

La bomba de sodio*

Breve revisión sobre conceptos generales y cinética enzimática

Dr. Ramón Fabregat**

Resumen: La bomba de sodio (Na, K-ATPasa) es una enzima con peso molecular alrededor de 280,000 daltoms, compuesta por cuatro subunidades, dos denominadas alfa, y dos beta. Se supone que constituye del 10 al 15 por ciento del total de las proteínas de membrana, llegando a existir entre 4700 y 5600 unidades por micrómetro cuadrado en la médula renal. La bomba de sodio mueve al exterior de la célula 3 iones de sodio, por 2 de potasio al interior, con consumo de 1 ATP. Tiene importancia en la clínica por ser el sitio donde actúan directamente los digitálicos.

Introducción

La bomba de sodio, descrita originalmente por Skou en 1957 ha sido desde entonces sujeto de amplios estudios. El autor mencionado, propuso que se trata de una enzima, una ATPasa, que es estimulada a funcionar por Na^+ y K^+ , además de ser la causante del mecanismo de transporte activo de cationes monovalentes a ambos lados de la membrana.

Esta enzima se encuentra en todas las membranas plasmáticas en diferentes concentraciones, dependiendo directamente de la actividad metabólica celular, así como de la necesidad de movilización de cationes a ambos lados de la membrana, por ejemplo, la cantidad de enzima que se encuentra en las membranas celulares de la porción delgada de la rama ascendente del asa de Henle es de 5 a 7 veces mayor que en las células del túbulo

contorneado proximal, sabiendo además que este segmento está involucrado en la regulación hormonal de la reabsorción de sodio.¹ Hay varios autores que proponen que la concentración de la enzima en las membranas plasmáticas, está en relación directa con la demanda de movilización de sodio,²⁻⁷ llegando a sugerir los mismos autores una densidad entre 4700 y 5600 unidades por micrómetro cuadrado, siendo la enzima entre el 10 y el 15 por ciento del total de las proteínas de la membrana,²⁴ con variantes según el órgano y la especie animal estudiados.

Es extraordinariamente difícil la purificación de esta proteína a partir de la membrana celular, por lo que pasó más de una década para que se pudiera aislar y verificar su estructura.

Estructura (ver figura 1)

Hokin y col.⁸ proponen que cada partícula tiene un diámetro de 45 a 55 Å, aunque la medición varía según la técnica empleada.

Según un análisis de la morfología hecho por Jørgensen en 1974, cada molécula de la enzima tiene una longitud a través de la membrana de 70 Å.

Ya para 1966 se corroboró el origen proteico de la bomba de sodio.⁹⁻¹²

El peso molecular aproximado de la enzima activa es alrededor de 280,000 daltons variando notablemente según el autor.

Kyte,¹³ fue el primero en demostrar que la enzima estaba constituida por dos tipos de polipéptidos, uno mayor, actualmente llamado subunidad alfa, con peso molecular alrededor de 100,000 y otro menor, con aproximadamente la mitad de peso, llamado subunidad beta.

El péptido o subunidad alfa contiene los sitios donde actúan la ouabaina y el ATP,

* Revisado por: Dr. Juan C. Díaz Zagoya, Depto. de Bioquímica y Dr. Héctor Brust, Depto. de Fisiología, Fac. de Medicina, UNAM.

** Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, UNAM.

cada uno de ellos en diferente sitio,¹⁴ por lo que también se le llama subunidad catalítica. Se ha comprobado que toda la molécula atraviesa de cara a cara la membrana celular.

El peso estimado de la subunidad alfa, y mencionado, varía según los autores de 85,000 a 125,000,^{13,25} y para la subunidad beta de 45,000 a 60,000, sabiéndose que existe en esta última un componente de carbohidratos.¹⁵

Hay para cada Na, K-ATPasa dos subunidades alfa y dos beta, lo que concuerda con el peso molecular total de 250,000 a 300,000 daltons.¹⁶

Los lípidos de la membrana son esenciales para el funcionamiento de la bomba de sodio, y al separarlos de esta, se inactiva.¹⁷ Depende de la presencia de un fosfolípido específico, aunque actualmente este concepto provoca controversia.

En estudios de microscopía electrónica (con tinción negativa y técnicas de criofractura) se ha observado que la subunidad alfa se encuentra principalmente dentro de la membrana, pero con alguna extensión a ambos lados de la misma. Para la subunidad beta, aunque tiene un segmento dentro de la membrana, su mayor extensión se encuentra fuera.

Características enzimáticas

Para que la Na, K-ATPasa se active se requiere la presencia de Mg^{2+} y esencialmente de ATP, tanto en vivo como en vitro, es un complejo Mg-ATP, y los estudios de cinética, indican que este es el sustrato de la enzima, y que incluso si el ATP libre se une a la enzima, ésta se inhibe. Se describen dos sitios para el ATP, uno de gran afinidad, y otro de baja afinidad, al momento de esta revisión, la importancia de estos dos tipos de sitios no está bien establecida.

El ATP es el nucleótido principalmente uti-

lizado para la actividad enzimática, pero también intervienen en orden decreciente dATP, CTP, GTP, ITP y UTP. El ADP es competidor, pero el Pi (fósforo inorgánico) no lo es.¹⁵

La actividad de fosfatasa es estimulada en la presencia de sodio y concentraciones micromolares de ATP. Siendo el Mg-ATP uno de los principales reguladores de la actividad enzimática.

Los sitios en los cuales el Mg^{2+} actúa pueden ser varios y al menos se suponen dos en la cara interna de la membrana.

La mayoría de los cationes divalentes son inhibidores en la presencia de Mg^{2+} , mientras el Mn^{2+} , Fe^{2+} , Ni^{2+} , Cd^{2+} y Co^{2+} pueden substituir en la reacción al Mg^{2+} .²⁶

Se ha demostrado que hay sitios para el Na en ambas caras de la proteína, además de que el sodio puede ocupar también los sitios del potasio.²⁶

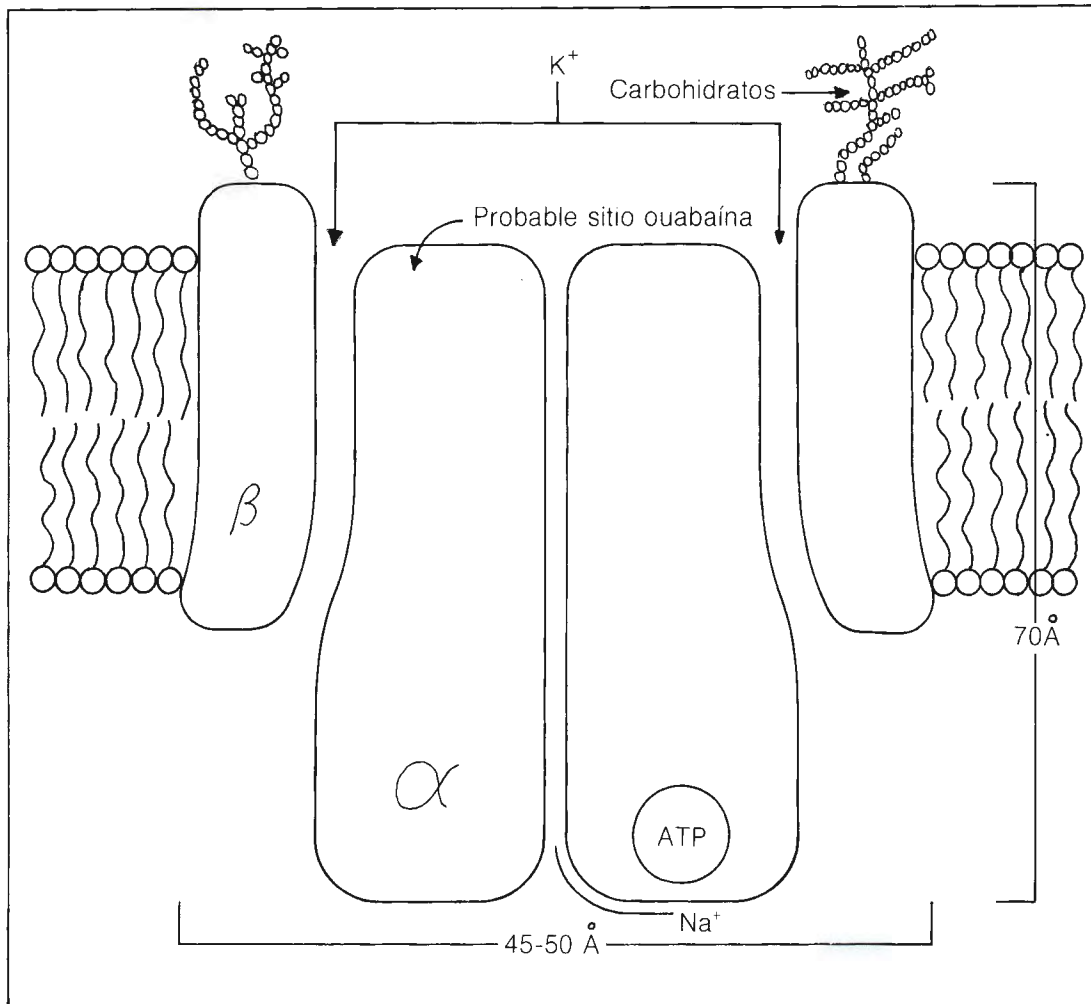
La estimulación de la Na, K-ATPasa puede ser lograda a concentraciones altas de sodio.¹⁹

Los sitios para el sodio no pueden ser substituidos por el potasio, se ha demostrado que son altamente específicos, aunque existe evidencia que el Li puede substituir y activar los sitios intracelulares del sodio en la Na, K-ATPasa, así como también substituir al potasio.

Así mismo hay estudios que corroboran que el potasio extracelular por sí solo puede activar la bomba de sodio, sabiéndose también que existen dos sitios para el potasio, ambos localizados en la cara extracelular de la bomba de sodio. Estos sitios pueden ser ocupados por Tl^+ , Rb^+ , Cs^+ , NH_4^+ , Li^+ en orden decreciente.^{25, 26}

Los dos tipos de sitio para el potasio, se distinguen por su diferente actividad, los denominados sitios alfa de moderada afinidad, y los de alta afinidad, que son los que actúan

Fig. 1. Esquema hipotético de la bomba de sodio.



en la secuencia de reacciones de la ATPasa en su ciclo normal, que son los llamados sitios beta. Los sitios alfa para el potasio son muy parecidos a los sitios del Na en el interior de la célula por sus características, pero su importancia no ha sido determinada al momento.²⁶

Secuencia de la reacción

Varios autores^{18,21,22} han demostrado que la enzima es fosforilada en presencia de Na⁺ y Mg²⁺ y ATP, así como comprobaron que la fosfoenzima existe en dos formas: E¹P que es sensible a la desfosforilación por ADP y E²P sensible a desfosforilación en presencia de K. Se puede considerar que E¹P y E²P sólo difieren en su estado conformacional.

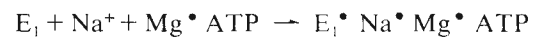
En resumen la secuencia de fosforilación de

la enzima va de acuerdo al siguiente esquema:



Si asumimos que el esquema anterior es correcto faltaría explicar cómo es que se realiza el transporte de cationes a ambos lados de la membrana. (Ver figura 2)

1er. paso. A la enzima libre se añade Mg • ATP y Na⁺.



2o. paso. Viene la liberación de ADP, quedando unido a la enzima un fósforo, un sodio y magnesio.

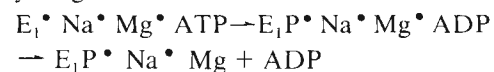
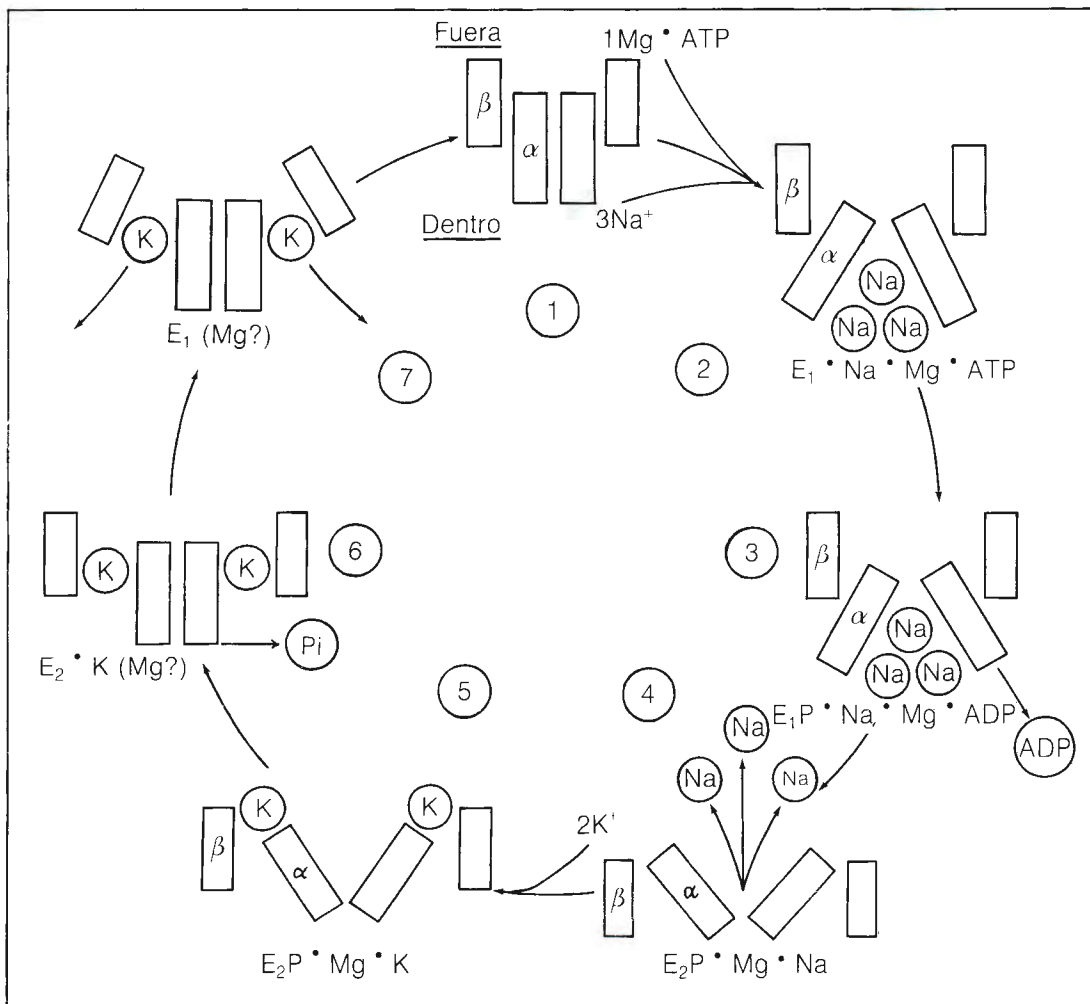
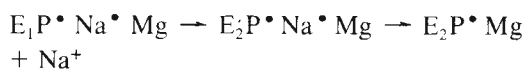


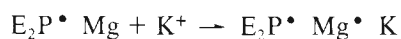
Fig. 2. Mecanismo de acción supuesto para la bomba de sodio (para detalles ver el texto).



3er. paso. Aquí es liberado el sodio al exterior, en forma un tanto desconocida, suponiendo que hay cambios en la estructura terciaria de la proteína, cambiando de la forma 1 a la 2:



4o. paso. Por un mecanismo llamado de Ping Pong, el K⁻ se une al momento o después de ser liberado el Na⁺, esto último al parecer hace que sean disponibles los sitios beta para el potasio.

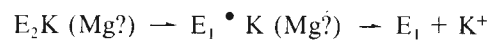


5o. paso. El fósforo se libera antes que el potasio, probablemente también el magnesio,

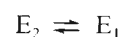
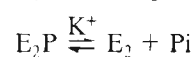
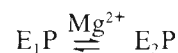
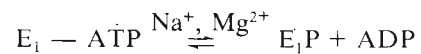
pero no está bien establecido:



6o. paso. En este último paso hay conversión de la enzima a su forma uno, dando la liberación del potasio al interior de la célula.



Resumiendo:



En donde E₁P y E₂P son dos estados de la

enzima fosforilada y E_1 y E_2 son dos estados conformacionales de la enzima libre.

Hay que tomar en cuenta que el balance en condiciones normales es de 3 iones de sodio, por 2 iones de potasio, con gasto de una molécula de ATP.

Se han propuesto así mismo otras formas de funcionamiento de la bomba de sodio, tales como el intercambio sodio/sodio, potasio/potasio, funcionamiento en reversa y transporte de sodio sin intercambio,³¹ pero son variantes sólo encontradas *in vitro* en condiciones extremas, al momento no encontradas en vivo, razón por la cual no se mencionan en esta revisión.

Acción de la ouabaína sobre la Na, K-ATPasa

Existen varios inhibidores de la bomba de sodio, de muy diferentes clases y formas de acción, de todos ellos, al momento sólo los digitálicos tienen importancia clínica, dentro de ellos la ouabaína, específicamente la dihidrouabaína,²⁷ ha sido uno de los más estudiados, por cuatro razones especiales:

a) Es altamente específica a la bomba de sodio, de hecho se supone que la Na, K-ATPasa, funciona como receptor de una sustancia, al momento desconocida, de producción endógena, cuya acción es similar a los digitálicos.²⁷

b) El hecho de que se une a la cara extracelular de la bomba de sodio proporciona un excelente medio marcador.²⁹

c) Además de que interviene en la reacción, en cualquiera de sus pasos frenando la actividad enzimática. El conocimiento de que la dihidrouabaína es menos eficaz en la inhibición que la ouabaína.

d) Por ser prototipo de un grupo de medicamentos de gran utilidad en la clínica cardiovascular.

La ouabaína inhibe en forma reversible a la enzima en la subunidad alfa, y probablemente su antagonismo con el potasio se deba a una obstrucción de los sitios beta para el potasio, ocasionada por la ouabaína. Obstrucción que al parecer puede ser eliminada al incrementarse la obstrucción en el medio extracelular.

Aunque hay varias hipótesis acerca del fun-

cionamiento de los digitálicos, no hay una que explique completamente la acción de estos fármacos. Al parecer el inotropismo positivo, es causado por la alteración que causa indirectamente sobre el transporte del calcio y las proteínas de la membrana celular,^{28,31} siendo motivo suficiente para otra revisión.

Otros inhibidores como la oligomicina y el vanadato, tienen importancia en la experimentación en el laboratorio al momento, pero no así en la clínica.



Bibliografía

1. Schmidt, U., y Dubach, U.C.: Activity of Na, K-ATPase in the rat nephron. *Pflügers Arch Ges Physiol* 306:219, 1969.
2. Schmidt, U., y Dubach, U.C.: Induction of Na K-ATPase in the proximal and distal convolution of the rat nephron. *Europ. J. Clin. Invest.* 1:307, 1971.
3. Jorgensen, P.L., y Skou, J.C.: Preparation of the highly active Na, K-ATPase from the outer medulla of rabbit kidney. *Biochem Biophys Res Commun* 37:39, 1969.
4. Jorgensen, P.L.: The role of aldosterone in the regulation of the Na, K-ATPase in the rat kidney. *J. Steroid Biochem* 3:181, 1972.
5. Schmidt, U., y Dubach, U.C.: Induction of Na, K-ATPase in the proximal and distal convolution of the rat nephron after uninefrectomy. *Pflügers Arch. Ges. Physiol.* 346:39, 1974.
6. Hendler, E.D.; Torretti, J., y Epstein, F.H.: The distribution of Na, K-ATPase in renal tissue. *Am. J. Physiol.* 222:754, 1972.
7. Hendler, E.D.; Torretti, J.L.; Kupor, L., y Epstein, F.H.: Effect of adrenalectomy and hormonal replacement on Na, K-ATPase. *J. Clin. Invest.* 50:1329, 1971.
8. Hokin, L.E.; Dahl, J.L.; Deupree, J.D.; Dixon, J.F.; Hackney, J.F., y Parkue, F.: Studies on the characterization of Na, K-ATPase of sarcoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* 248:2593, 1973.
9. Mc Lennan, D.H.; Secman, P.; Iles, G.H., y Yip, C.C.: Membrane formation by the ATPase sarcoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* 246: 2702, 1971.
10. Tillack, T.W.; Boland, R., y Martonosi, A.: Ultrastructure of developing sarcoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* 249:624, 1974.
11. Mc Connell, D.C.; Tzagoloff, A.; Mc Lennan, D.H., y Green, D.E.: Formation of membranes by purified cytochrome oxidase. *J. Biol. Chem.* 241:2373, 1966.
12. Kagaway, I.: Reconstruction of oxidative phosphorylation. *Biochim. Biophys. Acta* 265:297, 1972.
13. Kyte, J.: Purification of Na, K-ATPase from canine renal medulla. *J. Biochem.* 246:4157, 1971.
14. Vesugi, S.; Dulak, N.C.; Dixon, J.F.; Hexum, T.D.; Dahl, J.L.; Perdue, J.F., y Hokin, L.F.: Studies on the characterization of Na, K-ATPase. *J. Biol. Chem.* 246:531, 1971.
15. Hokin, L.E., y Hexum, T.D.: Studies on the characterization of the Na, K-ATPase on the role of phospholipids in the enzyme. *Archs. Biochem. Biophys.* 151: 453, 1972.
16. Kepner, G.R. y Macey, R.I.: Membrane enzyme systems, molecular size determinations by radiation inactivation *Biochim Biophys Acta* 163:188, 1968.
17. Whittam, R., y Heeler, K.P.: Transport across cell

- membranes. *Ann. Rev. Physiol.* 132:21, 1970.
18. Post, R.L.; Kumes, y Rogers, T.N.: Alternating paths of phosphorylation of the Na and K pump of plasma membranes in *Mechanisms in Bioenergetics* (ed GF Azzone) pp. 203, N.Y., Academic Press.
 19. Glynn, I.M.: Membrane ATPase and cation transport. *Br. Med. Bull.* 24:165, 1968.
 20. Albers, R.W., y Koval, G.J.: Aspects of active transport. *Ann. Rev. Biochem.* 36:727, 1967.
 21. Albers, R.W., y Koval, G.J.: Na, K-ATPase of electrophorus electric organ VIII. *J. Biol. Chem.* 248: 777, 1973.
 22. Fahn, S.; Koval, G.J., y Albers, R.W.: A Phosphorylated intermediate in ATP dependent Na and K transport across Kidney membrans. *J. Biol. Chem.* 240:1437, 1965.
 23. Post, R.L.; Sen, A.K., y Rosenthal, A.S.: Na, K-ATPase of electrophorus electric organ I. *J. Biol. Chem.* 241:1882, 1966.
 24. Jorgensen, P.L.: Isolation and characterization of the components of the sodium pump Q. *Rev. Biophys.* 7(2):239, 1975.
 25. Robinson, J.D., y Fishner, M.S.: The (Na⁺ + K⁺) activated ATPase enzymatic and transport properties *Biochim. Biophys Acta* 549:145, 1979.
 26. Fishmann, M.C.: Endogenous digitalis like activity in mammalian brain. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 76(9):4661, Sep. 1979.
 27. Godfraind, T., y Ghysel-Burton, J.: Independence of the positive Inotropic effect of ouabain from the heart Na, K pump *Proc. Natl. Acad. Sci.* 77(5):1067, May. 1980.
 28. Lelievre, L.; Zachowski, A.; Charlemagne, D.; Laget, P., y Paraf, A.: Inhibition of the Na, K-ATPase ouabain, Involvement of calcium and membrane proteins. *Biochim Biophys Acta* 557:399, 1979.
 29. Kudoh, F.; Nakamura, S.; Yamaguchi, M., y Tonomura, Y.: Binding of ouabain to Na, K dependent ATPase during the ATPase reaction. *J. Biochem.* 86(4):1023, 1979.
 30. Haase, W., y Koepsell, H.: Substructure of membrane bound Na, K-ATPase protein. *Pflügers. Arch.* 381:127, 1979.
 31. Wallick, E.T.; Lane, L.K.; Schwartz, A.: Biochemical mecanism of the sodium pump. *Ann. Rev. Physiol.* 41:397, 1979.

