momento (tiempo cero de la cinética de descomposición) la reacción se detuvo a distintos tiempos añadiendo 2 mL de un medio compuesto por: ácido perclórico 440 mM y fosfato sódico 7 mM. Las muestras desnaturalizadas se incubaron en un baño de hielo durante 5 min antes de procesarlas para determinar el ^{32}P retenido en cada filtro. Muestras tratadas con H_2O_2 20 mM (●) y muestras no tratadas con H_2O_2 (○).

La cinética de descomposición de EP en muestras no tratadas es relativamente lenta —en las condiciones en que se mide— pudiendo calcularse una constante aparente de velocidad para el proceso de ~ 0´2 s^{-1} (*Figura 15*). El tratamiento de muestras E_1Ca_2 a 37 ºC durante 1 h con H_2O_2 20 mM produjo una disminución en la velocidad de descomposición de EP. La concentración de H_2O_2 utilizada produce una inhibición casi total de la actividad Ca^{2+}-ATPasa. La constante aparente de velocidad en las muestras tratadas fue de ~ 0´04 s^{-1}. Esto significa que el tratamiento con H_2O_2 20 mM ralentiza ~ 5 veces la descomposición de EP. Los datos experimentales se presentan en una escala relativa para facilitar la comparación de las muestras tratadas y no tratadas.

Efecto sobre cisteínas

Otro de los objetivos fue estudiar el daño oxidativo del H_2O_2 sobre la proteína Ca^{2+}-ATPasa valorando el número de cisteínas que permanecían intactas después del tratamiento. La reacción de muestras no tratadas con H_2O_2 confirmó la existencia de 25 cisteínas por molécula de Ca^{2+}-ATPasa (Murphy, 1976). La valoración de grupos SH se realizó en presencia de detergente utilizando el reactivo DTNB. Cuando muestras E_1Ca_2 se sometieron a tratamiento con H_2O_2 durante 1 h y a 37 ºC se produjo un descenso en los grupos SH valorables. El efecto observado es dependiente de la concentración de H_2O_2.

Los resultados indican que el número máximo de grupos SH que se alteran por el tratamiento con H_2O_2 es de ~ 10 (*Figura 16*).

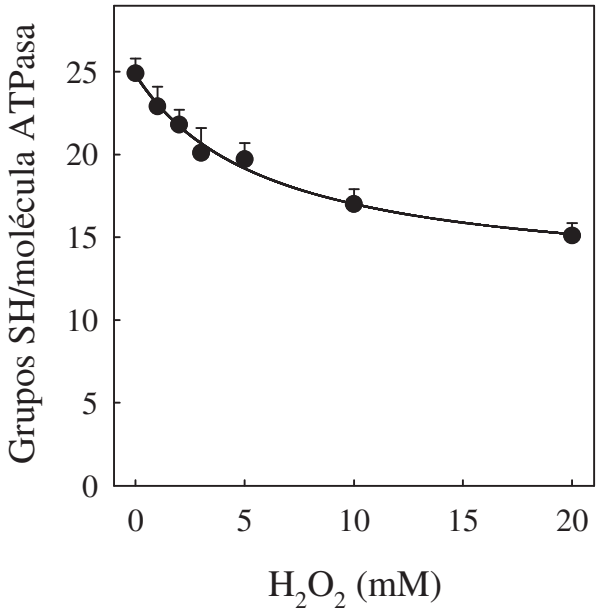

Figura 16. Efecto del tratamiento de vesículas de RS con H_2O_2/catalasa sobre la valoración de grupos SH. Muestras E_1Ca_2 compuestas por: Mops 20 mM (pH 7´0), KCl 80 mM, $MgCl_2$ 5 mM, EGTA 0´5 mM, $CaCl_2$ 0´551 mM (pCa = 4´3) y 0´4 mg RS/mL se sometieron a tratamiento a 37 ºC durante 1 h con diferentes concentraciones de H_2O_2. El medio de incubación de las muestras se sustituyó mediante columnas de Sephadex G-50 antes de hacer la determinación de grupos SH. La determinación se realizó a 25 ºC en un medio compuesto por: Tris-HCl 0´1 M (pH 7´8), SDS 1´6 mg/mL, 0´2 mg RS/mL y DTNB 4 mM.