

Departamento de Fisiología y Bioquímica  
Facultad de Ciencias  
Universidad de Navarra  
Pamplona (España)

## Papel de la ATPasa activable por $Mg^{++}$ , en el sistema enzimático ATPásico dependiente de $Na^+$ y $K^+$ del intestino delgado de rata <sup>1</sup>

por

J. M.ª Ribó<sup>2</sup> y F. Ponz

(Recibido para publicar el 1 de junio de 1969)

TAYLOR (17) detectó en intestino delgado de cobayo el sistema enzimático ATPásico <sup>3</sup> dependiente de  $Na^+$  y  $K^+$ , en una preparación obtenida según el método de MILLER y CRANE (13) para la obtención de material membranoso del borde en cepillo de las células epiteliales de intestino de hamster. BERG y CHAPMAN (1) estudiaron la distribución de la ATPasa dependiente de  $Na^+$  y  $K^+$  en las células

epiteliales del intestino delgado de rata y BERG y SZEKERCZES (2) han comparado dicho sistema enzimático con la ATPasa dependiente de  $Na^+$  y  $K^+$  procedente de eritrocitos.

En el estado actual de conocimiento del sistema ATPásico dependiente de  $Na^+$  y  $K^+$  debe decidirse si las diferentes actividades en que se puede descomponer el sistema (acilfosfatasa activable por  $K^+$ ; ATP-ADP transfosforilasa, etc.) corresponden a distintas conformaciones de un material único, o si son enzimas distintas íntimamente asociadas. Como primer paso debe aclararse el papel que juega la ATPasa activable por  $Mg^{++}$  sólo, en cada sistema determinado.

El objeto de este trabajo es el de comprobar si en una preparación de material membranoso de células intestinales, el sistema enzimático ATPásico dependiente de  $Na^+$  y  $K^+$  se comporta como un sistema único, y el papel que juega la actividad residual ATPásica en presencia de sólo  $Mg^{++}$  en dicho sistema.

<sup>1</sup> Este trabajo forma parte de la Tesis Doctoral del doctor J. M. RIBÓ, en la Facultad de Ciencias de la Universidad de Barcelona.

<sup>2</sup> Dirección actual: Departamento de Química Orgánica. Facultad de Ciencias. Universidad de Barcelona (España).

<sup>3</sup> Lista de abreviaturas:

ADP: adenosindifosfato; AMP: adenosinmonofosfato; ATP: adenosintrifosfato; Pi: fósforo inorgánico; PBGH: hidrocloreuro de prednisona-bisguanidilhidrazona; PLBGH: hidrocloreuro de prednisolona-bisguanidilhidrazona; TRIS: Tris-(hidroximetil)aminometano.

### Material y métodos

**PREPARACIÓN ENZIMÁTICA.** Mucosa separada del intestino delgado de rata era homogenada y tratada basándose en el método de MILLER y CRANE (13), según el procedimiento descrito por BERG y CHAPMAN (1); la fracción considerada en este trabajo ha sido la obtenida por estos autores a  $10.800 \times g$ , que denominaron «Miller and Crane coarse fraction». Dicha fracción se suspendía en sacarosa 0,25 M a pH 7,0 con Tris-HCl 10 mM, en volumen doble del peso inicial de mucosa. Esta suspensión se guardaba en refrigerador a  $-15^{\circ} C$ . El tiempo de conservación de estos preparados en frío ha estado siempre comprendido entre 1 y 5 días.

Para los experimentos, este material se descongelaba durante una hora a  $4^{\circ} C$ , dejándolo después 15 minutos a temperatura ambiente y utilizándose a continuación.

**DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD.** Se adicionaba 0,1 ml de la preparación enzimática a tubos de ensayo que contenían 2 ml de solución 5 mM  $Cl_2Mg$ , 160 mM NaCl, 15 mM KCl, 200 mM tampón Tris-HCl a pH 7,4 y 2,5 mM ATP sal Tris (Sigma). Los tubos se mantenían 10 minutos en un baño a  $37^{\circ} C$  antes de la adición de la preparación enzimática, y se verificaba la reacción a esta temperatura. La reacción se paraba por adición de 1 ml de ácido tricloroacético al 25 %. Salvo en los experimentos en que se estudiaba el curso de la reacción a lo largo del tiempo, el tiempo de reacción ha sido de 10 minutos. Separadas las proteínas precipitadas por centrifugación, se determinaba en una parte del sobrenadante el Pi liberado, por el método de FISKE-SUBBAROW (6). El nitrógeno de la preparación enzimática se determinó por el método del micro-Kjeldahl.

En las pruebas donde intervenían inhibidores, éstos se disolvían en el tampón

Tris-HCl, de modo que la concentración para los 2 ml finales fuera la deseada; este método de ensayo de inhibición se denominó «sin incubación previa».

También se determinaron inhibiciones «con incubación previa»: los inhibidores se disolvieron en sacarosa 0,25 M, tampón Tris-HCl 10 mM a pH 7,0 y la solución se mezcló con igual volumen de preparación enzimática una vez descongelada a  $4^{\circ} C$  durante 45 minutos; esta mezcla se dejó 30 minutos más a  $4^{\circ} C$  y finalmente a temperatura ambiente durante otros 15 minutos. Para que la cantidad de enzima fuera comparable con la usada en los otros experimentos se tomaron 0,2 ml de la mezcla de inhibidor con preparación enzimática.

**EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS.** Las actividades se expresaron generalmente en  $\mu M$  Pi hidrolizado por ml.

Como %, se entienden los % de ATP hidrolizado con respecto al inicial.

En los experimentos en presencia de inhibidores se consideró: % T, como los % de actividad respecto al Pi total hidrolizado en presencia de  $Mg^{++}$ ,  $Na^+$  y  $K^+$  o en presencia de solo  $Mg^{++}$ ; y % D como los % de actividad con respecto a las diferencias de actividad (expresadas en Pi hidrolizado) entre  $Mg^{++}$ ,  $Na^+$ ,  $K^+$  y sólo  $Mg^{++}$ .

Se definió como actividad específica, los  $\mu M$  de Pi hidrolizados por mg de N y por minuto.

### Resultados

El  $\beta$ -glicerofosfato, en las mismas condiciones que el ATP, no fue hidrolizado. La preparación enzimática carecía prácticamente de actividad ATPásica en ausencia de iones metálicos.

El mejor método encontrado para la conservación de los preparados enzimáticos fue la resuspensión en sacarosa 0,25 M a pH 7,0 y su almacenamiento a  $-15^{\circ} C$ , si estos preparados se utilizaban entre las

24 horas y los 15 días a partir de su obtención.

Las actividades específicas de los preparados enzimáticos en presencia de  $Mg^{++}$ ,  $Na^+$  y  $K^+$  oscilaron entre 0,48 y 0,90  $\mu M$  Pi/mg N/minuto, y las relaciones de actividad con respecto a las detectadas en presencia de sólo  $Mg^{++}$  oscilaron entre 1,2 y 1,7.

En la figura 1 se representa el curso de la reacción ATPásica a lo largo del tiempo en presencia de diferentes iones, con curvas típicas salvo la inflexión que se observa en la curva con sólo  $Mg^{++}$ . La relación de actividades con  $Mg^{++}$ ,  $Na^+$ ,  $K^+$  y con sólo  $Mg^{++}$  varía mucho con el tiempo de reacción, y para un determinado preparado alcanza un máximo entre los 10 y 25 minutos, coincidiendo con el transitorio aplanamiento de la curva con  $Mg^{++}$  sólo. Después de los 30 minutos y hasta

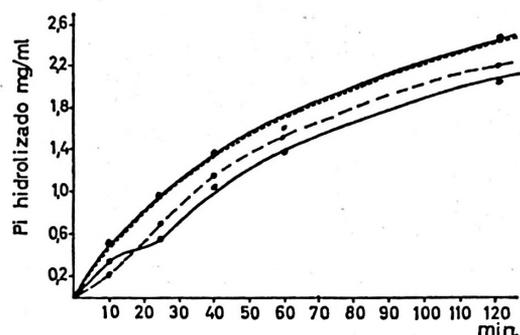


FIG. 1 Curso de la hidrólisis de ATP a lo largo del tiempo, en presencia de diferentes cationes (-----  $Mg^{++}$ ,  $Na^+$ ,  $K^+$ ; —  $Mg^{++}$ ; ----  $Ca^{++}$ ,  $Mg^{++}$ ,  $Na^+$ ,  $K^+$ ).

tiempos de 2 horas, las tres curvas siguen muy sensiblemente paralelas. Con tiempos largos, la cantidad de Pi liberado llega a ser superior al que podría separarse de un

TABLA I

Actividad ATPásica en diferentes tiempos de reacción, en presencia y ausencia de  $Ca^{++}$  5 mM

Ensayo	Tiempo de reacción (minutos)	Iones presentes											
		$Mg^{++}$		$Mg^{++}$ , $Na^+$ , $K^+$		$Ca^{++}$ , $Mg^{++}$ , $Na^+$ , $K^+$		$Ca^{++}$ , $Mg^{++}$		$Ca^{++}$ , $Na^+$ , $K^+$		$Ca^{++}$	
		% ATP hidrl.	Actv. espec.	% ATP hidrl.	Actv. espec.	% ATP hidrl.	Actv. espec.	% ATP hidrl.	Actv. espec.	% ATP hidrl.	Actv. espec.	% ATP hidrl.	Actv. espec.
1	1	6	1,15	6	1,15	6	1,15						
	4	19	0,87	23	1,07	14	0,66						
	10	36	0,67	42	0,92	32	0,59						
	15	46	0,58	55	0,69	42	0,55						
	25	57	0,43	81	0,61								
2	15	32	0,43	39	0,53	22	0,29	27	0,31			29	0,39
	25	34	0,28	56	0,46	42	0,34	34	0,28			44	0,39
	60	81	0,27	105	0,35	88	0,29	81	0,27			89	0,30
3	10	22	0,51	32	0,75	14	0,33	20	0,46	21	0,49	21	0,49
	25	34	0,31	59	0,54	44	0,40	44	0,41	49	0,45	46	0,43
	40	65	0,38	86	0,49	73	0,42	61	0,35	70	0,40	68	0,39
	60	86	0,33	99	0,38	94	0,36	91	0,35	89	0,34	75	0,29
	120	129	0,25	155	0,30	135	0,26	141	0,27	129	0,25	144	0,28
4	10	36	0,67	52	0,97	30	0,55	25	0,47	31	0,58	29	0,54
	40	79	0,37	101	0,47	70	0,33	70	0,33	73	0,34	60	0,28
	132	153	0,22	163	0,23	153	0,22	140	0,20	149	0,21	137	0,20

TABLE II  
Acción del Ca<sup>++</sup> a distintas concentraciones,  
sobre la actividad ATPásica dependiente  
de Na<sup>+</sup> y K<sup>+</sup>

Iones metálicos presentes	Actividad específica			Media
	Ensayo a	Ensayo b	Ensayo c	
Mg <sup>++</sup>	0,50	0,50	0,54	0,51
Mg <sup>++</sup> , Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup>	1,01	0,99	1,15	1,05
Mg <sup>++</sup> , Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> + 0,2 mM Ca <sup>++</sup>	0,93	0,93	—	0,93
+ 1,0 mM Ca <sup>++</sup>	0,77	0,71	0,75	0,74
+ 2,0 mM Ca <sup>++</sup>	0,68	0,75	0,75	0,73
+ 2,5 mM Ca <sup>++</sup>	0,62	0,71	0,70	0,68
+ 3,0 mM Ca <sup>++</sup>	0,59	0,59	0,71	0,63
+ 3,5 mM Ca <sup>++</sup>	—	0,55	0,55	0,55
+ 4,0 mM Ca <sup>++</sup>	0,59	0,59	0,61	0,60
+ 5,0 mM Ca <sup>++</sup>	0,54	0,46	0,49	0,50

Tiempo de reacción, 10 minutos.

solo grupo fosfato del ATP inicial, por lo que la hidrólisis ha de ser más profunda.

El Ca<sup>++</sup> muestra una evidente acción sobre la actividad ATPásica. Durante los primeros 15-20 minutos, la presencia de Ca<sup>++</sup> hace descender la actividad con Mg<sup>++</sup>, Na<sup>+</sup> y K<sup>+</sup> a valores todavía más bajos o poco diferentes de los correspondientes a la actividad con sólo Mg<sup>++</sup>. Más allá de los 30 minutos, la liberación de Pi es ya independiente de los cationes presentes.

En la tabla I se reúnen los datos de una serie de experimentos con distintos cationes en presencia o no de Ca<sup>++</sup> 5 mM. Los resultados con Mg<sup>++</sup>; con Mg<sup>++</sup>, Na<sup>+</sup> y K<sup>+</sup>; y con Mg<sup>++</sup>, Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> y Ca<sup>++</sup> son bien reproducibles. En cambio, las actividades en presencia de Ca<sup>++</sup>, de Ca<sup>++</sup> y Mg<sup>++</sup>, y de Ca<sup>++</sup>, Na<sup>+</sup> y K<sup>+</sup> no son bien reproducibles y no permiten comparación entre sí ni con las otras. El efecto de con-

TABLE III  
Actividad ATPásica en presencia de Mg<sup>++</sup> y de Mg<sup>++</sup>, Na<sup>+</sup>, y K<sup>+</sup> según la  
concentración de ATP

Ensayo	Concentración ATP (mM)											
	1,00		1,25		1,67		2,50		5,00		10,00	
	Mg <sup>++</sup>	Mg <sup>++</sup> Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup>	Mg <sup>++</sup>	Mg <sup>++</sup> Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup>	Mg <sup>++</sup>	Mg <sup>++</sup> Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup>	Mg <sup>++</sup>	Mg <sup>++</sup> Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup>	Mg <sup>++</sup>	Mg <sup>++</sup> Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup>	Mg <sup>++</sup>	Mg <sup>++</sup> Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup>
a	—	—	0,34	0,55	—	—	0,53	0,69	—	—	—	—
b	—	—	0,36	0,54	—	—	0,46	0,69	—	—	—	—
c	—	—	0,38	0,47	—	—	0,39	0,67	—	—	—	—
d	—	—	0,15	0,46	0,17	0,45	0,48	0,67	0,47	0,73	—	—
e	0,14	0,32	—	—	—	—	0,63	0,95	0,81	0,99	0,63	0,99
f	0,42	0,86	0,54	0,96	0,68	1,04	0,78	1,05	—	—	—	—
g	0,53	0,81	—	—	—	—	0,81	—	—	—	0,99	1,40
h	0,13	0,36	0,15	0,46	0,17	0,45	0,19	0,75	0,34	0,73	—	—
i	0,28	0,38	0,33	0,43	0,32	0,39	0,31	0,46	0,42	0,76	—	—
j	0,29	0,40	0,33	0,44	0,32	0,39	0,31	0,47	0,43	0,77	—	—
k	0,23	0,38	0,33	0,43	0,34	0,59	0,39	0,54	0,56	0,73	—	—
l	0,23	0,39	0,28	0,44	0,30	0,53	0,21	0,46	0,44	0,78	—	—
m	0,35	0,59	0,51	0,66	0,53	0,91	0,61	0,84	0,87	1,13	—	—
n	—	—	—	—	—	—	—	0,98	—	1,20	—	—
o	—	—	—	—	—	—	0,57	0,90	0,78	1,11	—	—

Tiempo de reacción, 10 minutos.

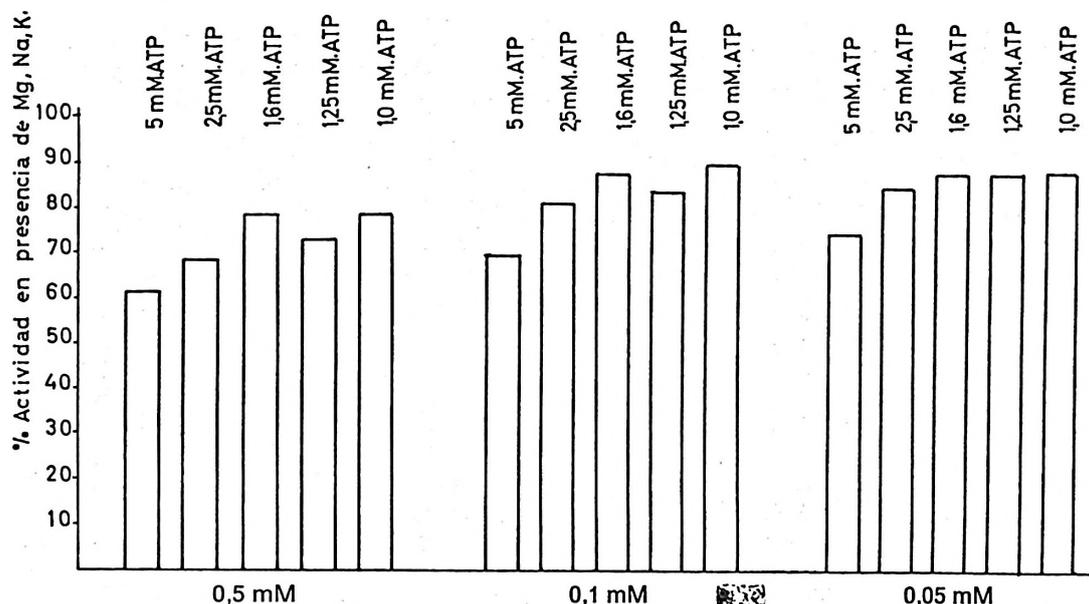


FIG. 2. Inhibición de la ATPasa por la ouabaina (0,5, 0,1 y 0,05 mM) «sin incubación previa», con distintas concentraciones de ATP. Actividad en ausencia de ouabaina = 100.

centraciones crecientes de  $\text{Ca}^{++}$  entre 0,2 y 5 mM, con tiempos de reacción de 10 minutos (tabla II), es la de inhibir progresivamente la actividad dependiente de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$ .

La influencia de la concentración de ATP se revela en la tabla III. El ATP hidrolizado en 10 minutos aumenta con la concentración inicial del sustrato, tanto en presencia de  $\text{Mg}^{++}$ ,  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  como con sólo  $\text{Mg}^{++}$ .

La ouabaina, adicionada al medio de reacción sin incubación previa, carece de efecto, como es bien conocido, sobre la actividad ATPásica con sólo  $\text{Mg}^{++}$ . En cambio, muestra una clara inhibición de la actividad dependiente de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  (fig. 2). La inhibición aumenta algo con la concentración de ATP y es de cerca del 40% con ouabaina 0,5 mM y ATP 5 mM.

La inhibición por la ouabaina se hace bastante mayor si la preparación enzimática es incubada con el glucósido desde un tiempo antes a que se inicie la reacción. En la figura 3 se aprecia este efecto de la

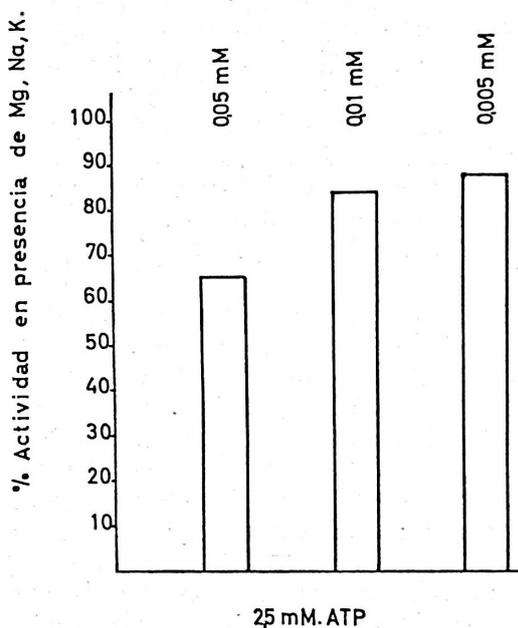


FIG. 3. Inhibición de la ATPasa por la ouabaina a distintas concentraciones «con incubación previa» y ATP 2,5 mM.

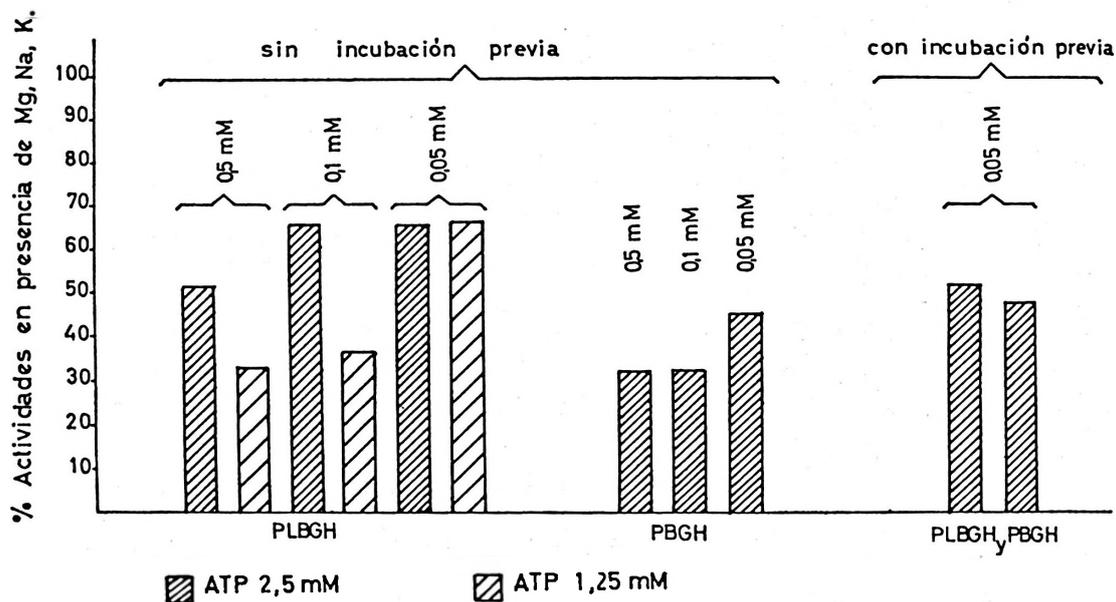


FIG. 4. Acción del PLBGH y PBGH sobre la actividad ATPásica en presencia de  $Mg^{++}$ ,  $Na^+$  y  $K^+$ . Actividad en ausencia de inhibidores = 100.

ouabaína *con incubación previa*, sobre la actividad ATPasa dependiente de  $Na^+$  y  $K^+$  frente a ATP 2,5 mM, con inhibiciones de un orden de magnitud diez veces superior al correspondiente sin *previa incubación*. Con estas condiciones de *preincubación*, la actividad con sólo  $Mg^{++}$  o no se modifica o incluso parece ligeramente estimulada por la ouabaína.

La acción de los derivados sintéticos de la prednisona y prednisolona, PBGH y PLBGH, se muestra en la figura 4. La actividad con sólo  $Mg^{++}$  no se inhibe por *incubación directa*, pero aparece inhibición si se somete el preparado a *previa incubación*. Las actividades con  $Mg^{++}$ ,  $Na^+$  y  $K^+$  resultan inhibidas fuertemente por estos productos, con diferencias escasas según se haya hecho el experimento con o sin *incubación previa*.

La azida sódica (tabla IV, fig. 5), por el método de *incubación previa*, ejerce también una clara inhibición de la actividad ATPasa. Esta inhibición se produce en un grado similar en presencia de los

tres cationes o cuando sólo hay  $Mg^{++}$ , y es bastante inferior a la que ejercen los otros inhibidores ensayados.

### Discusión

El examen del curso de la reacción en función del tiempo, con la notable inflexión que aparece en la curva de actividad en presencia de sólo  $Mg^{++}$ , hace pensar en que esta actividad, en el tiempo correspondiente a la zona plana de la gráfica (a los 15 minutos aproximadamente), se encuentra prácticamente agotada. El hecho de que el Pi liberado en tiempo suficientemente largo llegue a ser mayor que todo el que corresponde a la transformación de ATP en ADP, obliga a admitir una actividad fosfatásica sobre el ADP producido, que es probablemente responsable de la marcha paralela de las gráficas de hidrólisis más allá de los primeros 30 minutos.

Aun durante los primeros 20 ó 30 minutos, la relación de actividades según

TABLA IV  
Acción de la azida sódica sobre la ATPasa, con incubación previa

Ensayo	Iones presentes	Concentración azida sódica								
		1,0 mM			0,5 mM			0,1 mM		
		% T	% D	PI Hidr. (dif.)	% T	% D	PI Hidr. (dif.)	% T	% D	PI Hidr. (dif.)
17	Mg <sup>++</sup> Mg <sup>++</sup> , Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup>				5		0,02			
					85	46	0,08			
18	Mg <sup>++</sup> Mg <sup>++</sup> , Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup>				77		0,09			
					82	-64	0,08	84	-49	0,07
20	Mg <sup>++</sup> Mg <sup>++</sup> , Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup>	54		0,16	82		0,06	74		0,09
		65	12	0,25	73	32	0,16	76	40	0,14
21	Mg <sup>++</sup> Mg <sup>++</sup> , Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup>	59		0,10	67		0,08			
		62	0	0,15	76	33	0,10	78	43	0,09
22	Mg <sup>++</sup> Mg <sup>++</sup> , Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup>	49		0,19	86		0,06			
		76	17	0,12	80	31	0,10	94	80	0,03
23	Mg <sup>++</sup> Mg <sup>++</sup> , Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup>				75		0,10			
					70	-39	0,15			

Tiempo de reacción, 10 minutos.

estén presentes los tres iones o sólo el Mg<sup>++</sup>, varía con el tiempo. Parece por ello más adecuado expresar la actividad ATPasa dependiente de Na<sup>+</sup> y K<sup>+</sup> en función del Pi total hidrolizado por los preparados que con respecto a la diferencia con la actividad cuando sólo hay Mg<sup>++</sup>.

Los resultados con Ca<sup>++</sup> revelan que este catión no actúa por destrucción de la actividad dependiente de Na<sup>+</sup> y K<sup>+</sup>. El curso de la reacción con Mg<sup>++</sup>, Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> y Ca<sup>++</sup> es distinto cuantitativa y cualitativamente al que se observa cuando sólo hay Mg<sup>++</sup>. De otra parte, las dificultades de reproducibilidad de los experimentos con sólo Ca<sup>++</sup>, con Ca<sup>++</sup> y Mg<sup>++</sup> o con Ca<sup>++</sup>, Na<sup>+</sup> y K<sup>+</sup>, según los preparados utilizados, puede tener relación con la referencia de WINS y SCHOFFENIELS (19) de diferenciar, en sistemas similares a los nuestros, una ATPasa dependiente de Mg<sup>++</sup> y Ca<sup>++</sup>.

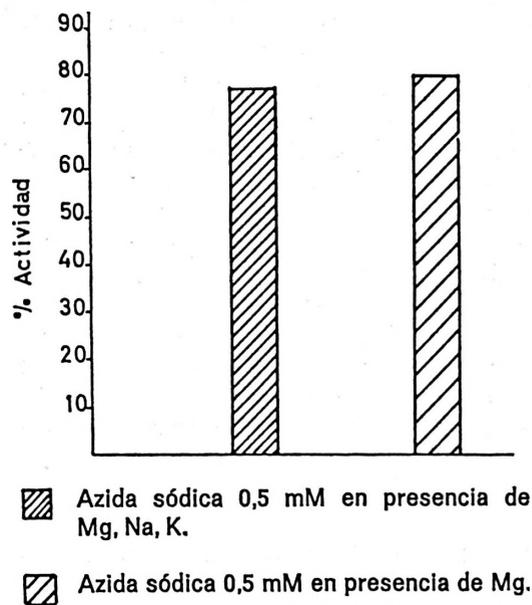


FIG. 5. Acción de la azida sódica «con incubación previa» sobre la actividad ATPásica.

La inhibición progresiva de la actividad ATPásica en presencia de  $Mg^{++}$ ,  $Na^+$  y  $K^+$  por concentraciones crecientes de  $Ca^{++}$ , es un resultado parecido al observado por SOMOGYI (15).

Todos estos resultados en relación con el  $Ca^{++}$  sugieren que la acción de este catión cuando están presentes los otros tres se explican bien por inhibición de la actividad ATPásica dependiente de  $Na^+$  y  $K^+$ , pero que cuando no están simultáneamente presentes el  $Mg^{++}$ ,  $Na^+$  y  $K^+$  la acción del calcio parece ejercerse por otros mecanismos.

En la figura 6 se expresa la relación entre actividad en presencia de  $Mg^{++}$ ,  $Na^+$  y  $K^+$  y concentración de ATP, según el sistema de LINEWEAVER-BURK. Los datos experimentales corresponden a los ensayos *h* a *m* de la tabla III, con tiempos de reacción de 10 minutos y tomando como velocidad de reacción el total de  $Pi$  hidrolizado en ese tiempo en presencia de los tres cationes y no la diferencia respecto de sólo  $Mg^{++}$ . En estas condiciones, la linealidad de la gráfica es excelente.

Este comportamiento abunda en la opinión de que para seguir la cinética correspondiente al sistema ATPásico dependiente de  $Na^+$  y  $K^+$  es preferible relacionarla con el  $Pi$  hidrolizado total.

Resulta interesante el aumento de la acción inhibitoria de la ouabaína conseguido por incubación previa del preparado enzimático con el glucósido. MCILWAIN (11) indicó que la ouabaína podría formar un complejo con grupos acídicos de la membrana, y si la inhibición requiriera un mecanismo de este tipo, es razonable que se facilite por preincubación. La interpretación que KOMETIANI y CAGAN (10), así como ISRAEL y TITUS (8) acerca del efecto de la ouabaína sobre la actividad ATPásica dependiente de  $Na^+$  y  $K^+$  y sobre el transporte activo de  $Na^+$  y  $K^+$  parece compatible con que pueda favorecerse por incubación previa.

El sistema ATPásico dependiente de  $Na^+$  y  $K^+$ , obtenido de mucosa intestinal

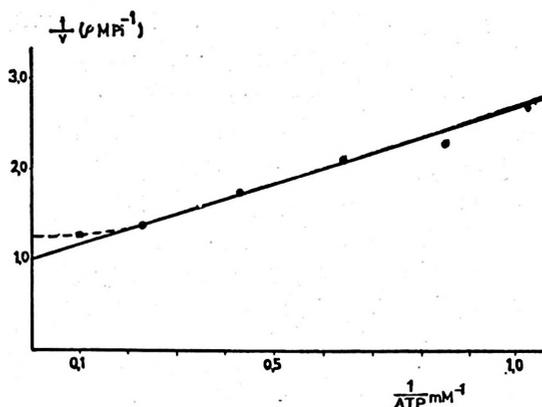


FIG. 6. Actividad ATPásica en presencia de  $Mg^{++}$ ,  $Na^+$ ,  $K^+$ , frente a concentraciones de ATP. Representación de LINEWEAVER-BURK (media de ensayos *h*, *i*, *j*, *l*, *m*, *n*, tabla III).

de rata, es menos sensible a la ouabaína y a otros inhibidores que los obtenidos de otros materiales biológicos. Sin embargo, se alcanzan niveles de inhibición similares cuando la ouabaína ha podido actuar sobre el preparado durante la incubación previa a iniciar la reacción. Puede tener este hecho relación con la menor sensibilidad al glucósido que se aprecia en el transporte activo de  $Na^+$  por el intestino delgado de rata.

Al comparar la acción inhibitoria de los tres cardiotónicos ensayados, lo mismo en experimentos con incubación previa que cuando se adicionan directamente, se establece una serie de potencia decreciente en el sentido  $PBGH > PLBGH > Ouabaína$ . En preparaciones de ATPasa- $Na^+$ ,  $K^+$  de miocardio de cobayo (4) se había observado ya la acción inhibitoria de estos productos. También se habían encontrado diferencias de sensibilidad según la especie animal y según procedan las preparaciones de músculo esquelético y miocardio (3, 5), diferencias que también aparecen en cuanto a su acción cardiotónica (7).

Por lo que se refiere a la azida, no hay duda de que el sistema ATPásico intestinal dependiente de  $Na^+$  y  $K^+$  resulta inhibido con concentraciones del orden de

$10^{-4}$  M y superiores, contrariamente a lo indicado por RENDI y UHR (14) para el procedente de riñón de ternera. También se inhibe la actividad en presencia de sólo  $Mg^{++}$ .

A lo largo del trabajo con inhibidores del sistema ATPásico dependiente de  $Na^+$  y  $K^+$  se ha podido observar que los resultados de distintos experimentos sólo eran bien comparables cuando las velocidades de reacción con o sin el correspondiente agente se expresaban como Pi total liberado en presencia de  $Mg^{++}$ ,  $Na^+$  y  $K^+$  y no como la diferencia entre el Pi liberado cuando están los tres cationes y el que se libera cuando sólo hay  $Mg^{++}$ . A pesar de que haya sido ampliamente aceptada la consideración de que la ATPasa dependiente de sólo  $Mg^{++}$  debía ser un sistema enzimático distinto del dependiente de  $Na^+$  y  $K^+$ , ha sido también frecuente expresar esta última actividad en función del Pi total hidrolizado (9, 12, 16, 18), y últimamente se ha pensado en que la actividad ATPasa residual en presencia de sólo  $Mg^{++}$ , en preparados bastante purificados, pueda ser debida, al menos en parte, al mismo sistema ATPásico que posee mucha más actividad cuando hay también  $Na^+$  y  $K^+$ .

Los resultados expuestos en este trabajo, tanto por lo que se refiere a la marcha de la reacción a lo largo del tiempo, como a las condiciones para la aplicabilidad de la cinética de LINEWEAVER y BURK y para la reproducibilidad de los experimentos con inhibidores, son mucho más conformes con la hipótesis de que la ATPasa residual cuando sólo hay  $Mg^{++}$  corresponda a una diferencia funcional del mismo sistema que opera más efectivamente cuando hay además  $Na^+$  y  $K^+$ .

### Resumen

Se estudia la actividad ATPasa dependiente de  $Na^+$  y  $K^+$  de una fracción de homogenado del tipo Miller y Crane de mucosa de intestino delgado de rata.

Se ha seguido el curso de la reacción a lo largo del tiempo en diversas condiciones, la acción del  $Ca^{++}$  sobre el sistema, la influencia de la concentración ATP y el efecto de la ouabaina y de otros inhibidores.

La relación de actividad con  $Mg^{++}$ ,  $Na^+$  y  $K^+$  a la que hay con sólo  $Mg^{++}$  varía con el tiempo de reacción, con un máximo entre 10 y 25 minutos, para disminuir con tiempos más largos. El  $Ca^{++}$  inhibe la actividad dependiente de  $Na^+$  y  $K^+$ .

La ouabaina inhibe al preparado de mucosa intestinal, aunque menos intensamente que a los de otras procedencias. Pero se alcanzan intensidades inhibitoras similares si el preparado se incubaba previamente con el glucósido. Otros cardiotónicos (PBGH y PLBGH) inhiben aún más que la ouabaina. El sistema es también inhibido por la azida sódica.

Diversos resultados sugieren que la actividad ATPasa residual en presencia de sólo  $Mg^{++}$  sea debida a una simple deficiencia funcional del mismo sistema que opera cuando hay también  $Na^+$  y  $K^+$ .

### Summary

**Role of the Mg-activated ATPase in the Enzymatic ATPase System Depending on  $Na^+$  and  $K^+$  from the Small Intestine of Rat**

The Na-K ATPase activity of a MILLER and CRANE type fraction from mucosa of rat small intestine has been studied. It has been followed under several ionic conditions the course of reaction in the time. The action of  $Ca^{++}$ , the influence of ATP concentration and the effects of ouabaine and other inhibitory agents have been also tested.

The relation of the ATPase activity in the presence of  $Mg^{++}$ ,  $Na^+$ ,  $K^+$  to that a with only  $Mg^{++}$ , changes with the reaction time, showing a maximum between 10 and 25 minutes and decreasing afterwards for a longer time.  $Ca^{++}$  inhibits the depending on Na and K activity.

Ouabaine inhibits the preparation from intestinal mucosa though less than those from other sources. A similar inhibition has been however observed when the preparation is previously incubated with the

glucoside. Other cardiotonic drugs (PBGH and PLBGH) proved to have a higher inhibitory power than ouabaine. The system is also inhibited by sodium azide.

Several results suggest that the ATPase residual activity in the presence of  $Mg^{++}$  could be merely due to a functional deficiency of the same system operating with also  $Na^+$  and  $K^+$  in the medium.

### Bibliografía

1. BERG, G. G. y CHAPMAN, B.: *J. Cell. Comp. Physiol.*, **65**, 361, 1965.
2. BERG, G. G. y SZEKERCZES, J.: *J. Cell Physiol.*, **67**, 487, 1966.
3. DRANSFELD, H., GALETKE, E. y GREEFF, K.: *Arch. Int. Pharmacody. et d. Ther.*, **166**, 342, 1967.
4. DRANSFELD, H. y GREEFF, K.: *Naunyn-Schmiedebergs Arch.*, **249**, 425, 1964.
5. DRANSFELD, H. y GREEFF, K.: *Naunyn-Schmiedebergs Arch.*, **250**, 244, 1965.
6. FISKE, C. H. y SUBBAROW, Y.: *J. Biol. Chem.*, **66**, 375, 1925.
7. GREEFF, K. y SCHLIEPER, E.: *Arch. Int. Pharmacod. Ther.*, **166**, 350, 1967.
8. ISRAEL, Y. y TITUS, E. O.: *Biochim. Biophys. Acta*, **139**, 450, 1967.
9. KANAZAWA, T., SAITO, M. y TONOMURA, Y.: *J. Biochem.*, **61**, 555, 1966.
10. KOMETIANI, Z. y CAGAN, R. H.: *Biochim. Biophys. Acta*, **135**, 1083, 1967.
11. MCILWAIN, H.: In «Chemical Exploration of the brain», Elsevier, 1963.
12. MEDZIHRADSKY, F., KLINE, M. H. y HOKIN, L. E.: *Arch. Biochem. Biophys.*, **121**, 311, 1967.
13. MILLER, D. y CRANE, R. K.: *Biochim Biophys. Acta*, **52**, 293, 1961.
14. RENDI, R. y UHR, M. L.: *Biochim. Biophys. Acta*, **89**, 520, 1964.
15. SOMOGYI, J.: *Hoppe-Seyler's Z. Phys. Chem.*, **336**, 264, 1964.
16. SWANSON, P. D.: *J. Neurochem.*, **13**, 229, 1966.
17. TAYLOR, C.: *Biochim. Biophys. Acta*, **60**, 437, 1962.
18. TANAKA, R. y ABOOD, L. G.: *Arch. Biochem. Biophys.*, **108**, 47, 1964.
19. WINS, P. y SCHOFFENIELS, E.: *Biochim. Biophys. Acta*, **120**, 341, 1966.